

AUS DEM INSTITUT FÜR MEERESKUNDE

**NACHWEIS UND CHARAKTERISIERUNG VON
ACTINOBAKTERIEN UND EINIGEN PLANCTOMYCETALES
AUS MARINEN SCHWÄMMEN**

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

VORGELEGT VON

**DIPLOM-BIOLOGIN
VANESSA GRABOWSKI**

KIEL 2002

Referent:
Korreferent:

Tag der Disputation: Kiel, den
Zum Druck genehmigt: Kiel, den

.....
(Der Dekan)

*Meiner Mutter
und
Geli & Axel*

“With these exciting developments there can be few adherents to the pessimistic belief that actinomycetes have little more to offer us!”

Robert D. Nolan & Thomas Cross, 1988

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden als Tagungsbeiträge mit Genehmigung der Zentaris AG vorab veröffentlicht:

Stöhr, R., Grabowski, V. und J. F. Imhoff, Diversity of bacteria associated with the sponges *Halichondria panicea* and *Haliclona loosanoffii*. (Poster) VAAM-Tagung München 12. - 16.03.2000

Grabowski, V. und J. F. Imhoff, Actinobacteria from marine sponges. (Poster) VAAM-Tagung Oldenburg 25. - 28.03.2001

Stöhr, R., Grabowski, V. und J. F. Imhoff, Diversität schwamm-assoziiertes Bakterien und ihr Potential zur Bildung biologisch aktiver Naturstoffe. (Poster) Statusseminar BMBF – Förderschwerpunkt „Marine Naturstoffe“ Frankfurt 09. - 10.05.2001

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung

Abstract

Einleitung 1

1	Biologie der untersuchten Organismengruppen	3
1.1	Biologie der Schwämme	3
	<i>Biologie von Halichondria panicea (Pallas 1766)</i>	6
1.2	Symbiose von Schwamm und Mikroorganismen	7
	<i>Naturstoffe aus Schwämmen und assoziierten Mikroorganismen</i>	12
1.3	Biologie der Actinobakterien	15
	<i>Naturstoffe aus Actinobakterien</i>	18

Experimenteller Teil 21

2	Standorte und Probenahmen	21
2.1	Probenahmen	21
2.1.1	Probenahmen in der Ostsee	21
2.1.2	Probenahmen in der Nordsee	22
2.1.3	Probenahmen im Mittelmeer	24
2.2	Probenbearbeitung	25
2.2.1	Bearbeitung der Ostseeproben	26
2.2.2	Bearbeitung der Nordseeproben	27
2.2.3	Bearbeitung der Mittelmeerproben	28
3	Material und Methoden	30
3.1	Molekularbiologische Methoden	30
3.1.1	DNA-Extraktion	31
3.1.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
3.1.3	Agarose-Gelelektrophorese	36
3.1.4	Reinigung von PCR-Produkten	37
3.1.5	Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)	37
3.1.6	Klonierung	40
3.1.7	Sequenzierung	42
3.1.8	Sequenzanalyse und phylogenetische Berechnungen	44

3.2	Mikrobiologische und physiologische Methoden	45
3.2.1	Isolierung von Bakterien	45
3.2.2	Nachweis von Antibiotikaproduktion	46
3.2.3	Fettsäureanalyse	48
3.2.4	Untersuchung der Salztoleranz	50
3.2.5	Substratverwertung	50
3.3	Mikroskopische Methoden	52
3.3.1	Lichtmikroskopie	52
3.3.2	Rasterelektronenmikroskopie	52
3.3.3	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung	53
	<i>Ergebnisse</i>	57
4	Diversität der Actinobakterien	59
4.1	Kultivierbare Diversität der Actinobakterien	59
4.1.1	Identifikation der Isolate durch Fettsäureanalyse (FAME)	59
	<i>Verteilung der Actinobakterien auf Standorte</i>	62
	<i>Verteilung der Actinobakterien auf Isolationsmedien</i>	64
	<i>Fettsäurezusammensetzung bei unterschiedlichen Familien und Unterordnungen der Actinobakterien</i>	66
4.1.2	Identifikation der Isolate durch Sequenzierung	70
4.1.3	Identifikation der Isolate aufgrund von Stoffwechseleigenschaften (BIOLOG)	74
4.1.4	Vergleich der verwendeten Identifikations-Methoden	75
4.2	Genetische Diversität der Actinobakterien	77
4.2.1	Diversität der Klone	77
4.2.2	Vergleich der Diversität verschiedener Proben aus der Ostsee, Nordsee und dem Mittelmeer mit Hilfe der Denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE)	80
4.2.3	Nachweis von Actinobakterien in <i>Halichondria panicea</i> mit Hilfe der Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH)	88
5	Charakterisierung ausgewählter Isolate	89
5.1	Morphologische Charakterisierung	89
5.2	Anpassung an den Salzgehalt	91
5.3	Antibiotikaproduktion	94
6	Planctomycetales	96
6.1	Klone der Gruppe Planctomycetales aus dem Mittelmeerschwamm <i>Haliclona valliculata</i>	96
6.2	Isolation von Planctomycetales	98

Diskussion	101
7 Diskussion der Methoden	101
7.1 Kultivierung	101
7.2 Zur Diversitätsanalyse eingesetzte Methoden	102
7.2.1 Fettsäureanalyse (FAME)	102
7.2.2 Substratverwertung mit dem BIOLOG-System	103
7.2.3 Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)	104
7.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	104
8 Kultivierungserfolg	105
9 Diversität der Actinobakterien	106
9.1 Diversität von Actinobakterien in der Wassersäule und in Sedimenten mariner Standorte	106
9.2 Diversität von Actinobakterien in den untersuchten Schwämmen	108
9.2.1 Kultivierte Diversität	108
Phylogenetische Einordnung von Isolaten auf Basis ihrer Fettsäurezusammensetzung	108
Phylogenetische Einordnung von Isolat-Sequenzen	109
9.2.2 Genetische Diversität	109
Phylogenetische Einordnung von Klon-Sequenzen	109
Vergleich der Diversität verschiedener Proben aus der Nordsee, der Ostsee und dem Mittelmeer	110
9.3 Diversität von Actinobakterien in <i>Halichondria panicea</i>	112
9.3.1 Nachweis von Actinobakterien im Mesohyl von <i>Halichondria panicea</i>	112
9.3.2 Kultivierte Diversität in <i>Halichondria panicea</i>	113
9.3.3 Genetische Diversität in <i>Halichondria panicea</i>	114
9.4 Beurteilung der verwendeten Methoden	114
10 Charakterisierung der Isolate	115
10.1 Morphologische Charakterisierung	115
10.2 Anpassung an den marinen Lebensraum	115
10.3 Naturstoffproduktion	117
11 Besondere Bakteriengruppen	119
11.1 Schwamm „Symbionten“	119
11.2 Planctomycetales	121
12 Schlußbetrachtung	122

<i>Literaturverzeichnis</i>	125
<i>Danksagung</i>	139
<i>Eidesstattliche Erklärung</i>	140
<i>Anhang</i>	141
A 1 Abkürzungsverzeichnis	141
A 2 Rezepte der Medien und Reagenzien	143
A 2.1 Rezepte der Medien	143
A 2.2 Rezepte der Reagenzien für die molekularbiologischen und mikroskopischen Methoden	150
A 3 Ergebnisse	152
A 3.1 Ergebnisse der Fettsäureanalyse	152
A 3.1.1 Ergebnisse der Fettsäureanalyse für den Standort Ostsee	156
A 3.1.2 Ergebnisse der Fettsäureanalyse für den Standort Nordsee	156
A 3.1.3 Ergebnisse der Fettsäureanalyse für den Standort Mittelmeer	157
A 3.1.4 Ergebnisse der Fettsäureanalyse für die verschiedenen Mediengruppen	158
A 3.1.5 Ergebnisse der Fettsäureanalyse von Isolaten aus einzelnen Schwamm-species	159
A 3.1.6 Korrektur der Fettsäure-Identifikationen auf Grundlage der 16S rDNA-Sequenzierungen	161
A 3.2 Ergebnisse der Sequenzierung	166
A 3.2.1 Ergebnisse der Sequenzierung von Isolaten	166
A 3.2.2 Ergebnisse der Sequenzierung von Klonen	169
A 3.2.3 Liste der Referenzsequenzen	178
A 3.3 Identifikation der Isolate durch das BIOLOG-System	180
A 3.4 Einsatz verschiedener Methoden zur Identifikation und Diversitätsanalyse	181
A 3.5 Ergebnisse der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE)	183
A 3.6 Ergebnisse der Untersuchungen auf Antibiotikaproduktion	184
A 3.7 Ergebnisse der Lichtmikroskopie	187
A 3.8 Ergebnisse der Untersuchung auf Salztoleranz	189

Kurzfassung

Marine Schwämme gelten als reiche Quelle für biologisch aktive Substanzen. Da es sich bei den Produzenten der Metabolite häufig um assoziierte oder symbiontische Bakterien handelt, gebührt den schwamm-assoziierten Actinobakterien besondere Aufmerksamkeit. Diese Bakteriengruppe ist bekannt für ihre Antibiotikaproduktion und könnte eine bedeutende Ressource für neue Naturstoffe darstellen.

Actinobakterien aus Schwämmen der Ostsee, der Nordsee und des Mittelmeeres wurden isoliert und charakterisiert. Es wurden hauptsächlich Isolate aus *Halichondria panicea* untersucht, der in der Ostsee in den Jahren 1999 bis 2000 mehrfach und in der Nordsee im Jahr 1999 einmalig beprobt wurde. Die Isolate wurden taxonomisch eingeordnet, um einen Überblick der kultivierten Diversität schwamm-assoziiierter Actinobakterien zu erhalten.

Zur Identifikation der Stämme wurden verschiedene Methoden eingesetzt. Es zeigte sich, daß die Sequenzierung der 16S rDNA die sicherste Methode zur Identifizierung von Umweltisolaten ist, die Fettsäureanalyse jedoch eine gute und schnelle Alternative zur Einordnung in Familien und Unterordnungen darstellt.

Da die kultivierte Diversität immer nur einen Ausschnitt der bakteriellen Diversität einer Probe widerspiegelt, wurde mit Hilfe von Klonierungsexperimenten und der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) die genetische Diversität der Actinobakterien in ausgewählten Schwammspecies untersucht und den Ergebnissen der Kultivierung gegenübergestellt.

Die kultivierte und die genetische Diversität zeigten wenig Übereinstimmung. Während die isolierten Actinobakterien hauptsächlich als Angehörige der Unterordnungen Micrococcineae (74 % der Isolate) und Corynebacterineae (22 % der Isolate) identifiziert werden konnten, bildeten die Sequenzen der Klone separate Cluster, die keiner Unterordnung zugeordnet werden konnten. Nur vereinzelt kam es unter den Klonsequenzen zur Clusterbildung mit Isolat- oder Referenzsequenzen. Im Gegensatz zu den Isolaten zeigten sich in der Verteilung der Klone schwamm-spezifische Muster insbesondere bei den beiden untersuchten Mittelmeerschwämmen *Haliclona valliculata* und *Ircinia spinosula*. Die Ergebnisse der DGGE erbrachten Hinweise auf standortspezifisches Vorkommen bestimmter schwamm-assoziiierter Actinobakterien, das Auftreten von artspezifischen Formen konnte mit dieser Methode jedoch nicht bestätigt werden.

Insgesamt ist ein mit anderen Untersuchungen vergleichbarer Anteil von 13 % aller identifizierten Isolate den Actinobakterien zugeordnet worden; der Lebensraum Schwamm präsentiert sich in der Verteilung der Actinobakterien und dem hohen Anteil an Micrococcineae dennoch als herausragend.

Mit 18 % Actinobakterien scheint *Halichondria panicea* einen besonders hohen Anteil an Bakterien dieser Gruppe zu beherbergen.

Die Klonierung der 16S rDNA von Planctomycetales aus Schwämmen ist in dieser Arbeit an *Haliclona valliculata* erstmals gelungen.

Die Anpassung der Actinobakterien an den marinen Lebensraum wurde auf Basis ihres Salzverhaltens ermittelt. Es zeigte sich, daß die isolierten Actinobakterien über breite Toleranzbereiche hinsichtlich des Salzgehaltes ihrer Umgebung verfügen. Der Großteil der Isolate wurde als marine Stämme oder als Brackwasserorganismen eingestuft und ist damit sehr gut an die Bedingungen in den Proben angepaßt.

Für die Isolierung von Actinobakterien war in dieser Arbeit die Verwendung eines Mediums, welches auf einer Auswahl an verschiedenen Kohlenstoffquellen basierte, erfolgreicher als parallel eingesetzte Selektivmedien, die nur ein Substrat enthielten.

Eine Auswahl an isolierten Actinobakterien wurde hinsichtlich ihrer Antibiotikaproduktion untersucht, um erste Hinweise auf die Möglichkeit von Symbiosen unter Actinobakterien und marinen Schwämmen auf Basis der Naturstoffproduktion zu erhalten. In der vorliegenden Arbeit verursachten 26 % der Isolate Wachstumshemmung bei *Staphylococcus lentus*, es ist aber zu erwarten, daß unter empfindlicheren Testbedingungen der prozentuale Anteil an antibiotikaproduzierenden Isolaten noch ansteigt. Actinobakterien können somit durchaus als Partner möglicher funktioneller Gemeinschaften mit den Schwämmen in Betracht gezogen werden und stellen darüber hinaus eine hoffnungsvolle Quelle neuer Naturstoffe dar.

Abstract

Marine sponges are often supposed to be a rich source of biological compounds. Associated or symbiotic bacteria are the producers of these metabolites, so that a special attention should be paid to sponge-associated actinobacteria. This bacterial group is known for its production of antibiotics and could be an important source of new natural substances.

Actinobacteria from sponges of the North Sea, the Baltic Sea and the Mediterranean Sea were isolated and characterized. Mainly isolates of *Halichondria panicea* were examined; this species was taken several times from the Baltic Sea in the years 1999 to 2000 and once from the North Sea in 1999. Taxonomic classification of the isolates was realized to obtain a picture of the cultured diversity of sponge associated actinobacteria.

Different techniques were employed to identify isolated strains. Among the methods applied, sequencing of 16S rDNA genes showed the best results. Classification by fatty acid analysis is considered to be a good alternative for rapid identification of isolates from environmental samples on the family and suborder level.

Since the cultured diversity represents only part of the bacterial diversity of a sample, the genetic diversity was examined by cloning and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of selected sponge samples.

A comparison of the cultured and the genetic diversity showed little correspondence. While the isolated actinobacteria mainly belong to the suborders Micrococccineae (74 % of the isolated actinobacteria) and Corynebacterineae (22 % of the isolated actinobacteria) clone sequences formed distinct clusters within the Actinobacteria, all of which could not be related to a certain suborder.

Only a small number of clone sequences clustered with sequences of isolates or reference strains. In contrast to the distribution of the isolates bacterial clone sequences from *Haliclona valliculata* and *Ircinia spinosula* from the Mediterranean Sea showed sponge-specific patterns. Results of DGGE gave reference to location-specific associated actinobacteria in sponges whereas the presence of species-specific forms could not be proved by this method.

Approximately 13 % of all isolates could be identified as actinobacteria which is similar to other investigations. Due to the distribution of isolated actinobacteria and the high amount of Micrococccineae, sponges represent a unique habitat. With 18 % identified actinobacteria among its isolates *Halichondria panicea* seems to contain particularly high numbers of actinobacteria.

This is the first report on cloning of 16S rDNA fragments of planctomycetales from sponge material from a sample of *Haliclona valliculata*.

Adaptation of isolated actinobacteria to the marine environment was determined on the basis of salt responses. Results indicate a wide range of salt tolerance among the isolates, most of which could be classified as marine or brackish organisms and therefore are well adapted to the conditions of the samples.

Isolation on media containing a variety of carbon sources was more successful than on selective media of only one substrate.

A selection of bacterial isolates was tested in regard to the production of antibiotics to obtain first reference to possible symbiosis of actinobacteria and sponges on the basis of natural compound production. In this work 26 % of the isolates caused inhibition of growth of *Staphylococcus lentus* and most probably this number will increase with the use of more sensitive test methods. Actinobacteria therefore may be partners of sponges, moreover this bacterial group represents a promising source of new biological compounds.

Einleitung

Bei der Suche nach neuen Wirkstoffen konzentriert sich die Forschung mehr und mehr auf marine Organismen, da sie einen anderen evolutionären Weg hinter sich haben als landbewohnende Lebewesen. Eigene Überlebensstrategien und Stoffwechselprozesse haben sich als Anpassung an das wäßrige, oft lichtarme und unter hohem Druck stehende Milieu entwickelt. Da die Kommunikation im Wasser nicht über flüchtige chemische Botenstoffe erfolgen kann wie an Land, müssen marine Organismen durch direkten Kontakt oder wasserlösliche Substanzen miteinander in Verbindung treten. Besonders die sesshaften Meerestiere, die unfähig zu Fluchtreaktionen sind, stellen aufgrund ihrer Giftproduktion gegen Fraßfeinde oder Überwucherung vielversprechende Wirkstoffkandidaten dar (Bewley *et al.* 1996; Bulte-Poncé *et al.* 1998; Ivanova *et al.* 1998; Zheng *et al.* 2001). Zu dieser Tiergruppe zählen vor allem Moostierchen (Bryozoa), Manteltiere (Tunicata) und Schwämme (Porifera) (Redaktion Geo Wissen 1999; Uriz *et al.* 2001). Marine Schwämme gelten als außerordentlich reiche Quelle für biologisch aktive Substanzen, konkurrenzlos in der Zahl und Vielfalt der nachgewiesenen Substanzen (Debitus *et al.* 1998; Müller *et al.* 1999; Müller und Schröder 1997; Uriz *et al.* 2001). Jedoch sind die Tiere häufig nur in geringen Zahlen verfügbar und liefern Metabolite in Kleinstmengen (Webster *et al.* 2001).

Oberflächen von marinen Pflanzen und Tieren stellen wichtige Lebensräume für Mikroorganismen dar (Fenical 1996; Genilloud *et al.* 1994). Da heute bekannt ist, daß es sich bei den Produzenten der interessanten Metabolite vielfach um assoziierte oder symbiontische Mikroorganismen mariner Tiere handelt (Bulte-Poncé *et al.* 1998; Debitus *et al.* 1998; Imamura *et al.* 1993; Moore 1999; Osinga *et al.* 1999; Stierle *et al.* 1988; Unson *et al.* 1994; Webster *et al.* 2001), gilt das besondere Interesse der Forschung der Gruppe der marinen Bakterien. Der Vorteil von mikrobiellen Naturstoffproduzenten ist ihre im Vergleich zu den Schwämmen einfache Kultivierung und die Möglichkeit, über genetische Veränderung die verantwortlichen Gene für die Metabolitproduktion in andere Bakterien zu übertragen (Moore 1999; Osinga *et al.* 1999; Webster *et al.* 2001; Webster und Hill 2001). Besondere Aufmerksamkeit gebührt der Gruppe der Actinobakterien (Bernan 1996; Goodfellow und Haynes 1984; Hotta *et al.* 1980a; Okami 1979; Okazaki und Okami 1976; Zheng *et al.* 2001), die eine natürliche Quelle für Antibiotika darstellt und für die Produktion von 70% der bekannten natürlich vorkommenden Antibiotika verantwortlich ist (Redaktion Ärzte Zeitung 2001). Mit marinen Pflanzen oder Tieren assoziierte oder frei im Meer und in Meeressedimenten lebende Actinobakterien könnten daher eine bedeutende Ressource für Naturstoffe darstellen (Okazaki und Okami 1976; Zheng *et al.* 2001). Vertreter dieser Bakteriengruppe wurden in der Vergangenheit vor allem aus marinen Sedimenten (Colquhoun *et al.* 1998; Ellaiah *et al.* 1996; Jensen *et al.* 1991; Korn-Wendisch und Kutzner 1991), Makroalgen, Seegräsern (Cross 1981; Genilloud *et al.* 1994; Goodfellow und Haynes 1984) und Meerestieren isoliert (Zheng *et al.* 2001). Es konnten jedoch nur 5% der Stämme kultiviert oder identifiziert werden (Bernan 1996).

Da marine Schwämme fast keine Fraßspuren aufweisen oder natürliche Feinde zu haben scheinen und somit die Produktion von abschreckenden Sekundärmetaboliten wahrscheinlich ist, wurde diese Tiergruppe im Projekt „Naturstoffe aus marinen Schwämmen und schwamm-assoziierten Bakterien“ untersucht. Ziel des Projektes ist die Untersuchung von Schwämmen hinsichtlich naturstoffproduzierender Bakterien und die Analyse eventuell synthetisierter Metabolite auf deren Eignung für die pharmazeutische Forschung.

Ziel der vorliegenden Arbeit im Rahmen des Projektes ist der Nachweis und die Charakterisierung von Actinobakterien aus marinen Schwämmen. Insbesondere soll ihre Fähigkeit zur Anpassung an den marinen Lebensraum und ihre Abundanz in verschiedenen Schwamm-species und in Schwämmen unterschiedlicher Standorte untersucht werden. Neben der Kultivierung werden chemische und molekularbiologische Methoden zur Identifizierung der Bakterien eingesetzt und ihre Anpassungsfähigkeit mit physiologischen Methoden untersucht. Ferner soll mit verschiedenen mikroskopischen Methoden der Nachweis von Actinobakterien im Schwamm erbracht werden und ausgewählte Isolate sollen charakterisiert werden. Eine Übersicht der angewendeten Methoden gibt Abbildung 1.

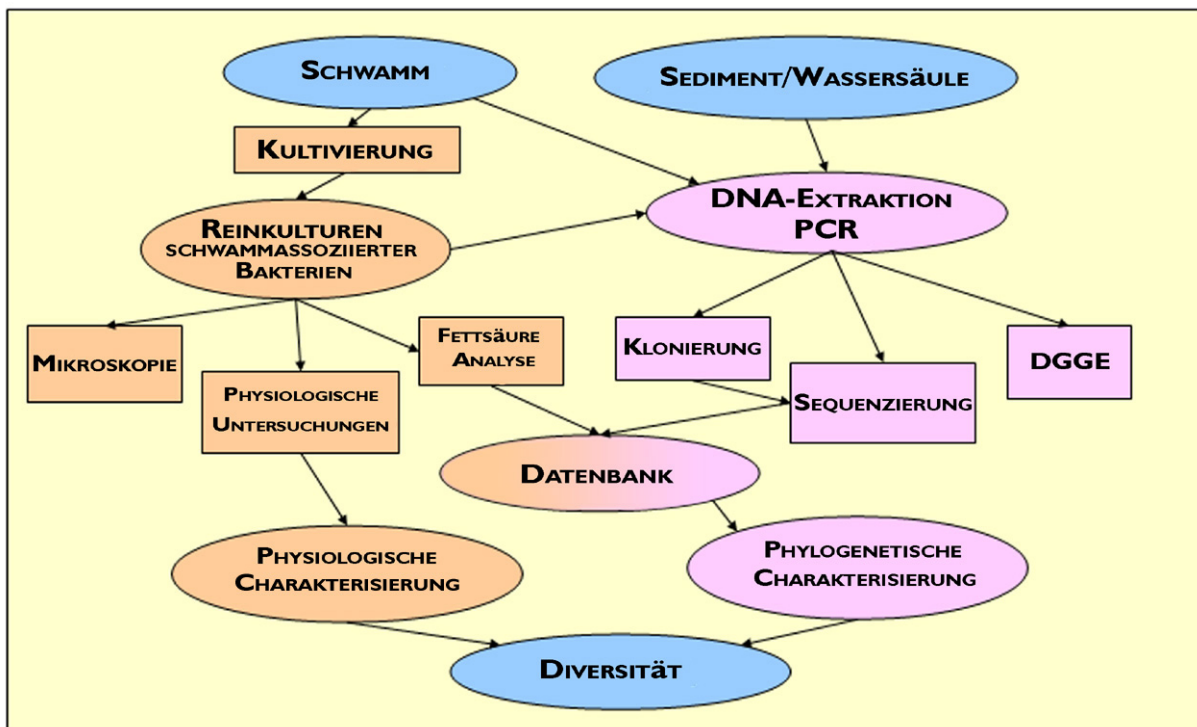


Abbildung 1. Strategie zur Analyse der Diversität schwammassoziiertter Actinobakterien. Ausgehend vom Probenmaterial werden parallel Ansätze klassischer mikrobiologischer Methoden wie Kultivierung, Mikroskopie und physiologische Untersuchungen und moderner molekularbiologischer Methoden wie Sequenzierung, Klonierung und denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE) verfolgt. Das gemeinsame Ziel beider Ansätze ist die Ermittlung der Diversität von Actinobakterien in den unterschiedlichen Proben über die physiologische Charakterisierung von Kulturen und die phylogenetische Charakterisierung genetischer Information.

1. Biologie der untersuchten Organismengruppen

1.1 Biologie der Schwämme

Schwämme bilden die am niedrigsten organisierte Gruppe der vielzelligen Tiere. Sie sind gekennzeichnet durch einen einfachen Aufbau und das Fehlen echter Organe und weisen ein charakteristisches, kompliziertes System innerer Kanäle und Hohlräume auf (Koie und Kristiansen 2001).

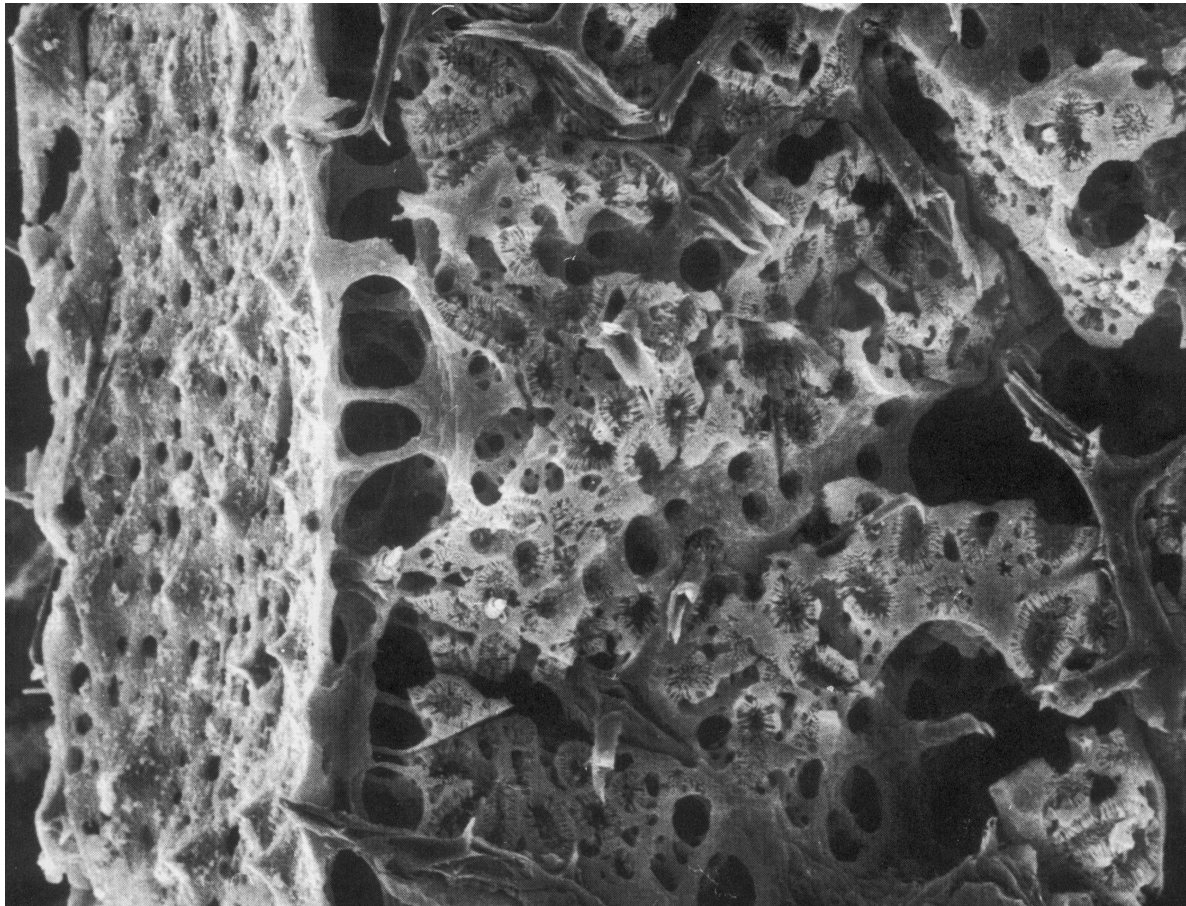


Abbildung 2. Querschnitt durch *Spongionella puchella*. Es können auf der Schwammoberfläche am linken Bildrand deutlich Poren, die Ostia, erkannt werden. Durch sie tritt Wasser in das Tier ein und wird durch einführende Kanäle zu den Geißelkammern in der Bildmitte geführt. Bei den dunklen röhrenartigen Gebilden, die das Mesohyl durchziehen, handelt es sich um Sponginfasern. (REM, x 110) (aus De Vos *et al.* 1991)

Der Schwammkörper besteht im einfachsten Fall aus einem Schlauch oder Sack, der durch zahlreiche winzige Poren mit der Außenwelt in Verbindung steht. An einem Ende des Magensackes befindet sich eine größere Ausfuhröffnung, das Osculum. Das Innere des Magenraumes, das Choanosom, ist mit einer einfachen Schicht von Geißelzellen, den Choanocyten, ausgekleidet (Luther und Fiedler 1961; Simpson 1984), deren Flimmerschlag Wasser durch die Wandporen ansaugt und durch den zentralen ausführenden Kanal, das Osculum, wieder abfließen läßt (Luther und Fiedler 1961). Der Wasserstrom versorgt die Tiere mit Nahrung und Sauerstoff und dient zur Entsorgung von Stoffwechselendprodukten (Osinga *et al.* 1999). Die mit dem Wasser zusammen unselektiv

eingesaugten festen Teilchen in der Größenordnung von 0,1 bis 50 μm , hauptsächlich Phytoplankton, heterotrophe Bakterien, heterotrophe Eukaryonten und Detritus, bilden die Nahrung der Schwämme (Osinga *et al.* 1999; Wilkinson 1978a). Die Filtrierleistung kann bei einem kleineren etwa 1 Kilogramm schweren Exemplar täglich bis zu 24.000 Liter betragen (Müller und Schröder 1997). Die Außenschicht des Schwammkörpers besteht aus unbegeißelten Zellen, den Pinacocyten, die den Schwamm auf dem Substrat verankern (Simpson 1984). Darunter kann eine Schicht aus Zellen, Skelettnadeln (Spiculen) und Sponginfasern liegen, die sich in ihrer hohen Packungsdichte vom anschließenden Mesohyl unterscheidet und als Ectosom bezeichnet wird (Simpson 1984). Die eigentliche Zwischenschicht, das Mesohyl, zeichnet sich durch frei bewegliche Zellen aus, die Archaeocyten, die Skelettelemente ausscheiden. Dabei handelt es sich entweder um Kalknadeln (Kalkschwämme, Calcarea) oder um zierliche drei- oder vierachsige Kieselnadeln, die sich zu einem feinen Gitterwerk vernetzen können (Kieselschwämme, Hexactinellida). Bei den Hornschwämmen (Demospongiae) wird außerdem noch ein mehr oder weniger feinmaschiges Netzwerk aus einer hornartigen Substanz (Spongin) gebildet, in welche die Kieselnadeln eingebettet sind. Der Schwammkörper wird dadurch sehr fest und elastisch (Luther und Fiedler 1961). Aufgrund der starken Variabilität der Gestalt innerhalb der Arten sind Größe und Form der Skelettnadeln häufig das einzige Mittel zur Unterscheidung der Species (Køie und Kristiansen 2001). Ebenfalls im Mesohyl sind besondere kugelförmige Zellen („spherulous cells“) zu finden, deren Funktion noch unbekannt ist (De Vos *et al.* 1991), denen jedoch in der Lokalisation von Naturstoffen eine bedeutende Rolle zufallen könnte.

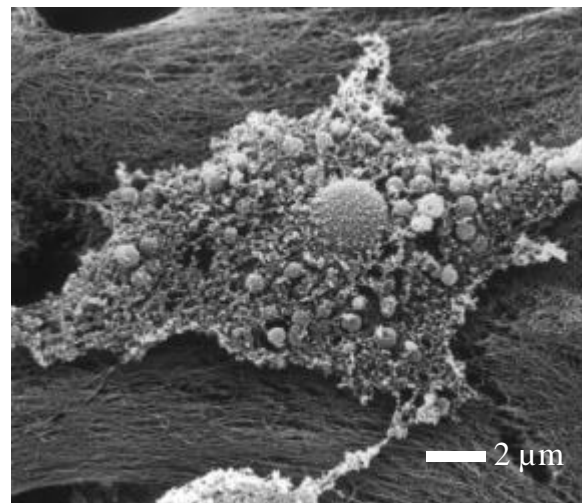
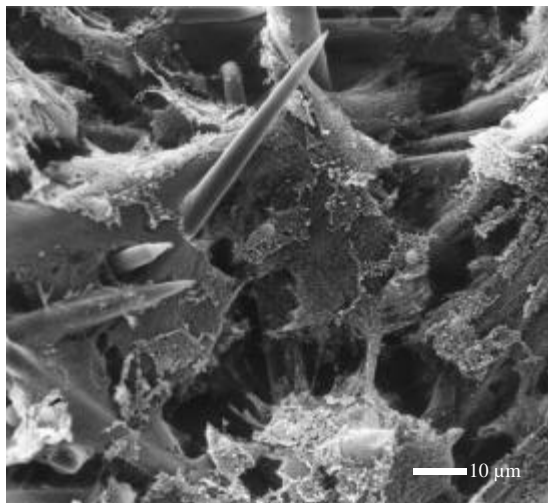


Abbildung 3. Spiculae und Archaeocyten im Mesohyl von *Halichondria panicea*. Links: Mesohylübersicht. (REM, x 1000) Rechts: Archaeocyte. (REM, x 5000).

Obwohl Schwämme keine echten Gewebe besitzen, werden abgrenzbare Zellschichten wie das Choanosom, Ectosom und insbesondere das Mesohyl in der Literatur häufig als „Schwammgewebe“ bezeichnet.

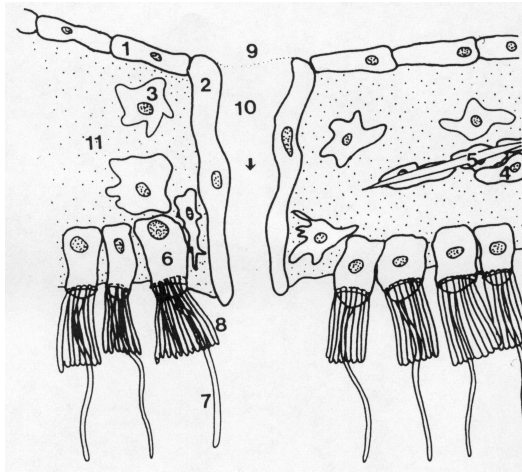


Abbildung 4. Cytologische Organisation eines Schwammes. 1: Exopinacocyte im Ectosom, 2: Porocyte, 3: Archaeocyte im Mesohyl, 4: Sclerocyte, 5: Von der Sclerocyte gebildete Spicule, 6: Choanocyte im Choanosom, 7: Flagellum der Choanocyte, 8: Microvilli der Choanocyte, 9: Osculum, 10: Einführender Kanal, 11: Collagenfibrillen im Mesohyl. (aus Mather und Bennett 1993)

Muskeln, echte Nervenzellen oder Sinnesorgane fehlen den Schwämmen. Den meisten Schwämmen fehlt außerdem die geschlossene Form eines Einzelwesens. Der Schwammkörper breitet sich mit zahlreichen unregelmäßig angeordneten Oscularrohren krustenförmig über die Unterlage aus. Berühren sich zwei Schwämme gleicher Art, verwachsen sie miteinander ohne sichtbare Grenzen; wird der Schwamm zerrissen, wächst jeder Teil für sich weiter. Schwämme zeichnen sich durch eine hohe Regenerationsfähigkeit aus und können aus vereinzelt Zellen innerhalb von Stunden oder Tagen neue Schwammkörper bilden (Luther und Fiedler 1961; Simpson 1984).

Die einfachsten Schwämme sind klein, mit ungegliedertem, schlauchförmigem Magenraum (Ascon-Typ), wie in Abbildung 5 dargestellt. Bei etwas größeren Formen ist der Magenraum in einen nicht bewimperten Mittelteil und ringförmig um diesen angeordnete Seitentaschen gegliedert, in denen sich die Geißelzellschicht ausbreitet (Sycon-Typ). Die großen Horn- und Kieselschwämme haben viele kleine Geißelkammern, die untereinander und mit der Außenwelt durch ein Netzwerk von zu- und abführenden Kanälen in Verbindung stehen (Leucon-Typ).

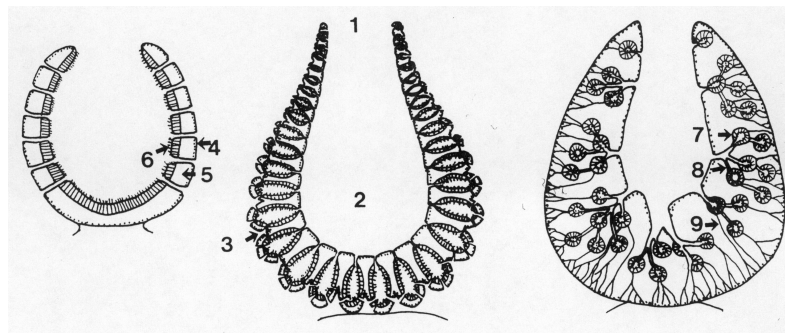


Abbildung 5. Organisationstypen bei Schwämmen. Links: Ascon-Typ, die einfachste Form bestehend aus einem einfachen, tubularen Aufbau ohne Faltungen in der Körperwand. Mitte: Sycon-Typ, durch Faltung der inneren und äußeren Körperwand entstehen Geißelkammern in der Körperwand um ein zentrales Atrium, mit dem sie durch eine Öffnung verbunden sind. Rechts: Leucon-Typ, eine Vielzahl von Geißelkammern liegt in der Körperwand und wird durch ein System von ein- und ausführenden Kanälen verbunden. 1: Osculum, 2: Atrium, 3: Ostia, 4: Ectosom, 5: Mesohyl, 6: Choanosom, 7: Geißelkammer, 8: ausführender Kanal, 9: einführender Kanal. (aus Mather und Bennett 1993)

Die Fortpflanzung erfolgt geschlechtlich über die Bildung von Eiern und Spermien oder ungeschlechtlich durch externe oder interne Knospen, den Gemmulae, die aus Archaeocyten gebildet werden (Luther und Fiedler 1961). Gemmulae können im Inneren des Schwammkörpers ungünstige Lebensbedingungen überleben, selbst wenn das Muttertier schließlich abstirbt (Myers 1998).

Schwämme sind prinzipiell in allen aquatischen Lebensräumen anzutreffen, hauptsächlich kommen sie aber im marinen Bereich vor, wo sie eine hohe Diversität aufweisen (Myers 1998). Ihr Vorkommen erstreckt sich weltweit von den Polarregionen bis zu den tropische Meeren und von der Gezeitenzone bis in abyssale Tiefen (Mather und Bennett 1993).

Biologie von *Halichondria panicea* (Pallas 1766)

Der Brotschwamm *Halichondria panicea* (Porifera: Demospongiae: Halichondriida: Halichondriidae) ist weltweit verbreitet (Witte 1989) und kommt häufig im Mittelmeer, im Atlantik, in der Nordsee und in der westliche Ostsee vor (Althoff *et al.* 1998; Sauer 1991). Hohe Abundanzen zeigt die Art vor allem an Nord- und Ostseeküsten (Witte 1989). Sie bildet ungleichmäßige Klumpen oder Beläge auf und unter Steinen, auf Algen (Koie und Kristiansen 2001), unter Algenvorhängen, in Schattengebieten und Höhlen, ab der Niedrigwasserlinie bis in die untere Gezeitenzone (Sauer 1991). In der Nord- und Ostsee wächst *Halichondria panicea* oft auf Rotalgen, vorzugsweise auf *Phyllophora* sp. (Barthel 1985) und *Phycodrys rubens* (Schönberg 1993), und stellt einen großen Teil der Makrobenthos-Biomasse. Das weite Verbreitungsgebiet deutet auf eine hohe Anpassungsfähigkeit des Schwammes hin, die sich auch im variablen Erscheinungsbild seines Habitus zeigt. Da die Wuchsform stark von Strömungsverhältnissen und dem besiedelten Substrat beeinflusst wird (Witte 1989), wächst die Art in der Gezeitenzone zu unregelmäßigen, rauhen Krusten, die zu Lappen oder kurzen osculatragenden Röhren erhoben sind und von leicht erhobenen Poren durchbrochen werden (Riedl 1983). In tieferem Wasser dagegen wächst *Halichondria panicea* eher in die Höhe und klumpenförmig (Sauer 1991). Die großen Ausstromöffnungen sitzen in tieferem Wasser auf kegelförmigen Erhöhungen (Koie und Kristiansen 2001). Der Habitus ist generell weich und brüchig, aber zäh (Riedl 1983), gelblich oder bräunlich und aufgrund seiner Besiedlung durch Grünalgen oft auch grünlich gefärbt (Koie und Kristiansen 2001). Die Fortpflanzung erfolgt vegetativ über Bildung von Gemmulae oder sexuell über die Bildung von Oocyten und Spermien (Wapstra und van Soest 1987).

Es sind verschiedene bioaktive Substanzen aus Individuen von *Halichondria panicea* und anderen Species der Gattung *Halichondria* isoliert worden (Li *et al.* 1995; Li *et al.* 1996; Nagle *et al.* 1992). Einer der erfolgreichsten Naturstoffe dieser Gruppe ist die gegen Tumorzellen wirkende Okadainsäure aus einem assoziierten Dinoflagellaten von *Halichondria okadai* (Murakami *et al.* 1982), die bereits in der therapeutischen Anwendung Bedeutung erlangte.

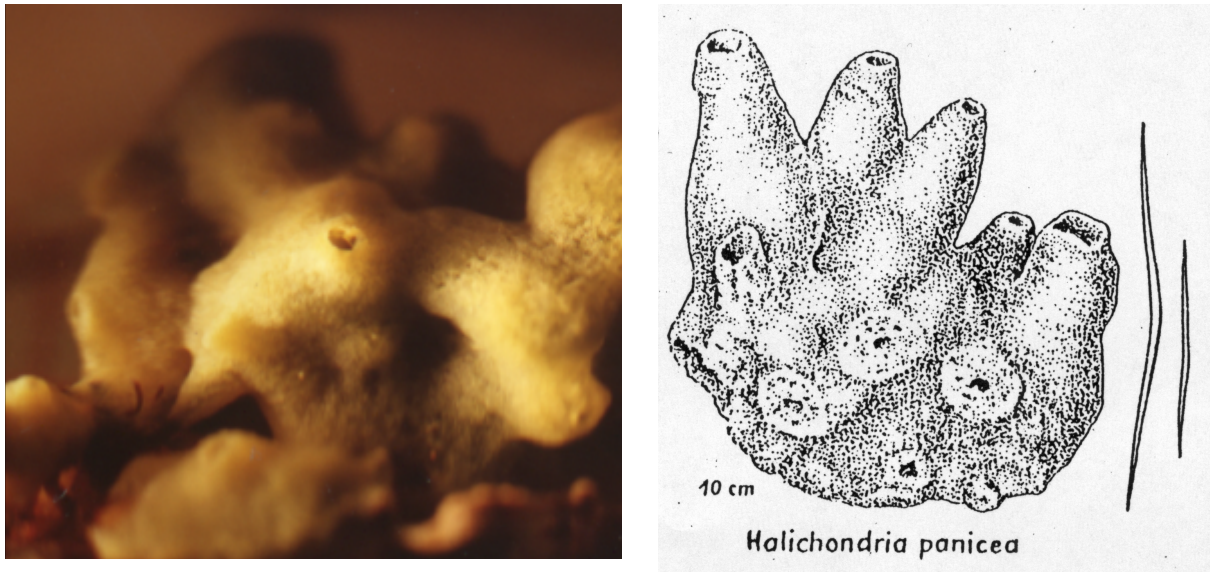


Abbildung 6. Habitusform von *Halichondria panicea*. Links: Auf einer Rotalge wachsendes Individuum aus der Ostsee (Foto: R. Stöhr). Rechts: Schematische Darstellung des Habitus (aus Riedl 1983)

1.2 Symbiose von Schwamm und Mikroorganismen

Schwämme enthalten eine hohe Diversität assoziierter Mikroorganismen, die vorwiegend im Mesohyl der Schwämme lokalisiert sind (De Vos *et al.* 1991; Santavy und Colwell 1990; Vacelet und Donadey 1977). Dort kommen neben Cyanobakterien (Bewley *et al.* 1996; De Vos *et al.* 1991; Müller und Schröder 1997; Sará 1971; Turon *et al.* 2000; Müller und Schröder 1997), Zooxanthellen (Gillor *et al.* 2000; Santavy *et al.* 1990; Santavy und Colwell 1990) und symbiontischen Algen (Barthel 1985) auch große Mengen Mikroorganismen vor, die nicht die Fähigkeit besitzen, Photosynthese zu betreiben (Garson *et al.* 1998). Bakterien (Bewley *et al.* 1996; Bultel-Poncé *et al.* 1998; Bultel-Poncé *et al.* 1999; De Vos *et al.* 1991; Gillor *et al.* 2000; Imamura *et al.* 1993; Muricy *et al.* 1993; Müller und Schröder 1997; Turon *et al.* 2000; Vacelet und Donadey 1977) sind im Mesohyl sowohl extra- als auch intrazellulär zu finden (Althoff *et al.* 1998; Bewley *et al.* 1996; Flowers *et al.* 1998; Garson *et al.* 1998; Santavy und Colwell 1990; Simpson 1984; Vacelet und Donadey 1977; Wilkinson 1978c). Gemeinsam mit anderen Mikroorganismen sind Bakterien auch an der Schwammoberfläche, innerhalb des Kanalsystems und bei einigen Schwämmen in Vakuolen der Zellkerne lokalisiert (Müller und Schröder 1997; Simpson 1984; Vacelet und Donadey 1977).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen deuten auf lokale Verteilungsmuster im Schwamm hin (Althoff *et al.* 1998; Bewley *et al.* 1996; Sará 1971; Simpson 1984; Turon *et al.* 2000; Vacelet und Donadey 1977; Wilkinson 1978b), die durch Wechselwirkung der Mikroorganismen untereinander (Kawano *et al.* 1997; Simpson 1984) oder durch selektive Phagozytose der Archaeocyten entstanden sein könnten (Wilkinson 1978a). In *Ircinia variabilis* konnte das symbiontische Cyanobakterium *Aphanocapsa feldmanni* nur im Mesohyl umgeben von Sponginfasern oder innerhalb der Schwammzellen lokalisiert werden, während die größeren Zellen von *Aphanocapsa raspaigellae* ausschließlich extrazellulär in Höhlen des Mesohyls vorlagen (Sará 1971). Auch andere Bakterien sind im Schwamm lokal begrenzt, an solchen Stellen jedoch meist in hoher Zahl zu finden (Gillor *et al.* 2000).

Eine ausführliche Übersicht des Vorkommens und der Lokalisation von Mikroorganismen in Schwämmen sowie der bisher bekannten Interaktionen zwischen den Mikroorganismen und ihren Wirten gibt Simpson (1984).

CYANOBAKTERIEN kommen in Schwämmen intrazellulär in Vakuolen, sogenannten „Cyanocyten“, extrazellulär im Mesohyl oder in einer Kombination beider Möglichkeiten vor. Die Zellen befinden sich meist in den Oberflächenschichten des Schwammes (Simpson 1984; Wilkinson 1978a), nur bei hoher Dichte des Mesohyls können sie auch mehrere Zentimeter tief im Schwammkörper liegen. An der Oberfläche sind sie an der Bildung eines „Symbiocortex“ beteiligt, schützen den Schwamm vor schädlicher Strahlung und geben ihm seine violett-braune Färbung (Simpson 1984). Aufgrund der photoautotrophen Lebensweise von Cyanobakterien sind ihre Zellzahlen in den Schwämmen lichtabhängig (Regoli *et al.* 2000; Wilkinson 1978a). Lokal können sie hohe Zellzahlen erreichen und im Ectosom mehr Raum einnehmen als Schwammzellen oder Bakterien (Wilkinson 1978c). Die Cyanobakterien können doppelt so groß werden wie Schwammzellen und bis zu 50 % des Mesohyl-Volumens ausmachen (De Vos *et al.* 1991; Unson *et al.* 1994). Der Verdau von extrazellulär vorkommenden Cyanobakterien wurde nur äußerst selten beobachtet (Wilkinson 1978c). Vielmehr scheint der Schwamm von der Photosyntheseleistung der Cyanobakterien zu profitieren, ein Transport von Metaboliten der Cyanobakterien in die Wirtszellen wurde beobachtet (Simpson 1984). Sará (1971) bemerkte im Cytoplasma der *Aphanocapsa feldmanni* enthaltenden Zellen von *Ircinia variabilis* eine hohe Anzahl von Einschlüssen. Die Quelle der Einschlüsse vermutet der Autor im Cyanobakterium. Hohe Dichten von vermutlich festen Einschlüssen im Cytoplasma schwamm-assoziiierter Cyanobakterien werden auch von Unson *et al.* (1994) beschrieben.

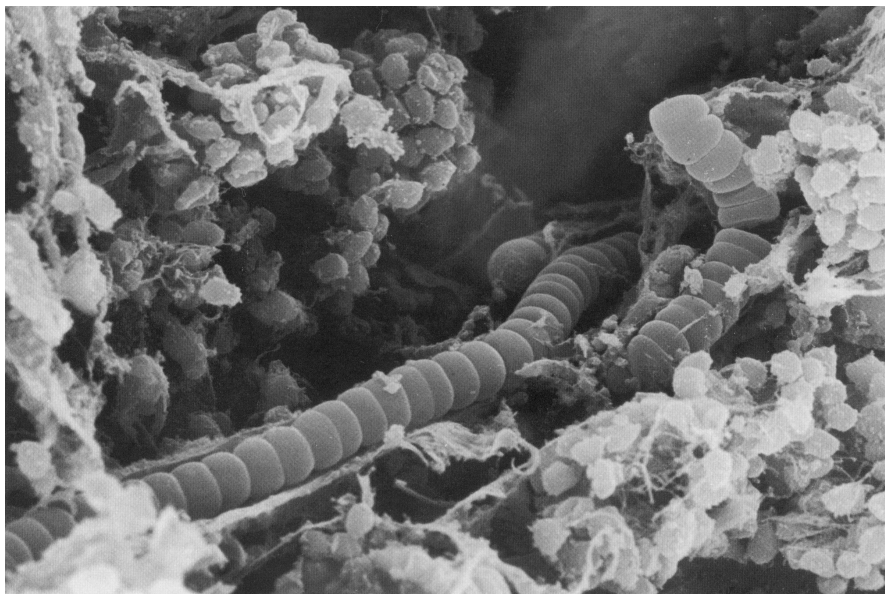


Abbildung 7. Filamente des extrazellulär in *Dysidea tupha* vorkommenden Cyanobakteriums *Oscillatoria spongilae*. (REM, x 1160) (aus De Vos *et al.* 1991)

DINOFLLAGELLATEN leben in Symbiose mit Protozoen (Radiolarien, Heliozoen, Foraminiferen), Coelenteraten (Quallen, Seeanemonen, Korallen), Mollusken oder Schwämmen und werden je nach Färbung, die sie dem Wirtsorganismus verleihen, als Zoochlorellen oder Zooxanthellen bezeichnet. Im Falle der Zooxanthellen wird die Farbe der Chlorophylle a und c durch verschiedene gelbe und braune Xanthophylle und Fucoxanthin überdeckt (von Sengbusch 1999). In Schwämmen kommen

Zooxanthellen und Zoochlorellen extrazellulär in den Oberflächenschichten oder intrazellulär in Cytoplasma-Vakuolen der Archaeo- oder Choanocyten vor (Simpson 1984). Der tropische Schwamm *Haliclona* sp. enthält große Populationen von Dinoflagellaten in Vakuolen der Archaeocyten, die bis zu 10 % des Zellvolumens ausmachen können (Garson *et al.* 1998). Zoochlorellen wurden auch in Gemmulae gefunden (Simpson 1984), was für eine Weitergabe der Symbionten von Generation zu Generation spricht. Von einer Symbiose zwischen Dinoflagellaten und Schwämmen wird ausgegangen, da erwiesen ist, daß Zooxanthellen bis zu 60 Prozent des durch Photosynthese fixierten Kohlenstoffs an die Wirtszellen abführen (von Sengbusch 1999). Freilebende Dinoflagellaten sind für ihre Toxin-Produktion bekannt (von Sengbusch 1999).

BAKTERIEN kommen in Größen von 0,3 bis 2 µm (De Vos *et al.* 1991) extrazellulär und intrazellulär in großen Vakuolen, den „Bakteriocyten“, im Schwamm-Mesohyl vor (Simpson 1984; Vacelet und Donadey 1977). Dabei hängt die Verteilung der Bakterien von der Dichte des Mesohyls ab (Simpson 1984; Vacelet und Donadey 1977; Wilkinson 1978a). In einem weniger dichten Mesohyl kommen wenig Bakterien eines oder zweier Morphotypen vor, wogegen in Schwämmen mit dichtem Mesohyl und massivem Erscheinungsbild hohe Bakterienvorkommen diverser Morphologietypen anzutreffen sind (De Vos *et al.* 1991; Vacelet und Donadey 1977). In *Aplysina* liegen die Bakterien auch in Vakuolen im Zellkern vor (Simpson 1984). Der Anteil der Bakterien variiert in den unterschiedlichen Schwammspecies. In manchen Arten machen Bakterien 40% der lebenden Bestandteile des Mesohyls aus, doppelt soviel wie Schwammzellen (De Vos *et al.* 1991; Turon *et al.* 2000; Vacelet und Donadey 1977), oder sogar bis zu 60 % der Gesamtbiomasse des Wirts (Friedrich *et al.* 1999; Simpson 1984; Wilkinson 1978a; Wilkinson 1978b; Wilkinson 1978c). Bei hohen Abundanzen sind die Bakterien erheblich an der Festigung des Schwammkörpers beteiligt (Wilkinson 1978b). In anderen Species kommen Bakterien dagegen nur in geringen Zahlen vor (Vacelet und Donadey 1977). De Vos *et al.* (1991) vermuten eine wichtige physiologische Rolle der Bakterien im Schwamm, obwohl sie auch als reine Nahrungspartikel aufgenommen werden (Simpson 1984). Gelegentlich wurde eine gezielte Aufnahme von Bakterien durch selektive Phagozytose oder der Verdau von Bakterien beobachtet (Simpson 1984; Vacelet und Donadey 1977). In manchen Schwämmen sind die gleichen Bakterien wie im Umgebungswasser zu finden (Madri *et al.* 1971; Wilkinson 1978b), in anderen scheint es sich um schwamm-spezifische Bakterienpopulationen zu handeln (Webster und Hill 2001; Wilkinson 1978b). Die Übertragung von Bakterien auf folgende Generationen durch Wanderung von bakterientragenden Vakuolen in die Larven wurde bei *Chondrosia reniformis* und *Aplysina* beobachtet (Simpson 1984).

Generell wird das Auftreten von Mikroorganismen in Schwämmen als vorteilhafte Verbindung angesehen, in der die Mikroorganismen dem Wirt Zugriff auf zusätzliche Nährstoffe ermöglichen (Wilkinson 1978a; Wilkinson 1978b; Wilkinson 1978c), zur Stabilität seines Skeletts beitragen (Wilkinson 1978a) oder an seinen Abwehrmechanismen beteiligt sind (Bultel-Poncé *et al.* 1999; Turon *et al.* 2000; Unson *et al.* 1994). Die Assoziation gilt hinsichtlich des Stoffwechsels profitabel für beide Seiten und kann einen signifikanten Einfluß auf den Sekundärstoffwechsel des Wirtes haben (Garson *et al.* 1998).

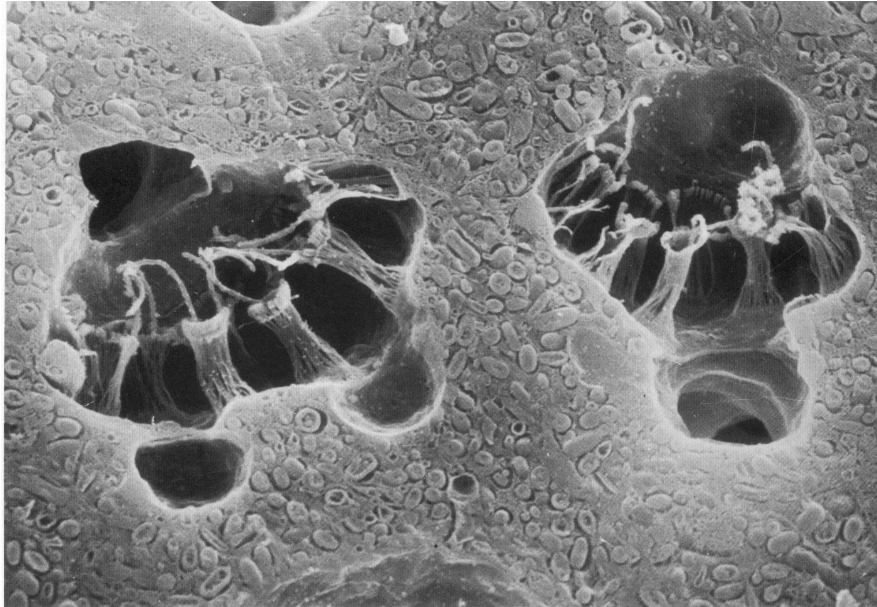


Abbildung 8. Bakterien im Mesohyl von *Discodermia polydiscus*. Die Bildmitte zeigt Choanocyten in zwei Geißelkammern des Schwammes. (REM, x 4000) (aus De Vos *et al.* 1991)

Aufgrund von Stofftransport und photochemischer Aktivität konnten Vertreter der Cyanobakterien und der Zooxanthellen als Schwamm-Symbionten charakterisiert werden (Santavy *et al.* 1990; Santavy und Colwell 1990; Sará 1971). Dagegen bleibt ungeklärt, welche der anderen schwamm-assoziierten Bakterien als Symbionten, als eingestrudelte Nahrungspartikel oder als zufällige Bewohner des Schwammes einzuordnen sind. Wilkinson (1978c) beschreibt in australischen Schwämmen Mikroorganismen, deren Vorkommen und Zusammensetzung weder saisonalen noch intraspezifischen Variationen unterliegt, deren Reproduktion vom Wirt kontrolliert zu sein scheint und die in engem Kontakt zu Schwammzellen stehen, was für einen Stoffaustausch sprechen könnte. Vereinzelt auftretender Verdau von Bakterien und Cyanobakterien könnte der Reinigung und Entfernung von degenerierten oder überschüssigen Zellen dienen (Wilkinson 1978c). Auch zeigten mit Schwämmen assoziierte Bakterien die Fähigkeit zur Verwertung verschiedener Substrate, die die gleichen Bakterien aus dem Umgebungswasser nicht nutzen können (Santavy und Colwell 1990).

Aus mikrobieller Sicht stellt der Wirt ein kleines Ökosystem dar, welches von wenigen, oft nur von einer gut angepaßten Species bewohnt wird (Amann *et al.* 1995). Definitionsgemäß müssen die Partner einer Symbiose zumindest zeitweilig zu gleichen Teilen Vorteile aus ihrem Zusammenleben ziehen (Lüttge *et al.* 1989). Dabei steht dem Angriff des einen Partners die Abwehr des anderen gegenüber. Im Symbiose genannten Gleichgewicht halten sich beide Aktivitäten ungefähr die Waage. Jeder der Symbiosepartner versucht zum eigenen Überleben soviel Nutzen aus dem anderen Partner zu ziehen wie möglich, wobei es nicht nur um Nährstoffe, sondern auch um andere Substanzen, wie z.B. um Wirkstoffe geht. Die Stabilität eines solchen Gleichgewichtes ist um so ausgeprägter, je mehr es unter den herrschenden Standortfaktoren Selektionsvorteile für die einzelnen Partner bietet. Ein wichtiges Merkmal echter Symbiose besteht darin, daß sie eine permanente Einrichtung im Lebenszyklus der Symbiosepartner darstellt (Lüttge *et al.* 1989).

Eine symbiontische Beziehung wurde angenommen, wenn der Schwamm dem Mikroorganismus Schutz und Nährstoffe bietet und der Mikroorganismus Stoffwechselprodukte als Nahrungsquelle oder Substanzen zum Schutz vor Predatoren oder Überwucherung an den Schwamm abgibt (Barthel

1985; Myers 1998; Santavy und Colwell 1990; Westphal 1988). Schwämme können als relativ nährstoffreiche Lebensräume für eine symbiontische Bakterienpopulation angesehen werden, da partikuläres organisches Material durch die Filtration des Schwammes angereichert wird und stickstoffhaltige Substanzen vom Schwamm ausgeschieden werden (Friedrich *et al.* 1999; Santavy und Colwell 1990). In Phasen der Inaktivität des Wirts könnten den Bakterien eine wichtige Rolle in der Ausscheidung von Stoffwechsel-Endprodukten zukommen (Wilkinson 1978b). Amann *et al.* (1995) beschreiben mikrobielle Symbionten als weitgehend unkultivierte Mikroorganismen, die in enger Assoziation mit ihren Partnern leben.

Für die Stabilität der symbiontischen Beziehung ist ein Erkennungsmechanismus erforderlich, in dem Oberflächenkomponenten der Bakterien eine entscheidende Rolle spielen könnten (Müller und Schröder 1997; Simpson 1984). Jede Schwammart muß über ein wachstumsförderndes und ein wachstumshemmendes Prinzip verfügen, welches erwünschte Bakterien anlockt und ihren Verdau verhindert und gleichzeitig die Invasion von Fremdorganismen unterbindet und nicht gewünschte Mikroorganismen zerstört (Müller und Schröder 1997).

Bei den Stoffen, die bakterielle Symbionten anlocken, handelt es sich wahrscheinlich um Lektine, die bestimmte Zuckerrezeptoren auf den Bakterien erkennen, meist Rezeptoren für Galaktose (Müller *et al.* 1981). Die Produktion von Lektin durch *Halichondria panicea*, welches das Wachstum des assoziierten Bakteriums *Pseudomonas insolita* fördert, könnte eine positive Erkennung und gezielte Anreicherung des Bakteriums zur Folge haben und damit die Basis für eine Symbiose bilden (Müller *et al.* 1981). Andererseits könnte die Symbiose zwischen Bakterien und Schwämmen auch als Ineffizienz der phagocytotischen Antwort von Archaeocyten und Choanocyten gewertet werden, indem diese die Bakterien nicht als Nahrungspartikel erkennen (Simpson 1984). Weitere wichtige Faktoren für das Zusammenleben von Schwamm und spezifischen Bakterienpopulationen stellt die Anpassung der Bakterien an die vom Wirt produzierten bioaktiven Substanzen (Müller *et al.* 1981) oder entwickelten Schutzmechanismen dar. In *Aplysina cavernicola* trugen die am häufigsten vorkommenden Bakteriengruppen Schleimlagen, zusätzliche Scheiden und hatten ein vergrößertes Periplasma, was vermutlich dem Schutz der Bakterien vor dem Verdau dient (Friedrich *et al.* 1999). Nach Wilkinson (1978c) könnten die schützenden Schleimkapseln auch vom Schwamm gebildet werden. Eine wichtige Rolle spielen auch mögliche Interaktionen innerhalb einer Symbiontengruppe (Wilkinson 1978a), wie den Bakterien, oder Interaktionen zwischen verschiedenen Symbiontentypen (Simpson 1984), wie Bakterien und Cyanobakterien. Cyanobakterien dominieren in den Oberflächenschichten des Schwammes, während Bakterien die tieferen Lagen des Mesohyls besiedeln, sie sind jedoch gelegentlich auch zusammen in Vakuolen nachgewiesen worden (Simpson 1984). In *Aplysina aerophoba* liegen Cyanobakterien und Bakterien gemeinsam im Ectosom vor, während das Choanosom durch Bakterien-Vorkommen gekennzeichnet ist (Turon *et al.* 2000). Auch Wilkinson (1978c) beschreibt das Zusammenleben von Bakterien und Cyanobakterien im Schwamm. Der tropische Schwamm *Dysidea herbacea* enthält sowohl das endosymbiontische filamentöse Cyanobakterium *Oscillatoria spongelliae* wie auch eine Vielzahl von Bakterien (Flowers *et al.* 1998).

Schwämme stellen eine erdgeschichtlich relativ alte Gruppe unter den Tieren dar, sie traten bereits im frühen Kambrium vor mehr als 600 Millionen Jahren auf (Müller 1999; Müller und Schröder 1997) und entwickelten im Ordovizium eine große Artenvielfalt. Schwämme und ihre assoziierten Mikroorganismen haben meist schon eine lange Geschichte der Koevolution hinter sich, was zu resistenten Mikroorganismen und damit zur Entwicklung von Symbiosen und anderen

Lebensgemeinschaften geführt haben könnte (Becerro *et al.* 1994; Simpson 1984; Wilkinson *et al.* 1981).

Eine Vielzahl von Arbeiten liegt vor, in denen spezifische oder funktionelle Assoziationen von Mikroorganismen und Schwämmen beschrieben wurden. Vacelet und Donadey (1977) entdeckten die gleiche, große und intrazelluläre Bakterienpopulation in vier Individuen von *Agelas oroides*, was auf eine speciesspezifische Assoziation hinweist. Cerrano *et al.* (2000) haben den Einfall großer Populationen der Diatomeenart *Melosira* sp. in den Schwamm *Scolymastra joubini* beobachtet, die möglicherweise eine Schädigung der Schwammzellen verursachen (Cerrano *et al.* 2000). Daß sich nur eine Diatomeenart in den Schwämmen angesiedelt hat, spricht für eine speciesspezifische Assoziation, die eventuell sogar vom Schwamm vorangetrieben wird. Demospongiae sind dafür bekannt, gezielt Silikatpartikel aufzunehmen und anzureichern, um ihren Habitus zu festigen. (Cerrano *et al.* 2000). Preston *et al.* (1996) entdeckten eine spezifische Assoziation zwischen einem neuen Archaeobakterium und dem kalifornischen Schwamm *Axinela* sp. und Althoff *et al.* (1998) vermuten eine Symbiose zwischen *Rhodobacter* und *Halichondria panicea*. In *Theonella swinhoei* liegen die Bakterien extrazellulär vor, wogegen *Aphanocapsa feldmanni* intrazellulär beobachtet wurde (Bewley *et al.* 1996). Die naturstoff-synthetisierenden filamentösen Cyanobakterien wurden in Schwammindividuen verschiedener Standorte immer im Schwamminneren gefunden (Bewley *et al.* 1996; Schmidt *et al.* 2000), so daß zwischen ihnen und dem Schwamm eine funktionelle Vergesellschaftung vermutet werden kann (Bewley *et al.* 1996). Webster *et al.* (2001) vermuten eine symbiontische Beziehung zwischen alpha-Proteobakterien und *Rhopaloeides odorabile*, da die Bakterien mit Choanocyten und Archaeocyten assoziiert sind, welche direkt in die Nährstoffaufnahme des Tieres involviert sind. Imhoff und Trüper (1976) konnten phototrophe Bakterien in marinen Schwämmen nachweisen, bei denen es sich möglicherweise ähnlich wie bei den Cyanobakterien um symbiontische Organismen handelt, die Photosyntheseprodukte an den Wirt abgeben und ihn vor Strahlung schützen. Shieh und Lin (1994) beobachteten die funktionelle Assoziation von heterotrophen stickstoff-fixierenden Bakterien und *Halichondria* sp., in der die Bakterien in den Oberflächenschichten des Schwammes vorliegen, wo sie unter Nutzung des organischen Materials des Schwammes Stickstoff fixieren (Shieh und Lin 1994).

Naturstoffe aus Schwämmen und assoziierten Mikroorganismen

Unter marinen Naturstoffen versteht man bioaktive Substanzen, die antimikrobielle Verbindungen, physiologisch aktive Substanzen wie Pheromone, pharmazeutisch aktive Substanzen und cytotoxische oder tumorhemmende Substanzen einschließen, außerdem marine Gifte und biochemische Grundstoffe, aus denen wertvolle Substanzen gewonnen werden könnten (Kitagawa 1988).

Schwämme gelten als Produzenten solcher bioaktiven Substanzen (Amade *et al.* 1987; Debitus *et al.* 1998; Muricy *et al.* 1993; Müller und Schröder 1997), die als weitgehend artspezifisch angesehen werden können (Müller und Schröder 1997). Es wurden bisher Strukturen aus 475 Schwamm-species beschrieben (Symbiosponge 2001), welche die Tiere vor Fraßfeinden (Garson *et al.* 1998; Gillor *et al.* 2000; Müller und Schröder 1997; Scott *et al.* 2000), pathogenen Mikroorganismen (Amade *et al.* 1987; Müller und Schröder 1997; Scott *et al.* 2000; Uriz *et al.* 2001; Zheng *et al.* 2001), Viren (Müller und Schröder 1997; Uriz *et al.* 2001), Überwucherung (Becerro *et al.* 1994; Gillor *et al.* 2000; Henrikson und Pawlik 1995; Müller und Schröder 1997; Scott *et al.* 2000), UV-Strahlung (Regoli

et al. 2000; Sará 1971) und Substrat-Konkurrenz (Garson *et al.* 1998; Gillor *et al.* 2000; Myers 1998) schützen. Verschiedene marine Tiere nutzen diese Eigenschaft der Porifera zu ihrem eigenen Vorteil, indem sie Schwämme auf ihre Körper setzen (Myers 1998), sie als Wohnraum nutzen oder sie abweiden und die im Schwamm enthaltenen Toxine anreichern, um sich selbst vor Predatoren zu schützen (Mather und Bennett 1993). Über ein Viertel der aus marinen Invertebraten isolierten Bakterien produzieren ebenfalls bioaktive Metabolite (Ivanova *et al.* 1998; Okazaki und Okami 1972). Bernan (1996) spricht in diesem Zusammenhang von komplexen chemischen Interaktionen zwischen marinen Bakterien und ihren Wirten, die Signalübertragung und Markierung des eingenommenen Territoriums einschließen. Amade *et al.* (1987) vermuten, daß die Naturstoffe als Schutz vor mikrobiellen Infektionen und der Regulation der assoziierten Bakterienpopulationen dienen (Madri *et al.* 1971). Dies könnte erfolgen, indem beispielsweise die Biomembranen der Mikroorganismen geschädigt oder ihre elektrophysiologischen Eigenschaften durch die Schwamm-Metabolite beeinflusst werden (Scott *et al.* 2000).

Marine Mikroorganismen werden als erfolgversprechende Quelle für neue Naturstoffe erachtet (Bernan 1996; Bultel-Poncé *et al.* 1999; Zheng *et al.* 2001), da sich die bisher isolierten bioaktive Substanzen sowohl der schwamm-assoziierten Mikroorganismen (Bewley *et al.* 1996; Bultel-Poncé *et al.* 1999; Debitus *et al.* 1998; Schmidt *et al.* 2000) als auch der Schwämme selbst (Debitus *et al.* 1998; Turon *et al.* 2000) als wirksam auf den Gebieten der Atemwegserkrankungen, der Herz-Kreislauf- und Stoffwechselerkrankungen und der Antifouling-Mittel erwiesen haben oder von entzündungshemmender, cytotoxischer, antitumorale und antibiotischer Wirkung waren (Müller und Schröder 1997; Myers 1998; Osinga *et al.* 1999). Da die bioaktiven Metabolite Produkte der Schwämme (Gillor *et al.* 2000; Santavy und Colwell 1990) oder ihrer Symbionten (Bewley *et al.* 1996; Stierle *et al.* 1988; Unson *et al.* 1994) sein können oder aus Kulturen von Mikroorganismen gewonnen werden, die aus Schwämmen isoliert wurden (Bultel-Poncé *et al.* 1998; Imamura *et al.* 1993; Lee *et al.* 1998) gestaltet sich die Lokalisation der metabolit-produzierenden Zellen als schwierig. Auch können die Substanzen in verschiedenen Zelltypen des Schwammes vorliegen oder angereichert werden (Gillor *et al.* 2000c; Turon *et al.* 2000; Unson *et al.* 1994).

In *Dysidea herbacea* konnte das Terpen Spirodysin in den Choanocyten und Archaeocyten nachgewiesen werden, während die chlorierten Diketopiperazine nur in den Zellen der symbiontischen Cyanobakterien der Art *Oscillatoria spongeliae* lokalisiert waren (Flowers *et al.* 1998). Dagegen wurden die mit dem Schwamm *Haliclona* sp. assoziierten cytotoxischen Alkaloide Haliclonacyclamin A und B von Garson *et al.* (1998) nur in den Schwammzellen und nicht in den im Schwamm vorkommenden Dinoflagellaten lokalisiert. Die Anreicherung der Hauptmetabolite von *Aplysina aerophoba* in den sogenannten kugeligen Zellen („spherulous cells“) des Schwamms führt Turon *et al.* (2000) zu der Vermutung, daß es sich bei diesem Zelltyp auch um den Ort der Produktion handeln könnte. Da aktive Substanzen vom Schwamm und von assoziierten Mikroorganismen hergestellt werden können oder es zur gleichzeitigen Synthese verschiedener Stoffe in Schwamm- und Bakterienzellen kommen kann (Flowers *et al.* 1998), sind Turon *et al.* (2000) der Auffassung, daß die Synthese von Naturstoffen mit der Symbiose von Schwamm und Mikroorganismen verbunden sein könnte, indem beispielsweise der Schwamm Substanzen produziert, die erst durch die enzymatische Einwirkung des Symbionten aktiviert werden. Um als Abschreckung zu wirken, müssen die Stoffe an der Oberfläche bzw. den exponierten Teilen des Schwammes lokalisiert sein (Gillor *et al.* 2000; Marin *et al.* 1998; Schupp *et al.* 1999; Swearingen III und Pawlik 1998) und können dort wie bei *Chondrilla nucula* eine hohe Variabilität aufweisen (Swearingen III und Pawlik 1998). In *Negombata*

magnifica konnten die Metabolite nicht in den Zellen der assoziierten Prokaryonten lokalisiert werden, sondern nur in den Schwammzellen, was die Annahme unterstützt, daß die Choanocyten des Schwammes der Produktionsort sind, die Substanz dann von Archaeocyten akkumuliert und an den Einsatzort transportiert wird (Gillor *et al.* 2000).

Eine Übersicht mariner Metabolite aus Bakterien, Cyanobakterien, Dinoflagellaten, Diatomeen, symbiontischen Mikroorganismen, Makroalgen etc., und ihrer Strukturen und Wirkungen geben Moore (1999) und Müller und Schröder (1997). Die Lokalisation von Metaboliten wurde ausführlich von Gillor *et al.* (2000) behandelt, Naturstoffe aus *Halichondria cylindrata* von Li *et al.* (1996) beschrieben. Tabelle 1 gibt Auskunft über Wirkstoffe, die in den letzten Jahren aus schwamm-assoziierten Bakterien isoliert werden konnten.

Tabelle 1. Metabolite aus schwamm-assoziierten Bakterien.

Bakterium	Wirkstoff	Wirkung	Schwamm-species	Quelle
<i>Can. Entotheonella palauensis</i>	Peptid	5	<i>Theonella swinhoei</i>	(Schmidt <i>et al.</i> 2000)
<i>Pseudomonas. aeruginosa</i>	Diketopiperazine	1	<i>Isodictya setifera</i>	(Jayatilake <i>et al.</i> 1996)
Pseudomonade	Quinolone	1	<i>Subera creba</i>	(Debitus <i>et al.</i> 1998)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Quinolone 1-4, Phosphatidylglycero-Lipid 5	1,6,7	<i>Homophymia</i> sp.	(Bultel-Poncé <i>et al.</i> 1999)

Wirkungen 1: antimikrobiell, 2: gegen Mikroalgen, 3: antitumoral, 4: insectizid/akarizidal (milbenabtötend), 5: fungizid, 6: cytotoxisch, 7: antiviral

Bekannte Naturstoffe und ihre Wirkung aus Schwämmen wurden von Kitagawa (1988), Kobayashi *et al.* (1988), Minale (1988) und Amade *et al.* (1982) zusammengefaßt und einige der Substanzen in Tabelle 2 dargestellt. Eine Vielzahl aus Schwämmen isolierter Metabolite und Schwammextrakte wurde auf ihre antitumorale, antimikrobielle und cytotoxische Wirkung getestet (Amade *et al.* 1987; Amade *et al.* 1982; Becerro *et al.* 1994; Longley *et al.* 1993; Muricy *et al.* 1993).

Tabelle 2. In Schwämmen nachgewiesene Metabolite.

Schwamm-species	Wirkstoff	Wirkung	Quelle
<i>Aplysina cauliformis</i>	Bromtyrosin Derivate	3	(Ciminiello <i>et al.</i> 1999)
<i>Cribrochalina vasculum</i>	Acetylenic Alcohols	3	(Hallock <i>et al.</i> 1995)
<i>Discoderma kiiensis</i>	Discodermin A (Tetradecapeptid)	1	(Matsunaga <i>et al.</i> 1985)
<i>Halichondria cylindrata</i>	Halicylindramide A-C (Peptide)	5,6	(Li <i>et al.</i> 1995)
<i>Halichondria cylindrata</i>	Halicylindramide D+E (Peptide)	5	(Li <i>et al.</i> 1996)
<i>Halichondria panicea</i>	Glycoshingolipide		(Nagle <i>et al.</i> 1992)
<i>Hyrtios eubamma</i>	Puupehenon	1,5	(Amade <i>et al.</i> 1982)
<i>Ianthella basta</i>	Bastadin 8+9	6	(Miao und Andersen 1990)
<i>Phakellia ventilabrum</i>	Sesquiterpenoidisonitril	1,5	(Amade <i>et al.</i> 1982)
<i>Plakortis halichondrioides</i>	C ₂₀ -cyclic peroxide 5, dihydroxy C ₁₄ -unsaturated acid 6+7	6	(Rudi und Kashman 1993)
<i>Spongia hispida</i>	5-Epi-Isospongiaquinon	1	(Urban und Capon 1992)
<i>Subera creba</i>	Tyrosin Metabolite	1	(Debitus <i>et al.</i> 1998)

Wirkungen 1: antimikrobiell, 2: gegen Mikroalgen, 3: antitumoral, 4: insectizid/akarizidal (milbenabtötend), 5: fungizid, 6: cytotoxisch

1.3 Biologie der Actinobakterien

Actinobakterien sind eine Gruppe von morphologisch diversen, Gram-positiven Bakterien, die ungewöhnlich hohe Anteile von Guanin (G) und Cytosin (C) in ihrer DNA aufweisen (> 55 mol %) (Ensign 1991; Goodfellow und Williams 1983). Je nach Gattung kann der GC-Gehalt bis zu 78 % der Gesamt-DNA ausmachen (Korn-Wendisch und Kutzner 1991; Schaal 1991). Die morphologische Diversität reicht von den Mikrokokken, die sich kokkoid teilen, bis zu Formen, die pleomorphe Stäbchen bilden oder einen Kokkus-Stäbchen-Kokkus Lebenszyklus durchleben (Ensign 1991; Goodfellow und Williams 1983). Komplexer sind die verzweigten, filament-bildenden Formen, die sich durch verschiedene Arten von Fragmentierung vermehren (Ensign 1991; Goodfellow und Williams 1983).

Innerhalb der Actinobakterien kommen Sporenbildner vor, die aus Hyphen ihres Luftmycels Sporen abschnüren oder Sporangien bilden und Sporen hervorbringen, unter denen auch mobile Formen sind (Ensign 1991). Die unterschiedlichen Gruppen können aufgrund der Bildung von Substratmycel, Luftmycel, der Bildung von Sporen und Sporangien oder ähnlichen Eigenschaften unterschieden werden (Schlegel 1992).

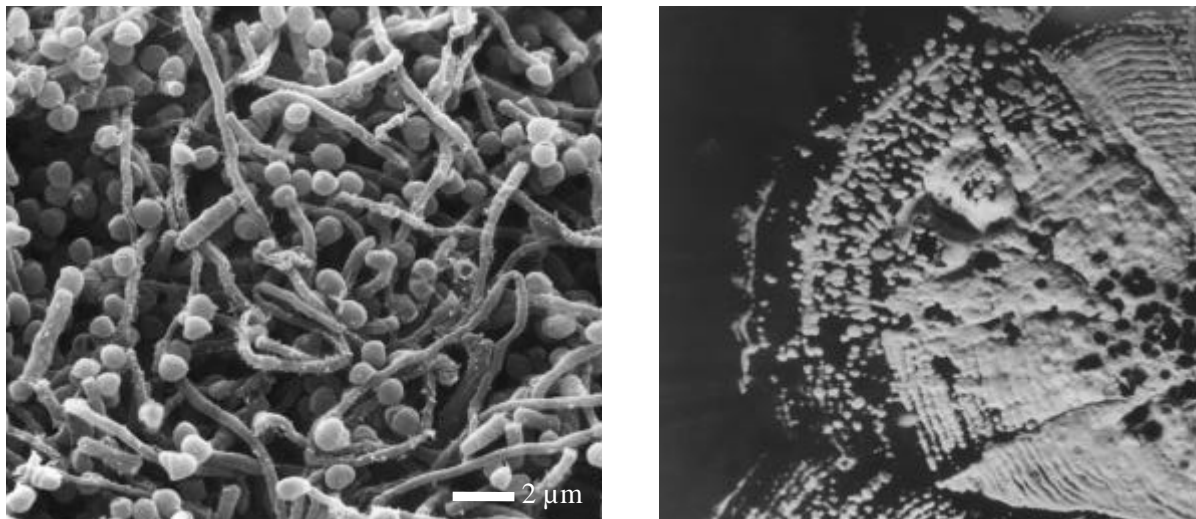


Abbildung 9. Links: Hyphengeflecht von *Streptomyces sampsonii* (HO b17 II) mit Sporangien oder Sporen besetzt. (REM, x 5000) Rechts: Für die Gattung *Streptomyces* typisches ringförmiges Luftmycel bei *Streptomyces intermedius* (N99-6 1v4).

Nach Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2001) werden die Actinobakterien auf Basis ihrer 16S rDNA-Sequenz-Ähnlichkeit in fünf Unterklassen der Klasse Actinobacteria des Phylums Actinobacteria Phylum Novum unterteilt (Abbildung 10). Die Unterklassen Acidimicrobidae, Rubrobacteridae, Coriobacteridae und Sphaerobacteridae bestehen jeweils aus einer einzigen Ordnung, einer Unterordnung und einer Familie. Die meisten Bakterien des Phylums fallen jedoch in die Unterklasse Actinobacteridae, die aus den beiden Ordnungen Actinomycetales und Bifidobacteriales gebildet wird. Die Bifidobacteriales teilen sich in zwei Familien, während sich die Ordnung Actinomycetales in zehn meist mehrere Familien umfassende Unterordnungen gliedert.

Actinobacteria phy. nov.

Actinobacteria

Acidimicrobidae

Acidimicrobiales (1 Unterordnung, 1 Familie, 1 Gattung)

Rubrobacteridae

Rubrobacterales (1 Unterordnung, 1 Familie, 1 Gattung)

Coriobacteridae

Coriobacteriales (1 Unterordnung, 1 Familie, 6 Gattungen)

Sphaerobacteridae

Sphaerobacterales (1 Unterordnung, 1 Familie, 1 Gattung)

Actinobacteridae

Actinomycetales

Actinomycineae (1 Familie, 4 Gattungen)

Micrococcineae (10 Familien mit 38 Gattungen)

Corynebacterineae (7 Familien mit 9 Gattungen)

Micromonosporineae (1 Familie, 9 Gattungen)

Propionibacterineae (2 Familien mit 10 Gattungen)

Pseudonocardineae (2 Familien mit 15 Gattungen)

Streptomycineae (1 Familie, 3 Gattungen)

Streptosporangineae (3 Familien mit 14 Gattungen)

Frankineae (6 Familien mit 10 Gattungen)

Glycomycineae (1 Familie, 1 Gattung)

Bifidobacteriales (2 Familien, 8 Gattungen)

Abbildung 10. Taxonomisches Schema der Actinobacteria nach Garrity (2001).

Die Sporen der Actinobakterien können ungünstige Bedingungen, wie Trockenheit, Hitze, Frost, hydrostatischen Druck und anaerobe Bedingungen über längere Zeiträume überleben (Cross 1981; Goodfellow und Williams 1983; Hartmans und De Bont 1991; Korn-Wendisch und Kutzner 1991).

