



**Kombinationswirkung von
lipophilen und hydrophilen Substanzen**

—

**Auswirkung auf Zusammensetzung und metabolische
Aktivität mariner bakterieller Gemeinschaften**

Von der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg zur Erlangung des Grades und Titels eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) angenommene Dissertation

von Herrn Marcus Nachtkamp
geboren am 31.05.1974 in Bielefeld

Erstgutachterin: H. Doz. Dr. Luise Berthe-Corti

Zweitgutachter: P.D. Dr. habil. Wolfgang Ahlf

Tag der Disputation: 5.02.2007

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.: Stickstoffkreislauf	6
Abbildung 1.2.: Schwefelkreislauf	7
Abbildung 3.1.: Ort der Entnahme des Wattsediments	30
Abbildung 3.2.: Schematische Übersicht: Begiftungsversuche	32
Abbildung 3.3.: Triphenyltetrazoliumchlorid \Rightarrow 1,3,5-Triphenylformazan	41
Abbildung 3.4.: Resazurin \Rightarrow Resorufin	43
Abbildung 3.5.: Tropfendurchmesser, Tropfenhöhe und Kontaktwinkel Θ_L	45
Abbildung 3.6.: Bestimmung der Oberflächenspannung: Blasendruckmethode	45
Abbildung 4.1.: Lagerung des Wattsediments	49
Abbildung 4.2.: Kritische Mizellenbildungskonzentration cmc: SDS	51
Abbildung 4.3.: SDS-Verwertung: Dehydrogenase-Aktivität	52
Abbildung 4.4.: SDS-Verwertung: Trübung der Kulturen	53
Abbildung 4.6.: Änderung der Cd^{2+} -Konzentration im Kulturverlauf	55
Abbildung 4.7.: Gesamtzellkonzentration der bakteriellen Gemeinschaft	58
Abbildung 4.5.: Wahrscheinlichste Lebendzellkonzentration: APB I.	54
Abbildung 4.8.: Wahrscheinlichste Lebendzellkonzentration: APB II.	59
Abbildung 4.9.: Kultivierbarkeit I.	61
Abbildung 4.11.: Kultivierbarkeit II.	64
Abbildung 4.12.: Anzahl: verwertete Substrate (Ecolog [®])	62
Abbildung 4.13.: Einfluß von SDS auf die Substratverwertung	68
Abbildung 4.14.: Einfluß von Cd^{2+} auf die Substratverwertung	70
Abbildung 4.15.: Einfluß von SDS und Cd^{2+} auf die Substratverwertung	72
Abbildung 4.16.: Clusteranalyse der Substratverwertungsspektren	74
Abbildung 4.17.: Physiologische Diversität der Gemeinschaft	82
Abbildung 4.18.: CO_2 -Produktion, O_2 -Konsum	85
Abbildung 4.19.: Zeitpunkte der metabolischen Kern-Phase	85
Abbildung 4.20.: Dehydrogenase-Aktivität	87
Abbildung 4.21.: Einfluß von Cd^{2+} und SDS auf die Hybridisierbarkeit	90
Abbildung 4.22.: Euklidischen Distanzen: Genetische Zusammensetzung	108
Abbildung 4.23.: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der DGGE-Bandenmuster	110

