

# Phylogenie und Diversität grüner Schwefelbakterien

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch–Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian–Albrechts–Universität  
zu Kiel

vorgelegt von  
Boris ALEXANDER

KIEL  
2002



Referent : Prof. Dr. Johannes F. Imhoff  
Korreferent: Prof. Dr. Peter Schönheit  
Tag der mündlichen Prüfung: 16. 12. 2002  
Zum Druck genehmigt: Kiel, den 18. 12. 2002

gez. W. Depmeier  
Dekan







## VORWORT

Die der vorliegenden Dissertationsschrift zugrunde liegende Arbeit begann 1998 in der von Prof. Dr. Johannes F. Imhoff geleiteten Abteilung Marine Mikrobiologie (später reorganisiert zur Mikrobiellen Ökologie im Forschungsbereich Marine Ökologie) im Institut für Meereskunde an der Universität Kiel (URL 1, S. 154) im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie an der Süddänischen Universität Odense in Dänemark (*Institut for Biokemi og Molekylær Biologi Syddansk Universitet*; Prof. Dr. Mette Miller, Prof. Dr. Raymond Cox, Jesper Andersen; URL 3, S. 154).

Diese internationale Zusammenarbeit wurde von der Europäischen Union im Rahmen des INTERREG-II-Projektes MEGBAS gefördert (*Research on Molecular Ecology of Green Sulfur Bacteria in the BAltic Sea*). Ein Teil dieser Kooperation war die Organisation eines gemeinsamen deutsch-dänischen molekular-ökologischen Praktikums im Jahr 2000 in Kiel. Ergebnisse dieser Kooperation wurden in populärwissenschaftlichen Artikeln und fachlichen Publikationen sowie Tagungsbeiträgen präsentiert (siehe Publikationen & Präsentationen, S. 156 f.).

Zwischenergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden in der Zeitschrift *Archives of Microbiology* publiziert (Alexander *et al.* 2002) und auf Tagungen präsentiert (Alexander & Imhoff 1999, 2000a, 2000b; Imhoff & Alexander 1999, 2002).



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>MATERIAL &amp; METHODEN</b>	<b>11</b>
<b>1 Material</b>	<b>11</b>
1.1 Chemikalien	11
1.2 Geräte	11
<b>2 Mikrobiologische Methoden</b>	<b>12</b>
2.1 Bakterienstämme	12
2.2 Medien und Anzuchtbedingungen	14
2.3 Probenahmestandorte	17
2.4 Probenahme und -behandlung	19
<b>3 Molekularbiologische Methoden</b>	<b>20</b>
3.1 Extraktion von DNA	20
3.1.1 Extraktion von DNA aus Flüssigkeiten mittels Standard-Methode	20
3.1.2 Extraktion von DNA aus Sedimentproben mittels Stool-Kit-Methode	21
3.1.3 Extraktion von DNA aus Sedimentproben mittels CTAB-Methode	22
3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion	22
3.3 Primer für Amplifikationen und Sequenzierungen	26
3.4 Aufreinigung von PCR-Produkten	29
3.5 Klonierung von DNA-Fragmenten aus Umweltproben	30
3.5.1 Ligation	31
3.5.2 Transformation	32
3.5.3 Bearbeitung der Klone	32
3.5.4 Screening-PCR	33
3.5.5 Screening-Sequenzierung	33
3.6 Sequenzierung	34
3.6.1 Auswahl der Primer	34
3.6.2 Cycle-Sequencing	36
3.6.3 Aufreinigung der Cycle-Sequencing-Produkte	37
<b>4 Elektrophoretische Methoden</b>	<b>37</b>
4.1 Agarose-Gel-Elektrophorese	37
4.2 Elektrophorese im Sequenziergerät	38
4.3 Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE)	38
4.3.1 PCR für die DGGE	39
4.3.2 Gel-Bereitung und Elektrophorese	39
4.4 Dokumentation der Proben	41
<b>5 Phylogenetische Berechnungen und Sequenzanalyse</b>	<b>41</b>
5.1 Sequenz-Nachbearbeitung	41
5.2 Abgleich mit der Datenbank	42
5.3 Das Alignment	43
5.4 Phylogenetische Berechnungen	44
<b>ERGEBNISSE</b>	<b>47</b>
<b>6 Kontrolle der Reinkulturen mit der DGGE</b>	<b>47</b>
<b>7 Methodische Entwicklungen</b>	<b>48</b>
7.1 Entwicklung von PCR-Primern für die 16S rDNA	48
7.2 Entwicklung von PCR-Primern für das <i>fmoA</i> -Gen	49

<b>8</b>	<b>Phylogenie grüner Schwefelbakterien</b>	<b>52</b>
8.1	Definition der Gruppen grüner Schwefelbakterien	53
8.1.1	Gruppeneinteilung nach Salzbedürftigkeit und 16S-rDNA-Phylogenie	53
8.1.2	Unterstützung der 16S-rDNA-Gruppierungen anhand des GC-Gehaltes	57
8.1.3	Einfluss von unbestimmten Basen auf die phylogenetische Distanz	59
8.1.4	Gruppensignaturen der 16S rDNA	62
8.2	Phylogenie des <i>fmoA</i> -Gens	63
8.2.1	Stammbaumdarstellung der <i>fmoA</i> -Sequenzen	63
8.2.2	Gruppensignaturen des <i>fmoA</i> -Gens	65
8.3	Phylogenie des FMO-Proteins	69
8.3.1	Stammbaumdarstellung der FMO-Sequenzen	69
8.3.2	Gruppensignaturen des FMO-Alignments	71
8.4	Vergleichende Phylogenie von 16S rDNA, <i>fmoA</i> und FMO	73
8.5	Alternative Algorithmen zur Stammbaumdarstellung	77
8.5.1	Parsimony-Methode	77
8.5.2	Maximum Likelihood	79
<b>9</b>	<b>Analyse ausgewählter salzhaltiger Standorte</b>	<b>81</b>
9.1	Phylogenie der Umweltsequenzen (16S rDNA)	83
9.1.1	Stammbaumdarstellung mit 16S-rDNA-Umweltsequenzen	84
9.1.2	Mikroheterogenität der 16S-rDNA-Umweltsequenzen	87
9.2	Phylogenie der Umweltsequenzen ( <i>fmoA</i> )	89
9.2.1	Stammbaumdarstellung mit <i>fmoA</i> -Umweltsequenzen	90
9.2.2	Mikroheterogenität der <i>fmoA</i> -Umweltsequenzen	92
9.3	Phylogenie der Umweltsequenzen (FMO)	94
9.3.1	Stammbaumdarstellung mit FMO-Umweltsequenzen	94
9.3.2	Mikroheterogenität der FMO-Umweltsequenzen	95
9.4	Vergleich der Umweltsequenzen (16S rDNA, <i>fmoA</i> , FMO)	96
9.5	Gruppensignaturen (Umweltproben vs. Reinkulturen)	97
9.6	Andere Umweltsequenzen (außerhalb der GSB)	98
<b>DISKUSSION</b>		<b>103</b>
<b>10</b>	<b>Diskussion methodischer Entwicklungen</b>	<b>103</b>
10.1	Primer-System für die 16S rDNA	103
10.2	Primer-System für das <i>fmoA</i> -Gen	106
<b>11</b>	<b>Phylogenie grüner Schwefelbakterien</b>	<b>107</b>
11.1	Die Gruppe 1 mit marinen und hypersalinen Stämmen	108
11.2	Die Gruppe 2 mit salzbedürftigen Stämmen	109
11.3	Die Gruppe 3 mit limnischen Stämmen	110
11.4	Die Gruppe 4 mit limnischen und salzbedürftigen Stämmen	111
11.5	Vorschläge für taxonomische Neuordnungen	112
11.5.1	Gattungen auf Basis der phylogenetischen Gruppen	114
11.5.2	Taxonomische Neuordnung von Arten	116
<b>12</b>	<b>Diskussion der Standortergebnisse</b>	<b>119</b>
12.1	Umweltsequenzen in Gruppe 1	121
12.2	Umweltsequenzen in Gruppe 4	123
12.3	Eine neue Gruppe grüner Schwefelbakterien ?	124
<b>ABSTRACT</b>		<b>126</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>		<b>127</b>
<b>LITERATUR</b>		<b>129</b>

---

<b>ANHANG</b>	<b>135</b>
<b>13 Tabellen der Gruppensignaturen im Alignment</b>	<b>135</b>
<b>14 Distanz-Matrizes</b>	<b>138</b>
<b>15 Mikroheterogenitätstabellen</b>	<b>145</b>
<b>16 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>152</b>
<b>17 Internet-Adressen (URL-Verzeichnis)</b>	<b>154</b>
<b>Publikationen</b>	<b>156</b>
<b>Präsentationen</b>	<b>157</b>
<b>Danksagung</b>	<b>158</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>161</b>
<b>Erklärung</b>	<b>163</b>

# TABELLEN

Tabelle 1: Verwendete Stämme oder deren Sequenzen (Grüne Schwefelbakterien)	13
Tabelle 2: Verwendete Sequenzen anderer Bakterien	14
Tabelle 3: Unterschiede der Standorte und Weiterbehandlung der Proben	19
Tabelle 4: Amplifikationsbedingungen für Reinkulturen	24
Tabelle 5: Amplifikationsbedingungen für Umweltproben	25
Tabelle 6: Primer und deren Verwendungszwecke	27
Tabelle 7: 16S-Primer der verschiedenen PCR-Amplifikationen und Sequenzierungen	28
Tabelle 8: <i>fmoA</i> -Primer der verschiedenen PCR-Amplifikationen und Sequenzierungen	29
Tabelle 9: Primer für PCR-Amplifikationen aus Vektor pCR4-TOPO und anschließende Sequenzierungen	29
Tabelle 10: Amplifikationsbedingungen für die Screening-PCR	33
Tabelle 11: Amplifikationsbedingungen für das Cycle-Sequencing	36
Tabelle 12: Amplifikationsbedingungen für die Muyzer-PCR	39
Tabelle 13: Beispiel eines Fasta3-Ergebnisses der Sequenz „xyz“	43
Tabelle 14: Beispiel eines kurzen Alignments von 16S-rDNA-Sequenzen mit dem Programm BioEdit	44
Tabelle 15: Abfolge der Berechnungen im Programmpaket Phylip	45
Tabelle 16: Primer-Bereich von F-99-GSB auf der 16S rDNA	49
Tabelle 17: Primer-Bereich von R-889-fmo	50
Tabelle 18: Primer-Bereich von F-Start-fmo	51
Tabelle 19: Primer-Bereich von F-478-fmo bzw. R-478-fmo auf der <i>fmoA</i> -Sequenz	52
Tabelle 20: Überblick über die Gruppensignaturen der 16S-rDNA-Sequenzen	62
Tabelle 21: Zusammenhängende Signaturbereiche auf der 16S rDNA	63
Tabelle 22: Überblick über die Gruppensignaturen der <i>fmoA</i> -Sequenzen	66
Tabelle 23: Zusammenhängende Signaturbereiche des <i>fmoA</i>	67
Tabelle 24: Kontinuierlicher Abschnitt des <i>fmoA</i> -Alignments mit charakteristischen Codon-Lücken	68
Tabelle 25: Überblick über die Gruppensignaturen der FMO-Sequenzen	71
Tabelle 26: Zusammenhängende Signaturbereiche des FMO	72
Tabelle 27: Kontinuierlicher Abschnitt des FMO-Alignments mit charakteristischen Deletionen	73
Tabelle 28: Isolierte und komplett sequenzierte DNA-Fragmente aus Umweltproben	82
Tabelle 29: Hauptvertreter der Nicht-GSB-Gattungen in 16S-rDNA-Klonierungsergebnissen	100
Tabelle 30: Gruppen-Signaturen der 16S-rDNA-Sequenzen	135
Tabelle 31: Gruppen-Signaturen der <i>fmoA</i> -Nukleotidsequenzen	136
Tabelle 32: Gruppen-Signaturen der FMO-Aminosäuresequenzen	137
Tabelle 33: Distanz-/Similaritäts-Matrix der 16S-rDNA-Sequenzen aus Reinkulturen	138
Tabelle 34: Distanz-/Similaritäts-Matrix der 16S-rDNA-Sequenzen aus Reinkulturen und Umweltproben	139
Tabelle 35: Distanz-/Similaritäts-Matrix der <i>fmoA</i> -Sequenzen aus Reinkulturen	140
Tabelle 36: Distanz-/Similaritäts-Matrix der <i>fmoA</i> -Sequenzen aus Reinkulturen und Umweltproben	141
Tabelle 37: Distanz-/Similaritäts-Matrix der FMO-Sequenzen aus Reinkulturen	142
Tabelle 38: Distanz-/Similaritäts-Matrix der FMO-Sequenzen aus Reinkulturen und Umweltproben	143
Tabelle 39: Einfluss der unbestimmten Basen auf die Distanz/Similarität der 16S-rDNA-Sequenzen	144
Tabelle 40: Mikroheterogenität der Probe Cviic-2 (16S und <i>fmoA</i> )	145
Tabelle 41: Mikroheterogenität der Probe BW-4 (16S)	146
Tabelle 42: Mikroheterogenität der Probe Sip-4 (16S)	147
Tabelle 43: Mikroheterogenität der Proben Sip-4 ( <i>fmoA</i> ) und SSM-3 (16S)	148
Tabelle 44: Mikroheterogenität der Probe SSM-3 (16S und <i>fmoA</i> )	149
Tabelle 45: Mikroheterogenität der Probe Laboe-3 (16S)	150
Tabelle 46: Mikroheterogenität der Probe Laboe-3 ( <i>fmoA</i> ), Stak-2 ( <i>fmoA</i> ) und Stein-1 (16S)	151

# ABBILDUNGEN

Abbildung 1: Phylogenetische Stellung der grünen Schwefelbakterien innerhalb der Bacteria	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Lage des FMO-Proteins in der Bakterienzelle	6
Abbildung 3: Struktur des FMO-Monomers	7
Abbildung 4: Struktur des FMO-Monomers inklusive gebundenen Bacteriochlorophylls <i>a</i>	8
Abbildung 5: Geographische Lage der Probenahmestandorte	18
Abbildung 6: Funktionsprinzip der Ligation mit dem „Topo TA Cloning Kit for Sequencing“	31
Abbildung 7: Aufteilung der Primer für die Sequenzierung der 16S-Fragmente	35
Abbildung 8: Aufteilung der Primer für die Sequenzierung der <i>fmoA</i> -Fragmente	35
Abbildung 9: Rohdaten einer Sequenz mit Programm Chromas dargestellt	42
Abbildung 10: Reinheitskontrolle der Kulturen im DGGE-Gel.	47
Abbildung 11: 16S-rDNA-Phylogenie auf Reinkulturbasis: Überblick	54
Abbildung 12: 16S-rDNA-Phylogenie auf Reinkulturbasis: Detaildarstellung der Gruppen 1-4	56
Abbildung 13: 16S-rDNA-Stammbaum in Kombination mit GC-Werten grüner Schwefelbakterien	58
Abbildung 14: 16S-rDNA: Vergleich des Einflusses unbestimmter Basen auf die phylogenetische Distanz	61
Abbildung 15: <i>fmoA</i> -Phylogenie auf Reinkulturbasis	64
Abbildung 16: FMO-Phylogenie auf Reinkulturbasis	70
Abbildung 17: 16S-rDNA-Stammbaum im Vergleich zu einem <i>fmoA</i> -Stammbaum	74
Abbildung 18: FMO-Stammbaum als Vergleich zur 16S-rDNA- und <i>fmoA</i> -Phylogenie	75
Abbildung 19: 16S-rDNA-Stammbaum nach Parsimony-Methode	78
Abbildung 20: <i>fmoA</i> -Stammbaum nach Parsimony-Methode	79
Abbildung 21: 16S-rDNA-Stammbaum nach Maximum-Likelihood-Methode	80
Abbildung 22: <i>fmoA</i> -Stammbaum nach Maximum-Likelihood-Methode	81
Abbildung 23: 16S-rDNA-Phylogenie der Umweltsequenzen innerhalb der Gruppen 1-4	85
Abbildung 24: Mikroheterogenität der 16S-rDNA-Umweltsequenzen in der marinen/hypersalinen Gruppe 1	88
Abbildung 25: <i>fmoA</i> -Phylogenie der Umweltsequenzen	92
Abbildung 26: Mikroheterogenität der <i>fmoA</i> -Umweltsequenzen in der marinen/hypersalinen Gruppe 1	93
Abbildung 27: FMO-Phylogenie der Umweltsequenzen	95
Abbildung 28: Mikroheterogenität der FMO-Umweltsequenzen in der marinen/hypersalinen Gruppe 1	96
Abbildung 29: 16S-rDNA-Phylogenie der Umweltsequenzen in der Nähe der GSB	99
Abbildung 30: Stammbaum wichtiger Vertreter der Bacteria im Hinblick auf die Umweltsequenzen	101
Abbildung 31: 16S-rDNA-Stammbaum vor und nach der taxonomischen Neuordnung	115
Abbildung 32: Zeitungsartikel der Lübecker Nachrichten	156
Abbildung 33: Posterbeispiele	157



# EINLEITUNG

## WENN DIE OSTSEE BLÜHT...

(veröffentlicht in „Seeluft“, Taschenbuch für Kultur und Reise, Alexander 1999b)

**W**enn die Ostsee blüht, kann das in vielen Fällen ein Hinweis darauf sein, daß die Selbstreinigungskraft der Natur noch funktioniert. Als »Blühen« bezeichnet man massive Vermehrungen von Mikroorganismen (Algen oder Bakterien) im Wasser. Das kann so stark sein, daß das Wasser farbig wird, obwohl die Lebewesen selbst nur wenige Tausendstel Millimeter groß sind. Hier soll es um eine noch wenig bekannte Gruppe von Mikroben gehen, den phototrophen Schwefelbakterien, die eine essentielle Rolle im funktionierenden ökologischen Gleichgewicht spielen. Bei Spaziergängen im Küstenbereich der Ostsee kann man besonders in den Spätsommermonaten regelmäßig an windgeschützten und strömungsarmen Bereichen rote bis grüne und braune Verfärbungen im Wasser beobachten.

Vor allem in Naturschutzgebieten, in denen die Uferbereiche noch nicht begradigt und für den Schiffsverkehr ausgebaut sind, finden Anschwemmungen von organischem Material im flachen Strandbereich statt. Das ist unter anderem die Voraussetzung für die massive Vermehrung phototropher Schwefelbakterien, die im Zentrum eines EU-Projektes in Kooperation mit Dänemark stehen. Phototroph bedeutet wörtlich übersetzt, daß sie sich »vom Licht ernähren«. Die Sonne ist also die Energiequelle für diese interessanten Lebewesen, genauso wie für grüne Pflanzen. Im Unterschied zu letzteren aber wandeln die Bakterien giftigen Schwefelwasserstoff um (Oxidation). Und das ist genau der Punkt im ökologischen Kreislauf, an dem diese spezialisierten Mikroben eine wichtige Funktion erfüllen:

Beim Abbau von organischem Material, z.B. angeschwemmten Algen, laufen mikrobielle Prozesse ab, die den Sauerstoff aufbrau-

chen. Dafür sind hauptsächlich ganz bestimmte Bakterien verantwortlich, sogenannte Sulfat-reduzierer, die durch ihre Stoffwechselvorgänge ein übelriechendes Gas produzieren, das an faulende Eier erinnert, den Schwefelwasserstoff. An bestimmten Küstenabschnitten kann man ihn deutlich wahrnehmen, wenn (besonders in der warmen Jahreszeit) dieses Gas aus dem Sediment ins Wasser und dann in die Luft entweicht.

### WENN DIE OSTSEE BLÜHT...

Ein EU-Projekt ermöglicht die Erforschung von Bakterien im Meer

Wenn die Ostsee blüht, kann das in vielen Fällen ein Hinweis darauf sein, daß die Selbstreinigungskraft der Natur noch funktioniert. Als »Blühen« bezeichnet man massive Vermehrungen von Mikroorganismen (Algen oder Bakterien) im Wasser. Das kann so stark sein, daß das Wasser farbig wird, obwohl die Lebewesen selbst nur wenige Tausendstel Millimeter groß sind. Hier soll es um eine noch wenig bekannte Gruppe von Mikroben gehen, den phototrophen Schwefelbakterien, die eine essentielle Rolle im funktionierenden ökologischen Gleichgewicht spielen. Bei Spaziergängen im

SEEFORUM

SULFAT



Die Forschungsschiff 'Alkor' auf Ostseefahrt.

bedeutet wörtlich übersetzt, daß sie sich vom Licht ernähren. Die Sonne ist also die Energiequelle für diese interessanten Lebewesen, genauso wie für grüne Pflanzen. Im Unterschied zu letzteren aber wandeln die Bakterien giftigen Schwefelwasserstoff um (Oxidation). Und das ist genau der Punkt im ökologischen Kreislauf, an dem diese spezialisierten Mikroben eine wichtige Funktion erfüllen: Beim Abbau von organischem Material, z.B. angeschwemmten Algen, laufen mikrobielle Prozesse ab, die den Sauerstoff aufbrauen. Das ist unter anderem die Voraussetzung für die massive Vermehrung phototropher Schwefelbakterien, die im Zentrum eines EU-Projektes in Kooperation mit Dänemark stehen. Phototroph

bedeutet wörtlich übersetzt, daß sie sich vom Licht ernähren. Die Sonne ist also die Energiequelle für diese interessanten Lebewesen, genauso wie für grüne Pflanzen. Im Unterschied zu letzteren aber wandeln die Bakterien giftigen Schwefelwasserstoff um (Oxidation). Und das ist genau der Punkt im ökologischen Kreislauf, an dem diese spezialisierten Mikroben eine wichtige Funktion erfüllen: Beim Abbau von organischem Material, z.B. angeschwemmten Algen, laufen mikrobielle Prozesse ab, die den Sauerstoff aufbrauen. Das ist unter anderem die Voraussetzung für die massive Vermehrung phototropher Schwefelbakterien, die im Zentrum eines EU-Projektes in Kooperation mit Dänemark stehen. Phototroph

(Layout-Kopie mit freundlicher Genehmigung von Dr. Roderich Stintzing, Signet-Verlag, Flensburg; Foto: Forschungsschiff Alkor auf Ostseefahrt, Universität Kiel/Institut für Meereskunde)

Phototrophe Schwefelbakterien benötigen nun genau diese chemische Verbindung zum Leben und zur Vermehrung. Dabei findet eine Umwandlung in harmlose Stoffe statt (Schwefel und Sulfat), und der Schwefelwasserstoff wird wieder aus der Umwelt entfernt. Während Algen und Pflanzen mit Hilfe der Sonnenenergie aus Wasser und Kohlendioxid Zucker herstellen und dabei Sauerstoff freisetzen (Photosynthese), läuft bei diesen Bakterien ein ähnlicher Vorgang ab, mit dem Unterschied, daß bei ihnen anstatt Wasser der Schwefelwasserstoff zersetzt wird und kein Sauerstoff entsteht. Ohne diese Entgiftungsleistung der Bakterien könnte eine Anhäufung des Gases nicht nur zur Geruchs-

belästigung führen, sondern auch zu einer Abtötung aller höheren Lebewesen im Wasser. Daraus würde eine starke Beeinträchtigung des normalen ökologischen Gleichgewichtes resultieren.

Ein Abbau von Schwefelwasserstoff findet auch in tieferen Bereichen der Ostsee statt. Dort allerdings dominieren farblose Schwefelbakterien, die keine Photosynthese betreiben, sondern ihre Energie aus der Umwandlung von dort verfügbaren Substanzen gewinnen. Zu bestimmten Zeiten bilden sie sogar weiße Matten auf der Sedimentoberfläche. In den flachen Küstenbereichen, wo Sonnenlicht verfügbar ist, sind vor allem phototrophe Schwefelbakterien zu finden, deren Farbe durch die artspezifische Zusammensetzung der lichtsammelnden Pigmente entsteht. Das kann von grün über braun bis rosa und rot reichen. Bei massivem Auftreten der Mikroben erscheinen dann Sedimenthorizonte oder sogar ganze Wasserflächen farbig. Wegen der Abhängigkeit vom Licht findet also eine Vermehrung nur in den oberen Millimetern der Sedimente oder im flachen Wasser statt. Häufig kann man bei genauer Betrachtung unter der sandfarbenen Oberfläche oder unter grünen Algenschichten rosa bis rot gefärbte Zonen im Spülsaum beobachten. Mehr als eine Milliarde Zellen einzelner Bakterienarten werden unter diesen Bedingungen in einem Gramm Sediment oder in einem Milliliter Wasser gefunden. Neben der weitreichenden ökologischen Bedeutung der Schwefelbakterien werden sie von der Industrie genutzt und z.B. bei der Entschwefelung von Gasen eingesetzt.

Diese spezialisierten Organismen haben noch weitere einzigartige Eigenschaften, wie die Fähigkeit, selbst bei extrem niedriger Lichteinstrahlung noch zu wachsen. Das prädestiniert sie als biologische Modellsysteme, um lichtgetriebene Energieumwandlung zu untersuchen und möglicherweise auch in die Praxis umzusetzen.

(...) Bis vor ein paar Jahren war es den Mikrobiologen, also den Forschern, die sich vor allem mit Bakterien befassen, nur mit dem Mikroskop oder durch das biochemische Verhalten der Organismen möglich, eine grobe

Bestimmung durchzuführen. Durch die Entwicklung von modernen Verfahren, die auch in der medizinischen Forschung eingesetzt werden, ist es heute möglich, Bakterien auf genetischer Ebene zu differenzieren und sie sogar in Umweltproben direkt nachzuweisen. Damit ist es erstmals realisierbar, ökologische Zusammenhänge im Mikrobereich zu untersuchen, weil man ganz genau das Vorkommen von einzelnen Arten an verschiedenen Standorten analysieren kann. (...)

Phototrophe Schwefelbakterien sind vor allem deshalb so außergewöhnlich, weil sie im Grunde »lebende Fossilien« sind. Sie haben sich auf unserer Erde vor Milliarden von Jahren entwickelt, als völlig andere Lebensbedingungen herrschten. Sauerstoff war nicht vorhanden, organische Materie noch kaum entstanden und Schwefelwasserstoff allgegenwärtig. Sauerstoff war für die damaligen Lebewesen sogar ein Gift. Phototrophe Schwefelbakterien waren die ersten Lebewesen, die Photosynthese betrieben, also die Sonnenenergie als Quelle nutzten und sie in biochemische Energie umwandeln konnten, lange bevor Algen und Pflanzen existierten. Sie haben den Wandel der Erdatmosphäre und der irdischen Ökosysteme überlebt und sind auch heute noch weltweit verbreitet. Jedoch beschränkt sich ihr Vorkommen auf wenige spezielle ökologische Nischen, in denen kein Sauerstoff vorhanden ist, wie das Sediment in flachen Küstenbereichen oder auch das freie Wasser in tieferen Schichten, das in der Ostsee häufig anoxisch ist. Man findet sie aber nicht nur im Meerwasser, sondern auch in Seen und Tümpeln.

Nach bisherigen Erkenntnissen sind die Urahnen der heute lebenden Schwefelbakterien sicherlich Vorfahren der sauerstoffproduzierenden Cyanobakterien und der Chloroplasten in Algen und höheren Pflanzen, die gewährleisten, daß der Mensch und alle tierischen Lebewesen existieren können.

All das sind Gründe, die diese Bakterien zu hochinteressanten Forschungsobjekten machen.

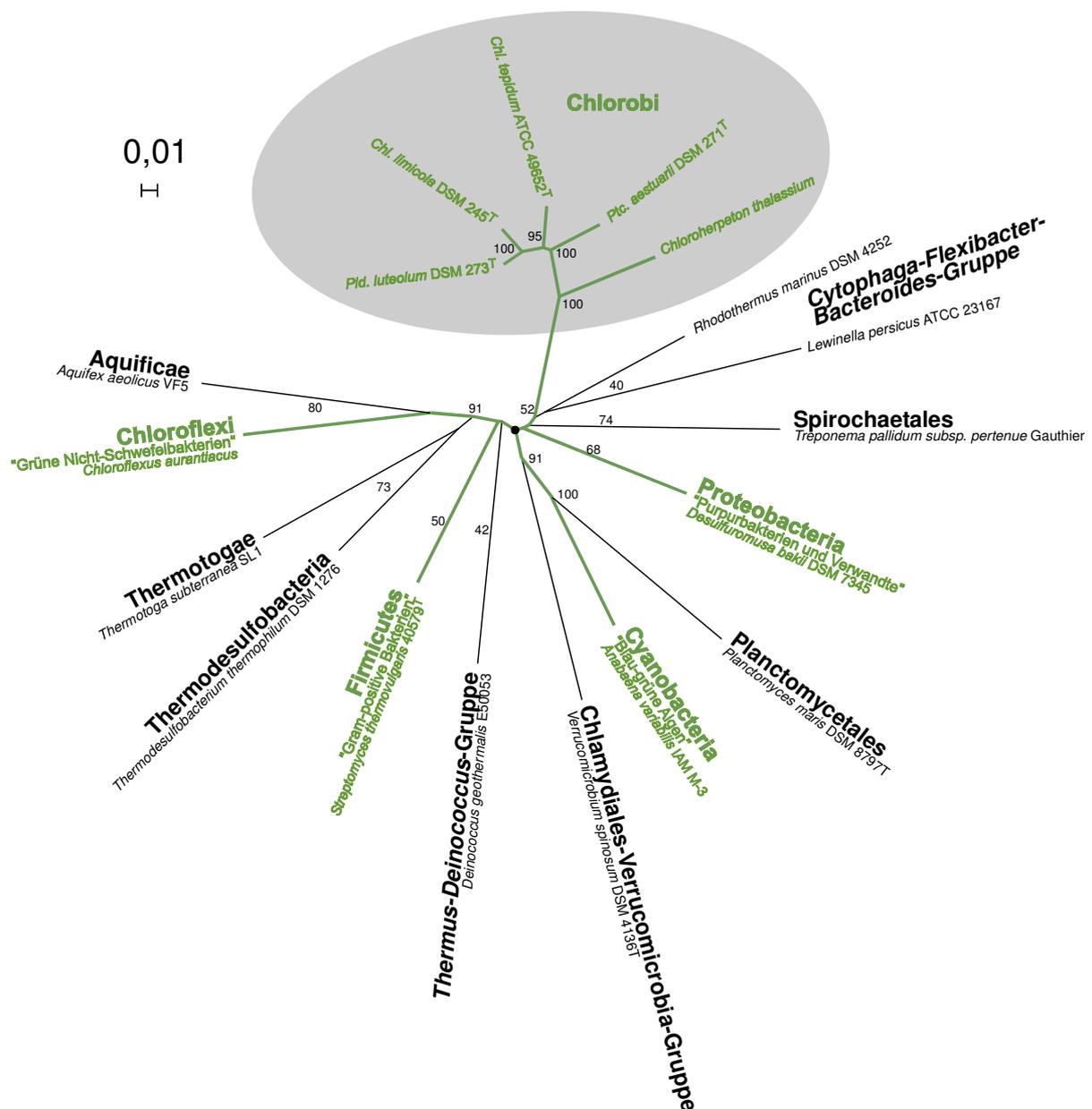
Boris Alexander

**G**rüne Schwefelbakterien sind unbeweglich, strikt phototroph, benötigen anaerobe Wachstumsbedingungen und können nur wenige organische Verbindungen assimilieren (Pfennig & Trüper 1974). Aus diesem Grund brauchen sie zum Wachstum stabile Umweltbedingungen, weil sie sich ansonsten kaum gegen die vielseitigeren phototrophen Purpurbakterien durchsetzen können. Trotzdem sind Chlorobiaceae in marinen Habitaten häufig anzutreffen, wenn auch in weit geringeren Mengen als die phototrophen Purpurbakterien, mit denen sie aufgrund ihrer ähnlichen Bedürfnisse meistens zusammen zu finden sind. Man findet sie unter anderem im Brackwasser, in marinen Lagunen und in Süßwassertümpeln (Brown & Herbert 1977; Caumette *et al.* 1983; Gietzen 1931; Matheron & Baulaigue 1972; Suckow 1966; Trüper 1970) sowie in tieferen anoxischen Schichten von Seen (Vila *et al.* 2002). Chlorobiaceae, die in der Erdgeschichte wahrscheinlich zu einer Zeit entstanden sind, in der noch kein Sauerstoff in der Atmosphäre vorhanden war, sind in ihrer Verbreitung heutzutage auf wenige anoxische ökologische Nischen beschränkt.

Anoxigene Photosynthese bedeutet, dass nicht das Wasser als Elektronendonator fungiert und damit auch kein Sauerstoff aus diesem freigesetzt wird, wie es bei den Cyanobakterien und den Pflanzen üblich ist. Als Reduktionsmittel dient vielmehr Schwefelwasserstoff ( $H_2S$ ) und im Laufe der Oxidation entsteht daraus zuerst Sulfat und in einem weiteren Schritt schließlich elementarer Schwefel.

$H_2S$  spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung solcher anoxischer Bedingungen und wird von sulfat- und schwefelreduzierenden Bakterien produziert (Trüper 1980, 1982). Das ist einer der Faktoren, der für die Entwicklung grüner Schwefelbakterien wichtig ist (Pfennig & Biebl 1976), welche den während der Photosynthese entstehenden elementaren Schwefel extrazellulär ablagern (im Gegensatz zu phototrophen Purpurbakterien). Wenn organische Materie im sulfatreichen Meerwasser reichlich vorhanden ist, kann rasch Sulfatreduktion einsetzen. Sulfat-reduzierende Bakterien können dann mehr als 50 % der organischen Komponenten oxidieren (Jørgensen & Fenchel 1974).

In Seen, bei denen die  $H_2S$ -enthaltenden anoxischen Schichten meist nur in Tiefen vorkommen, in die wenig Licht vordringt, haben die Chlorobiaceae durch die Fähigkeit, bei geringen Lichtintensitäten wachsen zu können (Biebl & Pfennig 1978), gegenüber den phototrophen Purpurbakterien einen deutlichen Vorteil. Das liegt an der effektiveren Anordnung ihrer lichtfangenden Antennensysteme in sogenannten Chlorosomen (siehe weiter unten). Ein anderer Selektionsfaktor ist die Lichtabsorption von Meerwasser, die dazu führt, dass sich mit zunehmender Tiefe das Spektrum bis auf 450-470 nm verengt (blauer Anteil). Das liegt genau im Absorptionsbereich der Antennenpigmente von braun-gefärbten Chlorobiaceae, die dann im Vergleich zu grünen Arten im Vorteil sind (Jerlov 1951; Trüper & Genovese 1968; Yentsch 1962).



**Abbildung 1: Phylogenetische Stellung der grünen Schwefelbakterien innerhalb der Bacteria**

Radialer phylogenetischer Stammbaum auf der Grundlage von 16S rDNA beispielhafter Vertreter der Bacteria. Die Topologie basiert auf einem Alignment von 1276 nt Länge. Die Berechnungen wurden mit der Distanz-Matrix-Methode durchgeführt (basierend auf dem Algorithmus von Jukes & Cantor 1969). Bootstrap-Werte sind prozentual. Die Maßangabe kennzeichnet die phylogenetische Distanz. Grüne Linien verbinden Gruppen, in denen alle oder einige Arten Photosynthese betreiben. Die Gruppeneinteilungen basieren auf Vorschlägen des NCBI (URL 17, S. 154).

Diese und andere Faktoren definieren beispielsweise in festen Sedimenten ganz klare Schichten phototropher Bakterien. Von unten nach oben nimmt die  $H_2S$ -Konzentration ab und die des Sauerstoff zu, während gleichzeitig die Lichtintensität größer wird. Die Oberflächenschicht bilden Cyanobakterien, die oxische Bedingungen vertragen und Sauerstoff produzieren, für die  $H_2S$  aber toxisch ist.

Darunter formieren sich phototrophe Purpurbakterien und grüne Schwefelbakterien, welche sowohl auf H<sub>2</sub>S und anoxische Bedingungen angewiesen sind, als auch auf eine Mindestmenge an Licht. Durch ihre jeweiligen Eigenschaften bestimmt, kommen die phototrophen Purpurbakterien mit ihrem vielseitigeren Stoffwechsel aber dem erhöhten Lichtbedarf über den Chlorobiaceae-Schichten vor. Solche Entwicklungen wurden schon an vielen Stellen gefunden und als Farbstreifensandwatt bezeichnet (Anagnostidis & Schwabe 1966; Hoffmann 1942; Schulz 1937; Schulz & Meyer 1939; Trüper 1970).

Unter den phototrophen Bakterien gibt es zwei Hauptgruppen, welche lichtgetriebene und chlorophyll-vermittelte Prozesse zur Energiegewinnung nutzen: die oxigenen Cyanobakterien und die anoxygenen Bakterien. Letztere sind sowohl morphologisch als auch physiologisch ziemlich unterschiedlich (Imhoff 1984; Imhoff & Trüper 1982; Imhoff *et al.* 1984; Pfennig 1967, 1977; Pfennig & Trüper 1974) und kommen in vier verschiedenen Gruppen vor. Die phototrophen Purpurbakterien (Chromatiaceae, Ectothiorhodospiraceae und Nicht-Schwefel-Purpurbakterien) sind Proteobacteria, während die grünen phototrophen Bakterien zu den Chlorobi und Chloroflexi gehören, die jeweils nur eine einzige Familie umfassen (Chlorobiaceae bzw. Chloroflexaceae). Schließlich gibt es auch innerhalb der Gram-positiven Bakterien (Firmicutes) phototrophe Vertreter (*Heliobacterium chlorum* und Verwandte, Woese *et al.* 1985).

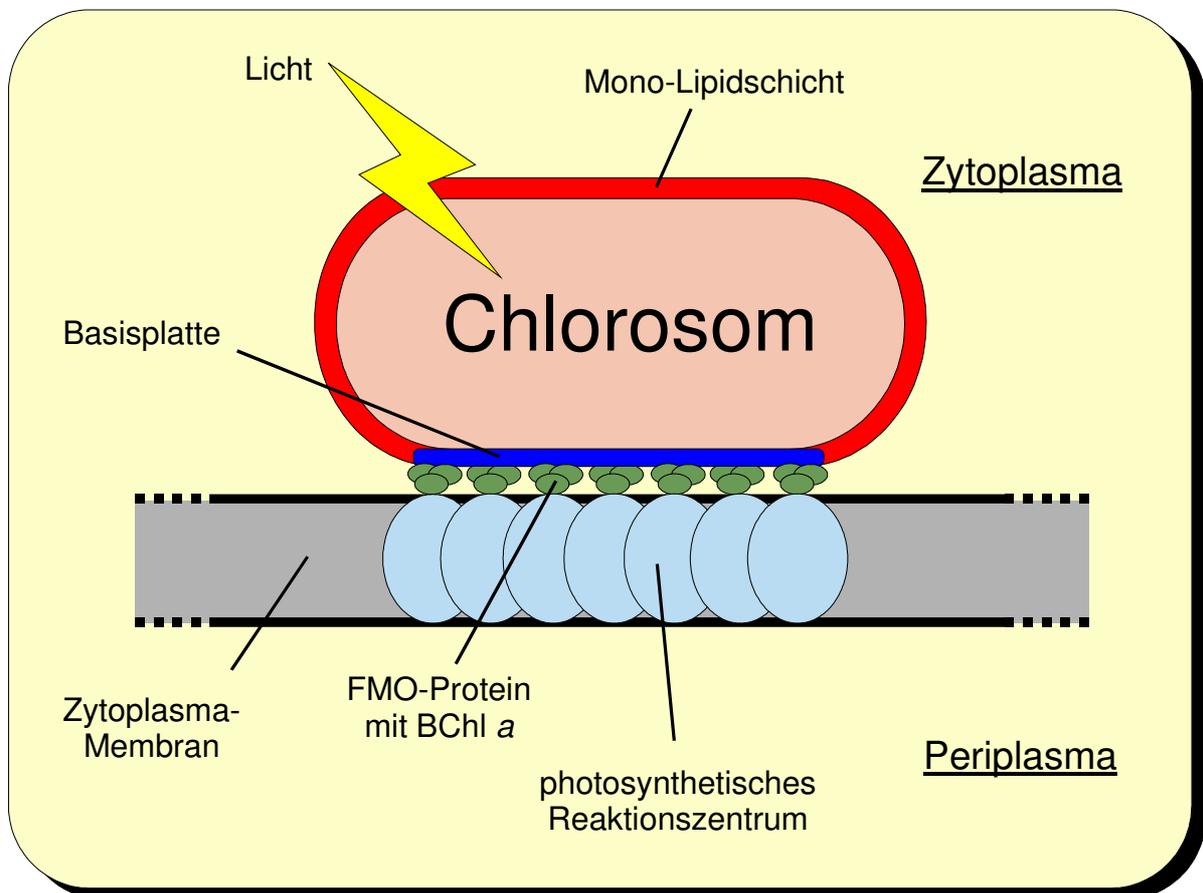
Erst durch Einführung von Sequenzierungstechniken für Proteine und Nukleinsäuren war es möglich zu erkennen, dass phototrophe Bakterien nicht zu einer Gruppe gehören, sondern in mehreren phylogenetischen Hauptlinien ihren Ursprung haben (Fox *et al.* 1980; Woese 1987). Einige kommen isoliert von anderen Arten vor und bilden eigene Gruppen (z.B. die Chlorobiaceae), andere wiederum sind vermischt mit nicht-phototrophen Arten (z.B. innerhalb der Proteobacteria). Der nach den taxonomischen Vorgaben des NCBI (National Center for Biotechnology Information) berechnete 16S-rDNA-Stammbaum zeigt anschaulich, dass phototrophe Vertreter innerhalb der Bacteria phylogenetisch weit verstreut sind (Abbildung 1).

Es wurde erst allmählich klar, dass innerhalb der Hauptgruppen phototropher Bakterien (auf Gattungs- und Art-Ebene) starke Diskrepanzen zwischen der taxonomischen Einteilung und der phylogenetischen Verwandtschaft bestehen (Nicht-Schwefel-Purpurbakterien: Kawasaki *et al.* 1993; Chromatiaceae: Fowler *et al.* 1984; Imhoff *et al.* 1998). Erste Erkenntnisse der Phylogenie innerhalb der Familie grüner Schwefelbakterien (Chlorobiaceae) wurden auf der Basis von 16S-rDNA-Sequenzen erlangt (Overmann & Tuschak 1997). Diese Arbeit zeigte signifikante Unterschiede zwischen der phylogenetischen Beziehung innerhalb der Chlorobiaceae auf Basis von 16S-rDNA-Sequenzen und der bisherigen taxonomischen Klassifikation auf. Zu einer ähnlichen Einschätzung kamen Figueras *et al.* (1997).

Die phototrophen grünen Schwefelbakterien (Chlorobiaceae) haben eine charakteristische Gemeinsamkeit mit grünen filamentösen Bakterien (Chloroflexaceae), nämlich das Vorhandensein der wichtigsten Antennenpigmente in Chlorosomen. Diese Strukturen sind zigarrenförmige Vesikel, die an der Innenseite der Zytoplasmamembran liegen und von einer Mono-Lipidschicht (lipid monolayer) umgeben sind (Cohen-Bazire *et al.* 1964; Staehelin *et al.* 1978, 1980). Sie dienen dazu, das Licht zu

absorbieren und die Energie zum eigentlichen photosynthetischen Reaktionszentrum weiterzuleiten, in dem die eigentliche photochemische Speicherung stattfindet (Abbildung 2).

Chlorosomen unterscheiden sich von allen anderen bekannten photosynthetischen Antennenkomplexen, weil die geometrische Anordnung der Pigmente vornehmlich durch Wechselwirkungen untereinander anstatt durch Pigment-Protein-Interaktionen bestimmt ist (Blankenship *et al.* 1995). Die Lichtabsorption übernehmen bei den grünen Schwefelbakterien die Bacteriochlorophylle *c*, *d* oder *e*, welche sich in den Chlorosomen befinden. Die Farbe der Bakterienkulturen wird letztlich durch die Gesamtpigmentkomposition bestimmt (Bacteriochlorophyll und Carotinoide). Die einen erscheinen dadurch grün (z.B. *Chlorobium limicola*) und die anderen eher braun (z.B. *Chlorobium phaeobacteroides*) (Imhoff 1995).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Lage des FMO-Proteins in der Bakterienzelle**

(nach Blankenship 1996)

Die grünen Schwefelbakterien enthalten außerdem einen einzigartigen Pigment-Proteinkomplex (Fenna-Matthews-Olson, FMO), der Bacteriochlorophyll *a* bindet und zwischen der sogenannten

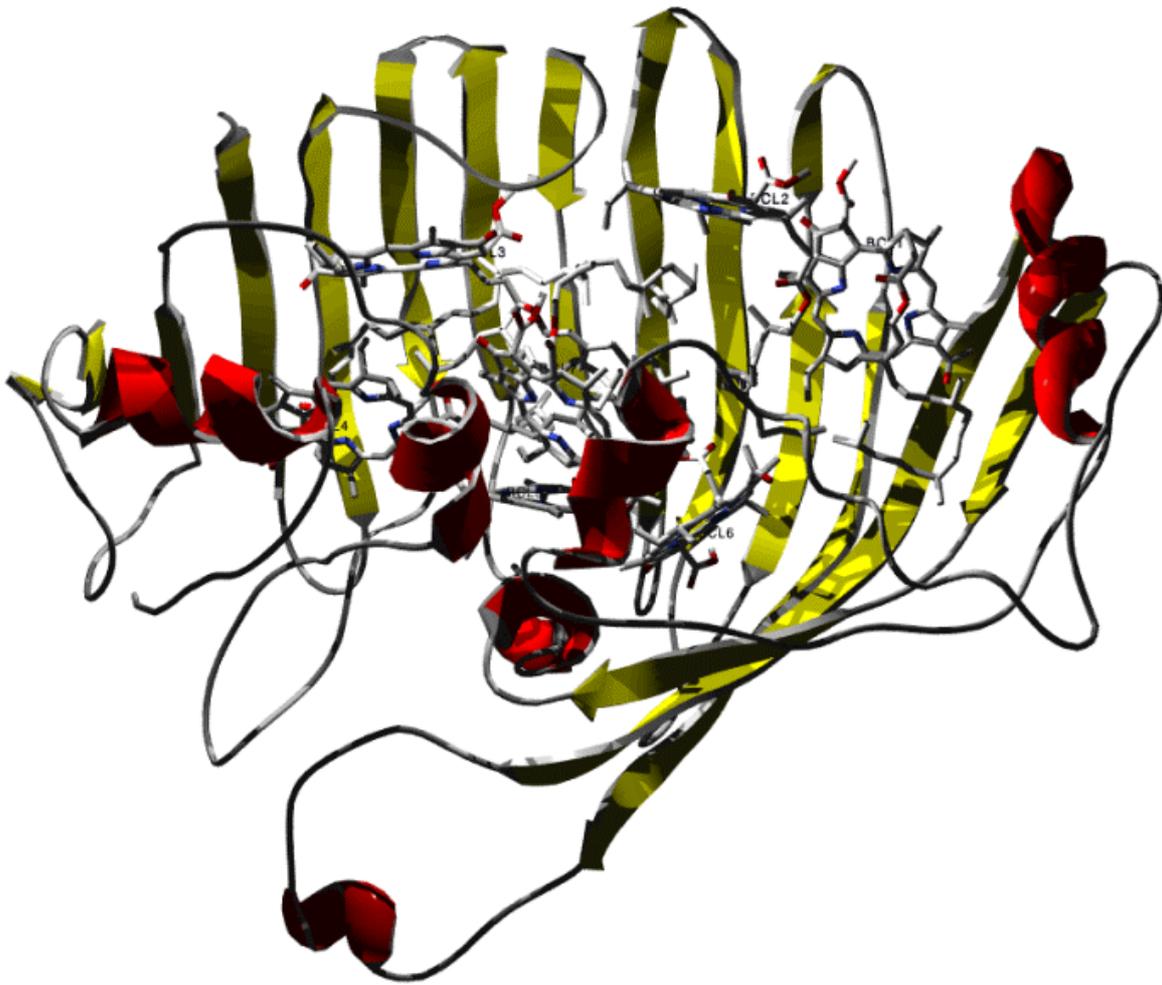
Basisplatte der Chlorosomen und Zytoplasmamembran lokalisiert ist (Amesz & Knaff 1988, Staehelin *et al.* 1980). Dort leitet er die Energie von den chlorosomalen Chlorophyllen (*c*, *d*, *e*) und denen der Basisplatte zum Reaktionszentrum in der Zytoplasmamembran weiter (Blankenship 1994). Das FMO-Protein kommt im Gegensatz zu den Chlorosomen nicht in Chloroflexaceae vor (Blankenship *et al.* 1995).



**Abbildung 3: Struktur des FMO-Monomers**

Graphische Darstellung des Fenna-Matthews-Olson-Proteins (FMO-Monomer) auf Basis einer 3-dimensionalen Röntgenstrukturanalyse an kristallisiertem FMO aus *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup> (Li *et al.* 1997, farbig gestaltet von J. Andersen, Universität Odense, Dänemark). Rot dargestellt sind  $\alpha$ -Helix-Bereiche und gelb sind  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen.

Das *fmoA*-Gen kodiert für ein Monomer des FMO-Proteins, das als Trimer aus drei gleichen Teilen zusammengesetzt ist (Fenna *et al.* 1974). Die erste Röntgenkristallstrukturanalyse wurde an dem FMO-Protein von *Prosthecochloris aestuarii* 2K durchgeführt und war damit auch der erste Protein-Pigment-Komplex, der mit 1,8 Å (= Ångström) aufgelöst wurde (Fenna & Matthews 1976). Später wurde die Röntgenstruktur des FMO von *Chlorobium tepidum* mit einer Auflösung von 2,2 Å bestimmt (Li *et al.* 1997, Abbildung 3 f.).



**Abbildung 4: Struktur des FMO-Monomers inklusive gebundenen Bacteriochlorophylls *a***

Graphische Darstellung des Fenna-Matthews-Olson-Proteins (FMO-Monomer) mit sieben gebundenen Molekülen Bacteriochlorophyll *a* (BCL) auf Basis einer 3-dimensionalen Röntgenstrukturanalyse an kristallisiertem FMO aus *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup> (Li *et al.* 1997, farbig gestaltet von J. Andersen, Universität Odense, Dänemark). Rot dargestellt sind  $\alpha$ -Helix-Bereiche und gelb sind  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen.

Die strukturelle Ähnlichkeit dieser zwei Proteine ist hoch. Beide bestehen aus drei identischen Untereinheiten, die über drei Symmetrieachsen in Beziehung stehen. Die Monomere bestehen vornehmlich aus  $\beta$ -Faltblättern (gelb in den beiden Abbildungen), die eine ungewöhnliche Struktur bilden. In dieser formt ein sehr langer  $\beta$ -Faltblatt-Abschnitt eine muschelartige Hülle, an deren Ende ein paar  $\alpha$ -Helix-Bereiche (rot) liegen. Innerhalb der Hülle sind sieben Bacteriochlorophyll-*a*-Moleküle (BChl *a*) an die Protein-Matrix gebunden. Das erfolgt jeweils durch einen Liganden, der mit dem zentralen Magnesiumion koordiniert ist. BChl 1, 2, 4, 6 und 7 sind mit Histidin-Resten koordiniert und BChl 5 mit einem Sauerstoffatom eines Leucin-Restes. Ein Wassermolekül schließlich bildet den Liganden für BChl 3 (Li *et al.* 1997).

Die Arbeiten von Vultu *et al.* (1998a, 1998b) haben gezeigt, dass die sieben Bacteriochlorophylle innerhalb eines Monomers räumlich eng gekoppelt sind und die Energie untereinander weitergeben, wobei jedes eine leicht unterschiedliche Anregungsenergie besitzt. Es ist noch nicht abschließend geklärt, welches von den beiden in Frage kommenden Molekülen (BChl 3 oder 6) am Ende dieser Kette steht und demnach mit dem Reaktionszentrum verbunden ist (Melkozernov *et al.* 1998; Vultu *et al.* 1998a, 1998b).

In Abbildung 4 ist ganz unten eine Schleife des FMO zu sehen, die einen  $\alpha$ -Helix-Bereich enthält. Diese ist für die Trimer-Bildung wichtig. So tritt jeweils die Schleife eines Monomers mit der entsprechenden Stelle eines anderen in Wechselwirkung.



# MATERIAL & METHODEN

## 1 MATERIAL

### 1.1 CHEMIKALIEN

Für die Analysen und Medien wurden im Allgemeinen Chemikalien vom höchsten verfügbaren Reinheitsgrad verwendet (in der Regel *pro analysi*). Diese wurden, wenn nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen bezogen<sup>1</sup>: BOEHRINGER, Mannheim; FLUKA BIOCHEMICA, Buchs, Schweiz; BIOZYM, Hess. Oldendorf; APPLIGENE, Heidelberg; MERCK, Darmstadt; PHARMACIA BIOTECH AB, Uppsala, Schweden; SIGMA ALDRICH, Steinheim und BECTON DICKINSON, Sparks, USA. Die eingesetzten Gase (N<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub>) kamen von der Firma MESSER-GRIESHEIM, Osterholz-Scharmbeck.

Spezielle Reagenzien und Komplettpakete (Kits) für die molekularbiologische Arbeit stammten von folgenden Firmen<sup>2</sup>: ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim (DNA Molecular Weight Marker X); QIAGEN, Hilden (QIAamp DNA Mini Kit, QIAamp DNA Stool Mini Kit, QIAquick PCR Purification Kit); MWG-BIOTECH, Ebersberg (Oligonukleotide); PERKIN-ELMER, Weiterstadt (Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit); AMERSHAM-PHARMACIA, Freiburg (Ready-To-Go PCR Beads) und INVITROGEN, Carlsbad, USA (Topo TA Cloning Kit for Sequencing).

Die den Reinigungs-Kits für Nukleinsäuren beiliegenden Puffer und Lösungen sind in der Regel nicht spezifiziert und werden daher bei der Beschreibung der Methoden mit der Bemerkung „im Lieferumfang“ gekennzeichnet.

Medien, Puffer und Lösungen wurden mit MilliQ-Wasser (MILLIPORE, Eschborn) angesetzt, alle anderen Mischungen hingegen, die in der PCR oder Sequenzierungsreaktionen eingesetzt wurden, mit DNA-freiem Wasser (FLUKA BIOCHEMICA, Buchs, Schweiz).

### 1.2 GERÄTE

Für die Erarbeitung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden folgende relevanten Geräte eingesetzt: die Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE) wurde in einem DGGE-2001-Gerät (CBS SCIENTIFIC, Del Mar, USA) mit angeschlossenem Power-Pac-300-Netzteil (BIORAD, München) durchgeführt, der zur Gel-Bereitung notwendige Gießstand kam ebenfalls von BIORAD. Als Gerät für die Sequenzierung stand ein ABI 310 (PERKIN-ELMER, Weiterstadt) mit zugehöriger Auswertungssoftware zur Verfügung. Als Thermocycler wurde das Modell Progene (THERMODUX, Wertheim) eingesetzt. Die Gele wurden mit Hilfe des Biodoc-II-Systems (BIOMETRA, Göttingen) dokumentiert. Die meisten Mischvorgänge im µl-Bereich wurden mit Hilfe eines Wirbelmischers

<sup>1</sup> Sofern kein anderes Land vermerkt wurde, befindet sich die Firma bzw. Dependence in Deutschland.

<sup>2</sup> Es war nicht immer klar, ob für ein verwendetes Produkt ein Schutzvermerk galt (©, ®, ™), deshalb wurde im gesamten Text der vorliegenden Arbeit auf deren Angabe verzichtet, um Missverständnisse zu vermeiden. Das bedeutet jedoch nicht automatisch, dass Namen von erwähnten Produkten frei verwendbar sind.

(Vortex), Modell RS1 (IDL) durchgeführt. Zentrifugationsvorgänge wurden je nach Anforderung in einer Tischzentrifuge, Modell 2-15 bzw. einer Kühlzentrifuge, Modell 3K30 (beide SIGMA, Osterode) vorgenommen. Lediglich für die CTAB-Extraktionsmethode kam eine Großzentrifuge, Modell J2-MC (BECKMANN, München) zum Einsatz. Elektrophoresekammer für Agarose-Gele war das Wide-Mini-Sub-Cell-GT-System mit angeschlossenem Power-Pac-200-Netzteil (beides BIORAD, München).

Das Pfennigs-Medium wurde in einer speziell dafür hergestellten 5-Liter-Glasflasche bereitet (Pfennig & Trüper 1992), die vier Öffnungen an der Oberseite aufwies. Eine der zwei zentralen Öffnungen ermöglichte die sterile Begasung des Mediums durch einen Schlauch mit einem Baumwollfilter. Durch die andere führte ein Glasrohr bis auf den Boden der Flasche, über das durch einen angeschlossenen Schlauch und eine kleine Glasglocke das Medium steril in luftdicht schließende 100-ml-Glasflaschen entnommen werden konnte. Die Öffnungen 3 und 4 bestanden lediglich aus dicht schließenden Schraubverschlüssen. Durch die eine konnte bei Bedarf Gas entweichen und durch die andere konnten sterile Lösungen zugegeben werden.

Ebenfalls in einer eigens dafür angefertigten Glasflasche (Siefert & Pfennig 1984) wurde die Sulfid-Futterlösung hergestellt und aufbewahrt. Sie bestand aus einer 500-ml-Flasche mit drei Öffnungen. Eine war zentral an der Oberseite und ermöglichte über einen Schlauch und ein Baumwollfilter die sterile Zugabe von CO<sub>2</sub>. Eine zweite daneben, hatte einen Schraubverschluss und diente dem Gas-Auslass beim Durchspülen mit CO<sub>2</sub>. Die dritte Öffnung war unten an der Seite der Flasche und führte über einen kurzen Schlauch mit einem Ventil zu einem schmalen hohen Reagenzglas, das mit einem Schraubverschluss versehen war. Über diesen Weg war es möglich, die unter Druck stehende Sulfid-Futterlösung abzulassen, ohne dass Sauerstoff in die Hauptflasche gelangte.

## 2 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

### 2.1 BAKTERIENSTÄMME

Zu Beginn dieser Arbeit stand eine große Anzahl an Reinkulturen zur Verfügung, aus denen DNA isoliert wurde. Zusätzlich wurden DNA-Sequenzen aus der Datenbank herangezogen (Tabelle 1). Diese breite Datenbasis war eine gute Grundlage für die nachfolgenden phylogenetischen Berechnungen.

*Chloroherpeton thalassium* trägt keine Stammbezeichnung, weil diese für die 16S-rDNA-Sequenz in der Datenbank nicht vorhanden war (Gibson *et al.* 1984). Der GC-Gehalt wurde für diese Bakterienart von denselben Autoren an drei verschiedenen Stämmen gemessen (GB 78, GB 80 und GB 81) und ist deshalb kein einzelner Wert sondern ein Bereich (45-48,2 mol%).

Tabelle 1: Verwendete Stämme oder deren Sequenzen (Grüne Schwefelbakterien)

Die Gruppeneinteilung (1-5) ist das Resultat der phylogenetischen Berechnungen dieser Arbeit.

Gruppe	GSB-Arten	Stamm <sup>3</sup>	4	5	16S Acc. Nr. <sup>6</sup>	fmoA Acc. Nr. <sup>6</sup>	Salz <sup>7</sup>	<sup>8</sup>	GC <sup>9</sup>
①	<i>Ptc. aestuarii</i>	DSM 271 <sup>T</sup>	I		Y07837	▶ AJ391151	✓	Pf	56,4
	<i>Chl. vibrioforme</i>	DSM 260 <sup>T</sup>	I		M62791	▶ AJ391145	✓	Pf/Ma	53,5
	<i>Chl. vibrioforme</i>	CHP 3402			AJ291827	AJ306185	✓	Vi	
	<i>Pld. phaeum</i>	CIB 2401			AJ291828	AJ306192/-89 <sup>10</sup>	✓	Vi	
	<i>Chl. phaeovibrioides</i>	DSM 1678	I	§	▶ AJ290833	▶ AJ391163	✓	Pf	
	<i>Ptc. aestuarii</i>	CHP 3401			AJ291826	AJ306195/-4 <sup>10</sup>	✓	Vi	
	<i>Ptc. aestuarii</i>	2K	A	§	▶ AJ290835	▶ AJ290823	✓	Am	
②	<i>Chl. vibrioforme</i>	DSM 262	I		Y08103	▶ AJ391159	✓	Pf/Ma	57,1
	<i>Pld. luteolum</i>	DSM 273 <sup>T</sup>	I		Y08107	▶ AJ391152	✓	Pf/Ma	58,1
	<i>Chl. phaeovibrioides</i>	UdG 6035			Y10653	—	✓	Fi	
	<i>Chl. vibrioforme</i>	DSM 261	I	§	▶ AJ290828	▶ AJ391146	✓	Pf	52,0
	<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i>	DSM 265 <sup>T</sup>	I	§	▶ AJ290829	▶ AJ391160	✓	Pf	53,5
	<i>Chl. phaeovibrioides</i>	DSM 269 <sup>T</sup>	I		Y08105	▶ AJ391150	✓	Pf	53,0
	<i>Chl. phaeovibrioides</i>	DSM 270	I	§	▶ AJ290834	▶ AJ391164	✓	Pf	52,0
③	<i>Pld. phaeoclathratiforme</i>	DSM 5477 <sup>T</sup>	O		Y08108	▶ AJ290822	—	Pf	47,9
	<i>Chl. phaeobacteroides</i>	DSM 266 <sup>T</sup>	I		Y08104	▶ AJ391148	—	Pf	49,0
	<i>Chl. ferrooxidans</i>	DSM 13031 <sup>T</sup>			Y18253	—	—	He	
	<i>Pld. clathratiforme</i>	PG			Y08106	—	—	Ov	
	<i>Chl. limicola</i>	DSM 245 <sup>T</sup>	I		Y10113	▶ AJ391153	—	Pf	51,0
	<i>Chl. limicola</i>	DSM 246	I	§	▶ AJ290824	▶ AJ391142	—	Pf	52,0
	<i>Chl. limicola</i>	DSM 247	I		—	▶ AJ391154	—	Pf	51,5
	<i>Chl. limicola</i>	DSM 248	I		—	▶ AJ391155	—	Pf	51,5
	<i>Chl. limicola f. thios.</i>	1630	I	§	▶ AJ290826	▶ AJ391157	—	Pf	52,5
	<i>Chl. limicola f. thios.</i>	9330	I	§	▶ AJ290827	▶ AJ391158	—	Pf	52,0
	<i>Chl. phaeobacteroides</i>	DSM 1855	I	§	▶ AJ290832	▶ AJ391162	—	Pf	
	<i>Chl. phaeobacteroides</i>	UdG 6046			Y10650	—	—	Fi	
	<i>Chl. phaeobacteroides</i>	UdG 6047			Y10651	—	—	Fi	
	<i>Chl. phaeobacteroides</i>	UdG 6051			Y10652	AJ306191	—	Fi	
④	<i>Chl. limicola</i>	UdG 6044			Y10645	AJ306190	—	Fi	
	<i>Chl. limicola</i>	M1			AB054671	—	nb	Ka	
	<i>Chl. vibrioforme</i>	UdG 6043			Y10648	AJ306187/-93 <sup>10</sup>	✓	Fi	
	<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i>	DSM 263	I		Y10647	▶ AJ391147	✓	Pf	56,6
	<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i>	NCIB 8346	I	§	▶ AJ290830	▶ AJ391161	✓	Pf	56,1
	<i>Chl. chlorovibrioides</i>	UdG 6026			Y10649	AJ306182/-8 <sup>10</sup>	✓	Fi	
	<i>Chl. limicola</i>	UdG 6038			Y10641	—	—	Fi	
	<i>Chl. limicola</i>	UdG 6040			Y10642	—	—	Fi	
	<i>Chl. limicola</i>	UdG 6041			Y10643	AJ306183	—	Fi	
	<i>Chl. limicola</i>	UdG 6042			Y10644	—	—	Fi	
	<i>Chl. limicola</i>	UdG 6045			Y10646	—	—	Fi	
	<i>Chl. phaeobacteroides</i>	DSM 1677	I	§	▶ AJ290831	▶ AJ391149	—	Pf	
	<i>Chl. phaeobacteroides</i>	1549			AJ299413	AJ306184	—	Or	
	<i>Chl. limicola f. thios.</i>	DSM 249 <sup>T</sup>	I		Y08102	▶ AJ391143 <sup>11</sup>	—	Pf	58,1
	<i>Chl. limicola f. thios.</i>	DSM 257	I		—	▶ AJ391156	—	Pf	52,5
	<i>Chl. limicola f. thios.</i>	1430	I	§	▶ AJ290825	▶ AJ391144	—	Pf	58,1
	<i>Clc. sulfurica</i>	1			X53184	—	nb		
<i>Chl. tepidum</i>	ATCC 49652 <sup>T</sup>			M58468	L13700	—	Wa	56,5	
⑤	<i>Chp. thalassium</i>				AF170103	—	✓	Gi	45-48,2

<sup>3</sup> Typenstämmen sind mit einem hochgestellten „T“ gekennzeichnet<sup>4</sup> Stämme dieser Arbeit: I: von J. Imhoff (IfM, Kiel) zur Verfügung gestellt (ursprünglich von N. Pfennig, Konstanz), A: von J. Amesz (Universität Leiden, Niederlande, †), O: von J. Overmann (Universität München).<sup>5</sup> §: 16S-rDNA- und fmoA-Sequenzen resultieren aus der selben DNA-Probe, die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurde.<sup>6</sup> Zugangsnummer der Datenbank EMBL-EBI, z.B. über SRS (Sequence Retrieval System), URL 11, S. 154. ▶: Sequenzen wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt und in der Datenbank hinterlegt. Alle anderen stammen aus der Datenbank.<sup>7</sup> Salzbedarf ✓: ja, -: nein, nb: nicht bekannt<sup>8</sup> Quellen für Salzbedarf und GC-Gehalt: Am: J. Amesz (Universität Leiden, Niederlande, †), Fi: Figueras *et al.* 1997, Gi: Gibson *et al.* 1984, He: Heising *et al.* 1999, Ka: Kanao *et al.* 2001, Ma: Mandel *et al.* 1971 (GC-Gehalt), Or: J. G. Ormerod (Universität Oslo, Norwegen), Ov: Overmann & Tuschak 1997, Pf: N. Pfennig (Konstanz), Vi: Vila *et al.* 2002, Wa: Wahlund *et al.* 1991<sup>9</sup> GC-Gehalt (Angabe in mol%)<sup>10</sup> Diese Sequenz ist in getrennten Abschnitten unter zwei Zugangsnummern in der Datenbank gespeichert.<sup>11</sup> Die fmoA-Sequenz von *Chl. limicola f. thios.* DSM 249<sup>T</sup>, welche für die Konstruktion der Primer F-Start-fmo und R-889-fmo herangezogen wurde (Kapitel 7.2, S. 49), hat die Zugangsnummer X83529.

Tabelle 2: Verwendete Sequenzen anderer Bakterien<sup>12</sup>

Bakterienarten	Stamm	16S Acc. Nr. <sup>13</sup>
<i>Anabaena variabilis</i>	IAM M-3	AB016520
<i>Aquifex aeolicus</i>	VF5	AJ309733
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>		M34116
<i>Deinococcus geothermalis</i>	E50053	Y15444
<i>Desulfuromusa bakii</i>	DSM 7345	X79412
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11775T	X80725
<i>Escherichia coli</i>	TOP10 One Shot	Für die Klonierung (von INVITROGEN)
<i>Lewinella persicus</i>	ATCC 23167	AF039295
<i>Planctomyces maris</i>	DSM 8797T	AJ231184
<i>Streptomyces thermovulgaris</i>	40579 <sup>T</sup>	Z68098
<i>Thermodesulfobacterium thermophilum</i>	DSM 1276	AF334601
<i>Rhodothermus marinus</i>	DSM 4252	X80994
<i>Thermotoga subterranea</i>	SL1	U22664
<i>Treponema pallidum subsp. pertenue</i>	Gauthier	AF426102
<i>Verrucomicrobium spinosum</i>	DSM 4136T	X90515

## 2.2 MEDIEN UND ANZUCHTBEDINGUNGEN

Die Reinkulturen wurden vor der Entnahme einer kleinen Menge Kulturflüssigkeit zur DNA-Gewinnung mehrfach mit einer Na<sub>2</sub>S-Lösung nachgefüttert. Danach in neues Pfennigs-Medium überimpft (Pfennig & Trüper 1992) und wieder mehrfach nachgefüttert, um eine möglichst hohe Lebendbakteriendichte in vollem Wachstum (*log*-Phase) zu erhalten.

Die Grundkomponenten von Pfennigs-Medium wurden unter Rühren in eine speziell dafür angefertigte Flasche gegeben (Kapitel 1.2, S. 11), in folgender Reihenfolge:

MilliQ-Wasser	4900 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,36 g
NH <sub>4</sub> Cl	1,36 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2,00 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,00 g
KCl	1,36 g

<sup>12</sup> Alle Sequenzen sonstiger Bakterien sind der Datenbank EMBL-EBI entnommen.

<sup>13</sup> Zugangsnummer der Datenbank EMBL-EBI, z.B. über SRS (Sequence Retrieval System), URL 11, S. 154

Die befüllte Flasche wurde 40 min bei 121 °C mit leicht geöffneten Schraubverschlüssen autoklaviert und anschließend unter N<sub>2</sub>-Druck (50-100 mbar) bei Raumtemperatur (RT) zum Abkühlen stehen gelassen. Danach wurde unter ständigem Rühren mit CO<sub>2</sub> bis zur Sättigung begast (40 min, 100-150 mbar) und die Flüssigkeit dadurch gesättigt. Unter N<sub>2</sub>-Zustrom (50-100 mbar) wurden anschließend unter Rühren folgende Lösungen zugegeben:

Spurenelement-Stammlösung (SL 12)	4 ml	(steril filtriert)
Vitamin-B <sub>12</sub> -Stammlösung	4 ml	(steril filtriert)
NaHCO <sub>3</sub> -Lösung	80 ml	(autoklaviert)
Na <sub>2</sub> S-Lösung	16 ml	(autoklaviert)

Nach vollständigem Vermischen wurde der pH-Wert durch Rühren und Begasen mit CO<sub>2</sub> (100-150 mbar) auf 6,8 eingestellt. Schließlich konnte unter erneutem N<sub>2</sub>-Druck (50-100 mbar) das Medium in sterile 100-ml-Glasflaschen randvoll abgefüllt werden.

Im folgenden ist die Zusammensetzung der einzelnen Lösungen aufgeführt:

#### Spurenelement-Stammlösung (SL 12)

1	MilliQ-Wasser	1000 ml			
2	FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1100 mg	CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	190 mg	6
3	ZnCl <sub>2</sub>	42 mg	CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	2 mg	7
4	MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	50 mg	NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	24 mg	8
5	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	300 mg	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	18 mg	9

Die Substanzen wurden der Reihe nach gelöst (1-9) und der pH-Wert mit HCl auf 2-3 eingestellt. Für die **Vitamin-B<sub>12</sub>-Stammlösung** wurde 2 mg Vitamin-B<sub>12</sub> in 100 ml MilliQ-Wasser gelöst. Die **NaHCO<sub>3</sub>-Lösung** bestand aus 6 g NaHCO<sub>3</sub>, das in 80 ml MilliQ-Wasser gelöst (= 7,5 %), anschließend mit CO<sub>2</sub> gesättigt und unter CO<sub>2</sub>-Druck in einer geschlossenen Flasche autoklaviert wurde. Die **Na<sub>2</sub>S-Lösung** setzte sich aus 1,6 g Na<sub>2</sub>S x 9 H<sub>2</sub>O zusammen, das in 16 ml MilliQ-Wasser aufgelöst (= 10 %), kurz mit N<sub>2</sub> begast und unter N<sub>2</sub>-Druck in einer geschlossenen Flasche autoklaviert wurde.

Beim Überimpfen einer Reinkultur in neues Pfennigs-Medium (PM) wurden zuerst unter sterilen Bedingungen 10 ml PM aus der randvollen 100-ml-Flasche genommen, um dann 10 ml Bakterien-suspension einzufüllen. Bei den Stämmen mit Salzbedarf (Tabelle 1, S. 13) wurden hingegen 13,5 ml

entfernt, und dann mit 10 ml Bakteriensuspension und 3,5 ml **Salz-Stammlösung** aufgefüllt. Dies ergab eine Salz-Endkonzentration von 1 %.

**Salz-Stammlösung** (nach Pfennig, Konstanz)  
(autoklaviert)

MilliQ-Wasser	170 ml
NaCl	50 g
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	8 g

Die angeimpften Flaschen wurden dann dicht verschlossen für 3 h dunkel aufbewahrt. Dabei reagierte der durch das Öffnen der Flaschen ins Medium gelangte Sauerstoff mit dem Na<sub>2</sub>S, bevor er die anaeroben Bakterien schädigen konnte. Danach wurden die Flaschen bei 20 °C und 200-500 Lux inkubiert und die Bakterien damit zum Wachstum gebracht. Zuerst wurde das Sulfid von den Bakterien zu Schwefel reduziert, der das Medium milchig eintrübte. Nach Reduzierung des Schwefels zu Sulfat verschwand die Trübung wieder.

Als qualitative chemische Nachweismethode für S<sup>2-</sup> diente die Reaktion mit einer definierten CuSO<sub>4</sub>-Lösung.

**Schwefeltestlösung**

CuSO <sub>4</sub>	5 mM
HCl	50 mM

Dazu wurde unter sterilen Bedingungen 1 ml der Kulturflüssigkeit in ein Reagenzröhrchen gegeben und mit 1 ml der leicht bläulichen Schwefeltestlösung vermischt. Bei Vorhandensein von Sulfid erfolgte ein deutlicher Farbumschlag nach braunrot (CuS). Dieser Test war deshalb besonders wichtig, weil bei zu frühem Nachfüttern mit Sulfid eine das Bakterienwachstum inhibierende Na<sub>2</sub>S-Konzentration entstehen könnte. Falls der Farbumschlag erfolgte, wurde nicht nachgefüttert, sondern die 100-ml-Flasche lediglich mit 1 ml Pfennigs-Medium wieder aufgefüllt, so dass bei verschlossener Flasche nur eine kleine Luftblase übrig war.

Wenn aber Sulfid und Schwefel verbraucht war (und damit auch CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> in Biomasse umgesetzt wurde), musste mit einer speziellen Sulfid-Futterlösung neues Reduktionsmittel nachgeliefert werden. Das erfolgte, indem 1 ml der Sulfid-Futterlösung zugegeben wurde. Auch danach wurden die Kulturen zunächst 3 h dunkel gestellt, bevor sie wieder ans Licht kamen. Diese Prozedur wiederholte sich noch 3-4 Mal, bis die Kultur dicht genug gewachsen war.

**Sulfid-Futterlösung** (Siefert & Pfennig 1984)

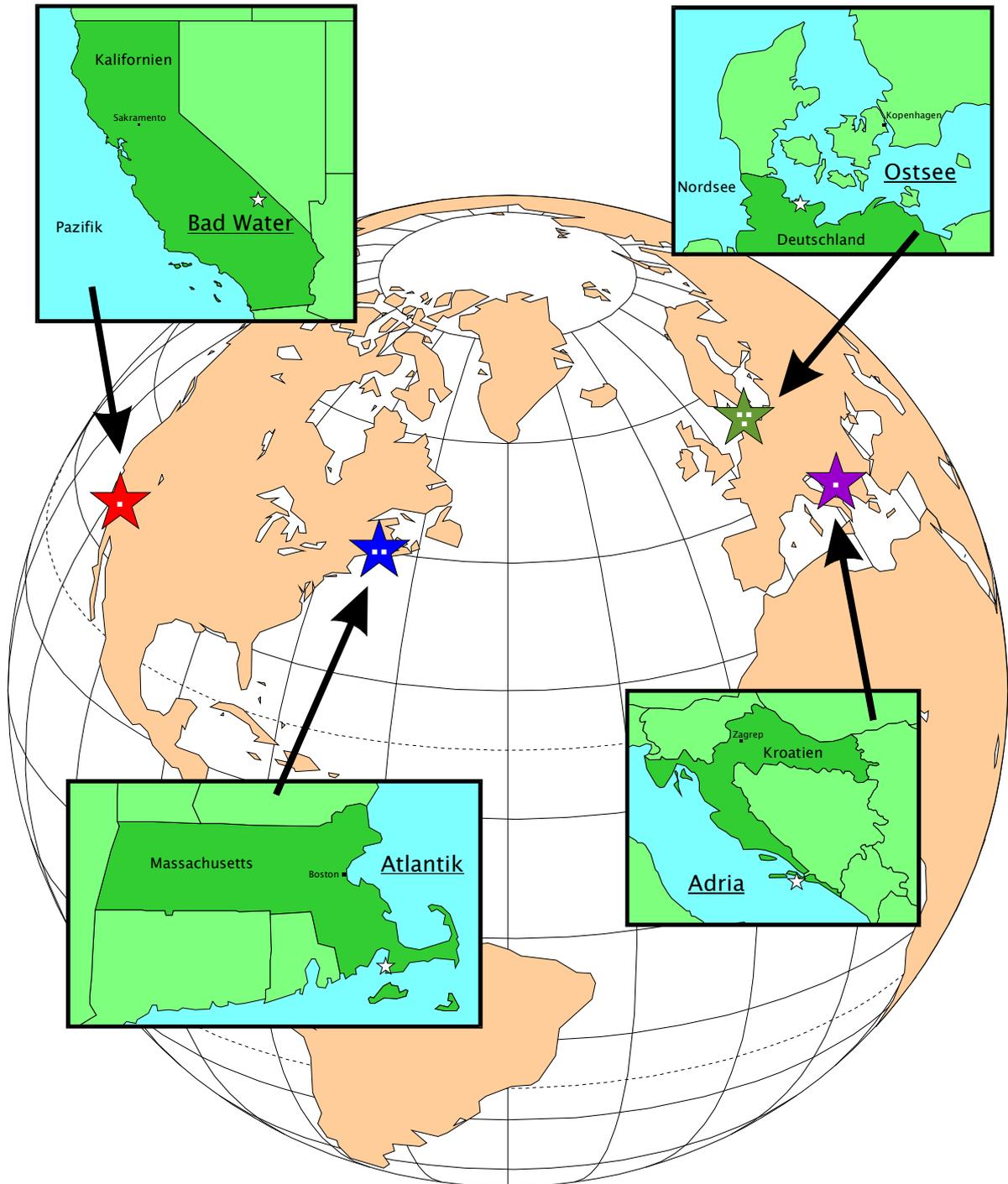
MilliQ-Wasser	250 ml
Na <sub>2</sub> S x 9 H <sub>2</sub> O	7,00 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2,65 g

Die Sulfid-Futterlösung wurde im speziell dafür konstruierten Glasgefäß (Kapitel 1.2, S. 11) hergestellt. Dazu wurden oben angegebene Substanzen gemischt und 20 min bei 121 °C mit leicht geöffneten Schraubverschlüssen autoklaviert. Danach wurde mit CO<sub>2</sub> begast. Nachdem die Luft verdrängt war, wurde die Flüssigkeit unter CO<sub>2</sub>-Druck (300 mbar) gesättigt (pH 7,2). Damit keine Luft in das Gefäß gelangen konnte, musste ständig ein positiver CO<sub>2</sub>-Druck in der Flasche herrschen.

### 2.3 PROBEHAHMESTANDORTE

Es wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Vielzahl an Umweltproben untersucht. Aufgrund der Lage des Standortes und dem Vergleich der Zwischenergebnisse wurde eine stichprobenartige Auswahl getroffen, die hier behandelt wird. Alle Proben stammen von J. Imhoff, wobei die Probe Cviic-2 ursprünglich von V. Cviić entnommen wurde. Es wurde darauf geachtet, dass die Auswahl geographisch (Abbildung 5) und ökologisch eine im Rahmen der vorhandenen Proben möglichst breite Streuung aufwies. Außerdem sollten alle verwendeten Verfahren der Weiterbehandlung nach Probenahme enthalten sein (Tabelle 3, S. 19).

Bis auf BW-4 kamen alle Proben von marinen oder marin geprägten Standorten. Laboe-3, Stak-2 und Stein-1 sind von deutschen Ostseestränden am Ausgang der Kieler Förde genommen worden, in der Nähe der Orte Laboe, Stakendorf bzw. Stein. Cviic-2 wurde aus dem geschichteten Salzsee „Malo Jezero“ auf der Insel Mljet in Kroatien genommen (Cviić 1955). Auch dieser See steht mit dem Meer (Adria) in Verbindung. Sip-4 und SSM-3 sind Proben aus dem Purpurfarbstreifensandwatt bei Sippewissett an der Atlantikküste der USA. Ebenfalls aus den USA stammt BW-4. Diese Schlammprobe ist vom Rand des salzhaltigen Tümpels Bad Water im Death Valley entnommen.



**Abbildung 5: Geographische Lage der Probenahmestandorte**

Die Punkte in den großen Sternen symbolisieren die Anzahl der Proben an diesem Standort.

## 2.4 PROBENAHE UND -BEHANDLUNG

Tabelle 3: Unterschiede der Standorte und Weiterbehandlung der Proben

Probe	Staat	Wasser-Gebiet	Art	Behandlung nach Probenahme <sup>14</sup>	DNA-Extraktion <sup>15</sup>	16S	<i>fmoA</i>
<b>BW-4</b>	USA	Bad Water	Salztümpel (kontinental)	PM, dann Na <sub>2</sub> S	Stool-Kit	✓	—
<b>Cviic-2</b>	Kroatien	Adria	Salzsee (mit dem Meer verbunden)	Winogradski, dann PM, dann Na <sub>2</sub> S	Standard	✓	✓
<b>Laboe-3</b>	Deutschland	Ostsee	Strand (marin)	einfache Anreicherung	Stool-Kit	✓	✓
<b>Sip-4</b>	USA	Atlantik	Strand (marin)	5 % Formaldehyd	CTAB	✓	✓
<b>SSM-3</b>	USA	Atlantik	Strand (marin)	5 % Formaldehyd	CTAB	✓	✓
<b>Stak-2</b>	Deutschland	Ostsee	Strand (marin)	einfache Anreicherung	Stool-Kit	—	✓
<b>Stein-1</b>	Deutschland	Ostsee	Strand (marin)	einfache Anreicherung	Stool-Kit	✓	—

Für PSA-1, Sip-4 und SSM-3 wurde direkt am Standort Schlamm mit 5%-Formaldehydlösung versetzt. Für die drei Ostseeproben wurde in ein 250-ml-Glasgefäß eine Mischung aus Meerwasser, organisches Material und Sediment randvoll gegeben, luftdicht verschlossen und bei 20°C und diffusem Tageslicht inkubiert (einfache Anreicherung). Für BW-4 wurde Schlamm am Standort in Pfennigs-Medium (Pfennig & Trüper 1992, S. 14) überführt und bei RT und diffusem Tageslicht angereichert. Später wurde das verbrauchte Sulfid mehrmals mit einer Schwefelstammlösung (Siefert & Pfennig 1984, S. 14) nachgefüttert. Genauso wurde mit Cviic-2 verfahren (Imhoff 1976); allerdings wurde vor der Anreicherung in Pfennigs-Medium zuerst Schlamm und Wasser in sogenannten Winogradski-Säulen angereichert (Winogradski 1888).

<sup>14</sup> PM = Pfennigs-Medium

<sup>15</sup> Standard-, Stool-Kit- und CTAB-Methode: Kapitel 3.1, S. 20 ff.