Die Actinobakterien sind eine Gruppe von physiologisch diversen Bakterien (Ensign 1991), die in einer Vielzahl von natürlichen und anthropogenen Lebensräumen anzutreffen ist (Goodfellow und Williams 1983). Ihre physiologische Diversität ist sowohl in der Produktion extrazellulärer Enzyme, in der Synthese und Exkretion vielfältiger Metabolite (Ensign 1991) als auch in ihrer Fähigkeit zum Abbau komplexer Pflanzen- und Tierbestandteile, darunter Polysaccharide wie Stärke, Pectin, Chitin, Proteine, Cellulose, aber auch aromatischer Verbindungen (Korn-Wendisch und Kutzner 1991) und anderer schwer zersetzlicher organischer Verbindungen zu sehen (Schlegel 1992).

Eine gute Übersicht der Ökologie von Actinobakterien und ihrem Vorkommen in aquatischen Lebensräumen geben Goodfellow und Williams (1983), Goodfellow und Haynes (1984) und Cross (1981).

Actinobakterien sind weltweit in unterschiedlichsten Biotopen verbreitet (Cross 1982; Goodfellow 1991; Goodfellow und Williams 1983; Hartmans und De Bont 1991). Ihre ökologische Nische wird jedoch in erster Linie in der aeroben Zone des Bodens gesehen (Cross 1981; Cross 1982; Ensign 1991;

Goodfellow und Williams 1983). Es kommen auch parasitische oder mutualistische Formen in Pflanzen und Tieren vor (Goodfellow und Williams 1983). Actinobakterien wurden aus Trinkwasser, Flüssen, Seen, Abwasseranlagen (Cross 1982), marinen Habitaten (Bernan 1996; Bernan *et al.* 1994; Colquhoun *et al.* 1998; Cross 1982; Ensign 1991; Frøhlich und Barthel 1997; Goodfellow und Haynes 1984; Gunn *et al.* 1982; Hartmans und De Bont 1991; Korn-Wendisch und Kutzner 1991; Okazaki und Okami 1972; Ravel *et al.* 1998; Weyland 1981b), aber auch aus menschlichen, pflanzlichen (Knibb *et al.* 1993) und tierischen Geweben (Bernan 1996; Goodfellow 1991; Webster *et al.* 2001; Zheng *et al.* 2001) isoliert, in denen sie als Symbiont oder Krankheitserreger vorkommen (Goodfellow und Williams 1983). Vertreter der Actinobakterien wurden zudem in extremen Habitaten wie in der Umgebung von Fumarolen, in der Tiefsee (bis 6455 m, Colquhoun *et al.* 1998), im Inneren von Insekten, als Bestandteil der Sea Ice Microbial Community (SIMCO) in den Salzlaugekanälen im antarktischen Eis (Junge *et al.* 1998) oder im Eis des antarktischen Vostok-Sees (Priscu *et al.* 1999) nachgewiesen.

Im marinen Bereich kommen sie im Littoral (Bernan *et al.* 1994; Goodfellow und Haynes 1984), in küstennahen Gebieten (Goodfellow und Haynes 1984; Hotta *et al.* 1980a) und in Tiefseesedimenten vor (Colquhoun *et al.* 1998; Ellaiah *et al.* 1996; Jensen *et al.* 1991; Korn-Wendisch und Kutzner 1991). Sie haben sich dabei an das vorherrschende Nahrungsangebot angepaßt und verwerten Agar, Chitin, Alginat, Laminarin und Cellulose (Korn-Wendisch und Kutzner 1991). Eine Übersicht der Actinobakterien aus marinen Habitaten geben Goodfellow und Haynes (1984).

Viele Autoren vermuten, daß es sich bei den Actinobakterien in marinen Lebensräumen um eingeschwämmte Landarten handelt, die im marinen Milieu vorwiegend als Sporen und nicht in aktiver, mycelbildender Form vorliegen (Goodfellow und Haynes 1984; Hartmans und De Bont 1991; Imamura *et al.* 1993; Jensen *et al.* 1991; Korn-Wendisch und Kutzner 1991; Okami und Okazaki 1974). Nach Imhoff (2001) sind Bakterien dann als marin einzustufen, wenn ihr Salzoptimum im marinen Bereich liegt, was die Salztoleranz neben der Barotoleranz (Helmke 1981) zu einem der entscheidenden Faktoren für das Überleben von eingespülten Actinobakterien macht (Okazaki und Okami 1972; Okazaki und Okami 1976). Okazaki und Okami (1976) wiesen bei marinen Streptomyceten eine höhere Salztoleranz nach als bei terrestrischen, Hunter *et al.* (1981) höhere Toleranzen bei Actinobakterien aus Salzmarschen als bei Actinobakterien aus Wäldern. Da auch terrestrische Actinobakterien über Salztoleranzen verfügen, könnte man annehmen, daß es sich bei den marinen Arten um die Selektion der widerstandsfähigsten, tolerantesten eingespülten Arten handelt (Korn-Wendisch und Kutzner 1991; Okami und Okazaki 1978). Allerdings wurden auch halophile (salzabhängige) Arten isoliert, die nicht ohne Salz wuchsen (Ellaiah *et al.* 1996; Okami und Okazaki 1978; Okazaki und Okami 1976; Weyland 1981b). Andere Autoren vermuten, daß die Actinobakterien Teil der indigenen marinen Mikroflora sind (Colquhoun *et al.* 1998; Ellaiah *et al.* 1996; Jensen *et al.* 1991; Moran *et al.* 1995; Okazaki und Okami 1976; Ravel *et al.* 1998; Webster *et al.* 2001; Weyland 1981b; Weyland 1981a), wobei sie sowohl die Wassersäule als auch das Sediment besiedeln (Okami und Okazaki 1978; Weyland 1981b). Moran *et al.* (1998) wiesen nach, daß *Streptomyces* im marinen Lebensraum in aktiver Form und nicht nur als Spore vorkommt. Helmke (1981) und Oppenheimer und ZoBell (1952) fanden Actinobakterien, die unter hydrostatischem Druck vergleichbar mit den Bedingungen in Tiefseesedimenten wachsen konnten, allerdings Veränderungen in ihrer Morphologie aufwiesen. Hunter *et al.* (1981) sprechen von deutlich unterschiedlichen, einzigartigen Actinobakterien in Salzmarschen.

Naturstoffe aus Actinobakterien

Viele Actinobakterien aus dem Boden produzieren Antibiotika (Ensign 1991; Goodfellow und Williams 1983). Hinsichtlich der chemischen Vielfalt der produzierten Verbindungen stehen die Streptomyceten dabei an erster Stelle (Cross 1982; Schlegel 1992; Zheng *et al.* 2001). Sie sind die Produzenten von mehr als der Hälfte der 10.000 dokumentierten bioaktiven Substanzen aus Actinobakterien (Anderson und Wellington 2001). Insgesamt sind bisher über 2000 Antibiotika eingehend charakterisiert worden; chemotherapeutisch angewendet wird bisher aber nur ein geringer Bruchteil (Schlegel 1992). Aufgrund der Kultivierungsproblematik konnte bis heute nur ein Bruchteil der potentiellen Antibiotikaproduzenten überhaupt untersucht werden (Schlegel 1992; Vobis 1991). Actinobakterien synthetisieren Substanzen, die neben der antibiotischen (Bernan *et al.* 1994; Biabani *et al.* 1997; Cross 1982; Ensign 1991; Nolan und Cross 1988; Okazaki und Okami 1972; Zheng *et al.* 2001) auch antitumorale (Biabani *et al.* 1997; Cross 1982; Nolan und Cross 1988; Okazaki und Okami 1972; Takahashi *et al.* 1989; Zheng *et al.* 2001), cytotoxische (Lee *et al.* 1998), antiparasitische (Nolan und Cross 1988), fungizide (Cross 1982; Ensign 1991; Nolan und Cross 1988), herbizide (Cross 1982) oder insectizide (Cross 1982; Nolan und Cross 1988; Takahashi *et al.* 1989) Wirkung zeigen.

Die Erforschung der Gruppe der Streptomyceten ist durch ihre industrielle Bedeutung als Produzent hochwirksamer Antibiotika stark vorangetrieben worden (Schlegel 1992), die schließlich sogar zu einer Überklassifizierung der Gattung *Streptomyces* führte (Anderson und Wellington 2001). Streptomycin, Chloromycetin, Aureomycin und Tetracycline sind die therapeutisch erfolgreichsten von hunderten isolierter Antibiotika (Redaktion Ärzte Zeitung 2001; Schlegel 1992).

Es konnte eine Vielzahl von Antibiotikaproduzenten auch unter marinen Actinobakterien entdeckt werden (Ellaiah *et al.* 1996; Okami 1979; Okazaki und Okami 1972), mehr als unter anderen marinen Bakteriengruppen (Zheng *et al.* 2001).

Übersichtsartikel der Metabolite von Actinobakterien liegen von Cross (1982), Nolan und Cross (1988) und Goodfellow und O'Donnell (1989) vor. Tabelle 3 gibt einige Beispiele der Metabolite aus Actinobakterien. Die Frage, welche Bedeutung die Antibiotika für ihre Produzenten in ihrem natürlichen Lebensraum haben, ist ungeklärt. Antibiotika werden auf speziellen Synthesewegen produziert, die man dem Sekundärmetabolismus zuordnet (Okami 1979; Redaktion Ärzte Zeitung 2001; Schlegel 1992).

Es sind Stoffwechselwege und Enzyme beteiligt, die zum Wachstum und zur Erhaltung der Zellen nicht benötigt werden (Okami 1979; Redaktion Ärzte Zeitung 2001; Schlegel 1992). Die genetischen Grundlagen für die Produktion dieser Stoffe liegen häufig auf Plasmiden vor (Hotta *et al.* 1980b, Okami 1979), die neben der Weitergabe von Generation zu Generation auch durch horizontalen Gentransfer (Bewley *et al.* 1996) erworben, weitergegeben und verloren werden können, ohne daß das Überleben des Bakteriums gefährdet wird. Da viele Antibiotika ein recht enges Wirkungsspektrum aufweisen, wird vermutet, daß sie den Produzenten an ihrem Standort einen Vorteil verschaffen, etwa gegen eng verwandte Arten und die Konkurrenten um das gleiche Substrat (Schlegel 1992) oder als Signalmoleküle für Interaktionen zwischen den Bakterien dienen (Kell und Kaprelyants 1996; Redaktion Ärzte Zeitung 2001).

Da sich in Australien eine weltweit einzigartige Tierpopulation entwickelt hat, liegt die Vermutung nahe, daß sich auch andersartige Bakterien entwickelt haben könnten, weswegen in Australien vermehrt Actinobakterien isoliert und auf bioaktive Substanzen untersucht wurden (Nolan und Cross 1988).

Tabelle 3. Metabolite aus Actinobakterien.

Bakterium	Wirkstoff	Wirkung	Probenart	Quelle
<i>Micrococcus luteus</i>	Acyl-mannobiosyl-glycerol-trichloro-hydroxydiphenylether	1	<i>Xestospongia</i> sp.	(Bultel-Poncé <i>et al.</i> 1998)
<i>Micromonospora</i>	Thiocoralin (Depsidepeptid)	3	Weichkoralle	(Romero <i>et al.</i> 1997)
<i>S. sioyaensis</i>	Altemicidin	3,4	Sediment	(Takahashi <i>et al.</i> 1989)
<i>S. tenjimariensis</i>	Aminoglycoside	1	Sediment	(Hotta <i>et al.</i> 1980a)
<i>Streptomyces</i> sp.	Antimycine	5	unidentifizierter Schwamm	(Imamura <i>et al.</i> 1993)
<i>Streptomyces</i> sp.	Bioxalomycin	1	Sediment	(Bernan <i>et al.</i> 1994)
<i>Streptomyces</i> sp.	Aminobenzoessäure	2	Sediment	(Biabani <i>et al.</i> 1998)
<i>Streptomyces</i> sp.	δ -Indomycinone (Pluramycin Klasse)	1,3	Stammsammlung Alfred-Wegener-Institut	(Biabani <i>et al.</i> 1997)
<i>Streptomyces</i> sp.	Phenazin Derivat	1,5	Sediment	(Pusecker <i>et al.</i> 1997)
<i>Streptomyces</i> sp.	Topoisomerase I Inhibitoren 1 bis 7	6	unidentifizierter Schwamm	(Lee <i>et al.</i> 1998)

Wirkungen 1: antimikrobiell, 2: gegen Mikroalgen, 3: antitumoral, 4: insectizid/akarizidal (milbenabtötend), 5: fungizid, 6: cytotoxisch

Experimenteller Teil

2. Standorte und Probenahme

Es wurden im Jahr 1999 vier Probenahmen in der Ostsee, der Nordsee und im Mittelmeer durchgeführt; zwei weitere Probenahmen fanden im Frühling 2000 statt.

Tabelle 4. Übersicht der Probenahmen.

Probenahme:	Schwamm	Probenbezeichnung
Januar 1999 Kleverberg Ost, Ostsee	<i>Halichondria panicea</i> (Pallas)	HO
März 1999 Kleverberg Ost, Ostsee	<i>Halichondria panicea</i> (Pallas)	HK
April 1999 Elba, Italien, Mittelmeer	<i>Ircinia fasciculata</i> (Pallas)	E99-1
	<i>Chondrosia reniformis</i> Nardo	E99-2
	<i>Axinella damicornis</i> (Esper)	E99-3
	<i>Acanthella acuta</i> Schmidt	E99-5
	<i>Halichondria panicea</i> (Pallas)	N99-6
Juli 1999 Helgoland, Nordsee	<i>Halichondria panicea</i> (Pallas)	N99-8
	<i>Haliclona oculata</i> (Pallas)	N99-8
	<i>Petrosia ficiformis</i> Poiret	N99-2/-7
Mai 2000 Elba/Italien, Mittelmeer	<i>Ircinia fasciculata</i> (Pallas)	E00-13
	<i>Chondrosia reniformis</i> Nardo	E00-1/-8
	<i>Axinella damicornis</i> (Esper)	E00-17
	<i>Agelas oroides</i> (Schmidt)	E00-3
	<i>Acanthella acuta</i> Schmidt	E00-4
	<i>Hamigera hamigera</i> Gray	E00-7
	<i>Petrosia ficiformis</i> Poiret	E00-2
	<i>Oscarella lobularis</i> (Schmidt)	E00-5
	<i>Axinella verrucosa</i> Schmidt	E00-12
	<i>Haliclona valliculata</i> (Griessinger)	E00-6
	<i>Ircinia spinosula</i> (Schmidt)	E00-25
	<i>Hemimycale columella</i> (Bowerbank)	E00-16
	<i>Aplysina cavernicola</i> Vacelet	E00-9
März 2000 Kleverberg Ost, Ostsee	<i>Halichondria panicea</i> (Pallas)	HP

2.1 Probenahmen

2.1.1 Probenahmen in der Ostsee

Der Meeresboden wurde vom Forschungsschiff aus mit einer Dredge (auch Baumkurre oder Baumschleppnetz genannt) abgefahren. Bei der Dredge handelt es sich um ein Fanggeschirr der Kutterfischerei, das aus einem sackförmigen Netz und dem eigentlichen Kurrbaum, einem Metallrahmen, besteht. Dieser Kurrbaum hält die vordere Netzöffnung während des Schleppens geöffnet und ist an den seitlichen Enden mit je einer eisernen Kufe ausgestattet, auf der das Netz über den Grund gleitet. Aufgrund des starren Kurrbaumes ist nur eine relativ kleine Netzöffnung von wenigen Metern möglich, da größere Bäume auf See nicht mehr sicher einsetzbar sind. Der Fang wurde an Deck gebracht, wobei er kurzfristig der Luft ausgesetzt war, und in eine mit Standortwasser gefüllte Wanne gegeben. Es wurden möglichst unverletzte und weitgehend substratfreie Individuen ausgewählt und in einer zweiten Wanne bis zur Verarbeitung zwischengelagert. Bei der Probenahme im Januar 1999 konnte mit dem Ruhmorlot eine Sediment- und Standortwasserprobe für die genetische Analyse genommen werden, bei der Probenahme im März aufgrund der Beschaffenheit des

Meeresbodens nur eine Wasserprobe mit Hilfe eines Wasserschöpfers. Die Proben wurden an Land bearbeitet. Die Positionen der Probenahmen wurden im Januar 1999 mit dem Bordcomputer der FK Littorina aufgenommen und im März 1999 und 2000 anhand von Seekarten durch den Kapitän der FB Polarfuchs bestimmt.

Westliche Ostsee 25.01.1999

FK „Littorina“

Dredgen auf Kleverberg nach Schwämmen

Dredgezeit:	60 min
Position Anfang:	54°27,761'N / 10°14,363'E
Position Ende:	54°27,965'N / 10°14,146'E
Fang:	<i>Halichondria panicea</i> (HO)

Wasser- und Sedimentprobe Rumohrlot

Position: 54°27,941'N / 10°14,223'E

Westliche Ostsee 23.03.1999

FB „Polarfuchs“

Dredgen auf Kleverberg nach Schwämmen

Dredgezeit:	10 min
Position Anfang:	54°27,7'N / 10°14,3'E
Position Ende:	54°27,9'N / 10°14,1'E
Fang:	<i>Halichondria panicea</i> (HK)

Wasserschöpfer 3x 1,2-Liter-Flasche

Westliche Ostsee 30.03.2000

FB „Polarfuchs“

Dredgen auf Kleverberg nach Schwämmen für Hälterungsversuche im Aquarium

Position Anfang:	54°25,6'N / 10°11,7'E
Position Ende:	54°25,5'N / 10°11,5'E
Fang:	<i>Halichondria panicea</i> (HP)

2.1.2 Probenahmen in der Nordsee

Die Probenahme der Schwämme erfolgte wie in der Ostsee mit einer Dredge. Beim Entleeren der Dredge kam der Fang kurzfristig mit Umgebungsluft in Berührung und wurde schnellstmöglich in eine belüftete Wanne mit Standortwasser gegeben. Da die Ausbeute an Schwämmen sehr gering war wurden alle gedredgten Schwammindividuen verarbeitet. Dabei handelte es sich weitgehend um unverletzte, substratfreie Tiere. Standortwasserproben wurden mit einem Wasserschöpfer, Substratproben mit einem Backengreifer genommen. Die Proben wurden vor Ort im schiffseigenen Labor verarbeitet. Die Positionen der Probenahmen und die Standortbedingungen (Temperatur, Salinität etc.) wurden mit dem Bordcomputer der FS Alkor aufgenommen.

Deutsche Bucht 17. - 19.07.99

FS „Alkor“

Dredgen auf Steingrund vor Helgoland nach Schwämmen

Tabelle 5. Übersicht der Probenahmen in der Nordsee am 17.07.1999.

Probenbezeichnung	N99-2		
Gerät	Dredge	Wasserschöpfer	Backengreifer
Position Anfang	54°14,72'N / 8°03,14'E	54°14,79'N / 8°02,99'E	54°14,84'N / 8°03,00'E
Position Ende	54°14,61'N / 8°03,14'E		
Lottiefe (m)	17,4	17,7	18,7
Dredgezeit (min)	5		
Temperatur (°C)		17,3	18,7
Kurs (°)		245	271,8
Salinität (‰)		31,8	
Species	<i>Petrosia ficiformis</i>		

Tabelle 6. Übersicht der Probenahmen in der Nordsee am 19.07.1999.

Probenbezeichnung	N99-6	N99-7	N99-8	
Gerät	Dredge	Dredge	Dredge	Wasserschöpfer
Position Anfang	54°15,10'N 8°03,45'E	54°14,70'N 8°03,14'E	54°15,72'N 8°03,17'E	54°14,22'N 8°03,12'E
Position Ende	54°14,83'N 8°03,27'E	54°14,50'N 8°02,78'E	54°14,48'N 8°02,84'E	
Lottiefe (m)	16,3	15,3	16,4	16,1
Dredgezeit (min)	11	12	16	
Temperatur (°C)	20,2	19,924	20,2	20,98
Kurs (°)	201,1 (0,8 Knoten)	215,0	238 (1,9 Knoten)	(0,9 Knoten)
Salinität (‰)	29,47	29,55	29,6	30,255
pH				8,19
Species	<i>Halichondria panicea</i>	<i>Petrosia ficiformis</i>	<i>Haliclona oculata</i>	

2.1.3 Probenahmen im Mittelmeer

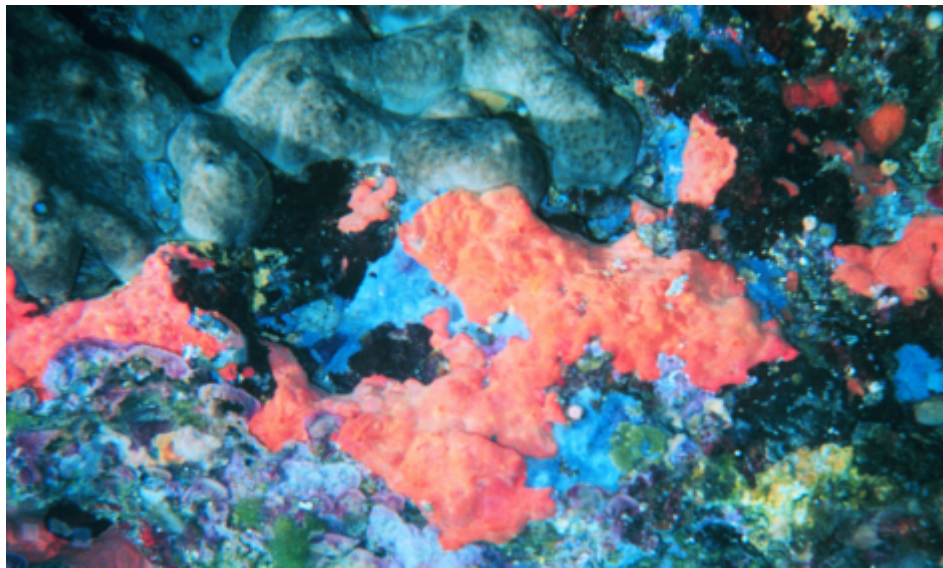


Abbildung 11. Schwamm-Lebensgemeinschaft auf einem Felsen an der Küste von Elba. Links oben im Bild ist *Chondrosia reniformis* braun gefleckt und darunter der blaue und der rote Sternschwamm *Anchinoe tenacior* und *Spirastrella cunctatrix* zu erkennen (Foto: R. Stöhr).

Die Probenahme von Schwämmen, Standortwasser und Sediment wurde von Tauchern des Instituts für Meereswissenschaften Hydra (Fetovaia auf Elba, Italien) mit sterilen Glasflaschen, Schraubdeckeldosen und Spritzen durchgeführt. Die Schraubdeckeldosen für den Transport der Schwammproben wurden wegen ihres Auftriebs bereits in 3 bis 6 m Tiefe geflutet, am Ort der Probenahme wurde dieses Wasser nochmals gegen Wasser aus der Schwammumgebung ausgetauscht. Zunächst wurde in 2 bis 4 m Entfernung des ausgewählten Tieres Standortwasser beprobt (2x 1 Liter), der Schwamm selbst wurde anschließend so schonend wie möglich direkt am Ansatz vom Substrat gelöst oder abgeschnitten und mit dem ihn umgebenden Wasser in eine der Schraubdeckeldosen gegeben. Mit 50 ml Spritzen wurden Sediment bzw. Substratproben genommen, indem die Spritzen an der aufgewirbelten und aufgekrazten Substratoberfläche aufgezogen wurden. Tiefe und Wassertemperatur wurden mit Tauchcomputern festgehalten und der Standort mit Hilfe einer Seekarte bestimmt.

Zum Spülen der Gefäße und der Schwämme vor und während ihrer Verarbeitung an Land wurde Meerwasser (37,2 ‰) an der Pier von Secceto entnommen und sterilfiltriert. Der Schwamm wurde während der Probenahme nicht der Luft ausgesetzt, sondern bis zur Verarbeitung, d.h. bis zu seiner Zerkleinerung ständig in sterilfiltriertem Meerwasser gehalten. Die Schraubdeckeldosen mit den Schwämmen wurden jeweils in geschlossenem Zustand in ein Aquarium mit sterilfiltriertem Mittelmeerwasser getaucht, unter Wasser geöffnet und in das Aquarium ausgeleert.

Tabelle 7. Übersicht der Tauchplätze zur Schwammsammlung auf Elba 1999 und 2000.

Tauchplatz	Ort	Position
Tauchplatz 1 (T1)	Capo Sant' Andrea	42°48'25"N / 10°08'25"E
Tauchplatz 2 (T2)	Punta di Fetovaia	42°43'24"N / 10°09'31"E
Tauchplatz 3 (T3)	Scoglio della Triglia	42°43'57"N / 10°16'13"E
Tauchplatz 4 (T4)	Secca di Capo di Fonza	42°44,5'N / 10°17,0'E
Tauchplatz 5 (T5)	Secca di Corallo	42°44'5"N / 10°17'3"E

Fetovaia (Elba), Italien 18.04. - 02.05.1999

Institut für Meereswissenschaften Hydra

Tauchgänge zum Sammeln von Schwämmen und Standortproben

Tabelle 8. Übersicht der Probenahmen im westlichen Mittelmeer 1999.

Probenbezeichnung	E99-1	E99-2	E99-3	E99-5
Tauchplatz	1	2	3	2
Tauchzeit (min)				41
Maximale Tiefe (m)	9,7	17,1	19,5	21
Temperatur (°C)	14	15	16	15
Salinität (‰)	39	38		
Species	<i>Ircinia variabilis</i>	<i>Chondrosia reniformis</i>	<i>Axinella damicornis</i>	<i>Acanthella acuta</i>

Fetovaia (Elba), Italien 04.05. - 22.05.2000

Institut für Meereswissenschaften Hydra

Tauchgänge zum Sammeln von Schwämmen und Standortproben

Tabelle 9. Übersicht der Probenahmen im westlichen Mittelmeer 2000.

Probenbezeichnung	Tauchplatz	Durchschnittstiefe (m)	Maximale Tiefe (m)	Temperatur (°C)	Species
E00-1 E00-2	1	7,9	13,7	17 (36,5 ‰)	<i>Chondrosia reniformis</i> <i>Petrosia ficiformis</i>
E00-3 E00-4	2	13,4	18,5	15	<i>Agelas oroides</i> <i>Acanthella acuta</i>
E00-5 E00-6	4		30-31,5	14,5	<i>Oscarella lobularis</i> <i>Haliclona valliculata</i>
E00-7 E00-8	1	4,2	6	18	<i>Hamigera hamigera</i> <i>Chondrosia reniformis</i>
E00-9	4		40	14,5	<i>Aplysina aerophoba</i>
E00-12	5		28-31	14,5	<i>Axinella verrucosa</i>
E00-13	1	5,7	7,9	17	<i>Ircinia fasciculata</i>
E00-16 E00-17	2	8	13		<i>Hemimycale columella</i> <i>Axinella damicornis</i>
E00-25	1	8,8	12,8	19	<i>Ircinia spinosula</i>

2.2 Probenbearbeitung

Alle Schwämme der Nordsee- und Mittelmeer-Probenahmen wurden anhand einer Materialprobe von Dr. Rob van Soest vom Institut für taxonomische Zoologie des Zoologischen Museums an der Universität Amsterdam taxonomisch klassifiziert. Ausnahmen bilden die Schwammproben E00-5 *Oscarella lobularis* (Schmidt), von der keine Bestimmung durch Dr. Soest durchgeführt wurde, bei der allerdings aufgrund der auffälligen Morphologie auch keine Verwechslungsmöglichkeit bestand und die Proben HO/HOB, HK und HP der Art *Halichondria panicea* (Pallas) aus der Ostsee, die ebenfalls aufgrund ihrer Morphologie und brüchigen Konsistenz erfolgreich selbst bestimmt werden konnten.

Nach Möglichkeit wurden mehrere Exemplare einer Art einer Probenahme als eine Probe zusammengeführt, um eine akkurate Aussage über die bakterielle Diversität der Species und nicht einzelner Individuen zu erhalten. In gleicher Weise wurden von Becerro *et al.* (1994) Untersuchungen zur biologischen Aktivität verschiedener Schwamm-species durchgeführt.

Die Schwamm- und Umweltproben wurden standardmäßig wie folgt bearbeitet:

Standortwasser: Entnahme von 1,2 l Standortwasser mit dem Wasserschöpfer, im Mittelmeer per Hand, das im Labor durch einen Cellulose-Nitrat-Filter mit Porengröße 0,2 µm filtriert und der Filter zur genetischen Analyse bei -20°C eingefroren wurde.

Rohextrakt: Stücke nach Möglichkeit mehrerer Schwammindividuen wurden in kleine Stücke zerschnitten, mit einem Ultra Turrax-Dispergierer (IKA-Werke GmbH, Staufen) zerkleinert und bei -20°C zur genetischen Analyse eingefroren.

Sediment: In der Ostsee wurden Sedimentproben mit dem Rumohrlot, in der Nordsee mit einem Backengreifer genommen, in Zentrifugenbecher überführt und bei -20°C eingefroren.

Im Mittelmeer wurde mit Hilfe einer 50 ml-Spritze aus der direkten Schwammumgebung Substrat aufgesaugt, in Zentrifugenbecher überführt und eingefroren.

Plattierung: Mit dem Rohextrakt wurde eine Verdünnungsreihe mit den Stufen 10⁻¹ bis 10⁻⁴ in sterilem Meerwasser angelegt, mit denen Nähragarplatten beimpft wurden. Als Meerwasser wurde für die Ostseeproben Ostseewasser verwendet, für die Nordsee auf 34 ‰ aufgesalzenes, gealtertes Ostseewasser und für die Mittelmeerproben gealtertes Mittelmeerwasser. Der Rohextrakt wurde mit Ausnahme der Mittelmeerproben aus dem Jahr 2000 ebenfalls ausplattiert. Für die Ostseeproben wurden 2 Platten pro Medium und Verdünnung angelegt, für die Nordseeproben mit Ausnahme der Probe N99-6 (2 Parallelen) und für die Mittelmeerproben jeweils nur eine Platte. Das Beimpfen der Platten erfolgte mit je 100 µl der einzelnen Verdünnungsstufen bzw. des Rohextraktes. Die Proben wurden mit Hilfe eines Drehtisches und Drigalsky-Spateln gleichmäßig auf den Agarplatten ausgestrichen und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probenserie HOB wurde abweichend bei 4°C und die Elba-Proben aus dem Jahr 2000 bei 10°C kultiviert.

Die Zusammensetzung der Medien ist in Kapitel A 2.1 „Rezepte der Medien“ im Anhang aufgeführt, die verfolgten Medienstrategien werden in Kapitel 3.2.1 „Isolierung von Bakterien“ erläutert.

2.2.1 Bearbeitung der Ostseeproben

Die Schwamm- und Umweltproben wurden wie oben beschrieben und wie in Tabelle 10 dargestellt bearbeitet. Alle Arbeiten fanden im Institut für Meereskunde in Kiel statt.

Tabelle 10. Übersicht der Probenahmen in der westlichen Ostsee und ihrer Bearbeitung.

Datum	25.01.1999	23.03.1999	30.03.2000
Probenbezeichnung	HO/HOB	HK	HP
Species	<i>Halichondria panicea</i>	<i>Halichondria panicea</i>	<i>Halichondria panicea</i>
Probenumfang und Bearbeitung	Wasserprobe	Wasserprobe	Probenahme für Kultivierungsversuche im Aquarium
	Sedimentprobe		
	Rohextrakt	Rohextrakt	
	Sediment		
Plattierung 2 Parallelen	Plattierung 2 Parallelen		
Eingesetzte Medien	HO: TSB 30;3;0,3;0,03 HOB: HSPC 30;15;7,5;0	Strepto A;B;C	

Die Probenahme am 30.03.2000 erfolgte nicht zur Isolierung von schwamm-assoziierten Bakterien, sondern zum Sammeln von Exemplaren der Art *Halichondria panicea* für Kultivierungsversuche. Aus den gesammelten Schwämmen wurden möglichst unverletzte Individuen, die optisch einen guten, gesunden Eindruck machten, ausgewählt und ins Aquarium des IfM gebracht. Dort wurden einige kleine Individuen auf Gitterkörbe in ein an den Ostseekreislauf des Aquariums angeschlossenes, gut belüftetes Versuchsbecken gesetzt und ihr Wachstum beobachtet. Eine größere Anzahl von Individuen wurde zur Lagerung in lebendem Zustand in ein anderes Versuchsbecken mit einer Gemeinschaft von Ostseelebewesen (Rotalgen, Grünalgen, Fische, Schnecken, Seesterne, Muscheln, Krebse etc.) gesetzt.

Schwammexemplare aus beiden Aquarien wurden am 18.06.2001 beprobt, indem von verschiedenen Individuen eine oder mehrere Proben zur genetischen Analyse entnommen wurden. Die Schwammproben wurden in 2 ml-Reaktionsgefäße gegeben und mit einem Glasstab homogenisiert. Das Wasser beider Aquarien wurde ebenfalls beprobt, im Labor durch einen Cellulose-Nitrat-Filter mit Porengröße 0,2 µm filtriert und der Filter zur genetischen Analyse bei -20°C eingefroren. Die Probenserie vom 18.06.2001 erhielt die Bezeichnung HP.

Für eine mikroskopische Untersuchung wurde das gemischte Aquarium nochmals am 12.11.2001 beprobt. Es wurde ein Exemplar zur Anfertigung von Schnitten und eine 1,2-Liter Wasserprobe entnommen. Die Probenahme vom 12.11.2001 erhielt keine gesonderte Bezeichnung, da sie ausschließlich für die Rasterelektronenmikroskopie und die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung bestimmt war.

2.2.2 Bearbeitung der Nordseeproben

Deutsche Bucht 17. - 19.07.99

Die Schwamm- und Umweltproben wurden wie oben beschrieben und wie in Tabelle 11 dargestellt bearbeitet. Alle Arbeiten fanden in den Laboren der FS Alkor statt.

Es wurden folgende 20 Medien eingesetzt:

Gruppe A) TSB 30; TSB 3; TSB 0,3; TSB 0,03; MAL; SW2; CHI; HSPC S; HSPC B

Gruppe B) ALG; GyA; GYM S; GYM B; DoII; GYM; SCK; HSPC 30; HSPC 15; HSPC 7,5; HSPC 0

Tabelle 11. Übersicht der Probenahmen in der Nordsee und ihrer Bearbeitung.

Proben-bezeichnung	N99-2	N99-6	N99-7	N99-8
Species	<i>Petrosia ficiformis</i>	<i>Halichondria panicea</i>	<i>Petrosia ficiformis</i>	<i>Haliclona oculata</i>
Probenumfang	Wasserprobe	Wasserprobe	Wasserprobe	Wasserprobe
	Sedimentprobe	Sedimentprobe	Sedimentprobe	Sedimentprobe
Bearbeitung	Rohextrakt	Rohextrakt	Rohextrakt	Rohextrakt
	Sediment	Sediment	Sediment	Sediment
	Plattierung	Plattierung 2 Parallelen	Plattierung	Plattierung
Eingesetzte Medien	Medien Gruppe A	alle Medien	Medien Gruppe B	alle Medien

2.2.3 Bearbeitung der Mittelmeerproben

Die Schwamm- und Umweltproben wurden wie oben beschrieben und wie in Tabelle 12 und 13 dargestellt bearbeitet. Alle Arbeiten fanden im Institut für Meereswissenschaften Hydra statt.

Fetovaia (Elba), Italien 18.04. - 02.05.1999

Es wurden folgende 9 Medien eingesetzt:

TSB 30; TSB 3; TSB 0,3; TSB 0,03; HSPC 15; HSPC 25; Strepto A; Strepto B; Strepto C

Tabelle 12. Übersicht der Probenahmen im Mittelmeer 1999 und ihrer Bearbeitung.

Proben-bezeichnung	E99-1	E99-2	E99-3	E99-5
Species	<i>Ircinia fasciculata</i>	<i>Chondrosia reniformis</i>	<i>Axinella damicornis</i>	<i>Acanthella acuta</i> 2 Individuen
Probenumfang	Wasserprobe	Wasserprobe	Wasserprobe	Wasserprobe
	Sedimentprobe	Sedimentprobe	Sedimentprobe	Sedimentprobe
Bearbeitung	Rohextrakt	Rohextrakt	Rohextrakt	Rohextrakt
	Sediment	Sediment	Sediment	Sediment
	Plattierung	Plattierung	Plattierung 2 Parallelen	Plattierung
Eingesetzte Medien	alle Medien	alle Medien	alle Medien	alle Medien



Abbildung 12. Schwamm an einer Felswand im Mittelmeer, im Vordergrund ein Meerjunker (*Coris julis*) (Foto: R. Stöhr).

Fetovaia (Elba), Italien 04.05. - 22.05.2000

Es wurden folgende 13 Medien eingesetzt:

TSB 3; TSB 3 + Salz; HSPC 30; HSPC 15; HSPC 7,5; HSPC 0; SSI; MYX; MYX + Salz; CYT; CHI; ACT; BHI

Tabelle 13. Übersicht der Probenahmen im Mittelmeer 2000 und ihrer Bearbeitung.

Probenbezeichnung	Species	Probenumfang	Bearbeitung	Zahl der Individuen	Eingesetzte Medien
E00-1	<i>Chondrosia reniformis</i>	Wasserprobe Sedimentprobe	Rohextrakt Sediment	2	
E00-2	<i>Petrosia ficiformis</i>	Wasserprobe Sedimentprobe	Rohextrakt Sediment	2	
E00-3	<i>Agelas oroides</i>	Wasserprobe Sedimentprobe	Rohextrakt Sediment	2	
E00-4	<i>Acanthella acuta</i>	Wasserprobe	Rohextrakt Plattierung	4	alle Medien
E00-5	<i>Oscarella lobularis</i>	Wasserprobe Sedimentprobe	Rohextrakt Sediment Plattierung	4	alle Medien
E00-6	<i>Haliclona valliculata</i>	Wasserprobe	Rohextrakt Plattierung	1	alle Medien
E00-7	<i>Hamigera hamigera</i>	Wasserprobe Sedimentprobe	Rohextrakt Sediment Plattierung	3	alle Medien
E00-8 A+E	<i>Chondrosia reniformis</i>	Wasserprobe	Rohextrakt Plattierung	3	alle Medien
E00-9	<i>Aplysina cavernicola</i>	Wasserprobe Sedimentprobe	Rohextrakt Sediment Plattierung	2	alle Medien
E00-12	<i>Axinella verrucosa</i>	Wasserprobe Sedimentprobe	Rohextrakt Sediment Plattierung	2	alle Medien
E00-13	<i>Ircinia fasciculata</i>	Wasserprobe Sedimentprobe	Rohextrakt Sediment	2	
E00-16	<i>Hemimycale columella</i>	Wasserprobe Sedimentprobe	Rohextrakt Sediment	3	
E00-17	<i>Axinella damicornis</i>	Wasserprobe Sedimentprobe	Rohextrakt Sediment	3	
E00-25	<i>Ircinia spinosula</i>	Wasserprobe Sedimentprobe	Rohextrakt Sediment	2	

Um den Kultivierungserfolg von tiefgekühlten, mit Glycerin behandelten Proben zu ermitteln, wurde Rohextrakt der Probe E00-8 *Chondrosia reniformis* in der Probenserie E00-8A als Kontrolle ohne Zugabe von Glycerin zur Plattierung verarbeitet und in der Probenserie E00-8E nach Zugabe von Glycerin und eintägiger Lagerung bei -20°C.

3. Material und Methoden

Von der Firma Amersham Pharmacia Biotech Inc. (Piscataway, NJ, USA) sind Ready-to-go-PCR-Beads, dNTPs, TRIS und EDTA bezogen worden. Polymerase mit Puffer stammte von New England Biolabs Inc. (Beverly, MA, USA). Die Firma FLUKA Chemie GmbH (Buchs, CH) lieferte Chemikalien für die Medien und für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH), das DNA-freie Wasser und Ethidium-Bromid. Primer wurden von MWG Biotech AG (Ebersberg) und FISH-Sonden von der Firma Thermo Hybaid (Ulm) hergestellt. Es wurde der Molekulargewichtsmarker X von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) verwendet. Von der Firma Merk (Darmstadt) wurden neben Chemikalien zum Ansatz der Medien auch Ethanol, Formaldehyd zur Fixierung der Proben für die Rasterelektronenmikroskopie und Formamid und Acrylamid für die Herstellung von DGGE-Gelen verwendet. Agar und Komplexbestandteile der Medien wurden von Difco Laboratories (Detroit, MI, USA) geliefert, weitere Komplexbestandteile von der Firma Becton-Dickinson Microbiology Systems (Cockeysville, MD, USA). Agarose wurde bei Biozym (Hess. Oldendorf) bestellt und das Gas für die Gaschromatographie und Rasterelektronenmikroskopie von Messer-Griesheim (Osterholz-Scharmbeck) bezogen.

Die Bestandteile der eingesetzten Medien, Reagenzien und Lösungen sind grundsätzlich im höchsten verfügbaren Reinheitsgrad eingesetzt worden, mindestens aber im Reinheitsgrad zur Analyse. Die Rezepte der Lösungen sind im Anhang im Kapitel A 2 „Rezepte der Medien und Reagenzien“ aufgeführt.

Der Einsatz von Geräten und als Zubehör bestellten Reagenzien sowie die Verwendung von Arbeits-Kits ist unter Angabe der Hersteller in den einzelnen Kapiteln aufgeführt und beschrieben.

3.1 Molekularbiologische Methoden

Die Phylogenie befaßt sich mit der Rekonstruktion von Verwandtschaftsbeziehungen der Organismen. Sie geht dabei von der einfachen Annahme aus, daß neue Species aus vorhandenen entstehen, was in einem phylogenetischen Baum dargestellt werden kann. Organismen, die über die gleichen Fähigkeiten verfügen, sind demnach verwandt, da sie von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen. Der Erwerb von Fähigkeiten durch lateralen Gentransfer wird dabei nicht berücksichtigt und stellt eine der Grenzen der phylogenetischen Methoden dar. Die Untersuchung der Verwandtschaftsbeziehungen kann auf dem Vergleich von makromolekül-bildenden Nucleotiden und Protein basieren, wird jedoch meist in Form von ribosomalen DNA-(rDNA)-Gen-Bäumen dargestellt. Ribosomen sind Zellorganellen aus ribosomaler RNA (rRNA) und globulären Proteinen, die in allen lebenden Zellen vorkommen. In stoffwechselaktiven Zellen ist eine Vielzahl von Ribosomen vertreten, an denen die Translation stattfindet, also die Umsetzung der auf Boten-Ribonucleinsäuren (mRNAs) kopierten Erbinformation in die dadurch definierte Folge von Aminosäuren. Ribosomen sind die Zentren der Proteinsynthese einer Zelle und bestehen aus zwei Untereinheiten. In Bakterienzellen kommen nur freie Ribosomen vor, die einen Sedimentationskoeffizienten von 70S aufweisen und sich aus einer großen 50S- und einer kleinen 30S-Untereinheit zusammensetzen. Die in der Stammbaumanalyse häufig untersuchte 16S rRNA ist eine Sequenz aus der kleinen Untereinheit der Ribosomen und wird vom 16S rDNA-Gen codiert. Es zeigt sich beim Vergleich verschiedener rDNAs, daß bestimmte Abschnitte auf den Genen hoch konserviert, andere Regionen aber ordnungs-

oder gattungsspezifisch sind und einige Sequenzbereiche von Species zu Species variieren (Abbildung 12 „Sekundärstruktur der 16S rDNA von *Streptomyces coelicolor*“).

Dieses Muster aus unterschiedlich konservativen Bereichen bildet die Grundlage der Verwendung der 16S rDNA in der Phylogenie und ermöglicht die Herstellung unterschiedlich spezifischer Werkzeuge, wie Primer und Sonden, die ihrerseits die Voraussetzung für eine Untersuchung der Diversität in einem ökologischen Zusammenhang ist (Giovannoni und Rappé 2000).

3.1.1 DNA-Extraktion

Um eine Identifikation der schwamm-assoziierten Bakterien auf Basis ihrer ribosomalen RNA vorzunehmen und Aussagen über ihre Diversität machen zu können, wird zunächst die chromosomale DNA, auf der sich die Gene (rDNAs) der ribosomalen RNA befinden, extrahiert. Da mit Isolaten, Schwamm-Rohextrakten, Sedimentproben und Filtern der Wasserproben unterschiedliche Ausgangsmaterialien vorlagen und die Wahl unterschiedlicher DNA-Extraktionsmethoden das Ergebnis der nachfolgenden Untersuchungen beeinflussen kann (Muyzer und Smalla 1998), erfolgten die Extraktionen standardmäßig mit dem QIAamp® DNA Mini Kit der Firma QIAGEN Inc. (Valencia, CA, USA) nach dem Arbeitsprotokoll für Gram-positive Bakterien.

Die DNA-Extraktion mit Hilfe dieses Kits erfolgt über die Freilegung der DNA aus den Zellen mit Hilfe mehrerer Lysis-Schritte und ihre anschließende Bindung an eine Silikat-Gel-Membran. Durch verschiedene Wasch- und Zentrifugationsschritte werden störende Zell- oder Probenbestandteile, wie z.B. Proteine, entfernt. Mit einer letzten Zentrifugation wird die gereinigte DNA in einem Elutionspuffer von der Membran gewaschen und steht nachfolgenden Untersuchungen zur Verfügung.

Für die DNA-Extraktion aus Isolaten und Schwamm-Rohextrakten wurde jeweils 1 ml Probe eingesetzt, wobei es sich bei den Isolaten um 1 ml einer gut gewachsenen Flüssigkultur handelte. Für die Extraktion aus Sedimentproben wurden 500 µl Ausgangsmaterial verwendet. Für die Untersuchung der Wasserproben wurde jeweils ein halber Filter verwendet, durch den zuvor 1 Liter Wasserprobe filtriert worden war. Eluiert wurden alle Proben mit 200 µl Elutionspuffer.

3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die von Mullis *et al.* 1986 entwickelte Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die spezifische Vermehrung von DNA, indem ein Sequenzabschnitt mit einer thermostabilen DNA-Polymerase in einem zyklischen Prozeß vervielfältigt wird. Da für die Reaktion kurze DNA-Fragmente als Startpunkte benötigt werden, müssen die flankierenden Sequenzen des gewünschten DNA-Abschnittes bekannt sein. Diese „Start“-Fragmente werden als Primer bezeichnet und haben meist eine Länge von 15 bis 30 Basen. Sie binden an eine für die jeweilige Organismengruppe spezifische Region der DNA.

Das Ausgangsmaterial für die PCR ist die in Lösung befindliche DNA, welche die zu vermehrende DNA-Sequenz enthält. Es erfolgt die Zugabe der thermostabilen DNA-Polymerase, der vier Nucleotide (dNTPs), die als Bausteine für die neu zu synthetisierende DNA dienen, und der Primer, die komplementär zu den Enden der Zielsequenz sind. Die DNA wird zunächst durch kurzes Erhitzen (30 sec bei 94°C) denaturiert und in ihre Einzelstränge zerlegt. Anschließend wird sie abgekühlt, damit die Primer in der Hybridisierungsphase (Annealing, z.B. 40 sec bei 50°C) über Wasserstoffbrücken an die komplementären Sequenzen an den Enden der Ziel-DNA binden können. Dabei bindet jeder Primer an einem Strang. Nun folgt die Synthesephase (Elongation, 40 sec bei 72°C), in der die DNA-Polymerase die Primer durch Anhängen von Nucleotiden verlängert, indem sie den längeren Strang als Vorlage benutzt. Am Ende der Synthesephase wird die Probe wieder auf 94°C erhitzt und es beginnt ein neuer Zyklus von Denaturierung, Hybridisierung und Synthese. Die PCR ist eine Methode zur schnellen, exponentiellen Vervielfältigung von DNA und hat den Vorteil, daß auch die Bearbeitung von in Kleinstmengen vorliegender DNA möglich wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde die 16S rDNA des Bakterienchromosoms untersucht, die in ihrer Struktur unterschiedlich konservative Bereiche aufweist. Das Auftreten dieser hochkonservativen, semikonservativen und hochvariablen Genregionen bildet die Voraussetzung für spezifische Amplifikationen. Ein Vergleich von Proben-Sequenzen und Datenbank-Sequenzen des Gens ermöglicht Aussagen über die taxonomische Einordnung und die Verwandtschaftsbeziehungen der untersuchten Sequenzen. Wie in Abbildung 13 dargestellt, weisen bestimmte Abschnitte des 16S rDNA-Fragmentes innerhalb der Actinobakterien ausreichend Variationen auf, um für eine spezifische Amplifikation auf Gattungs- (alpha- und beta-Region) und Speciesebene (gamma-Region) geeignet zu sein (Anderson und Wellington 2001). Bei der Arbeit mit 16S rDNA muß jedoch beachtet werden, daß eine artspezifische Amplifikation erreicht werden kann, eine stammspezifische jedoch in der Regel nicht (Anderson und Wellington 2001).

Es wurde standardmäßig nach der DNA-Extraktion bei allen Proben (Schwammprobe, Sedimentprobe, Wasserprobe oder Isolat) zunächst eine Amplifikation mit universellen Eubakterien-Primern durchgeführt. Diese amplifizieren spezifisch ein ca. 1400 Basenpaare (bp) langes Fragment der bakteriellen 16S rDNA. Die auf diese Weise gewonnenen bakteriellen DNA-Fragmente wurden gereinigt und dienten als Template für weitere Amplifikationen mit spezifischen Primern.

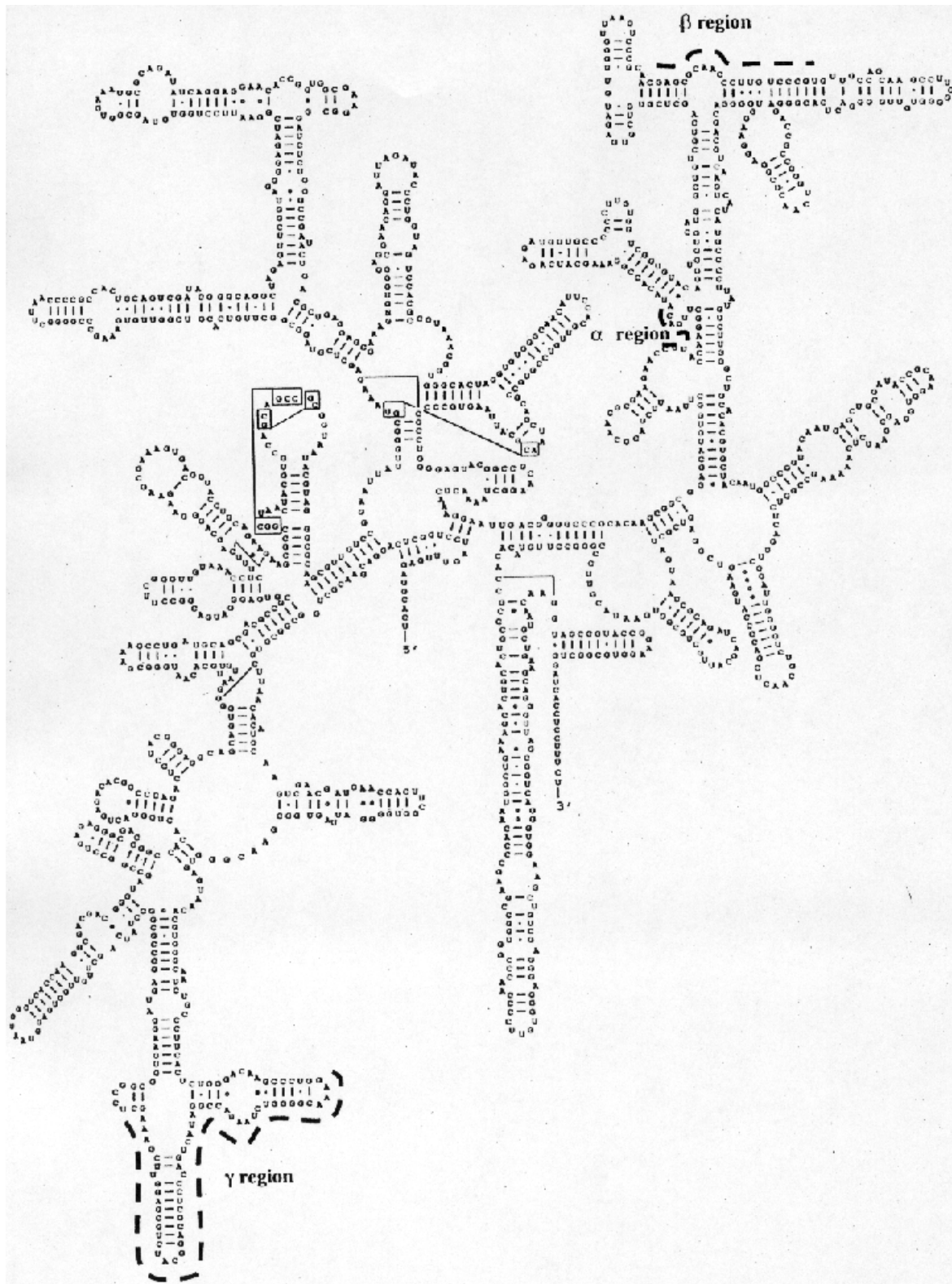


Abbildung 13. Sekundärstruktur der 16S rDNA von *Streptomyces coelicolor*. Die Sequenzen der variablen Regionen α , β und γ ermöglichen den Nachweis der Gattung *Streptomyces* und entsprechen den Nucleotiden 982 - 998, 1102 - 1122 und 158 - 203. (aus Anderson und Wellington 2001)

Tabelle 14. Verwendete Primer.

Method	Primerbezeichnung	Sequenz (5'® 3')
Eubakterielle Voramplifikation	5' Start	GTT TGA TCM TGG CTC AG
	3' 1387	CGG GCG GTG TGT ACA AGG
Actinobakterien-spezifische Amplifikation	5' 243	GGA TGA GCC CGC GGC CTA
	3' 1387	CGG GCG GTG TGT ACA AGG
Streptomyceten-spezifische Amplifikation	5' 149	CAA GCC CTG GAA ACG GGG
	3' 1135	GTC CCC AGC ACC ACA AGG
Variationen der Actinobakterien- und Streptomyceten-spezifischen Primer	5' 149	CAA GCC CTG GAA ACG GGG
	3' 1387	CGG GCG GTG TGT ACA AGG
	5' Start	GTT TGA TCM TGG CTC AG
	3' 1135	GTC CCC AGC ACC ACA AGG
Cytophagen-spezifische Amplifikation	5' Start	GTT TGA TCM TGG CTC AG
	3' Cyt1020	CAT TTA AGC CTT GGT AAG G
Amplifikation für DGGE	5' 342+GC	[CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G]* CCT ACG GGA GGC AGC AG
	3' 534	ATT ACC GCG GCT GCT GG
Amplifikation für Klonierung	5' 243	GGA TGA GCC CGC GGC CTA
	3' 1387	CGG GCG GTG TGT ACA AGG
Screening nach Klonierung	M13F	GTA AAA CGA CGG CCA G
	M13R	CAG GAA ACA GCT ATG AC
Sequenzierung der Isolate	5' Start	GTT TGA TCM TGG CTC AG
	5' 149	CAA GCC CTG GAA ACG GGG
	5' 243	GGA TGA GCC CGC GGC CTA
	5' 534	CCA GCA GCC GCG GTA AT
	5' 907	AAA CTC AAA GGA ATT GAC
	3' 534	ATT ACC GCG GCT GCT GG
	3' 907	GTC AAT TCC TTT GAG TTT
	3' 1135	GTC CCC AGC ACC ACA AGG
	3' 1387	CGG GCG GTG TGT ACA AGG
Sequenzierung der Klone	5' 243	GGA TGA GCC CGC GGC CTA
	5' 534	CCA GCA GCC GCG GTA AT

* [] markiert Anfang und Ende der GC-Klammer

Die PCR wurde für unterschiedliche Zielbereiche der DNA mit unterschiedlichen Primern (siehe Tabelle 14 „Verwendete Primer“) und Polymerasen durchgeführt. Mit Ausnahme der Primer 5'342+GC und 3'534 von Muyzer *et al.* (1993), M13F und M13R der Firma Invitrogen (als Bestandteil des TOPO TA Cloning Kits) und des Primers 5'243 von Heuer *et al.* (1997) sind alle verwendeten Primer von Mitarbeitern der Abteilung Mikrobielle Ökologie des Instituts für Meereskunde entwickelt worden.

Die Amplifikation mit eubakteriellen Primern erfolgte mit der Vent_r® (exo⁻) DNA Polymerase der Firma New England Biolabs Inc. (Beverly, MA, USA), dem mitgelieferten ThermoPol Reaktionspuffer, dem DNA Polymerization Mix (dNTPs) der Firma Amersham Pharmacia Biotech Inc. (Piscataway, NJ, USA) und DNA-freiem Wasser. Für diesen Amplifikationstyp wurde ein Gesamtvolumen von 50 µl in eine „Touchdown“-PCR eingesetzt. Der Vorteil der „Touchdown“-PCR liegt darin, daß durch ein schrittweises Absenken der Annealing-Temperatur in den Bereich der

Bindungstemperatur der Primer (-1.0°C pro Zyklus) in den ersten Zyklen nur geringe Mengen des Produktes synthetisiert werden, dessen Sequenz im Primerbereich exakt komplementär zu der Sequenz der Primer ist. Die Folge ist eine erhöhte Spezifität und die Minimierung der Bildung unerwünschter Nebenprodukte. Liegen die spezifischen PCR-Produkte dieser ersten Zyklen in ausreichender Anzahl als Vorlage für die folgenden Zyklen vor, schließt sich eine Abfolge von Denaturierung-Annealing-Elongation-Zyklen bei Bindungstemperatur der Primer (im Annealing) an, um eine hohe Ausbeute an Kopien der Ziel-DNA zu erhalten. Abschließend werden in der finalen Extension eventuell abgebrochene Produkte durch ein Annealing bei sehr niedriger Temperatur (40°C) und einer langen Elongationsphase (5 min) aufgefüllt.

Die Amplifikation für die DGGE wurde ebenfalls mit der Vent_R® (exo⁻) DNA Polymerase, jedoch ohne „Touchdown“ durchgeführt.

Für die Voramplifizierung mit eubakteriellen Primern und die Amplifikation für die DGGE wurde aus den verschiedenen PCR-Komponenten zunächst ein Mastermix bestehend aus Polymerase, dNTPs, Primern, Puffer und Wasser hergestellt, der portionsweise auf die Reaktionsgefäße verteilt wurde. In jedes Reaktionsgefäß wurde separat das DNA-Template pipettiert und das Gefäß anschließend kurz zentrifugiert (5 sec 2000 rpm), um Tröpfchen von den Rändern zu entfernen.

Die einzelnen Reaktionen waren wie folgt zusammengesetzt:

DNA-freies Wasser	40,5 µl
ThermoPol Puffer	5,0 µl
dNTP's	0,5 µl
Primer 1 (10 pmol/µl)	1,0 µl
Primer 2 (10 pmol/µl)	1,0 µl
Vent _R ® (exo ⁻) DNA Polymerase	1,0 µl*
<u>Template</u>	<u>1,0 µl</u>
Reaktionsvolumen	50,0 µl

* 1 µl Vent_R® (exo⁻) DNA Polymerase entspricht 2 units
(1 unit = Einbau von 10 nmol dNTP bei 75°C in 30 min in 1x Puffer)

Für die Amplifizierung mit spezifischen Primern wurden Ready-to-go™ PCR Beads der Firma Amersham Pharmacia Biotech Inc. eingesetzt, die neben der Taq-Polymerase bereits fast alle Bestandteile für die PCR enthalten (dNTPs, Puffer, BSA, MgCl₂). Es müssen nur noch DNA-freies Wasser, Primer und Template zugegeben werden. Das Gesamtvolumen der Reaktionen betrug 25 µl und war wie folgt zusammengesetzt:

DNA-freies Wasser:	22 µl
Primer 1 (10 pmol/µl)	1,0 µl
Primer 2 (10 pmol/µl)	1,0 µl
<u>Template</u>	<u>1,0 µl</u>
Reaktionsvolumen	25,0 µl

Für die Herstellung eines Standards für die DGGE wurde eine Mittelmeerprobe mit Cytophagen-spezifischen Primern unter Verwendung des „Touchdown“-Programmes (siehe Tabelle

15 „Amplifikationsbedingungen“) amplifiziert. Alle anderen spezifischen Amplifikationen wurden nach der Zentrifugation ohne „Touchdown“ direkt mit einer Abfolge von Zyklen mit Annealing-Temperaturen im Bereich der Primer-Bindungstemperaturen durchgeführt.

Da bei der Anwendung des TOPO TA Cloning Kit der Firma Invitrogen die Verwendung einer Taq-Polymerase notwendig ist, wurde die der Klonierung vorangehende PCR-Reaktion mit den Ready-to-go™ PCR Beads, dem spezifischen 5'Primer 5`243 und dem universellen 3'Primer 3`1387 durchgeführt.

Tabelle 15. Amplifikationsbedingungen.

Amplifikation	Zyklusanzahl	Annealing		Elongation		Denaturierung	
		Temp.	Zeit	Temp.	Zeit	Temp.	Zeit
Eubakterielle Voramplifikation mit Touchdown von 60 auf 40°C	1					94°C	2 min
	15	60-45°C	30 sec	72°C	40 sec	94°C	30 sec
	25	50°C	30 sec	72°C	40 sec	94°C	30 sec
	1	42°C	60 sec	72°C	5 min		
Actinobakterien-spezifische Amplifizierung	1					94°C	2 min
	29	63°C	40 sec	72°C	60 sec	94°C	30 sec
	1	42°C	60 sec	72°C	5 min		
Streptomyceten-spezifische Amplifizierung	1					94°C	2 min
	29	60°C	40 sec	72°C	40 sec	94°C	30 sec
	1	42°C	60 sec	72°C	5 min		
Cytophagen-spezifische Amplifikation	1					94°C	2 min
	15	65-50°C	40 sec	72°C	40 sec	94°C	30 sec
	20	50°C	40 sec	72°C	40 sec	94°C	30 sec
	1	42°C	60 sec	72°C	5 min		
Amplifikation für DGGE	1					94°C	2 min
	25	50°C	40 sec	72°C	40 sec	94°C	30 sec
	1	42°C	60 sec	72°C	5 min		
Screening nach Klonierung	1					94°C	2 min
	25	55°C	30 sec	72°C	50 sec	94°C	30 sec
	1	42°C	60 sec	72°C	5 min		
Cycle Sequencing	1					94°C	2 min
	99	50°C	15 sec	60°C	4 min	96°C	30 sec

Nach Beendigung der in Tabelle 15 dargestellten Programme wurden die Reaktionsgefäße automatisch auf 4°C gekühlt. Alle Amplifikationen erfolgten in Progene-Thermocyclern der Firma Techne (Cambridge, UK).

Bei jedem PCR-Ansatz wurden Positiv- und Negativ-Kontrollen durchgeführt und das Ergebnis in einem 2%igen Agarosegel überprüft. Die Produkte wurden entweder sofort zur weiteren Untersuchung gereinigt (siehe Abschnitt 3.1.4 „Reinigung von PCR-Produkten“) oder zur Lagerung bei -20°C eingefroren.

3.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Durch das Anlegen einer Spannung wandern in ein Agarosegel aufgetragene DNA-Fragmente von der Kathode zur Anode, wobei ihre Geschwindigkeit in erster Linie von ihrer Ladung und Größe bestimmt wird. Bei Nucleinsäuren ist die Wanderungsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zur Länge der Nucleinsäure-Fragmente. Sie tragen zwar um so mehr negative Ladungen je länger das Fragment ist, aber das Gel wirkt als Molekularsieb und behindert die Wanderung längerer Fragmente

stärker als die kürzeren, so daß sie in der gleichen Zeit eine wesentlich kürzere Strecke im Gel durchwandern (Campbell 1997). Ein Farbmaler, mit dem jede Probe versetzt wird, markiert das Ende des Laufes. Das Gel wird zur Auswertung mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Ethidium-Bromid, Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH) angefärbt, der direkt in die DNA-Doppelhelix bindet und die DNA bei Anregung mit UV-Licht sichtbar macht. Ob die erhaltene Bande das gewünschte PCR-Produkt ist, läßt sich über den Vergleich mit einem Längenmarker (DNA Molecular Weight Marker X, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim,) ermitteln.

Zur Überprüfung des Erfolges einer PCR-Reaktion oder einer Reinigung wurden 3 µl des Produktes mit 3 µl der Farbmaler vermischt und in die Taschen eines 2%igen Agarosegels pipettiert (siehe Anhang „Rezepte der Medien und Reagenzien“). 1 µl des Längenmarkers wurde mit 2 µl H₂O und 3 µl Farbmaler vermischt und ebenfalls aufgetragen. Gele bis 16 Proben wurden in einer Elektrophoresekammer der Firma Herolab GmbH (Wiesloch) und Gele bis 40 Proben in einer Wide Mini-Sub® Cell GT-System-Elektrophoresekammer (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA) gestartet. Ein 2197 Power Supply der Firma Pharmacia LKB Biotechnology (Uppsala, S) legte eine Spannung von 200 V für 15 min an. Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel 15 min in einer wäßrigen Ethidium-Bromid-Lösung (1.3 µmol/l H₂O) angefärbt, durch kurzes Schwänken im Wasserbad von überschüssigem Ethidium-Bromid befreit und auf einem UV-Transilluminator ausgewertet. Die digitale Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer CCD-Kamera des BioDoc II Systems von Biometra. Die Bilder wurden direkt mit einem Thermosublimationsdrucker gedruckt oder als Bilddatei gespeichert und später mit einem geeigneten Programm (COREL PHOTO PAINT, PHOTOSHOP) geöffnet und bearbeitet.

3.1.4 Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem QIAquick DNA-Purification-Kit der Firma QIAGEN Inc. (Valencia, CA, USA), der wie der Extraktions-Kit auf der Bindung der DNA an die Silikat-Gel-Membranen von Zentrifugations-Röhrchen beruht. Alle nötigen Reagenzien sind im Lieferumfang enthalten und die Prozedur besteht ähnlich wie bei der Extraktion aus einem Bindungsschritt, mehreren Wasch- und Zentrifugationsschritten und einer abschließenden Eluierung der DNA in 30 µl Elutionspuffer. Die eluierte, gereinigte DNA wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei -20°C gelagert oder direkt in weitere Reaktionen eingesetzt.

3.1.5 Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)

Die Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE) ermöglicht das Auftrennen von DNA-Fragmenten gleicher Länge aufgrund ihres Denaturierungsverhaltens. Sequenzunterschiede der DNA-Fragmente führen zu unterschiedlichem Schmelzverhalten und damit zu einer unterschiedlichen Auftrennung im Gel (Muyzer *et al.* 1993), wobei sich besonders Unterschiede in den A-T- und G-C-Gehalten auswirken. Die DNA-Doppelhelix wird durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen in einer A-T- und mit drei Wasserstoffbrückenbindungen in einer G-C-Paarung verbunden. Durch die zusätzliche Bindung in der G-C-Paarung ist diese insgesamt stärker und weist eine höhere Schmelzstabilität auf.

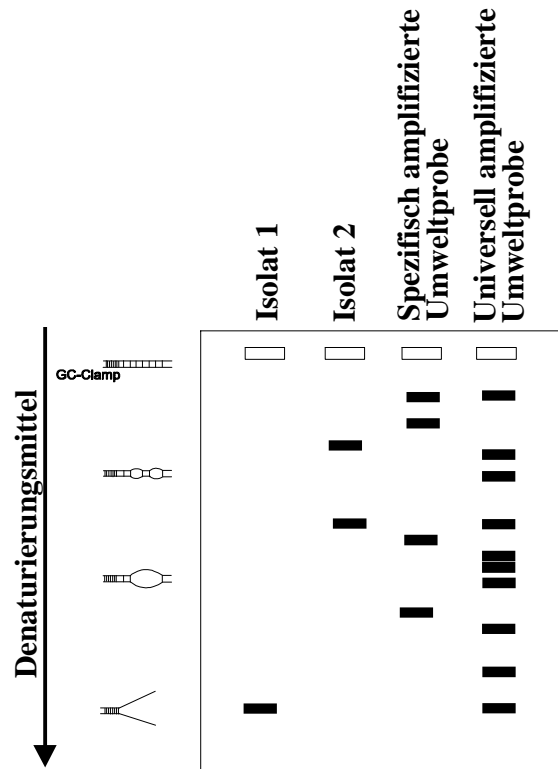


Abbildung 14. Funktionsprinzip der DGGE. DNA-Fragmente werden aufgrund ihres unterschiedlichen Schmelzverhaltens in einem linearen Denaturierungsgradienten getrennt. (modifiziert nach Söling und Petri 1998)

Aufgrund des unterschiedlichen Schmelzverhaltens der DNA-Fragmente variiert auch die Geschwindigkeit ihrer Wanderung durch das Gel, so daß die DNA-Fragmente an unterschiedlichen Stellen im Gel in ihrer Wanderung zum Stillstand kommen. Bei seinem Lauf vom niedrigeren zum höheren Denaturierungsmittelgehalt im Gel beginnt sich das doppelsträngige Fragment an den Stellen niedrigster Schmelzstabilität aufzutrennen, der Doppelstrang denaturiert an diesen Stellen zu Einzelsträngen, und das Fragment büßt aufgrund seiner veränderten Struktur Wanderungsgeschwindigkeit ein (Muyzer *et al.* 1993; Muyzer und Smalla 1998). Mit der Erhöhung des Gehaltes an Denaturierungsmittel trennen sich die Stränge immer weiter auf, bis sich auch die Bereiche höchster Schmelzstabilität lösen. Da bei einer vollständigen Trennung des Doppelstranges die Mobilität der Einzelstränge schlagartig erhöht wird und sie aus dem Gel herauswandern könnten, wird der Doppelstrang in einem Amplifikationsschritt vor der DGGE mit einer hochgradig schmelzstabilen GC-reichen Region (GC-Klammer) versehen (Muyzer und Smalla 1998). Sie hält die beiden Einzelstränge zusammen, das Fragment kann durch die resultierende Y-Struktur im Gel nicht mehr weiter wandern und ermöglicht eine Trennung und Detektion der Sequenzvarianten in der Probe (Muyzer und Smalla 1998). Das Ergebnis ist die direkte Visualisierung der dominant in einer Probe vorhandenen DNA und damit der vorherrschenden Bakteriengruppen in der beprobten mikrobiellen Gemeinschaft (Muyzer *et al.* 1995; Muyzer und Smalla 1998). Durch Sequenzierung der Banden kann eine Identifizierung dieser Gruppen erreicht werden (Muyzer *et al.* 1993; Muyzer und Smalla 1998) und eine qualitative und semiquantitative Aussage über die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft getroffen werden (Muyzer *et al.* 1993).

Bei den verwendeten Gelen handelte es sich um Polyacrylamidgele, bei den Denaturierungsmitteln um Harnstoff und Formamid, wobei 42 g Harnstoff und 40 ml Formamid einer 100 % denaturierenden Lösung entsprechen.

Die Gele wurden in einem Gießstand zwischen zwei vorher fixierte und seitlich abgedichtete Glasplatten gegossen. Die verwendeten Glasplatten sind mit SDS und Ethanol gereinigt und die dem Gel zugewandte Seiten mit 140 µl Repel-Silan überzogen worden. Für den jeweiligen Probenotyp muß die in der Literatur ausführlich beschriebene Methode (Heuer *et al.* 1997; Muyzer *et al.* 1993; Muyzer *et al.* 1995; Muyzer und Smalla 1998) in Laufdauer, angelegter Spannung und Gradient angepaßt werden (Muyzer und Smalla 1998). Für die Trennung der bakteriellen Diversität aus Schwammextrakten wurden jeweils 18 ml der hoch- und niedrig-denaturierenden Komponente eingesetzt, wobei es sich um einen Denaturierungsmittelgradienten von 20 - 80 % handelte, der von einem Acrylamidgradienten (6 - 8 %) in gleicher Orientierung überlagert wurde. Man spricht in solchen Fällen von Doppelgradientengelen (DG-DGGE) (Petri und Imhoff 2001).

Tabelle 16. Zusammensetzung der gradientenbildenden Lösungen für die DGGE.

Bestandteil	80 % Denaturierungsmittelgehalt 8 % Acrylamidgehalt	20 % Denaturierungsmittelgehalt 6 % Acrylamidgehalt
Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1	20,0 ml	15,0 ml
Harnstoff	33,6 g	8,4 g
Formamid	32 ml	8 ml
TAE 50x	1,0 ml	1,0 ml
Milli-Q	ad 100 ml	ad 100 ml

Um einen gleichmäßigen Gradienten des Denaturierungsmittels im Gel zu erreichen, wurde ein Gradientenmischer (Modell GM 040, C.B.S. Cientific, Del Mar, CA, USA) mit zwei kommunizierenden Röhren verwendet.

Die Polymerisation des Acrylamids wurde durch Zugabe von jeweils 140 µl 20%igem Ammoniumperoxodisulfat (APS) und 6 µl N;N;N;N-Tetramethylethylendiamin (TEMED) bereits im Gradientenmischer gestartet. Zur Sicherstellung der vollständigen Polymerisation der Gele härteten diese mindestens 5 Stunden aus bevor die Proben aufgetragen wurden.

Durchgeführt wurde die DGGE in einer Laufkammer der Firma C.B.S. Scientific (Del Mar, CA, USA), Model DGGE 2001, die mit 0,5x TAE-Puffer (20mM Tris, 20 mM NaAc, 2 mM EDTA, pH 7,8) befüllt wurde. Der Lauf erfolgte für 14 Stunden bei 60°C und 80 V (Power Pac 300, BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA) über Nacht. Ein Umwälzthermostat (Modell 71 CBS, C.B.S. Scientific, Del Mar, CA, USA) gewährleistete dabei die gleichmäßige Durchmischung und Temperatur des Puffers im Tank.

Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit einem gefärbten Laufpuffer versetzt, der ihr spezifisches Gewicht erhöhte und sie in die Geltaschen einfüllbar machte. Als Standards wurden Amplifikate eines Isolates aus *Halichondria panicea* aus der Ostsee (HO-2a21, amplifiziert mit universellen Primern), eines Referenzstammes (DSMZ-Nr. 40233 *Streptomyces coelicolor*, amplifiziert mit spezifischem Primer für Actinobakterien) und einer Bakteriengemeinschaft einer Wasserprobe aus dem östlichen Mittelmeer (Meteor M44/4 1999, Station 239/1200 m, amplifiziert mit spezifischen Primern für Cytophagen) verwendet. Die Gele wurden mit 20 µl PCR-Produkt vermischt mit 6 µl Laufpuffer beschickt. Nach dem Lauf wurden sie 30 min in einer Ethidium-Bromid-Lösung angefärbt, weitere 30 min im Aqua dest.-Bad von überschüssigem Ethidium-Bromid befreit und auf einem UV-Leuchttisch ausgewertet und dokumentiert.

3.1.6 Klonierung

Die Klonierung ist die Erzeugung eines Klons definierter DNA-Sequenz aus einer großen Anzahl unterschiedlicher DNA-Fragmente und kann als Vervielfältigung einer Kombination von DNA zweier verschiedener Organismen, sogenannter rekombinanter DNA, durch einen Wirtsorganismus verstanden werden. Die Vervielfältigung erfolgt, indem ein gewünschter DNA-Abschnitt an einer bestimmten Stelle (multiple cloning site) in ein Plasmid über Ligation integriert und diese Mischung dann in zur Aufnahme von Plasmiden befähigte (kompetente) Wirtszellen eingeschleust wird. Meist werden dabei Bakterienzellen als Wirte genutzt, weil die Isolation ihrer DNA und die Rückführung rekombinanter DNA in die Zellen vergleichsweise einfach ist. Das Plasmid dient als Transportvehikel für die Ziel-DNA in den Wirt und wird als Vektor bezeichnet (Campbell 1997). Der in dieser Arbeit verwendete Vektor beinhaltet ein Gen, das zum Absterben der Wirtszelle führt. Wird die Ziel-DNA korrekt in das Plasmid eingebaut, wird das Gen unterbrochen und seine Expressierung verhindert. Der Wirt, eine *Escherichia coli*-Zelle, stirbt nicht ab, sondern vermehrt sich und die rekombinante DNA. Dieses Verfahren hat den Vorteil, daß unter den plasmid-tragenden Zellen nur die positiv rekombinanten lebensfähig sind und ein aufwendiges Screening auf Antibiotikaresistenzen der Kolonien unnötig wird.

Um das Wachstum ausschließlich plasmid-tragender Zellen zu gewährleisten, tragen die Vektoren ein Gen für eine Resistenz gegen die Antibiotika Kanamycin und Ampicillin. Durch ein Ausplattieren der Zellen auf Kanamycin/Ampicillin-haltigen Nährboden können nur solche Bakterien mit dem eingeschleusten Vektor auf den Platten wachsen. Ferner verfügt der Vektor über einzelne überhängende 3'Desoxythymidine, so daß PCR-Produkte, die durch eine Amplifikation mit einer Taq-Polymerase entstanden sind und einzelne überhängende Desoxyadenosine aufweisen, eine effiziente Ligation mit dem Vektor erfahren. Überhängende Enden von DNA-Abschnitten, die aufgrund von Template-unabhängiger terminaler Transferase-Aktivität entstehen, werden auch als „sticky ends“ bezeichnet. Einen weiteren Mechanismus zur Sicherung des störungsfreien Einbaus der Ziel-Sequenz in den Vektor stellt die kovalente Bindung der aus dem *Vaccinia*-Virus gewonnene Topoisomerase I mit dem Phosphat am 3'Ende eines jeden DNA-Stranges dar. Diese Bindung kann von der OH-Gruppe am 5'Ende eines PCR-Produktes angegriffen und gelöst werden, was eine Ligation der beiden Vektorenden verhindern und den spezifischen Einbau der Ziel-DNA begünstigen soll (Instruktions-Handbuch TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen). Eine Übersicht des Funktionsprinzips des verwendeten Klonierungs-Kits gibt Abbildung 14.

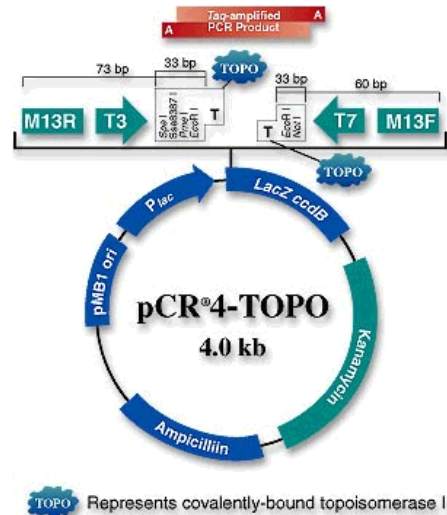


Abbildung 15. Funktionsprinzip der Klonierung mit dem TOPO TA Cloning Kit. (www.invitrogen.com)

Die Klonierungsexperimente wurden mit dem TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing Version E2 der Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA durchgeführt. Der Lieferumfang des Kits beinhaltet neben Vektor und Wirt auch Salzlösung, SOC-Medium, steriles Wasser sowie 2 Primerpaare für das anschließende Screening.

Nach der Amplifikation und Aufreinigung der PCR-Produkte ausgewählter Proben erfolgte zunächst die Ligation. Dazu wurde jedes PCR-Produkt in folgender Weise mit Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂) und dem Vektor vorsichtig vermischt und 30 min bei Raumtemperatur (22°C) inkubiert:

PCR-Produkt	4 µl
Salzlösung	1 µl
<u>TOPO-Vektor</u>	<u>1 µl</u>
Summe	6 µl

Zur Transformation, d.h. zur Aufnahme der rekombinanten DNA durch die Wirtszellen, wurden je Probe 2 µl der Ligations-Mischung in ein Reaktionsgefäß mit kompetenten Zellen des Wirts *E. coli* gegeben, vorsichtig mit der Pipettenspitze verrührt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 30 sec einem Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad ausgesetzt und für 2 min auf Eis gebracht. Es folgte die Zugabe von 250 µl auf Raumtemperatur gebrachtes SOC-Medium und die einstündige Inkubation bei 37°C auf einem Horizontalschüttler. Nach der Inkubation wurden die Zellen auf LB-Kanamycin-Agarplatten ausplattiert, wobei für jede Probe 5 Platten mit 50 µl der Zellsuspension und 5 Platten einer 1:5 - Verdünnung (10 µl Zellsuspension + 40 µl SOC-Medium) angelegt wurden. Die zwei verschiedenen Quantitäten wurden gewählt, um zu gewährleisten, daß nach 24 Stunden Bebrütung bei 37°C Platten mit ca. 100 bis 300 Kolonien zur Zellernte vorliegen. Dabei muß es sich um Platten handeln, von denen einzelne Kolonien abgenommen („gepickt“) werden können, die aus einer Ausgangszelle entstanden sind und somit einem Klon entsprechen. Die Zellen einzeln liegender Kolonien wurden mit der Spitze einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in einem 0,5 ml-Reaktionsgefäß in 50 µl DNA-Freiem Wasser resuspendiert. Durch Erhitzen für 10 min auf 94°C wurden die Zellen lysiert und 75 Kolonien pro Probe, d.h. 75 Klone gepickt.

Zur Überprüfung des Klonierungs-Erfolges wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt, in der durch den Einsatz von Primern, die den Insert-Bereich flankieren, genau das DNA-Fragment amplifiziert wird, in welchem die Ziel-DNA bei korrekt erfolgtem Einbau liegen sollte. Es wurde pro Klon 1 µl der lysierten Zellsuspension in die PCR-Reaktion eingesetzt. Die Länge des entstehenden PCR-Produktes gibt Auskunft darüber, ob die Ziel-DNA richtig eingebaut wurde, so daß mit Hilfe dieser Screening-Reaktion fehlerhafte Klone ausgesondert und die verbleibenden Klone mit Cycle Sequencing und anschließender Ausfällung für die Sequenzierung vorbereitet werden konnten.

3.1.7 Sequenzierung

Die von Sanger 1977 entwickelte und in Abbildung 16 dargestellte Methode zur Bestimmung der Nucleotidsequenz eines DNA-Moleküls beruht auf der *in vitro*-Synthese eines Komplementärstranges zu einem der beiden Einzelstränge der DNA, deren Nucleotidabfolge ermittelt werden soll. Die Methode basiert auf dem zufälligen Einbau modifizierter Nucleotide, der Didesoxyribonucleotide (ddNTPs), die im Gegensatz zu den Desoxyribonucleotiden (dNTPs) an der 3'-Position der (Desoxy)-Ribose keine OH-Gruppe sondern nur ein Wasserstoffatom tragen. Dadurch kann die DNA-Polymerase keine weiteren Nucleotide anfügen. Die Synthese der komplementären Stränge beginnt am Primer und setzt sich solange fort, bis ein Didesoxyribonucleotid eingebaut wird und die Synthese abbricht. Da das Reaktionsgemisch sowohl Desoxy- als auch Didesoxyribonucleotide enthält, stehen die beiden Nucleotide beim Einbau in den DNA-Strang miteinander in Konkurrenz. Durch einen hohen Überschuß an Desoxyribonucleotiden wird jedoch nur ein geringer Prozentsatz der DNA-Stränge jeweils nicht weiter verlängert.

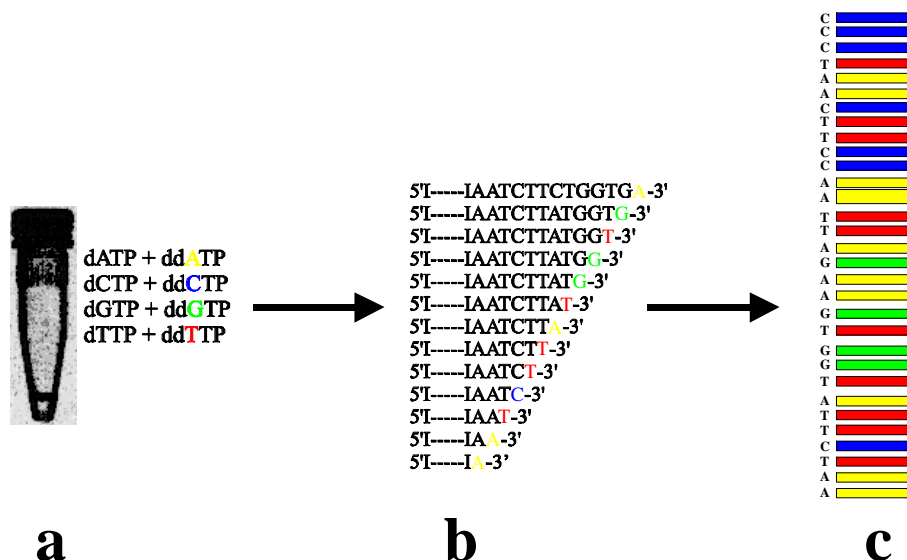


Abbildung 16. Funktionsprinzip der Sequenzierung nach Sanger. a: Der Sequenzierungsansatz wird mit einer Mischung von Desoxyribonucleotiden (dNTPs) und fluoreszenzmarkierten Didesoxyribonucleotiden (ddNTPs) versehen und amplifiziert. b: Es entsteht ein kompletter Satz von DNA-Fragmenten, die sich in ihrer Länge um je ein Nucleotid unterscheiden und deren letzte Base ein markiertes Didesoxyribonucleotid ist. c: Die Sequenz kann anschließend ermittelt werden, indem mit einer Lasereinrichtung bei allen Fragmenten diese letzte Base gelesen wird. (modifiziert nach Söling und Petri 1998)

Da der Einbau eines Didesoxyribonucleotids aus statistischen Gründen an jeder beliebigen Stelle des DNA-Moleküls möglich ist, entsteht ein vollständiger Satz von DNA-Fragmenten, die sich entsprechend ihrer Länge um je ein Nucleotid unterscheiden. Das Gemisch repräsentiert die gesamte zu sequenzierende DNA. Die neuen Stränge werden durch Elektrophorese in einem hochprozentigen, extrem dünnen Polyacrylamid-Gel getrennt, das auch Fragmente zu trennen vermag, die sich in ihrer Länge nur um eine Base unterscheiden. Da die vier Didesoxyribonucleotide mit unterschiedlich fluoreszierenden Substanzen markiert wurden, kann die Sequenz des neusynthetisierten Stranges mit Hilfe einer Lasereinrichtung direkt vom Bandenmuster abgelesen werden. Bei allen getrennten Fragmenten wird die letzte Base, das fluoreszierende Didesoxyribonucleotid, gelesen. Aus der sich ergebenden Sequenz kann die Sequenz des Matrizenstranges abgeleitet werden.