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1.: Vitaminlösung nach Schlegel (1992, modifiziert)	24
Tabelle 2.2.: Spurenelementlösung (DSMZ 124, mod.)	25
Tabelle 2.3.: Seewasser, 4-fach konzentriert, nach Levring (1946)	25
Tabelle 2.4.: Zusammensetzung der Seewasserbouillon X-2	26
Tabelle 2.5.: Referenzstämme: FISH	28
Tabelle 2.6.: Software, Internetanwendungen und Datenbanken	28
Tabelle 2.7.: Verwendete Nucleotide	29
Tabelle 3.1.: Zusammensetzung von Casein	35
Tabelle 3.2.: Konzentrationen der Substrate: Seewasserbouillon X-2	36
Tabelle 3.3.: PCR: Zusammensetzung der Ansätze	37
Tabelle 3.4.: PCR: Struktur des Programms	37
Tabelle 3.5.: Oligonukleotidsonden der Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung	40
Tabelle 3.6.: Medien: Ermittlung der wahrscheinlichsten Lebendzellzahl	41
Tabelle 3.7.: Substrate des Substratverwertungstests (EcoPlate™)	42
Tabelle 3.8.: Molare Extinktionskoeffizienten: Resazurin/Resorufin	43
Tabelle 4.1.: Gesamtzellkonzentration	57
Tabelle 4.2.: Lebendzellzahlen der APB	60
Tabelle 4.3.: Kultivierbarkeit	63
Tabelle 4.4.: Bezeichnung der Substrate in Abb. 4.13 - 4.15	67
Tabelle 4.5.: Lebendzellzahlen: Methanol-verwertende Bakterien	79
Tabelle 4.6.: Lebendzellzahlen: Sulfat-reduzierende Bakterien	80
Tabelle 4.7.: Lebendzellzahlen: Denitrifizierende Bakterien	81
Tabelle 4.8.: Variablen der Regressionsanalyse der physiologischen Diversität	82
Tabelle 4.9.: Regressionsanalyse der O ₂ -Verbrauchs- und CO ₂ -Bildungsraten	86
Tabelle 4.10.: Regressionsanalyse: Zeitpunkte der metabolischen Kernphasen	88
Tabelle 4.11.: DHA der bakteriellen Gemeinschaft	90
Tabelle 4.12.: Anteile der <i>Archaea</i> an der Gesamtzellkonzentration I.	94
Tabelle 4.13.: Anteile der <i>Archaea</i> an der Gesamtzellkonzentration II.	95
Tabelle 4.14.: Anteile der <i>Eubacteria</i> an der Gesamtzellkonzentration I.	96
Tabelle 4.15.: Anteile der <i>Eubacteria</i> an der Gesamtzellkonzentration II.	97
Tabelle 4.16.: Anteile der <i>Eubacteria</i> an der Gesamtzellkonzentration III.	98
Tabelle 4.17.: Anteil der <i>Archaea</i> an der Gesamtzellkonzentration III.	99

Tabelle 4.18.: Zusammensetzung der <i>Eubacteria</i> I.	101
Tabelle 4.19.: Zusammensetzung der <i>Eubacteria</i> II.	102
Tabelle 4.20.: Anteile der <i>Cytophaga/Flavobacteria</i> an den <i>Eubacteria</i>	103
Tabelle 4.21.: Anteile der Gram-positiven mit hohem GC-Gehalt an den <i>Eubacteria</i>	104
Tabelle 4.22.: Anteile der α - <i>Proteobacteria</i> an den <i>Eubacteria</i>	105
Tabelle 4.23.: Anteile der β - <i>Proteobacteria</i> an den <i>Eubacteria</i>	106
Tabelle 4.24.: Anteile der γ - <i>Proteobacteria</i> an den <i>Eubacteria</i>	107
Tabelle 4.25.: Anteile der δ - <i>Proteobacteria</i> an den <i>Eubacteria</i>	108
Tabelle 4.26.: Anzahl der DNA-Banden in den DGGE-Gelen	113
Tabelle 4.27.: Binäre Matrix der DNA-Bandenmuster (DGGE) I.	114
Tabelle 4.28.: Binäre Matrix der DNA-Bandenmuster (DGGE) II.	115
Tabelle 5.1.: Phylogenetische Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft	126