### 3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

Unter diesem Kapitel sind alle Techniken vereint, die bei der Extraktion, Aufreinigung, Amplifikation, Sequenzierung oder elektrophoretischen Trennung von DNA eingesetzt wurden.

#### 3.1 EXTRAKTION VON DNA

Unabhängig von der Probe wurde die Extraktion von DNA immer nach dem gleichen Prinzip durchgeführt. Zunächst wurde das Material einer Lyse unterzogen, um die Zellbestandteile freizusetzen, dann wurde die DNA von den übrigen Zellbestandteilen getrennt und schließlich über Säulchen, die eine spezielle Bindungsmatrix enthielten, per Zentrifugation aufgereinigt. Nukleinsäuren aus Sedimentproben sind in oft hohem Maße mit Huminstoffen belastet, welche bei der normalen Extraktion nicht vollständig entfernt werden können. Diese Stoffe können nachfolgende enzymatische Reaktionen inhibieren. Aus diesem Grund wurde bei Proben mit viel organischem Material ein zusätzlicher Reinigungsschritt eingefügt, der die Huminstoffe an eine Matrix adsorbiert.

##### 3.1.1 Extraktion von DNA aus Flüssigkeiten mittels Standard-Methode

Die Extraktion von DNA aus flüssigen Bakterienkulturen und wässrigen Umweltproben wurde mit Hilfe des „QIAamp DNA Mini Kit“ nach einem modifizierten Protokoll durchgeführt. Puffer AL und AW befanden sich im Lieferumfang. Je ca. 2 ml der Probe wurden bei 4°C mit 5000 x g für 10 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig vom Pellet abpipettiert. Zu jedem Probengefäß wurden nun 180 µl Lysispuffer zugesetzt und sorgfältig resuspendiert, kräftig gemischt<sup>16</sup> und 30 min bei 37°C inkubiert.

<b>Lysispuffer</b>	Lysozym	20 mg/ml
	Tris/HCl	20 mM (pH 8,0)
	EDTA	2 mM
	Triton	1,2 %

Danach wurden jedem Ansatz 200 µl Puffer AL und 25 µl Proteinase-K-Lösung (17,8 mg/ml) zugesetzt, gründlich gemischt und 30 min bei 70°C inkubiert. Nach der Zugabe von 210 µl Ethanol<sup>abs</sup> wurde kräftig gemischt und die Mischung auf je ein QIAamp-Minisäulchen aufgetragen, das in einem 2-ml-Auffangröhrchen steckte. Die Säulchen wurden verschlossen und für 1 min bei RT und 6000 g zentrifugiert. Die aus den Zellen freigesetzte DNA band dabei an die Matrix in den Säulchen, während

<sup>16</sup> Auf diese Weise im Text angegebene Mischvorgänge wurden mit einem Wirbelmischer (Vortex) durchgeführt.

Zelltrümmer, Proteine, DNA-, RNA-Bruchstücke und Salze sich im Durchlauf befanden. Anschließend wurden die Säulchen in neue Auffangröhrchen überführt, je 500 µl Puffer AW zugesetzt und mit 14000 g bei RT für 1 min zentrifugiert. Die DNA wurde so gereinigt, ohne sich von der Matrix zu lösen. Zur Elution der DNA wurden die Säulchen in 1,5-ml-Reaktionsgefäße gesteckt und 200 µl DNA-freies Wasser (70°C) wurde auf die Matrix pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 min wurden die Säulchen 1 min lang bei 6000 g und RT zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal durchgeführt. Das Gesamtvolumen betrug somit 400 µl.

### 3.1.2 Extraktion von DNA aus Sedimentproben mittels Stool-Kit-Methode

Bei dieser Extraktion wurde nach der Beschreibung des Herstellers des „QIAamp DNA Stool Mini Kit“ verfahren, der eigentlich für die Extraktion von DNA aus humanen Stuhlproben hergestellt wurde, aber laut Aussage der Firma QIAGEN (Hilden) auch Huminstoffen aus Sediment abfangen kann. Puffer ASL, AL, AW1, AW2, AE sowie die InhibitEX-Tabletten, die Proteinase-K-Lösung und QIAamp-Minisäulchen befanden sich im Lieferumfang.

Eine Umweltprobe mit viel organischem Material wurde in ein Reaktionsgefäß gefüllt und bei 5000 g und RT für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 200 mg vom Pellet abgewogen. Dann wurde 1,4 ml Puffer ASL dazugegeben und 1 min kräftig gemischt. Anschließend wurde die Suspension 5 min lang bei 70°C erhitzt, danach für 15 s kräftig gemischt und bei 14000 g 1 min lang zentrifugiert, um feste Partikel zu pelletieren. Vom Überstand wurde 1,2 ml abgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Zu dieser Flüssigkeit wurde eine Tablette InhibitEX gegeben, an dessen Matrix sich die Huminstoffe adsorbieren sollten. Sofort wurde 1 min kräftig gemischt und dann 1 min bei RT inkubiert. Dann wurde bei 14000 g die Probe 3 min lang bei RT zentrifugiert, um die an die Matrix von InhibitEX gebundenen Inhibitoren zu pelletieren. Der gesamte Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und weitere 3 min bei 14000 g zentrifugiert. Vom Überstand wurde 200 µl in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert, in dem vorher 15 µl Proteinase-K-Lösung zugegeben worden war. Dieser Mischung wurde noch 200 µl Puffer AL zugefügt und dann 15 s lang kräftig gemischt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß 10 min lang bei 70°C inkubiert und danach 200 µl Ethanol<sup>abs</sup> zugegeben. Die Mischung wurde kräftig gemischt und komplett in ein QIAamp-Minisäulchen pipettiert, das in einem Auffangröhrchen steckte. Das Säulchen wurde geschlossen und bei 14000 g 1 min lang zentrifugiert. Die DNA war nun an der Matrix gebunden, die sich in dem Säulchen befand. Dieses wurde in ein neues Auffangröhrchen gesteckt und 500 µl Puffer AW1 in das Säulchen pipettiert. Wieder wurde bei 14000g 1 min lang zentrifugiert und die DNA dabei gereinigt. Das Säulchen wurde erneut in ein neues Röhrchen überführt und 500 µl Puffer AW2 dazugegeben. Dieses Mal wurde 3 min lang bei 14000 g zentrifugiert. Um nun die Matrix ganz von Waschpuffern zu befreien, wurde ein letztes Mal bei 14000 g 1 min lang zentrifugiert. Zur Elution der DNA wurde das Säulchen in ein neues Reaktionsgefäß gesteckt, 200 µl Puffer AE auf die Matrix pipettiert, 1 min inkubiert und bei 14000 g 1 min lang zentrifugiert. Die DNA befand sich dann gelöst im Reaktionsgefäß.

### 3.1.3 Extraktion von DNA aus Sedimentproben mittels CTAB-Methode

Eine andere Methode bedient sich zur Entfernung der inhibierenden Huminstoffe keiner Matrix sondern der unterschiedlichen Lösbarkeit in Chloroform bzw. Isoamylalkohol. Diese Reinigung hat sich bei Proben bewährt, die in Formaldehyd fixiert waren.

1 g Sediment wurde in ein 10 ml-Röhrchen gefüllt, mit 2,7 ml DNA-Extraktionspuffer sowie 20 µl Proteinase-K-Lösung (10<sup>mg</sup>/<sub>ml</sub>) versetzt und bei 37°C 30 min lang inkubiert.

#### DNA-Extraktionspuffer

Tris/HCl	100 mM	pH 8,0
EDTA	100 mM	pH 8,0
NaCl	1500 mM	
CTAB	1 %	

Anschließend wurden 300 µl SDS-Lösung (20 %) hinzugesetzt, vermischt und 2 h bei 65°C inkubiert, wobei alle 15-20 min vorsichtig geschüttelt wurde. Nach erfolgter Zentrifugation (10 min, 6000 g, RT) wurde der Überstand in ein neues 10-ml-Röhrchen überführt, das Pellet noch zweimal mit 0,9 ml DNA-Extraktionspuffer und 100 µl SDS-Lösung (20 %) 10 s kräftig gemischt, 10 min bei 65°C inkubiert und abzentrifugiert (siehe oben). Alle Überstände wurden zusammengefügt, mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24/1) kräftig gemischt und zur Phasentrennung kurz anzentrifugiert. Die wässrige Phase (ca. 4,5 ml) wurde in ein neues 10-ml-Röhrchen überführt und die DNA durch Zusatz von ca. 2,7 ml (0,6 Vol.) Isopropanol ausgefällt. Die ausgefällte DNA wurde zentrifugiert (20 min, 16000 g, RT), das Pellet nach dem Abpipettieren des Überstandes mit ca. 500 µl eiskaltem Ethanol (70 %) gereinigt, nochmals zentrifugiert (10 min, 16000 g, RT), der Überstand verworfen und das neue Pellet in 1 ml DNA-freiem Wasser aufgenommen und gelöst. Dieses Rohlysate wurde im Folgenden mit Hilfe des „QIAquick PCR Purification Kits“ aufgereinigt. 100 µl Rohlysate wurden also mit 500 µl Puffer PB (im Lieferumfang) vermischt und zusammen mit diesem auf ein QIAquick-Minisäulchen (im Lieferumfang) aufgetragen und 1 min mit 14000 g bei RT zentrifugiert. Die DNA blieb an der Matrix adsorbiert; der Durchlauf wurde verworfen. Auf das Säulchen wurde dann 750 µl Puffer PE (im Lieferumfang) gegeben und erneut für 1 min mit 14000 g bei RT zentrifugiert. Der Durchlauf wurde wieder verworfen und nochmals für 1 min zentrifugiert, um letzte Reste des Waschpuffers zu entfernen. Zur Elution der DNA wurden 50 µl DNA-freies Wasser auf das Säulchen pipettiert, 1 min bei RT inkubiert und 1 min bei 14000 g bei RT zentrifugiert. Der Durchlauf enthielt dann die gelöste DNA.

## 3.2 POLYMERASE-KETTEN-REAKTION

Für die Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. Polymerase-Chain-Reaction = PCR) wurden käuflich zu erwerbende Mischungen verwendet. Hierbei befinden sich die Substanzen in einer Trägermatrix in

500- $\mu$ l-Reaktionsgefäßen passend für die verwendeten Thermocycler (Ready-To-Go PCR Beads). Diese Mischung enthielt *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, eine dNTP-Mischung (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Puffer, Verstärker wie BSA und Triton und  $MgCl_2$ . Zusammentzügen waren nur noch die gelöste Template-DNA, die Primer (Oligonukleotide in Wasser gelöst) und DNA-freies Wasser bis zu einem Endvolumen von 25  $\mu$ l, wobei das durch die PCR-Beads verdrängte Volumen mitberücksichtigt werden musste. Diese Mischung wurde schließlich den PCR-Beads zugesetzt.

<b>allgemeine PCR</b>	Ready-To-Go PCR Beads	1 Kügelchen	
	Template-DNA	10-100 ng	(gelöst)
	Primer 1	10 pmol	(gelöst)
	Primer 2	10 pmol	(gelöst)
	DNA-freies Wasser	ad 25 $\mu$ l	

Die Ergebnisse mit diesem System waren ausgezeichnet im Vergleich zu anderen Polymerasen und Systemen.

Die verwendete *Taq*-Polymerase besitzt keine Proofreading-Funktion, das bedeutet, die 3'-5'-Exonukleaseaktivität ist entfernt. Damit lässt sich die Ausbeute und Geschwindigkeit der Reaktion beschleunigen, weil diese der normalen 5'-3'-Replikation entgegenwirkende Korrekturfunktion Zeit kostet. Außerdem ist dadurch das Produkt (Amplifikat) auch ohne Aufreinigung vor zu schnellem Abbau geschützt. Die höhere Fehlerrate in der Größenordnung  $10^{-4}$  (1 Basenpaar [= bp] Fehleinbau auf 10.000 bp) im Vergleich zu  $10^{-8}$  bis  $10^{-11}$  ist tolerierbar (Amplifikatlängen von ca. 900 bis 1.300 bp). Weitere Überlegungen zum Einfluss auf die Mikroheterogenität finden sich in Kapitel 12 (S. 119).

Bei den Amplifikationen, bei denen es auf sehr spezifische Ergebnisse ankam (aus Reinkulturen), wurde eine sogenannte Touchdown-PCR durchgeführt (Tabelle 4). Dabei starteten die Zyklen mit einer Annealingtemperatur<sup>17</sup>, die deutlich über der Schmelztemperatur der Primer lag. In jedem weiteren Zyklus erniedrigte sich die Annealingtemperatur um 1°C und näherte sich schließlich der eigentlichen Temperatur, mit der dann die Hauptmenge der Zyklen zur Amplifikation durchgeführt wurde. Dadurch war es möglich, die DNA-Abschnitte, an welche die Primer am besten banden, in den ersten Zyklen zu bevorzugen, um dann durch die exponentiell ansteigenden Amplifikatstückzahlen einen nicht mehr einzuholenden Mengenvorsprung der erwünschten Amplifikate im Vergleich zu den Nebenprodukten zu erreichen.

Bei den Umweltproben kam es dagegen eher darauf an, nicht zu spezifisch zu amplifizieren, um eine möglichst hohe Bandbreite von unerforschten und unerwarteten Sequenzen grüner Schwefelbakterien zu erhalten. Deshalb wurde bei fast allen Umweltproben auf die Touchdown-PCR verzichtet (Tabelle 5). Allerdings war hier dann eine sorgfältige Auswahl der Annealingtemperatur nötig, weil sonst zu

<sup>17</sup> Temperatur, bei der die Primer sich an die Template-DNA anlagern.

viele Amplifikate bakterieller rRNA-Gene erhalten worden wären, die außerhalb der gewünschten Gruppe lagen.

**Tabelle 4: Amplifikationsbedingungen für Reinkulturen**

Die Amplifikate aus Reinkulturen wurden ohne Klonierung sequenziert.

Amplifikation	Anzahl Zyklen	Annealing <sup>18 / 19</sup>		Elongation		Denaturierung	
							
<b>16S-rDNA-Fragmente</b>	1					94 °C	2 min
	10	67 °C 	57 °C 40 s	72 °C	30 s	94 °C	30 s
	20		57 °C 40 s	72 °C	30 s	94 °C	30 s
	1		42 °C 1 min	72 °C	5 min		
<b>fmoA-Fragmente</b>	1					94 °C	2 min
	15	56-66 °C 	41-51 °C 40 s	72 °C	30 s	94 °C	30 s
	20		41-51 °C 40 s	72 °C	30 s	94 °C	30 s
	1		42 °C 1 min	72 °C	5 min		
<b>Re-PCR<sup>20</sup></b>	1					94 °C	2 min
	20		45 °C 40 s	72 °C	30 s	94 °C	30 s
	1		42 °C 1 min	72 °C	5 min		

<sup>18</sup> Temperaturangabe X-Y °C bedeutet: Annealingtemperatur wurde für jede Probe individuell variiert

<sup>19</sup> : nach jedem Zyklus wurde die Annealingtemperatur um 1 °C herabgesetzt (Touchdown-PCR)

<sup>20</sup> Für einzelne Proben mit wenig Amplifikationsprodukt in der ersten PCR

Tabelle 5: Amplifikationsbedingungen für Umweltproben

Die Amplifikate aus Umweltproben wurden vor der Sequenzierung durch Klonierung in individuelle Sequenzen separiert. Für jede PCR wurde zuerst der Initiatorschritt, dann die individuellen Zyklen und zuletzt der finale Schritt durchgeführt. Der Übersicht halber ist der erste und letzte Schritt je nur einmal aufgeführt.

Amplifikation	Anzahl Zyklen	Annealing	Elongation	Denaturierung	
		 	 	 	
<b>Initiatorschritt</b>	1			94 °C 2 min	
<b>16S-rDNA-Fragmente</b> aus Probe ...	<b>BW-4</b>	<b>28</b>	<b>60 °C</b> 40 s	72 °C 30 s 94 °C 30 s	
	<b>Cviic-2</b>	<b>10</b>	67 °C  57 °C <sup>21</sup> 40 s	72 °C 30 s	94 °C 30 s
		<b>20</b>	<b>57 °C</b> 40 s	72 °C 30 s	94 °C 30 s
	<b>Laboe-3</b>	<b>25</b>	<b>51 °C</b> 40 s	72 °C 30 s	94 °C 30 s
	<b>PSA-1</b>	<b>35</b>	<b>48 °C</b> 40 s	72 °C 30 s	94 °C 30 s
	<b>Sip-4</b>	<b>30</b>	<b>51 °C</b> 40 s	72 °C 30 s	94 °C 30 s
	<b>SSM-3</b>	<b>25</b>	<b>56 °C</b> 40 s	72 °C 30 s	94 °C 30 s
	<b>Stein-1</b>	<b>25</b>	<b>54 °C</b> 40 s	72 °C 30 s	94 °C 30 s
<b>fmoA-Fragmente</b> aus Probe ...	<b>Cviic-2</b>	<b>25</b>	<b>43 °C</b> 40 s	72 °C 30 s	94 °C 30 s
	<b>Laboe-3</b>	<b>35</b>	<b>40 °C</b> 40 s	72 °C 30 s	94 °C 30 s
	<b>Sip-4</b>	<b>35</b>	<b>43 °C</b> 40 s	72 °C 30 s	94 °C 30 s
	<b>SSM-3</b>	<b>30</b>	<b>40 °C</b> 40 s	72 °C 30 s	94 °C 30 s
		<b>30<sup>22</sup></b>	<b>40 °C</b> 40 s	72 °C 30 s	94 °C 30 s
	<b>Stak-2</b>	<b>30</b>	<b>45 °C</b> 40 s	72 °C 30 s	94 °C 30 s
<b>30<sup>22</sup></b>		<b>40 °C</b> 40 s	72 °C 30 s	94 °C 30 s	
<b>Finaler Schritt</b>	1	42 °C 1 min	72 °C 5 min		

Für jeden Ansatz wurde die Kombination aus Annealingtemperatur und Zyklenzahl neu überdacht und getestet, um jeweils das beste Ergebnis zu erzielen. Bei den Amplifikationen aus Reinkulturen wurde Wert darauf gelegt, dass die Annealingtemperatur so hoch und die Anzahl der Zyklen so niedrig wie

<sup>21</sup> : nach jedem Zyklus wurde die Annealingtemperatur um 1 °C herabgesetzt (Touchdown-PCR)

<sup>22</sup> Dieser Schritt war eine sogenannte Re-PCR, bei der 1 µl des vorangegangenen PCR-Produktes noch mal als Template eingesetzt wurde.

möglich war, um die Anzahl und Menge von eventuellen Nebenprodukten unter die Nachweisgrenze in einem Agarose-Gel zu senken. Bei Amplifikationen aus Umweltproben wiederum sollte die Annealingtemperatur eher niedrig liegen und die Zyklen wegen einer höheren Ausbeute eher im mittleren Bereich sein (weitere Überlegungen hierzu in Kapitel 10, S. 103).

Jede PCR wurde durch einen finalen Zyklus mit sehr niedriger Annealingtemperatur (40°C) sowie einem langen Elongationsschritt (5 min) abgerundet, um vollständig doppelsträngige DNA-Fragmente zu erhalten. In wenigen Fällen bei der Amplifikation von *fmoA*-Fragmenten musste wegen sehr schwacher Ausbeute eine konsekutive PCR (Re-PCR) durchgeführt werden, das heißt, 1 µl des PCR-Produkts wurde als Template in einem neuen Ansatz eingesetzt, um die End-Amplifikatmenge zu erhöhen.

In jedem Ansatz wurde eine Blindprobe eingesetzt, bei der statt Template-DNA lediglich DNA-freies Wasser zugesetzt wurde, um jedes Mal die Reinheit der durchgeführten Ansätze zu verifizieren.

### 3.3 PRIMER FÜR AMPLIFIKATIONEN UND SEQUENZIERUNGEN

Primer (Oligonukleotide) sind kurze DNA-Fragmente, die in einer PCR paarweise eingesetzt werden, um ein Amplifikationsprodukt bestimmter Länge zu erhalten. Für jeden 25-µl-PCR-Ansatz wurden je 10 pmol 5'-Primer bzw. 3'-Primer eingesetzt. Für Sequenzierungsreaktionen wird allerdings nur ein Primer verwendet.

Für diese Arbeit wurde auf bereits etablierte Primer zurückgegriffen, sowie eine Vielzahl von Oligonukleotiden theoretisch entwickelt. Davon wurden wenige herausgefiltert, die letztlich zum Einsatz kamen (Kapitel 7, S. 48). Das waren Primer F-99-GSB für spezifische Amplifikationen und Sequenzierungen von 16S-rDNA-Fragmenten, Primer F-Start-fmo und R-889-fmo für spezifische Amplifikationen und Sequenzierungen von *fmoA*-Fragmenten sowie Primer F-478-fmo und R-478-fmo nur für Sequenzierungen von *fmoA*-Fragmenten (Tabelle 6 ff. und Abbildung 7 f., S. 35).

Tabelle 6: Primer und deren Verwendungszwecke

Name	Amplifikation aus			Sequenzierung von		Amplifikation aus 16S für DGGE
	16S	<i>fmoA</i>	Vektor pCR4-TOPO	16S	<i>fmoA</i>	
F-99-GSB	✓	—	—	✓	—	—
GC-F-342	—	—	—	—	—	✓
F-519	—	—	—	✓	—	—
R-519	—	—	—	✓	—	✓
F-908	—	—	—	✓	—	—
R-908	—	—	—	✓	—	—
R-1369	✓ <sup>23</sup>	—	—	✓	—	—
R-1388	✓ <sup>24</sup>	—	—	✓	—	—
F-Start-fmo	—	✓	—	—	✓	—
F-478-fmo	—	—	—	—	✓	—
R-478-fmo	—	—	—	—	✓	—
R-889-fmo	—	✓	—	—	✓	—
M13F	—	—	✓	✓ <sup>25</sup>	✓ <sup>25</sup>	—
M13R	—	—	✓	✓ <sup>25</sup>	✓ <sup>25</sup>	—

<sup>23</sup> Zweiter Primer bei Reinkulturen<sup>24</sup> Zweiter Primer bei Umweltproben<sup>25</sup> 16S und *fmoA* jeweils aus dem Vektor pCR4-TOPO

**Tabelle 7: 16S-Primer der verschiedenen PCR-Amplifikationen und Sequenzierungen**

Der Primer F-99-GSB wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt. Er ist der einzige 16S-Primer, der spezifisch für grüne Schwefelbakterien (GSB) ist. Alle anderen sind eubakterielle 16S-Primer: GC-F-342 und F/R-519 sind der Arbeit von Muyzer *et al.* (1993) entnommen. F/R-908, R-1369 und R-1388 stammen von J. Süling (IfM Kiel, mit dem ARB-Programm<sup>26</sup>, persönl. Mitteilung).

Name	Sequenz (5'→3')	Position <sup>27</sup>	T <sub>m</sub> <sup>28</sup>
<b>F-99-GSB<sup>29</sup></b>	ACT TGG CGC AAG GGT GA	99-117	55 °C
<b>GC-F-342</b>	<sup>30</sup> (CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G) – –CCT ACG GGA GGC AGC AG	<sup>31</sup> 342-358	<sup>31</sup> 60 °C
<b>F-519</b>	CCA GCA GCC GCG GTA AT	519-535	58 °C
<b>R-519</b>	ATT ACC GCG GCT GCT GG	535-519	
<b>F-908</b>	AAA CTC AAA GGA ATT GAC	908-925	47 °C
<b>R-908</b>	GTC AAT TCC TTT GAG TTT	925-908	
<b>R-1369</b>	CCC GGG AAC GTA TTC ACC G	1387-1369	61 °C
<b>R-1388</b>	CGG GCG GTG TGT ACA AGG	1405-1388	63 °C

<sup>26</sup> von lateinisch *arbor* (Baum), URL 13, S. 154

<sup>27</sup> Die Position der Primer bezieht sich auf die 16S rDNA von *Escherichia coli* ATCC 11775T.

<sup>28</sup> Die Schmelztemperatur wurde thermodynamisch berechnet und auf ganze Zahlen gerundet.

<sup>29</sup> siehe auch Tabelle 16, S. 49

<sup>30</sup> Die GC-Klammer ist unterstrichen.

<sup>31</sup> ohne GC-Klammer

**Tabelle 8: *fmoA*-Primer der verschiedenen PCR-Amplifikationen und Sequenzierungen**

Alle *fmoA*-Primer wurden im Rahmen dieser Arbeit entwickelt.

Name	Sequenz <sup>32</sup> (5'→3')	Position <sup>33</sup>	T <sub>m</sub> <sup>34</sup>
<b>F-Start-<i>fmo</i><sup>35</sup></b>	ATG GCT CTT TTY GG	1-14	ø 41 °C
<b>F-478-<i>fmo</i><sup>36</sup></b>	ATY GAH ACH TGG GAA GG	478-494	ø 51 °C
<b>R-478-<i>fmo</i><sup>36</sup></b>	CCT TCC CAD GTD TCR AT	494-478	
<b>R-889-<i>fmo</i><sup>37</sup></b>	CCG ACC ATN CCG TGR TG	905-889	ø 58 °C

**Tabelle 9: Primer für PCR-Amplifikationen aus Vektor pCR4-TOPO und anschließende Sequenzierungen**

Die Sequenzen der M13-Primer wurden der Beschreibung des Topo TA Cloning Kit for Sequencing entnommen.

Name	Sequenz (5'→3')	T <sub>m</sub> <sup>38</sup>
<b>M13F</b>	GTA AAA CGA CGG CCA G	52 °C
<b>M13R</b>	CAG GAA ACA GCT ATG AC	50 °C

### 3.4 AUFREINIGUNG VON PCR-PRODUKTEN

Vor der Zugabe des PCR-Produkts zum Ligations- bzw. Sequenzierungsansatz muss dieses aufgereinigt werden, um für die weiteren Reaktionen störende Bestandteile wie Salze sowie restliche Oligo- und monomere Nukleotide (Desoxynukleotide) zu entfernen. Das geschah mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“. Puffer PB und PE sowie QIAamp-Minisäulchen befanden sich im Lieferumfang.

Hierbei wurde zunächst in das Reaktionsgefäß mit dem 25-µl-PCR-Produkt 125 µl des Puffers PB zugegeben und vermischt. Die gesamten 150 µl wurden dann in ein QIAamp-Minisäulchen gegeben, das in einem 2-ml-Auffangröhrchen steckte. Die so vorbereiteten Einheiten wurden für 1 min bei 14000 g und RT zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Nun wurden 750 µl Puffer PE auf das Säulchen gegeben und erneut wie oben zentrifugiert. Der Durchlauf wurde wieder verworfen und zur

<sup>32</sup> Die Bezeichnung der mehrdeutigen Nukleotide (fett und unterstrichen) folgt der allgemeinen IUPAC-Nomenklatur.

<sup>33</sup> Die Position der Primer bezieht sich auf das *fmoA*-Gen von *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup>.

<sup>34</sup> Die Schmelztemperatur wurde thermodynamisch berechnet, auf ganze Zahlen gerundet und ist ein durchschnittlicher Wert (ø) aufgrund der mehrdeutigen Nukleotide.

<sup>35</sup> siehe auch Tabelle 18, S. 51

<sup>36</sup> siehe auch Tabelle 19, S. 52

<sup>37</sup> siehe auch Tabelle 17, S. 50

<sup>38</sup> Die Schmelztemperatur wurde thermodynamisch berechnet und auf ganze Zahlen gerundet..

Entfernung letzter Waschpufferreste ein weiteres Mal zentrifugiert. Anschließend wurde das Säulchen mit der gebundenen DNA in ein neues Reaktionsgefäß gesteckt, zur Elution mit 50 µl DNA-freiem Wasser versetzt, 1 min bei RT inkubiert und wie oben 1 min zentrifugiert. Das Eluat enthielt das gereinigte PCR-Produkt.

### 3.5 Klonierung von DNA-Fragmenten aus Umweltproben

Bei der PCR-Amplifizierung von DNA aus Umweltproben wird im Gegensatz zu Reinkulturen normalerweise kein einheitliches Produkt entstehen, weil je nach Auswahl der Primer und PCR-Bedingungen mehr oder weniger heterogene DNA-Fragmente amplifiziert werden. Da das bei dieser Arbeit erwünscht war, um die Diversität der grünen Schwefelbakterien zu untersuchen, mussten diese heterogenen DNA-Fragmente vor der Sequenzierung voneinander separiert werden.

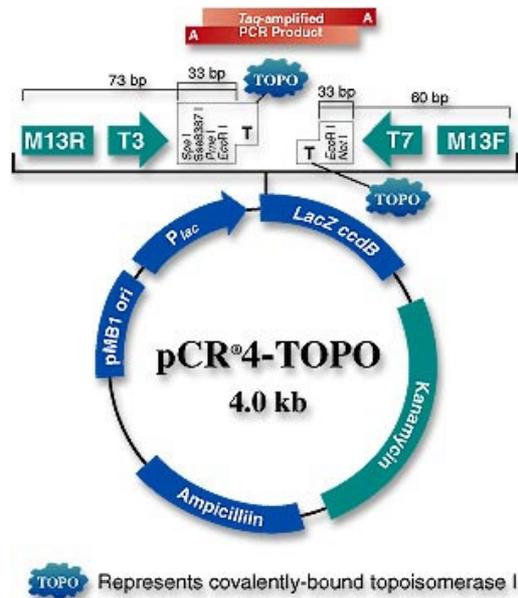
Das Prinzip der Klonierung beruht darauf, dass aus einer Mischung von DNA-Produkten einzelne Fragmente in ein Plasmid (Vektor) ligiert werden. Dabei wird in der Ligationsmischung der Vektor an einer vordefinierten Position gespalten und durch die Insertion eines DNA-Fragmentes wieder geschlossen. Einzelne Vektoren werden dann von kompetenten Zellen (in der Regel *Escherichia coli*) unter bestimmten Bedingungen bei genügend hohem Verhältnis von Bakterienzellen zu Vektoren durch kurzzeitige Durchlässigkeit ihrer Membran aufgenommen.

Werden dann diese Bakterien auf Agarplatten ausgestrichen, so können schließlich in genügender Menge klonierte Zellen<sup>39</sup> geerntet werden. Diese besitzen alle den gleichen Vektor und damit auch das gleiche DNA-Fragment, das von einem einzigen ursprünglichen PCR-Fragment abstammt.

Für diese Arbeit wurde das „Topo TA Cloning Kit for Sequencing“ verwendet, das den Vektor pCR4-TOPO enthielt (Abbildung 6). Dieser war so beschaffen, dass auf Agarplatten mit dem Antibiotikum Kanamycin nur Bakterien zum Wachstum kamen, die bei der Transformation den Vektor mit einem darin inserierten DNA-Fragment aufgenommen hatten. Zellen ohne Vektor waren nicht kanamycin-resistent und wuchsen nicht weiter (das trifft auf die meisten zu). Bakterien hingegen mit einem reinen Vektor ohne DNA-Fragment starben ab. Bei ihnen wurde ein letales Protein aus dem *ccdB*-Gen im Vektor exprimiert, dessen Bildung durch die Insertion eines DNA-Fragments unterblieben wäre.

---

<sup>39</sup> Alle Zellen einer Bakterienkolonie auf der Platte stammen im Normalfall von einer einzigen Ursprungszelle ab.



(INVITROGEN, Carlsbad, USA)

**Abbildung 6: Funktionsprinzip der Ligation mit dem „Topo TA Cloning Kit for Sequencing“**

### 3.5.1 Ligation

Zunächst wurde eine PCR mit DNA aus einer Umweltprobe gemacht (Tabelle 5, S. 25). Das Produkt wurde gereinigt (Kapitel 3.4), nachdem eine Kontrolle auf einem Agarose-Gel (Kapitel 4.1, S. 37) stattgefunden hatte. Dann wurde nach dem folgenden Schema die Ligationmischung hergestellt (Salzlösung, Wasser und Vektor waren im Lieferumfang enthalten):

#### Ligationsansatz

PCR-Produkt	3 µl
Salzlösung <sup>40</sup>	1 µl
DNA-freies Wasser	1 µl
Vektor pCR4-TOPO	1 µl

Nach sanftem Mischen in einem Reaktionsgefäß wurde der Ansatz 30 min bei RT inkubiert (Vektoren bauen DNA-Fragmente ein) und danach die Transformation durchgeführt.

<sup>40</sup> 1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl<sub>2</sub>

### 3.5.2 Transformation

Als Transformation wird der Vorgang bezeichnet, durch den der Vektor in die kompetent gemachte Bakterienzelle geschleust wird. Dazu wurden 2 µl der Ligationsmischung (Kapitel 3.5.1) in ein Reaktionsgefäß mit chemisch kompetenten *Escherichia-coli*-Zellen (Stamm „TOP10 One Shot“, im Lieferumfang) gegeben und sehr sanft gerührt. Die Mischung wurde 30 min auf Eis inkubiert und danach für 30 s einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt (in einem temperierten Wasserbad). Dabei gelangen einzelne Vektoren in die Bakterienzellen. Daraufhin wurde die Mischung sofort wieder für 2 min auf Eis gelagert. Anschließend wurde in das Reaktionsgefäß 250 µl SOC-Medium<sup>41</sup> (im Lieferumfang) gegeben, welches RT hatte. Das Medium enthielt eine besonders hohe Konzentration an Glukose, damit sich die Zellen in kurzer Zeit wieder erholen und die vektorvermittelte Resistenz ausbilden konnten, um auf den Antibiotikaplatten wachsen zu können. Das geschah während einer Inkubation von 1 h Dauer bei 37°C im Brutschrank, wobei die Reaktionsgefäße immer leicht horizontal bewegt wurden.

### 3.5.3 Bearbeitung der Klone

Im Anschluss an die Inkubation mit dem SOC-Medium wurden Reaktionsgefäße mit folgendem Inhalt beschickt.

2 Reaktionsgefäße	10 µl <i>Escherichia-coli</i> -Suspension + 40 µl SOC-Medium	(1:5)
2 Reaktionsgefäße	50 µl <i>Escherichia-coli</i> -Suspension	unverdünnt

Diese 50-µl-Volumina mit den beiden verschiedenen Konzentrationen an Zellen wurden je mit einem Drigalski-Spatel auf eine Petrischale mit LB-Medium ausplattiert, das 50 µg/ml Kanamycin enthielt.

<b>LB-Medium</b>	NaCl	10 g	(pH 7,0)
	Hefeextrakt	5 g	
	Trypton	10 g	
	MilliQ-Wasser	ad 1000 ml	

Insgesamt wurden also zwei Platten mit unverdünntem und zwei Platten mit verdünntem Ansatz (1:5) versetzt. Dadurch konnte erfahrungsgemäß sichergestellt werden, mit wenigstens einer der Verdünnungen eine geeignete Anzahl voneinander separierter Kolonien zu erhalten. Die Platten wurden 24 h lang in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert.

<sup>41</sup> 2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glukose

Nachdem die Kolonien auf den Platten gewachsen waren, wurden 100 davon gepickt. Das heißt, in jede Kolonie wurde eine Pipette mit Spitze (20-200 µl) vorsichtig gestochen und somit etwas Zellmaterial aufgenommen, das anschließend in einem Reaktionsgefäß in 50 µl DNA-freiem Wasser suspendiert wurde. Die Reaktionsgefäße wurden dann in einem Thermocycler für 10 min auf 94°C erhitzt und dann auf 4°C abgekühlt. Durch diesen Vorgang und durch das salzfreie Wasser, in dem sich die Bakterienzellen befanden, erfolgte eine Zellyse und die Inaktivierung der DNasen (DNA-spaltende Enzyme).

### 3.5.4 Screening-PCR

Die gewonnenen Lysate (siehe voriges Kapitel) konnten direkt in eine PCR eingesetzt werden (1 µl als Template in einem 25-µl-Ansatz), um die im Vektor eingebauten DNA-Fragmente in großer Zahl zu amplifizieren (Tabelle 10). Das erfolgte mit dem Primer-Paar M13F/M13R (Tabelle 9, S. 29 und Abbildung 6, S. 31). Diese setzten am durch die Lyse freigewordenen Vektor an beiden Enden etwa 90 nt außerhalb des DNA-Fragments (Insert) an und amplifizierten so das vollständige Insert.

**Tabelle 10: Amplifikationsbedingungen für die Screening-PCR**

Ablauf	Anzahl Zyklen	Annealing	Elongation	Denaturierung
		 	 	 
<b>Initiatorschritt</b>	1			94°C 2 min
<b>Hauptschritte</b>	25	55°C 40 s	72°C 45 s	94°C 30 s
<b>Finaler Schritt</b>	1	42°C 1 min	72°C 5 min	

Dieser Vorgang wird im Folgenden als Screening-PCR bezeichnet, weil hierdurch ein schneller Überblick über den Klonierungserfolg möglich war. Die PCR-Ansätze wurden auf einem Agarose-Gel (Kapitel 4.1, S. 37) analysiert. Dabei kam es besonders darauf an, dass die erwarteten Größen der Inserts in den Lysaten enthalten waren, was sich durch die erwartete Bande im Gel ausdrückte. Das konnte durch einen Längenmarker (DNA-Molecular Weight Marker X) und Vergleichsproben gut abgeschätzt werden. Letzte Sicherheit, ob es sich um korrekt klonierte DNA-Fragmente handelte, wurde aber erst durch die Sequenzierung erlangt.

### 3.5.5 Screening-Sequenzierung

Nach der Klonierung einer Umweltprobe sind je nach Diversität oft viele der klonierten DNA-Fragmente identisch. Um den Aufwand der Sequenzierung so gering wie möglich zu halten, wurde

deshalb zuerst eine sogenannte Screening-Sequenzierung durchgeführt. Dabei wurde jede bei der Screening-PCR (Kapitel 3.5.4) für positiv befundene Probe teilsequenziert, indem bei 16S-Fragmenten ausgehend vom Primer R-519 in Richtung der Bindungsstelle von Primer F-99-GSB sequenziert wurde (Abbildung 7, S. 35). Damit wurde eine Sequenz mit über 400 nt Länge erhalten, die ausreichend lang war und einen hypervariablen Bereich überspannte, um über einen Sequenzvergleich herauszufinden, ob und wie stark sich die einzelnen klonierten DNA-Fragmente voneinander unterschieden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde dann entschieden, welche DNA-Fragmente schließlich komplett sequenziert wurden. Eine Auflistung jedes einzelnen klonierten und sequenzierten DNA-Fragments und die Unterschiede untereinander findet sich in Kapitel 15 im Anhang (S. 145).

Äquivalent wurde mit den klonierten *fmoA*-Fragmenten verfahren. Hierbei wurde beim Screening ausgehend vom Primer M13F in Richtung des Inserts sequenziert (Abbildung 8, S. 35). Es wurde eine Länge von über 450 nt für den Vergleich erhalten. Für diese Screening-Sequenzierung konnte kein im Insert bindender Primer verwendet werden, weil die Primer F-Start-fmo, F-478-fmo, R-478-fmo und R-889-fmo mit ihren relativ niedrigen Schmelzpunkten  $T_m$  nicht optimal für die Bedingungen der Sequenzierreaktion (Kapitel 3.6.2, S. 36) waren. Sie lieferten nicht bei jedem DNA-Fragment brauchbare Ergebnisse und waren deshalb für ein Screening ungeeignet, bei dem es darauf ankam, dass die Qualität jeder Sequenzierung vergleichbar war. Mit ihnen konnten jedoch bei einigen DNA-Fragmenten wertvolle Zusatzinformationen bei der kompletten Sequenzierung gewonnen werden.

Da es sich nicht um eine richtungsspezifische Ligation handelte, wurden die PCR-Fragmente in beiden möglichen Orientierungen in die Vektoren eingebaut. Durch die Verwendung eines außerhalb des Inserts bindenden Primers wie M13F wurde je nach Orientierung des Inserts mal die eine und mal die andere Seite sequenziert, was keinen direkten Vergleich aller Sequenzen untereinander möglich machte. Deshalb war es bei der einen Sorte nötig, mit dem Primer M13R noch eine zweite Sequenzierung durchzuführen, um vergleichbare Abschnitte der Inserts zu erhalten.

## 3.6 SEQUENZIERUNG

Zu Beginn dieser Arbeit waren die technischen Möglichkeiten noch nicht optimal (ALF-Sequenziergerät mit geringer Leseweite; keine Möglichkeit zur Klonierung). Deshalb wurden die ohne Klonierung schwer zu sequenzierenden *fmoA*-Reinkulturamplifikate nach der Amplifikation aufgereinigt und dann an die Firma MWG-BIOTECH (Ebersberg) zur Analyse gegeben. Als sich die technischen Gegebenheiten im Laufe der Zeit besserten, wurden einige der *fmoA*-Sequenzen noch durch eigene Sequenzierungen in ihrer Qualität verbessert.

### 3.6.1 Auswahl der Primer

Für die Sequenzierreaktion (Cycle-Sequencing) wird nur ein Primer benötigt. Um ein Amplifikat vollständig zu sequenzieren und um Fehlerquellen zu minimieren, reicht ein einziger Durchlauf nicht

aus. In dieser Arbeit wurde mindestens ein zweiter Durchlauf mit einem anderen Primer gemacht. Die Einzelsequenzen konnten dann miteinander verglichen werden (Abbildung 7 f.).

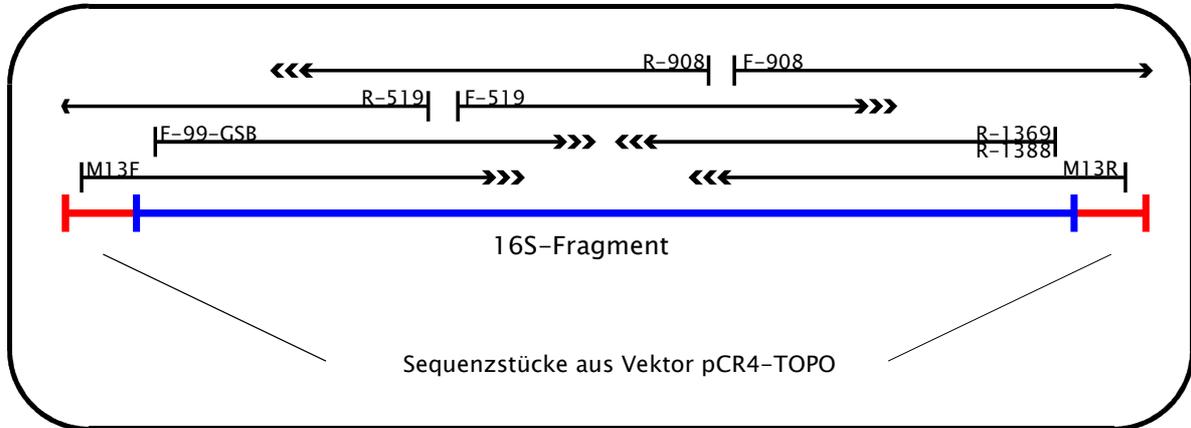


Abbildung 7: Aufteilung der Primer für die Sequenzierung der 16S-Fragmente

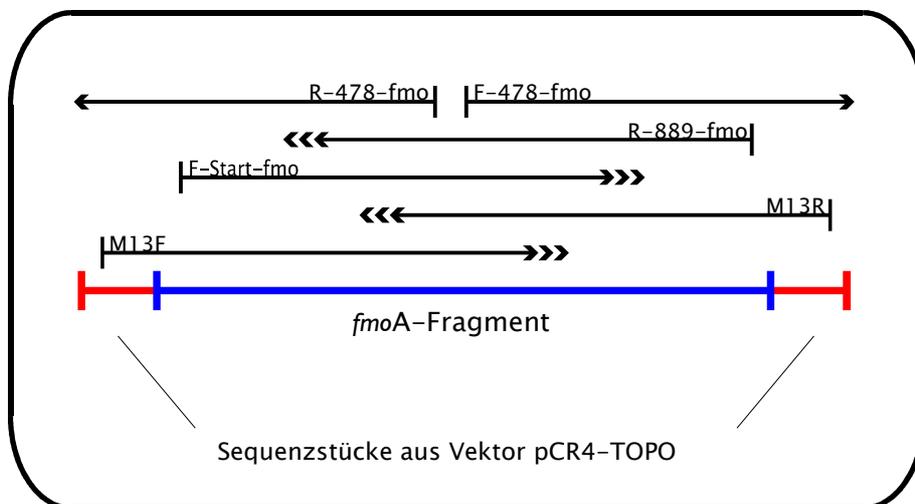


Abbildung 8: Aufteilung der Primer für die Sequenzierung der *fmoA*-Fragmente

Da alle Amplifikate länger als 600 bp waren, war es wegen der begrenzten Leseweite des Sequenziergerätes nötig für eine vollständige Sequenzierung nicht nur die Start- und End-Primer sondern auch solche heranzuziehen, die mitten im Amplifikat banden und von dort aus in beide Richtungen die Sequenzierung ermöglichten.

Die Fehlergrenze der Sequenzierung lag für einzelne Durchläufe bei etwa 0,1 %. Das bezieht sich allerdings nur auf die Kernabschnitte, also nicht auf die Enden einer Sequenz. Diese wenigen Fehler wurden durch weitere unabhängige Sequenzierungsschritte mit anderen Primern erkannt und korrigiert (Abbildung 7 f.). Eine komplette Sequenzierung eines DNA-Fragmentes, bei der jede Base mehrfach bestimmt wurde, sollte also deutlich unter 0,1 % Fehlbasen enthalten.

### 3.6.2 Cycle-Sequencing

Verwendet wurde in dieser Arbeit das „Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“, das aus „Terminator Ready Reaction Mix“ (Polymerase, dNTP, ddNTP, u.a.) und Puffer bestand.

<b>Cycle-Sequencing</b>	Terminator Ready Reaction Mix	0,8 µl	(im Lieferumfang)
	2,5 x Sequencing Buffer	7,2 µl	(im Lieferumfang)
	Template-DNA	10-100 ng	(gelöst)
	Primer	3,2 pmol	(gelöst)
	DNA-freies Wasser	ad 20 µl	

Für die Sequenzierreaktion wurde die Methode des Cycle-Sequencings angewendet. Diesem liegt eine PCR-Reaktion mit nur einem Primer zugrunde, bei der in jedem Elongationsschritt erneut die Reaktion nach Sanger (1977) zur Erzeugung von Abbruchfragmenten führt. Das führt dazu, dass keine exponentielle Amplifikation stattfindet, sondern vom Primer ausgehend die normale Synthese von unterschiedlich langen DNA-Fragmenten.

**Tabelle 11: Amplifikationsbedingungen für das Cycle-Sequencing**

Ablauf	Anzahl Zyklen	Annealing	Elongation	Denaturierung
		 	 	 
<b>Initiatorschritt</b>	1			94°C 2 min
<b>Hauptschritte</b>	99	50°C 15 s	60°C 4 min	96°C 30 s

Der Abbruch der Elongation geschieht durch zufälligen Einbau von **Di**-Desoxy-Ribonukleotidtriphosphaten (**ddNTP = ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP**), die zu einem geringen Prozentsatz (1 %) den normalen Desoxy-Ribonukleotidtriphosphaten (dNTP) beigemischt waren. Jede Sorte

ddNTP war mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert, was die spätere automatische Analyse der verschieden langen Abbruchfragmente im Einspurverfahren erlaubte (Kapitel 4.2, S. 38).

### 3.6.3 Aufreinigung der Cycle-Sequencing-Produkte

Nach dem Cycle-Sequencing wurden die Produkte gereinigt, um störende Substanzen zu entfernen, die bei der nachfolgenden Sequenzierung die Qualität mindern würden. Hierbei wurde 80 µl Ethanol (80 %) zu jedem 20-µl-Ansatz gegeben und kräftig gemischt. Diese Mischung wurde 15 min bei RT inkubiert. Daraufhin wurde bei 4°C für 20 min und 14000 g zentrifugiert, um die gefällte DNA zu pelletieren. Der Überstand wurde sehr vorsichtig mit einer sehr dünnen Pipettenspitze abgezogen, ohne das Pellet zu zerstören. Anschließend wurden 250 µl Ethanol (70 %) hinzugefügt, kräftig gemischt und 10 min zentrifugiert (4°C, 14000 g). So wurde das Pellet gereinigt. Die Reaktionsgefäße sollten dabei in der gleichen Weise in den Rotor gestellt werden, wie bei dem ersten Schritt, damit sich das Pellet nicht von der Gefäßwand löste. Danach wurde wieder der Überstand möglichst vollständig abgezogen und das Pellet getrocknet, indem die Reaktionsgefäße 1 min lang bei 90°C mit offenem Deckel in einem Thermocycler erhitzt wurden. Zu jedem Pellet wurden schließlich 30 µl TSR<sup>42</sup> gegeben und 15 s lang kräftig gemischt, um die DNA zu lösen. Das wurde noch verstärkt, indem die Mischung in einem Thermocycler 2 min lang auf 95°C erhitzt und anschließend auf 4°C heruntergekühlt wurde. Letztlich wurde die Lösung in ein Detektionsgefäß (im Lieferumfang) umgefüllt. Dieses wurde dann zur automatischen Sequenzierung gegeben (Kapitel 4.2).

## 4 ELEKTROPHORETISCHE METHODEN

### 4.1 AGAROSE-GEL-ELEKTROPHORESE

Die Agarose-Gel-Elektrophorese mit dem Wide-Mini-Sub-Cell-GT-System diente der Überprüfung der Ergebnisse einer DNA-Extraktion, PCR oder PCR-Aufreinigung. Es wurden ausschließlich 1-%-ige Gele verwendet, für die 1 g Agarose<sup>43</sup> in 100 ml TBE-Puffer aufgekocht und gelöst wurde.

**10-fach TBE-Puffer** (pH 7,8)

Tris	100 mM
Borsäure	80 mM
EDTA	1 mM

Die Flüssigkeit wurde dann zum Erkalten in einen Gel-Träger (im Lieferumfang) gegossen, in dem ein sogenannter Kamm (im Lieferumfang) für die Aussparungen der Taschen sorgte, die später befüllt werden sollten. Nachdem Erkalten wurde der Kamm entfernt, der beladene Gel-Träger in die

<sup>42</sup> Template Suppression Reagent, im Lieferumfang des „Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“

<sup>43</sup> Spezial-Agarose für die Elektrophorese von Nukleinsäuren, die größer als 500 bp sind.

Elektrophoresekammer gesetzt und das Gel mit TBE-Puffer überschichtet. Zur Elektrophorese wurde 10 % des Gesamtvolumens jeder Probe mit 3 µl Farbmarker vermischt und in die Taschen des Gels pipettiert.

**Agarose-Gel-Farbmarker**

Glycerin	50 ml
MilliQ-Wasser	50 ml
Bromphenolblau	0,1 % (w/v)

Als Größenvergleich wurde in mindestens eine Tasche 4 µl einer Mischung vom „DNA Molecular Weight Marker X“ aufgetragen, der klar erkennbare Banden von DNA-Fragmenten lieferte (... 500 bp, 1000 bp, 1600 bp, 2000 bp, ...).

**Längenmarker**

DNA Molecular Weight Marker X	15 µl
Agarose-Gel-Farbmarker	15 µl
TBE	75 µl (pH 7,8)

Anschließend wurde die Elektrophoresekammer geschlossen und für 12 min eine Spannung von 200 V angelegt. Das Gel wurde 5 min lang in einem wässrigen Ethidiumbromid-Bad ( $1,3 \frac{\mu\text{mol}}{1000 \text{ ml}}$ ) gefärbt und danach kurz in Wasser geschwenkt. Es konnte schließlich unter UV-Licht dokumentiert werden (Kapitel 4.4, S. 41).

## 4.2 ELEKTROPHORESE IM SEQUENZIERGERÄT

Die aufgereinigten Cycle-Sequencing-Produkte in den Detektionsgefäßen wurden in einem automatischen Sequenziergerät analysiert (ABI 310). Die Trennung der verschieden langen DNA-Fragmente erfolgte hierbei in einem Acrylamid-Gel in einer Kapillare. An dieser lag eine elektrische Spannung und die Fragmente wurden elektrophoretisch nach Größe getrennt. Die Analyse der verschieden langen und je nach Abbruchbase unterschiedlich fluoreszenzmarkierten DNA-Stränge erfolgte mit einem Laser, der die Farbstoffe anregte und eines Detektors, der die Signale aufnahm.

## 4.3 DENATURIERENDE GRADIENTEN-GEL-ELEKTROPHORESE (DGGE)

Durch die Elektrophorese in einem Agarose-Gel werden DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge separiert, während bei der DGGE Fragmente gleicher Länge aber unterschiedlicher Sequenz aufgetrennt werden. Im Idealfall können sogar einzelne Basenpaarunterschiede zu einem

verschiedenen Laufverhalten im Gel führen. In dieser Arbeit wurde die DGGE angewandt, um die Qualität der Reinkulturen zu überprüfen (Kapitel 6, S. 47).

#### 4.3.1 PCR für die DGGE

Es wurde zunächst eine PCR durchgeführt (Tabelle 12), um ein bestimmtes Stück auf der 16S rDNA zu amplifizieren, das sogenannte Muyzer-Fragment (Muyzer *et al.* 1993). Das Primer-Paar dafür war GC-F-342/R-519 (Tabelle 7, S. 28).

**Tabelle 12: Amplifikationsbedingungen für die Muyzer-PCR**

Ablauf	Anzahl Zyklen	Annealing		Elongation		Denaturierung	
							
<b>Initiatorschritt</b>	1					94 °C	2 min
<b>Touchdown</b>	15	65 °C  44	40 s	72 °C	30 s	94 °C	30 s
<b>Hauptschritte</b>	20	50 °C	40 s	72 °C	30 s	94 °C	30 s
<b>Finaler Schritt</b>	1	42 °C	1 min	72 °C	5 min		

Der Primer GC-F-342 enthielt die sogenannte GC-Klammer, die sehr reich an Guanin und Cytosin ist und dazu führt, dass die Amplifikate alle um dieses Stück verlängert waren. Die Amplifikate wurden später elektrophoretisch durch ein Acrylamid-Gel mit ansteigendem Denaturierungsgradienten bewegt und so an sequenzspezifischen Bereichen aufgeschmolzen; das heißt, die doppelsträngige DNA wurde einzelsträngig. Im Bereich der Klammer jedoch blieb das Fragment doppelsträngig und somit entstand eine Y-förmige Struktur, deren Mobilität im Gel sehr stark reduziert war. Je nach Sequenz haben DNA-Fragmente ein unterschiedliches Schmelzverhalten.

#### 4.3.2 Gel-Bereitung und Elektrophorese

In der vorliegenden Arbeit wurde ein System der Firma CBS SCIENTIFIC (Del Mar, USA) verwendet. Das zu gießende Gel sollte einen Denaturierungsgradienten von 40-64 % bekommen und zusätzlich einen Acrylamidgradienten von 6-8 % (Doppelgradient). Letzterer war für die scharfe Ausprägung der Banden von Vorteil (Cremonesi *et al.* 1997, Petri & Imhoff 2001). Für die Gel-Bereitung wurden zunächst zwei Stammlösungen vorbereitet:

<sup>44</sup> : nach jedem Zyklus wurde die Annealingtemperatur um 1 °C herabgesetzt (Touchdown-PCR)

DGGE-Stammlösungen	A	B
	64 % Denaturierungsmittelgehalt 8 % Acrylamidgehalt	40 % Denaturierungsmittelgehalt 6 % Acrylamidgehalt
Acrylamid / Bisacrylamid 37,5:1	20 ml	15 ml
Harnstoff	26,9 g	16,8 g
Formamid	25,6 ml	16 ml
TAE-Puffer (50-fach)	1 ml	1 ml
MilliQ-Wasser	ad 100 ml	ad 100 ml

**50-fach TAE-Puffer** (pH 7,8)

Tris	500 mM
Natriumacetat	250 mM
EDTA	25 mM

Zunächst wurden zwei Glasplatten mit 0,1-%-SDS-Lösung (w/v) gereinigt und danach mit Ethanol<sup>abs</sup> abgewischt. Jede Platte wurde an der Innenseite schließlich mit 140 µl Repel-Silan behandelt, um ein späteres Festhaften des Gels zu verhindern. Ein Abstandshalter auf jeder Seite diente dazu, die Platten soweit auseinander zu halten, dass das Gel in definierter Dicke gegossen werden konnte. Die so vorbereiteten Platten wurden fest in einen Gießstand (BIORAD, München) montiert. Unmittelbar vor dem Gießen des Gels wurde den Lösungen A und B je 6 µl TEMED und 140 µl APS (20 % w/v) zugegeben, welche die Polymerisation starteten (TEMED) bzw. beschleunigten (APS). Sofort darauf wurden die beiden Lösungen in einen Gradientenmischer gegeben (CBS SCIENTIFIC, Del Mar, USA), der die beiden Lösungen langsam vermischte und über einen Schlauch zwischen die Glasplatten führte. Als erstes (unten im Gel) lief die unvermischte Lösung A durch (stark denaturierend), wurde langsam von Lösung B verdünnt, bis am Schluss (oben im Gel) fast nur noch die Lösung B (weniger denaturierend) durchlief. Unmittelbar nach dem Gießvorgang wurde zwischen die Platten in das noch nicht polymerisierte Gel ein Kamm (BIORAD, München) gesteckt, der die Taschen bildete, die später mit den Proben befüllt werden sollten. Das Gel wurde etwa 120 min bei RT zur vollständigen Polymerisation stehen gelassen.

Das feste Gel wurde dann in die Elektrophoresekammer (DGGE-2001, CBS SCIENTIFIC, Del Mar, USA) die mit 20 Litern Laufpuffer (0,5-fach TAE-Puffer, pH 7,8) befüllt war. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden 20 µl jeder Probe mit je 6 µl Auftragspuffer versetzt.

**DGGE-Auftragspuffer**

Glycerin	7 ml
MilliQ-Wasser	2,5 ml
Bromphenolblau	2 % (w/v)

Die Gel-Taschen wurden zunächst mit etwas Laufpuffer gespült und dann mit den zu untersuchenden Proben befüllt. Dann wurden die Elektroden an die Elektrophoresekammer angeschlossen (oben negativ, unten positiv) und für 14 h eine Spannung von 80 V angelegt. Nach der Elektrophorese wurden die Glasplatten entfernt, das Gel auf eine stabile Kunststoffolie überführt und 30 min in einem wässrigen Ethidiumbromid-Bad ( $1,3 \mu\text{mol}/1000 \text{ ml}$ ) gefärbt. Daraufhin wurde das Gel in einem Wasserbad entfärbt. Anschließend konnte das Ergebnis dokumentiert werden (Kapitel 4.4).

#### 4.4 DOKUMENTATION DER PROBEN

Die Dokumentation der Gele erfolgte nach dem Färben mit Ethidiumbromid mit dem Biodoc-II-System. Dazu wurde das Gel auf einen UV-Transilluminator gelegt und mit einer CCD-Kamera (im Lieferumfang) digital dokumentiert. Die Aufnahmen wurden dann über einen Thermosublimationsdrucker ausgedruckt oder als Bild-Datei im Tif-Format gespeichert.

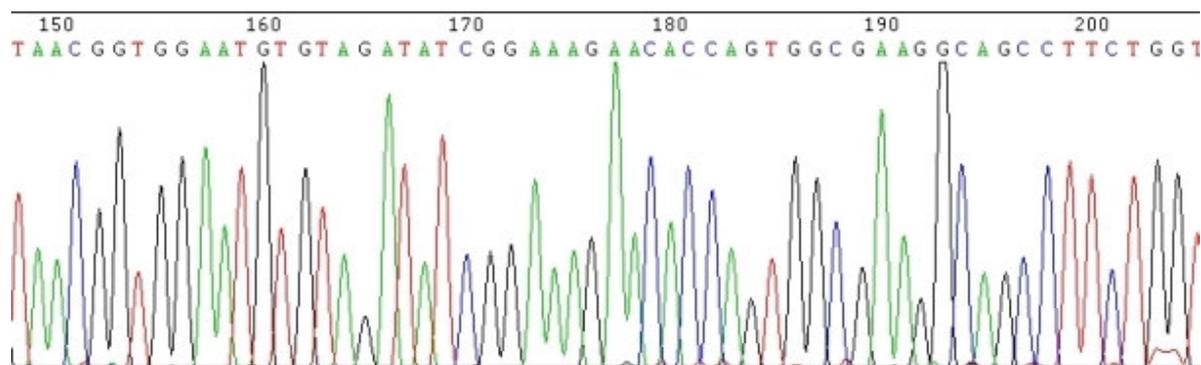
## 5 PHYLOGENETISCHE BERECHNUNGEN UND SEQUENZANALYSE

### 5.1 SEQUENZ-NACHBEARBEITUNG

Die vom automatischen Sequenziergerät ABI 310 ausgegebenen Dateien und die Sequenzen aus der Datenbank wurden am Computer analysiert. Das Sequenziergerät liefert als Rohdatensatz zwei Dateien. Davon war eines im ASCII-Format (Text) und die andere konnte als Chromatogramm dargestellt werden, wobei jede Base durch ein Maximum charakterisiert ist. Für jeden der vier Basentypen wurde eine separate Farbe gewählt.

Jedes Amplifikat wurde mehrfach mit verschiedenen Primern sequenziert (Abbildung 7 f., S. 35). Diese Teilsequenzen wurden dann manuell nachbearbeitet, wenn die Rohdaten nicht mit den ausgegebenen Basen übereinstimmten oder keine eindeutige Angabe gemacht wurde (mit dem Programm Chromas<sup>45</sup>, McCarthy 1997).

<sup>45</sup> Version 1.42, URL 6, S. 154



**Abbildung 9: Rohdaten einer Sequenz mit Programm Chromas<sup>45</sup> dargestellt**

Anschließend wurden die Teilsequenzen eines Amplifikats mit dem Programm SeqMan-II<sup>46</sup> in einem Alignment zusammengefasst (sie wurden übereinander gelegt, um die Konsensussequenz zu finden) und auf Unstimmigkeiten der Sequenzierungen überprüft. Diese wurden dann im selben Programm mit Hilfe der Rohdaten versucht zu klären. Außerdem wurden die Sequenzen auf die relevanten Bereiche gekürzt. Der Export der Konsensus-Gesamtsequenz fand dann im Fasta-Format statt, bei dem am Anfang der Sequenz eine Titelzeile mit der Benennung eingefügt wird.

## 5.2 ABGLEICH MIT DER DATENBANK

Jede so gewonnene Sequenz wurde dann mit der prokaryontischen Datenbank (EM\_PRO)<sup>47</sup> mit dem dort verfügbaren Programm Fasta3 (Pearson 1990; Pearson & Lipman 1988) abgeglichen. Die Sucheinstellungen wurden von der Internetseite als Standard vorgeschlagen und so übernommen.

Die dann ausgegebenen Ergebnisse waren nach Relevanz geordnet, wobei drei Faktoren berücksichtigt wurden (Tabelle 13):

- Die prozentuale Übereinstimmung mit der Datenbank (Identität) ...
- ... auf der Länge des ununterbrochen überlappenden Bereichs ...
- ... und der sogenannte *E*-Wert (*E*-Value).

Die Identität ist nicht mit der Similarität zu verwechseln. Bei ersterer werden nur die Basenübereinstimmungen gezählt, während bei letzterer ein Algorithmus zugrunde liegt, der ein evolutionstheoretisches Modell vertritt. Der ist ein statistischer Wert, der berücksichtigt, wie wahrscheinlich eine Zufallsübereinstimmung sein könnte. Je niedriger der *E*-Wert, desto sicherer ist, dass die eingegebene Sequenz tatsächlich ein Teil der in der Datenbank gefundenen sein könnte und damit zu einem bestimmten Bakterienstamm gehört. Verständlicherweise ist die Übereinstimmung

<sup>46</sup> Version 4.03, Firma DNASTAR 1999, Madison, USA

<sup>47</sup> bei EMBL-EBI: European Bioinformatics Institute, Cambridge, England, URL 7, S. 154



In der vorliegenden Arbeit wurde das Alignment mit dem Programm ClustalX<sup>48</sup> (Thompson *et al.* 1994) mit den Standardeinstellungen berechnet und die ausgegebene Datei „\*.aln“ schließlich mit dem Programm BioEdit<sup>49</sup> (Hall 2001) kontrolliert und nach Bedarf manuell nachbearbeitet (Tabelle 14). Grundsätzlich wurden die Primer-Bereiche links und rechts abgeschnitten, weil diese nicht notwendigerweise die Sequenz darstellen, die in der zu messenden DNA vorkam. Manche Primer binden unter bestimmten Bedingungen auch, wenn sie nicht in jeder Base mit der Template-DNA übereinstimmen.

**Tabelle 14: Beispiel eines kurzen Alignments von 16S-rDNA-Sequenzen mit dem Programm BioEdit**

In der Mitte befindet sich ein variabler Bereich während rechts viele Basen konserviert sind.

	10	20	30	40	50	60	70	80
CVRRDAA	TTTGCAGAGGAAGAA	CAATGCTGGTT	TACCGGCAGT	GACGGTACTCT	TGCCGAA	TAAGCCACGGG	TAACTCTGT	GCCAGCA
2371	TTTGTAGAGGAAGAA	CAATGCTGGTT	TACCGGCAGT	GACGGTACTCT	TGCCGAA	TAAGCCACGGG	TAACTCTGT	GCCAGCA
2K	TTTGCAGAGGAAGAA	CAGCCTGCTT	TGC	GGGTGTGACGGTACTCT	TGCCGAA	TAAGCCACGGG	TAACTCTGT	GCCAGCA
PAE291826	TTTGCAGAGGAAGAA	CAGCCTGCTT	TGC	GGGTGTGACGGTACTCT	TGCCGAA	TAAGCCACGGG	TAACTCTGT	GCCAGCA
PARIBORNA	TTTGTAGAGGAAGAA	TAGCCTGCTT	TGC	GGGTGTGACGGTACTCT	TGCCGAA	TAAGCCACGGG	TAACTCTGT	GCCAGCA
2311	TTTGCAGAGGAAGAAAA	TGCTGGTT	TACCGGCAGT	GACGGTACTCT	TGCCGAA	TAAGCCACGGG	TAACTCTGT	GCCAGCA
2323	TTTGCAGAGGAAGAAAA	TGCTGGTT	TACCGGCAGT	GACGGTACTCT	TGCCGAA	TAAGCCACGGG	TAACTCTGT	GCCAGCA
2362	TTTGCAGAGGAAGAAAA	TGCTGGTT	TACCGGCAGT	GACGGTACTCT	TGCCGAA	TAAGCCACGGG	TAACTCTGT	GCCAGCA
CLRIBOR	TTTGCAGAGGAAGAAAA	TGCTGGTT	TACCGGCAGT	GACGGTACTCT	TGCCGAA	TAAGCCACGGG	TAACTCTGT	GCCAGCA
2324	YTTTCAGAGGAAGAAAA	TGCTGGTT	TACCGGCAGT	GACGGTACTCT	TGCCGAA	TAAGCCACGGG	TAACTCTGT	GCCAGCA
CP605116S	TTTGCAGAGGAAGAAAA	TGCTGGTT	TACCGGCAGT	GACGGTACTCT	TGCCGAA	TAAGCCACGGG	TAACTCTGT	GCCAGCA
PPY08108	TTTGTAGAGGAAGAA	TATCCCGGTT	TACCGG	ACTGACGGTACTCT	TGCCGAA	TAAGCCACGGG	TAACTCTGT	GCCAGCA
CPY08104	TTTGTGGAGGAAGAA	TATCCCGATT	TAT	CGGGACTGACG	TACTCCGCGAA	TAAGCCACGGG	TAACTCTGT	GCCAGCA
2341	TTTGTAGAGGAAGAA	ATGTTCGGTT	TACCGGCAGT	GACGGTACTCT	TGCCGAA	TAAGCCACGGG	TAACTCTGT	GCCAGCA
CPY08105	TTTGTAGAGGAAGAA	ATGTTCGGTT	TACCGGCAGT	GACGGTACTCT	TGCCGAA	TAAGCCACGGG	TAACTCTGT	GCCAGCA
2372	TTTGTAGAGGAAGAA	ATGTTCGGTT	TACCGGCAGT	GACGGTACTCT	TGCCGAA	TAAGCCACGGG	TAACTCTGT	GCCAGCA
2350	TTTGTAGAGGAAGAA	ATGTTCGGTT	TACCGGCAGT	GACGGTACTCT	TGCCGAA	TAAGCCACGGG	TAACTCTGT	GCCAGCA
CVY08103	TTTGTAGAGGAAGAA	ATGTTCGGTT	TACCGGCAGT	GACGGTACTCT	TGCCGAA	TAAGCCACGGG	TAACTCTGT	GCCAGCA
PLY08107	TTTGTAGAGGAAGAA	ATGTTCGGTT	TACCGGCAGT	GACGGTACTCT	TGCCGAA	TAAGCCACGGG	TAACTCTGT	GCCAGCA
CL604116S	TTTGCAGGGGACGAA	TAGGTTCGGCT	TGCCGGCT	TGTGACGGTACCCT	TGCCGAA	TAAGCCACGGG	TAACTCTGT	GCCAGCA
CPH299413	TTTGCAGGGGACGAA	TAGGTTCGGCT	TGCCGGCT	TGTGACGGTACCCT	TGCCGAA	TAAGCCACGGG	TAACTCTGT	GCCAGCA
2361	TTTGCAGGGGACGAA	TAGGTTCGGCT	TGCCGGCT	TGTGACGGTACCCT	TGCCGAA	TAAGCCACGGG	TAACTCTGT	GCCAGCA
CTSSRIBRR	TTTGCAGGGGACGAA	TAGGTTCGGCT	TGCCGGCT	TGTGACGGTACCCT	TGCCGAA	TAAGCCACGGG	TAACTCTGT	GCCAGCA
2322	TTTGCAGGGGACGAA	TAGGTTCGGCT	TGCCGGCT	TGTGACGGTACCCT	TGCCGAA	TAAGCCACGGG	TAACTCTGT	GCCAGCA
CLY08102	TTTGCAGGGGACGAA	TAGGTTCGGCT	TGCCGGCT	TGTGACGGTACCCT	TGCCGAA	TAAGCCACGGG	TAACTCTGT	GCCAGCA
CV26316SR	TTTGTGGGGACGAA	TAGGTTCGGCT	TGCAGACT	NTGACNN	TACCCAGCGAA	TAAGCCACGGG	TAACTCTGT	GCCAGCA
CL604416S	TTTGTGGGGGAGAA	TAGGTTCGGCT	TGCCGACT	CTGACGGTACC	TGCCGAA	TAAGCCACGGG	TAACTCTGT	GCCAGCA
CC602616S	TTTGTGGGGGAGAA	TAGGTTCGGCT	TGCCGACT	CTGACGGTACC	TGCCGAA	TAAGCCACGGG	TAACTCTGT	GCCAGCA
2352	TTTGTGGGGGAGAA	TAGGTTCGGCT	TGCCGACT	CTGACGGTACC	TGCCGAA	TAAGCCACGGG	TAACTCTGT	GCCAGCA
RM16SRR	TTTCTGGGGGAGAA	TATCCCGGCT	CTGGT	CGGGACTGACGGT	TACCCAGGAA	TAAGCCACGGG	TAACTCTGT	GCCAGCA

## 5.4 PHYLOGENETISCHE BERECHNUNGEN

Mit dem Programm BioEdit wurde nach der manuellen Kontrolle des Alignments und der Entfernung überstehender Sequenzbereiche an den Enden die Datei in dem Phylip4-Format abgespeichert (\*.phy), um nachfolgend phylogenetische Berechnungen durchzuführen. Das geschah mit dem Programmpaket Phylip<sup>50</sup> (Felsenstein 1989, 1993).

Für die Nukleotid-Berechnungen der Distanz-Matrizes (Anhang 14, S. 138) sowie der phylogenetischen Stammbäume wurde die Distanz-Matrix-Methode mit dem Rechenalgorithmus nach Jukes & Cantor (1969) gewählt, den das Phylip-Programm DNADIST ausführte (Kapitel 8.1.1, S. 53

<sup>48</sup> Version 1.64b (Windows-Version von ClustalW)

<sup>49</sup> Version 5.0.2, URL 8, S. 154

<sup>50</sup> Version 3.5c (URL 14, S. 154)

und 8.2.1, S. 63). Entsprechend wurde für die Aminosäure-Berechnungen<sup>51</sup> die Distanz-Methode mit der Dayhoff-PAM-Matrix (Aminosäureaustauschmodell, Dayhoff *et al.* 1978) gewählt, die das Phylip-Programm PROTDIST berechnete (Kapitel 8.3.1, S. 69).

Die Distanz-Matrix war in der ausgegebenen Datei „\*.dst“ enthalten<sup>52</sup>. Aus dieser zweidimensionalen Form wurde mit der Fitch-Margoliash-Distanz-Methode, ausgeführt vom Phylip-Programm FITCH (Fitch & Margoliash 1967) ein dreidimensionaler Stammbaum errechnet. Dieser wurde später schließlich zweidimensional dargestellt. Es wurde darin die Option „Global Rearrangement“ gewählt, die zwar für eine deutliche Verlängerung der Rechenzeit sorgte, aber das Ergebnis durch vielfaches Umgruppieren verbesserte, und am Ende die Datei „\*.con“ produzierte.

Beispielhaft wurden für die Nukleotid-Berechnungen neben der Distanz-Matrix-Methode zwei weitere Methoden getestet. Dabei handelte es sich um die Parsimony-Methode (Eck & Dayhoff 1966, Kluge & Farris 1969) und um Maximum-Likelihood (Felsenstein 1981). Erstere Berechnung wurde mit dem Phylip-Programm DNAPARS durchgeführt und letztere mit DNAML (ohne die Option „Global Rearrangement“).

**Tabelle 15: Abfolge der Berechnungen im Programmpaket Phylip**

In Klammern nach den Programmnamen steht die jeweils ausgegebene Datei-Endung.

Methoden				
Parsimony:		DNAPARS (*.con)		
Distanz-Matrix:	SEQBOOT (*.boo)	DNADIST (*.dst)	FITCH (*.con)	CONSENSE (*.tre)
		PROTDIST (*.dst)		
Maximum Likelihood:		DNAML (*.con)		

Bei der sogenannten Bootstrap-Analyse (Felsenstein 1985), die für eine statistische Absicherung sorgte, wurden die oben angegebenen Berechnungen mit DNADIST bzw. PROTDIST gefolgt von FITCH sowie DNAPARS und DNAML vielfach hintereinander ausgeführt, woraus schließlich ein Konsensus-Stammbaum erstellt wurde, der an den Verzweigungen die prozentuale Häufigkeit angibt (Bootstrap-Werte), mit der diese beiden Sequenzen bzw. Sequenzgruppen bei den wiederholten Berechnungen benachbart waren<sup>53</sup>. Dazu wurde die ursprüngliche Datei „\*.phy“ vom Phylip-Programm SEQBOOT mehrfach in Folge in die Datei „\*.boo“ geschrieben. Es wurde in dieser Arbeit generell eine Wiederholungsrate von 100 gewählt. Ausnahmen sind die Parsimony-Berechnungen (500 Wiederholungen DNAPARS, Abbildung 19 *f.*, S. 78 *f.*) und zwei Distanz-Matrix-Berechnungen mit

<sup>51</sup> Die Translation erfolgte im Internet nach dem universalen genetischen Code bei EMBL-EBI mit WebiN (URL 10, S. 154) oder Transeq (URL 12, S. 154).

<sup>52</sup> Der Stern „\*“ steht für einen beliebigen Dateinamen.

<sup>53</sup> Zugrunde gelegt wurde hierbei die 3-dimensionale Darstellung der zu vergleichenden phylogenetischen Stammbäume, auch wenn die Darstellung letztlich 2-dimensional erfolgt.

Aminosäuresequenzen (Abbildung 16, S. 70, mit 38 und Abbildung 18, S. 75, mit 35 Wiederholungen PROTDIST-FITCH).

Die Datei „\*.boo“ wurde dann nach einer der oben beschriebenen Methoden weiterberechnet und zwar mit der selben Anzahl an Wiederholungen wie in SEQBOOT vorgegeben wurde. Die am Schluss entstehende Datei „\*.con“ enthielt nun den mehrfachen Datensatz zur Stammbaumdarstellung. Dieser musste nun noch mit dem Phylip-Programm CONSENSE umgewandelt werden, damit ein einziger Stammbaum dargestellt werden konnte (ausgegebene Datei war „\*.tre“). Das Programm folgt der MI-Methode nach Margush & McMorris (1981). Dieser Konsensus-Stammbaum enthielt zwar die Bootstrap-Werte, nicht aber die Distanzlängen im Fall der Distanz-Matrix- und Maximum-Likelihood-Methode. Hierfür musste schließlich noch manuell einer der Datensätze aus der Datei „\*.con“ beispielhaft ausgewählt werden, der in der Darstellung dem Konsensus-Stammbaum entsprach. Zur graphischen Umsetzung in einen phylogenetischen Stammbaum wurde das Programm TreeView<sup>54</sup> (Page 1996) genutzt, dass die Daten aus den Dateien „\*.con“ und „\*.tre“ verwerten konnte.

Die Sequenzen der 16S rDNA wurden als Nukleotidsequenz analysiert, während die des funktionellen Gens *fmoA* als zwei korrespondierende Datensätze berechnet wurden:

- als Nukleotidsequenz
- als Aminosäuresequenz<sup>55</sup>

---

<sup>54</sup> Version 1.5.2, URL 9, S. 154

<sup>55</sup> Die Translation erfolgte im Internet nach dem universalen genetischen Code bei EMBL-EBI mit WebiN (URL 10, S. 154) oder Transeq (URL 12, S. 154).

# ERGEBNISSE

## 6 KONTROLLE DER REINKULTUREN MIT DER DGGE

Zu Beginn dieser Arbeit standen 23 Reinkulturen grüner Schwefelbakterien zur Verfügung (Tabelle 1, S. 13). Zur Kontrolle der Reinheit wurden exemplarisch 12 Stämme ausgewählt, aus denen DNA isoliert wurde, um eine DGGE mit 16S-rDNA-Fragmenten durchzuführen (Kapitel 4.3, S. 38). Das Laufverhalten der Banden im DGGE-Gel wird entscheidend durch die Basenkomposition der DNA-Fragmente beeinflusst. Banden unterschiedlicher Laufweite sollten der Theorie zufolge in jedem Fall auf DNA-Fragmente hinweisen, die sich mindestens in einem Nukleotid unterscheiden. Bei Banden auf gleicher Höhe ist erst einmal davon auszugehen, dass es sich um dieselbe Nukleotidsequenz handelt. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass DNA-Fragmente mit unterschiedlicher Zusammensetzung zufällig das gleiche Schmelz- und damit Laufverhalten im Gel aufweisen.

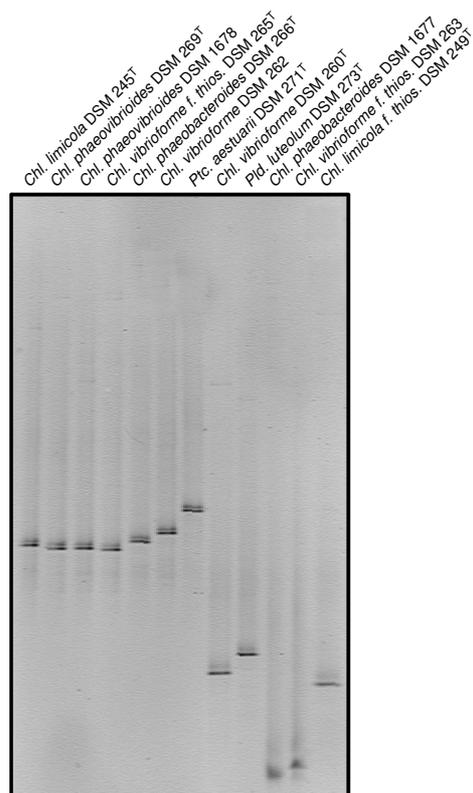


Abbildung 10: Reinheitskontrolle der Kulturen im DGGE-Gel.

So sollten also Bakterien in einer Reinkultur alle die gleiche Kopie des 16S-rRNA-Gens aufweisen und deshalb in der DGGE auch nur eine Bande zeigen (abgesehen von Mikroheterogenitäten). Bei den 12 getesteten Stämmen war dies ausnahmslos der Fall (Abbildung 10).

## 7 METHODISCHE ENTWICKLUNGEN

### 7.1 ENTWICKLUNG VON PCR-PRIMERN FÜR DIE 16S rDNA

Für die Entwicklung spezifischer Primer für die 16S rDNA grüner Schwefelbakterien standen eine ganze Reihe von 16S-rDNA-Sequenzen in der Datenbank EMBL-EBI<sup>56</sup> zur Verfügung. Diese wurden in einem „Alignment“ mit einer Auswahl an Sequenzen anderer Bakteriengruppen zusammengefasst, um konservierte Bereiche zu finden, die typisch für die grünen Schwefelbakterien sind, sich aber deutlich von anderen Bakterien unterscheiden. In die engere Auswahl kamen zehn Bereiche, aus denen Oligonukleotidsequenzen erstellt wurden. Diese wurden mit der prokaryontischen Datenbank (EM\_PRO) mit Hilfe des dort verfügbaren Programms Fasta3 (Pearson 1990; Pearson & Lipman 1988) abgeglichen<sup>57</sup>. Wichtig war hierbei, dass möglichst nur die grünen Schwefelbakterien die höchsten Übereinstimmungen erzielten. Die besten Ergebnisse lieferten vier Oligonukleotidsequenzen, von denen einer der spätere Primer F-99-GSB (Tabelle 7, S. 28) wurde. Letzterer passte in voller Länge von 17 nt zu den grünen Schwefelbakterien (außer *Chloroherpeton thalassium*) und hatte mindestens zwei Nukleotid-Unterschiede zu den anderen gefundenen Bakterien (Tabelle 16).

Die vier in die engere Wahl gekommenen Oligonukleotidsequenzen wurden schließlich als Primer in vielen PCR-Ansätzen mit unterschiedlichsten Amplifikationsbedingungen eingesetzt und sowohl miteinander als auch mit eubakteriellen Primern kombiniert. Der einzige Primer, der ausnahmslos bei allen vorhandenen DNA-Proben grüner Schwefelbakterien in Kombination mit eubakteriellen Primern ein Amplifikat in der erwarteten Größe<sup>58</sup> erzeugte, war F-99-GSB. Dieser war auch von seiner Bindungsstelle im 16S-rRNA-Gen besonders geeignet für nachfolgende phylogenetische Untersuchungen, weil diese nicht weit vom Startpunkt entfernt war. Das ermöglichte in Kombination mit einem eubakteriellen Primer am anderen Ende (R-1369 oder R-1388) die Amplifikation eines sehr großen Bereichs der 16S rDNA (ca. 1240-1260 bp<sup>59</sup> von 1450 bp<sup>60</sup> also ca. 86 %).

---

<sup>56</sup> „European Molecular Biology Laboratory“ (EMBL, Heidelberg) mit der Außenstation „European Bioinformatics Institute“ (EBI, Cambridge, England). Zugang z.B. über SRS (Sequence Retrieval System), URL 11, S. 154

<sup>57</sup> Innerhalb der Datenbank EMBL-EBI, URL 7, S. 154

<sup>58</sup> Es gab keine Nebenbanden. Die Größe wurde auf Agarose-Gelen gegen einen Längenmarker verglichen (Kapitel 14.1, S. 37).

<sup>59</sup> Die beiden Primer-Bereiche sind in den Längenangaben nicht enthalten.