Die Sequenzierung erfolgte in einem Applied Biosystems (ABI) PRISM 310 Genetic Analyzer der Firma Perkin-Elmer. Die im folgenden dargestellte Vorbereitung der Proben für die Sequenzierung erfolgte gemäß der Anleitung des Betriebshandbuchs. Spezielle Reaktionsgefäße, Septen, sowie TSR-Puffer („Template Suppressor Reagent“) und Terminationsmischung (Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit) wurden als Zubehör von Perkin Elmer bezogen.

Sequenzier-Reaktion und Ausfällung

Für die Sequenzier-Reaktion (Cycle Sequencing) wurden 6 µl 2,5-fachen Sequenzierpuffer (200 mM Tris-HCl [pH 9,0], 5 mM MgCl₂), 2 µl des Terminationsmixes, der Polymerase, dNTP's und fluoreszenzmarkierte ddNTPs enthielt, 10 µl DNA-freies Wasser, 1 µl Template-DNA sowie 1 µl Sequenzierprimer (3,2 pmol/µl) in einem 0,5 ml-Reaktionsgefäß vermischt. Die Reaktion wurde über Nacht im Thermocycler durchgeführt (Programm „Cycle Sequencing“ in Tabelle 15).

Es folgte eine Ausfällung, die der Reinigung der Reaktionsprodukte dient. Es wurden zunächst 16 µl DNA-freies Wasser und 64 µl 95%iger Ethanol in jedes Reaktionsgefäß pipettiert, durch vortexen mit dem PCR-Produkt vermischt und die DNA 15 min bei Raumtemperatur gefällt. Nach der Fällung wurden die Proben in definierter Ausrichtung im Rotor 20 min bei 13.500 rpm und 6°C zentrifugiert, der Überstand vorsichtig entfernt und verworfen und das Pellet mit 250 µl 70%igem Ethanol versetzt und vermischt. Mit gleicher Ausrichtung der Gefäße im Rotor wurde weitere 10 min (13.500 rpm, 6°C) zentrifugiert. Der überstehende Alkohol wurde wieder vorsichtig abgezogen und verworfen und die Pellets im Thermocycler 2 min bei 94°C getrocknet. 25 µl TSR-Puffer wurden zugegeben, gründlich mit dem Pellet vermischt und die Lösung für weitere 2 min auf 94°C erhitzt. Schließlich wurde der Ansatz zur Elektrophorese in ein spezielles 0,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit einem Septum verschlossen und in das Sequenzier-Gerät eingesetzt.

Sequenzier-Elektrophorese

Die Elektrophorese des DNA-Satzes im ABI PRISM 310-Kapillargerät erfolgte durch das POP6-Polymer in einer 50 µm-Kapillare von 66 cm Länge. Ein Lauf unter Standardbedingungen, der ein DNA-Fragment-Set über etwa 500-600 Basen lesen kann, wurde mit 12,2 kV, 4,5 mA, 50°C, einer Laserstärke von 9 mW in einem Zeitraum von etwa 3 Stunden durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte über das systemeigene Software-Paket, die Überprüfung und Nachbearbeitung über die CHROMAS-Software.

3.1.8 Sequenzanalyse und phylogenetische Berechnungen

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die vom ABI PRISM 310 Genetic Analyzer ausgegebenen Chromatogramme in das Programm CHROMAS Version 1.45 geladen und weiterbearbeitet. Da die Sequenzbereiche direkt hinter dem Sequenzierprimer meist schlecht vom Gerät gelesen wurden, wurden diese in solchen Fällen abgeschnitten und die Sequenzen auf Lesefehler und nicht gelesene und übersprungene Basen überprüft. Wurden mehrere Sequenzabschnitte eines Gens sequenziert, wurden diese nach ihrer CHROMAS-Bearbeitung von Hand aneinandergesetzt. Die Sequenzen wurden in der EMBL-Datenbank mit bekannten Sequenzen verglichen und anschließend mit Hilfe weiterer Programme auf ihre taxonomische Einordnung und verwandtschaftlichen Beziehungen untersucht. Dazu wurden sie untereinander und mit den Sequenzen von Referenzstämmen (eine Liste der Referenzstämmen befindet sich in Kapitel 11.3.3 im Anhang) mit Hilfe des Programmes CLUSTALW 1.7 (Thompson *et al.* 1994) verglichen (aligned) und ähnliche Sequenzen in erste, grobe Gruppen zusammengefaßt. Dieses Alignment wurde gegebenenfalls im Programm BIOEDIT Version 5.0.9 (Hall 1997) per Hand editiert und mit dem PHYLIP-Programmpaket Version 3.572c (Felsenstein 1993) Stammbäume aufgrund der Ähnlichkeit der eingeladenen Einzelsequenzen errechnet. Aus dem Alignment wurde zunächst mit Hilfe des DNADIST-Programms unter PHYLIP eine Distanzmatrix errechnet, wobei als Rechenalgorithmus das Jukes-Cantor-Modell gewählt wurde, das die Möglichkeit multipler Substitution an jeder Stelle der DNA berücksichtigt (Jukes und Cantor 1969).

Die phylogenetischen Stammbäume wurden mit dem Programm FITCH unter PHYLIP errechnet und mit dem Programm TREEVIEW Version 3.2 (Page 1996) graphisch dargestellt, wobei *Methanobacterium bryantii* oder *Escherichia coli* als outgroup fungierten.

Zur Berechnung von bootstrap-Werten wurden 100 Bäume unter Verwendung der Programme SEQBOOT und CONSENSUS unter PHYLIP analysiert. Zur Darstellung eines phylogenetischen Baumes mit bootstrap-Werten und Distanzen wurde der Stammbaum mit der dem consensus-Baum ähnlichsten Topographie ausgewählt und mit den bootstrap Werten des consensus-Baumes versehen.

Die Sequenzen der Isolate schwanken in ihrer Länge. 40 Isolate haben eine Sequenzlänge von 800 bis 1100 Basenpaaren (bp), 21 eine Länge von 400 bis 800 bp und 20 liegen in ihrer Länge zwischen 200 und 400 bp. Es wurden Referenz- und Isolatsequenzen auf die gleiche Länge geschnitten und verrechnet und mit phylogenetischen Stammbäumen auf Basis der unterschiedlich langen Sequenzen verglichen. Es konnten bei den phylogenetischen Berechnungen keine Unterschiede der Verteilung von Isolaten aufgrund ihrer unterschiedlichen Länge festgestellt werden. Die Klonsequenzen liegen in einer Länge von ca. 400 bp vor.

3.2 Mikrobiologische und physiologische Methoden

3.2.1 Isolierung von Bakterien

Es wurden verschiedene Medienreihen für die Isolierung einer möglichst großen Diversität an schwamm-assoziierten Bakterien eingesetzt. Bei der TSB-Reihe handelt es sich um Nährböden, die unterschiedliche Konzentrationen eines Komplexbestandteils, Tryptischer Soja-Nährbouillon, enthalten. Das halbsynthetische Poly-C-Medium (HSPC), welches die Basis einer weiteren Medienreihe darstellt, ist ein vitamin- und spurenelementreiches künstliches Medium. Nährplatten dieser Medienreihe bieten den Bakterien eine Auswahl einzelner Kohlenstoffquellen an und wurden darüber hinaus auch in ihren Salzgehalten variiert. Da einzelnen Bakteriengruppen eine besondere Aufmerksamkeit zuteil werden sollte, wurde neben der TSB- und der HSPC-Reihe auch eine Anzahl von Selektivmedien eingesetzt. Um Actinobakterien zu isolieren wurden 13 Medien eingesetzt (Strepto A, Strepto B, Strepto C, CHI, ALG, GyA, GYM, GYM S, GYM B, DoII, SCK, ACT, BHI), die sich Stoffwechseleigenschaften der Gruppe zu nutze machen, indem beispielsweise für andere Gruppen schwer abbaubare Komplexbestandteile wie Chitin, Alginat und Stärke als einzige Kohlenstoffquelle eingesetzt werden. Auch für die *Cytophaga/Flavobakterium*-Gruppe und die Myxobakterien wurden Medien eingesetzt, die in ihrer Zusammensetzung den Besonderheiten des Stoffwechsels dieser Gruppen angepasst sind (MAL, CYT, SW2, MYX). Um mögliche Symbionten der Schwämme zu isolieren wurde ein Medium eingesetzt (SSI), welches das Milieu in den Schwammzellen imitieren sollte. Medien der HSPC-Reihe und der Selektivmedien für Actinobakterien wurden außerdem Schwamm- und Bodenextrakte zugegeben, um einen möglichen wachstumsfördernden Effekt bestimmter Inhaltsstoffe dieser „Substrate“ zu untersuchen. Tabelle 17 gibt eine Übersicht der verwendeten Kurzbezeichnungen der Medien und ihrer Salzgehalte. Es wurden auf den verschiedenen Exkursionen insgesamt 37 Medien eingesetzt, deren Rezepte im Anhang im Kapitel A 2.1 „Rezepte der Medien“ aufgeführt sind.

Tabelle 17. Übersicht der Medien, der Salzgehalte und der verwendeten Medien-Abkürzungen.

Abkürzung	Medium	Salzgehalt (%)	Abkürzung	Medium	Salzgehalt (%)
aa/a	TSB 30	0,1/3,8*	l	MYX	0,1
ab/b	TSB 3**	0,1/3,8*	IS	MYX + Salz	3,4
abS	TSB 3 + Salz	3,4	o	ACT	0,2
ac/c	TSB 0,3	0,1/3,8*	p	BHI	0,7
ad/d	TSB 0,03	0,1/3,8*	q	CYT	
ea	HSPC 30	3,8	r	Doll	3,4
eb	HSPC 15	2,0	s	GYM	3,4
ec	HSPC 7,5	1,3	sa	GYM S	3,4
ed	HSPC 0	0,6	sb	GYM B	3,4
ee	HSPC B		t	SCK	3,4
ef	HSPC S	0,7	u	GyA	3,4
eg	HSPC S + Salz	3,4	v	CHI	3,4
eh	HSPC 25		w	ALG	3,4
f	MAL		x	Strepto A	0,18
g	SW2		y	Strepto B	0,5
h	SSI	0,5	z	Strepto C	1,2

* = Die Medien der TSB-Reihe hatten für die Ostsee-Probenahme einen Salzgehalt von 0,1 % und wurden für die Probenahme in Nordsee und Mittelmeer 2000 auf 3,8 % aufgesalzen. ** = Das TSB 3-Medium der Probenahme auf Elba im Jahr 2000 hatte eine andere Zusammensetzung als das Medium für die Nordsee-Exkursion und wird deshalb als zusätzliches Medium gezählt.

Die auf den Isolierungs-Nährböden wachsenden Kolonien wurden durch Überimpfen mit einer Impflohe auf neue Platten des gleichen Mediums vereinzelt, wobei möglichst morphologisch unterschiedliche und möglichst viele Kolonien von den einzelnen Platten abgenommen wurden (bei Platten mit ≤ 50 Kolonien erfolgte die Abnahme aller Kolonien). Die gewonnenen Isolate wurden anschließend für die Fettsäureanalyse auf TSB 30 überimpft oder für eine DNA-Extraktion in Flüssigmedium angezogen.

3.2.2 Nachweis von Antibiotikaproduktion

Antibiotika sind sekundäre Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, die aus der Zelle ausgeschieden werden und andere Organismen schon in sehr geringen Konzentrationen in ihrem Wachstum hemmen (Drews 1983).

Der Nachweis von Antibiotika-Aktivität bei Bakterien kann mit vergleichsweise einfachen Tests erbracht werden. Die Methode beruht darauf, daß auf einer Nähragarplatte, die mit einem Testkeim (Indikatorbakterium) dicht beimpft wird, in der Umgebung des Antibiotika-Produzenten das Wachstum ausbleibt und es zur Bildung eines Hemmhofes kommt. Das aus der Kolonie des Produzenten in den Agar diffundierende Antibiotikum unterbindet das Wachstum des Indikatorbakteriums und führt zur Ausbildung des Hemmhofes im geschlossenen Bakterienrasen. Zur qualitativen Prüfung des Antibiotikabildners reicht es aus, diesen auf den Mittelpunkt einer Nähragarplatte zu impfen und die Indikatorbakterien radial strichförmig vom Plattenrand bis zum Teststamm auszustreichen (Strichtest). Nach Bebrütung lassen sich aufgrund des Ausmaßes der Wachstumshemmung der verschiedenen Indikatorbakterien Aussagen über das Wirkungsspektrum des Antibiotikums machen. Die Antibiotika unterscheiden sich bezüglich ihrer Wirkung auf Gram-positive und -negative Bakterien, auf Hefen, Dermatophyten und andere Mikroorganismen in charakteristischer Weise. Als Testkeime dienen für diese Organismengruppen repräsentative Mikroorganismen. Der Plattendiffusionstest ermöglicht bei Einhaltung konstanter Versuchsbedingungen eine quantitative Prüfung der Antibiotika-Wirkung, da der Durchmesser des entstehenden Hemmhofes dem Logarithmus der Konzentration des Antibiotikums proportional ist. Zur Durchführung werden Agarplatten hergestellt, die durch Eingießen des Indikatorbakteriums in den noch flüssigen Agar gleichmäßig mit diesem beimpft sind. Die Testlösungen werden aufgebracht, indem sie entweder in ausgestanzte Löcher oder in aufgesetzte Glas- oder Metallzylinder pipettiert oder in Filterpapier aufgesogen und als Filterpapierscheiben auf den Agar gelegt werden. Bei positiver Reaktion wird nach Bebrütung eine Hemmzone sichtbar (Schlegel 1992).

In der vorliegenden Arbeit sollte der Nachweis der Antibiotikaproduktion bei ausgewählten, isolierten Actinobakterien eine Vororientierung über ihr Wirkungsspektrum und damit ein Auswahlkriterium für weitere physiologische Untersuchungen liefern. Aus diesem Grund wurden zur qualitativen Prüfung Strich- und Agardiffusionstests an 126 Isolaten vorgenommen. Als Indikatorbakterien wurden folgende Stämme eingesetzt:

<i>Bacillus subtilis</i>	(DSMZ-Nr. 347)
<i>Escherichia coli</i> K12	(DSMZ-Nr. 498)
<i>Mycobacterium phlei</i>	(DSMZ-Nr. 750)
<i>Candida glabrata</i>	(DSMZ-Nr. 6425)
<i>Staphylococcus lentus</i>	(DSMZ-Nr. 6672)

Die Indikatorbakterien wurden laut DSMZ-Anweisung auf einem für ihr Wachstum günstigen, flüssigen Medium (DSMZ Medien 1 und 92, siehe Kapitel A 2.1) vorgezogen und ihre Fähigkeit zum Wachstum auf Platten des verwendeten Testagars überprüft. Da salzempfindliche Bakterien in ihrem Wachstum durch salzhaltige Nährlösungen gehemmt werden können, wurden die zur Anzucht der Isolate verwendeten unbeimpften Medien in ihrer Wirkung auf die Indikatorstämme überprüft, um falsch positive Ergebnisse auszuschließen. Die Schwamm-Isolate wurden in Nährlösung auf Basis des DSMZ-Mediums 65 angeimpft (siehe Kapitel A 2.1) und drei Tage bei Raumtemperatur (22°C) auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde 1 ml bewachsene Nährlösung steril entnommen, in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei 5000 g zentrifugiert. Pro Isolat wurde ein autoklaviertes Cellulose-Testscheibchen (Antibiotika-Testblättchen, Schleicher & Schuell, Dassel) in das Zentrum einer Testagarplatte gelegt, und diese mit den Indikatorbakterien beimpft. Mit einer Impföse wurde etwas Zellsuspension aus der Indikatorstamm-Flüssigkultur entnommen und in einem Strich vom Plattenrand bis an das noch sterile Cellulose-Testscheibchen gezogen, wobei sichergestellt werden mußte, daß die Impfstriche bis an das Testplättchen heranreichten. Die Platte wurde in gleichmäßigen Abständen mit allen fünf Indikatorstämmen in dieser Weise beimpft, so daß sich fünf Impfstriche radial vom Testplättchen im Plattenzentrum bis an den Plattenrand erstreckten. Das Cellulose-Testscheibchen wurde anschließend mit 50 µl des Überstandes der zentrifugierten Isolat-Nährlösung getränkt, drei Tage bei 30°C bebrütet und danach auf Wachstumshemmung der Indikatorbakterien im Impfstrich untersucht. Da nach drei Tagen Schüttel-Inkubation möglicherweise noch nicht ausreichende Konzentrationen der ausgeschiedenen Antibiotika in der Nährlösung vorliegen, wurde das Verfahren mit allen Isolaten nach einer Wachstumszeit von sechs Tagen wiederholt.

Zur Bestätigung der Ergebnisse aus dem Strichtest wurde für alle im Strichtest positiven Stämme ein Agardiffusionstest durchgeführt, wobei als Indikatororganismen nur *Staphylococcus lentus* und *Candida glabrata* eingesetzt wurden. Jeweils 1 ml der Flüssigkulturen eines Indikatorstammes wurde an den Rand einer sterilen Petrischale pipettiert und etwa 15 - 20 ml nach dem Autoklavieren auf etwa 45°C abgekühlter Testagar an den gegenüberliegenden Rand der Petrischale gegossen. Durch mehrfaches kreisförmiges Bewegen der Platte auf ihrer Unterlage wurden die Zellen der Indikatorbakterienkultur gleichmäßig im Agar verteilt. Der Agar wurde nach seiner Verfestigung drei Stunden nach dem Gießen mit zwei oder vier sterilen Cellulose-Testscheibchen belegt und diese mit 50 µl Nährmedium-Überstand des zu testenden Isolates getränkt. Die Platten wurden wie im Strichtest drei Tage bei 30°C inkubiert und danach auf Ausbildung von Hemmhöfen um die Testscheibchen untersucht. Die Abnahme des Mediums zum Beimpfen des Testscheibchens erfolgte im Agardiffusionstest einmalig nach drei Tagen; es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.2.3 Fettsäureanalyse

Die Zellmembranen von Bakterien sind sehr unterschiedlich in ihrem Aufbau, so daß die Vielseitigkeit ihrer molekularen Zusammensetzung gute Voraussetzungen für eine Klassifizierung von Bakterien durch die chemische Analyse ihrer Zellmembran bietet (Minnikin und Goodfellow 1981). Durch den Vergleich von Fettsäureprofilen unbekannter Stämme mit denen einer Datenbank kann auf Basis ihrer Similarität eine taxonomische Klassifizierung vorgenommen werden. In Anlehnung an ihre englische Bezeichnung (**fatty acid methyl ester**) werden die untersuchten Fettsäuremethylester oft als FAME bezeichnet.

Für die Fettsäureanalyse wurden die Isolate für 24 h bei 28°C auf einem Standard-Medium (TSB 30, siehe 11.1 „Rezepte der Medien und Reagenzien“) angezogen. Etwa 40 mg Zellmaterial wurde mit einem sterilen Spatel aus dem zweiten und dritten Quadranten der Nährplatte geerntet, in ein lipidfreies Schraubdeckelröhrchen überführt und nach Aufarbeitungsprotokoll des „Microbial Identification System“ (MIS, Version 3.0, MIDI Inc. Newark, DE, USA) zur Messung von Membranlipiden aus Bakterien aufgearbeitet, wobei die Membranlipide in mehreren Arbeitsschritten in ihre Fettsäuren zerlegt und diese zur Messung verestert wurden. Die Zusammensetzung der verwendeten Reagenzien ist in Tabelle 18 aufgeführt.

Tabelle 18. Verwendete Reagenzien zur Aufarbeitung der Proben für die Fettsäureanalyse.

Reagenzien	Bestandteil	Menge
Reagenz 1: Verseifung	NaOH	40,50 g
	Methanol	135 ml
	Milli-Q	135 ml
Reagenz 2: Methylierung	6 N HCl	146,25 ml
	Methanol	123,75 ml
Reagenz 3: Extraktion	Hexan	100 ml
	tert-Buthylethan	100 ml
Reagenz 4: Reinigung	NaOH	6,48 g
	Milli-Q	540 ml
Reagenz 5: Reinigung	NaCl	30,00 g
	Milli-Q	ad 100 ml

Die geernteten Zellen wurden zunächst in 1 ml Reagenz 1 resuspendiert. Die enthaltenen Membranlipide wurden durch Kochen (30 min bei 100°C) in ihre Fettsäuren zerlegt und diese nach schnellem Abkühlen im Wasserbad durch Mischen mit 2 ml Reagenz 2 und anschließender Inkubation bei 80°C für 10 min zu Fettsäuremethylestern verestert. Extrahiert wurde durch Zugabe von 1,5 ml Reagenz 3 durch Über-Kopf-Schütteln (10 Minuten) und Zentrifugation (4500 rpm, 15°C, 2 min). Die wäßrige Unterphase wurde vorsichtig abgezogen und die organische Phase mit 3 ml Reagenz 4 und 0,4 ml Reagenz 5 versetzt und weitere 5 min geschüttelt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (4500 rpm, 15°C, 5 min) wurde die organische Phase in ein Meßröhrchen überführt, durch einen Stickstoffstrom auf ein Volumen von etwa 300 µl konzentriert und mit einem Septum verschlossen.

Die Messung erfolgte in einem HP 5890 Series II Gaschromatograph (GC) der Firma Hewlett Packard (Böblingen) mit einem Flammenionisationsdetektor. Über einen Autosampler wurden jeweils 2 µl Probe in den GC injiziert. Gesteuert wurde die automatische Probenahme, die GC-Programmierung und die Datenverarbeitung vom Microbial Identification System (MIS).

Tabelle 19. Konfiguration des HP 5890 Series II Gaschromatographen.

Säule	5%-Phenyl-Methylpolysiloxan-Säule (25 m) 25 m x 0,2 mm Innendurchmesser
Temperaturprogramm	170°C (2°C · min ⁻¹ ; 260°C)
Trägergas	Wasserstoff (H ₂)
Detektor	FID Wasserstoff, synthetische Luft: (Reinheitsgrad 5)
Injektor	Split-Mode Splitrate: 1:50 Flußrate: 0,4 ml · min ⁻¹

Die Identifikation der Fettsäuremethylester erfolgte über den Peak-Vergleich mit dem MIS calibration standard mix, bei dem die qualitative und quantitative Fettsäurezusammensetzung einer Probe berücksichtigt wird. Der Standard besteht aus einer Mischung von gradkettigen gesättigten Fettsäuren in den Längen von 9 bis 20 Kohlenstoffatomen (9:0 bis 20:0). Die Fettsäurezusammensetzung der Probe wurde mit den gespeicherten Fettsäuremustern der Systemdatenbank verglichen und der ähnlichste Datenbankeintrag unter Angabe der Ähnlichkeit (Similaritäts-Index) und der Art- und Gattungsbezeichnung mit dem Chromatogramm ausgedruckt. Das MIS-Programm kann darüber hinaus Dendrogramme auf Basis der Similaritätsanalysen errechnen, wobei die Euklidische Distanz (ED) die Entfernung zwischen zwei Stämmen aufgrund ihrer Fettsäureprofile angibt. Die Euklidische Distanz ist die zweidimensionale Entfernung zwischen zwei Stämmen beim Vergleich ihrer Fettsäurezusammensetzung mit Hilfe eines 2-D Plots. Euklidische Distanzen bis 25 geben die Verwandtschaft auf dem Gattungsniveau an, bis 10 die Species und unter 6 die Subspecies.

Mit Hilfe der Fettsäureanalyse war eine vorläufige Identifizierung der Isolate möglich, auf deren Grundlage Stämme für weitere Untersuchungen ausgewählt wurden. Die auf der Fettsäureanalyse beruhende Identifikation wurde an einem Teil der bearbeiteten Stämme mit molekularbiologischen Methoden überprüft.

3.2.4 Untersuchung der Salztoleranz

Es wurden 57 Stämme ausgewählt und in TSB 3 Medium pH 7,5 mit 0,015 % NaCl (siehe Anhang 11.1 „Rezepte der Medien und Reagenzien“) angezogen. Aus diesen Vorkulturen wurden jeweils fünf Tropfen mit einer sterilen Pasteurpipette in Röhrcchen mit 3 ml TSB 3 Medium mit den Salzgehalten 0 %; 0,75 %; 1,5 %; 3,4 % und 6,8 % NaCl überführt. Der Salzgehalt 0 % entspricht Süßwasser, 0,75 % und 1,5 % entsprechen Brackwasserbedingungen, 3,4 % entspricht dem marinen Milieu beispielsweise in der Nordsee und 6,8 % einem hochsalinen Milieu mit doppeltem Meersalzgehalt. Es wurden für jeden Stamm und jeden Salzgehalt zwei Röhrcchen für eine Doppelbestimmung angeimpft. Sofort nach dem Beimpfen wurde die erste photometrische Messung zur Aufnahme des Blindwertes durchgeführt. Weil das Medium eine leichte Eigenfärbung aufwies, wurden die Messungen bei 600 nm durchgeführt. Es wurden über fünf Tage jeweils zwei Messungen täglich zu jeweils der gleichen Tageszeit (9 und 15 Uhr) durchgeführt und die Röhrcchen im Labor bei Raumtemperatur (24 - 28°C) inkubiert. Vor der ersten Messung wurden die Röhrcchen geputzt und ihre Ausrichtung im Strahlengang markiert, da Kulturröhrcchen oft unterschiedlich dicke Glaswände besitzen, die die Absorption verändern, sobald sie nicht in derselben Ausrichtung im Strahlengang des Photometers stehen. Vor jeder Messung wurden die Proben mit einem Vortexer durchmischt und das Photometer für jeden Salzgehalt mit einer unbeimpften Referenz auf 0 geeicht. Die Absorptionen wurden gegen die Zeit aufgetragen, die Wachstumsraten bestimmt und die Entwicklung des Wachstums bei den verschiedenen Salzgehalten miteinander verglichen.

3.2.5 Substratverwertung

Bakterien verfügen über die Fähigkeit, zu ihrer Energiegewinnung eine bestimmte Auswahl an Kohlenstoffquellen zu nutzen; das Muster der verwertbaren Substanzen ist dabei gattungs- und artspezifisch. Diese Tatsache kann zur Bestimmung von unbekanntem Stämmen genutzt werden, indem einem Testorganismus unter Standardbedingungen verschiedene Kohlenstoffquellen angeboten werden und das Muster der tatsächlich genutzten Substanzen mit den Verwertungsmustern bekannter Stämme verglichen wird.

Die Firma BIOLOG Inc. (Hayward, CA, USA) vertreibt einen solchen Test zur Substratverwertung in Form einer 96-well-Mikrotiterplatte, die speziell für bestimmte Bakteriengruppen abgestimmte Sortimente an Kohlenstoffquellen enthält und über eine Farbreaktion die vom Testorganismus verwerteten Substrate sichtbar macht. Mit dem systemeigenen Computerprogramm können die Muster der Mikrotiterplatten ausgewertet und eine Bestimmung des Teststammes durch den Abgleich mit gespeicherten Mustern bekannter Bakterien in einer Datenbank vorgenommen werden.

Die BIOLOG MicroPlates (bezogen von Merlin GmbH, Bornheim-Hersel) testen die Fähigkeit von Mikroorganismen zur Oxidation von ausgewählten Kohlenstoffquellen und ergeben ein charakteristisches Muster an rot gefärbten Vertiefungen, einen „metabolischen Fingerabdruck“ der Stoffwechselfähigkeiten des angeimpften Organismus. Die Titerplatten sind mit 95 getrockneten Kohlenstoffquellen ausgestattet. Eine Vertiefung, die im Trocknungsprozeß während der Herstellung nur mit Wasser und nicht mit einer Kohlenstoffquelle befüllt war, dient als Negativkontrolle. Tetrazolium-Violett ist als Redoxindikator in allen Vertiefungen vorhanden und zeigt die metabolische Aktivität in den Vertiefungen an, in denen eine Kohlenstoffquelle durch den Testorganismus oxidiert wird.

Das zu identifizierende Isolat wird in Röhrchen mit 20 ml vorgewärmter Salzlösung (0,85 % NaCl) gebracht; dabei soll ein festgelegter Dichtebereich eingehalten werden. Die 96 Vertiefungen der ebenfalls vorgewärmten Mikrotiterplatte werden mit jeweils 150 µl der Bakteriensuspension steril beimpft. Das Vorwärmen der Salzlösung und der Testplatten ist notwendig, da einige Species sehr sensibel auf Kälteschocks reagieren. Beim Animpfen sind alle Vertiefungen farblos. Vertiefungen, deren Substanz im Test oxidiert wird, zeigen den typischen Farbumschlag des reduzierten Tetrazoliums zu Dunkelrot. Alle anderen Vertiefungen sowie die Negativkontrolle bleiben farblos. Die Testplatten werden über Nacht (16 - 24 h) bei 30°C inkubiert und das erhaltene Muster in das BIOLOG MicroLog Computer-Programm eingespeist, das dann automatisch einen Vergleich mit den Mustern seiner Species-Datenbank durchführt. Liegt eine adäquate Übereinstimmung vor, wird eine Identifizierung des Isolates erreicht.

Die Kulturen wurden je nach Wachstumsgeschwindigkeit ein bis drei Tage auf TSB 30 Agarplatten bei Raumtemperatur angezogen. Mit einer Öse wurde Zellmaterial vorsichtig von der Nährbodenoberfläche entnommen, ohne dabei Reste des Agars selbst zu überführen, da jeder Nährstoffeintrag zu falsch positiven Ergebnissen führen kann. Es wurden so lange Zellen in die Salzlösung gebracht, bis eine Transmission von 35 – 42 % erreicht wurde (Turbidimeter 9502/328, BIOLOG Inc., Hayward, CA, USA). Da Actinobakterien untersucht werden sollten, wurden GP2 Microplates für Gram-positive und Milchsäurebakterien verwendet. Die Vertiefungen der Testplatte sind mit jeweils 150 µl der Suspension steril beimpft und für 24 Stunden bei 30°C inkubiert worden. Die Platten wurden anschließend visuell ausgewertet, wobei eine deutliche Rotfärbung als „positiv“, keine Färbung als „negativ“ und eine leichte Rotfärbung oder das Auftreten von roten Klümpchen als „grenzwertig“ aufgenommen wurden. Das Muster der positiven Vertiefungen eines jeden Teststammes wurde nach einem vom Hersteller vorgegebenen Code in eine Bionummer umgewandelt und in das System eingegeben. Die MicroLog™ Software Version 3.50 des BIOLOG MicroStation™ Systems 3.50 (BIOLOG Inc., Hayward, CA, USA) nahm durch den Vergleich der eingegebenen Bionummer mit den Bionummern bekannter Gram-positiver Bakterien in der GP-Datenbank eine Identifizierung vor. Eine akzeptable Identifizierung liegt nach Angabe des Herstellers vor, wenn nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden ein Similaritätsindex von $\geq 0,500$ erreicht wird.

3.3 Mikroskopische Methoden

3.3.1 Lichtmikroskopie

Für die lichtmikroskopische Untersuchung wurde mit einer Pipettenspitze Mediumflüssigkeit aus Flüssigkulturen entnommen oder mit einer sterilen Öse Zellmaterial von Agarplatten geerntet, mit einem Lichtmikroskop (STANDARD WL, ZEISS, Oberkochen) betrachtet und die Bakterienzellen einem der in Tabelle 20 dargestellten Zelltyp zugeordnet.

Tabelle 20. Zellformen der Isolate und ihre Einordnung in „Zelltypen“.

Typ	Zellform
A	mittelgroßes* Stäbchen
B	großes* Stäbchen
C	große* Kokken
D	Zellpakete (vorwiegend Tetraden)
E	kleine* Kokken
F	Filamente
G	Hyphengeflecht
H	kleine* Stäbchen
I	große* ovale Zellen mit auffälliger Strukturierung im Cytoplasma

* = Die Größen der Zellen wurden im Verhältnis zueinander bestimmt und nicht ausgemessen.

3.3.2 Rasterelektronenmikroskopie

Für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung wurden ausgewählte Bakterienstämme in Flüssigmedium (DSMZ Nr. 65) angezogen. Proben wurden nach drei und sieben Tagen sowie nach 4 Wochen entnommen und mit 1 % Formaldehyd fixiert. Eine osculumtragende Erhebung eines Exemplares von *Halichondria panicea* aus dem Aquarium (Probenahme 12.11.2001) wurde in dünne Scheiben geschnitten und diese in 1x PBS mit 1 % Formaldehyd fixiert. Alle Proben sind im Anschluß mit einer Ethanolreihe (30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 100 %, 100 %, 100 %, je 10 min) entwässert worden. In einer Critical Point-Trocknungsanlage DPD 030 der Firma Balzers AG (Balzers, FL) wurden die Proben getrocknet und im Sputtergerät SCD 004 (Balzers AG, Balzers, FL) mit Gold bedampft. Die mikroskopische Betrachtung erfolgte im Rasterelektronenmikroskop DSM 940 der Firma ZEISS (Oberkochen), die Dokumentation auf einem Ilford 100 Delta Professional Film und die Entwicklung im institutseigenen Fotolabor.

3.3.3. Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) gewinnt bei der Untersuchung von Umweltproben immer größere Beachtung, da sie den Nachweis von RNA- und DNA-Sequenzen verschiedener Bakterien-gruppen und damit eine Aufnahme der bakteriellen Diversität direkt in der Probe ermöglicht (Glöckner *et al.* 1996; Leitch *et al.* 1994). Schwer oder nicht kultivierbare Bakterien werden genauso erfaßt wie solche, die bei lichtmikroskopischer Untersuchung nicht durch typische morphologische Eigenschaften zu identifizieren sind (Glöckner *et al.* 1996). Neben der qualitativen kann auch eine quantitative Aussage über das Auftreten bestimmter Bakteriengruppen in der Probe gemacht werden (Glöckner *et al.* 2000) und lokale oder saisonale Veränderungen der Zusammensetzung von bakteriellen Gemeinschaften nachgewiesen werden (Glöckner *et al.* 1999). Damit bietet die Methode in Kombination mit vergleichenden Sequenzanalysen ein gutes Abbild der mikrobiellen Gemeinschaft eines Standortes (Glöckner *et al.* 2000).

Die zu untersuchende Probe wird für die Hybridisierung zunächst fixiert und sofort mit der Hybridisierungslösung inkubiert, die neben Salzen und Natriumdodecylsulfat auch die markierte Sonde enthält. Je nach Sonde kann auch Formamid enthalten sein. Formamid sorgt in Hybridisierungslösungen dafür, daß die Reaktionen bei Temperaturen stattfinden können, die die Gewebestruktur nicht schädigen und beeinflußt die Stringenz (Leitch *et al.* 1994). Die Geschwindigkeit der Hybridisierung hängt von der Sondenlänge, der Komplexität der Sequenz und ihrer Konzentration ab (Leitch *et al.* 1994). Da die RNA in mehreren hundert Kopien in der Zelle vorliegt und somit eine ausreichend hohe Konzentration an Reaktionspartnern für die Sonde gegeben ist, eignet sie sich besonders gut für Untersuchungen auf Basis der *in situ*-Hybridisierung.

Im Allgemeinen hybridisieren kurze Sonden schneller, da sie besser in das Präparat diffundieren können. Die nach der Hybridisierung folgenden Waschschrte dienen der Reinigung des Präparates von locker gebundenen Sonden, damit nur perfekt gepaarte Hybridmoleküle erhalten bleiben (Leitch *et al.* 1994). Das neu gebildete doppelsträngige Molekül läßt sich aufgrund seiner Markierung in der Probe nachweisen und die Stelle, an der die Hybridisierung stattgefunden hat, durch mikroskopische Verfahren lokalisieren, wobei die Nachweismethode von der Sondenmarkierung abhängt (Leitch *et al.* 1994). Für die Markierung der Sonden werden neben Enzymen und Metallen auch Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Bei Anregung der Farbstoffe mit Licht der entsprechenden Wellenlänge kann die ausgestrahlte Fluoreszenz mit geeigneten Lichtfiltern sichtbar gemacht werden (Leitch *et al.* 1994). Für die *in situ*-Hybridisierung von RNA-Sequenzen werden häufig mit dem Indocarbocyanin-Farbstoff Cy3 (Anregung bei 554 nm, Emission bei 570 nm, orangegelb fluoreszierend) markierte Sonden verwendet und das Präparat nach der Hybridisierung mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol, Anregung bei 345 nm, Emission bei 450 nm, hellblau fluoreszierend) gegengefärbt.

Gewebeproben müssen frisch sein und rasch fixiert werden, da die Fixierung den Verlust von Nucleinsäuren durch die Inaktivierung von endogenen Nucleasen und anderen abbauenden Enzymen begrenzt und die Gewebestruktur konserviert. Während eine Gruppe von Fixiermitteln die Präparate quervernetzt (z.B. Formaldehyd), fällt eine zweite Gruppe Protein aus und sorgt für eine erhöhte Permeabilität des fixierten Gewebes (Leitch *et al.* 1994; Roller *et al.* 1994). Die Verwendung von 50 % Ethanol für die Fixierung sorgt neben der Durchlässigkeit der Schwammzellen auch für die Durchlässigkeit der Zellmembranen Gram-positiver Bakterien (Amann *et al.* 1995; Bond *et al.* 1999). Im Anschluß an die Fixierung wird das Präparat in einer Ethanolreihe entwässert und an der Luft getrocknet.

Die Stringenz, mit der die *in situ*-Hybridisierung durchgeführt wird, bestimmt den ungefähren Prozentsatz korrekt gepaarter Nucleotide im Doppelstrang aus Sonde und Zielsequenz. Sie ist abhängig von der Temperatur, der Ionenstärke und der Konzentration helixdestabilisierender Moleküle in den Hybridisierungs- und Waschlösungen (wie z.B. Formamid). Unter stringenten Bedingungen bleiben nur Sonden mit nahezu perfekt komplementären Sequenzen gepaart (Leitch *et al.* 1994).

Untersuchungen mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) sind an Teststämmen (Amann *et al.* 1990), bakteriellen Gemeinschaften (Bond *et al.* 1999; Glöckner *et al.* 1996), an Actinobakterien aus Umweltproben (Pernthaler *et al.* 2001; Roller *et al.* 1994) und an Schnitten verschiedener Schwämme (Friedrich *et al.* 1999; Webster *et al.* 2001; Webster und Hill 2001) von verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführt worden (siehe Übersichtsartikel Amann *et al.* 1995). Die veröffentlichten Protokolle und Sonden-Sequenzen (Amann *et al.* 1990; Amann *et al.* 1995; Bond *et al.* 1999; Friedrich *et al.* 1999; Glöckner *et al.* 1996; Glöckner *et al.* 1999; Pernthaler *et al.* 2001; Roller *et al.* 1994; Webster *et al.* 2001; Webster und Hill 2001) dienten als Grundlage der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchung auf das Vorhandensein von Actinobakterien im Mesohyl des Ostseeschwammes *Halichondria panicea*.

Eine osculumtragende Erhebung eines Exemplars von *Halichondria panicea* aus dem Aquarium (Probenahme 12.11.2001) wurde in dünne Scheiben geschnitten, diese in 1x PBS gewaschen und in einer 1:1 (v:v) Mischung von 3 %iger Paraformaldehyd-Lösung und 50 %igem Ethanol für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Es folgte ein Waschschriff in 1x PBS und die Entwässerung mit Hilfe einer Ethanolreihe (50 %, 80 %, 96 %, je 3 min). Die Schnitte wurden auf Filterpapier luftgetrocknet und für 60 sec unter einer Quecksilberlampe gebleicht, da Schwammmaterial häufig Eigenfluoreszenz aufweist, welche die Ergebnisse beeinflussen kann (Webster *et al.* 2001; Webster und Hill 2001). Eine parallel genommene Wasserprobe wurde filtriert und der Filter mit 3 %iger Paraformaldehyd-Lösung 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach dem Waschen mit 1x PBS und sterilfiltriertem Milli-Q wurde der Filter auf Filterpapier luftgetrocknet. Für die weitere Bearbeitung wurden die Filter in vier gleich große Stücke geschnitten. Die Schnitte bzw. Filterstücke wurden einzeln auf geputzte Objektträger gebracht und mit je 100 µl Hybridisierungs-Lösung gleichmäßig betropft. Eine Aufstellung der verwendeten Lösungen und ihrer Zusammensetzung geben die Tabellen 21 und 22.

Tabelle 21. Zusammensetzung der verwendeten Arbeitslösungen und der Hybridisierungs-Lösung.

Sonden-Arbeitslösung	Hybridisierungs-Lösung	DAPI-Arbeitslösung
5 µl Sondenlösung (200 pmol/ml)	95 µl Hybridisierungspuffer	1 µg DAPI
95 µl DNA-freies Wasser	5 µl Sonden-Arbeitslösung	1000 µl DNA-freies Wasser

Tabelle 22. Zusammensetzung der Hybridisierungs- und Waschpuffer.

Sonde	Lösung	Hybridisierungspuffer	Waschpuffer
HGC69a 20 % Formamid	5 M NaCl	360 µl	2150 µl
	1 M Tris · HCl	40 µl	1000 µl
	0,5 M EDTA	-	500 µl
	Formamid	400 µl	-
	Milli-Q	1200 µl	ad 50 ml
EUB338 NON338 0 % Formamid	10 % SDS	2 µl	50 µl
	5 M NaCl	360 µl	9000 µl
	1 M Tris · HCl	40 µl	1000 µl
	Milli-Q	1600 µl	ad 50 ml
	10 % SDS	2 µl	50 µl

Die Hybridisierung erfolgte für 4 Stunden bei 46°C im Hybridisierungssofen Mini-Hybi der Firma Saur (Reutlingen), wobei jeder Objektträger separat in einer eigenen Feuchtkammer gelagert wurde.

Es wurden die am 5' Ende mit Cy3 markierten Sonden HGC69a, EUB338 und NON338 (Thermo Hybaid, Ulm) eingesetzt (Tabelle 21). Die Spezifität der Sonde HGC69a wurde von Roller *et al.* (1994) durch parallele Hybridisierung mit Sonden für alpha-, beta- und gamma-Proteobakterien und von Friedrich *et al.* (1999) durch parallele Hybridisierung mit einer Sonde für Gram-positive Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt überprüft. Es zeigten sich keine Überlappungen in den Fluoreszenz-Signalen. Es kann also von einer spezifischen Bindung der Sonde an ihre Ziel-DNA ausgegangen werden (Roller *et al.* 1994).

Für die Sonde HGC69a wurde der Hybridisierungspuffer mit 20 % Formamid verwendet; der Hybridisierungspuffer für die anderen beiden Sonden war formamid-frei. Entsprechend wurde dem Waschpuffer für HGC69a zur Erhöhung der Stringenz 0,5 M EDTA zugesetzt.

Tabelle 23. Sequenz und Spezifität der verwendeten 5' Cy3-markierten DNA-Sonden.

Sonde	Spezifität	Sequenz (Cy3-5'® 3')
HGC69a	Actinobakterien	TAT AGT TAC CAC CGC CGT
EUB338	Bakterien	GCT GCC TCC CGT AGG AGT
NON338	Negativ Kontrolle	ACT CCT ACG GGA GGC AGC

Nach der Hybridisierung wurden die Proben bei 48°C 15 min in Waschpuffer gewaschen, auf Filterpapier getrocknet und anschließend mit je 100 µl DAPI-Lösung 5 min im Dunkeln gefärbt.

Nach einem abschließenden Waschschrift in sterilfiltriertem Milli-Q und der Trocknung auf Filterpapier im Dunkeln wurden die Proben mit einer Mischung aus Cityfluor und Vectashield (5:1) auf einem gereinigten Objektträger eingebettet und mit Hilfe des Photomikroskops Axiophot für Durchlicht und Auflichtfluoreszenz der Firma ZEISS (Oberkochen) mit den entsprechenden Filtern (DAPI: ZEISS 01; Cy3: Chroma HQ 41007, Chroma Technology Corporation, Brattleboro, VT, USA) mikroskopiert. Die Software METAMORPH Version 3.5 (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA, USA) ermöglichte die digitale Dokumentation.

Ergebnisse

Um eine möglichst hohe bakterielle Diversität aus unterschiedlichen Schwammspecies zu isolieren wurden verschiedene Mediengruppen eingesetzt, die im Kapitel 3.2.1 „Isolierung von Bakterien“ näher beschrieben sind. Zur Aufnahme der kultivierbaren Diversität wurden verschiedene Methoden (Fettsäureanalytik, Sequenzierung, Substratverwertung) eingesetzt und verglichen. Es wurde die Klassifizierung der Actinobakterien aus der 2. Auflage von Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol. 1) (Garrity 2001) zugrunde gelegt.

Die anschließend gezeigte genetische Diversität der Actinobakterien beruht auf Klonierungsexperimenten und den Ergebnissen der Denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) mit deren Hilfe die Diversität von Actinobakterien in verschiedenen Schwammspecies und von unterschiedlichen Standorten verglichen und die Proben auf artspezifische oder standortspezifische Muster untersucht wurden.

Neben den Diversitätsanalysen wurde eine Anzahl von Isolaten näher charakterisiert. Es werden u.a. Ergebnisse von Untersuchungen zur Antibiotikaproduktion und Salztoleranz präsentiert, die zu einer Einschätzung der Anpassung der Actinobakterien an den Lebensraum Meer und der Möglichkeit einer funktionellen Lebensgemeinschaft dieser Bakteriengruppe mit dem Schwamm führen sollen. Abschließend wird der Nachweis von Vertretern der Planctomycetales im Schwamm erbracht.

Tabelle 24 gibt eine Übersicht der im Text verwendeten Gruppenbezeichnungen einzelner Unterordnungen (englisch: suborder, im Folgenden abgekürzt als SO) und Familien innerhalb der Actinobacteria.

Tabelle 24. Aufstellung einiger wichtiger Unterordnungen und Familien der Ordnung Actinomycetales mit ihren in dieser Arbeit verwendeten Gruppenbezeichnungen nach Garrity (2001).

Unterordnung (Gruppe)	Familien (Gruppe)
Actinomycineae (1)	Actinomycetaceae (1-1)
Micrococcineae (6)	Micrococcaceae (6-1) Brevibacteriaceae (6-2) Cellulomonadaceae (6-3) Microbacteriaceae (6-8)
Corynebacterineae (7)	Corynebacteriaceae (7-1) Gordoniaceae (7-3) Nocardiaceae (7-5) Tsukamurellaceae (7-6)
Micromonosporineae (8)	Micromonosporaceae (8-1)
Streptomycineae (11)	Streptomycetaceae (11-1)
Streptosporangineae (12)	Thermomonosporaceae (12-3)

4 Diversität der Actinobakterien

4.1 Kultivierbare Diversität der Actinobakterien

4.1.1 Identifikation der Isolate durch Fettsäureanalyse (FAME)

Von 3328 isolierten Stämmen wurden 2670 (80 %) einer Fettsäureanalyse (FAME, von englisch **fatty acid methyl ester**) mit dem MIDI-System unterzogen (siehe Kapitel 3.2.3 „Fettsäureanalyse“). Die übrigen 658 Stämme (20 %) wuchsen nicht auf dem für die Fettsäureanalyse notwendigen Standardmedium (TSB 30) und konnten somit nicht auf ihre Fettsäurezusammensetzung untersucht werden. Legt man als Kriterium für eine gute Identifikation einen Similaritätsindex von $\geq 0,300$ (Oka *et al.* 2000) zugrunde, waren 1793 (67 %) der Untersuchungen gültig. Von diesen 1793 Identifikationen fielen 229 (13 %) auf Vertreter der Actinobakterien. Eine Auflistung der Actinobakterien-Identifikationen befindet sich im Anhang (A 3.1 „Ergebnisse der Fettsäureanalyse“).

Tabelle 25. Übersicht der isolierten Bakterienstämme, Fettsäureanalysen und Actinobakterien-Identifikationen an den verschiedenen Probestandorten.

Probenahme	Isolate	Durchgeführte FAME-Analysen	Gültige FAME-Identifikationen	Actinobakterien laut FAME
Ostsee 1999	1376	1064	825	179
Nordsee 1999	927	681	430	20
Mittelmeer 1999	294	294	177	keine
Mittelmeer 2000	631	631	361	30
Summe	3228	2670	1793	229

Alle 229 durch Fettsäureanalyse identifizierten Isolate fallen in die Ordnung Actinomycetales der Unterklasse Actinobacteridae der Klasse Actinobacteria des Phylums Actinobacteria. Der Großteil der aus den Schwämmen isolierten und mit der FAME identifizierten Actinobakterien gehören in die Unterordnung Micrococccineae wie in Abbildung 17 dargestellt.

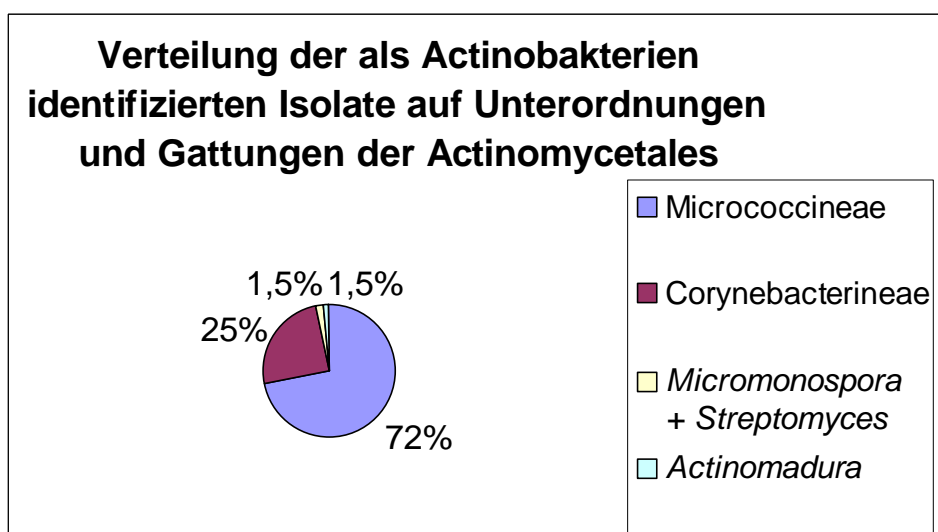
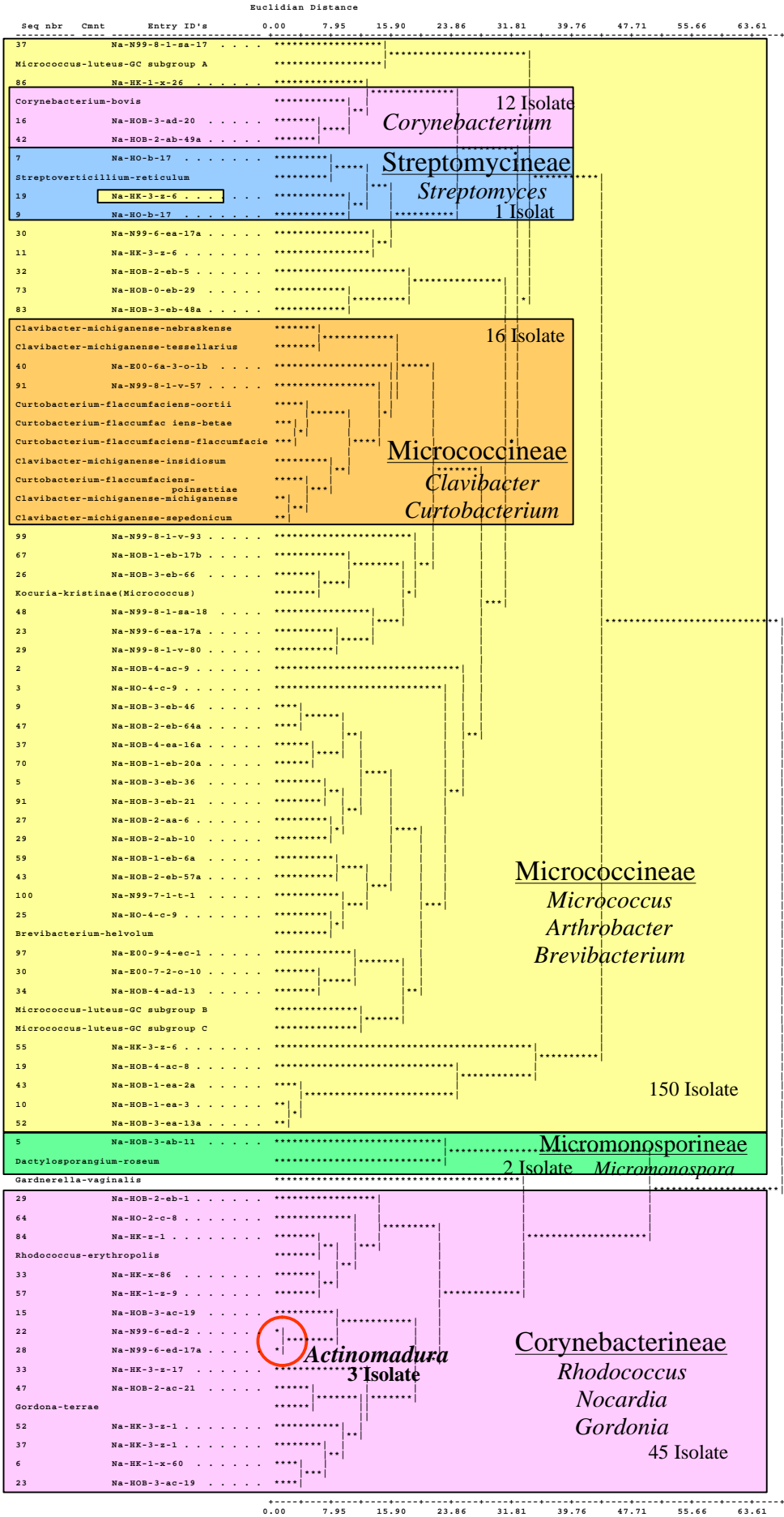


Abbildung 17. Verteilung der Actinobakterienidentifikationen innerhalb der Ordnung Actinomycetales.

Das Dendrogramm in Abbildung 18 zeigt die Verteilung der Isolate in vier Cluster, die den Unterordnungen Micrococcineae (gelb und orange), Corynebacterineae (pink), Streptomycineae (blau) und Micromonosporineae (grün) zugeordnet werden können. Die Familie Microbacteriaceae (orange) konnte als separates Cluster innerhalb der Unterordnung Micrococcineae (gelb) identifiziert werden. Aufgrund der Ähnlichkeit ihrer Fettsäuremuster liegen die Cluster der Gattungen *Corynebacterium* und *Streptovercillium* innerhalb des Micrococcineae-Clusters und die *Actinomadura*-Identifikationen im Corynebacterineae-Cluster.

Es sind in erster Linie Vertreter in den Familien Micrococcaceae (Gattungen *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Kocuria*), Brevibacteriaceae (Gattung *Brevibacterium*), Cellulomonadaceae (Gattung *Cellulomonas*) und Microbacteriaceae (Gattungen *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Microbacterium*) identifiziert worden. Diese Gruppe macht mit 166 Identifikationen 72 % aller Isolate aus. Die zweite große Gruppe mit 57 Isolaten (25 %) wird durch Vertreter der Unterordnung Corynebacterineae gestellt. Die Isolate verteilen sich auf die Familien Nocardiaceae (Gattungen *Rhodococcus*, *Nocardia*), Corynebacteriaceae (Gattung *Corynebacterium*), Gordoniaceae (Gattung *Gordonia*) und Tsukamurellaceae (Gattung *Tsukamurella*). Mit einem Isolat ist die Unterordnung Streptomycineae (Familie Streptomycetaceae, Gattung *Streptovercillium*) und mit zwei Isolaten die Unterordnung Micromonosporineae (Familie Micromonosporaceae, Gattung *Micromonospora*) vertreten. Drei weitere Isolate wurden in der Unterordnung Streptosporangineae (Familie Thermomonosporaceae, Gattung *Actinomadura*) identifiziert.

Abbildung 18 auf Seite 61. Übersichtsdendrogramm von Bakterien-Isolaten auf Basis der Ähnlichkeit von analysierten Fettsäureprofilen. Aus einem nicht abgebildeten Dendrogramm aller als Actinobakterien identifizierten Isolate wurden repräsentative Stämme für jedes Cluster ausgewählt und dieses Übersichtsdendrogramm errechnet. Dargestellt ist die Verteilung der Isolate auf die Unterordnungen der Actinomycetales (farbige Kästen). Neben den Unterordnungen sind häufig vorkommende Gattungen und die Anzahl der jeweils repräsentierten Isolate angegeben.



Verteilung der Actinobakterien auf Standorte

Geographische Verteilung

Da der Schwerpunkt der Untersuchungen auf der Species *Halichondria panicea* aus der Ostsee lag und bei den zugehörigen Probenreihen HO, HOB und HK mit Abstand die größte Anzahl an Isolaten gewonnen werden konnte, war ein Anteil von etwa der Hälfte aller FAME-Untersuchungen (46 %) für diesen Standort zu erwarten. Die in der Anzahl der gewonnenen Isolate ähnlichen Standorte Mittelmeer und Nordsee liegen auch in der Anzahl der gültigen FAME-Identifikationen in einer Größenordnung (Abbildung 19, links). Die erreichten FAME-Identifikationen verteilen sich also entsprechend der Menge an isolierten Stämmen auf die drei Standorte. In der Verteilung von Actinobakterien-Identifikationen auf die drei Standorte (Abbildung 19, rechts) fällt aus diesem Grunde der sehr hohe Anteil an positiven Ergebnissen (78 %) für die Proben aus der Ostsee auf. Die Standorte Nordsee und Mittelmeer liegen auch in dieser Auftragsung in ähnlicher Größenordnung, stellen jedoch mit 9 und 13 % zusammen nicht einmal ein Viertel der identifizierten Actinobakterien.

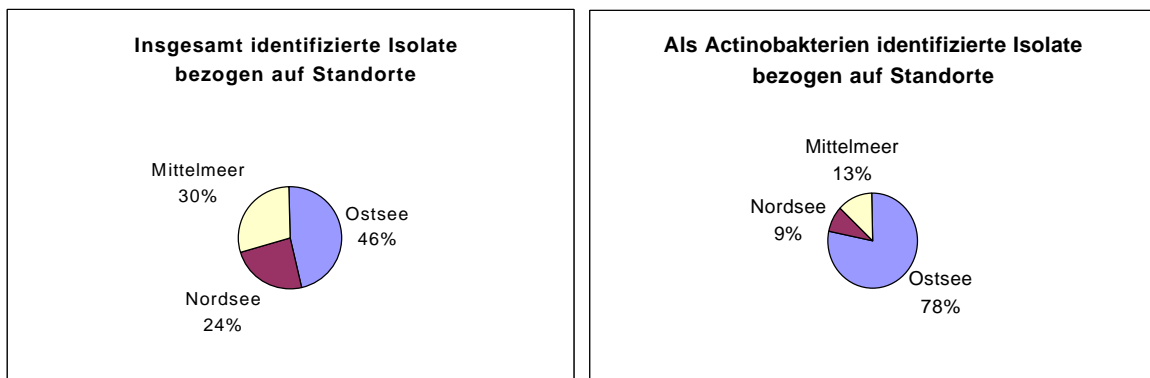


Abbildung 19. Verteilung der insgesamt identifizierten Isolate und der identifizierten Actinobakterien.

Verteilung der Actinobakterien auf die verschiedenen Schwammspecies

Relativ hohe prozentuale Anteile von 17 bis 24 % an Actinobakterien unter den FAME-Identifikationen konnten bei den Schwämmen *Halichondria panicea*, *Oscarella lobularis* und *Hamigera hamigera* festgestellt werden. Wie aus Tabelle 26 hervorgeht, konnten bei diesen Species 51 bzw. 60% aller Isolate mit Hilfe der Fettsäureanalyse identifiziert werden. Schwämme, die mit 100 bis 200 Stämmen eine relativ hohe Anzahl an Isolaten erbrachten und bei denen ebenfalls eine Identifikation von wenigstens der Hälfte der Isolate erfolgreich war, wie *Chondrosia reniformis*, *Acanthella acuta* und *Axinella damicornis/verrucosa* zeigen mit 2 bis 3 % dagegen niedrige Anteile an Actinobakterien.

Mit 12 bis 13 % Actinobakterien unter den identifizierten Isolaten liegen die Schwämme *Haliclona oculata/valliculata* und *Aplysina cavernicola* im mittleren Bereich, wobei berücksichtigt werden muß, daß nur 33 bzw. 5 % aller Isolate dieser Schwämme identifiziert werden konnten. Bei einer weiteren Identifikation von Isolaten dieser Species könnte sich die Höhe der Anteile an Actinobakterien besonders bei *Aplysina cavernicola* noch stark verändern.

Während aus dem Mittelmeerschwamm *Ircinia fasciculata*, der mit 83 % die höchste Rate an identifizierten Isolaten aufweist, kein Actinobakterium gewonnen werden konnte, zeigen zwei andere Species aus dem Mittelmeer, *Oscarella lobularis* und *Hamigera hamigera*, bezogen auf die Gesamtzahl an Isolate, die höchsten Anteile an Actinobakterien. Da bei beiden Arten nur eine eher geringe Anzahl an Isolaten vorliegt, muß die Möglichkeit einer Korrektur der Zahlen nach unten bei einer Erhöhung der Zahl an Identifikationen eingeräumt werden. Als sicher ist dagegen der hohe Anteil von Actinobakterien bei *Halichondria panicea* anzusehen, der auf einem umfangreichen Datensatz beruht.

Tabelle 26. Prozentanteile der FAME-Identifikationen an den Gesamtisolaten und Anteile der identifizierten Actinobakterien an der Gesamtzahl der FAME-Identifikationen einzelner Schwammspecies.

Schwammspecies	Zahl der Isolate	Prozentanteil der FAME-Identifikationen von den Isolaten dieser Species	Prozentanteil der Actinobakterien an den FAME-Identifikationen dieser Species
<i>Halichondria panicea</i>	1934	60	17
<i>Haliclona oculata/valliculata</i>	325	33	12
<i>Chondrosia reniformis</i>	170	52	2
<i>Acanthella acuta</i>	212	58	3
<i>Axinella damicornis/verrucosa</i>	122	50	3
<i>Ircinia fasciculata</i>	207	83	Keine
<i>Petrosia ficiformis</i>	86	19	6
<i>Oscarella lobularis</i>	41	51	24
<i>Hamigera hamigera</i>	71	51	22
<i>Aplysina cavernicola</i>	60	5	13

Aus der Schwammspecies *Halichondria panicea* wurden 60 % der Isolate gewonnen (1934 von 3228) und 1155 Isolate konnten erfolgreich mit FAME identifiziert werden (64 % aller Fettsäure-Identifikationen). Da *Halichondria panicea* die einzige beprobte Art in der Ostsee war, stellt der Schwamm dort 100 % aller Isolate und FAME-Identifikationen, in der Nordsee als eine von drei beprobten Arten noch 60 % der Isolate (558 von 927) und 77 % der FAME-Identifikationen (330 von 430).

Verteilung der Actinobakterien auf Isolationsmedien

Zur Aufnahme einer möglichst großen Diversität der schwamm-assoziierten Bakterien wurde ein breites Spektrum von Medien zur Isolierung eingesetzt. Dabei wurden unterschiedliche Strategien verfolgt (siehe Kapitel 3.2.1 „Isolierung von Bakterien“). Ausgehend von einem Basismedium wurden verschiedene Salzgehalte (HSPC-Reihe) oder Nährstoffkonzentrationen (TSB-Reihe) angeboten. Auch kamen Kombinationen von Selektivmedien zum Einsatz, die spezielle Bakteriengruppen aufgrund ihrer besonderen Stoffwechselfähigkeiten im Wachstum begünstigen sollen. Für die Gruppe der Actinobakterien wurde eine Reihe von Medien mit speziellen Substraten, wie Chitin, Alginat, Stärke hergestellt. Selektivmedien wurden auch für andere Bakteriengruppen (*Cytophaga/Flavobacterium*-Gruppe, Myxobakterien) und mögliche Schwamm-Symbionten eingesetzt. Eine Aufstellung aller verwendeten Medien und ihrer Zusammensetzung befindet sich im Anhang in Kapitel A 2.1 „Rezepte der Medien“.

Um den Erfolg des Einsatzes selektiver Medien für die Isolierung von Actinobakterien aus marinen Umweltproben zu prüfen, wurden die Actinobakterien-Identifikationen für die einzelnen Mediengruppen ausgezählt und der Isolationserfolg der einzelnen Mediengruppen in Tabelle 27 dargestellt.

Tabelle 27. Verteilung der Actinobakterien-Identifikationen auf verschiedene Medien.

Medium	FAME-Identifikationen	Actinobakterien-Identifikationen	Prozentanteil der Actinobakterien an der Gesamtzahl an FAME-Identifikationen	Prozentanteil der Actinobakterien an der Gesamtzahl an Actinobakterien-Identifikationen
TSB-Serie	515	47	9	21
HSPC-Serie	580	142	24	62
Selektivmedien für Actinobakterien	547	35	6	15
Selektivmedien für andere Bakteriengruppen	151	5	3	2
Summe	1793	229		

Entgegen den Erwartungen ist nur ein geringer Anteil der identifizierten Actinobakterien auf Selektivmedien für diese Gruppe isoliert worden (35 Stämme). Der überwiegende Teil der Isolate (142 Stämme) ist auf Medien der HSPC-Serie und damit auf einem verschiedene Kohlenstoffquellen enthaltenden Medium unterschiedlicher Salzgehalte gewachsen (siehe Tabelle 28). Der zweitgrößte Teil (47 Stämme) ist auf Medien der TSB-Serie und damit auf Medien unterschiedlicher Nährstoffkonzentrationen gewachsen. Bei dieser Mediengruppe wurde der Salzgehalt den Bedingungen am Probenahmeort angeglichen, mit Ausnahme der ersten Exkursion in der Ostsee (HO, HOB) und der Probenahme im Mittelmeer 1999 (E99-Serie). Weitere 5 als Actinobakterien identifizierte Isolate sind auf Medien gewachsen, die das Wachstum anderer Bakteriengruppen begünstigen sollten. Da sowohl Actinobakterien als auch Vertreter der *Cytophaga/Flavobacterium*-Gruppe die Fähigkeit zum Abbau von Makromolekülen besitzen, kann es beim Einsatz von Selektivmedien auf Basis der Stoffwechseleigenschaften von Bakteriengruppen zu derartigen „Überschneidungen“ kommen.

Bei der Betrachtung der Verteilung von Actinobakterien-Identifikationen auf die Medien für jeden Probenahmestandort (Tabelle 28), zeigt sich, daß ein hoher Anteil der Actinobakterien aus der Ostsee auf salzhaltigen Nährböden mit mindestens 2,0 bis 3,4 % NaCl isoliert werden konnte (69 %).

Innerhalb dieser Gruppe sind 22 % Isolate sogar auf einem Medium gewachsen, das in seinem Salzgehalt höher liegt als der Probenahmeort. Aus der Nordsee konnten mit Ausnahme von zwei Stämmen alle Isolate auf Medien mit 3,4 bis 3,8 % NaCl geerntet werden, davon immerhin 65 % auf den eingesetzten Selektivmedien. 23 % der Isolate aus dem Mittelmeer aus dem Jahr 2000 wurden auf Medien mit einem Salzgehalt von 3,4 bis 3,8 % aufgefunden, die übrigen 77 % wuchsen auf Medien ohne Salz oder mit Salzgehalten des Brackwasserbereiches (bis 2,0 % NaCl). Zwei der Stämme, die nicht auf Medium mit Meersalzgehalt isoliert wurden, wuchsen auf dem Symbiontenmedium, welches die Bedingungen im intrazellulären Milieu von Schwammzellen imitiert und weitere 12 Isolate auf Medien ähnlichen Salzgehaltes (0,2 bis 0,7 % NaCl). Eine relativ hohe Ausbeute an Actinobakterien (27 %) konnte mit dem Actinomyceten-Agar der Firma Difco (ACT) mit einem Salzgehalt von 0,2 % erzielt werden. Aus der Probenahme im Mittelmeer 1999 konnten keine Actinobakterien mit Hilfe der FAME identifiziert werden, was eventuell auf die Auswahl der in dieser Probenahme eingesetzten Medien zurückzuführen ist. Wie gerade dargestellt wurden Actinobakterien zu einem großen Anteil auf Medien isoliert, die den Salzgehalt des Probenahmestandortes aufwiesen oder mögliche Bedingungen im Inneren von Wirtszellen imitieren. Der Salzgehalt scheint für die Isolation der Bakteriengruppe aus marinen Schwämmen eine entscheidendere Rolle zu spielen als das Nährstoffangebot oder die Nährstoffkonzentration eines Mediums. Da für die Probenahme im Mittelmeer 1999 Medien eingesetzt wurden, die einen maximalen Salzgehalt von 1,2 % und damit nur einen Brackwasser-Salzgehalt hatten, das Mittelmeer aber ein vergleichsweise hohen Salzgehalt von etwa 3,8 % aufweist, kann dieser Umstand zum Fehlen der Actinobakterien in den Isolaten geführt haben.

Tabelle 28. Verteilung der Actinobakterien-Identifikationen auf die eingesetzten Medien. Zur Erklärung der Medienabkürzungen siehe A 2.1 „Rezepte der Medien“.

Medium	Medien-eigenschaften	Salzgehalt (%)	Actinobakterien-Identifikationen				
			Ostsee	Nordsee	Mittelmeer 2000	Gesamt	
TSB 30	variierende Nährstoffkonzentration	0,1/3,8*	5	0	n.e	5	
TSB 3		0,1/3,8*	13	0	2	15	
TSB 3 + Salz		3,4	n.e	n.e	1	1	
TSB 0,3		0,1/3,8*	20	0	n.e	20	
TSB 0,03		0,1/3,8*	6	0	n.e	6	
HSPC 30	variierender Salzgehalt, Auswahl an C-Quellen	3,8	39	2	2	43	
HSPC 15		2,0	84	0	3	87	
HSPC 7,5		1,3	0	0	6	6	
HSPC 0		0,6	0	2	1	3	
HSPC S + Salz		3,4	n.e	3	n.e	3	
SSI	selektiv für Symbionten	0,5	n.e	0	2	2	
ACT	selektiv für Actinobakterien	0,2	n.e	n.e	8	8	
BHI		0,7	n.e	n.e	3	3	
GYM		3,4	n.e	3	n.e	3	
GYM S		3,4	n.e	2	n.e	2	
SCK		3,4	n.e	1	n.e	1	
GyA		3,4	n.e	1	n.e	1	
CHI		3,4	n.e	5	2	7	
ALG		3,4	n.e	1	n.e	1	
Strepto A		0,18	6	n.e	n.e	6	
Strepto C		1,2	6	n.e	n.e	6	
Summe				179	20	30	229

n.e = Das Medium wurde in dieser Probenahme nicht eingesetzt, * = Die Medien der TSB-Reihe hatten für die Ostsee-Probenahme einen Salzgehalt von 0,1 % und wurden für die Probenahme in Nordsee und Mittelmeer 2000 auf 3,8 % aufgesalzen.

Der Versuch zur Verwendbarkeit von Glycerin-Archivierung für Plattierungen von Schwamm-Material ergab, daß bei gleichem Plattierungsumfang aus der Glycerin-Archivierung nur etwa die Hälfte der Isolate gewonnen werden konnten (38 Isolate aus dem Glycerin-Ansatz gegenüber 57 Isolaten aus der Frischmaterial-Plattierung). Über eine Verschiebung der isolierten Diversität kann an dieser Stelle keine Aussage getroffen werden, da sich die vorliegende Arbeit in erster Linie mit Actinobakterien beschäftigt und aus dem Versuchsansatz nur zwei gültige Actinobakterien-Identifikationen aus der Glycerin-Plattierung (E00-8E) vorliegen.

Fettsäurezusammensetzung bei unterschiedlichen Familien und Unterordnungen der Actinobakterien

Die in der Literatur beschriebenen Markerfettsäuren für Gram-positive Bakterien 15:0 *iso*, 16:0 *iso*, und 17:0 *iso* (Ritchie *et al.* 2000), sowie die für Actinobakterien typischen Fettsäuren 18:1 ω 9c und 10 Methyl 18:0 (Lauer 2001) konnten in den meisten Fettsäurechromatogrammen und damit in den untersuchten Unterordnungen (SO) der Actinomycetales wiedergefunden werden (Tabelle 29). Jedoch liegen diese Markerfettsäuren in den meisten Fällen lediglich in geringen Anteilen der Gesamtfettsäure vor. Die Fettsäure 15:0 *iso* erreicht nur in der Unterordnung Micrococcineae bis zu 43 % an der Gesamtfettsäure, die Fettsäure 16:0 *iso* macht in den Unterordnungen Corynebacterineae, Micrococcineae und Micromonosporineae bis zu 30 % aus. Die Fettsäure 17:0 *iso* ist in den Unterordnungen Micrococcineae und Micromonosporineae mit nur höchstens 10 % vertreten, die Fettsäure 18:1 ω 9c in der Unterordnung Actinomycineae und Corynebacterineae mit bis zu 40 % und die Fettsäure 10 Me 18:0 in der Unterordnung Corynebacterineae bis zu 23 %. Die nach Ritchie *et al.* (2000) ebenfalls für die Gruppe der Gram-positiven Bakterien typischen Fettsäuren 10 Methyl 16:0 und 10 Methyl 17:0 traten nur in der Unterordnung Micromonosporineae in geringen Anteilen auf; in den meisten Chromatogrammen fehlten diese Fettsäuren. Andere Fettsäuren, die nicht als Markerfettsäuren gelten, können dagegen höhere Anteile an der Gesamtfettsäure ausmachen wie z.B. die Fettsäure 15:0 *anteiso*, die in allen untersuchten Unterordnungen mit Werten von bis 78 % nachgewiesen wurde. Auch wurden die Fettsäuren 16:0, 17:1 ω 8c und 17:0 *anteiso* in fast allen Unterordnungen mit Anteilen von bis zu 37 %, 18 % bzw. 40 % detektiert. Während die Fettsäure 14:0 *iso* in den Unterordnungen Corynebacterineae und Micrococcineae bis zu 7 % ausmachen kann, sind die Fettsäuren 15:1 *anteiso* und *iso* 17:1 ω 9c den beiden Unterordnungen Micrococcineae und Micromonosporineae in Werten bis zu 10 % gemein.

Tabelle 29. Fettsäurezusammensetzung von Unterordnungen (SO) der Actinomycetales. Markerfettsäuren für Actinobakterien sind rot markiert und bei allen untersuchten Isolatn der gleichen Unterordnung auftretende Fettsäuren fett hervorgehoben. SO 1: Actinomycineae, SO 7: Corynebacterineae, SO 6: Micrococcineae, SO 8: Micromonosporineae, SO 11: Streptomyceinae.

Fettsäure	Anteil der Fettsäure an der Gesamtfettsäure in Prozent					
	SO 1	SO 7	SO 6	SO 8	SO 11	<i>Actinomadura</i>
14:0 2OH			0-9			
14:0 iso		1-4	0-7	0-1	4	
14:0	1	1-10	0-3		1	
15:1 anteiso		0-1	0-5	8-9		
15:0 anteiso	1	39-46	37-78	30-31	28	
15:0 iso		0-9	1-43		11	
15:0	1	0-9	0-4	1-2	4	
16:1 2OH			0-7	0-1		
16:0 iso		14-31	1-30	4-15	13	
16:0	21	1-37	1-16	1-2	10	20-22
anteiso 17:1 ω9c			0-5	1-3	4	
iso 17:1 ω9c		0-1	0-2	6-10	2	
17:1 ω5c		0-3				
17:1 ω8c	1	1-11	0-2	8-18	1	
17:0 iso		0-4	1-7	3-10	3	
17:0 anteiso		8-29	1-40	7-12	12	
17:0	2	0-15	0-4	2		
17:0 10 methyl		0-4		1-7		
18:1 ω9c	41	8-38	0-2	0-1		33-35
18:0	8	2-9	0-4	0-2		2-5
10 Me18:0		0-23	0-1	0-2		
16:1 ω7c/ 15:0 iso 2OH	1	8-31	0-4		7	0-3
18:2 ω6,9c/ 18:0 anteiso	25	0-1	0-2			38-43
19:1 ω11c/ 19:1 ω9c		1-7				

Die Unterordnung Actinomycineae, vertreten durch die Familie Actinomycetaceae, zeigt ein von allen anderen Unterordnungen deutlich abweichendes Fettsäuremuster und zeichnet sich durch die drei Fettsäuren 16:0, 18:1 ω9c und 18:2 ω6,9c/18:0 iso mit einem Anteil von zusammen 87 % der Gesamtfettsäure aus.

Bei der Betrachtung der Fettsäureanteile an der Gesamtfettsäure auf Basis der Familienzugehörigkeit, dargestellt in Tabelle 30, zeigt sich, daß die vier untersuchten Familien der Unterordnung Micrococcineae in ihrer Fettsäurezusammensetzung sowohl qualitativ als auch quantitativ recht homogen sind, wogegen die vier Familien der Unterordnung Corynebacterineae deutliche Unterschiede im Fettsäuremuster zeigen. Die Fettsäure 14:0 beispielsweise kann ausschließlich bei den beiden Familien Nocardiaceae und Tsukamurellaceae in Anteilen bis zu 10 % festgestellt werden und nur die drei Familien Gordoniaceae, Nocardiaceae und Tsukamurellaceae weisen die Markerfettsäuren 18:1 ω9c und 10 Me 18:0 sowie die Fettsäure 16:1 ω7c/15:0 iso 2OH auf. Die Familie Corynebacteriaceae unterscheidet sich in ihren hohen Anteilen der Fettsäuren 15:0 anteiso (39-46 %), 16:0 (1-10 %) und 17:0 anteiso (8-29 %) von den anderen Familien der gleichen Unterordnung, während sie in genau diesen Fettsäuregehalten dem Muster in der Unterordnung Micrococcineae gleicht. Die Unterordnung Micromonosporineae, vertreten durch die Familie Micromonosporaceae, zeichnet sich durch ein der Unterordnung Micrococcineae entsprechendes Fettsäuremuster, das Fehlen der Markerfettsäure 15:0 iso und die höchsten Werte bei der Markerfettsäure 17:0 iso aus.

Es kann festgestellt werden, daß die als Markerfettsäuren für die Actinobakterien geltenden Fettsäuren 15:0 *iso*, 16:0 *iso*, 17:0 *iso*, 18:1 ω 9c und 10 Me 18:0 in den meisten aber nicht allen untersuchten Chromatogrammen detektiert wurden und in den Unterordnungen auch keinen hohen Anteil an der Gesamtfettsäure ausmachen. Bei dem Vergleich der Fettsäuremuster der Unterordnungen gleichen sich die Profile der Unterordnungen Corynebacterineae, Micrococcineae und Micromonosporineae relativ stark, während die Unterordnungen Actinomycineae und Streptomycineae abweichende Fettsäuremuster zeigen und sich damit von allen anderen Unterordnungen deutlich absetzen. Innerhalb der Unterordnung kann es stabile Fettsäuremuster, wie in der Unterordnung Micrococcineae geben, oder zu familienspezifischen Abweichungen kommen, wie in Unterordnung Corynebacterineae festgestellt wurde.

Die Fettsäurezusammensetzung der als *Actinomadura* identifizierten Isolate unterscheidet sich deutlich von den Mustern der anderen Actinobakterien. Weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der Isolate weisen darauf hin, daß die Isolate nicht zu den Actinobakterien gehören (siehe Kapitel 6.2). Der hohe Anteil der Markerfettsäure für Actinobakterien 18:1 ω 9c hat vermutlich zusammen mit dem Auftreten der Fettsäuren 16:0 und 18:2 ω 6,9c/18:0 *anteiso*, die beispielsweise bei den Actinomycineae in größeren Anteilen detektiert werden, zu einer Einordnung der Isolate in die Gattung *Actinomadura* durch das MIDI-System geführt.

Tabelle 30. Fettsäurezusammensetzung von Familien der Actinomycetales. Markerfettsäuren für Actinobakterien sind rot markiert und bei allen untersuchten Isolatn der gleichen Familie auftretende Fettsäuren fett hervorgehoben. Zur Erklärung der Unterordnungen (SO) und der Familien-Abkürzungen siehe Tabelle 24.