Abkürzungsverzeichnis

Alf / α -PB	α - <i>Proteobacteria</i>
APB	Actetat-Pyruvat-verwertende Bakterien
Arch	<i>Archaea</i>
Bet / β -PB	β - <i>Proteobacteria</i>
C	Kultivierbarkeit (culturability)
CA	Konzentrationsadditivität (concentration additivity)
CFB	<i>Cytophaga/Flavobacteria</i>
cmc	Kritische Mizellenbildungskonzentration (critical micellar concentration)
D	Simpson Diversitätsindex
d	Euklidische Distanz
DAPI	Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
Delta / δ -PB	δ - <i>Proteobacteria</i>
DGGE	Denaturierende Gradientengelelektrophorese
DHA	Dehydrogenase-Aktivität
DNB	Denitrifizierende Bakterien
dNTP	Desoxynucleotid
DSMZ	Deutsch Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E	Evenness

E _B	Brillouin Evenness
EC	Effektkonzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Eub	<i>Eubacteria</i>
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
Gam / γ PB	γ - <i>Proteobacteria</i>
GPHGC	Gram-positive, hoher GC-Gehalt
H _B	Brillouin Diversitätsindex
H _{Sh}	Shannon Wiener Diversitätsindex
IA	Unabhängige Wirkung (independant joint action)
LOEC	Niedrigste Effektkonzentration (lowest observed effect concentration)
MetB	Methanol-verwertende Bakterien
MPN	Wahrscheinlichste Lebendzellzahl (most probable number)
PCA	Hauptkomponentenanalyse (principal component analysis)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
R ²	Korrelationskoeffizient
R _M	Mineralisierungsrate
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SR	Artenvielfalt (species richness)
SRB	Sulfat-reduzierende Bakterien
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
VBNC	Lebende, nicht kultivierbare Zellen (viable but non-culturable)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Lebensraum Wattenmeer.....	1
1.2. Bedeutung bakterieller Gemeinschaften für die globalen Stoffkreisläufe.....	3
1.3. Anthropogene Einflüsse auf das Wattenmeer und seine bakteriellen Gemeinschaften.....	10
1.3.1. Cadmium.....	10
1.3.2. Wirkung lipo-, bzw. amphiphiler Substanzen.....	15
1.4. Bewertung von Kombinationswirkungen auf Gemeinschaften.....	15

1.4.1. Konzepte zur Erfassung von Kombinationswirkungen.....	16
1.4.2. Konzepte zur Beschreibung der Diversität von Gemeinschaften:.....	18
1.5. Ziel der Arbeit.....	20
2. Material.....	22
2.1. Chemikalien.....	22
2.2. Geräte.....	23
2.2.1. Geräte allgemein.....	23
2.2.2. Fermentation	23
2.2.3. PCR / DGGE.....	24
2.2.4. Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung / DAPI.....	24
2.2.5. Substratverwertungsspektren - Biolog® EcoPlate™	24
2.3. Lösungen.....	24
2.3.1. Vitaminlösung nach Schlegel (1992, modifiziert).....	24
2.3.2. Spurenelementlösung (DSMZ 124, modifiziert).....	25
2.3.3. Artifizielles Seewasser nach Levring (1946), 4-fach konzentriert.....	25
2.3.4. Artifizielles Seewasser nach Grasshoff (1983).....	25
2.4. Medien.....	26
2.4.1. Seewasserbouillon X-2	26
2.4.2. Medium zur Kultivierung methanolverwertender Bakterien.....	26
2.4.3. Medium zur Kultivierung denitrifizierender Bakterien.....	27
2.4.4. Medium zur Kultivierung sulfatreduzierender Bakterien.....	27
2.4.5. Sonifiziermedium.....	27
2.5. Bakterienstämme.....	27
2.6. Größenstandard für die Gelelektrophorese.....	28
2.7. Software, Internetanwendungen, Datenbanken.....	28
2.8. Nucleotide.....	29
3. Methoden.....	30
3.1. Gewinnung des Inokulums.....	30
3.2. Kultivierung der bakteriellen Gemeinschaft.....	30
3.3. Konzeption der Begiftungsversuche.....	31
3.4. Einsatz der Noxen.....	32
3.4.1. Cadmiumacetat.....	32
3.4.2. Natriumdodecylsulfat.....	33