<sup>60</sup> auf *Escherichia coli* ATCC 11775T bezogen

Tabelle 16: Primer-Bereich von F-99-GSB auf der 16S rDNA<sup>61</sup>

Position <sup>62</sup>	99	117	156
<i>Chl. vibrioforme</i> DSM 260 <sup>T</sup>	GAGT	ACTTGGCGCAAGGGTGA	GTAAGGTATAGGTAAGTTGCCTACAGGACCGGCATAACC
<i>Pld. phaeum</i> CIB 2401	GAGT	ACTTGGCGCAAGGGTGA	GTAAGGTATAGGTAATTTGCCTACAGGACCGGCATAACC
<i>Chl. vibrioforme</i> CHP 3402	GAGT	ACTTGGCGCAAGGGTGA	GTAAGGTATAGGTAATTTGCCTACAGGACCGGCATAACC
<i>Ptc. aestuarii</i> CHP 3401	AAGT	ACTTGGCGCAAGGGTGA	GTAAGGTATAGGTAATTTGCCTACAGGACCGGCATAACC
<i>Ptc. aestuarii</i> DSM 271 <sup>†</sup>	AAGT	ACTTGGCGCAAGGGTGA	GTAAGGTATAGGTAATTTGCCTACAGGACCGGCATAACC
<i>Chl. limicola</i> DSM 245 <sup>†</sup>	GAGT	ACTTGGCGCAAGGGTGA	GTAACGTATAGGTAATCTGCCCTTTGGACTGGGATAACC
<i>Chl. phaeobacteroides</i> UdG 6047	GAGT	ACTTGGCGCAAGGGTGA	GTAACGTATAGGTAATCTGCCCTTTGGANTGGGATAACC
<i>Chl. phaeobacteroides</i> UdG 6051	GAGT	ACTTGGCGCAAGGGTGA	GTAACGTATAGGTAATCTGCCCTTTGGACTGGGATAACC
<i>Chl. phaeobacteroides</i> UdG 6046	GACT	ACTTGGCGCAAGGGTGA	GTAACGTATAGGTAATCTGCCCTTTGGACTGGGATAACC
<i>Pld. clathratiforme</i> PG	GAGT	ACTTGGCGCAAGGGTGA	GTAATATATAGGWAATCTGCCCTTWGGACTGGGATAACC
<i>Pld. phaeoclathratiforme</i> DSM 5477 <sup>†</sup>	GAGT	ACTTGGCGCAAGGGTGA	GTAACGTATAGGTAATCTGCCCTTTGGACTGGGATAACC
<i>Chl. ferrooxidans</i> DSM 13031 <sup>†</sup>	AAGT	ACTTGGCGCAAGGGTGA	GTAATGTATAGGTAATCTGCCCTTTGGACTGGGATAACC
<i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 266 <sup>†</sup>	AAGT	ACTTGGCGCAAGGGTGA	GTAATGTATAGGTAATCTGCCCTTTGGACTGGGATAACC
<i>Chl. phaeovibrioides</i> DSM 269 <sup>†</sup>	GAGT	ACTTGGCGCAAGGGTGA	GTAATGTATAGGTAATCTGCCCTTAGGACTGGCATAACC
<i>Chl. vibrioforme</i> DSM 262	GAGT	ACTTGGCGCAAGGGTGA	GTAAGGCATAGGTAATCTGCCCTTTGGACTGGGATAACC
<i>Pld. luteolum</i> DSM 273 <sup>†</sup>	GAGT	ACTTGGCGCAAGGGTGA	GTAAGGCATAGGTAATCTGCCCTTTGGACTGGGATAACC
<i>Chl. phaeovibrioides</i> UdG 6035	GAGT	ACTTGGCGCAAGGGTGA	GTAAGGCATAGGTAATCTGCCCTTTGGAGTGGGATAACC
<i>Chl. limicola</i> UdG 6041	AAGA	ACTTGGCGCAAGGGTGA	GTAAGGNATAGGTAATCTGCCCTTTGGANTGGGATAACC
<i>Chl. limicola</i> UdG 6042	AAGG	ACTTGGCGCAAGGGTGA	GTAAGGCATAGGTAATCTGCCCTTTGGACTGGGATAACC
<i>Chl. limicola</i> UdG 6045	AAGG	ACTTGGCGCAAGGGTGA	GTAAGGCATAGGTAATCTGCCCTTTGGACTGGGATAACC
<i>Chl. limicola</i> UdG 6038	AAGG	ACTTGGCGCAAGGGTGA	GTAAGGCATAGGTAATCTGCCCTTTGGACTGGGATAACC
<i>Chl. phaeobacteroides</i> 1549	AAGG	ACTTGGCGCAAGGGTGA	GTAAGGCATAGGTAATCTGCCCTTTGGACTGGGATAACC
<i>Chl. limicola</i> UdG 6040	AAGG	ACTTGGCGCAAGGGTGA	GTAAGGCATAGGTAATCTGCCCTTTGGACTGGGATAACC
<i>Chl. tepidum</i> ATCC 49652 <sup>†</sup>	AAAG	ACTTGGCGCAAGGGTGA	GTAAGGCATAGGTAATCTGCCCTTTGGTCTGGGATAACC
<i>Chl. limicola f. thios.</i> DSM 249 <sup>†</sup>	AAGG	ACTTGGCGCAAGGGTGA	GTAATGTATAGGTAATCTGCCCTTTGGTTGGGATAACC
<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> DSM 263	AAGN	ACTTGGCGCAAGGGTGA	GTAAGGCATAGGTANTNTNCCNTTTGGANTGGCATAACC
<i>Chl. vibrioforme</i> UdG 6043	AAGN	ACTTGGCGCAAGGGTGA	GTAAGGCATAGGTAATNTGCCCTTTGGACNGGCATAACC
<i>Chl. limicola</i> UdG 6044	AAGT	ACTTGGCGCAAGGGTGA	GTAAGGCATAGGTAATTTGCCCTTTGGACTGGCATAACC
<i>Chl. chlorovibrioides</i> UdG 6026	AAGT	ACTTGGCGCAAGGGTGA	GTAAGGCATANGTAATCTGCCCTTTGGACTGGGATAACC
<i>Chl. limicola</i> M1	AAGG	ACTTGGCGCAAGGGTGA	GTAAGGCATAGGTAATCTGCCCTTTGGACTGGCATAACC
<i>Cic. sulfurica</i> 1	????	?????????GTTG	GTAAGGCATAGGTAATCTGCCCTTTGGACTGGGATAACC
<i>Chloroherpeton thalassium</i>	TAGT	ACTTGGCGTACGGGTGA	GTAAGGTATTGGTAATCTGCCCTTTGGTCTGCACATACCT

F-99-GSB

5' -ACTTGGCGCAAGGGTGA -3'

## 7.2 ENTWICKLUNG VON PCR-PRIMERN FÜR DAS *fmoA*-GEN

Ein ganz anderer Ausgangszustand als bei der 16S rDNA bot sich bei der Entwicklung von Primern für das *fmoA*-Gen. Es gab lediglich zwei Eintragungen in der Datenbank; die von *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>†</sup> und von *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* DSM 249<sup>†</sup> (Acc. Nr. L13700 bzw. X83529). In einem Alignment von zwei Sequenzen ist es schwer möglich, konservierte Bereiche zu erkennen. Deshalb wurde die Aminosäuresequenz nach Chlorophyll-*a*-Bindungsstellen untersucht, da diese erfahrungsgemäß weniger variabel sind. Diese Bereiche enthalten Histidin-Reste, die in Wechselwirkung mit dem Chlorophyll treten. Da die Chlorophyllbindung eine essentielle Funktion des FMO-Proteins ist, muss das Histidin konserviert sein, weil keine andere Aminosäure diese Funktion übernehmen kann. Weiterhin gibt es nur zwei Codons in der Nukleotidsequenz für Histidin (CAT und CAC), die sich lediglich in der dritten Base unterscheiden. Also wurde das Alignment aus den beiden *fmoA*-Sequenzen nach Histidin-Codons durchsucht. Für die Oligonukleotidwahl kamen diese Bereiche in Frage, sofern die umgebenden Codons zu Aminosäuren gehörten, die nicht durch zu viele Codons bestimmt werden<sup>63</sup>.

<sup>61</sup> Die hier aufgeführten Sequenzen sind nicht nur die, die zur Verfügung standen, als die Primer entwickelt wurden, sondern auch die im Laufe der Zeit neu hinzugekommenen.

<sup>62</sup> Die Position bezieht sich auf die 16S rDNA von *Escherichia coli* ATCC 11775<sup>T</sup>

<sup>63</sup> Negativbeispiele sind Serin oder Leucin mit jeweils sechs Codons.

**Tabelle 17: Primer-Bereich von R-889-fmo**

Farbig hinterlegt ist die Primer-Bindungsstelle auf dem kodierenden Strang des *fmoA*-Gens, wovon die beiden Positionen blau sind, die im Primer mit mehrdeutigen Nukleotiden<sup>64</sup> versehen wurden. Der Primer R-889-fmo wird durch die Komplementärbasen auf dem gegenüberliegenden Strang von rechts nach links definiert (Tabelle 8, S. 29).

	Position <sup>65</sup>	889	905
<i>Chl. limicola f. thios.</i> DSM 249 <sup>T</sup>			
korrespondierende AS			
<i>Chl. tepidum</i> ATCC 49652 <sup>T</sup>			
korrespondierende AS			
R-889-fmo (3'-5')			

5'	CAC	CAC	GGC	ATG	GTC	GGC	-3'
	H	H	G	M	V	G	
5'	CAC	CAC	GGT	ATG	GTC	GGA	-3'
	H	H	G	M	V	G	
3'	-GT	R	GTG	CC	N	TAC	CAG CC -5'

Besonders herausgeragt hat dabei der spätere Primer R-889-fmo mit zwei aufeinanderfolgenden Histidin-Codons, dann je einem für Glycin, Methionin, Valin und wieder Glycin (Tabelle 17).

Glycin wird durch 4 Codons definiert (GGN), genauso wie Valin (GTN). Methionin hingegen hat nur eines (ATG). Von der Annahme ausgehend, dass die Aminosäuren an dieser Chlorophyll-Bindungsstelle konserviert sind, nicht aber die Nukleinsäuren, und die variable Base des zweiten Glycin-Codons aus dem Primer-Bereich ausgeschlossen wird (C bzw. A), bleibt folgende Anzahl an Kombinationen:  $2 \times 2 \times 4 \times 1 \times 4 = 64$ . Da eine Primer-Mischung aus so vielen Kombinationen für PCR-Ansätze ungeeignet ist, erfolgte eine Beschränkung auf zwei variable Positionen. Das war jeweils die dritte Base im ersten Histidin- und im ersten Glycin-Codon (Tabelle 17, blau hinterlegt). Die Anzahl an Kombination betrug nun 8 ( $2 \times 4$ ). Damit waren eventuelle größere Variationen nur noch für die dritte Base des Valin-Codons nicht abgedeckt, die aber nahe dem 5'-Ende des Primers R-889-fmo lag. Für Primer-Anlagerung und -Elongation in einer PCR ist jedoch eine Basenübereinstimmung am 3'-Ende wesentlich entscheidender.

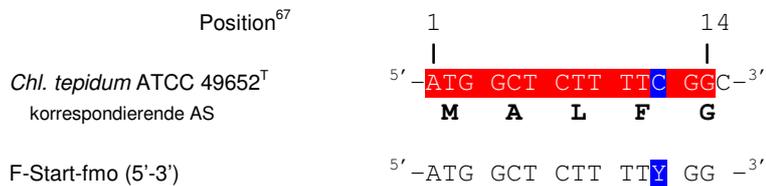
Auf ähnliche Weise wurden insgesamt sieben Primer erstellt, von denen einer (F-Start-fmo) nicht in der Nähe von Chlorophyll-Bindungsstellen lag, sondern vom Start-Codon des *fmoA*-Gens ausging. Für diesen Bereich war allerdings nur vom Stamm *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup> Sequenzinformation vorhanden.

<sup>64</sup> Sowohl die mehrdeutigen Nukleotide als auch der Einbuchstaben-Code der Aminosäuren (AS) folgt der allgemeinen IUPAC-Nomenklatur.

<sup>65</sup> Die Position der Nukleotide bezieht sich auf das *fmoA*-Gen von *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup>

**Tabelle 18: Primer-Bereich von F-Start-fmo**

Farbig hinterlegt ist die Primer-Bindungsstelle auf dem kodierenden Strang des *fmoA*-Gens, wovon die Position blau ist, die im Primer mit einem mehrdeutigen Nukleotid<sup>66</sup> versehen wurde (Tabelle 8, S. 29).



Die Oligonukleotidsequenzen der sieben ausgewählten Primer wurden wie oben beschrieben (Kapitel 7.1, S. 48) mit dem Programm Fasta3 gegen die prokaryontische Datenbank abgeglichen. F-Start-fmo ergab mit seinem mehrdeutigen Nukleotid zwei Übereinstimmungen: Eine nicht identifizierte Sequenz von *Borrelia burgdorferi* und erwartungsgemäß das *fmoA*-Gen von *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup>. Alle anderen Ergebnisse waren mindestens durch ein unterschiedliches Nukleotid gekennzeichnet.

R-889-fmo hatte neben der Übereinstimmung mit den beiden Stämmen *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup> und *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* DSM 249<sup>T</sup> ebenso mindestens eine Base bei den übrigen Ergebnissen, die nicht zu der Oligonukleotidsequenz passte. Die restlichen 5 ausgewählten Primer lieferten ähnliche Resultate.

Die sieben Primer wurden in verschiedenen PCR-Ansätzen in nahezu allen Kombinationen und mit differierenden Amplifikationsbedingungen eingesetzt. Nur das Primer-Paar F-Start-fmo/R-889-fmo erzielte mit allen verfügbaren DNA-Proben grüner Schwefelbakterien bei geeigneten Bedingungen PCR-Produkte in der erwarteten Größe<sup>68</sup>. Mit diesem Primer-Paar war es möglich, einen Großteil des *fmoA*-Gens zu amplifizieren (ca. 875 bp<sup>69</sup> von 1098 bp<sup>70</sup>, also ca. 80 %) und damit geeignete phylogenetische Untersuchungen durchzuführen. Um bei einigen Sequenzierungen die Qualität zu verbessern, wurde noch ein Primer-Position benötigt, die etwa in der Mitte des Amplifikationsbereichs des Primer-Paars F-Start-fmo/R-889-fmo liegen sollte.

Diese Position wurde auf Grundlage der im Rahmen dieser Arbeit sequenzierten *fmoA*-Amplifikate ausgewählt und enthält viele konservierte Basen (Tabelle 19). Die Oligonukleotidsequenz wurde ebenfalls mit Fasta3 gegen die Datenbank abgesichert und schließlich wurden zwei Sequenzier-Primer daraus gemacht: **F-478-fmo** und **R-478-fmo** (Tabelle 8, S. 29). So war es möglich, von der Mitte des *fmoA*-Amplifikates ausgehend in beide Richtungen zu sequenzieren.

<sup>66</sup> Sowohl die mehrdeutigen Nukleotide als auch der Einbuchstaben-Code der Aminosäuren (AS) folgt der allgemeinen IUPAC-Nomenklatur.

<sup>67</sup> Die Position der Nukleotide bezieht sich auf das *fmoA*-Gen von *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup>

<sup>68</sup> Es gab keine Nebenbanden und die Größe wurde auf Agarose-Gelen gegen einen Längenmarker verglichen (Kapitel 14.1, S. 37).

<sup>69</sup> Die beiden Primer-Bereiche sind hier nicht enthalten.

<sup>70</sup> auf *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup> bezogen

Tabelle 19: Primer-Bereich von F-478-fmo bzw. R-478-fmo auf der *fmoA*-Sequenz<sup>71</sup>

Farbig hinterlegt ist die Primer-Bindungsstelle auf dem kodierenden Strang des *fmoA*-Gens, wovon die drei Positionen blau sind, die im Primer mit mehrdeutigen Nukleotiden<sup>72</sup> versehen wurden. Der Primer R-478-fmo wird durch die Komplementärbasen auf dem gegenüberliegenden Strang von rechts nach links definiert.

Position <sup>73</sup>	436	478	494
<i>Chl. vibrioforme</i> DSM 260 <sup>T</sup>	CATGACATCATGATGAAAGTTCCGCTCGACAACAAGGACCTT	ATGGAACATGGGAAGG	
<i>Chl. phaeovibrioides</i> DSM 1678	CATGACATCATGATGAAAGTTCCGCTCGACAACAAGGATCTT	ATGGAACCTGGGAAGGA	
<i>Ptc. aestuarii</i> DSM 271 <sup>T</sup>	CATGACATCATGATGAAAGTGGCGCTTGACAACAACGACCTG	ATCGATACATGGGAAGGA	
Atlantik SSM-3 K-303	CATGACATCATGATGAAAGTGGCGCTTGACAACAACGACCTG	ATCGATACATGGGAAGGA	
Atlantik Sip-4 K-802	CATGACATCATGATGAAAGTTCCGCTTGACAACAACGACCTG	ATCGATACATGGGAAGGA	
Ostsee Laboe-3 K-600	CATGACATCATGATGAAAGTGGCGCTTGACAACAACGACCTG	ATCGATACATGGGAAGGA	
Ostsee Stak-2 K-455	CATGACATCATGATGAAAGTGGCGCTTGACAACAACGACCTG	ATCGATACCTGGGAAGGA	
Adria Cviic-2 K-1011	CATGATATCATGATGAAAGTTCCCTCTGGAAAACAATGACCTT	ATCGACATGGGAAGGC	
Adria Cviic-2 K-1027a	CACGATATCATGATGAAAGTTCCCTCTGGAAAACAACGATCTT	ATCGACATGGGAAGGC	
<i>Ptc. aestuarii</i> CHP 3401	CATGATATCATGATGAAAGTTCCCTCTGGAAAACAATGATCTT	ATCGATACCTGGGAAGGT	
<i>Ptc. aestuarii</i> 2K	CATGACATCCTCATGAAAGTTCCCTCTTGACAACAACGACCTC	ATCGATACCTGGGAAGGC	
<i>Chl. limicola f. thios.</i> DSM 249 <sup>T</sup>	CACGACATCCTCATGAAAGTTCCACTCGACAACAACGACCTC	ATCGACACCTGGGAAGGC	
<i>Chl. limicola f. thios.</i> 1430	CACGACATCCTCATGAAAGTTCCACTCGACAACAACGACCTC	ATCGACACCTGGGAAGGC	
<i>Chl. limicola f. thios.</i> DSM 257	CACGACATCCTCATGAAAGTTCCACTCGACAACAACGACCTC	ATCGACACCTGGGAAGGC	
<i>Chl. phaeobacteroides</i> 1549	CACGACATCCTCATGAAAGTTCCACTCGACAACAACGACCTC	ATCGACACCTGGGAAGGC	
<i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 1677	CACGACATCCTCATGAAAGTTCCACTCGACAACAACGACCTC	ATCGACACCTGGGAAGGC	
<i>Chl. limicola</i> UdG 6041	CACGACATCCTCATGAAAGTTCCACTCGACAACAACGACCTC	ATCGACACCTGGGAAGGC	
<i>Chl. tepidum</i> ATCC 49652 <sup>T</sup>	CACGACATCCTCATGAAAGTTCCGCTCGACAACAACGACCTC	ATCGACACCTGGGAAGGC	
<i>Chl. chlorovibrioides</i> UdG 6026	CATGACATCCTCATGAAAGTTCCGCTCGAAAACAACGACCTT	ATCGACACTGGGAAGGC	
<i>Chl. limicola</i> UdG 6044	CATGACATCCTCATGAAAGTCCCGCTCGACAACAACGACCTT	ATCGACACTGGGAAGGT	
<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> DSM 263	CATGACATCCTCATGAAAGTTCCGCTCGAAAACAACGACCTT	ATCGACACTGGGAAGGT	
<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> NCIB 8346	CATGACATCCTCATGAAAGTTCCGCTCGAAAACAACGACCTT	ATCGACACTGGGAAGGT	
Atlantik SSM-3 K-307	CACGACATCCTCATGAAAGTTCCGCTCGACAACAACGACCTC	ATCGATACCTGGGAAGGT	
Atlantik SSM-3 K-354	CATGACATCCTCATGAAAGTTCCGCTCGACAACAACGACCTC	ATCGATACCTGGGAAGGT	
<i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 1855	CATGACATCATGAAAGTCCCTCTCGACAATCCTGATGTA	ATCGACACTGGGAAGGA	
<i>Chl. limicola</i> DSM 248	CATGACATCATGAAAGTCCCTCTCGACAATCCTGATGTA	ATCGACACTGGGAAGGA	
<i>Chl. limicola f. thios.</i> 1630	CATGACATCATGAAAGTCCCTCTCGACAATCCTGATGTA	ATCGACACTGGGAAGGA	
<i>Chl. phaeobacteroides</i> UdG 6051	CATGACATCATGAAAGTCCCTCTCGACAATCCTGATGTA	ATCGACACTGGGAAGGA	
<i>Chl. limicola</i> DSM 245 <sup>T</sup>	CATGACATCATGAAAGTTCCCTCTCGACAATCCTGATGTA	ATCGACACTGGGAAGGA	
<i>Chl. limicola f. thios.</i> 9330	CATGACATCATGAAAGTTCCCTCTCGACAATCCTGATGTA	ATCGACACTGGGAAGGA	
<i>Chl. limicola</i> DSM 246	CATGACATCATGAAAGTTCCCTCTCGACAATCCTGATGTA	ATCGACACTGGGAAGGA	
<i>Chl. limicola</i> DSM 247	CATGACATCATGAAAGTTCCCTCTCGACAATCCTGATGTA	ATCGACACTGGGAAGGA	
<i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 266 <sup>T</sup>	CATGACATCATGAAAGTGGCTCTTGACAACAATGATGTT	ATCGACATGGGAAGGC	
<i>Pld. phaeoclathratiforme</i> DSM 5477 <sup>T</sup>	CATGACATTATCATGAAAGTTCCGCTTGACAATCCCGATGTT	ATCGACACTGGGAAGGC	
<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> DSM 265 <sup>T</sup>	CACGACATCATGAAAGTGGCTCTCGACAACCCCGATGTC	ATGACACTGGGAAGGC	
<i>Chl. phaeovibrioides</i> DSM 270	CACGACATCATGAAAGTGGCTCTCGACAACCCCGATGTC	ATGACACTGGGAAGGC	
<i>Chl. phaeovibrioides</i> DSM 269 <sup>T</sup>	CACGACATCATGAAAGTGGCTCTCGACAACCCCGATGTC	ATGACACTGGGAAGGC	
<i>Chl. vibrioforme</i> DSM 261	CACGACATCATGAAAGTGGCTCTCGACAACCCCGATGTC	ATGACACTGGGAAGGC	
<i>Chl. vibrioforme</i> DSM 262	CACGACATCATGAAAGTGGCTCTCGACAACCCCGATGTC	ATGACACTGGGAAGGC	
<i>Pld. luteolum</i> DSM 273 <sup>T</sup>	CACGACATCATGAAAGTGGCTTGACAACAACGATGTC	ATCGATACCTGGGAAGGA	
F-478-fmo		5' -ATYGAACATGGGAAGG-3'	
R-478-fmo		3' -TARCTATGACCTTCC-5'	

## 8 PHYLOGENIE GRÜNER SCHWEFELBAKTERIEN

Die genetische Verwandtschaft der grünen Schwefelbakterien wurde von mehreren unabhängigen Seiten aus beleuchtet. Es wurden sowohl Untersuchungen auf der Basis des für Prokaryonten am häufigsten für phylogenetische Betrachtungen herangezogenen 16S-rRNA-Gens durchgeführt, als auch mit dem bisher als einzigartig für die Gruppe der grünen Schwefelbakterien geltenden *fmoA*-Gen. Weiterhin wurde durch die vom *fmoA* abgeleitete Aminosäuresequenz (FMO) eine dritte Möglichkeit geschaffen, Verwandtschaftsbeziehungen zu studieren.

Mit verschiedenen Rechenmodellen der Bioinformatik und deren statistischer Absicherung (Bootstrapping), wurde zudem die Chance eröffnet, die Fehler gegeneinander abzugleichen, die jedes theoretische Modell verursachen kann. Diese Algorithmen gingen jeweils von anderen Annahmen aus, was die Evolution (Mutation) der Nukleotide bzw. Aminosäuren in einer Sequenz betraf.

<sup>71</sup> Die hier aufgeführten Sequenzen sind nicht nur die, die zur Verfügung standen, als die Primer entwickelt wurden, sondern auch die im Laufe der Zeit neu hinzugekommenen.

<sup>72</sup> Die mehrdeutigen Nukleotide folgen der allgemeinen IUPAC-Nomenklatur.

<sup>73</sup> Die Position der Nukleotide bezieht sich auf das *fmoA*-Gen von *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup>.

Auch der GC-Gehalt des Genoms der Bakterien konnte in einigen Beispielen unterstützende Hinweise auf Gruppenbildungen geben. Schließlich diene noch die Salzbedürftigkeit der Arten als einzige physiologische Eigenschaft dazu, die Ergebnisse zu untermauern.

Bei den phylogenetischen Stammbäumen wurde in den meisten Fällen die radiale Darstellung ohne Wurzel (unrooted) bevorzugt. Diese hat im Gegensatz zum Phenogramm (Stimmgabelform)<sup>74</sup> den Vorteil, dass die Gruppen besser abgegrenzt und die Distanzen leichter erkennbar sind. Allerdings ergaben sich dabei manchmal Beschriftungsprobleme. Wenn zwei Sequenzen eine so geringe Distanz aufwiesen, dass die graphische Auflösung die Abzweigung kaum oder nicht erkennen ließ, wurden diese in einigen Fällen in eine einzige Zeile geschrieben und mit einer „und“-Verknüpfung versehen. In diesem Fall steht der Bootstrap-Wert, der immer prozentual angegeben ist, nicht an der Abzweigung sondern am Wort „und“. In anderen Fällen, wenn der Platz an der Abzweigung zu gering ist, steht der Wert zwischen den Beschriftungen der Zweige.

Die Maßangabe in jeder Abbildung mit phylogenetischen Stammbäumen gibt immer den Distanzwert 0,01 an. Da die berechneten Werte allerdings einen dreidimensionalen Stammbaum beschreiben, der schließlich zweidimensional dargestellt wird, kann dies nur als ungefähre Angabe betrachtet werden.

## 8.1 DEFINITION DER GRUPPEN GRÜNER SCHWEFELBAKTERIEN

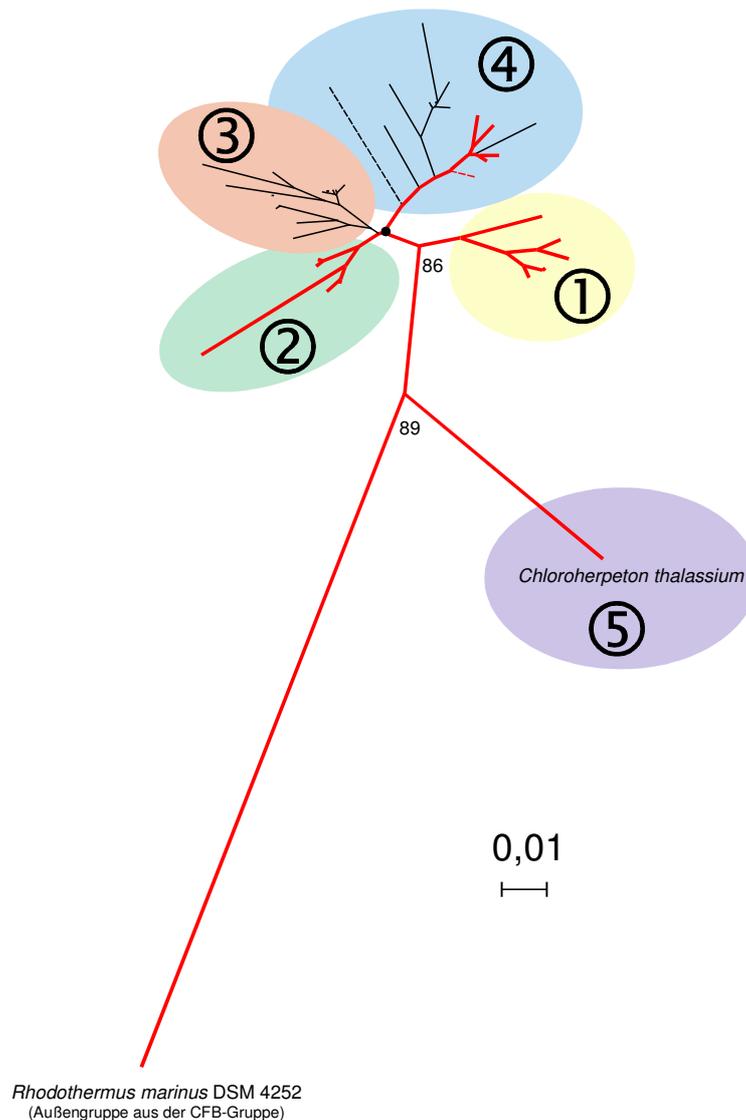
Zur Berechnung des Verwandtschaftsgrades der grünen Schwefelbakterien wurden zu den 32 in der Datenbank verfügbaren 16S-rDNA-Sequenzen noch 12 weitere aus den Reinkulturen gewonnen, die für diese Arbeit zur Verfügung standen (Tabelle 1, S. 13). Durch geeignete Auswahl des GSB-spezifischen Primers F-99-GSB konnte 86 % des 16S-rRNA-Gens für die nachfolgenden Berechnungen amplifiziert werden (Kapitel 7.1, S. 48). Es wurde ganz bewusst auf die Verwendung von zwei eubakteriell bindenden Primern verzichtet, was bei Reinkulturen ohne weiteres möglich gewesen wäre. Dadurch hätte sogar fast das gesamte 16S-rRNA-Gen amplifiziert werden können. Erstens ist jedoch die Sicherheit stark erhöht, reine Chlorobiaceae-Amplifikate zu erhalten, wenn mindestens ein für diese Gruppe spezifischer Primer verwendet wird. Dadurch steigt die Qualität der Sequenzierung. Zweitens konnte durch die Verwendung dieses Primer-Systems Erfahrung gesammelt werden, um es später in der Umweltanalyse richtig einzusetzen.

### 8.1.1 Gruppeneinteilung nach Salzbedürftigkeit und 16S-rDNA-Phylogenie

Nach der Distanz-Matrix-Methode, basierend auf dem Algorithmus von Jukes & Cantor (1969) im Programm DNADIST, Programmpaket Phylip, Tabelle 15, S. 45) wurden die evolutiven Distanzen berechnet, welche die Nukleotidsequenzen nach diesem Modell untereinander hatten (Tabelle 33, S. 138), und ein dreidimensionaler phylogenetischer Stammbaum errechnet, der schließlich aber zweidimensional dargestellt wird (Abbildung 11). Die statistische Absicherung erfolgte durch vielfache Wiederholung der Rechenschritte.

<sup>74</sup> Das Phenogramm wurde für die Darstellung der Mikroheterogenitätsgruppen verwendet (z.B. Abbildung 24, S. 88).

Das Modell von Jukes & Cantor geht davon aus, dass es für jeden Basenaustausch in der Evolution eine gleiche Wahrscheinlichkeit gibt, mit der dieser auftritt. Die anderen Algorithmen in DNADIST, die hier nicht angewandt wurden, unterscheiden in verschiedenen Gewichtungen nach Mutationstypen (Transition und Transversion). Bei ersterer werden Purine (G oder A) durch Purine und Pyrimidine (C oder T) durch Pyrimidine ersetzt, bei letzterer Purine durch Pyrimidine oder vice versa.



**Abbildung 11: 16S-rDNA-Phylogenie auf Reinkulturbasis: Überblick**

Radialer phylogenetischer Stammbaum auf der Grundlage von 16S rDNA. Die Topologie basiert auf Sequenzlängen von ca. 1240 nt, die mit dem Primer-Paar F-99-GSB/R-1369 erhalten (eigene Daten) oder darauf zugeschnitten wurden (Sequenzen von EMBL-EBI). Die Berechnungen wurden mit der Distanz-Matrix-Methode durchgeführt (basierend auf dem Algorithmus von Jukes & Cantor 1969). Rote Linien verbinden salzbedürftige Arten. Bootstrap-Werte sind prozentual. Die Maßangabe kennzeichnet die phylogenetische Distanz.

Fünf Hauptgruppen der grünen Schwefelbakterien mit unterschiedlichem Grad an Sequenzvariabilität konnten aus den limnischen, salzbedürftigen, marinen und hypersalinen Arten gebildet werden.

Während die Gruppen 1-4 relativ dicht beieinander liegen (Similarität  $S_i = 88,7-100,0 \%$ )<sup>75</sup>, ist *Chloroherpeton thalassium* (Gruppe 5) deutlich entfernt vom Rest der grünen Schwefelbakterien ( $S_i = 85,8-89,2 \%$ ). Die Abbildung 11 zeigt auch deutlich die Entfernung der Gruppen 1-5 zu einem der nächsten Verwandten in der Datenbank, *Rhodothermus marinus* DSM 4252 (Similarität 76,7-79,4 %).

Innerhalb der Gruppen 1-4 haben die Sequenzen der Gruppe 1 die größte Distanz zu den anderen. Diese wird sowohl durch rein marine Bakterien repräsentiert, wie z.B. dem Typenstamm *Prosthecochloris aestuarii* DSM 271<sup>T</sup> (Abbildung 12) als auch durch hypersaline nicht marine Arten (*Prosthecochloris aestuarii* CHP 3401 und CHP 3402 sowie *Pelodictyon phaeum* CIB 2401, Vila *et al.* 2002). Ein weiterer Vertreter ist der in der Photosyntheseforschung gut bekannte und als Co-Kultur leicht zu züchtende Stamm *Prosthecochloris aestuarii* 2K. Ein weiterer Hinweis auf die starke Abgrenzung dieser Gruppe sind die sehr hohen Bootstrap-Werte (91-100), die darauf hindeuten, dass kaum Varianz in der Topologie vorhanden ist. In keinem der Stammbäume, die diesem Konsensus-Stammbaum zugrunde liegen, waren Sequenzen der Gruppe 1 außerhalb zu finden.

Gruppe 4 enthält sowohl salzbedürftige Arten als auch limnische. Das gilt auch für die Großgruppe 2/3, die aufgrund der engen Verwandtschaft von 2 und 3 gebildet werden kann. In beiden Fällen werden diese physiologischen Unterschiede klar durch die Stammbaum-Topologie unterstrichen. So sind einige Stämme der Gruppe 4 an niedrige Salzkonzentrationen angepasst und stehen im phylogenetischen Stammbaum recht distanziert zu den Süßwasser-Arten. Diese Untergruppe enthält neben *Chlorobium chlorovibrioides* UdG 6026 auch zwei Isolate von Lascelles, *Chlorobium vibrioforme f. thiosulfatophilum* DSM 263<sup>76</sup> und NCIB 8346 (Figueras *et al.* 1997). Nicht in dieses Bild passen lediglich der Stamm *Chlorobium limicola* M1, über dessen Kultivierungsbedürfnisse und Herkunft wenig bekannt war, und *Chlorobium limicola* UdG 6044, der von Figueras *et al.* (1997) als limnische Art ohne Salzbedürfnis angegeben wurde. Die übrigen Stämme der Gruppe 4 sind reine Süßwasser-Arten, welche sich nicht so eng zusammen gruppieren wie andere. Dazu zählen Typenstämme wie *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* DSM 249<sup>T</sup>, *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup>, dessen Genom mittlerweile vollständig sequenziert ist, aber auch *Clathrochloris sulfurica*<sup>77</sup> (Stamm 1), *Chlorobium phaeobacteroides* 1549 und DSM 1677 und mehrere Stämme mit der Bezeichnung UdG (Figueras *et al.* 1997).

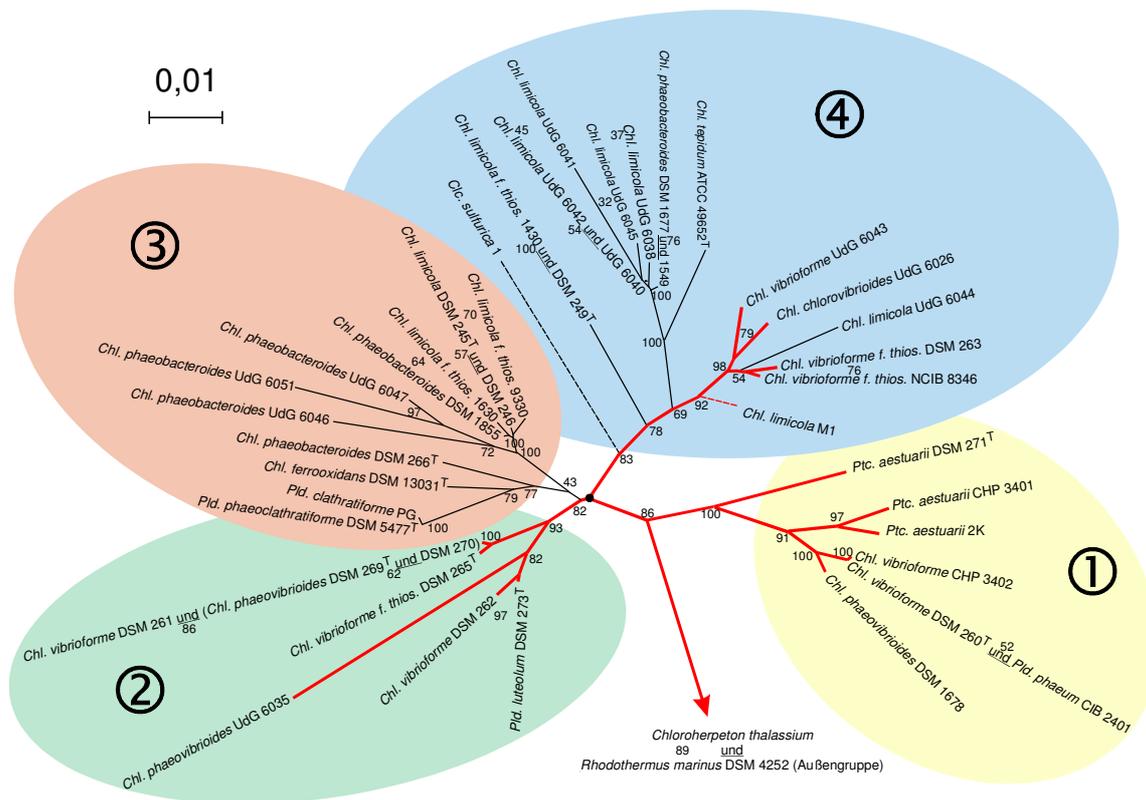
Die Bootstrap-Werte B sind an den Hauptverzweigungen sehr hoch ( $B = 69-100$ ), was andeutet, dass die Topologie insgesamt stabil ist. Lediglich innerhalb der Untergruppe um *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup> treten niedrigere Werte auf ( $B = 32-54$ ), die nur im Zusammenhang mit den UdG-Stämmen stehen, was auf deren höheren Anteil an unbestimmten Basen zurückzuführen sein könnte. Fehlen die meisten UdG-Stämme der Gruppe 4, treten ausnahmslos hohe Bootstrap-Werte auf, wie im 16S-rDNA-Stammbaum in Abbildung 17 (S. 74) zu erkennen ist. Die Untergruppe für sich betrachtet ist allerdings trotzdem stabil, das heißt, die UdG-Stämme sind in den einzelnen Stammbäumen, die dem

<sup>75</sup> Werte aus der korrespondierenden Distanz-/Similaritäts-Matrix (Tabelle 33, S. 138).

<sup>76</sup> DSM 263 ist auch unter der Stammbezeichnung NCIB 8327 bekannt.

<sup>77</sup> Bei diesem Stamm wurde vermutet, dass er limnischer Herkunft sei.

Konsensus-Stammbaum zugrunde liegen, ebenfalls benachbart. Es ändert sich nur deren interne Topologie. Diese Stabilität an den unteren Verzweigungen wird durch die beiden Maximalwerte (jeweils B = 100) repräsentiert, die in dieser Untergruppe zu finden sind: Abspaltung von *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup> sowie die Basisverzweigung der restlichen Sequenzen (UdG-Stämme, *Chlorobium phaeobacteroides* 1549 und DSM 1677).



**Abbildung 12: 16S-rDNA-Phylogenie auf Reinkulturbasis: Detaildarstellung der Gruppen 1-4**

Radialer phylogenetischer Stammbaum auf der Grundlage von 16S rDNA. Die Topologie basiert auf Sequenzlängen von ca. 1240 nt, die mit dem Primer-Paar F-99-GSB/R-1369 erhalten (eigene Daten) oder darauf zugeschnitten wurden (Sequenzen von EMBL-EBI). Die Berechnungen wurden mit der Distanz-Matrix-Methode durchgeführt (basierend auf dem Algorithmus von Jukes & Cantor 1969). Rote Linien verbinden salzbedürftige Arten. Gestrichelte Linien symbolisieren Arten, deren Salzbedürftigkeit nicht bekannt war. Bootstrap-Werte sind prozentual. Die Maßangabe kennzeichnet die phylogenetische Distanz.

Eine weitere leichte Instabilität ist an der Basisverzweigung der limnischen Stämme *Chlorobium phaeobacteroides* DSM 266<sup>T</sup>, *Chlorobium ferrooxidans* DSM 13031<sup>T</sup>, *Pelodictyon clathratiforme* PG und *Pelodictyon phaeoclathratiforme* DSM 5477<sup>T</sup> (innere Bootstrap-Werte 77-100, aber an der Basis nur 43) zu erkennen. Diese Untergruppe ist zwar in etwa der Hälfte der Stammbäume, die den Konsensus-Stammbaum bilden, in Gruppe 3, aber in den restlichen Fällen ist eine Tendenz zur Basis der Großgruppe 2/3 bzw. ganz zur salzbedürftigen Gruppe 2 zu erkennen.

Die Similarität innerhalb der Salz-Untergruppe um *Chlorobium chlorovibrioides* UdG 6026 ist sehr hoch ( $S_{i_{\min}} = 97,8 \%$ ), während die Sequenzen der limnischen Bakterien der Gruppe 4 weiter verstreut sind ( $S_i = 93,0-100,0 \%$ )<sup>78</sup> und keine gemeinsame Wurzel haben.

Die Gruppen 2 und 3 liegen zwar dicht beieinander, dennoch grenzen sie sich klar voneinander ab. Am deutlichsten wird dies dadurch, dass in letzterer ausnahmslos limnische, stäbchenförmige und in ersterer vibrioide<sup>79</sup> Vertreter der grünen Schwefelbakterien zu finden sind, die an niedrige Salzkonzentrationen angepasst sind (Tabelle 1, S. 13 und Abbildung 12, rote Linien).

In Gruppe 3 befinden sich insgesamt vier Typenstämmen, welche die ganze Vielfalt gut repräsentieren: *Chlorobium limicola* DSM 245<sup>T</sup>, *Chlorobium phaeobacteroides* DSM 266<sup>T</sup>, *Chlorobium ferrooxidans* DSM 13031<sup>T</sup> und *Pelodictyon phaeoclathratiforme* DSM 5477<sup>T</sup>. Um *Chlorobium limicola* DSM 245<sup>T</sup> gruppieren sich die meisten Arten. Hinzu kommen noch drei UdG-Stämme, die in deren Nähe sind.

Insgesamt sorgen auch hier ausreichend hohe Bootstrap-Werte für eine genügende Sicherheit bei der Gruppeneinteilung. Der niedrigste Wert ist  $B_{\min} = 43$  und stellt eine Ausnahme dar. Er sitzt an der Verzweigung, welche die Stämme um *Chlorobium limicola* DSM 245<sup>T</sup> von den restlichen der Gruppe 3 trennt und symbolisiert gleichzeitig die enge Verknüpfung der Gruppe 3 mit 2. Diese Untergruppe um *Chlorobium ferrooxidans* DSM 13031<sup>T</sup> sitzt sehr weit unten an der Basis der Gruppe 3. Bei Betrachtung der einzelnen Stammbäume, die den Konsensus-Stammbaum bilden, kann festgestellt werden, dass sie sich mehrmals an der Wurzel beider Gruppen befindet als auch an der von Gruppe 2. Diese Untergruppe bildet sozusagen das Bindeglied, kann aber trotzdem bedenkenlos zu Gruppe 3 gezählt werden, deren Similaritätswerte größer als 93,0 % sind.

Im Vergleich dazu ist 91,5 % der niedrigste Wert innerhalb der Großgruppe 2/3, während 94,1 % innerhalb der Gruppe 2 das Minimum darstellt. In dieser Gruppe tauchen die salzbedürftigen Typenstämmen *Chlorobium phaeovibrioides* DSM 269<sup>T</sup>, *Chlorobium vibrioforme f. thiosulfatophilum* DSM 265<sup>T</sup> und *Pelodictyon luteolum* DSM 273<sup>T</sup> auf. Auch hier stehen hohe Bootstrap-Werte für Stabilität in der topologischen Darstellung ( $B = 62-100$ ). Wenn berücksichtigt wird, dass die verhältnismäßig große Zahl an unbestimmten Basen in der Sequenz von *Chlorobium phaeovibrioides* UdG 6035 für die außergewöhnliche Länge des Astes verantwortlich ist (Kapitel 8.1.3, S. 59), können zwei Untergruppen gebildet werden, eine um *Chlorobium phaeovibrioides* DSM 269<sup>T</sup> und eine zweite um *Pelodictyon luteolum* DSM 273<sup>T</sup>.

### 8.1.2 Unterstützung der 16S-rDNA-Gruppierungen anhand des GC-Gehaltes

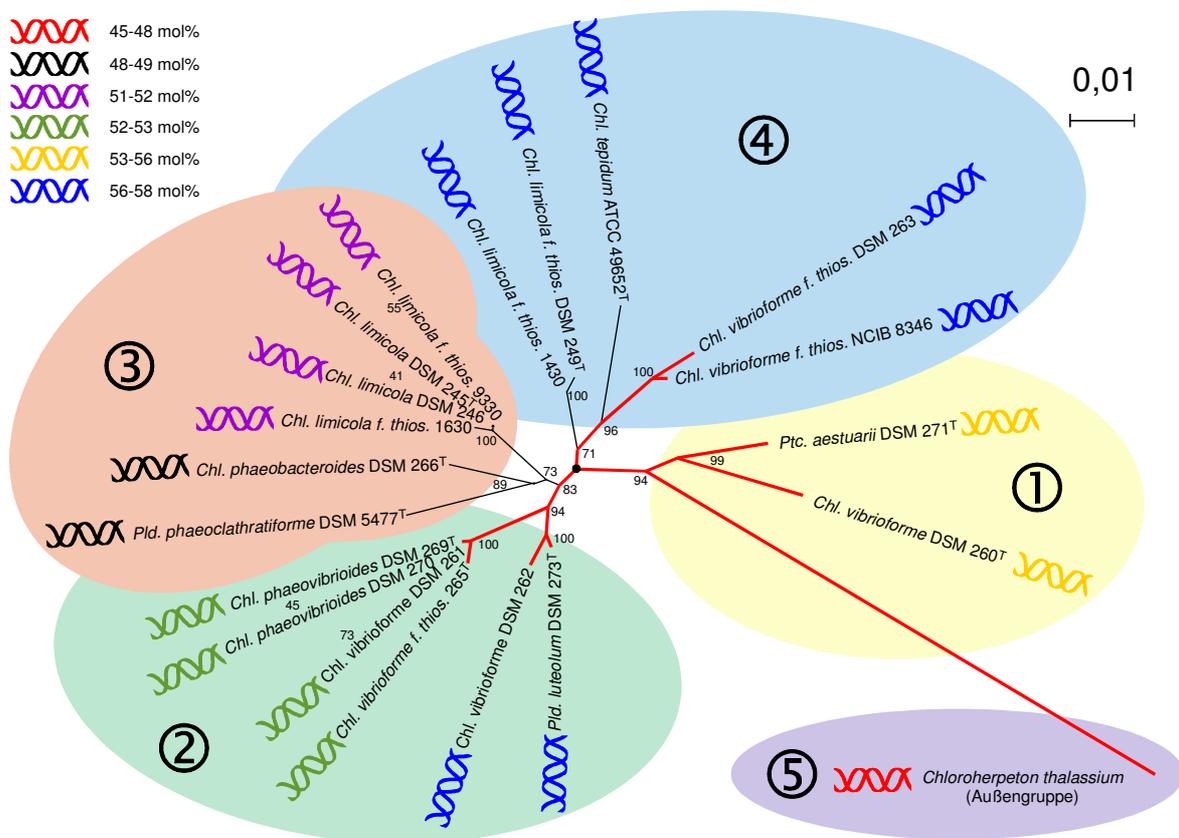
Der GC-Gehalt der Gesamt-DNA der grünen Schwefelbakterien ist nicht von allen Arten bekannt. Deshalb wurde ein phylogenetischer Stammbaum mit einer Auswahl an 16S-rDNA-Sequenzen erstellt, und zwar mit den Bakterienstämmen, deren GC-Gehalt, also der Gehalt an Guanin und Cytosin bekannt war (Tabelle 1, S. 13 und Abbildung 13).

<sup>78</sup> Werte aus der korrespondierenden Distanz-/Similaritäts-Matrix (Tabelle 33, S. 138).

<sup>79</sup> = gebogen, kommaförmig

Für sich alleine betrachtet ist dieser Durchschnittswert kein genaues verlässliches Kriterium, Verwandtschaftsbeziehungen zu studieren, weil auch wenig verwandte Arten unter Umständen einen ähnlichen GC-Gehalt aufweisen können. Das heißt, der Anteil an Guanin und Cytosin im Genom kann durchaus ähnlich sein, auch wenn damit ganz andere Gene codiert werden. Auf der anderen Seite ist es wahrscheinlich, dass sehr nahe verwandte Stämme auch einen vergleichbaren GC-Gehalt haben, da sie in den meisten Genen übereinstimmen.

Differieren also zwei Stämme in diesem Wert, so sind sie wahrscheinlich deutlich verschieden; ist er gleich, so ist dies bei der Betrachtung einer (Unter-)Gruppe zumindest kein Negativkriterium.



**Abbildung 13: 16S-rDNA-Stammbaum in Kombination mit GC-Werten grüner Schwefelbakterien**

Radialer phylogenetischer Stammbaum auf der Grundlage von 16S rDNA. Die Topologie basiert auf Sequenzlängen von ca. 1240 nt, die mit dem Primer-Paar F-99-GSB/R-1369 erhalten (eigene Daten) oder darauf zugeschnitten wurden (Sequenzen von EMBL-EBI). Die Berechnungen wurden mit der Distanz-Matrix-Methode durchgeführt (basierend auf dem Algorithmus von Jukes & Cantor 1969). Rote Linien verbinden salzbedürftige Arten. Bootstrap-Werte sind prozentual. Die Maßangabe kennzeichnet die phylogenetische Distanz.

Selbstverständlich kommt es darauf an, wie die Aufteilung in GC-Gehalt-Bereiche vollzogen wird, also welche Werte zusammen genommen werden. Dies kann nur individuell geschehen und folgt keinem

allgemeingültigen Gesetz. Für diese Arbeit wurden folgende Bereiche erstellt: 45-48 mol%, 48-49 mol%, 51-52 mol%, 52-53 mol%, 53-56 mol% und 56-58 mol%.

Die Gruppen, beschrieben im Kapitel 8.1.1 anhand des 16S-rRNA-Gens und einer physiologischen Eigenschaft (Salzbedürftigkeit), werden auch bei Betrachtung des GC-Gehalts bestätigt.

So hat Gruppe 1 einen GC-Gehalt (53-56 mol%), den sonst keine Gruppe aufweist. Im Gegensatz dazu findet sich in der ganzen Gruppe 4 und in einer Untergruppe von 2 (*Pelodictyon luteolum* DSM 273<sup>T</sup> und *Chlorobium vibrioforme* DSM 262) ein Wert im Bereich von 56-58 mol%. Deutlich trennt sich weiterhin die Untergruppe um *Chlorobium limicola* DSM 245<sup>T</sup> (51-52 mol%) von den restlichen beiden Stämmen der Gruppe 3 ab (*Chlorobium phaeobacteroides* DSM 266<sup>T</sup> und *Pelodictyon phaeoclathratiforme* DSM 5477<sup>T</sup>, 48-49 mol%). Genauso ist es bei den beiden Untergruppen in Gruppe 2 (52-53 vs. 56-58 mol%). Und schließlich hat *Chloroherpeton thalassium* als einziger Vertreter der Gruppe 5 einen völlig anderen GC-Gehalt (45-48 mol%)<sup>80</sup> als alle anderen grünen Schwefelbakterien.

### 8.1.3 Einfluss von unbestimmten Basen auf die phylogenetische Distanz

Unbestimmte Basen sitzen in DNA-Sequenzen an Positionen, an denen bei der Sequenzierung keine eindeutige Aussage über die Nukleotid-Art (Adenin, Thymin, Guanin oder Cytosin) gemacht werden kann. Deshalb gibt es nach internationaler Übereinkunft (IUPAC-Nomenklatur<sup>81</sup>) neben den Abkürzungen für die eindeutigen Nukleotide (A, T, G oder C) auch mehrdeutige Bezeichnungen (unbestimmte Basen). Bei zwei in Frage kommenden Möglichkeiten sind das je nach Kombination R, Y, K, M, S oder W; bei drei wird B, D, H oder V verwendet. Wenn nur bekannt ist, dass ein Nukleotid an eine Position gehört, aber nicht welches, dann steht dort der Buchstabe N.

Wenn bei einer phylogenetischen Berechnung in einer Sequenz nun solche unbestimmten Basen vorkommen, werden sie je nach Algorithmus (Parsimony, Distanz-Matrix oder Maximum-Likelihood) anders gewichtet. Ohne Einfluss bleiben sie in keinem Fall, denn diese Algorithmen vergleichen in einem Alignment die Nukleotide in den Spalten nach verschiedenen Mustern miteinander.

Bei der Parsimony-Methode werden alle Spalten eines Alignments aus der Berechnung herausgenommen, die entweder unbestimmte Basen oder gar kein Nukleotid enthalten, während bei den beiden Distanz-Methoden jeder Buchstabe einen Wert darstellt. Fehlende Nukleotide werden allerdings nicht gewertet. Somit wird bei letzteren Algorithmen beispielsweise ein N als Unterschied zu einem A gewertet, genauso wie ein C, G oder T.

Bei den in dieser Arbeit erstellten Sequenzen kommen so gut wie keine unbestimmten Basen vor. In der Datenbank allerdings sind einige der UdG-Stämme von mehreren unbestimmten Basen gekennzeichnet. Diese sind bei den Distanz-Methoden dafür verantwortlich, dass die Zweige überproportional lang werden. Es wird also eine größere Distanz angezeigt, als tatsächlich vorhanden ist.

<sup>80</sup> Dieser Wert beruht auf der Messung von drei verschiedenen Stämmen (GB 78, GB 80 und GB 81) der Art *Chloroherpeton thalassium* (Gibson *et al.* 1984). Die 16S-rDNA-Sequenz hingegen, die in der Datenbank vorhanden war und von denselben Autoren erstellt wurde, hatte keine Stammsbezeichnung.

<sup>81</sup> IUPAC = International Union of Pure and Applied Chemistry (URL 15, S. 154)

Da diese Stellen unregelmäßig verteilt waren, führte dieser Fehler allerdings nicht zu einer veränderten Topologie.

Das würde erst passieren, wenn in vielen Sequenzen in den gleichen Spalten mehrere identische unbestimmte Basen auftauchen würden. Dann würde nämlich nicht nur die unbestimmte Base als Unterschied gewertet (= größere Distanz zu den anderen), sondern diese auch noch als Übereinstimmung mit den anderen (identischen) unbestimmten Basen, wobei sich diese sonst evtl. fremden Sequenzen dann topologisch annähern würden.

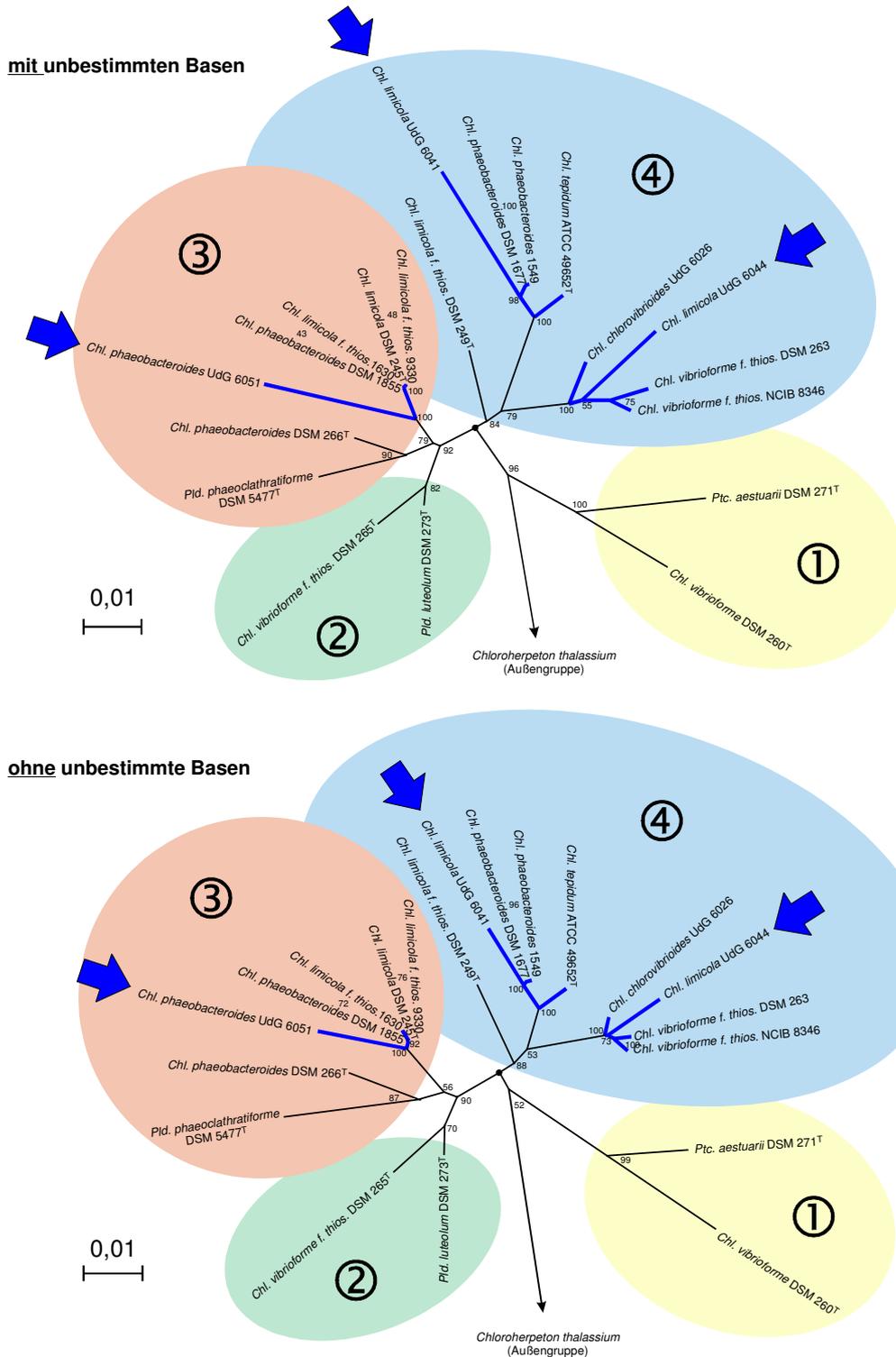
Für eine Beispielberechnung wurde eine bestimmte Anzahl 16S-rDNA-Sequenzen der grünen Schwefelbakterien ausgewählt und damit ein phylogenetischer Stammbaum nach der Distanz-Matrix-Methode erstellt (Abbildung 14, oben). Danach wurden in dem zugrunde liegenden Alignment alle die Spalten manuell herausgestrichen, die mindestens eine unbestimmte Base enthielten. Dabei wies bei einer ursprünglichen Gesamtlänge des Alignments<sup>82</sup> von 1242 nt *Chlorobium phaeobacteroides* UdG 6051 (Gruppe 3) 64 unbestimmte Basen auf, *Chlorobium limicola* UdG 6041 (Gruppe 4) hatte 48, während *Chlorobium limicola* UdG 6044 (Gruppe 4) nur 23 besaß. Insgesamt wurden aber 275 Spalten gestrichen, weil sich die unbestimmten Basen aller Sequenzen selten in der gleichen Spalte befanden. Das resultierende Alignment war demnach nur noch 966 nt lang. Der daraus errechnete Stammbaum ist in Abbildung 14 unten dargestellt.

Bei einem Vergleich der beiden Stammbäume in Abbildung 14 wird sofort deutlich, dass die langen Zweige von *Chlorobium phaeobacteroides* UdG 6051, *Chlorobium limicola* UdG 6041 und UdG 6044 sich bis auf etwa die Hälfte verkürzen, wenn die Distanz-Berechnung ohne die unbestimmten Basen durchgeführt wird, sich die Topologie aber keineswegs ändert. Gerade bei der Untergruppe um *Chlorobium limicola* UdG 6044 wird deutlich, dass die Stämme alle ein bisschen näher zusammenrücken. Die Similarität<sup>83</sup>, die dieser Stamm zu den am nächsten verwandten Sequenzen hat, reicht von 97,8-98,2 % (oberer Stammbaum). Nach Streichung der unbestimmten Basen sind die Werte höher (98,6-98,8 %). Das gilt genauso für *Chlorobium phaeobacteroides* UdG 6051 und dessen Untergruppe um *Chlorobium limicola* DSM 245<sup>T</sup> (vorher Si = 96,6-96,7 und nachher 98,2-98,3 %) sowie für *Chlorobium limicola* UdG 6041 und dessen nächste Verwandte um *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup> (vorher Si = 96,6-98,0 und nachher 97,7-99,3 %).

---

<sup>82</sup> Ein Alignment hat immer eine definierte Länge, während die Angaben über die enthaltenen Sequenzlängen differieren können, weil gerade bei der 16S rDNA Insertionen von Nukleotiden zu Lücken bei den anderen Sequenzen führen (und vice versa bei Deletionen). Siehe Tabelle 14, S. 44.

<sup>83</sup> Die zu der Abbildung 14 (S. 61) korrespondierende Distanz-/Similaritäts-Matrix befindet sich im Anhang in Tabelle 39, S. 144



**Abbildung 14: 16S-rDNA: Vergleich des Einflusses unbestimmter Basen auf die phylogenetische Distanz**

Radiale phylogenetische Stammbäume auf der Grundlage von 16S rDNA. Die Topologie basiert in der oberen Abb. auf Sequenzlängen von ca. 1240 nt<sup>82</sup>, die mit dem Primer-Paar F-99-GSB/R-1369 erhalten (eigene Daten) oder darauf zugeschnitten wurden (Sequenzen von EMBL-EBI). Untere Abb.: Ohne unbestimmte Basen (Alignment ca. 965 nt lang). Die Berechnungen wurden mit der Distanz-Matrix-Methode durchgeführt (basierend auf dem Algorithmus von Jukes & Cantor 1969). Bootstrap-Werte sind prozentual. Die Maßangaben kennzeichnen die phylogenetische Distanz.

### 8.1.4 Gruppensignaturen der 16S rDNA

Als Grundlage der phylogenetischen Berechnungen dient das Alignment (Kapitel 5.3, S. 43). Auf dessen Grundlage versuchen verschiedene Programme mit diversen Algorithmen Verwandtschaftsbeziehungen herzustellen, meist mit Modellvorstellungen über die Evolution bzw. Mutation der Sequenzen in der Vergangenheit.

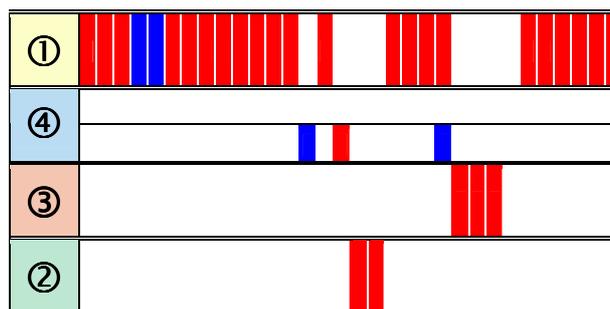
Wird das Alignment manuell durchsucht, können unabhängig von Modellen einige Nukleotidpositionen (Spalten) erkannt werden, die typisch für bestimmte Gruppen sind. Solche Signaturen sind in Tabelle 30 (S. 135) detailliert aufgeführt, wobei nur die Spalten des Alignments dargestellt sind, in denen signifikante Bereiche auftraten. Einen Überblick bietet Tabelle 20.

Solche Signaturen können entweder aus lauter gleichen Nukleotiden einer Gruppe bestehen, die bei den anderen Sequenzen nicht auftauchen (rot dargestellt) oder auch aus unterschiedlichen Nukleotiden, die aber ebenfalls nirgendwo sonst in der Spalte zu finden sind (blau dargestellt).

Die 14 Vertreter<sup>84</sup> der Gruppe 1 zeichnen sich durch die weitaus meisten Gruppensignaturen aus. An 24 Positionen ist eine deutliche Abgrenzung zu den anderen Sequenzen zu erkennen. Lediglich zwei Signaturen bestehen aus verschiedenen Nukleotid-Arten, die anderen besitzen identische Basen. Zusätzlich hat die Umweltsequenz Atlantik SSM-3 K-153 (Gruppe 4) 13 signifikante Positionen mit Gruppe 1 gemeinsam (Positionen 115-215) und zeigt dadurch ihre weitläufige Verwandtschaft auf.

**Tabelle 20: Überblick über die Gruppensignaturen der 16S-rDNA-Sequenzen**

Die dieser schematischen Darstellung zugrunde liegende Tabelle mit Detailinformationen befindet sich im Anhang (Tabelle 30, S. 135). Umkreiste Zahlen kennzeichnen die Gruppen grüner Schwefelbakterien. Gruppe 4 ist noch aufgespalten in die limnischen (obere Hälfte) und die salzbedürftigen Vertreter (untere Hälfte). Jede farbige Spalte steht für eine gruppenspezifische Nukleotidposition im Alignment<sup>85</sup> (rot: identische nt; blau: verschiedene nt).



Für die Gesamtheit der 21 Sequenzen, die zu Gruppe 4 gerechnet werden können, gibt es in dem durchsuchten 16S-rDNA-Alignment keine Gruppensignaturen, genauso wenig wie für die 11 limnischen Stämme. Die salzbedürftigen Vertreter der Gruppe 4 hingegen (10 Sequenzen) haben drei typische Positionen (zwei davon werden von nicht-identischen Nukleotiden gebildet). In Gruppe 3 (12

<sup>84</sup> Es wurden insgesamt sowohl Sequenzen aus Reinkulturen als auch aus Umweltproben in die Betrachtung einbezogen.

<sup>85</sup> Das durchsuchte Alignment basierte auf Sequenzlängen von ca. 1240 nt, die mit dem Primer-Paar F-99-GSB/R-1369 erhalten (eigene Daten aus Reinkulturen) oder darauf zugeschnitten wurden (Sequenzen von EMBL-EBI bzw. eigene Umweltsequenzen, die mit dem Primer-Paar F-99-GSB/R-1388 erhalten wurden).

Sequenzen) wurden drei und in Gruppe 2 (7 Sequenzen) schließlich auch noch zwei Gruppensignaturen festgestellt.

Manche Signaturen kommen in besonders charakteristischen Bereichen gehäuft vor. Diese eignen sich unter anderem auch zur spezifischen Amplifikation von einzelnen Gruppen grüner Schwefelbakterien (Tabelle 21).

**Tabelle 21: Zusammenhängende Signaturbereiche auf der 16S rDNA**

Farbig hinterlegt sind die **identischen** oder **nicht-identischen** Signaturen. Positionsangaben beziehen sich auf *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup>. Die Bezeichnung der mehrdeutigen Nukleotide folgt der allgemeinen IUPAC-Nomenklatur. Siehe auch Tabelle 30, S. 135.

	Positionen	Gruppe
<b>T</b> TGCCT <b>AC</b> AGGAC <b>M</b>	115-128	1
<b>C</b> AGGAAT <b>C</b> GCCT <b>GT</b> AGATA <b>A</b>	197-215	1
<b>G</b> CTA <b>G</b> CAGGT <b>A</b>	1099-1109	1
<b>A</b> TTGAAAR <b>AT</b>	984-993	3

*Chlorobium ferrooxidans* DSM 13031<sup>T</sup> und *Chlorobium phaeobacteroides* DSM 266<sup>T</sup> bilden eine Ausnahme und reihen sich nicht in den Signaturbereich von Gruppe 3 ein. Die Ergebnisse für die Signaturbereiche 115-128 und 197-215 sind ähnlich aber nicht ganz identisch zu denen, die in der Arbeit von Vila *et al.* (2002) vorgestellt wurden und liegen in der Domäne V2 (Gutell *et al.* 1985).

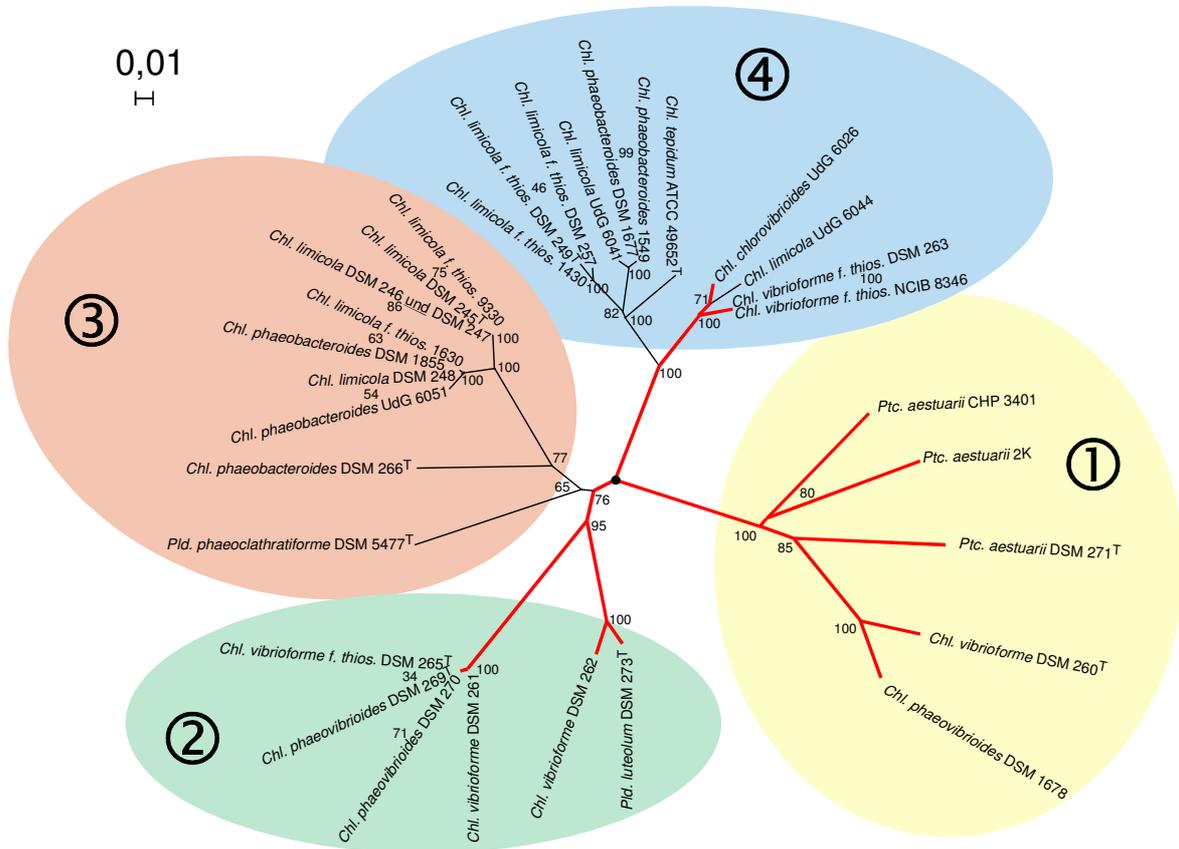
## 8.2 PHYLOGENIE DES *fmoA*-GENS

Die weitaus meisten für die nachfolgenden Berechnungen herangezogenen Sequenzen des *fmoA*-Gens (insbesondere der Typenstämmen) wurden in dieser Arbeit erstellt (25 Stück). In der Datenbank EMBL-EBI waren zu Beginn nur zwei fremde Datensätze vorhanden (Tabelle 1, S. 13). Dadurch, dass ein großer Teil des *fmoA*-Gens (80 %) mit Hilfe des in dieser Arbeit entwickelten spezifischen Primer-Paars F-Start-fmo/R-889-fmo amplifiziert werden konnte (Kapitel 7.2, S. 49), wurde eine valide Grundlage geschaffen, die Topologie der grünen Schwefelbakterien zusätzlich zu der 16S-rDNA-Verwandtschaft auch auf der Basis eines funktionellen Gens zu untersuchen.

### 8.2.1 Stammbaumdarstellung der *fmoA*-Sequenzen

Die phylogenetischen Distanzen aller *fmoA*-Sequenzen aus Reinkulturen wurden wie schon bei der 16S rDNA mit der Distanz-Matrix-Methode berechnet (basierend auf dem Algorithmus von Jukes & Cantor 1969). Die einzelnen Werte sind in Tabelle 35 (S. 140) zusammengestellt. Schließlich wurde ein durch Bootstrapping statistisch abgesicherter Konsensus-Stammbaum erstellt, der in Abbildung 15 dargestellt ist und alle *fmoA*-Sequenzen enthält, die verfügbar waren und eine ausreichende Qualität

aufwiesen. Insgesamt ist die Topologie sehr ähnlich der des 16S-rDNA-Stammbaumes (Abbildung 12, S. 56) und genauso stabil, was die Bootstrap-Werte betrifft. Alle Gruppen sind klar voneinander abgegrenzt.



**Abbildung 15: *fmoA*-Phylogenie auf Reinkulturbasis**

Radialer phylogenetischer Stammbaum auf der Grundlage von *fmoA*-Sequenzen. Die Topologie basiert auf Sequenzlängen von ca. 875 nt, die mit dem Primer-Paar F-Start-fmo/R-889-fmo erhalten (eigene Daten) oder darauf zugeschnitten wurden (Sequenzen von EMBL-EBI). Die Berechnungen wurden mit der Distanz-Matrix-Methode durchgeführt (basierend auf dem Algorithmus von Jukes & Cantor 1969). Rote Linien verbinden salzbedürftige Arten. Bootstrap-Werte sind prozentual. Die Maßangabe kennzeichnet die phylogenetische Distanz.

Die Sequenzen der Gruppe 1 stammen alle von marinen/hypersalinen Bakterien. Unter ihnen findet sich der Typenstamm *Prosthecochloris aestuarii* DSM 271<sup>T</sup> und der Stamm 2K. Gruppe 4 spaltet sich deutlich in zwei distinkte Untergruppen auf; die mit limnischen Vertretern um *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup> und die mit einem leichten Salzbedürfnis (*Chlorobium chlorovibrioides* UdG 6026 u. a.), wobei *Chlorobium limicola* UdG 6044 aus dem Rahmen fällt. Auch in Gruppe 2 fallen zwei getrennte Untergruppen auf, wobei in dieser allerdings nur Stämme vorkommen, die ein leichtes Salzbedürfnis haben (rote Linien). Die eine Untergruppe besteht aus *Chlorobium vibrioforme* DSM 262 und *Pelodictyon luteolum* DSM 273<sup>T</sup> und die andere umfasst die Stämme um *Chlorobium vibrioforme* f.

*thiosulfatophilum* DSM 265<sup>T</sup>. In Gruppe 3 können drei Untergruppen ausgemacht werden: *Pelodictyon phaeoclathratiforme* DSM 5477<sup>T</sup> und *Chlorobium phaeobacteroides* DSM 266<sup>T</sup> jeweils als einzige Vertreter und schließlich die große Anzahl an Stämmen um *Chlorobium limicola* DSM 245<sup>T</sup>.

Das *fmoA*-Gen enthält insgesamt deutlich weniger konservierte Bereiche, als es bei der 16S rDNA der Fall ist. Durch diese größere Varianz in der Sequenz sind die Distanzwerte viel höher und die Similarität damit niedriger. So liegt der niedrigste Wert bei 71,0 % zwischen *Chlorobium phaeovibrioides f. thiosulfatophilum* DSM 269<sup>T</sup> (Gruppe 2) und *Chlorobium vibrioforme* DSM 260<sup>T</sup> (Gruppe 1) (Tabelle 35, S. 140). Die von der 16S rDNA bekannten ungefähren Grenzwerte für Arten ( $Si_{min} = 97\%$ ) und Gattungen ( $Si_{min} = 95\%$ ) können hier nicht angewandt werden.

In Gruppe 1 reichen die Similaritätswerte von 81,8-94,4 %. In Gruppe 4 sind die Sequenzen am nächsten beieinander ( $Si_{min} = 88,0\%$ ) während es in Gruppe 3 Stämme gibt, die sehr weit auseinander liegen ( $Si_{min} = 81,9\%$ ). Bei Gruppe 2 ist der niedrigste Wert  $Si_{min} = 84,3\%$ .

Die Bootstrap-Werte sind generell sehr hoch und bis auf eine Ausnahme an den Hauptverzweigungen größer als 77. Diese Ausnahme ist *Pelodictyon phaeoclathratiforme* DSM 5477<sup>T</sup>, der an der Basis der Gruppe 3 mit einem Wert von  $B = 65$  abzweigt. Das ist zwar immer noch verlässlich, dennoch zeigt sich in den einzelnen Stammbäumen, die den Konsensus-Stammbaum bilden, die Tendenz dieses Stammes zu Gruppe 2, in der er sich in einigen Fällen anordnet. Das ist auch nicht verwunderlich, da er sehr weit an der Wurzel der Gruppe 3 sitzt und nur eine kurze Distanz zur Basis dieser Gruppe hat. *Chlorobium phaeobacteroides* DSM 266<sup>T</sup> hingegen ist nur in wenigen Ausnahmen in der Gruppe 2 zu finden.

Ansonsten treten weniger hohe Bootstrap-Werte ( $B = 34-71$ ) nur an den feinen Verästelungen zwischen sehr ähnlichen Sequenzen auf. Damit ist die Haupttopologie bis in die Untergruppen stabil und klar definiert. Lediglich an den Endverzweigungen treten leichte Variationsmöglichkeiten auf. Diese werden dann deutlich, wenn die Berechnung mit jeweils unterschiedlichen Kombinationen an Sequenzen wiederholt wird<sup>86</sup>. Dabei verändern die feinen Verästelungen mit etwas niedrigeren Bootstrap-Werten öfter einmal ihre Positionen zueinander, während die Hauptäste oder gar die Gruppen in allen Varianten, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, absolut stabil blieben.

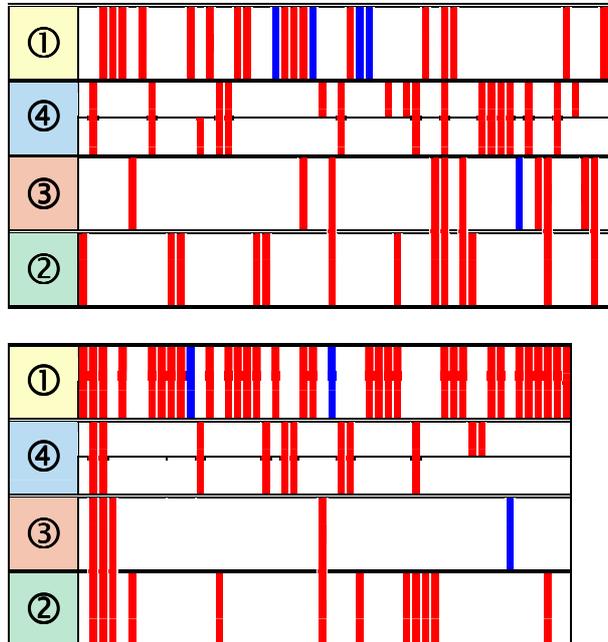
## 8.2.2 Gruppensignaturen des *fmoA*-Gens

Über die allgemeine Definition von Gruppensignaturen wurde schon im Kapitel 8.1.4 (S. 62) berichtet. Wird das *fmoA*-Alignment, wie dort beschrieben, Spalte für Spalte nach gruppentypischen Nukleotiden durchsucht, fallen einige Positionen auf.

<sup>86</sup> Nicht zu verwechseln mit dem Bootstrapping. Dabei bleibt bei den verschiedenen Wiederholungen die Zusammensetzung der Sequenzen gleich. Es ändert sich von Berechnung zu Berechnung lediglich die Anordnung der Spalten des zugrunde liegenden Alignments.

**Tabelle 22: Überblick über die Gruppensignaturen der *fmoA*-Sequenzen**

Die dieser schematischen Darstellung zugrunde liegende Tabelle mit Detailinformationen befindet sich im Anhang (Tabelle 31, S. 136). Umkreiste Zahlen kennzeichnen die Gruppen grüner Schwefelbakterien. Gruppe 4 ist noch aufgespalten in die limnischen (obere Hälfte) und die salzbedürftigen Vertreter (untere Hälfte). Jede farbige Spalte steht für eine gruppenspezifische Nukleotidposition im Alignment<sup>87</sup> (rot: identische nt; blau: verschiedene nt).



Die durch 11 Sequenzen<sup>88</sup> vertretene marine/hypersaline Gruppe 1 (*Prosthecochloris aestuarii* DSM 271<sup>T</sup> u. a.) unterscheidet sich mit 55 Signaturen deutlich von den anderen und grenzt sich damit am stärksten ab. Davon bestehen sechs aus unterschiedlichen Nukleotiden (blau dargestellt in Tabelle 22), der Rest weist identische auf (rot). Gruppe 4 als Gesamtheit (13 Sequenzen) grenzt sich in 22 Spalten von den anderen Gruppen ab, wobei sich dessen sieben limnische Stämme um *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup> (obere Hälfte) noch an fünf Positionen zusätzlich differenzieren; die salzbedürftigen Vertreter um *Chlorobium chlorovibrioides* UdG 6026 immerhin noch an einer einzigen.

Die limnische Gruppe 3 ist mit zehn Sequenzen vertreten und an sechs Positionen signifikant (zwei davon mit nicht-identischen Nukleotiden), während sich die sechs Vertreter der salzbedürftigen Gruppe 2 sogar in 15 Spalten von den anderen unterscheiden. Zusätzlich bildet die Großgruppe 2/3 auch eine Einheit, was an zehn Positionen deutlich wird.

Signaturen treten manchmal gehäuft auf und sind dadurch besonders charakteristisch (Tabelle 23). Manche Bereiche können deshalb als Grundlage für neue Primer dienen, die für einzelne Gruppen der grünen Schwefelbakterien spezifisch sind.

<sup>87</sup> Das durchsuchte Alignment basierte auf Sequenzlängen von ca. 875 nt, die mit dem Primer-Paar F-Start-fmo/R-889-fmo erhalten (eigene Daten) oder darauf zugeschnitten wurden (Sequenzen von EMBL-EBI).

<sup>88</sup> Es wurden insgesamt sowohl Sequenzen aus Reinkulturen als auch aus Umweltproben in die Betrachtung einbezogen.

**Tabelle 23: Zusammenhängende Signaturbereiche des *fmoA***

Farbig hinterlegt sind die **identischen** oder **nicht-identischen** Signaturen. Positionsangaben beziehen sich auf *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>1</sup>. Die Bezeichnung der mehrdeutigen Nukleotide folgt der allgemeinen IUPAC-Nomenklatur. Gruppe 4a kennzeichnet die salzbedürftige Untergruppe von 4. Siehe auch Tabelle 31, S. 136.