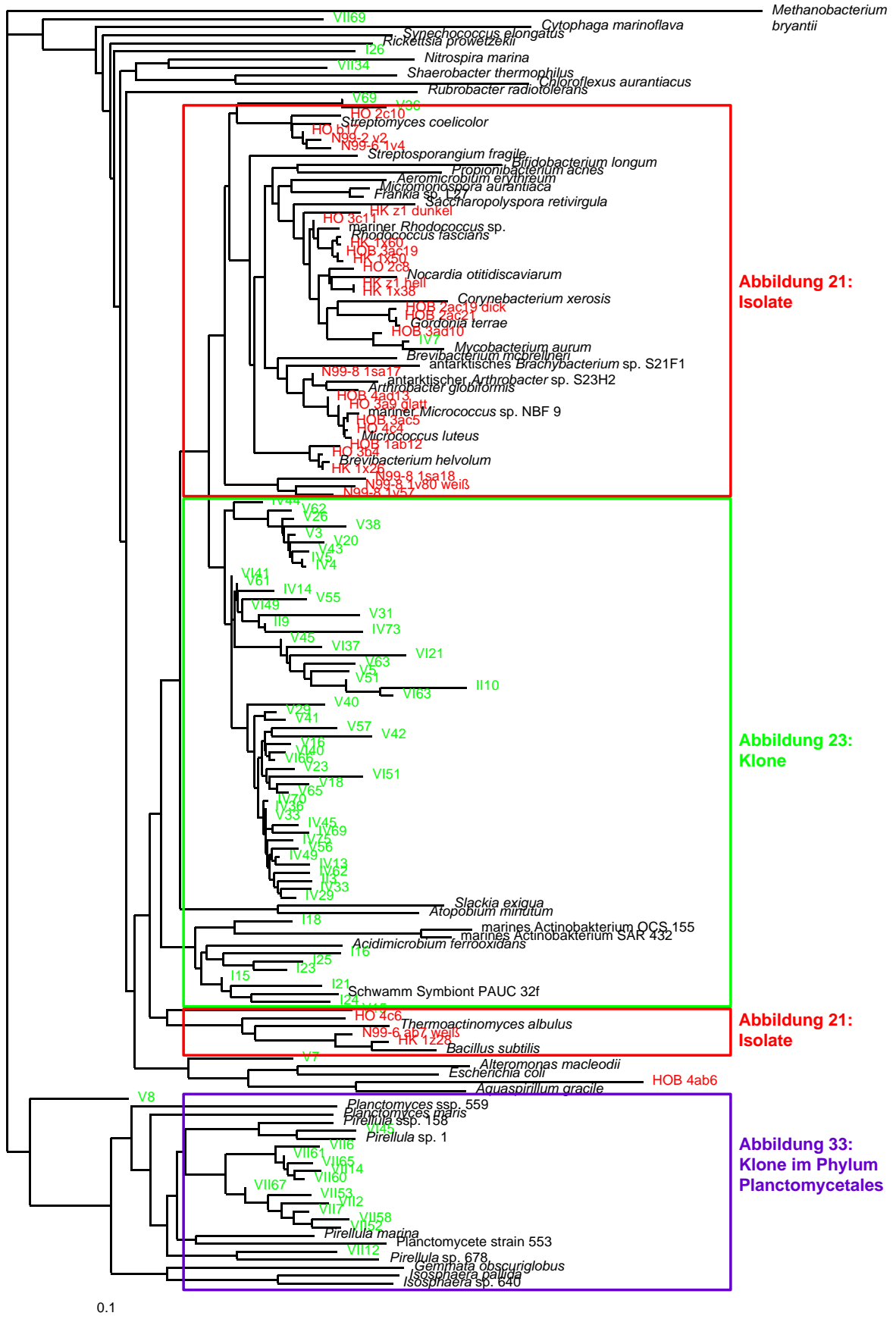
Fettsäure	Anteil der Fettsäure an der Gesamtfettsäure in Prozent											Actino- madura
	SO 1-1	SO 7-1	SO 7-3	SO 7-5	SO 7-6	SO 6-1	SO 6-2	SO 6-3	SO 6-8	SO 8-1	SO 11-1	
10:0			0-1	0-1	0-1	0-2						
12:0 3OH			0-1		0-1	0-1		0-1				
12:0 2OH				0-1		0-1						
12:0				0-1	0-1	0-1		0-1				
13:0 anteiso		0-1				0-4		0-2				
13:0 iso				0-1		0-3		0-1				
13:0				0-1		0-1						
14:0 2OH						0-1		0-9				
14:0 iso		1-4		0-1		0-6	0-2	2-7	0-5	0-1	4	
14:0	1	0-1	0-2	1-10	4-6	0-3		0-3	0-2		1	
15:1 anteiso		0-1				0-3	0-2	0-5		8-9		
15:1 ω5c				0-1								
15:1 ω6c				0-1	0-1							
15:0 anteiso	1	39-46		0-3	0-1	43-78	48-66	37-73	38-54	30-31	28	
15:0 iso		1-9		0-3	0-8	1-43	7-14	1-26	1-11		11	
15:0 iso 3OH						0-1		0-1				
15:0 2OH						0-1						
15:0	1	0-1	0-4	0-9	0-4	0-4	0-4	0-3	0-1	1-2	4	
16:1 2OH						0-7				0-1		
16:1 iso						0-3		0-1	0-2	2		
16:1 ω7c				0-2		0-1						
16:1 ω7c alc						0-2	0-3					
16:1 ω9c			0-1	0-2	0-3	0-1						
16:1 ω11c						0-2	0-3					
16:0 2OH												0-1
16:0 iso		14-31		0-1		1-18	2-15	3-30	11-30	4-15	13	
16:0	21	1-10	16-23	20-37	24-33	1-7	1-2	1-10	1-16	1-2	10	20-22
16:0 10 Me			0-3	0-4								
17:1 anteiso						0-2			0-1			
anteiso 17:1 ω9c						0-5	0-1	0-1		1-3	4	
iso 17:1 ω9c				0-1	0-1	0-2		0-1		6-10	2	
iso 17:1 ω10c						0-2		0-1				
17:1 ω5c				0-3								
17:1 ω8c	1	0-2	1-11	1-10	1-8	0-2				8-18	1	
17:0 iso		0-4		0-1		0-7	1-3	0-4	0-5	3-10	3	
17:0 anteiso		8-29		0-1		1-26	19-30	2-17	4-40	7-12	12	
17:0 2OH				0-1								
17:0 3OH						0-1	0-1					
17:0	2	0-1	0-15	0-7	1-3	0-2	0-1	0-2	3-4	2		
17:0 cyclo				0-1		0-1		0-1				
17:0 10 methyl			0-4	0-4						1-7		
18:1 2OH						0-2						
18:1 ω9c	41	0-2	11-34	8-32	33-38	0-2				0-1		33-35
18:1 ω7c		0-2	0-2	0-3	0-1	0-2	0-1	0-1	0-1	0-1		
18:0 3OH					0-1	0-1						0-1
18:0	8		2-9	0-9	0-3	0-4		0-1		0-2		2-5
10 Me18:0			11-15	0-23	0-12	0-1				0-2		
19:0 anteiso				0-2								
19:0			0-5	0-5	0-1							
19:0 10 Me				0-1		0-1						
20:4 ω6,9,12,15c			0-2	0-2	0-1							
20:2 ω6,9c				0-2	0-2							
20:1 ω7c				0-1								
20:1 ω9c	1		0-2	0-1	0-1							
20:0 iso						0-1						0-1
20:0				0-3		0-2						
15:1 iso/ 13:0 3OH						0-2		0-1				
14:0 3OH/ 16:1 iso						0-1		0-1				
16:1 ω7c/ 15:0 iso 2OH	1	0-2	8-20	9-31	9-15	0-4	0-2	0-4	0-2		7	0-3
17:1 iso/17:1 anteiso						0-2		0-1				
18:2 ω6,9c/18:0 ant.	25		0-1			0-2						38-43
19:1 ω11c/19:1 ω9c				1-7	0-4							

4.1.2 Identifikation der Isolate durch Sequenzierung

Der phylogenetische Stammbaum in Abbildung 20 gibt einen Überblick der Verteilung von Sequenzen der Isolate und Klone innerhalb der Eubakterien. Es wurden Referenzsequenzen aus der EMBL-Datenbank gewählt, die das Spektrum der Eubakterien und insbesondere der Actinobakterien gut abdecken. Eine Liste der Referenzsequenzen sowie Tabellen des Vergleichs von Isolat- und Klonsequenzen mit Sequenzen der EMBL-Datenbank finden sich im Anhang (Tabellen A 16 bis A 23).

Aufgrund der Datenmenge konnte der phylogenetische Übersichtsstammbaum nur einfach gerechnet werden (vergleiche Kapitel 3.1.8). Um abgesicherte Verteilungen der Sequenzen zu erhalten, wurden Gruppen von Isolaten und Klonen gebildet und mit den Referenzen 100fach verrechnet (bootstrap-Rechnung) und in den Abbildungen 21 und 23 unter Angabe der Wahrscheinlichkeit der Verzweigung an dieser Stelle (bootstrap-Werte) dargestellt. Die Klone der Serie VII aus *Haliclona valliculata* (E00-6) sind den Planctomycetales am ähnlichsten. Um die genaue Einordnung dieser Klone in die Gruppe der Planctomycetales darzustellen, wurde ein weiterer Stammbaum (Abbildung 33) gerechnet, der ein eingeschränktes Spektrum an Referenzen der Actinobacteria, jedoch zusätzliche Referenzsequenzen aus der Gruppe der Planctomycetales (Gripenburg *et al.* 1999) enthält.

Abbildung 20 auf Seite 71. Phylogenetischer Stammbaum der Sequenzen von Isolaten (rote Bezeichnungen), Klonen (güne Bezeichnungen) und Referenzstämmen (schwarze Bezeichnungen) auf Basis der 16S rDNA. Die Farbmarkierung ist in allen dargestellten phylogenetischen Stammbäumen einheitlich und ermöglicht den Vergleich mit dem Fettsäure-Dendrogramm in Abbildung 18. Der Stammbaum wurde einfach gerechnet und dient der Übersicht. Die farbigen Kästen markieren die Lage von Sequenzgruppen im phylogenetischen Gesamtstammbaum, die in den 100fach gerechneten Stammbäumen der Abbildungen 21, 23 und 33 dargestellt sind.

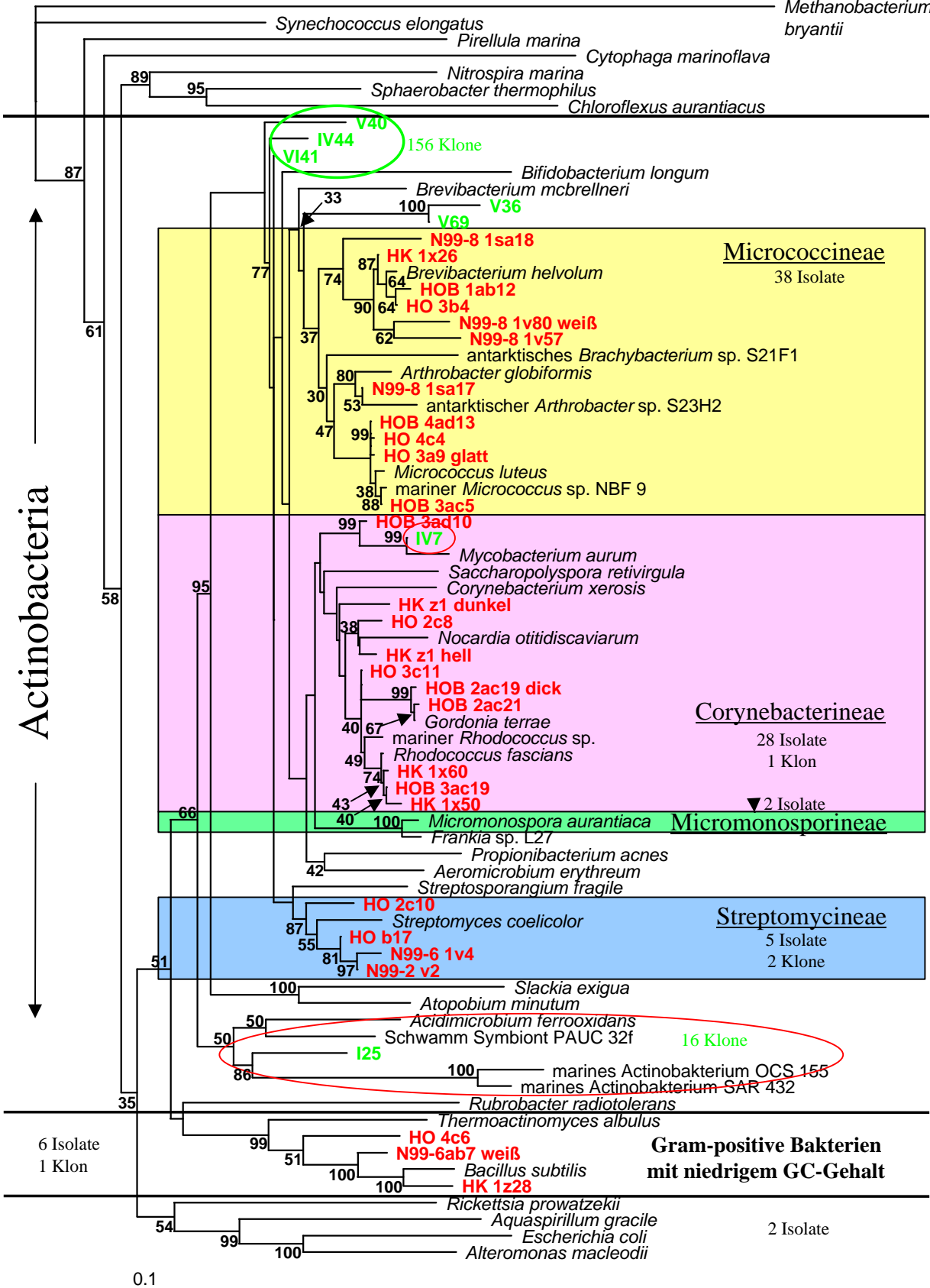


In dem in Abbildung 21 dargestellten phylogenetischen Stammbaum ist eine deutlich mit den in Abbildung 18 dargestellten Ergebnissen der Fettsäureanalyse übereinstimmende Gruppierung der Isolate zu erkennen. Die Sequenzen der Isolate bilden ein großes Cluster innerhalb der Actinobacteria, welches sich in die vier Unterordnungen Micrococcineae, Corynebacterineae, Streptomycineae und Micromonosporineae unterteilen läßt. Im Gegensatz zur Fettsäureanalyse ist auf Basis der 16S rDNA eine saubere Trennung zwischen den Sequenzen der einzelnen Unterordnungen möglich. Sequenzen aus den Klonierungsexperimenten (grün) finden sich nur vereinzelt in Clustern mit Isolaten oder Referenzstämmen (rote Ringe) und bilden ein separates Cluster innerhalb der Actinobacteria (grüner Ring). Sequenzen aus Meerwasserproben oder aus dem antarktischen Meereis und terrestrische Referenzstämme bilden keine getrennten Cluster. Oft liegen sie eng zusammen, wie z.B. *Arthrobacter* sp. S23H2 aus dem antarktischen Meereis mit *Arthrobacter globiformis* oder die aus Meerwasserproben gewonnenen Sequenzen von *Micrococcus* NBF 9 und *Rhodococcus* sp. mit Sequenzen von *Micrococcus luteus* bzw. *Rhodococcus fascians*.

Von den 81 erhaltenen Isolatsequenzen fallen 38 (47 %) in die Micrococcineae; eine zweite große Gruppe von 28 Sequenzen (35 %) clustert innerhalb der Corynebacterineae. Mit nur fünf als *Streptomyces* identifizierten Sequenzen sind die Isolate in der Gruppe der Streptomycineae schwach vertreten. In die Unterordnung Micromonosporineae fallen sogar nur zwei Sequenzen. Trotz der für die Actinobakterien spezifischen Amplifikation mit dem Primer 5'243 (siehe Kapitel 3.1.2) treten ferner Sequenzen auf, die außerhalb der Actinobacteria clustern. Sechs Sequenzen gehören in die Gruppe der Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt, davon die Hälfte in die Gattung *Thermoactinomyces*, die häufig in Gemeinschaft mit Actinobakterien isoliert wird (Colquhoun *et al.* 1998; Goodfellow und Haynes 1984) und zwei Sequenzen zu den beta-Proteobakterien.

Die Verteilung der Isolate innerhalb der Actinobakterien entspricht den aufgrund der FAME-Ergebnisse gestellten Erwartungen. Die Anteile der Isolate an den vier Unterordnungen sind zugunsten der schwächeren Unterordnungen verschoben, zeigen jedoch die gleiche Reihenfolge in ihrer Größe mit den dominierenden Micrococcineae, gefolgt von den Corynebacterineae, Streptomycineae und Micromonosporineae.

Abbildung 21 auf Seite 73. Phylogenetischer Stammbaum von Isolatsequenzen auf Basis der 16S rDNA. Zur Darstellung der Einordnung der Sequenzen in die Actinobacteria sind Referenzsequenzen und zur besseren Orientierung ebenfalls einige Sequenzen aus den Klonierungsexperimenten angegeben. Die Farbmarkierungen entsprechen Abbildung 20. Die Unterordnungen der Actinobakterien wurden entsprechend der Farbgebung in Abbildung 18 mit farbigen Blöcken hinterlegt. Die Micrococcineae wurden gelb, die Corynebacterineae rosa, Streptomycineae blau und die Micromonosporineae grün hinterlegt. Sind nicht alle Sequenzen eines Clusters oder einer Gruppe in die Rechnung und Darstellung eines Stammbaumes eingegangen, wurde die Anzahl der Vertreter des Clusters als Isolat- und/oder Klon-Anzahl in den Unterordnungsblöcken, hinter durch Klammern gekennzeichnete Cluster oder in durch Kreise oder Linien markierten Bereichen angegeben. Die bootstrap-Werte wurden als schwarze Ziffern an die Verzweigungen gesetzt. Da eine relativ hohe Anzahl an bootstrap-Werten zwischen 30 und 50 lag wurde die Angabegrenze entsprechend herabgesetzt und alle Werte ≥ 30 in die Stammbäume gesetzt.



Von den 81 Isolatsequenzen stammen 59 aus *Halichondria panicea* aus der Ostsee und 22 aus der Nordsee (Tabelle 31). In der Verteilung der Sequenzen auf die Unterordnungen lassen sich kaum Muster erkennen. Auffällig ist lediglich, daß von den 10 Sequenzen aus *Haliclona oculata* sieben in die Familie Microbacteriaceae der Unterordnung Micrococccineae fallen und alle sechs Isolatsequenzen, die mit den Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt clustern, aus der Species *Halichondria panicea* (Nord- und Ostsee) stammen. Außerdem stellt die Probe *Halichondria panicea* aus der Nordsee die beiden als *Micromonospora* identifizierten Sequenzen. Da der Großteil der Sequenzen aus *Halichondria panicea* stammt (70 von 81 Sequenzen), dürfen diese „Auffälligkeiten“ jedoch nicht überbewertet werden.

Tabelle 31. Anzahl und Herkunft der Isolate-Sequenzen.

Schwamm	Probenahmeort	Probenbezeichnung	Anzahl der Sequenzen
<i>Halichondria panicea</i>	Ostsee	HO	17
<i>Halichondria panicea</i>	Ostsee	HOB	23
<i>Halichondria panicea</i>	Ostsee	HK	19
<i>Halichondria panicea</i>	Nordsee	N99-6	11
<i>Haliclona oculata</i>	Nordsee	N99-8	10
<i>Petrosia ficiformis</i>	Nordsee	N99-2	1

4.1.3 Identifikation der Isolate aufgrund von Stoffwechseleigenschaften (BIOLOG)

Die Untersuchung von 56 Stämmen erbrachte für 27 Isolate (47,5 % der getesteten Stämme) eine Identifikation auf Basis ihrer Substratverwertung. Als Kriterium für eine gültige Identifizierung diente der vom Hersteller angegebene Similaritätsindex von $\geq 0,500$ nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden. Eine Übersicht der Identifikationen wird in Tabelle A 25 im Anhang gegeben. Von den 27 Isolaten fallen 15 in die Unterordnung Corynebacterineae (*Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Gordonia*), sieben in die Unterordnung Micrococccineae (*Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Cellulomonas*, *Microbacterium*, *Aureobacterium*) und vier Stämme in die Gruppe der Gram-positiven Bakterien mit geringem GC-Gehalt (*Pediococcus*, *Lactococcus*). Ein Isolat wurde als Vertreter der CDC Group E (siehe Tabelle A 26 im Anhang) identifiziert und fiel damit in die Unterordnung Actinomycineae.

4.1.4 Vergleich der verwendeten Identifikations-Methoden

Um die Eignung verschiedener Methoden zur Identifikation von Isolaten aus Schwämmen einzuschätzen, wurden die Ergebnisse der Fettsäureanalyse, der Sequenzierung und des BIOLOG-Systems bei mehrfach identifizierten Isolaten miteinander verglichen. Für 47 Isolate liegt eine Doppelidentifizierung vor (Tabelle 32): 35 Isolate konnten mit FAME und Sequenzierung der 16S rDNA, sechs durch FAME und BIOLOG und sechs weitere durch Sequenzierung der 16S rDNA und BIOLOG identifiziert werden. Vier Isolate wurden durch alle drei Methoden identifiziert.

Tabelle 32. Mehrfachidentifikationen von Isolaten

Identifizierung durch	Isolate
FAME/Sequenzierung	35
FAME/Biolog	6
Sequenzierung/Biolog	6
FAME/Sequenzierung/Biolog	4
Summe	51

Wie aus Tabelle A 27 im Anhang hervorgeht wurde unter den mit allen Methoden identifizierten Stämmen nur einer übereinstimmend der Art *Micrococcus luteus* zugeordnet. Bei einem zweiten waren die Identifikationen durch Sequenzierung und BIOLOG identisch, die FAME-Identifikation jedoch abweichend. Das dritte Isolat konnte in seiner Zugehörigkeit zu den Corynebacterineae von allen drei Methoden identifiziert werden, Gattung und Art wurden jedoch unterschiedlich zugeordnet. Der letzte Stamm schließlich zeigt in Sequenzierung und FAME die gleiche Unterordnung mit unterschiedlicher Gattung, während die BIOLOG-Identifikation völlig im Ergebnis abweicht und eine andere Unterordnung angibt.

Auch die Doppelidentifikationen zeigten wenig übereinstimmende Ergebnisse. Durch Sequenzierung und FAME konnte nur für vier Isolate eine identische Bestimmung erreicht werden. Weitere 11 Isolate konnten der gleichen Gattung, zwei Stämme der gleichen Familie zugeordnet werden. Zehn Stämme konnten mit den beiden Methoden als der gleichen Unterordnung zugehörig identifiziert werden während bei den restlichen acht Isolaten keine übereinstimmende Identifikation erreicht werden konnte. Bei den sechs Doppelidentifikationen durch Sequenzierung und BIOLOG konnte nur ein Isolat der gleichen Familie zugeordnet werden, die übrigen Isolate zeigten zusammen mit den sechs Doppelidentifikationen durch FAME und BIOLOG keine übereinstimmenden Ergebnisse.

Nach Pinhassi *et al.* (1997) wurde bei Untersuchungen auf Basis der 16S rDNA bei Ähnlichkeiten von $\geq 97\%$ von einer Identifizierung auf Spezies- und bei Ähnlichkeiten von mindestens 93 % von einer Identifizierung auf Gattungs-Ebene ausgegangen. Bei der Betrachtung der 35 Doppelidentifikationen durch Sequenzierung und FAME zeigen nur vier Isolate identische Ergebnisse. Dieses Ergebnis ist unerwartet niedrig, läßt sich aber nach der Untersuchung der Fettsäuremuster in Kapitel 4.1.1 durch die große Ähnlichkeit der Fettsäure-Chromatogramme verschiedener Familien und Unterordnungen erklären. Da die Sequenzierung der Isolate die Cluster der Fettsäure-Untersuchung abdeckt, wurde eine erneute Betrachtung der unsequenzierten Isolate hinsichtlich ihrer phylogenetischen Einordnung vorgenommen. Dazu wurden auf der Grundlage der Euklidischen Distanz Cluster der gleichen Gattung und der gleichen Art im Fettsäure-Dendrogramm gebildet, die sequenzierten Stämme in diesen Clustern markiert, ihre 16S rDNA-Identifikation eingetragen und mit den FAME-Ergebnissen verglichen. Zusätzlich wurden auffällige morphologische Eigenschaften wie z.B. die Tetraden-Bildung bei *Micrococcus*-Arten berücksichtigt. Auf dieser Grundlage wurde eine Korrektur der Fettsäure-Identifikationen vorgenommen, die zu einer leichten Verschiebung der Fettsäure-Ergebnisse führte.

Die Korrekturen sind in den Tabellen A 14 und A 15 im Anhang dokumentiert. Die Abbildung A 1 im Anhang gibt eine Übersicht der bearbeiteten Cluster.

Tabelle 33. Übersicht der Verteilung von Identifikationen nach der Korrektur taxonomischen Einordnung der Fettsäure-Identifikationen. Familien, deren Zahlen sich stark verändert haben, sind rot hervorgehoben.

Familie	MIDI	Gesamt	Korrektur	Gesamt
Micrococcaceae	135	166	138	180
Brevibacteriaceae	4		17	
Cellulomonadaceae	11		6	
Microbacteriaceae	16		19	
Corynebacteriaceae	12		1	
Gordoniaceae	5	57	9	44
Nocardiaceae	34		34	
Tsukamurellaceae	6		0	
Micromonosporaceae	2		2	
Streptomycetaceae	1	1	1	1
Thermomonosporaceae	3	3	3	3
Summe	229	229	229	229

Obwohl die Bearbeitung der Fettsäure-Identifikationen in einzelnen Familien deutliche Verschiebungen hervorgerufen hat, wie in Tabelle 33 für die Familien Brevibacteriaceae, Cellulomonadaceae, Corynebacteriaceae und Gordoniaceae festzustellen ist, hat sich das Gesamtbild auf Ebene der Unterordnung eher geringfügig verändert. Im Wesentlichen sind 13 Identifikationen aus der Gruppe der Corynebacterineae in die Micrococcineae verschoben worden, darunter sechs als *Corynebacterium bovis* identifizierte Isolate, die durch Sequenzierung den *Brevibacterium helvolum* zugeordnet werden konnten (siehe Tabelle A 15). Auch ist es zu Verschiebungen innerhalb von Familien gekommen. Beispielsweise wurden 24 Isolate, die aufgrund ihrer Fettsäurezusammensetzung den *Arthrobacter* zugeordnet wurden als *Micrococcus* identifiziert. Aufgrund der Clusterbildung im Fettsäure-Dendrogramm und der genetischen Identifikation von drei durch MIDI als *Tsukamurella paurometabolum* klassifizierten Isolaten als *Rhodococcus*, wurden auch die übrigen drei Isolate in die Gruppe der *Rhodococcus* gestellt und die Gattung *Tsukamurella* verschwindet aus der Liste der Identifikationen. Die fehlerhafte Identifikation der *Rhodococcus* Isolate als *Tsukamurella paurometabolum* ist neben den Gehalten der Fettsäuren 17:1 ω 8c und 18:1 ω 9c insbesondere auf das Auftreten der Fettsäure 14:0 und hohen Gehalten über 20 % der Fettsäure 16:0 in beiden Familien zurückzuführen, mit denen sie sich deutlich von anderen Familien der Corynebacterineae absetzen. Im Fall der als *Corynebacterium bovis* fehlidentifizierten *Brevibacterium helvolum* Isolate haben vermutlich die Gehalte der Fettsäuren 15:0 *iso*, 15:0 *anteiso*, 16:0 *iso*, 17:0 *anteiso* und das Fehlen der Fettsäuren 18:1 ω 9c und 16:1 ω 7c/15:0 *iso* 2OH der untersuchten Stämme zur Verwechslung der beiden Familien geführt, da die Familie Corynebacteriaceae in diesen Fettsäuren dem typischen Muster der Familien innerhalb der Micrococcineae entspricht.

Abbildung 22 gibt eine Übersicht der Verteilung der Identifikationen auf Basis der korrigierten Fettsäureanalyse und der Sequenzierung der 16S rDNA für *Halichondria panicea* aus der Ostsee.

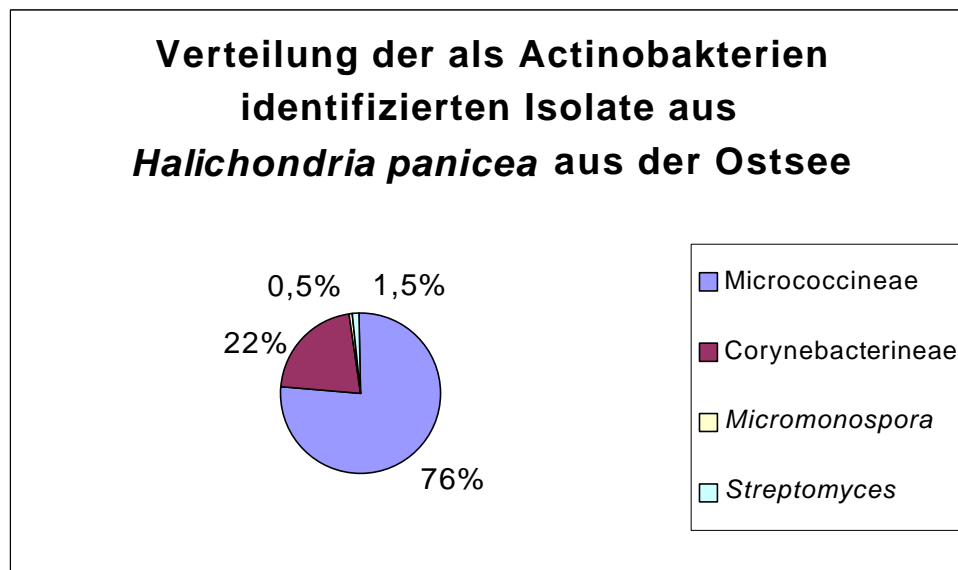


Abbildung 22. Verteilung aller identifizierten Actinobacteria aus *Halichondria panicea* aus der Ostsee auf Unterordnungen und Gattungen.

4.2 Genetische Diversität der Actinobakterien

4.2.1 Diversität der Klone

Um ein vollständigeres Bild von der Diversität der Bakterien in den Schwämmen zu erhalten wurde neben der in Kapitel 4.1 präsentierten kultivierbaren Diversität die genetische Diversität mit Hilfe von Klonierungsexperimenten untersucht. Eine Übersicht der durchgeführten Klonierungen gibt Tabelle 34.

Tabelle 34. Übersicht der Klonierungsexperimente.

Schwamm	Probenbezeichnung	Herkunft	Bezeichnung der Klon-Serie	Anzahl der gewonnenen Klone
<i>Ircinia spinosula</i>	E00-25	Mittelmeer	I	17
<i>Haliclona oculata</i>	N99-8	Nordsee	II und VI	7 und 33
<i>Halichondria panicea</i>	HK	Ostsee	IV	63
<i>Halichondria panicea</i>	N99-6	Nordsee	V	62
<i>Haliclona valliculata</i>	E00-6	Mittelmeer	VII	42

Die 224 gewonnenen Klone verteilen sich auf sieben Gruppen und nur wenige von ihnen clustern mit Isolatsequenzen oder Referenzen, sondern bilden separate Cluster, wie aus Abbildung 23 hervorgeht. Die Gruppen 1, 6 und 7 liegen außerhalb der Actinobacteria, jedoch fällt mit den Gruppen 2 bis 5 der Großteil der Sequenzen in diese Bakteriengruppe (siehe Tabelle 35).

Die sechs Klone der Gruppe 1 fallen in verschiedene Phyla der Eubakterien (delta- und gamma-Proteobakterien, Cyanobakterien, *Dictyoglomus* sp. Gruppe). Gruppe 6 besteht aus einem Klon in der Gruppe der Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt und die mit 42 Klonen relativ große Gruppe 7 clustert innerhalb der Planctomycetales, darunter allein 40 Sequenzen aus *Haliclona valliculata* aus dem Mittelmeer. Mit Ausnahme der beiden als Cyanobakterien identifizierten Klonsequenzen aus Gruppe 1, die 100% Übereinstimmung im Datenbankvergleich erreichen, beträgt die Übereinstimmung der Sequenzen der Gruppen 1, 6 und 7 nur 84 bis 94 %.

Tabelle 35. Verteilung der Klone in Gruppen und Cluster.

Gruppe	Cluster	Anzahl der Klone	Einordnung	Schwamm	Herkunft
1		6	Eubacteria		
2	A	16	Actinobacteria	<i>Ircinia spinosula</i>	Mittelmeer
3	B-D	145	Actinobacteria	<i>Halichondria panicea</i> <i>Haliclona oculata</i>	Ost-/Nordsee Nordsee
4		3	Actinobacteria	<i>Halichondria panicea</i>	Ost-/Nordsee
5	E	11	Actinobacteria	<i>Halichondria panicea</i>	Ost-/Nordsee
6		1	Gram-positve Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt	<i>Halichondria panicea</i>	Nordsee
7		40 1 1	Planctomcetales	<i>Haliclona valliculata</i> <i>Haliclona oculata</i> <i>Halichondria panicea</i>	Mittelmeer Nordsee Nordsee

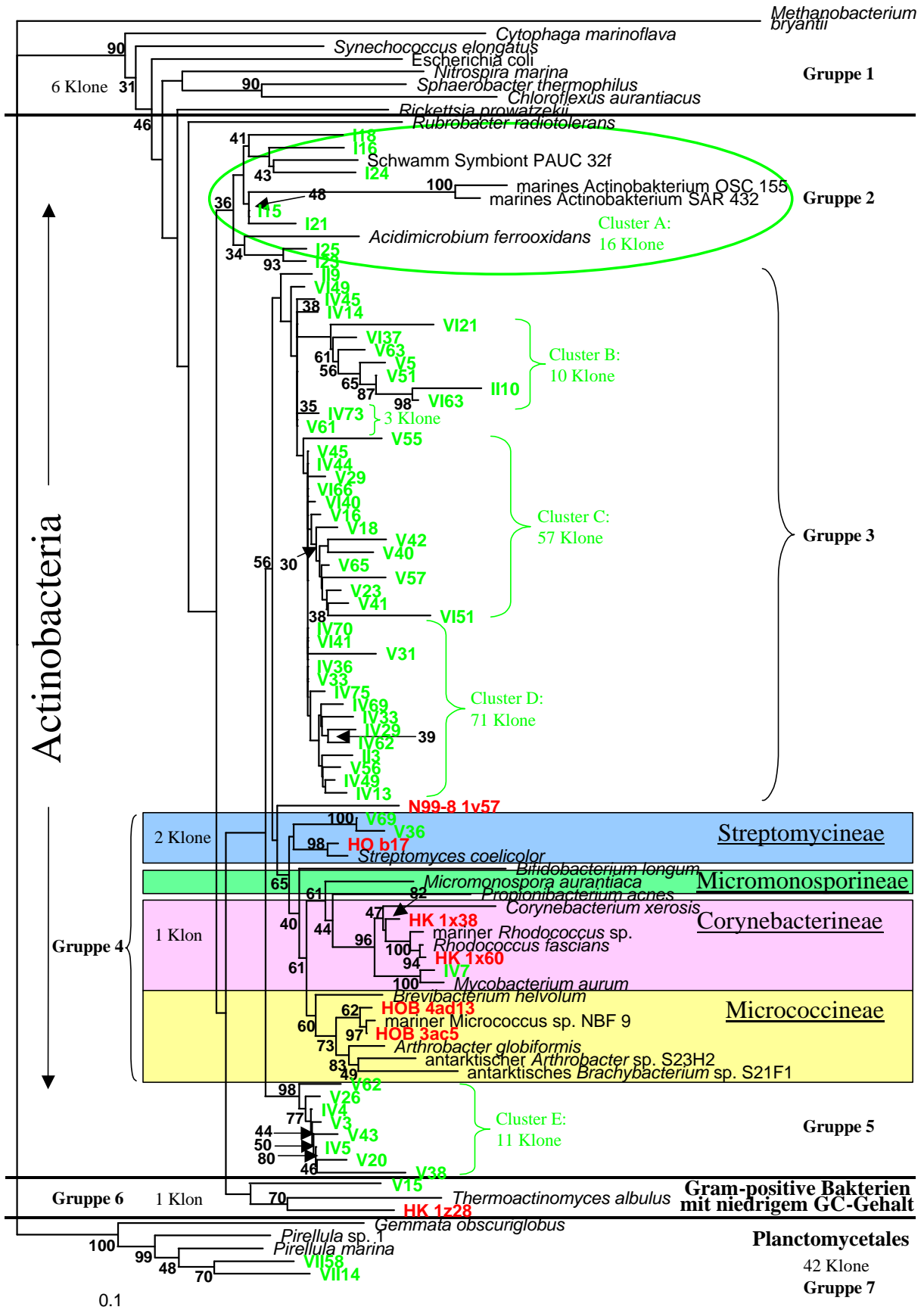
Innerhalb der Actinobacteria bilden 16 der 17 Klone aus Gruppe 2, das von Sequenzen des Schwammes *Ircinia spinosula* gebildet wird, ein separates Cluster mit vier Referenzsequenzen, von denen es sich überwiegend um Sequenzen aus Umweltproben und nicht um kultivierte Stämme handelt (Schwamm Symbiont PAUC 32f und Actinobakterien SAR 432 und OSC 155).

Die große Gruppe 3 bildet ein separates von Referenzen und Isolaten deutlich getrenntes Großcluster, das sich nochmals in die kleineren Cluster B (10 Klone), C (57 Klone) und D (71 Klone) unterteilt. Cluster B wird aus Klonsequenzen der Serien V und II+VI gebildet und damit ausschließlich aus Sequenzen der Nordsee-Schwammproben von *Halichondria panicea* und *Haliclona oculata*. Cluster C wird mit Ausnahme der Klonsequenz IV44 aus *Halichondria panicea* der Ostsee aus Klonsequenzen von Actinobakterien der beiden Nordsee-Schwämme gebildet. Dagegen liegt der Schwerpunkt von Cluster D auf Sequenzen des Ostsee-Schwammes *Halichondria panicea*, der 54 von 71 Sequenzen stellt.

Die drei Klone der Gruppe 4 stellen die einzigen Sequenzen dar, die gemeinsam mit Sequenzen der Isolate auftreten. Die Klone V36 und V69 aus *Halichondria panicea* der Nordsee liegen innerhalb der Streptomycineae und der Klon IV7 aus *Halichondria panicea* der Ostsee wurde mit 98,5 % als *Mycobacterium chlorophenicus* identifiziert und fällt damit in die Unterordnung Corynebacterineae. Gruppe 5 entspricht dem cluster E, dessen 11 Klonsequenzen aus den beiden *Halichondria panicea* Proben der Ost- und Nordsee ein weiteres separates Cluster bilden; die Sequenzen konnten mit 92 bis 98 % Übereinstimmung als *Nostocoida limicola* II identifiziert werden.

Es kann zusammenfassend festgestellt werden, daß die Klonsequenzen aus den beiden Mittelmeerschwämmen *Haliclona valliculata* und *Ircinia spinosula* (Gruppen 2 und 7) in sich abgeschlossene Cluster mit Referenzsequenzen bilden. Das „*Nostocoida limicola* II“-Cluster E besteht ausschließlich aus Sequenzen der Species *Halichondria panicea* aus Nordsee und Ostsee, ebenso die drei mit Isolaten clusternden Klonsequenzen der Gruppe 4. Die Mehrheit der Klonsequenzen (Gruppe 3) teilt sich in die Cluster B, C und D, wobei ersteres von Sequenzen aus Nordsee-schwämmen gebildet wird und bei den letzteren jeweils die Mehrheit der Sequenzen aus Schwammproben entweder der Ostsee oder der Nordsee stammen.

Abbildung 23 auf Seite 79. Phylogenetischer Stammbaum von Klonsequenzen aus Schwämmen auf Basis der 16S rDNA. Zur Darstellung der Einordnung der Sequenzen in die Actinobacteria sind Referenzsequenzen und zur besseren Orientierung ebenfalls einige Isolatsequenzen angegeben. Die Farbmarkierungen entsprechen denen in Abbildung 20 und 21.



Unter der Bezeichnung „*Nostocoida limicola*“ sind in der EMBL-Datenbank 19 Sequenzen eingetragen, die in drei Gruppen eingeteilt und mit den römischen Ziffern I, II und III bezeichnet sind. Es handelt sich dabei um Sequenzen der 16S rDNA von isolierten Bakterien aus Klärschlamm. Die insgesamt 14 Sequenzen der Bezeichnung *Nostocoida limicola* I und II werden in der Gruppe der Actinobakterien der Unterordnung Micrococcineae zugeordnet, die fünf Sequenzen von *Nostocoida limicola* III dagegen zu den Planctomycetales gezählt. Die Klonsequenzen der vorliegenden Arbeit, deren nächster Verwandter die EMBL-Datenbank mit „*Nostocoida limicola* II“ angab und die in diesem Kapitel als Klone im „*Nostocoida limicola* II-Cluster“ besprochen wurden, sind ausnahmslos dem Eintrag UNRDNA16S am ähnlichsten, der den Actinobakterien zugeordnet wird. Die Sequenz von *Nostocoida limicola* III im phylogenetischen Baum der Klone aus *Haliclona valliculata* in Abbildung 33 gehört jedoch zu den Planctomycetales und wurde als Referenzsequenz für diese Bakteriengruppe eingesetzt.

4.2.2 Vergleich der Diversität verschiedener Proben aus der Ostsee, Nordsee und dem Mittelmeer mit Hilfe der Denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE)

Mit Hilfe der Denaturierenden Gradientengelelektrophorese sollte die Diversität von schwamm-assoziierten Actinobakterien in den verschiedenen Schwammspecies und den verschiedenen Probenahmeorten aufgenommen und sowohl miteinander als auch mit der Diversität von Actinobakterien in Standortwasser- und Sedimentproben verglichen werden (siehe Kapitel 3.1.2). Die drei Gele wurden mit den Buchstaben *a*, *b* und *c* bezeichnet und Banden, die in mehr als einer Probe auftraten, mit einem Code aus Gelbezeichnung und einem weiteren Buchstaben des Alphabets beschriftet. Dabei wurden die Banden die in Laufrichtung des Gels zuerst auftraten, mit dem Zweitbuchstaben *a* bezeichnet und alle folgenden Banden in alphabetischer Reihenfolge gekennzeichnet. Da das Gel *c* mehr als 26 Banden aufweist wurden hier zusätzlich einige Buchstaben des griechischen Alphabets verwendet. Der zweite Buchstabe einer Bandenbezeichnung weist dabei auf die Lage der Bande im betrachteten Gel hin, nicht jedoch auf Banden eines anderen Gels, die den gleichen Zweitbuchstaben tragen. Die Bande *aa* entspricht somit der zweiten Bande *aa* in Gel *a*, nicht aber den Banden *ba* oder *ca* in den Gelen *b* und *c*. Die gleiche Lage der Banden in einem Gel wurde durch die Verwendung eines Standards (Mittelmeer-Marker, siehe Kapitel 3.1.5 in „Material und Methoden“) mit einem bekannten, reproduzierbaren Bandenmuster bestimmt. Dazu wurde in jedem Gel die Distanz der ersten und zweiten Hauptbande des Markers (mit Pfeilen gekennzeichnet) gleich 5 Geleinheiten (GE) gesetzt, die Distanz aller Banden zur ersten Marker-Bande ausgemessen und diese in Geleinheiten umgerechnet (nach Blümel 2001). Die Banden eines Gels mit gleichen Werten an Geleinheiten wurden als übereinstimmend eingestuft und mit gleichen Zweitbuchstaben bezeichnet. Dieses Verfahren wurde für jedes der drei Gele durchgeführt. Die Verwendung des Markers und seine Gleichbehandlung mit den Proben einer jeden Probenserie gewährleistet die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Gele. Alle drei Gele weisen Randeffekte auf, die durch eine unregelmäßige elektrische Feldstärke an den Rändern des Gels während des Laufes verursacht wurden und die Auswertung einzelner Banden oder Proben erschwerte oder verhinderte.

Gel a: Schwämme aus Nord- und Ostsee

Neben verschiedenen Standards (im Folgenden auch als „Marker“ bezeichnet) sind in Gel *a* Schwammproben drei verschiedener Schwamm-species unterschiedlicher Herkunft aufgetragen, darunter vier verschiedene Proben von *Halichondria panicea* aus der Nordsee, der Ostsee und aus dem Becken der „Ostseelebensgemeinschaft“ im Aquarium (vergleiche Kapitel 2.2.1 „Bearbeitung der Ostseeproben“).

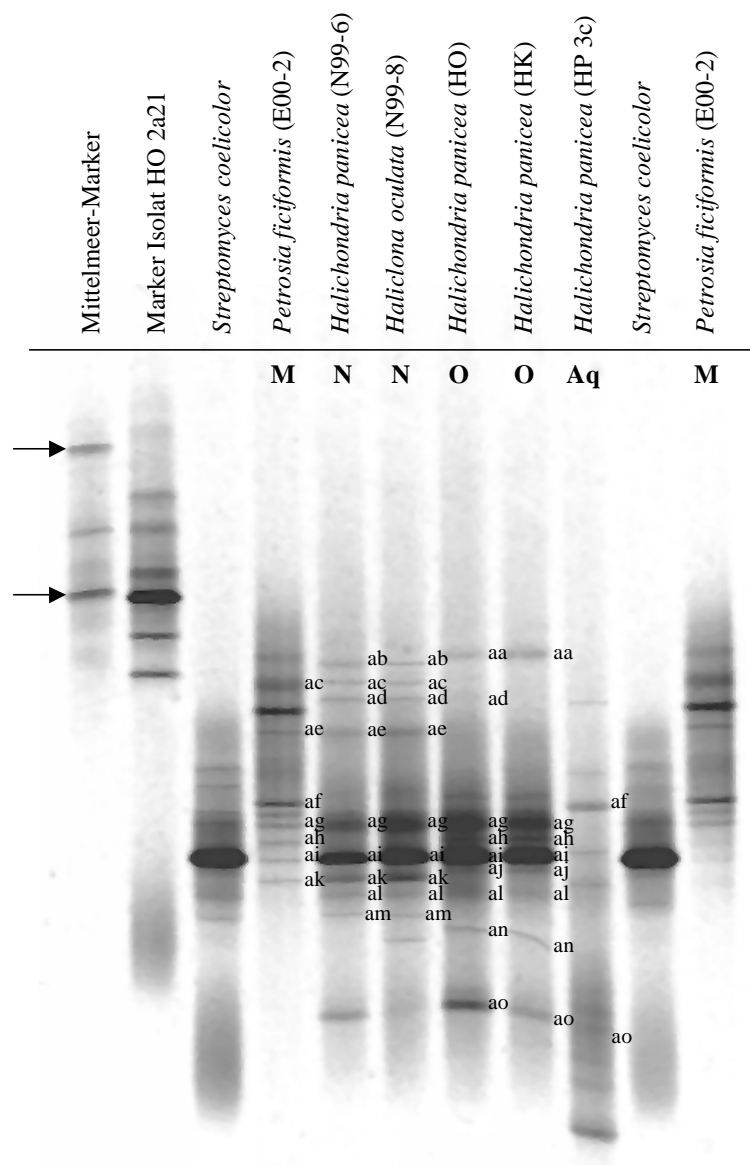


Abbildung 24. DGGE-Gel *a* mit Schwammproben der Nordsee und der Ostsee. Es sind exemplarisch Schwammproben des Mittelmeeres und aus dem Aquarium mit aufgetragen worden. Die Pfeile markieren die beiden Banden des Mittelmeer-Markers, die zur Definition von Geleinheiten genutzt wurden.

Die Diversität scheint in allen Proben mit acht bis zehn Banden ähnlich groß zu sein. Mit Ausnahme der *Halichondria panicea*-Probe HP 3c aus dem Aquarium zeigen die Bandenmuster der einzelnen Proben eine hohe Übereinstimmung, besonders in der unteren Gelhälfte, in der sie die Banden *ag* und *ai* teilen. In den Nord- und Ostseeproben stellen diese Banden die Hauptbanden dar, während sie in

der Probe E00-2 *Petrosia ficiformis* schwächer ausgeprägt sind. Die Nordseeproben N99-6 *Halichondria panicea* und N99-8 *Haliclona oculata* haben die Banden *ab* und *am* gemein, die Ostseeproben HO und HK, beide *Halichondria panicea*, die Banden *aj* und *an*, die sich ausschließlich an diesen Standorten zeigen und in den Proben der übrigen Standorte nicht auftreten. Es tritt keine gemeinsame, artspezifische Bande bei den vier Proben von *Halichondria panicea* auf, jedoch zeigt sich die Bande *ao* bei den drei Proben HO, HK und HP 3c dieser Art, die abgesehen von der zeitweiligen Hälterung der Probe HP 3c im Aquarium, alle aus der Ostsee stammen. Gemeinsam sind Nord- und Ostseeproben die Bande *al* und *ad*, wobei letztere nur in einer der beiden Ostseeproben von *Halichondria panicea* auftritt. Die Bande *ah* tritt bei den beiden Ostseeproben HO und HK von *Halichondria panicea* und der Probe E00-2 von *Petrosia ficiformis* aus dem Mittelmeer auf, während die Banden *ac*, *ae* und *ak* der Mittelmeerprobe und den beiden Nordseeschwämmen N99-6 *Halichondria panicea* und N99-8 *Haliclona oculata* gemein sind. Die Bande *aa* kommt ausschließlich in den beiden *Halichondria panicea*-Proben aus der Ostsee HO und HK vor. Abgesehen von der Bande *ao* hat der Aquariumschwamm HP 3c nur eine einzige weitere Bande mit einer anderen Probe gemein, die Bande *af*, die nur noch bei *Petrosia ficiformis* aus dem Mittelmeer auftritt.

Insgesamt betrachtet weisen die Schwammproben aus den verschiedenen Meeresgebieten recht ähnliche Bandenmuster auf, insbesondere Proben des gleichen Standortes. Auffällig abweichend und schwach zeigt sich dagegen das Bandenmuster der Probe HP 3c von *Halichondria panicea* aus dem Aquarium. Keine Bande konnte bei allen Schwämmen festgestellt werden, jedoch zeigen die Proben aus den drei Meeren die beiden übereinstimmenden Banden *ag* und *ai*. Bei Schwämmen gleicher Herkunft treten jeweils zwei weitere gemeinsame Banden auf, in der Nordsee die Banden *ab* und *am*, in der Ostsee die Banden *aj* und *an*. Darüber hinaus treten gemeinsame Banden unabhängig vom Probenahmeort in verschiedenen Proben auf. Es konnte kein Hinweis auf ein artspezifisches Bandenmuster bei *Halichondria panicea* festgestellt werden. Die übereinstimmende Bande *ao* der Proben HO, HK und HP 3c lässt sich eher auf die gemeinsame Herkunft aus der Ostsee als auf die übereinstimmende Artzugehörigkeit zurückführen, da diese Bande nicht in der Nordseeprobe N99-6 der Art auftritt.

Gel b: Vergleich von Schwamm- und Umweltproben

Das Gel b zeigt die Bandenmuster von Schwammproben der Nordsee, Ostsee und aus dem Aquarium im Vergleich zu Bandenmustern von Sediment- und Wasserproben aus Nord- und Ostsee. Die Proben aus dem Aquarium stammen aus zwei verschiedenen Versuchsbecken. Es sind drei *Halichondria panicea*-Proben aus dem Becken der Ostseelebensgemeinschaft aufgetragen (HP 3c, HP 3a1 und HP 3a2) sowie eine Probe des Exemplars der gleichen Art, das isoliert in einem Becken für Wachstumsversuche gehalten wurde (HP Kultur). Die Umweltproben scheinen mit sieben bis 16 Banden eine höhere Diversität aufzuweisen als die Schwammproben bei denen fünf bis höchstens zehn Banden auftreten. Die Sediment- oder Substratproben zeigen dabei komplexere Bandenmuster als die Wasserproben. Da *Halichondria panicea* in der Ostsee häufig auf Rotalgen der Gattung *Phyllophora* wächst, wurde eine Probe eines Rotalgenexemplars als „Substrat“-Probe aufgetragen und die Diversität der anhaftenden Actinobakterien mit den Bandenmustern der schwamm-assoziierten Actinobakterien verglichen.

Mit Ausnahme der *Petrosia ficiformis*-Probe N99-2 sind sich die Bandenmuster der Nordseeproben untereinander und dem Muster der Nordseewasserprobe recht ähnlich. Das Bandenmuster der Probe N99-2 *Petrosia ficiformis* zeigt dagegen eine höhere Übereinstimmung mit den Sedimentproben der Nordsee. Die Rotalge *Phyllophora* sp. aus der Ostsee hat übereinstimmende Banden vor allem mit den

übrigen Umweltproben aus Nord- und Ostsee. Eine generelle Übereinstimmung kann auch unter den Bandenmustern der verschiedenen *Halichondria panicea*-Proben aus der Ostsee und den beiden Aquarien festgestellt werden. Die drei Hauptbanden *bq*, *bs* und *bu* treten bei allen *Halichondria panicea*-Proben aus der Ostsee und den beiden Aquarien auf, wobei die Probe HP 3c wegen des starken Randeffects aus den Betrachtungen ausgespart werden muß. Die drei Banden liegen ebenfalls in den beiden Ostseewasserproben vor. Die Wasserproben zeigen darüber hinaus die drei Banden *bi*, *bm* und *bo*, die in keiner anderen Probe auftreten und für das Ostseewasser spezifisch zu sein scheinen.

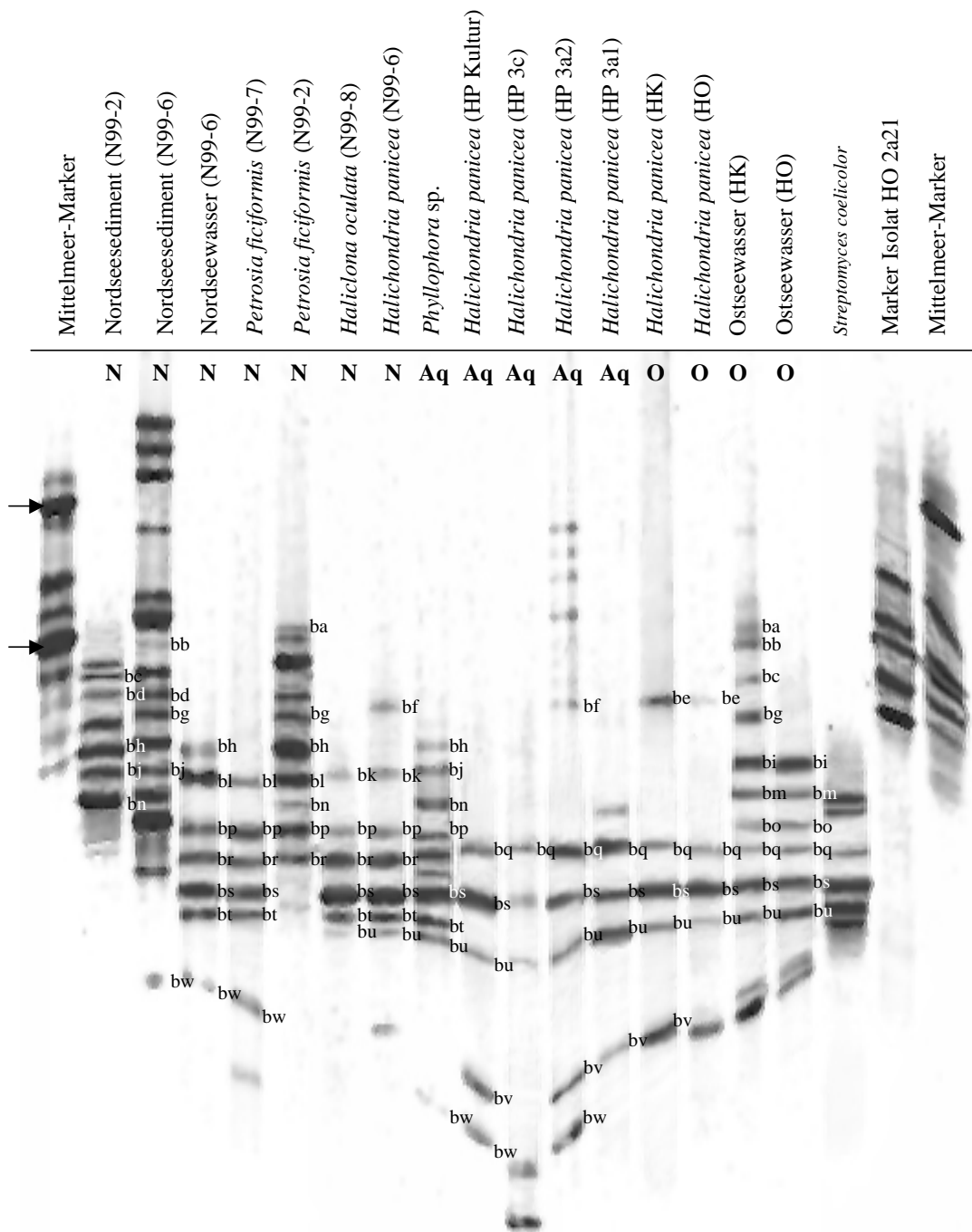


Abbildung 25. DGGE-Gel *b* mit Schwammproben der Nordsee, Ostsee und aus dem Aquarium im Vergleich zu Wasserproben und Sediment aus Nord- und Ostsee. Die Pfeile markieren die beiden Banden des Mittelmeer-Markers, die zur Definition von Geleinheiten genutzt wurden.

Die Ostseewasserprobe HK hat die drei Banden *bb*, *bc* und *bg* mit wenigstens einer der beiden Nordseesedimentproben N99-2 und N99-6 gemein, die Banden *ba* und *bg* außerdem mit der *Petrosia ficiformis*-Probe N99-2. Die beiden *Halichondria panicea*-Proben HK und HO aus der Ostsee zeichnen sich durch die gemeinsame Bande *be* aus. Die beiden *Halichondria*-Proben HP 3a1 und HP 3a2, die von unterschiedlichen Stellen eines Individuums aus dem Sammelaquarium stammen, zeigen abgesehen von den drei Hauptbanden *bq*, *bs* und *bu* sowie der Bande *bv* voneinander abweichende Bandenmuster. So kann eine erheblich höhere Bandenzahl bei der Probe HP 3a2 festgestellt werden. Die Schwammproben aus der Nordsee zeigen mit Ausnahme der Probe N99-2 *Petrosia ficiformis* die übereinstimmenden Banden *bp*, *br*, *bs* und *bt*, wobei diese vier Banden ebenfalls im Umgebungswasser anzutreffen sind. Die beiden *Petrosia ficiformis* Proben N99-7 und N99-2 zeigen außer den gemeinsamen Banden *bl*, *bp* und *br*, die alle drei auch im Nordseewasser zu finden sind, unterschiedliche Bandenmuster. Unter den Nordseeproben zeigen nur die Proben der Schwämme N99-8 *Haliclona oculata* und N99-6 *Halichondria panicea* die in keiner anderen Probe vorkommende Bande *bk*.

Es fällt auf, daß fast alle Banden, die in Schwammproben vorkommen, auch in den Proben der Schwammumgebung, also in Wasser oder Sediment vorkommen. Ausnahmen bilden für die Nordsee nur die Bande *bk* und für die Ostsee die Bande *be*. In den Umweltproben des gleichen Materials eines Standortes treten weitere gemeinsame Banden auf, die in den entsprechenden Schwammproben und in anderen Umweltproben nicht mehr aufzufinden sind. So unterscheiden sich die Bandenmuster der Sedimentproben der Nordsee deutlich vom Bandenmuster der entsprechenden Wasserprobe und die Ostseewasserproben zeigen ein deutlich anderes Muster als die Rotalgenprobe, die den Schwämmen in der Ostsee als Substrat dient. Der Standort Nordsee zeigt in der Gesamtheit seiner Schwammproben ein deutlich anderes Bandenmuster als die Schwammproben aus Aquarium oder Ostsee. Die Schwammproben der Ostsee und des Aquariums stimmen relativ gut in ihrem Bandenmuster überein, was auf die gemeinsame Probenherkunft aus der Ostsee zurückgeführt werden könnte. Auffallend ist ebenfalls, daß das Muster der Rotalgenprobe mehr Übereinstimmung mit Nordseeproben als mit Ostsee- oder Aquariumsproben aufweist, obwohl sie ursprünglich in der Ostsee genommen wurde.

In fast allen Schwammproben konnten die Banden *bs* und *bu* beobachtet werden, in den Schwammproben der Nordsee weiterhin die Banden *bp* und *br*, in der Ostsee und den Aquarien *bq* und *bv*. Es konnten keine artspezifischen Banden bei den Proben von *Halichondria panicea* und *Petrosia ficiformis* festgestellt werden. Im Gegenteil wurde bei den beiden *Petrosia ficiformis*-Proben aus der Nordsee N99-2 und N99-7 stark abweichende Bandenmuster festgestellt wie auch bei den beiden Proben HP 3a1 und HP 3a2 des gleichen Schwammindividuum von *Halichondria panicea* aus dem Aquarium. Damit stimmen die Ergebnisse des Gels *b* mit denen des Gels *a* überein. Ein weiteres wichtiges Ergebnis des Gels *b* ist das Vorkommen der meisten Schwammbanden auch in den Umweltwasserproben ihres Standortes, während wenig Übereinstimmung mit den Bandenmustern der entsprechenden Sediment- oder Substratproben zu erkennen ist. Auch kann es in Einzelfällen zu starken Unterschieden in den Bandenmustern der gleichen Species des gleichen Standortes oder gar innerhalb der Proben eines Individuums kommen.

Gel c: Schwämme des Mittelmeeres

In diesem Gel sind Proben von Schwämmen des Mittelmeeres, der Nord- und der Ostsee zusammen mit einer Ostseewasser- und zwei Nordseesedimentproben aufgetragen worden. Der allgemeine Trend zu höheren Bandenanzahlen bei Umweltproben, besonders Sedimentproben, ist auch hier zu beobachten. Unter den Schwammproben weisen komplexere Bandenmuster bei den Mittelmeerproben höhere Diversitäten hin als in den Proben aus Ost- und Nordsee.

Die Banden *ca*, *cb*, *cc*, *ce*, *cq* und *cg* treten ausschließlich bei Proben von Mittelmeerschwämmen auf, es gibt jedoch keine Bande, die allen Mittelmeerproben gemein ist. Die Banden *cz* und *cb* kommen in fast allen Schwammproben, mit Ausnahme von E00-1 *Chondrosia reniformis*, E00-3 *Agelas oroides* und E00-25 *Ircinia spinosula*, und in der Ostseewasserprobe vor. Die Banden *cc* und *ce* beschränken sich auf die Schwammproben aus Nord- und Ostsee und die Ostseewasserprobe.

Einen Sonderfall stellt der Schwamm *Petrosia ficiformis* dar, von dem die drei Proben N99-2 und N99-7 aus der Nordsee und E00-2 aus dem Mittelmeer vorliegen. Die Bandenmuster der Proben N99-2 und E00-2 stimmen in den Banden *cn* und *cy* miteinander und mit anderen Mittelmeerschwammproben überein, während die Bande *cr* die einzige ist, die in allen drei Proben vorkommt. Da diese Bande auch in anderen Proben vorkommt, kann sie nicht als artspezifische Bande angesehen werden. Die Probe N99-7 zeigt abweichend in den Banden *cz*, *cb*, *cc* und *ce* Übereinstimmung zu den Schwammproben aus Nord- und Ostsee. Die Bandenmuster der meisten Mittelmeerschwämme sind recht unterschiedlich. Neben häufig auftretenden Banden wie *ci*, *cr*, *ct*, *cz* und *cb*, die allesamt auch bei Proben anderer Standorte vorkommen, sind vereinzelt gemeinsame Banden, wie *ce* und *cq*, unter einigen Mittelmeerproben oder unter Mittelmeerproben und Proben anderer Standorte zu finden (*cj*, *cm*, *cp*, *co*, *cv*, *cd*). Die Bande *ca* konnte nur bei den Proben der Ostseeschwämme und des Ostseewassers gefunden werden und könnte eine für den Standort spezifische Bande darstellen. Ausschließlich im Nordseesediment tritt die Bande *ch* auf. Die Bande *ck* scheint spezifisch für *Halichondria panicea* aus der Ostsee zu sein.

Anders als in den Gelen *a* und *b*, in denen vor allem Schwammproben aus Nord- und Ostsee betrachtet wurden, konnte in diesem Gel unter den Mittelmeerschwämmen kaum Ähnlichkeit der Bandenmuster festgestellt werden, obwohl sie insgesamt eine höhere Diversität als die Schwammproben der anderen Meere aufweisen. Die beiden Schwämme der Gattung *Axinella* zeigten vier gemeinsame Banden (*ca*, *ci*, *ct*, *cb*), die sie jedoch auch mit anderen Proben teilen. Da keine Wasser- und Sedimentproben aus dem Mittelmeer untersucht wurden, kann über die Ähnlichkeit von Schwammbanden und Umweltproben für das Mittelmeer keine Aussage getroffen werden. Dagegen können die Ergebnisse der ersten beiden Gele in Bezug auf die Ähnlichkeit der Nord- und Ostseeproben zu ihren Umweltproben in diesem Gel bestätigt werden. So zeigen die Nordseeschwammproben keine gemeinsame Bande mit ihren Sedimentproben und die Ostseewasserprobe stimmt in den drei wichtigen Banden *cb*, *cc* und *ce* mit den Schwammproben aus der Ostsee überein. Im direkten Vergleich der drei vorliegenden *Petrosia ficiformis*-Proben N99-2, N99-7 und E00-2 wird deutlich, daß die Proben N99-2 und E00-2 von verschiedenen Standorten eine stärkere Übereinstimmung untereinander und mit den übrigen Mittelmeerproben aufweisen, als mit der Probe N99-7 aus der Nordsee, dessen Bandenmuster stark den Mustern der *Halichondria panicea*-Proben aus Nord- und Ostsee ähnelt.

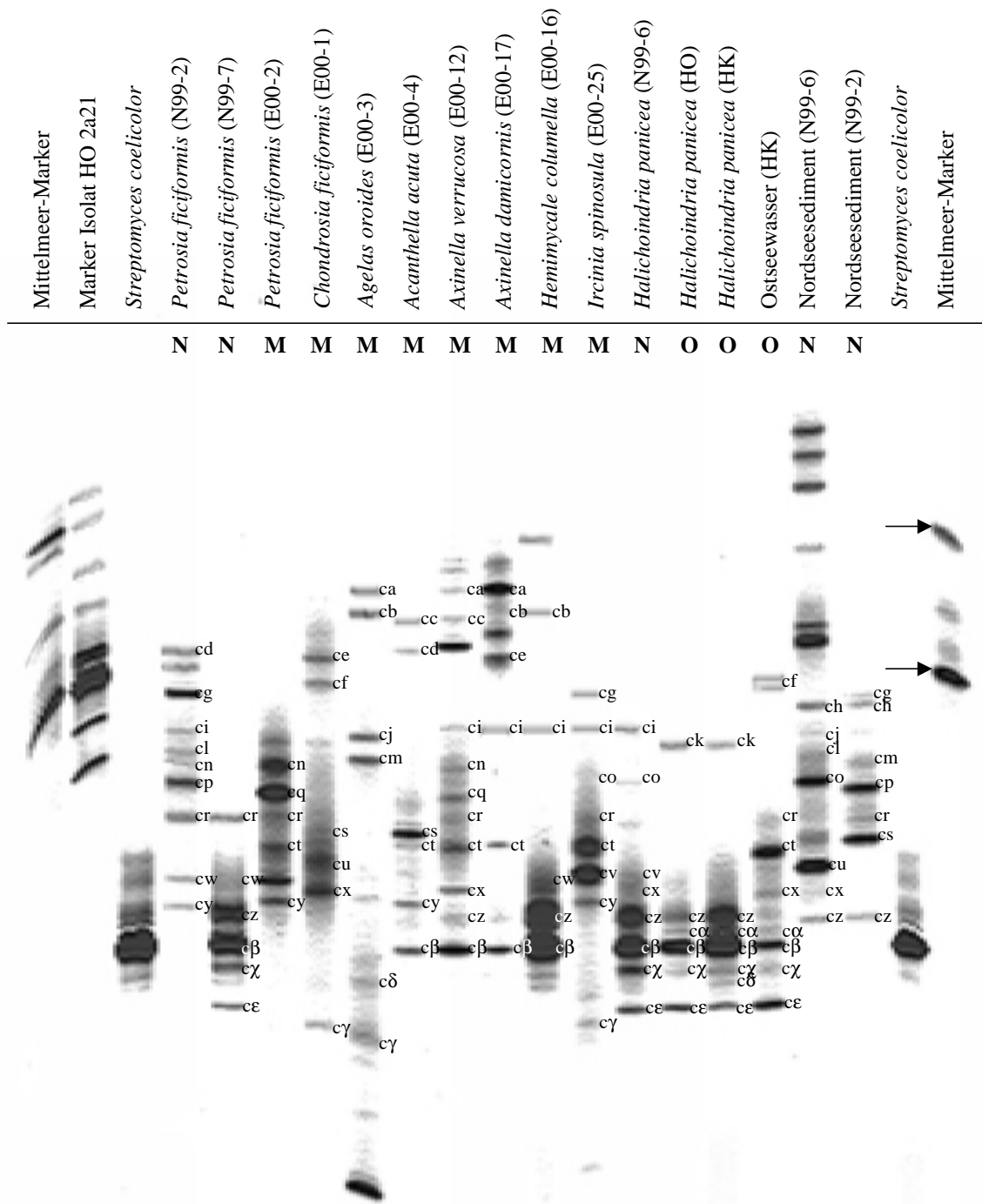


Abbildung 26. DGGE-Gel *c* mit Schwammproben des Mittelmeeres, der Nordsee und der Ostsee. Die Pfeile markieren die beiden Banden des Mittelmeer-Markers, die zur Definition von Geleinheiten genutzt wurden.

Einige auffällige Banden konnten übereinstimmend in allen drei Gelen festgestellt werden und sind in Tabelle 35 zusammengestellt.

Tabelle 35. Spezifische DGGE-Banden.

Bande in Gel a	Geleinheiten 1 GE = 0,56 cm	Bande in Gel b	Geleinheiten 1 GE = 0,54 cm	Bande in Gel c	Geleinheiten 1 GE = 0,52 cm	Eigenschaft
<i>aa</i>	6,96	<i>be</i>	6,85	<i>ck</i>	6,73	Nur bei <i>Halichondria panicea</i> in der Ostsee (HO, HK)
		<i>bi</i> <i>bm</i> <i>bo</i>	9,07 10,16 11,30	<i>ct</i> <i>cx</i>	9,62 11,35	Nur im Ostseewasser
<i>ag</i> <i>ai</i> <i>al</i>	12,86 13,93 15,18	<i>bs</i> <i>bu</i>	13,70 15,19	<i>cc</i> <i>ce</i>	13,85 15,19	Bei Schwämmen der Nord- und Ostsee (außer <i>Petrosia ficiformis</i>)
<i>aj</i>	14,46			<i>cd</i>	14,23	Bei Schwämmen und Wasser aus der Ostsee

4.2.3 Nachweis von Actinobakterien in *Halichondria panicea* mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) ermöglicht den Nachweis Actinobakterien direkt im Schwamm und kann Aufschluß über mögliche Verteilungsmuster der Bakterien im Schwamm-Mesohyl geben. Die für Actinobakterien spezifische Sonde HGC69a (Friedrich *et al.* 1999; Roller *et al.* 1994) erbrachte neben dem Nachweis von Actinobakterien im Mesohyl von *Halichondria panicea* auch Hinweise für das Auftreten der Bakterien in distinkten Bereichen des Mesohyls. Wie in Abbildung 28 zu erkennen, scheinen die Zellen in lokalen Anhäufungen im Mesohyl konzentriert vorzukommen. Im umgebenden Aquariumwasser kommen Actinobakterien dagegen wahrscheinlich als einzelne Zellen vor, wofür die Anfärbung einzeln liegende Zellen auf dem Wasserfilter in Abbildung 27 spricht.

Die Positivkontrolle EUB338 detektierte unspezifisch Bakterien sowohl im Schwamm-Mesohyl als auch auf dem Wasserfilter, ebenso die DAPI-Färbungen, während mit der Negativkontrolle NON338 keine Fluoreszenz-Signale erreicht werden konnten.

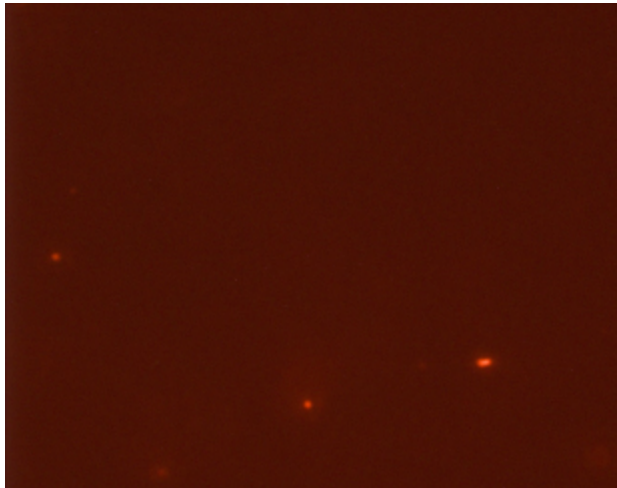


Abbildung 27. Epifluoreszenz-Aufnahme eines Umgebungswasserfilters von *Halichondria panicea*. Der Filter wurde mit der für Actinobakterien spezifischen Cy3-markierten Sonde HGC69a hybridisiert.

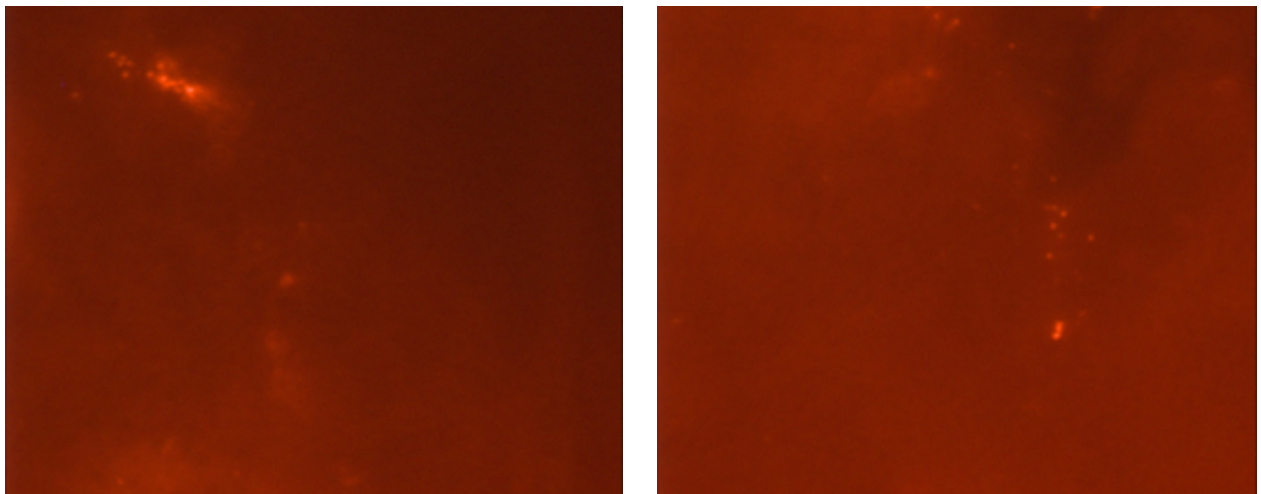


Abbildung 28. Epifluoreszenz-Aufnahmen von *Halichondria panicea*. Die Mesohylregion wurde mit der für Actinobakterien spezifischen Cy3-markierten Sonde HGC69a hybridisiert.

5 Charakterisierung ausgewählter Isolate

5.1 Morphologische Charakterisierung

Es wurden 131 Isolate lichtmikroskopisch betrachtet und einem der in Tabelle 20 (Kapitel 3.3.1) aufgeführten Zelltyp zugeordnet. Von 40 Isolaten des Zelltyps A konnten 11 der Gattung *Brevibacterium* und weitere sieben Stämme der Gattung *Rhodococcus* zugeordnet werden. Sechs weitere Isolate wurden als Angehörige der Micrococcineae identifiziert. *Brevibacterium* bildet Stäbchen und *Rhodococcus* und Vertreter der Micrococcineae zeigen Fragmentation in Stäbchen und Kokken (Collins 1991; Kocur *et al.* 1991).

Die 13 identifizierten Isolate des Zelltyps B fielen in die Unterordnung der Corynebacterineae, die gerade oder leicht gebogene Stäbchen bilden (Liebl 1991). Es wurden sechs weitere unidentifizierte Stämme diesem Zelltyp zugeordnet. Die großen Kokken des Zelltyps C ließen sich überwiegend der Unterordnung Micrococcineae zuordnen (10 Stämme insgesamt, davon fielen acht in die Unterordnung Micrococcineae und zwei in die Unterordnung Corynebacterineae). Micrococcineae zeigen vor allem runde oder sphärische Formen und Corynebakterien können in ovalen Formen vorliegen (Kocur *et al.* 1991; Liebl 1991).

Von den 16 zellpaketbildenden Isolaten fielen 10 Stämme in die Gattung *Micrococcus*, die für die Bildung von Tetraden bekannt ist (Schleifer 1986). Der Zelltyp E, der kleine Kokken repräsentiert, kam elfmal vor, wovon vier Stämme den Gattungen *Micrococcus*, *Rhodococcus* und *Nocardia* zugeordnet werden konnten. Diese Bakteriengruppen kommen in erster Linie coccoid vor (Kocur *et al.* 1991). Von den drei mycelbildenden Stämmen wurden alle als Angehörige der Gattung *Streptomyces* identifiziert, die als Hyphenbildner gilt (Korn-Wendisch und Kutzner 1991). Kleine Stäbchen wurden bei 14 Isolaten beobachtet, von denen ein Teil in die Unterordnung Micrococcineae fällt (5 Isolate). Hier könnten Formen zum Tragen kommen, die einen Kokkus-Stäbchen-Kokkus-Lebenszyklus aufweisen, wie z.B. *Arthrobacter*, oder kokkoide Formen, die irregulär fragmentieren (Collins und Bradbury 1991; Jones und Keddie 1991). Die großen ovalen Zellen des Typs I, die eine deutliche Strukturierung im Zellinneren aufwiesen, kamen bei zehn Isolaten vor, die nicht eindeutig phylogenetisch einzuordnen waren.

Es wurden einige Isolate als Beispiele für die unterschiedlichen Morphologien der Actinobakterien für die Rasterelektronenmikroskopie (englisch: scanning electron microscopy, SEM) vorbereitet und dokumentiert, darunter das Isolate HK 3z31c aus *Halichondria panicea* aus der Ostsee als Vertreter des Zelltyps I. Querschnitte von *Halichondria panicea* aus dem Sammelaquarium wurden auf das Vorkommen von Bakterien untersucht. Aufnahmen der in dieser Arbeit angefertigten Präparate für die Rasterelektronenmikroskopie sind in diesem Kapitel und in der Einleitung abgebildet.

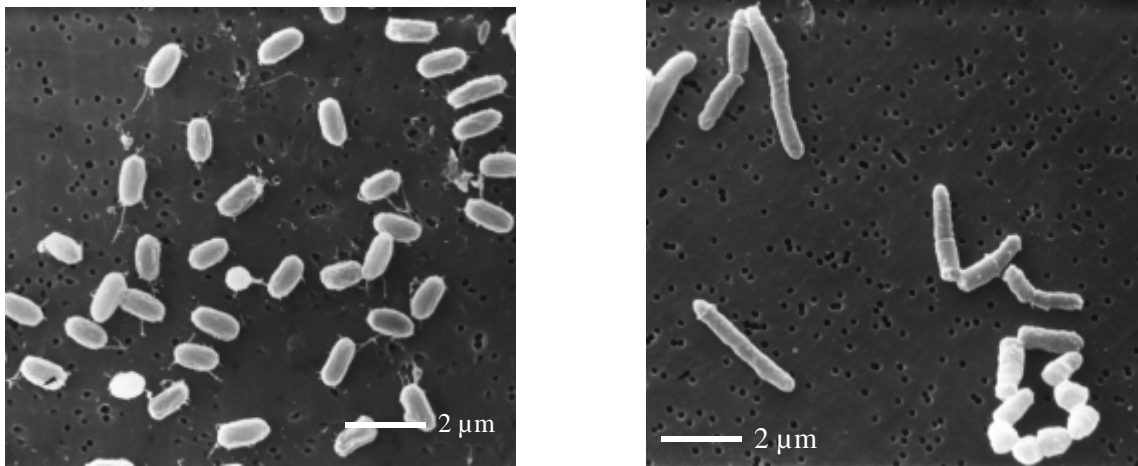


Abbildung 29. Mit *Halichondria panicea* aus der Nordsee assoziierte Bakterien in Reinkultur. Links ovale, begeißelte Zellen des mit BIOLOG als *Corynebacterium* identifizierten Isolates N99-6 sa 341 (REM, x 7500) Rechts: In Teilung befindliche Stäbchen von *Rhodococcus fascians* (N99-6 v24). (REM, x 7500)

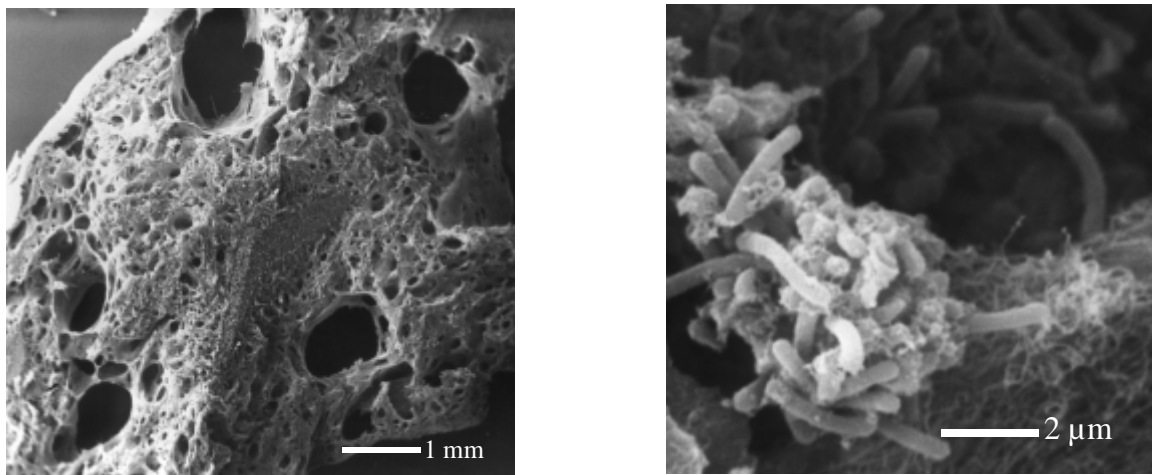


Abbildung 30 Querschnitt durch eine osculumtragende Erhebung von *Halichondria panicea*. Links: Übersicht des Schwammschnittes mit Gewebe einer vom Schwamm umwachsenen Rotalge der Gattung *Phyllophora* (Bildmitte). (REM, x 15) Rechts: Haufenartiges Vorkommen eines stäbchenförmigen Bakteriums im Mesohyl von *Halichondria panicea*. (REM, x 7500)

5.2 Anpassung an den Salzgehalt

Von 55 Isolaten wurden Wachstumskurven bei unterschiedlichen Salzgehalten aufgenommen und die Wachstumsraten berechnet. Anhand der Wachstumsraten kann auf das Wachstumsverhalten bei den verschiedenen Salzgehalten geschlossen und eine Einteilung der untersuchten Isolate in Gruppen vorgenommen werden, der die in Tabelle 36 dargestellte Klassifizierung nach Imhoff (2001) zugrunde liegt.

Tabelle 36. Klassifizierung von Bakterien auf Basis ihres Salzoptimums nach Imhoff (2001).

Klassifizierung der Bakterien	Optimum der Salzkonzentration	Gruppe
Süßwasser-Bakterien	< 0,5 %	3
Brackwasser-Bakterien	0,5 bis 2,0 %	2
Marine Bakterien	2,0 bis 7,0 %	1

Zu Gruppe 1 gehören 23 Isolate, die aufgrund höchster Wachstumsraten in salzhaltigen Medien (optimales Wachstum bei 3,4 und 6,8 %) und geringem Wachstum in Süßwassermedium den marinen Bakterien zugeordnet werden können (Tabelle 37, rot markiert). Die Gruppe 2 stellt mit 24 Isolaten eine weitere große Gruppe dar. Die Isolate dieser Gruppe gehören zu den Brackwasser-Bakterien (blau markiert), da sie höchste Wachstumsraten und damit optimales Wachstum bei mittleren Salzgehalten (0,6 bis 2,0 %) zeigen. Die Isolate wachsen auch ohne Salz, reagieren aber recht empfindlich auf hohe Salzgehalte, bei denen kaum Wachstum festzustellen ist. Gruppe 3 (schwarze Wachstumsraten) beinhaltet acht Isolate, bei denen höchste Wachstumsraten auf salzlosem Medium erzielt wurden. Die Wachstumsraten nehmen in dieser Süßwasser-Gruppe in der Regel mit ansteigendem Salzgehalt ab. Abbildung 31 zeigt die Wachstumskurven von Repräsentanten der drei Gruppen.

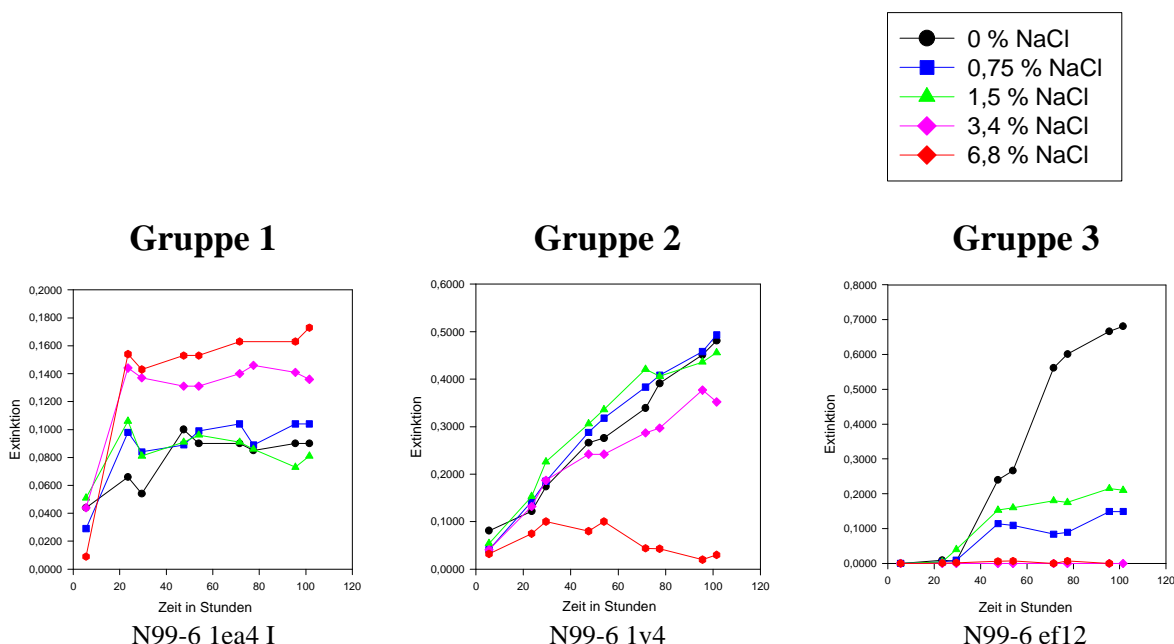


Abbildung 31. Wachstumskurven dreier Isolate in Medien unterschiedlichen Salzgehaltes.