3.5. Analysen im Detail.....	33
3.5.1. Abgasanalyse.....	33
3.5.2. Untersuchung der DNA-Präsenz innerhalb der Gemeinschaft.....	36
3.5.2.1. DNA-Extraktion.....	36
3.5.2.2. Polymerase-chain-reaction (PCR).....	37
3.5.2.3. Elektrophorese von DNA-Fragmenten im Agarosegel.....	37
3.5.2.4. Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE).....	38
3.5.3. Untersuchung der phylogenetischen Zusammensetzung mittels Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) - Bestimmung der Gesamtzellkonzentration (DAPI).....	39
3.5.4. Bestimmung der Lebendzellzahl und der physiologischen Diversität der Gemeinschaft mittels MPN.....	40
3.5.5. Bestimmung der metabolischen Diversität mittels EcoPlate™.....	41
3.5.6. Ermittlung der Gesamt-Dehydrogenase-Aktivität - Resazurintest.....	42
3.6. Verwertung von SDS durch die marine bakterielle Gemeinschaft.....	44
3.7. Bestimmung der Oberflächenspannung SDS-haltiger Seewasserbouillon X-2... 44	44
3.7.1. Drop-collapse-Test nach Bodour <i>et al.</i> (1998).....	44
3.7.2. Blasendruck-Methode.....	45
3.8. Statistik.....	47
3.9. Diversität.....	48
4. Ergebnisse.....	49
4.1. Versuche zur Ermittlung geeigneter Kulturparameter.....	49
4.1.1. Frisches oder gefrorenes Wattsediment als Inokulum für die Begiftungsversuche?.....	49
4.1.2. Bestimmung der kritischen Mizellenbildungskonzentration (cmc) über die Oberflächenspannung σ_L	50
4.1.3. Verwertung von SDS durch die bakterielle Gemeinschaft.....	51
4.1.4. Löslichkeit des Cadmiumacetats.....	54
4.2. Begiftungsversuche.....	55
4.2.1. Gesamtzellkonzentration / wahrscheinlichste Lebendzellzahl.....	55
4.2.1.1. Gesamtzellkonzentration der bakteriellen Gemeinschaft.....	55
4.2.1.2. Wahrscheinlichste Lebendzellzahl der bakteriellen Gemeinschaft.....	57
4.2.1.3. Kultivierbarkeit C der bakteriellen Gemeinschaft.....	60

4.2.2. Metabolische Diversität der Gemeinschaft.....	63
4.2.2.1. Substratverwertungsspektren - Ecolog®.....	64
4.2.2.2. Bestimmung der physiologischen Diversität mittels MPN.....	73
4.2.3. Metabolische Aktivität der Gemeinschaft.....	82
4.2.3.1. O ₂ -Konsum / CO ₂ -Produktion.....	82
4.2.3.2. Metabolische Kern-Phasen.....	84
4.2.3.3. Aktivität der Dehydrogenasen - Resazurintest.....	85
4.2.4. Zusammensetzung der Gemeinschaft.....	88
4.2.4.1. Phylogenetische Zusammensetzung der Gemeinschaft.....	88
4.2.4.2. Einfluß der Noxen auf die phylogenetische Zusammensetzung der Gemeinschaft.....	90
4.2.4.3. Genetische Diversität der bakteriellen Gemeinschaft.....	106
5. Diskussion.....	113
5.1. Kultivierung:.....	114
5.2. Auswahl und Konzentration der Noxen:.....	114
5.2.1. Auswahl des Schwermetalls:.....	114
5.2.2. Eingrenzung der zu verwendenden Cd ²⁺ -Konzentrationen:.....	115
5.2.3. Auswahl der lipophilen/amphiphilen Substanz:.....	116
5.2.4. Eingrenzung der zu verwendenden SDS-Konzentrationen:.....	116
5.2.5. Verwertung von SDS durch die marine bakterielle Gemeinschaft:.....	117
5.3. Einfluß von Cd ²⁺ und SDS auf die Gesamtzellkonzentration, Lebendzellzahl und Kultivierbarkeit der bakteriellen Gemeinschaft.....	119
5.3.1. Wirkung von Cd ²⁺ und SDS auf Lebendzellzahl und Gesamtzellkonzentration:.....	119
5.3.1.1. Wirkung von Cd ²⁺ auf Lebendzellzahl und Gesamtzellkonzentration.....	119
5.3.1.2. Wirkung von SDS auf Lebendzellzahl und Gesamtzellkonzentration	120
5.3.2. Einfluß von Cd ²⁺ und SDS auf die Kultivierbarkeit:.....	121
5.4. Auswirkung von Cd ²⁺ und SDS auf die Struktur der Gemeinschaft.....	122
5.4.1. Phylogenetische Zusammensetzung.....	122
5.4.2. Genetische Diversität:.....	126
5.5. Auswirkung von Cd ²⁺ und SDS auf die metabolische Aktivität.....	127