	Positionen	Gruppe
<b>T</b> ATTCTCGAGGG <b>T</b>	54-66	1
<b>R</b> CN <b>CAG</b> AAAGGB <b>R</b>	178-190	1
<b>A</b> CB <b>W</b> CH <b>V</b>	202-209	1
<b>T</b> TCC <b>A</b> GCAGTCGATY <b>T</b> CH <b>C</b> GH <b>GG</b>	496-518	1
<b>AAY</b>	525a-c	1
<b>G</b> TNGAW <b>W</b>	628-633	1
<b>AAA</b> TTCTCWCATG <b>C</b>	670-683	1
<b>AAY</b> <b>C</b> T <b>T</b> CCNGGYGTWTC <b>ACC</b>	814-833	1
<b>A</b> GGGCRAAAGTAAAYGT <b>C</b>	97-114	2
<b>G</b> AARCCBCT <b>G</b>	165-174	2
<b>C</b> AT <b>C</b> GTYGACTCCATC <b>G</b> CA	693-711	2
<b>CAG</b>	511-513	2/3
<b>T</b> CGCATCTCCGCCGT <b>A</b> T	195-211	4a
<b>CA</b>	757 und 758	4a
<b>G</b> T <b>C</b>	157-159	4
<b>T</b> G <b>G</b> TATCGGTTGGCGACTTC <b>AG</b>	308 und 329	4
<b>G</b> GCMTG <b>AA</b> CACCGAGAGCGGH <b>CC</b>	625 und 641	4

Ein Charakteristikum der *fmoA*-Sequenz soll hier noch gesondert dargestellt werden. Während bei dem 16S-rRNA-Gen relativ häufig Deletionen oder Insertionen einzelner Nukleotide vorkommen, ist dies bei einem funktionellen Gen eine Besonderheit. Funktionell bedeutet in diesem Zusammenhang, dass bei der Expression zunächst mRNA (messenger RNA) gebildet wird, aus der schließlich ein Protein translatiert wird. Durch die Expression der 16S-rDNA hingegen entsteht die rRNA (ribosomale RNA), ein Bestandteil der Ribosomen.

Das liegt daran, dass es bei der 16S rRNA sogenannte hochvariable Bereiche gibt, die Schleifen bilden, welche ohne Funktionsbeeinträchtigung nicht nur in der Sequenz variieren sondern auch kürzer oder länger sein können. Bei einem funktionellen Gen wie dem *fmoA* würde das Verschwinden oder Hinzukommen von einzelnen Nukleotiden in der Sequenz unweigerlich zu einer Leserasterverschiebung führen (frame shift), die das nach der Translation entstandene Protein ab dieser Position völlig verändern würde. Ab und zu treten solche Ereignisse aber auch gehäuft auf. Wenn dabei ein ganzes Codon deletiert oder inseriert wird, ist eine Aminosäure in der Sequenz verschwunden oder hinzugekommen, was die Funktion des Proteins nicht verändern muss.

Ein solches Ereignis ist ein besonderes Merkmal der marinen/hypersalinen Gruppe 1. Drei der 57 Signaturen stellen ein zusammenhängendes Codon (AAC bzw. AAT) dar, wogegen bei den anderen Sequenzen an dieser Position eine Lücke im Alignment ist (Tabelle 24). Beide Codons stehen für

dieselbe Aminosäure (Asparagin) und stehen zwischen den Basenpositionen<sup>89</sup> 525 und 526. Bei der Annahme, dass die Gruppe 1, in der marine Vertreter exklusiv vorkommen, den Ursprung innerhalb der grünen Schwefelbakterien darstellt, ist das Fehlen dieses Codons bei den anderen Stämmen eine Deletion, die in der Evolution nachträglich aufgetreten ist.

In einem anderen Bereich (Basenpositionen 514-516)<sup>89</sup> ist wahrscheinlich auch eine Deletion eines ganzen Codons aufgetreten, die in diesem Fall jedoch nicht gruppenspezifisch ist und nur zwei bisher bekannte Stämme im salzbedürftigen Teil der Gruppe 4 betrifft: Zwei Isolate von Lascelles, *Chlorobium vibrioforme f. thiosulfatophilum* DSM 263<sup>90</sup> und NCIB 8346. Es ist durchaus möglich, dass der zu diesen beiden sehr nahe verwandte Stamm *Chlorobium chlorovibrioides* UdG 6026 an dieser Position ebenfalls eine Deletion aufweist, jedoch hatte diese Sequenz aus der Datenbank dort leider einen größeren unbestimmten Bereich mit mehreren aufeinanderfolgenden nicht bestimmten Positionen. Da bei solchen ausgedehnten Schwachstellen in der Sequenz häufig keine wirkliche Aussage über die Anzahl der fehlenden Nukleotidpositionen gemacht werden kann, wurde dieser Bereich mit Fragezeichen versehen, weil sich gerade hier auch charakteristische Lücken im Alignment befinden könnten (Tabelle 24).

**Tabelle 24: Kontinuierlicher Abschnitt des *fmoA*-Alignments<sup>88</sup> mit charakteristischen Codon-Lücken**

	Position <sup>91</sup>	510	515	525	526	535	545		
Gr. 1	<i>Chl. vibrioforme</i> DSM 260 <sup>T</sup>	AGCAGT	CGATCT	CCGGTGG	TGGGTCAA	CTTGGCGA	CTGGATTC	CCGGAAATTC	
	<i>Chl. phaeovibrioides</i> DSM 1678	AGCAGT	CGATCT	TGGTGG	TGGGTCAA	CTTGGGTG	ACTGGATC	CCGGAAATTC	
	<i>Ptc. aestuarii</i> DSM 271 <sup>†</sup>	AGCAGT	CGATTT	CAGGAGG	CGGTGCCAA	CTTGGTGA	CTGGATC	CAGGAAATTC	
	Atlantik SSM-3 K-303	AGCAGT	CGATTT	CAGGAGG	CGGTGCCAA	CTTGGTGA	CTGGATC	CAGGAAATTC	
	Atlantik Sip-4 K-802	AGCAGT	CGATTT	CAGGAGG	CGGTGCCAA	CTTGGTGA	CTGGATC	CAGGAAATTC	
	Ostsee Laboe-3 K-600	AGCAGT	CGATTT	CAGGAGG	CGGTGCCAA	CTTGGTGA	CTGGATC	CAGGAAATTC	
	Ostsee Stak-2 K-455	AGCAGT	CGATTT	CAGGAGG	CGGTGCCAA	CTTGGTGA	CTGGATC	CAGGAAATTC	
	Adria Cviic-2 K-1011	AGCAGT	CGATTT	CAGGAGG	CGGTGCCAA	CTTGGTGA	CTGGATC	CAGGAAATTC	
	Adria Cviic-2 K-1027a	AGCAGT	CGATTT	CAGGAGG	CGGTGCCAA	CTTGGTGA	CTGGATC	CAGGAAATTC	
	<i>Ptc. aestuarii</i> CHP 3401	GCCAGT	CGATTT	CCGGTGG	TGGTGC	AAACTT	CGGTG	CTGGATC	CAGGAAATTC
<i>Ptc. aestuarii</i> 2K	AGCAGT	CGATTT	CCGGTGG	TGGTGC	AAACTT	CGGTG	CTGGATC	CAGGAAATTC	
Gr. 4	<i>Chl. limicola f. thios.</i> DSM 249 <sup>†</sup>	TGAGAG	CGGATTT	GCCAGCAC	CGGGACG	---	TTCAAC	GACTGGATC	CCGGGACTTCT
	<i>Chl. limicola f. thios.</i> 1430	TGAGAG	CGGATTT	GCCAGCAC	CGGGACG	---	TTCAAC	GACTGGATC	CCGGGACTTCT
	<i>Chl. limicola f. thios.</i> DSM 257	TGAGAG	CGGATTT	GCCAGCAC	CGGGACG	---	TTCAAC	GACTGGATC	CCGGGACTTCT
	<i>Chl. phaeobacteroides</i> 1549	TGAGAG	CGGATTT	GCCAGCAC	CGGGACG	---	TTCAAC	GACTGGATC	CCGGGACTTCT
	<i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 1677	TGAGAG	CGGATTT	GCCAGCAC	CGGGACG	---	TTCAAC	GACTGGATC	CCGGGACTTCT
	<i>Chl. limicola</i> UdG 6041	TGAGAG	CGGATTT	GCCAGCAC	CGGGACG	---	TTCAAC	GACTGGATC	CCGGGACTTCT
	<i>Chl. tepidum</i> ATCC 49652 <sup>†</sup>	TGAAAAG	CCGATTT	GGCAGCAC	CCGGTGC	---	TTCAAC	GACTGGATC	CCGGGACTTCT
	<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> DSM 263	GGCAGT	CGATGGGA	---	ACCGGGCT	---	TTTGGT	GATGGAT	CCCGTGAATTC
	<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> NCIB 8346	GGCAGT	CGATGGGA	---	ACCGGGCT	---	TTTGGT	GATGGAT	CCCGTGAATTC
	<i>Chl. chlorovibrioides</i> UdG 6026	GGCAGT	CGATGGGA	???	?????	???	TTTGGT	GATGGAT	CCCGTGAATTC
Gr. 3	<i>Chl. limicola</i> UdG 6044	CGCAGT	CGATTT	GCCAGCAC	CCCGTGC	---	TTGGT	GATGGAT	CCCGTGAATTC
	Atlantik SSM-3 K-307	TGAAAGG	CTGTGG	CCAGCAC	CCGGTGC	---	TTCAAC	GACTGGATC	CCGGGAAATTC
	Atlantik SSM-3 K-354	TGAAAGG	CTGTGG	CCAGCAC	CCGGTGC	---	TTCAAC	GACTGGATC	CCGGGAAATTC
	<i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 1855	TAAAAG	CCGCTCC	CAGAGCAC	CAGGAGCA	---	TTCAAC	GACTGGATC	CCGGGAAATTC
	<i>Chl. limicola</i> DSM 248	TAAAAG	CCGCTCC	CAGAGCAC	CAGGAGCA	---	TTCAAC	GACTGGATC	CCGGGAAATTC
	<i>Chl. limicola f. thios.</i> 1630	TAAAAG	CCGCTCC	CAGAGCAC	CAGGAGCA	---	TTCAAC	GACTGGATC	CCGGGAAATTC
	<i>Chl. phaeobacteroides</i> UdG 6051	TAAAAG	CCGCTCC	CAGAGCAC	CAGGAGCA	---	TTCAAC	GACTGGATC	CCGGGAAATTC
	<i>Chl. limicola</i> DSM 245 <sup>†</sup>	TAAAAG	CCGCTCC	CAGAGCAC	CAGGAGCA	---	TTCAAC	GACTGGATC	CCGGGAAATTC
	<i>Chl. limicola f. thios.</i> 9330	TAAAAG	CCGCTCC	CAGAGCAC	CAGGAGCA	---	TTCAAC	GACTGGATC	CCGGGAAATTC
	<i>Chl. limicola</i> DSM 246	TAAAAG	CCGCTCC	CAGAGCAC	CAGGAGCA	---	TTCAAC	GACTGGATC	CCGGGAAATTC
Gr. 2	<i>Chl. limicola</i> DSM 247	TAAAAG	CCGCTCC	CAGAGCAC	CAGGAGCA	---	TTCAAC	GACTGGATC	CCGGGAAATTC
	<i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 266 <sup>T</sup>	TAAAAG	CCGCTCC	CAGAGCAC	CAGGAGCA	---	TTCAAC	GACTGGATC	CCGGGAAATTC
	<i>Pld. phaeoclathratiforme</i> DSM 5477 <sup>T</sup>	TTCCGGG	CGCTTC	CAGTCAA	CACTGG	CAAC	---	TTCAAC	GACTGGATC
	<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> DSM 265 <sup>†</sup>	TGCGTT	CCATG	CAGAGCAC	CAGGGGCT	---	TTCAA	TGATGGAT	CCCGGAGTTCT
	<i>Chl. phaeovibrioides</i> DSM 270 <sup>†</sup>	TGCGTT	CCATG	CAGAGCAC	CAGGGGCT	---	TTCAA	TGATGGAT	CCCGGAGTTCT
	<i>Chl. phaeovibrioides</i> DSM 269 <sup>†</sup>	TGCGTT	CCATG	CAGAGCAC	CAGGGGCT	---	TTCAA	TGATGGAT	CCCGGAGTTCT
	<i>Chl. vibrioforme</i> DSM 261	TGCGTT	CCATG	CAGAGCAC	CAGGGGCT	---	TTCAA	TGATGGAT	CCCGGAGTTCT
	<i>Chl. vibrioforme</i> DSM 262	TGAAAG	CTCC	CAGAGCAC	CCGGGCA	---	TTCAA	TGATGGAT	CCCGGAGTTCT
	<i>Pld. luteolum</i> DSM 273 <sup>†</sup>	TGAAA	GACTCC	CAGAGCAC	CCGGTGC	---	TTCAA	TGATGGAT	CCCGTGAATTC

<sup>89</sup> bezogen auf *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>†</sup>  
<sup>90</sup> DSM 263 ist auch unter der Stammbezeichnung NCIB 8327 bekannt.  
<sup>91</sup> auf *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>†</sup> bezogen

## 8.3 PHYLOGENIE DES FMO-PROTEINS

Die FMO-Aminosäuresequenzen wurden aus den *fmoA*-Nukleotidsequenzen erstellt. Deren Translation erfolgte im Internet nach dem universalen genetischen Code bei EMBL-EBI mit WebiN oder Transeq (URL 10 bzw. URL 12, S. 154).

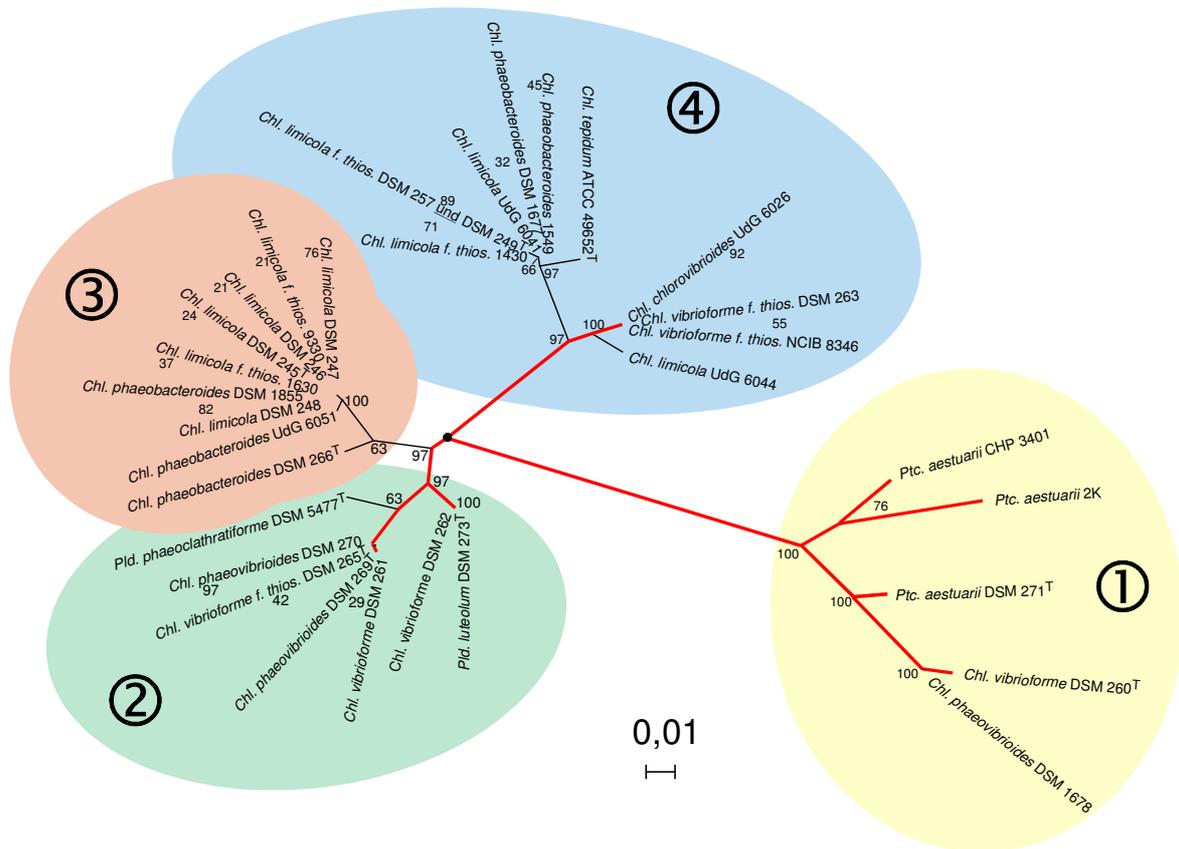
### 8.3.1 Stammbaumdarstellung der FMO-Sequenzen

Auch die Verwandtschaft der FMO-Aminosäuresequenzen wurde nach einer Distanz-Matrix-Methode bestimmt, wobei hier das PAM-Modell nach Dayhoff *et al.* (1978) mit PROTDIST im Programmpaket Phylip gewählt wurde (Tabelle 15, S. 45). Hierbei ist wichtig zu erwähnen, dass das Modell davon ausgeht, dass es für jede Aminosäure bestimmte Wahrscheinlichkeiten gibt, sich in der Evolutionsgeschichte in eine andere umzuwandeln. Darauf beruhend werden die phylogenetischen Distanzen errechnet. In PROTDIST sind noch zwei weitere Modelle enthalten; das 2-Parameter-Modell nach Kimura (1983) und die Kategorien-Distanz nach Felsenstein (1993). Ersteres Modell ist ähnlich der Parsimony-Methode. Es wertet die identischen Aminosäuren ohne Berücksichtigung eines eventuellen evolutiven Aminosäureaustausches. Dies ist eine sehr simple Theorie, die hier nicht verwendet wurde. Letztere Methode ähnelt der von Dayhoff, nur geht es bei ihr nicht um die Wahrscheinlichkeit des Austausches einzelner Aminosäuren sondern ganzer Kategorien (saure, basische, geladene, neutrale AS, usw.). Dieser Algorithmus wie auch der von Kimura wurde beispielhaft getestet, aber nachdem sich für die Phylogenie der FMO-Sequenzen keine wesentlichen Veränderungen ergaben, wurde auf die Darstellung dieser beiden Methoden verzichtet.

In Abbildung 16 sind alle Stämme enthalten, von denen FMO- bzw. deren korrespondierende *fmoA*-Sequenzen bekannt waren, sofern deren Qualität ausreichend war (Tabelle 1, S. 13). Die rein marine/hypersaline Gruppe 1 hat auf Aminosäureebene eine deutliche Distanz zu allen anderen Gruppen und isoliert sich damit stark. Deshalb ist die Similarität (Tabelle 37, S. 142) sehr niedrig mit  $Si_{\min} = 77,0\%$  zwischen *Prosthecochloris aestuarii* 2K (Gruppe 1) und *Chlorobium vibrioforme* DSM 261 (Gruppe 2). Trotz dieser klaren Abgrenzung im FMO-Stammbaum ist die relativ große Distanz innerhalb der Gruppe 1 auffällig ( $Si_{\min} = 89,5\%$ ). Der niedrigste Si-Wert liegt sogar in der Größenordnung der untersten Similaritätsgrenze zwischen den Gruppen 2, 3 und 4 ( $Si_{\min} = 86,1\%$ ).

Innerhalb der letztgenannten Gruppen steht Gruppe 4 schließlich etwas separat und bildet zwei Untergruppen: limnische Arten um *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup> ( $Si_{\min} = 97,7\%$ ) bzw. salzbedürftige um *Chlorobium chlorovibrioides* UdG 6026 ( $Si_{\min} = 96,9\%$ ). Eine Ausnahme ist da allerdings wieder *Chlorobium limicola* UdG 6044. Gruppen 2 und 3 liegen dicht beieinander ( $Si_{\min} = 90,3\%$ ), dennoch sind sie klar getrennt. Die nur aus limnischen Stämmen bestehende Gruppe 3 enthält *Chlorobium phaeobacteroides* DSM 266<sup>T</sup> und eine Untergruppe um *Chlorobium limicola* DSM 245<sup>T</sup>, während Gruppe 2 zwei Untergruppen (eine um *Pelodictyon luteolum* DSM 273<sup>T</sup> und eine zweite um *Chlorobium vibrioforme f. thiosulfatophilum* DSM 265<sup>T</sup>) als auch einen solitären Vertreter hat (*Pelodictyon phaeoclathratiforme* DSM 5477<sup>T</sup>), der als einziger nicht salzbedürftig in dieser Gruppe ist.

Insgesamt haben sehr viele der Aminosäuresequenzen Distanzen, die gegen Null gehen. Diese ordnen sich sehr eng bei den Endverzweigungen der Untergruppen an.



**Abbildung 16: FMO-Phylogenie auf Reinkulturbasis**

Radialer phylogenetischer Stammbaum auf der Grundlage von FMO-Sequenzen. Die Topologie basiert auf Aminosäure-Sequenzlängen von ca. 290 aa, die aus Nukleotidsequenzen erstellt wurden, welche mit dem Primer-Paar F-Start-fmo/R-889-fmo erhalten (eigene Daten) oder darauf zugeschnitten wurden (Sequenzen von EMBL-EBI). Die Distanz wurde nach Dayhoff *et al.* (1978) ermittelt. Rote Linien verbinden salzbedürftige Arten. Bootstrap-Werte sind prozentual. Die Maßangabe kennzeichnet die phylogenetische Distanz.

Durch die Translation der *fmoA*-Sequenzen sank aufgrund der Variabilität an der dritten Position der Codons insgesamt betrachtet das Diversitätspotential der Aminosäure- im Vergleich zu den Nukleotidsequenzen, weil sich Codons, die gleiche Aminosäuren definieren, häufig an der dritten Position unterscheiden. Dennoch ist der niedrigste Similaritätswert  $S_{i_{min}} = 77,0\%$  (*fmoA*:  $S_{i_{min}} = 71,0\%$ ) noch deutlich niedriger als bei der 16S rDNA ( $S_{i_{min}} = 88,7\%$ )<sup>92</sup>. Auch hier ist zu bedenken, dass die FMO-Similaritätswerte nicht mit den allgemein akzeptierten Grenzwerten für die Gruppen- und Art-Definitionen verglichen werden dürfen, die auf der 16S rDNA beruhen.

<sup>92</sup> ohne *Chloroherpeton thalassium* (Gruppe 5)

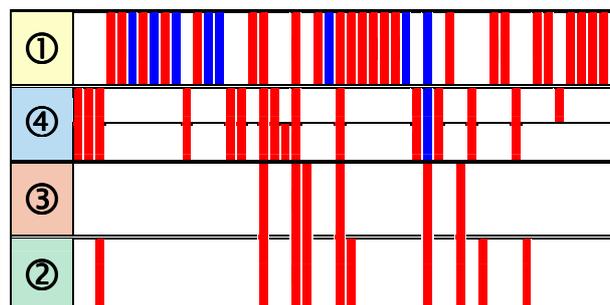
Nahezu alle Bootstrap-Werte der Gruppe 1 sind maximal groß ( $B = 100$ ), wobei die einzige Ausnahme mit  $B = 76$  auch als ausreichend sicherer Wert gelten kann. Hohe bis sehr hohe Werte treten auch an der Basis der anderen Gruppen und Untergruppen auf ( $B = 63-100$ ). Lediglich an den Endverzweigungen kommen neben hohen auch niedrigere Werte vor ( $B = 21-97$ ). Werden die einzelnen Stammbäume betrachtet, die den Konsensus-Stammbaum bilden, so ist folgendes festzustellen: *Pelodictyon phaeoclathratiforme* DSM 5477<sup>T</sup> bleibt immer in Gruppe 2, auch wenn seine Sequenz nicht am dargestellten Platz mit  $B = 63$  liegt, während sich *Chlorobium phaeobacteroides* DSM 266<sup>T</sup> einige Male bei Gruppe 2 einfindet.

### 8.3.2 Gruppensignaturen des FMO-Alignments

Die allgemeine Definition von Gruppensignaturen wurde im Kapitel 8.1.4 (S. 62) eingeführt. Die marine/hypersaline Gruppe 1, vertreten mit insgesamt 11 Sequenzen<sup>93</sup> im betrachteten Alignment, zeichnet sich durch 33 typische Positionen aus (farbig hinterlegt), die nur bei diesen auftreten (Tabelle 25), wovon acht aus unterschiedlichen Aminosäuren bestehen (blau). Damit hat diese Gruppe die weitaus meisten Signaturen. Gruppe 4 als Gesamtes besitzt allerdings immerhin noch etwa die Hälfte davon (15) darunter eine einzige mit nicht-identischen Aminosäuren. Deren beide Untergruppen schließlich weisen sich zumindest jeweils an einer Position mit einer Gruppensignatur aus. Die Großgruppe 2/3 weist sich an sechs Positionen aus, während Gruppe 3 keine eigenen, Gruppe 2 hingegen noch vier Signaturen besitzt.

**Tabelle 25: Überblick über die Gruppensignaturen der FMO-Sequenzen**

Die dieser schematischen Darstellung zugrunde liegende Tabelle mit Detailinformationen befindet sich im Anhang Tabelle 32, S. 137). Umkreiste Zahlen kennzeichnen die Gruppen grüner Schwefelbakterien. Gruppe 4 ist noch aufgespalten in die limnischen (obere Hälfte) und die salzbedürftigen Vertreter (untere Hälfte). Jede farbige Spalte steht für eine gruppenspezifische Nukleotidposition im Alignment<sup>94</sup> (rot: identische nt; blau: verschiedene nt).



Gehäuft auftretende Signaturen sind unabhängig von phylogenetischen Berechnungen ein wertvolles Indiz für die Zugehörigkeit einer Sequenz zu einer Gruppe (Tabelle 26).

<sup>93</sup> Es wurden insgesamt sowohl Sequenzen aus Reinkulturen als auch aus Umweltproben in die Betrachtung einbezogen.

<sup>94</sup> Das durchsuchte Alignment basierte auf Aminosäuresequenzlängen von ca. 290 aa, deren zugrunde liegende *fmoA*-Sequenzen mit dem Primer-Paar F-Start-fmo/R-889-fmo erhalten (eigene Daten) oder darauf zugeschnitten wurden (Sequenzen von EMBL-EBI).

**Tabelle 26: Zusammenhängende Signaturbereiche des FMO**

Farbig hinterlegt sind die **identischen** oder **nicht-identischen** Signaturen. An Positionen, die durch verschiedene Aminosäuren definiert sind, stehen diese untereinander. Positionsangaben beziehen sich auf *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup>. Der Einbuchstaben-Code der Aminosäuren folgt der allgemeinen IUPAC-Nomenklatur. Siehe auch Tabelle 32 (S. 137).

	Positionen	Gruppe
	54-70	1
	166-175a	1
	202-210	1
	224-228	1
	247-256	1
	272-278	1
	208-211	2/3
	6-9	4
	83 und 84	4
	207-214	4

Die schon im Kapitel 8.2.2 (S. 65) besprochene Deletion ganzer Codons in den untersuchten *fmoA*-Sequenzen ist folglich auch bei den von diesen abgeleiteten Aminosäuresequenzen von großer Bedeutung. Dabei ist festzustellen, dass Asparagin (N) bei allen Vertretern der Gruppe 1 vorhanden ist, an dieser Position aber bei sämtlichen anderen untersuchten Sequenzen eine Deletion<sup>95</sup> zwischen den Aminosäurepositionen<sup>96</sup> 175 und 176 vorliegt (Tabelle 27).

Eine wahrscheinlich zufällige Deletion stellt die fehlende Position 172 bei zwei der salzbedürftigen Stämmen in Gruppe 4 dar (*Chlorobium vibrioforme f. thiosulfatophilum* DSM 263<sup>97</sup> und NCIB 8346), an der die restlichen Vertreter der Gruppe 4 und die ganze Gruppe 3 die Aminosäure Serin (S) besitzen. Ob der sehr nah verwandte Stamm *Chlorobium chlorovibrioides* UdG 6026 an dieser Position auch eine Deletion aufweist, konnte nicht festgestellt werden, weil die *fmoA*-Sequenz aus der Datenbank, wie im vorigen Kapitel beschrieben, hier einen größeren unbestimmten Bereich aufwies (mit Fragezeichen markiert).

<sup>95</sup> Je nach Betrachtungsweise. Es könnte sich in der Evolution durchaus auch um die Insertion des Asparagin bei Gruppe 1 gehandelt haben. Hier soll aber die Annahme gelten, dass Gruppe 1 evolutiv älter ist.

<sup>96</sup> bezogen auf *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup>

<sup>97</sup> DSM 263 ist auch unter der Stammbezeichnung NCIB 8327 bekannt.

Tabelle 27: Kontinuierlicher Abschnitt des FMO-Alignments mit charakteristischen Deletionen

Position <sup>98</sup>	155	165	175	176	185	195
<i>Chl. vibrioforme</i> DSM 260 <sup>T</sup>	VPLDNKDLIET	EGFQOSISGGGVNF	GDWIREFFFI	G	PAYTALNEGGORI	
<i>Chl. phaeovibrioides</i> DSM 1678	VPLDNKDLIET	EGFQOSISGGGVNF	GDWIREFFFI	G	PAYTALNEGGORI	
<i>Ptc. aestuarii</i> DSM 271 <sup>T</sup>	VPLDNNDLIDT	EGFQOSISGGGANF	GDWIREFFFI	G	PAFTALNEGGORI	
Atlantik SSM-3 K-303	VPLDNNDLIDT	EGFQOSISGGGANF	GDWIREFFFI	G	PAFTALNEGGORI	
Ostsee Laboe-3 K-600	VPLDNNDLIDT	EGFQOSISGGGANF	GDWIREFFFI	G	PAFTALNEGGORI	
Ostsee Stak-2 K-455	VPLDNNDLIDT	EGFQOSISGGGANF	GDWIREFFFI	G	PAFTALNEGGORI	
Atlantik Sip-4 K-802	VPLDNNDLIDT	EGFQOSISGGGANF	GDWIREFFFI	G	PAFTALNEGGORI	
Adria Cviic-2 K-1011	VPLENNDLIDT	EGFQOSISGGGANF	NDWIREFFFI	G	PAFTALNEGGORI	
Adria Cviic-2 K-1027a	VPLENNDLIDT	EGFQOSISGGGANF	NDWIREFFFI	G	PAFTALNEGGORI	
<i>Ptc. aestuarii</i> 2K	VPLDNNDLVDT	EGFQOSISGGGANF	GDWIREFFFI	G	PAFAALNEGGORI	
<i>Ptc. aestuarii</i> CHP 3401	VPLENNDLIDT	EGFSOSISGGGANF	GDWIREFFLI	G	PAFAALNEGGORI	
<i>Chl. limicola f. thios.</i> DSM 249 <sup>T</sup>	VPLDNNDLIDT	EGTVRAIGSTGT	FNDWIRDFWFI	G	PAFTALNEGGORI	
<i>Chl. limicola f. thios.</i> DSM 257	VPLDNNDLIDT	EGTVRAIGSTGT	FNDWIRDFWFI	G	PAFTALNEGGORI	
<i>Chl. limicola f. thios.</i> 1430	VPLDNNDLIDT	EGTVRAIGSTCA	FNDWIRDFWFI	G	PAFTALNEGGORI	
<i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 1677	VPLDNNDLIDT	EGTVRAIGSTCA	FNDWIRDFWFI	G	PAFTALNEGGORI	
<i>Chl. phaeobacteroides</i> 1549	VPLDNNDLIDT	EGTVRAIGSTCA	FNDWIRDFWFI	G	PAFTALNEGGORI	
<i>Chl. limicola</i> UdG 6041	VPLDNNDLIDT	EGTVRAIGSTCA	FNDWIRDFWFI	G	PALTALNEGGORI	
<i>Chl. tepidum</i> ATCC 49652 <sup>T</sup>	VPLDNNDLIDT	EGTVKAVGSTCA	FNDWIRDFWFI	G	PAFTALNEGGORI	
<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> DSM 263	VPLENNDLIDT	EGTROSMGTCA	FNDWIREFFFI	G	PAFTALNEGGORI	
<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> NCIB 8346	VPLENNDLIDT	EGTROSMGTCA	FNDWIREFFFI	G	PAFTALNEGGORI	
<i>Chl. chlorovibrioides</i> UdG 6026	VPLENNDLIDT	ERTROSMG????	FNDWIREFFFI	G	PAFTALNEGGORI	
<i>Chl. limicola</i> UdG 6044	VPLDNNDLIDT	EGTTOSIGSTCA	FNDWIREFFFI	G	PAFTALNEGGORI	
Atlantik SSM-3 K-307	VPLDNNDLIDT	EGTVKAVGSTCA	FNDWIREFFFI	G	PAFTALNEGGORI	
Atlantik SSM-3 K-354	VPLDNNDLIDT	EGTVKAVGSTCA	FNDWIREFFFI	G	PAFTALNEGGORI	
<i>Chl. limicola</i> DSM 248	VPLDNPVDIDT	EGTVKAVOSTCA	FNDWIRDFWFI	G	PAFTALNEGGORI	
<i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 1855	VPLDNPVDIDT	EGTVKAVOSTCA	FNDWIRDFWFI	G	PAFTALNEGGORI	
<i>Chl. limicola f. thios.</i> 9330	VPLDNPVDIDT	EGTVKAVOSTCA	FNDWIRDFWFI	G	PAFTALNEGGORI	
<i>Chl. limicola f. thios.</i> 1630	VPLDNPVDIDT	EGTVKAVOSTCA	FNDWIRDFWFI	G	PAFTALNEGGORI	
<i>Chl. limicola</i> DSM 247	VPLDNPVDIDT	EGTVKAVOSTCA	FNDWIRDFWFI	G	PAFTALNEGGORI	
<i>Chl. limicola</i> DSM 245 <sup>T</sup>	VPLDNPVDIDT	EGTVKAVOSTCA	FNDWIRDFWFI	G	PAFTALNEGGORI	
<i>Chl. limicola</i> DSM 246	VPLDNPVDIDT	EGTVKAVOSTCA	FNDWIRDFWFI	G	PAFTALNEGGORI	
<i>Chl. phaeobacteroides</i> UdG 6051	VPLDNPVDIDT	EGTVKAVOSTCA	FNDWIRDFWFI	G	PAFTALNEGGORI	
<i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 266 <sup>T</sup>	VPLDNPVDIDT	EGTVKAVOSTCA	FNDWIRDFWFI	G	PAFTALNEGGORI	
<i>Pld. phaeoclathratiforme</i> DSM 5477 <sup>T</sup>	VPLDNPVDIDT	EGTLRALOSTG	FNDWIREFFFI	G	PAFTALNEGGORI	
<i>Chl. vibrioforme</i> DSM 261	VPLDNPVDIDT	EGTMRSMOTTCA	FNDWIREFFFI	G	PAFTALNEGGORI	
<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> DSM 265 <sup>T</sup>	VPLDNPVDIDT	EGTMRSMOTTCA	FNDWIREFFFI	G	PAFTALNEGGORI	
<i>Chl. phaeovibrioides</i> DSM 269 <sup>T</sup>	VPLDNPVDIDT	EGTMRSMOTTCA	FNDWIREFFFI	G	PAFTALNEGGORI	
<i>Chl. phaeovibrioides</i> DSM 270	VPLDNPVDIDT	EGTMRSMOTTCA	FNDWIREFFFI	G	PAFTALNEGGORI	
<i>Chl. vibrioforme</i> DSM 262	VPLDNNVDIDT	EGTLKALOTTCA	FNDWIREFFFI	G	PAFTALNEGGORI	
<i>Pld. luteolum</i> DSM 273 <sup>T</sup>	VPLDNNVDIDT	EGTLKALOTTCA	FNDWIREFFFI	G	PAFTALNEGGORI	

## 8.4 VERGLEICHENDE PHYLOGENIE VON 16S rDNA, *fmoA* UND FMO

In den vorhergehenden Abschnitten wurden anhand der 16S rDNA-, *fmoA*- und FMO-Sequenzen die Gruppenbildungen untersucht. Dabei wurden die Ergebnisse weitgehend unabhängig voneinander beschrieben. In diesem Abschnitt sollen nun die errechneten phylogenetischen Stammbäume miteinander verglichen werden, allerdings ohne eine Diskussion zu führen, da diese erst in dem dafür vorgesehenen Kapitel stattfindet.

Dafür wurden zur besseren direkten Vergleichbarkeit drei Stammbäume erstellt<sup>99</sup>, errechnet aus den entsprechend unterschiedlichen Sequenz-Arten (16S rDNA, *fmoA* und FMO), die jeweils identische Stämme enthalten.

<sup>98</sup> auf *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup> bezogen

<sup>99</sup> Rechenmethoden wie bei den Kapiteln 18.1

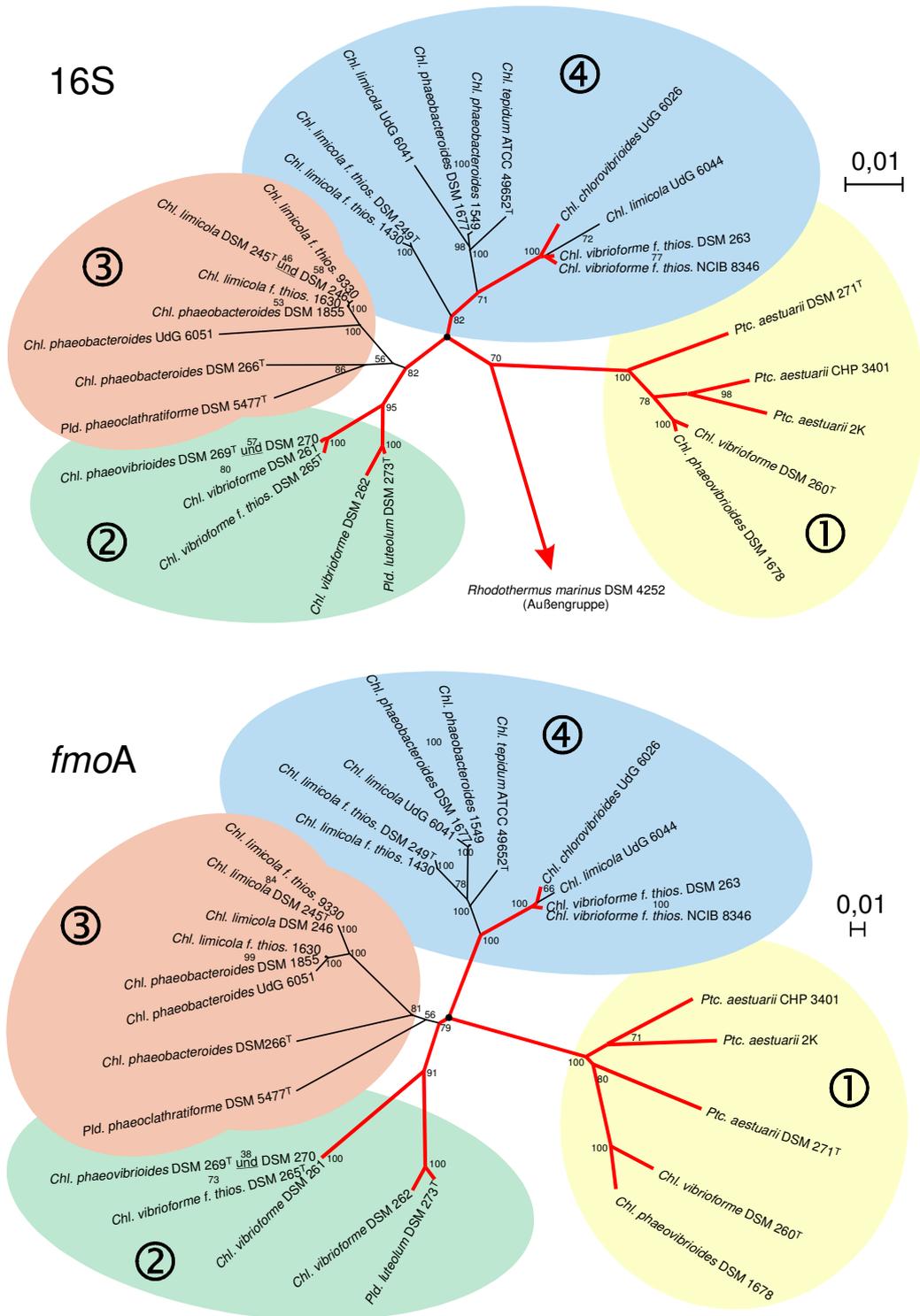
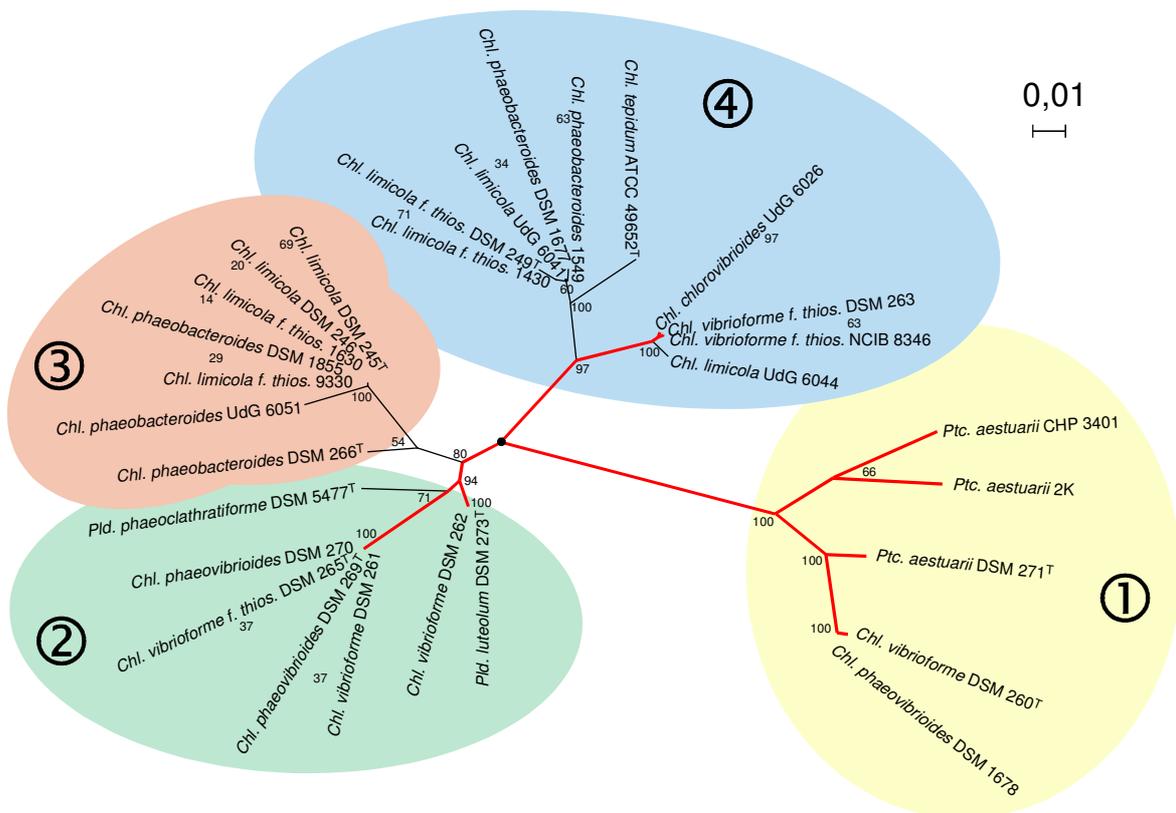


Abbildung 17: 16S-rDNA-Stammbaum im Vergleich zu einem *fmoA*-Stammbaum

Radiale phylogenetische Stammbäume auf der Grundlage von 16S rDNA (oben) bzw. *fmoA* (unten). Die Topologie basiert auf Sequenzlängen von ca. 1240 nt (16S) bzw. 875 nt (*fmoA*), die mit Primer-Paar F-99-GSB/R-1369 (16S) bzw. F-Start-fmo/R-889-fmo (*fmoA*) erhalten (eigene Daten) oder darauf zugeschnitten wurden (Sequenzen von EMBL-EBI). Die Berechnungen wurden mit der Distanz-Matrix-Methode durchgeführt (basierend auf dem Algorithmus von Jukes & Cantor 1969). Rote Linien verbinden salzbedürftige Arten. Bootstrap-Werte sind prozentual. Die Maßangaben kennzeichnen die phylogenetische Distanz.

Bei dem Stammbaum mit 16S-rDNA-Sequenzen wurde zusätzlich noch die Außengruppe *Rhodothermus marinus* DSM 4252 aufgenommen. Für die *fmoA*- bzw. FMO-Sequenzen gab es keine Möglichkeit, eine Außengruppe zu wählen, weil dieses Gen bzw. Protein nur bei grünen Schwefelbakterien vorkommt. Die einzige Möglichkeit wäre *Chloroherpeton thalassium*, der phylogenetisch relativ weit von den übrigen grünen Schwefelbakterien entfernt ist. Für diesen Stamm stand allerdings im Rahmen dieser Arbeit weder eine Reinkultur zur DNA-Extraktion zur Verfügung, noch gab es in der Datenbank einen entsprechenden Eintrag.



**Abbildung 18: FMO-Stammbaum als Vergleich zur 16S-rDNA- und *fmoA*-Phylogenie**

Radialer phylogenetischer Stammbaum auf der Grundlage von FMO-Sequenzen. Die Topologie basiert auf Aminosäure-Sequenzlängen von ca. 290 aa, die aus Nukleotidsequenzen erstellt wurden, welche mit dem Primer-Paar F-Start-fmo/R-889-fmo erhalten (eigene Daten) oder darauf zugeschnitten wurden (Sequenzen von EMBL-EBI). Die Distanz wurde nach Dayhoff *et al.* (1978) ermittelt. Rote Linien verbinden salzbedürftige Arten. Bootstrap-Werte sind prozentual. Die Maßangabe kennzeichnet die phylogenetische Distanz.

Bei einem Vergleich der drei Stammbäume wird sofort deutlich, dass die allgemeine Topologie der Gruppen und sogar der Untergruppen sehr ähnlich ist (Abbildung 17 *f.*). Dieses ist besonders bemerkenswert, da es sich hierbei um den Vergleich des 16S-rRNA-Gens mit einem davon unabhängigen funktionellen Gen (*fmoA*) und dessen abgeleitete Aminosäuresequenz handelt. Letztere ist zwar in gewissem Maße abhängig von der zugrunde liegenden Nukleotidsequenz, da aber

die Berechnungen der Aminosäuredistanzen mit einem anderen Algorithmus (Dayhoff-PAM-Matrix) durchgeführt werden, der statt vier Basen die 20 Aminosäure-Arten einbezieht und vergleicht, ist die Einbeziehung der abgeleiteten Proteinphylogenie sehr wichtig und hilfreich.

Absolut identisch bei allen drei Stammbäumen ist die Formierung der marinen/hypersalinen Gruppe 1 und deren große Distanz zu den anderen. In allen Fällen benachbart sind *Chlorobium vibrioforme* DSM 260<sup>T</sup> und *Chlorobium phaeovibrioides* DSM 1678 bzw. *Prosthecochloris aestuarii* 2K und CHP 3401. Der Typenstamm *Prosthecochloris aestuarii* DSM 271<sup>T</sup> steht jedes Mal etwas isoliert von den übrigen Stämmen der Gruppe 1, wobei er im 16S-rDNA-Stammbaum abseits dieser, und in den beiden anderen Stammbäumen zwischen den beiden Paaren platziert ist.

Genauso klar grenzt sich Gruppe 4 in allen Fällen ab. Deren salzbedürftige Untergruppe mit *Chlorobium chlorovibrioides* UdG 6026, *Chlorobium limicola* UdG 6044<sup>100</sup>, *Chlorobium vibrioforme f. thiosulfatophilum* DSM 263 und NCIB 8346 separiert sich deutlich von den limnischen Vertretern der Gruppe. Beim 16S-rDNA-Stammbaum bilden die beiden in allen drei Stammbäumen nah beieinander liegenden Stämme *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* 1430 und DSM 249<sup>T</sup> eine eigene Untergruppe, während sie sich im *fmoA*- bzw. FMO-Stammbaum zur Untergruppe um *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup> gesellen.

Es lagen nur für drei UdG-Stämme *fmoA*-Sequenzen in der Datenbank vor. Da keine der UdG-Stämme als Kultur zur Verfügung stand, konnten die fehlenden Daten im Rahmen dieser Arbeit nicht erstellt werden. Für die drei vorhandenen fällt aber auf, dass sie alle im 16S-rDNA-Stammbaum relativ lange Linien besitzen, dabei aber von den zugehörigen Untergruppen abzweigen. Diese vermeintliche Distanz wurde schon in Kapitel 8.1.3 (S. 59) besprochen. Sie rührt von der erhöhten Anzahl unbestimmter Basen her, was auch dadurch deutlich wird, dass die UdG-Stämme *Chlorobium phaeobacteroides* UdG 6051 (Gruppe 3), *Chlorobium limicola* UdG 6041 und UdG 6044 (Gruppe 4) im *fmoA*- und FMO-Stammbaum relativ gesehen viel näher bei den Stämmen der zugehörigen Untergruppen stehen. Bei deren *fmoA*-Sequenzen in der Datenbank kamen fast keine unbestimmten Basen vor (und damit natürlich auch keine unbestimmten Aminosäuren).

Gruppen 2 und 3 sind sehr nahe verwandt, was sich nicht nur durch deren gegenseitige Nähe zeigt, sondern auch durch zwei Typenstämmen, die gesamt betrachtet sozusagen zwischen diesen beiden Gruppen stehen und damit einen fließenden Übergang schaffen. Das sind *Chlorobium phaeobacteroides* DSM 266<sup>T</sup> und *Pelodictyon phaeoclathratiforme* DSM 5477<sup>T</sup>. Ersterer kann aber trotzdem klar zu Gruppe 3 gerechnet werden, während letzterer im 16S-rDNA- und *fmoA*-Stammbaum durch etwas niedrigere Bootstrap-Werte die Tendenz zu Gruppe 2 zeigt und im FMO-Stammbaum sogar ganz bei dieser steht.

Bei den Untergruppen um *Chlorobium limicola* DSM 245<sup>T</sup> (Gr. 3), um *Chlorobium vibrioforme f. thiosulfatophilum* DSM 265<sup>T</sup> (Gr. 2) und dem Paar *Chlorobium vibrioforme* DSM 262 und *Pelodictyon luteolum* DSM 273<sup>T</sup> (Gr. 2) hingegen sind die Zuordnungen zu einer der beiden Gruppen in allen drei untersuchten Stammbäumen eindeutig und übereinstimmend.

---

<sup>100</sup> Als einziger Stamm in dieser Untergruppe: limnischer Herkunft laut Datenbank.

In allen drei Berechnungen harmoniert die Topologie auch mit der physiologischen Eigenschaft der Salzbedürftigkeit. Ausnahmen sind nur der angeblich limnische Stamm *Chlorobium limicola* UdG 6044 (Figueras *et al.* 1997), der immer in der salzbedürftigen Untergruppe von 4 angesiedelt ist, sowie der limnische Stamm *Pelodictyon phaeoclathratiforme* DSM 5477<sup>T</sup>. Letzterer ist nur im FMO-Stammbaum in der salzbedürftigen Gruppe 2 zu finden, ansonsten aber erwartungsgemäß bei den Vertretern der Süßwassergruppe 3.

## 8.5 ALTERNATIVE ALGORITHMEN ZUR STAMMBAUMDARSTELLUNG

In dieser Arbeit wurden alle Stammbäume (Nukleotid- und Aminosäuresequenzen) mit Distanz-Matrix-Methoden im Gegensatz zu Parsimony oder Maximum-Likelihood erstellt. Erstere hat sich als Standardmethode durchgesetzt und führte auch bei den vorliegenden Auswertungen zu guten Ergebnissen. Beide anderen Methoden haben Nachteile, die im folgenden erwähnt werden sollen, jedoch eigneten sie sich zumindest exemplarisch dazu, die oben dargestellten Ergebnisse zu untermauern. Deshalb wurden mit den 16S-rDNA- und *fmoA*-Sequenzen verschiedene Berechnungen mit alternativen Algorithmen durchgeführt (Tabelle 15, S. 45).

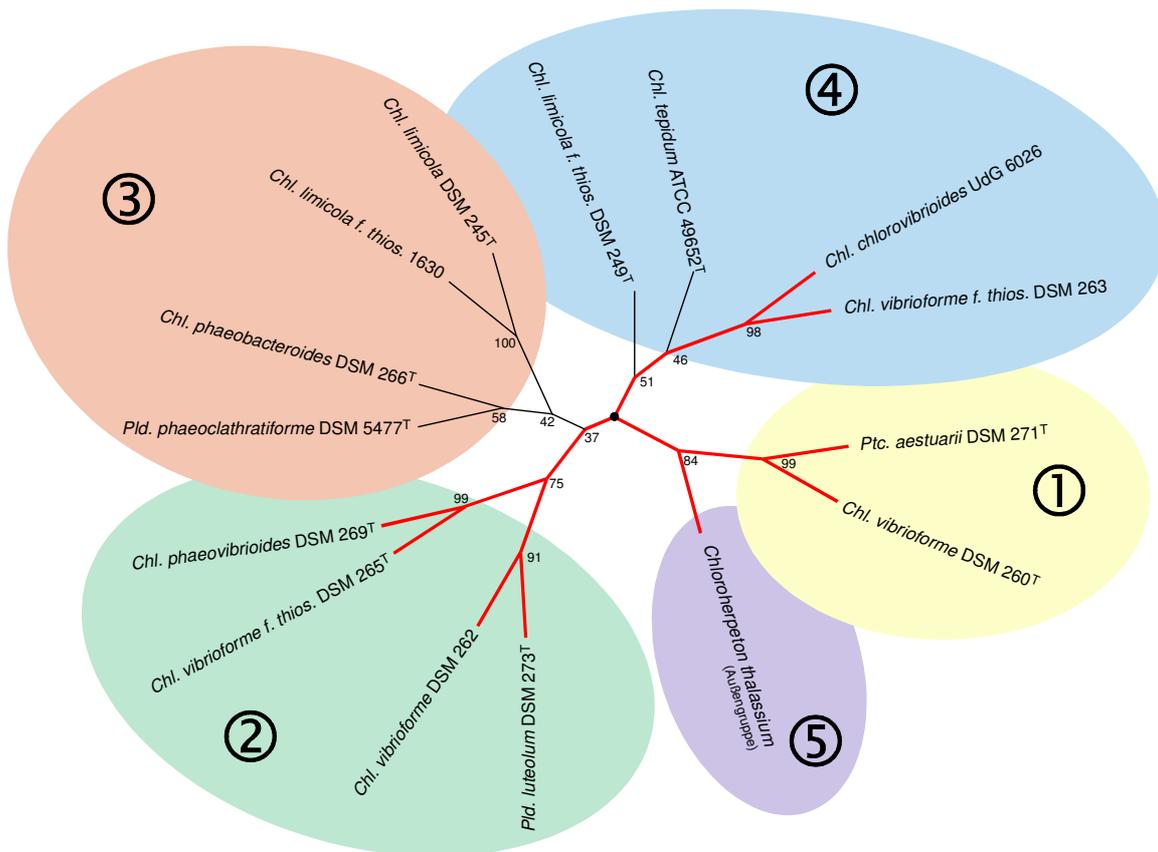
### 8.5.1 Parsimony-Methode

Die Parsimony-Berechnung (Eck & Dayhoff 1966, Kluge & Farris 1969) vergleicht ohne einen evolutionstheoretischen Aspekt lediglich die Basen bzw. Aminosäuren der einzelnen Spalten des Alignments miteinander und ist dadurch sehr schnell. Sie untersucht sozusagen den Status quo.

Das funktioniert bei sehr ähnlichen Sequenzen innerhalb einer verwandten Gruppe wie den grünen Schwefelbakterien recht gut, verglichen mit den anderen Methoden werden allerdings keine Distanzen berechnet, sondern nur Nachbarschaften ermittelt. Deshalb haben in diesen phylogenetischen Stammbäumen die Zweiglängen keine Bedeutung.

Für die jeweiligen Sequenzen einer identischen Auswahl an Stämmen<sup>101</sup> wurde für die 16S rDNA und das *fmoA* die Parsimony-Berechnung mit Bootstrapping durchgeführt. Die Bildung der Paare und Gruppen folgt bei der 16S-rDNA (Abbildung 19) exakt der Topologie der Distanz-Matrix-Stammbäume (Abbildung 17 oben, S. 74).

<sup>101</sup> Lediglich *Chloroherpeton thalassium* ist zusätzlich als Außengruppe im 16S-rDNA-Baum enthalten.

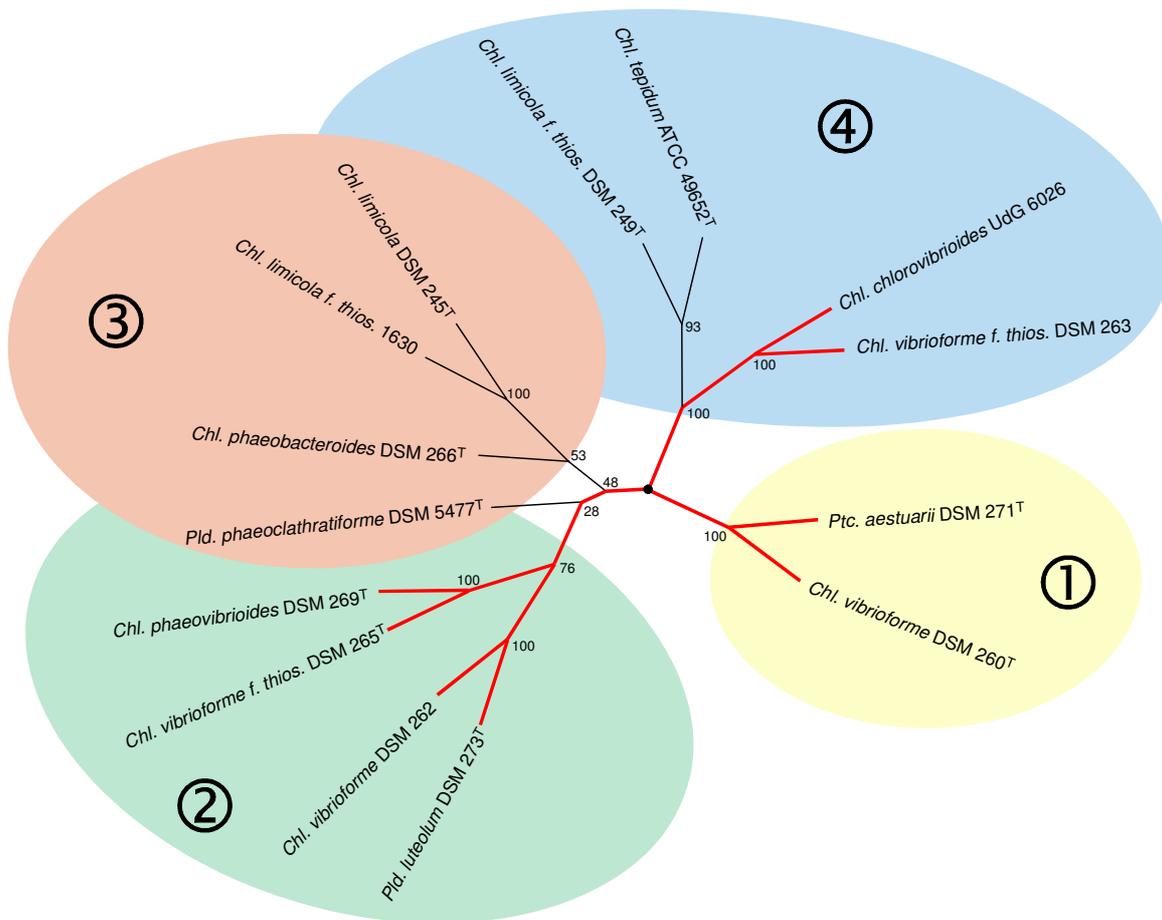


**Abbildung 19: 16S-rDNA-Stammbaum nach Parsimony-Methode**

Radialer phylogenetischer Stammbaum auf der Grundlage von 16S rDNA. Die Topologie basiert auf Sequenzlängen von ca. 1240 nt, die mit dem Primer-Paar F-99-GSB/R-1369 erhalten (eigene Daten) oder darauf zugeschnitten wurden (Sequenzen von EMBL-EBI). Die Berechnung wurde mit der Parsimony-Methode (Eck & Dayhoff 1966, Kluge & Farris 1969) durchgeführt. Rote Linien verbinden salzbedürftige Arten. Bootstrap-Werte sind prozentual.

Genauso verhält es sich bei dem *fmoA*-Parsimony-Stammbaum (Abbildung 20), der allerdings an einer Stelle abweicht. Dort ist *Pelodictyon phaeoclathratiforme* DSM 5477<sup>T</sup> der salzbedürftigen Gruppe 2 zugeordnet, wie es sonst nur im FMO-Stammbaum vorkam (Abbildung 18, S. 75). Allerdings weist dieser limnische Typenstamm auch hier wieder mit einem recht niedrigen Bootstrap-Wert von B = 28 eine intermediäre Stellung auf (Abbildung 17 unten, S. 74).

Auch der Vergleich der beiden Parsimony-Stammbäume zeigt, dass trotz der Untersuchung von völlig unterschiedlichen Genen die Verwandtschaft der grünen Schwefelbakterien sehr kongruent dargestellt werden kann.

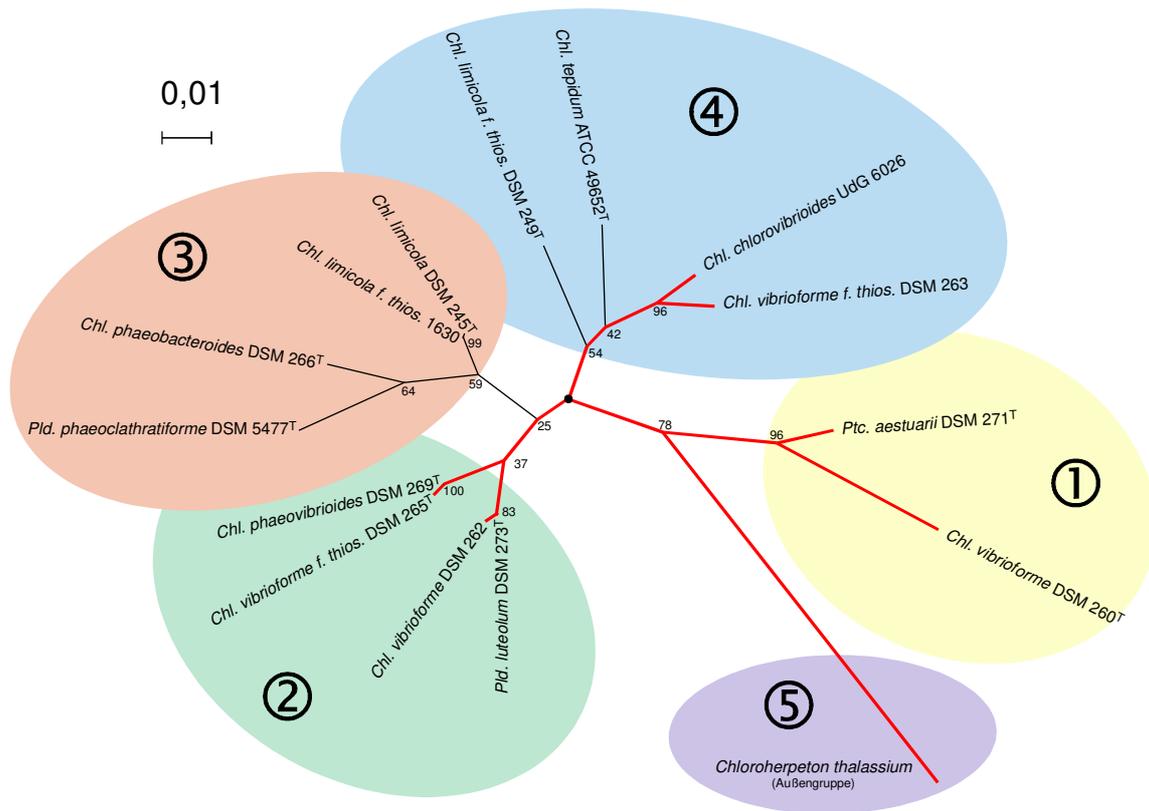


**Abbildung 20: *fmoA*-Stammbaum nach Parsimony-Methode**

Radialer phylogenetischer Stammbaum auf der Grundlage von *fmoA*-Sequenzen. Die Topologie basiert auf Sequenzlängen von ca. 875 nt, die mit dem Primer-Paar F-Start-*fmo*/R-889-*fmo* erhalten (eigene Daten) oder darauf zugeschnitten wurden (Sequenzen von EMBL-EBI). Die Berechnung wurde mit der Parsimony-Methode (Eck & Dayhoff 1966, Kluge & Farris 1969) durchgeführt. Rote Linien verbinden salzbedürftige Arten. Bootstrap-Werte sind prozentual.

### 8.5.2 Maximum Likelihood

Die Maximum-Likelihood-Methode nach Felsenstein (1981) hat den großen Nachteil, dass sie sehr rechenintensiv ist; vor allem, wenn noch die Option „Global Rearrangement“ gewählt wird, welche hilft, die Topologie zu stabilisieren. Für die gleiche Auswahl an Stämmen wie im vorigen Kapitel und ebenfalls für die 16S rDNA als auch für das *fmoA* wurde diese Methode exemplarisch angewandt (Tabelle 15, S. 45).



**Abbildung 21: 16S-rDNA-Stammbaum nach Maximum-Likelihood-Methode**

Radialer phylogenetischer Stammbaum auf der Grundlage von 16S rDNA. Die Topologie basiert auf Sequenzlängen von ca. 1240 nt, die mit dem Primer-Paar F-99-GSB/R-1369 erhalten (eigene Daten) oder darauf zugeschnitten wurden (Sequenzen von EMBL-EBI). Die Berechnung wurde mit der Maximum-Likelihood-Methode (Felsenstein 1981) durchgeführt. Rote Linien verbinden salzbedürftige Arten. Bootstrap-Werte sind prozentual. Die Maßangabe kennzeichnet die phylogenetische Distanz.

Die allgemeine Topologie des 16S-rDNA-Stammbaumes in Abbildung 21 ist identisch zu den mit der Distanz-Matrix-Methode berechneten Stammbäumen (z.B. Abbildung 17 oben, S. 74). Darüber hinaus sind die ermittelten Distanzen (Zweiglängen) beider Methoden sehr ähnlich.

Letzteres gilt genauso für den *fmoA*-Maximum-Likelihood-Stammbaum in Abbildung 22, verglichen mit dem nach der Standardmethode erhaltenen Ergebnis (z.B. Abbildung 17 unten, S. 74). Die Topologie ist nahezu übereinstimmend, allerdings weicht sie an der schon mehrfach diskutierten Stelle um die beiden Typenstämme *Chlorobium phaeobacteroides* DSM 266<sup>T</sup> und *Pelodictyon phaeoclathratiforme* DSM 5477<sup>T</sup> etwas ab. So liegen bei dem *fmoA*-Stammbaum, der mit der Distanz-Matrix-Methode errechnet wurde, die Sequenzen der Gruppe 3 näher beieinander, verglichen mit dem der Maximum-Likelihood-Berechnung.

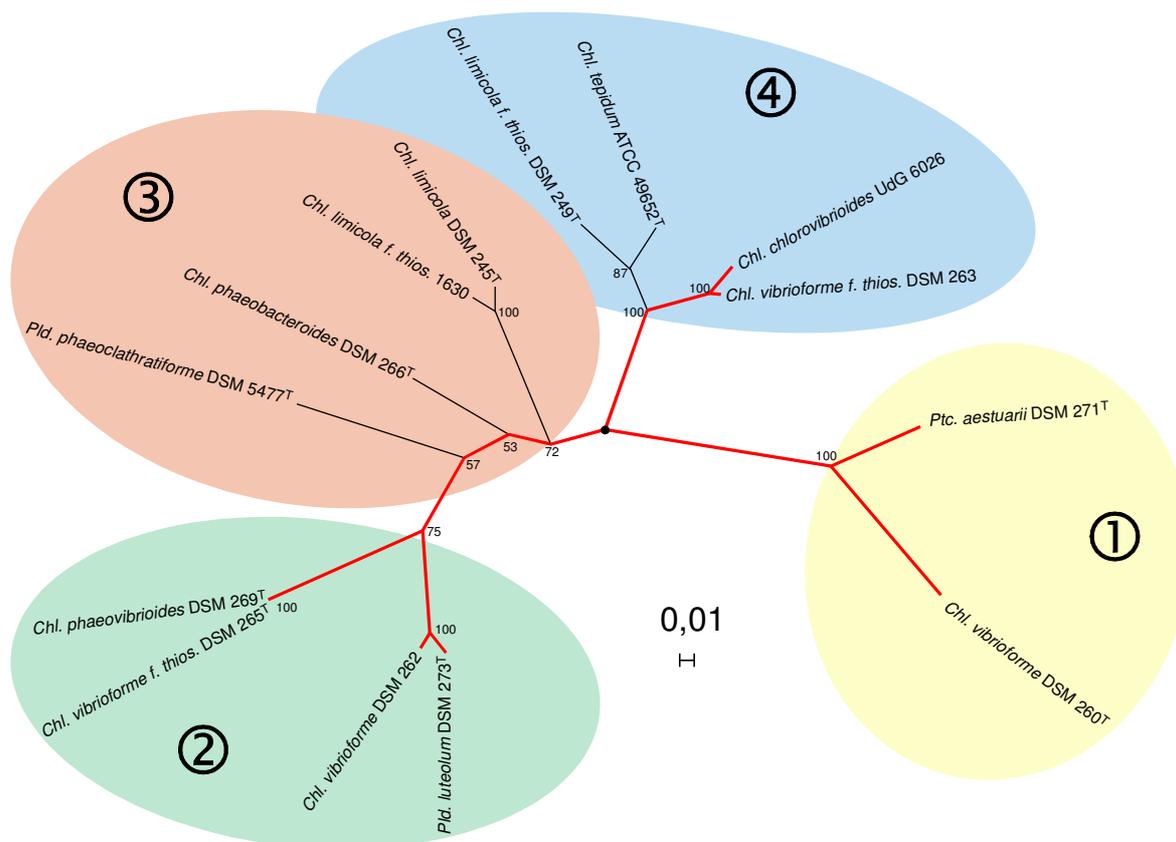


Abbildung 22: *fmoA*-Stammbaum nach Maximum-Likelihood-Methode

Radialer phylogenetischer Stammbaum auf der Grundlage von *fmoA*-Sequenzen. Die Topologie basiert auf Sequenzlängen von ca. 875 nt, die mit dem Primer-Paar F-Start-fmo/R-889-fmo erhalten (eigene Daten) oder darauf zugeschnitten wurden (Sequenzen von EMBL-EBI). Die Berechnung wurde mit der Maximum-Likelihood-Methode (Felsenstein 1981) durchgeführt. Rote Linien verbinden salzbedürftige Arten. Bootstrap-Werte sind prozentual. Die Maßangabe kennzeichnet die phylogenetische Distanz.

## 9 ANALYSE AUSGEWÄHLTER SALZHALTIGER STANDORTE

Nachdem für die Untersuchung der Reinkulturen die Methoden entwickelt und angewendet wurden, konnten verschiedene Umweltproben (Kapitel 2.3, S. 17) analysiert werden. Diese kamen aus der westlichen Ostsee, aus einem mit der Adria verbundenen See in Kroatien, von der Atlantikküste der USA sowie im selben Land aus dem Tümpel Bad Water im Death Valley.

Tabelle 28: Isolierte und komplett<sup>102</sup> sequenzierte DNA-Fragmente aus Umweltproben<sup>103</sup>

Gewässer <sup>104</sup>	Probe	MHG <sup>105</sup>	16S	<i>fmoA</i>	Acc. Nr. <sup>106</sup>	
Adria	Cviic-2	MHG-1	K-13 <sup>R</sup> K-69		AJ428420 AJ428421	
		MHG-2		K-1011 <sup>R</sup> K-1079	AJ428448 AJ428450	
		MHG-3		K-1027a <sup>R</sup>	AJ428449	
Bad Water	BW-4	MHG-4	K-902 <sup>R</sup> K-974		AJ428433 AJ428434	
Atlantik	Sip-4	MHG-5	K-706 <sup>R</sup> K-721		AJ428431 AJ428432	
		MHG-6	K-701 <sup>R</sup>		AJ428430	
		MHG-7	K-790 <sup>R</sup>		AJ428454	
		MHG-8		K-802 <sup>R</sup> K-839	AJ428446 AJ428447	
	SSM-3	MHG-9	K-100 <sup>R</sup>		AJ428422	
		MHG-10	K-101 <sup>R</sup>		AJ428423	
		MHG-11	K-106 <sup>R</sup>		AJ428424	
		MHG-12	K-108 <sup>R</sup>		AJ428425	
		MHG-13	K-137 <sup>R</sup>		AJ428426	
		MHG-14	K-153 <sup>R</sup>		AJ428427	
		MHG-15		K-303 <sup>R</sup> K-311 K-351	AJ428435 AJ428437 AJ428438	
		MHG-16		K-307 <sup>R</sup>	AJ428436	
		MHG-17		K-354 <sup>R</sup>	AJ428439	
	Ostsee	Laboe-3	MHG-18	K-500 <sup>R</sup>		AJ428429
			MHG-19		K-600 <sup>R</sup> K-635 K-683 K-686	AJ428442 AJ428443 AJ428444 AJ428445
		Stak-2	MHG-20		K-455 <sup>R</sup> K-400	AJ428441 AJ428440
		Stein-1	MHG-21	K-207 <sup>R</sup>		AJ428428
MHG-22			K-249 <sup>R</sup>		AJ428451	
MHG-23			K-273 <sup>R</sup>		AJ428452	
MHG-24			K-298 <sup>R</sup>		AJ428453	

Die Proben waren sowohl von ihrer geographischen Lage ( verschiedene Kontinente) als auch der Art des Gewässers (Brackwasser bis Salzsee) sehr unterschiedlich und boten damit einen repräsentativen Überblick. Sie wurden nach der Entnahme nicht normiert weiterbehandelt, sondern es wurden verschiedene Methoden angewandt und getestet, um systematische Fehler zu vermeiden (Tabelle 3, S. 19). Außerdem war vor Probenahme noch nicht bekannt, welche Verarbeitung sich für die nachfolgenden Analysen am besten eignen würde.

<sup>102</sup> „Komplett“ bedeutet, dass das gesamte Amplifikat (1260 nt bei der 16S bzw. 875 nt beim *fmoA*) aus dem Klonierungsergebnis sequenziert wurde, im Gegensatz zum Screening (nur 400-450 nt).

<sup>103</sup> Eine Übersicht aller durch die Screening-Sequenzierung erhaltenen Ergebnisse und die Basenunterschiede (Mikroheterogenität) findet sich im Anhang (Kapitel 15, S. 145)

<sup>104</sup> vgl. Abbildung 5, S. 18

<sup>105</sup> Das hochgestellte „R“ weist die Referenzsequenz einer Mikroheterogenitätsgruppe (MHG) aus (Tabelle 40, S. 145)

<sup>106</sup> Zugangsnummer der Datenbank EMBL-EBI, z.B. über SRS (Sequence Retrieval System), URL 11, S. 154

Von der Mehrheit der Proben konnten schließlich sowohl 16S-rDNA- als auch *fmoA*-Sequenzen erhalten werden, bei manchen allerdings nur jeweils die eine oder die andere Art (Tabelle 28). Die Bezeichnung der durch Klonierung erhaltenen Sequenzen haben in den meisten Fällen<sup>107</sup> die Reihenfolge: Gewässer Probe Klon-Nr. (z.B. Ostsee Laboe-3 K-500), wobei das Gewässer den Standort charakterisiert, der zweite Teil ist die Bezeichnung für die Umweltprobe, die genommen wurde, und am Schluss steht die Nummer des Bakterienklons, aus dem die Sequenz bestimmt wurde (Kapitel 3.5, S. 30). Neben den hier dargestellten Standorten wurden auch noch weitere untersucht, wobei in diesen jedoch keine 16S-rDNA- bzw. *fmoA*-Fragmente grüner Schwefelbakterien nachgewiesen werden konnten. Das Ergebnis einer solchen Probe aus einem mit dem Mittelmeer verbundenen Salzsee (PSA-1) sowie eine Auswertung aller gefundenen Sequenzen, die nicht zu den grünen Schwefelbakterien gerechnet werden konnten, wird gesondert dargestellt (Kapitel 9.6, S. 98).

## 9.1 PHYLOGENIE DER UMWELTSEQUENZEN (16S rDNA)

Zur Amplifikation von 16S-rDNA-Fragmenten aus Umweltproben wurde wie bei den Reinkulturen der spezifische Primer F-99-GSB eingesetzt. Der zweite jedoch wurde durch den eubakteriellen Primer R-1388 ersetzt (Tabelle 7, S. 28). Mit diesem Paar konnten Amplifikatlängen von ca. 1260 nt Länge<sup>108</sup> erzielt werden. Für das Alignment wurden sie allerdings passend zu den in dieser Arbeit sequenzierten 16S-rDNA-Reinkulturfragmenten auf ca. 1240 nt gekürzt.

Ein ganz entscheidender Unterschied in den PCR-Bedingungen für Reinkultur- und Umweltproben ist die Spezifität. Für erstere ist es gerade bei der allgemein prokaryontisch vorkommenden 16S rDNA von entscheidender Bedeutung, dass Primer nur an den Stellen auf der DNA binden, für die sie konstruiert wurden, damit keinerlei Verunreinigungen amplifiziert werden. Eine solche Fehl-amplifikation, auch wenn sie am Endprodukt nur einen geringen Anteil hat, kann im Agarose-Gel nicht erkannt werden, wenn die Menge zu gering ist oder die Größe mit der erwarteten übereinstimmt. In einer nachfolgenden Sequenzierung würde aus dem Gemisch ein schlechtes bis unbrauchbares Ergebnis erzielt werden, weil Basen nicht eindeutig bestimmt würden. Unter Umständen könnte auch eine Chimäre<sup>109</sup> entstehen. Deshalb wurden für die Amplifikation aus Reinkulturen sehr spezifische PCR-Bedingungen gewählt<sup>110</sup>.

Das Problem kann allerdings auch durch eine Klonierung umgangen werden, die in der vorliegenden Arbeit aber nur für die Umweltproben angewandt wurde. Dabei werden aus Fragmentgemischen einzelne Moleküle separiert, die durch Vermehrung der Klonierungsbakterien vervielfacht und schließlich aus diesen mit einer PCR amplifiziert werden. Somit war es kein Problem, ein reines Ergebnis bei der Sequenzierung zu erhalten, obwohl in einer Umweltprobe eine Vielzahl verschiedener 16S-rDNA-Typen enthalten sind.

<sup>107</sup> Eine Ausnahme stellt die Bezeichnung der Sequenzen im Phenogramm zur Detaildarstellung der Mikroheterogenitätsgruppen dar. Hier wurde zur besseren Vergleichbarkeit nur die MHG und Klonnummer angeführt.

<sup>108</sup> ohne Primer-Bereiche

<sup>109</sup> In diesem Zusammenhang bedeutet „Chimäre“, dass durch eine Fragmentmischung im Ausgangsprodukt eine Pseudo-Sequenz gemessen wird, die nicht nur punktuell Basen des nicht erwünschten Amplifikats aufweist sondern ganze Abschnitte.

<sup>110</sup> [1] Touchdown-PCR [2] möglichst hohe Annealingtemperatur (57 °C) [3] möglichst wenige Zyklen (Tabelle 4, S. 24)

Im Gegenteil war es die Absicht, mit den Primern möglichst auch bisher unbekannte Arten einzubeziehen. Dabei musste eine Gratwanderung gemacht werden, weil die PCR-Bedingungen einerseits nicht zu unspezifisch sein durften, damit nicht zu viele 16S-rDNA-Fragmente aus nur sehr weitläufig verwandten Arten amplifiziert wurden. Andererseits sollte auch mit den auf bekannten GSB-Arten basierenden Primern nicht nur der *Status quo* der bestehenden Forschung verifiziert werden.

Deshalb wurde für die Amplifikation der 16S rDNA nur ein einziger gruppenspezifischer Primer (F-99-GSB) gewählt, während der andere für alle Eubakterien passen sollte. Dieser wiederum sollte zwar gut zu den bisher bekannten grünen Schwefelbakterien passen, aber durch die Wahl der PCR-Bedingungen auch leichte Sequenzvariationen an der Bindungsstelle akzeptieren, die bei entfernter verwandten GSB-Arten vorkommen könnten.

Diese Bedingungen sind in Tabelle 5 (S. 25) aufgeführt. Die Kombination aus Annealingtemperatur und Zyklenzahl wurde durch vielfaches Ausprobieren gewählt. Dabei wurde zuerst mit einer sehr niedrigen Temperatur (45°C) und vielen Zyklen (35) begonnen, so dass bei der nachfolgenden Kontrolle im Agarose-Gel zwar ein starkes Hauptprodukt, aber auch Nebenbanden auftauchten. Danach wurde die Temperatur schrittweise erhöht (auf 48-60°C, je nach Probe), bis diese Nebenbanden verschwanden, um schließlich dann noch die Anzahl der Zyklen so weit zu reduzieren (auf 35-25, je nach Probe), dass das erwartete Produkt gerade noch in ausreichender Menge vorhanden war.

Ein gutes Klonierungsergebnis war aus den so gewonnenen Ausgangsprodukten *per definitionem* dann erzielt, wenn in den 100 untersuchten Klonen je Probe möglichst wenige Fehlamplifikate<sup>111</sup> vorkamen und ein paar Sequenzen nicht von grünen Schwefelbakterien stammten. Damit wurde sichergestellt, dass die Amplifikationsbedingungen nicht zu spezifisch waren und theoretisch vorhandene unbekannte GSB-Arten auch hätten erfasst werden können. Dies war bei folgenden Proben der Fall (die Zahl der 16S-rDNA-Sequenzen aus Nicht-GSB-Arten steht in Klammern): BW-4 [7], Sip-4 [9], SSM-3 [1], Laboe-3 [11]. Bei Stein-1 hingegen tauchten sehr viele 16S-rDNA-Sequenzen anderer Arten auf [67] und bei Cviic-2 keine einzige (Tabelle 40 ff., S. 145 ff.). Diese werden in Kapitel 9.6 (S. 98) noch gesondert dargestellt.