Das festgestellte Wachstumsverhalten der Isolate stimmt für die Gruppen 1 und 3 zum größten Teil mit den Bedingungen ihres Isolationsmediums überein (Tabelle 37). Isolate der Gruppe 1, die im Salzversuch salzhaltiges Medium bevorzugen, wurden überwiegend auf Medien mit hohem Salzgehalt (3,4 bis 3,8 % NaCl) isoliert, Vertreter der Gruppe 3 auf niedrigen Salzgehalten. Gruppe 2, die im Salztest die höchsten Wachstumsraten im Brackwasserbereich zeigte, wurde in erster Linie auf Medien mit hohen Salzgehalten und auch auf salzlosen Isolationsmedien gewonnen. Daß die Vertreter dieser Gruppe überwiegend auf anderen als auf Platten mittlerer Salzgehalte isoliert wurden, könnte darauf zurückgeführt werden, daß in den Probenahmen aus deren Material ein Großteil der Stämme gewonnen werden konnten, kaum Medien mittleren Salzgehaltes eingesetzt wurden (in der N99-Serie aus der Nordsee nur die zwei Medien HSPC 0 und SSI und in der HO/HOB-Serie aus der Ostsee nur Medium HSPC 0).

Tabelle 37 auf Seite 93. Wachstumsraten bei unterschiedlichen Salzgehalten.

* = Salzgehalt des Isolationsmediums in Prozent, ** = BIOLOG-Identifikation, k.W. = kein Wachstum, Rote Bezeichnungen: Vertreter der Gruppe 1. Blaue Bezeichnungen: Vertreter der Gruppe 2. Schwarze Bezeichnungen: Vertreter der Gruppe 3

Isolat	Bakterium	Isolations medium*	Wachstumsrate μ bei Salzgehalt				
			0 %	0,75 %	1,5 %	3,4 %	6,8 %
HK 1z28	<i>Thermoactinomyces</i>	1,2	0,24	0,43	0,31	1,20	2,52
HK 2z3	<i>Clavibacter michiganese</i>	1,2	0,61	1,35	1,04	1,44	0,77
HK 3z29	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	1,2	0,58	0,87	0,79	0,72	1,03
HOB 2ac21	<i>Gordonia terrae</i>	0,1	0,43	0,71	0,69	1,00	0,31
HOB 2aa6	<i>Arthrobacter globiformis</i>	0,1	0,34	0,41	0,47	0,73	k.W.
HOB 2ac5	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	0,1	0,78	1,11	1,17	0,95	1,29
N99-2 v2	<i>Streptomyces griseus</i>	3,4	1,08	1,91	1,49	1,07	2,05
N99-6 1ea4I	<i>Arthrobacter ilicis</i>	3,8	0,54	1,62	0,98	1,58	3,79
N99-6 1eg4	<i>Micrococcus luteus</i>	3,8	0,47	1,32	0,58	1,36	k.W.
N99-6 ab7 grau	<i>Thermoactinomyces</i>	0,6	0,65	1,57	1,24	1,69	1,40
N99-6 eb2III	nicht identifiziert	2	0,09	1,73	1,15	1,49	1,87
N99-6 eb2IV	<i>Pediococcus pentosaceus**</i>	2	0,21	1,61	1,18	1,76	1,66
N99-6 ed17 gelb	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	0,6	1,12	1,82	1,39	1,37	2,64
N99-6 s17	<i>Cellulomonas turbata</i>	3,4	k.W.	3,20	1,30	4,41	5,00
N99-6 sa34I	<i>Corynebacterium propinquum**</i>	3,4	0,34	1,09	0,79	0,87	1,80
N99-6 sa34II	<i>Pediococcus pentosaceus**</i>	3,4	0,19	1,30	1,01	1,35	3,38
N99-6 t2 weiß	nicht identifiziert	3,4	0,26	1,64	1,61	1,72	2,22
N99-8 1sa20 glatt	<i>Curtobacterium</i> sp.	3,4	0,92	1,83	1,02	2,34	1,67
N99-8 1v80 gelb	Unidentifiziertes Actinobakterium	3,4	0,49	1,44	0,40	1,56	0,69
N99-8 1v93	<i>Agrococcus</i> sp.	3,4	0,42	1,91	1,06	2,28	1,83
HO b17II	<i>Streptomyces sampsonii</i>	0,1	3,76	4,39	3,44	5,18	0,94
HOB 4ac5	<i>Cellulomonas fimi**</i>	0,1	0,59	0,53	0,54	1,21	k.W.
N99-7 1t1	<i>Kocuria varians</i>	3,4	1,71	5,72	1,28	5,83	k.W.
HO 2a16b	<i>Corynebacterium aquaticum**</i>	0,1	k.W.	5,41	3,28	3,64	5,27
HO b17	<i>Streptomyces somaliensis</i>	0,1	0,86	4,60	4,41	6,11	3,74
HK 1x26	<i>Brevibacterium helvolum</i>	0,18	0,61	1,99	1,38	1,03	0,91
HK 1z57	nicht identifiziert	1,2	0,24	1,28	1,47	1,33	1,32
HK 1z9	<i>Rhodococcus erythreus</i>	1,2	1,31	2,22	1,60	1,78	1,33
HK 2z47	<i>Micrococcus luteus**</i>	1,2	0,54	0,99	0,98	0,67	0,99
HK 3z31c	nicht identifiziert	1,2	1,18	4,21	4,22	2,39	k.W.
HOB 2ab30II	nicht identifiziert	0,1	0,11	0,27	0,60	0,27	0,22
N99-6 1ea4II	<i>Lactococcus lactis**</i>	3,8	0,49	1,87	1,65	1,24	1,77
N99-6 1v4	<i>Streptomyces intermedius</i>	3,4	0,61	1,01	0,90	0,88	0,56
N99-6 ea17a g	<i>Brevibacterium helvolum</i>	3,8	0,85	0,85	1,68	0,64	1,25
N99-6 eb2I	nicht identifiziert	2	0,22	1,91	1,85	1,54	1,56
N99-6 v24 gelb	<i>Rhodococcus fascians</i>	3,4	0,39	0,88	0,55	0,66	0,81
N99-8 1s16	<i>Rhodococcus fascians</i>	3,4	0,45	1,17	1,45	0,86	0,96
N99-8 1sa18	<i>Microbacterium</i> sp.	3,4	0,97	2,84	1,66	1,32	0,68
N99-8 1v80 oran.	Unidentifiziertes Corynebacterium-ähnliches Bakterium	3,4	1,60	3,59	2,94	2,55	1,97
N99-8 1v80 weiß	unidentifiziertes Actinobakterium	3,4	0,94	2,64	1,45	1,85	1,46
E00-4 2ea4	nicht identifiziert	3,8	0,33	1,32	0,48	0,55	0,57
E00-8E 4ed6	nicht identifiziert	0,6	0,46	0,92	0,39	0,56	0,66
HOB 3ad32	<i>Rhodococcus erythreus</i>	0,1	0,76	0,94	0,64	k.W.	0,60
HOB 4ad13	<i>Micrococcus luteus</i>	0,1	0,68	1,28	0,61	0,42	0,72
N99-6 sa9	Unidentifiziertes Bakterium	3,4	4,02	4,30	4,18	2,17	k.W.
N99-7 1w1	<i>Microbacterium arborescens**</i>	3,4	0,88	2,23	1,28	k.W.	k.W.
N99-8 1sa17	<i>Arthrobacter</i> sp.	3,4	1,53	5,55	1,34	k.W.	k.W.
HO 4c5	<i>Corynebacterium aquaticum**</i>	0,1	4,22	2,44	2,58	2,30	k.W.
HOB 2ab30I	nicht identifiziert	0,1	1,04	0,96	0,82	0,25	k.W.
HOB 2ad39	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	0,1	1,90	1,71	0,84	k.W.	k.W.
N99-6 eb2	nicht identifiziert	2	4,51	3,67	2,76	4,21	3,07
N99-6 ef12	<i>Micromonospora halophytica</i>	0,7	3,13	2,71	2,87	k.W.	k.W.
N99-8 1v57	<i>Agrococcus</i> sp.	3,4	1,30	0,90	0,85	0,73	0,72
E00-8E 4ed2	nicht identifiziert	0,6	0,46	0,43	0,41	0,37	0,43
E99-3 4z1	nicht identifiziert	1,2	1,05	0,83	0,75	1,01	0,77

5.3 Antibiotikaproduktion

Wie in Tabelle 38 dargestellt waren 33 Stämme im Strichtest positiv (zur Durchführung siehe Kapitel 3.2.2). Bei der Überprüfung dieser positiven Stämme durch den Agardiffusionstest verursachten neun Stämme eine Hemmhofbildung bei *Staphylococcus lentus*. Es zeigte sich in beiden Testverfahren Aktivität gegen *Staphylococcus lentus*, im Strichtest in vier Fällen auch gegen *Candida glabrata*.

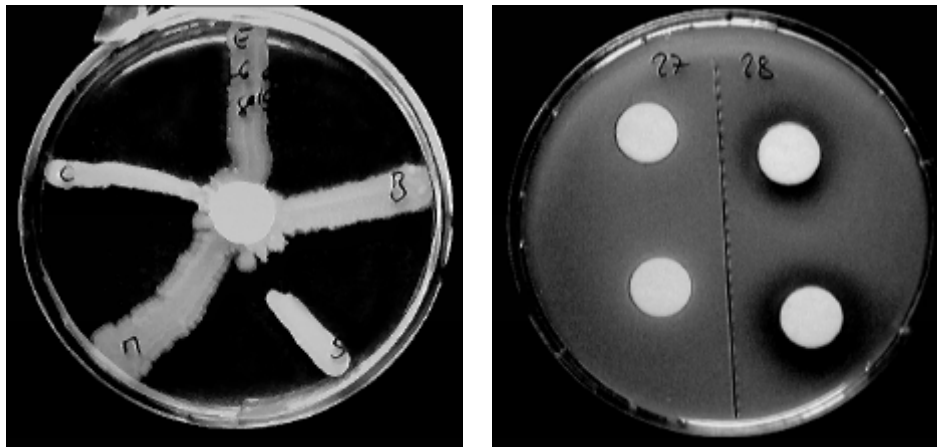


Abbildung 32. Hemmung des Wachstums von *Staphylococcus lentus* im Strichtest (unten rechts im linken Bild) und im Agardiffusionstest (rechtes Bild) durch Kulturflüssigkeit von *Microbacterium liquefaciens* (Isolat N99-6 ed17 gelb, links) und dem von BIOLOG als Gram-positives Bakterium mit niedrigem GC-Gehalt identifizierten Isolat N99-6 eb2 IV (rechts) aus *Halichondria panicea* aus der Nordsee.

Die Mehrheit der aktiven Stämme (16 Isolate, Tabelle 38) wuchs auf salzlosem Medium, sieben Isolate zeigten Wachstum auf Medium mit Brackwasser-Salzgehalten (0,6 bis 2,0 % NaCl) und 10 Stämme wuchsen nur auf Medium mit Meersalzgehalten (3,4 bis 3,8 % NaCl). Die aktiven Isolate stammen aus fünf verschiedenen Probeserien (HO, HOB, HK, N99-6 und N99-8), wurden auf 13 verschiedenen Medien isoliert und als Vertreter unterschiedlichster Gattungen, Familien und Unterordnungen identifiziert. Für 11 Stämme liegt noch keine gültige Identifikation vor. Damit kann kein Muster in Bezug auf ihre taxonomische Einordnung, ihre Herkunft (Probe, Medium) oder ihr Salzverhalten bei den aktiven Isolaten festgestellt werden.

Tabelle 38. Übersicht der Isolate mit Aktivität im Agardiffusionstest und im Strichtest.

Schwamm- Isolat	Isolations- medium*	Bakterium	Agardiffusion s-test	Strichtest	
			Test auf antimikrobielle Aktivität gegen		
			<i>S. lentus</i>	<i>S. lentus</i>	<i>C. glabrata</i>
HO-3a21	0,1	<i>Microbacterium laevaniformans</i>	-	-	+(3d)
HO-4c5	0,1	<i>Corynebacterium aquaticum</i> **	-	+(3+6d)	-
HOB-2aa35c w	0,1	<i>Rhodococcus</i> sp.	-	+(3d)	-
HOB-3aa6	0,1	nicht identifiziert	-	+(6d)	-
HOB 1ab12	0,1	<i>Brevibacterium helvolum</i>	-	+(6d)	-
HOB 2ab30 II	0,1	nicht identifiziert	-	+(3d)	-
HOB 2ab49	0,1	nicht identifiziert	-	+(3d)	-
HOB 3ab12	0,1	nicht identifiziert	-	+(3d)	-
HOB 2ac16	0,1	nicht identifiziert	-	+(3d)	-
HOB-2ac19	0,1	<i>Gordonia terrae</i>	-	+(6d)	-
HOB 3ac11	0,1	nicht identifiziert	-	+(3+6d)	-
HOB-4ac5	0,1	<i>Cellulomonas fimi</i> **	-	+(3d)	-
HOB-2ad11b	0,1	<i>Rhodococcus</i>	-	+(3d)	-
HOB 2ad39	0,1	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	-	+(3d)	-
HOB-3ad11	0,1	nicht identifiziert	+(3d)	+(3d)	-
HOB 3ad20	0,1	<i>Brevibacterium helvolum</i>	-	+(3+6d)	-
N99-6 ab7g	3,8	<i>Thermoactinomyces</i>	+(3d)	+(3d)	-
N99-6 ea17a g I	3,8	<i>Brevibacterium helvolum</i>	+(3d)	+(3+6d)	-
N99-6 1ea4 II	3,8	<i>Lactococcus lactis</i> **	+(3d)	+(3+6d)	-
N99-6 eb2 I	2,0	nicht identifiziert	+(3d)	+(3+6d)	+(6d)
N99-6 eb2 IV	2,0	<i>Pediococcus pentosaceus</i> **	+(3d)	+(3+6d)	+(6d)
N99-6 ed17gelb	0,6	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	n.g.	+(3d)	-
N99-6 s17	3,4	<i>Cellulomonas turbata</i> 0,583	-	+(3d)	-
N99-6 sa34 II	3,4	<i>Pediococcus pentosaceus</i> **	+(3d)	+(3+6d)	+(6d)
N99-6 t2 w	3,4	<i>Corynebacterium propinquum</i> **	+(3d)	+(3d)	-
N99-6 t17	3,4	„ <i>Actinomadura</i> “	-	+(3d)	-
N99-6 u18	3,4	nicht identifiziert	-	+(3d)	-
N99-8 1r2	3,4	nicht identifiziert	-	+(3d)	-
N99-8 1sa21	3,4	nicht identifiziert	-	+(3d)	-
Na-HK 2z3	1,2	<i>Clavibacter michiganense</i>	-	+(6d)	-
Na-HK-2z47	1,2	<i>Micrococcus luteus</i> **	-	+(3d)	-
Na-HK 3z17	1,2	<i>Gordonia amarae</i>	-	+(3d)	-
Na-HK 3z29	1,2	<i>Rhodococcus erythropolis</i> **	+(3d)	+(6d)	-

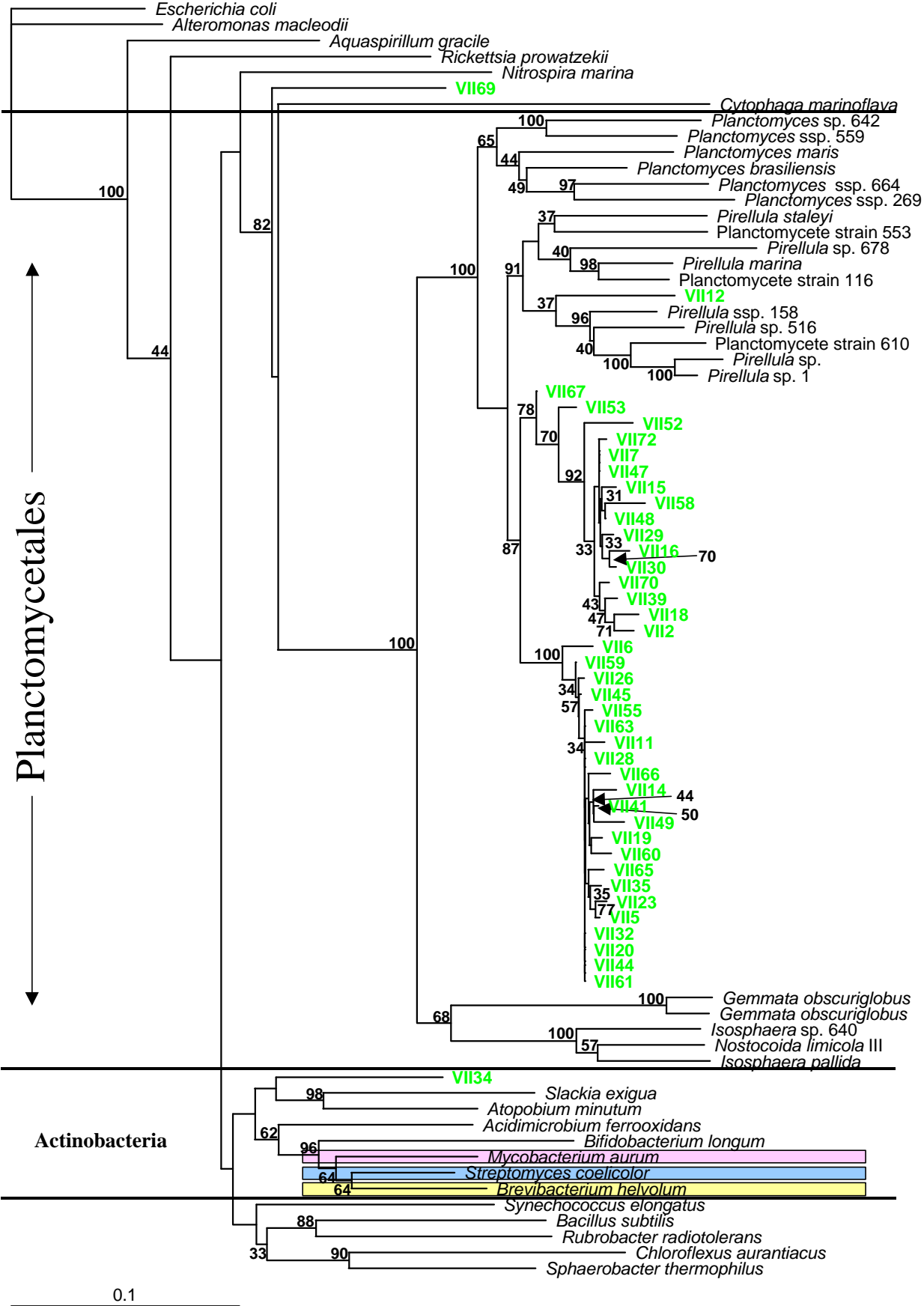
* = Salzgehalt des Isolationsmediums in Prozent, ** BIOLOG-Identifikation, + = Aktivität, - = keine Aktivität, n.g. = nicht gemessen, 3d = nach 3 Tagen Kultivierung, 6d = nach 6 Tagen Kultivierung, + = Aktivität, - = keine Aktivität, n.g. = nicht gemessen, 3d = nach 3 Tagen Kultivierung, 6d = nach 6 Tagen Kultivierung

6 Planctomycetales

6.1 Klone der Gruppe Planctomycetales aus dem Mittelmeerschwamm *Haliclona valliculata*

Der in Abbildung 33 dargestellte phylogenetische Stammbaum zeigt die Verteilung aller Klonsequenzen aus dem Schwamm *Haliclona valliculata* (E00-6) aus dem Mittelmeer. Mit Ausnahme der Klone VII34 und VII69 liegen alle Sequenzen innerhalb der Gruppe der Planctomycetales. Da die Klonsequenzen mit dem für Actinobakterien spezifischen Primer 5'243 amplifiziert wurden und von der Gesamtheit der übrigen 182 Klonsequenzen aus anderen Schwamm-Proben nur fünf außerhalb der Actinobacteria liegen (siehe Kapitel 4.2.1 „Diversität der Klone“), ist das stark gehäufte Auftreten der Klonsequenzen von *Haliclona valliculata* in der Planctomycetales-Gruppe auffällig. Es wurde nach Griepenburg *et al.* (1999) eine die Gruppe der Planctomycetales abdeckende Auswahl an Referenzsequenzen zusammengestellt und mit den Klonsequenzen als bootstrap-Lauf verrechnet. Wie in Abbildung 33 deutlich zu erkennen ist, bilden die Klonsequenzen zwei distinkte Cluster innerhalb der Planctomycetales. Einzige Ausnahme ist die Sequenz VII12, die gemeinsam mit Referenzsequenzen von *Pirellula*-Stämmen auftritt. Die beiden Cluster sind mit 17 (oberes Cluster plus Klon VII64) und 22 Sequenzen etwa gleich groß. Von den Referenzstämmen liegt das *Pirellula*-Cluster den Klonsequenzen am nächsten, die Sequenzen konnten jedoch nur mit Übereinstimmungen von 87 bis 94 % als *Pirellula* identifiziert werden.

Abbildung 33 auf Seite 97. Phylogenetischer Stammbaum aller Klonsequenzen aus *Haliclona valliculata* (E00-6) auf Basis der 16S rDNA. Die Farbmarkierungen entsprechen denen in Abbildung 20 und 21. *Nostocoida limicola* III ist in diesem Stammbaum als Referenzsequenz für die Planctomycetales eingesetzt (siehe Kapitel 4.2.1).



6.2 Isolation von Planctomycetales

Zwei von den zehn Isolaten des Zelltyps I konnten mit Hilfe der Fettsäureanalyse als *Actinomadura* identifiziert werden. Eine Reihe weiterer Isolate (siehe Tabelle 39) konnte aufgrund ihrer Fettsäurezusammensetzung nicht eingeordnet werden, wurde vom MIDI-System aber in die Nähe der als *Actinomadura* identifizierten Isolate gestellt. Da ein Großteil dieser Isolate die gleiche Morphologie aufweist wie die identifizierten Isolate könnte es sich bei diesen Stämmen um Vertreter der gleichen Gruppe handeln. Aufgrund der Größe und Morphologie der Zellen dieser Isolate könnte es sich um Angehörige der Gruppe Planctomycetales handeln. Hierfür spricht auch die Wahrscheinlichkeit einer Verwechslung von Actinobakterien und Planctomycetales durch MIDI, auf die in Kapitel 4.1.1 näher eingegangen wurde. Weder eine Amplifizierung noch Klonierung der 16S rDNA der Isolate mit eubakteriellen Primern führte zu einem verwendbaren DNA-Fragment für eine Sequenzierung, die phylogenetische Einordnung der Isolate bleibt offen.

Tabelle 39. Übersicht der Isolate des Zelltyps I.

Schwamm-Isolat	Isolations-medium	Zelltyp	Antibiotika-produktion*	Identifizierung durch Fettsäureanalyse (MIDI)
HK-2z47	Strepto C	Stäbchen	positiv	nicht identifiziert**
HK-3z31c	Strepto C	groß, oval	negativ	nicht identifiziert**
HO-4c5	TSB 0,3	groß, oval	positiv	nicht identifiziert
N99-6 ac9	TSB 0,3	gStäbchen	negativ	nicht identifiziert**
N99-6 ea20	HSPC 30	groß, oval	nicht untersucht	nicht identifiziert**
N99-6 ed17a	HSPC 0	groß, oval	nicht untersucht	<i>Actinomadura yumaensis</i>
N99-6 ed17b	HSPC 0	groß, oval	nicht untersucht	nicht identifiziert**
N99-6 ed2	HSPC 0	groß, oval	negativ	<i>Actinomadura yumaensis</i>
N99-6 ed20	HSPC 0	groß, oval	nicht untersucht	nicht identifiziert**
N99-6 ed7b	HSPC 0	groß, oval	negativ	nicht identifiziert**
N99-6 t17	SCK		positiv	<i>Actinomadura yumaensis</i>
N99-6 u18	GYA	groß, oval	positiv	nicht identifiziert**
N99-8 1sa21	GYMS	Stäbchen	positiv	nicht identifiziert**

* = die Aktivität bezieht sich auf die in Kapitel 5.3 dargestellten Ergebnisse der Untersuchung auf Antibiotikaproduktion, ** = keine gültige FAME-Identifikation, aber im Dendrogramm in der Nähe der als *Actinomadura* identifizierten Isolate,

Die Zellen vermehren sich durch Knospungen an einem reproduktiven Pol und lichtmikroskopische Aufnahmen des Isolates HK 3z31c aus *Halichondria panicea* aus der Ostsee als Repräsentant dieser Gruppe (Abbildung 34) zeigen deutlich sichtbare Strukturierungen des Zellinneren, die auf eine für bestimmte Gruppen der Planctomycetales typische Kompartimentierung in Pirellulosom und Kappen-Region hindeuten. Bei einer weiteren Untersuchung des Isolates mit dem Rasterelektronenmikroskop konnten darüber hinaus auch fibrillenartige Anhänge am Zellpol gegenüber dem reproduktiven Pol beobachtet werden, mit denen die Zellen sich an Substrat anheften können (Abbildung 35). Im Test auf Antibiotikaproduktion zeigten fünf von neun Isolaten Aktivität, was die Gruppe in Hinsicht auf die Naturstoffsuche aber auch als mögliche Schwamm-Symbionten als sehr interessant erscheinen läßt.

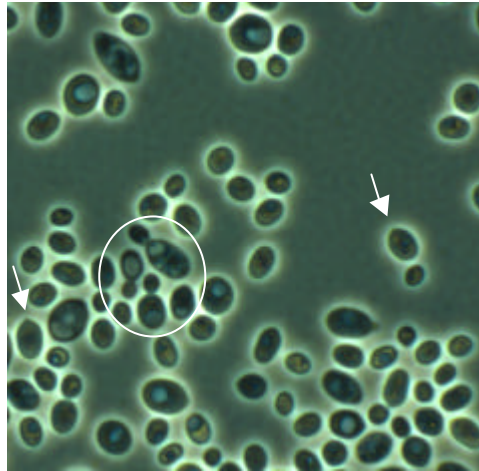


Abbildung 34. Lichtmikroskopisches Präparat des nicht identifizierten Isolates HK 3z31c (Zelltyp I). Weißer Ring: Zellen mit Knospungen am reproduktiven Zellpol. Weiße Pfeile: Zellen mit einhornartigen Strukturen die der Anheftung an Substrat dienen, sogenannten Prosthecae, am Zellpol. Eine Kompartimentierung der Zellen ist zu erkennen, wobei es sich um Pirellulosomen und polare Kappen-Region handeln könnte. (x 1000)

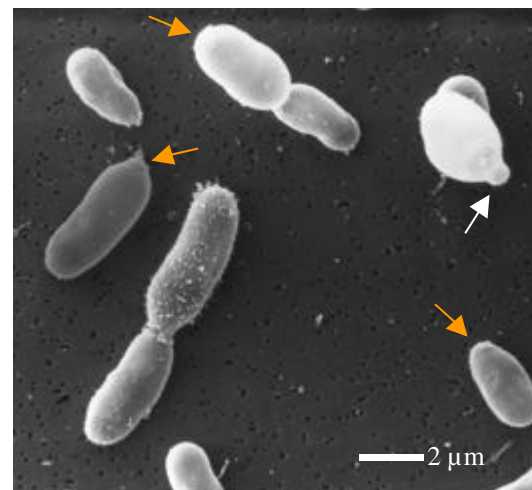
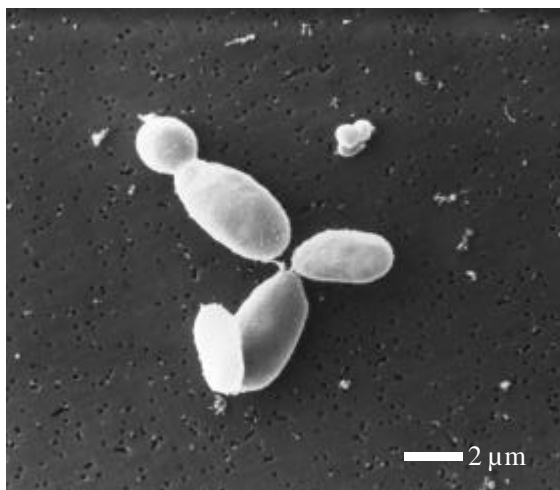


Abbildung 35. Mit *Halichondria panicea* assoziierte Bakterien in Reinkultur. Links: Rosettenbildung bei dem nicht identifizierten Isolat HK 3z31c. (REM, x 5000) Rechts: Zellen des Isolates HK 3z31c, rechts oben im Bild eine ovale Zelle mit einer Knospung oder einer Prostheca an einem Pol (weißer Pfeil). Die orangen Pfeile markieren fibrillenartige Anhänge zur Anheftung der Zellen an Substrat, gegenüber liegt der reproduktive Pol. (REM, x 5000)

Diskussion

Marine Schwämme wurden auf das Vorkommen von Actinobakterien untersucht, die eine erfolgversprechende Quelle in der Suche nach neuen Naturstoffen darstellen. Actinobakterien wurden im Schwamm mit Hilfe von mikroskopischen Methoden nachgewiesen und aus verschiedenen Schwammproben isoliert. Da die qualitative und quantitative Zusammensetzung des Artenspektrums wesentlich von den gewählten Kulturbedingungen beeinflusst wird (Okazaki und Okami 1976; Würtz 1999), ergeben Kulturansätzen ein mehr oder weniger verzerrtes Abbild der eigentlichen bakteriellen Diversität einer Probe. Aus diesem Grunde wurden die kultivierten Isolate identifiziert und der mit Klonierungsversuchen direkt am Schwamm-Material ermittelten genetischen Diversität gegenübergestellt. Der Vergleich der genetischen Diversität verschiedener Schwammspezies unterschiedlicher Ökosysteme wurde durch den Einsatz der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) möglich.

Die Anpassung der Actinobakterien an den marinen Lebensraum konnte anhand ihres Salzverhaltens bestimmt werden.

Um die schwamm-assoziierten Actinobakterien hinsichtlich ihres Potentials als Naturstoffproduzenten einzuordnen, wurde ihre antimikrobiellen Wirkung auf fünf Indikatororganismen untersucht. Die Naturstoffproduktion kann die Grundlage einer symbiontischen Beziehung zwischen Schwamm und Actinobakterium sein; auf diesen Aspekt wird ebenfalls näher eingegangen.

Im folgenden wird kurz auf die Aussagefähigkeit und Anwendbarkeit einzelner Methoden hinsichtlich der Fragestellung dieser Arbeit eingegangen. Im Anschluß werden die erhaltenen Ergebnisse diskutiert.

7 Diskussion der Methoden

7.1 Kultivierung

Bei der Kultivierung von schwamm-assoziierten Bakterien kann ihr ungewöhnlicher spezifischer Lebensraum ein Problem darstellen. Osinga *et al.* (1999) sind der Ansicht, daß das Isolationsmedium im Idealfall die Bedingungen und die Osmolarität des Schwamm-Mesohyls, aus dem die Bakterien isoliert werden, imitieren sollten. Es liegen jedoch keine Untersuchungen zu den Osmolaritäten des Schwamm-Mesohyls verschiedener Schwämme vor. Auch sollte der Kontakt der Bakterien während ihrer Isolierung mit zerstörten Schwammzellen vermieden werden, da die verletzten Schwammzellen Toxine enthalten können, die zum Absterben der assoziierten Bakterien führen könnten (Osinga *et al.* 1999). Bei der Zerkleinerung des Probenmaterials mit einem Ultra-Turrax kann dieser Kontakt jedoch nicht verhindert werden. Cross (1982) ist der Ansicht, daß der Einsatz eines einzelnen Mediums, selbst wenn dieses als selektiv für Actinobakterien gilt, grundsätzlich nicht zur Isolation aller Actinobakterien einer Probe führen kann.

Da eine intensive und komplexe Interaktion zwischen den Mikroorganismen auf der Nährbodenoberfläche herrscht und die meisten Actinobakterien beispielsweise durch ihr langsames Wachstum einen Nachteil haben, wenn sie mit anderen Bakterien ihres natürlichen Lebensraumes auf

Nährböden konkurrieren müssen (Cross 1982), können die in Kultivierungsversuchen auftretenden Actinobakterien lediglich ein verzerrtes Abbild ihrer im natürlichen Lebensraum vorkommenden Abundanzen darstellen. Unter den Actinobakterien gibt es viele langsam wachsende Formen wie z.B. *Mycobacterium*, die von anpassungsfähigeren Formen in kurzer Zeit überwachsen werden (Goodfellow und Williams 1983; Vobis 1991). Die Tatsache, daß Kolonien in der Regel nach Augenmaß gepickt werden, führt zusätzlich zur Bevorzugung einzelner Gruppen, wie von Nolan und Cross (1988) bewiesen wurde.

7.2 Zur Diversitätsanalyse eingesetzte Methoden

Es ist unbestritten, daß die Diversität von mikrobiellen Gemeinschaften in Umweltproben nicht auf Basis von Kulturansätzen bestimmt werden kann, da eine Vielzahl von Bakterien nicht mit den üblichen klassischen Techniken kultivierbar ist (Webster *et al.* 2001). Klonierung und Sequenzierung von 16S rRNA Genen können dagegen Daten liefern, mit denen komplexe Bakteriengemeinschaften beschrieben und charakterisiert werden können (Webster *et al.* 2001). Rheims *et al.* (1996) machten die gleiche Beobachtung wie in der vorliegenden Arbeit, daß eine große Anzahl von schwamm-assoziierten Actinobakterien nur genetisch untersucht und nicht kultiviert werden konnte.

7.2.1 Fettsäureanalyse (FAME)

Die Fettsäureanalyse ist ein zuverlässiges Mittel zur schnellen Charakterisierung hoher Zahlen von Umweltstämmen, unbeeinflusst von der undurchsichtigen taxonomischen Situation innerhalb der Gruppe der Actinobacteria, die durch Patentierungen seit den 40er Jahren stark überklassifiziert ist (Anderson und Wellington 2001).

Die Methode basiert auf der variierenden Fettsäurezusammensetzung unter den verschiedenen Gattungen der Actinobakterien (Korn-Wendisch und Kutzner 1991). Beispielsweise zeichnet sich die Familie der Streptomycetaceae durch gesättigte Fettsäuren, die meist *iso*- oder *anteiso*-verzweigt oder unverzweigt sind, mit 14 bis 18 Kohlenstoffatomen (Anderson und Wellington 2001; Korn-Wendisch und Kutzner 1991) und die Nocardiaceae durch gesättigte und ungesättigte Fettsäuremethylester mit 12 bis 18 Kohlenstoffatomen (Goodfellow 1991) aus. Die Gattung *Micromonospora* enthält vor allem die Fettsäuren 17:0 *anteiso*, 16:1 *iso* und 17:1 (Romero *et al.* 1997). Die Fettsäurezusammensetzung ist abhängig von Umweltfaktoren (Hartmans und De Bont 1991) und vom Alter der Kulturen, so daß die Durchführung der Fettsäureanalyse nur unter standardisierten Bedingungen erfolgen kann (siehe Kapitel 3.2.3).

Bei der Verwendung der FAME zur Identifizierung von Bakterien aus Umweltproben muß berücksichtigt werden, daß es sich um eine Methode aus der klinischen Mikrobiologie zur Identifizierung klinischer Isolate handelt und daß die Datenbank zum überwiegenden Teil aus Fettsäuremustern eben solcher Isolate besteht und damit nur bedingt zur Bestimmung von Umweltstämmen geeignet ist (Brown und Leff 1996). Trotz dieser Einschränkung ergab sich in dieser Arbeit wie bei Ritchie *et al.* (2000) eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse von Fettsäureanalyse und Sequenzierung der 16S rDNA. Es sind insgesamt 67 % der FAME-Identifikationen durch die Sequenzierung bestätigt worden und nur 9 % der Identifikationen wurden auf Basis der Fettsäureanalyse einer falschen Familie oder Unterordnung zugeordnet. Es konnte damit insgesamt eine gute Identifikation der Actinobakterien auf dem Niveau der Unterordnung und der Familie

festgestellt werden. Bei 24 % der Identifikationen kam es zu fehlerhaften Einordnungen auf der Art- und Gattungsebene, insbesondere innerhalb der Micrococccineae, was vermutlich auf einen Mangel an Referenzeinträgen in der verwendeten MIDI-Datenbank zurückzuführen ist. Zu Fehlidentifikationen kam es ferner bei Angehörigen der Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt und einigen unidentifizierten Isolaten, die möglicherweise zu den Planctomycetales gehören, einer Gruppe, für die ebenfalls keine Referenzeinträge in der MIDI-Datenbank enthalten sind. Arbeiten zur Prüfung der Sicherheit von Identifikationen mit FAME durch Oka *et al.* (2000) erbrachten 98,0 % korrekte Identifikationen auf dem Artenniveau bei falsch positiven Ergebnissen vor allem für *Arthrobacter globiformis*, *Kocuria kristinae* und *Micrococcus luteus*.

7.2.2 Substratverwertung mit dem BIOLOG-System

Weniger als die Hälfte der untersuchten Isolate konnte aufgrund ihrer Stoffwechseleigenschaften identifiziert werden. 13 der 28 Identifikationen stimmen nicht mit den Ergebnissen der Sequenzierung oder Fettsäureanalyse überein, und nur ein Isolat wurde in Übereinstimmung mit den anderen Methoden als *Micrococcus luteus* identifiziert.

Da das BIOLOG-System zur Identifikation von pathogenen Bakterien in der klinischen Mikrobiologie entwickelt wurde und nur eine begrenzte Anzahl von Referenzeinträgen besitzt, konnte eine Identifikation mariner Isolate mit Hilfe dieser Methode nicht zufriedenstellend erreicht werden. Erschwerend wirkt in diesem Zusammenhang, daß Mißidentifizierungen auch bei Stämmen erfolgten, deren Substratverwertungsmuster in den Datenbanken vorhanden sind (Oka *et al.* 2000).

Schwamm-assoziierte Bakterien verfügen über vielfältigere metabolische Fähigkeiten als Bakterien aus dem Umgebungswasser, was direkt mit dem im Vergleich zum Umgebungswasser hohen potentiell verfügbaren Nährstoffangebot im Schwamm korreliert (Santavy und Colwell 1990). Auch zeigt die Substratverwertung stärkere saisonale Schwankungen als Unterschiede zwischen den Lebensräumen (Hunter *et al.* 1981), was eine Identifikation behindern kann.

Oka *et al.* (2000) beobachteten falsch positive Identifikation für *Arthrobacter globiformis*. Das System kann offensichtlich nicht ohne Abstriche auf Umweltproben übertragen werden und scheint für die schnelle Identifikation von Umweltisolaten ungeeignet, was auch Bernan (1996) in einem ähnlichen Versuch feststellen mußte.

Da die Identifizierung der in dieser Arbeit gewonnenen Isolate durch das BIOLOG-System nicht als sicher betrachtet werden kann, sind zwar einige Identifikationen von BIOLOG, sofern keine Einordnung durch eine andere Methode vorlag, im Ergebnisteil aufgeführt worden, jedoch als BIOLOG-Identifikation gekennzeichnet worden (durch Fußnoten in den Tabellen 37 und 38). Auch der Anhang enthält Übersichtslisten der BIOLOG-Ergebnisse, die durch entsprechende Überschriften oder besondere Farbgebung kenntlich gemacht wurden (siehe Tabellen A 25 und A 27 im Anhang).

7.2.3 Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)

Bei der Verwendung der DGGE für Diversitätsanalysen und der Deutung der Bandenmuster muß berücksichtigt werden, daß Banden, die im DGGE-Gel auf gleicher Höhe liegen, nicht zwangsläufig die gleiche Sequenz besitzen (Muyzer *et al.* 1993) und es zum Auftreten von Mehrfachbanden kommen kann, was auf Mikroheterogenitäten der verschiedenen rDNA Operons zurückzuführen ist (Heuer *et al.* 1997; Muyzer und Smalla 1998).

Daß Würtz (1999) mit eubakteriellen Primern im Schnitt weniger Banden pro Probe erzielt als in der vorliegenden Arbeit mit spezifischen Primern, kann auf methodische Probleme zurückgeführt werden, insbesondere darauf, daß vermutlich die hohe eubakterielle Diversität nicht sauber in der DGGE auftrennbar ist. Es wurde beobachtet, daß Banden verschiedener Bakterienspezies trotz vorhandener Sequenzvariabilität nicht separiert werden konnten, bei anderen Versuchen aber Sequenzen, die sich nur in einem Nucleotid unterschieden, sehr wohl zu trennen waren (Muyzer und Smalla 1998).

7.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In der PCR kann es zu einer unspezifischen oder unregelmäßigen Anlagerung der Primer kommen, so daß bestimmte Sequenzen im Vergleich mit anderen bevorzugt amplifiziert werden. Bei der Untersuchung von Actinobakterien in Klonierungsexperimenten oder mit der DGGE kann es daher in den vorangegangenen PCR-Schritten zu einer Verdrängung ihrer DNA durch konkurrierende DNA kommen (Muyzer und Smalla 1998).

Neben einer Ungenauigkeit des in dieser Arbeit verwendeten für Actinobakterien spezifischen Primers 5'243 in Proben gemischter DNA aus Referenzstämmen oder aus Umweltproben, die schon bei seiner Veröffentlichung von Heuer *et al.* (1997) eingeräumt wurde, können insbesondere die SSU-rRNA Gene der Planctomycetales zu mismatches mit vielen Bakterien-Primern führen (Giovannoni und Rappé 2000).

Die in Schwamm-Material enthaltenen Huminsäuren und andere große Moleküle wie Proteine können die PCR stören, falls sie bei der DNA-Extraktion nicht restlos entfernt werden konnten, wie auch die Bildung von chimären Molekülen in Proben gemischter DNA (Muyzer und Smalla 1998; Würtz 1999).

Daß eine quantitative Schätzung der Abundanz jedes Organismus durch die Detektionsgrenze der PCR eingeschränkt wird, bildet eine der Grenzen der molekularbiologischen Methoden (Webster *et al.* 2001). Bei der Klonierung kann es bei Verwendung unterschiedlicher Primerkombinationen oder Vektoren zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen (Muyzer und Smalla 1998), so daß in der vorliegenden Arbeit möglichst standardisierte Arbeitsabläufe genutzt wurden.

8 Kultivierungserfolg

In den Kultivierungsversuchen konnten auf den Isolierungs-Nährböden 4687 Kolonien gewonnen werden, von denen nach der ersten Überimpfung jedoch nur 3328 Stämme anwuchsen. Der Verlust der Differenz von 1359 Bakterienstämmen ist auf die Kultivierungsbedingungen zurückzuführen, die sich erheblich von den Bedingungen des natürlichen Lebensraums der Bakterien unterscheiden (siehe Kapitel 7.1). Die Anzahl der in der Probe enthaltenen Bakterienstämme, die nicht auf den Isolationsplatten wuchsen, liegt im Dunkeln; bei *Ceratoporella nicholsoni* beispielsweise beträgt die Diskrepanz zwischen der gezählten Gesamtbakterienzahl und der Zahl kultivierter Bakterien 89 bis 97 % (Santavy *et al.* 1990).

Cross (1982) beschreibt eine hohe Ausbeute an anderen Bakteriengruppen auf nährstoffreichen Kulturplatten, während Actinobakterien auf solchen Medien nur in geringen Zahlen isoliert werden konnten. In der vorliegenden Arbeit dagegen wurde der Großteil der Actinobakterien auf Medien der nährstoffreichen HSPC-Serie isoliert. Da die Gruppe der Actinobakterien generell als sehr flexibel in der Nutzung verschiedener Substrate gilt und zudem in der Lage ist, für andere Bakteriengruppen unzugängliche Substanzen zu verwerten (Korn-Wendisch und Kutzner 1991), kann das aus einer Mischung von Kohlenstoffquellen bestehende HSPC-Medium ihr einen Selektionsvorteil verschafft und zu der relativ hohen Ausbeute an Actinobakterien geführt haben. Entscheidend könnte dabei das Angebot vieler verschiedener Kohlenstoffquellen und nicht ihre Konzentration im Medium sein.

Es wurde ferner eine Auswahl an speziellen Isolationsmedien für Actinobakterien entwickelt und eingesetzt, die sich im Versuch jedoch als relativ unselektiv erwies, eine Beobachtung, die auch Nolan und Cross (1988) machten. Eine Übersicht selektiver Medien für Actinobakterien gibt Cross (1982). Webster *et al.* (2001) erzielten die höchste Diversität an assoziierten Bakterien des Schwammes *Rhopaloeides odorabile* mit Meerwasser-Agar ohne Schwammextrakte. Auch andere Autoren beschreiben den Zusatz von Schwammextrakten in ein Medium als stark wachstumshemmend und die kultivierte Diversität als dramatisch reduziert (Madri *et al.* 1971; Webster *et al.* 2001), wogegen Würtz (1999) wässrige Extrakte des Schwammes für ein geeignetes Medium für die Isolation von schwamm-assoziierten Bakterien hält. Auf den im Kultivierungsversuch eingesetzten Medien der HSPC-Reihe mit Schwammextrakten, die eine Auswahl an geringkonzentrierten Kohlenstoffquellen enthaltenden, sind insgesamt weniger als 5 % der identifizierten Isolate gewachsen. Die zeigen bei Zugabe von Schwammextrakt eine deutlich geringere Bakterienzahlen als in den entsprechenden Medien ohne Schwammextrakte. Das GYM-Medium mit Schwammextrakt, das hochkonzentrierte Bestandteile an Glucose, Hefeextrakt und Malzextrakt enthält, hat dagegen in einem Vergleichstest fast die doppelte Anzahl an Isolaten (54 Isolate) erbracht als ohne Schwammextrakt (33 Isolate). Möglicherweise ist für den Kultivierungserfolg neben der Art und Menge der im Schwamm enthaltenen Antibiotika auch die Kombination von Schwammextrakt und Basismedium von Bedeutung.

9 Diversität der Actinobakterien

9.1. Diversität von Actinobakterien in der Wassersäule und in Sedimenten mariner Standorte

In marinen Lebensräumen dominieren Vertreter der gamma-Proteobakterien und der *Cytophaga/Flavobacterium*-Gruppe das Bakterioplankton (Cottrell und Kirchman 2000; Giovannoni und Rappé 2000; Glöckner *et al.* 1999). Daneben werden alpha-Proteobakterien, Planctomycetales und Actinobakterien in größeren Abundanzen detektiert (Bernan 1996; Giovannoni und Rappé 2000; Glöckner *et al.* 1999; Pinhassi *et al.* 1997). Archaea können in geringen Zahlen in den Proben nachgewiesen werden; beta-Proteobakterien treten an marinen Standorten nicht oder nur vereinzelt auf (Glöckner *et al.* 1999; Pinhassi *et al.* 1997).

Bernan (1996) demonstrierte die starken Unterschiede in der Zusammensetzung mariner mikrobieller Gemeinschaften in den unterschiedlichen Regionen der Welt. Beispielsweise machen Actinobakterien in Meerwasserproben von den Fidschi-Inseln 12 % der bakteriellen Gemeinschaft aus, im Meerwasser vor Vancouver ist ihr Anteil an der Gesamtzahl mehr als doppelt so groß. In verschiedenen Proben des Nord- und Südpazifiks setzt sich die bakterielle Diversität aus 71 % Gram-negativen Bakterien, 11 % Pilzen, 9 % Actinobakterien und 3 % Gram-variablen Bakterien zusammen. Der Großteil kultivierbarer Bakterien aus den Ozeanen ist Gram-negativ (Proteobakterien, *Cytophaga/Flavobacterium*) (Gunn *et al.* 1982), was vermutlich aus ihrer hohen Abundanz und Diversität in marinen Lebensräumen resultiert (Bernan 1996). Neben den lokalen Unterschieden in der bakteriellen Zusammensetzung konnten in Untersuchungen an einem Küstenstandort signifikante Änderungen im Vorkommen verschiedener Bakteriengruppen festgestellt werden, die auf eine saisonale Sukzession des Bakterienplanktons ähnlich wie beim Phytoplankton hinweisen (Pinhassi *et al.* 1997).

Das Auftreten und die Verteilung der Actinobakterien in marinen Habitaten und insbesondere in Meeressedimenten ist von verschiedenen Autoren beschrieben worden (Cross 1981; Ellaiah *et al.* 1996; Goodfellow und Haynes 1984; Jensen *et al.* 1991; Moran *et al.* 1995; Okami 1979; Okami und Okazaki 1978; Weyland 1981b; Weyland 1981a). Nach Goodfellow und Williams (1983) und Goodfellow und Haynes (1984) machen sie jedoch nur einen kleinen Teil der bakteriellen Gemeinschaft dieser Lebensräume aus.

Die Zahl der Actinobakterien ist in der offenen See geringer als in küstennahen Sedimenten (Okazaki und Okami 1972; Weyland 1981a) und nimmt mit der Distanz vom Land und mit steigender Wassertiefe ab (Goodfellow und Haynes 1984; Jensen *et al.* 1991; Korn-Wendisch und Kutzner 1991; Moran *et al.* 1995; Weyland 1981a). Der Grund dafür muß nicht in einer eventuellen Herkunft vom Land liegen, sondern könnte in ihrer wichtigen Rolle in der Transformation und Zersetzung von pflanzlichen Biopolymeren begründet sein. Da Küstenbereiche durch das Vorkommen von Gefäßpflanzen gekennzeichnet sind und die offenen Ozeane diese Lebensgrundlage nicht bieten, stellen küsten- und sedimentnahe Bereiche für die Actinobakterien Habitate guten Nährstoffangebotes dar (Moran *et al.* 1995). Obwohl die Zahl der Actinobakterien mit zunehmender Wassertiefe abnimmt, steigt ihr Anteil an der bakteriellen Gesamtpopulation mit der Tiefe an (Korn-Wendisch und Kutzner 1991).

In der vorliegenden Arbeit durchgeführte Untersuchungen mit der DGGE zeigten komplexe Bandenmuster in Proben der Schwammumgebung, was auf eine hohe Diversität an Actinobakterien in

der Wassersäule und dem Sediment an den küstennahen Probenahmestandorten (siehe Kapitel 2.1) hindeutet.

Die Gattungen *Streptomyces*, *Micromonospora* und *Rhodococcus* sind die am häufigsten isolierten Organismen in küstennahen Meeressedimenten (Goodfellow und Haynes 1984; Goodfellow und Williams 1983; Korn-Wendisch und Kutzner 1991; Okazaki und Okami 1976; Vobis 1991; Weyland 1981a). Weyland (1981a) konnte von 2274 isolierten Actinobakterien aus dem Nord- und Südatlantik und des westlichen Mittelmeeres 11 % den Streptomyceten (237 Stämme), 39 % den Micromonosporen (893 Stämme) und 50 % den Nocardiaformen (1144 Stämme, hauptsächlich *Rhodococcus* und *Nocardia*) zuordnen. In der Nordsee dominieren *Streptomyces*- und *Micromonospora*-Arten. Ein relativ hoher Anteil an *Streptomyces* (48 Isolate) konnte auch im Iberischen Meer nachgewiesen werden, was mit dem ausfließenden Mittelmeer-Tiefenwasser in Verbindung stehen könnte (Weyland 1981a). Die Iberische See, die Biscaya und der Atlantik zeigen mit 337, 98 und 68 Isolaten eine hohe Ausbeute an Micromonosporen (Weyland 1981a). Goodfellow und Haynes (1984) konnten von selektiv isolierten Actinobakterien aus Atlantik-Sedimenten 39 % den Micromonosporen, 39 % der Gattung *Streptomyces* und 22 % der Gattung *Rhodococcus* zuordnen. Während der Anteil an Micromonosporen exakt dem aus Weylands (1981a) Zählungen entspricht, erscheinen die Prozentanteile für *Streptomyces* und Nocardiaforme geradezu vertauscht. Dieser Umstand kann auf die unterschiedliche Durchführung und insbesondere auf den Einsatz unterschiedlicher Medien in den beiden Untersuchungen zurückgeführt werden. Nach Gunn *et al.* (1982) machen Vertreter der Gattung *Micrococcus* erstaunlicherweise nur einen geringen Anteil der isolierten Gram-positiven Kokken aus, obwohl die Bakteriengemeinschaft, die normalerweise in oligotrophen Gewässern angetroffen wird, zum Großteil aus Vertretern der Micrococcaceae besteht (Santavy und Colwell 1990).

Streptomyces, vor allem in flacheren Meeresabschnitten und in Küstennähe anzutreffen (Jensen *et al.* 1991; Moran *et al.* 1995), macht im Vergleich mit anderen Gruppen aber nur einen geringen Teil der marinen Actinobakterien aus (Okami und Okazaki 1978; Weyland 1981a). Die Populationsdichte dieser Gattung kann sich sehr schnell in Abhängigkeit vom Nährstoffangebot verändern (Moran *et al.* 1995). *Micromonospora* zeigt höhere Abundanzen in Tiefseesedimenten, während im freien Ozean die Nocardiaformen die dominante Gruppe unter den Actinobakterien ausmachen (Weyland 1981a). Diese Verteilung der Actinobakterien befindet sich in Übereinstimmung mit ihrem Verhalten gegenüber Temperatur, Salinität (Weyland 1981b) und hydrostatischem Druck (Helmke 1981), so daß die untersuchten Micromonosporen und Nocardiaformen als marine Organismen angesehen werden können.

9.2 Diversität von Actinobakterien in den untersuchten Schwämmen

9.2.1 Kultivierte Diversität

Phylogenetische Einordnung von Isolaten auf Basis ihrer Fettsäurezusammensetzung

Die Fettsäurezusammensetzung verschiedener Familien und Unterordnungen entspricht qualitativ, aber nicht quantitativ den gestellten Erwartungen. Die für die Actinobakterien typischen Fettsäuren 15:0 *iso*, 16:0 *iso*, 17:0 *iso*, 18:1 ω 9c und 10 Me 18:0 (Lauer 2001; Ritchie *et al.* 2000) konnten in den meisten, aber nicht in allen Chromatogrammen detektiert werden und machten häufig nur relativ kleine Anteile an der Gesamtfettsäure der untersuchten Bakterien aus. Beim Vergleich der Unterordnungen können relativ ähnliche Fettsäureprofile für die Corynebacterineae, Micrococcineae und Micromonosporineae festgestellt werden, wogegen die Streptomycineae und die Actinomycineae in ihrer Zusammensetzung deutlich abweichen und eigene typische Profile aufweisen. Die vier untersuchten Familien der Micrococcineae zeigen recht einheitliche Fettsäureprofile. In der Gruppe der Corynebacterineae gibt es dagegen deutliche Unterschiede zwischen den Fettsäuremustern einzelner Familien; besonders abweichend stellt sich das Profil der Gattung *Corynebacterium* dar, das stark den Fettsäuremustern der Micrococcineae ähnelt. Die nicht immer gegebene Unterscheidbarkeit von Fettsäureprofilen (siehe Kapitel 7.2.1) ist vermutlich gemeinsam mit fehlenden Referenzeinträgen für eine Anzahl von Fehlidentifikationen des MIDI-Systems verantwortlich, die durch die Sequenzierung repräsentativer Isolate aufgedeckt wurden.

In der vorliegenden Arbeit konnten 13 % der 1793 durch Fettsäureanalyse (FAME) identifizierten Isolate den Actinobakterien zugeordnet werden, was in der Größenordnung den Zellzählungen von Bernan (1996) entspricht. Es sind 229 Isolate auf Basis ihrer Fettsäurezusammensetzung und weitere 42 Isolate durch Sequenzierung ihrer 16S rDNA identifiziert worden. Da sechs dieser sequenzierten Isolate als Gram-positive Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt identifiziert wurden, konnten insgesamt 265 Isolate den Actinobakterien zugeordnet werden. Von allen durch Fettsäureanalyse oder Sequenzierung der 16S rDNA identifizierten Actinobakterien fielen 74 % in die Unterordnung Micrococcineae, allein 56 % aller Isolate in die Gattung *Micrococcus*. 22 % der Isolate gehören zu den Corynebacterineae, hauptsächlich zur Gattung *Rhodococcus*, 2 % zur Gattung *Streptomyces*, 1 % zu den *Micromonospora* und 1 % fehlerhaft als *Actinomadura* identifizierte Isolate vermutlich in das Planctomycetales-Cluster (siehe Kapitel 11.2).

Die Ergebnisse des Kultivierungsversuches unterscheiden sich in der Verteilung der identifizierten Isolate auf die einzelnen Gruppen der Actinobakterien erheblich von der in Kapitel 9.1 dargestellten Verteilung der Actinobakterien in marinen Lebensräumen. Dabei muß berücksichtigt werden, daß in der vorliegenden Arbeit Bakterienzahlen verschiedener Schwämme unterschiedlicher Standorte zusammengefaßt wurden, unterschiedliche Autoren häufig selektive Medien eingesetzt haben, welche die Isolierung bestimmter Gruppen bevorzugt haben und die Zusammensetzung von schwamm-assoziierten Bakterien sich deutlich von der bakteriellen Zusammensetzung des Umgebungswassers unterscheiden kann. So konnte beispielsweise von isolierten Bakterien aus *Ceratoporella nicholsoni* kein einziges in der umgebenden Wassersäule gefunden werden. Auch waren die schwamm-assoziierten Bakterien untereinander ähnlicher als die Bakterien des Umgebungswassers, die eine höhere Diversität zeigten (Santavy und Colwell 1990). Die Autoren werten ihre Ergebnisse als Hinweis auf eine funktionelle Gemeinschaft des Schwammes mit bestimmten assoziierten Bakterien.

Die Verteilung der Actinobakterien auf die unterschiedlichen Schwammspecies ergibt, daß aus *Halichondria panicea* 64 % der Gesamtisolate gewonnen wurden, die Species 84 % aller Actinobakterien stellt und 17 % ihrer Isolate als Actinobakterien identifiziert wurden. Damit scheint die gut untersuchte Species reich an assoziierten Actinobakterien zu sein. Auch *Oscarella lobularis* und *Hamigera hamigera* zeigen mit 24 und 22 % Actinobakterien unter ihren Isolaten hohe Anteile dieser Bakteriengruppe, während *Chondrosia reniformis*, *Acanthella acuta* und *Axinella* mit 2 bis 3 % Actinobakterien besonders wenig Bakterien dieser Gruppe unter ihren Isolaten aufweisen. Dabei muß berücksichtigt werden, daß für die meisten Schwämme nur ein begrenzter Datensatz vorliegt und die Anteile an Actinobakterien bei weiterer Untersuchung eventuell noch nach unten oder oben korrigiert werden müssen.

Phylogenetische Einordnung von Isolatsequenzen

Die Sequenzen der Isolate der vorliegenden Arbeit clusterten eng miteinander, mit marinen Referenzsequenzen und den Sequenzen kultivierter Referenzstämmen. Wie im Ergebnisteil dargestellt (Abbildung 24), liegen in den Unterordnungen Micrococcineae und Corynebacterineae Umweltsequenzen eng mit kultivierten Referenzstämmen zusammen. Sequenzen des marinen Actinobacteria-Clusters nach Giovannoni und Rappé (2000) bilden zwar ein Cluster mit *Acidimicrobium ferrooxidans*, liegen von den übrigen kultivierten Referenzstämmen jedoch relativ weit entfernt. Die Autoren vermuten unter den marinen Actinobakterien eine noch unbekannte Unterklasse. Dafür spricht, daß auch von anderen Autoren (Colquhoun *et al.* 1998; Junge *et al.* 1998; Okami 1979; Okazaki und Okami 1976; Webster *et al.* 2001) neue Actinobakterien im marinen Lebensraum beschrieben wurden, beispielsweise im antarktischen Eislaugenkanalsystem. Bei der Verteilung der Isolate auf die unterschiedlichen Gruppen innerhalb der Actinobacteria können keine Muster festgestellt werden (siehe Kapitel 4.1.2). Isolierte Actinobakterien mariner Herkunft scheinen aber generell eng mit bereits bekannten Actinobakterien mariner Standorte verwandt zu sein (Giovannoni und Rappé 2000).

9.2.2 Genetische Diversität

Phylogenetische Einordnung von Klonsequenzen

In Klonierungsexperimenten mit Material des Schwammes *Rhopaloeides odorabile* konnte eine hohe Diversität an assoziierten Bakterien festgestellt werden, die neben vielen anderen Gruppen auch Actinobakterien, Gram-positive Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt, Planctomycetales und eine Anzahl unbekannter Stämme einschloß (Webster *et al.* 2001). Insgesamt fielen 30 % der Klone aus dem Schwamm-Material in die Gruppe der Actinobakterien, wobei der hohe Anteil neuer Actinobakterien-Sequenzen (25 %) von den Autoren als Hinweis auf eine Ansammlung indigener mariner Actinobakterien in *Rhopaloeides odorabile* gewertet wird (Webster *et al.* 2001). Die Stämme zeigen keine Übereinstimmung mit bekannten Actinobakterien, sondern weisen nur eine entfernte Verwandtschaft auf, unter anderem mit thermophilen (*Aerothermobacter marianis*) und acidophilen (*Ferromicrobium acidophilum*) Actinobakterien (Webster *et al.* 2001).

Mit noch unbekanntenen Gruppen unter den Actinobakterien könnte die Bildung der separaten Cluster der Sequenzen aus den Klonierungsversuchen erklärt werden (Abbildung 26). Von den 224 Klonen clustern nur 8 % in der Nähe von Referenzsequenzen oder Isolaten innerhalb der Actinobacteria. Der Großteil der Klonsequenzen bildet wie in den Untersuchungen von Webster *et al.* (2001) und Giovannoni und Rappé (2000) eigene distinkte Cluster. Die Ergebnisse aus den Klonierungsversuchen und der Isolierung weichen stark von einander ab, was auf die unterschiedlichen Bedingungen z.B. hinsichtlich der Selektivität in Kultivierungsansätzen und molekularbiologischen Untersuchungen zurückzuführen ist (siehe Kapitel 7). Durch den Einsatz von Medien und durch die vom natürlichen Standort abweichenden Lebensbedingungen kann im Kultivierungsansatz nur ein Bruchteil der in der Probe vorhandenen Bakterien mit stark verzerrten Abundanzen dargestellt werden. Die Tatsache, daß in der Untersuchung von *Rhopaloeides odorabile* der dominante Bakterienstamm unter den Isolaten in den Sequenzdaten komplett fehlt (Webster *et al.* 2001), ist ein eindrucksvoller Beleg dafür.

Es zeigt sich bei den Klonsequenzen der beiden Mittelmeerschwämme *Ircinia spinosula* und *Haliclona valliculata* eine separate Clusterbildung nur der jeweils eigenen Klonsequenzen (Abbildung 26). Die Sequenzen aus *Ircinia spinosula* liegen mit nur einer Ausnahme alle zusammen und von anderen Klon- und Isolatsequenzen getrennt in einem Cluster mit *Acidimicrobium ferrooxidans* und zwei Sequenzen des von Giovannoni und Rappé (2000) beschriebenen marinen Actinobakterien-Clusters. 40 von 42 Klonen aus *Haliclona valliculata* bilden zwei distinkte Cluster in der Nähe der Gattung *Pirellula* in der Gruppe der Planctomycetales. Ein einzeln liegendes Cluster innerhalb der Actinobakterien, das elf als *Nostocoida limicola* II identifizierte und damit zu den Micrococcineae gehörende Klonsequenzen umfaßt (Abbildung 26), wird ausschließlich aus Sequenzen der Species *Halichondria panicea* gebildet, und das 10 Klonsequenzen umfassende Teilcluster des Großclusters aus Sequenzen von Nordsee-Schwämmen (*Halichondria panicea*, *Haliclona oculata*).

Neben der exklusiven Clusterbildung von Klonsequenzen aus einer Schwammspezies (*Ircinia spinosula*, *Haliclona valliculata*) und der Clusterbildung von Sequenzen einer Species von unterschiedlichen Standorten (*Nostocoida limicola* II-Cluster) kommt es also auch zur habitatspezifischen Clusterbildung von Sequenzen (Nordsee-Cluster). Der Hauptteil der Klonsequenzen bildet jedoch im Großcluster vermischte Untercluster mit Sequenzen der drei Nord- und Ostsee-Proben.

Vergleich der Diversität in verschiedenen Proben aus Nordsee, Ostsee und dem Mittelmeer

Wilkinson (1978c) beschreibt im Vergleich zu anderen Schwämmen die Populationen assoziierter Bakterien in den *Halichondrida* als relativ klein. Würtz (1999) findet auf Basis von DGGE-Profilen eine vielfältige und variable Zusammensetzung der assoziierten Bakterien wie auch in den DGGE-Analysen dieser Arbeit für die Actinobakterien festgestellt werden konnte. Im Gegensatz zu dem von Althoff *et al.* (1998) beschriebenen regelmäßigen Auftreten eines assoziierten Bakteriums bei Schwämmen aus dem Mittelmeer und der Nordsee konnten jedoch weder in den Untersuchungen von Würtz (1999) noch in der vorliegenden Arbeit artspezifische Banden bei *Halichondria panicea* festgestellt werden.

Die untersuchten Schwammproben aus Ostsee und Nordsee haben zwei gemeinsame Banden (Tabelle 24). Einen ähnlichen Befund bei seinen Untersuchungen wertet Würtz (1999) als Hinweis auf das Vorhandensein dominanter Arten oder Gattungen im Schwamm. Für die Standorte Ostsee und Nordsee treten in Gel *a* und *b* (Abbildungen 27 und 28) jeweils zwei weitere exklusive Banden auf, was auf standortspezifische Muster hinweist. Die Arbeiten stimmen auch in dem Fehlen einer

gemeinsamen Bande bei allen *Halichondria panicea* Proben überein. In den Gelen *a* bis *c* (Abbildungen 27 bis 29) konnte keine allen untersuchten Schwämmen gemeinsame Bande beobachtet werden.

Die Aquariumsproben HP 3a1, HP 3a2 und HP 3c zeigen ähnliche Muster wie die Ostseeproben von *Halichondria panicea*, was vermutlich auf die gemeinsame Herkunft aus der Ostsee zurückzuführen ist.

Entgegen den Ergebnissen von Würtz (1999) kommen fast alle Actinobakterien-Banden in den Schwämmen auch in Umweltproben vor, was ebenfalls für eine Aufnahme von Bakterien aus der Schwammumgebung spricht. Da die Bandenmuster der Schwämme denen der Wasserproben ähnlicher sind als den Sedimentproben, strömen die Actinobakterien vermutlich in erster Linie mit oder als Nahrungspartikel in den Schwamm ein. Sediment- und Wasserproben zeigen konstante Muster, was auf eine homogene Verteilung der Bakterien hindeutet.

Die Bandenübereinstimmung scheint abhängig vom Standort, nicht aber von der Species zu sein. Würtz (1999) konnte darüber hinaus auch keine saisonale Gesetzmäßigkeit feststellen. Es herrscht relativ hohe Ähnlichkeit zwischen den Bandenmustern der Ost- und Nordsee-Proben, während die Aquarium-Probe in ihrem Bandenmuster stark abweicht. Dieser Unterschied könnte aus einer selektiven Aufnahme von Bakterien aus der bakteriellen Gemeinschaft des Aquariumwassers resultieren, welche durch das ständige Abschäumen und Filtrieren des Wassers verändert wird.

Die Bakterien innerhalb eines Individuums zeigten in den Untersuchungen von Würtz (1999) eine homogene Verteilung, auch zwischen verschiedenen Individuen war eine große Übereinstimmung zu erkennen, was für eine großflächige Verteilung der Bakterienpopulationen über den Schwamm spricht. Es wurden allerdings auch Ausnahmen beobachtet, in denen Verteilungsmuster innerhalb eines Schwammes völlig vom allgemeinen Bild abwichen oder das Artenspektrum innerhalb eines Individuums variierte. In dieser Arbeit wurden Unterschiede in verschiedenen Individuen einer Art eines Standortes (*Petrosia ficiformis*) und innerhalb eines Individuums (*Halichondria panicea* aus dem Aquarium) festgestellt, die u.a. auf unterschiedliche lokale Verteilungsmuster der Bakterien im Umgebungswasser zurückzuführen sind.

9.3 Diversität von Actinobakterien in *Halichondria panicea*

9.3.1 Nachweis von Actinobakterien im Mesohyl von *Halichondria panicea*

Mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) konnten Actinobakterien in einem Querschnitt einer Erhöhung von *Halichondria panicea* im Mesohyl des Schwammes nachgewiesen werden. Actinobakterien wurden als einzelne Zellen im umgebenden Wasser detektiert. Im Schwamm-Mesohyl sind die Bakterien dagegen in distinkten Bereichen konzentriert, was auf lokale Vorkommen von schwamm-assoziierten Bakterien hinweist. Lokale Anhäufungen von Bakterien im Schwamm-Mesohyl könnten auf eine mögliche Funktion oder bei haufenartigem Vorkommen von Bakterien der gleichen Morphologie auf eine Vermehrung der Bakterien im Schwamm hindeuten und damit auf eine spezifische Gemeinschaft mit dem Schwamm hindeuten. Es könnte sich aber auch z.B. lediglich um durch die Zellgröße bedingte Ansammlungen in Kanälen des Schwammes oder um zur Nahrungsaufnahme „angereicherte“ Bakterien handeln.

Während Friedrich *et al.* (1999) mit Hilfe der FISH nur vereinzelt Vertreter der Planctomycetales und Actinobakterien in *Aplysina cavernicola* nachweisen konnten, nehmen die Actinobakterien nach Webster *et al.* (2001) einen relativ hohen Anteil der Bakterienpopulation in Schwämmen ein. Da in *Rhopaloeides odorabile* ein hoher Anteil an neuen Actinobakterien aufgefunden wurde, vermuten die Autoren eine indigene marine Actinobakteriengemeinschaft (Webster *et al.* 2001). Die Untersuchung des Schwamm-Mesohyls mit Hilfe der FISH bestätigte die generelle Struktur der mikrobiellen Lebensgemeinschaft, wie sie zuvor mit Klonierungsexperimenten ermittelt wurde.

Die Untersuchung verschiedener Süßwasser-Lebensräume auf das Vorkommen von Actinobakterien erbrachte enge Verwandtschaftsbeziehungen der Klone untereinander, mit anderen Süßwasser-Klonen und mit Klonen aus Bodenproben, jedoch nicht mit Klonen aus marinen Lebensräumen (Glöckner *et al.* 2000). Vom nächsten kultivierbaren Verwandten bleibt auch das Süßwasser-Klon-Cluster relativ weit entfernt (Glöckner *et al.* 2000). Im Süßwasser erreichen Vertreter der Actinobakterien bei Auszählung von FISH-Präparaten zeitweilig bis zu 63 % der Biomasse des Bakterioplanktons, eine Kultivierung der Stämme blieb jedoch erfolglos (Glöckner *et al.* 2000). Die Untersuchungen zeigen, daß Actinobakterien ähnlich wie in marinen Lebensräumen auch in Süßwasser-Ökosystemen weit verbreitet und in hohen Abundanzen vorkommen. Sie stellen neben den beta-Proteobakterien eine dominante Gruppe dar, die eine bestimmte funktionelle Nische im Ökosystem besetzt hat (Glöckner *et al.* 2000). Genetische Untersuchungen zeigen, daß Actinobakterien zu gleichen Anteilen wie *Cytophaga/Flavobacterium*, beta- und alpha-Proteobakterien vorkommen. Diese Gruppen machen zusammen drei Viertel der bakteriellen Gemeinschaft aus (Glöckner *et al.* 2000).

Die kultivierbare Bakteriengesellschaft in *Rhopaloeides odorabile* ist dominiert von einem einzigen Bakterienstamm der alpha-Proteobakterien (Webster und Hill 2001). Gegenüber bisherigen Untersuchungen, die eine große Diversität in der schwamm-assoziierten Bakteriengesellschaft nachgewiesen haben (Friedrich *et al.* 1999; Santavy *et al.* 1990; Wilkinson 1978b), erscheint dies ungewöhnlich (Webster und Hill 2001). Die Dominanz des Stammes zeigte sich unabhängig von saisonalen oder geographischen Einflüssen. Zusammen mit der Tatsache, daß der Stamm nicht im Umgebungswasser des Schwammes nachgewiesen werden konnte und intrazellulär oder eng assoziiert an Oberflächen von Schwammzellen vorkam führt dies zu der Annahme, daß es sich um einen echten Symbionten handeln könnte (Webster und Hill 2001). Da weder das isolierte Bakterium noch andere Vertreter der alpha-Proteobakterien bei gleichzeitig durchgeführten Klonierungsexperimenten nachgewiesen werden konnten (Webster *et al.* 2001), scheint der unter den Isolaten dominierende

Stamm in *Rhopaloeides odorabile* nur in sehr geringen Zahlen vorzukommen, was im Einklang mit der These von Würz (1999) steht, daß die Mehrzahl der assoziierten Bakterien dem Schwamm als Nahrungsquelle dienen und nur bestimmte Bakterien, die einen geringen Anteil der bakteriellen Gemeinschaft im Schwamm ausmachen, eine spezifische Funktion haben.

9.3.2 Kultivierte Diversität in *Halichondria panicea*

In *Halichondria panicea* aus der Ostsee machen die Actinobakterien 18 % der kultivierten Bakterien aus. Die Zusammensetzung der Isolate entspricht der in Kapitel 9.2.1 dargestellten Verteilung aller 265 Isolate und weicht in Folge dessen ebenfalls von der Verteilung der kultivierbaren Actinobakterien aus dem Atlantik, dem Pazifik und dem Mittelmeer ab. Wie Goodfellow und Haynes (1984), Goodfellow und Williams (1983), Korn-Wendisch und Kutzner (1991), Okazaki und Okami (1976), Vobis (1991) und Weyland (1981a) für die Wassersäule und die Meeressedimente beschrieben haben, stellen Okami und Okazaki (1978) und Zeng *et al.* (2001) auch in marinen Tieren und Pflanzen Stämme der Gattungen *Streptomyces* und *Micromonospora* als dominant unter den isolierten Actinobakterien fest, wobei aus Proben des Atlantiks mehr *Streptomyces* Stämme gewonnen werden konnten als aus Proben des Mittelmeeres (Genilloud *et al.* 1994). Bei der Untersuchung des Schwammes *Microionia prolifera* wurden dagegen wie in der vorliegenden Arbeit *Corynebacterium* und *Micrococcus* als dominante Vertreter der Actinobakterien aus der Schwammflüssigkeit isoliert, jedoch schwankt bei diesem Schwamm die bakterielle Zusammensetzung im Jahresgang (Madri *et al.* 1971). Auch Bultel-Poncé *et al.* (1998) beschreiben *Micrococcus luteus* im Schwamm *Xestospongia* sp. und Santavy *et al.* (1990) ein coryneform-ähnliches Bakterium in *Ceratoporella nicholsoni* als dominant vorkommend. Würz (1999) identifiziert fünf von sieben Gram-positiven Isolaten aus *Halichondria panicea* als Vertreter der Micrococcaceae und deutet damit ein Übergewicht der isolierbaren Actinobakterien des Schwammes in dieser Unterordnung an, so wie es in dieser Arbeit festgestellt wurde. Die dargestellten Unterschiede in der Zusammensetzung von Bakteriengemeinschaften in Schwämmen und in Wasser- oder Sedimentproben können durch unterschiedliche Faktoren im Ökosystem und Lebensraum erklärt werden oder durch eine selektive Akkumulierung bestimmter Bakterien durch den Schwamm (Santavy *et al.* 1990).

Neben der Morphologie und der Reproduktionsphase wird auch die bakterielle Zusammensetzung der Schwämme von lokalen Lebensbedingungen und Habitaten beeinflusst (Wapstra und van Soest 1987; Würz 1999); in manchen Fällen zeigen Individuen starke morphologische und biochemische Unterschiede, obwohl sich die Bedingungen ihrer Lebensräume nur minimal unterscheiden (Mather und Bennett 1993). Andererseits können die gleichen Actinobakterien in verschiedenen Schwamm-Individuen des gleichen Probenahmeortes nachgewiesen werden (Bultel-Poncé *et al.* 1998). Obwohl es zu einer jahreszeitlich oder Antibiotika bedingten Variation der Abundanzen der einzelnen Bakteriengruppen kommen kann und die Bakterien leicht zwischen Habitaten und Wirten wechseln können (Olafsen 1996), zeigt sich häufig eine ausgeprägte Stabilität in der Quantität der schwamm-assoziierten Organismen (Madri *et al.* 1971). Schwämme scheinen den Bakterien Mikrohabitate zu bieten, worauf unter anderem das Vorkommen anaerober Bakterien in Schwämmen hinweist (Imhoff und Trüper 1976; Wilkinson *et al.* 1981).

9.3.3 Genetische Diversität in *Halichondria panicea*

Während Althoff *et al.* (1998) die Klonsequenz eines alpha-Proteobakteriums in mehreren Exemplaren des Schwammes *Halichondria panicea* verschiedener Standorte nachwies, konnten in der vorliegenden Arbeit keine mit dieser Schwammart spezifisch assoziierten Actinobakterien festgestellt werden, legt man dafür das Vorkommen in Exemplaren verschiedener Standorte, das Fehlen der Bakterien im Umgebungswasser und hohe Abundanzen des Bakteriums im Schwamm zur Grundlage, wie in der zu diesem Thema veröffentlichten Literatur üblich. In der DGGE konnte keine artspezifische Bande für die Art festgestellt werden und die Klonierung ergab ein separates Cluster für die Art (Kapitel 4.2.1), das jedoch nur einen kleinen Teil der Klone beinhaltet. Da unterschiedliche Habitate Einfluß auf die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft in den Schwämmen haben (Wapstra und van Soest 1987; Würtz 1999) und an einem Standort ein Bakterium die gleiche Funktion in einer Symbiose einnehmen kann wie an einem anderen Standort ein anderes Bakterium, muß das Fehlen einer artspezifischen Bande im DGGE-Gel oder einer in den Exemplaren häufig auftretenden Sequenz eine funktionelle Gemeinschaft eines Actinobakteriums mit dem Schwamm keinesfalls ausschließen.

9.4 Beurteilung der verwendeten Methoden

Die Verteilung der Isolate auf die verschiedenen Gruppen innerhalb der Actinobacteria ist bei den Ergebnissen der Fettsäureanalyse und bei den Sequenzierungen sehr ähnlich. Beide Untersuchungsmethoden führen zu einer Einordnung des Großteils der Isolate in die Unterordnung der Micrococcineae, einer weiteren großen Gruppe in die Unterordnung Corynebacterineae und nur einige wenige Vertreter in den Gattungen *Streptomyces* und *Micromonospora*. In der Sequenzierung fiel der Anteil der Corynebacterineae höher und der Anteil der Micrococcineae geringer aus als bei den Fettsäure-Identifikationen, was durch die geringere Gesamtzahl der zugrunde liegenden Isolate in der Sequenzierung hervorgerufen sein könnte. Da in die Fettsäure-Identifikation etwa drei Mal so viele Isolate eingeflossen sind wie in die Sequenzierung, kann es bei dem kleineren Datensatz zu einem leicht verzerrten Bild gekommen sein, das sich bei Erhöhung der Gesamtzahl der untersuchten Isolate noch zu Gunsten der Micrococcineae verschieben könnte. Die Sequenzierung hat sich für die Identifizierung der Gattung *Streptomyces* als empfindlicher herausgestellt. Dieser Umstand ist zweifellos auf das Fehlen entsprechender Einträge in der MIDI-Datenbank zurückzuführen.

Wie in Kapitel 7.2.2 dargelegt wurde, ist eine Identifizierung von Bakterien aus Umweltproben auf Basis ihrer Substratverwertung (BIOLOG-System) nicht erfolgreich, so daß die Methode für derartige Versuchsansätze nicht geeignet ist.

10 Charakterisierung der Isolate

10.1 Morphologische Charakterisierung

Die lichtmikroskopische Beobachtung führte zur Einordnung von 131 Isolaten in morphologische Typen, die anschließend mit den Identifikationen (FAME, Sequenzierung) der Stämme verglichen wurde. Es zeigte sich, daß der Großteil der Ergebnisse zu den Identifikationen paßt, beispielsweise wurde die Tetraden-Bildung bei *Micrococcus luteus* beobachtet und Hyphengeflechte bei *Streptomyces*-Arten. Eine Klassifizierung auf Grundlage morphologischer Eigenschaften ist wegen der variable Formen und irreguläre Fragmentierung der Actinobakterien je nach Lebensbedingungen und Lebensphase nicht möglich.

In der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung eines Querschnittes durch eine osculartragende Erhöhung von *Halichondria panicea* konnte das Vorkommen von Bakterien des gleichen morphologischen Typs, vermutlich sogar der gleichen Art, in Zellhaufen beobachtet werden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen anderer Autoren (Bewley *et al.* 1996; Friedrich *et al.* 1999; Sará 1971; Simpson 1984; Turon *et al.* 2000; Vacelet und Donadey 1977; Wilkinson 1978c) weisen auf das Vorkommen von schwamm-assoziierten Bakterien in lokalen Verteilungsmustern hin, was anhand des untersuchten Schnittes auch für die Bakterienpopulation in *Halichondria panicea* bestätigt werden konnte.

10.2 Anpassung an den marinen Lebensraum

Die durchschnittliche Salinität von Meerwasser liegt bei 3,5 %, an die sich marine Organismen angepaßt haben (Osinga *et al.* 1999). Die Einstufung als mariner Organismus wird aufgrund ihres Salzoptimums getroffen, was weite Toleranzbereiche der Bakterien gegenüber hohen und niedrigen Salzgehalten nicht ausschließt (Imhoff 2001).

Viele Actinobakterien können im salzigen Lebensraum (3,5 % NaCl) und bei niedrigen Temperaturen (15°C) wachsen (Okazaki und Okami 1976). Verschiedenen Autoren haben gutes Wachstum von Actinobakterien bei Salzgehalten bis 7 % NaCl, Toleranzen sogar bis zu 10 % beobachtet (Ellaiah *et al.* 1996; Okazaki und Okami 1972), wobei *Streptomyces*-Stämme häufig Wachstum bei höheren NaCl-Gehalten zeigten (7 bis 9 %) (Bernan *et al.* 1994; Hotta *et al.* 1980a; Jensen *et al.* 1991; Okami und Okazaki 1974; Takahashi *et al.* 1989; Weyland 1981b) als andere Actinobakterien-Gruppen. Micromonosporen wachsen beispielsweise nur bis 4 % NaCl (Goodfellow und Haynes 1984). Unterschiedlich hohe Salztoleranzen bei Actinobakterien können jedoch auch in Abhängigkeit von den gewählten Versuchsbedingungen auftreten (Küster und Neumeier 1981; Okazaki and Okami 1976). So können terrestrische Actinobakterien bei 3,5 % NaCl und 15°C kultiviert werden und salzempfindliche Stämme durch Kultivierung mit schrittweiser Erhöhung des Salzgehaltes adaptiert werden (Okami und Okazaki 1978).

Stämme mariner Herkunft zeigen oft sehr breite Toleranzbereiche, wachsen auch bei höheren Salzgehalten und zeigen häufig ein Bedürfnis nach Natriumionen (Hunter *et al.* 1981; Ravel *et al.* 1998). Bei Actinobakterien einer Salzmarsch konnten Salztoleranzen bis 12 % festgestellt werden, wogegen terrestrische Verwandte nur bis 5 % NaCl wuchsen (Hunter *et al.* 1981).

Während sensible Arten die Temperatur- und Salzbedingungen nicht ertragen, können einige Actinobakterien lange Zeit am Meeresgrund leben und wachsen. Der Meeresboden gilt daher als

Habitat interessanter Actinobakterien, die sowohl an Land als auch im Meer leben können (Okami und Okazaki 1974).

Einige Stämme zeigen ein Salzbedürfnis mit optimalem Wachstum bei 10 - 100 % NaCl im Medium (Küster und Neumeier 1981; Weyland 1981b), andere Stämme wachsen auch ohne Salz, zeigten optimales Wachstum und Sporenbildung jedoch erst bei mindestens 25 % der normalen Meerwasser-Salinität (Weyland 1981b). *Nocardia*-forme wuchsen in Untersuchungen von Helmke (1981) und Weyland (1981b) nicht in Süßwassermedium und nicht bei Temperaturen über 24°C, so daß die meeresbewohnenden Vertreter dieser Gruppe als psychrophil und halophil angesprochen werden können

Der Großteil der in dieser Arbeit auf ihr Salzverhalten untersuchten Isolate zeichnet sich durch optimales Wachstum bei marinen oder Brackwasser-Bedingungen aus. 23 der untersuchten Isolate können aufgrund ihres Salzoptimums als marin, weitere 24 als Brackwasser-Bakterien eingestuft werden. Nur acht Isolate wuchsen am besten auf salzlosen Medien. Auch wenn nicht alle als marin eingestuften Isolate aus der Nordsee und dem Mittelmeer stammen und nicht alle Brackwasser-Stämme aus der Ostsee, so ist die Anpassung der untersuchten Isolate an ihren Lebensraum im Schwamm doch als sehr gut zu bewerten. Die Isolate zeigen darüber hinaus recht große Toleranzbereiche, nur neun von 55 Stämmen zeigten überhaupt kein Wachstum bei 6,8 % NaCl und nur zwei Stämme wuchsen nicht auf salzlosem Medium.