5.5.1. Auswirkung der Noxen auf O ₂ -Verbrauch und CO ₂ -Produktion.....	127
5.5.2. Einfluß der Noxen auf die Dehydrogenase-Aktivität der Gemeinschaft...	128
5.5.3. Einfluß von Noxen auf die Substratverwertung der Gemeinschaft.....	130
5.5.4. Einfluß von Cd ²⁺ und SDS auf die physiologische Diversität (MPN).....	131
5.5.4.1. Acetat-Pyruvat-verwertende Bakterien (APB):.....	131
5.5.4.2. Methanol-verwertende Bakterien (MetB):.....	131
5.5.4.3. Sulfat-reduzierenden Bakterien (SRB):.....	131
5.5.4.4. Denitrifizierende Bakterien (DNB):.....	133
5.5.4.5. Ermittlung der physiologischen Diversität mittels Shannon-Wiener-Indices:.....	134
5.6. Bewertung der Kombinationswirkung.....	134
6. Zusammenfassung und Ausblick.....	138
7. Literatur.....	143

1. Einleitung

Die mikrobielle Aktivität im Intertidalsediment des niederländisch-deutsch-dänischen Wattenmeers spielt eine bedeutende Rolle bei der Remineralisierung organischer Substanzen. Das Wattenmeer ist ein Ablagerungsraum für organische Substanzen, die aus dem Atlantik, aus einmündenden Flüssen, aus der Erosion von Küste und Meeresboden, sowie aus der Atmosphäre stammen (Eisma und Kalf, 1987). Zudem ist es auch ein Gebiet mit hoher Primärproduktion (Gattuso *et al.*, 1998). Besonders das Sediment ist aufgrund der hohen Zellkonzentrationen für die Mineralisierung organischer Substanzen von Bedeutung: Die Konzentration der Bakterien im Sediment ist um ein Vielfaches höher, als in der Wassersäule. In der Wassersäule sind i.d.R. zwischen $5 \cdot 10^5$ und $3 \cdot 10^6$ Bakterien pro Milliliter nachweisbar (Zweifel und Hagström, 1995). Reinthaler *et al.* (2005) wiesen dementsprechend im Jahresmittel 10^6 Z/ml in der Nordsee nach. Im Gegensatz dazu waren in oberflächennahen Schichten des Dangaster Wattsediments $4,6 \cdot 10^9$ bis $6,4 \cdot 10^9$ Z/ml nachweisbar (Mußmann *et al.*, 2005).

Nachfolgend wird der Lebensraum Wattenmeer, mit seinen besonderen chemisch-physikalischen Bedingungen ebenso erläutert, wie die Rolle der bakteriellen Gemeinschaften in den globalen Stoffkreisläufen. Zudem werden anthropogene Einflüsse auf die bakterielle Gemeinschaft, sowie Methoden und Ansätze zur Erfassung toxischer Kombinationswirkungen und zur Beschreibung der bakteriellen Diversität erörtert.