### 9.1.1 Stammbaumdarstellung mit 16S-rDNA-Umweltsequenzen

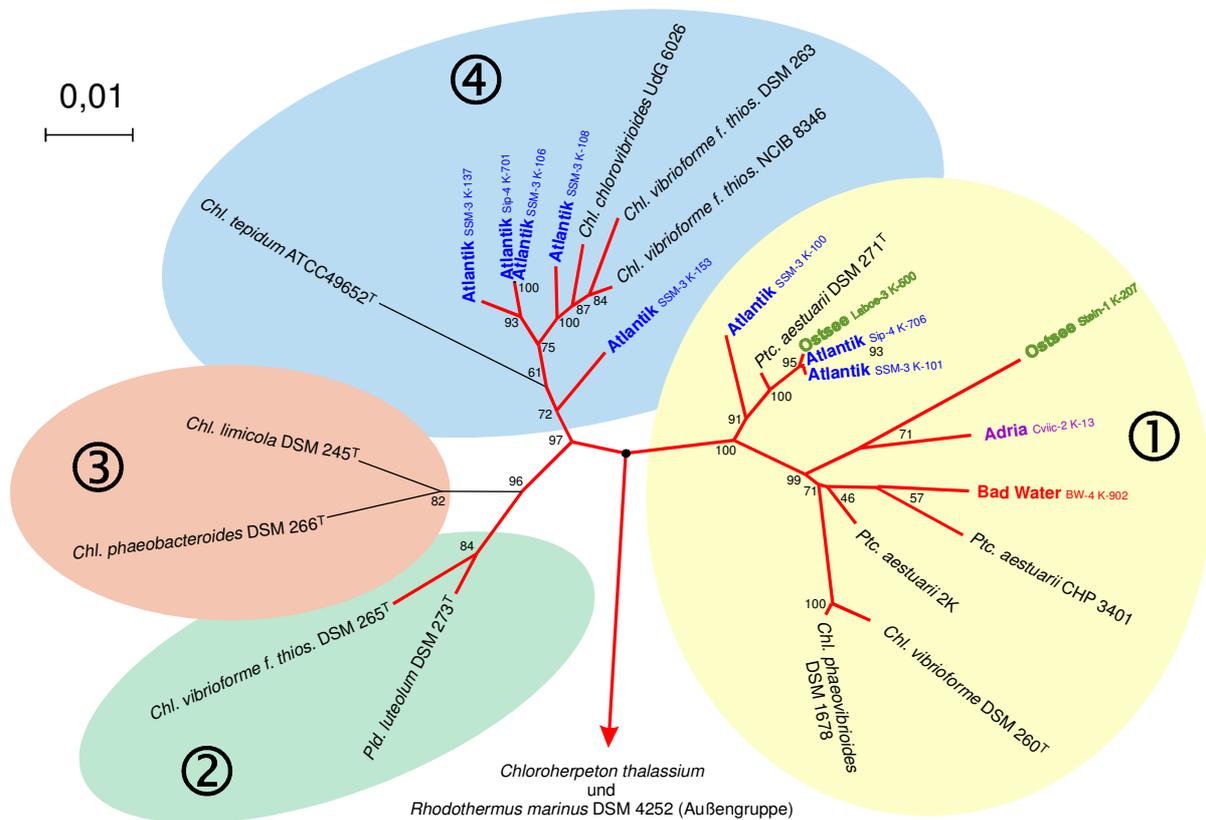
Nach der Charakterisierung der Gruppen aus Reinkultursequenzen wurde davon eine geeignete Auswahl getroffen und zusammen mit den repräsentativen Umweltsequenzen<sup>112</sup> phylogenetische Berechnungen nach der Distanz-Matrix-Methode basierend auf dem Algorithmus von Jukes & Cantor (1969) durchgeführt.

---

<sup>111</sup> Sequenzen, die nicht aus dem erwarteten Bereich der 16S rDNA stammten.

<sup>112</sup> In dieser Arbeit als Referenzsequenzen der Mikroheterogenitätsgruppen bezeichnet (Tabelle 28, S. 82 mit einem hochgestellten „R“ gekennzeichnet).

Jede Umweltsequenz wurde vorher gegen die prokaryontische Datenbank verglichen, um sicherzustellen, dass die nächstverwandten Sequenzen aus dem Bereich der grünen Schwefelbakterien stammen (Kapitel 5.2, S. 42)<sup>113</sup>.



**Abbildung 23: 16S-rDNA-Phylogenie der Umweltsequenzen innerhalb der Gruppen 1-4**

Radialer phylogenetischer Stammbaum auf der Grundlage von 16S rDNA. Die Topologie basiert auf Sequenzlängen von ca. 1240 nt, die mit den Primer-Paaren F-99-GSB/R-1369 bzw. F-99-GSB/R-1388 erhalten (eigene Daten) oder darauf zugeschnitten wurden (Daten von EMBL-EBI). Die Berechnungen wurden mit der Distanz-Matrix-Methode durchgeführt (basierend auf dem Algorithmus von Jukes & Cantor 1969). Rote Linien verbinden salzbedürftige Arten. Bootstrap-Werte sind prozentual. Die Maßangabe kennzeichnet die phylogenetische Distanz. Umweltsequenzen sind jeweils Repräsentant einer MHG.

Das Programm Fasta3 stellte beim Datenbankabgleich der meisten Umweltsequenzen fest, dass die Sequenz eindeutig mit der 16S rDNA von grünen Schwefelbakterien in Verbindung gebracht werden konnte. Das bedeutete, dass die Identität ausreichend hoch war und die Ergebnisliste nur Chlorobiaceae auf den ersten Positionen aufwies. Diese Resultate waren durchweg signifikant ( $E < e^{-12}$ ) und mit den Repräsentanten der Mikroheterogenitätsgruppen (MHG, Kapitel 9.1.2, S. 87) wurde der phylogenetische Stammbaum in Abbildung 23 erstellt. In den seltenen restlichen Fällen

<sup>113</sup> Die Fasta3-Recherche ist während der Anfertigung dieser Arbeit gemacht worden. Deren Ergebnisse können sich selbstverständlich ändern, da die Datenbank kein statisches Archiv ist sondern ständiger Aktualisierung unterworfen ist.

wurden die Sequenzen ausschließlich anderen Bakteriengruppen in der Datenbank zugeordnet (Kapitel 9.6, S. 98).

Die größte Sequenzdiversität wurde in den beiden Atlantikproben Sip-4 und SSM-3 gefunden, die den gleichen Standort an der Ostküste der USA repräsentieren (Sippewissett). Jede Probe enthielt hauptsächlich Sequenzen, die mit (Gruppe 1) sehr nahe verwandt sind (Atlantik Sip-4 K-706 und SSM-3 K-101). Bei ersterer war die Häufigkeit<sup>114</sup>  $H = 84/88$  und bei letzterer Probe  $H = 61/92$  (Tabelle 42 f., S. 147 f.). Die Similarität zu diesem Typenstamm betrug bei beiden 99,4 %. Eine etwas entfernter verwandte Umweltsequenz ist Atlantik SSM-3 K-100 (Si = 98,2 % zu *Prosthecochloris aestuarii* DSM 271<sup>T</sup>), die nur ein einziges Mal vorkam ( $H = 1/92$ ). Der niedrigste Similaritätswert der Gruppe 1 beträgt 94,6 %.

Die restlichen Atlantikproben reihten sich in der salzbedürftigen Untergruppe von 4 ein, wobei Atlantik SSM-3 K-106 ( $H = 16/92$ ) der einen Probe nahezu identisch zu Atlantik Sip-4 K-701 ( $H = 3/88$ ) der anderen war. Die Häufigkeit der übrigen ist  $2/92$  bei Atlantik SSM-3 K-137,  $11/92$  bei Atlantik SSM-3 K-108 und  $1/92$  bei Atlantik SSM-3 K-153. Die Similarität der Umweltsequenzen in Gruppe 4 zu der für alle am nächsten liegenden Reinkultur *Chlorobium vibrioforme f. thiosulfatophilum* NCIB 8346 reicht von Si = 96,2-98,8 %<sup>115</sup>. Insgesamt ist bei dieser Untergruppe  $S_{\min} = 95,3$  %.

Aus den Ostseeproben konnten zwei deutlich unterschiedliche MHG isoliert werden, deren Referenzsequenzen Ostsee Laboe-3 K-500 und Ostsee Stein-1 K-207 sind und in der marinen/hypersalinen Gruppe 1 stehen. Ihre jeweiligen Häufigkeiten<sup>116</sup> sind ganz verschieden ( $H = 84/84$  bzw.  $3/7$ ). In letzterer Probe wurden insgesamt nur sehr wenige 16S-rDNA-Sequenzen grüner Schwefelbakterien nachgewiesen. Ostsee Laboe-3 K-500 ist fast identisch zu den oben angeführten beiden Atlantikproben, die eine hohe Similarität zu *Prosthecochloris aestuarii* DSM 271<sup>T</sup> haben, während Ostsee Stein-1 K-207 keinen nah verwandten Vertreter aus den Reinkulturen aufweisen kann (Si ca. 95-96 %).

Aus einem kroatischen Insel-Salzsee, verbunden mit der Adria, wurden vor Jahrzehnten Proben entnommen und im Labor aufbewahrt. Aus einer davon (Cviic-2) wurde DNA isoliert und 16S-rDNA-Sequenzen konnten amplifiziert werden<sup>117</sup> (Referenzsequenz Adria Cviic-2 K-13). Letztlich waren aber alle sehr ähnlich und wurden zu einer einzigen MHG zusammengefasst ( $H = 34/34$ ). Adria Cviic-2 K-13 hat keine nah verwandte Sequenz in Gruppe 1 und die Reinkulturen besitzen zu ihr eine Similarität von ca. 96-97 %.

Eine weitere Probe wurde im amerikanischen Nationalpark Death Valley aus dem salzigen Tümpel Bad Water genommen. Das ist der einzige der untersuchten Standorte, der nicht marin war oder eine Verbindung zum Meer hatte. Auch hier konnte allerdings wieder nur eine MHG aus den 77 16S-rDNA-Sequenzen gebildet werden ( $H = 77/77$ ), das heißt, die Identität der Screening-Sequenzen war größer als ca. 99 %<sup>118</sup>. Die Referenzsequenz ist Bad Water BW-4 K-902 (Gruppe 1) und die nächstverwandten 16S rDNA sind die von *Prosthecochloris aestuarii* CHP 3401 und 2K mit Si = 97,8 % bzw. 97,0 %,

<sup>114</sup> Die erste Zahl der Häufigkeit gibt alle in einer MHG befindlichen Sequenzen an; die zweite alle in einer Probe gefundenen 16S-rDNA-Sequenzen grüner Schwefelbakterien.

<sup>115</sup> In der diesen Si-Werten zugrunde liegenden Distanz-Matrix (Tabelle 34, S. 139) sind auch Sequenzen enthalten, die aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in die Berechnung des Umwelt-Baumes aufgenommen wurden. Da es sich also hierbei um eine unabhängige Berechnung handelt, können leichte Unterschiede zu den im Baum dargestellten Distanzen auftreten.

<sup>116</sup> Tabelle 45/Tabelle 46 auf S. 150/151

<sup>117</sup> Tabelle 40, S. 145

<sup>118</sup> auf die Screening-Länge von 400-450 nt bezogen

wobei ersterer Stamm ebenfalls aus einem hypersalinen Binnengewässer isoliert wurde (Vila *et al.* 2002).

Es wurden erwartungsgemäß keinerlei Sequenzen gefunden, die mit den limnischen Vertretern der grünen Schwefelbakterien gruppieren; weder in Gruppe 3 noch im Bereich der Süßwasser-Arten von Gruppe 4 um *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup>. Allerdings tauchte auch kein Verwandter der salzbedürftigen Gruppe 2 oder von *Chloroherpeton thalassium* (Gruppe 5) auf.

Insgesamt bestätigte sich die Tendenz, die schon bei den Reinkulturen zu erkennen war, dass die Gruppe 1 einen separaten Zweig innerhalb der GSB darstellt, eine sehr hohe Sequenzvariabilität besitzt und damit wohl eine große Diversität aufweist. Die salzbedürftigen Arten (und die marinen Umweltsequenzen) um *Chlorobium chlorovibrioides* UdG 6026 (Gruppe 4) liegen dagegen eher dicht beieinander und bilden wahrscheinlich eine Untergruppe.

Die Bootstrap-Werte sind meist größer als  $B = 71$ , lediglich an der Verzweigung von *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup> ( $B = 61$ ) sowie *Prosthecochloris aestuarii* CHP 3401 und 2K ( $B = 57$  bzw. 46) treten etwas niedrigere auf.

### 9.1.2 Mikroheterogenität der 16S-rDNA-Umweltsequenzen

Bei der Klonierung einer Umweltprobe, die im Vergleich zu der Anzahl der untersuchten Klone eine geringe Variabilität im gesuchten Sequenz-Bereich aufweist, ist es normal, dass man vielfach dieselbe Sequenz analysiert wie z.B. in Tabelle 41 (S. 146) ersichtlich. Die Sequenz aus Klon K-902 kam 46 Mal vor und wurde damit als Referenzsequenz bezeichnet.

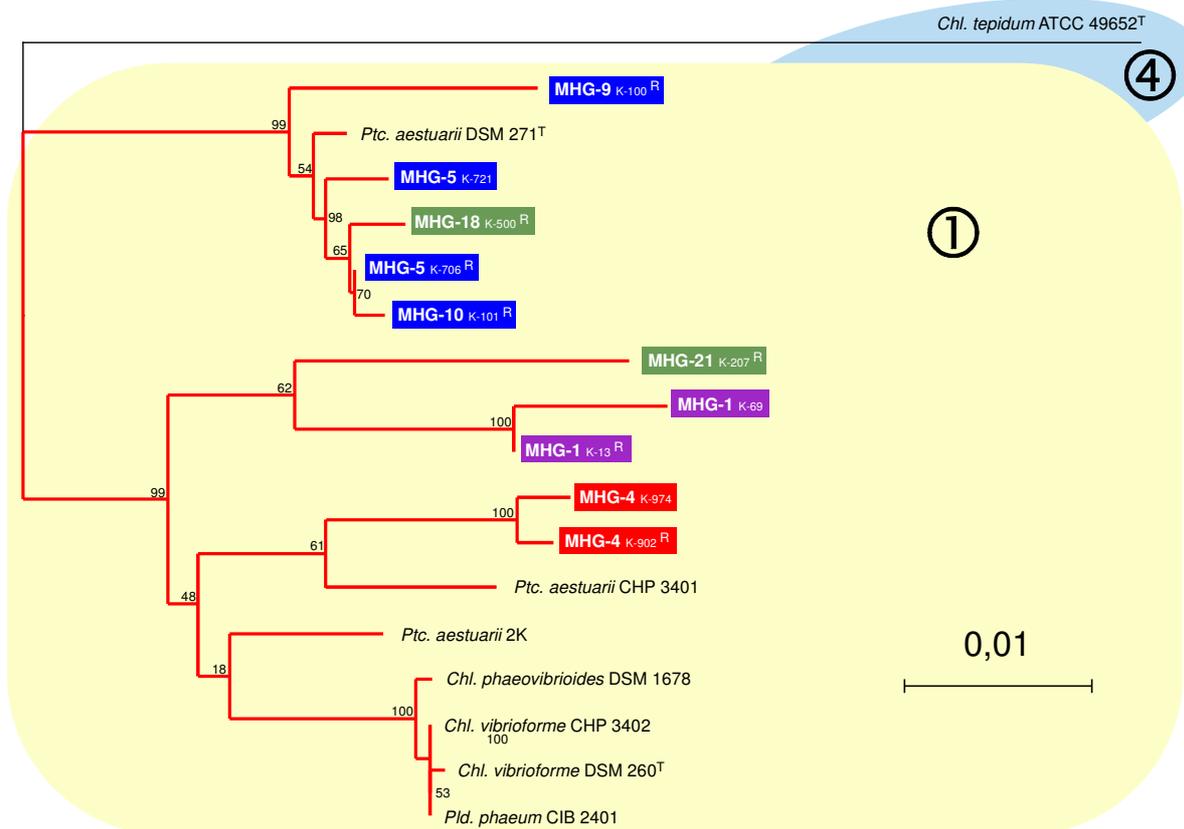
Das Vorkommen der gleichen Sequenz in vielen Klonen (Häufigkeit) repräsentiert oft auch deren vorherrschende Präsenz in der Umweltprobe. Eine unterrepräsentierte Sequenz kann aber auch durch die PCR bevorzugt amplifiziert werden, weil die Primer besser greifen als bei der häufiger vorkommenden (PCR als semiquantitative Methode).

Ob eine Sequenz aus einem Klon identisch oder ähnlich zu einer anderen ist, wurde allerdings nicht durch die vollständige Sequenzierung erreicht. Weil dieses einen unverhältnismäßigen Aufwand bedeutet hätte, wurden zwei Voruntersuchungen gemacht: die Screening-PCR und Screening-Sequenzierung (Kapitel 3.5.4 *f.*, S. 33 *f.*). Bei ersterer wurden die nicht erwarteten Amplifikatlängen im Agarose-Gel aussortiert und bei letzterer jeweils eine einzige Sequenzierung durchgeführt, die ca. 400-450 nt lieferte und einen hypervariablen Bereich enthielt. Diese wurden dann in einem Alignment manuell verglichen und die Basenunterschiede gezählt.

Sequenzen, die sich dann um weniger als ca. 1 % der Nukleotide unterschieden (ca. 4-5 nt auf 400-450 nt Screening-Länge) wurden *per definitionem* zu Mikroheterogenitätsgruppen (MHG) zusammen genommen. Innerhalb einer MHG wurden die einzelnen Nukleotid-Unterschiede zu der Sequenz gezählt, die am häufigsten identisch vorkam<sup>119</sup>. Voll sequenziert wurden schließlich diese Referenzsequenzen und zusätzlich eine kleine Auswahl an anderen deutlich unterschiedlichen

<sup>119</sup> mit hochgestelltem „R“ als Referenzsequenz in Tabelle 40 *ff.*, S. 145 *ff.* gekennzeichnet

Sequenzen aus derselben MHG. In Abbildung 24 sind diese in einem Phenogramm dargestellt, um einen Eindruck von deren Distanz zu vermitteln und zu zeigen, dass die manuell ermittelten Ergebnisse für die kurzen Sequenzabschnitte repräsentativ genug waren. Die Abgrenzung der Mikroheterogenität von Amplifikations- bzw. Sequenzierfehlern wird in der Diskussion in Kapitel 12 (S. 119) vorgenommen.



**Abbildung 24: Mikroheterogenität der 16S-rDNA-Umweltsequenzen in der marinen/hypersalinen Gruppe 1**

Auf *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup> wurzelnder phylogenetischer Stammbaum auf der Grundlage von 16S rDNA. Die Topologie basiert auf Sequenzlängen von ca. 1240 nt, die mit den Primer-Paaren F-99-GSB/R-1369 bzw. F-99-GSB/R-1388 erhalten (eigene Daten) oder darauf zugeschnitten wurden (Daten von EMBL-EBI). Die Berechnungen wurden mit der Distanz-Matrix-Methode durchgeführt (basierend auf dem Algorithmus von Jukes & Cantor 1969). Rote Linien verbinden salzbedürftige Arten. Bootstrap-Werte sind prozentual. Die Maßangabe kennzeichnet die phylogenetische Distanz. Umweltsequenzen eines Gewässers sind mit derselben Farbe hinterlegt (Atlantik, Ostsee, Adria, Bad Water).

Die Umweltproben in Abbildung 24 sind nicht mit der sonst üblichen Bezeichnung Gewässer Probe Klon-Nr. sondern zur besseren Vergleichbarkeit mit MHG-Nr. Klon-Nr. angegeben. Drei Beispiele der Varianz innerhalb einer Mikroheterogenitätsgruppe bestätigen die Kriterien, die für den kurzen Auswahlabschnitt (400-450 nt) angewandt wurden (Identität *per def.* > 99 %), indem sie zeigen, dass letztendlich die Similarität der zugehörigen Vollsequenzen (ca. 1240 nt) auch größer als 99 % ist. Das sind

MHG-5 K-706<sup>R</sup> und K-721 (Si = 99,7 %), MHG-1 K-13<sup>R</sup> und K-69 (Si = 99,4 %) sowie MHG-4 K-902<sup>R</sup> und K-974 (Si = 99,5 %).<sup>120</sup> Während die Referenzsequenzen in einer Probe *per definitionem* sehr häufig vorkamen (Tabelle 40 ff., S. 145 ff.), waren die Sequenzen von K-721, K-69 und K-974 jeweils nur ein einziges Mal vertreten. Das bedeutet, die Kombination der wenigen Basen, die den Unterschied zur Referenzsequenz ausmachten (3-4 nt pro 400-450 nt), wurde bei keiner anderen Screening-Sequenz innerhalb der zugehörigen MHG gefunden.

## 9.2 PHYLOGENIE DER UMWELTSEQUENZEN (*fmoA*)

Der allgemeine Unterschied der PCR-Spezifität bei den Amplifikationen aus Reinkulturen bzw. Umweltproben wurde schon in Kapitel 9.1 behandelt. Im Gegensatz zu der Amplifikation von 16S rDNA, bei der ein GSB-spezifischer mit einem eubakteriellen Primer kombiniert wurde, mussten im Falle vom *fmoA*, das nur bei grünen Schwefelbakterien vorkommt, zwei spezifische Primer eingesetzt werden (Primer-Paar F-Start-fmo/R-889-fmo). Diese erzielten bei den Reinkulturen gute Ergebnisse.

Bei den aus Umweltproben zu amplifizierenden *fmoA*-Sequenzen kam es nicht darauf an, die Spezifität durch die Amplifikationsbedingungen zu lockern (z.B. durch Herabsetzung der Annealingtemperatur), weil der in die PCR einzusetzende Primer aus einem Oligonukleotid-Gemisch mit definierten Basenunterschieden bestand (Kapitel 7.2, S. 49). Diese Erweiterung der Spezifität war schon deshalb nötig, weil die Primer lediglich auf Grundlage von zwei *fmoA*-Sequenzen erstellt werden mussten, und natürlich nicht nur diese Arten amplifiziert werden sollten.

Das Problem, das bei der 16S rDNA auftreten kann, nämlich zu viele GSB-fremde Sequenzen zu amplifizieren, die nicht aufgrund ihrer Länge im Agarose-Gel erkannt werden können, ist beim *fmoA* nicht gegeben, weil dieses ausschließlich bei grünen Schwefelbakterien vorkommt. Es ist zwar nicht gänzlich zu verhindern, dass die *fmoA*-Primer auch an anderen Stellen binden, jedoch ist die Wahrscheinlichkeit geringer, dass ein Fehlamplifikat mit der erwarteten Länge entsteht, als bei der 16S rDNA. Solche Fehlamplifikationen konnten bei der Kontrolle der PCR-Produkte, die in die Klonierung eingesetzt werden sollten, im Agarose-Gel als Nebenbanden erkannt und durch Variation der PCR-Bedingungen reduziert werden. Fehlsequenzen, die später aus einigen Klonen ermittelt wurden, waren deshalb hauptsächlich auf Amplifikate zurückzuführen, deren Bande im Agarose-Gel ungefähr auf Höhe der erwarteten *fmoA*-Sequenzen lag, und somit im für die Klonierung eingesetzten gemischten PCR-Produkt nicht erkennbar waren.

Um die Spezifität trotzdem etwas zu lockern, wurde aber auf das bei den Reinkultur-PCR angewandte Touchdown-Verfahren verzichtet. Auf der anderen Seite wurde durch vielfaches Ausprobieren die beste Kombination aus Annealingtemperatur und Zyklenzahl bestimmt (Tabelle 5, S. 25), um eine ausreichende Menge an erwartetem PCR-Produkt ohne im Agarose-Gel sichtbare Nebenbanden zu erhalten. Solche in den meisten Fällen aus kurzen Fragmenten bestehenden Nebenbanden würden

<sup>120</sup> In der diesen Si-Werten zugrunde liegenden Distanz-Matrix (Tabelle 34, S. 139) sind auch Sequenzen enthalten, die aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in die Berechnung des MHG-Baumes aufgenommen wurden. Da es sich also hierbei um eine unabhängige Berechnung handelt, können leichte Unterschiede zu den im Baum dargestellten Distanzen auftreten.

sonst bei der Ligation bevorzugt in den Vektor eingebaut und würden zu einer hohen Anzahl an Fehlsequenzen bei der Analyse der einzelnen Klone führen.

Die oben genannten Banden im Agarose-Gel bei der Screening-PCR nach der Klonierung, die ungefähr auf der Höhe des erwarteten *fmoA*-Amplifikats angesiedelt waren (Unterschiede bis ca. 100 nt über oder unter der erwarteten Größe), wurden schließlich auch in die nachfolgende Screening-Sequenzierung einbezogen, weil es sich hierbei um *fmoA*-Fragmente unbekannter grüner Schwefelbakterien mit größeren Deletionen oder Insertionen hätte handeln können.

Beim Datenbankabgleich mit Fasta3 tauchte allerdings in keinem dieser Fälle eine dem *fmoA* nur im entferntesten verwandte Sequenzgruppe auf. Es wurden lediglich Ähnlichkeiten mit völlig anderen Genombereichen unterschiedlichster Prokaryonten außerhalb der Gruppe grüner Schwefelbakterien gefunden.

### 9.2.1 Stammbaumdarstellung mit *fmoA*-Umweltsequenzen

Für eine übersichtliche Stammbaumdarstellung wurde eine Auswahl an Vertretern der Reinkulturen getroffen, die vor allem die beiden Bereiche repräsentierten, in welchen sich die Umwelt-Referenzsequenzen<sup>121</sup> einordneten (Gruppe 1 und 4). Insgesamt betrachtet wurden keine *fmoA*-ähnlichen Sequenzen außerhalb der Gruppen 1-4 der grünen Schwefelbakterien gefunden.

Die Fasta3-Suche in der prokaryontischen Datenbank von EMBL-EBI ergab für alle *fmoA*-Screening-Sequenzen, die letztendlich ausgewählt wurden (Tabelle 40 ff., S. 145 ff.) eine eindeutige Zuordnung zu den grünen Schwefelbakterien. Die Liste der Übereinstimmungen wurde immer von Chlorobiaceae angeführt, wobei mit ausreichend hoher Sicherheit ( $E < e^{-12}$ ) ein Zufallsergebnis ausgeschlossen werden konnte. Die Identität der eingegebenen Umweltsequenzen mit den *fmoA*-Genen der besten Übereinstimmungen (also der Arten, die ganz oben auf der Liste waren) betrug ca. 83-89 %<sup>122</sup> und zwar auf der ganzen Länge des zu überprüfenden DNA-Fragments (400-450 nt).<sup>123</sup>

Alle weiter unten in der Liste befindlichen Nicht-Chlorobiaceae waren nicht signifikant verwandt. Sie hatten demnach größere *E*-Werte (= kleinere Wahrscheinlichkeit einer signifikanten Übereinstimmung) sowie niedrigere Prozentzahlen bei der Identitätsangabe. Vor allem aber wurde nur für einen kurzen Bereich der Nukleotidsequenz (70-150 nt) diese Pseudo-Übereinstimmung in der Datenbank gefunden (= kleiner Überlappungsbereich, Kapitel 5.2, S. 42). Somit wurde also noch vor der phylogenetischen Berechnung festgestellt, dass mit den gewählten Methoden tatsächlich Fragmente des *fmoA*-Gens aus den Umweltproben amplifiziert wurden.

Die höchste Sequenzvariabilität trat in der Atlantikprobe SSM-3 auf. Neben der einen Mikroheterogenitätsgruppe, vertreten durch Atlantik SSM-3 K-303, die nahezu identisch zum *fmoA*-Gen vom Typen-

---

<sup>121</sup> Die im phylogenetischen Baum enthaltenen Referenzsequenzen repräsentieren Mikroheterogenitätsgruppen und spiegeln *per definitionem* die Vielfalt der gefundenen *fmoA*-Sequenzen wieder (Kapitel 19.2.2, S. 92).

<sup>122</sup> Zu beachten ist, dass es im *fmoA*-Gen im Vergleich zu den gewohnten Werten bei der 16S rDNA eine höhere Nukleotidvarianz gibt, die *per se* zu einer niedrigeren Identität auch von näher verwandten Sequenzen führt.

<sup>123</sup> Dieses Ergebnis repräsentiert nur den Status quo zum Zeitpunkt des Fasta3-Abgleichs. In der Datenbank waren nicht die im Rahmen dieser Arbeit sequenzierten Reinkultur- und Umweltsequenzen vom *fmoA* enthalten. Diese sind erst später der Öffentlichkeit zur Verfügung gestellt worden.

stamm *Prosthecochloris aestuarii* DSM 271<sup>T</sup> war (Abbildung 25; Si = 99,7 %) <sup>124</sup>, traten in Gruppe 4 noch zwei andere auf, repräsentiert durch Atlantik SSM-3 K-354 und K-307. Diese sind durch ihre Lage im phylogenetischen Stammbaum und der marinen Herkunft zu der salzbedürftigen Untergruppe um *Chlorobium chlorovibrioides* UdG 6026 zu rechnen, obwohl der Bootstrap-Wert an deren Basis (B = 59) nicht ganz so hoch ist, wie an den meisten anderen Verzweigungen im Stammbaum. Die beiden Umweltsequenzen in Gruppe 4 haben etwa die gleiche Similarität zu jedem Vertreter dieser Gruppe (Si = 89,2-91,8 %). Untereinander liegen sie mit Si = 93,1 % fast genauso weit auseinander und beide traten nur ein einziges Mal in der Klonierungsprobe SSM-3 auf (Häufigkeit jeweils  $H = \frac{1}{17}$ ; Tabelle 44, S. 149) <sup>125</sup>. Den Rest mit  $H = \frac{15}{17}$  bildete Atlantik SSM-3 K-303 in Gruppe 1. Die zu *Prosthecochloris aestuarii* DSM 271<sup>T</sup> fast ebenso identische Sequenz Atlantik Sip-4 K-802 (Si = 99,4 %) repräsentiert sogar die einzige MHG der Probe Sip-4 ( $H = \frac{29}{29}$ ; Tabelle 43, S. 148).

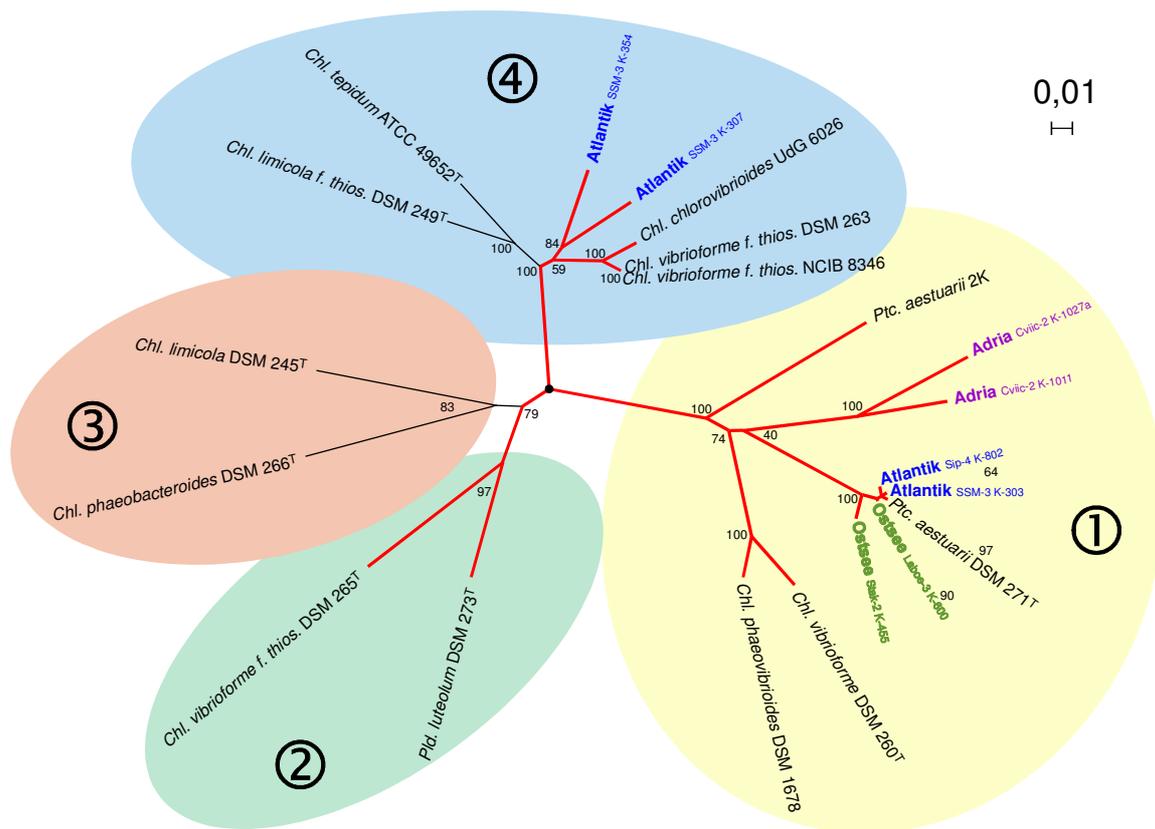
Ähnlich ist es mit den beiden Ostseeproben Laboe-3 und Stak-2. Es wurde jeweils nur eine einzige MHG gefunden, die durch Ostsee Laboe-3 K-600 und Stak-2 K-455 repräsentiert ist ( $H = \frac{67}{67}$  bzw.  $\frac{4}{4}$ ; Tabelle 46, S. 151). Beide liegen in Gruppe 1 ebenfalls sehr nahe bei *Prosthecochloris aestuarii* DSM 271<sup>T</sup> (Si = 99,2 % bzw. 97,6 %).

Interessanter ist das Ergebnis der Umweltprobe aus Kroatien (Cviic-2). Hier konnten zwei deutlich verschiedene MHG in der marinen/hypersalinen Gruppe 1 ermittelt werden, die durch Adria Cviic-2 K-1027a und K-1011 vertreten sind. Ihre Similarität untereinander liegt bei 88,0 % und ist damit recht klein. Es gab keine weiteren Umwelt- oder Reinkultursequenzen in ihrer Nähe, weshalb der Similaritätsbereich Si = 78,7-84,1 % zu den anderen aus Gruppe 1 sehr niedrig ist. In dieser Probe aus Kroatien konnten 20 *fmoA*-Sequenzen gefunden werden, von denen K-1011 der Hauptvertreter war ( $H = \frac{14}{20}$ ) während K-1027a nur ein Mal vorkam ( $H = \frac{1}{20}$ ; Tabelle 40, S. 145).

Bei der Analyse der *fmoA*-Fragmente wurden keine Sequenzen außerhalb der bekannten Gruppen gefunden. Wie bei der 16S rDNA lagen keine von diesen in Gruppe 2 oder 3.

<sup>124</sup> In der diesen Si-Werten zugrunde liegenden Distanz-Matrix (Tabelle 36, S. 141) sind auch Sequenzen enthalten, die aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in die Berechnung des Umwelt-Baumes aufgenommen wurden. Da es sich also hierbei um eine unabhängige Berechnung handelt, können leichte Unterschiede zu den im Baum dargestellten Distanzen auftreten.

<sup>125</sup> Die erste Zahl der Häufigkeit gibt alle in einer MHG befindlichen Sequenzen an; die zweite weist alle in einer Probe gefundenen *fmoA*-Sequenzen aus.



**Abbildung 25: *fmoA*-Phylogenie der Umweltsequenzen**

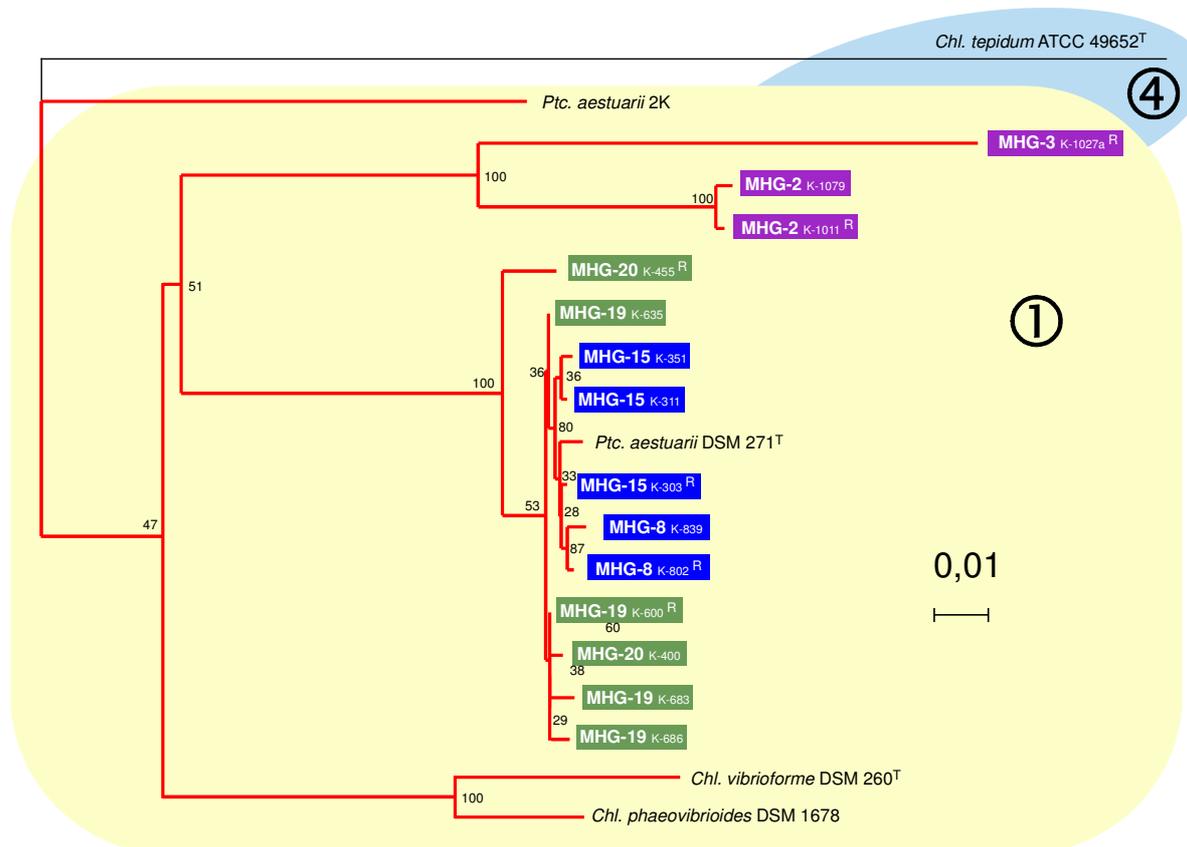
Radialer phylogenetischer Stammbaum auf der Grundlage von *fmoA*. Die Topologie basiert auf Sequenzlängen von ca. 875 nt, die mit dem Primer-Paar F-Start-*fmo*/R-889-*fmo* erhalten (eigene Daten) oder darauf zugeschnitten wurden (Sequenzen von EMBL-EBI). Die Berechnungen wurden mit der Distanz-Matrix-Methode durchgeführt (basierend auf dem Algorithmus von Jukes & Cantor 1969). Rote Linien verbinden salzbedürftige Arten. Bootstrap-Werte sind prozentual. Die Maßangabe kennzeichnet die phylogenetische Distanz. Umweltsequenzen sind jeweils Repräsentant einer MHG.

### 9.2.2 Mikroheterogenität der *fmoA*-Umweltsequenzen

Die allgemeine Beschreibung der Mikroheterogenität wurde schon in Kapitel 9.1.2 (S. 87) vorgenommen. Zur Verdeutlichung der niedrigen aber dennoch vorhandenen Varianz innerhalb einer MHG wurde ein Phenogramm mit ausgewählten Sequenzen erstellt (Abbildung 26).

Bei den *fmoA*-Umweltsequenzen wurde nach vollendeter Screening-Sequenzierung genauso verfahren wie bei der 16S rDNA, mit dem Unterschied, dass Sequenzen schon dann zu einer MHG zusammengenommen wurden, wenn sie sich in maximal 2 % der Nukleotide unterschieden (das entspricht maximal 8-9 nt auf 400-450 nt Screening-Sequenzlänge; Identität *per def.* > 98 %). Dieses Kriterium erwies sich als hilfreich, um im Vorfeld schon wesentliche Sequenzunterschiede von marginalen Variationen (Mikroheterogenität) abzugrenzen.

Die geringe aber doch vorhandene Varianz innerhalb einer MHG wird in Abbildung 26 an mehreren Beispielen verdeutlicht. Es wurde grundsätzlich die Referenzsequenz vollsequenziert und zusätzlich noch andere Fragmente, wenn sie innerhalb der MHG einen möglichst hohen Unterschied zu dieser aufwiesen.



**Abbildung 26: Mikroheterogenität der *fmoA*-Umweltsequenzen in der marinen/hypersalinen Gruppe 1**

Auf *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup> wurzelnder phylogenetischer Stammbaum auf der Grundlage von *fmoA*-Fragmenten. Die Topologie basiert auf Sequenzlängen von ca. 875 nt, die mit dem Primer-Paar F-Start-fmo/R-889-fmo erhalten (eigene Daten) oder darauf zugeschnitten wurden (Daten von EMBL-EBI). Die Berechnungen wurden mit der Distanz-Matrix-Methode durchgeführt (basierend auf dem Algorithmus von Jukes & Cantor 1969). Rote Linien verbinden salzbedürftige Arten. Bootstrap-Werte sind prozentual. Die Maßangabe kennzeichnet die phylogenetische Distanz. Umweltsequenzen eines Gewässers sind mit derselben Farbe hinterlegt (Atlantik, Ostsee, Adria).

Die zugehörigen Similaritätswerte sind der Tabelle 36 (S. 141) entnommen: MHG-2 K-1011<sup>R</sup> und K-1079 (Si = 99,4 %); MHG-20 K-400 und K-455<sup>R</sup> (Si = 97,9 %) <sup>126</sup>; MHG-19 K-600<sup>R</sup>, K-635, K-683 und K-686 (Si = 99,2-99,8 %); MHG-15 K-303<sup>R</sup>, K-311 und K-351 (Si = 99,1-99,4 %) sowie MHG-8 K-802<sup>R</sup> und K-839 (Si = 99,7 %). Die Referenzsequenzen kamen *per definitionem* am häufigsten vor, wobei alle anderen

<sup>126</sup> Dieser Wert liegt leicht außerhalb des Definitionsbereichs einer MHG (Si = 98,0-100 %). Da die Abweichung aber minimal ist, wurden die Sequenzen K-400 und K-455<sup>R</sup> trotzdem zu der MHG-20 zusammengefasst.

jeweils nur ein einziges Mal vorhanden waren. Eine Ausnahme bildet allerdings MHG-20. In der zugehörigen Probe Stak-2 wurden insgesamt nur vier *fmoA*-Sequenzen gefunden (Tabelle 46, S. 151).

Im Vergleich zur 16S rDNA wurde für die Entscheidung zur Vollsequenzierung noch eine weitere Eigenschaft herangezogen, weil sich aus der Nukleotidsequenz auch Aminosäuren ableiten lassen. Insofern wurde jeder Basenunterschied einer Screeningsequenz noch daraufhin überprüft, ob im Vergleich zur Referenzsequenz nach der Translation ein Aminosäureaustausch resultieren würde. Sofern mindestens zwei AS-Austausche vorkamen, wurde dieses Fragment ebenfalls vollsequenziert, was besonders für die Mikroheterogenität des FMO wichtig war (Kapitel 9.3.2, S. 95).

### 9.3 PHYLOGENIE DER UMWELTSEQUENZEN (FMO)

Die FMO-Sequenzen basieren vollständig auf deren zugehörigen *fmoA*-Gen-Fragmenten, weil sie aus diesen unter Berücksichtigung der allgemeinen IUPAC-Nomenklatur translatiert wurden. Von daher gilt alles, was über Primer-Auswahl und Spezifikation in Kapitel 9.2 geschrieben wurde, auch hier.

#### 9.3.1 Stammbaumdarstellung mit FMO-Umweltsequenzen

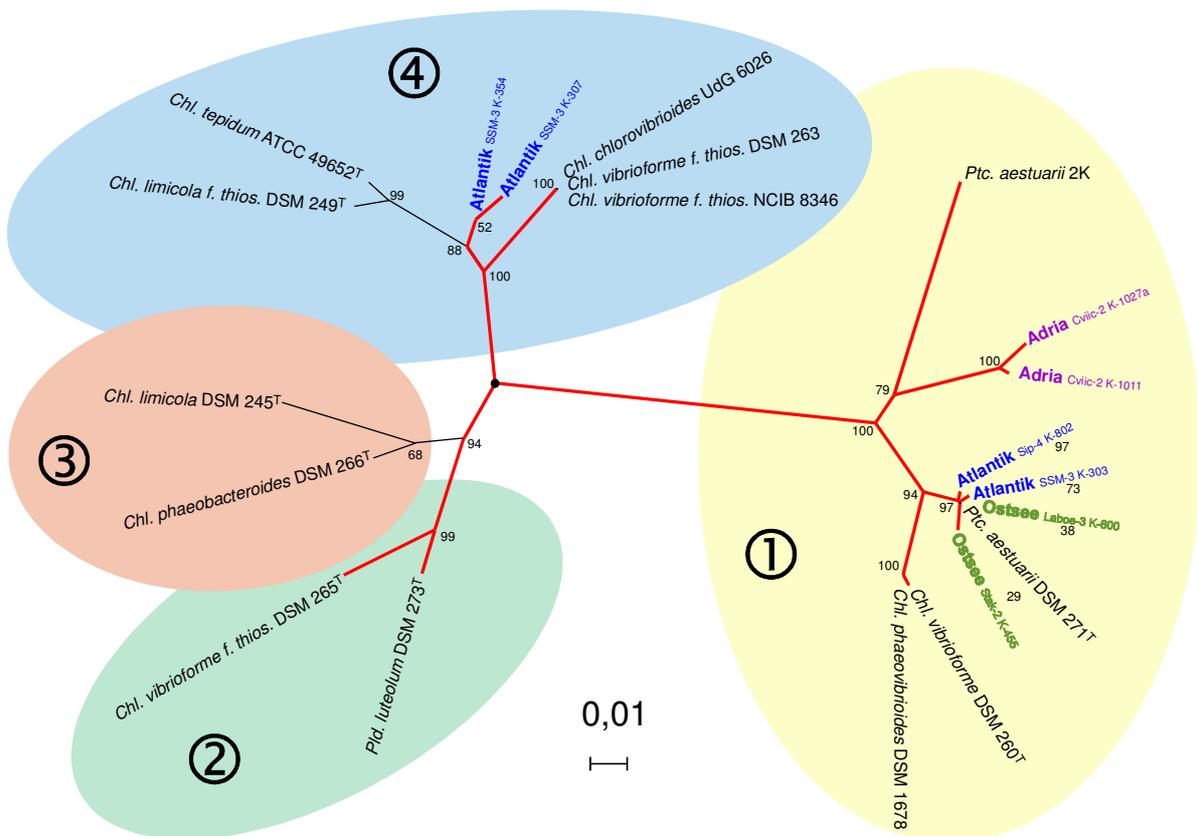
Die Auswahl der Reinkultur- und Umweltsequenzen entspricht exakt der des *fmoA*-Stammbaumes in Abbildung 25 (S. 92). Wie dort beschrieben, ist auch auf Aminosäureebene die größte Variabilität in der Probe SSM-3 zu finden. Die aus vier verschiedenen Proben zweier Kontinente gewonnenen Sequenzen Atlantik SSM-3 K-303 und Atlantik Sip-4 K-802 sowie Ostsee Laboe-3 K-600 und Ostsee Stak-2 K-455 sind alle nahezu identisch zu *Prosthecochloris aestuarii* DSM 271<sup>T</sup> in der marinen/hypersalinen Gruppe 1 (Si = 99,0-100,0 %) <sup>127</sup> und repräsentieren jeweils die zugehörige MHG (Abbildung 27).

Die beiden einzigen nachgewiesenen Sequenzen außerhalb der Gruppe 1 sind im Aminosäure-Stammbaum ebenfalls zu Gruppe 4 zu rechnen und bilden mit den untereinander nahezu identischen Sequenzen *Chlorobium chlorovibrioides* UdG 6026, *Chlorobium vibrioforme f. thiosulfatophilum* DSM 263 und NCIB 8346 (Si = 99,3-100,0 %) eine salzbedürftige Untergruppe. Diese beiden Umweltfragmente haben eine Similarität von 98,4 % und liegen damit nahe beieinander. Darüber hinaus besitzen sie einen ähnlichen Abstand sowohl zu den limnischen als auch zu den salzbedürftigen Vertretern der Gruppe 4 (Similarität jeweils ca. 96 %).

In Gruppe 1 haben die zwei MHG-Vertreter der Adria-Probe Adria Cviic-2 K-1027a und K-1011 eine kleine aber deutliche Distanz (Si = 98,7 %) und es gibt keine Reinkultursequenz in deren unmittelbarer Nähe (Si<sub>max</sub> = 93,2 %).

---

<sup>127</sup> In der diesen Si-Werten zugrunde liegenden Distanz-Matrix (Tabelle 38, S. 143) sind auch Sequenzen enthalten, die aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in die Berechnung des Umwelt-Baumes aufgenommen wurden. Da es sich also hierbei um eine unabhängige Berechnung handelt, können leichte Unterschiede zu den im Baum dargestellten Distanzen auftreten.



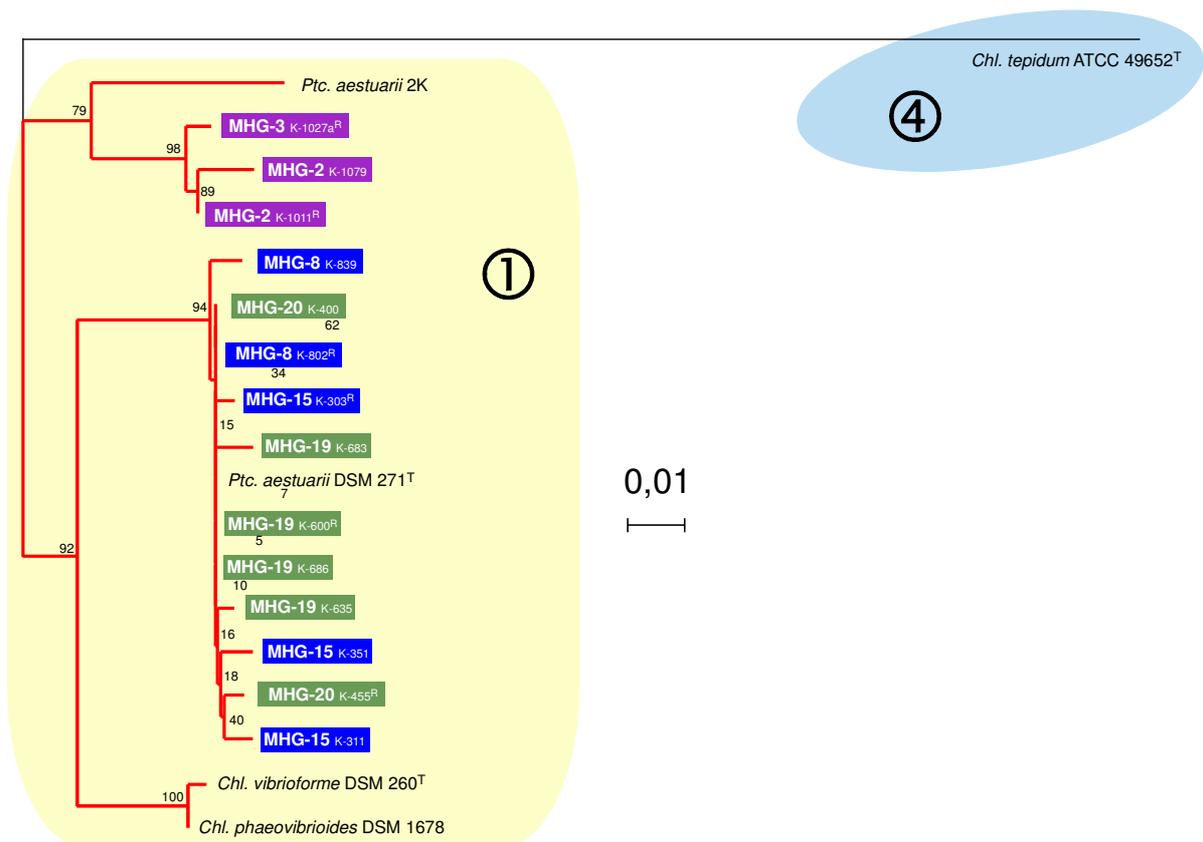
**Abbildung 27: FMO-Phylogenie der Umweltsequenzen**

Radialer phylogenetischer Stammbaum auf der Grundlage von FMO-Sequenzen. Die Topologie basiert auf Aminosäure-Sequenzlängen von ca. 290 aa, die aus Nukleotidsequenzen erstellt wurden, welche mit dem Primer-Paar F-Start-fmo/R-889-fmo erhalten (eigene Daten) oder darauf zugeschnitten wurden (Sequenzen von EMBL-EBI). Die Distanz wurde nach Dayhoff *et al.* (1978) ermittelt. Rote Linien verbinden salzbedürftige Arten. Bootstrap-Werte sind prozentual. Die Maßangabe kennzeichnet die phylogenetische Distanz. Umweltsequenzen sind jeweils Repräsentant einer MHG.

### 9.3.2 Mikroheterogenität der FMO-Umweltsequenzen

Im Kapitel 9.1.2 (S. 87) wurde bereits die Definition der Mikroheterogenität am Beispiel der 16S rDNA vorgenommen und in Kapitel 9.2.2 (S. 92) für das *fmoA* angepasst. Aus den *fmoA*-Fragmenten, der im gleichen Kapitel befindlichen Abbildung 26, wurden Aminosäuresequenzen erstellt und ein Pheno-gramm berechnet (Abbildung 28).

Die Similaritätswerte der im folgenden beschriebenen Vertreter der Mikroheterogenitätsgruppen sind der Tabelle 38 (S. 143) entnommen: MHG-2 K-1011<sup>R</sup> und K-1079 (Si = 99,0 %); MHG-20 K-400 und K-455<sup>R</sup> (Si = 98,7 %); MHG-19 K-600<sup>R</sup>, K-635, K-683 und K-686 (Si = 98,7-99,7 %); MHG-15 K-303<sup>R</sup>, K-311 und K-351 (Si = 99,0-99,4 %) sowie MHG-8 K-802<sup>R</sup> und K-839 (Si = 99,0 %).



**Abbildung 28: Mikroheterogenität der FMO-Umweltsequenzen in der marinen/hypersalinen Gruppe 1**

Auf *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup> wurzelnder phylogenetischer Stammbaum auf der Grundlage von FMO-Fragmenten. Die Topologie basiert auf Aminosäuresequenzlängen von ca. 290 aa, die aus Nukleotidsequenzen erstellt wurden, welche mit dem Primer-Paar F-Start-fmo/R-889-fmo erhalten (eigene Daten) oder darauf zugeschnitten wurden (Sequenzen von EMBL-EBI). Die Distanz wurde nach Dayhoff *et al.* (1978) ermittelt. Rote Linien verbinden salzbedürftige Arten. Bootstrap-Werte sind prozentual. Die Maßangabe kennzeichnet die phylogenetische Distanz. Umweltsequenzen eines Gewässers sind mit derselben Farbe hinterlegt (Atlantik, Ostsee, Adria).

#### 9.4 VERGLEICH DER UMWELTSEQUENZEN (16S rDNA, *fmoA*, FMO)

Bei Umweltsequenzen ist ein direkter Vergleich der Phylogenie verschiedener Gene nicht möglich, weil im Gegensatz zu Sequenzen aus einer Reinkultur diese nicht eindeutig einem Organismus zugeordnet werden können. In der vorliegenden Arbeit ist dies jedoch trotzdem vertretbar, weil die gefundene Diversität insgesamt gering war. Das soll aber erst in der Diskussion erfolgen.

Der größte Unterschied zwischen den Ergebnissen aus Umweltproben besteht darin, dass im Rahmen der 16S-rDNA-Analyse auch Sequenzen gefunden wurden, die außerhalb der bisher bekannten fünf Gruppen grüner Schwefelbakterien lagen (Ostsee Stein-1 K-249, K-273 und K-298 sowie Atlantik Sip-4 K-790; Abbildung 29, S. 99).

Sowohl bei der 16S rDNA als auch beim *fmoA*/FMO wurden Gruppenvertreter aus 1 und 4 nachgewiesen. Bei letzterer sind die Umweltsequenzen erwartungsgemäß eher der salzbedürftigen Untergruppe zuzurechnen. Weiterhin sind in allen drei phylogenetischen Stammbäumen die Fragmente, die am häufigsten vorkamen, eindeutig zu *Prosthecochloris aestuarii* DSM 271<sup>T</sup> zu rechnen, während keine der anderen Umweltsequenzen eine so hohe Similarität zu einem der übrigen Reinkulturstämme aufwies. Das zeigt sehr anschaulich, dass mit molekularen Methoden auch Sequenzen nachgewiesen werden können, die wahrscheinlich zu Stämmen gehören, welche bisher nicht kultivierbar waren.

Im 16S-rDNA-Stammbaum gibt es noch zwei Sequenzen, die etwas abseits der Hauptvertreter der Umweltfragmente stehen, jeweils nur in einem Klon nachgewiesen wurden und auch kein entsprechendes Pendant im *fmoA*- bzw. FMO-Stammbaum haben: Atlantik SSM-3 K-153 (Gruppe 4) und K-100 (Gruppe 1). Generell konnte mit der für die 16S rDNA entwickelten Nachweismethode eine größere Sequenzvariabilität in der gleichen Probe erfasst werden als es beim *fmoA* der Fall war (Abbildung 23, Abbildung 25 und Abbildung 27). In zwei Proben konnten zwar 16S-rDNA-Fragmente amplifiziert werden, aber keine vom funktionellen Gen: BW-4 (Bad Water) und Stein-1 (Ostsee).

Eine kleine Ausnahme bildet das Ergebnis der Umweltprobe aus Kroatien (Cviic-2). Hier konnten zwei deutlich verschiedene MHG ermittelt werden, die durch Adria Cviic-2 K-1027a und K-1011 vertreten sind (bei der 16S rDNA nur eine). Ihre Similarität untereinander liegt bei 88,0 % und ist damit recht groß, auch wenn man davon ausgeht, dass im Verhältnis zur 16S rDNA beim *fmoA* durch eine größere Sequenzvariabilität die Si-Werte generell niedriger sind. Als vergleichbares Beispiel kann die Similarität von *Chlorobium chlorovibrioides* UdG 6026 zu *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* DSM 249<sup>T</sup> dienen. Auf *fmoA*-Basis ist der Si-Wert ebenfalls 88,0 %, während er bei der 16S-rDNA 95,6 % beträgt, womit die beiden Sequenzen noch zu einer Bakteriengattung, aber nicht mehr zur selben Art gerechnet werden können.

## 9.5 GRUPPENSIGNATUREN (UMWELTPROBEN VS. REINKULTUREN)

Im Allgemeinen ordnen sich alle 16S-rDNA-, *fmoA*- und FMO-Umweltsequenzen der Gruppen 1-4 sehr gut in die für Reinkultur-Fragmente ermittelten Gruppensignaturen ein (Tabelle 30 ff., S. 135 ff.). Die Sequenz Atlantik SSM-3 K-153 weicht allerdings an mehreren Positionen ab. Sie weist 13 von 24 Signaturen der Gruppe 1 auf (Positionen 115-215), obwohl sie im phylogenetischen 16S-rDNA-Stammbaum eindeutig zur salzbedürftigen Untergruppe von 4 zu rechnen ist, mit der sie auch in allen drei Signaturen übereinstimmt.

Auch gerade das sehr signifikante zusätzliche Codon (*fmoA*-Position 525a-c) bzw. die zusätzliche Aminosäure Asparagin (FMO-Position 175a) kommt ausnahmslos bei allen der Gruppe 1 zugeordneten Umweltsequenzen vor, nicht aber bei Atlantik SSM-3 K-153.

## 9.6 ANDERE UMWELTSEQUENZEN (AUßERHALB DER GSB)

Bei der Amplifikation von 16S-rDNA-Fragmenten aus Umweltproben wurde besonderen Wert darauf gelegt, die PCR nicht zu stringent zu halten, damit die Möglichkeit gegeben war, Sequenzen auch außerhalb der bisher bekannten fünf Gruppen zu entdecken (Kapitel 9.1, S. 83).

Die Sequenzen, die den bisher bekannten Gruppen am nächsten standen, sind in Abbildung 29 dargestellt. Sie wurden aus zwei völlig unterschiedlichen Proben amplifiziert (Sip-4 von der Atlantik-küste der USA und Stein-1 aus der Ostsee), wovon drei Sequenzen jeweils in nur einem einzigen der untersuchten Klone auftraten (Tabelle 42 und Tabelle 46, S. 147/151). Ostsee Stein-1 K-273 allerdings hatte in einem zweiten Klon ein fast identisches Pendant (K-275).

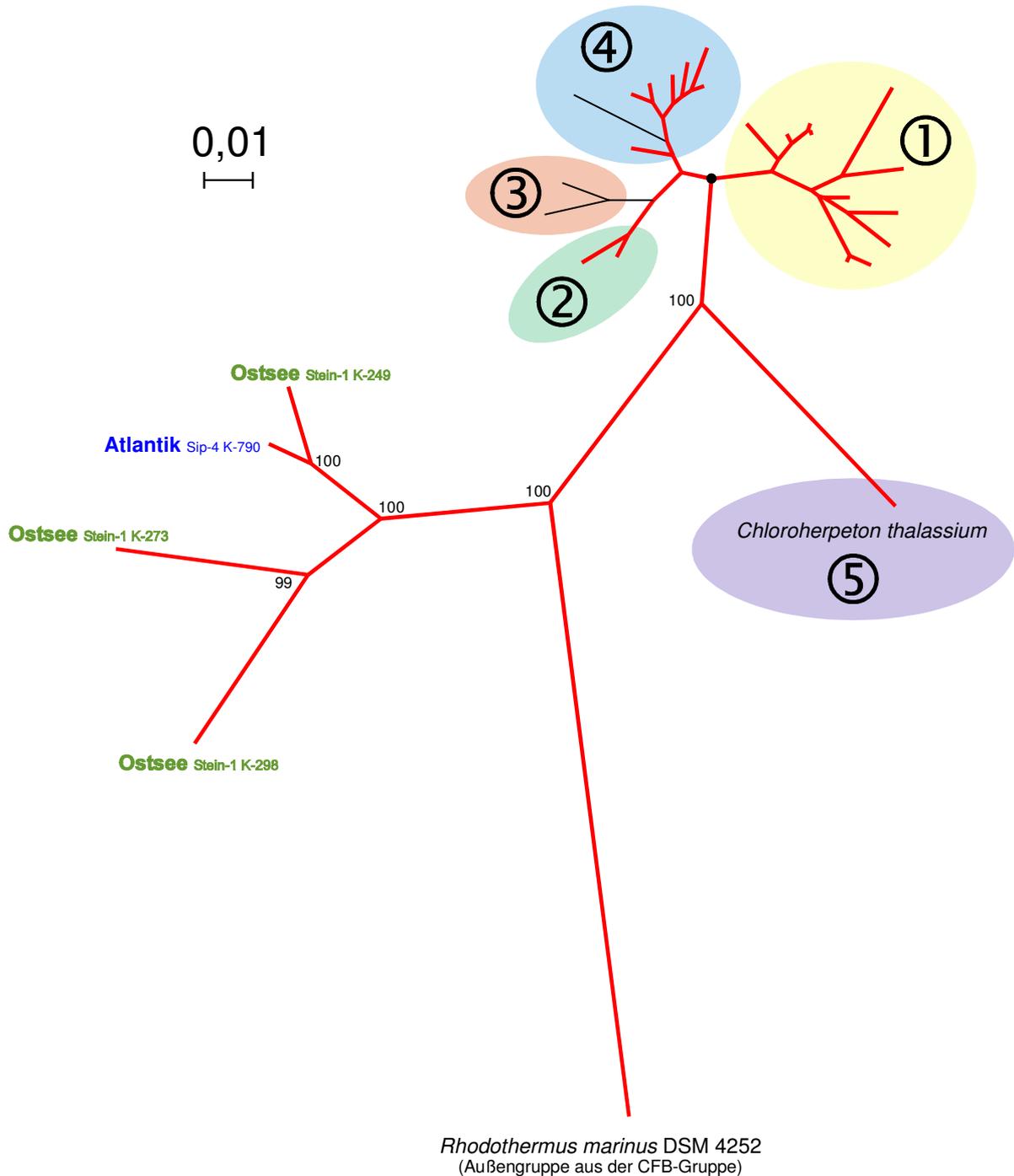
Die Similarität reicht untereinander von 91,2-97,2 %. Zu *Chloroherpeton thalassium* (Gruppe 5) und den anderen grünen Schwefelbakterien der Gruppen 1-4 herrscht ein relativ großer Abstand (Si = 80,0-82,6 %), während die Entfernung zu *Rhodothermus marinus* DSM 4252 aus der nahe verwandten *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*-Gruppe (CFB) mit Si = 81,0-81,7 % etwa genauso weit ist (Tabelle 34, S. 139).

Beim Datenbankabgleich ergab sich mit einer ausreichend hohen Sicherheit von  $E < e^{-12}$  (E-Value, E-Wert), dass die Sequenzen Ostsee Stein-1 K-249 und K-273 sowie Atlantik Sip-4 K-790 insgesamt als nächste Verwandte die grünen Schwefelbakterien sowie *Rhodothermus*- und *Cytophaga*-Arten haben (Identität<sup>128</sup> ca. 82 %). Für Ostsee Stein-1 K-298 waren die besten Übereinstimmungen die 16S rDNA der Gattung *Rhodothermus* (Id ca. 83 %). Darüber hinaus gab es in der Datenbank einige Umweltsequenzen von nicht näher bestimmten Bakterien (nicht identifiziert bzw. nicht kultiviert), die sogar deutlich größere Ähnlichkeiten aufwiesen (Id bis ca. 91 %). Manche davon wurden sogar den grünen Schwefelbakterien zugeordnet (z.B. eine 16S rDNA aus Sedimenten der Antarktis mit der Zugangsnummer AF424373).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass diese selten gefundene Sequenzgruppe wohl zu Bakterien gehört, deren phylogenetischer Platz zwischen den grünen Schwefelbakterien und der *Cytophaga/Flavobacterium*-Gruppe liegen muss.

---

<sup>128</sup> Identität ist nicht mit Similarität zu verwechseln. Bei ersterer werden nur die Basenübereinstimmungen gezählt, während bei letzterer ein Algorithmus zugrunde liegt, der ein evolutionstheoretisches Modell vertritt.



**Abbildung 29: 16S-rDNA-Phylogenie der Umweltsequenzen in der Nähe der GSB**

Radialer phylogenetischer Stammbaum auf der Grundlage von 16S rDNA. Die Topologie basiert auf Sequenzlängen von ca. 1240 nt, die mit den Primer-Paaren F-99-GSB/R-1369 bzw. F-99-GSB/R-1388 erhalten (eigene Daten) oder darauf zugeschnitten wurden (Daten von EMBL-EBI). Die Berechnungen wurden mit der Distanz-Matrix-Methode durchgeführt (basierend auf dem Algorithmus von Jukes & Cantor 1969). Bootstrap-Werte sind prozentual. Die Maßangabe kennzeichnet die phylogenetische Distanz.

Eine gewisse Bestätigung für die Eignung von Bedingungen und Primer war dann gegeben, wenn im Klonierungsergebnis einer Probe auch wenige 16S-rDNA-Sequenzen vorkamen, die laut Datenbank (Fasta3) nicht den grünen Schwefelbakterien zugeordnet werden konnten, aber mit diesen weitläufig verwandt waren (Tabelle 41 ff., S. 146 ff.). Auf folgende Proben traf dies zu (die Häufigkeit H der Nicht-GSB-Sequenzen steht in eckigen Klammern<sup>129</sup>): Bad Water BW-4 [<sup>7</sup>/<sub>84</sub>], Atlantik Sip-4 [<sup>9</sup>/<sub>97</sub>], Atlantik SSM-3 [<sup>1</sup>/<sub>93</sub>], Ostsee Laboe-3 [<sup>11</sup>/<sub>95</sub>]. In den übrigen beiden 16S-rDNA-Klonierungsergebnissen war das Verhältnis ungünstiger: Adria Cviic-2 [<sup>0</sup>/<sub>34</sub>] und Ostsee Stein-1 [<sup>67</sup>/<sub>74</sub>].

**Tabelle 29: Hauptvertreter der Nicht-GSB-Gattungen in 16S-rDNA-Klonierungsergebnissen**

Die aufgeführten Gattungen gehören zu folgenden Bakterien-Gruppen:

*Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides-Gruppe* (CFB)

*Proteobacteria* („Purpurbakterien und Verwandte“)

*Firmicutes* („Gram-positive Bakterien“)

*Chlamydiales-Verrucomicrobia-Gruppe*

*Thermotogae*

Bad Water BW-4	<i>Cytophaga, Flavobacterium, Rhodothermus, Desulfocapsa, Desulfonema, Mesorhizobium</i>
Atlantik Sip-4	<i>Cytophaga, Desulfocella, Desulfovibrio, Desulfotignum, Desulfuromusa, Streptomyces</i>
Atlantik SSM-3	<i>Desulfobacter</i>
Ostsee Laboe-3	<i>Cytophaga, Flexibacter, Lewinella, Desulfobacterium, Desulfobulbus, Desulfomicrobium, Desulforhopalus, Desulfuromonas</i>
Ostsee Stein-1	<i>Cytophaga, Flavobacterium, Flexibacter, Lewinella, Aeromonas, Beggiatoa, Bdellovibrio, Desulfobacterium, Desulfobulbus, Desulfocapsa, Desulfococcus, Desulfofustis, Desulfomicrobium, Desulfovibrio, Desulforhopalus, Desulfuromonas, Erythrobacter, Geobacter, Roseospira, Shewanella, Sphingomonas, Thiomicrospira, Prosthecobacter, Verrucomicrobium, Thermotoga</i>
Mittelmeer PSA-1	<i>Prevotella</i>

In einer weiteren durchsuchten Probe wurde keine einzige GSB-Sequenz gefunden, deshalb ist sie bisher nicht erwähnt worden: PSA-1 stammt von dem Strand eines Salzsees (Etang) in der Nähe von Montpellier (Frankreich), der mit dem Mittelmeer in offener Verbindung steht. Hier wurden die 18 ermittelten Sequenzen mit hoher Signifikanz ausschließlich der Gattung *Prevotella* zugeordnet (*Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides-Gruppe*, CFB) und stehen damit den grünen Schwefelbakterien nahe.

<sup>129</sup> Die erste Zahl der Häufigkeit gibt die Anzahl der Nicht-GSB-Sequenzen an; die zweite führt alle in einer Probe gefundenen 16S-rDNA-Sequenzen auf.



unbestimmten oder nicht kultivierten Arten wurden dabei außer Acht gelassen. Oft betrug die Identität der besten Übereinstimmungen nur ca. 80-90 % (insgesamt kamen Werte von ca. 70-99 % vor).

Am häufigsten sind Sequenzen von Bakterien gefunden worden, deren nächste Verwandte laut Datenbank zur CFB-Gruppe oder den Proteobacteria gerechnet werden. Diese stehen den Chlorobi auch vergleichsweise nahe im Vergleich zu den meisten anderen Gruppen der Bacteria (Abbildung 30).

Eine Amplifikation von ähnlichen aber nicht den grünen Schwefelbakterien zuzurechnenden Fragmenten kam allerdings nur bei der 16S rDNA vor, weil diese ein Bestandteil des Genoms aller Prokaryonten ist. Das *fmoA*-Gen ist im Unterschied dazu nach heutigem Wissen auf die Gruppe grüner Schwefelbakterien beschränkt. Demnach waren unspezifisch amplifizierte Fragmente in keiner Weise dem *fmoA* ähnlich. Die in der Datenbank gefundenen nächstverwandten Sequenzen hatten meist eine sehr niedrige Identität und waren absolut nicht signifikant (niedriger *E*-Wert und kleiner Überlappungsbereich). Das deutet darauf hin, dass die unspezifischen Ergebnisse im Fall des *fmoA* zufällig waren und verschiedenste DNA-Abschnitte in anderen Bakterien amplifiziert wurden.

# DISKUSSION

Die grünen Schwefelbakterien stellen eine physiologisch kohärente Gruppe spezialisierter anoxygener phototropher Bakterien dar. Bei der bisherigen Betrachtung sowohl aufgrund klassisch-taxonomischer Eigenschaften als auch auf Basis von 16S-rDNA-Sequenzvergleichen (Overmann & Tuschak 1997) bilden die Chlorobiaceae eine eigenständige Gruppe bzw. sind eine separate Linie innerhalb des Reiches der Bacteria (Abbildung 1, S. 4).

Die phylogenetische Beziehung der Chlorobiaceae untereinander jedoch korreliert auf 16S-rDNA-Basis nicht mit der derzeit gültigen taxonomischen Klassifizierung, die sich vor allem auf klassische Kriterien wie Zellmorphologie, Absorptionseigenschaften der Pigmente, Struktur der photosynthetischen Pigmente und das Vorhandensein von Gasvesikeln stützt.

Zur Untersuchung der bisher bekannten 16S-rDNA-Phylogenie grüner Schwefelbakterien und zur Weiterentwicklung dieser, wurde die Anzahl an verfügbaren Sequenzen dieses Gens erhöht und ein funktionelles Gen in die Betrachtung mit einbezogen (*fmoA*).

Um nicht alleine von kultivierbaren Chlorobiaceae abhängig zu sein, wurden neben der Verwendung von Reinkulturen die entwickelten Methoden auch für die Untersuchung von Umweltproben in der zweiten Phase dieser Arbeit adaptiert. Damit war es möglich, Sequenzen von bisher wahrscheinlich unbekanntem Stämmen nachzuweisen und auch eine Aussage über die Diversität und Verteilung der grünen Schwefelbakterien an marinen und hypersalinen Standorten zu machen.

## 10 DISKUSSION METHODISCHER ENTWICKLUNGEN

Die sorgfältige Auswahl der Primer ist für die Gewinnung von den Sequenzen, die untersucht werden sollen, von essentieller Bedeutung. Während bei der Arbeit mit Reinkultur-DNA mangelnde Primer-Qualität und -Spezifität noch durch geeignete PCR-Bedingungen ausgeglichen werden kann, ist bei Umweltproben vor allem im Bereich funktioneller Gene kein befriedigendes Ergebnis mehr zu erwarten, wenn sich die Primer schlecht an die vorgesehenen Bereiche auf der DNA anlagern.

### 10.1 PRIMER-SYSTEM FÜR DIE 16S rDNA

Bisher wurden 16S-rDNA-Fragmente grüner Schwefelbakterien nicht durch GSB-spezifische Amplifikation gewonnen, sondern mit eubakteriellen Primern. Bei der Untersuchung von Reinkulturen konnten auf diese Weise reine Produkte gewonnen werden, wenn keinerlei Verunreinigung durch andere Bakterien sowohl im Ausgangsprodukt als auch in der nachfolgenden Verarbeitung auftrat. Die Gewinnung von GSB-Fragmenten aus Umweltproben war mit dieser Methode ebenfalls möglich, allerdings musste das PCR-Produkt, das aus 16S-rDNA-Fragmenten verschiedenster Bakterienarten bestand, noch vor der Sequenzierung durch eine Klonierung aufgetrennt werden. Der Nachteil dabei ist, dass das Ergebnis nur aus einem geringen Anteil an GSB-DNA besteht und dadurch der

Klonierungsaufwand sehr hoch ist, wenn nur eine bestimmte, meist unterrepräsentierte Bakteriengruppe wie die grünen Schwefelbakterien von Interesse ist. Andererseits ist es dabei schwer, die Diversität ausreichend gut zu erfassen. Als Beispiel sei hier eine Klonierung konstruiert, bei der wie in der vorliegenden Arbeit 100 Klone je Probe untersucht werden. Wenn davon nur fünf Klone überhaupt 16S-rDNA-Fragmente von GSB enthalten, ist die Wahrscheinlichkeit sehr gering, innerhalb dieser dann auch Arten der Chlorobiaceae zu detektieren, die weniger häufig vorkommen. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Standorten Sip-4, SSM-3 und Laboe-3 wären dann wahrscheinlich nur 16S-rDNA-Fragmente des stark vertretenen marinen Typenstammes *Prosthecochloris aestuarii* DSM 271<sup>T</sup> nachgewiesen worden (Tabelle 42 ff., S. 147 ff.).

Die Entwicklung von GSB-spezifischen Primern war deshalb für eine gute Amplifikation aus Reinkulturen hilfreich und bei den Standortuntersuchungen essentiell notwendig. So wurden schon für erstere die Primer konstruiert, die später bei den Umweltproben zum Einsatz kommen sollten. Dadurch konnten nach der theoretischen Primer-Auswahl einige Erfahrungen im praktischen Einsatz an wenig komplizierten Reinkulturproben gewonnen werden, was sich als sehr hilfreich für die nachfolgenden Standortklonierungen erwies.

Schließlich wurde ein spezifischer Primer ausgewählt, der nahe am Beginn der 16S rDNA liegt und keinerlei unbestimmte mehrdeutige Nukleotide enthalten sollte (F-99-GSB, Kapitel 7.1, S. 48). Dies erschien deshalb als notwendig, weil der zweite Primer eubakteriell sein sollte, das heißt, bei allen bekannten Arten der Bacteria binden konnte, was es ermöglichte, einerseits spezifisch GSB zu amplifizieren, andererseits innerhalb dieser Gruppe aber möglichst unspezifisch die Diversität zu erfassen. Ein Primer mit unbestimmten Nukleotiden hätte bei der in allen Bakterien vorkommenden 16S rDNA die Gefahr bedeutet, zu wenige Chlorobiaceae zu erfassen.

Mit der gewählten Primer-Kombination wurden alle in der Datenbank befindlichen 16S-rDNA-Sequenzen grüner Schwefelbakterien bis auf die von *Chloroherpeton thalassium* erfasst. Dieser Stamm wies an 2 von 17 Positionen ein anderes Nukleotid auf (Tabelle 16, S. 49). Allerdings lag diese Stelle in der Mitte des Primers und war damit nicht am für die Bindung kritischen 3'-Ende. Nach der Primer-Anlagerung (Annealing) in einer PCR findet dort nämlich die Anlagerung von weiteren Nukleotiden (Elongation) statt. Wenn an dieser Stelle Basenpaarungen wegen Sequenzunterschieden nicht oder nur schwach erfolgen können, ist das Primer-Molekül dort instabil und eine Elongation schlecht möglich. Anders ist das bei fehlenden Übereinstimmungen in der Mitte oder am 5'-Ende. Sofern das Oligonukleotid insgesamt gut bindet, kann eine Elongation am 3'-Ende problemlos stattfinden.

Wie viele Fehlpaarungen noch zu einer Bindung und damit zu einem geeigneten Amplifikat führen, hängt schließlich von den gewählten PCR-Bedingungen ab, die für die Reinkulturen so gewählt wurden, dass möglichst nur eine hundertprozentige Basen-Übereinstimmung zu einem Ergebnis führte. Dieses war deshalb notwendig, weil zur nachfolgenden Sequenzierung keine Auftrennung des PCR-Produktes über eine Klonierung erfolgen sollte und eine Sequenzierung nicht mit einem Gemisch aus verschiedenen Fragmenten möglich ist.

Bei Amplifikationen aus Umweltproben war es wichtiger auch Fehlpaarungen zuzulassen, ohne jedoch zu viele Nicht-GSB-Fragmente zu klonieren. Für jeden Standort wurden unterschiedliche Bedingungen angewandt, was einmal dazu führte, dass von 74 verwertbaren Klonsequenzen nur 7 zu den grünen Schwefelbakterien oder deren Umgebung gerechnet werden konnten (Stein-1, Tabelle 46, S. 151). Drei davon waren untereinander nahezu identisch und bei den restlichen vier war es nicht sicher, ob sie überhaupt zur Gruppe der Chlorobiaceae gerechnet werden können (Abbildung 29, S. 99). Leider war es nicht möglich aus dieser Probe *fmoA*-Fragmente zu amplifizieren, um die Resultate zu untermauern. Das Ergebnis konnte auch nicht durch eine Steigerung der Stringenz der PCR-Bedingungen verbessert werden, da dieses zu einer stark reduzierten Amplifikatmenge führte.

Es wird deshalb vermutet, dass die DNA-Menge grüner Schwefelbakterien in der Probe Stein-1 sehr gering gewesen sein muss, was auch das Scheitern der *fmoA*-Amplifikation erklären könnte. Das soll kurz erläutert werden: Bei den PCR-Experimenten mit Reinkultur-DNA war davon auszugehen, dass im Wesentlichen nur Chlorobiaceae-Genom vorhanden war und damit sowohl 16S-rRNA- als auch *fmoA*-Gene grüner Schwefelbakterien. Mit jeweils geeigneten PCR-Bedingungen konnten aus allen untersuchten Reinkulturproben sowohl Amplifikate des einen als auch des anderen Gens in ausreichender Menge erhalten werden.

Wenn in einer DNA-Extraktion aus einer Umweltprobe aber nur ein sehr geringer Anteil Chlorobiaceae-DNA vorhanden ist (wie es eventuell bei Stein-1 der Fall war), dann entscheidet die Oligonukleotid-Konzentration der passenden Primer wesentlich über das Gelingen einer PCR. Die in dieser Arbeit entwickelten *fmoA*-Primer bestehen im Gegensatz zu den 16S-rDNA-Primern jeweils aus einem Gemisch von leicht unterschiedlichen Oligonukleotiden (Tabelle 17 f., S. 50 f.). Die Menge an passenden Primern war also in einem PCR-Ansatz für die Amplifikation des *fmoA* naturgemäß niedriger als in einem für die 16S rDNA. Damit könnte das Verhältnis der *fmoA*-Primer-Moleküle zu vorhandenen Bindestellen bei einer niedrigen Konzentration an Chlorobiaceae-DNA eventuell schon zu ungünstig für eine *fmoA*-Amplifikation gewesen sein, während mit 16S-rDNA-Primern aber noch Ergebnisse erzielt werden konnten.

Insgesamt ist die Auswahl des spezifischen Primers F-99-GSB als geeignet anzusehen, auch 16S rDNA von grünen Schwefelbakterien zu amplifizieren, die außerhalb der bisher bekannten Arten liegen und eventuell in dem Primer-Bindebereich leichte Variationen aufweisen. Das wurde dadurch gezeigt, dass in einigen Proben nicht nur Fragmente von Chlorobiaceae nachgewiesen wurden (Abbildung 30, S. 101). Die meisten dieser Sequenzen sind mit mehr oder weniger Identität und Signifikanz mit zwei Gruppen der Bacteria in Verbindung zu bringen: Der Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides-Gruppe (CFB) und den Proteobacteria. Diese sind am nächsten mit den Chlorobi verwandt (neben den Spirochaetales) und haben nur leichte Variationen am Primer-Bindebereich. Sollte es also noch Chlorobi geben, die außerhalb der bisher bekannten fünf Gruppen liegen, ist zumindest theoretisch die Möglichkeit gegeben, diese nachzuweisen. Dies ist allerdings nicht möglich, wenn sie wider Erwarten einen größeren Unterschied im F-99-GSB-Bindebereich als die gefundenen Vertreter der CFB- oder Proteobacteria-Gruppe haben oder in so geringer Menge am Standort vorkommen, dass sie unterhalb der Nachweisgrenze der angewandten Methode liegen.

Als ein Beweis dafür kann das oben genannte Ergebnis der Probe Stein-1 (Ostsee) zusammen mit Sip-4 (Atlantik) gewertet werden, bei der insgesamt fünf Sequenzen gefunden wurden (vier verschiedene MHG), die keine Entsprechung in der Datenbank aufwiesen (größte Identität ca. 80 % sowohl mit Vertretern der CFB-Gruppe als auch den Chlorobiaceae). Im phylogenetischen 16S-rDNA-Stammbaum wurden sie ebenfalls zwischen diesen beiden benachbarten Gruppen angesiedelt (Abbildung 29, S. 99). Es könnte sich hierbei also entweder um noch unbekannte außenstehende Vertreter einer der beiden Gruppen handeln oder um eine eigenständige Einheit.