Der Grad der Anpassung von Actinobakterien an den marinen Lebensraum kann ganz unterschiedlich ausfallen. Während Jensen *et al.* (1991) von taxonomisch bedingten Unterschieden ausgehen, vermuten Colquhoun *et al.* (1998) den Anpassungsprozeß an sich als wichtigen Faktor für die jeweilige Ausprägung von Toleranzen.

Aufgrund des selektiven Drucks beim Übertritt vom terrestrischen in den marinen Lebensraum werden in marinen Proben Organismen erwartet, die an Land wesentlich seltener (Okami 1979) oder gar nicht anzutreffen sind. Die ökologisch unterschiedlichen Bedingungen könnten andere Arten der Aktivität als bei landbewohnenden Formen hervorgerufen haben (Ellaiah *et al.* 1996; Okami und Okazaki 1978; Okazaki und Okami 1976). Die Anwesenheit von Meerwasser übt beispielsweise einen positiven Effekt auf die Antibiotikaproduktion aus, was auf das Vorhandensein von Spurenelementen zurückzuführen sein könnte (Küster und Neumeier 1981; Okami und Okazaki 1978).

Halotoleranz ist eine genetisch kontrollierte Eigenschaft der Actinobakterien, die bei *Streptomyces*-Stämmen mit Veränderungen des Cytoplasmas zusammenhängen (Küster und Neumeier 1981).

Actinobakterien sind auch unter extremen Lebensbedingungen anzutreffen, wie z.B. in Sedimenten des Japan Grabens in 4400 bis 6400 m Tiefe (Colquhoun *et al.* 1998) oder als Bestandteil der mikrobiellen Lebensgemeinschaft im Meereis, der SIMCO (sea ice microbial community), wo sie hohe Salinitäten zwar ertragen, aber nicht immer ein Bedürfnis nach Natriumionen zeigen. Dies weist insbesondere für die Meereis-Formen darauf hin, daß sie auch in Habitaten mit geringen Salinitäten leben könnten (Junge *et al.* 1998).

Extreme Habitate dürften neue und speziell angepasste Bakterien enthalten (Junge *et al.* 1998). Die im antarktischen Eis lebenden kokkoiden Actinobakterien (*Arthrobacter*, *Brachybacterium*) können in einem breiten Bereich von Temperatur und Salinität wachsen (Junge *et al.* 1998). Die beiden Actinobakterien-Stämme S23H2 und S21F1 aus den Laugenkanälen wuchsen gleich gut bei 0 bis 30°C und bei Salinitäten von 0 bis 30 % (Junge *et al.* 1998).

Der Großteil mariner *Streptomyces*- und *Micromonospora*-Stämme zeigt neben der Halotoleranz auch eine höhere Barotoleranz als terrestrische Stämme (Helmke 1981). Es besteht eine Verbindung zwischen Barotoleranz und bestimmten taxonomischen Eigenschaften, so findet sich die höchste Barotoleranz bei Nocardiaformen (Helmke 1981). Colquhoun *et al.* (1998) konnten Wachstum in der Tiefsee bei 40 bis 60 MPa nachweisen. *Arthrobacter*-Stämme als Vertreter der Corynebacterineae zeigen Temperaturtoleranz und Anpassung an niedrige Temperaturen unter Veränderung ihrer Morphologie (Sieburth 1967). Gleiches gilt für Actinobakterien (*Micrococcus*, *Actinomyces*) für Anpassung an hydrostatischen Druck bis 600 atm (Oppenheimer und Zobell 1952).

10.3 Naturstoffproduktion

Unter den Actinobakterien ist besonders die Gruppe der Streptomyceten dafür bekannt, daß ihre Stämme nicht nur einen bioaktiven Stoff, sondern oft eine Vielzahl von aktiven Substanzen parallel synthetisieren (Cross 1982). Nach Takahashi *et al.* (1989) produziert einer von 200 Stämmen einen neuen Naturstoff. *Streptomyces*-Stämme zeigen die höchste Aktivität und *Micromonospora* mit ihrer Aktivierung der Naturstoffsynthese die schnellste Reaktion auf veränderte Lebensbedingungen (Zheng *et al.* 2001). Fast 90 % der in dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Naturstoffproduktion untersuchten Actinobakterien stammen aus Individuen der Schwammart *Halichondria panicea*. Die Extrakte dieser Species zeigen cytotoxische Wirkung und ihre Aktivität ist in Exemplaren aus der Nord- und Ostsee höher als bei Individuen aus dem Mittelmeer (Althoff *et al.* 1998). Auch unterschiedliche Schwammarten des gleichen Standorts zeigen unterschiedliche Wirksamkeit gegen Testorganismen (Becerro *et al.* 1994). Generell kann jedoch festgestellt werden, daß die antibakterielle Wirkung von Schwammextrakten gegen Gram-positive Bakterien am höchsten (77 %), gegen Gram-negative etwas geringer (53 %) und gegen Hefen am geringsten (32 %) ist (Amade *et al.* 1987).

Bei 26 % der untersuchten Stämme (33 von 126 getesteten Isolaten) wurde Aktivität im Strichtest festgestellt. Wirkstofftestungen von Bernan (1996) und Okazaki und Okami (1972) an freilebenden marinen Actinobakterien ergaben bei 27 bzw. 29 % der untersuchten Stämme Aktivität; bei Organismen, die in Lebensgemeinschaften mit marinen Tieren oder Pflanzen leben, zeigten sich bis zu 65 % der untersuchten Mikroorganismen aktiv (Zheng *et al.* 2001). In Untersuchungen von Schwammextrakten konnte bei bis zu 90 % der Extrakte biologische Aktivität festgestellt werden (Amade *et al.* 1982; McCaffrey und Endean 1985; Muricy *et al.* 1993). Der im Strichtest festgestellte Anteil aktiver Isolate in der Gruppe der Actinobakterien liegt mit 26 % unterhalb der Erwartungen für schwamm-assoziierte Formen und entspricht eher den Untersuchungsergebnissen freilebender mariner Actinobakterien. Da in die Wirkstofftests nur sehr geringe Mengen an unkonzentriertem Kulturüberstand eingesetzt wurden, muß eine relativ große Menge an Wirkstoff oder Wirkstoffen von den Kulturen produziert und ausgeschieden worden sein, um eine Wachstumshemmung bei den Indikatororganismen hervorzurufen. Osinga *et al.* (1999) beobachteten, daß interessante Metabolite von Schwämmen oder assoziierten Bakterien häufig nur in Kleinstmengen produziert werden, was eine Ursache für den mit 26 % für schwamm-assoziierte Bakterien relativ geringen Anteil aktiver Stämme sein könnte. Da aktive Substanzen in Schwammzellen meist angereichert und gespeichert werden und bis zu 12 % des Trockengewichts (Unson *et al.* 1994) ausmachen können, ist die Naturstoffproduktion im Schwamm an seinem natürlichen Standort im Gegensatz zu den Bedingungen in einer Reinkultur möglicherweise nach Bedarf des Tieres und damit durch Umweltfaktoren reguliert. Bei einer Untersuchung auf Antibiotikaproduktion im Labor herrschen andere Bedingungen, mögliche Einflüsse auf die Naturstoffproduktion durch andere Mikroorganismen oder den Wirt sind

ausgeschaltet. Es ist bekannt, daß die Produktion von bioaktiven Substanzen abhängig vom physiologischen Zustand der Produzenten (Flowers *et al.* 1998) und von Umweltfaktoren ist (Bewley *et al.* 1996; Ivanova *et al.* 1998; Okami 1979; Okazaki und Okami 1972; Okazaki und Okami 1976; Unson *et al.* 1994). Mikroorganismen, die in ihrem natürlichen Standort als Naturstoffproduzenten gelten, können sich in Monokulturen hinsichtlich ihrer Metabolitproduktion grundlegend anders verhalten, z.B. aufgrund einer veränderten Genexpression (Osinga *et al.* 1999), des Fehlens von Streßfaktoren oder fehlender Konkurrenz, so daß es im standardisierten Laborversuch zu fundamental anderen Ergebnissen als im natürlichen Lebensraum und zu weniger Fällen festgestellter Aktivität kommen kann.

Der überwiegende Teil der Isolate zeigte nach drei Tagen Kultivierung Wachstumshemmung bei den Indikatororganismen, was mit den Beobachtungen anderer Autoren bei ähnlichen Versuchen übereinstimmt (Ivanova *et al.* 1998). Bei einem Drittel der aktiven Stämme konnte die Aktivität auch nach sechs Tagen Kultivierungszeit festgestellt werden, Aktivität gegen *Candida glabrata* zeigte sich nur bei vier Isolaten, davon in drei Fällen erst nach sechs Tagen Kultivierung. Obwohl Schwämme und schwamm-assoziierte Bakterien das Wachstum insbesondere von Gram-positiven Bakterien hemmen, bleiben Pilze häufig von ihren Wirkstoffen unbeeinflusst (Amade *et al.* 1987; McCaffrey und Endean 1985; Zheng *et al.* 2001). Diese Unempfindlichkeit der Pilze gegenüber den Naturstoffen aus Schwämmen und Bakterien könnte auf die unterschiedliche Lebensweise und den unterschiedlichen Aufbau der Zellen zurückgeführt werden. Auch das Fehlen von Angriffspunkten, die Nutzung unterschiedlicher Substrate und Nährstoffe und das Fehlen von Konkurrenz können eine Rolle spielen. Da es sich bei allen fünf Indikatororganismen um terrestrische Stämme handelt, Bakterien jedoch meist Wirkstoffe gegen nah verwandte Arten oder Konkurrenten um das gleiche Substrat produzieren und sich die Naturstoffproduktion bei marinen Actinobakterien von der terrestrischer Stämme unterscheidet (Okami und Okazaki 1978), überrascht nicht, daß Aktivität im Strichtest nur gegen zwei der Indikatororganismen (*Staphylococcus lentus* und *Candida glabrata*) festgestellt werden konnte. Aufgrund der Testergebnisse der Schwamm-Isolate kann nicht auf ihr eigentliches Potential zur Naturstoffproduktion und das Wirkungsspektrum der Naturstoffe geschlossen werden (Amade *et al.* 1987; Becerro *et al.* 1994). Es ist durchaus möglich, daß im Test inaktive Stämme in ihrem natürlichen Lebensraum Naturstoffe produzieren, da beispielsweise ein Stoffaustausch zwischen Wirt und Symbiont essentiell für die Naturstoffproduktion ist (Unson *et al.* 1994). Da die Wirkstoffproduktion im Lebensraum Schwamm von vielen unterschiedlichen Faktoren abhängig ist und es keine Garantie gibt, daß die Bakterien in Reinkultur die gleichen Sekundärmetabolite produzieren wie im Schwamm (Marin *et al.* 1998; Unson *et al.* 1994), liefert der Strich- oder Agardiffusionstest lediglich Hinweise auf vorhandenes Potential, was in der vorliegenden Arbeit und im Projekt „Naturstoffe aus marinen Schwämmen und schwamm-assoziierten Bakterien“ auch angestrebt war.

In den Strichtests sind deutlich mehr aktive Stämme festgestellt worden als in den Agardiffusionstests. Da sich die beiden Tests durch die Lebensbedingungen für die Indikatororganismen in wenigstens einem Parameter, dem Sauerstoffangebot, deutlich unterscheiden, können abweichende Ergebnisse der Methoden möglicherweise darauf zurückgeführt werden. Bei den Indikatororganismen handelt es sich um aerobe Bakterien, so daß das Eingießen in den Agar und die damit verbundene geringere Sauerstoffversorgung zu einer veränderten Stoffwechselaktivität führen kann. Dies könnte Auswirkungen auf die Aufnahme des Wirkstoffes haben oder seine Wirksamkeit beeinflussen. Zum Beispiel könnten die Zellen bei Sauerstoffmangel oder Streßbedingungen auf einen anderen Stoffwechseltyp umschalten und andere Stoffwechselprodukte produzieren und ausscheiden. Ferner können sich die Angriffspunkte des Wirkstoffes verändern, so daß es zu keiner Wachstumshemmung

kommen kann. Ein veränderter Stoffwechsel könnte auch zum Abbau des Wirkstoffes führen. All dies könnte dazu führen, daß eine Aufhebung der Wachstumshemmung des Indikatororganismus eintritt und es zu falsch negativen Ergebnissen in den Tests auf Antibiotikaproduktion kommt.

11 Besondere Bakteriengruppen

11.1 Schwamm „Symbionten“

Die im Schwamm lebenden Bakterien werden gemeinhin als „Symbionten“ beschrieben (Bewley *et al.* 1996; Simpson 1984; Wilkinson 1978c), obwohl keine oder kaum Hinweise auf eine artspezifische oder funktionelle Vergesellschaftung oder auch nur auf ein regelmäßiges Vorkommen der Bakterien vorliegen. Der Begriff Symbiont wird in der Regel dann benutzt, wenn die Mikroorganismen nur im Schwamm und nicht im umgebenden Wasser vorkommen (Santavy und Colwell 1990). So wurden neue schwammspezifische „Symbionten“ unter anderem von Wilkinson (1978b) und Santavy *et al.* (1990) beschrieben. Imamura *et al.* (1993) sprechen von den im Benthos enthaltenen Mikroorganismen als kommensale Formen. Bewley *et al.* (1996) haben heterotrophe Bakterien im Schwamm *Theonella feldmanni* sowohl in äußeren Schichten als auch im Inneren des Schwammes nachgewiesen und vermuten darunter Symbionten und unspezifisch assoziierte Formen, die als Nahrungsquelle dienen. Allein die Tatsache, daß assoziierte Mikroorganismen biologisch aktive Substanzen herstellen, die zunächst dem Wirt zugeschrieben wurden, läßt auf die Möglichkeit einer symbiontischen Beziehung zwischen Mikroorganismus und Schwamm schließen (Ivanova *et al.* 1998). So fanden Becero *et al.* (1994) keinen bakteriellen Aufwuchs auf dem Schwamm *Crambe crambe*, der Metabolite an der Schwammoberfläche zur Abwehr von Aufwuchs einsetzt. Zwei der schwamm-assoziierten Bakterien schienen resistent gegen diese Metabolite zu sein, was den Erwartungen der Autoren betreffend symbiontischen Beziehungen entsprach. Preston *et al.* (1996) konnten in allen zu unterschiedlichen Jahreszeiten gesammelten und unterschiedlich alten Exemplaren von *Axinella* sp. ein „symbiontisches“ Archaeobakterium nachweisen, welches nicht in anderen Schwammspecies des Standortes oder im Umgebungswasser anzutreffen war. Auch das Vorkommen von alpha-Proteobakterien in der Umgebung der Choanocyten-Kammern von *Rhopaloeides odorabile* könnte auf eine Symbiose hinweisen, da die Choanocyten in die Nährstoffaufnahme involviert sind und die Abgabe von Nährstoffen durch die Bakterien an den Schwamm möglich erscheint (Webster *et al.* 2001).

Wilkinson *et al.* (1981) beschreiben den gleichen bakteriellen „Symbiont“ in neun von 10 Schwämmen des Mittelmeers und des Großen Barriere-Riffs, in denen er 40% der Isolate ausmacht. Das Auftreten von gleichen Bakterien in Schwämmen verschiedener Standorte und von gleichen Bakterien im Schwamm, aber nicht im Umgebungswasser spricht für eine Symbiose, wogegen Bakterien, die auch im Umgebungswasser vorkamen, wie z.B. *Micrococcus*-Stämme, von den Autoren nicht als Symbionten eingestuft wurden.

Bei adulten Individuen von *Halichondria panicea* aus Nord- und Ostsee ließ sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Würtz (1999) und im Gegensatz zu den Klonierungsexperimenten von Althoff *et al.* (1998) mit Hilfe der DGGE keine artspezifische Bakterienzusammensetzung nachweisen. In *Halichondria panicea* aus dem Mittelmeer ist nach Müller *et al.* (1981) *Pseudomonas insolita* die dominante Bakterienart; das Bakterium wächst jedoch nur in Anwesenheit des vom Schwamm synthetisierten Lektins. Westphal entdeckte 1988 eine funktionelle Gemeinschaft zwischen

Algen und *Halichondria panicea*. Während Vertreter anderer Bakteriengruppen als Schwamm-Symbionten identifiziert werden konnten, scheint es unter den Actinobakterien in *Halichondria panicea* keine spezifisch-assoziierten Formen zu geben.

Würtz (1999) hat die im Zusammenhang mit der Symbiose wichtige Weitergabe von Bakterien an Larvenstadien bei *Halichondria panicea* untersucht und festgestellt, daß nach der „Grundausstattung“ der Larven mit spezifischen Mikroorganismen durch den Mutterschwamm im Folgenden die Bakterienpopulationen in den Larven innerhalb weniger Tage nach dem Festsetzen aus der Umgebung „aufgefüllt“ werden und dann für einen längeren Zeitraum unabhängig von der Veränderung der Artenzusammensetzung in der Umgebung stabil bleiben. Es handelt sich bei der Weitergabe von Bakterien vom Muttertier auf die Larve um einen spezifischen Vorgang. Bestimmte Bakteriengruppen, die nur einen geringen Anteil der Gesamtpopulation in *Halichondria panicea* ausmachen werden unabhängig von der Variabilität der Bakterienpopulation im Verlauf der Ontogenese oder der Embryogenese aus dem Mesohyl des Mutterschwammes auf die Oozyte bzw. den Embryo übertragen. Aus diesem Grunde vermutet der Autor, daß die Mehrzahl der Bakterien im Schwamm eine weniger spezifische Funktion haben, sondern vielmehr einen Nahrungsvorrat für Zeiten darstellen, in denen die Filtration beeinträchtigt ist. Dieser artspezifische Transfer läßt eine wichtige Funktion der Bakterien für den heranwachsenden Schwamm vermuten, beispielsweise die Synthese biologisch aktiver Sekundärmetabolite. Die Übergabe von bestimmten Bakterien an die nächste Generation wurde auch bei *Chondrosia reniformis* (Marin *et al.* 1998) und *Aplysina* (Simpson 1984) beobachtet.

Die Regulation der Zusammensetzung schwamm-assoziiierter Bakterien kann über verschiedene Mechanismen erfolgen. Der Schwamm kann durch selektive Phagozytose die Bakterienpopulation beeinflussen (Wilkinson 1978a) oder durch inhibierende Wechselwirkung, wofür die Vielzahl der in Schwämmen nachgewiesenen antibakteriellen Substanzen spricht (Amade *et al.* 1987). Auch muß es sich bei chemischen Prozessen nicht nur um Schwamm-Bakterien-Interaktionen handeln, sondern die Konkurrenz der Mikroorganismen untereinander kann eine große Rolle spielen. Hierfür spricht wiederum die vielfältige Antibiotikaproduktion der Bakterien. Mit dem Auftreten einer Species könnte sich demnach die ganze Gemeinschaft der schwamm-assoziierten Bakterien verändern (Würtz 1999). Auch die makroskopischen Endo- und Epibionten könnten Einfluß auf die Bakterienpopulation nehmen (Würtz 1999). Althoff *et al.* (1998) vermuten, daß die Bakterien mit der Nahrung eingestrudelt werden und im Schwamm eine kommensale oder antagonistische Beziehung zum Wirt etablieren; dagegen sprechen jedoch die Untersuchungen von Santavy und Colwell (1990), die deutlich unterschiedliche Bakterienpopulationen in Schwämmen und ihrem Umgebungswasser erbrachten.

11.2 Planctomycetales

Die Planctomycetales sind eine außergewöhnliche und weit verbreitete Gruppe unter den sich durch Knospung vermehrenden Bakterien. Ihre Zellwand wird nicht durch das bei anderen Bakterien übliche Peptidoglycan gebildet und die Gruppe weist einige ungewöhnliche molekularbiologische Besonderheiten wie z.B. kurze 5S rRNA und eine einzigartige Ultrastruktur auf (Fuerst 1995). Die Zellen zeigen kraterförmige Strukturen gegenüber dem reproduktiven Pol und fibrillenartige oder prostheca-ähnliche Anhänge zum Anheften der Zellen an Substrat (Fuerst *et al.* 1997). Eine besondere Form der Kompartimentierung der Zellen in Pirellulosom und Kappen-Region wurde bei der Gattung *Pirellula* beobachtet (Lindsay *et al.* 1997). Das Vorkommen der Fettsäure 18:1 ω 9c ist charakteristisch für die Ordnung Planctomycetales (Kerger *et al.* 1988), die sich in die vier Gattungen *Pirellula*, *Planctomyces*, *Gemmata* und *Isosphaera* unterteilt (Fuerst *et al.* 1997).

Vertreter dieser Gruppe wurden, obwohl sie ursprünglich als Süßwasser-Bewohner angesehen wurden, vermehrt auch in marinen Lebensräumen nachgewiesen. Als bevorzugte Lebensweise wird die Anlagerung an Partikel angenommen (Fuerst 1995, Giovannoni und Rappé 2000).

Drei Isolate der schwamm-assoziierten Bakterien wurden mit Hilfe der Fettsäureanalyse als *Actinomadura* identifiziert, was mit genetischen Methoden nicht bestätigt werden konnte, da weder eine Sequenzierung noch eine Klonierung der Isolate unter den in dieser Arbeit gewählten Bedingungen erfolgreich war. Weitere 10 unidentifizierte Isolate zeigten die gleiche Morphologie wie diese Stämme. Das Isolat HK 3z31c aus *Halichondria panicea* aus der Ostsee wurde als Repräsentant der Gruppe einer näheren Charakterisierung mit mikroskopischen Methoden unterzogen. Die licht- und rasterelektronenmikroskopische Untersuchung des Isolates lieferte Hinweise für eine Zugehörigkeit zu den Planctomycetales. Die Zellen liegen in einer Größe von etwa 2 μ m Länge und 1 μ m Breite vor und zeigen Strukturen im Zellinneren, die möglicherweise eine Kompartimentierung in Pirellulosom und Kappen-Region darstellen. Ferner konnten einhornartige Ausbildungen am Zellpol der Bakterien, sogenannte Prosthecae, festgestellt werden, die der Anheftung der Zellen an das Substrat dienen.

Das Fettsäuremuster der drei analysierten Isolate weicht deutlich von den Mustern der untersuchten Actinobakterien ab, wurde aufgrund der hohen Anteile an der Fettsäure 18:1 ω 9c, die als Markerfettsäure für Gram-positive Bakterien mit hohem GC-Gehalt gilt (Lauer 2001) und dem Vorkommen der Fettsäuren 16:0 und 18:2 ω 6,9c/18:0 *anteiso* jedoch der Gruppe der Actinobakterien zugerechnet. Nach Kerger *et al.* (1988) ist die Fettsäure 18:1 ω 9c auch charakteristisch für die Planctomycetales. Die MIDI-Datenbank enthält keine Referenzeinträge der Planctomycetales, was eine Fehlidentifikation als Actinobakterium begünstigt haben könnte.

Da eine Sequenzierung nicht durchführbar war, muß die phylogenetische Einordnung des Isolates HK 3z31c und der ganzen Gruppe von unidentifizierten Stämmen des gleichen Zelltyps offen bleiben. Da fünf von neun auf Antibiotikaproduktion getestete Isolate Aktivität zeigten (siehe Kapitel 5.3) und bisher keine Planctomycetales aus marinen Schwämmen isoliert wurden ist eine Identifizierung und weitere Charakterisierung der Isolate wünschenswert.

Vertreter der Planctomycetales sind von Friedrich *et al.* (1999) und Webster *et al.* (2001) mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung als Zellhaufen in der Nähe von Sponginfasern und den Geißelkammern von Schwämmen nachgewiesen worden, die Befunde konnten jedoch weder durch Klonierung des Schwammmaterials noch durch Sequenzierung von Isolaten bestätigt werden (Webster,

Diskussion

persönliche Mitteilung). In der vorliegenden Arbeit ist erstmalig der Nachweis von Planctomycetales in Schwämmen durch Klonierung erbracht worden (siehe Abbildung 36 und Kapitel 6.1).

12 Schlußbetrachtung

Die phylogenetische Einordnung der Isolatsequenzen zeigt die Micrococccineae, hauptsächlich die Gattung *Micrococcus*, als dominante Isolate der Actinobakterien in den untersuchten Schwämmen. Da die Klonierungsergebnisse abweichend ausfallen und die Micrococccineae möglicherweise in sehr geringen Abundanzen im Schwamm vertreten sind, wird dieser Bakteriengruppe keine große Bedeutung zugeschrieben. Die Verteilung der Isolate innerhalb der Actinobacteria stimmt mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen an Schwämmen überein, weicht jedoch deutlich von der Verteilung von Isolaten aus der Wassersäule und dem Sediment ab. Dies weist den Schwamm als gesondertes Ökosystem innerhalb der marinen Lebensräume aus. Trotz der zu erwartenden niedrigen Abundanzen der isolierten Bakterien spricht das Vorkommen solcher Bakterien im Schwamm, die im Umgebungswasser nicht oder nur in geringem Maße anzutreffen sind, für eine gezielte Akkumulation und damit für eine Funktion dieser Arten im Schwamm. Auch das konzentrierte Auftreten der Bakterien an bestimmten Stellen im Schwamm-Mesohyl könnte als Hinweis für mögliche Funktion der Bakterien gedeutet werden. Die DGGE liefert in diesem Zusammenhang Hinweise auf eine standortspezifische Verteilung der Bakterien, was mit der Aufnahme von Bakterien aus dem Umgebungswasser zusammenhängen könnte.

Die Klonierungen erbrachten von den Kultivierungsversuchen stark abweichende Einordnungen, was den Unterschied der kultivierbaren und genetisch zu ermittelnden Diversität von Bakterien in Umweltproben unterstreicht. Dabei müssen die Grenzen der jeweiligen Methoden berücksichtigt werden; auch ein molekularbiologischer Ansatz kann aufgrund der Detektionsgrenzen von PCR und DGGE nur eine Annäherung an die tatsächliche Diversität liefern. Während sich die kultivierbare Diversität gut in die Referenzsequenzen der Actinobakterien einfügt, liegt ein Großteil der Klonsequenzen in einem separaten Cluster, was auf eine noch unbekannt neue Gruppe in diesem Phylum hinweisen könnte. Dieses Cluster liegt auch von dem von Giovannoni und Rappé (2000) beschriebenen marinen Actinobakterien-Cluster relativ weit entfernt. Die Inkonsistenz der phänotypischen und molekularen Taxonomie könnte durch zeitgleich ablaufende Spezialisierungsereignisse in Actinobakterien als Anpassung an veränderte Lebensbedingungen hervorgerufen werden, wie es Colquhoun *et al.* (1998) bei Actinobakterien der Tiefsee feststellen konnten. Neben morphologischen Veränderungen der Zellen aufgrund der Anpassung an variierende oder extreme Lebensbedingungen, kann es möglicherweise auch zu Veränderungen in der genetischen Ausstattung der Bakterien kommen. Interessant ist in diesem Zusammenhang, ob für die Anpassung wichtige Gene auf Plasmiden lokalisiert sind.

Ein Viertel der auf Antibiotikaproduktion untersuchten Actinobakterien zeigt sich als biologisch aktiv, obwohl die Isolate nur einen kleinen Teil der schwamm-assoziierten Bakterien repräsentieren. Sie bieten damit die Grundlage für eine mögliche funktionelle Gemeinschaft mit dem Schwamm, die in dieser Arbeit jedoch nicht nachgewiesen werden konnte, und bestätigen die wichtige Rolle der Actinobakterien in der Suche nach neuen Naturstoffen im Meer.

Es konnten keine artspezifischen DGGE-Banden, keine größeren artspezifischen Cluster unter den Sequenzen oder auffällige Unterschiede zu den Umgebungswasserproben festgestellt werden. Somit konnten auch keine direkten Hinweise auf artspezifische Assoziationen zwischen einzelnen Actinobakterien und den Schwämmen aus der Nord- und Ostsee, insbesondere *Halichondria panicea*, gefunden werden. Die Klonsequenzen der beiden Mittelmeerschwämme *Ircinia spinosula* und *Haliclona valliculata* bilden zwar separate Cluster, da jedoch in der DGGE im Bandenmuster von

Ircinia spinosula keine der beiden dominanten Banden exklusiv in dieser Species vorkommt, kann nicht von einer spezifischen Bakterienpopulation ausgegangen werden.

Die Funktion eines bakteriellen Symbionten kann in verschiedenen Schwammspecies oder in der gleichen Species verschiedener Standorte durch unterschiedliche Bakterien wahrgenommen werden. Aus diesem Grund reicht zur Feststellung einer funktionellen Beziehung die genetische Untersuchung allein nicht aus. Vielmehr muß auch die Darlegung des stoffwechselfysiologischen Aspektes einer solchen Lebensgemeinschaft erfolgen. Der in dieser Arbeit angestrebte Nachweis von angepaßten, neuen und naturstoffproduzierenden Actinobakterien in marinen Schwämmen konnte erbracht werden, wenn auch die Frage einer speziellen Funktion dieser Bakterien in den Schwämmen offen bleiben muß.

Viele Autoren (Colquhoun *et al.* 1998; Ellaiah *et al.* 1996; Jensen *et al.* 1991; Moran *et al.* 1995; Okami und Okazaki 1978; Okazaki und Okami 1976; Ravel *et al.* 1998; Weyland 1981b) beschreiben Actinobakterien als angepaßten, aktiven Teil der marinen mikrobiellen Gemeinschaft. Der überwiegende Teil der in dieser Arbeit untersuchten Isolate kann aufgrund seines Salzverhaltens als gut an den marinen bzw. an den Brackwasser-Lebensraum angepaßt bezeichnet werden. Der Großteil der Isolate weist darüber hinaus einen breiten Toleranzbereich auf.

Der Kultivierungserfolg war bei Einsatz eines nährstoffreichen Mediums, das eine Auswahl an Kohlenstoffquellen anbietet, am höchsten. Vermutlich hat das Medium in seiner Zusammensetzung hervorragend den Fähigkeiten und der Flexibilität des Stoffwechsels der Actinobakterien entsprochen. *Halichondria panicea* scheint im Vergleich zu anderen Schwämmen einen besonders hohen Anteil an kultivierbaren Actinobakterien zu besitzen.

Ergebnisse der Klonierungsexperimente und der Mikroskopie des Isolates HK 3z31c weisen auf eine Planctomycetales-Population in den Schwämmen hin. Aus *Haliclona valliculata* aus dem Mittelmeer konnten Klonsequenzen gewonnen werden, deren nächste verwandte Sequenzen aus der Gattung *Pirellula* stammen. Planctomycetales sind mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung bereits in Schwämmen nachgewiesen worden, jedoch konnten die Ergebnisse bisher weder durch Klonierungen bestätigt werden noch wurden Vertreter der Gruppe aus Schwämmen isoliert. Die vorliegende Arbeit könnte ein erster wichtiger Schritt in der Untersuchung von Planctomycetales aus Schwämmen darstellen, da höchstwahrscheinlich eine Anzahl nicht eindeutig identifizierter Isolate Vertreter dieser ursprünglich als Süßwasser-Bewohner angesehen, in jüngster Zeit aber vermehrt auch in marinen Lebensräumen nachgewiesenen Gruppe zuzuordnen sind.

Literaturverzeichnis

- Abel, E., Kohlmeyer, J., Kusel, H., Matthes, D., Riedl, R., Rossi, L., von Salvini-Plawen, L. und Sará, M. (1983). *Fauna und Flora des Mittelmeeres*. (Hrsg. Riedl, R.) Verlag Paul Parey, Hamburg.
- Althoff, K., Schütt, C., Steffen, R., Batel, R. und Müller, W. E. G. (1998). Evidence for a symbiosis between bacteria of the genus *Rhodobacter* and the marine sponge *Halichondria panicea*: Harbor also for putatively toxic bacteria? *Mar. Biol.* **130**, 529-536.
- Amade, P., Charroin, C., Baby, C. und Vacelet, J. (1987). Antimicrobial activities of marine sponges from the Mediterranean Sea. *Mar. Biol.* **94**, 271-275.
- Amade, Ph., Pesundo, D. und Chevolut, L. (1982). Antimicrobial activities of marine sponges from French Polynesia and Brittany. *Mar. Biol.* **70**, 223-228.
- Amann, R. I., Krumholz, L. und Stahl, D. A. (1990). Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* **172**, 762-770.
- Amann, R. I., Ludwig, W. und Schleifer, K.-H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**, 143-169.
- Anderson, A. S. und Wellington, E. M. H. (2001) The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 797-814.
- Barthel, D. (1985) Experimentelle Untersuchungen zur Ökologie von *Halichondria panicea* (Porifera) aus der Nord- und Ostsee. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. DISSERTATION, 1-138.
- Becerro, M. A., Lopez, N. I., Turon, X. und Uriz, M. J. (1994). Antimicrobial activity and surface bacterial film in marine sponges. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **179**, 195-205.
- Bernan, U. S. (1996). Marine microorganisms: A resource for the discovery of novel bioactive metabolites. In: *Proceedings from the US-EC Workshop on Marine Microorganisms, Brussels, Belgium, 1996*. (Hrsg. European Commission) 75-85. Directorate-General, Science, Research and Development.
- Bernan, V. S., Montenegro, D. A., Korshalla, J. D., Maiese, W. M., Steinberg, D. A. und Greenstein, M. (1994). Bioxalomycins, new antibiotics produced by the marine *Streptomyces* sp. LL-31F508: Taxonomy and fermentation. *J. Antibiot.* **47**, 1417-1424.
- Bewley, C. A., Holland, N. D. und Faulkner, D. J. (1996). Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts. *Experientia* **52**, 716-722.
- Biabani, M. A. F., Baake, M., Lovisetto, B., Laatsch, H., Helmke, E. und Weyland, H. (1998). Anthranilamides: New antimicrobial active substances from a marine *Streptomyces* sp.. *J. Antibiot.* **51**, 333-340.

- Biabani, M. A. F., Laatsch, H., Helmke, E. und Weyland, H. (1997). δ -Indomycinone: A new member of pluramycin class of antibiotics isolated from marine *Streptomyces* sp.. *J. Antibiot.* **50**, 874-877.
- Blümel, M. (2001) Bakterien als Tracerorganismen für Wassermassen. Molekularbiologische Untersuchungen zur bakteriellen Diversität im östlichen Mittelmeer. DIPLOMARBEIT, 1-88.
- Bond, P. L., Erhart, R., Wagner, M., Keller, J. und Blackall, L. L. (1999). Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and nonefficient biological phosphorus removal activated sludge systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4077-4084.
- Brown, B. J. und Leff, L. G. (1996). Comparison of fatty acid methyl ester analysis with the use of API 20E and NFT strips for identification of aquatic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2183-2185.
- Bultel-Poncé, V., Berge, J.-P., Debitus, C., Nicolas, J.-L. und Guyot, M. (1999). Metabolites from the sponge-associated bacterium *Pseudomonas* species. *Mar. Biotechnol.* **1**, 384-390.
- Bultel-Poncé, V., Debitus, C., Berge, J.-P., Cerceau, C. und Guyot, M. (1998). Metabolites from the sponge-associated bacterium *Micrococcus luteus*. *J. Mar. Biotechnol.* **6**, 233-236.
- Campbell, N. A. (1997). Gentechnologie . In: *Biologie*. (Hrsg. J. Markl) 401-429. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Cerrano, C., Arillo, A., Bavestrello, G., Calciani, B., Cattaneo-Vietti, R., Penna, A., Sará, M. und Totti, C. (2000). Diatom invasion in the antarctic hexactinellid sponge *Scolymastra joubini*. *Polar Biol.* **23**, 441-444.
- Ciminiello, P., Dell`Aversano, C., Fattorusso, E., Magno, S. und Pansini, M. (1999). Chemistry of verongida sponges. 9. Secondary metabolite composition of the caribbean sponge *Aplysina cauliformis*. *J. Nat. Prod.* **62**, 590-593.
- Collins, M. D. (1991). The genus *Brevibacterium*. In: *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. Vol. 2. (Hrsg. A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K.-H. Schleifer) 1351-1354. Springer Verlag, New York.
- Collins, M. D. und Bradbury, J. F. (1991). The genera *Agromyces*, *Aureobacterium*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, and *Microbacterium*. In: *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. Vol. 2. (Hrsg. A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K.-H. Schleifer) 1355-1368. Springer Verlag, New York.
- Colquhoun, J. A., Heald, S. C., Li, L., Tamaoka, J., Kato, C., Horikoshi, K. und Bull, A. T. (1998). Taxonomy and biotransformation activities of some deep-sea actinomycetes. *Extremophiles* **2**, 269-277.
- Cottrell, M. T. und Kirchman, D. L. (2000). Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence *in situ* hybridisation. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5116-5122.

- Cross, T. (1981). Aquatic actinomycetes: A critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. *J. Appl. Bacteriol.* **50**, 397-423.
- Cross, T. (1982). Actinomycetes: A continuing source of new metabolites. *Dev. In. Microbiol.* **23**, 1-18.
- De Vos, L., Rützler, K., Boury-Esnault, N., Donadey, C. und Vacelet, J. (1991). *Atlas of Sponge Morphology*. Smithsonian Institution Press, Washington.
- Debitus, C., Guella, G., Mancini, I., Waikedre, J., Guemas, J.-P., Nicolas, J.-L. und Pietra, F. (1998). Quinolones from a bacterium and tyrosine metabolites from its host sponge, *Suberea creba* from the Coral Sea. *J. Mar. Biotechnol.* **6**, 136-141.
- Drews, G. (1983). *Mikrobiologisches Praktikum*. Springer Verlag, Berlin.
- Ellaiah, P., Kalyan, D., Rao, V. S. V. und Rao, B. V. L. N. (1996). Isolation and characterisation of bioactive actinomycetes from marine sediments. *Hindustan Antibot. Bull.* **38**, 48-52.
- Ensign, J. C. (1991). Introduction to the actinomycetes. In: *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. Vol. 2. (Hrsg. A. Bawllows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K.-H. Schleifer) 811-815. Springer Verlag, New York.
- Felsenstein, J. (1993) PHYLIP Phylogeny Interference Package. Version 3.572c. Seattle, Department of Genetics, University of Washington.
- Fenical, W. (1996). Evaluation of the microbial associations with marine plants and animals: A strategy for the discovery of new biomedical agents. In: *Proceedings from the US-EC Workshop on Marine Microorganisms, Brussels, Belgium, 1996*. (Hrsg. European Commission) 99. Directorate-General, Science, Research and Development.
- Flowers, A. E., Garson, M. J., Webb, R. I., Dumdei, E. J. und Charan, R. D. (1998). Cellular origin of chlorinated diketopiperazines in the dictyoceratid sponge *Dysidea herbacea* (Keller). *Cell Tissue Res.* **292**, 597-607.
- Friedrich, A. B., Merkert, H., Fendert, T., Hacker, J., Proksch, P. und Hentschel, U. (1999). Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernicola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Mar. Biol.* **134**, 461-470.
- Frøhlich, H. und Barthel, D. (1997). Silica uptake of the marine sponge *Halichondria panicea* in Kiel Bight. *Mar. Biol.* **128**, 115-125.
- Fuerst, J. A. (1995). The planctomycetes: emerging models for microbial ecology, evolution and cell biology. *Microbiology* **141**, 1493-1506.
- Fuerst, J. A., Gwilliam, H. G., Lindsay, M., Lichanska, A., Belcher, C., Vickers, J. E., Hugenholtz, P. (1997). Isolation and molecular identification of planctomycete bacteria from postlarvae of the Giant Tiger Prawn, *Penaeus monodon*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 254-262.

- Garrity, G. M. (Hrsg.) (2001). The archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Springer Verlag, New York.
- Garson, M. J., Flowers, A. E., Webb, R. I., Charan, R. D. und McCaffrey, E. J. (1998). A sponge/dinoflagellate association in the haplosclerid sponge *Haliclona* sp.: Cellular origin of cytotoxic alkaloids by Percoll density gradient fractionation. *Cell Tissue Res.* **293**, 365-373.
- Genilloud, O., Pelaez, F., Gonzales, I. und Diez, M. T. (1994). Diversity of actinomycetes and fungi on seaweeds from the Iberian Sea. *Microbiologia* **10**, 413-422.
- Gillor, O., Carmeli, S., Rahamim, Y., Fishelson, Z. und Ilan, M. (2000). Immunolocalization of the toxin Latrunculin B within the Red Sea sponge *Negombata magnifica* (Demospongiae, Latrunculiidae). *Mar. Biotechnol.* **2**, 213-223.
- Giovannoni, S. und Rappé, M. (2000). Evolution, diversity, and molecular ecology of marine prokaryotes. In: *Microbial Ecology of the Oceans*. (Hrsg. D. L. Kirchmann) 47-84. Wiley-Liss Inc., New York.
- Glöckner, F. O., Amann, R., Alfreider, A., Pernthaler, J., Psenner, R., Trebesius, K. und Schleifer, K.-H. (1996). An *in situ* hybridisation protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *System. Appl. Microbiol.* **19**, 403-406.
- Glöckner, F. O., Fuchs, B. M. und Amann, R. (1999). Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: A first comparison based on fluorescence *in situ* hybridisation. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3721-3726.
- Glöckner, F. O., Zaichikov, E., Belkova, N., Denissova, L., Pernthaler, J., Pernthaler, A. und Amann, R. (2000). Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5053-5065.
- Goodfellow, M. (1991). The family *Nocardiaceae*. In: *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. Vol. 3. (Hrsg. A. Bawlow, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K.-H. Schleifer) 1188-1213. Springer Verlag, New York.
- Goodfellow, M. und Haynes, J. A. (1984). Actinomycetes in marine sediments. In: *Biological, biochemical and biomedical aspects of actinomycetes*. (Hrsg. L. Ortiz-Ortiz, L. F. Bojalil und V. Yakoleff) 453-472. Academic Press, Orlando, Florida.
- Goodfellow, M. und O'Donnell, A. G. (1989). Search and discovery of industrially-significant actinomycetes. In: *Microbial products: new approaches*. (Hrsg. S. Baumberg, M. Rhodes und I. Hunter) 343-383. Cambridge University Press, Cambridge.
- Goodfellow, M. und Williams, S. T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**, 189-216.

- Gripenburg, U., Ward-Rainey, N., Mohamed, S., Schlesner, H., Marxsen, H., Rainey, F. A., Stackebrandt, E. und Auling, G. (1999). Phylogenetic diversity, polyamine pattern and DNA base composition of members of the order *Planctomycetales*. *Internat. J. Sytem. Bacteriol.* **49**, 689-696.
- Gunn, B. A., Singleton, F. L., Peele, E. R. und Colwell, R. R. (1982). A note on the isolation and enumeration of Gram positive cocci from marine and estuarine waters. *J. Appl. Bacteriol.* **53**, 127-129.
- Hall, T. (1997) BIOEDIT. Version 5.0.9. Department of Microbiology, North Carolina State University.
- Hallock, Y. F., Cardellina, J. H. I., Balaschak, M. S., Alexander, M. R., Prather, T. R., Shoemaker, R. H. und Boyd, M. R. (1995). Antitumor activity and stereochemistry of acetylenic alcohols from the sponge *Cribrochalina vasculum*. *J. Nat. Prod.* **58**, 1801-1807.
- Hartmans, S. und De Bont, J. A. M. (1991). The genus *Mycobacterium* - Nonmedical. In: *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. Vol. 3. (Hrsg. A. Bawlow, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K.-H. Schleifer) 1214-1237. Springer Verlag, New York.
- Helmke, E. (1981). Growth of actinomycetes from marine and terrestrial origin under increased hydrostatic pressure. In: *Actinomycetes*. (Hrsg. K. P. Schaal und G. Pulverer) 321-327. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Henrikson, A. A. und Pawlik, J. R. (1995). A new antifouling assay method: results from field experiments using extracts of four marine organisms. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **194**, 157-165.
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K. und Wellington, E. M. H. (1997). Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3233-3241.
- Hotta, K., Okami, Y. und Umezawa, H. (1980b). Studies on new aminoglycoside antibiotics, Istamycins, from an actinomycete isolated from a marine environment. II. Possible involvement of plasmid in Istamycin production. *J. Antibiot.* **33**, 1510-1514.
- Hotta, K., Saito, N. und Okami, Y. (1980a). Studies on new aminoglycoside antibiotics, Istamycins, from an actinomycete isolated from a marine environment. *J. Antibiot.* **33**, 1502-1514.
- Hunter, J. C., Eveleigh, D. E. und Casella, G. (1981). Actinomycetes of a salt marsh. In: *Actinomycetes*. (Hrsg. K. P. Schaal und G. Pulverer) 195-200. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Imamura, N., Nishijima, M., Adachi, K. und Sano, H. (1993). Novel antimycin antibiotics, Urauchimycins A and B, produced by marine actinomycete. *J. Antibiot.* **46**, 241-246.
- Imhoff, J. F. (2001). True marine and halophilic anoxygenic phototrophic bacteria. *Arch. Microbiol.* **176**, 243-254.

- Imhoff, J. F. und Trüper, H. G. (1976). Marine sponges as habitats of anaerobic phototrophic bacteria. *Microbial Ecol.* **3**, 1-9.
- Ivanova, E. P., Nicolau, D. V., Yumoto, N., Taguchi, T., Okamoto, K., Tatsu, Y. und Yoshikawa, S. (1998). Impact of conditions of cultivation and adsorption on antimicrobial activity of marine bacteria. *Mar. Biol.* **130**, 545-551.
- Jayatilake, G. S., Thornton, M. P., Leonard, A. C., Grimwade, J. E. und Baker, B. J. (1996). Metabolites from an antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Nat. Prod.* **59**, 293-296.
- Jensen, P. R., Dwight, R. und Fenical, W. (1991). Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1102-1108.
- Jones, D. und Keddie, R. M. (1991). The genus *Arthrobacter*. In: *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. Vol. 2. (Hrsg. A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K.-H. Schleifer) 1283-1299. Springer Verlag, New York.
- Jukes, T. H. und Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. In: *Mammalian protein metabolism*. (Hrsg. H. N. Munro) 21-132. Academic, New York.
- Junge, K., Gosink, J. J., Hoppe, H.-G. und Staley, J. T. (1998). *Arthrobacter*, *Brachybacterium* and *Planococcus* isolates identified from antarctic sea ice brine. Description of *Planococcus mcmeekinii*, sp. nov.. *System. Appl. Microbiol.* **21**, 306-314.
- Kawano, Y., Nagawa, Y., Nakanishi, H., Nakajima, H., Matsuo, M. und Higashihara, T. (1997). Production of thiotropocin by a marine bacterium, *Caulobacter* sp. and its antimicrobial activities. *J. Mar. Biotechnol.* **5**, 225-229.
- Kell, D. B. und Kaprelyants, A. S. (1996). Are many microbial secondary metabolites really pheromones with important physiological functions, a knowledge of which could guide discovery programmes? Dormancy, differentiation, social resuscitation and pheromone production in nonsporulating bacteria. In: *Proceedings from the US-EC Workshop on Marine Microorganisms, Brussels, Belgium, 1996*. (Hrsg. European Commission) 87-98. Directorate-General, Science, Research and Development.
- Kerger, B. D., Mancuso, C. A., Nichols, P. D., White, D. C., Langworthy, T., Sittig, M., Schlesner, H. und Hirsch, P. (1988) The budding bacteria, *Pirellula* and *Planctomyces*, with atypical 16S rRNA and absence of peptidoglycan, show eubacterial phospholipids and uniquely high proportions of long chain beta-hydroxy fatty acids in the lipopolysaccharide lipid A. *Arch. Microbiol.* **149**, 255-260.
- Kitagawa, I. (1988). Studies in marine pharmaceutical chemistry research in Japanese universities. In: *Pharmaceuticals and the Sea*. (Hrsg. C. W. Jefford, K. L. Rinehart und L. S. Shield) 55-71. Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster.

- Knibb, W., Colorni, A., Ankaoua, M., Lindell, D., Diamant, A. und Gordin, H. (1993). Detection and identification of a pathogenic marine mycobacterium from the european seabass *Dicentrarchus labrax* using polymerase chain reaction and direct sequencing of 16S rDNA sequences. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **2**, 225-232.
- Kobayashi, J., Nakamura, H., Ohizumi, Y., Kobayashi, M. und Hirata, Y. (1988). Research on marine natural products at the Mitsubishi-Kasei Institute of Life Sciences. In: *Pharmaceuticals and the Sea*. (Hrsg. C. W. Jefford, K. L. Rinehart und L. S. Shield) 73-78. Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster.
- Kocur, M., Kloos, W. E. und Schleifer, K.-H. (1991). The genus *Micrococcus*. In: *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. Vol. 2. (Hrsg. A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K.-H. Schleifer) 1300-1311. Springer Verlag, New York.
- Koie, M. und Kristiansen, A. (2001). *Der große Kosmos Strandführer. Tiere und Pflanzen in Nord- und Ostsee*. Franckh-Kosmos Verlags-GmbH & Co., Stuttgart.
- Korn-Wendisch, F. und Kutzner, H. J. (1991). The family *Streptomycetaceae*. In: *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. Vol. 2. (Hrsg. A. Bawlow, H. G. Trüper, M. Dworkin und K.-H. Schleifer) 921-995. Springer Verlag, New York.
- Küster, E. und Neumeier, W. (1981). Halotolerance in some streptomycetes producing tetracyclines. In: *Actinomycetes*. (Hrsg. P. Schaal und G. Pulverer) 315-319. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Lauer, A. (2001) Diversität und Dynamik nitratreduzierender und denitrifizierender Bakteriengruppen eines Ackerbodens. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. DISSERTATION, 1-199.
- Lee, H. K., Lee, D.-S., Lim, J., Kim, J. S., Im, K. S. und Jung, J. H. (1998). Topoisomerase I inhibitors from the *Streptomyces* sp. strain KM86-9B isolated from a marine sponge. *Arch. Pharm. Res.* **21**, 729-733.
- Leitch, A. R., Schwarzacher, T., Jackson, D. und Leitch, I. J. (1994). *In situ-Hybridisierung*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Li, H., Matsunaga, S. und Fusetani, N. (1995). Halicylindramides A-C, antifungal and cytotoxic depsipeptides from the marine sponge *Halichondria cylindrata*. *J. Med. Chem.* **38**, 338-343.
- Li, H., Matsunaga, S. und Fusetani, N. (1996). Halicylindramides D and E, antifungal peptides from the marine sponge *Halichondria cylindrata*. *J. Nat. Prod.* **59**, 163-166.
- Liebl, W. (1991). The genus *Corynebacterium* - Nonmedical. In: *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. Vol. 2. (Hrsg. A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K.-H. Schleifer) 1157-1171. Springer Verlag, New York.
- Lindsay, M., Webb, R. I. Fuerst, J. A. (1997). Pirellosomes: a new type of membrane-bounded cell compartment in planctomycete bacteria of the genus *Pirellula*. *Microbiology* **143**, 739-748.

- Longley, R. E., McConnell, O. J., Essich, E. und Harmody, D. (1993). Evaluation of marine sponge metabolites for cytotoxicity and signal transduction activity. *J. Nat. Prod.* **56**, 915-920.
- Luther, W. und Fiedler, K. (1961). *Die Unterwasserfauna der Mittelmeerküsten*. Verlag Paul Parey, Hamburg.
- Lüttge, U., Kluge, M. und Bauer, G. (1989). *Botanik*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- MacLeod, R. A. (1968). On the role of inorganic ions in the physiology of marine bacteria. *Adv. Microbiol. Sea* **1**, 95-126.
- Madri, P. P., Hermel, M. und Claus, G. (1971). The microbial flora of the sponge *Microcionia prolifera* VERRILL and its ecological implications. *Bot. Mar.* **14**, 1-5.
- Marin, A., López, M. D., Esteban, M. A., Meseguer, J., Muñoz, J. und Fontana, A. (1998). Anatomical and ultrastructural studies of chemical defence in the sponge *Dysidea fragilis*. *Mar. Biol.* **131**, 639-645.
- Mather, P. und Bennett, I. (Hrsg.) (1993). Phylum Porifera. Sponges. In: *A Coral Reef Handbook*. 35-46. Surrey Beatty & Sons, Chipping Norton.
- Matsunaga, S., Fusetani, N. und Konosu, S. (1985). Bioactive marine metabolites, IV. Isolation and the amino acid composition of Discodermin A, an antimicrobial peptide, from the marine sponge *Discodermia kiiensis*. *J. Nat. Prod.* **48**, 236-241.
- McCaffrey, E. J. und Endean, R. (1985). Antimicrobial activity of tropical and subtropical sponges. *Mar. Biol.* **89**, 1-8.
- Miao, S. und Andersen, R. J. (1990). Cytotoxic metabolites from the sponge *Ianthella basta* collected in Papua New Guinea. *J. Nat. Prod.* **53**, 1441-1446.
- Minale, L. (1988). Marine natural products research at laboratories in Naples, Italy. In: *Pharmaceuticals and the Sea*. (Hrsg. C. W. Jefford, K. L. Rinehart und L. S. Shield) 83-93. Technomic Publishing Co.Inc., Lancaster.
- Minnikin, D. E. und Goodfellow, M. (1981). Lipids in the classification of actinomycetes. In: *Actinomycetes*. (Hrsg. K. P. Schaal und G. Pulverer) 99-109. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Moore, B. S. (1999). Biosynthesis of marine natural products: Microorganisms and macroalgae. *Nat. Prod. Rep.* **16**, 653-674.
- Moran, M. A., Rutherford, L. T. und Hodson, R. E. (1995). Evidence for indigenous *Streptomyces* populations in a marine environment determined with a 16S rRNA probe. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3695-3700.
- Müller, W. E. G. (1999). 16S rRNA sequences as diagnostic tools to elucidate potential symbiotic relationships between bacteria and the marine sponge *Halichondria panicea*: reply to Stackebrandt and Pukall (*Mar. Biol.* 133: 159-161). *Mar. Biol.* **134**, 213-215.

- Müller, W. E. G. und Schröder, H. C. (1997). Bioaktive Substanzen aus Schwämmen: Gene weisen den Weg bei der Suche nach neuen Arzneimitteln. *Biologie in unserer Zeit* **6**, 389-398.
- Müller, W. E. G., Wimmer, W., Schatton, W., Böhm, M., Batel, R. und Filic, Z. (1999). Initiation of an aquaculture of sponges for the sustainable production of bioactive metabolites in open systems: Example, *Geodia cydonium*. *Mar. Biotechnol.* **1**, 569-579.
- Müller, W. E. G., Zahn, R. K., Kurelec, B., Lucu, C., Müller, I. und Uhlenbruck, G. (1981). Lectin, a possible basis for symbiosis between bacteria and sponges. *J. Bacteriol.* **145**, 548-558.
- Mullis, K. B., Faloona, F. A., Scharf, S., Saiki, R. K., Horn, G. und Erlich, H. A. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*.
- Murakami, Y., Oshima, Y. und Yasumoto, T. (1982). Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **48**, 69-72.
- Muricy, G., Hajdu, E., Araujo, F. V. und Hagler, A. N. (1993). Antimicrobial activity of Southwest Atlantic shallow-water marine sponges (Porifera). *Scienti Marina* **57**, 427-432.
- Muyzer, G. und 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.
- Muyzer, G., De Wall, E. C. und Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 695-700.
- Muyzer, G., Teske, A., Wirsén, C. O. und Jannasch, H. W. (1995). Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent-samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch. Microbiol.* **164**, 165-172.
- Myers, P. (1998) Phylum Porifera. University of Michigan Museum of Zoology. <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/porifera.html>
- Nagle, D. G., McClatchey, W. C. und Gerwick, W. H. (1992). New glycosphingolipids from the marine sponge *Halichondria panicea*. *J. Nat. Prod.* **55**, 1013-1017.
- Nolan, R. D. und Cross, T. (1988). Isolation and screening of actinomycetes. In: *Actinomycetes in Biotechnology*. (Hrsg. M. Goodfellow, S. T. Williams und M. Mordarski) 1-32. Academic Press, San Diego.
- Oberzill, W. (1967). *Mikrobiologische Analytik: Grundlagen der quantitativen Erfassung von Umwelteinwirkungen auf Mikroorganismen*. Hans Carl Verlag, Nürnberg.
- Oka, N., Hartel, P. G., Finlay-Moore, O., Gagliardi, J., Zuberer, D. A., Fuhrmann, J. J., Angle, J. S. und Skipper, H. D. (2000). Misidentification of soil bacteria by fatty acid methyl ester (FAME) and BIOLOG analyses. *Biol. Fertil Soils* **32**, 256-258.

- Okami, Y. (1979). Antibiotics from marine microorganisms with reference to plasmid involvement. *J. Nat. Prod.* **42**, 583-595.
- Okami, Y. und Okazaki, T. (1974). Studies on marine microorganisms. III. Transport of spores of actinomycete into shallow sea mud and the effect of salt and temperature on their survival. *J. Antibiot.* **27**, 240-247.
- Okami, Y. und Okazaki, T. (1978). Actinomycetes in marine environments. *Nocardia* and *Streptomyces*. In: *Proceedings from the International Symposium on Nocardia and Streptomyces, Warsaw, 1976*. (Hrsg. M. Mordarski, W. Kurylowics und J. Jeljaszewicz) 145-151. Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart.
- Okazaki, T. und Okami, Y. (1972). Studies on marine microorganisms. II. Actinomycetes in Sagami Bay and their antibiotic substances. *J. Antibiot.* **25**, 461-466.
- Okazaki, T. und Okami, Y. (1976). Studies on actinomycetes isolated from shallow sea and their antibiotic substances. In: *Actinomycetes - the boundary microorganisms*. (Hrsg. T. Arai) 123-161. Toppan Co Ltd., Tokyo.
- Olafsen, J. A. (1996). Interactions between hosts and bacteria in aquaculture. In: *Proceedings from the US-EC Workshop on Marine Microorganisms, Brussels, Belgium, 1996*. (Hrsg. European Commission) 127-145. Directorate-General, Science, Research and Development.
- Oppenheimer, C. H. und Zobell, C. E. (1952). The growth and viability of sixty-three species of marine bacteria is influenced by hydrostatic pressure. *J. Mar. Res.* **11**, 10-18.
- Osinga, R., Tramper, J. und Wijffels, H. (1999). Cultivation of marine sponges. *Mar. Biotechnol.* **1**, 509-532.
- Page, R. D. M. (1996). TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in Biosciences* **12**, 357-358.
- Pernthaler, J., Posch, T., Simek, K., Vrba, J., Pernthaler, A., Glöckner, F. O., Nübel, U., Psenner, R., and Amann, R. (2001). Predator-specific enrichment of actinobacteria from a cosmopolitan freshwater clade in mixed continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2145-2155.
- Petri, R. und Imhoff, J. F. (2001). Genetic analysis of sea-ice bacterial communities of the Western Baltic Sea using an improved double gradient method. *Polar Biology* **24**, 252-257.
- Pinhassi, J., Zweifel, U. L. und Hagström, Å. (1997). Dominant marine bacterioplankton species found among colony-forming bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3359-3366.
- Preston, C. M., Ying Wu, K., Molinski, T. F. und DeLong, E. F. (1996). A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. nov.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6241-6246.
- Priscu, J. C., Adams, E. E., Lyons, W. B., Voytek, M. A., Mogk, D. W., Brown, R. L., McKay, C. P., Takacs, C. D., Welch, K. A., Wolf, C. F., Kirshtein, J. D. und Avcı, R. (1999). Geomicrobiology of subglacial ice above Lake Vostok, Antarctica. *Science* **286**, 2141-2144.

- Pusecker, K., Laatsch, H., Helmke, E. und Weyland, H. (1997). Dihydrophencomycin Methyl Ester, a new phenazine derivative from a marine streptomycete. *J. Antibiot.* **50**, 479-483.
- Ravel, J., Amoroso, M. J., Colwell, R. R. und Hill, R. T. (1998). Mercury-resistant actinomycetes from the Chesapeake Bay. *FEMS Microbiol. Lett.* **162**, 177-184.
- Redaktion Ärzte Zeitung. (2001) Bakterien in Meeresschwämmen könnten Quelle für Antibiotika sein. Ärzte Zeitung Online. www.aerztezeitung.de/
- Redaktion Geo Wissen. (1999) Die blaue Apotheke. *Geo Wissen* **9**, 174-174.
- Regoli, F., Cerrano, C., Chierici, E., Bompadre, S. und Bavestrello, G. (2000). Susceptibility to oxidative stress of the mediterranean demosponge *Petrosia ficiformis*: Role of endosymbionts and solar irradiance. *Mar. Biol.* **137**, 453-461.
- Reichardt, W. (1978). *Einführung in die Methoden der Gewässermikrobiologie*. Fischer Verlag, Stuttgart.
- Rheims, H., Spröer, C., Rainey, F. A. und Stackebrandt, E. (1996). Molecular biological evidence for the occurrence of uncultured members of the actinomycete line of decent in different environments and geographical locations. *Microbiology* **142**, 2863-2870.
- Riedl, R. (Hrsg.) (1983) *Fauna und Flora des Mittelmeeres*. Verlag Paul Parey, Hamburg.
Diese Quelle ist unter Abel *et al.* vollständig angegeben.
- Ritchie, N. J., Schutter, M. E., Dick, R. P. und Myrold, D. D. (2000). Use of length heterogeneity PCR and fatty acid methyl ester profiles to characterize microbial communities in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1668-1675.
- Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W. und Schleifer, K.-H. (1994d). *In situ* probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology* **140**, 2849-2858.
- Romero, F., Espliego, F., Pèrez Baz, J., de Quesada, T. G., Gràvalos, D., de la Calle, F. und Fernández-Puentes, J. L. (1997). Thiocoraline, a new depsipeptide with antitumor activity produced by a marine *Micromonospora*. I. Taxonomy, fermentation, isolation, and biological activities. *J. Antibiot.* **50**, 734-737.
- Rudi, A. und Kashman, Y. (1993). Three new cytotoxic metabolites from the marine sponge *Plakortis halichondrioides*. *J. Nat. Prod.* **56**, 1827-1830.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Santavy, D. L. und Colwell, R. R. (1990). Comparison of bacterial communities associated with the caribbean sclerosponge *Ceratoporella nicholsoni* and ambient seawater. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **67**, 73-82.
- Santavy, D. L., Willenz, P. und Colwell, R. R. (1990). Phenotypic study of bacteria associated with the caribbean sclerosponge, *Ceratoporella nicholsoni*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1750-1762.

- Sará, M. (1971). Ultrastructural aspects of the symbiosis between two species of the genus *Aphanocapsa* (Cyanophyceae) and *Ircinia variabilis* (Demospongiae). *Mar. Biol.* **11**, 214-221.
- Sauer, F. (1991). *Meerespflanzen, Meerestiere nach Farbfotos erkannt*. Fauna Verlag, Karlsfeld.
- Schaal, K. P. (1991). The genera *Actinomyces*, *Arcanobacterium*, and *Rothia*. In: *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. Vol. 2. (Hrsg. A. Bawlow, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K.-H. Schleifer) 850-905. Springer Verlag, New York.
- Schlegel, H. G. (1992). *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Schleifer, K.-H. (1986). Family I Micrococcaceae. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. (Hrsg. P. H. A. Sneath) 1003-1035. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Schmidt, E. W., Obratsova, A. Y., Davidson, S. K., Faulkner, D. J., and Haygood, M. G. (2000). Identification of the antifungal peptide-containing symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei* as a novel δ -proteobacterium, "*Candidatus* Entotheonella palauensis". *Mar. Biol.* **136**, 969-977.
- Schönberg, C. (1993) Die Ausbildung des mineralischen Skeletts bei dem Schwamm *Halichondria panicea* Pallas unter saisonalen und regionalen Aspekten. Carl von Ossietzky Universität Oldenburg. DIPLOMARBEIT, 1-117.
- Schupp, P., Eder, C., Paul, V. und Proksch, P. (1999). Distribution of secondary metabolites in the sponge *Oceanapia* sp. and its ecological implications. *Mar. Biol.* **135**, 573-580.
- Scott, R. H., Whymant, A. D., Foster, A., Gordon, K. H., Milne, B. F. und Jaspars, M. (2000). Analysis of the structure and electrophysiological actions of Halitoxins: 1,3 alkyl-pyridinium salts from *Callyspongia ridleyi*. *J. Membrane Biol.* **176**, 119-131.
- Shieh, W. Y. und Lin, Y. M. (1994). Association of heterotrophic nitrogen-fixing bacteria with a marine sponge of *Halichondria* sp. *Bull. Mar. Sci.* **54**, 557-564.
- Simpson, T. L. (1984). *The cell biology of sponges*. Springer-Verlag, New York.
- Stierle, A. C., Cardellina, J. H. und Singleton, F. L. (1988). A marine *Micrococcus* produces metabolites ascribed to the sponge *Tedania ignis*. *Experientia* **44**, 1021-1021.
- Süling, J. und Petri, R. (1998) Molekularbiologische Methoden der bakteriellen Diversitätsanalyse im Tiefenprofil der Station Bocknis Eck unter besonderer Berücksichtigung der *Cytophaga/Flavobacterium*-Gruppe. PRAKTIKUMS-SKRIPT
- Swearingen III, D. C. und Pawlik, J. R. (1998). Variability in the chemical defense of the sponge *Chondrilla nucula* against predatory reef fishes. *Mar. Biol.* **131**, 619-627.
- Symbiosponge. (2001) About SYMBIOSPONGE.
www-zma.bio.uva.nl/departments/coel/symbiosponge/web/about/about.html

- Takahashi, A., Kurasawa, S., Ikeda, D., Okami, Y. und Takeuchi, T. (1989). Altemicidin, a new acaricidal and antitumor substance. 1. Taxonomy, fermentation, isolation and physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* **42**, 1556-1561.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. und Gibson, T. J. (1994). ClustalW: 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.
- Turon, X., Becerro, M. A. und Uriz, M. J. (2000). Distribution of brominated compounds within the sponge *Aplysina aerophoba*: Coupling of X-ray microanalysis with cryofixation techniques. *Cell. Tissue Res.* **301**, 311-322.
- Unson, M. D., Holland, N. D. und Faulkner, D. J. (1994). A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue. *Mar. Biol.* **119**, 1-11.
- Urban, S. and Capon, R. J. (1992). 5-Epi-Isospongiaquinone, a new sesquiterpene/quinone antibiotic from an Australian marine sponge, *Spongia hispida*. *J. Nat. Prod.* **55**, 1638-1642.
- Uriz, M. J., Martin, D., Turon, X., Ballesteros, E., Hughes, R. und Acebal, C. (2001). An approach to the ecological significance of chemically mediated bioactivity in Mediterranean benthic communities. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **70**, 175-188.
- Vacelet, J. und Donadey, C. (1977). Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **30**, 301-314.
- Vobis, G. (1991). The genus *Actinoplanes* and Related Genera. In: *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. Vol. 3. (Hrsg. A. Bawlow, H. G. Trüper, M. Dworkin und K.-H. Schleifer) 1029-1060. Springer Verlag, New York.
- von Sengbusch, P. (1999) Pyrrhophyta oder Dinophyta (Dinoflagellaten). Botanik an der Universität Hamburg. http://www.rz.uni-hamburg.de/biologie/b_online/d44/44f.htm
- Wapstra, M. und van Soest, R. W. M. (1987). Sexual reproduction, larval morphology and behaviour in demosponges from the southwest of the Netherlands. In: *Taxonomy of Porifera from the N.E. Atlantik and Mediterranean Sea*. (Hrsg. J. Vacelet und N. Boury-Esnault) 281-307. Springer-Verlag, Berlin.
- Webster, N. S. PERSÖNLICHE MITTEILUNG betreffend Planctomyceten in *Rhopaloeides odorabile*.
- Webster, N. S. und Hill, R. T. (2001). The culturable microbial community of the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile* is dominated by an α -Proteobacterium. *Mar. Biol.* **138**, 843-851.
- Webster, N. S., Wilson, K. J., Blackall, L. L. und Hill, R. T. (2001). Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 434-444.

- Westphal, K. (1988) Einfluss der im Schwamm *Halichondria panicea* vorkommenden Algen auf Wachstum und Stoffwechsel. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. DIPLOMARBEIT, 1-124.
- Weyland, H. (1981a). Distribution of actinomycetes on the sea floor. In: *Actinomycetes*. (Hrsg. K. P. Schaal und G. Pulverer) 185-193. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Weyland, H. (1981b). Characteristics of actinomycetes isolated from marine sediments. In: *Actinomycetes*. (Hrsg. K. P. Schaal und G. Pulverer) 309-314. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Wilkinson, C. R. (1978a). Microbial associations in sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. *Mar. Biol.* **49**, 161-167.
- Wilkinson, C. R. (1978b). Microbial associations in sponges. II. Numerical analysis of sponge and water bacterial populations. *Mar. Biol.* **49**, 169-176.
- Wilkinson, C. R. (1978c). Microbial associations in sponges. III. Ultrastructure of the *in situ* associations in coral reef sponges. *Mar. Biol.* **49**, 177-185.
- Wilkinson, C. R., Nowak, M., Austin, B., and Colwell, R. R. (1981). Specificity of bacterial symbionts in mediterranean and Great Barrier Reef sponges. *Microb. Ecol.* **7**, 13-21.
- Witte, U. (1989) Fortpflanzung des Schwammes *Halichondria panicea* in Brackwassergebieten. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. DIPLOMARBEIT, 1-108.
- Würtz, S. (1999) Dynamik und Diversität assoziierter Bakterienpopulationen beim Brotkrumenschwamm *Halichondria panicea* (Pallas, 1766). Freie Universität Berlin. DIPLOMARBEIT, 1-85.
- Zheng, Z., Zeng, W., Huang, Y., Yang, Z., Li, J., Cai, H. und Su, W. (2001). Detection of antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan Strait, China. *FEMS Micobial Letters* 87-91.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. J. F. Imhoff möchte ich für die Vergabe und Betreuung des Themas, die angenehme Arbeitsatmosphäre, die ständige Gesprächsbereitschaft und den Freiraum bei der Gestaltung der Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. P. Schönheit danke ich für seine Bereitschaft, das Korreferat für diese Arbeit zu übernehmen.

Die Arbeit wurde im Rahmen des Projektes „Biologisch aktive Naturstoffe aus marinen Schwämmen und assoziierten Mikroorganismen“ von der Zentaris AG und dem BMBF (03F0239A) gefördert. Ich möchte mich insbesondere bei Herrn Dr. Günther von der Zentaris AG und bei den im Projekt mitwirkenden Kollegen der Arbeitsgruppen von Herrn Proksch, Herrn Bringmann und Herrn Schaumann für die gute und unkomplizierte Zusammenarbeit bedanken.

Bei Dr. Jörg Süling und Diplom-Biologin Martina Blümel und Diplom-Biologe Heiko Trautmann möchte ich mich ganz herzlich für die vielfältige Hilfe und Unterstützung am PC, am Mikroskop, an den verflixten Sequenzen, am Manuskript und an meiner Seele bedanken.

Dr. Rüdiger Stöhr danke ich für die gute Zusammenarbeit, die ständige Hilfsbereitschaft und die Einführung in die Methoden der klassischen Mikrobiologie.

Dr. Thomas Kath danke ich für die große Anteilnahme an meiner Arbeit, die vielen Anregungen und die problemlose Zusammenarbeit an unserem gemeinsamen Arbeitsplatz.

Ohne die Hilfe, die Zeit und das Wissen von Dr. Rolf Schmaljohann würde es das Kapitel Rasterelektronenmikroskopie in dieser Arbeit nicht geben. Danke.

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Mikrobielle Ökologie“, besonders bei Frank Lappe und Regine Wicher, für die Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie. Insbesondere danke ich meiner Mutter, Verena Grabowski, und meiner Tante und meinem Onkel, Angelika und Axel Glander, die mir in jeglicher Hinsicht den Rücken frei gehalten haben.

Quiero dar las gracias tambien a Jorge Aracil Romero por su apoyo, su paciencia y su amor.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit, abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer, selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Kiel,

Anhang

A 1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumine = Serumalbumin aus Rinderblut
C	Cytosin
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
Cy3	Indocarbocyanin-Farbstoff
DAPI	4',6-Diamin-2-phenylindol
ddNTP	dideoxyribonucleotid = Didesoxyribonukleotid
DG-DGGE	Doppelgradienten-DGGE
DGGE	Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese
DNA	deoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
dNTP	deoxyribonucleotid = Desoxyribonukleotid
ED	Euklidische Distanz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gravitationskraft
G	Guanin
IfM	Institut für Meereskunde an der Universität Kiel
LB	Luria-Bertani
Milli Q	über eine Millipore-Anlage hochgereinigtes Wasser
MIS	Microbial Identification System
PBS	phosphate buffered saline = phosphatgepufferte Saline
PCR	polymerase chain reaction = Polymerase Kettenreaktion
RNA	ribonucleic acid = Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute
rRNA	ribosomal ribonucleic acid = ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Sedimentationseinheit (früher Svedberg Einheit)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIMCO	sea ice microbial community = Mikrobielle Gemeinschaft des Meereises
SO	suborder = Unterordnung
SSU	small subunit = kleine Untereinheit der Ribosomen
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

A 2 Rezepte der Medien und Reagenzien

A 2.1 Rezepte der Medien

Isolation

A. Unspezifische Medien

1. Tryptose-Soja-Medium für die Probenahmen in der Ostsee im Januar 1999 und auf Elba 1999

<u>A) TSB 30-Medium. g/l</u>		<u>C) TSB 0,3-Medium. g/l</u>	
TSB-Broth	30	TSB-Broth	0,3
Aqua dest.	ad 1000 ml	Aqua dest.	ad 1000 ml
Agar	15	Agar	15
<u>B) TSB 3-Medium. g/l</u>		<u>D) TSB 0,03-Medium. g/l</u>	
TSB-Broth	3	TSB-Broth	0,03
Aqua dest.	ad 1000 ml	Aqua dest.	ad 1000 ml
Agar	15	Agar	15

Medium A bis D: pH 7,8

2. Tryptose-Soja-Medium für die Probenahmen in der Nordsee

<u>E) TSB 30-Medium. g/l</u>		<u>G) TSB 0,3-Medium. g/l</u>	
TSB-Broth	30	TSB-Broth	0,3
künstliches Meerwasser	ad 1000 ml	künstliches Meerwasser	ad 1000 ml
Agar	15	Agar	15
<u>F) TSB 3-Medium. g/l</u>		<u>H) TSB 0,03-Medium. g/l</u>	
TSB-Broth	3	TSB-Broth	0,03
künstliches Meerwasser	ad 1000 ml	künstliches Meerwasser	ad 1000 ml
Agar	15	Agar	15

Medium E bis H: pH 7,8

Als künstliches Meerwasser diene das HSPC 30-Medium ohne C-Quellen-Mix (siehe Punkt 4).

3. Tryptose-Soja-Medium für Probenahmen auf Elba 2000

<u>TSB 3-Medium [TSB 3]. g/l</u>		<u>TSB 3-Medium [TSB 3 + Salz]. g/l</u>	
TSB-Broth	3	TSB-Broth	3
NaCl	30	NaCl	30
Betain	0,15	Betain	0,15
Aqua dest.	ad 1000 ml	künstliches Meerwasser	ad 1000 ml
pH	7,8	pH	7,8
Agar	15	Agar	15
Cycloheximid	0,05	Cycloheximid	0,05

Als künstliches Meerwasser diene das HSPC 30-Medium ohne C-Quellen-Mix (siehe Punkt 4).

4. HSPC-Medien mit Substraten für die Probenahmen in der Nordsee

HSPC-Medium mit Schlammextrakt [HSPC B]

<u>Basalmedium, g/l</u>	
NaCl	30,0
NaHCO ₃	0,84
10x Mineralsalz-Mix	100 ml
Schlammextrakt	100 ml
künstliches Meerwasser	ad 1000 ml
Agar	15
+ 1m Phosphatpuffer	1 ml
+ Spurenelementlösung	1 ml
+ Vitaminiösung	1 ml
+ Kohlenstoffquellen-Mix	10 ml
pH	7,3

Als künstliches Meerwasser dient das HSPC 30-Medium ohne C-Quellen-Mix.

Herstellung von Schlamm-Extrakt:

500 g Schlamm (Kieler Förde) wurde in 500 ml Aqua dest. aufgenommen, in einen 2-Liter-Erlenmeyerkolben überführt und auf einem Rotationsschüttler für eine Stunde bei 100 rpm ausgeschüttelt. Die Masse wurde anschließend in Polycarbonat Zentrifugationsröhrchen überführt, 20 min bei 13500 rpm zentrifugiert und der „Überstand“ in 100 ml PE Flaschen portioniert.

Es wurden 100 ml Extrakt pro Liter Medium vor dem Autoklavieren zugegeben und nicht sofort verbrauchter Extrakt bei -20°C gelagert.

HSPC-Medium mit Schwammextrakt [HSPC S]

<u>Basalmedium, g/l</u>	
NaCl	30,0
NaHCO ₃	0,84
10x Mineralsalz-Mix	100 ml
Schwammextrakt	200 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml
Agar	15
+ 1m Phosphatpuffer	1 ml
+ Spurenelementlösung	1 ml
+ Vitaminiösung	1 ml
+ Kohlenstoffquellen-Mix	10 ml
pH	7,3

Herstellung von Schwamm-Extrakt:

10 g lyophilisiertes Schwammmaterial wurde in 200 ml Aqua dest. aufgenommen, mit einem Ultra Turrax zerkleinert und bei 13500 rpm für 20 min zentrifugiert. Es folgte eine Portionierung des Überstandes in 100 ml PE Flaschen. 200 ml Extrakt pro Liter Medium wurden vor dem Autoklavieren zugegeben und nicht verbrauchter Extrakt bei -20°C gelagert.

B. Selektivmedien für Flavobacterium und Cytophaga

1. Medien für die Probenahmen in der Nordsee

<u>Maltose Medium [MAL], g/l</u>		<u>SW2 Agar [SW2], g/l</u>	
Sedimentextrakt	100 ml	Na-Acetat	0,02
Maltose	5,0	NH ₄ Cl	1,0
Hefeextrakt	0,5	Betain	0,15
KNO ₃	0,5	aufgesalzenes Ostseewasser	ad 1000 ml
Betain	0,15	Agar	15
aufgesalzenes Ostseewasser	ad 1000 ml	pH	7,2
Agar	15		
pH	7,2		

Medium M1 [CYT], g/l

Bacto-Pepton	5,0
Hefeextrakt	1,0
Fleischextrakt	2,0
NaCl	3,0
aufgesalzenens Ostseewasser	ad 1000 ml
Agar	15
pH	7,2

Als aufgesalzenes Ostseewasser dient gealtertes Ostseewasser, das mit NaCl auf 3,4 % eingestellt wird.

C. Selektivmedien für Actinobakterien

1. Medien für die Probenahmen in der Ostsee im März 1999 und auf Elba 1999

Actinobakterien Agar A [Strepto A], g/l

Glycerin	20 ml
Glycin	2,5
NaCl	1
K ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1
Spurenelemente (HSPC)	1 ml
Agar	15
pH	7,5
Endsalzgehalt:	0,18 %

Actinobakterien Agar B [Strepto B], g/l

Glucose	4
Hefeextrakt	4
Malz	10
CaCO ₃	2
Agar	15
pH	7,2
Endsalzgehalt:	0,72 %

Actinobakterien Agar C [Strepto C], g/l

Glucose	10
Bacto Pepton	10
Pepton Casein	2
Hefeextrakt	2
Agar	15
pH	7,8
Endsalzgehalt:	1,2 %

Die Endsalzgehalte wurden mit NaCl eingestellt.

2. Medien für die Probenahmen in der Nordsee und auf Elba 2000

Alginat-Agar [ALG], g/l

Alginat	4,00
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,001
MnCl ₂	0,001
Betain	0,15 g
künstliches Meerwasser	ad 1000 ml
pH	7,3
Agar	15
Cycloheximid	0,05

Chitin-Agar [CHI], g/l

Chitin (colloidal)	4,00
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,001
MnCl ₂	0,001
Betain	0,15
künstliches Meerwasser	ad 1000 ml
pH	7,3
Agar	15
Cycloheximid	0,05

Anhang

Glycerin-Arginin-Agar [GyA], g/l

Glycerin	12,5
Arginin	1,00
Fe ₂ (SO ₄) ₃ · 6H ₂ O	0,01
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,001
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,001
MnSO ₄ · H ₂ O	0,001
Betain	0,15
künstliches Meerwasser	ad 1000 ml
pH	7,3
Agar	15
Cycloheximid	0,05

Stärke-Casein-KNO₃-Agar [SCK], g/l

Stärke	10,0
KNO ₃	2,00
Casein	0,30
CaCO ₃	0,02
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01
Betain	0,15
künstliches Meerwasser	ad 1000 ml
pH	7,3
Agar	15
Cycloheximid	0,05

GYM-Agar mit Schlammextrakt [GYM B], g/l

Glucose	1,0
Hefe-Extrakt	1,0
Malz-Extrakt	1,0
CaCO ₃	2,0
Betain	0,15
Schlammextrakt	100 ml
künstliches Meerwasser	ad 1000 ml
pH	7,3
Agar	15
Cycloheximid	0,05

Herstellung von Schlamm-Extrakt:

500 g Schlamm (Kieler Förde) wurde in 500 ml Aqua dest. aufgenommen, in einen 2-Liter-Erlenmeyerkolben überführt und auf einem Rotationsschüttler für eine Stunde bei 100 rpm ausgeschüttelt. Die Masse wurde anschließend in Polycarbonat Zentrifugationsröhrchen überführt, 20 min bei 13500 rpm zentrifugiert und der „Überstand“ in 100 ml PE Flaschen portioniert.

Es wurden 100 ml Extrakt pro Liter Medium vor dem Autoklavieren zugegeben und nicht sofort verbrauchter Extrakt bei -20°C gelagert.

GYM-Agar mit Schwammextrakt [GYM S], g/l

Glucose	1,0
Hefe-Extrakt	1,0
Malz-Extrakt	1,0
CaCO ₃	2,0
Betain	0,15
Schwammextrakt	200 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml
pH	7,3
Agar	15
Cycloheximid	0,05

Herstellung von Schwamm-Extrakt:

10 g lyophilisiertes Schwammmaterial wurde in 200 ml Aqua dest. aufgenommen, mit einem Ultra Turrax zerkleinert und bei 13500 rpm für 20 min zentrifugiert. Es folgte eine Portionierung des Überstandes in 100 ml PE Flaschen. 200 ml Extrakt pro Liter Medium wurden vor dem Autoklavieren zugegeben und nicht verbrauchter Extrakt bei -20°C gelagert.

D(oligo)-Medium II [DoII], g/l

Bacto-Pepton	0,05
K ₂ HPO ₄	0,04
KNO ₃	0,05
Betain	0,15
künstliches Meerwasser	ad 1000 ml
pH	7,3
Agar	15
Cycloheximid	0,05

GYM-Agar [GYM], g/l

Glucose	1,0
Hefe-Extrakt	1,0
Malz-Extrakt	1,0
CaCO ₃	2,0
Betain	0,15
künstliches Meerwasser	ad 1000 ml
pH	7,3
Agar	15
Cycloheximid	0,05

Brain Heart Infusion with PABA [BHI] g/l

Brain Heart Infusion	37
Agar	15
künstliches Meerwasser	ad 1000 ml
pH	7,4

Actinomycete-Isolation-Agar [ACT] g/l

Actinomyceten-Agar	22
Agar	15
künstliches Meerwasser	ad 1000 ml
pH	8,1

Als künstliches Meerwasser dient das HSPC 30-Medium ohne C-Quellen-Mix.

D. Selektivmedium für Schwamm-Symbionten

1. Medium für die Probenahmen auf Elba 2000

Symbionten-Medium I [SSI], g/l

KCl	3,75 g
NaHCO ₃	10 mM
Na ₂ HPO ₄	5 mM
Trehalose	5 mM
Glycinbetain	5 mM
TSB	0,3 g
Spurenelement-Lösung SLB	1 ml
Vitamin-Lösung VA	1 ml
C-Mix	10 ml
10 % künstliches Meerwasser	ad 1000 ml
pH	7,2

10 % künstliches Meerwasser, g/l (entspricht 50 ml doppelt konz. Stammsalzlösung)

NaCl	2,73 (48,8 mM)
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,69 (2,8 mM)
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0,49 (2,4 mM)
KCl	0,075 (1 mM)
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,145 (1 mM)
KBr	0,01 (0,1 mM)

Spurenelement-Lösung SLB, mg/l (SLA, mit nur 1 mg Na-Selenit)

FeCl · 4H ₂ O	1,8 g
CoCl ₂ · 6H ₂ O	250
NiCl ₂ · 6H ₂ O	10
CuCl ₂ · 2H ₂ O	10
MnCl ₂ · 4H ₂ O	70
ZnCl ₂	100
H ₃ BO ₃	500
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	30
Na ₂ SeO ₄ · 5H ₂ O	1
Aqua dest	ad 1000 ml

Vitamin-Lösung VA, mg/l

Biotin	10
Niacin	35
Thiamin Dichlorid	30
p-aminobenzoic acid	20
Pyridoxolium Hydrochlorid	10
Ca-panthothenat	10
Vitamin B ₁₂	5
Aqua dest.	ad 100 ml

E. Selektivmedium für Myxobakterien

1. Medien für die Probenahmen auf Elba 2000

<u>WCX-Medium 3,4 % [MYX + Salz], g/l</u>		<u>WCX-Medium [MYX], g/l</u>	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1	CaCl ₂ · 2H ₂ O	1
Betain	0,15	Betain	0,15
künstliches Meerwasser	ad 1000 ml	Aqua dest.	ad 1000 ml
pH	7,2	pH	7,2
Agar	15	Agar	15
Cycloheximid	0,05	Cycloheximid	0,05

Auf diesem Medium wird *Escherichia coli* als lebender Futterorganismus angeboten.
Als künstliches Meerwasser dient das HSPC 30-Medium ohne C-Quellen-Mix.