1.1. Lebensraum Wattenmeer

Das niederländisch-deutsch-dänische Wattenmeer bildet mit 9000 km^2 das größte zusammenhängende Wattenmeer der Welt. Es wird im Norden und Westen z.T. durch die Friesischen Inseln begrenzt. Diese schützen es vor intensivem Wellenschlag.

Der flache Grund der Wattenmeeres weist mit ca. 0,1 % ein sehr geringes Gefälle auf. Bei Ebbe fallen daher große Flächen trocken. Neben den Anziehungskräften von Sonne und Mond beeinflussen der Wind und die Topologie der Deutschen Bucht (Tomczak, 1952; Wyrcki, 1952), sowie der Standort (Seiss und Plüss, 2003) die Höhe der Tide.

Das Wattenmeer erhält aus der Nordsee Salzwasser, und aus den Flußsystemen Rhein, Ems, Weser und Elbe $300 - 350 \text{ km}^3$ Süßwasser pro Jahr. Das Salzwasser strömt ebenso ostwärts durch den Ärmelkanal in die Nordsee ein, wie südwärts entlang der Britischen Ostküste. Beide Ströme vereinen sich zur Hauptströmung, die

(entgegen dem Uhrzeigersinn) durch die Deutschen Bucht zirkuliert, um an Norwegens Westküste die Nordsee wieder zu verlassen (Lohse, 1996). Die Mengen des ins Wattenmeer einströmenden Süßwassers hängen von den Niederschlagsmengen in den Einzugsgebieten der Flüsse ab. Die Mengen des einströmenden Salzwassers v.a. vom Tidenhub. Mit den Anteilen der Salz- und Süßwasser-Zuflüsse variiert der Salzgehalt des Wattenmeeres.

Lebensbedingungen der bakteriellen Gemeinschaften des Wattenmeeres

Die spezifischen Lebensbedingungen des Wattenmeeres stellen besondere Anforderungen an die autochthonen bakteriellen Gemeinschaften:

- **Salzkonzentration:** Die mittlere Salzkonzentration des Nordseewassers beträgt 3,0 bis 3,2 ‰. Der Wechsel von Ebbe und Flut erzeugt starke Schwankungen der Salzkonzentration: Bei Ebbe kann die Salzkonzentration durch Verdunstung des Porenwassers im Sediment stark zunehmen. Ebenso führt im Winter die Bildung von Eis auf dem trockengefallenen Watt zur Zunahme der Salzkonzentration. Andererseits kann bei Regen die Salzkonzentration im trockengefallenen Watt stark absinken.
- **Trockenheit:** Bei Ebbe können die oberflächennahen Sedimentschichten wetterbedingt austrocknen. Die bakteriellen Gemeinschaften dieser Schichten erleiden Trockenstreß.
- **Temperatur:** Die mittlere Temperatur des Nordseewassers beträgt im Sommer 14°C, im Winter 5°C. Bei Ebbe kann sich im Sommer die Temperatur des dunklen Wattbodens durch die Sonneneinstrahlung stark erhöhen. Bei Flut wird die Temperatur durch das wiederkehrende kalte Meerwasser sehr schnell verringert. Im Winter kann die Temperatur des Watts bei Ebbe die des Watts bei Flut weit unterschreiten.
- **Sauerstoffkonzentration:** Die O₂-Konzentration im Sediment wird von drei Faktoren bestimmt: Die Sauerstoffzehrung aerober, chemoorganotropher Organismen wirkt der O₂-Produktion autotropher, benthischer Organismen, sowie der Diffusion von O₂ aus der Wassersäule ins Sediment entgegen. Die Photosyntheseleistung (Lassen *et al.*, 1992), sowie die Diffusion von O₂ aus der Wassersäule ins Sediment nehmen mit der Tiefe ab. Die O₂-Konzentration nimmt daher schnell ab, das Millieu wechselt innerhalb weniger