Am Anfang und am Ende von Amplifikat-Fragmenten befindet sich aufgrund des Wesens einer PCR die Nukleotidfolge des Primers und nicht die der ursprünglichen DNA (Template). Deshalb kann keine Aussage darüber gemacht werden, wie und ob der Primer-Bindebereich der oben genannten Umweltfragmente tatsächlich von den bisher bekannten grünen Schwefelbakterien abweicht. Falls dieser aber ähnlich viele Unterschiede zum eingesetzten 16S-rDNA-Primer hat wie bei den nachgewiesenen CFB- oder Proteobacteria-Vertretern, ist dessen Anlagerung von der Konkurrenz zur 16S rDNA anderer Arten geprägt. Dann wäre es nicht verwunderlich, dass lediglich fünf Klone die Fragmente dieser noch unbekanntes Gruppe enthielten.

## 10.2 PRIMER-SYSTEM FÜR DAS *fmoA*-GEN

Die Konstruktion der Primer zur Amplifikation von *fmoA*-Fragmenten konnte sich auf lediglich zwei Sequenzen stützen, die zum damaligen Zeitpunkt in der Datenbank verfügbar waren. Diese wurden jeweils aufwändig durch Klonierung gewonnen und nicht mit Hilfe einer PCR, weil keine spezifischen Primer zur Verfügung standen (Dracheva *et al.* 1992, Hager-Braun *et al.* 1995).

Deshalb war es notwendig, zur Untersuchung der Phylogenie dieses funktionellen Gens, möglichst viele weitere *fmoA*-Sequenzen zu bekommen. Dieses ist effektiv nur mit einem System möglich, das es erlaubt, spezifisch die gesuchten Fragmente aus jeder der vorhandenen Reinkulturen zu isolieren. Für die zweite Phase, nämlich die Anwendung der Methode auf Umweltproben, wäre die Klonierung erst recht zu aufwändig und unspezifisch. Deshalb war es sinnvoll, gezielt die gesuchten Fragmente zu amplifizieren. Bei den Umweltproben schloss sich dann noch die Klonierung an, um die gemischten Fragmente für die Sequenzierung zu separieren.

Es bestand dabei das Risiko, bei der Konstruktion von Primern auf Basis von nur zwei Sequenzen, nicht alle zur Verfügung stehenden Arten grüner Schwefelbakterien einzuschließen. Die Entwicklung und Selektion der Primer bei der Reinkultur-DNA verlief dennoch sehr gut (Kapitel 7.2, S. 49), obwohl für jede Probe die PCR-Bedingungen noch individuell angepasst werden mussten, damit das Produkt in ausreichender Menge und ohne Nebenbanden auftrat. Es war schließlich möglich, *fmoA*-Fragmente von jeder zur Verfügung stehenden Reinkultur in sehr guter Qualität zu amplifizieren und zu sequenzieren. Die Erfahrungen, die dabei gesammelt wurden, waren sehr hilfreich bei der schwierigeren Anpassung der Methode an die Amplifikation aus Umweltproben. Es gelang dennoch nicht, bei allen Proben, bei denen 16S rDNA grüner Schwefelbakterien gewonnen werden konnte, auch *fmoA*-Amplifikate zu erhalten. Meist lag es daran, dass insgesamt zu wenig Chlorobiaceae-DNA

vorhanden war. Bei Reinkulturen und stark angereicherten Umweltproben war eine *fmoA*-Amplifikation wahrscheinlich aus diesem Grund leichter möglich.

Da das *fmoA*-Gen nach bisherigem Wissen nur bei den GSB vorkommt, wurde nicht erwartet, dass Amplifikate, die sich nicht dieser Gruppe zuordnen ließen, im Gegensatz zu den Ergebnissen bei der 16S rDNA eine besondere Bedeutung für die PCR-Spezifität haben könnten. Wahrscheinlich waren diese Produkte, die gelegentlich auftraten, das Ergebnis zufälliger Primer-Anlagerungen.

Nach Kontrolle der Screening-PCR im Agarose-Gel wurden von Amplifikaten, die von der erwarteten Fragmentgröße leicht abwichen, stichprobenartig Sequenzierungen vorkommen. Deren Fasta3-Vergleiche mit der Datenbank ergaben Übereinstimmungen mit meist niedriger Signifikanz, die auf die verschiedensten Genombereiche völlig unterschiedlicher Bakteriengruppen hindeuteten. Es schien also keine Verbindung oder Verwandtschaft zum *fmoA* zu geben, zumal solche Fehlamplifikationen unter bestimmten Bedingungen auch durch die Anlagerung von zwei gleichen Start- oder End-Primern vorkommen können.

Positive Resultate traten im Schnitt bei etwa der Hälfte aller untersuchten Klone auf. Diese im Vergleich zur 16S rDNA niedrige Ausbeute verdeutlicht die auf niedrige Spezifität ausgerichtete Methode. Wenn keine Oligonukleotidgemische eingesetzt worden wären (also keine Primer mit unbestimmten Basen), hätte wahrscheinlich aus kaum einer Probe das *fmoA* gewonnen werden können. Die beiden ursprünglichen Sequenzen in der Datenbank, die als Vorlage für die Primer-Konstruktion dienten, kamen nämlich nicht von salzbedürftigen oder marinen Stämmen, sondern von zwei nahe verwandten limnischen Arten aus Gruppe 4 (*Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup> und *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum* DSM 249<sup>T</sup>).

## 11 PHYLOGENIE GRÜNER SCHWEFELBAKTERIEN

Durch den Vergleich von 16S rDNA und *fmoA* konnte ein deutlich verbessertes phylogenetisches System innerhalb der grünen Schwefelbakterien aufgebaut werden. Es resultieren fast identische Gruppen aus der Berechnung von Stammbäumen auf der Basis dieser Gene, was auf eine weitgehend kongruente Evolution der 16S rRNA und dem FMO schließen lässt. Dieses ist ziemlich bemerkenswert und unterstützt die bisherige Phylogenie, die nur auf der 16S rDNA aufbaut. Die hohen Bootstrap-Werte an den meisten Verzweigungen stehen für signifikante, reproduzierbare Berechnungen und sichern die vorgeschlagene Einteilung in fünf Hauptgruppen gut ab. Auch die Einbeziehung von Signatursequenzen, Gesamt-GC-Gehalt und Salzbedürftigkeit in die Betrachtungen führte zu einer Bestätigung der Gruppierungen.

In den folgenden Betrachtungen soll dieser Konsens nach Gruppen aufgeteilt und genauer diskutiert werden. Dabei werden die 16S-rDNA-, *fmoA*- und FMO-Phylogenie verglichen und durch zusätzliche Informationen gestützt, die durch die Betrachtung des Gesamt-GC-Gehaltes, der Gruppensignaturen, der Salzbedürftigkeit und verschiedener Algorithmen zur Stammbaumberechnung gewonnen werden konnten.

Die früher namensgebenden und taxonomisch relevanten mikroskopischen Eigenschaften „Bakterienzellform“ (stäbchenförmig [-*bacteroides*] vs. kommaförmig [-*vibrioides*]) und „Gasvesikelbildung“ eignen sich anscheinend genauso wenig für eine Gruppendifinition wie die Zusammensetzung der Pigmente (braune [*phaeo-*] vs. grüne Arten<sup>130</sup>) (Overmann & Tuschak 1997). So kann schon an der Namensgebung erkannt werden, dass in den Gruppen 1-4 jeweils sowohl braune als auch grüne Arten völlig gemischt vorkommen. Ähnlich ist es bei der Zellform, wobei hier allerdings die Gruppierung etwas einheitlicher ist.

## 11.1 DIE GRUPPE 1 MIT MARINEN UND HYPERSALINEN STÄMMEN

Gruppe 1 ist sehr deutlich von den anderen Arten separiert (Overmann & Tuschak 1997). Untereinander haben die Stämme die größte Sequenzvariation innerhalb der grünen Schwefelbakterien (besonders auf FMO-Basis). Diese Ergebnisse werden ausnahmslos von allen berechneten phylogenetischen Stammbäumen unterstützt (16S rDNA, *fmoA* und FMO) und gelten für sämtliche Algorithmen, die vergleichend angewandt wurden (Distanz-Matrix-, Parsimony- und Maximum-Likelihood-Methode). Die Bootstrap-Werte sind dabei immer besonders hoch, was auf eine sehr stabile topologische Anordnung hindeutet, die nicht durch Hinzufügen oder Entfernen von Sequenzen oder unterschiedliche Berechnungsarten beeinflusst wird.

Unterschiede in der Topologie gibt es lediglich innerhalb der Gruppe 1, nicht aber in deren Beziehung zu den restlichen Bakterienstämmen. So ist die Paarung [*Prosthecochloris aestuarii* 2K, CHP 3401] in den 16S-rDNA-Stammbäumen näher bei der Paarung [*Chlorobium vibrioforme* DSM 260<sup>T</sup>, *Chlorobium phaeovibrioides* DSM 1678] angeordnet als die Sequenz von *Prosthecochloris aestuarii* DSM 271<sup>T</sup>, wohingegen bei den *fmoA*- und FMO-Stammbäumen dieser Fall umgekehrt ist. Berechnungseinflüsse können weitgehend ausgeschlossen werden, weil hier wie in der gesamten vorliegenden Arbeit drei völlig unterschiedliche Sequenzgruppen ausgewertet wurden (16S rDNA, *fmoA* und FMO) und alle Bootstrap-Werte auf hohe Signifikanz hindeuten.

Es sieht so aus, als ob die beiden Paarungen stabil zueinander angeordnet sind, während aber *Prosthecochloris aestuarii* DSM 271<sup>T</sup> im 16S-rDNA-Stammbaum eine andere Stellung einnimmt als im *fmoA*- bzw. FMO-Stammbaum. Dies kann seinen Ursprung im horizontalen Gentransfer haben. Hierbei wäre denkbar, dass *Prosthecochloris aestuarii* DSM 271<sup>T</sup> im Laufe der Zeit eines der beiden Gene ausgetauscht hatte und somit deren kongruente Evolution umgangen wurde. Ebenfalls zu beachten ist, dass dessen 16S-rDNA-Sequenz nicht im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurde, sondern aus der Datenbank stammt (Tabelle 1, S. 13). Das *fmoA*-Fragment hingegen wurde im Rahmen dieser Arbeit aus einer Reinkulturprobe amplifiziert und daraus die *fmoA*- sowie FMO-Sequenz ermittelt. Trotz identischer Bezeichnung kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass die Datenbanksequenz auf DNA-Fragmenten eines anderen Stammes basiert.

Es ist allerdings auch möglich, dass dies eine der wenigen echten Diskrepanzen zwischen den Berechnungen der 16S-rDNA- und *fmoA*-Stammbäumen ist. So wurden beispielsweise im Rahmen

---

<sup>130</sup> Auf die Pigmentkomposition wird in der Diskussion nicht eingegangen.

dieser Arbeit vom Stamm *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* DSM 249<sup>T</sup> beide Gene aus derselben DNA-Probe gewonnen. Trotzdem hat DSM 249<sup>T</sup> im 16S-rDNA-Stammbaum eine deutlich größere Distanz zu der Untergruppe um *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup> als im *fmoA*- bzw. FMO-Stammbaum (Abbildung 17 f., S. 74 f.).

Gruppe 1 besitzt die weitaus meisten Signaturen sowohl auf 16S-rDNA-, *fmoA*- als auch FMO-Basis und separiert sich auch damit deutlich von allen anderen. Der größte zusammenhängende Signaturbereich auf der 16S rDNA ist von Position 197 bis 215 (CAGGAATGGCCTGTAGATA)<sup>131</sup>. Dieser ist bis auf 2 Basen kongruent zu dem Ergebnis von Vila *et al.* (2002). Auf dem funktionellen Gen ist ein besonders charakteristischer Bereich zwischen Position 511 und 518 zu finden (TCHGGHGG)<sup>131</sup> und beim FMO von 166 bis 175a (F<sup>O</sup>/<sub>S</sub>QSISSGGG<sup>V</sup>/<sub>A</sub>N)<sup>131</sup>. Damit schließt sich ein einzigartiges diagnostisches Element an, welches Gruppe 1 auszeichnet. Auf Position 175a (FMO) (bzw. 525a-c beim *fmoA*) befindet sich nämlich eine Aminosäure (bzw. ein Codon), die je nach Betrachtungsweise als inseriert oder bei den anderen Gruppen als deletiert angesehen werden kann. Bei der durch die vorigen Ergebnisse unterstützten Annahme, dass die salzbedürftigen Arten die evolutiv ältesten sind (hohe Diversität und große phylogenetische Distanz der Gruppe 1), und damit die grünen Schwefelbakterien ihren Ursprung im marinen Bereich haben, ist das Codon für die Aminosäure Asparagin (N) im Laufe der Zeit wahrscheinlich verloren gegangen.

Unterstützend zu den oben genannten Ergebnissen kann der Gesamt-GC-Gehalt zweier repräsentativer Arten dienen (*Prosthecochloris aestuarii* DSM 271<sup>T</sup> und *Chlorobium vibrioforme* DSM 260<sup>T</sup>). Er liegt im Bereich von 53-56 mol%, während alle anderen Stämme höhere oder niedrigere Werte aufweisen. Damit haben die Stämme der Gruppe 1 eine weitere Eigenschaft gemeinsam, die den Fokus aber nicht auf einzelne Gene legt, sondern das Gesamtgenom betrachtet. Alleine aufgrund dieser Information könnte allerdings keine Phylogenie erstellt werden.

Im Gegensatz zu den bisher betrachteten Eigenschaften auf DNA-Ebene gibt es zusätzlich noch ein physiologisches Charakteristikum. Alle Stämme in dieser Gruppe sind salzbedürftig und können je nach ihrer Herkunft zu hypersalinen (z.B. *Prosthecochloris aestuarii* CHP 3401, Vila *et al.* 2002)<sup>132</sup> bzw. marinen Bakterien (z.B. *Prosthecochloris aestuarii* DSM 271<sup>T</sup>) gerechnet werden. Sie haben das größte Salzbedürfnis der in dieser Arbeit untersuchten grünen Schwefelbakterien.

## 11.2 DIE GRUPPE 2 MIT SALZBEDÜRFTIGEN STÄMMEN

Gruppen 2 und 3 sind sich phylogenetisch am ähnlichsten unter den grünen Schwefelbakterien, obwohl das Salzbedürfnis bei Stämmen der Gruppe 3 fehlt, während es bei denen in Gruppe 2 vorhanden ist. Letztere Eigenschaft ist die deutlichste, jedoch nicht die einzige, die eine klare Unterscheidung dieser beiden Gruppen unterstützt.

<sup>131</sup> auf *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup> bezogen

<sup>132</sup> *Prosthecochloris aestuarii* CHP 3401 und CHP 3402 sowie *Pelodictyon phaeum* CIB 2401 stammen aus einem hypersalinen See (30-73 ‰). Von letzteren beiden wurden in dieser Arbeit allerdings nur die 16S-rDNA-Sequenzen verarbeitet (Abbildung 12, S. 56).

Die der Gruppe 2 zugeordneten Stämme (Tabelle 1, S. 13) sind ausnahmslos in jedem berechneten Stammbaum mit hohen Bootstrap-Werten gemeinsam angeordnet. Das gilt sowohl für die verschiedenen Sequenzen (16S rDNA, *fmoA* und FMO) als auch für verschiedene Rechenmodelle (Distanz-Matrix-, Parsimony- und Maximum-Likelihood-Methode). Auch die Unterteilung in die zwei Untergruppen um *Pelodictyon luteolum* DSM 273<sup>T</sup> und um *Chlorobium vibrioforme f. thiosulfatophilum* DSM 265<sup>T</sup> ist absolut stabil. Letzteres wird auch durch die Betrachtung des GC-Gehaltes bekräftigt. So sind hier deutliche Unterschiede zwischen den beiden Untergruppen festzustellen (Abbildung 13, S. 58).

Die Stämme der Untergruppe um *Pelodictyon luteolum* DSM 273<sup>T</sup> haben den gleichen GC-Gehalt wie die in Gruppe 4, dies ist jedoch kein Negativkriterium für die Zuordnung zu Gruppe 2. Phylogenetisch eng beieinander liegende Stämme haben in der Regel einen ähnlichen GC-Gehalt, weil die genetische Gesamtkomposition kaum voneinander abweicht. Bei Stämmen, die weiter auseinander liegen, ist dies aber genauso möglich, wenn trotz unterschiedlicher Gene die gesamte Basenzusammensetzung zufällig ähnlich ist. Gleicher GC-Gehalt kann deshalb als Indiz, nicht aber als Beweis einer nahen Verwandtschaft dienen. Haben jedoch eng verwandte Stämme einen deutlich unterschiedlichen GC-Gehalt, so wäre dies unvereinbar. Dieses trifft allerdings auf keine der untersuchten Untergruppen zu.

An einigen Signaturpositionen der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen grenzt sich Gruppe 2 vor allem auf *fmoA*-Basis gut von den anderen Stämmen ab (Tabelle 30 ff., S. 135 ff.). Zusätzlich hat sie auf *fmoA*- und FMO-Basis fast ebenso viele Positionen mit Gruppe 3 gemeinsam, was ebenfalls kongruent zur jeweiligen Stammbaumtopologie ist. Damit wird sowohl die enge Verwandtschaft beider Gruppen im Vergleich zu Gruppen 1 und 4 unterstrichen als auch deren Abgrenzung voneinander.

### 11.3 DIE GRUPPE 3 MIT LIMNISCHEN STÄMMEN

Wie im vorigen Abschnitt angedeutet, ist die Gruppe 3 phylogenetisch sehr nah verwandt mit Gruppe 2 und hat mit dieser einige Gruppensignaturen gemeinsam. An wenigen Positionen auf 16S-rDNA- und *fmoA*-Basis grenzt sie sich aber von dieser ab. Noch deutlicher wird dies bei der Betrachtung der verschiedenen Stammbäume. Hier ist die Untergruppe um *Chlorobium limicola* DSM 245<sup>T</sup> immer topologisch klar von der Gruppe 2 abgegrenzt.

Bei den beiden Typenstämmen *Pelodictyon phaeoclathratiforme* DSM 5477<sup>T</sup> und *Chlorobium phaeobacteroides* DSM 266<sup>T</sup> ist die Zuordnung allerdings etwas differenzierter zu betrachten. Beide sind in den Stammbäumen grundsätzlich auf die ein oder andere Weise benachbart und besitzen einen sehr ähnlichen GC-Gehalt von 48-49 mol%, der mit keiner anderen der untersuchten Stämme übereinstimmt. Auf 16S-rDNA-Basis sind sie eindeutig sowohl bei Betrachtung der Stammbäume als auch des Signaturbereichs zu Gruppe 3 zu rechnen.

Auf *fmoA*- und FMO-Signaturbasis hingegen ist eine deutliche Tendenz zu Gruppe 2 zu erkennen. Beide Stämme stimmen nicht in allen Gruppensignaturen mit der Gruppe 3 überein.

In allen *fmoA*-Stammbäumen, die mit der Distanz-Matrix-Methode berechnet wurden, liegen *Pelodictyon phaeoclathratiforme* DSM 5477<sup>T</sup> und *Chlorobium phaeobacteroides* DSM 266<sup>T</sup> topologisch in der Gruppe 3, jedoch nahe an deren Basis. Bei Verwendung der zwei alternativen Berechnungsmethoden hingegen (Parsimony und Maximum-Likelihood) befindet sich *Pelodictyon phaeoclathratiforme* DSM 5477<sup>T</sup> näher bei Gruppe 2. Dieses gilt ebenso für die Stammbäume der FMO-Sequenzen, die mit der Distanz-Matrix-Methode berechnet wurden. Generell haben die beiden Typenstämme niedrigere Bootstrap-Werte als alle anderen Gruppenmitglieder von 2 und 3.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass aufgrund der Ergebnisse auf 16S-rDNA- und *fmoA*-Basis sowie bei der Betrachtung der Salzbedürftigkeit (beide Stämme sind limnischer Herkunft) eine Zuordnung von *Pelodictyon phaeoclathratiforme* DSM 5477<sup>T</sup> und *Chlorobium phaeobacteroides* DSM 266<sup>T</sup> zu Gruppe 3 gerechtfertigt ist. Die damit nicht ganz konform gehenden Ergebnisse vor allem auf FMO-Basis können auf diese Weise erklärt werden, dass beide Typenstämme wahrscheinlich ein intermediäres Bindeglied zwischen den eng verwandten Gruppen 2 und 3 darstellen.

#### 11.4 DIE GRUPPE 4 MIT LIMNISCHEN UND SALZBEDÜRFTIGEN STÄMMEN

Mit allen angewandten phylogenetischen Berechnungsmethoden ergibt sich eine deutlich abgegrenzte Gruppe 4, die sich in zwei Bereiche aufspaltet. Der eine umfasst die limnischen Arten um *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup> und um *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* DSM 249<sup>T</sup>, der andere stellt die salzbedürftige Untergruppe um *Chlorobium chlorovibrioides* UdG 6026 dar (Figueras *et al.* 1997).

Während sich die salzbedürftigen Stämme in den verschiedenen Stammbäumen (16S rDNA, *fmoA* und FMO) grundsätzlich eng zusammen gruppieren und auf 16S-rDNA-Basis Gruppensignaturen besitzen, liegen die limnischen Vertreter nur in den *fmoA*- und FMO-Stammbäumen nah beieinander. Auf 16S-rDNA-Basis hingegen sind sie etwas verstreuter. Hier bildet *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* DSM 249<sup>T</sup> zusammen mit *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* 1430 eine Abzweigung, *Clathrochloris sulfurica* 1 eine andere und die Untergruppe um *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup> einen dritten Ast (Abbildung 12, S. 56). Diese münden nicht direkt ineinander, sondern treffen jeweils auf den Basis-Ast der salzbedürftigen Untergruppe.

Hier liegt jedoch kein Widerspruch zu den Ergebnissen auf *fmoA*- bzw. FMO-Basis vor. Die Topologie deutet dort lediglich auf eine engere Verwandtschaft zwischen den limnischen Stämmen hin als auf 16S-rDNA-Basis errechnet wurde. Solche Variationen bei einem phylogenetischen Vergleich völlig unterschiedlicher Gene sind dadurch erklärbar, dass die Berechnungen letztlich auf Theorien (Algorithmen) beruhen, mit denen ein Modell der Evolution aufgebaut wird.

Gruppensignaturen finden sich ebenfalls nur auf *fmoA*- (6 Positionen) und FMO-Basis (1 Position), nicht jedoch bei der Betrachtung der 16S-rDNA-Sequenzen, was absolut kongruent zu den Stammbaumtopologien ist. Alle untersuchten Vertreter der Gruppe 4 haben einen GC-Gehalt von 56-58 mol%. Dies kann als Indiz für deren Verwandtschaft gelten, allerdings nicht als Beweis.

Es kann von der Annahme ausgegangen werden, dass alle grünen Schwefelbakterien von marinen Arten abstammen (Gruppe 1), weil diese die größte Distanz zu den übrigen aufweisen (Imhoff 2001). Wahrscheinlich sind die salzbedürftigen Vertreter insgesamt evolutiv älter als die limnischen Stämme. Die nicht-marinen salzbedürftigen Arten stellen in der Evolution wahrscheinlich das Bindeglied zwischen Süß- und Meerwasser-Stämmen dar (Kapitel 12.2, S. 123). Diese Theorie wird dadurch verdeutlicht, dass man in den phylogenetischen Stammbäumen die salzbedürftigen, hypersalinen und marinen Arten miteinander verbindet, wie es in dieser Arbeit bei jeder Darstellung gemacht wurde (rote Linien). Aus Gruppe 1 hervorgehend haben sich nach dieser Vorstellung die beiden salzbedürftigen Äste (Gruppe 2 und die Untergruppe in 4) gebildet. Aus diesen wiederum gingen schließlich die limnischen Vertreter der grünen Schwefelbakterien hervor.

Wenn die Stammbäume auf *fmoA*- bzw. FMO-Basis die tatsächliche Evolution besser darstellen, wären die limnischen Vertreter aus einer Ursprungsart hervorgegangen. Die 16S-rDNA-Phylogenie unterstützt hingegen die Annahme, dass die Entwicklung der Süßwasserarten in Gruppe 4 durch mehrere evolutive Ereignisse vorangetrieben wurde.

## 11.5 VORSCHLÄGE FÜR TAXONOMISCHE NEUORDNUNGEN

Aufgrund der umfangreichen phylogenetischen Daten und der daraus abgeleiteten Erkenntnisse ist es vertretbar, die bisherige Taxonomie in einigen Punkten in Frage zu stellen und neue Vorschläge zu machen (Figueras *et al.* 1997; Overmann & Tuschak 1997; Imhoff 1999, 2002; Alexander *et al.* 2002).

Bevor Reinkulturen zur Verfügung standen, wurden phototrophe Bakterien ausschließlich aufgrund morphologischer Kriterien benannt und identifiziert (Vorhandensein von Gasvesikeln, Beweglichkeit der Bakterien, Zellform). Als es möglich war viele Arten im Labor zu züchten, wurde die Differenzierung der Gattungen der Chlorobiaceae nach physiologischen, biochemischen und zytologischen Kriterien vorgenommen (Pfennig 1977, 1989a, 1989b). Sehr anschaulich kann dies an den folgenden Beispielen erläutert werden. Zum Vergleich eignet sich am besten der 16S-rDNA-Stammbaum in Abbildung 12 (S. 56), der insgesamt die größte Anzahl an Sequenzen grüner Schwefelbakterien enthält (für manche Stämme existierten allerdings nur *fmoA*-Daten). Die Gruppeneinteilung, die nach Auswertung der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse vorgenommen wurde, ist übersichtlich in Tabelle 1 (S. 13) dargestellt.

Die Art *Chlorobium vibrioforme* wurde neben anderen Merkmalen aufgrund der grün<sup>133</sup> resultierenden Pigmentkomposition (Gattungsname), der vibrioiden Zellform (Artbezeichnung) und dem Salzbedürfnis charakterisiert. Die Unterart *Chlorobium vibrioforme f. thiosulfatophilum* kennzeichnet zusätzlich die Fähigkeit zur Verarbeitung von Thiosulfat. Nach den in dieser Arbeit gewonnenen phylogenetischen Ergebnissen kommen aber die bisher bekannten Vertreter dieser Art in mehreren Gruppen vor. So sind *Chlorobium vibrioforme* CHP 3402 und der Typenstamm DSM 260<sup>T</sup> in der marinen/hypersalinen Gruppe 1. *Chlorobium vibrioforme* DSM 261, DSM 262 und *Chlorobium*

---

<sup>133</sup> Es wird hier der Übersichtlichkeit wegen nicht genauer auf die Pigmentkomposition eingegangen (Bacteriochlorophyll *c*, *d* oder *e*; siehe Einleitung, S. 1 *ff.*), sondern lediglich zwischen braun und grün erscheinenden Reinkulturen unterschieden (Imhoff 1995).

*vibrioforme f. thiosulfatophilum* DSM 265<sup>T</sup> befinden sich hingegen in der salzbedürftigen Gruppe 2 während *Chlorobium vibrioforme* UdG 6043, *Chlorobium vibrioforme f. thiosulfatophilum* DSM 263 und NCIB 8346 in der salzbedürftige Untergruppe von 4 zu finden sind. Der GC-Gehalt ist teilweise sehr verschieden und reicht von 52,0 mol% (*Chlorobium vibrioforme* DSM 261) bis 57,1 mol% (*Chlorobium vibrioforme* DSM 262), was sicherlich ein weiteres Argument gegen deren Zugehörigkeit zu einer gemeinsamen Art darstellt.

Ganz ähnlich trifft dieses auf die wohl bekannteste Art *Chlorobium limicola* (grün, stäbchenförmig, limnisch) und deren Unterart *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* zu (Verwertung/Oxidation von Thiosulfat). Die zugehörigen Stämme kommen sowohl in der limnischen Gruppe 3 vor (*Chlorobium limicola* DSM 245<sup>T</sup>, DSM 246, DSM 247 und DSM 248 sowie *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* 1630 und 9330), als auch im limnischen Teil der Gruppe 4 (*Chlorobium limicola* UdG 6038, UdG 6040, UdG 6041, UdG 6042 und UdG 6045 sowie *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* DSM 249<sup>T</sup>, DSM 257 und 1430). Der GC-Gehalt reicht von 51,0 mol% (*Chlorobium limicola* DSM 245<sup>T</sup>) bis 58,1 mol% (*Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* DSM 249<sup>T</sup>).

Die braunen vibrioiden salzbedürftigen Stämme *Chlorobium phaeovibrioides* DSM 1678 (Gruppe 1) sowie *Chlorobium phaeovibrioides* DSM 269<sup>T</sup>, DSM 270 und UdG 6035 (Gruppe 2) können wohl ebenso nicht zu einer Art gerechnet werden.

Die untersuchten Stämme von *Chlorobium phaeobacteroides* (braun, stäbchenförmig, limnisch) finden sich nicht nur in Gruppe 3 (*Chlorobium phaeobacteroides* DSM 266<sup>T</sup>, DSM 1855, UdG 6046, UdG 6047 und UdG 6051) sondern auch in Gruppe 4 (*Chlorobium phaeobacteroides* 1549 und DSM 1677).

Auf der anderen Seite gibt es Stämme, die nicht nur nahezu identische 16S-rDNA- sondern auch fast gleiche *fmoA*-Sequenzen haben, bisher aber zu ganz verschiedenen Arten gezählt wurden. Als Beispiel dient hier eine Untergruppe von 2 (*Chlorobium vibrioforme* DSM 261, *Chlorobium vibrioforme f. thiosulfatophilum* DSM 265<sup>T</sup> sowie *Chlorobium phaeovibrioides* DSM 269<sup>T</sup> und DSM 270), deren Similarität untereinander auf 16S-rDNA-Basis größer ist als 99,7 % (Tabelle 33, S. 138). Interessanterweise sind zwar alle diese Stämme salzbedürftig und vibrioid und haben einen ähnlichen GC-Gehalt von 52,0-53,5 mol%, aber die beiden ersteren wachsen als grüne Kulturen während die beiden letzteren braun erscheinen. *Chlorobium vibrioforme f. thiosulfatophilum* DSM 265<sup>T</sup> kann zudem als einziger dieser Stämme Thiosulfat verwerten.

Ähnliches gilt für die sehr nah verwandten Stämme *Chlorobium vibrioforme* DSM 260<sup>T</sup> und *Chlorobium phaeovibrioides* DSM 1678 (Gruppe 1, Si = 99,3 %, 16S rDNA), bei denen erstere Kultur grün und letztere braun erscheint. An diesen Beispielen ist zu sehen, dass das phänotypische Merkmal Pigmentkomposition und die physiologische Eigenschaft Thiosulfatverarbeitung nicht zur Unterscheidung von Arten herangezogen werden können.

Diese Ergebnisse haben somit weitreichende Konsequenzen für die Klassifizierung der grünen Schwefelbakterien. Phylogenetische Untersuchungen auf 16S-rDNA-, *fmoA*- und FMO-Basis sowie die Betrachtung des GC-Gehaltes und der Salzbedürftigkeit der Stämme (Imhoff 2001) haben sich als verlässliche Kriterien herausgestellt, um Verwandtschaftsbeziehungen aufzustellen. Andere hier nicht

betrachtete Eigenschaften, die eventuell für eine taxonomische Einteilung herangezogen werden könnten, sind Lipid- und Fettsäure-Zusammensetzungen der Bakterienmembranen (Imhoff & Bias-Imhoff 1995).

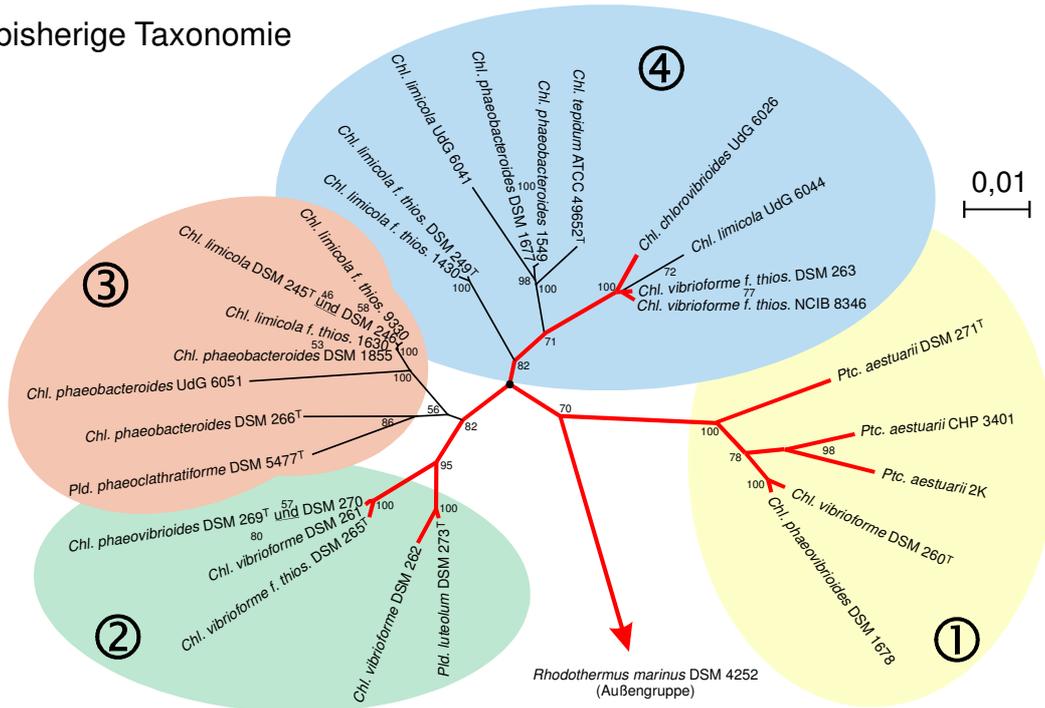
Die folgenden Vorschläge zu taxonomischen Umordnungen (Abbildung 31) und neuen Bezeichnungen basieren auf Daten dieser Arbeit und sind in Kooperation mit J. F. Imhoff (IfM, Kiel) gemacht worden (Imhoff 1999, 2002; Alexander *et al.* 2002).

### 11.5.1 Gattungen auf Basis der phylogenetischen Gruppen

Die phylogenetischen Gruppen, die in Tabelle 1 (S. 13) aufgeführt sind, können sehr gut zur Neudefinition von Gattungsgrenzen herangezogen werden. Nach Beachtung der taxonomischen Regeln sind Namen zunächst an den Typenstamm gebunden. Erst wenn Konfusionen mit anderen schon vergebenen Bezeichnungen auftreten, muss auch ein Typenstamm umbenannt und eventuell als solcher gestrichen werden (Abbildung 31). Alle Similaritätswerte dieses Abschnitts beziehen sich auf die 16S rDNA und sind in Tabelle 33 (S. 138) nachzulesen.

Die marine/hypersaline Gruppe 1 ist prädestiniert, die Gattung *Prosthecochloris* zu repräsentieren, mit *Prosthecochloris aestuarii* DSM 271<sup>T</sup> als Typenstamm der Gattung. Die Similarität dieser Art zu den restlichen Gruppenmitgliedern reicht von 95,8-97,3 % und ist damit in gutem Einklang mit der Definition der Gattungsgrenze von 95 % auf 16S-rDNA-Basis. Nach den Regeln des „International code of nomenclature of bacteria“ (Lapage *et al.* 1992) wird damit der Artname *Chlorobium vibrioforme* ganz verschwinden, weil der Typenstamm dieser Art (*Chlorobium vibrioforme* DSM 260<sup>T</sup>) nicht mehr zur Gattung *Chlorobium* sondern zu *Prosthecochloris* gehören wird.

bisherige Taxonomie



neue Taxonomie

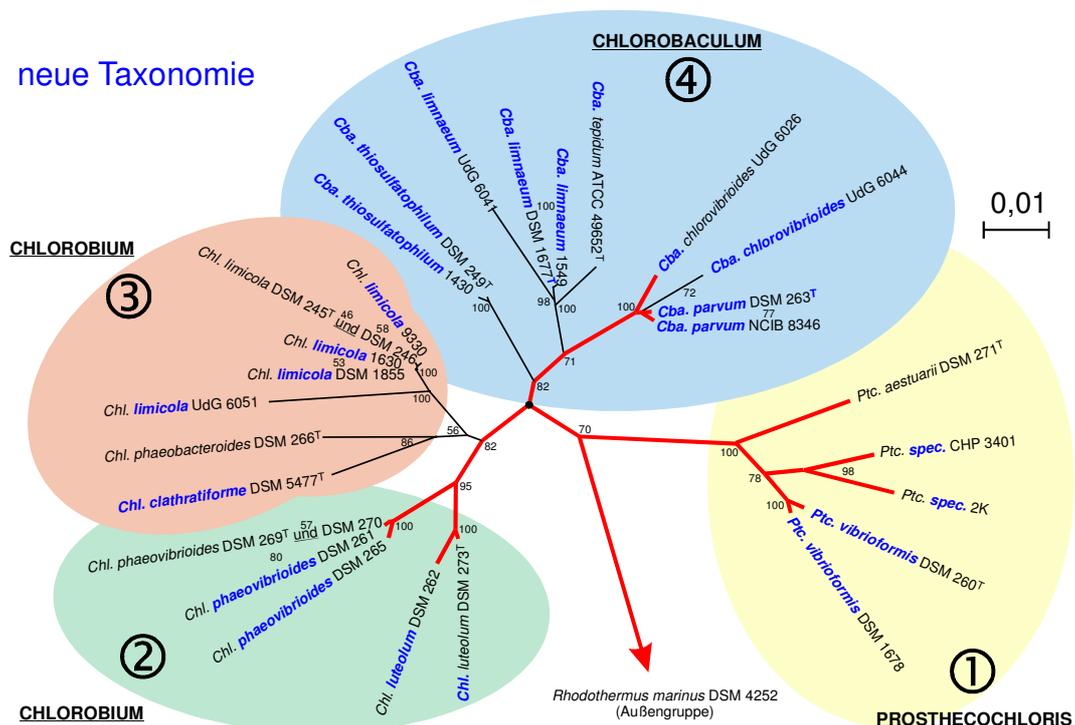


Abbildung 31: 16S-rDNA-Stammbaum vor und nach der taxonomischen Neuordnung

Radialer phylogenetischer Stammbaum auf der Grundlage von 16S rDNA (oben: bisherige Taxonomie, unten: neue Taxonomie). Die Topologie basiert auf Sequenzlängen von ca. 1240 nt, die mit Primer-Paar F-99-GSB/R-1369 erhalten (eigene Daten) oder darauf zugeschnitten wurden (Sequenzen von EMBL-EBI). Die Berechnungen wurden mit der Distanz-Matrix-Methode durchgeführt (basierend auf dem Algorithmus von Jukes & Cantor 1969). Rote Linien verbinden salzbedürftige Arten. Bootstrap-Werte sind prozentual. Die Maßangaben kennzeichnen die phylogenetische Distanz. Blau hervorgehoben sind die taxonomischen Vorschläge.

Weiterhin sollte die Gattungsbezeichnung *Chlorobium* für alle Bakterien gelten, die mit *Chlorobium limicola* DSM 245<sup>T</sup> näher verwandt sind, wie die Vertreter der limnischen Gruppe 3. Deren Similarität zum Typenstamm liegt auf 16S-rDNA-Basis je nach Stamm bei 95,9-99,9 %. Möglicherweise ist es sinnvoll, auch noch die Stämme der nah verwandten salzbedürftigen Gruppe 2 hier einzubeziehen. Diese haben nämlich eine Similarität zu *Chlorobium limicola* DSM 245<sup>T</sup>, die von 96,3-96,8 % geht. Hierbei wurde der Stamm *Chlorobium phaeovibrioides* UdG 6035 (Si = 93,1 %) bewusst ausgeklammert, da die relativ hohe Distanz (langer Ast im Stammbaum) auf eine größere Anzahl an unbestimmten Nukleotiden in der 16S-rDNA-Sequenz aus der Datenbank zurückzuführen ist (vergleiche auch Kapitel 8.1.3, S. 59).

Aufgrund der phylogenetischen Distanz zum Typenstamm *Chlorobium limicola* DSM 245<sup>T</sup> ist es nicht mehr vertretbar, die Stämme der Gruppe 4 zu dieser Gattung zu rechnen. Deshalb müssen sie zu einer neuen Gattung gezählt werden. Als Vorschlag soll der Name *Chlorobaculum* neu eingeführt werden, wobei *Chlorobium tepidum* als *Chlorobaculum tepidum* die Typenart dieser Gattung sein soll, mit ATCC 49652<sup>T</sup> als Typenstamm dieser Art. Die Vertreter der Gruppe 4 haben eine Similarität von 95,1-98,5 % zu diesem Referenzorganismus. *Clathrochloris sulfurica* 1, als einziger Stamm der Gruppe 4 nicht mit der Gattungsbezeichnung *Chlorobium* versehen, kann trotz seiner Similarität von 95,1 % zu *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup> eventuell weiterhin als Vertreter einer eigenen Gattung angesehen werden, weil die Distanz recht hoch ist. Von diesem Stamm lag leider nur eine 16S-rDNA-Sequenz aus der Datenbank vor, weshalb zur Unterstützung seiner phylogenetischer Zuordnung keine Einordnung auf *fmoA*- und FMO-Basis vorgenommen werden konnte.

Letztlich wird der eindeutig von den anderen Gruppen entfernte Stamm *Chloroherpeton thalassium* (Gruppe 5) nach der Reorganisierung unzweifelhaft seinen Status als eigene Gattung behalten.

## 11.5.2 Taxonomische Neuordnung von Arten

Unter den Arten grüner Schwefelbakterien gibt es viele, die in den verschiedenen phylogenetischen Stammbäumen (16S rDNA, *fmoA*, FMO) sehr nah verwandt sind und trotzdem unterschiedliche Namen tragen. Dadurch wird nach der im vorigen Abschnitt eingeführten Gattungsgrenzen eine Änderung der Benennung oft nicht zu vermeiden sein (Abbildung 31). Alle Vorschläge basieren zunächst auf den phylogenetischen Stammbäumen der 16S rDNA, jedoch wurden in die Überlegungen stets auch deren Anordnungen in den *fmoA*- und FMO-Stammbäumen mit einbezogen, wenn dies auch nicht immer explizit betont wird. Es erfolgte nur, wenn die Phylogenie auf Basis des funktionellen Gens bzw. des Proteins einen besonderen Beitrag zur Klärung lieferte. Alle in diesem Abschnitt angegebenen Similaritätswerte sind auf die 16S rDNA bezogen und der Tabelle 33 (S. 138) entnommen.

In Gruppe 1 könnte *Prosthecochloris aestuarii* 2K seine Artbezeichnung zwar noch tragen (Si = 97,3 % zu *Prosthecochloris aestuarii* DSM 271<sup>T</sup>), jedoch steht *Prosthecochloris aestuarii* CHP 3401 näher beim Stamm 2K (Si = 98,1 %) als bei DSM 271<sup>T</sup> (96,5 %). Mit letzterem kann CHP 3401 nicht mehr zu einer Art gezählt werden. Deshalb ist es wegen der Nähe von 2K und CHP 3401 sinnvoller,

diese beiden als eine gemeinsame Art zusammenzufassen. Weil kein Typenstamm in einer mikrobiologischen Sammlung hinterlegt wurde, bleibt die Artbezeichnung noch offen (*Prosthecochloris spec.*).

Wie im vorigen Abschnitt schon erwähnt, muss nach der Neuordnung der Gattungen die Art *Chlorobium vibrioforme* gestrichen werden, weil deren Typenstamm DSM 260<sup>T</sup> nicht zu *Chlorobium* gehört (Gruppe 2/3) sondern in Gruppe 1 liegt und zu *Prosthecochloris* zu rechnen ist. Somit ist vorzuschlagen, dieses Bakterium als *Prosthecochloris vibrioformis* zu reklassifizieren, wobei DSM 260 als Typenstamm dieser Art und DSM 1678 (bisher *Chlorobium phaeovibrioides*) als zusätzlicher Stamm gelten soll.

In Gruppe 2 gehören *Pelodictyon luteolum* DSM 273<sup>T</sup> und *Chlorobium vibrioforme* DSM 262 zu einer gemeinsamen Art (Si = 99,4 %). Der Typenstamm müsste daher die Gattungsbezeichnung *Chlorobium* bekommen und könnte als *Chlorobium luteolum* DSM 273<sup>T</sup> weiterhin als Referenzstamm dieser Art dienen. Damit würde DSM 262 automatisch auch zu dieser Art gehören.

In derselben Gruppe befinden sich auch *Chlorobium phaeovibrioides* DSM 269<sup>T</sup> und DSM 270 sowie *Chlorobium vibrioforme* DSM 261 und *Chlorobium vibrioforme f. thiosulfatophilum* DSM 265<sup>T</sup>, deren Similarität untereinander größer als 99,7 % ist. Sie gehören deshalb sicherlich alle vier zu einer einzigen Art. Die Bezeichnung *Chlorobium vibrioforme* würde nach der Neuordnung gestrichen und damit hätte auch die Unterart *thiosulfatophilum* keine Existenzberechtigung mehr. Damit sollte der bisherige Typenstamm DSM 265 als solcher gestrichen werden. Sinnvoll wäre es also, DSM 269 als alten und neuen Typenstamm der Art *Chlorobium phaeovibrioides* anzusehen. Alle vorgenannten Stämme würden dann dieser zugeordnet.

In Gruppe 3 sollte *Chlorobium limicola* DSM 245<sup>T</sup> der Typenstamm für die Gattung *Chlorobium* (Gruppe 2/3) und somit auch als Artbezeichnung namensgebend für die nahe verwandten Stämme *Chlorobium limicola* DSM 246, *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* 1630 und 9330 sowie *Chlorobium phaeobacteroides* DSM 1855 sein, die untereinander eine Similarität von mindestens 99,7 % besitzen. Zusätzlich ist es vertretbar, *Chlorobium phaeobacteroides* UdG 6051 auch zu *Chlorobium limicola* UdG 6051 zu reklassifizieren, obwohl die Similarität zu *Chlorobium limicola* DSM 245<sup>T</sup> nur 96,6 % beträgt. Diese recht große Distanz (langer Ast im Stammbaum) der Sequenz aus der Datenbank ist auf die erhöhte Anzahl unbestimmter Basen zurückzuführen. Wie schon im Kapitel 8.1.3 (S. 59) ausgeführt, kann die Distanz deutlich erniedrigt werden, wenn die Spalten im Alignment gestrichen werden, die unbestimmte Basen enthalten. Wenn danach eine phylogenetische Berechnung mit der Distanz-Matrix-Methode durchgeführt wird (basierend auf Jukes & Cantor 1969), dann verkürzt sich der Ast von *Chlorobium phaeobacteroides* UdG 6051 im Stammbaum deutlich sichtbar (Abbildung 14, S. 61). Außerdem zeigt die Berechnung von Stammbäumen auf *fmoA*- und *FMO*-Basis die große Verwandtschaft von UdG 6051 zu *Chlorobium limicola* DSM 245<sup>T</sup> und den anderen Vertretern der zugehörigen Untergruppe sehr signifikant auf (Abbildung 15 f., S. 64 bzw. 70). Die *fmoA*-Sequenz von UdG 6051 enthielt praktisch keine unbestimmten Basen.

Die beiden restlichen Typenstämme *Chlorobium phaeobacteroides* DSM 266<sup>T</sup> und *Pelodictyon phaeoclathratiforme* DSM 5477<sup>T</sup> sind phylogenetisch weit genug voneinander entfernt, um nicht zu einer Art gezählt zu werden (96,6 %). Damit könnten sie jeweils den Status als Referenzorganismus beibehalten, wobei allerdings DSM 5477 wegen der Zugehörigkeit zu Gruppe 3 zu *Chlorobium* reklassifiziert werden müsste. Dabei könnte auch der Arname *phaeoclathratiforme* zu *clathratiforme* transferiert werden. Letztlich hieße dieser Stamm dann *Chlorobium clathratiforme* DSM 5477<sup>T</sup>. Der zu diesem auf 16S-rDNA-Basis nahezu identische Organismus *Pelodictyon clathratiforme* PG (Si = 99,7 %) kann auf jeden Fall als gleiche Art angesehen und zu *Chlorobium clathratiforme* PG umbenannt werden (allerdings lag für diesen Stamm leider keine *fmoA*-Sequenz vor).

Aufgrund des erforderlichen Gattungstransfers zu *Chlorobaculum* in Gruppe 4 (außer eventuell *Clathrochloris sulfurica* 1) wäre es notwendig, die beiden bisherigen Typenstämme *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup> und *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* DSM 249<sup>T</sup> umzubenennen. Ersterer würde lediglich einen neuen Gattungsnamen bekommen (*Chlorobaculum tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup>), während letzterer komplett reklassifiziert werden müsste. Da dieser Stamm keine Unterart von *Chlorobium limicola* DSM 245<sup>T</sup> ist (Si = 95,9 %), sollte die Artbezeichnung *limicola f. thiosulfatophilum* zu *thiosulfatophilum* transferiert werden, um Verwechslungen auszuschließen. Das Resultat wäre dann *Chlorobaculum thiosulfatophilum* DSM 249<sup>T</sup>. Dieser Organismus hätte mit dem auf 16S-rDNA- (Si = 99,8 %) und *fmoA*-Basis fast identischen Stamm 1430 einen weiteren Vertreter.

Da in diesem Punkt die phylogenetischen Ergebnisse auf *fmoA*- und FMO-Basis etwas zu den 16S-rDNA-Berechnungen differieren (Abbildung 15 f., S. 64 bzw. 70), besteht hier Erklärungsbedarf. So ist in den Stammbäumen, die auf dem funktionellen Gen bzw. dem Protein beruhen, die Verwandtschaft des Stammes DSM 249<sup>T</sup> und 1430 zu ATCC 49652<sup>T</sup> viel größer als auf 16S-rDNA-Basis, womit eine Zugehörigkeit zu einer einzigen Art gerechtfertigt wäre. Da aber die GC-Gehalte von DSM 249<sup>T</sup> und 1430 bei 58,1 mol% liegen und im Vergleich dazu *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup> einen deutlich niedrigeren Wert von 56,5 mol% aufweist, ist die Trennung in zwei verschiedene Arten sinnvoller.

Möglicherweise kommt diese Diskrepanz dadurch zustande, dass ein horizontaler Gentransfer des funktionellen Gens *fmoA* zwischen den Arten um *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* DSM 249<sup>T</sup> und denen um *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup> in der Evolution stattgefunden hat. Wenn also diese insgesamt zwar unterschiedlichen Organismen (siehe GC-Gehalt und 16S rDNA) durch so ein Ereignis zu sehr ähnlichen Sequenzen des *fmoA*-Gens kamen, wäre dieser Sachverhalt damit erklärt.

Diese These unterstützt noch ein weiterer Stamm, von dem leider keine 16S-rDNA-Sequenz vorlag. Es handelt sich hierbei um *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* DSM 257. Dessen GC-Gehalt liegt sogar nur bei 52,5 mol% und unterscheidet sich dabei sowohl von *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* DSM 249<sup>T</sup> als auch von *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup>. Seine *fmoA*- und FMO-Sequenzen sind allerdings mit DSM 249<sup>T</sup> und 1430 nahezu identisch.

Da sowohl die 16S-rDNA- als auch die *fmoA*-Sequenzen von *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* 1430 im Gegensatz zu denen vom Stamm DSM 249<sup>T</sup> aus derselben DNA-Extraktion im Rahmen

dieser Arbeit gewonnen wurden, ist diese mögliche Fehlerquelle sicher keine Erklärung für die Unterschiede.

Die Stämme *Chlorobium phaeobacteroides* 1549 und DSM 1677 sowie *Chlorobium limicola* UdG 6041 haben zwar eine enge Verwandtschaft zu *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup> (Si = 96,6-98,4 %), sollten aber besser zu einer eigenen Art gerechnet werden (z.B. *Chlorobaculum limnaeum* 1549, DSM 1677 und UdG 6041). Das legt deren klare Abgrenzung zu ATCC 49652<sup>T</sup> in den *fmoA*- und FMO-Stammbäumen nahe. Hierfür ist die Schaffung eines neuen Typenstammes notwendig (*Chlorobaculum limnaeum* DSM 1677<sup>T</sup>).

Die salzbedürftigen Stämme in Gruppe 4 können schließlich noch in zwei Arten aufgeteilt werden. *Chlorobium chlorovibrioides* UdG 6026 müsste dazu in *Chlorobaculum chlorovibrioides* UdG 6026<sup>T</sup> umbenannt werden und wäre der Typenstamm für diese Art. Als zusätzlicher Stamm käme *Chlorobium limicola* UdG 6044 als *Chlorobaculum chlorovibrioides* UdG 6044 (Si = 97,8 % zu UdG 6026) dazu. Dieser Stamm wurde als limnisch charakterisiert (Figueras *et al.* 1997), obwohl alle anderen Vertreter dieser Untergruppe salzbedürftig sind. Es ist der einzige Fall in den Untersuchungen dieser Arbeit, in dem die Salzbedürftigkeit nicht kongruent zu den phylogenetischen Ergebnissen war. Es ist deshalb denkbar, dass hier eine Verwechslung vorliegt.

Die zweite Art der salzbedürftigen Untergruppe von 4 könnten die beiden Stämme *Chlorobium vibrioforme f. thiosulfatophilum* DSM 263 und NCIB 8346 bilden. Sie haben zwar eine hohe Similarität zu UdG 6026 (Si = 98,2-98,4 %), die eine Zuordnung zu der gemeinsamen neuen Art *Chlorobaculum chlorovibrioides* rechtfertigen würde. Durch eine bei beiden Stämmen vorkommende Deletion einer Aminosäure in der FMO-Proteinsequenz (Tabelle 27, S. 73) ist es aber denkbar, sie in einer eigenen Art zusammenzufassen (*Chlorobaculum parvum* DSM 263<sup>T</sup> und NCIB 8346).

## 12 DISKUSSION DER STANDORTERGEBNISSE

Das primäre Ziel der Untersuchung von Umweltproben war weniger die Charakterisierung spezieller Standorte sondern der Versuch, die Diversität und Verteilung grüner Schwefelbakterien in salzhaltigen Gewässern abzuschätzen. Die angewandten genetischen Methoden sollten gezielt grüne Schwefelbakterien nachweisen (auf 16S-rDNA- und *fmoA*-Basis), um ein möglichst hoch auflösendes Bild der genetischen Vielfalt zu erhalten. Bisher wurden solche Ergebnisse mehr oder weniger zufällig bei allgemeinen genetischen Standortuntersuchungen erhalten (Gordon & Giovannoni 1996, Øvreås *et al.* 1997). Auf der anderen Seite wurden mit selektiven Anzuchtbedingungen Reinkulturen grüner Schwefelbakterien gewonnen (Trüper 1970, Vila *et al.* 2002). Diese Methode hat den Vorteil, dass die isolierten Stämme nicht nur für genetische sondern auch für mikroskopische, physiologische und mikrobiologische Untersuchungen zur Verfügung stehen. Nachteile sind die lange Vorlaufzeit bis eine Reinkultur wirklich als solche zu bezeichnen ist und die beschränkte Selektivität je nach Anzuchtbedingungen. Das bedeutet, dass nicht alle Bakterien (mit bisherigen Methoden) kultivierbar sind.

Ein anderer Ansatz ist der spezifische Nachweis grüner Schwefelbakterien durch *In-situ*-Hybridisierungen mit fluoreszierend markierten Oligonukleotid-Sonden (Tuschak *et al.* 1999). Hierbei

kann das Vorhandensein von Chlorobiaceae-Arten in Umweltproben mit dem Mikroskop überprüft werden. Die Charakterisierung ist dann allerdings auf morphologische Kriterien beschränkt, die für taxonomische Einordnungen nur eingeschränkt herangezogen werden können (Kapitel 11.5, S. 112). Mit dieser Methode kann somit keine Phylogenie betrieben werden. Eventuell ist es möglich neue Gruppen zu erkennen, falls diese deutliche mikroskopische Unterschiede zu den bisherigen Arten aufweisen.

Der Vorteil der in dieser Arbeit angewandten gezielten genetischen Suche ist die Schnelligkeit, mit der Ergebnisse erhalten werden. Weiterhin ist es möglich, auch schlecht oder bisher nicht kultivierbare Bakterienstämme zu erfassen. Ein gewisser Nachteil ist allerdings, dass Sequenzen verschiedener Gene (16S rDNA und *fmoA*) nicht eindeutig einem Stamm zugeordnet werden können, was die Vergleichbarkeit in phylogenetischen Stammbäumen einschränkt. Dies bedeutet, dass keine Information darüber vorliegen kann, ob zwei Sequenzen aus ein und demselben Stamm gewonnen wurden. Im phylogenetischen Vergleich von 16S-rDNA- und *fmoA*-Stammbäumen der Reinkulturen hingegen konnten die Resultate gegenseitig verglichen und abgesichert werden. Dennoch war es vertretbar, aufgrund der geringen Sequenzvielfalt in den Umweltproben gewisse Zuordnungen zu machen.

Trotz der gewünschten und notwendigen Spezifität wurde ebenso darauf geachtet, dass mit den angewandten Methoden auch Fragmente hätten amplifiziert werden können, die außerhalb der bisher bekannten Arten grüner Schwefelbakterien liegen. Das wurde schon ausführlich in Kapitel 10 (S. 103) diskutiert.

Die beobachtete Mikroheterogenität der Umweltsequenzen ist eine Eigenschaft, die nicht mit Fehlern bei der Amplifikation alleine erklärt werden kann, auch wenn dies nicht ganz auszuschließen ist. Einige der von der Referenzsequenz abweichenden Nukleotidpositionen sind sicher auf das verwendete Polymerasesystem zurückzuführen, bei dem etwa alle 10.000 bp ( $10^{-4}$ ) ein Fehleinbau während der Elongationsphase der PCR auftritt (Kapitel 3.2, S. 22). Es gab jedoch wesentlich mehr Unterschiede. Eine Beispielberechnung soll dies verdeutlichen: Die MHG-5 (Probe Sip-4, 16S) enthielt 84 Sequenzen, die bei einer durchschnittlichen Screening-Sequenzlänge von 425 nt zusammen 35.700 Nukleotide umfassen (Tabelle 42, S. 147). Bei einer geschätzten Fehlerrate von  $10^{-4}$  dürften darunter höchstens 4 (!) Fehler sein. Es wurden aber in MHG-5 an insgesamt 46 Nukleotidpositionen Unterschiede zur Referenzsequenz K-706<sup>R</sup> gefunden.

Auch einzelne Fehler bei der Sequenzierung spielen als Ursache für die beobachtete Mikroheterogenität eher eine untergeordnete Rolle. Diese würden zwar bei der Screening-Sequenzierung eventuell nicht bemerkt, weil für ein Amplifikat nur ein Durchlauf vorgenommen wurde. Deshalb wurden nicht nur die Amplifikate, welche die Referenzsequenz lieferten, sondern beispielhaft auch andere Amplifikate einer MHG komplett sequenziert (z.B. in MHG-19: K-600<sup>R</sup>, K-635, K-683 und K-686; Abbildung 26, S. 93). Durch die komplette in mehreren Schritten durchgeführte Sequenzierung, bei der jede Base mindestens zweimal in unabhängigen Sequenzier-Ansätzen gelesen wurde, können zufällig auftretende Fehlesungen ausgeglichen werden (Abbildung 7 f., S. 35). Dabei hat sich herausgestellt, dass die Basen, die beim Screening von der Referenzsequenz abwichen (Mikrohetero-

genität), genauso in der komplett durchgeführten Sequenzierung vorhanden waren. Die Fehlergrenze bei den in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungs-Sequenzierungen lag unter 0,1 % und damit deutlich niedriger als die Abweichungen, die durch Mikroheterogenitäten hervorgerufen wurden (Kapitel 3.6.1, S. 34).

## 12.1 UMWELTSEQUENZEN IN GRUPPE 1

Alle GSB-Sequenzen (16S rDNA und *fmoA*/FMO) der Ostseestandorte Stak-2, Laboe-3 und Stein-1 konnten eindeutig zu der marinen/hypersalinen Gruppe 1 gezählt werden. Die meisten davon waren sehr ähnlich zu der jeweiligen Sequenz von *Prosthecochloris aestuarii* DSM 271<sup>T</sup> (Abbildung 23, S. 85). Auf 16S-rDNA-Basis betrug die Similarität zwischen Umweltsequenzen und Typenstamm 99,3 %. Das steht auch in gutem Einklang mit den Erkenntnissen der klassischen Mikrobiologie. So ist *Prosthecochloris aestuarii* weit verbreitet und wurde schon an vielen marinen Standorten gefunden (Cohen *et al.* 1977; Gorlenko & Lebedeva 1971; Imhoff 1988; Matheron & Baulaigue 1972, 1976; Puchkova 1984). Da hierfür aber keine genetischen Informationen zur Verfügung standen, war es nicht klar, ob es sich bei den isolierten Reinkulturen nur um *Prosthecochloris aestuarii* im engeren Sinne (also nahe Verwandte des Typenstammes) oder auch um Stämme handelt, die zwar nach der vorgeschlagenen neuen Taxonomie zu der Gattung *Prosthecochloris* aber nicht zur Art *aestuarii* gerechnet werden sollten (z.B. 2K oder CHP 3401).

Am Standort Stein-1 wurden 16S-rDNA-Fragmente gefunden, die abseits der bisher bekannten Vertreter der Gruppe 1 stehen (z.B. K-207)<sup>134</sup>. Leider war es nicht möglich, auch *fmoA*-Fragmente aus dieser Probe zu isolieren.

Es gab am Standort Cviic-2 (Adria) Sequenzen, deren Vertreter K-13 darstellt, die auf 16S-rDNA-Basis so nah verwandt zu K-207 waren (Si = 97,0 %), dass man die zugehörigen Stämme eventuell einer gemeinsamen Art zuordnen könnte. In dieser Probe wurden auch *fmoA*-Fragmente gefunden (K-1011, K-1027a u. a.), die in Gruppe 1 des *fmoA*-Stammbaumes topologisch ähnlich separat stehen, wie K-13 und K-207 im 16S-rDNA-Stammbaum (Abbildung 25, S. 92). Noch deutlicher wird dies im FMO-Stammbaum (Abbildung 27, S. 95). Es kann nicht ohne Weiteres davon ausgegangen werden, dass die 16S-rDNA- und *fmoA*-Fragmente aus der Probe Cviic-2 von der gleichen Art stammten. Allerdings gibt es Indizien, die diese Annahme unterstützen.

Cviic-2 war die einzige der untersuchten Proben, die von einer Anreicherungskultur (Winogradski-Säule) stammte, die sich über viele Jahre hinweg im Labor befand und immer wieder mit H<sub>2</sub>S-Lösung nachgefüttert wurde. Die Bakterien vermehrten sich unter diesen Bedingungen sehr gut und wuchsen dicht heran. Das war wahrscheinlich auch der Grund, warum mit dieser Probe die besten Resultate bei den PCR-Amplifikationen ähnlich wie bei den Reinkulturen erzielt wurden. Durch eine derart selektive Anzucht war zu erwarten gewesen, dass die Artenvielfalt leidet und die Kultur nicht mehr den Standort repräsentiert. Künstliche Bedingungen, wie sie bei der Zucht im Labor herrschen, fördern

<sup>134</sup> Im Folgenden werden beispielhaft nur die Referenzsequenzen einer Mikroheterogenitätsgruppe angegeben. Diese wurden jeweils in die phylogenetischen Berechnungen für die Stammbäume einbezogen und sind in den Abbildungen zu finden.

meistens bestimmte Bakterienarten mehr als andere und führen zu einer Artenverarmung. Auf 16S-rDNA-Basis konnte erwartungsgemäß nur ein Sequenz-Typ ermittelt werden, der lediglich an wenigen Nukleotidpositionen variierte (Mikroheterogenität). Bei der Amplifikation der *fmoA*-Fragmente wurden immerhin noch zwei MHG gefunden, deren Vertreter besonders im FMO-Stammbaum dicht beieinander liegen (Si = 98,7 % von K-1011 und K-1027a).

Zusammengefasst würde es bedeuten, dass wahrscheinlich die Sequenzen Stein-1 K-207 und Cviic-2 K-13 (16S rDNA) sowie Cviic-2 K-1011 und K-1027 (*fmoA*) aus einer einzigen Art stammen, von der bisher anscheinend noch keine Reinkultur bekannt ist und für die es auch noch keine Bezeichnung gibt.

Vertreter des Typenstammes *Prosthecochloris aestuarii* DSM 271<sup>T</sup> scheint es an allen rein marinen Standorten zu geben; dort kommen sie wohl in großer Anzahl vor. Das gilt zumindest für eine Bakterienblüte, wie sie bei den Probenahmen herrschte. Hier scheint dieser Stamm bevorzugt zu wachsen. So konnten sowohl 16S-rDNA- (K-101, K-500, K-706) als auch *fmoA*-Fragmente (K-303, K-455, K-600, K-802) in den Proben der Ostsee und der Ostküste der USA (Atlantik) gefunden werden, die unzweifelhaft *Prosthecochloris aestuarii* DSM 271<sup>T</sup> zugeordnet werden können. Diese Sequenzen wie auch die anderen aus ihren jeweiligen MHG waren immer am häufigsten bei der Untersuchung der Klonfragmente zu finden. Das ist zwar kein Beweis dafür, dass *Prosthecochloris aestuarii* auch am Standort am häufigsten vorkommt. Ein Indiz ist es aber allemal, weil die Ostseeproben nach Entnahme nicht mit künstlichem Medium versehen wurden und auch nicht mit H<sub>2</sub>S-Lösung nachgefüttert wurden. Dadurch ist nicht zu erwarten gewesen, dass sich das Verhältnis der Bakterienarten untereinander gravierend zu der Situation am Standort unterscheiden würde. Die Atlantikproben wurden sogar direkt am Standort in Formaldehydlösung fixiert, was Kultureinflüsse gänzlich ausscheiden lässt.

Eine bevorzugte Primer-Anlagerung bei der PCR-Amplifikation ist ebenfalls nicht auszuschließen, jedoch ist der Primer auf 16S-rDNA-Basis so gewählt worden, dass alle zur Verfügung stehenden Arten grüner Schwefelbakterien an der Bindestelle die gleiche Sequenz aufwiesen. Die beiden *fmoA*-Primer hingegen sind vornehmlich auf der Basis zweier Vertreter der Gruppe 4 entwickelt worden (*Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum* DSM 249<sup>T</sup> und *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup>), wobei durch Extrapolation ihre Spezifität erweitert wurde. Wenn überhaupt sollten also eher Vertreter der Gruppe 4 einen Vorteil bei der *fmoA*-Primer-Anlagerung gehabt haben, nicht aber *Prosthecochloris aestuarii* aus Gruppe 1.

Es scheint, als ob *Prosthecochloris aestuarii* DSM 271<sup>T</sup> eine dominante Art repräsentiert, die an marinen Standorten ubiquitär vorkommt. Auf 16S-rDNA-Basis wurde eine gewisse Heterogenität gefunden. So reichen die Similaritätswerte der nah verwandten Umweltsequenzen zum Typenstamm von 98,2 % (K-100) bis 99,4 % (K-706).

Gruppe 1 repräsentiert nicht nur marine sondern auch kontinentale Arten. So befindet sich in ihr auch der Stamm *Prosthecochloris aestuarii* CHP 3401, der aus einem hypersalinen See isoliert wurde (Salada de Chiprana, Aragón, Spanien, Vila *et al.* 2002). Auf Artniveau verwandt zu dessen 16S rDNA

ist die Umweltsequenz K-902 (Bad Water, Death Valley, USA) mit einer Similarität von 97,8 %. Leider konnte aus dieser Probe keine *fmoA*-Sequenz gewonnen werden. Trotzdem ist dies ein Hinweis darauf, dass auch diese Art anscheinend nicht auf einen Kontinent beschränkt sondern an verschiedenen unabhängigen Standorten zu finden ist. Nach der neuen Taxonomie ist sie zusammen mit dem Stamm 2K zu *Prosthecochloris spec.* zu rechnen.

Die Frage, warum sehr ähnliche Sequenzen sowohl auf 16S-rDNA- als auch *fmoA*-Basis an so unterschiedlichen und weit entfernten Standorten wie Ostsee und Atlantikküste USA bzw. spanisches und amerikanisches Binnengewässer zu finden sind (Abbildung 5, S. 18), ist nur spekulativ zu beantworten. Es kommen zwei Theorien in Frage.

Zur erdgeschichtlichen Blüte der grünen Schwefelbakterien gab es wahrscheinlich flächendeckend Bedingungen, unter denen diese anaeroben phototrophen Bakterien sich entwickeln konnten. Nachdem sich in der Atmosphäre der Sauerstoff ansammelte, wichen sie immer weiter zurück, bis sie heutzutage nur noch in wenigen endemischen Gebieten zu finden sind. Es wäre denkbar, dass bestimmte Arten grüner Schwefelbakterien sich im Laufe der Erdgeschichte trotz einer geographischen Isolation vorher zusammenhängender Standorte evolutiv kaum weiterentwickelt haben und deshalb auch in entfernten Gebieten noch nahezu identische Sequenzen zu finden sind. Nach dieser Theorie hätte es dann zur Blüte der grünen Schwefelbakterien dann Bakterientypen gegeben, die bevorzugt in salzhaltigen Binnengewässern vorkamen (z.B. CHP 3401 und K-902) während andere im Meer lebten (DSM 271<sup>T</sup> und Verwandte).

Eine andere denkbare Erklärung wäre, dass immer wieder ein Austausch von Bakterien zwischen endemischen Standorten vorkommt. Das kann zwischen der Ostsee und der Ostküste Amerikas sicher durch Schiffe passieren. Wie allerdings aus dem Bad Water in den USA Bakterien in einen See in Spanien gekommen sein sollen oder umgekehrt, ist schwer vorstellbar. Eventuell spielen hier Vögel eine Rolle, wie es bei der Verbreitung bestimmter schwimmender Teichpflanzen bekannt ist (z.B. die kleine Wasserlinse, *Lemna minor*). Allerdings wäre ein solcher Transfer nur unter bestimmten Bedingungen möglich, weil grüne Schwefelbakterien sehr empfindlich auf Sauerstoff reagieren und keine Dauerstadien aufweisen.

## 12.2 UMWELTSEQUENZEN IN GRUPPE 4

Nur aus den Atlantikproben wurden Sequenzen gefunden, die topologisch zu Gruppe 4 gehören. Dort reihen sie sich alle um die salzbedürftige Untergruppe von *Chlorobium chlorovibrioides* UdG 6026. Diese erfährt damit eine deutliche Steigerung ihrer Sequenzvielfalt im Vergleich zu den bisher bekannten Sequenzen aus Reinkulturen. Das gilt vor allem auf 16S-rDNA- aber auch auf *fmoA*- bzw. FMO-Basis.

Besonders interessant ist hier die Sequenz K-153, die im 16S-rDNA-Stammbaum dicht an der Basis der Gruppe 4 angesiedelt ist (Abbildung 23, S. 85). Sie könnte zu einem Stamm gehören, der ein Bindeglied zwischen der Gruppe 1 und 4 darstellt. Dies wird unterstützt durch die Betrachtung von Gruppensignaturen. So wird die Sequenz im Stammbaum zwar phylogenetisch noch zur Gruppe 4

gerechnet, sie hat aber auch 13 typische Signaturpositionen mit Gruppe 1 gemeinsam (Tabelle 30, S. 135). Das wäre ein weiteres Indiz dafür, dass die marine/hypersaline Gruppe 1 die evolutiv älteste unter den grünen Schwefelbakterien ist, aus der sich die salzbedürftige Untergruppe von 4 und die Gruppe 2 entwickelt haben, aus denen dann wiederum die limnischen Arten hervorgegangen sind (Kapitel 11.4, S. 111).

### 12.3 EINE NEUE GRUPPE GRÜNER SCHWEFELBAKTERIEN ?

Ein kleine Gruppe der ermittelten 16S-rDNA-Sequenzen konnte bei einem Datenbankabgleich weder den grünen Schwefelbakterien noch einer anderen Bakteriengruppe eindeutig zugeordnet werden (Abbildung 29, S. 99). Sie wurde überwiegend in der Ostseeprobe Stein-1 aber auch in Sip-4 (Atlantikküste der USA) gefunden. Insgesamt konnte diese Gruppe sehr selten nachgewiesen werden. Dieses muss aber nicht mit deren tatsächlicher Häufigkeit am Standort zusammenhängen. Die phylogenetische Entfernung zu den fünf Gruppen grüner Schwefelbakterien ist vielmehr so groß, dass wahrscheinlich die Bindung des Primers F-99-GSB nicht mehr optimal war.

Leider konnten mit den *fmoA*-Primern keine Fragmente gewonnen werden, die im positiven Fall aufgrund der Exklusivität dieses Gens eine Zuordnung zu den grünen Schwefelbakterien eindeutig ermöglicht hätten. So bleibt unklar, ob diese Gruppe entweder kein *fmoA*-Gen besitzt, oder ob dessen Amplifikation mit den angewandten Methoden nicht möglich war. Man kann aber sicher die Vermutung äußern, dass diese bisher anscheinend nicht durch Reinkulturen vertretene Gruppe ihren phylogenetischen Platz intermediär zwischen den grünen Schwefelbakterien und der *Cytophaga/Flavobacterium*-Gruppe hat.

Es ist unwahrscheinlich, dass es sich bei diesen Sequenzen um zufällig entstandene Fehlamplikate handelte (Chimären oder ähnliches), weil beispielsweise die Sequenz Ostsee Stein-1 K-249 und Atlantik Sip-4 K-790 eine hohe Similarität aufweisen (Si = 97,2 %), obwohl sie aus völlig unterschiedlichen Proben und Gegenden stammen. Auch steht diese Gruppe nicht völlig isoliert. Es gibt in der Datenbank zwar keine korrespondierende 16S rDNA aus Reinkulturen (Id nur bis 82 %), aber durchaus in der Nähe liegende andere Umweltsequenzen mit einer Similarität von bis zu 91 % (Kapitel 9.6, S. 98).

Es ist abschließend anzunehmen, dass die Arten grüner Schwefelbakterien, die bisher als Reinkulturen gewonnen werden konnten, zu den dominant wachsenden Vertretern zählen. Gleiches gilt anscheinend für Massenentwicklungen (Blüten) am Standort, weshalb deren 16S-rDNA- und *fmoA*-Fragmente bevorzugt nachgewiesen wurden. Die „interessanten“ Sequenzen, phylogenetisch abseits der Reinkulturen, kamen oft nur in wenigen Klonen vor.



## ABSTRACT

The phylogeny of green sulfur bacteria was studied on the basis of gene sequences of the 16S rRNA and of the FMO protein and the deduced amino acid sequence. Representative and type strains (47 strains total) of most of the known species were analyzed. The Fenna-Matthews-Olson protein (FMO) is a water soluble bacteriochlorophyll *a* protein which mediates energy transfer between the chlorosomes and the reaction center. It is a characteristic and unique feature of the green sulfur bacteria.

The *fmoA* gene codes for the monomer of the FMO protein, which binds chlorophyll *a* and is associated in a trimeric structure. On the basis of *fmoA* gene sequences from *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup> and *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* DSM 249<sup>T</sup> available from the EMBL database, primers were constructed that allowed sequence analysis of a major part of the *fmoA* gene (80 %). Furthermore, on 16S rDNA basis a primer specific for green sulfur bacteria was developed. In combination with eubacterial primer about 86 % of the gene length could be amplified.

The largely congruent phylogenetic relationship of sequences of the *fmoA* gene (respectively FMO) and of 16S rDNA sequences gives considerable support to the phylogeny of green sulfur bacteria previously suggested on the basis of 16S rDNA sequences. Five distinct groups of strains were recognized on the basis of 16S rDNA, *fmoA* and FMO sequences and supported by characteristic signature nucleotides and amino acids, by the comparison of GC contents of whole genomes as well as the salt dependence of strains.

Marine, halophilic and other salt dependent strains formed clusters separate from freshwater strains. The resulting phylogenetic grouping and relationship of the green sulfur bacteria do not correlate with their current taxonomic classification which is mainly based on morphological, biochemical and cytological properties.

The aim of the present studies were not only phylogenetic investigations of pure cultures of green sulfur bacteria but also the analysis of natural communities and their distribution in different environments. The strategy involves the analysis of DNA extracted from environmental samples with procedures which were adapted from the methods well-tried with pure cultures.

The results give considerable support that the diversity of salt dependent green sulfur bacteria in the investigated habitats is not substantially greater than it is represented by the pure cultures. This is especially true for dominant strains during bacterial blooms. Furthermore, the salt dependent species seem to be cosmopolitical, both in marine and in continental habitats (salt lakes).

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Phylogenie grüner Schwefelbakterien wurde auf der Basis von Gensequenzen der 16S rRNA und des FMO-Proteins sowie der abgeleiteten Aminosäuresequenzen untersucht. Repräsentative und Typenstämmen (47 Stämme insgesamt) der meisten bekannten Arten wurden analysiert. Das Fenna-Matthews-Olson-Protein (FMO) ist ein wasserlösliches Bacteriochlorophyll-*a*-Protein, das den Energietransfer zwischen den Chlorosomen und dem Reaktionszentrum vermittelt. Dies ist charakteristisch und einzigartig für die Gruppe der grünen Schwefelbakterien.

Das *fmoA*-Gen kodiert für das Monomer des FMO-Proteins, das Chlorophyll *a* bindet und in einer trimeren Struktur assoziiert ist. Auf der Basis von *fmoA*-Gensequenzen von *Chlorobium tepidum* ATCC 49652<sup>T</sup> und *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* DSM 249<sup>T</sup> (Datenbank EMBL) wurden Primer konstruiert, die Sequenzanalysen eines Großteils des *fmoA*-Gens erlaubten (80 %). Weiterhin wurde auf 16S-rDNA-Basis ein für grüne Schwefelbakterien spezifischer Primer entwickelt. In Kombination mit eubakteriellen Primern konnte etwa 86 % der Länge des Gens amplifiziert werden.

Die weitgehend kongruente phylogenetische Beziehung der Sequenzen des *fmoA*-Gens (bzw. FMO) und der 16S-rDNA-Sequenzen unterstützen die Phylogenie grüner Schwefelbakterien, wie sie bisher nur auf Basis der 16S rDNA bekannt war. Fünf getrennte Gruppen konnten auf der Basis von 16S-rDNA-, *fmoA*- und FMO-Sequenzen bestimmt werden. Unterstützt wurden die Ergebnisse noch durch charakteristische Signaturnukleotide und -aminosäuren, durch den Vergleich der Gesamt-GC-Gehalte und der Salzbedürftigkeit von Stämmen.

Marine, halophile und andere salzbedürftige Stämme bildeten Gruppen und Untergruppen, die deutlich abseits der limnischen Stämme lagen. Die resultierende phylogenetische Gruppierung und die Verwandtschaftsbeziehungen der grünen Schwefelbakterien untereinander korrelieren nicht mit ihrer momentanen taxonomischen Klassifizierung, welche hauptsächlich auf morphologischen, biochemischen und zytologischen Kriterien beruht.

Das Ziel dieser Arbeit waren nicht nur phylogenetische Untersuchungen an Reinkulturen grüner Schwefelbakterien sondern auch die Analyse natürlicher Gemeinschaften und deren Verteilung in verschiedenen Habitaten. Die Strategie umfasste die Analyse von DNA, die aus Umweltproben isoliert wurde, wobei Methoden angewandt wurden, die sich schon bei den Reinkulturen bewährt hatten.

Die Diversität salzbedürftiger grüner Schwefelbakterien scheint an den untersuchten Standorten nicht bedeutend größer zu sein als durch Reinkulturen repräsentiert. Dies gilt insbesondere für die dominanten Stämme während einer Massenentwicklung. Weiterhin scheinen die salzbedürftigen Arten kosmopolitisch vorzukommen, sowohl in marinen als auch kontinentalen Habitaten (Salzseen).