Kultivierung

<u>DSMZ-Medium # 65, g/l</u>	
Glucose	4
Hefeextrakt	4
Malz	10
CaCO ₃	2
Agar	15
pH	7,2

Fettsäureanalyse/Turbidimetrie/Substratverwertung

<u>TSB 30-Medium, g/l</u>	
TSB-Broth	30
Aqua dest.	ad 1000 ml
Agar	15

Nachweis von Antibiotikaproduktion

<u>DSMZ-Medium # 1, g/l</u>		<u>DSMZ-Medium # 92, g/l</u>	
Pepton	5	TSB	30
Fleischextrakt	3	Hefe	3
Agar	15	Agar	15
pH	7,0	pH	7,0 - 7,2

<u>DSMZ-Medium # 1 für Bacilli, g/l</u>		<u>Testagar I, g/l</u>	
Pepton	5	Glucose	2
Fleischextrakt	3	Pepton	10
MnSO ₄ · H ₂ O	0,01	Hefe	1
Agar	15	Agar	15
pH	7,0	pH	7,0

Medien auf Basis des DSMZ-Mediums # 65

<u>DSMZ-Medium # 65, g/l</u>	
Glucose	4
Hefeextrakt	4
Malz	10
CaCO ₃	2
Agar	15
pH	7,2

Das DSMZ-Medium # 65 wurde als Süßwassermedium oder als Salzwassermedium (3,4 % NaCl) angeboten.

DSMZ-Medium # 65 halb, g/l

Glucose	2
Hefeextrakt	2
Malz	5
CaCO ₃	1
Agar	15
pH	7,2

Das DSMZ-Medium # 65 halb wurde als Süßwassermedium oder als Salzwassermedium (3,4 % NaCl) angeboten.

Klonierung

Luria-Bertani-Medium [LB], g/l

Hefeextrakt	5
Trypton	10
NaCl	10
Aqua dest.	ad 1000 ml
pH	7,0

Zugabe von 50 µg/ml Kanamycin nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf etwa 55°C, Lagerung bei 4°C, lichtgeschützt.

A 2.2 Rezepte der Reagenzien für die molekularen und mikroskopischen Methoden

DNA-Extraktion

Lysis-Puffer (nach Handbuch-Rezept aus QIAamp Mini Kit)

Lysozym	20 mg/ml
Tris · HCl	20 mM
EDTA	2 mM
Triton X-100	1,2 % (v/v)

Agarose-Gel-Elektrophorese

Agarose-Gel

Agarose >500 Bp, Biozym, Hess. Oldendorf	2 g
TBE-Puffer, 1fach	100 ml

Farbmarker

Glucose	10 g
Aqua dest.	ad 50 ml
Bromphenolblau	0,1 % (w/v)

TBE-Puffer (10fach) g/l

Tris	121,14
Borsäure	51,32
EDTA	3,72
Aqua dest.	ad 1000 ml

Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE)

TAE-Puffer (50fach) g/l

Tris	242,28
Natrium-Acetat	164,06
EDTA	74,448
Aqua dest.	ad 1000 ml
pH	7,8

Auftragspuffer

Glucose	4 g
Aqua dest.	ad 20 ml
Bromphenolblau	2 % (w/v)

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Lösung A (g/l)

NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	8,2794
Milli-Q	ad 1000 ml

Lösung B (g/l)

Na ₂ HPO ₄	8,5176
Milli-Q	ad 1000 ml

1x PBS (g/l)

Lösung A	46,7 ml
Lösung B	120,0 ml
NaCl	7,597
Milli-Q	ad 1000 ml
pH	7,2
sterilfiltrieren	

3x PBS (g/l)

Lösung A	140,0 ml
Lösung B	360,0 ml
NaCl	22,792
Milli-Q	ad 1000 ml
pH	7,2
autoklavieren	

3 %ige Paraformaldehyd-Lösung (100 ml)

Paraformaldehyd	3g
3xPBS	33 ml
Milli-Q	60 ml
pH	7,2
sterilfiltrieren	

0,5 M EDTA-Lösung (g/l)

EDTA 186,12 g
Milli-Q ad 1000 ml
pH 8,0 (mit NaOH)
autoklavieren

1 M Tris-HCl-Lösung (g/l)

Tris 121,14
Milli-Q ad 1000 ml
pH 7,3 (mit HCl)
autoklavieren

5 M NaCl-Lösung (g/l)

NaCl 292,20
Milli-Q ad 1000 ml
autoklavieren

10 % SDS-Lösung (20 ml)

SDS 2 g
Milli-Q 20 ml

A 3 Ergebnisse

A 3.1 Ergebnisse der Fettsäureanalyse

Tabelle A 1. Übersicht aller als Actinobakterien identifizierter Isolate

Isolat	Identifikation MIDI	Gruppe	Similaritätsindex	Anteil der erkannten FSME %
Na-HO-3-a-9	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,665	99,51
Na-HO-3-a-11	<i>Microbacterium laevaniformans</i>	6-8	0,455	100
Na-HO-b-17	<i>Streptovercillium reticulum</i>	11-1	0,440	98,71
Na-HO-18-b	<i>Rhodococcus rhodnii</i>	7-5	0,647	100
Na-HO-2-c-8	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	7-5	0,542	98,53
Na-HO-2-c-8a	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	7-5	0,444	96,43
Na-HO-2-c-8b	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	7-5	0,547	98,38
Na-HO-3c-4	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,872	100
Na-HO-3-c-11	<i>Tsukamurella paurometabolum</i>	7-6	0,681	98,53
Na-HO-4-c-4	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,525	100
Na-HO-4-c-9	<i>Cellulomonas fimi</i>	6-3	0,389	99,68
Na-HOB-2-aa-6	<i>Arthrobacter globiformis</i>	6-1	0,620	100
Na-HOB-2-aa-29	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	6-8	0,311	98,04
Na-HOB-2-aa-35c	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	6-8	0,513	100
Na-HOB-1-ab-8	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,443	98,48
Na-HOB-2-ab-1a	<i>Micrococcus lylae</i>	6-1	0,636	100
Na-HOB-2-ab-5	<i>Brevibacterium mcbrellneri</i>	6-2	0,391	97,62
Na-HOB-2-ab-10	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,604	98,01
Na-HOB-2-ab-23	<i>Nocardia globerula</i>	7-5	0,460	100
Na-HOB-2-ab-49a	<i>Corynebacterium bovis</i>	7-1	0,454	97,66
Na-HOB-3-ab-5	<i>Corynebacterium bovis</i>	7-1	0,406	100
Na-HOB-3-ab-7	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	6-8	0,810	100
Na-HOB-3-ab-11	<i>Micromonospora carbonacea</i>	8-1	0,413	97,19
Na-HOB-4-ab-1a	<i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	6-1	0,578	100
Na-HOB-4-ab-6	<i>Micrococcus lylae</i>	6-1	0,697	100
Na-HOB-2-ac-4	<i>Corynebacterium aquaticum</i>	7-1	0,506	100
Na-HOB-2-ac-5	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	6-8	0,786	100
Na-HOB-2-ac-11a	<i>Corynebacterium bovis</i>	7-1	0,327	99,63
Na-HOB-2-ac-19	<i>Nocardia asteroides</i>	7-5	0,744	90,58
Na-HOB-2-ac-21	<i>Nocardia asteroides</i>	7-5	0,767	98,92
Na-HOB-3-ac-5	<i>Micrococcus lylae</i>	6-1	0,742	96,24
Na-HOB-3-ac-9	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,563	99,68
Na-HOB-3-ac-19	<i>Rhodococcus fascians</i>	7-5	0,556	96,27
Na-HOB-3-ac-28	<i>Micromonospora carbonacea</i>	8-1	0,357	99,54
Na-HOB-3-ac-35	<i>Corynebacterium bovis</i>	7-1	0,430	100
Na-HOB-3-ac-37	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	6-8	0,436	100
Na-HOB-4-ac-8	<i>Micrococcus lylae</i>	6-1	0,471	100
Na-HOB-4-ac-9	<i>Arthrobacter agilis</i>	6-1	0,459	100
Na-HOB-2-ad-11b	<i>Nocardia asteroides</i>	7-5	0,642	98,24
Na-HOB-2-ad-39	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	6-8	0,808	100
Na-HOB-3-ad-20	<i>Corynebacterium bovis</i>	7-1	0,377	100
Na-HOB-3-ad-32	<i>Nocardia restricta</i>	7-5	0,421	88,54
Na-HOB-4-ad-12	<i>Corynebacterium bovis</i>	7-1	0,578	96,63
Na-HOB-4-ad-13	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,491	100
Na-HOB-1-ea-1a	<i>Nocardia restricta</i>	7-5	0,637	97,25
Na-HOB-1-ea-2a	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	6-1	0,512	100
Na-HOB-1-ea-3	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	6-1	0,441	100
Na-HOB-1-ea-4	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	6-1	0,439	97,98
Na-HOB-1-ea-10	<i>Tsukamurella paurometabolum</i>	7-6	0,644	92,30
Na-HOB-1-ea-10e	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,324	100
Na-HOB-1-ea-11	<i>Tsukamurella paurometabolum</i>	7-6	0,595	93,76
Na-HOB-1-ea-11a	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	6-1	0,448	100
Na-HOB-1-ea-12	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	6-1	0,443	99,50

Fortsetzung Tabelle A 1 von Seite 152				
Isolat	Identifikation MIDI	Gruppe	Similaritätsindex	FSME %
Na-HOB-1-ea-12a	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	6-8	0,629	100
Na-HOB-1-ea-12f	<i>Rhodococcus equi</i>	7-5	0,560	100
Na-HOB-1-ea-13	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	6-1	0,481	100
Na-HOB-1-ea-14a	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	6-1	0,392	100
Na-HOB-1-ea-15a	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	6-1	0,389	100
Na-HOB-1-ea-16	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	6-1	0,419	100
Na-HOB-1-ea-17a	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,411	98,34
Na-HOB-1-ea-17d	<i>Rhodococcus fascians</i>	7-5	0,746	98,96
Na-HOB-1-ea-18-b	<i>Rhodococcus rhodnii</i>	7-5	0,407	100
Na-HOB-2-ea-6a	<i>Cellulomonas fimi</i>	6-3	0,338	100
Na-HOB-2-ea-8a	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,401	100
Na-HOB-2-ea-8b	<i>Corynebacterium aquaticum</i>	7-1	0,497	100
Na-HOB-2-ea-9	<i>Cellulomonas fimi</i>	6-3	0,347	99,24
Na-HOB-3-ea-12b	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	6-1	0,395	100
Na-HOB-3-ea-13a	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	6-1	0,399	99,04
Na-HOB-3-ea-30	<i>Arthrobacter atrocyanus</i>	6-1	0,569	92,91
Na-HOB-3-ea-31	<i>Arthrobacter atrocyanus</i>	6-1	0,612	99,30
Na-HOB-4-ea-13	<i>Arthrobacter atrocyanus</i>	6-1	0,815	100
Na-HOB-4-ea-16a	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,568	98,56
Na-HOB-4-ea-16b	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	6-1	0,432	100
Na-HOB-4-ea-17a	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,558	97,89
Na-HOB-4-ea-19a	<i>Arthrobacter atrocyanus</i>	6-1	0,529	99,83
Na-HOB-4-ea-20a	<i>Arthrobacter atrocyanus</i>	6-1	0,606	100
Na-HOB-4-ea-20b	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,435	100
Na-HOB-4-ea-21a	<i>Arthrobacter atrocyanus</i>	6-1	0,705	100
Na-HOB-4-ea-22	<i>Arthrobacter atrocyanus</i>	6-1	0,389	96,58
Na-HOB-4-ea-24a	<i>Arthrobacter atrocyanus</i>	6-1	0,501	100
Na-HOB-4-ea-25a	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,602	100
Na-HOB-4-ea-25b	<i>Micrococcus lylae</i>	6-1	0,632	100
Na-HOB-4-ea-26a	<i>Arthrobacter atrocyanus</i>	6-1	0,643	100
Na-HOB-0-eb-5	<i>Rhodococcus equi</i>	7-5	0,402	100
Na-HOB-0-eb-13a	<i>Nocardia restricta</i>	7-5	0,646	97,16
Na-HOB-0-eb-14	<i>Tsukamurella paurometabolum</i>	7-6	0,680	95,77
Na-HOB-0-eb-15a	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,618	100
Na-HOB-0-eb-18	<i>Nocardia globerula</i>	7-5	0,429	100
Na-HOB-0-eb-20b	<i>Nocardia restricta</i>	7-5	0,408	99,46
Na-HOB-0-eb-29	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,672	100
Na-HOB-1-eb-6a	<i>Cellulomonas fimi</i>	6-3	0,420	99,22
Na-HOB-1-eb-7a	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,414	94,97
Na-HOB-1-eb-8	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,449	95,61
Na-HOB-1-eb-10	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,616	99,67
Na-HOB-1-eb-10a	<i>Kocuria kristinae</i>	6-1	0,871	100
Na-HOB-1-eb-11b	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,611	97,33
Na-HOB-1-eb-14a	<i>Kocuria kristinae</i>	6-1	0,793	100
Na-HOB-1-eb-17	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	7-5	0,407	96,67
Na-HOB-1-eb-17b	<i>Kocuria kristinae</i>	6-1	0,798	90,87
Na-HOB-1-eb-18	<i>Arthrobacter atrocyanus</i>	6-1	0,731	100
Na-HOB-1-eb-20	<i>Micrococcus lylae</i>	6-1	0,648	100
Na-HOB-1-eb-20a	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,669	100
Na-HOB-1-eb-22b	<i>Micrococcus lylae</i>	6-1	0,638	100
Na-HOB-1-eb-25a	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,594	100
Na-HOB-1-eb-27b	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,613	100
Na-HOB-1-eb-31	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,529	100
Na-HOB-2-eb-1	<i>Rhodococcus equi</i>	7-5	0,438	87,21
Na-HOB-2-eb-3	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	6-8	0,343	100
Na-HOB-2-eb-4	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,396	97,18
Na-HOB-2-eb-4a	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,426	96,15
Na-HOB-2-eb-5	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,430	95,42
Na-HOB-2-eb-12a	<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	6-1	0,542	91,07
Na-HOB-2-eb-25a	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,443	95,44
Na-HOB-2-eb-26	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,649	97,91
Na-HOB-2-eb-32	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,561	100
Na-HOB-2-eb-33a	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,613	99,45

Fortsetzung Tabelle A 1 von Seite 153				
Isolat	Identifikation MIDI	Gruppe	Similaritätsindex	FSME %
Na-HOB-2-eb-33b	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,579	100
Na-HOB-2-eb-42	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	7-5	0,585	100
Na-HOB-2-eb-43	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,412	100
Na-HOB-2-eb-45b	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,597	100
Na-HOB-2-eb-51	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	6-1	0,435	97,59
Na-HOB-2-eb-57	<i>Kocuria kristinae</i>	6-1	0,490	100
Na-HOB-2-eb-57a	<i>Kocuria kristinae</i>	6-1	0,478	86,45
Na-HOB-2-eb-59a	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,593	96,43
Na-HOB-2-eb-59b	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,538	100
Na-HOB-2-eb-64a	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,646	100
Na-HOB-2-eb-71	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,591	98,05
Na-HOB-3-eb-9	<i>Corynebacterium bovis</i>	7-1	0,532	100
Na-HOB-3-eb-11	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,684	100
Na-HOB-3-eb-17a	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,612	100
Na-HOB-3-eb-18	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	7-5	0,483	97,63
Na-HOB-3-eb-18c-s	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,617	100
Na-HOB-3-eb-19a	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,689	100
Na-HOB-3-eb-19b	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	7-5	0,542	97,09
Na-HOB-3-eb-20b	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,589	100
Na-HOB-3-eb-20c	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,439	95,71
Na-HOB-3-eb-21	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,684	98,45
Na-HOB-3-eb-21a	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,607	97,24
Na-HOB-3-eb-22a	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,626	100
Na-HOB-3-eb-22c	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,653	98,93
Na-HOB-3-eb-26	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,571	100
Na-HOB-3-eb-27	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,647	100
Na-HOB-3-eb-29a	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,547	100
Na-HOB-3-eb-30b	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,678	100
Na-HOB-3-eb-32	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,569	99,18
Na-HOB-3-eb-35	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,561	100
Na-HOB-3-eb-36	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,616	100
Na-HOB-3-eb-37b	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,572	100
Na-HOB-3-eb-42	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,529	100
Na-HOB-3-eb-43	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,630	100
Na-HOB-3-eb-44	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,643	100
Na-HOB-3-eb-46	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,516	100
Na-HOB-3-eb-48a	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,545	96,33
Na-HOB-3-eb-48b	<i>Rhodococcus globerulus</i>	7-5	0,524	98,09
Na-HOB-3-eb-51	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,507	100
Na-HOB-3-eb-52	<i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	6-1	0,559	100
Na-HOB-3-eb-53	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,737	100
Na-HOB-3-eb-53b	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,570	100
Na-HOB-3-eb-55	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,618	100
Na-HOB-3-eb-58	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,724	100
Na-HOB-3-eb-60	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,332	95,71
Na-HOB-3-eb-61	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,616	100
Na-HOB-3-eb-63a	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,345	98,23
Na-HOB-3-eb-66	<i>Kocuria kristinae</i>	6-1	0,810	91,86
Na-HOB-3-eb-67	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,481	100
Na-HOB-4-eb-46a	<i>Kocuria varians</i>	6-1	0,359	100
Na-HK-x-82	<i>Rhodococcus fascians</i>	7-5	0,634	99,63
Na-HK-x-86	<i>Nocardia restricta</i>	7-5	0,474	100
Na-HK-1x-25	<i>Rhodococcus fascians</i>	7-5	0,309	100
Na-HK-1-x-26	<i>Cellulomonas flavigena</i>	6-3	0,426	99,36
Na-HK-1-x-54	<i>Tsukamurella paurometabolum</i>	7-6	0,345	100
Na-HK-1-x-60	<i>Rhodococcus fascians</i>	7-5	0,743	97,62
Na-HK-z-1	<i>Rhodococcus equi</i>	7-5	0,481	95,78
Na-HK-1-z-9	<i>Rhodococcus equi</i>	7-5	0,648	95,06
Na-HK-2-z-3	<i>Clavibacter michiganense</i>	6-8	0,657	100
Na-HK-3-z-1	<i>Rhodococcus fascians</i>	7-5	0,806	97,58
Na-HK-3-z-6	<i>Corynebacterium bovis</i>	7-1	0,311	100
Na-HK-3-z-17	<i>Gordonia amarae</i>	7-3	0,447	95,27

Fortsetzung auf Seite 155

Fortsetzung Tabelle A 1 von Seite 154				
Isolat	Identifikation MIDI	Gruppe	Similaritäts-index	FSME %
Na-N99-6-ea-17a	<i>Kocuria kristinae</i>	6-1	0,550	100
Na-N99-6-1-ea-4	<i>Arthrobacter ilicis</i>	6-1	0,692	100
Na-N99-6-ed-2	<i>Actinomadura yumaensis</i>	12-3	0,328	95,72
Na-N99-6-ed-17gelb	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	6-8	0,835	100
Na-N99-6-ed-17	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	6-8	0,860	98,82
Na-N99-6-ed-17a	<i>Actinomadura yumaensis</i>	12-3	0,309	100
Na-N99-6-1-eg-4	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,514	100
Na-N99-6-1-eg-4a	<i>Micrococcus lylae</i>	6-1	0,402	100
Na-N99-6-4-eg-2	<i>Micrococcus lylae</i>	6-1	0,783	100
Na-N99-6-s-17	<i>Cellulomonas turbata</i>	6-3	0,583	100
Na-N99-6-s-22	<i>Cellulomonas turbata</i>	6-3	0,524	100
Na-N99-6-t-17	<i>Actinomadura yumaensis</i>	12-3	0,368	99,41
Na-N99-6-u-8	<i>Micrococcus lylae</i>	6-1	0,462	100
Na-N99-6-v-24	<i>Nocardia restricta</i>	7-5	0,490	98,09
Na-N99-6-w-49	<i>Arthrobacter globiformis</i>	6-1	0,637	99,49
Na-N99-7-1-t-1	<i>Cellulomonas fimi</i>	6-3	0,550	100
Na-N99-8-1-s-16	<i>Tsukamurella paurometabolum</i>	7-6	0,410	100
Na-N99-8-1-sa-17	<i>Cellulomonas turbata</i>	6-3	0,346	100
Na-N99-8-1-sa-18	<i>Brevibacterium mcbrellneri</i>	6-2	0,672	96,78
Na-N99-8-1-v-57	<i>Brevibacterium linens</i>	6-2	0,738	98,22
Na-N99-8-1-v-80	<i>Kocuria kristinae</i>	6-1	0,829	94,10
Na-N99-8-1-v-93	<i>Brevibacterium epidermidis</i>	6-2	0,783	95,40
Na-E00-4-1-ab-4	<i>Cellulomonas fimi</i>	6-3	0,381	98,62
Na-E00-4-4-ed-1	<i>Cellulomonas fimi</i>	6-3	0,655	100
Na-E00-4-1-o-1	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,806	100
Na-E00-4-1-o-2	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,801	100
Na-E00-5-abs-2	<i>Kocuria kristinae</i>	6-1	0,780	100
Na-E00-5-1-ea-1	<i>Rhodococcus fascians</i>	7-5	0,762	100
Na-E00-5-1-ea-2a	<i>Kocuria varians</i>	6-1	0,819	100
Na-E00-5-1-eb-4	<i>Gordonia bronchialis</i>	7-3	0,409	86,71
Na-E00-5-2-p-1	<i>Rhodococcus fascians</i>	7-5	0,679	92,81
Na-E00-6-3-eb-1	<i>Gordonia bronchialis</i>	7-3	0,484	86,80
Na-E00-6-3-ec-2	<i>Gordonia bronchialis</i>	7-3	0,543	89,46
Na-E00-6-2-h-1	<i>Micrococcus lylae</i>	6-1	0,366	100
Na-E00-6A-3-h-1	<i>Micrococcus lylae</i>	6-1	0,513	97,94
Na-E00-6a-3-o-1b	<i>Clavibacter michiganense</i>	6-8	0,640	100
Na-E00-6a-3-o-4	<i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	6-1	0,602	100
Na-E00-6b-3-p-1a	<i>Corynebacterium aquaticum</i>	7-1	0,534	100
Na-E00-7-1-eb-12	<i>Rhodococcus equi</i>	7-5	0,423	100
Na-E00-7-2-ec-15b	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	6-8	0,736	100
Na-E00-7-4-ec-8	<i>Gordonia bronchialis</i>	7-3	0,376	85,40
Na-E00-7-2-o-10	<i>Micrococcus lylae</i>	6-1	0,752	99,56
Na-E00-7-2-o-13	<i>Micrococcus lylae</i>	6-1	0,725	99,50
Na-E00-7-2-o-14	<i>Micrococcus lylae</i>	6-1	0,422	96,99
Na-E00-7-2-o-16	<i>Micrococcus lylae</i>	6-1	0,452	99,80
Na-E00-7-2-v-4b	<i>Clavibacter michiganense</i>	6-8	0,646	100
Na-E00-8E-4-ab-2b*	<i>Arthrobacter oxydans</i>	6-1	0,341	98,53
Na-E00-8E-2-p-1a	<i>Corynebacterium aquaticum</i>	7-1	0,619	100
Na-E00-9-4-ec-1	<i>Micrococcus lylae</i>	6-1	0,768	100
Na-E00-9-1-v-4	<i>Micrococcus luteus</i>	6-1	0,821	99,51
Na-E00-12-1-ec-1	<i>Kocuria varians</i>	6-1	0,731	100
Na-E00-12-2-ec-3	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	6-8	0,497	100

A 3.1.1. Ergebnisse der Fettsäureanalyse für den Standort Ostsee

Tabelle A 2. FAME-Identifikationen aus *Halichondria panicea* aus der Ostsee, ausgezählt nach den Medien.

Probenserie	HO		HOB		HK		FAME
	Isolate	FAME	Isolate	FAME	Isolate	FAME	Gesamt
aa/a	64	37	81	54			91
ab/b	62	35	86	60			95
ac/c	64	37	113	79			116
ad/d	11	1	142	80			81
ea			106	66			66
eb			251	171			171
x					202	97	97
z					194	108	108
Summe	201	110	779	510	396	205	825

Tabelle A 3. Als Actinobakterien identifizierten Isolate aus *Halichondria panicea* aus der Ostsee, ausgezählt nach den Medien.

Medium	Probenserie HO/HK	Probenserie HOB	Gesamt
aa/a	2	3	5
ab/b	2	11	13
ac/c	7	13	20
ad/d		6	6
ea		39	39
eb		84	84
x	6		6
z	6		6
Summe	23	156	179

A 3.1.2. Ergebnisse der Fettsäureanalyse für den Standort Nordsee

Tabelle A 4. FAME-Identifikationen aus den Schwämmen der Nordsee, ausgezählt nach den Medien.

Medium	Probenserie N99-2/7	Probenserie N99-6	Probenserie N99-8	Gesamt
aa		18		18
ab		23		23
ac		10		10
ad		10		10
ea		24		24
eb		19		19
ec		18		18
ed		7		7
ee		3		3
ef		9		9
eg		18		18
f		1		1
g		2		2
r		19	4	23
s	1	21	11	33
sa	3	38	13	54
sb	3	20	10	33
t	1	13		14
u		5		5
v	8	19	33	60
w		33	13	46
Summe	16	330	84	430

Tabelle A 5. Als Actinobakterien identifizierte Isolate aus den Schwämmen der Nordsee, ausgezählt nach den Medien.

Medium	Probenserie N99-2/7	Probenserie N99-6	Probenserie N99-8	Gesamt
ea		2		2
ed		2		2
eg		3		3
s		2	1	3
sa			2	2
t	1			1
u		1		1
v		2	3	5
w		1		1
Summe	1	13	6	20

A 3 1.3. Ergebnisse der Fettsäureanalyse für den Standort Mittelmeer (Elba)

Tabelle A 6. FAME-Identifikationen aus den Schwämmen von Elba 1999, ausgezählt nach den Medien.

Medium	Probenserie				Gesamt
	E99-1	E99-2	E99-3	E99-5	
a	1	1	3	11	16
ab/b		5	3	1	9
c			7	1	8
d				3	3
eb		15	7	22	44
eh		21	3	42	66
x				2	2
y		10		17	27
z			2		2
Summe	1	52	25	99	177

Tabelle A 7. FAME-Identifikationen aus den Schwämmen von Elba 2000, ausgezählt nach den Medien.

Medium	Probenserie								Gesamt
	E00-4	E00-5	E00-6	E00-7	E00-8	E00-9	E00-12	E00-13	
ab	2	3	1		7		6	13	32
abS	1	1						12	14
ea	1	4						18	23
eb		2	2		4		4	14	26
ec	3		6	16		8	6	11	50
ed	2	2		1	2	1	7	10	25
h	3	8	3	1	8	4		5	32
i	2			2	1			19	24
iS	3				1		3	50	57
o	4		4	12	2		5	8	35
p	3	1	7	1	9	1	5	5	32
q				2	1				3
v				1	1	1		5	8
Summe	24	21	23	36	36	15	36	170	361

Tabelle A8. Als Actinobakterien identifizierten Isolate aus den Schwämmen von Elba, ausgezählt nach den Medien.

Medium	Probenserie							Gesamt
	E00-4	E00-5	E00-6	E00-7	E00-8	E00-9	E00-12	
ab	1				1			2
abS		1						1
ea		2						2
eb		1	1	1				3
ec			1	2		1	2	6
ed	1							1
h			2					2
o	2		2	4				8
p		1	1		1			3
v				1		1		2
Summe	4	5	7	8	2	2	2	30

A 3.1.4. Ergebnisse der Fettsäureanalyse für die verschiedenen Mediengruppen

Tabelle A9. Erfolg der Isolierung auf den eingesetzten Medien auf Basis der FAME-Identifikationen und als Actinobakterien identifizierten Isolate.

Medium	Fettsäure-Identifikationen					Actinobakterien-Identifikationen			
	Ostsee	Nordsee	Mittelmeer 1999	Mittelmeer 2000	Gesamt	Ostsee	Nordsee	Mittelmeer 2000	Gesamt
aa/a	91	18	16		125	5			5
ab/b	95	23	9	32	159	13		2	15
abS				14	14			1	1
ac/c	116	10			126	20			20
ad/d	81	10			91	6			6
ea	66	24		23	113	39	2	2	43
eb	171	19	44	26	260	84		3	87
ec		18	8	50	76			6	6
ed		7	3	25	35		2	1	3
ee		3			3				
ef		9			9				
eg		18			18		3		3
eh			66		66				
f		1			1				
g		2			2				
h				32	32			2	2
i				24	24				
iS				57	57				
o				35	35			8	8
p				32	32			3	3
q				3	3				
r		23			23				
s		33			33		3		3
sa		54			54		2		2
sb		33			33				
t		14			14		1		1
u		5			5		1		1
v		60		8	68		5	2	7
w		46			46		1		1
x	97		2		99	6			6
y			27		27				
z	108		2		110	6			6
Summe	825	430	177	361	1793	179	20	30	229

Tabelle A10. Übersicht der Isolate, FAME-Identifizierungen und als Actinobakterien identifizierten Stämme von verschiedenen Probenahmeorten und auf den vier Medienserien.

Medien- gruppe		Ostsee	Nordsee	Mittelmeer 1999	Mittelmeer 2000	Summe
TSB	Isolate	623	75			
	FAME	383	61	25	46	515
	Actino- bakterien	44	keine	keine	3	47
HSPC	Isolate	357	158			
	FAME	237	98	121	124	580
	Actino- bakterien	123	7	keine	12	142
Selektive Medien für Actinobakt erien	Isolate	396	680			
	FAME	205	268	31	43	547
	Actino- bakterien	12	13	keine	10	35
Selektive Medien für andere Bakterien	Isolate	keine	14			
	FAME	keine	3	keine	148	151
	Actino- bakterien	keine	keine	keine	5	5
Summen	Isolate	1376	927	294	631	3328
	FAME	825	430	177	361	1793
	Actino- bakterien	179	20	keine	30	229

A 3.1.5. Ergebnisse der Fettsäureanalyse von Isolaten aus einzelnen Schwammspecies

Tabelle A 11. Isolatzahlen und FAME-Identifikationen mehrfach beprobter Species oder Gattungen

Schwamm	Probenahme	FAME	Isolate
<i>Halichondria panicea</i>	Ostsee (HOB)	510	779
	Ostsee (HK/HO)	315	597
	Nordsee	330	558
	Gesamt	1155	1934
<i>Haliclona</i>	Nordsee	84	283
	Mittelmeer 2000	23	42
	Gesamt	107	325
<i>Chondrosia reniformis</i>	Mittelmeer1999	52	75
	Mittelmeer 2000	36	95
	Gesamt	88	170
<i>Acanthella acuta</i>	Mittelmeer1999	99	158
	Mittelmeer 2000	24	54
	Gesamt	123	212
<i>Axinella</i>	Mittelmeer1999	25	60
	Mittelmeer 2000	36	62
	Gesamt	61	122
<i>Ircinia fasciculata</i>	Mittelmeer1999	1	1
	Mittelmeer 2000	170	206
	Gesamt	171	207
Andere		88	258
Summe		1793	3228

Tabelle A 12. Isolatezahlen aller beprobter Species.

Schwamm	Probenbezeichnung	Isolate
<i>Halichondria panicea</i>	HO	201
<i>Halichondria panicea</i>	HOB	779
<i>Halichondria panicea</i>	HK	396
<i>Petrosia ficiformis</i>	N99-2/7	86
<i>Halichondria panicea</i>	N99-6	558
<i>Haliclona oculata</i>	N99-8	283
<i>Ircinia fasciculata</i>	E99-1	1
<i>Chondrosia reniformis</i>	E99-2	75
<i>Axinella damicornis</i>	E99-3	60
<i>Acanthella acuta</i>	E99-5	158
<i>Acanthella acuta</i>	E00-4	54
<i>Oscarella lobularis</i>	E00-5	41
<i>Haliclona valliculata</i>	E00-6	42
<i>Hamigera hamigera</i>	E00-7	71
<i>Chondrosia reniformis</i>	E00-8A	57
<i>Chondrosia reniformis</i>	E00-8E	38
<i>Aplysina cavernicola</i>	E00-9	60
<i>Axinella verrucosa</i>	E00-12	62
<i>Ircinia fasciculata</i>	E00-13	206
Summe		3228

Tabelle A 13. Verteilung der FAME-Identifikationen auf Unterordnungen der Actinobakterien.

Unterordnung der Actinobakterien (#)	Anzahl der FAME-Identifikationen
<i>Micrococcineae</i> (VI)	166
<i>Corynebacterineae</i> (VII)	60
<i>Micromonosporineae</i> (VIII)	2
<i>Streptomycineae</i> (XI)	1

A 3.1.6 Korrektur der Fettsäure-Identifikationen auf Grundlage der 16S-rDNA-Sequenzierungen

Tabelle A 14. Übersicht der korrigierten FAME-Identifikationen. Zur Lage der Cluster siehe Abbildung A 1 auf Seite 162.

Cluster	Species nach FAME	Species nach Korrektur auf Basis der 16S rDNA-Identifikation
1, 4, 6, 7	<i>Arthrobacter atrocyanus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
	<i>Arthrobacter ilcis</i>	<i>Kocuria varians</i>
	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
	<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	<i>Kocuria varians</i>
	<i>Cellulomonas fimi</i>	<i>Kocuria varians</i>
	<i>Micrococcus lylae</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
2	<i>Arthrobacter oxydans</i>	<i>Brevibacterium helvolum</i>
	<i>Corynebacterium bovis</i>	<i>Brevibacterium helvolum</i>
	<i>Kocuria kristinae</i>	<i>Brevibacterium helvolum</i>
	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	<i>Brevibacterium helvolum</i>
3	<i>Arthrobacter atrocyanus</i>	<i>Microbacterium liquefaciens</i>
	<i>Brevibacterium mcbrellneri</i>	<i>Microbacterium liquefaciens</i>
	<i>Corynebacterium aquaticum</i>	<i>Clavibacter michiganense</i>
9	<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Rhodococcus</i>
	<i>Nocardia globerula</i>	<i>Rhodococcus erythreus</i>
	<i>Nocardia globerulus</i>	<i>Rhodococcus fascians</i>
	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	<i>Arthrobacter</i>
	<i>Nocardia restricta</i>	<i>Rhodococcus erythreus</i>
	<i>Rhodococcus equi</i>	<i>Rhodococcus erythreus</i>
	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	<i>Rhodococcus</i>
	<i>Rhodococcus rhodnii</i>	<i>Gordonia terrae</i>
	<i>Tsukamurella paurometabolum</i>	<i>Rhodococcus fascians</i>

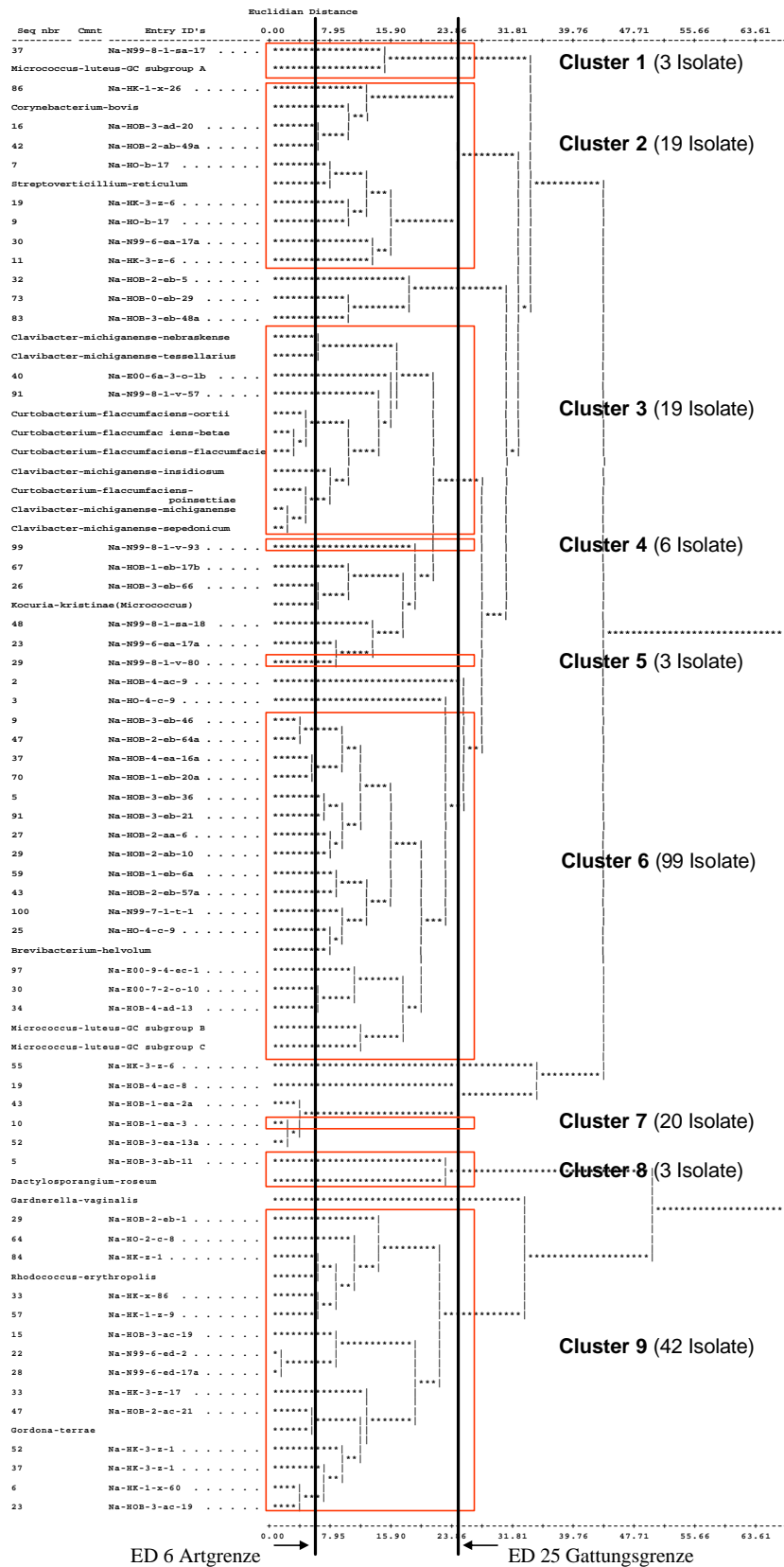


Abbildung A 1. Lage der Cluster im Fettsäure-Dendrogramm, in denen Korrekturen der Identifikationen vorgenommen wurden.

Tabelle A 15. Korrektur der Fettsäure-Identifikationen. Zur Lage der Cluster siehe Abbildung A 1 auf Seite 162.

Isolat	Identifikation durch Sequenzierung und MIDI	Cluster	Korrektur auf Basis der Ergebnisse der Sequenzierung und Clusterbildung
Na-N99-6-4-eg-2	<i>Micrococcus lylae</i>	1	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-N99-8-1-sa-17	<i>Arthrobacter</i> sp. 98,104 <i>Cellulomonas turbata</i>	1	
Na-E00-6-2-h-1	<i>Micrococcus lylae</i>	1	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-HO-b-17	<i>Streptomyces somaliensis</i> 99,813 <i>Streptovercillum reticulum</i>	2	
Na-HOB-2-aa-29	<i>Brevibacterium helvolum</i> 100 <i>Microbacterium liquefaciens</i>	2	
Na-HOB-2-ab-49a	<i>Brevibacterium helvolum</i> 98,864 <i>Corynebacterium bovis</i>	2	
Na-HOB-3-ab-5	<i>Corynebacterium bovis</i>	2	<i>Brevibacterium helvolum</i>
Na-HOB-2-ac-4	<i>Brevibacterium helvolum</i> 99,636 <i>Corynebacterium aquaticum</i>	2	
Na-HOB-2-ac-11a	<i>Brevibacterium helvolum</i> 96,096 <i>Corynebacterium bovis</i>	2	
Na-HOB-4-ad-12	<i>Brevibacterium helvolum</i> 99,392 <i>Corynebacterium bovis</i>	2	
Na-HOB-3-eb-9	<i>Corynebacterium bovis</i>	2	<i>Brevibacterium helvolum</i>
Na-HK-1-x-26	<i>Brevibacterium helvolum</i> 99,587 <i>Cellulomonas flavigena</i>	2	
Na-HK-3-z-6	<i>Brevibacterium helvolum</i> 99,516 <i>Corynebacterium bovis</i>	2	
Na-E00-8E-4-ab-2b*	<i>Arthrobacter oxydans</i>	2	<i>Brevibacterium helvolum</i>
Na-N99-6-ea-17a	<i>Kocuria kristinae</i>	2	<i>Brevibacterium helvolum</i>
Na-HOB-3-ab-7	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	2	<i>Brevibacterium helvolum</i>
Na-HOB-3-ac-35	<i>Corynebacterium bovis</i>	2	<i>Brevibacterium helvolum</i>
Na-HOB-3-ad-20	<i>Brevibacterium helvolum</i> 99,759 <i>Corynebacterium bovis</i>	2	
Na-HOB-2-eb-3	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	2	<i>Brevibacterium helvolum</i>
Na-HOB-3-ac-37	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	2	<i>Brevibacterium helvolum</i>
Na-HOB-2-ab-5	<i>Brevibacterium mcbrellneri</i>	3	<i>Microbacterium liquefaciens</i>
Na-HOB-4-ab-1a	<i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	3	<i>Microbacterium liquefaciens</i>
Na-HOB-2-ea-8b	<i>Corynebacterium aquaticum</i>	3	<i>Clavibacter michiganense</i>
Na-N99-8-1-sa-18	<i>Microbacterium</i> sp. 97,826 <i>Brevibacterium mcbrellneri</i>	3	
Na-N99-8-1-v-57	<i>Agrococcus</i> sp. 97,815 <i>Brevibacterium linens</i>	3	
Na-E00-6b-3-p-1a	<i>Corynebacterium aquaticum</i>	3	<i>Clavibacter michiganense</i>
Na-HOB-1-eb-18	<i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	4	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-N99-8-1-v-93	<i>Agrococcus</i> sp. 97,690 <i>Brevibacterium epidermidis</i>	4	
Na-HOB-1-ea-15a	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	5	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-N99-8-1-v-80	Unident. Actinobac. (Micro) 96,376 <i>Kocuria kristinae</i>	5	
Na-HO-4-c-4	<i>Micrococcus luteus</i> 99,387 <i>Micrococcus luteus</i>	6	
Na-HOB-2-ab-1a	<i>Micrococcus lylae</i>	6	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-HOB-4-ab-6	uncultivated bacterium 96,783 <i>Micrococcus lylae</i>	6	
Na-HOB-3-ac-5	<i>Micrococcus luteus</i> 99,448 <i>Micrococcus lylae</i>	6	
Na-HOB-3-ac-9	<i>Micrococcus psychrophilum</i> 95,055 <i>Micrococcus luteus</i>	6	
Na-HOB-4-ac-8	<i>Micrococcus lylae</i>	6	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-HOB-4-ac-9	<i>Micrococcus luteus</i> 100 <i>Arthrobacter agilis</i>	6	
Na-HOB-4-ad-13	<i>Micrococcus luteus</i> 99,350 <i>Micrococcus luteus</i>	6	
Na-HOB-1-ea-2a	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	6	<i>Micrococcus luteus</i>

Fortsetzung Tabelle A 15 von Seite 163			
Isolat	Identifikation Sequenzierung/MIDI	Cluster	Korrektur
Na-HOB-1-ea-11a	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	6	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-HOB-1-ea-12	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	6	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-HOB-1-ea-13	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	6	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-HOB-1-ea-14a	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	6	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-HOB-1-ea-16	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	6	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-HOB-3-ea-12b	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	6	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-HOB-3-ea-13a	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	6	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-HOB-3-ea-30	<i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	6	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-HOB-4-ea-16b	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	6	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-HOB-4-ea-19a	<i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	6	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-HOB-4-ea-20a	<i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	6	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-HOB-4-ea-21a	<i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	6	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-HOB-4-ea-22	<i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	6	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-HOB-4-ea-24a	<i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	6	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-HOB-4-ea-25b	<i>Micrococcus lylae</i>	6	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-HOB-4-ea-26a	<i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	6	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-HOB-1-eb-20	<i>Micrococcus lylae</i>	6	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-HOB-2-eb-12a	<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	6	<i>Kocuria varians</i>
Na-HOB-3-eb-52	<i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	6	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-N99-6-1-ea-4	<i>Arthrobacter ilicis</i>	6	<i>Kocuria varians</i>
Na-N99-6-1-eg-4a	<i>Micrococcus lylae</i>	6	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-N99-7-1-t-1	<i>Cellulomonas fimi</i>	6	<i>Kocuria varians</i>
Na-E00-4-1-ab-4	<i>Cellulomonas fimi</i>	6	<i>Kocuria varians</i>
Na-E00-4-4-ed-1	<i>Cellulomonas fimi</i>	6	<i>Kocuria varians</i>
Na-E00-6A-3-h-1	<i>Micrococcus lylae</i>	6	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-E00-6a-3-o-4	<i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	6	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-E00-7-2-o-10	<i>Micrococcus lylae</i>	6	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-E00-7-2-o-13	<i>Micrococcus lylae</i>	6	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-E00-7-2-o-14	<i>Micrococcus lylae</i>	6	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-E00-7-2-o-16	<i>Micrococcus lylae</i>	6	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-E00-9-4-ec-1	<i>Micrococcus lylae</i>	6	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-HOB-4-ea-13	<i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	6	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-HOB-1-ea-3	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	7	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-HOB-1-ea-4	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	7	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-HOB-1-eb-22b	<i>Micrococcus lylae</i>	7	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-HOB-2-eb-51	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	7	<i>Micrococcus luteus</i>
Na-HOB-3-ab-11	<i>Micrococcus luteus</i> 98,880 <i>Micromonospora carbonacea</i>	8	
Na-HO-18-b	<i>Rhodococcus rhodnii</i>	9	<i>Gordonia terrae</i>
Na-HO-2-c-8a	<i>Rhodococcus</i> sp. 98,017 <i>Rhodococcus rhodochrous</i>	9	
Na-HO-2-c-8b	<i>Arthrobacter</i> sp. 98,671 <i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	9	
Na-HO-3-c-11	<i>Rhodococcus fascians</i> 97,605 <i>Tsakamurella paurometabolum</i>	9	
Na-HOB-2-ab-23	<i>Nocardia globerula</i>	9	<i>Rhodococcus erythreus</i>
Na-HOB-2-ac-19	<i>Gordonia terrae</i> 99,760 <i>Nocardia asteroides</i>	9	
Na-HOB-2-ac-21	<i>Gordonia terrae</i> 99,811 <i>Nocardia asteroides</i>	9	
Na-HOB-3-ac-19	<i>Rhodococcus</i> sp. 100 <i>Rhodococcus fascians</i>	9	
Na-HOB-2-ad-11b	<i>Nocardia asteroides</i>	9	<i>Rhodococcus</i>
Na-HOB-3-ad-32	<i>Nocardia restricta</i>	9	<i>Rhodococcus erythreus</i>
Na-HOB-1-ea-1a	<i>Nocardia restricta</i>	9	<i>Rhodococcus erythreus</i>
Na-HOB-1-ea-10	<i>Tsakamurella paurometabolum</i>	9	<i>Rhodococcus fascians</i>
Na-HOB-1-ea-11	<i>Tsakamurella paurometabolum</i>	9	<i>Rhodococcus fascians</i>
Na-HOB-1-ea-12f	<i>Rhodococcus equi</i>	9	<i>Rhodococcus erythreus</i>
Na-HOB-1-ea-18-b	<i>Rhodococcus rhodnii</i>	9	<i>Gordonia terrae</i>
Na-HOB-0-eb-5	<i>Rhodococcus equi</i>	9	<i>Rhodococcus erythreus</i>
Na-HOB-0-eb-13a	<i>Nocardia restricta</i>	9	<i>Rhodococcus erythreus</i>
Na-HOB-0-eb-14	<i>Tsakamurella paurometabolum</i>	9	<i>Rhodococcus fascians</i>
Na-HOB-0-eb-18	<i>Nocardia globerula</i>	9	<i>Rhodococcus erythreus</i>
Na-HOB-0-eb-20b	<i>Nocardia restricta</i>	9	<i>Rhodococcus erythreus</i>

Fortsetzung Tabelle A 15 von Seite 164			
Isolat	Identifikation Sequenzierung/MIDI	Cluster	Korrektur
Na-HOB-1-eb-17	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	9	<i>Rhodococcus</i>
Na-HOB-2-eb-1	<i>Rhodococcus equi</i>	9	<i>Rhodococcus erythreus</i>
Na-HOB-2-eb-42	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	9	<i>Arthrobacter sp.</i>
Na-HOB-3-eb-19b	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	9	<i>Rhodococcus</i>
Na-HOB-3-eb-48b	<i>Rhodococcus globerulus</i>	9	<i>Rhodococcus fascians</i>
Na-HK-x-82	<i>Rhodococcus fascians</i> 99,716 <i>Rhodococcus fascians</i>	9	
Na-HK-x-86	<i>Nocardia calcaria</i> 99,446 <i>Nocardia restricta</i>	9	
Na-HK-1-x-54	<i>Rhodococcus sp.</i> 99,905 <i>Tsukamurella paurometabolum</i>	9	
Na-HK-1-x-60	<i>Rhodococcus fascians</i> 99,229 <i>Rhodococcus fascians</i>	9	
Na-HK-z-1	<i>Rhodococcus erythreus</i> 92,678 <i>Rhodococcus equi</i>	9	
Na-HK-1-z-9	<i>Rhodococcus erythreus</i> 99,805 <i>Rhodococcus equi</i>	9	
Na-HK-3-z-1	<i>Rhodococcus sp.</i> 99,530 <i>Rhodococcus fascians</i>	9	
Na-N99-8-1-s-16	<i>Rhodococcus fascians</i> 97,525 <i>Tsukamurella paurometabolum</i>	9	
Na-E00-7-1-eb-12	<i>Rhodococcus equi</i>	9	<i>Rhodococcus erythreus</i>

A 3.2 Ergebnisse der Sequenzierung

A 3.2.1 Ergebnisse der Sequenzierung von Isolaten

Tabelle A 16. Ergebnisse der Sequenzierung der Isolate.

Name	Primer	Länge	Nächster Verwandter nach FASTA3	EMBL-Nummer des nächsten Verwandten	Prozent der Übereinstimmung
HO-3a3	5' Start 5'534	899	<i>Brevibacterium helvolum</i>	BH16SR	99,332
HO-3a9 gelb	5'534	417	<i>Micrococcus luteus</i>	MLU276811	100
HO-3a9 glatt	5' Start	354	<i>Arthrobacter</i> sp.	AF235113	99,718
HO-3a9 transp.	5'534	135	<i>Micrococcus psychrophilum</i>	MPS005932	88,148
HO-b17	5'243 5'534 5'907	1066	<i>Streptomyces somaliensis</i>	SSO7400	99,813
HO-b17 II	5'534 5'907 3'1135	799	<i>Streptomyces sampsonii</i>	SS16SRR10	99,376
HO-b18	5'243 5'534	506	<i>Rhodococcus fascians</i>	RFRIBORNA	99,605
HO-2b17	5'534	403	<i>Brevibacterium helvolum</i>	BH16SR	99,005
HO-3b4	5' Start 5'534	819	<i>Brevibacterium helvolum</i>	BH16SR	99,268
HO-4b1	5'534	234	<i>Micrococcus psychrophilum</i>	MPS005932	98,291
HO-2c8	5' Start 5'534 5'907	1059	<i>Rhodococcus</i> sp.	RSP16SR	98,017
HO-2c8b	5' Start 5'534 3'907	903	<i>Arthrobacter</i> sp.	AF235113	98,671
HO-2c10	5'243 5'534 5'907 3'1387	1101	<i>Streptomyces albulus</i>	AB024440	97,911
HO-3c7	5' Start	216	<i>Micrococcus luteus</i>	MLRRSS	99,537
HO-3c11	5'243	166	<i>Rhodococcus fascians</i>	RFRIBORNA	97,605
HO-4c4	5' Start 5'534	816	<i>Micrococcus luteus</i>	MLU409096	99,387
HO-4c6	5' Start 5'534	804	<i>Thermoactinomyces sacchari</i> (low GC Gram-positive)	AF138737	87,406
HOB 2aa29	5'534	293	<i>Brevibacterium helvolum</i>	BH16SR	100
HOB-3aa6	5' Start 5'534	882	<i>Rhodococcus</i> sp.	RSP16SR	98,186
HOB 1ab12	5' Start 5'534	743	<i>Brevibacterium helvolum</i>	BH16SR	98,520
HOB 2ab49a	5'534	351	<i>Brevibacterium helvolum</i>	BH16SR	98,864
HOB 3ab11	5'534	356	<i>Micrococcus luteus</i>	MLU276811	98,880
HOB-4ab6	5' Start 5'534	737	uncultured bacterium environmental sample	AF286171	96,783
HOB 2ac4	5'243 3'907	550	<i>Brevibacterium helvolum</i>	BH16SR	99,636
HOB 2ac9 gelbl	5'534	210	<i>Micrococcus psychrophilum</i>	MPS005932	95,055
HOB 2ac11a	5'534	337	<i>Brevibacterium helvolum</i>	BH16SR	96,096
HOB-2ac19	5'534	417	<i>Gordonia terrae</i>	GT43249RR	99,760
HOB-2ac19 dick	5' Start 5'534	902	<i>Gordonia terrae</i>	AS16SR59	99,335
HOB 2ac21	5'243 5'907 3'907 3'1135	1059	<i>Gordonia terrae</i>	GT43249RR	99,811
HOB 3ac5	5' Start 5'243	543	<i>Micrococcus luteus</i>	AF057289	99,448
HOB 3ac9	5'534	210	<i>Micrococcus psychrophilum</i>		95,055

Fortsetzung Tabelle A 16 von Seite 166					
Name	Primer	Länge	Nächster Verwandter nach FASTA3	EMBL-Nummer des nächsten Verwandten	Prozent der Übereinstimmung
HOB 3ac9 gelb	5' Start	354	<i>Arthrobacter</i> sp.	AF235113	99,435
HOB-3ac19	5' Start 5'243 5'534	884	<i>Rhodococcus</i> sp.	AB010907	100
HOB-4ac9	5'534	340	<i>Micrococcus luteus</i>	MLU276811	100
HOB 3ad10	5'243 5'534	447	<i>Mycobacterium chlorophenolicus</i>	MCPCP116	98,210
HOB 3ad20	5'534	414	<i>Brevibacterium helvolum</i>	BH16SR	99,759
HOB 3ad20a weiß	5'534	198	<i>Brevibacterium helvolum</i>	BH16SR	99,495
HOB 3ad20a orange	5' Start 5'534	881	<i>Brevibacterium helvolum</i>	BH16SR	98,528
HOB 4ad12	5' Start 5'534	822	<i>Brevibacterium helvolum</i>	BH16SR	99,392
HOB-4ad13	5'243 5'534	619	<i>Micrococcus luteus</i>	MLU409095	99,350
N99-2 v2	5' Start 5'149 3'1387	1071	<i>Streptomyces griseus</i>	AB045867	98,884
N99-6 ab7weiß	5' Start 5'534	895	<i>Bacillus acidovorans</i> (low GC Gram-positve)	BA16SR	87,211
N99-6 ab7grau	5' Start 5'534	942	<i>Thermoactinomyces dichotomicus</i> (low GC Gram-positve)	AF138733	86,986
N99-6 ea17 gelb I	5'534	175	<i>Microbacterium</i> sp.	AF329727	98,286
N99-6 ea17b schwarz	5' Start 5'534	894	<i>Bacillus acidovorans</i> (low GC Gram-positve)	BA16SR	87,417
N99-6 ec5	5' Start 5'534	895	<i>Bacillus</i> sp. (low GC Gram-positve)	D50612	93,909
N99-6 ef12	5'534	293	<i>Micromonospora halophytica</i>	MH16RRNA	97,952
N99-6 ef12 schwarz	5' Start	346	<i>Micromonospora fulvoviolaceus</i>	MF16RRNA	97,983
N99-6 sa9	5'534	261	unidentified bacterium environmental sample	UBZ97852	98,467
N99-6 u8	5' Start 5'534	681	<i>Micrococcus luteus</i>	MLU409096	98,825
N99-6 v24 gelb	5'534 5'907	813	<i>Rhodococcus fascians</i>	RFRIBORNA	100
N99-6 1v4	5' Start 5'149 3'1135 3'1387	1328	<i>Streptomyces intermedius</i>	SIZ76686	98,047
N99-8 1s16	5'534	206	<i>Rhodococcus fascians</i>	RFRIBORNA	97,525
N99-8 1sa17	5'243 5'534	633	<i>Arthrobacter</i> sp.	AF197057	98,104
N99-8 1sa18	5' Start 5'243 5'534	787	<i>Microbacterium</i> sp.	AB042081	97,826
N99-8 1sa20 glatt	5'534	289	<i>Curtobacterium</i> sp.	AB042093	98,616
N99-8 1sa20 kraus	5'534	416	<i>Curtobacterium</i> sp.	AB042093	96,403
N99-8 1v57	5' Start 5'534	777	<i>Agrococcus</i> sp.	AF170739	97,815
N99-8 1v80 weiß	5' Start 5'534	884	Unident. Actinobacterium	UAC292034	96,376
N99-8 1v80 gelb	5'534	280	unident. Gram-pos. Bak. (Actinobakterium)	AB008510	97,500
N99-8 1v80 orange	5'534	218	unident. Corynebac.-like bacterium	AB027703	93,981
N99-8 1v93	5' Start	306	<i>Agrococcus</i> sp.	AF170739	97,690

Fortsetzung auf Seite 168

Fortsetzung Tabelle A 16 von Seite 167					
Name	Primer	Länge	Nächster Verwandter nach FASTA3	EMBL-Nummer des nächsten Verwandten	Prozent der Übereinstimmung
Na-HK x82	5'243 5'907 3'907 3'1135	1058	<i>Rhodococcus fascians</i>	RFRIBORNA	99,716
Na-HK x86 flü	5'243 5'534 5'907	1083	<i>Nocardia calcaria</i>	NC16SR3	99,446
Na-HK x86 fest	5'243 5'534 5'907 3'907	1035	<i>Rhodococcus erythreus</i>	RE43066RR	99,614
Na-HK 1x25	5'534 5'907 3'907	899	<i>Rhodococcus</i> sp.	AB010907	100
Na-HK 1x26	5'243 5'534 3'907	725	<i>Brevibacterium helvolum</i>	BH16SR	99,587
Na-HK 1x37	5'243 5'534 5'907 3'907	1044	<i>Rhodococcus</i> sp.	AB010907	99,522
Na-HK 1x38	5'243 5'534 5'907 3'907	1058	<i>Rhodococcus erythreus</i>	RE43066RR	99,811
Na-HK 1x39	5'243 5'534 5'907 3'907	1063	<i>Rhodococcus</i> sp.	AB010907	99,812
Na-HK 1x50	5'243 5'534 5'907	789	<i>Rhodococcus fascians</i>	RFRIBORNA	99,732
Na-HK 1x51	5'243 5'534 5'907 3'907 3'1135	1031	<i>Rhodococcus</i> sp.	AB010907	99,903
Na-HK 1x54	5'243 5'534 5'907 3'907	1051	<i>Rhodococcus</i> sp.	AB010907	99,905
Na-HK 1x60	5'243 5'534 5'907	1037	<i>Rhodococcus fascians</i>	RFRIBORNA	99,229
Na-HK z1 hell	5'243 5'534 5'907 3'907	1031	<i>Nocardia calcaria</i>	NC16SR3	99,903
Na-HK z1 dunkel	5'243 5'534 5'907 3'907	1034	<i>Rhodococcus erythreus</i>	RE43066RR	92,678
Na-HK 1z9	5'243 5'534 5'907	1028	<i>Rhodococcus erythreus</i>	RE43066RR	99,805
Na-HK 1z28	5' Start 5'534	907	<i>Thermoactinomyces yunnaensis</i> (lowGC Gram-positive)	AF367589	85,063
Na-HK 3z1	5'243 5'534 5'907	1060	<i>Rhodococcus</i> sp.	AB010907	99,530
Fortsetzung auf Seite 169					

Fortsetzung Tabelle A 16 von Seite 168					
Name	Primer	Länge	Nächster Verwandter nach FASTA3	EMBL-Nummer des nächsten Verwandten	Prozent der Übereinstimmung
Na-HK 3z6 ora	5'243 5'534 5'907 3'907	1032	<i>Brevibacterium helvolum</i>	BH16SR	99,516
Na-HK 3z29	5'243	351	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	REAF1265	99,715

A 3.2.2 Ergebnisse der Sequenzierung von Klonen

Tabelle A 17. Ergebnisse der Sequenzierung der Klonserie I aus E00-25 *Ircinia spinosula* / Elba

Name	Primer	Länge	Nächster Verwandter nach FASTA3	EMBL-Nummer	Übereinstimmung %	Nächstverwandtes Actinobakterium %, EMBL-Nummer	Datei
I 3	5'243	456	Uncult. sludge bacterium (env)	AF234754	92,140	91,703 UHI241005 uncult. high-GC Gram+ bacterium	C2
I 6	5'243	433	Uncult. high-GC Gram+ bacterium	UHI241005	92,379	90,300 MP16SRRNA <i>Microthrix parvicella</i>	C4
I 7	5'243	324	Uncult. sponge symbiont	AF186411	93,231	92,923 UHI241005 uncult. high-GC Gram+ bacterium	C5
I 9	5'243	374	Unident. bacterium (env)	AF317769	96,524	94,385 UHI241005 uncult. high-GC Gram+ bacterium	C6
I 11	5'243	292	Uncult. bacterial clone (env)	AY038390	93,814	93,174 UHI241005 uncult. high-GC Gram+ bacterium	C8
I 12	5'243	413	Unident. bacterium (env)	AF317769	95,652	93,237 UHI241005 uncult. high-GC Gram+ bacterium	C9
I 14	5'243	355	Unident. bacterium (env)	AF317769	93,258	91,011 UHI241005 uncult. high-GC Gram+ bacterium	C10
I 15	5'243	303	Uncult. eubacterium (env)	AF047642	94,408	93,421 UHI241005 uncult. high-GC Gram+ bacterium	C11
I 16	5'243	370	Unident. bacterium (env)	AF317769	93,531	91,644 UHI241005 uncult. high-GC Gram+ bacterium	C12
I 18	5'243	353	Uncult. sponge symbiont	AF186411	92,045	90,935 UAJ32687 uncult. actinobact.	C14
I 21	5'243	392	Uncult. sponge symbiont	AF186411	91,414	91,162 UHI241005 uncult. high-GC Gram+ bacterium	C15
I 22	5'243	337	Unident. bacterium (env)	AF317769	94,675	94,379 UHI241005 uncult. high-GC Gram+ bacterium	C16
I 23	5'243	430	Unident. bacterium (env)	AF317769	94,444	92,841 UBA277687 uncult. actionbact.	C17
I 24	5'243	417	Uncult. high-GC Gram+ bact.	UHI241005	92,601	90,453 MP16SRRNA <i>Microthrix parvicella</i>	C18
I 25	5'243	453	Unident. bacterium (env)	AF317769	94,260	92,274 UBA277687 uncult. actionbact.	C19
I 26	5'243	407	Uncult. sponge symbiont (env) delta-Proteobact.	AF186415	96,552		C20
I 28	5'243	449	Uncult. sponge symbiont	AF186411	92,000	92,000 UHI241005 uncult. high-GC Gram+ bacterium	C21

Tabelle A 18. Ergebnisse der Sequenzierung der Klonserie II aus N99-8 *Haliclona oculata* / Nordsee

Name	Primer	Länge	Nächster Verwandter nach FASTA3	EMBL-Nummer	Übereinstimmung %	Nächstverwandtes Actinobakterium %, EMBL-Nummer	Datei
II 3	5'243	459	Unident. bacterium (env)	AB021325	95,000	92,391 UBA277695 uncult. actinobact.	C22
II 4	5'243	432	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,288	93,271 ACE7290 <i>Acidothermus cellulolyticus</i>	C23
II 8	5'243	453	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,009	92,905 ACE7290 <i>Acidothermus cellulolyticus</i>	C25
II 9	5'243	197	<i>Nostocoida limicola</i> II	UNRDNA16S	95,876	95,876 AF125090 <i>Tetrasphaera australiensis</i>	C26
II 10	5'243	453	Uncult. bacterium	UBA277699	91,189	86,374 A16STM210 <i>Actinomyces</i> sp.	C27
II 13	5'243	456	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,718	93,654 ACE7290 <i>Acidothermus cellulolyticus</i>	C29
II 17	5'243	435	Unident. bacterium (env)	AB021325	97,931	95,161 ACE7290 <i>Acidothermus cellulolyticus</i>	C30

Tabelle A 19. Ergebnisse der Sequenzierung der Klonserie IV aus Na-HK *Halichondria panicea* / Ostsee

Name	Primer	Länge	Nächster Verwandter nach FASTA3	EMBL-Nummer	Übereinstimmung %	Nächstverwandtes Actinobakterium %, EMBL-Nummer	Datei
IV 2	5'243	470	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,588	93,603 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C32
IV 3	5'243	495	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,755	93,712 AB026221 <i>Streptomyces turgidiscabies</i>	C33
IV 4	5'243	480	<i>Nostocoida limicola</i> II	UNRDNA16S	94,375		C34
IV 5	5'243	454	<i>Nostocoida limicola</i> II	UNRDNA16S	93,819		C35
IV 6	5'243	462	Unident. bacterium (env)	AB021325	95,896	92,873 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C36
IV 7	5'243	469	<i>Mycobacterium chlorophenolicus</i>	MCPCP116	98,495		C37
IV 8	5'243	471	Unident. bacterium (env)	AB021325	95,148	92,194 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C38
IV 9	5'243	473	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,414	93,671 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C39
IV 10	5'243	462	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,544	93,521 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C40
IV 11	5'243	474	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,624	93,671 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C41
IV 12	5'243	482	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,862	93,920 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C42
IV 13	5'243	480	Unident. bacterium (env)	AB021325	94,813	92,243 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C43
IV 14	5'243	461	Uncult. bacterium	UBA277690	92,441	88,528 SARRND <i>Streptomyces ambifaciens</i>	C44
IV 15	5'243	459	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,304	93,261 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C45
IV 16	5'243	479	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,234	93,291 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C46
IV 17	5'243	473	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,624	93,671 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C47
IV 19	5'243	497	Unident. bacterium (env)	AB021325	97,183	94,165 UBA277695 uncult. actinobact.	C48

Fortsetzung Tabelle A 19 von Seite 170							
Name	Primer	Länge	Nächster Verwandter nach FASTA3	EMBL-Nummer	Übereinstimmung %	Nächstverwandtes Actinobakterium %, EMBL-Nummer	Datei
IV 20	5'243	442	Unident. bacterium (env)	AB021325	95,672	92,711 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C87
IV 22	5'243	450	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,239	93,142 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C89
IV 23	5'243	455	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,703	93,626 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C90
IV 24	5'243	301	Unident. bacterium (env)	AB021325	95,695	95,033 AF125090 <i>Tetrasphaera australiensis</i>	C91
IV 25	5'243	457	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,507	93,450 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C92
IV 28	5'243	431	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,520	93,503 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C94
IV 29	5'243	460	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,304	93,261 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C95
IV 31	5'243	410	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,107	92,944 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C96
IV 32	5'243	483	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,258	93,501 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C97
IV 33	5'243	482	Unident. bacterium (env)	AB021325	95,983	93,658 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C98
IV 34	5'243	467	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,154	93,376 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C99
IV 35	5'243	436	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,330	93,349 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C100
IV 36	5'243	458	Unident. bacterium (env)	AB021325	97,162	94,105 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C101
IV 37	5'243	460	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,957	93,913 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C102
IV 38	5'243	453	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,689	93,598 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C103
IV 39	5'243	457	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,288	93,231 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C104
IV 40	5'243	458	Unident. bacterium (env)	AB021325	97,162	94,105 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C105
IV 41	5'243	457	Unident. bacterium (env)	AB021325	95,633	92,576 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C106
IV 42	5'243	458	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,304	93,261 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C107
IV 43	5'243	438	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,591	93,394 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C108
IV 44	5'243	451	Unident. bacterium (env)	AB021332	95,143	94,702 UNRDNA16S <i>Nostocoida limicola</i> II	C109
IV 45	5'243	458	Unident. bacterium (env)	AB021325	95,643	92,593 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C110
IV 46	5'243	441	Unident. bacterium (env)	AB021325	95,260	92,744 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C111
IV 47	5'243	456	Unident. bacterium (env)	AB021325	95,852	92,795 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C112
IV 48	5'243	456	Unident. bacterium (env)	AB021325	95,852	93,231 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C113
IV 49	5'243	436	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,128	93,349 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C114
IV 50	5'243	457	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,943	93,886 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C115
IV 51	5'243	441	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,136	93,182 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C116
IV 53	5'243	442	Unident. bacterium (env)	AB021325	95,928	92,986 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C117
IV 54	5'243	441	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,833	93,891 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C118
IV 56	5'243	440	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,154	93,213 AB026221 <i>Streptomyces turgidiscabies</i>	C119

Fortsetzung Tabelle A 19 von Seite 171							
Name	Primer	Länge	Nächster Verwandter nach FASTA3	EMBL-Nummer	Übereinstimmung %	Nächstverwandtes Actinobakterium %, EMBL-Nummer	Datei
IV 57	5'243	442	Unident. bacterium (env)	AB021325	95,928	92,986 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C120
IV 59	5'243	441	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,380	93,439 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C121
IV 60	5'243	438	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,796	94,050 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C122
IV 62	5'243	442	Unident. bacterium (env)	AB021325	95,249	92,986 ACE7290 <i>Acidothermus cellulolyticus</i>	C123
IV 63	5'243	423	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,690	94,048 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C124
IV 64	5'243	443	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,614	93,679 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C125
IV 67	5'243	420	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,643	93,990 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C126
IV 68	5'243	510	<i>Nostocoida limicola</i> II	UCRDNA16S	94,141		C127
IV 69	5'243	435	Unident. bacterium (env)	AB021325	93,864	91,743 AB012607 <i>Micropruina glycogenica</i>	C128
IV 70	5'243	448	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,444	93,736 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C129
IV 71	5'243	442	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,163	93,228 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C130
IV 72	5'243	428	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,737	93,939 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C131
IV 73	5'243	433	<i>Streptomyces kathirae</i>	AY015428	86,836		C132
IV 74	5'243	442	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,380	93,439 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C133
IV 75	5'243	441	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,145	93,197 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C134

Tabelle A 20. Ergebnisse der Sequenzierung der Klonserie V aus N99-6 *Halichondria panicea* / Nordsee

Name	Primer	Länge	Nächster Verwandter nach FASTA3	EMBL-Nummer	Übereinstimmung %	Nächstverwandtes Actinobakterium %, EMBL-Nummer	Datei
V 1	5'243	473	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,421	93,263 AB026221 <i>Streptomyces turgidiscabies</i>	C49
V 2	5'243	477	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,862	93,291 ACE7290 <i>Acidothermus cellulolyticus</i>	C50
V 3	5'243	452	<i>Nostocoida limicola</i> II	UNRDNA16S	94,027		C51
V 5	5'243	477	Unident. bacterium (env)	AB021325	89,958	89,540 UBA277694 uncult. actinobact.	C52
V 6	5'243	458	Unident. bacterium (env)	AB021325	97,162	93,886 AB026221 <i>Streptomyces turgidiscabies</i>	C53
V 7	243	644	Uncult. gamma-proteobacterium (env)	AB031651	94,286		C54.doc
V 8	243	736	<i>Planctomyces maris</i>	P231184	87,891		C55.doc
V 9	5'243	469	Unident. bacterium (env)	AB021325	97,228	94,030 ACE7290 <i>Acidothermus cellulolyticus</i>	C56
V 14	5'243	455	Unident. bacterium (env)	AB021325	93,640	91,667 SC1399487 <i>Streptomyces cinnabarinus</i>	C61

Fortsetzung Tabelle A 20 von Seite 172							
Name	Primer	Länge	Nächster Verwandter nach FASTA3	EMBL-Nummer	Übereinstimmung %	Nächstverwandtes Actinobakterium %, EMBL-Nummer	Datei
V 15	5'243	638	<i>Epulopiscium</i> sp. (low GC Gram-positive)	ESRRNAC	90,545		C62 V15F
V 16	5'243	455	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,491	93,202 ACE7290 <i>Acidothermus cellulolyticus</i>	C63
V 17	5'243	456	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,718	93,435 AB026221 <i>Streptomyces turgidiscabies</i>	C64
V 18	5'243	453	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,916	93,612 AB026221 <i>Streptomyces turgidiscabies</i>	C65
V 19	5'243	458	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,943	93,668 AB026221 <i>Streptomyces turgidiscabies</i>	C66
V 20	5'243	435	<i>Nostocoida limicola</i> II	UCRDNA16S	92,677		C135
V 22	5'243	428	Actinobacterium from anoxic bulk soil	ASA229252	94,145	93,925 UDRDNA16S <i>Nostocoida limicola</i> II	C137
V 23	5'243	465	Unident. bacterium (env)	AB021325	97,009	93,803 ACE7290 <i>Acidothermus cellulolyticus</i>	C138
V 24	5'243	405	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,296	93,548 AB026221 <i>Streptomyces turgidiscabies</i>	C139
V 25	5'243	366	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,164	93,151 AF233338 <i>Streptomyces maritimus</i>	C140
V 26	5'243	418	<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	ACE7290	93,510		C141
V 27	5'243	410	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,350	92,944 AB026221 <i>Streptomyces turgidiscabies</i>	C142
V 28	5'243	437	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,119	92,466 AB026221 <i>Streptomyces turgidiscabies</i>	C143
V 29	5'243	389	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,667	93,590 AB026221 <i>Streptomyces turgidiscabies</i>	C144
V 31	5'243	434	Unident. bacterium (env)	AB021325	88,046	86,437 AF369704 <i>Streptomyces roseoflavus</i>	C146
V 32	5'243	436	Unident. bacterium (env)	AB021325	95,872	92,890 AB026221 <i>Streptomyces turgidiscabies</i>	C147
V 33	5'243	377	Unident. bacterium (env)	AB021325	97,347	95,652 AF060689 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C148
V 35	5'243	418	Unident. bacterium (env)	AB021325	97,613	94,272 ACE7290 <i>Acidothermus cellulolyticus</i>	C150
V 36	5'243	421	Unident. bacterium (env)	AB021325	92,647	91,686 UBA277701 uncult. actinobact.	C151
V 37	5'243	437	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,347	93,607 ACE7290 <i>Acidothermus cellulolyticus</i>	C152
V 38	5'243	425	<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	ACE7290	90,780		C153
V 39	5'243	422	Unident. bacterium (env)	AB021325	95,704	93,029 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C154
V 40	5'243	438	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,110	92,906 AB026214 <i>Streptomyces scabies</i>	C155
V 41	5'243	430	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,759	93,488 ACE7290 <i>Acidothermus cellulolyticus</i>	C156

Fortsetzung auf Seite 174

Fortsetzung Tabelle A 20 von Seite 173							
Name	Primer	Länge	Nächster Verwandter nach FASTA3	EMBL-Nummer	Übereinstimmung %	Nächstverwandtes Actinobakterium %, EMBL-Nummer	Datei
V 42	5'243	439	Unident. bacterium (env)	AB021325	93,213	90,271 AB026221 <i>Streptomyces turgidiscabies</i>	C157
V 43	5'243	439	<i>Nostocoida limicola</i> II	UCRDNA16S	93,379		C158
V 44	5'243	442	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,606	93,665 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C159
V 45	5'243	447	Unident. bacterium (env)	AB021325	91,964	91,295 UBA277694 uncult. actinobact.	C160
V 46	5'243	442	Unident. bacterium (env)	AB021325	95,928	92,986 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C161
V 47	5'243	433	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,313	93,548 AB026221 <i>Streptomyces turgidiscabies</i>	C162
V 49	5'243	423	Unident. bacterium (env)	AB021325	97,636	94,326 AB026221 <i>Streptomyces turgidiscabies</i>	C163
V 51	5'243	415	Uncult. Crater Lake bacterium	AF316675	91,566	89,880 UBA277692 uncult. actinobact.	C164
V 53	5'243	365	Unident. bacterium (env)	AB021325	97,260	94,521 SARRND <i>Streptomyces ambifaciens</i>	C165
V 55	5'243	466	<i>Streptomyces</i> sp.	AF131577	86,177		C166
V 56	5'243	413	Unident. bacterium (env)	AB021325	95,874	93,012 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C167
V 57	5'243	435	Unident. bacterium (env)	AB021325	94,495	92,202 ACE7290 <i>Acidothermus cellulolyticus</i>	C168
V 58	5'243	441	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,818	93,636 ACE7290 <i>Acidothermus cellulolyticus</i>	C169
V 59	5'243	441	Unident. bacterium (env)	AB021325	95,928	92,986 AF060676 <i>Kineococcus</i> -like bact.	C170
V 60	5'243	212	Unident. bacterium (env)	AB021325	97,260	96,918 AF125090 <i>Tetrasphaera australiensis</i>	C171
V 61	5'243	216	Unident. bacterium (env)	AB021325	97,222	97,222 AF125090 <i>Tetrasphaera australiensis</i>	C172
V 62	5'243	441	<i>Nostocoida limicola</i> II	UCRDNA16S	93,679		C173
V 63	5'243	443	Unident. bacterium (env)	AB021325	91,236	90,112 AF131530 <i>Streptomyces</i> sp.	C174
V 64	5'243	411	Unident. bacterium (env)	AB021325	97,080	94,404 ACE7290 <i>Acidothermus cellulolyticus</i>	C175
V 65	5'243	377	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,552	94,595 ACE7290 <i>Acidothermus cellulolyticus</i>	C176
V 66	5'243	404	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,782	93,564 ACE7290 <i>Acidothermus cellulolyticus</i>	C177
V 67	5'243	352	Unident. bacterium (env)	AB021325	97,443	95,702 ACE7290 <i>Acidothermus cellulolyticus</i>	C178
V 68	5'243	335	Unident. bacterium (env)	AB021325	97,024	93,750 SSP308573 <i>Streptomyces</i> sp.	C179
V 69	5'243	411	Unident. bacterium (env)	AB021325	94,404	93,431 UBA277701 uncult. actinobact.	C180
V 70	5'243	365	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,712	95,278 ACE7290 <i>Acidothermus cellulolyticus</i>	C181
V 71	5'243	376	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,809	94,851 ACE7290 <i>Acidothermus cellulolyticus</i>	C182

Fortsetzung Tabelle A 20 von Seite 174							
Name	Primer	Länge	Nächster Verwandter nach FASTA3	EMBL-Nummer	Übereinstimmung %	Nächstverwandtes Actinobakterium %, EMBL-Nummer	Datei
V 73	5'243	424	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,706	93,632 ACE7290 <i>Acidothermus cellulolyticus</i>	C183
V 74	5'243	440	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,136	92,955 AB026221 <i>Streptomyces turgidiscabies</i>	C184
V 75	5'243	422	Unident. bacterium (env)	AB021325	97,150	94,498 AF060676 <i>Kineococcus-like bact.</i>	C185

Tabelle A 21. Ergebnisse der Sequenzierung der Klonserie VI aus N99-8 *Haliclona oculata* aus der Nordsee

Name	Primer	Länge	Nächster Verwandter nach FASTA3	EMBL-Nummer	Übereinstimmung %	Nächstverwandtes Actinobakterium %, EMBL-Nummer	Datei
VI 8	5'243	433	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,092	93,333 AB026221 <i>Streptomyces turgidiscabies</i>	C70
VI 9	5'243	434	Unident. bacterium (env)	AB021325	97,005	93,779 AB026221 <i>Streptomyces turgidiscabies</i>	C71
VI 11	5'243	435	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,330	93,349 AF060676 <i>Kineococcus-like bact.</i>	C72
VI 14	5'243	457	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,070	93,013 AF060676 <i>Kineococcus-like bact.</i>	C73
VI 16	5'243	460	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,304	93,043 AF060676 <i>Kineococcus-like bact.</i>	C74
VI 21	5'243	421	<i>Streptomyces</i> sp.	SSP308577	89,336		C186
VI 25	5'243	424	Unident. bacterium (env)	AB021325	97,406	94,774 ACE7290 <i>Acidothermus cellulolyticus</i>	C187
VI 26	5'243	372	Unident. bacterium (env)	AB021325	93,566	92,683 GSP316573 <i>Blastococcus</i> sp.	C188
VI 30	5'243	399	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,758	93,017 AB026221 <i>Streptomyces turgidiscabies</i>	C190
VI 33	5'243	414	Unident. bacterium (env)	AB021325	97,356	94,217 ACE7290 <i>Acidothermus cellulolyticus</i>	C191
VI 34	5'243	422	Unident. bacterium (env)	AB021325	97,387	94,737 ACE7290 <i>Acidothermus cellulolyticus</i>	C192
VI 36	5'243	173	<i>Calothrix</i> Cyanobakterium	CSPAG13R	100		C193
VI 37	5'243	440	Unident. bacterium (env)	AB021325	93,439	92,009 GSP316573 <i>Blastococcus</i> sp.	C194
VI 38	5'243	421	Unident. bacterium (env)	AB021325	97,387	94,737 ACE7290 <i>Acidothermus cellulolyticus</i>	C195
VI 40	5'243	442	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,840	93,679 ACE7290 <i>Acidothermus cellulolyticus</i>	C201
VI 41	5'243	253	<i>Nostocoida limicola</i> II	UCRDNA16S	98,419		C197
VI 42	5'243	423	Unident. bacterium (env)	AB021325	95,272	92,619 ACE7290 <i>Acidothermus cellulolyticus</i>	C198
VI 45	5'243	437	Uncult. <i>Pirellula</i>	AF029078	98,853	94,725 AF453520 <i>Pirellula</i> sp.	C200
VI 47	5'243	430	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,744	93,488 ACE7290 <i>Acidothermus cellulolyticus</i>	VI 47

Fortsetzung Tabelle A 21 von Seite 175							
Name	Primer	Länge	Nächster Verwandter nach FASTA3	EMBL-Nummer	Übereinstimmung %	Nächstverwandtes Actinobakterium %, EMBL-Nummer	Datei
VI 49	5'243	244	Unident. bacterium (env)	AB021325	97,119	97,119 AF125090 <i>Tetrasphaera australiensis</i>	VI 49
VI 51	5'243	329	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,689	95,050 ACE7290 <i>Acidothermus cellulolyticus</i>	VI 51
VI 52	5'243	448	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,437	93,096 AB026221 <i>Streptomyces turgidiscabies</i>	VI 52
VI 53	5'243	415	Unident. bacterium (env)	AB021325	95,874	92,718 AB026221 <i>Streptomyces turgidiscabies</i>	VI 53
VI 54	5'243	396	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,212	93,182 AB026221 <i>Streptomyces turgidiscabies</i>	VI 54
VI 57	5'243	435	Unident. bacterium (env)	AB021325	97,011	93,793 ACE7290 <i>Acidothermus cellulolyticus</i>	VI 57
VI 62	5'243	377	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,817	95,122 AF060689 <i>Kineococcus-like bact.</i>	VI 62
VI 63	5'243	393	Uncult. bacterium (env)	UBA277699	90,585	87,750 SC1399487 <i>Streptomyces cinnabarinus</i>	VI 63
VI 65	5'243	396	Unident. bacterium (env)	AB021325	95,202	92,424 AB026221 <i>Streptomyces turgidiscabies</i>	VI 65
VI 66	5'243	430	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,305	93,533 AB026221 <i>Streptomyces turgidiscabies</i>	VI 66
VI 69	5'243	429	Unident. bacterium (env)	AB021325	96,729	93,692 AF060676 <i>Kineococcus-like bact.</i>	VI 69
VI 72	5'243	194	Uncult. bacterium	UEAJ9505	96,907	95,361 SARRND <i>Streptomyces ambifaciens</i>	VI 72
VI 73	5'243	316	Unident. bacterium (env)	AB021325	97,468	97,152 AF125090 <i>Tetrasphaera australiensis</i>	VI 73
VI 75	5'243	187	<i>Calothrix</i> Cyanobakterium	CSPAG13R	100		VI 75