# LITERATUR

- Abella CA, Cristina XP, Martinez A, Pibernat II, Vila X (1998) Two new motile phototrophic consortia: "*Chlorochromatium lunatum*" and "*Pelochromatium selenoides*". Arch Microbiol 169(5):452-459
- Alexander B (1999a) Die Universitäten Kiel und Odense erforschen Schwefelbakterien in der Ostsee – Lebewesen mit erstaunlichen Eigenschaften: Grenzüberschreitende Kooperation für die Umwelt. In: Lübecker Nachrichten vom 23. März, Lübeck, S. 27 (siehe Abbildung 32)
- Alexander B (1999b) Wenn die Ostsee blüht... Ein EU-Projekt ermöglicht die Erforschung von Bakterien im Meer. In: Liebelt T, Stintzing R (Hrsg) Seeluft – Nord und Ostsee, Band 3, Schleswig-Holstein, Die See: Balsam für Körper und Seele, Taschenbuch für Kultur und Reise. ISBN 3-933205-10-7. Signet-Verlag, Flensburg, S. 112-115
- Alexander B, Imhoff JF (1999) Comparison of diversity of green sulfur bacteria at natural sites. (Poster) IVth workshop on green & heliobacteria, Girona, Spanien, 28.-31. August
- Alexander B, Imhoff JF (2000a) Diversity of green sulfur bacteria in the natural environment. (Poster) Microbiology2000: 1. gemeinsamer Kongress der DGHM, ÖGHMP und VAAM, München, Deutschland, 12.-16. März (URL 4)
- Alexander B, Imhoff JF (2000b) Phylogenetic relationship of green sulfur bacteria on the basis of *fmo* and 16S rDNA gene sequences. (Poster) ISPP2000: 10th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, Barcelona, Spanien, 26.-31. August (URL 5)
- Alexander B, Andersen JH, Cox RP, Imhoff JF (2002) Phylogeny of green sulfur bacteria on the basis of 16S rRNA and of the Fenna-Matthews-Olson protein. Arch Microbiol 178:131-140, DOI 10.1007/s00203-002-0432-4
- Amesz J, Knaff DB (1988) Molecular mechanism of bacterial photosynthesis. In: Zehnder AJB (Hrsg) Biology of anaerobic microorganisms. Wiley, Chichester, S. 113-178
- Anagnostidis K, Schwabe GH (1966) Über artenreiche Bestände von Cyanophyten und Bacteriophyten in einem Farbstreifensandwatt sowie über das Auftreten Gomontiella-artig deformierter *Oscillatoria trichome*. Nova Hedwegia 11:417
- Andersen JH, Alexander B, Figueras JB, Miller M, Cox RP (2000) A functional oriented comparison of FMOA sequences predicts the structural basis for differences in spectral properties of this protein. (Poster) ISPP2000: 10th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, Barcelona, Spanien, 26.-31. August (URL 5)
- Biebl H, Pfennig N (1978) Growth yields of green sulfur bacteria in mixed cultures with sulfur and sulfate reducing bacteria. Arch Microbiol 117:9
- Blankenship RE (1994) Protein structure, electron transfer and evolution of prokaryotic photosynthetic reaction centers. Antonie van Leeuwenhoek 65:311-329
- Blankenship RE (1996) Chlorosome antennas from green photosynthetic bacteria. In: The spectrum, Band 9, 3. Ausgabe. Center for Photochemical Sciences, Bowling Green State University, Bowling Green, Ohio, USA, S. 2-7
- Blankenship RE, Olson JM, Miller M (1995) Antenna complexes from green photosynthetic bacteria. In: Blankenship RE, Madigan MT, Bauer CE (Hrsg) Anoxygenic photosynthetic bacteria. Kluwer, Dordrecht Boston London, S. 399-435
- Brown CM, Herbert RA (1977) Ammonia assimilation in members of the Rhodospirillaceae. FEMS Lett 1:43
- Caumette P, Pagano M, Saint-Jean L (1983) Vertical distribution of phytoplankton, bacteria and zooplankton in a stratified part of Bietri Bay (Ebrie Lagoon, Ivory Coast). Trophic relationships. Hydrobiologia 106:135
- Cohen Y, Krumbein WE, Shilo M (1977) Solar Lake (Sinai). 2. Distribution of photosynthetic microorganisms and primary production. Limnol Oceanogr 22:609
- Cohen-Bazire, Pfennig N, Kunizawa R (1964) The fine structure of green bacteria. J Cell Biol 22:207-225
- Cremonesi L, Firpo S, ferrari M, Righetti PG, Gelfi C (1997) Double-gradient DGGE for optimized detection of DNA point mutations. Biotechniques 22:326-330
- Cvičić V (1955) Red water in the lake "Malo Jezero" (Island of Mljet). Acta Adriatica 6:3-13

- Dayhoff MO, Schwartz RM, Orcutt BC (1978) A model of evolutionary change in proteins. In: Dayhoff MO (Hrsg) Atlas of protein sequence and structure, Band 5, Ergänzungsband 3 (1979). National Biomedical Research Foundation, Washington DC, S. 345-352
- Daurat-Larroque ST, Brew K, Fenna RE (1986) The complete amino acid sequence of a bacteriochlorophyll *a* protein from *Prosthecochloris aestuarii*. J Biol Chem 261(8):3607-3615
- Deisenhofer J, Huber R, Michel H (1989) The structure of the photochemical reaction center of *Rhodospseudomonas viridis* and its implications for function. In: Fasman GO (Hrsg) Predictions of protein structure and the principles of protein conformations. Plenum, New York, 99-116
- Dracheva S, Williams JAC, Blankenship RE (1992) Cloning and sequencing of the FMO-protein gene from *Chlorobium tepidum*. In: Murata N (Hrsg) Research in Photosynthesis. Kluwer Academic Publishers, S. 53-56
- Eck RV, Dayhoff MO (1966). Atlas of protein sequence and structure. National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, Maryland.
- Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. J Mol Evolution 17:368-376
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791
- Felsenstein J (1989) PHYLIP – Phylogenetic Inference Package (Version 3.2). Cladistics 5:164-166
- Felsenstein J (1993) PHYLIP – Phylogeny Inference Package (Version 3.5c). Vertrieb durch den Autor. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA. URL 14, S. 154
- Fenna RE, Matthews BW (1976) Structure of a bacteriochlorophyll *a*-protein from *Prosthecochloris aestuarii*. Brookhaven Symp Biol 28:170-182
- Fenna RE, Matthews BW, Olson JM, Shaw EK (1974) Structure of a bacteriochlorophyll protein from the green photosynthetic bacterium *Chlorobium limicola*: Crystallographic evidence for a trimer. J Mol Biol 84:231-240
- Figueras JB, Garcia-Gil LJ, Abella CA (1997) Phylogeny of the genus *Chlorobium* based on 16S rDNA sequence. FEMS Microbiol Letters 152:31-36
- Fitch WM, Margoliash E (1967) Construction of phylogenetic trees. Science 155:279-284
- Fowler VJ, Pfennig N, Schubert W, Stackebrandt E (1984) Towards a phylogeny of phototrophic purple sulfur bacteria – 16S rRNA oligonucleotide cataloguing of 11 species of Chromatiaceae. Arch Microbiol 139:382-387
- Fox GE, Stackebrandt E, Hespell RB, Gibson J, Maniloff I, Dyer TA, Wolfe RS, Balch WE, Tanner RS, Magrum LJ, Zablen LB, Blackmore R, Gupta R, Bonen L, Lewis BJ, Stahl DA, Luehrsen KR, Chen KN, Woese CR (1980) The phylogeny of prokaryotes. Science 209:457-463
- Gibson J, Pfennig N, Waterbury JB (1984) *Chloroherpeton thalassium* gen. nov. et spec. nov., a non-filamentous, flexing and gliding green sulfur bacterium. Arch Microbiol 138(2):96-101
- Gietzen J (1931) Untersuchungen über marine Thiorhodaceen. Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Hyg Abt 2, 83:183
- Gordon DA, Giovannoni SJ (1996) Detection of stratified microbial populations related to *Chlorobium* and *Fibrobacter* species in the Atlantic and Pacific Oceans. Appl Environ Microbiol 62 :1171-1177
- Gorlenko VM, Lebedeva EV (1971) New green sulfur bacteria with appendages. Mikrobiologiya 40:1035
- Gutell RR, Weiser B, Woese CR, Noller HF (1985) Comparative anatomy of 16S-like ribosomal RNA. Prog Nucleic Acid Res 32:155-216
- Hager-Braun C, Xie DL, Jarosch U, Herold E, Buttner M, Zimmermann R, Deutzmann R, Hauska G, Nelson N (1995) Stable photo-bleaching of P840 in *Chlorobium* reaction center preparations: presence of the 42-kDa bacteriochlorophyll *a* protein and a 17-kDa polypeptide. Biochemistry (New York) 34:9617-9624
- Hall T (2001) Programm BioEdit (Version 5.0.2) Vertrieb durch den Autor. Department of Microbiology, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, USA. URL 8, S. 154
- Heising S, Richter L, Ludwig W, Schink B (1999) *Chlorobium ferrooxidans* sp. nov., a phototrophic green sulfur bacterium that oxidizes ferrous iron in co culture with a “*Geospirillum*” sp. strain. Arch Microbiol 172(2):116-124
- Hoffmann C (1942) Beiträge zur Vegetation des Farbstreifensandwatts. Kiel Meeresforsch 4:85

- Imhoff JF (1976) Phototrophe Bakterien salzhaltiger Standorte: Ökologische und taxonomische Aspekte. (Diplomarbeit) Institut für Mikrobiologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
- Imhoff JF (1984) Reassignment of the genus *Ectothiorhodospira* Pesh 1936 to a new family Ectothiorhodospiraceae fam. nov., and emended description of the Chromatiaceae Bavendamm 1924. Int J Syst Bacteriol 34:338
- Imhoff JF (1988) Halophilic phototrophic bacteria. In: Rodriguez-Valera F (Hrsg) Halophilic Bacteria, Band I. CRC Press, Boca Raton, S. 85-108
- Imhoff JF (1995) Taxonomy and physiology of phototrophic purple bacteria and green sulfur bacteria. In: Blankenship RE, Madigan MT, Bauer CE (Hrsg) Anoxygenic photosynthetic bacteria. Kluwer, Dordrecht Boston London, S. 1-15
- Imhoff JF (1999) A phylogenetically oriented taxonomy of anoxygenic phototrophic bacteria. In: Pescheck GA, Löffenhardt W, Schmetterer G (Hrsg) The Phototrophic Prokaryotes. Kluwer, New York, Academic/Plenum Publ Corp, S. 763-774
- Imhoff JF (2001) True marine and halophilic anoxygenic phototrophic bacteria. Arch Microbiol 176:243-254
- Imhoff JF (2002, im Druck) A phylogenetic taxonomy of the Chlorobiaceae family on the basis of 16S rRNA and *fmo* (Fenna-Matthews-Olson protein) gene sequences. Int J Syst Evol Microbiol
- Imhoff JF, Alexander B (1999) Phylogeny of the Fenna-Matthews-Olson (FMO) protein. (Vortrag) IVth workshop on green & heliobacteria, Girona, Spanien, 28.-31. August
- Imhoff JF, Alexander B (2002) The phylogeny and ecological distribution of green sulfur bacteria with special emphasis on marine habitats. (Vortrag) EMBO Workshop on Green and Heliobacteria; Molecular Biology, Structure and Function; Passau, 19.-24. April (URL 16)
- Imhoff JF, Bias-Imhoff U (1995) Lipids, quinones and fatty acids of anoxygenic phototrophic bacteria. In: Blankenship RE, Madigan MT, Bauer CE (Hrsg) Anoxygenic photosynthetic bacteria. Kluwer, Dordrecht Boston London, S. 179-205
- Imhoff JF, Trüper HG (1982) Taxonomic classification of photosynthetic bacteria (Anoxyphotobacteria, phototrophic bacteria). In: Mitsui A, Black CC (Hrsg) Handbook of biosolar resources, Band 1, Basic principals, Teil 2. CRC Press, Boca Raton, Florida, S. 513
- Imhoff JF, Trüper HG, Pfennig N (1984) Rearrangement of the species and genera of the phototrophic "Purple Nonsulfur Bacteria". Int J Syst Bacteriol 34:340
- Imhoff JF, Süling J, Petri R (1998) Phylogenetic relationships among the Chromatiaceae, their taxonomic reclassification and description of the new genera *Allochromatium*, *Halochromatium*, *Isochromatium*, *Marichromatium*, *Thiococcus*, *Thiohalocapsa* and *Thermochromatium*. Int J Syst Bacteriol 48:1129-1143
- Jaspers E, Overmann J (1997) Separation of bacterial cells by isoelectric focusing, a new method for analysis of complex microbial communities. Appl Environ Microbiol 63(8) :3176-3181
- Jerlov NG (1951) Optical studies of ocean waters. In: Petterson H (Hrsg) Reports of the Swedish deep-sea expedition 1947-1948, Band 3. Erlanders Boktryckeri AB, Göteborg, S. 1
- Jørgensen BB, Fenchel T (1974) The sulfur cycle of a marine sediment model system. Mar Biol 24:180
- Jukes TH, Cantor CR (1969) Evolution of protein molecules. In: Munro H (Hrsg) Mammalian Protein metabolism. Academic Press, New York, S. 21-132
- Kanao T, Fukui T, Atomi H, Imanaka T (2001) ATP-citrate lyase from the green sulfur bacterium *Chlorobium limicola* is a heteromeric enzyme composed of two distinct gene products. Europ J Biochem 268(6):1670-1678
- Kawasaki H, Hoshino Y, Yamasato K (1993) Phylogenetic diversity of phototrophic purple non-sulfur bacteria in the Proteobacteria alpha-group. FEMS: Microbiol Lett 112:61-66
- Kimura M (1983) The Neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press, Cambridge
- Kluge AG, Farris JS (1969) Quantitative phyletics and the evolution of anurans. Systematic Zoology 18:1-32
- Kondratieva EN, Pfennig N, Trüper HG (1992) The phototrophic prokaryotes. In: Starr MP, Stolz H, Trüper HG, Schlegel HG (Hrsg) The prokaryotes. Springer, Berlin, S. 312-330
- Kusomoto N, Sétif P, Brettel K, Seo D, Sakurai H (1999) Electron transfer kinetics in purified reaction centers from the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* studied by multiple-flash excitation. Biochemistry 38:12124-12137

- Lapage SP, Sneath PHA, Lessel EF, Skerman VBD, Seeliger HPR, Clark WA (Hrsg) (1992) International code of nomenclature of bacteria (Überarbeitung von 1990). Bacteriological code. American Society for Microbiology, Washington DC
- Li YF, Zhou W, Blankenship RE, Allen JP (1997) Crystal structure of the bacteriochlorophyll *a* protein from *Chlorobium tepidum*. J Mol Biol 271(3):456-471
- Mandel M, Leadbetter ER, Pfennig N, Trüper HG (1971) Deoxyribonucleic acid base composition of phototrophic bacteria. Int J Syst Bacteriol 21:222-230
- Margush T, McMorris FR (1981) Consensus n-trees. Bulletin of Mathematical Biol 43:239-244
- Matheron R, Baulaigue R (1972) Bactéries photosynthétiques sulfureuses marines. Assimilation des substances organiques et minérales, et influence de la teneur en chlorure de sodium du milieu de culture sur leur développement. Arch Microbiol 86:291-304
- Matheron R, Baulaigue R (1976) On the ecology of marine Chromatiaceae and Chlorobiaceae. Ann Microbiol 127(4):515-520
- McCarthy C (1997) Programm Chromas (Version 1.42). Vertrieb durch Technelysium, Helensvale, Australien. URL 6, S. 154
- Melkozernov AN, Olson JM, Li Y, Allen JP, Blankenship RE (1998) Orientation and excitonic interactions of the Fenna-Matthews-Olson bacteriochlorophyll *a* protein in membranes of the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. Photosynth Res 56:315-328
- Méndez-Álvarez S, Esteve I, Guerrero R, Gaju N (1996) Genomic analysis of different *Chlorobium* strains by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping. Int J Syst Bacteriol 46:1177-1179
- Méndez-Álvarez S, Esteve I, Guerrero R, Gaju N (1998) RAPD fingerprinting of *Chlorobium* strains. Syst Appl Microbiol 21 :274-278
- Mukhopadhyay B, Johnson EF, Ascano M Jr (1999) Conditions for vigorous growth on sulfide and reactor-scale cultivation protocols for the thermophilic green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. Appl Environ Microbiol 65(1) :301-306
- Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG (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
- Naterstad K, Kolstø AB, Sirevåg R (1995) Physical map of the genome of the green phototrophic bacterium *Chlorobium tepidum*. J Bacteriol 177(19):5480-5484
- Olson JM (1978) Bacteriochlorophyll *a* proteins from green bacteria. In: Clayton RK, Sistrom WR (Hrsg) The photosynthetic bacteria. Plenum, New York, 161-178
- Overmann J, Tuschak C (1997) Phylogeny and molecular fingerprinting of green sulfur bacteria. Arch Microbiol 167:302-309
- Øvreås L, Forney L, Daae FL, Torsvik V (1997) Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Sælenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol 63(9):3367-3373
- Page RDM (1996) TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences 12:357-358
- Pearson WR (1990) Rapid and sensitive sequence comparison with FAST and FASTA. Methods Enzymol 183:63-98
- Pearson WR, Lipman DJ (1988) Improved tools for biological sequence analysis. Proc Natl Acad Sci USA 85:2444-2448
- Petri R, Imhoff JF (2000) The relationship of nitrate reducing bacteria on the basis of *narH* gene sequences and comparison of *narH* and 16S rDNA based phylogeny. System Appl Microbiol 23:47-57
- Petri R, Imhoff JF (2001) Genetic analysis of sea-ice bacterial communities of the Western Baltic Sea using an improved double gradient method. Polar Biol 24: 252-257
- Pfennig N (1967) Photosynthetic bacteria. Annu Rev Microbiol 21:285
- Pfennig N (1977) Phototrophic green and purple bacteria: A comparative, systematic survey. Annual Reviews of Microbiology 31:275-290
- Pfennig N (1989a) Ecology of phototrophic purple and green sulfur bacteria. In: Schlegel HG, Bowien B (Hrsg) Autotrophic bacteria. Springer, Berlin, S. 97-115
- Pfennig N (1989b) Green sulfur bacteria. In: Staley JT, Bryant MP, Pfennig N, Holt JG (Hrsg) Bergey's manual of systematic bacteriology, 1. Ausgabe, Band 3. Williams & Wilkins, Baltimore, S. 1682-1697

- Pfennig N, Biebl H (1976) *Desulfuromonas acetoxidans* gen. nov. and sp. nov., a new anaerobic, sulfur-reducing, acetate-oxidizing bacterium. Arch Microbiol 110:3
- Pfennig N, Trüper HG (1974) The phototrophic bacteria. In: Buchanan RE, Gibbons NE (Hrsg) Bergey's manual of determinative bacteriology, 8. Ausgabe. Williams & Wilkins, Baltimore, S. 24
- Pfennig N, Trüper HG (1989) Anoxygenic phototrophic bacteria. In: Staley JT, Bryant MP, Pfennig N, Holt JG (Hrsg) Bergey's manual of systematic bacteriology, Band 3. Williams & Wilkins, Baltimore, S. 1635-1709
- Pfennig N, Trüper HG (1992). The family Chromatiaceae. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (Hrsg) The prokaryotes. Springer, New York, S. 3200-3221
- Pierson BK, Castenholz RW (1978) Photosynthetic apparatus and cell membranes of the green bacteria. In: Clayton RK, Sistrom WR (Hrsg) The photosynthetic bacteria. Plenum, New York, 179-196
- Puchkova NN (1984) Green sulfur bacteria inhabiting shallow saline water bodies. Mikrobiologiya 53:324-328
- Puchkova NN, Gorlenko VM (1982) A new green sulfur bacterium, *Chlorobium chlorovibrioides* nov. spec. Mikrobiologiya 51:118-124
- Remsen CC (1978) Comparative sub cellular architecture of photosynthetic bacteria. In: Clayton RK, Sistrom WR (Hrsg) The photosynthetic bacteria. Plenum, New York, 31-60
- Rippmann F (1996) Pride and prejudice and G protein-coupled receptor models. In: Findlay JBC (Hrsg) Membrane protein models. BIOS Scientific Publishers, Oxford, 91-105
- Sanger F, Nicklein S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain termination inhibitors. Proc Natl Acad Sci, USA, 74:5463-5467
- Schulz E (1937) Das Farbstreifen-Sandwatt und seine Fauna, eine ökologisch-biozönotische Untersuchung an der Nordsee. Kiel Meeresforsch 1:359
- Schulz E, Meyer H (1939) Weitere Untersuchungen über das Farbstreifen-Sandwatt. Kiel Meeresforsch 3:321
- Siefert E, Pfennig N (1984) Convenient method to prepare neutral sulfide solution for cultivation of phototrophic sulfur bacteria. Arch Microbiol 139:100-101
- Sirevåg R (1995) Carbon metabolism in green bacteria. In: Blankenship RE, Madigan MT, Bauer CE (Hrsg) Anoxygenic photosynthetic bacteria. Kluwer, Dordrecht Boston London, S. 871-883
- Staehelein LA, Fuller RC, Drews (1978) Visualization of the supramolecular architecture of chlorosomes (chlorobium vesicles) in freeze-fractured cells of *Chloroflexus aurantiacus*. Arch Microbiol 119:269-277
- Staehelein LA, Golecki JR, Drews (1980) Supramolecular organization of chlorosomes (chlorobium vesicles) and of their membrane attachment sites in *Chlorobium limicola*. Biochim Biophys Acta 589:30-45
- Suckow R (1966) Schwefelmikrobengesellschaften der See- und Boddengewässer von Hiddensee. Z Allgem Mikrobiol 6:309
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTALW. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Res 22:4673-4680
- Thorner JP, Trosper TL, Strouse CE (1978) Bacteriochlorophyll *in vivo*: Relationship of spectral forms to specific membrane components. In: Clayton RK, Sistrom WR (Hrsg) The photosynthetic bacteria. Plenum, New York, 133-160
- Tonolla M, Demarta A, Peduzzi R, Hahn D (1999) *In situ* analysis of phototrophic sulfur bacteria in the chemocline of meromictic lake Cadagno (Switzerland). Appl Environ Microbiol 65(3):1325-1330
- Trüper HG (1970) Culture and isolation of phototrophic sulfur bacteria from the marine environment. Helgol wiss Meeresunters 20:6-16
- Trüper HG (1980) Distribution and activity of phototrophic bacteria at the marine water-sediment interface. Colloq Int CNRS 293:275
- Trüper HG (1982) Microbial processes in the sulfur cycle through time. In: Holland HD, Schidlowski M (Hrsg) Mineral Deposits and the Evolution of the Biosphere, 5. Ausgabe. Springer-Verlag, Heidelberg
- Trüper HG (1987) Phototrophic bacteria (an incoherent group of prokaryotes). A taxonomic versus phylogenetic survey. Mikrobiologiya 3(2):71-89
- Trüper HG, Genovese S (1968) Characterization of photosynthetic sulfur bacteria causing red water in Lake Faro (Messina, Sicily). Limnol Oceanogr 13:225

- Trüper HG, Pfennig N (1992) The family Chlorobiaceae. In: Starr MP, Stolz H, Trüper HG, Schlegel HG (Hrsg) The prokaryotes. Springer, Berlin, S. 3583-3592
- Tuschak C, Glaeser J, Overmann J (1999) Specific detection of green sulfur bacteria by in situ hybridization with a fluorescently labeled oligonucleotide probe. Arch Microbiol 171:265-272
- Vila X, Guyoneaud R, Cristina XP, Figueras JB, Abella CA (2002) Green sulfur bacteria from hypersaline Chiprana Lake (Monegros, Spain): habitat description and phylogenetic relationship of isolated strains. Photosynth Res 71:165-172
- Vultu SIE, de Baat MA, Louwe RJW, Permentier HP, Neef T, Miller M, van Amerongen H, Aartsma TJ (1998a) Exciton simulation of optical spectra of the FMO complex from the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. J Phys Chem B 102:9577
- Vultu SIE, Neerken S, Louwe RJW, de Baat MA, Amesz J, Aartsma TJ (1998b) Excited state structure and dynamics in FMO antenna complexes from photosynthetic green sulfur bacteria. J Phys Chem B 102:10630-10635
- Wahlund TM, Woese CR, Castenholz RW, Madigan MT (1991) A thermophilic green sulfur bacterium from New Zealand Hot Springs, *Chlorobium tepidum* sp. nov. Arch Microbiol 156:81-90
- Winogradski SN (1888) Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Bakterien. I. Zur Morphologie und Physiologie der Schwefelbakterien. A. Felix, Leipzig
- Witt D, Bergstein-Ben Dan T, Stackebrandt E (1989) Nucleotide sequence of 16S rRNA and phylogenetic position of the green sulfur bacterium *Clathrochloris sulfurica*. Arch Microbiol 152(2):206-208
- Woese CR (1987) Bacterial evolution. Microbiol Rev 51:221-271
- Woese CR, Debrunner-Vossbrinck B, Oyaizu H, Stackebrandt E, Ludwig W (1985) Gram-positive bacteria: possible photosynthetic ancestry. Science 229:762-765
- Yentsch CS (1962) Marine plancton. In: Lewin RA (Hrsg) Physiology and biochemistry of algae. Academic Press, London, S. 771

# ANHANG

## 13 TABELLEN DER GRUPPENSIGNATUREN IM ALIGNMENT

Tabelle 30: Gruppen-Signaturen der 16S-rDNA-Sequenzen

**Rot** hinterlegt sind identische<sup>135</sup> Nukleotide, die im Alignment typisch für eine Gruppe sind. **Blau** hinterlegt sind nicht-identische signifikante Nukleotide einer Gruppe. Das dargestellte Alignment ist **diskontinuierlich** und enthält nur die Spalten, in denen Gruppensignaturen vorkommen. Es basiert auf einem Alignment aus Sequenzen von ca. 1240 nt Länge, die mit dem Primer-Paar F-99-GSB/R-1369 erhalten (eigene Daten aus Reinkulturen) oder darauf zugeschnitten wurden (Sequenzen von EMBL-EBI bzw. eigene Umweltsequenzen, die mit dem Primer-Paar F-99-GSB/R-1388 erhalten wurden). Die Bezeichnung der mehrdeutigen Nukleotide folgt der allgemeinen IUPAC-Nomenklatur. Die Positionen von ganzen Signaturbereichen sind mit der Farbe der zugehörigen Gruppe markiert.

Position <sup>136</sup>	115	121	122	128	160	197	199	200	201	204	209	210	215	428	567	630	639	720	724	818a	819	972	984	992	993	1099	1103	1109	1267	1288	1305		
<b>1</b>	<i>Pld. phaeum</i> CIB 2401	T	A	C	C	G	C	C	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	T	C	C	C	C	C	C	C	G	G	A	A	C	C	
	<i>Chl. vibrioforme</i> CHP 3402	A	A	C	C	G	C	C	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	T	C	C	C	C	C	C	C	G	G	A	A	C	C	
	<i>Chl. vibrioforme</i> DSM 260 <sup>T</sup>	T	A	A	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	T	C	C	C	C	C	C	C	G	G	A	A	C	C	
	<i>Chl. phaeovibrioides</i> DSM 1678	T	A	A	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	T	C	C	C	C	C	C	C	G	G	A	A	C	C	
	<i>Ptc. aestuarii</i> 2K	T	A	A	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	T	C	C	C	C	C	C	C	G	G	A	A	C	C	
	<i>Ptc. aestuarii</i> CHP 3401	T	A	A	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	T	C	C	C	C	C	C	C	G	G	A	A	C	C	
	Atlantik SSM-3 K-101	T	A	A	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	T	C	C	C	C	C	C	C	G	G	A	A	C	C	
	Atlantik Sip-4 K-706	T	A	A	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	T	C	C	C	C	C	C	C	G	G	A	A	C	C	
	Ostsee Laboe-3 K-500	T	A	A	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	T	C	C	C	C	C	C	C	G	G	A	A	C	C	
	Atlantik SSM-3 K-100	T	A	A	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	T	C	C	C	C	C	C	C	G	G	A	A	C	C	
	Adria Cviic-2 K-13	T	A	A	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	T	C	C	C	C	C	C	C	G	G	A	A	C	C	
	Ostsee Stein-1 K-207	T	A	A	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	T	C	C	C	C	C	C	C	G	G	A	A	C	C	
	Bad Water BW-4 K-902	T	A	A	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	T	C	C	C	C	C	C	C	G	G	A	A	C	C	
	<i>Ptc. aestuarii</i> DSM 271 <sup>T</sup>	T	A	A	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	T	C	C	C	C	C	C	C	G	G	A	A	C	C	
<b>4</b>	<i>Chl. limicola</i> UdG 6045	N	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	A	T	A	A	T	G	-	T	G	C	G	G	A	T	T	T	C	T	
	<i>Chl. limicola</i> UdG 6038	N	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	A	T	A	A	T	G	-	T	G	C	G	G	A	T	T	T	C	T	
	<i>Chl. limicola</i> UdG 6041	C	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	A	T	A	A	T	G	-	T	G	C	G	G	A	T	T	T	C	T	
	<i>Chl. limicola</i> UdG 6042	C	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	A	T	A	A	T	G	-	T	G	C	G	G	A	T	T	T	C	T	
	<i>Chl. limicola</i> UdG 6040	C	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	A	T	A	A	T	G	-	T	G	C	G	G	A	T	T	T	C	T	
	<i>Chl. phaeobacteroides</i> 1549	C	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	A	T	A	A	T	G	-	T	G	C	G	G	A	T	T	T	C	T	
	<i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 1677	C	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	A	T	A	A	T	G	-	T	G	C	G	G	A	T	T	T	C	T	
	<i>Chl. tepidum</i> ATCC 49652 <sup>T</sup>	C	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	A	T	A	A	T	G	-	T	G	C	G	G	A	T	T	T	C	T	
	<i>Chl. limicola f. thios.</i> 1430	C	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	A	C	A	A	T	G	-	T	G	C	G	G	A	A	C	T	C	T	
	<i>Chl. limicola f. thios.</i> DSM 249 <sup>T</sup>	C	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	A	C	A	A	T	G	-	T	G	C	G	G	A	A	C	T	C	T	
	<i>Clc. sulfurica</i> 1	C	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	C	A	A	A	T	G	-	T	G	C	G	G	A	T	T	T	C	T	
	Atlantik SSM-3 K-153	T	A	C	C	G	C	G	A	G	T	A	A	C	C	T	T	A	T	G	-	T	A	C	G	G	A	A	T	T	C	T	
	Atlantik SSM-3 K-106	C	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	C	C	C	T	A	T	G	-	T	A	C	G	G	A	A	T	T	C	T
	Atlantik Sip-4 K-701	C	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	C	C	C	T	A	T	G	-	T	A	C	G	G	A	A	T	T	C	T
	Atlantik SSM-3 K-137	C	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	C	C	C	T	A	T	G	-	T	A	C	G	G	A	A	T	T	C	T
	Atlantik SSM-3 K-108	C	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	C	C	C	T	A	T	G	-	T	T	C	G	G	A	A	T	T	C	T
	<i>Chl. vibrioforme f. thios</i> DSM 263	N	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	A	T	A	A	T	G	-	T	G	C	G	G	A	A	T	T	C	T	
	<i>Chl. vibrioforme</i> UdG 6043	N	T	T	N	A	G	T	T	T	C	A	A	G	A	T	A	A	T	G	-	T	T	C	G	G	N	A	C	T	C	T	
	<i>Chl. limicola</i> UdG 6044	T	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	A	T	A	A	T	G	-	T	T	C	G	G	A	A	T	T	C	T	
	<i>Chl. chlorovibrioides</i> UdG 6026	C	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	A	T	C	T	A	T	G	-	T	T	C	G	G	A	A	T	T	C	T
	<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> NCIB 8346	C	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	A	T	C	T	A	T	G	-	T	T	C	G	G	A	A	T	T	C	T
<b>3</b>	<i>Chl. limicola</i> DSM 246	C	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	A	C	A	A	T	G	-	T	G	A	A	T	A	A	T	T	C	T	
	<i>Chl. limicola</i> DSM 245 <sup>T</sup>	C	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	A	C	A	A	T	G	-	T	G	A	A	T	A	A	T	T	C	T	
	<i>Chl. limicola f. thios.</i> 9330	N	T	T	T	A	K	T	T	T	C	A	A	G	A	C	A	A	T	G	-	T	G	A	A	T	A	A	T	T	C	T	
	<i>Chl. limicola f. thios.</i> 1630	C	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	A	C	A	A	T	G	-	T	G	A	A	T	A	A	T	T	C	T	
	<i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 1855	C	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	A	C	A	A	T	G	-	T	G	A	A	T	A	A	T	T	C	T	
	<i>Chl. phaeobacteroides</i> UdG 6047	C	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	A	C	A	A	T	G	-	T	G	A	A	T	A	A	A	C	T	C	T
	<i>Chl. phaeobacteroides</i> UdG 6051	C	T	T	T	A	G	T	T	A	C	A	A	G	A	C	A	A	T	A	-	T	G	A	A	N	A	A	C	T	C	T	
	<i>Chl. phaeobacteroides</i> UdG 6046	C	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	A	C	A	A	T	G	-	T	G	A	A	T	A	A	T	T	C	T	
	<i>Chl. ferrooxidans</i> DSM 13031 <sup>T</sup>	C	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	A	C	A	A	T	G	-	T	G	C	G	G	A	A	T	T	C	T	
	<i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 266 <sup>T</sup>	C	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	A	C	A	A	T	G	-	T	C	C	G	G	A	A	T	T	C	T	
	<i>Pld. clathratiforme</i> PG	C	T	T	T	A	R	W	T	T	C	A	A	G	A	C	A	A	T	G	-	T	G	A	A	T	A	A	T	T	C	T	
	<i>Pld. phaeoclathratiforme</i> DSM 5477 <sup>T</sup>	C	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	A	C	A	A	T	G	-	T	G	A	A	T	A	A	T	T	C	T	
<b>2</b>	<i>Chl. vibrioforme</i> DSM 261	C	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	A	C	A	A	G	C	G	-	T	G	C	G	G	A	A	T	T	C	T
	<i>Chl. phaeovibrioides</i> DSM 270	C	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	A	C	A	A	T	G	-	T	G	C	G	G	A	A	T	T	C	T	
	<i>Chl. phaeovibrioides</i> DSM 269 <sup>T</sup>	C	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	A	C	A	A	T	G	-	T	G	C	G	G	A	A	T	T	C	T	
	<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> DSM 265 <sup>T</sup>	C	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	A	C	A	A	T	G	-	T	G	C	G	G	A	A	C	T	C	T	
	<i>Chl. vibrioforme</i> DSM 2p2	C	T	T	T	A	G	T	T	T	C	A	A	G	A	C	A	A	T	G	-	T	G	C	G	G	A	A	T	T	C	T	



Tabelle 32: Gruppen-Signaturen der FMO-Aminosäuresequenzen

**Rot:** identische<sup>139</sup> bzw. **Blau:** nicht-identische Aminosäuren, die typisch für eine Gruppe sind. **Grau:** Deletionen einzelner Aminosäuren in der Sequenz. Das dargestellte Alignment ist **diskontinuierlich** und enthält nur die Spalten, in denen Gruppensignaturen vorkommen. Es basiert auf einem Alignment aus Aminosäuresequenzen von ca. 290 aa Länge, die aus Nukleotidsequenzen erstellt wurden, welche mit dem Primer-Paar F-Start-fmo/R-889-fmo erhalten (eigene Daten) und darauf zugeschnitten wurden (Sequenzen von EMBL-EBI). Der Einbuchstaben-Code der Aminosäuren folgt der allgemeinen IUPAC-Nomenklatur. Die Positionen von ganzen Signaturbereichen sind mit der Farbe der zugehörigen Gruppe markiert.

	Position <sup>140</sup>	6	7	9	29	40	54	55	60	61	64	67	68	69	70	83	84	86	98	103	112	149	159	166	167	171	172	173	175a	193	202	204	207	208	209	210	211	214	221	224	228	232	237	247	250	253	254	255	272	273	278				
①	<i>Chl. vibrioforme</i> DSM 260 <sup>1</sup>	T	K	T	Q	A	E	A	A	Q	V	F	T	S	Q	V	V	V	A	E	K	M	L	F	Q	S	G	G	N	I	P	Q	N	F	G	V	F	E	S	K	A	I	S	Q	K	S	I	G	N	L	R				
	<i>Chl. phaeovibrioides</i> DSM 1678	T	K	T	Q	A	E	A	A	Q	V	F	T	S	Q	V	V	V	V	A	E	K	M	L	F	Q	S	G	G	N	I	P	Q	N	F	G	V	F	E	S	K	A	I	S	Q	K	S	I	G	N	L	R			
	<i>Ptc. aestuarii</i> DSM 271 <sup>T</sup>	T	K	T	Q	A	E	A	T	Q	V	F	T	S	T	V	V	V	V	V	A	E	K	M	L	F	Q	S	G	G	N	I	P	Q	N	F	G	V	F	E	S	K	A	I	S	Q	K	S	I	G	N	L	R		
	Atlantik SSM-3 K-303	T	K	T	Q	A	E	A	T	Q	V	F	T	S	T	V	V	V	V	V	V	A	E	K	M	L	F	Q	S	G	G	N	I	P	Q	N	F	G	V	F	E	S	K	A	I	S	Q	K	S	I	G	N	L	R	
	Ostsee Laboe-3 K-600	T	K	T	Q	A	E	A	T	Q	V	F	T	S	T	V	V	V	V	V	V	A	E	K	M	L	F	Q	S	G	G	N	I	P	Q	N	F	G	V	F	E	S	K	A	I	S	Q	K	S	I	G	N	L	R	
	Ostsee Stak-2 K-455	T	K	T	Q	A	E	A	T	Q	V	F	T	S	T	V	V	V	V	V	V	A	E	K	M	L	F	Q	S	G	G	N	I	P	Q	N	F	G	V	D	E	S	K	A	I	S	Q	K	S	I	G	N	L	R	
	Atlantik Sip-4 K-802	T	K	T	Q	A	E	A	T	Q	V	F	T	S	T	V	V	V	V	V	V	A	E	K	M	L	F	Q	S	G	G	N	I	P	Q	N	F	G	V	F	E	S	K	A	I	S	Q	K	S	I	G	D	L	R	
	Adria Cviic-2 K-1011	T	K	N	Q	A	E	A	Q	T	F	T	T	A	N	V	V	V	V	V	V	A	K	S	M	L	F	Q	S	G	G	N	I	P	Q	N	F	G	V	F	E	S	K	A	I	S	Q	K	S	I	G	N	L	R	
	Adria Cviic-2 K-1027a	T	K	T	Q	A	D	A	G	Q	T	F	T	T	A	N	V	V	V	V	V	V	A	K	S	M	L	F	Q	S	G	G	N	I	P	Q	N	F	G	V	F	E	S	K	A	I	S	Q	K	S	I	G	N	L	R
	<i>Ptc. aestuarii</i> 2K	T	K	T	Q	A	D	A	A	Q	T	F	T	T	K	N	V	V	V	V	V	V	A	S	S	L	F	Q	S	G	G	N	I	P	Q	N	F	G	V	F	E	T	K	A	V	S	Q	K	S	I	G	N	L	R	
<i>Ptc. aestuarii</i> CHP 3401	T	N	T	Q	A	D	A	A	Q	V	F	T	T	S	K	V	V	V	V	V	V	A	S	S	M	L	F	S	S	G	G	N	X	X	S	F	G	V	E	Q	X	K	A	? <sup>139</sup>	? <sup>139</sup>	K	R	S	I	G	N	L	R		
④	<i>Chl. limicola f. thios.</i> DSM 249 <sup>T</sup>	S	N	V	K	P	N	V	P	A	F	I	S	A	V	T	I	A	S	M	S	L	L	T	V	G	S	T	-	L	R	E	G	L	N	T	E	P	S	R	G	M	S	K	R	Q	V	A	E	F	V				
	<i>Chl. limicola f. thios.</i> DSM 257	S	N	V	K	P	N	V	P	A	F	I	S	A	V	T	I	A	S	M	S	L	L	T	V	G	S	T	-	L	R	E	G	L	N	T	E	P	S	R	G	M	S	K	R	Q	V	A	E	F	V				
	<i>Chl. limicola f. thios.</i> 1430	S	N	V	K	P	N	V	P	A	F	I	S	A	V	T	I	A	S	M	S	L	L	T	V	G	S	T	-	L	R	E	G	L	N	T	E	P	S	R	G	M	S	K	R	Q	V	A	E	F	V				
	<i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 1677	S	N	V	K	P	N	V	P	A	F	I	S	A	V	T	I	A	S	M	S	L	L	T	V	G	S	T	-	L	R	E	G	L	N	T	E	P	S	R	G	M	S	K	R	Q	V	A	E	F	V				
	<i>Chl. phaeobacteroides</i> 1549	? <sup>139</sup>	? <sup>139</sup>	V	K	P	N	V	P	A	F	I	S	A	V	T	I	A	S	M	S	L	L	T	V	G	S	T	-	L	R	E	G	L	N	T	E	P	S	R	G	M	S	K	R	Q	V	A	E	F	V				
	<i>Chl. limicola</i> UdG 6041	? <sup>139</sup>	? <sup>139</sup>	V	K	P	N	V	P	A	F	I	S	A	V	T	I	A	S	M	S	L	L	T	V	G	S	T	-	L	R	E	G	L	N	T	E	P	S	R	G	M	S	K	R	Q	V	A	E	F	V				
	<i>Chl. tepidum</i> ATCC 49652 <sup>T</sup>	S	N	V	K	P	N	V	P	A	F	I	S	A	V	T	I	A	S	M	T	L	L	T	V	G	S	T	-	L	R	E	G	L	N	T	E	P	S	R	G	M	S	K	R	Q	V	A	E	F	V				
	<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> DSM 263	S	N	V	K	P	N	V	P	A	F	I	S	A	V	T	I	A	S	M	T	L	L	T	R	G	-	T	-	L	K	E	G	M	N	T	E	P	S	R	G	M	S	K	R	S	V	A	D	F	V				
<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> NCIB 8346	S	N	V	K	P	N	V	P	A	F	I	S	A	V	T	I	A	S	M	T	L	L	T	R	G	-	T	-	L	K	E	G	M	N	T	E	P	S	R	G	M	S	K	R	S	V	A	D	F	V					
<i>Chl. chlorovibrioides</i> UdG 6026	? <sup>139</sup>	? <sup>139</sup>	V	K	P	N	V	P	A	F	I	S	A	V	T	I	A	S	M	T	L	L	T	R	G	? <sup>139</sup>	? <sup>139</sup>	-	L	K	E	G	M	N	T	E	P	S	R	G	M	S	K	R	S	V	A	D	F	V					
<i>Chl. limicola</i> UdG 6044	T	N	V	K	P	N	V	P	A	F	I	S	A	V	T	I	A	S	M	T	L	L	T	T	G	S	T	-	L	X	E	G	M	N	T	E	P	S	R	G	M	S	K	R	S	V	A	D	F	V					
Atlantik SSM-3 K-307	S	N	V	K	P	N	V	P	A	F	I	S	A	V	T	I	A	S	M	T	L	L	T	V	G	S	T	-	L	R	E	G	L	N	T	E	P	S	R	G	M	S	K	R	Q	V	A	D	F	V					
Atlantik SSM-3 K-354	S	N	V	K	P	N	V	P	A	F	I	S	A	V	T	I	A	S	M	T	L	L	T	V	G	S	T	-	L	R	E	G	L	N	T	E	P	S	R	G	M	S	K	R	S	V	A	D	F	V					
③	<i>Chl. limicola</i> DSM 248	T	K	T	K	P	N	V	P	A	F	F	S	A	V	V	V	A	C	S	S	I	V	T	V	Q	S	T	-	L	R	E	S	I	G	T	Q	D	S	R	G	V	S	K	R	S	V	A	E	F	V				
	<i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 1855	T	K	T	K	P	N	V	P	A	F	F	S	A	V	V	V	A	C	S	S	I	V	T	V	Q	S	T	-	L	R	E	S	I	G	T	Q	D	S	R	G	V	S	K	R	S	V	A	E	F	V				
	<i>Chl. limicola f. thios.</i> 9330	T	K	T	K	P	N	V	P	A	F	F	S	A	V	V	V	A	C	S	S	I	V	T	V	Q	S	T	-	L	R	E	S	I	G	T	Q	D	S	R	G	V	S	K	R	S	V	A	E	F	V				
	<i>Chl. limicola f. thios.</i> 1630	T	K	T	K	P	N	V	P	A	F	F	S	A	V	V	V	A	C	S	S	I	V	T	V	Q	S	T	-	L	R	E	S	I	G	T	Q	D	S	R	G	V	S	K	R	S	V	A	E	F	V				
	<i>Chl. limicola</i> DSM 247	T	K	T	K	P	N	V	P	A	F	F	S	A	V	V	V	A	C	S	S	I	V	T	V	Q	S	T	-	L	R	E	S	I	G	T	Q	D	S	R	G	V	S	K	R	S	V	A	E	F	V				
	<i>Chl. limicola</i> DSM 245 <sup>T</sup>	T	K	T	K	P	N	V	P	A	F	F	S	A	V	V	V	A	C	S	S	I	V	T	V	Q	S	T	-	L	R	E	S	I	G	T	Q	D	S	R	G	V	S	K	R	S	V	A	E	F	V				
	<i>Chl. limicola</i> DSM 246	T	K	T	K	P	N	V	P	A	F	F	S	A	V	V	V	A	C	S	S	I	V	T	V	Q	S	T	-	L	R	E	S	I	G	T	Q	D	S	R	G	V	S	K	R	S	V	A	E	F	V				
	<i>Chl. phaeobacteroides</i> UdG 6051	? <sup>139</sup>	? <sup>139</sup>	? <sup>139</sup>	K	P	N	V	P	A	F	F	S	A	V	V	V	A	C	S	S	I	V	T	V	Q	S	T	-	L	R	E	S	I	G	T	Q	D	S	R	G	V	S	K	R	S	V	A	E	F	V				
<i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 266 <sup>T</sup>	T	K	T	K	P	N	V	P	A	F	F	S	A	V	V	V	A	C	S	S	I	V	T	V	Q	S	T	-	L	R	E	S	I	G	T	Q	E	S	R	G	I	S	K	S	V	A	E	F	V						
<i>Pld. phaeoclathratiforme</i> DSM 5477 <sup>T</sup>	T	K	T	K	P	N	V	P	A	F	F	S	A	V	V	V	A	C	S	S	I	V	T	L	Q	S	T	-	L	K	E	S	I	G	T	Q</																			

# 14 DISTANZ-MATRIZES

Tabelle 33: Distanz-/Similaritäts-Matrix der 16S-rDNA-Sequenzen aus Reinkulturen<sup>141</sup>

(Die Similarität wurde aus der Distanz berechnet; mathematische Rundung auf 3 signifikante Stellen)

	Similarität (%)																																												
	Gruppe 1							Gruppe 3									Gruppe 2						Gruppe 4										Gr.5												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
1 <i>Chl. vibrioforme</i> DSM 260 <sup>T</sup>	99,8	99,8	99,3	97,5	96,9	95,8	93,3	93,1	93,2	93,3	93,3	91,8	91,4	91,7	92,0	91,9	92,9	92,9	93,4	93,4	93,5	93,3	92,4	93,0	89,6	90,1	91,9	91,5	91,4	91,9	91,8	91,9	92,2	91,4	91,5	92,3	93,2	92,1	92,1	92,7	92,6	91,2	87,6	78,2	
2 <i>Plid. phaeum</i> CIB 2401	0,002	99,9	99,4	97,6	97,1	96,0	93,4	93,3	93,4	93,4	93,4	92,0	91,5	91,8	92,0	92,0	93,0	93,0	93,5	93,6	93,6	93,4	92,5	93,2	89,7	90,2	92,1	91,7	91,5	92,0	92,1	92,1	92,3	91,5	91,6	92,5	93,4	92,3	92,3	92,8	92,8	91,3	87,8	78,3	
3 <i>Chl. vibrioforme</i> CHP 3402	0,002	0,001	99,4	97,6	97,0	95,9	93,4	93,2	93,3	93,4	93,4	91,9	91,4	91,8	92,1	91,9	92,9	93,0	93,5	93,5	93,5	93,4	92,5	93,1	89,7	90,1	92,0	91,6	91,5	91,9	91,9	92,0	92,2	91,4	91,6	92,3	93,3	92,2	92,2	92,7	92,7	91,3	87,7	78,2	
4 <i>Chl. phaeovibrioides</i> DSM 1678	0,007	0,006	0,007	97,6	97,0	96,4	93,6	93,5	93,5	93,6	93,6	92,1	91,5	91,9	92,4	92,3	93,4	93,4	93,9	94,0	94,0	93,9	92,9	93,4	89,0	90,3	92,3	91,9	91,7	92,2	92,2	92,3	92,5	91,7	91,8	92,6	93,5	92,4	92,4	93,0	92,9	91,7	88,2	78,4	
5 <i>Ptc. aestuarii</i> 2K	0,026	0,024	0,025	0,025	98,1	97,3	92,4	92,2	92,3	92,4	92,4	91,0	90,1	90,7	91,4	91,3	92,3	92,4	92,7	92,8	92,8	92,6	91,6	92,2	88,9	90,2	92,0	91,6	91,5	92,0	91,9	92,2	92,2	91,0	91,1	92,4	93,2	92,0	92,2	92,9	92,8	90,6	88,1	78,4	
6 <i>Ptc. aestuarii</i> CHP 3401	0,031	0,030	0,030	0,030	0,019	96,5	93,0	92,8	92,9	93,0	92,9	91,6	90,9	91,3	91,7	91,6	92,3	92,8	92,4	92,5	92,5	92,3	91,2	91,8	88,7	90,7	92,3	92,0	91,8	92,3	92,2	92,3	92,0	91,6	91,6	92,0	92,5	91,7	91,7	92,2	92,3	90,3	88,1	78,1	
7 <i>Ptc. aestuarii</i> DSM 271 <sup>T</sup>	0,043	0,042	0,042	0,037	0,027	0,036	92,4	92,3	92,4	92,5	92,5	90,8	90,2	90,9	92,3	92,1	93,2	93,2	93,7	93,8	93,8	93,6	93,0	93,5	90,2	91,4	93,1	92,7	92,6	93,1	92,9	93,1	93,2	92,6	92,7	93,3	93,7	93,0	93,5	93,7	93,9	91,4	89,0	78,7	
8 <i>Chl. limicola</i> DSM 246	0,070	0,069	0,070	0,067	0,080	0,074	0,080	99,7	99,9	100,0	99,9	98,2	96,6	97,2	96,2	96,2	95,9	96,7	96,6	96,7	96,7	96,6	96,2	96,7	93,0	93,5	95,4	94,9	94,8	95,3	95,3	95,4	94,8	95,8	95,8	94,0	94,4	93,9	94,2	94,6	94,6	95,2	88,4	78,8	
9 <i>Chl. limicola f. thios.</i> 1630	0,072	0,070	0,071	0,069	0,083	0,076	0,081	0,003	99,9	99,8	99,8	98,2	96,6	97,2	96,1	96,1	95,7	96,5	96,6	96,7	96,7	96,6	96,2	96,7	93,0	93,5	95,4	94,9	94,8	95,3	95,3	95,4	94,8	95,8	95,8	94,0	94,5	93,9	94,2	94,6	94,6	95,1	88,3	78,6	
10 <i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 1855	0,071	0,070	0,070	0,068	0,081	0,075	0,080	0,001	0,001	99,9	99,8	98,3	96,7	97,3	96,2	96,2	95,8	96,6	96,7	96,8	96,8	96,7	96,3	96,8	93,1	93,6	95,5	95,0	94,9	95,4	95,4	95,5	94,9	95,9	95,9	94,1	94,5	94,0	94,3	94,7	94,7	95,2	88,4	78,8	
11 <i>Chl. limicola</i> DSM 245 <sup>T</sup>	0,070	0,069	0,070	0,067	0,081	0,074	0,079	0,000	0,002	0,001	99,9	98,2	96,6	97,2	96,2	96,2	95,9	96,7	96,6	96,7	96,7	96,6	96,3	96,8	93,1	93,6	95,5	95,0	94,9	95,4	95,4	95,5	94,9	95,9	95,9	94,1	94,5	94,0	94,3	94,7	94,7	95,3	88,5	78,7	
12 <i>Chl. limicola f. thios.</i> 9330	0,071	0,069	0,070	0,067	0,080	0,074	0,079	0,001	0,002	0,002	0,001	98,2	96,6	97,1	96,1	96,1	95,8	96,6	96,5	96,6	96,6	96,4	96,1	96,6	93,1	93,5	95,3	94,8	94,8	95,2	95,2	95,3	94,7	95,7	95,7	94,0	94,4	93,9	94,2	94,5	94,5	95,3	88,3	78,7	
13 <i>Chl. phaeobacteroides</i> UdG 6047	0,087	0,084	0,086	0,083	0,096	0,089	0,098	0,018	0,018	0,017	0,018	0,018	97,9	96,3	94,4	94,4	94,1	94,9	95,0	95,1	95,1	95,2	94,6	95,1	92,3	94,5	94,2	93,6	93,4	93,8	93,9	93,8	93,5	94,4	94,4	93,0	93,9	94,4	93,2	93,2	93,3	93,5	86,9	77,5	
14 <i>Chl. phaeobacteroides</i> UdG 6051	0,092	0,090	0,091	0,090	0,107	0,097	0,105	0,035	0,035	0,034	0,035	0,035	0,022	95,8	93,0	93,0	93,0	93,7	94,0	94,0	94,1	94,2	93,5	94,0	92,2	93,5	92,8	92,8	92,1	92,5	92,5	92,5	92,1	93,3	93,4	92,2	93,2	93,6	92,1	92,1	92,0	92,5	85,8	76,7	
15 <i>Chl. phaeobacteroides</i> UdG 6046	0,088	0,086	0,087	0,086	0,100	0,093	0,097	0,028	0,028	0,027	0,028	0,029	0,038	0,043	94,4	94,4	93,7	94,9	94,7	94,8	94,8	94,7	94,4	94,8	92,1	92,4	93,2	92,8	92,3	92,9	92,9	93,0	92,3	93,7	93,7	92,6	93,3	92,7	92,8	93,0	92,8	92,8	86,7	77,7	
16 <i>Plid. clathratiforme</i> PG	0,085	0,084	0,083	0,080	0,092	0,089	0,081	0,039	0,040	0,039	0,039	0,040	0,058	0,073	0,059	99,7	97,2	96,7	95,6	95,7	95,7	95,6	94,7	94,9	91,6	92,1	94,0	93,5	93,4	93,8	93,9	93,8	93,4	95,5	95,5	93,0	93,5	92,9	93,7	93,6	93,5	93,5	87,1	78,6	
17 <i>Plid. phaeoclathratiforme</i> DSM 5477 <sup>T</sup>	0,086	0,085	0,086	0,081	0,092	0,089	0,083	0,039	0,040	0,039	0,039	0,040	0,058	0,073	0,059	0,003	97,0	96,6	95,5	95,5	95,6	95,5	94,6	94,8	91,5	92,0	94,0	93,5	93,3	93,7	93,8	93,8	93,4	95,4	95,4	93,0	93,5	92,9	93,6	93,6	93,5	93,4	87,1	78,7	
18 <i>Chl. ferrooxidans</i> DSM 13031 <sup>T</sup>	0,075	0,074	0,075	0,069	0,081	0,082	0,071	0,043	0,044	0,043	0,042	0,043	0,062	0,074	0,066	0,029	0,031	96,4	96,5	96,6	96,6	96,4	95,2	95,5	91,8	92,5	94,5	94,0	93,8	94,4	94,3	94,4	94,4	95,7	95,6	94,2	94,2	93,7	94,2	94,8	94,4	94,5	87,9	79,4	
19 <i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 266 <sup>T</sup>	0,075	0,073	0,074	0,070	0,080	0,076	0,071	0,034	0,036	0,035	0,034	0,035	0,053	0,066	0,053	0,034	0,035	0,037	96,0	96,1	96,1	95,9	95,3	95,4	92,4	92,3	94,2	93,7	93,6	93,9	94,1	94,0	93,4	95,3	95,3	93,5	93,9	93,4	94,2	94,0	93,7	93,7	88,5	79,4	
20 <i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 261	0,069	0,068	0,068	0,063	0,077	0,080	0,066	0,035	0,035	0,034	0,035	0,036	0,052	0,063	0,055	0,045	0,047	0,036	0,041	99,8	99,9	99,7	97,7	98,1	94,2	92,2	93,9	93,4	93,3	93,8	93,8	93,9	93,9	95,2	95,2	93,9	94,4	93,8	94,2	94,5	94,2	93,8	88,5	79,0	
21 <i>Chl. phaeovibrioides</i> DSM 269 <sup>T</sup>	0,069	0,067	0,068	0,062	0,076	0,079	0,065	0,034	0,034	0,033	0,034	0,035	0,051	0,062	0,054	0,044	0,046	0,035	0,040	0,002	100,0	99,8	97,9	98,1	94,3	92,3	94,0	93,5	93,3	93,8	93,8	93,9	93,9	95,2	95,3	94,0	94,4	93,9	94,3	94,6	94,3	93,9	88,5	79,1	
22 <i>Chl. phaeovibrioides</i> DSM 270	0,068	0,067	0,068	0,062	0,076	0,079	0,065	0,034	0,034	0,033	0,034	0,035	0,051	0,062	0,054	0,044	0,046	0,035	0,040	0,001	0,000	99,8	97,8	98,1	94,3	92,3	94,0	93,5	93,3	93,9	93,8	93,9	93,9	95,2	95,3	94,0	94,4	93,9	94,3	94,6	94,3	93,9	88,6	79,1	
23 <i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> DSM 265 <sup>T</sup>	0,070	0,069	0,069	0,064	0,078	0,081	0,067	0,035	0,035	0,034	0,035	0,037	0,049	0,061	0,055	0,045	0,047	0,037	0,043	0,003	0,002	0,002	97,5	97,9	94,1	92,1	93,7	93,3	93,2	93,6	93,6	93,7	93,7	95,2	95,2	93,8	94,4	93,7	94,1	94,3	94,0	93,6	88,5	78,9	
24 <i>Chl. vibrioforme</i> DSM 262	0,080	0,079	0,079	0,075	0,090	0,094	0,073	0,039	0,039	0,038	0,038	0,040	0,056	0,068	0,058	0,055	0,056	0,050	0,048	0,023	0,022	0,022	0,025	99,4	95,7	93,0	94,8	94,3	94,3	94,7	94,7	94,8	94,8	95,7	95,7	94,8	95,0	94,6	95,1	95,4	95,1	95,2	88,6	78,7	
25 <i>Plid. luteolum</i> DSM 273 <sup>T</sup>	0,073	0,072	0,072	0,070	0,082	0,087	0,068	0,034	0,034	0,033	0,033	0,035	0,051	0,063	0,054	0,053	0,054	0,047	0,048	0,020	0,019	0,019	0,021	0,006	95,7	93,5	95,3	94,8	94,6	95,1	95,1	95,2	95,2	96,0	96,0	95,2	95,4	95,0	95,5	95,8	95,5	95,3	88,9	79,0	
26 <i>Chl. phaeovibrioides</i> UdG 6035	0,112	0,110	0,111	0,107	0,120	0,122	0,105	0,073	0,073	0,072	0,073	0,073	0,082	0,083	0,083	0,090	0,090	0,087	0,080	0,060	0,060	0,059	0,061	0,045	0,044	91,1	92,1	91,9	91,6	91,7	91,8	91,8	91,6	92,6	92,7	92,5	93,5	92,3	93,6	92,3	92,2	91,9	86,2	77,3	
27 <i>Chl. limicola</i> UdG 6041	0,107	0,105	0,106	0,104	0,105	0,09																																							

Tabelle 34: Distanz-/Similaritäts-Matrix der 16S-rDNA-Sequenzen aus Reinkulturen und Umweltproben<sup>142</sup>

		(Die Similarität wurde aus der Distanz berechnet; mathematische Rundung auf 3 signifikante Stellen)																																			Similarität (%)							
		Gruppe 1																	Gruppe 4																		Gr. 3	Gr. 2	Gr.5					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40			
1	<i>Chl. vibrioforme</i> DSM 260 <sup>T</sup>	99,8	99,3	99,8	97,7	96,9	95,4	95,5	95,5	95,3	95,0	96,8	96,4	95,5	96,8	96,7	95,8	92,2	91,5	92,1	93,2	92,2	92,1	92,7	92,7	92,7	94,2	92,9	92,7	91,2	93,3	93,0	93,3	93,1	87,8	81,3	81,4	80,7	80,6	78,3				
2	<i>Pld. phaeum</i> CIB 2401	0,002	99,4	99,9	97,8	97,0	95,6	95,6	95,5	95,2	96,9	96,5	95,6	97,0	96,8	95,9	92,3	91,7	92,3	93,4	92,3	92,3	92,8	92,9	92,8	94,3	93,0	92,9	91,4	93,4	93,1	93,4	93,2	88,0	81,3	81,4	80,7	80,7	78,4					
3	<i>Chl. phaeovibrioides</i> DSM 1678	0,007	0,006	99,4	97,7	97,0	96,0	96,0	96,0	95,9	95,3	97,2	96,8	96,0	96,9	96,9	96,4	92,5	91,8	92,4	93,5	92,4	92,4	93,0	93,1	93,1	94,6	93,2	93,1	91,7	93,6	93,4	93,9	93,4	88,6	81,5	81,6	80,5	80,6	78,4				
4	<i>Chl. vibrioforme</i> CHP 3402	0,002	0,001	0,007	97,7	97,0	95,5	95,5	95,5	95,4	95,1	96,9	96,5	95,6	96,9	96,7	95,9	92,3	91,6	92,2	93,3	92,2	92,2	92,7	92,8	92,8	94,3	93,0	92,8	91,3	93,4	93,1	93,4	93,1	87,9	81,4	81,5	80,7	80,8	78,3				
5	<i>Ptc. aestuarii</i> 2K	0,024	0,022	0,023	0,023	98,3	96,8	96,9	96,9	96,8	96,0	96,6	96,2	95,8	97,0	96,8	97,5	92,4	91,3	92,4	93,4	92,2	92,4	93,0	93,2	93,2	94,8	93,5	93,2	90,8	92,5	92,7	92,8	92,4	88,6	81,8	81,9	81,1	81,2	78,6				
6	<i>Ptc. aestuarii</i> CHP 3401	0,032	0,030	0,030	0,031	0,017	96,0	96,1	96,1	95,9	95,2	96,1	95,7	95,9	97,8	97,6	96,6	92,1	91,8	91,9	92,7	91,8	91,8	92,2	92,3	92,3	94,0	92,7	92,6	90,4	93,1	92,8	92,3	91,9	88,4	81,7	81,7	80,9	80,9	78,3				
7	Atlantik SSM-3 K-101	0,047	0,046	0,041	0,047	0,032	0,042	99,9	99,8	99,6	98,2	96,0	95,5	95,7	95,6	95,6	99,4	93,1	92,6	93,1	93,7	93,0	93,5	93,7	93,4	93,4	95,2	93,7	94,6	91,2	92,1	93,0	93,6	93,4	89,3	81,8	81,9	80,9	80,9	78,7				
8	Atlantik Sip-4 K-706	0,047	0,045	0,041	0,046	0,031	0,040	0,001	99,8	99,7	98,2	96,0	95,6	95,8	95,7	95,7	99,4	93,3	92,8	93,2	93,8	93,1	93,6	93,7	93,4	93,3	95,3	93,8	94,6	91,3	92,3	93,5	93,7	93,5	89,4	82,0	82,1	81,0	81,0	78,9				
9	Ostsee Laboe-3 K-500	0,047	0,045	0,041	0,046	0,031	0,040	0,002	0,002	99,5	98,2	96,0	95,5	95,6	95,7	95,5	99,3	93,4	92,8	93,2	93,8	93,1	93,6	93,7	93,5	93,4	95,2	93,8	94,6	91,3	92,4	93,2	93,7	93,7	89,5	82,1	82,2	81,1	81,2	79,0				
10	Atlantik Sip-4 K-721	0,048	0,047	0,042	0,048	0,033	0,043	0,004	0,003	0,005	98,1	95,8	95,3	95,6	95,5	95,5	99,3	93,2	92,7	93,2	93,8	93,1	93,6	93,7	93,3	93,2	95,1	93,7	94,6	91,2	92,3	93,1	93,5	93,5	89,1	82,0	82,0	80,8	80,9	78,8				
11	Atlantik SSM-3 K-100	0,052	0,050	0,048	0,051	0,041	0,050	0,018	0,018	0,018	0,020	95,2	94,8	94,6	95,1	94,9	98,2	93,7	93,5	94,5	94,8	94,3	94,6	95,0	94,5	94,5	95,8	94,3	95,9	91,7	92,2	92,5	93,0	94,0	88,6	81,9	81,9	81,1	80,7	78,6				
12	Adria Cviic-2 K-13	0,033	0,031	0,029	0,032	0,031	0,023	0,046	0,044	0,041	0,041	0,043	0,049	99,4	97,0	96,1	96,1	96,0	92,7	92,1	92,9	93,9	93,0	93,3	93,6	93,7	93,7	95,1	93,7	93,9	91,2	93,0	93,1	93,4	93,0	88,8	81,7	81,9	80,6	80,5	78,8			
13	Adria Cviic-2 K-69	0,037	0,036	0,033	0,036	0,039	0,044	0,047	0,046	0,047	0,048	0,054	0,006	96,6	95,7	95,7	95,6	92,3	91,7	92,4	93,5	92,5	92,9	93,1	93,2	93,2	94,6	93,2	93,5	90,8	92,5	92,6	92,9	92,5	88,6	81,3	81,5	80,2	80,2	78,3				
14	Ostsee Stein-1 K-207	0,047	0,045	0,041	0,046	0,043	0,042	0,044	0,043	0,045	0,046	0,056	0,030	0,035	96,6	96,7	96,1	92,5	92,1	91,8	92,5	91,6	92,0	92,3	92,4	92,4	93,8	92,5	92,7	90,7	93,0	93,0	93,1	92,6	88,5	81,2	81,5	80,2	80,2	78,2				
15	Bad Water BW-4 K-902	0,033	0,031	0,032	0,032	0,031	0,023	0,046	0,044	0,044	0,046	0,051	0,040	0,044	0,035	99,5	96,0	92,9	93,2	92,6	93,2	92,5	92,6	92,9	92,8	92,8	94,1	92,7	93,2	91,3	94,1	93,8	93,1	93,1	88,2	81,7	81,6	80,9	80,9	78,3				
16	Bad Water BW-4 K-974	0,034	0,033	0,032	0,033	0,032	0,024	0,046	0,044	0,046	0,046	0,053	0,040	0,044	0,034	0,005	96,0	92,7	93,1	92,3	93,1	92,5	92,4	92,7	92,7	92,6	94,1	92,7	93,1	91,1	93,9	93,6	93,1	93,0	88,0	81,4	81,4	80,5	80,5	78,1				
17	<i>Ptc. aestuarii</i> DSM 271 <sup>T</sup>	0,043	0,042	0,037	0,043	0,026	0,035	0,007	0,006	0,007	0,007	0,018	0,041	0,046	0,040	0,041	0,041	93,3	92,8	93,3	93,8	93,1	93,6	93,7	93,4	93,3	95,1	93,8	94,6	91,5	92,6	93,4	93,6	93,6	89,3	82,2	82,2	81,1	81,1	78,9				
18	<i>Chl. tepidum</i> ATCC 49652 <sup>T</sup>	0,083	0,081	0,079	0,082	0,081	0,083	0,072	0,070	0,069	0,071	0,066	0,077	0,081	0,079	0,075	0,076	0,070	96,0	95,9	95,4	95,2	95,5	96,2	95,8	95,7	94,4	95,6	95,6	95,2	95,0	93,4	93,7	95,3	88,6	82,0	82,3	80,8	80,8	79,5				
19	<i>Chl. limicola f. thios.</i> DSM 249 <sup>T</sup>	0,090	0,088	0,087	0,089	0,093	0,087	0,078	0,076	0,076	0,077	0,068	0,083	0,089	0,084	0,071	0,073	0,076	0,041	95,1	95,5	94,9	95,6	95,6	95,8	95,7	94,5	95,2	95,8	94,9	95,9	95,4	95,2	96,1	88,5	82,1	82,6	81,5	80,8	79,2				
20	<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> DSM 263	0,083	0,081	0,080	0,083	0,080	0,085	0,073	0,071	0,071	0,071	0,058	0,074	0,080	0,087	0,078	0,081	0,071	0,042	0,051	98,4	98,1	98,2	99,0	97,5	97,4	95,7	96,8	98,2	94,5	94,0	93,5	93,7	95,2	88,6	81,2	81,8	80,8	80,9	78,4				
21	<i>Chl. vibrioforme</i> UdG 6043	0,071	0,069	0,068	0,070	0,070	0,077	0,066	0,065	0,065	0,065	0,054	0,063	0,069	0,080	0,071	0,073	0,065	0,048	0,047	0,017	98,1	98,7	98,5	97,7	97,6	95,9	96,8	98,1	94,9	94,6	94,1	94,4	95,5	89,2	81,4	81,9	80,8	80,9	79,0				
22	<i>Chl. limicola</i> UdG 6044	0,083	0,081	0,081	0,082	0,083	0,087	0,073	0,072	0,072	0,072	0,060	0,073	0,079	0,089	0,079	0,079	0,072	0,050	0,053	0,019	0,019	97,8	98,2	97,1	97,0	95,3	96,3	97,9	94,2	94,1	93,6	93,7	95,0	88,3	80,8	81,2	80,3	80,3	78,7				
23	<i>Chl. chlorovibrioides</i> UdG 6026	0,083	0,081	0,080	0,083	0,080	0,087	0,068	0,067	0,067	0,067	0,056	0,070	0,075	0,085	0,078	0,080	0,067	0,046	0,045	0,018	0,013	0,023	98,4	97,6	97,4	95,7	96,9	98,1	94,7	94,3	94,3	94,1	95,5	89,2	81,1	81,8	81,2	81,1	79,1				
24	<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> NCIB 8346	0,077	0,076	0,074	0,076	0,074	0,083	0,066	0,066	0,066	0,066	0,052	0,067	0,072	0,081	0,075	0,076	0,066	0,039	0,045	0,010	0,015	0,018	0,016	98,1	98,1	96,2	97,3	98,8	95,1	94,7	94,1	94,3	95,8	89,2	81,7	82,2	81,2	81,2	79,5				
25	Atlantik SSM-3 K-106	0,076	0,075	0,073	0,076	0,071	0,081	0,069	0,069	0,068	0,070	0,057	0,066	0,070	0,080	0,076	0,077	0,069	0,043	0,043	0,025	0,024	0,029	0,025	0,019	100,0	97,9	98,8	97,9	95,5	95,4	94,3	94,5	96,4	89,6	81,2	81,7	80,7	80,5	79,0				
26	Atlantik Sip-4 K-701	0,077	0,075	0,073	0,076	0,071	0,081	0,069	0,070	0,069	0,071	0,057	0,066	0,071	0,080	0,076	0,078	0,070	0,044	0,044	0,027	0,025	0,031	0,026	0,019	0,000	97,9	98,8	97,9	95,4	95,3	94,3	95,1	96,2	89,4	81,1	81,7	80,7	80,4	79,0				
27	Atlantik SSM-3 K-153	0,060	0,059	0,056	0,060	0,054	0,062	0,049	0,048	0,049	0,051	0,043	0,051	0,056	0,065	0,061	0,061	0,050	0,058	0,057	0,045	0,042	0,048	0,044	0,039	0,021	0,021	97,4	96,0	93,6	94,0	93,0	94,3	94,8	89,0	81,2	81,6	80,2	80,0	78,3				
28	Atlantik SSM-3 K-137	0,075	0,073	0,071	0,074	0,068	0,077	0,066	0,065	0,065	0,066	0,060	0,066	0,071	0,079	0,076	0,076	0,065	0,046	0,049	0,033	0,032	0,038	0,032	0,027	0,012	0,012	0,026	97,1	95,5	95,4	94,4	94,5	96,4	89,7	81,2	82,0	80,6	80,9	78,9				
29	Atlantik SSM-3 K-108	0,076	0,075	0,073	0,075	0,071	0,078	0,056	0,056	0,056	0,056	0,042	0,063	0,068	0,077	0,071	0,073	0,056	0,046	0,043	0,018	0,019	0,022	0,019	0,012	0,021	0,021	0,041	0,030	94,6	94,4	94,1	94,4	95,9	89,6	81,8	82,2	81,3	81,1	79,1				
30	<i>Clc. sulfurica</i> 1	0,093	0,092	0,088	0,093	0,098	0,103	0,094	0																																			

Tabelle 35: Distanz-/Similaritäts-Matrix der *fmoA*-Sequenzen aus Reinkulturen<sup>143</sup>

		(Die Similarität wurde aus der Distanz berechnet; mathematische Rundung auf 3 signifikante Stellen)																								Similarität (%)							
		Gruppe 4										Gruppe 3										Gruppe 2					Gruppe 1						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
1	<i>Chl. chlorovibrioides</i> UdG 6026		97,1	97,1	97,1	88,0	88,5	88,0	88,5	88,7	88,7	88,5	77,6	77,2	77,5	78,7	78,4	78,4	78,4	78,4	78,5	78,4	77,9	77,8	77,9	77,9	80,5	80,3	73,6	75,0	76,0	74,8	75,1
2	<i>Chl. limicola</i> UdG 6044	0,030		96,1	96,1	88,0	88,7	88,2	88,3	88,5	88,4	88,5	78,4	78,0	78,4	79,2	78,7	78,7	78,7	78,7	79,5	78,7	78,6	78,5	78,6	78,6	80,9	80,7	74,1	75,3	75,9	75,0	75,7
3	<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> DSM 263	0,030	0,040		100,0	88,6	89,3	88,7	89,0	89,2	89,3	89,5	78,2	77,9	78,2	79,1	78,8	78,8	78,7	78,7	78,6	77,8	78,5	78,4	78,5	78,5	81,4	81,1	73,6	75,0	75,4	74,6	75,8
4	<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> NCIB 8346	0,030	0,040	0,000		88,6	89,3	88,7	89,0	89,2	89,3	89,5	78,2	77,9	78,2	79,1	78,8	78,8	78,7	78,7	78,6	77,8	78,5	78,4	78,5	78,5	81,4	81,1	73,6	75,0	75,4	74,6	75,8
5	<i>Chl. limicola f. thios.</i> DSM 249 <sup>T</sup>	0,131	0,130	0,124	0,124		99,2	98,5	93,5	93,9	93,9	92,8	79,7	79,3	79,5	80,2	80,3	80,3	80,0	80,0	79,4	77,5	77,8	77,6	77,8	77,5	80,7	81,0	73,4	74,0	72,9	74,4	73,1
6	<i>Chl. limicola f. thios.</i> 1430	0,125	0,122	0,116	0,116	0,008		98,8	94,0	94,2	94,3	93,1	80,3	79,8	80,0	80,5	80,7	80,7	80,5	80,5	79,8	77,8	78,1	78,0	78,1	78,1	81,0	81,0	73,8	74,4	73,5	74,6	73,3
7	<i>Chl. limicola f. thios.</i> DSM 257	0,131	0,129	0,122	0,122	0,015	0,012		93,1	93,3	93,3	92,4	79,9	79,6	79,8	80,4	80,4	80,4	80,2	80,2	79,5	77,4	77,5	77,4	77,5	77,5	80,4	80,6	73,6	74,1	72,9	74,7	73,3
8	<i>Chl. limicola</i> UdG 6041	0,125	0,127	0,119	0,119	0,068	0,063	0,073		99,0	99,0	92,0	80,1	79,8	79,9	80,6	79,9	79,9	79,8	79,8	79,0	77,2	77,8	77,7	77,8	77,8	81,0	81,5	73,0	73,3	73,0	74,9	73,1
9	<i>Chl. phaeobacteroides</i> 1549	0,122	0,124	0,116	0,116	0,064	0,060	0,070	0,011		100,0	92,4	80,5	80,2	80,3	81,0	80,3	80,3	80,1	80,1	79,0	77,6	78,5	78,4	78,5	78,5	81,1	81,5	73,8	73,9	73,4	75,5	73,7
10	<i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 1677	0,122	0,126	0,116	0,116	0,063	0,060	0,070	0,011	0,000		92,4	80,4	80,1	80,2	81,0	80,2	80,2	80,0	80,0	78,9	77,5	78,3	78,2	78,3	78,3	80,9	81,3	73,7	73,9	73,4	75,3	73,6
11	<i>Chl. tepidum</i> ATCC 49652 <sup>T</sup>	0,125	0,125	0,113	0,113	0,076	0,072	0,080	0,084	0,080	0,080		79,7	79,4	79,5	80,2	79,7	79,7	79,5	79,5	79,6	77,5	77,4	77,3	77,4	77,4	80,2	80,7	73,5	73,9	73,3	73,8	74,8
12	<i>Chl. limicola f. thios.</i> 1630	0,267	0,255	0,257	0,257	0,237	0,229	0,234	0,231	0,226	0,227	0,237		99,9	99,9	98,8	96,2	96,2	96,1	96,1	84,6	82,7	79,2	79,1	79,2	79,2	81,2	81,9	74,2	74,5	74,7	74,5	74,7
13	<i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 1855	0,272	0,260	0,262	0,262	0,243	0,235	0,238	0,236	0,230	0,232	0,241	0,001		99,8	98,7	96,0	96,0	95,9	95,9	84,7	82,5	78,9	78,8	78,9	78,9	80,8	81,6	73,9	74,1	74,4	74,3	74,5
14	<i>Chl. limicola</i> DSM 248	0,267	0,255	0,257	0,257	0,240	0,232	0,235	0,234	0,229	0,230	0,240	0,001	0,002		98,9	96,1	96,1	96,0	96,0	84,5	82,5	79,0	78,9	79,0	79,0	81,2	81,9	73,9	74,3	74,6	74,6	74,7
15	<i>Chl. phaeobacteroides</i> UdG 6051	0,251	0,244	0,244	0,244	0,230	0,226	0,227	0,224	0,219	0,219	0,230	0,012	0,013	0,011		94,9	94,9	94,8	94,8	84,0	81,9	79,2	79,2	79,2	79,2	81,7	82,4	73,2	73,9	74,4	74,2	74,1
16	<i>Chl. limicola</i> DSM 245 <sup>T</sup>	0,255	0,250	0,249	0,249	0,229	0,223	0,227	0,234	0,229	0,230	0,237	0,039	0,041	0,040	0,053		100,0	99,8	99,8	83,6	82,1	78,6	78,4	78,6	78,6	80,0	80,7	74,3	75,0	75,1	73,5	74,7
17	<i>Chl. limicola f. thios.</i> 9330	0,255	0,250	0,249	0,249	0,229	0,223	0,227	0,234	0,229	0,230	0,237	0,039	0,041	0,040	0,053	0,000		99,8	99,8	83,6	82,1	78,6	78,4	78,6	78,6	80,0	80,7	74,3	75,0	75,1	73,5	74,7
18	<i>Chl. limicola</i> DSM 246	0,255	0,250	0,250	0,250	0,232	0,226	0,230	0,236	0,231	0,232	0,240	0,040	0,042	0,042	0,054	0,002	0,002		100,0	83,4	82,2	78,7	78,6	78,7	78,7	79,8	80,7	74,3	75,0	75,3	73,5	74,7
19	<i>Chl. limicola</i> DSM 247	0,255	0,250	0,250	0,250	0,232	0,226	0,230	0,236	0,231	0,232	0,240	0,040	0,042	0,042	0,054	0,002	0,002	0,000		83,4	82,2	78,7	78,6	78,7	78,7	79,8	80,7	74,3	75,0	75,3	73,5	74,7
20	<i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 266 <sup>T</sup>	0,253	0,239	0,252	0,252	0,241	0,235	0,240	0,247	0,247	0,248	0,238	0,172	0,171	0,173	0,180	0,185	0,185	0,188	0,188		82,1	80,6	80,5	80,6	80,6	82,5	82,2	73,8	74,7	75,5	73,5	74,5
21	<i>Pld. phaeoclathratiforme</i> DSM 5477 <sup>T</sup>	0,255	0,250	0,263	0,263	0,267	0,264	0,269	0,271	0,266	0,267	0,267	0,197	0,199	0,200	0,207	0,204	0,204	0,203	0,203	0,204		81,8	81,7	81,8	81,8	80,3	80,6	74,2	74,5	74,8	73,0	74,4
22	<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> DSM 265 <sup>T</sup>	0,262	0,252	0,254	0,254	0,264	0,259	0,267	0,263	0,253	0,256	0,269	0,243	0,248	0,246	0,243	0,253	0,253	0,251	0,251	0,224	0,209		99,9	100,0	99,8	84,9	84,4	71,1	72,1	72,8	72,4	71,9
23	<i>Chl. phaeovibrioides</i> DSM 269 <sup>T</sup>	0,263	0,253	0,255	0,255	0,266	0,261	0,269	0,265	0,255	0,257	0,271	0,245	0,249	0,248	0,243	0,254	0,254	0,253	0,253	0,226	0,210	0,001		99,9	99,7	84,7	84,3	71,0	72,0	72,7	72,3	71,8
24	<i>Chl. phaeovibrioides</i> DSM 270	0,262	0,252	0,254	0,254	0,264	0,259	0,267	0,263	0,253	0,256	0,269	0,243	0,248	0,246	0,243	0,253	0,253	0,251	0,251	0,224	0,209	0,000	0,001		99,8	84,9	84,4	71,1	72,1	72,8	72,4	71,9
25	<i>Chl. vibrioforme</i> DSM 261	0,262	0,252	0,254	0,254	0,267	0,259	0,267	0,263	0,253	0,256	0,269	0,243	0,248	0,246	0,243	0,253	0,253	0,251	0,251	0,224	0,209	0,002	0,003	0,002		84,7	84,3	71,2	72,2	72,8	72,4	71,9
26	<i>Chl. vibrioforme</i> DSM 262	0,226	0,220	0,214	0,214	0,223	0,220	0,227	0,219	0,218	0,221	0,230	0,217	0,222	0,216	0,210	0,232	0,232	0,235	0,235	0,200	0,229	0,169	0,171	0,169	0,171		96,8	73,4	73,7	73,8	74,2	74,3
27	<i>Pld. luteolum</i> DSM 273 <sup>T</sup>	0,229	0,223	0,217	0,217	0,220	0,220	0,224	0,212	0,212	0,215	0,223	0,207	0,211	0,207	0,200	0,223	0,223	0,223	0,223	0,203	0,224	0,175	0,176	0,175	0,176	0,033		74,2	74,7	73,4	74,9	75,2
28	<i>Chl. vibrioforme</i> DSM 260 <sup>T</sup>	0,325	0,318	0,325	0,325	0,329	0,322	0,326	0,334	0,323	0,324	0,327	0,317	0,321	0,321	0,331	0,315	0,315	0,315	0,315	0,322	0,317	0,366	0,367	0,366	0,364	0,329	0,317		94,4	82,3	81,8	84,2
29	<i>Chl. phaeovibrioides</i> DSM 1678	0,305	0,300	0,304	0,304	0,320	0,313	0,318	0,330	0,321	0,322	0,322	0,311	0,317	0,315	0,321	0,304	0,304	0,304	0,304	0,309	0,311	0,348	0,350	0,348	0,347	0,323	0,309	0,058		83,1	82,8	84,8
30	<i>Ptc. aestuarii</i> CHP 3401	0,290	0,290	0,298	0,298	0,336	0,327	0,336	0,334	0,328	0,329	0,331	0,309	0,314	0,310	0,314	0,302	0,302	0,300	0,300	0,297	0,307	0,338	0,340	0,338	0,338	0,322	0,329	0,202	0,191		84,8	83,8
31	<i>Ptc. aestuarii</i> 2K	0,307	0,304	0,310	0,310	0,314	0,310	0,308	0,306	0,297	0,300	0,322	0,312	0,314	0,310	0,316	0,327	0,327	0,327	0,327	0,328	0,335	0,344	0,346	0,344	0,344	0,317	0,306	0,209	0,195	0,170		83,1
32	<i>Ptc. aestuarii</i> DSM 271 <sup>T</sup>	0,303	0,293	0,292	0,292	0,334	0,330	0,330	0,334	0,324	0,325	0,308	0,309	0,312	0,308	0,318	0,309	0,309	0,309	0,309	0,311	0,313	0,352	0,354	0,352	0,352	0,315	0,301	0,177	0,170	0,182	0,192	
<b>Distanz</b>		(Die Distanz wurde nach Jukes & Cantor (1969) mit DNADIST im Programmpaket Phylip ermittelt; mathematische Rundung auf 3 signifikante Stellen)																															

<sup>143</sup> Die Sequenzen waren nicht notwendigerweise identisch. Der Similaritätswert 100,0 % bzw. die Distanz 0,000 kann sich auch durch die mathematische Rundung ergeben.

**Tabelle 36: Distanz-/Similaritäts-Matrix der *fmoA*-Sequenzen aus Reinkulturen und Umweltproben<sup>144</sup>**

		(Die Similarität wurde aus der Distanz berechnet; mathematische Rundung auf 3 signifikante Stellen)																											Similarität (%)							
		Gruppe 1																			Gruppe 4							Gr. 3		Gr. 2						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31				
1	Ostsee Stak-2 K-400		99,8	99,4	99,3	99,5	98,9	98,7	99,1	99,0	98,6	99,0	97,9	83,9	83,7	81,2	84,1	83,1	84,1	84,8	75,2	75,9	76,0	76,0	73,3	74,6	74,1	74,2	75,1	74,6	72,4	75,5				
2	Ostsee Laboe-3 K-600	0,002		99,7	99,5	99,8	99,1	99,0	99,3	99,2	98,9	99,2	98,2	84,1	83,9	81,4	84,3	83,3	84,3	85,0	75,2	75,9	76,0	76,0	73,4	74,7	74,2	74,3	75,1	74,6	72,4	75,5				
3	Ostsee Laboe-3 K-686	0,006	0,003		99,2	99,4	98,7	98,6	99,0	98,9	98,5	98,9	97,8	83,9	83,7	81,0	84,1	83,1	84,1	84,8	75,0	75,7	75,7	75,7	73,2	74,5	74,1	74,1	74,9	74,3	72,2	75,3				
4	Ostsee Laboe-3 K-683	0,007	0,005	0,008		99,3	98,6	98,5	98,9	98,7	98,4	98,7	97,7	83,9	83,7	81,4	83,9	82,9	84,1	84,8	75,1	75,7	75,9	75,9	73,2	74,5	74,2	74,1	75,3	74,3	72,4	75,5				
5	Ostsee Laboe-3 K-635	0,005	0,002	0,006	0,007		99,1	99,0	99,3	99,2	98,9	99,2	97,9	83,9	83,7	81,3	84,3	83,3	84,2	84,9	75,2	75,9	76,0	76,0	73,3	74,6	74,2	74,3	75,0	74,4	72,4	75,5				
6	Atlantik Sip-4 K-802	0,012	0,009	0,013	0,014	0,009		99,7	99,5	99,4	99,1	99,2	97,3	84,0	83,8	81,0	83,9	83,1	84,3	84,9	75,7	76,2	76,4	76,4	73,7	75,1	74,5	74,6	75,0	74,7	72,1	75,5				
7	Atlantik Sip-4 K-839	0,013	0,010	0,014	0,015	0,010	0,003		99,4	99,3	99,0	99,1	97,1	84,0	83,8	81,0	83,9	83,1	84,2	84,8	75,6	76,1	76,3	76,3	73,5	75,0	74,3	74,5	74,7	74,3	71,7	75,1				
8	Atlantik SSM-3 K-303	0,009	0,007	0,010	0,012	0,007	0,005	0,006		99,7	99,1	99,4	97,5	84,0	83,8	81,0	83,9	82,9	84,1	84,7	75,2	75,9	76,0	76,0	73,2	74,7	74,0	74,1	74,8	74,5	72,1	75,3				
9	<i>Ptc. aestuarii</i> DSM 271 <sup>T</sup>	0,010	0,008	0,012	0,013	0,008	0,006	0,007	0,003		99,0	99,5	97,6	83,9	83,7	81,0	83,7	83,0	84,2	84,8	75,1	75,8	75,9	75,9	73,1	74,8	74,1	74,2	74,7	74,6	71,9	75,1				
10	Atlantik SSM-3 K-311	0,014	0,012	0,015	0,016	0,012	0,009	0,010	0,009	0,010		99,2	97,0	83,9	83,7	81,2	83,9	82,7	83,9	84,5	75,0	75,8	75,7	75,7	72,9	74,6	73,8	73,9	74,7	74,0	72,2	74,8				
11	Atlantik SSM-3 K-351	0,010	0,008	0,012	0,013	0,008	0,008	0,009	0,006	0,005	0,008		97,4	84,0	83,8	81,0	84,0	82,9	84,0	84,6	75,1	76,0	75,9	75,9	73,0	74,5	74,1	74,0	74,5	74,3	72,2	75,1				
12	Ostsee Stak-2 K-455	0,021	0,019	0,022	0,023	0,021	0,028	0,029	0,026	0,024	0,030	0,027		83,6	83,3	81,2	84,3	83,0	83,4	84,5	75,5	75,9	76,0	76,0	73,4	74,6	73,9	74,7	74,9	74,7	72,4	75,3				
13	Adria Cviic-2 K-1011	0,181	0,178	0,181	0,181	0,181	0,180	0,180	0,180	0,181	0,181	0,180	0,186		99,4	88,0	83,4	80,9	81,4	82,0	73,4	73,7	73,8	73,8	71,1	71,9	71,6	73,1	75,1	75,4	71,9	71,5				
14	Adria Cviic-2 K-1079	0,184	0,181	0,184	0,184	0,184	0,183	0,183	0,183	0,184	0,184	0,183	0,189	0,006		87,8	83,2	80,7	81,0	81,7	73,2	73,5	73,6	73,6	70,9	71,7	71,2	72,9	74,9	75,0	71,5	71,2				
15	Adria Cviic-2 K-1027a	0,217	0,214	0,219	0,214	0,216	0,219	0,219	0,219	0,219	0,217	0,219	0,217	0,131	0,133		81,5	78,7	81,0	81,2	72,1	72,2	72,3	72,3	70,3	70,8	70,9	71,7	72,5	73,6	71,0	73,1				
16	<i>Ptc. aestuarii</i> CHP 3401	0,179	0,176	0,179	0,182	0,176	0,182	0,182	0,182	0,183	0,182	0,180	0,176	0,188	0,191	0,212		84,7	82,2	83,0	75,9	75,9	75,3	75,3	72,8	73,2	73,9	74,6	75,1	75,4	72,7	73,3				
17	<i>Ptc. aestuarii</i> 2K	0,192	0,189	0,192	0,195	0,189	0,192	0,192	0,195	0,193	0,196	0,195	0,193	0,220	0,224	0,250	0,172		81,7	82,7	74,7	74,9	74,5	74,5	74,3	73,7	74,5	75,1	73,4	73,4	72,3	74,8				
18	<i>Chl. vibrioforme</i> DSM 260 <sup>T</sup>	0,179	0,176	0,179	0,179	0,177	0,176	0,177	0,179	0,177	0,181	0,180	0,187	0,214	0,219	0,219	0,203	0,210		94,4	73,7	74,1	73,6	73,6	73,4	73,5	73,6	74,3	74,3	73,9	71,1	74,1				
19	<i>Chl. phaeovibrioides</i> DSM 1678	0,170	0,167	0,170	0,170	0,168	0,168	0,170	0,171	0,170	0,174	0,173	0,174	0,206	0,209	0,217	0,192	0,196	0,058		75,0	75,3	75,1	75,1	74,0	73,9	74,1	75,7	75,0	74,7	72,2	74,6				
20	<i>Chl. chlorovibrioides</i> UdG 6026	0,301	0,301	0,304	0,302	0,301	0,294	0,295	0,301	0,302	0,304	0,302	0,297	0,329	0,331	0,350	0,291	0,308	0,324	0,304		97,1	97,1	97,1	88,0	88,5	89,8	91,5	78,4	78,5	77,9	80,2				
21	<i>Chl. limicola</i> UdG 6044	0,291	0,291	0,294	0,294	0,291	0,286	0,288	0,291	0,293	0,293	0,289	0,291	0,324	0,327	0,347	0,291	0,305	0,317	0,299	0,030		96,1	96,1	88,1	88,5	89,7	91,4	78,8	79,6	78,6	80,6				
22	<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> DSM 263	0,290	0,290	0,293	0,291	0,290	0,283	0,285	0,290	0,291	0,293	0,291	0,290	0,322	0,326	0,346	0,299	0,311	0,325	0,303	0,030	0,040		100,0	88,6	89,5	90,8	91,8	78,8	78,6	78,5	81,0				
23	<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> NCIB 8346	0,290	0,290	0,293	0,291	0,290	0,283	0,285	0,290	0,291	0,293	0,291	0,290	0,322	0,326	0,346	0,299	0,311	0,325	0,303	0,030	0,040	0,000		88,6	89,5	90,8	91,8	78,8	78,6	78,5	81,0				
24	<i>Chl. limicola f. thios.</i> DSM 249 <sup>T</sup>	0,330	0,328	0,332	0,332	0,330	0,325	0,326	0,332	0,333	0,337	0,335	0,328	0,365	0,368	0,378	0,338	0,315	0,329	0,319	0,130	0,130	0,123	0,123		92,8	90,3	89,9	80,3	79,4	77,8	80,9				
25	<i>Chl. tepidum</i> ATCC 49652 <sup>T</sup>	0,311	0,309	0,312	0,312	0,311	0,302	0,304	0,309	0,307	0,311	0,312	0,311	0,352	0,355	0,370	0,332	0,323	0,327	0,321	0,125	0,125	0,113	0,113	0,076		89,2	90,0	79,7	79,6	77,4	80,6				
26	Atlantik SSM-3 K-307	0,318	0,316	0,318	0,316	0,316	0,312	0,314	0,319	0,318	0,323	0,318	0,321	0,357	0,363	0,368	0,321	0,311	0,325	0,318	0,110	0,111	0,098	0,098	0,104	0,116		93,1	78,7	79,0	77,4	80,3				
27	Atlantik SSM-3 K-354	0,316	0,314	0,318	0,318	0,314	0,311	0,312	0,318	0,316	0,321	0,319	0,309	0,333	0,337	0,355	0,310	0,303	0,315	0,293	0,090	0,092	0,086	0,086	0,108	0,107	0,072		79,6	79,5	77,4	81,0				
28	<i>Chl. limicola</i> DSM 245 <sup>T</sup>	0,302	0,302	0,305	0,300	0,304	0,304	0,309	0,307	0,309	0,309	0,312	0,305	0,302	0,305	0,343	0,303	0,329	0,315	0,304	0,255	0,250	0,249	0,249	0,229	0,236	0,251	0,238		83,6	78,6	80,6				
29	<i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 266 <sup>T</sup>	0,311	0,311	0,314	0,314	0,313	0,309	0,314	0,312	0,311	0,319	0,314	0,309	0,299	0,304	0,325	0,298	0,329	0,322	0,309	0,253	0,239	0,252	0,252	0,241	0,238	0,246	0,240	0,185		80,6	82,1				
30	<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> DSM 265 <sup>T</sup>	0,344	0,344	0,348	0,344	0,344	0,350	0,355	0,350	0,352	0,348	0,348	0,344	0,352	0,359	0,367	0,340	0,345	0,365	0,348	0,261	0,251	0,253	0,253	0,264	0,268	0,268	0,252	0,224		84,3					
31	<i>Pld. luteolum</i> DSM 273 <sup>T</sup>	0,297	0,297	0,300	0,297	0,297	0,302	0,300	0,302	0,307	0,302	0,300	0,302	0,300	0,359	0,363	0,334	0,330	0,308	0,318	0,311	0,230	0,225	0,219	0,219	0,221	0,224	0,229	0,219	0,224	0,204	0,176				
<b>Distanz</b>		(Die Distanz wurde nach Jukes & Cantor (1969) mit DNADIST im Programmpaket Phylip ermittelt; mathematische Rundung auf 3 signifikante Stellen )																																		

<sup>144</sup> Die Sequenzen waren nicht notwendigerweise identisch. Der Similaritätswert 100,0 % bzw. die Distanz 0,000 kann sich auch durch die mathematische Rundung ergeben.

Tabelle 37: Distanz-/Similaritäts-Matrix der FMO-Sequenzen aus Reinkulturen<sup>145</sup>

		(Die Similarität wurde aus der Distanz berechnet; mathematische Rundung auf 3 signifikante Stellen)																												Similarität (%)			
		Gruppe 1					Gruppe 4										Gruppe 3								Gruppe 2								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
1	<i>Chl. vibrioforme</i> DSM 260 <sup>T</sup>	99,7	95,8	90,5	89,5	80,2	80,2	80,3	80,3	78,1	78,1	78,2	77,2	78,4	78,7	78,9	79,9	79,7	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	78,1	81,5	80,5	78,7	79,0	79,0	79,0	79,7	79,7
2	<i>Chl. phaeovibrioides</i> DSM 1678	0,003	96,1	91,0	89,9	80,8	80,8	80,9	80,8	78,7	78,7	78,7	77,8	79,0	79,3	79,4	80,5	80,3	80,5	80,5	80,5	80,5	80,5	80,5	78,7	82,0	81,0	79,3	79,6	79,6	79,6	80,2	80,2
3	<i>Ptc. aestuarii</i> DSM 271 <sup>T</sup>	0,044	0,040	92,0	90,2	82,0	82,0	81,8	82,0	79,6	79,6	79,9	79,0	80,2	80,3	80,6	81,3	81,2	81,4	81,4	81,4	81,4	81,4	81,4	79,6	83,7	81,6	80,7	81,0	81,0	81,0	82,0	82,0
4	<i>Ptc. aestuarii</i> CHP 3401	0,102	0,096	0,085	92,3	82,5	82,5	81,9	81,6	79,6	79,6	80,0	78,7	80,3	80,0	80,4	81,2	81,0	81,3	81,3	81,3	81,3	81,3	81,3	80,3	81,5	81,2	80,4	80,7	80,7	80,7	81,2	81,2
5	<i>Ptc. aestuarii</i> 2K	0,113	0,108	0,104	0,082	79,4	79,4	79,1	79,4	77,2	77,2	77,5	76,6	77,8	77,9	78,2	79,4	79,2	79,5	79,5	79,5	79,5	79,5	79,5	77,5	79,6	78,4	77,0	77,3	77,3	77,3	78,3	78,3
6	<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> DSM 263	0,229	0,222	0,206	0,200	0,241	100,0	99,3	97,4	94,8	94,8	95,1	94,5	95,5	95,1	95,4	88,2	88,1	88,3	88,3	88,3	88,3	88,3	88,3	88,0	88,7	88,2	88,3	88,6	88,6	88,6	90,2	90,2
7	<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> NCIB 8346	0,229	0,222	0,206	0,200	0,241	0,000	99,3	97,4	94,8	94,8	95,1	94,5	95,5	95,1	95,4	88,2	88,1	88,3	88,3	88,3	88,3	88,3	88,3	88,0	88,7	88,2	88,3	88,6	88,6	88,6	90,2	90,2
8	<i>Chl. chlorovibrioides</i> UdG 6026	0,228	0,221	0,209	0,207	0,245	0,007	0,007	96,9	94,3	94,3	94,3	93,6	94,6	94,2	94,6	87,8	87,7	87,8	87,8	87,8	87,8	87,8	87,8	87,4	88,6	88,1	87,9	88,2	88,2	88,2	89,8	89,8
9	<i>Chl. limicola</i> UdG 6044	0,229	0,222	0,206	0,211	0,241	0,027	0,027	0,031	94,2	94,2	94,5	93,9	94,8	94,8	95,1	88,3	88,2	88,3	88,3	88,3	88,3	88,3	88,3	88,7	88,8	87,9	87,4	87,7	87,7	87,7	89,6	89,6
10	<i>Chl. limicola f. thios.</i> DSM 249 <sup>T</sup>	0,259	0,251	0,238	0,237	0,271	0,054	0,054	0,060	0,060	100,0	99,7	98,1	99,4	99,0	99,3	89,9	89,8	89,9	89,9	89,9	89,9	89,9	89,9	89,7	90,7	88,6	86,8	87,1	87,1	87,1	89,3	89,3
11	<i>Chl. limicola f. thios.</i> DSM 257	0,259	0,251	0,238	0,237	0,271	0,054	0,054	0,060	0,060	0,000	99,7	98,1	99,4	99,0	99,3	89,9	89,8	89,9	89,9	89,9	89,9	89,9	89,9	89,7	90,7	88,6	86,8	87,1	87,1	87,1	89,3	89,3
12	<i>Chl. limicola f. thios.</i> 1430	0,258	0,251	0,234	0,233	0,267	0,050	0,050	0,060	0,057	0,003	0,003	98,4	99,7	99,3	99,7	90,2	90,1	90,2	90,2	90,2	90,2	90,2	90,1	90,7	88,3	87,1	87,4	87,4	87,4	89,6	89,6	
13	<i>Chl. tepidum</i> ATCC 49652 <sup>T</sup>	0,271	0,263	0,247	0,251	0,281	0,057	0,057	0,067	0,064	0,020	0,020	0,016	98,1	97,7	98,0	89,2	89,1	89,3	89,3	89,3	89,3	89,3	89,1	90,3	87,3	86,1	86,4	86,4	86,4	89,3	89,3	
14	<i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 1677	0,254	0,247	0,230	0,229	0,263	0,047	0,047	0,056	0,053	0,007	0,007	0,003	0,020	99,7	100,0	90,5	90,4	90,5	90,5	90,5	90,5	90,5	90,4	90,4	88,0	86,8	87,1	87,1	87,1	89,3	89,3	
15	<i>Chl. limicola</i> UdG 6041	0,250	0,242	0,229	0,233	0,262	0,051	0,051	0,060	0,054	0,010	0,010	0,007	0,023	0,003	99,7	90,7	90,6	90,8	90,8	90,8	90,8	90,8	90,0	90,6	88,1	87,0	87,2	87,2	87,2	89,5	89,5	
16	<i>Chl. phaeobacteroides</i> 1549	0,248	0,241	0,224	0,228	0,257	0,047	0,047	0,056	0,051	0,007	0,007	0,003	0,020	0,000	0,003	91,1	91,0	91,1	91,1	91,1	91,1	91,1	91,1	90,4	90,9	88,5	87,3	87,6	87,6	87,6	89,8	89,8
17	<i>Chl. limicola</i> DSM 248	0,234	0,226	0,215	0,217	0,241	0,128	0,128	0,134	0,127	0,109	0,109	0,105	0,116	0,102	0,099	0,095	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,0	95,4	92,2	91,0	91,3	91,3	91,3	92,5	92,5	
18	<i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 1855	0,236	0,229	0,217	0,219	0,244	0,129	0,129	0,135	0,129	0,110	0,110	0,106	0,118	0,103	0,100	0,096	0,000	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,0	95,4	92,1	90,9	91,2	91,2	91,2	92,4	92,4	
19	<i>Chl. limicola f. thios.</i> 9330	0,233	0,225	0,214	0,216	0,240	0,128	0,128	0,133	0,127	0,108	0,108	0,105	0,116	0,101	0,099	0,095	0,000	0,000	100,0	100,0	100,0	100,0	99,0	95,5	92,2	91,0	91,3	91,3	91,3	92,5	92,5	
20	<i>Chl. limicola f. thios.</i> 1630	0,233	0,225	0,214	0,216	0,240	0,128	0,128	0,133	0,127	0,108	0,108	0,105	0,116	0,101	0,099	0,095	0,000	0,000	0,000	100,0	100,0	100,0	99,0	95,5	92,2	91,0	91,3	91,3	91,3	92,5	92,5	
21	<i>Chl. limicola</i> DSM 247	0,233	0,225	0,214	0,216	0,240	0,128	0,128	0,133	0,127	0,108	0,108	0,105	0,116	0,101	0,099	0,095	0,000	0,000	0,000	0,000	100,0	100,0	99,0	95,5	92,2	91,0	91,3	91,3	91,3	92,5	92,5	
22	<i>Chl. limicola</i> DSM 246	0,233	0,225	0,214	0,216	0,240	0,128	0,128	0,133	0,127	0,108	0,108	0,105	0,116	0,101	0,099	0,095	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	100,0	99,0	95,5	92,2	91,0	91,3	91,3	91,3	92,5	92,5	
23	<i>Chl. limicola</i> DSM 245 <sup>T</sup>	0,233	0,225	0,214	0,216	0,240	0,128	0,128	0,133	0,127	0,108	0,108	0,105	0,116	0,101	0,099	0,095	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	99,0	95,5	92,2	91,0	91,3	91,3	91,3	92,5	92,5		
24	<i>Chl. phaeobacteroides</i> UdG 6051	0,259	0,251	0,239	0,229	0,268	0,131	0,131	0,138	0,122	0,110	0,110	0,106	0,118	0,103	0,107	0,103	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	94,2	91,2	90,3	90,6	90,6	90,6	91,8	91,8	
25	<i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 266 <sup>T</sup>	0,212	0,205	0,184	0,213	0,239	0,122	0,122	0,123	0,121	0,100	0,100	0,100	0,104	0,103	0,101	0,097	0,047	0,047	0,047	0,047	0,047	0,047	0,047	0,060	94,4	92,6	92,9	92,9	92,9	95,1	95,1	
26	<i>Pld. phaeoclathratiforme</i> DSM 5477 <sup>T</sup>	0,226	0,219	0,211	0,217	0,255	0,128	0,128	0,130	0,132	0,124	0,124	0,128	0,139	0,131	0,129	0,125	0,083	0,083	0,082	0,082	0,082	0,082	0,082	0,058	95,1	95,4	95,4	95,4	96,1	96,1		
27	<i>Chl. vibrioforme</i> DSM 261	0,250	0,242	0,223	0,227	0,275	0,127	0,127	0,132	0,138	0,145	0,145	0,142	0,153	0,145	0,143	0,139	0,096	0,097	0,095	0,095	0,095	0,095	0,104	0,078	0,050	99,7	99,7	99,7	95,8	95,8		
28	<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> DSM 265 <sup>T</sup>	0,246	0,239	0,219	0,224	0,271	0,124	0,124	0,129	0,134	0,142	0,142	0,138	0,150	0,142	0,140	0,136	0,093	0,093	0,092	0,092	0,092	0,092	0,101	0,075	0,047	0,003	100,0	100,0	96,1	96,1		
29	<i>Chl. phaeovibrioides</i> DSM 269 <sup>T</sup>	0,246	0,239	0,219	0,224	0,271	0,124	0,124	0,129	0,134	0,142	0,142	0,138	0,150	0,142	0,140	0,136	0,093	0,093	0,092	0,092	0,092	0,092	0,101	0,075	0,047	0,003	0,000	100,0	96,1	96,1		
30	<i>Chl. phaeovibrioides</i> DSM 270	0,246	0,239	0,219	0,224	0,271	0,124	0,124	0,129	0,134	0,142	0,142	0,138	0,150	0,142	0,140	0,136	0,093	0,093	0,092	0,092	0,092	0,092	0,101	0,075	0,047	0,003	0,000	0,000	96,1	96,1		
31	<i>Chl. vibrioforme</i> DSM 262	0,237	0,230	0,206	0,216	0,257	0,105	0,105	0,110	0,112	0,116	0,116	0,112	0,116	0,116	0,113	0,109	0,079	0,080	0,079	0,079	0,079	0,079	0,079	0,086	0,050	0,040	0,043	0,040	0,040	0,040	100,0	
32	<i>Pld. luteolum</i> DSM 273 <sup>T</sup>	0,237	0,230	0,206	0,216	0,257	0,105	0,105	0,110	0,112	0,116	0,116	0,112	0,116	0,116	0,113	0,109	0,079	0,080	0,079	0,079	0,079	0,079	0,079	0,086	0,050	0,040	0,043	0,040	0,040	0,040	0,000	

**Distanz** (Die Distanz wurde nach Dayhoff *et al.* (1978) mit PROTDIST im Programmpaket Phylip ermittelt; mathematische Rundung auf 3 signifikante Stellen)

<sup>145</sup> Die Sequenzen waren nicht notwendigerweise identisch. Der Similaritätswert 100,0 % bzw. die Distanz 0,000 kann sich auch durch die mathematische Rundung ergeben.

**Tabelle 38: Distanz-/Similaritäts-Matrix der FMO-Sequenzen aus Reinkulturen und Umweltproben<sup>146</sup>**

		(Die Similarität wurde aus der Distanz berechnet; mathematische Rundung auf 3 signifikante Stellen)																											Similarität (%)				
		Gruppe 1																			Gruppe 4							Gr. 3		Gr. 2			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
1	<i>Chl. vibrioforme</i> DSM 260 <sup>T</sup>		99,7	95,4	95,1	95,1	95,4	95,4	95,8	95,8	95,1	95,1	95,4	95,1	95,1	92,5	91,5	92,2	89,5	90,5	80,2	80,2	80,3	80,3	78,1	77,2	78,9	79,4	80,0	81,5	79,0	79,7	
2	<i>Chl. phaeovibrioides</i> DSM 1678	0,003		95,8	95,5	95,5	95,8	95,8	96,1	96,1	95,5	95,5	95,8	95,5	95,5	92,9	91,9	92,6	89,9	91,0	80,8	80,8	80,9	80,8	78,7	77,8	79,5	79,9	80,5	82,0	79,6	80,2	
3	Ostsee Laboe-3 K-635	0,047	0,043		99,0	99,0	99,3	99,3	99,7	99,7	99,0	99,0	99,3	99,0	99,3	92,9	91,9	92,8	89,9	91,6	81,6	81,6	81,4	81,6	79,2	78,6	79,7	80,7	81,0	83,3	80,6	81,6	
4	Ostsee Laboe-3 K-683	0,050	0,046	0,010		98,7	99,0	99,0	99,4	99,4	98,7	98,7	99,0	98,7	98,7	92,6	91,6	92,5	89,6	91,3	81,3	81,3	81,1	81,4	79,0	78,3	79,4	80,5	81,1	83,0	80,7	81,4	
5	Ostsee Laboe-3 K-686	0,051	0,046	0,010	0,013		99,0	99,0	99,4	99,4	98,7	98,7	99,0	98,7	98,7	92,6	91,6	92,5	89,6	91,3	81,5	81,5	81,3	81,6	79,1	78,5	79,6	80,7	81,0	83,2	80,6	81,6	
6	Atlantik SSM-3 K-303	0,047	0,043	0,007	0,010	0,010		99,4	99,7	99,7	99,0	99,0	99,4	99,0	99,0	92,9	91,9	92,9	89,9	91,6	81,7	81,7	81,4	81,7	79,3	78,7	79,7	80,8	81,1	83,4	80,7	81,7	
7	Atlantik SSM-3 K-351	0,047	0,043	0,007	0,010	0,010	0,007		99,7	99,7	99,0	99,0	99,4	99,0	99,2	92,9	91,9	92,9	89,9	91,6	81,7	81,7	81,4	81,7	79,3	78,9	79,7	80,8	81,1	83,6	81,0	82,0	
8	Ostsee Laboe-3 K-600	0,044	0,040	0,003	0,007	0,007	0,003	0,003		100,0	99,4	99,4	99,7	99,4	99,5	93,2	92,3	93,2	90,2	92,0	82,0	82,0	81,8	82,0	79,6	79,0	80,1	81,1	81,4	83,7	81,0	82,0	
9	<i>Ptc. aestuarii</i> DSM 271 <sup>T</sup>	0,044	0,040	0,003	0,007	0,007	0,003	0,003	0,000		99,4	99,4	99,7	99,4	99,5	93,2	92,3	93,2	90,2	92,0	82,0	82,0	81,8	82,0	79,6	79,0	80,1	81,1	81,4	83,7	81,0	82,0	
10	Atlantik SSM-3 K-311	0,050	0,046	0,010	0,013	0,013	0,010	0,010	0,006	0,006		98,7	99,0	98,7	99,1	92,6	91,6	92,5	89,6	91,3	81,4	81,4	81,1	81,4	79,0	78,4	79,4	80,5	80,8	83,0	80,4	81,4	
11	Atlantik Sip-4 K-839	0,050	0,046	0,010	0,013	0,013	0,010	0,010	0,007	0,007	0,013		99,0	98,7	98,7	93,0	92,0	92,9	90,0	91,6	81,7	81,7	81,5	81,7	79,3	78,7	79,8	80,8	80,8	83,1	80,4	81,4	
12	Atlantik Sip-4 K-802	0,047	0,043	0,007	0,010	0,010	0,007	0,007	0,003	0,003	0,010	0,010		99,0	99,0	92,9	91,9	92,9	89,9	91,6	82,3	82,3	82,1	82,3	79,7	79,1	80,4	81,4	81,5	83,8	81,3	82,3	
13	Ostsee Stak-2 K-400	0,050	0,046	0,010	0,013	0,013	0,010	0,010	0,006	0,006	0,013	0,013	0,010		98,7	92,6	91,6	92,6	89,9	91,3	81,7	81,7	81,5	81,7	79,3	78,7	79,8	80,8	81,4	83,7	81,0	82,0	
14	Ostsee Stak-2 K-455	0,050	0,046	0,007	0,013	0,013	0,010	0,008	0,005	0,005	0,009	0,013	0,010	0,013		92,6	91,6	92,6	89,9	91,6	81,4	81,4	81,2	81,4	79,0	78,4	79,5	80,5	81,0	83,3	80,6	81,6	
15	Adria Cviic-2 K-1011	0,079	0,074	0,075	0,078	0,078	0,074	0,074	0,071	0,071	0,078	0,074	0,074	0,078	0,078		99,0	98,7	91,6	92,7	80,7	80,7	80,4	80,1	78,7	78,4	78,9	80,2	80,1	81,4	79,0	80,0	
16	Adria Cviic-2 K-1079	0,090	0,085	0,086	0,089	0,089	0,085	0,085	0,082	0,082	0,089	0,085	0,085	0,089	0,089	0,010		97,7	90,6	91,7	79,7	79,7	79,8	79,1	77,7	77,4	77,9	79,2	79,1	80,4	78,0	79,0	
17	Adria Cviic-2 K-1027a	0,083	0,078	0,075	0,079	0,079	0,075	0,075	0,071	0,071	0,079	0,075	0,075	0,078	0,078	0,013	0,023		91,5	92,7	80,7	80,7	80,5	80,2	78,8	78,5	78,9	80,2	80,3	81,7	79,1	80,1	
18	<i>Ptc. aestuarii</i> 2K	0,113	0,108	0,109	0,112	0,112	0,108	0,108	0,104	0,104	0,112	0,108	0,108	0,109	0,108	0,089	0,101	0,090		92,3	79,4	79,4	79,1	79,4	77,2	76,6	77,7	78,4	79,5	79,6	77,3	78,3	
19	<i>Ptc. aestuarii</i> CHP 3401	0,102	0,096	0,089	0,093	0,093	0,089	0,089	0,085	0,085	0,093	0,089	0,089	0,092	0,089	0,077	0,088	0,077	0,082			82,5	82,5	81,9	81,6	79,6	78,7	79,8	80,5	81,3	81,5	80,7	81,2
20	<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> DSM 263	0,229	0,222	0,211	0,215	0,212	0,210	0,210	0,206	0,206	0,214	0,210	0,202	0,210	0,214	0,223	0,237	0,223	0,241	0,200		100,0	99,3	97,4	94,8	94,5	96,4	96,7	88,3	88,7	88,6	90,2	
21	<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> NCIB 8346	0,229	0,222	0,211	0,215	0,212	0,210	0,210	0,206	0,206	0,214	0,210	0,202	0,210	0,214	0,223	0,237	0,223	0,241	0,200	0,000		99,3	97,4	94,8	94,5	96,4	96,7	88,3	88,7	88,6	90,2	
22	<i>Chl. chlorovibrioides</i> UdG 6026	0,228	0,221	0,214	0,218	0,215	0,213	0,213	0,209	0,209	0,217	0,213	0,205	0,213	0,217	0,227	0,236	0,226	0,245	0,207	0,007	0,007		96,9	94,3	93,6	95,6	95,9	87,8	88,6	88,2	89,8	
23	<i>Chl. limicola</i> UdG 6044	0,229	0,222	0,211	0,214	0,212	0,210	0,210	0,206	0,206	0,214	0,209	0,202	0,209	0,213	0,231	0,244	0,230	0,241	0,211	0,027	0,027	0,031		94,2	93,9	95,5	95,8	88,3	88,8	87,7	89,6	
24	<i>Chl. limicola f. thios.</i> DSM 249 <sup>T</sup>	0,259	0,251	0,244	0,247	0,245	0,243	0,243	0,238	0,238	0,247	0,242	0,237	0,242	0,246	0,250	0,264	0,249	0,271	0,237	0,054	0,054	0,060	0,060		98,1	96,5	96,1	89,9	90,7	87,1	89,3	
25	<i>Chl. tepidum</i> ATCC 49652 <sup>T</sup>	0,271	0,263	0,252	0,256	0,253	0,251	0,247	0,247	0,247	0,255	0,251	0,245	0,251	0,255	0,255	0,269	0,254	0,281	0,251	0,057	0,057	0,067	0,064	0,020		96,5	96,1	89,3	90,3	86,4	89,3	
26	Atlantik SSM-3 K-307	0,248	0,240	0,237	0,240	0,238	0,236	0,236	0,232	0,232	0,240	0,236	0,228	0,236	0,239	0,248	0,262	0,247	0,265	0,235	0,037	0,037	0,046	0,047	0,036	0,036		98,4	89,6	89,7	87,1	89,9	
27	Atlantik SSM-3 K-354	0,241	0,234	0,223	0,226	0,224	0,222	0,222	0,218	0,218	0,226	0,222	0,214	0,222	0,225	0,230	0,244	0,229	0,254	0,225	0,033	0,033	0,042	0,043	0,040	0,040	0,017			90,3	90,7	88,1	90,6
28	<i>Chl. limicola</i> DSM 245 <sup>T</sup>	0,233	0,225	0,219	0,218	0,220	0,218	0,218	0,214	0,214	0,222	0,222	0,212	0,213	0,219	0,232	0,246	0,228	0,240	0,216	0,128	0,128	0,133	0,127	0,108	0,116	0,112	0,104		95,5	91,3	92,5	
29	<i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 266 <sup>T</sup>	0,212	0,205	0,189	0,192	0,190	0,188	0,185	0,184	0,184	0,192	0,192	0,183	0,184	0,189	0,214	0,228	0,210	0,239	0,213	0,122	0,122	0,123	0,121	0,100	0,104	0,111	0,099	0,047		92,9	95,1	
30	<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> DSM 265 <sup>T</sup>	0,246	0,239	0,224	0,223	0,225	0,223	0,220	0,219	0,219	0,228	0,227	0,215	0,219	0,224	0,246	0,260	0,246	0,271	0,224	0,124	0,124	0,129	0,134	0,142	0,150	0,142	0,130	0,092	0,075		96,1	
31	<i>Pld. luteolum</i> DSM 273 <sup>T</sup>	0,237	0,230	0,211	0,214	0,212	0,210	0,206	0,206	0,206	0,214	0,214	0,202	0,205	0,210	0,232	0,246	0,232	0,257	0,216	0,105	0,105	0,110	0,112	0,116	0,116	0,109	0,100	0,079	0,050	0,040		

**Distanz** (Die Distanz wurde nach Dayhoff *et al.* (1978) mit PROTDIST im Programmpaket Phylip ermittelt; mathematische Rundung auf 3 signifikante Stellen)

<sup>146</sup> Die Sequenzen waren nicht notwendigerweise identisch. Der Similaritätswert 100,0 % bzw. die Distanz 0,000 kann sich auch durch die mathematische Rundung ergeben.

Tabelle 39: Einfluss der unbestimmten Basen auf die Distanz/Similarität der 16S-rDNA-Sequenzen

mit unbestimmten Basen		147 Similarität (%)																				
		Gr. 1		Gruppe 4								Gruppe 3						Gr. 2		Gr.5		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	<i>Chl. vibrioforme</i> DSM 260 <sup>T</sup>	95,8	90,1	91,9	91,9	92,2	91,5	92,3	92,1	92,1	92,7	93,1	93,2	93,3	93,3	91,4	91,9	92,9	93,3	93,0	87,6	
2	<i>Ptc. aestuarii</i> DSM 271 <sup>T</sup>	0,043	91,4	93,1	93,1	93,2	92,7	93,3	93,0	93,5	93,7	92,3	92,4	92,5	92,5	90,2	92,1	93,2	93,6	93,5	89,0	
3	<b><i>Chl. limicola</i> UdG 6041</b>	0,107	0,091	97,9	98,0	96,6	95,1	94,4	95,0	94,1	94,3	93,5	93,6	93,6	93,5	93,5	92,0	92,3	92,1	93,5	86,3	
4	<i>Chl. phaeobacteroides</i> 1549	0,086	0,073	0,021	99,9	98,4	96,4	95,7	94,8	95,3	96,0	95,3	95,4	95,4	95,2	92,5	93,7	93,9	93,6	95,1	88,1	
5	<i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 1677	0,085	0,072	0,020	0,001	98,5	96,5	95,8	94,9	95,4	96,1	95,4	95,5	95,5	95,3	92,5	93,8	94,0	93,7	95,2	88,1	
6	<i>Chl. tepidum</i> ATCC 49652 <sup>T</sup>	0,083	0,071	0,034	0,016	0,015	96,0	95,9	95,1	95,4	96,2	94,8	94,9	94,9	94,7	92,1	93,4	93,4	93,7	95,2	88,2	
7	<i>Chl. limicola f. thios.</i> DSM 249 <sup>T</sup>	0,090	0,077	0,051	0,037	0,036	0,041	95,1	94,8	95,6	95,6	95,8	95,9	95,9	95,7	93,4	95,4	95,3	95,2	96,0	88,1	
8	<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> DSM 263	0,082	0,070	0,058	0,045	0,044	0,042	0,050	98,1	98,2	99,0	94,0	94,1	94,1	94,0	92,2	93,0	93,5	93,8	95,2	88,4	
9	<b><i>Chl. limicola</i> UdG 6044</b>	0,083	0,074	0,051	0,054	0,053	0,051	0,054	0,019	97,8	98,2	93,9	94,0	94,0	93,9	93,6	92,9	93,4	93,7	95,0	87,8	
10	<i>Chl. chlorovibrioides</i> UdG 6026	0,084	0,068	0,061	0,048	0,047	0,047	0,046	0,018	0,023	98,4	94,2	94,3	94,3	94,2	92,1	93,6	94,2	94,1	95,5	88,7	
11	<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> NCIB 8346	0,077	0,066	0,060	0,041	0,040	0,039	0,045	0,010	0,018	0,016	94,6	94,7	94,7	94,5	92,1	93,6	94,0	94,3	95,8	88,8	
12	<i>Chl. limicola f. thios.</i> 1630	0,072	0,081	0,068	0,048	0,048	0,054	0,044	0,063	0,064	0,061	0,056	99,9	99,8	99,8	96,6	96,1	96,5	96,6	96,7	88,3	
13	<i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 1855	0,071	0,080	0,067	0,048	0,047	0,053	0,043	0,062	0,063	0,060	0,055	0,001	99,9	99,8	96,7	96,2	96,6	96,7	96,8	88,4	
14	<i>Chl. limicola</i> DSM 245 <sup>T</sup>	0,070	0,079	0,067	0,048	0,047	0,053	0,043	0,062	0,063	0,060	0,056	0,002	0,001	99,9	96,6	96,2	96,7	96,6	96,8	88,5	
15	<i>Chl. limicola f. thios.</i> 9330	0,071	0,079	0,068	0,050	0,049	0,055	0,045	0,063	0,064	0,061	0,057	0,002	0,002	0,001	96,6	96,1	96,6	96,4	96,6	88,3	
16	<b><i>Chl. phaeobacteroides</i> UdG 6051</b>	0,092	0,105	0,068	0,079	0,079	0,083	0,070	0,083	0,067	0,083	0,083	0,035	0,034	0,035	0,035	93,0	93,7	94,2	94,0	85,8	
17	<i>Pld. phaeoclathratiforme</i> DSM 5477 <sup>T</sup>	0,086	0,083	0,084	0,066	0,065	0,070	0,048	0,074	0,074	0,067	0,067	0,040	0,039	0,039	0,040	0,073	96,6	95,5	94,8	87,1	
18	<i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 266 <sup>T</sup>	0,075	0,071	0,082	0,063	0,063	0,070	0,049	0,068	0,069	0,061	0,063	0,036	0,035	0,034	0,035	0,066	0,035	95,9	95,4	88,5	
19	<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> DSM 265 <sup>T</sup>	0,070	0,067	0,083	0,067	0,066	0,066	0,050	0,064	0,065	0,061	0,059	0,035	0,034	0,035	0,037	0,061	0,047	0,043	97,9	88,5	
20	<i>Pld. luteolum</i> DSM 273 <sup>T</sup>	0,073	0,068	0,068	0,050	0,049	0,049	0,041	0,049	0,052	0,047	0,043	0,034	0,033	0,033	0,035	0,063	0,054	0,048	0,021	88,9	
21	<i>Chloroherpeton thalassium</i>	0,136	0,119	0,152	0,130	0,129	0,129	0,130	0,126	0,133	0,122	0,121	0,127	0,126	0,125	0,127	0,157	0,141	0,125	0,125	0,121	

Distanz <sup>148</sup>

ohne unbestimmte Basen <sup>149</sup>		147 Similarität (%)																				
		Gr. 1		Gruppe 4								Gruppe 3						Gr. 2		Gr.5		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	<i>Chl. vibrioforme</i> DSM 260 <sup>T</sup>	95,9	91,6	92,1	92,2	92,7	91,8	93,3	93,3	93,2	93,3	94,0	94,1	94,2	94,2	93,2	92,3	93,4	93,8	93,4	87,3	
2	<i>Ptc. aestuarii</i> DSM 271 <sup>T</sup>	0,043	93,2	93,7	93,8	94,1	93,1	94,0	93,8	94,3	94,0	93,2	93,3	93,5	93,5	92,3	92,8	94,0	94,0	93,8	88,5	
3	<b><i>Chl. limicola</i> UdG 6041</b>	0,089	0,072	99,2	99,3	97,7	96,6	96,0	95,8	95,9	96,0	94,9	95,0	95,0	94,9	94,0	93,8	93,9	93,6	94,8	87,7	
4	<i>Chl. phaeobacteroides</i> 1549	0,083	0,066	0,008	99,9	98,3	96,9	96,5	95,7	96,2	96,5	95,5	95,6	95,6	95,5	94,1	94,1	94,2	94,1	95,3	88,3	
5	<i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 1677	0,082	0,065	0,007	0,001	98,4	97,0	96,6	95,7	96,3	96,6	95,6	95,7	95,7	95,6	94,2	94,2	94,3	94,2	95,4	88,4	
6	<i>Chl. tepidum</i> ATCC 49652 <sup>T</sup>	0,076	0,062	0,023	0,017	0,016	96,7	96,9	96,1	96,5	96,9	95,2	95,3	95,3	95,2	93,8	94,1	93,9	94,4	95,6	88,6	
7	<i>Chl. limicola f. thios.</i> DSM 249 <sup>T</sup>	0,087	0,072	0,035	0,032	0,031	0,034	96,2	95,9	96,6	96,2	95,8	95,9	95,9	95,8	94,7	95,5	95,2	95,2	96,2	88,4	
8	<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> DSM 263	0,071	0,063	0,042	0,036	0,035	0,032	0,039	98,8	98,8	99,6	95,1	95,2	95,2	95,1	93,9	94,1	94,1	94,9	96,2	88,9	
9	<b><i>Chl. limicola</i> UdG 6044</b>	0,071	0,065	0,044	0,045	0,044	0,041	0,042	0,013	98,6	98,8	95,1	95,2	95,2	95,1	94,5	94,1	94,1	94,9	96,0	88,8	
10	<i>Chl. chlorovibrioides</i> UdG 6026	0,072	0,059	0,043	0,039	0,038	0,036	0,035	0,013	0,015	98,8	95,2	95,3	95,3	95,2	94,0	94,7	94,8	95,0	96,3	89,2	
11	<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> NCIB 8346	0,071	0,063	0,042	0,036	0,035	0,032	0,039	0,004	0,013	0,013	95,1	95,2	95,2	95,1	93,9	94,1	94,1	94,9	96,2	89,0	
12	<i>Chl. limicola f. thios.</i> 1630	0,063	0,071	0,053	0,046	0,045	0,049	0,043	0,051	0,051	0,049	0,051	99,9	99,8	99,8	98,2	96,3	96,7	97,1	97,2	88,6	
13	<i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 1855	0,062	0,070	0,052	0,045	0,044	0,048	0,042	0,049	0,049	0,048	0,049	0,001	99,9	99,9	98,3	96,4	96,8	97,2	97,3	88,7	
14	<i>Chl. limicola</i> DSM 245 <sup>T</sup>	0,061	0,068	0,052	0,045	0,044	0,048	0,042	0,050	0,050	0,048	0,050	0,002	0,001	100,0	98,2	96,4	96,9	97,1	97,3	88,8	
15	<i>Chl. limicola f. thios.</i> 9330	0,061	0,068	0,053	0,046	0,045	0,050	0,043	0,051	0,051	0,050	0,051	0,002	0,001	0,000	98,2	96,4	96,9	97,0	97,2	88,8	
16	<b><i>Chl. phaeobacteroides</i> UdG 6051</b>	0,072	0,081	0,063	0,062	0,061	0,065	0,055	0,064	0,057	0,063	0,064	0,018	0,017	0,018	0,018	94,8	95,2	96,0	95,8	87,2	
17	<i>Pld. phaeoclathratiforme</i> DSM 5477 <sup>T</sup>	0,081	0,075	0,065	0,062	0,061	0,062	0,046	0,062	0,062	0,055	0,062	0,038	0,037	0,037	0,037	0,054	96,6	95,7	95,1	87,5	
18	<i>Chl. phaeobacteroides</i> DSM 266 <sup>T</sup>	0,070	0,063	0,064	0,061	0,060	0,064	0,050	0,062	0,062	0,054	0,062	0,034	0,033	0,032	0,032	0,049	0,035	96,3	95,6	89,0	
19	<i>Chl. vibrioforme f. thios.</i> DSM 265 <sup>T</sup>	0,065	0,063	0,067	0,062	0,061	0,058	0,050	0,053	0,053	0,052	0,053	0,030	0,029	0,030	0,031	0,042	0,044	0,038	97,9	88,6	
20	<i>Pld. luteolum</i> DSM 273 <sup>T</sup>	0,070	0,065	0,054	0,048	0,047	0,045	0,039	0,042	0,038	0,040	0,029	0,028	0,028	0,029	0,043	0,051	0,045	0,021	88,9		
21	<i>Chloroherpeton thalassium</i>	0,139	0,125	0,135	0,127	0,126	0,123	0,127	0,120	0,121	0,117	0,118	0,124	0,122	0,121	0,121	0,140	0,136	0,119	0,123	0,120	

Distanz <sup>148</sup>

<sup>147</sup> Die Similarität wurde aus der Distanz berechnet: Mathematische Rundung auf 3 signifikante Stellen.

<sup>148</sup> Die Distanz wurde nach Jukes & Cantor (1969) mit DNADIST im Programmpaket Phylip ermittelt. Mathematische Rundung auf 3 signifikante Stellen.

<sup>149</sup> Die Sequenzen waren nicht notwendigerweise identisch. Der Similaritätswert 100,0 % bzw. die Distanz 0,000 kann sich auch durch die mathematische Rundung ergeben.

## 15 MIKROHETEROGENITÄTSTABELLEN

**Tabelle 40: Mikroheterogenität der Probe Cviic-2 (16S und *fmoA*)**

Hierbei wurden die Ergebnisse der Screening-Sequenzierung (Kapitel 3.5.5, S. 33) einer Klonierungsprobe (16S bzw. *fmoA*) in einem Alignment manuell verglichen. Sequenzen, die sich um weniger als ca. 1 % (16S) bzw. 2 % (*fmoA*) der Nukleotide (nt) unterschieden (1 % entspricht ca. 4-5 nt auf 400-450 nt Screening-Sequenzlänge) wurden zu Mikroheterogenitätsgruppen (MHG) zusammengenommen. Innerhalb einer MHG wurden dann die einzelnen Nukleotid-Unterschiede zu der Sequenz gezählt, die am häufigsten identisch vorkam (mit hochgestelltem „R“ als Referenzsequenz gekennzeichnet). Zusätzlich unterstrichen sind alle Klonierungsproben, die komplett sequenziert und der Datenbank EMBL-EBI übermittelt wurden (Tabelle 28, S. 82).

Gewässer <sup>150</sup>	Probe	MHG	16S <sup>151</sup>	<i>fmoA</i>	Unter- schie- de (nt)	AS <sup>152</sup> - Tausch	andere <sup>153</sup>	
<b>Adria</b>	Cviic-2 16S	MHG-1	K-5		2			
			K-10		1			
			<u>K-13<sup>R</sup> (18)</u>		–			
			K-44		1			
			K-45		2			
			K-54		2			
			K-55		3			
			K-64		2			
			K-65		1			
			<u>K-69</u>		<b>3</b>			
			K-71		2			
			K-72		1			
			K-73		1			
			K-74		1			
	K-78		3					
	K-81		1					
	K-85		1					
			andere				–	
		Cviic-2 <i>fmoA</i>	MHG-2	<u>K-1011<sup>R</sup> (14)</u>		–		
				K-1026		1		
	K-1060				1			
	<u>K-1079</u>				<b>2</b>	Asp ► Gly Glu ► Lys		
	K-1094				2			
	K-1099				2			
	MHG-3		<u>K-1027a<sup>R</sup> (1)</u>		–			

<sup>150</sup> vgl. Abbildung 5, S. 18

<sup>151</sup> In Klammern steht die Anzahl der nicht einzeln aufgeführten Sequenzen, die mit der Referenzsequenz identisch waren.

<sup>152</sup> Aminosäure-Tausch: Hier ist angegeben, wenn durch einen Nukleotid-Unterschied in der *fmoA*-Sequenz ein Codon so verändert wird, dass auf Aminosäurebasis ein AS-Austausch im Vergleich zur Referenzsequenz erfolgen würde. Der Dreibuchstaben-Code der Aminosäuren folgt der allgemeinen IUPAC-Nomenklatur.

<sup>153</sup> Anzahl der 16S-Sequenzen einer Klonierungsprobe, die nach phylogenetischer Analyse nicht der Gruppe der grünen Schwefelbakterien zugeordnet werden können.

Tabelle 41: Mikroheterogenität der Probe BW-4 (16S)

(Erläuterungen siehe Tabelle 40, S. 145)

Gewässer <sup>154</sup>	Probe	MHG	16S <sup>155</sup>	<i>fmoA</i>	Unterschiede andere <sup>156</sup> (nt)
<b>Bad Water</b>	BW-4 16S	MHG-4	K-900		3
			K-901		1
			<b><u>K-902<sup>R</sup></u></b> (46)		–
			K-908		1
			K-910		1
			K-912		2
			K-914		1
			K-917		1
			K-920		1
			K-923		1
			K-924		3
			K-925		1
			K-926		1
			K-929		3
			K-931		2
			K-936		2
			K-944		1
			K-946		1
			K-947		1
			K-958		1
			K-960		2
			K-963		2
			K-965		2
			K-966		1
			K-968		1
			<b><u>K-974</u></b>		<b>4</b>
			K-975		2
			K-981		1
			K-982		2
			K-983		1
			K-984		2
			K-994		1
					andere

<sup>154</sup> vgl. Abbildung 5, S. 18<sup>155</sup> In Klammern steht die Anzahl der nicht einzeln aufgeführten Sequenzen, die mit der Referenzsequenz identisch waren.<sup>156</sup> Anzahl der 16S-Sequenzen einer Klonierungsprobe, die nach phylogenetischer Analyse nicht zur Gruppe der grünen Schwefelbakterien gezählt werden können.

Tabelle 42: Mikroheterogenität der Probe Sip-4 (16S)

(Erläuterungen siehe Tabelle 40, S. 145)

Gewässer <sup>157</sup>	Probe	MHG	16S <sup>158</sup>	<i>fmoA</i>	Unterschiede andere <sup>159</sup> (nt)
Atlantik	Sip-4 16S	MHG-5	K-700		1
			K-702		1
			K-703		1
			K-704		1
			K-705		1
			<b><u>K-706<sup>R</sup> (49)</u></b>		–
			K-711		1
			K-714		1
			<b><u>K-721</u></b>		<b>3</b>
			K-723		1
			K-733		1
			K-737		1
			K-739		3
			K-740		1
			K-741		1
			K-745		1
			K-746		1
			K-748		2
			K-749		2
			K-752		2
			K-754		1
			K-755		1
			K-758		2
			K-761		1
			K-763		1
			K-772		1
			K-774		1
			K-777		1
			K-778		1
			K-781		1
			K-783		2
			K-785		1
			K-789		1
		K-791		2	
		K-794		1	
		K-797		2	
		MHG-6	<b><u>K-701<sup>R</sup> (2)</u></b>	–	
			K-722	1	
		MHG-7	<b><u>K-790<sup>R</sup> (1)</u></b>	–	
			andere	9	

<sup>157</sup> vgl. Abbildung 5, S. 18<sup>158</sup> In Klammern steht die Anzahl der nicht einzeln aufgeführten Sequenzen, die mit der Referenzsequenz identisch waren.<sup>159</sup> Anzahl der 16S-Sequenzen einer Klonierungsprobe, die nach phylogenetischer Analyse nicht zur Gruppe der grünen Schwefelbakterien gezählt werden können.

Tabelle 43: Mikroheterogenität der Proben Sip-4 (*fmoA*) und SSM-3 (16S)

(Erläuterungen siehe Tabelle 40, S. 145)

Gewässer <sup>160</sup>	Probe	MHG	16S <sup>161</sup>	<i>fmoA</i>	Unter- schiede (nt)	AS <sup>162</sup> - Tausch	andere <sup>163</sup>
<b>Atlantik</b>	<b>Sip-4</b> <i>fmoA</i>	MHG-8		<b><u>K-802<sup>R</sup> (23)</u></b>	–		
				K-807	1	Gln ► Pro	
				K-812	1		
				K-820	1		
				K-826	1	Ile ► Thr	
				<b><u>K-839</u></b>	<b>2</b>	Lys ► Glu Val ► Ala	
				K-871	2		
	(Fortsetzung nächste Seite)	<b>SSM-3</b> 16S	MHG-9	<b><u>K-100<sup>R</sup> (1)</u></b>	–		
			MHG-10	<b><u>K-101<sup>R</sup> (35)</u></b>	–		
				K-110	1		
				K-111	1		
				K-112	1		
				K-116	1		
				K-124	1		
				K-129	2		
				K-133	1		
				K-134	1		
				K-135	1		
				K-140	1		
				K-145	1		
				K-151	2		
				K-152	1		
				K-155	1		
				K-156	1		
				K-160	1		
				K-169	1		
				K-173	1		
				K-175	1		
				K-177	1		
				K-181	1		
				K-182	1		
				K-186	1		
				K-187	1		
K-188				1			
K-196	1						
MHG-11	<b><u>K-106<sup>R</sup> (12)</u></b>	–					
	K-118	1					
	K-125	1					
	K-165	1					
	K-185	1					

<sup>160</sup> vgl. Abbildung 5, S. 18<sup>161</sup> In Klammern steht die Anzahl der nicht einzeln aufgeführten Sequenzen, die mit der Referenzsequenz identisch waren.<sup>162</sup> Aminosäure-Tausch: Hier ist angegeben, wenn durch einen Nukleotid-Unterschied in der *fmoA*-Sequenz ein Codon so verändert wird, dass auf Aminosäurebasis ein AS-Austausch im Vergleich zur Referenzsequenz erfolgen würde. Der Dreibuchstaben-Code der Aminosäuren folgt der allgemeinen IUPAC-Nomenklatur.<sup>163</sup> Anzahl der 16S-Sequenzen einer Klonierungsprobe, die nach phylogenetischer Analyse nicht zur Gruppe der grünen Schwefelbakterien gezählt werden können.

Tabelle 44: Mikroheterogenität der Probe SSM-3 (16S und *fmoA*)

(Erläuterungen siehe Tabelle 40, S. 145)

Gewässer <sup>164</sup>	Probe	MHG	16S <sup>165</sup>	<i>fmoA</i>	Unterschiede (nt)	AS <sup>166</sup> -Tausch	andere <sup>167</sup>	
<b>Atlantik</b>	(Fortsetzung von voriger Seite)	MHG-12	K-103		1			
			<b><u>K-108<sup>R</sup></u></b> (4)		–			
			K-132		1			
			K-174		1			
			K-176		1			
			K-191		1			
			K-192		1			
			K-199		1			
			MHG-13	<b><u>K-137<sup>R</sup></u></b> (1)		–		
				K-171		2		
	MHG-14	<b><u>K-153<sup>R</sup></u></b> (1)		–				
		andere				1		
	SSM-3 16S	MHG-15		<b><u>K-303<sup>R</sup></u></b> (6)		–		
				<b><u>K-311</u></b>		4		
				K-316		2		
				K-324		2		
				<b><u>K-351</u></b>		4		
				K-370		1		
				K-375		1		
				K-388		1		
			K-397		1	Gln ► Arg		
			K-399		1			
MHG-16	<b><u>K-307<sup>R</sup></u></b> (1)		–					
MHG-17	<b><u>K-354<sup>R</sup></u></b> (1)		–					

<sup>164</sup> vgl. Abbildung 5, S. 18<sup>165</sup> In Klammern steht die Anzahl der nicht einzeln aufgeführten Sequenzen, die mit der Referenzsequenz identisch waren.<sup>166</sup> Aminosäure-Tausch: Hier ist angegeben, wenn durch einen Nukleotid-Unterschied in der *fmoA*-Sequenz ein Codon so verändert wird, dass auf Aminosäurebasis ein AS-Austausch im Vergleich zur Referenzsequenz erfolgen würde. Der Dreibuchstaben-Code der Aminosäuren folgt der allgemeinen IUPAC-Nomenklatur.<sup>167</sup> Anzahl der 16S-Sequenzen einer Klonierungsprobe, die nach phylogenetischer Analyse nicht zur Gruppe der grünen Schwefelbakterien gezählt werden können.

Tabelle 45: Mikroheterogenität der Probe Laboe-3 (16S)

(Erläuterungen siehe Tabelle 40, S. 145)

Gewässer <sup>168</sup>	Probe	MHG	16S <sup>169</sup>	<i>fmoA</i>	Unterschiede (nt)	andere <sup>170</sup>			
<b>Ostsee</b>	<b>Laboe-3</b> 16S	MHG-18	<b>K-500<sup>R</sup> (60)</b>		–				
			K-502		1				
			K-510		1				
			K-516		1				
			K-517		1				
			K-518		1				
			K-519		1				
			K-527		1				
			K-528		2				
			K-534		1				
			K-535		1				
			K-537		1				
			K-541		1				
			K-548		1				
			K-558		1				
			K-561		1				
			K-566		1				
			K-572		1				
			K-573		1				
			K-574		2				
			K-580		1				
			K-581		1				
			K-589		1				
			K-592		2				
			K-597		1				
						andere			11

<sup>168</sup> vgl. Abbildung 5, S. 18<sup>169</sup> In Klammern steht die Anzahl der nicht einzeln aufgeführten Sequenzen, die mit der Referenzsequenz identisch waren.<sup>170</sup> Anzahl der 16S-Sequenzen einer Klonierungsprobe, die nach phylogenetischer Analyse nicht zur Gruppe der grünen Schwefelbakterien gezählt werden können.

Tabelle 46: Mikroheterogenität der Probe Laboe-3 (*fmoA*), Stak-2 (*fmoA*) und Stein-1 (16S)

(Erläuterungen siehe Tabelle 40, S. 145)

Gewässer <sup>171</sup>	Probe	MHG	16S <sup>172</sup>	<i>fmoA</i>	Unterschiede (nt)	AS <sup>173</sup> -Tausch	andere <sup>174</sup>		
<b>Ostsee</b>	<b>Laboe-3</b> <i>fmoA</i>	MHG-19		<b><u>K-600<sup>R</sup></u> (45)</b>	–				
				K-602	1	Ser ► Pro			
				K-606	1	Glu ► Gly			
				K-613	1				
				K-617	1				
				K-627	1				
				<b><u>K-635</u></b>	<b>3</b>				
				K-646	1				
				K-648	1	Ser ► Gly			
				K-650	1				
				K-653	1				
				K-655	1	Leu ► Phe			
				K-663	1	Asp ► Gly			
				K-664	1				
				K-668	1				
				K-670	2				
				K-676	1				
				K-678	2	Ser ► Pro			
						<b><u>K-683</u></b>	<b>3</b>	Ser ► Pro Leu ► Pro	
						<b><u>K-686</u></b>	<b>2</b>	Ala ► Ser Glu ► Gly	
				K-687	1	Pro ► Ser			
				K-688	1				
				K-689	1	Phe ► Leu			
		<b>Stak-2</b> <i>fmoA</i>	MHG-20		<b><u>K-400</u></b>	<b>5</b>			
					K-422	5			
					<b><u>K-455<sup>R</sup></u> (1)</b>	–			
					K-456	1	Lys ► Arg		
	<b>Stein-1</b> 16S	MHG-21		<b><u>K-207<sup>R</sup></u> (1)</b>	–				
				K-220	1				
				K-264	1				
		MHG-22	<b><u>K-249<sup>R</sup></u> (1)</b>	–					
		MHG-23	<b><u>K-273<sup>R</sup></u> (1)</b>	–					
				K-275	3				
				<b><u>K-300<sup>R</sup></u> (1)</b>	–				
			andere				67		

<sup>171</sup> vgl. Abbildung 5, S. 18<sup>172</sup> In Klammern steht die Anzahl der nicht einzeln aufgeführten Sequenzen, die mit der Referenzsequenz identisch waren.<sup>173</sup> Aminosäure-Tausch: Hier ist angegeben, wenn durch einen Nukleotid-Unterschied in der *fmoA*-Sequenz ein Codon so verändert wird, dass auf Aminosäurebasis ein AS-Austausch im Vergleich zur Referenzsequenz erfolgen würde. Der Dreibuchstaben-Code der Aminosäuren folgt der allgemeinen IUPAC-Nomenklatur.<sup>174</sup> Anzahl der 16S-Sequenzen einer Klonierungsprobe, die nach phylogenetischer Analyse nicht zur Gruppe der grünen Schwefelbakterien gezählt werden können.

## 16 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Å	Angström	EBI	European Bioinformatics Institute
aa	Amino acid[s] (Aminosäure[n])	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Abb.	Abbildung	EMBL	European Molecular Biology Laboratory
Acc. Nr.	Accession Number (Zugangsnummer einer Sequenz in der Datenbank)	EMBO	European Molecular Biology Organization
Ala	Alanin	engl.	englisch
APS	Ammoniumperoxidsulfat	<i>et al.</i>	lat. <i>et alii</i> = und andere (in Zitaten)
ARB	von lat. <i>arbor</i> = Baum (Programm zur 16S-Analyse)	Ethanol <sup>abs</sup>	Ethanol absolut (96 %)
Arg	Arginin	evtl.	eventuell
AS	Aminosäure[n]	<i>f.</i>	lat. <i>forma</i> (in Artbezeichnungen)
Asp	Aspartat (Asparaginsäure)	<i>f.</i>	folgende[s] (Kapitel, Seite, ...)
ATCC	American Type Culture Collection	<i>ff.</i>	folgende (Kapitel, Seiten, ...)
B	Bootstrap-Wert	<i>fmoA</i>	Fenna-Matthews-Olson-Gen
BChl	Bacteriochlorophyll[e]	FMO	Fenna-Matthews-Olson-Protein
B <sub>min</sub>	niedrigster Bootstrap-Wert	g	Gramm
bp	Basenpaar[e]	g	Erdbeschleunigung 9,81 ms <sup>-2</sup>
BSA	Bovines Serumalbumin	G	Guanin
bzw.	beziehungsweise	GC-Gehalt	Gehalt an Guanin und Cytosin
C	Cytosin	Gln	Glutamin
ca.	lat. <i>circa</i> = ungefähr	Glu	Glutamat (Glutaminsäure)
<i>Cba.</i>	<i>Chlorobaculum</i>	Gly	Glycin
CFB-Gruppe	<i>Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides</i> -Gruppe	Gr.	Gruppe
<i>Chl.</i>	<i>Chlorobium</i>	GSB	Grüne Schwefelbakterien
<i>Chp.</i>	<i>Chloroherpeton</i>	h	Stunde[n]
<i>Clc.</i>	<i>Clathrochloris</i>	H	Häufigkeit (einer Sequenz-Art in einer Umweltprobe)
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid	Hrsg	Herausgeber
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat	Id	Identität (einer Sequenz mit einer in der Datenbank gefundenen)
dCTP	Desoxy-Cytidintriphosphat	IfM	Institut für Meereskunde
ddATP	Di-Desoxy-Adenosintriphosphat	Ile	Isoleucin
ddCTP	Di-Desoxy-Cytidintriphosphat	ISBN	Internationale Standardbuchnummer
ddGTP	Di-Desoxy-Guanosintriphosphat	IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (URL 15, S. 154)
ddNTP	Di-Desoxy-Ribonukleotidtriphosphat	I	Liter
ddTTP	Di-Desoxy-Thymidintriphosphat	lat.	lateinisch
<i>per def.</i>	<i>per definitionem</i>	LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
DGGE	Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese	Leu	Leucin
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie	Lys	Lysin
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat	M	molar
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure	mbar	Millibar
dNTP	Desoxy-Ribonukleotidtriphosphat	mg	Milligramm
DOI	Digital Object Identifiers, URL 18, S. 154, bei Artikeln im Internet)	MHG	Mikroheterogenitätsgruppe[n]
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	min	Minute[n]
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat	ml	Milliliter
		µl	Mikroliter
		mM	Millimolar
		mRNA	messenger RNA

nb	nicht bekannt
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCIB	National Collection of Industrial and Marine Bacteria
ng	Nanogramm
nt	Nukleotid[e]
Nr.	Nummer
<hr/>	
ÖGHMP	Österreichische Gesellschaft für Hygiene, Mikrobiologie und Präventivmedizin
<hr/>	
PC	Personal computer (Rechner)
PCR	Polymerasekettenreaktion
persönl.	persönliche
Phe	Phenylalanin
PHYLIP	Akronym von <u>PHY</u> Logeny <u>I</u> nference <u>P</u> ackage
<i>Pld.</i>	<i>Pelodictyon</i>
PM	Pfennigs-Medium
pmol	Picomol
Pro	Prolin
<i>Ptc.</i>	<i>Prosthecochloris</i>
<hr/>	
[ ] <sup>R</sup>	Referenzsequenz (innerhalb einer Mikroheterogenitätsgruppe)
rDNA	ribosomale DNA
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
<hr/>	
s	Sekunde
S.	Seite[n]
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
Si	Similaritätswert[e]
Si <sub>max</sub>	größter Similaritätswert
Si <sub>min</sub>	niedrigster Similaritätswert
SRS	Sequence Retrieval System (Datenbank von EMBL-EBI)
<i>subsp.</i>	Subspezies (Unter-Art)

T	Thymin
[ ] <sup>T</sup>	Typenstamm
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
<i>thios.</i>	<i>thiosulfatophilum</i>
Thr	Threonin
T <sub>m</sub>	Melting temperature (Schmelztemperatur)
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
TSR	Template Suppression Reagent
<hr/>	

u. a.	und andere
UdG	Universität de Girona (Universität von Girona, Spanien)
URL	Uniform Resource Locator (Internetadresse)
USA	United States of America (Vereinigte Staaten von Amerika)
usw.	und so weiter
UV	ultraviolett[es]
<hr/>	

V	Volt
VAAM	Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie
Val	Valin
vgl.	vergleiche
vs.	lat. <i>versus</i> = gegen
Vol.	Volumenprozent
<hr/>	

z.B.	zum Beispiel
<hr/>	

## 17 INTERNET-ADRESSEN (URL-VERZEICHNIS)

- URL 1: <http://www.ifm.uni-kiel.de/>
- URL 2: <http://e-diss.uni-kiel.de/math-nat.html>
- URL 3: <http://www.ou.dk/>
- URL 4: <http://www.mpk.med.uni-muenchen.de/bak/microb2000/Microb.html>
- URL 5: <http://ispp2000@ubxlab.com/ispp2000/index.html>
- URL 6: <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>
- URL 7: <http://www.ebi.ac.uk/fasta33/>
- URL 8: <http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
- URL 9: <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>
- URL 10: <http://www.ebi.ac.uk/embl/Submission/webin.html>
- URL 11: <http://srs.ebi.ac.uk/>
- URL 12: <http://www.ebi.ac.uk/emboss/transeq/>
- URL 13: <http://www.arb-home.de/>
- URL 14: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>
- URL 15: [http://www.iupac.org/index\\_to.html](http://www.iupac.org/index_to.html)
- URL 16: <http://www.mpi-muelheim.mpg.de/strneu/staff/holzwarth/workshop/index.html>
- URL 17: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/>
- URL 18: <http://www.doi.org/>

Für diese Internetadressen und deren Inhalte kann keine Verantwortung übernommen werden, weil es sich hierbei nicht um statische Archive handelt, sondern um Informationen, die sich in ständigem Fluss befinden. Die Auswahl wurde aber nach bestem Wissen und Gewissen vorgenommen.

Die Veröffentlichung der vorliegenden Dissertation findet ebenfalls im weltweiten Datennetz statt (Kieler Dissertationen online, URL 2).



## PUBLIKATIONEN

- Alexander B (1997) Herstellung eines Lebendimpfstoffes gegen *Helicobacter pylori* auf der Basis attenuierter *Salmonella*- und *Vibrio*-Stämme. (**Diplomarbeit**) Lehrstuhl Mikrobiologie, Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Bayerische Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
- Alexander B (1999a) Die Universitäten Kiel und Odense erforschen Schwefelbakterien in der Ostsee – Lebewesen mit erstaunlichen Eigenschaften: Grenzüberschreitende Kooperation für die Umwelt. In: **Lübecker Nachrichten** vom 23. März, Lübeck, S. 27 (siehe Abbildung 32)
- Alexander B (1999b) Wenn die Ostsee blüht... Ein EU-Projekt ermöglicht die Erforschung von Bakterien im Meer. In: Liebelt T, Stintzing R (Hrsg) Seeluft – Nord und Ostsee, Band 3, Schleswig-Holstein, Die See: Balsam für Körper und Seele, Taschenbuch für Kultur und Reise. ISBN 3-933205-10-7. **Signet-Verlag**, Flensburg, S. 112-115
- Alexander B, Andersen JH, Cox RP, Imhoff JF (2002) Phylogeny of green sulfur bacteria on the basis of gene sequences of 16S rRNA and of the Fenna-Matthews-Olson protein. **Arch Microbiol** 178:131-140, DOI 10.1007/s00203-002-0432-4
- Alexander B, Imhoff JF. Diversity of green sulfur bacteria in the natural environment on the basis of 16S rRNA and of the Fenna-Matthews-Olson protein. (**In Vorbereitung**)
- Andersen JH, Alexander B, Imhoff JF, Miller M. Evolutionary changes in the pigment-binding regions of the FMO-protein, a light-harvesting antenna from green sulfur bacteria. Photosynth Res (**In Vorbereitung**)

Die Universitäten Kiel und Odense erforschen Schwefelbakterien in der Ostsee – Lebewesen mit erstaunlichen Eigenschaften

### Grenzüberschreitende Kooperation für die Umwelt

Von BORIS ALEXANDER

An manchen Küstenabschnitten steigt dem Spaziergänger ein Gestank wie von faulen Eiern in die Nase. Was da riecht, ist vor allem Schwefelwasserstoff, der durch den Abbau von organischer Substanz am Meeresboden entsteht. Das übelriechende Gas ist schädlich für die meisten Organismen. Nicht jedoch für Schwefelbakterien. Die benötigen es vielmehr zum Wachstum. Man kann zeitweise sogar regelrechte Massenentwicklungen, sogenannte Blüten, beobachten, die das Wasser rot bis braun ver-

farben. Das tritt vor allem in Bereichen auf, in denen die Ostsee durch Nährstoffeintrag aus der Landwirtschaft überdüngt ist. Die Schwefelbakterien bauen das giftige Gas ab und entfernen es somit wieder aus der Umwelt. Das ist einer der Gründe für die Untersuchung dieser Bakterien. Je mehr man über Kreisläufe und Entgiftungsvorgänge in der Natur weiß, desto besser kann man Umweltprobleme verstehen und helfend eingreifen.

Das Institut für Meereskunde in Kiel und die Universität Odense (Dänemark) befinden sich in der Startphase einer Forschungs-

kooperation, die von der EU gefördert wird. Ziele sind Umweltuntersuchungen in der westlichen Ostsee durch die genaue Bestimmung phototropher Schwefelbakterien. Diese Bakterien gewinnen, genau wie grüne Pflanzen, ihre Energie aus dem Licht, brauchen aber keinen Sauerstoff. Sie spielen eine wichtige Rolle in ökologischen Stoffkreisläufen. Darüber hinaus soll die Kooperation der beiden Hochschulen in Forschung und Lehre intensiviert werden.

Projektpartner auf deutscher Seite sind Prof. Johannes F. Imhoff vom Institut für Meereskun-

de Kiel, Abteilung Marine Mikrobiologie, auf dänischer Seite die Professoren Mette Miller und Raymond Cox vom Institut für Biochemie der Universität Odense. Hinzu kommen jeweils ein Doktorand.

In den nächsten Jahren sollen mikrobiologische Standortanalysen in Gewässern der westlichen Ostsee um Fünen und Schleswig-Holstein durchgeführt werden. Dabei untersucht man Vorkommen und Vielfalt phototropher Schwefelbakterien. Ihre Fähigkeit, giftigen Schwefelwasserstoff in harmlose Verbindungen (Schwefel und Sulfat) umzuwan-

deln, machen sie zu einem wichtigen Glied im Stoffkreislauf des Schwefels. Zudem wandeln sie das schädliche Gas gleich dort um, wo es entsteht, so daß es nicht in die Atmosphäre gelangt. Das hat weitreichende ökologische Bedeutung und wird sogar für die Entschwefelung von Gasen in der Industrie angewandt. Weiterhin haben diese einzigartigen Organismen die Fähigkeit, selbst bei extrem wenig Licht zu wachsen. Sie stellen deshalb biologische Modellsysteme für die Umwandlung von Licht in andere Energieformen dar. Sie sind sehr effektive Bio-Solarzellen.

#### Abbildung 32: Zeitungsartikel der Lübecker Nachrichten

Alexander 1999a. Abgedruckt am 23. März 1999 auf der Wissenschaftsseite. Layout-Kopie mit freundlicher Genehmigung vom Verlag Lübecker Nachrichten.

# PRÄSENTATIONEN

Alexander B, Imhoff JF (1999) Comparison of diversity of green sulfur bacteria at natural sites. (Poster) IVth workshop on green & heliobacteria, Girona, Spanien, 28.-31. August (siehe Abbildung 33)

Imhoff JF, Alexander B (1999) Phylogeny of the Fenna-Matthews-Olson (FMO) protein. (Vortrag) IVth workshop on green & heliobacteria, Girona, Spanien, 28.-31. August

Alexander B, Imhoff JF (2000a) Diversity of green sulfur bacteria in the natural environment. (Poster) Microbiology2000: 1. gemeinsamer Kongress der DGHM, ÖGHMP und VAAM, München, Deutschland, 12.-16. März (URL 4)

Alexander B, Imhoff JF (2000b) Phylogenetic relationship of green sulfur bacteria on the basis of *fmo* and 16S rDNA gene sequences. (Poster) ISPP2000: 10th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, Barcelona, Spanien, 26.-31. August (URL 5) (siehe Abbildung 33)

Andersen JH, Alexander B, Figueras JB, Miller M, Cox RP (2000) A functional oriented comparison of FMOA sequences predicts the structural basis for differences in spectral properties of this protein. (Poster) ISPP2000: 10th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, Barcelona, Spanien, 26.-31. August (URL 5)

Imhoff JF, Alexander B (2002) The phylogeny and ecological distribution of green sulfur bacteria with special emphasis on marine habitats. (Vortrag) EMBO Workshop on Green and Heliobacteria; Molecular Biology, Structure and Function; Passau, 19.-24. April (URL 16)

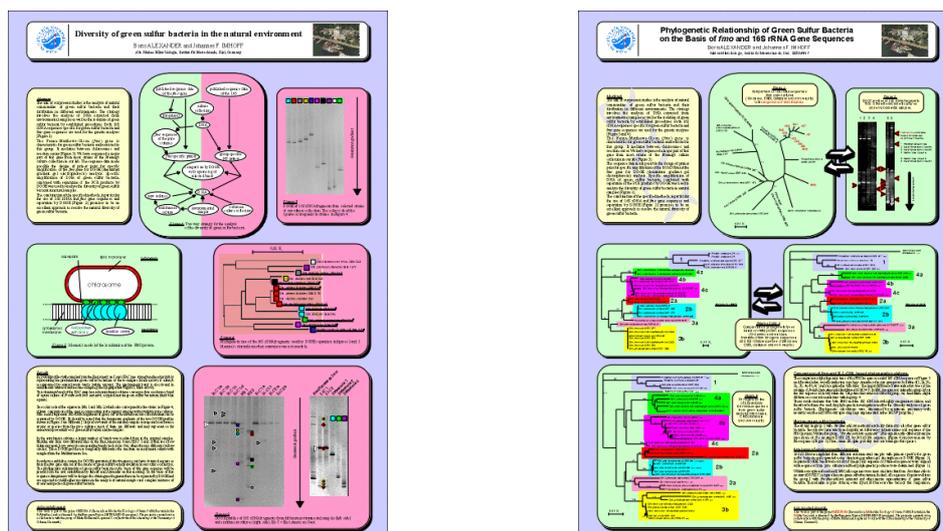
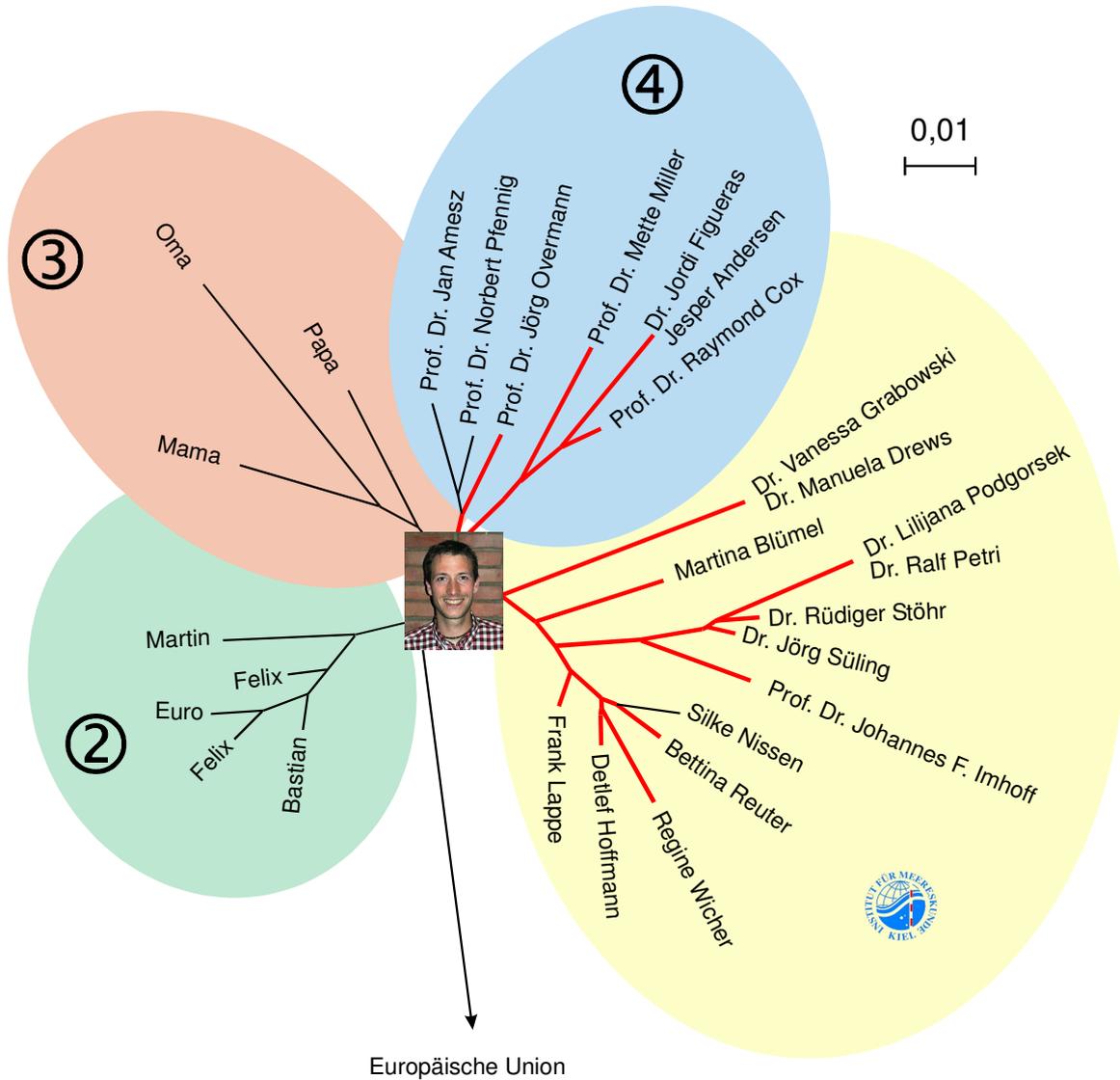


Abbildung 33: Posterbeispiele

Links: Alexander & Imhoff 1999. Rechts: Alexander & Imhoff 2000b.

# DANKSAGUNG



## Dankbaum

Radialer Dankbaum auf der Grundlage von Beziehungen. Die Topologie basiert auf der Zugehörigkeit zu Gruppen. Die Berechnung wurde mit meiner Methode (2002) durchgeführt. Rote Linien verbinden marine und halotolerante Arten. Bootstrap-Werte sind unnötig. Die Maßangabe kennzeichnet nicht die persönliche Distanz.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Johannes F. **Imhoff**, der mich freundlich in seine Arbeitsgruppe in Kiel aufgenommen, mir ein Labor mit wunderbarem Blick auf die Förde zur Verfügung gestellt, mir viel (wissenschaftlichen) Freiraum gelassen hat, immer ein offenes Ohr für mich hatte und mir Hilfestellung bei diversen Publikationen gab.

Weiterhin gilt mein Dank den vielen anderen genannten und ungenannten, jetzigen und ehemaligen **Mitarbeitern** der Abteilung Mikrobielle Ökologie (ehemals Marine Mikrobiologie) und des gesamten Instituts für Meereskunde für viele kleine und größere Hilfestellungen und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Allen voran bin ich Dr. Jörg **Süling** zu großem Dank verpflichtet, der mir sehr viel beigebracht, mich immer unterstützt und schließlich meine Arbeit Korrektur gelesen hat.

Nicht weniger hilfreich war Dr. Ralf **Petri**, der nie müde wurde, Fragen zu beantworten. Ohne ihn und Dr. Lilijana **Podgorsek** hätte ich außerdem nicht so viel Spaß beim Mittagessen gehabt.

Martina **Blümel** danke ich herzlich für viele erfrischende Unterbrechungen des Arbeitsalltags und die besondere Unterstützung in den letzten Monaten meiner Dissertation.

Frank **Lappe**, Regine **Wicher**, Detlef **Hoffmann** sowie Bettina **Reuter** danke ich für deren Hilfestellung in praktischen und unpraktischen Angelegenheiten.

Ich danke dem **Meeresaquarium**, den **Seehunden** sowie auch den **Forschungsschiffen** am IfM-Kai, die mich immer wieder erfreuten (außer FS Heincke, die mich auf einer 12-Tage-Fahrt von Kiel nach Helsinki und zurück kräftig durchgeschüttelt hatte).

Den verschiedenen **Kantinen** in Kiel danke ich sehr, weil sie essentiell für mein leibliches und geistiges Wohlbefinden gesorgt haben, genauso wie dem Bringservice „**Hallo Pizza**“, der mich manches Mal vor dem abendlichen Hungertod rettete.

Für die Reinkulturen, die mir direkt oder indirekt überlassen wurden, danke ich sehr Prof. Dr. Norbert **Pfennig**, sowie auch Prof. Dr. John **Amesz** (†) und Prof. Dr. Jörg **Overmann**.

Den Dänen Prof. Dr. Mette **Miller**, Prof. Dr. **Cox** und Jesper **Andersen** danke ich für eine interessante Kooperation und die Gastfreundschaft in ihrem Land.

Meinen **Eltern** und meiner **Oma** gilt ein großer Dank für ihre emotionale und finanzielle Unterstützung sowie das große Interesse an meiner Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt meinem Freund **Martin**, der mich vielfach unterstützte und in Krisenzeiten psychologisch geschult wieder aufbaute. Dafür verleihe ich ihm den Dr. b. o. (für besondere Opferbereitschaft).



# LEBENS LAUF

Geburtstag: 25. März 1970  
Geburtsort: Erlenbach am Main  
Staatsangehörigkeit: deutsch

---

1976-1980	Josef-Anton-Rohe-Volksschule (Grundschule) in Kleinwallstadt (Bayern)
1980-1989	Hermann-Staudinger-Gymnasium in Erlenbach am Main (Bayern)
1989	Abitur mit der Gesamtnote 1,8
1989-1990	Studium der Physik, Bayerische Julius-Maximilians-Universität in Würzburg
1990-1997	Studium der Biologie, Bayerische Julius-Maximilians-Universität in Würzburg
1994	Vordiplom in Biologie mit der Gesamtnote „sehr gut“
1996-1997	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie (Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Bayerische Julius-Maximilians-Universität, Würzburg) mit dem Thema „Herstellung eines Lebendimpfstoffes gegen <i>Helicobacter pylori</i> auf der Basis attenuierter <i>Salmonella</i> - und <i>Vibrio</i> -Stämme“.
1997	Diplom in Biologie mit der Gesamtnote „sehr gut“
1998-2001	wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Meereskunde in Kiel (Doktorand)



# ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit, abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer, selbstständig angefertigt und außer den hier angegebenen keine weiteren Hilfsmittel verwendet habe.

Kiel, den 16. 12. 2002

Boris Alexander