Tabelle A 22. Ergebnisse der Sequenzierung der Klonserie VII aus E00-6 *Haliclona valliculata* von Elba

Name	Primer	Länge	Nächster Verwandter nach FASTA3	EMBL-Nummer	Übereinstimmung %	Nächstverwandter Planctomycetales %, EMBL-Nummer	Datei
VII 2	5'243 5'534	712	<i>Pirellula</i> sp.	PSP16S139	90,678		C75
VII 5	5'243	414	<i>Pirellula</i> sp.	PSP16S139	89,398		C77
VII 6	5'243 5'534	652	Uncultured bacterium	AF280862	89,198	87,719 PSP16S139 <i>Pirellula</i> sp. strain 139	C78
VII 7	5'243	444	Uncult. planctomycete	UPL297459	91,422	90,745 PSP16S139 <i>Pirellula</i> sp. strain 139	C79
VII 11	5'243	494	Uncult. planctomycete	UPL297459	89,537	88,687 PSP16S158 <i>Pirellula</i> sp. strain 158	C80
VII 12	5'243	396	Uncult. marine eubacterium (env)	AF159640	90,816	86,398 PPHCP1 <i>Pirellula</i> sp.	C81
VII 14	5'243	461	<i>Pirellula</i> sp.	PSP16S139	88,865		C82
VII 15	5'243	451	Uncult. Planctomycete	UPL297459	90,909	90,466 PSP16S139 <i>Pirellula</i> sp. strain 139	C83
VII 16	5'243	435	Uncult. Planctomycete	UPL297459	91,284	90,367 PSP16S139 <i>Pirellula</i> sp. strain 139	C84
VII 18	5'243 5'534	755	<i>Pirellula</i> sp.	PSP16S139	91,413		C85

Fortsetzung Tabelle A 22 von Seite 176							
Name	Primer	Länge	Nächster Verwandter nach FASTA3	EMBL-Nummer	Übereinstimmung %	Nächstverwandter Planctomycetales %, EMBL-Nummer	Datei
VII 19	5'243 5'534	623	Uncult. hydro-carbon seep bacterium	AF154092	90,080	89,301 PSP16S139 <i>Pirellula</i> sp. strain 139	C86
VII 20	5'243	437	Uncult. hydro-carbon seep bacterium	AF154092	88,838	88,610 PSP16S139 <i>Pirellula</i> sp. strain 139	VII 20
VII 23	5'243	423	<i>Pirellula</i> sp.	PSP16S139	88,941		VII 23
VII 26	5'243	412	<i>Pirellula</i> sp.	PSP16S139	89,372		VII 26
VII 28	5'243	451	<i>Pirellula</i> sp.	PSP16S139	89,286		VII 28
VII 29	5'243	459	Uncult. Planctomycete	UPL297459	90,652	90,110 PSP16S139 <i>Pirellula</i> sp. strain 139	VII 29
VII 30	5'243	414	Uncult. Planctomycete	UPL297459	90,821	60,602 PSP16S139 <i>Pirellula</i> sp. strain 139	VII 30
VII 32	5'243	318	Uncult. Planctomycete	UPL297459	92,381	91,483 PSP16S139 <i>Pirellula</i> sp. strain 139	VII 32
VII 34	5'243	319	Uncult. marine eubacterium	AF159638	90,909	85,000 DSP16S <i>Desulfovibrio</i> sp.	VII 34
VII 35	5'243	455	Uncult. Planctomycete	UPL297459	88,403	88,300 PSP16S139 <i>Pirellula</i> sp. strain 139	VII 35
VII 39	5'243	446	Uncult. Planctomycete	UPL297459	90,869	89,978 PSP16S139 <i>Pirellula</i> sp. strain 139	VII 39
VII 41	5'243	323	Uncult. Planctomycete	UPL297459	91,358	90,432 PSP16S139 <i>Pirellula</i> sp. strain 139	VII 41
VII 44	5'243	435	Uncult. Planctomycete	UPL297459	89,450	88,991 PSP16S139 <i>Pirellula</i> sp. strain 139	VII 44
VII 45	5'243	267	Uncult. Planctomycete	UPL297459	91,386	91,011 PSP16S139 <i>Pirellula</i> sp. strain 139	VII 45
VII 47	5'243	369	<i>Pirellula</i> sp.	PSP16S139	91,892		VII 47
VII 48	5'243	406	<i>Pirellula</i> sp.	PSP16S139	91,176		VII 48
VII 49	5'243	464	<i>Pirellula</i> sp.	PSP16S139	89,849		VII 49
VII 52	5'243	407	<i>Pirellula</i> sp.	PSP16S139	91,198		VII 52
VII 53	5'243	369	<i>Pirellula</i> sp.	PSP16S139	91,892		VII 53
VII 55	5'243	460	<i>Pirellula</i> sp.	PSP16S139	89,059		VII 55
VII 58	5'243	446	Uncult. Planctomycete	UPL297459	90,604	90,157 PSP16S139 <i>Pirellula</i> sp. strain 139	VII 58
VII 59	5'243	287	Uncult. Planctomycete	UPL297459	91,189	90,592 PSP16S139 <i>Pirellula</i> sp. strain 139	VII 59
VII 60	5'243	440	<i>Pirellula</i> sp.	PSP16S139	89,091		VII 60
VII 61	5'243	347	Uncult. Planctomycete	UPL297459	91,359	91,066 PSP16S139 <i>Pirellula</i> sp. strain 139	VII 61
VII 63	5'243	332	Uncult. Planctomycete	UPL297459	92,638	91,265 PSP16S158 <i>Pirellula</i> sp. strain 158	VII 63
VII 64	5'243	338	Uncult. planctomycete	AF259633	94,012	92,330 PMIFAM16S <i>Pirellula marina</i>	VII 64
VII 65	5'243	371	Uncult. bacterium	AF280862	89,516	89,247 PSP16S139 <i>Pirellula</i> sp. strain 139	VII 65
VII 66	5'243	397	<i>Pirellula</i> sp.	PSP16S139	89,924		VII 66
VII 67	5'243	228	<i>Pirellula</i> sp.	PSP16S139	94,248		VII 67
VII 69	5'243	296	Unident. bacterium (env)	AB015577	87,797	79,730 SSD916 <i>Synechocystis</i> sp.	VII 69
VII 70	5'243	450	Uncult. Planctomycete	UPL297459	90,625	89,732 PSP16S139 <i>Pirellula</i> sp. strain 139	VII 70
VII 72	5'243	411	<i>Pirellula</i> sp.	PSP16S139	90,709		VII 72

A 3.2.3 Liste der Referenzsequenzen

Tabelle A 23. Liste der Referenzsequenzen aus der EMBL-Datenbank

Name	EMBL-Nummer	Länge
<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	U75647	1465
<i>Aeromicrobium erythreum</i>	AF005021	1474
<i>Alteromonas macleodii</i>	AMY18228	1492
<i>Aquaspirillum gracile</i>	AF078753	1487
<i>Arthrobacter atrocyanus</i>	AARDNA16	1472
<i>Arthrobacter citreus</i>	ACRDNA16	1475
<i>Arthrobacter globiformis</i>	AGRDNA16	1464
<i>Arthrobacter histidinolorans</i>	AHRNA16S	1480
<i>Arthrobacter ilicis</i>	AIRNA16S	1486
<i>Arthrobacter psychrolactophilus</i>	AF134183	1306
<i>Arthrobacter</i> sp. S23H2	AF041789	1446
<i>Atopobium minutum</i>	LMSSRNA	1526
<i>Bacillus subtilis</i> strain KL-073	AY030330	1493
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	S83624	1532
<i>Bifidobacterium longum</i>	BLRR16SK	1477
<i>Brachybacterium</i> sp. S21F1	AF041790	1436
<i>Brevibacterium avium</i>	BAV17962	1394
<i>Brevibacterium casei</i>	BC16SRNA	1440
<i>Brevibacterium epidermis</i>	BE16SRN2	1482
<i>Brevibacterium helvolum</i>	BH16SR	1462
<i>Brevibacterium iodinum</i>	BI16RNA	1485
<i>Brevibacterium linens</i>	BL16SR	1473
<i>Brevibacterium mcbrellneri</i>	BM16SRRN1	1404
<i>Brevibacterium otitidis</i>	BO16SRRN1	1380
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	CA16SRRN1	1401
<i>Collinsella aerofaciens</i>	AJ245920	1417
<i>Coriobacterium glomerans</i>	X79048	1435
<i>Corynebacterium xerosis</i>	AF024653	1444
<i>Cytophaga marinoflava</i>	CMRR16SG	1479
<i>Eggerthella lenta</i>	AF292375	1500
<i>Escherichia coli</i>	ECRRD	1541
<i>Frankia</i> sp. strain L27	FSSSRNA	1461
<i>Gardnerella vaginalis</i>	GVRN16S	1477
<i>Gemmata obscuriglobus</i>	GO16S633	1462
<i>Gemmata obscuriglobus</i>	G231191	1446
<i>Gordonia aichiensis</i>	GA16SR	1469
<i>Gordonia amarae</i>	GARRNA16S	1452
<i>Gordonia bronchialis</i>	GB16RNA1	1393
<i>Gordonia hirsuta</i>	GH16SRR	1461
<i>Gordonia rubropertinctus</i>	GR16RNA1	1400
<i>Gordonia sputi</i>	GS16RNA1	1320
<i>Gordonia terrae</i>	GT16S	1356
<i>Isosphaera pallida</i>	I231195	1470
<i>Isosphaera</i> sp. 640	ISP16S640	1490
<i>Methanobacterium bryantii</i>	AF028688	1476
<i>Micrococcus luteus</i>	MLRRSS	1526
<i>Micrococcus lylae</i>	MLRDNA16	1472
<i>Micrococcus</i> sp.	MS1F1516S	1373
<i>Micrococcus</i> sp. NBF9, marin	AF343930	732
<i>Micromonaspora aurantiaca</i>	MA16RRNA	1476
<i>Micromonaspora brunnescens</i>	MB16RRN	1464
<i>Micromonaspora carbonacea</i>	MC16RRNA	1476
<i>Micromonaspora chalcea</i>	MCRRN16S	1477
<i>Micromonaspora chersinia</i>	MCH16RRNA	1477
<i>Micromonaspora echinoaurantiaca</i>	MEA16SRRN	1474
<i>Micromonaspora fulvoviolaceus</i>	MF16RRNA	1474
<i>Micromonaspora globosa</i>	MGRRNA16S	1470
<i>Micromonaspora halophytica</i>	MH16RRNA	1476
<i>Micromonaspora halophytica</i>	MHN16RRNA	1468
<i>Micromonaspora lacustris</i>	MLA16RRNA	1476

Fortsetzung Tabelle A 23 von Seite 178		
Name	EMBL-Nummer	Länge
<i>Micromonaspora megalomicea</i>	MMM16RRNA	1480
<i>Micromonaspora narushino</i>	MN16RRNA	1476
<i>Mycobacterium</i>	Knibb et al. 1993	584
<i>Mycobacterium asiaticum</i>	MASI16S	1468
<i>Mycobacterium aurum</i>	MAUR16S	1458
<i>Mycobacterium austroafricanum</i>	MA16SRRR	1462
<i>Mycobacterium avium</i>	MAV16SRN	1465
<i>Mycobacterium chitae</i>	MCHI16S	1457
<i>Mycobacterium chlorophenolicus</i>	MCPCP116	1532
<i>Mycobacterium confluentis</i>	MC16SRNAD	1335
<i>Mycobacterium conspicuum</i>	MCR16SRNA	1433
<i>Mycobacterium cookii</i>	MCO16S	1459
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	MCH16SRN	1449
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	MTU16SRN	1464
<i>Nitrospira marina</i>	NM16SR1	1482
<i>Nocardia asteroides</i>	NA16SR	1471
<i>Nocardia brasiliensis</i>	NB16SR	1465
<i>Nocardia carnea</i>	NC16SR	1463
<i>Nocardia farcinica</i>	NF16SR	1465
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	NOSSRNA	1460
<i>Nocardia pseudosporangifera</i>	NP16SRRNA	1472
<i>Nocardia transvalensis</i>	NT16SR	1472
<i>Nostocoida limicola</i> III	AF244748	1485
<i>Pirellula marina</i>	PMIFAM16S	1503
<i>Pirellula</i> sp.	AF099714	1501
<i>Pirellula</i> sp. 1	PSPRNA16	1516
<i>Pirellula</i> sp. 516	PSP16S516	1495
<i>Pirellula</i> sp. 678	PSP16S678	1501
<i>Pirellula</i> ssp. 158	PSP16S158	1496
<i>Pirellula staleyi</i>	P231183	1477
<i>Planctomyces brasiliensis</i>	P231190	1447
<i>Planctomyces maris</i>	P231184	1504
<i>Planctomyces</i> sp. 642	PSP16S642	1519
<i>Planctomyces</i> ssp. 269	PSP16S269	1479
<i>Planctomyces</i> ssp. 559	P231189	1491
<i>Planctomyces</i> ssp. 664	PSP16S	664
<i>Planctomycete</i> strain 116	P231181	1466
<i>Planctomycete</i> strain 553	P231178	1458
<i>Planctomycete</i> strain 610	P231170	1485
<i>Propionibacterium acnes</i>	PACN16S	1359
<i>Pseudonocardia thermophila</i>	PT16S	1299
<i>Rhodococcus coprophilus</i>	RC16RNA3	1321
<i>Rhodococcus corynebacterioides</i>	RCO16SR	1322
<i>Rhodococcus equi</i>	RERR16S	1360
<i>Rhodococcus erythreus</i>	RE43066RR	1476
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	RE16RNA1	1314
<i>Rhodococcus fascians</i>	RF16RNA1	1314
<i>Rhodococcus</i> sp.	RS16SJ27	1467
<i>Rhodococcus</i> sp. , marin	AB010913	1480
<i>Rickettsia prowazekii</i>	RPGGSA	1508
<i>Rubrobacter radiotolerans</i>	AJ243870	1504
<i>Saccharopolyspora retivirgula</i>	SR16SRNAB	1427
<i>Slackia exigua</i>	AF101240	1465
<i>Sphaerobacter thermophilus</i>	X53210	1208
<i>Streptomyces albulus</i>	AB024440	1488
<i>Streptomyces coelicolor</i>	SC16SRNA	2300
<i>Streptomyces griseocarneum</i>	SG16SRRN2	1515
<i>Streptomyces griseus</i>	SY15501	1478
<i>Streptomyces intermedius</i>	SIZ76686	1474
<i>Streptomyces sampsonii</i>	SS16SRR10	1531
<i>Streptosporangium amethystogenes</i>	SA16S4317	1449
<i>Streptosporangium fragile</i>	SFU48992	1412
<i>Synechococcus elongatus</i>	SE16SRRN1	1453

Fortsetzung auf Seite 180

Fortsetzung Tabelle A 23 von Seite 179		
Name	EMBL-Nummer	Länge
Uncultured actinobacterium OCS155, marin	AF001652	1433
Uncultured actinobacterium SAR432, marin	AF110142	1514
uncultured actinobacterium, marin	AF367391	563
uncultured bacterium ACE-33, marin	AF142808	1002
Uncultured sponge symbiont PAUC32f	AF186411	1471
Unkultivierter <i>Synechococcus</i>	AF245618	1446

Tabelle A 24. Verwendete Datenbanken.

Datenbank	Methode	Anzahl der eingetragenen Actinobakterien
EMBL	16S rDNA	19888
MIS	Fettsäure mit MIDI	170
GP	Substratverwertung mit BIOLOG	339*

* = Die GP-Datenbank von BIOLOG beinhaltet auch die Gruppe der alle Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt.

A 3.3 Identifikation der Isolate durch das BIOLOG-System

Tabelle A 25. Identifikationen von Isolaten mittels BIOLOG-Test unter Angabe der Similaritätsindice.

Schwamm-Isolat	Gruppe	Identifikation durch BIOLOG	Similaritätsindex
HO-2a16b	7-1	<i>Corynebacterium aquaticum</i> A	0,592
HO-4c5	7-1	<i>Corynebacterium aquaticum</i> A	0,631
HOB-2aa6	7-1	<i>Corynebacterium aquaticum</i> A	0,549
HOB 2ac5	7-1	<i>Corynebacterium aquaticum</i> B	0,570
HOB 2ac21	7-3	<i>Gordonia terrae</i>	0,562
HOB-4ac5	6-3	<i>Cellulomonas fimi</i>	0,722
HOB-3ad32	6-1	<i>Micrococcus luteus</i>	0,729
HOB-4ad13	6-1	<i>Micrococcus luteus</i>	0,879
HK 1z28	1-1	CDC Group E	0,620
HK-2z47	6-1	<i>Micrococcus luteus</i>	0,597
HK 3z29	7-5	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	0,628
N99-2 v2	7-1	<i>Corynebacterium jeikeium</i> A	0,666
N99-7 1t1	7-1	<i>Corynebacterium aquaticum</i> A	0,619
N99-7 1w1	6-8	<i>Microbacterium arborescens</i>	0,506
N99-6 ea17a g I	6-8	CDC Group A-5	0,562
N99-6 1ea4 II	Low GC	<i>Lactococcus lactis</i> ss <i>hordniae</i>	0,529
N99-6 eb2 II	Low GC	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	0,817
N99-6 eb2 IV	Low GC	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	0,581
N99-6 ed17gelb	7-1	<i>Corynebacterium aquaticum</i> B	0,607
N99-6 sa34 II	Low GC	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	0,791
N99-6 t2 w	7-1	<i>Corynebacterium propinquum</i> CDC Anf-3	0,556
N99-6 1v4	7-1	<i>Corynebacterium jeikeium</i> A	0,828
N99-8 1s16	7-1	<i>Caseobacter polymorphus</i>	0,725
N99-8 1sa20 gl	7-1	<i>Corynebacterium aquaticum</i> A	0,509
N99-8 1v57	7-1	<i>Corynebacterium propinquum</i>	0,549
N99-8 1v80 gel	6-8	<i>Aureobacterium testaceum</i>	0,534
N99-8 1v80 ora	7-1	<i>Corynebacterium aquaticum</i> A	0,663

Tabelle A 26. Einteilung pathogener Bakterien in CDC-Gruppen durch die Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

CDC-Gruppe	Bakterium
E	<i>Actinomyces radingael turicensis</i>
A 5	<i>Microbacterium</i> spp.

A 3.4 Einsatz verschiedener Methoden zur Identifikation und Diversitätsanalyse

Tabelle A 27. Isolate mit Mehrfachidentifikationen durch Sequenzierung, Fettsäureanalyse und Substratverwertung.

Schwamm-Isolat	Gruppe	Identifikation durch Sequenzierung, Fettsäure (MIDI) und BIOLOG
HO-3a9 gelb	6-1 6-1	<i>Micrococcus luteus</i> 100 <i>Micrococcus luteus</i> 0,665 (99,51)
HO-b17	11-1 11-1	<i>Streptomyces somaliensis</i> 99,813 <i>Streptoverticillium reticulum</i> 0,440 (98,71)
HO-2c8	7-5 7-5	<i>Rhodococcus</i> sp. 98,017 <i>Nocardia otitidiscaviarum</i> 0,542 (98,53)
HO-2c8b	6-1 7-5	<i>Arthrobacter</i> sp. 98,671 <i>Nocardia otitidiscaviarum</i> 0,547 (98,38)
HO-3c11	7-5 7-6	<i>Rhodococcus fascians</i> 97,605 <i>Tsukamurella paurometabolum</i> 0,681 (98,53)
HO-4c4	6-1 6-1	<i>Micrococcus luteus</i> 99,387 <i>Micrococcus luteus</i> 0,525 (100)
HOB-2aa6	6-1 7-1	<i>Arthrobacter globiformis</i> 0,620 (100) <i>Corynebacterium aquaticum A</i> 0,549
HOB 2aa29	6-2 6-8	<i>Brevibacterium helvolum</i> 100 <i>Microbacterium liquefaciens</i> 0,311 (98,04)
HOB-2ab49a	6-2 7-1	<i>Brevibacterium helvolum</i> 98,864 <i>Corynebacterium bovis</i> 0,454 (97,66)
HOB 3ab11	6-1 8-1	<i>Micrococcus luteus</i> 98,880 <i>Micromonospora carbonacea</i> 0,413 (97,19)
HOB-4ab6	6-1	Uncultured bacterium (env) 96,783 <i>Micrococcus lylae</i> 0,697 (100)
HOB 2ac4	6-2 7-1	<i>Brevibacterium helvolum</i> 99,636 <i>Corynebacterium aquaticum</i> 0,506 (100)
HOB 2ac5	6-8 7-1	<i>Microbacterium liquefaciens</i> 0,786 (100) <i>Corynebacterium aquaticum B</i> 0,570
HOB 2ac11	6-2 7-1	<i>Brevibacterium helvolum</i> 96,096 <i>Corynebacterium bovis</i> 0,327 (99,63)
HOB-2ac19	7-3 7-5	<i>Gordonia terrae</i> 99,760 <i>Nocardia asteroides</i> 0,744 (90,58)
HOB 2ac21	7-3 7-5 7-3	<i>Gordonia terrae</i> 99,811 <i>Nocardia asteroides</i> 0,767 (98,92) <i>Gordonia terrae</i> 0,562
HOB 3ac5	6-1 6-1	<i>Micrococcus luteus</i> 99,448 <i>Micrococcus lylae</i> 0,742 (96,24)
HOB 3ac9	6-1 6-1	<i>Micrococcus psychrophilum</i> 95,055 <i>Micrococcus luteus</i> 0,563 (99,68)
HOB-3ac19	7-5 7-5	<i>Rhodococcus</i> sp. 100 <i>Rhodococcus fascians</i> 0,556 (96,27)
HOB-4ac9	6-1 6-1	<i>Micrococcus luteus</i> 100 <i>Arthrobacter agilis</i> 0,459 (100)
HOB 3ad20	6-2 7-1	<i>Brevibacterium helvolum</i> 99,759 <i>Corynebacterium bovis</i> 0,377 (100)
HOB-3ad32	7-5 6-1	<i>Nocardia restricta</i> 0,421 (88,54) <i>Micrococcus luteus</i> 0,729
HOB 4ad12	6-2 7-1	<i>Brevibacterium helvolum</i> 99,392 <i>Corynebacterium bovis</i> 0,578 (96,63)
HOB-4ad13	6-1 6-1 6-1	<i>Micrococcus luteus</i> 99,350 <i>Micrococcus luteus</i> 0,491 (100) <i>Micrococcus luteus</i> 0,879
HK x82	7-5 7-5	<i>Rhodococcus fascians</i> 99,716 <i>Rhodococcus fascians</i> 0,634 (99,63)
HK x86	7-5 7-5	<i>Nocardia calcarea</i> 99,446 <i>Nocardia restricta</i> 0,474 (100)
HK 1x25	7-5 7-5	<i>Rhodococcus</i> sp. 100 <i>Rhodococcus fascians</i> 0,309 (100)
HK 1x26	6-2 6-3	<i>Brevibacterium helvolum</i> 99,587 <i>Cellulomonas flavigena</i> 0,426 (99,36)
HK 1x54	7-5 7-6	<i>Rhodococcus</i> sp. 99,905 <i>Tsukamurella paurometabolum</i> 0,345 (100)
HK 1x60	7-5 7-5	<i>Rhodococcus fascians</i> 99,229 <i>Rhodococcus fascians</i> 0,743 (97,62)
HK z1 dunkel	7-5 7-5	<i>Rhodococcus erythreus</i> (92,678) <i>Rhodococcus equi</i> 0,451 (95,78)
HK 1z9	7-5 7-5	<i>Rhodococcus erythreus</i> 99,805 <i>Rhodococcus equi</i> 0,648 (95,06)

Fortsetzung Tabelle A 27 von Seite 181		
Schwamm-Isolat	Gruppe	Identifikation durch Sequenzierung, Fettsäure (MIDI) und BIOLOG
HK 1z28	Low GC	<i>Thermoactinomyces yunnaensis</i> 85,063 CDC Group E 0,620
HK 3z1	7-5 7-5	<i>Rhodococcus</i> sp. 99,530 <i>Rhodococcus fascians</i> 0,806 (97,58)
HK 3z6 ora	6-2 7-1	<i>Brevibacterium helvolum</i> 99,516 <i>Corynebacterium bovis</i> 0,311 (100)
N99-2 v2	11-1 7-1	<i>Streptomyces griseus</i> 98,884 <i>Corynebacterium jeikeium</i> A 0,666
N99-7 1t1	6-3 7-1	<i>Cellulomonas fimi</i> 0,550 (100) <i>Corynebacterium aquaticum</i> A 0,619
N99-6 ea17a g l	6-1	<i>Kocuria kristinae</i> 0,550 (100) CDC Group A-5 0,562
N99-6 ed17gelb	6-8 7-1	<i>Microbacterium liquefaciens</i> 0,835 (100) <i>Corynebacterium aquaticum</i> B 0,607
N99-6 u8	6-1 6-1	<i>Micrococcus luteus</i> 98,825 <i>Micrococcus lylae</i> 0,462 (100)
N99-6 v24 gelb	7-5 7-5	<i>Rhodococcus fascians</i> 100 <i>Nocardia restricta</i> 0,490 (98,09)
N99-6 1v4	11-1 7-1	<i>Streptomyces intermedius</i> 98,047 <i>Corynebacterium jeikeium</i> A 0,828
N99-8 1s16	7-5 7-6 7-1	<i>Rhodococcus fascians</i> 97,525 <i>Tsukamurella paurometabolum</i> 0,410 (100) <i>Caseobacter polymorphus</i> 0,725
N99-8 1sa17	6-1 6-3	<i>Arthrobacter</i> sp. 98,104 <i>Cellulomonas turbata</i> 0,346 (100)
N99-8 1sa18	6-8 6-2	<i>Microbacterium</i> sp. 97,826 <i>Brevibacterium mcbrellneri</i> 0,672 (96,78)
N99-8 1sa20 gl	6-8 7-1	<i>Curtobacterium</i> sp. 98,616 <i>Corynebacterium aquaticum</i> A 0,509
N99-8 1v57	6-8 6-2 7-1	<i>Agrococcus</i> sp. 97,815 <i>Brevibacterium linens</i> 0,738 (98,22) <i>Corynebacterium propinquum</i> 0,549
N99-8 1v80 wei	6-1	Unidentified Actinobacterium 96,376 <i>Kocuria kristinae</i> 0,829 (94,10)
N99-8 1v80 gel	6-8	Unidentified Gram-positive bacterium 97,500 <i>Aureobacterium testaceum</i> 0,534
N99-8 1v80 ora	(7-1) 7-1	Unidentified Coryne-like bacterium 93,981 <i>Corynebacterium aquaticum</i> A 0,663
N99-8 1v93	6-8 6-2	<i>Agrococcus</i> sp. 97,690 <i>Brevibacterium epidermis</i> 0,783 (95,40)

A 3.5 Ergebnisse der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE)

Tabelle A 28. Geleinheiten der Banden in DGGE-Gel a.

Bande	Geleinheiten	Bande	Geleinheiten	Bande	Geleinheiten
aa	6,96	af	12,14	ak	14,64
ab	7,32	ag	12,86	al	15,18
ac	8,04	ah	13,21	am	15,89
ad	8,57	ai	13,93	an	16,25
ae	9,64	aj	14,46	ao	18,93

Tabelle A 29. Geleinheiten der Banden in DGGE-Gel b.

Bande	Geleinheiten	Bande	Geleinheiten	Bande	Geleinheiten
ba	4,23	bi	9,07	bq	12,22
bb	5,00	bj	9,44	br	12,59
bc	6,11	bk	9,63	bs	13,70
bd	6,67	bl	9,81	bt	14,44
be	6,85	bm	10,19	bu	15,19
bf	7,04	bn	10,56	bv	Randeffekt
bg	7,41	bo	11,30	bw	Randeffekt
bh	8,70	bp	11,48		

Tabelle A 30. Geleinheiten der Banden in DGGE-Gel c.

Bande	Geleinheiten	Bande	Geleinheiten	Bande	Geleinheiten
ca	1,92	cl	7,12	cw	11,15
cb	2,69	cm	7,31	cx	11,35
cc	2,88	cn	7,50	cy	11,92
cd	3,65	co	8,08	cz	12,31
ce	4,04	cp	8,27	ca	12,69
cf	4,81	cq	8,46	cb	13,27
cg	5,19	cr	9,23	cc	13,85
ch	5,58	cs	9,62	cd	14,23
ci	6,35	ct	10,00	ce	15,19
cj	6,54	cu	10,78	cg	15,77
ck	6,73	cv	10,96		

A 3.6 Ergebnisse der Untersuchungen auf Antibiotikaproduktion

Tabelle A 31. Ergebnisse der Untersuchung auf Antibiotikaproduktion

Schwamm- Isolat	Agardiffusions- Test	Strichtest			
		Test auf antimikrobielle Aktivität gegen			
	<i>S. lentus</i>	<i>S. lentus</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
E00-13 10 ⁻¹ 1		-	-	-	-
HO-2a16b	-	-	-	-	-
HO-3a3		-	-	-	-
HO-3a21	-	-	+(3d)	-	-
HO-b17		-	-	-	-
HO-b17b II		-	-	-	-
HO-18b I+II		-	-	-	-
HO-2b14		-	-	-	-
HO-2b17		-	-	-	-
HO-3b4	-	-	-	-	-
HO-4b1		-	-	-	-
HO-2c8 I		-	-	-	-
HO-2c8 II		-	-	-	-
HO-3c11		-	-	-	-
HO-4c4		-	-	-	-
HO-4c5	-	+(3+6d)	-	-	-
HOB-2aa6		-	-	-	-
HOB-2aa35c ge		-	-	-	-
HOB-2aa35c w	-	+(3d)	-	-	-
HOB-2aa44		-	-	-	-
HOB-3aa6	-	+(6d)	-	-	-
HOB 1ab12	-	+(6d)	-	-	-
HOB-2ab5		-	-	-	-
HOB-2ab23		-	-	-	-
HOB 2ab23a		-	-	-	-
HOB 2ab30 I		-	-	-	-
HOB 2ab30 II	-	+(3d)	-	-	-
HOB-2ab49a		-	-	-	-
HOB 2ab49	-	+(3d)	-	-	-
HOB 3ab5		-	-	-	-
HOB-3ab7		-	-	-	-
HOB 3ab12	-	+(3d)	-	-	-
HOB-4ab1a		-	-	-	-
HOB-4ab6		-	-	-	-
HOB 2ac4		-	-	-	-
HOB 2ac5		-	-	-	-
HOB 2ac11a		-	-	-	-
HOB 2ac16	-	+(3d)	-	-	-
HOB-2ac19	-	+(6d)	-	-	-
HOB-2ac19 dic		-	-	-	-
HOB 3ac5		-	-	-	-
HOB 3ac11	-	+(3+6d)	-	-	-
HOB-3ac28		-	-	-	-
HOB 3ac35		-	-	-	-
HOB 3ac37	-	?	-	-	-
HOB-4ac5	-	+(3d)	-	-	-
HOB 4ac8		-	-	-	-
HOB-4ac9		-	-	-	-
HOB 4ac11		-	-	-	-
HOB-2ad11a		-	-	-	-
HOB-2ad11b	-	+(3d)	-	-	-
HOB 2ad39	-	+(3d)	-	-	-
HOB-2ad64	-	-	-	-	-
HOB-3ad11	+(3d)	+(3d)	-	-	-
HOB 3ad20	-	+(3+6d)	-	-	-

Fortsetzung auf Seite 185

Fortsetzung Tabelle A 31 von Seite 184					
Schwamm- Isolat	Agardiffusions-Test	Strichtest			
		Test auf antimikrobielle Aktivität gegen			
	<i>S. lentus</i>	<i>S. lentus</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
HOB-3ad32		-	-	-	-
HOB 4ad12		-	-	-	-
HOB-4ad13		-	-	-	-
N99-2 v2		-	-	-	-
N99-6 ab7g	+(3d)	+(3d)	-	-	-
N99-6 ac9		-	-	-	-
N99-6 ea17a g I	+(3d)	+(3+6d)	-	-	-
N99-6 ea17b s		-	-	-	-
N99-6 1ea4 I	-	-	-	-	-
N99-6 1ea4 II	+(3d)	+(3+6d)	-	-	-
N99-6 eb2 I	+(3d)	+(3+6d)	+(6d)	-	-
N99-6 eb2 II	-	-	-	-	-
N99-6 eb2 III	-	-	-	-	-
N99-6 eb2 IV	+(3d)	+(3+6d)	+(6d)	-	-
N99-6 ec5	-	-	-	-	-
N99-6 ed2		-	-	-	-
N99-6 ed17gelb	n.m.	+(3d)	-	-	-
N99-6 1eg4		-	-	-	-
N99-6 1eg4al		-	-	-	-
N99-6 1eg4all		-	-	-	-
N99-6 s17	-	+(3d)	-	-	-
N99-6 sa9		-	-	-	-
N99-6 sa34	-	-	-	-	-
N99-6 sa34 I	-	-	-	-	-
N99-6 sa34 II	+(3d)	+(3+6d)	+(6d)	-	-
N99-6 t2 w	+(3d)	+(3d)	-	-	-
N99-6 t17	-	+(3d)	-	-	-
N99-6 u8 I		-	-	-	-
N99-6 u8 II		-	-	-	-
N99-6 u18	-	+(3d)	-	-	-
N99-6 v24 gelb		-	-	-	-
N99-7 1t1		-	-	-	-
N99-7 1w1		-	-	-	-
N99-8 1r2	-	+(3d)	-	-	-
N99-8 1s16		-	-	-	-
N99-8 1sa17		-	-	-	-
N99-8 1sa18		-	-	-	-
N99-8 1sa20 gl		-	-	-	-
N99-8 1sa20 kr		-	-	-	-
N99-8 1sa21	-	+(3d)	-	-	-
N99-8 1v80 wei		-	-	-	-
N99-8 1v80 gel		-	-	-	-
N99-8 1v80 ora		-	-	-	-
N99-8 1v93		-	-	-	-
Na-HK x82		-	-	-	-
Na-HK x86		-	-	-	-
Na-HK x86 flü		-	-	-	-
Na-HK x86 fest		-	-	-	-
Na-HK 1x25		-	-	-	-
Na-HK 1x26		-	-	-	-
Na-HK 1x37		-	-	-	-
Na-HK 1x39		-	-	-	-
Na-HK 1x50		-	-	-	-
Na-HK 1x51		-	-	-	-
Na-HK 1x54		-	-	-	-

Fortsetzung Tabelle A 31 von Seite 185					
Schwamm-Isolat	Agardiffusions-Test	Strichtest			
	Test auf antimikrobielle Aktivität gegen				
	<i>S. lentus</i>	<i>S. lentus</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
Na-HK 1x60		-	-	-	-
Na-HK z1		-	-	-	-
Na-HK z1 hell		-	-	-	-
Na-HK 1z9		-	-	-	-
Na-HK 1z28		-	-	-	-
Na-HK 1z38		-	-	-	-
Na-HK 1z57		-	-	-	-
Na-HK 2z3	-	+(6d)	-	-	-
Na-HK-2z47	-	+(3d)	-	-	-
Na-HK 3z1		-	-	-	-
Na-HK 3z6 ora	-	-	-	-	-
Na-HK 3z17	-	+(3d)	-	-	-
Na-HK 3z29	+(3d)	+(6d)	-	-	-
Na-HK-3z31c		-	-	-	-
E99-3 4z1		-	-	-	-

+ = Aktivität, - = keine Aktivität, n.m. = nicht gemessen, 3d = nach 3 Tagen Kultivierung, 6d = nach 6 Tagen Kultivierung

A 3.7 Lichtmikroskopie

Tabelle A 32. Liste der mikroskopierten Isolate.

Schwamm-Isolat	Zelltyp	Gruppe	Identifizierung durch Sequenzierung, Fettsäure (MIDI) und BIOLOG
E99-3 4z2	A		
N99-6 eb2 III	A		
N99-6 sa34 I	A		
HOB-2ac19 dic	A	7-3	<i>Gordonia terrae</i> 99,335
N99-6 ac9	A		
HK-2z47	A	6-1	<i>Micrococcus luteus</i> 0,597 (6,27)
N99-6 eb2 I	A		
N99-6 1ea4	A	6-1	<i>Kocuria varians</i>
N99-6 ec5	A	Low GC	<i>Bacillus</i> sp. 93,909
HOB 2aa29	A	6-2	<i>Brevibacterium helvolum</i> 100
HO-2b17	A	6-2	<i>Brevibacterium helvolum</i> 99,005
HO-3b4	A	6-2	<i>Brevibacterium helvolum</i> 99,268
HOB 4ad12	A	6-2	<i>Brevibacterium helvolum</i> 99,392
HK 3z6 ora	A	6-2	<i>Brevibacterium helvolum</i> 99,516
HK 1x26	A	6-2	<i>Brevibacterium helvolum</i> 99,587
HOB 2ac4	A	6-2	<i>Brevibacterium helvolum</i> 99,636
HOB 3ad20	A	6-2	<i>Brevibacterium helvolum</i> 99,759
HO-2a16b	A	7-1	<i>Corynebacterium aquaticum</i> A 0,592 (6,35)
HOB 3ab5	A	7-1	<i>Brevibacterium helvolum</i>
HOB 3ac35	A	7-1	<i>Brevibacterium helvolum</i>
HO-3a11	A	6-8	<i>Microbacterium laevaniformans</i> 0,455 (100)
HOB 3ac37	A	6-8	<i>Brevibacterium helvolum</i>
N99-6 ed17gelb	A	6-8	<i>Microbacterium liquefaciens</i> 0,835 (100)
N99-6 ed17	A	6-8	<i>Microbacterium liquefaciens</i> 0,860 (98,82)
HK x86 fest	A	7-5	<i>Rhodococcus erythreus</i> 99,614
N99-8 1s16	A	7-5	<i>Rhodococcus fascians</i> 97,525
HO-b18	A	7-5	<i>Rhodococcus fascians</i> 99,605
HK 1x50	A	7-5	<i>Rhodococcus fascians</i> 99,732
HO-2c8	A	7-5	<i>Rhodococcus</i> sp. 98,017
HK 1x37	A	7-5	<i>Rhodococcus</i> sp. 99,522
HK 1x54	A	7-5	<i>Rhodococcus</i> sp. 99,905
N99-6 ab7grau	A	Low GC	<i>Thermoactinomyces dichotomicus</i> 86,986
HK 2z3	A	7-8	<i>Clavibacter michiganese</i> 0,657 (100)
HK 1z28	A	Low GC	<i>Thermoactinomyces yunnaensis</i> 85,063
HOB-2ab5	A	6-2	<i>Microbacterium liquefaciens</i>
E99-3 1b4	A	Low GC	<i>Bacillus mycoides</i> 94,764
HO-3a9 glatt	B	6-1	<i>Arthrobacter</i> sp. 99,718
N99-6 ea17b s	B	Low GC	<i>Bacillus acidovorans</i> 87,417
N99-7 1t1	B	6-3	<i>Kocuria varians</i>
N99-6 s22	B	6-3	<i>Cellulomonas turbata</i> 0,524 (100)
HOB 2ac21	B	7-3	<i>Gordonia terrae</i> 99,811
HOB-2ad11b	B	7-5	<i>Rhodococcus</i>
HK x86 flü	B	7-5	<i>Nocardia calcarea</i> 99,446
HOB-2ab23	B	7-5	<i>Rhodococcus erythreus</i>
HK 3z29	B	7-5	<i>Rhodococcus erythropolis</i> 0,628 (5,73)
N99-6 v24 gelb	B	7-5	<i>Rhodococcus fascians</i> 100
HO-3c11	B	7-5	<i>Rhodococcus fascians</i> 97,605
HK 1x60	B	7-5	<i>Rhodococcus fascians</i> 99,229
HK x82	B	7-5	<i>Rhodococcus fascians</i> 99,716
HK 1x25	B	7-5	<i>Rhodococcus</i> sp. 100
HK 3z1	B	7-5	<i>Rhodococcus</i> sp. 99,530
HK 1x39	B	7-5	<i>Rhodococcus</i> sp. 99,812
HK 1x51	B	7-5	<i>Rhodococcus</i> sp. 99,903
N99-6 ea17a g I	B	6-1	<i>Brevibacterium helvolum</i>
HO-4c6 (I) 4c6II	B	Low GC	<i>Thermoactinomyces sacchari</i> 87,406
HOB 3ac9gelb	C	6-1	<i>Arthrobacter</i> sp. 99,435

Fortsetzung auf Seite 188

Fortsetzung Tabelle A 32 von Seite 187			
Schwamm-Isolat	Zelltyp	Gruppe	Identifizierung durch Sequenzierung, Fettsäure (MIDI) und BIOLOG
HOB 2ac11 (a)	C	6-2	<i>Brevibacterium helvolum</i> 96,096
HOB 3ad20a or	C	6-2	<i>Brevibacterium helvolum</i> 98,528
HOB 3ad20a w	C	6-2	<i>Brevibacterium helvolum</i> 99,495
N99-8 1sa18	C	6-8	<i>Microbacterium</i> sp. 97,826
HOB 2ab1a	C	6-1	<i>Micrococcus luteus</i>
HO-4b1	C	6-1	<i>Micrococcus psychrophilum</i> 98,291
HOB-3ad32	C	7-5	<i>Rhodococcus erythreus</i>
HK 1z9	C	7-5	<i>Rhodococcus erythreus</i> 99,805
N99-8 1sa17	C	6-1	<i>Arthrobacter</i> sp. 98,104
E99-5 1b5	D		
HOB 3ac11	D		
HO-4c9	D	6-3	<i>Cellulomonas fimi</i> 0,389 (99,68)
N99-7 1w1	D	6-8	<i>Microbacterium arborescens</i> 0,506 (7,80)
HOB-3ab7	D	6-8	<i>Brevibacterium helvolum</i>
N99-6 1eg4	D	6-1	<i>Micrococcus luteus</i> 0,514 (100)
HO-3c4	D	6-1	<i>Micrococcus luteus</i> 0,872 (100)
HO-3a9 gelb	D	6-1	<i>Micrococcus luteus</i> 100
HOB-4ad13	D	6-1	<i>Micrococcus luteus</i> 99,350
HO-4c4	D	6-1	<i>Micrococcus luteus</i> 99,387
HOB 3ac5	D	6-1	<i>Micrococcus luteus</i> 99,448
HO-3c7	D	6-1	<i>Micrococcus luteus</i> 99,537
N99-6 1eg4al	D	6-1	<i>Micrococcus luteus</i>
HOB 4ac8	D	6-1	<i>Micrococcus luteus</i>
N99-6 4eg2	D	6-1	<i>Micrococcus luteus</i>
HOB-4ab6	D		Uncultured bacterium (env) 96,783
HOB-4ab1a	E	6-1	<i>Microbacterium liquefaciens</i>
HOB 2ac5	E	6-8	<i>Microbacterium liquefaciens</i> 0,786 (100)
N99-6 u8	E	6-1	<i>Micrococcus luteus</i> 98,825
HOB 3ad10	E	7-4	<i>Mycobacterium chlorophenolicus</i> 98,210
HK z1 hell	E	7-5	<i>Nocardia calcarea</i> 99,903
HK z1 dunk	E	7-5	<i>Rhodococcus erythreus</i> 92,678
HOB-3ac19	E	7-5	<i>Rhodococcus</i> sp. 100
HOB-2aa35c w	E		
HOB-2aa35c ge	E	6-8	<i>Microbacterium liquefaciens</i> 0,513 (100)
N99-6 ab7weiß	E	Low GC	<i>Bacillus acidovorans</i> 87,211
HOB 3ac9	E	6-1	<i>Micrococcus psychrophilum</i> 95,055
HOB-3aa6	F	7-5	<i>Rhodococcus</i> sp. 98,186
HO-2c10	G	11-1	<i>Streptomyces albulus</i> 97,911
HO-b17b II	G	11-1	<i>Streptomyces sampsonii</i> 99,376
HO-b17	G	11-1	<i>Streptomyces somaliensis</i> 99,813
N99-6 ef12	H	8-1	<i>Micromonospora halophytica</i> 97,952
HOB 2ab30 II	H		
HO-3a8	H		
N99-8 1v93	H	6-8	<i>Agrococcus</i> sp. 97,690
HOB-2ab49a	H	6-2	<i>Brevibacterium helvolum</i> 98,864
HO-3a3 (dop)	H	6-2	<i>Brevibacterium helvolum</i> 99,332
N99-8 1sa20 gl	H	6-8	<i>Curtobacterium</i> sp. 98,616
N99-6 1ea4 II	H	Low GC	<i>Lactococcus lactis</i> ss <i>hordniae</i> 0,529 (6,25)
N99-6 eb2 IV	H	Low GC	<i>Pediococcus pentosaceus</i> 0,581 (5,08)
N99-6 sa34 II	H	Low GC	<i>Pediococcus pentosaceus</i> 0,791 (3,08)
N99-8 1v80 wei	H		Unidentified Actinobaterium 96,376
N99-8 1v80 ora	H	7-1	unidentified Coryne-like bacterium 93,981
N99-8 1v80 gel	H		Unidentified Gram-positive bacterium 97,500
N99-8 1v57	H	6-8	<i>Agrococcus</i> sp. 97,815
HK-3z31c	I		
N99-6 ea20	I		
N99-6 ed17b	I		
N99-6 ed20	I		
N99-6 ed7b	I		
N99-6 u18	I		
N99-6 ed17a	I	12-3	<i>Actinomadura yumaensis</i> 0,309 (100)

Fortsetzung Tabelle A 32 von Seite 188			
Schwamm-Isolat	Zelltyp	Gruppe	Identifizierung durch Sequenzierung, Fettsäure (MIDI) und BIOLOG
N99-6 ed2	I	12-3	<i>Actinomadura yumaensis</i> 0,328 (95,72)
N99-8 1sa21	I		
HO-4c5	I	7-1	<i>Corynebacterium aquaticum</i> A 0,631 (5,69)

A 3.8 Untersuchung auf Salztoleranz

Tabelle A 33. Extinktionen der mit Hilfe der Turbidimetrie auf Salztoleranz untersuchten Isolate.

Isolat	Stunden	0 % NaCl	0,75 % NaCl	1,5 % NaCl	3,4 % NaCl	6,8 % NaCl
E004 3ea4	5,5	0,0720	0,0030	0,0560	0,0440	0,0340
	23,5	0,1230	0,1670	0,1630	0,1330	0,1510
	29,5	0,1340	0,1950	0,1880	0,1780	0,1790
	47,5	0,1690	0,2600	0,2580	0,2230	0,2210
	54,0	0,1910	0,2700	0,2830	0,3030	0,2510
	71,5	0,2060	0,3000	0,3130	0,3380	0,2760
	77,5	0,2510	0,3200	0,3330	0,4630	0,3110
	95,5	0,2660	0,3150	0,3830	0,3580	0,2660
	101,5	0,2710	0,3900	0,3830	0,3930	0,3360
	E00-8E 4ed2	5,5	0,0530	0,0500	0,0440	0,0120
23,5		0,0880	0,0750	0,1060	0,0340	0,0310
29,5		0,1150	0,0850	0,1460	0,0470	0,0560
47,5		0,1650	0,1600	0,1610	0,0790	0,0660
54,0		0,1900	0,1650	0,2060	0,0990	0,0860
71,5		0,2350	0,2130	0,2160	0,1040	0,0860
77,5		0,2700	0,2300	0,2460	0,1140	0,1060
95,5		0,3300	0,2630	0,2510	0,1090	0,0800
101,5		0,3380	0,2750	0,2310	0,1140	0,1260
E00-8E 4ed6		5,5	0,0530	0,0000	0,0370	0,0160
	23,5	0,0880	0,0500	0,0780	0,0480	0,0440
	29,5	0,1080	0,0720	0,1230	0,0700	0,0390
	47,5	0,1650	0,1020	0,1280	0,0780	0,0490
	54,0	0,1830	0,1520	0,1430	0,1430	0,0790
	71,5	0,2180	0,1720	0,1630	0,1320	0,0790
	77,5	0,2580	0,1920	0,1880	0,1680	0,0990
	95,5	0,3030	0,2070	0,1730	0,1080	0,0890
	101,5	0,3030	0,2370	0,1730	0,1480	0,1660
	E99-3 4z1	5,5	0,0270	0,0000	0,0050	0,0000
23,5		0,0080	0,0000	0,0060	0,0150	0,0080
29,5		0,0070	0,0000	0,0200	0,0000	0,0120
47,5		0,0500	0,0350	0,0650	0,0800	0,0160
54,0		0,0820	0,0550	0,1100	0,1280	0,0210
71,5		0,1700	0,0820	0,1700	0,2000	0,1000
77,5		0,2020	0,0950	0,1950	0,2200	0,0620
95,5		0,1510	0,1150	0,1650	0,1850	0,0970
101,5		0,1620	0,1200	0,1880	0,2500	0,1220
HOB 2ab30 II		5,5	0,0390	0,0550	0,0380	0,0430
	23,5	0,0200	0,0630	0,0890	0,0630	0,0860
	29,5	0,0310	0,0590	0,0920	0,0800	0,0780
	47,5	0,0260	0,0820	0,1170	0,0900	0,0590
	54,0	0,0340	0,0820	0,1320	0,1060	0,0570
	71,5	0,0290	0,1230	0,2450	0,1280	0,0730
	77,5	0,0450	0,1090	0,2270	0,1330	0,0650

Fortsetzung auf Seite 190

Fortsetzung Tabelle A 33 von Seite 189						
Isolat	Stunden	0 % NaCl	0,75 % NaCl	1,5 % NaCl	3,4 % NaCl	6,8 % NaCl
	95,5	0,0500	0,1300	0,0890	0,1290	0,0710
	101,5	0,0600	0,1320	0,0840	0,1280	0,0760
HOB 2ab30 I	5,5	0,0010	0,0050	0,0000	0,0000	0,0000
	23,5	0,0010	0,0150	0,0000	0,0000	0,0000
	29,5	0,0000	0,0100	0,0010	0,0000	0,0000
	47,5	0,0110	0,0200	0,0030	0,0010	0,0000
	54,0	0,0050	0,0450	0,0070	0,0030	0,0000
	71,5	0,0150	0,0770	0,0110	0,0120	0,0000
	77,5	0,0280	0,0900	0,0240	0,0220	0,0000
	95,5	0,0500	0,0250	0,0430	0,0230	0,0000
	101,5	0,0500	0,0180	0,0210	0,0220	0,0000
HOB 2ac21	5,5	0,0200	0,0090	0,0090	0,0030	0,0000
	23,5	0,0360	0,0530	0,0640	0,0480	0,0390
	29,5	0,0470	0,0630	0,0590	0,0560	0,0440
	47,5	0,0810	0,0980	0,0850	0,0860	0,0470
	54,0	0,0720	0,1100	0,1090	0,0960	0,0770
	71,5	0,0970	0,1130	0,1140	0,1160	0,0970
	77,5	0,1020	0,1380	0,1290	0,1210	0,0770
	95,5	0,1170	0,1550	0,1390	0,1560	0,1020
	101,5	0,1120	0,1530	0,1420	0,1660	0,1120
HK 1x26	5,5	0,0280	0,0020	0,0120	0,0180	0,0020
	23,5	0,0460	0,0320	0,0740	0,0490	0,0370
	29,5	0,0590	0,0350	0,0940	0,0600	0,0370
	47,5	0,0810	0,0650	0,1340	0,1100	0,0770
	54,0	0,0910	0,0800	0,1560	0,1100	0,0820
	71,5	0,1110	0,0950	0,1860	0,1200	0,1020
	77,5	0,1160	0,0950	0,1810	0,1300	0,0820
	95,5	0,1160	0,1100	0,1860	0,1300	0,1020
	101,5	0,1410	0,1200	0,2040	0,1300	0,1170
HK 1z28	5,5	0,0240	0,0330	0,0450	0,0460	0,0180
	23,5	0,0280	0,0670	0,0850	0,1130	0,1190
	29,5	0,0180	0,0670	0,0890	0,1170	0,1140
	47,5	0,0380	0,1020	0,0940	0,1250	0,1290
	54,0	0,0350	0,1220	0,1040	0,1420	0,1250
	71,5	0,0390	0,1520	0,1240	0,1470	0,1270
	77,5	0,0310	0,1420	0,1310	0,1470	0,1240
	95,5	0,0670	0,1670	0,1440	0,1420	0,1010
	101,5	0,0620	0,1670	0,1420	0,1570	0,1140
HK 1z57	5,5	0,0160	0,0420	0,0440	0,0410	0,0480
	23,5	0,0030	0,1100	0,1330	0,1110	0,1290
	29,5	0,0000	0,1040	0,1240	0,1090	0,1290
	47,5	0,0000	0,0990	0,1290	0,1210	0,1390
	54,0	0,0000	0,1160	0,1340	0,1260	0,1440
	71,5	0,0140	0,1090	0,1370	0,1510	0,1590
	77,5	0,0340	0,1040	0,1390	0,1660	
	95,5	0,0360	0,1200	0,1390	0,1860	0,1640
	101,5	0,0410	0,1340	0,1390	0,1910	0,1840
HK 1z9	5,5	0,0310	0,0055	0,0160	0,0100	0,0120
	23,5	0,1360	0,0905	0,0900	0,0890	0,0620
	29,5	0,1610	0,1275	0,1200	0,1140	0,0770
	47,5	0,3090	0,2675	0,2650	0,2240	0,1220
	54,0	0,3110	0,2875	0,2800	0,2590	0,1450
	71,5	0,3710	0,2925	0,2850	0,2690	0,1770

Fortsetzung Tabelle A 33 von Seite 190						
Isolat	Stunden	0 % NaCl	0,75 % NaCl	1,5 % NaCl	3,4 % NaCl	6,8 % NaCl
	77,5	0,3860	0,3575	0,3900	0,3790	0,1070
	95,5	0,4260	0,3925	0,3400	0,4240	0,1970
	101,5	0,4360	0,4225	0,4300	0,4590	0,2270
HK 2z3	5,5	0,0400	0,0090	0,0200	0,0090	0,0030
	23,5	0,0800	0,0670	0,0930	0,0600	0,0240
	29,5	0,1000	0,0790	0,1030	0,0830	0,0390
	47,5	0,1450	0,1160	0,1480	0,1410	0,0940
	54,0	0,1650	0,1390	0,1630	0,1660	0,1190
	71,5	0,2140	0,1590	0,1580	0,1860	0,1940
	77,5	0,2150	0,1590	0,1780	0,1960	
	95,5	0,2200	0,1850	0,1780	0,1910	0,2790
	101,5	0,2250	0,2040	0,1830	0,2060	0,2940
HK 2z47	5,5	0,0240	0,0000	0,0070	0,0160	0,0030
	23,5	0,0480	0,0650	0,0880	0,0550	0,0330
	29,5	0,0630	0,0770	0,1000	0,0700	0,0500
	47,5	0,0910	0,1130	0,1590	0,1270	0,0830
	54,0	0,0960	0,1620	0,1930	0,1370	0,1010
	71,5	0,1560	0,2370	0,2380	0,1570	0,1130
	77,5	0,1610	0,2320	0,2580	0,1920	0,1240
	95,5	0,1970	0,3020	0,2780	0,2170	0,1350
	101,5	0,2110	0,3170	0,2780	0,2320	0,1580
HK 3z29	5,5	0,0340	0,0120	0,0190	0,0240	0,0040
	23,5	0,1240	0,0980	0,1240	0,1490	0,1190
	29,5	0,1240	0,1490	0,1440	0,1560	0,1540
	47,5	0,1960	0,2870	0,3340	0,2310	0,1690
	54,0	0,2120	0,3220	0,3590	0,2310	0,1940
	71,5	0,2890	0,3670	0,3840	0,3210	0,2040
	77,5	0,2840	0,3520	0,4240	0,3460	
	95,5	0,3440	0,3670	0,4140	0,4310	0,2140
	101,5	0,3440	0,3920	0,4390	0,4310	0,2440
HK 3z31c	5,5	0,0210	0,0000	0,0030	0,0030	0,0000
	23,5	0,0510	0,0470	0,0710	0,0180	0,0000
	29,5	0,0710	0,0500	0,0660	0,0280	0,0060
	47,5	0,1360	0,0550	0,1260	0,0680	0,0000
	54,0	0,1310	0,1040	0,1310	0,0780	0,0000
	71,5	0,1710	0,1300	0,1390	0,0780	0,0030
	77,5	0,1760	0,1300	0,1760	0,1030	
	95,5	0,1660	0,1300	0,1640	0,0780	0,0000
	101,5	0,1760	0,1450	0,1560	0,0840	
HO 2a16b	5,5	0,0000	0,0000	0,0070	0,0000	0,0000
	23,5	0,0000	0,0580	0,0820	0,0920	0,1040
	29,5	0,0010	0,0540	0,0800	0,1020	0,1240
	47,5	0,0020	0,0270	0,0530	0,1150	0,1730
	54,0	0,0060	0,0340	0,0640	0,1210	0,1840
	71,5	0,0050	0,0380	0,0590	0,1330	0,2040
	77,5	0,0050	0,0340	0,0640	0,1420	0,2090
	95,5	0,0070	0,0590	0,0550	0,1390	0,2290
	101,5	0,0060	0,0580	0,0530	0,1470	0,2440
HO 4c5	5,5	0,0045	0,0200	0,0150	0,0000	0,0030
	23,5	0,1065	0,1250	0,1040	0,0690	0,0000
	29,5	0,1025	0,1350	0,1210	0,1200	0,0020
	47,5	0,1065	0,1450	0,1380	0,1200	0,0075
	54,0	0,1005	0,1500	0,1480	0,1210	0,0030

Fortsetzung Tabelle A 33 von Seite 191						
Isolat	Stunden	0 % NaCl	0,75 % NaCl	1,5 % NaCl	3,4 % NaCl	6,8 % NaCl
	71,5	0,1035	0,1850	0,1680	0,1400	0,0060
	77,5	0,1025	0,1800	0,1820	0,1520	0,0000
	95,5	0,1065	0,1900	0,1680	0,1570	0,0000
	101,5	0,1065	0,2000	0,1730	0,1600	0,0030
HO b17	5,5	0,0560	0,0000	0,0040	0,0010	0,0000
	23,5	0,0520	0,0630	0,1090	0,0980	0,0330
	29,5	0,0810	0,1030	0,1190	0,1080	0,0700
	47,5	0,1230	0,1280	0,1480	0,1630	
	54,0	0,1420	0,0880	0,1630	0,1600	0,1650
	71,5	0,1550	0,1080	0,1380	0,2040	0,2050
	77,5	0,1460	0,1180	0,1480	0,2080	0,1660
	95,5		0,0950	0,1320	0,2140	0,2050
	101,5	0,1810	0,0680	0,1230	0,2230	0,2190
HO b17 II	5,5	0,0070	0,0050	0,0120	0,0030	0,0480
	23,5	0,1170	0,1350	0,1580	0,1460	0,0790
	29,5	0,1090	0,1240	0,1550	0,1560	0,1130
	47,5	0,1190	0,1490	0,1680	0,2160	0,2030
	54,0	0,1110	0,1090	0,1430	0,2160	0,2130
	71,5	0,1260	0,1220	0,1110	0,2410	0,2480
	77,5	0,1330	0,1290	0,1030	0,2420	0,2330
	95,5	0,1480	0,1440	0,1110	0,2760	0,2310
	101,5	0,1880	0,1240	0,0940	0,2660	0,2230
HOB 2aa6	5,5	0,0365	0,0280	0,0200	0,0040	0,0000
	23,5	0,0665	0,0590	0,0600	0,0000	0,0000
	29,5	0,0805	0,0810	0,0720	0,0060	0,0000
	47,5	0,1365	0,1280	0,1080	0,0400	0,0000
	54,0	0,1275	0,1380	0,1200	0,0490	0,0000
	71,5	0,1365	0,1430	0,1300	0,0600	0,0000
	77,5	0,1455	0,1330	0,1300	0,0700	0,0000
	95,5	0,1555	0,1430	0,1400	0,0730	0,0000
	101,5	0,1415	0,1430	0,1310	0,0740	0,0000
HOB 2ac5	5,5	0,0490	0,0410	0,0300	0,0240	0,0110
	23,5	0,1040	0,1650	0,1440	0,0990	0,0740
	29,5	0,1440	0,2170	0,1780	0,1190	0,1010
	47,5	0,2140	0,3020	0,2630	0,1510	0,1390
	54,0	0,2390	0,3870	0,3170	0,1640	0,1490
	71,5	0,3240	0,4370	0,3380	0,1740	0,1580
	77,5	0,3340	0,4870	0,3760	0,1840	0,1540
	95,5	0,3670	0,5270	0,4080	0,1740	0,1590
	101,5	0,3790	0,5900	0,4480	0,1740	0,1640
HOB 2ad39	5,5	0,0000	0,0000	0,0020	0,0010	0,0000
	23,5	0,0000	0,0000	0,0730	0,0000	0,0000
	29,5	0,0000	0,0000	0,0280	0,0030	0,0000
	47,5	0,2660	0,1750	0,1670	0,0350	0,0000
	54,0	0,2810	0,1650	0,1670	0,0330	0,0000
	71,5	0,5660	0,1480	0,2370	0,0280	0,0220
	77,5	0,6260	0,1600	0,2470	0,0080	0,0320
	95,5	0,7360	0,2200	0,2820	0,0190	0,0220
	101,5	0,7810	0,2100	0,2220	0,0080	0,0520
HOB 3ad32	5,5	0,0090	0,0000	0,0080	0,0020	0,0000
	23,5	0,0360	0,0240	0,0110	0,0000	0,0040
	29,5	0,0530	0,0300	0,0100	0,0000	0,0030
	47,5	0,0810	0,0470	0,0100	0,0000	0,0130

Fortsetzung Tabelle A 33 von Seite 192						
Isolat	Stunden	0 % NaCl	0,75 % NaCl	1,5 % NaCl	3,4 % NaCl	6,8 % NaCl
	54,0	0,0860	0,0570	0,0190	0,0000	0,0130
	71,5	0,1060	0,0800	0,0250	0,0000	0,0160
	77,5	0,1240	0,0900	0,0320	0,0000	0,0030
	95,5	0,1530	0,1350	0,0880	0,0000	0,0190
	101,5	0,1610	0,1480	0,0110	0,0000	0,0230
HOB 4ac5	5,5	0,0260	0,0320	0,0340	0,0000	0,0000
	23,5	0,0810	0,1090	0,1100	0,0080	0,0000
	29,5	0,0920	0,1060	0,1100	0,0130	0,0000
	47,5	0,1060	0,1230	0,1320	0,0090	0,0000
	54,0	0,0970	0,1360	0,1400	0,0210	0,0000
	71,5	0,1310	0,1370	0,1500	0,0560	0,0000
	77,5	0,0890	0,1430	0,1550	0,0700	0,0000
	95,5	0,0870	0,1410	0,1700	0,0810	0,0000
	101,5	0,0870	0,1380	0,1630	0,0910	0,0010
HOB 4ad13	5,5	0,0130	0,0000	0,0190	0,0170	0,0170
	23,5	0,0380	0,0300	0,1040	0,0440	0,0510
	29,5	0,0420	0,0400	0,0770	0,0670	0,0660
	47,5	0,0540	0,0700	0,0980	0,0160	0,1060
	54,0	0,0680	0,1050	0,1000	0,0800	0,1160
	71,5	0,0680	0,1450	0,0770	0,0300	0,1160
	77,5	0,0990	0,1850	0,1170	0,0600	0,1460
	95,5	0,1300	0,2050	0,1070	0,0250	0,1660
	101,5	0,1230	0,2000	0,1220	0,0490	0,2160
N99-6 1ea4 I	5,5	0,0440	0,0290	0,0510	0,0440	0,0090
	23,5	0,0660	0,0980	0,1060	0,1440	0,1540
	29,5	0,0540	0,0840	0,0810	0,1370	0,1430
	47,5	0,1000	0,0890	0,0910	0,1310	0,1530
	54,0	0,0900	0,0990	0,0960	0,1310	0,1530
	71,5	0,0900	0,1040	0,0910	0,1400	0,1630
	77,5	0,0850	0,0890	0,0860	0,1460	
	95,5	0,0900	0,1040	0,0730	0,1410	0,1630
	101,5	0,0900	0,1040	0,0810	0,1360	0,1730
N99-6 1ea4 II	5,5	0,0695	0,0280	0,0420	0,0530	0,0390
	23,5	0,1000	0,1140	0,1450	0,1340	0,1470
	29,5	0,1170	0,1100	0,1310	0,1240	0,1550
	47,5	0,1040	0,0960	0,1313	0,1650	0,1470
	54,0	0,1120	0,1000	0,1360	0,1480	0,1620
	71,5	0,1570	0,1230	0,1560	0,1740	0,1570
	77,5	0,1440	0,1070	0,1560	0,1640	
	95,5	0,1500	0,1180	0,1360	0,1810	0,1670
	101,5	0,1570	0,1160	0,1310	0,1790	0,1770
N99-6 1eg4	5,5	0,0180	0,0000	0,0140	0,0010	0,0000
	23,5	0,0000	0,0000	0,0110	0,0320	0,0000
	29,5	0,0000	0,0000	0,0340	0,0500	0,0080
	47,5	0,0000	0,0350	0,0140	0,0970	0,0030
	54,0	0,0000	0,0020	0,0620	0,1160	0,0080
	71,5	0,0120	0,0980	0,0890	0,1760	0,0030
	77,5	0,0340	0,1130	0,0990	0,1710	0,0000
	95,5	0,0920	0,1650	0,1130	0,2210	0,0000
	101,5	0,1180	0,1990	0,1410	0,2310	0,0000
N99-6 1v4	5,5	0,0810	0,0410	0,0540	0,0410	0,0320
	23,5	0,1220	0,1420	0,1530	0,1320	0,0750
	29,5	0,1740	0,1850	0,2260	0,1870	0,1000

Fortsetzung Tabelle A 33 von Seite 193						
Isolat	Stunden	0 % NaCl	0,75 % NaCl	1,5 % NaCl	3,4 % NaCl	6,8 % NaCl
	47,5	0,2660	0,2880	0,3060	0,2420	0,0800
	54,0	0,2760	0,3180	0,3360	0,2420	0,1000
	71,5	0,3390	0,3830	0,4210	0,2870	0,0440
	77,5	0,3910	0,4080	0,4060	0,2970	0,0430
	95,5	0,4510	0,4580	0,4360	0,3770	0,0200
	101,5	0,4810	0,4930	0,4560	0,3520	0,0300
N99-6 ab7 g	5,5	0,0670	0,0370	0,0570	0,0350	0,0490
	23,5	0,0590	0,1200	0,1450	0,1240	0,1400
	29,5	0,0660	0,1190	0,1300	0,1190	0,1320
	47,5	0,0650	0,1050	0,1100	0,1130	0,1340
	54,0	0,0740	0,1140	0,1110	0,1240	0,1500
	71,5	0,1250	0,1300	0,1240	0,1590	0,1370
	77,5	0,1320	0,1190	0,1250	0,1490	
	95,5	0,1580	0,1360	0,1460	0,1590	0,1250
	101,5	0,1520	0,1340	0,1420	0,2210	0,1500
N99-6ea17a g	5,5	0,0910	0,0310	0,0620	0,0370	0,0190
	23,5	0,1850	0,1310	0,1560	0,0550	0,0480
	29,5	0,2130	0,1660	0,1810	0,0700	0,0660
	47,5	0,2430	0,2210	0,2360	0,0870	0,1150
	54,0	0,2480	0,2680	0,2660	0,1060	0,1400
	71,5	0,2280	0,3110	0,3060	0,1700	0,1750
	77,5	0,2480	0,3360	0,3310	0,1800	
	95,5	0,2430	0,3810	0,3510	0,2050	0,2050
	101,5	0,2330	0,4010	0,3760	0,3000	0,2350
N99-6 eb2	5,5	0,0040	0,0070	0,0140	0,0090	0,0010
	23,5	0,1180	0,1100	0,1110	0,2120	0,0200
	29,5	0,1240	0,0740	0,1060	0,2110	0,0300
	47,5	0,1080	0,1650	0,1160	0,2350	0,0480
	54,0	0,0830	0,1600	0,1360	0,2350	0,0480
	71,5	0,1380	0,2000	0,2110	0,2190	0,0500
	77,5	0,1630	0,2100	0,2370	0,2650	0,0450
	95,5	0,3180	0,2150	0,2610	0,2550	0,0600
	101,5	0,3580	0,2100	0,2860	0,2700	0,0400
N99-6 eb2 I	5,5	0,0770	0,0260	0,0280	0,0380	0,0260
	23,5	0,0910	0,1090	0,1120	0,1210	0,0840
	29,5	0,0960	0,1030	0,1040	0,1030	0,0910
	47,5	0,0580	0,0780	0,1080	0,0770	0,0590
	54,0	0,0540	0,0830	0,1180	0,1010	0,0490
	71,5	0,0810	0,1220	0,1630	0,1510	0,0590
	77,5	0,0880	0,1110	0,1630	0,1460	
	95,5	0,1490	0,1480	0,1580	0,1760	0,0890
	101,5	0,1010	0,1560	0,1580	0,1810	0,0940
N99-6 eb2 III	5,5	0,0900	0,0320	0,0550	0,0450	0,0270
	23,5	0,0960	0,1170	0,1300	0,1380	0,1100
	29,5	0,0950	0,0820	0,1000	0,1090	0,1080
	47,5	0,0380	0,0970	0,1050	0,1030	0,1150
	54,0	0,0410	0,1020	0,1150	0,1230	0,1250
	71,5	0,0400	0,1070	0,1200	0,1640	0,1250
	77,5	0,0430	0,0970	0,1230	0,1530	0,1150
	95,5	0,0650	0,1120	0,1250	0,1630	0,1410
	101,5	0,0780	0,1170	0,1250	0,1680	0,1500
N99-6 eb2 IV	5,5	0,0720	0,0420	0,0580	0,0410	0,0470
	23,5	0,0840	0,1410	0,1410	0,1540	0,1630

Fortsetzung Tabelle A 33 von Seite 194						
Isolat	Stunden	0 % NaCl	0,75 % NaCl	1,5 % NaCl	3,4 % NaCl	6,8 % NaCl
	29,5	0,0970	0,1300	0,1370	0,1480	0,1680
	47,5	0,1020	0,1350	0,1360	0,1610	0,1930
	54,0	0,1020	0,1250	0,1490	0,1510	0,1980
	71,5	0,1170	0,1350	0,1770	0,1910	0,2030
	77,5	0,1270	0,1250	0,2170	0,1790	0,1980
	95,5	0,1420	0,1450	0,1170	0,1960	0,2030
	101,5	0,1320	0,1430	0,1050	0,2060	0,2230
N99-6 ed17 g	5,5	0,0700	0,0200	0,0300	0,0220	0,0050
	23,5	0,1790	0,1000	0,1000	0,0690	0,0450
	29,5	0,2140	0,1230	0,1200	0,0870	0,0700
	47,5	0,2540	0,1860	0,1400	0,0890	0,1200
	54,0	0,2940	0,2280	0,1780	0,1140	0,1500
	71,5	0,3180	0,2780	0,2100	0,1240	0,1750
	77,5	0,3590	0,3030	0,2400	0,1290	0,1800
	95,5	0,3540	0,3230	0,2450	0,1090	0,1950
	101,5	0,3740	0,3580	0,2600	0,1180	0,2200
N99-6 ef12	5,5	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	23,5	0,0090	0,0040	0,0040	0,0000	0,0010
	29,5	0,0060	0,0090	0,0400	0,0000	0,0020
	47,5	0,2400	0,1140	0,1530	0,0000	0,0060
	54,0	0,2660	0,1090	0,1600	0,0000	0,0070
	71,5	0,5610	0,0840	0,1800	0,0000	0,0000
	77,5	0,6010	0,0890	0,1750	0,0000	0,0070
	95,5	0,6660	0,1490	0,2150	0,0000	0,0000
	101,5	0,6810	0,1490	0,2100	0,0000	
N99-6 s17	5,5	0,0000	0,0000	0,0140	0,0040	0,0000
	23,5	0,0000	0,0220	0,0370	0,1090	0,0850
	29,5	0,0000	0,0180	0,0400	0,1220	0,1120
	47,5	0,0000	0,0000	0,0400	0,1290	0,1750
	54,0	0,0000	0,0080	0,0510	0,1480	0,1850
	71,5	0,0000	0,0000	0,0510	0,1720	0,2150
	77,5	0,0000	0,0000	0,0550	0,1730	0,2200
	95,5	0,0000	0,0000	0,0600	0,1730	0,2250
	101,5	0,0000	0,0000	0,0580	0,1780	0,2750
N99-6 sa34 I	5,5	0,0760	0,0390	0,0510	0,0490	0,0280
	23,5	0,0980	0,0880	0,0920	0,0940	0,1080
	29,5	0,1090	0,0890	0,1040	0,0690	0,1030
	47,5	0,1110	0,0740	0,1070	0,0890	0,0530
	54,0	0,1290	0,0820	0,1170	0,1020	0,0580
	71,5	0,1690	0,0940	0,0870	0,1490	0,0730
	77,5	0,1790	0,0770	0,0920	0,1370	0,0580
	95,5	0,1850	0,0940	0,0760	0,1540	0,0880
	101,5	0,1840	0,0640	0,0770	0,1540	0,0930
N99-6 sa34 II	5,5	0,0600	0,0350	0,0510	0,0460	0,0100
	23,5	0,0690	0,0930	0,1090	0,1270	0,1260
	29,5	0,0880	0,0850	0,1090	0,1190	0,1310
	47,5	0,0930	0,0860	0,1200	0,1020	0,0990
	54,0	0,0970	0,0980	0,1290	0,1190	0,0930
	71,5	0,1570	0,1130	0,1240	0,1640	0,0940
	77,5	0,1280	0,0970	0,1340	0,1540	0,0840
	95,5	0,1020	0,1080	0,1210	0,1940	0,1020
	101,5	0,0950	0,1000	0,1240	0,1640	0,1160
N99-6 sa9	5,5	0,0000	0,0000	0,0000	0,0060	0,0000

Fortsetzung Tabelle A 33 von Seite 195						
Isolat	Stunden	0 % NaCl	0,75 % NaCl	1,5 % NaCl	3,4 % NaCl	6,8 % NaCl
	23,5	0,0000	0,0000	0,0000	0,0110	0,0000
	29,5	0,0000	0,0000	0,0370	0,0190	0,0040
	47,5	0,1110	0,1480	0,1310	0,0960	0,0000
	54,0	0,1210	0,1290	0,1460	0,1360	0,0000
	71,5	0,3210	0,0970	0,1610	0,1710	0,0000
	77,5	0,3810	0,0990	0,1460	0,1610	0,0000
	95,5	0,5560	0,1690	0,1360	0,1460	0,0000
	101,5	0,6160	0,0640	0,1710	0,1660	0,0000
N99-6 t2 weiß	5,5	0,0530	0,0430	0,0570	0,0520	0,0280
	23,5	0,0500	0,1470	0,1900	0,1890	0,1480
	29,5	0,0690	0,1320	0,1780	0,1890	0,1480
	47,5	0,0640	0,1420	0,1960	0,2290	0,1580
	54,0	0,0610	0,1370	0,2080	0,2640	0,1630
	71,5	0,0630	0,1570	0,2420	0,2840	0,1630
	77,5	0,0780	0,1470	0,2230	0,2440	0,1680
	95,5	0,0940	0,1770	0,1830	0,2540	0,1880
	101,5	0,0920	0,1770	0,2010	0,2490	0,2010
N99-6 v24 g	5,5	0,0470	0,0060	0,0300	0,0200	0,0110
	23,5	0,0640	0,0490	0,0820	0,0920	0,0830
	29,5	0,1000	0,0740	0,1050	0,1070	0,1080
	47,5	0,1170	0,0540	0,1410	0,1580	0,1630
	54,0	0,1440	0,1140	0,1700	0,1870	0,1930
	71,5	0,1640	0,1190	0,2200	0,2320	0,2230
	77,5	0,1840	0,1440	0,2200	0,2420	0,2220
	95,5	0,2100	0,1740	0,2650	0,2570	0,2330
	101,5	0,2240	0,2020	0,2750	0,2820	0,2830
N99-7 1t1	5,5	0,0220	0,0000	0,0130	0,0000	0,0000
	23,5	0,0790	0,0730	0,0340	0,0000	0,0000
	29,5	0,0840	0,0730	0,0640	0,0000	0,0000
	47,5	0,0960	0,0720	0,0820	0,0000	0,0000
	54,0	0,0870	0,0790	0,0840	0,0010	0,0000
	71,5	0,0710	0,0690	0,0900	0,0700	0,0000
	77,5	0,0720	0,0790	0,0990	0,0600	0,0000
	95,5	0,0630	0,0940	0,1040	0,0900	0,0000
	101,5	0,0540	0,0990	0,0980	0,1050	0,0000
N99-7 1w1	5,5	0,0300	0,0000	0,0130	0,0030	0,0020
	23,5	0,0540	0,0060	0,0000	0,0010	0,0000
	29,5	0,0650	0,0330	0,0000	0,0000	0,0040
	47,5	0,0690	0,0560	0,0160	0,0000	0,0000
	54,0	0,0500	0,0530	0,0340	0,0000	0,0040
	71,5	0,0350	0,0370	0,0600	0,0150	0,0010
	77,5	0,0450	0,0430	0,0600	0,0010	0,0000
	95,5	0,0410	0,0580	0,0960	0,0030	0,0000
	101,5	0,0410	0,0660	0,0330	0,0000	0,0010
N99-8 1s16	5,5	0,0320	0,0030	0,0000	0,0100	0,0040
	23,5	0,0420	0,0760	0,0940	0,0690	0,0440
	29,5	0,0580	0,0900	0,1160	0,1080	0,0680
	47,5	0,0780	0,1230	0,1160	0,1530	0,1090
	54,0	0,0880	0,1730	0,1760	0,1680	0,1340
	71,5	0,0520	0,2580	0,2310	0,1980	0,1440
	77,5	0,1130	0,2780	0,2810	0,2480	0,1540
	95,5	0,1830	0,3030	0,3060	0,2580	0,1840
	101,5	0,1930	0,3180	0,3160	0,3030	0,1840

Fortsetzung Tabelle A 33 von Seite 196						
Isolat	Stunden	0 % NaCl	0,75 % NaCl	1,5 % NaCl	3,4 % NaCl	6,8 % NaCl
N99-8 1sa17	5,5	0,0400	0,0000	0,0190	0,0050	0,0000
	23,5	0,1260	0,0640	0,0520	0,0110	0,0200
	29,5	0,1470	0,0820	0,0620	0,0150	0,0250
	47,5	0,1670	0,1120	0,1070	0,0090	0,0240
	54,0	0,2070	0,1420	0,1200	0,0060	0,0240
	71,5	0,2320	0,1670	0,1420	0,0180	0,0120
	77,5	0,2720	0,1940	0,1420	0,0060	0,0000
	95,5	0,3070	0,2120	0,1770	0,0070	0,0050
	101,5	0,3170	0,2320	0,1770	0,0040	0,0150
	N99-8 1sa18	5,5	0,0310	0,0070	0,0220	0,0400
23,5		0,0660	0,0810	0,0910	0,1160	0,0050
29,5		0,0820	0,1200	0,1160	0,1490	0,0150
47,5		0,0970	0,1500	0,1910	0,2210	0,0310
54,0		0,0920	0,2150	0,2260	0,2560	0,0470
71,5		0,0870	0,2330	0,2460	0,3140	0,0760
77,5		0,1000	0,2750	0,2760	0,3210	0,0810
95,5		0,1080	0,3000	0,3060	0,3140	0,1340
101,5		0,1020	0,3300	0,3210	0,3460	0,1600
N99-8 1sa20g		5,5	0,0140	0,0000	0,0140	0,0000
	23,5	0,0070	0,0210	0,0360	0,0170	0,0010
	29,5	0,0210	0,0330	0,0610	0,0560	0,0040
	47,5	0,0700	0,0490	0,0830	0,1200	0,0560
	54,0	0,0750	0,0540	0,1270	0,1310	0,0870
	71,5	0,0670	0,0070	0,0560	0,2260	0,1390
	77,5	0,0630	0,0000	0,0470	0,2560	0,1490
	95,5	0,0650	0,0000	0,0130	0,2810	0,2140
	101,5	0,0450	0,0000	0,0060	0,3210	0,2440
	N99-8 1v57	5,5	0,0000	0,0220	0,0270	0,0090
23,5		0,0000	0,1150	0,1390	0,0410	0,0210
29,5		0,0160	0,1110	0,1910	0,0520	0,0310
47,5		0,0140	0,1950	0,2250	0,0760	0,0560
54,0		0,0390	0,2310	0,2700	0,0840	0,0610
71,5		0,2910	0,2760	0,2900	0,1110	0,1060
77,5		0,3760	0,3260	0,3500	0,1310	0,1160
95,5		0,5060	0,2760	0,3750	0,1660	0,1610
101,5		0,5060	0,2860	0,4000	0,1760	0,1510
N99-8 1v80 g		5,5	0,0210	0,0000	0,0560	0,0020
	23,5	0,0190	0,0100	0,0650	0,0460	0,0000
	29,5	0,0200	0,0360	0,0800	0,0690	0,0020
	47,5	0,0310	0,0750	0,1150	0,1110	0,0000
	54,0	0,0430	0,1070	0,1350	0,1490	0,0050
	71,5	0,0690	0,1330	0,1700	0,1940	0,0260
	77,5	0,0920	0,1520	0,1850	0,2130	0,0160
	95,5	0,1220	0,1570	0,1550	0,2140	0,0570
	101,5	0,1240	0,1720	0,1600	0,2340	0,0270
	N99-8 1v80 o	5,5	0,0260	0,0000	0,0150	0,0130
23,5		0,0690	0,0000	0,1030	0,0710	0,0000
29,5		0,0860	0,0000	0,1360	0,0880	0,0000
47,5		0,1020	0,0530	0,2010	0,1430	0,0210
54,0		0,1200	0,0780	0,2520	0,1780	0,0150
71,5		0,1490	0,1030	0,2510	0,2280	0,0350
77,5		0,2060	0,1230	0,3010	0,2530	0,0360
95,5		0,1910	0,1280	0,2810	0,2330	0,0500

Fortsetzung Tabelle A 33 von Seite 197						
Isolat	Stunden	0 % NaCl	0,75 % NaCl	1,5 % NaCl	3,4 % NaCl	6,8 % NaCl
	101,5	0,2040	0,1530	0,3010	0,2580	0,0530
N99-8 1v80 w	5,5	0,0360	0,0150	0,0550	0,0480	0,0460
	23,5	0,0240	0,1090	0,1630	0,1920	0,1380
	29,5	0,0340	0,1190	0,1560	0,1700	0,1450
	47,5	0,0290	0,1030	0,1570	0,1600	0,1600
	54,0	0,0470	0,1090	0,1540	0,1750	0,1700
	71,5	0,0670	0,1440	0,1780	0,1900	0,1450
	77,5	0,0950	0,1560	0,1830	0,1880	0,1150
	95,5	0,1720	0,2090	0,2130	0,1650	0,0950
	101,5	0,1520	0,2090	0,2080	0,2100	0,1150
N99-8 1v93	5,5	0,0280	0,0000	0,0150	0,0030	0,0020
	23,5	0,0290	0,0260	0,0320	0,0500	0,0090
	29,5	0,0330	0,0370	0,0570	0,0650	0,0190
	47,5	0,0580	0,0570	0,0960	0,1620	0,0490
	54,0	0,0620	0,0780	0,1160	0,1980	0,0740
	71,5	0,0600	0,0610	0,1010	0,2230	0,1340
	77,5	0,0750	0,0920	0,1110	0,2530	0,1590
	95,5	0,1070	0,0920	0,0730	0,1830	0,1640
	101,5	0,0880	0,1120	0,1010	0,2280	0,2290
N99-2 v2	5,5	0,0180	0,0040	0,0110	0,0640	0,0000
	23,5	0,0420	0,0590	0,0450	0,0340	0,0320
	29,5	0,0470	0,0540	0,0800	0,0440	0,0320
	47,5	0,1190	0,1140	0,1500	0,0990	0,0720
	54,0	0,1300	0,1340	0,1700	0,0990	0,0820
	71,5	0,1570	0,1640	0,1790	0,1010	0,1470
	77,5	0,1820	0,1790	0,1800	0,1090	
	95,5	0,1720	0,1810	0,1900	0,0990	0,1850
	101,5	0,2120	0,1990	0,2120	0,1890	0,1220

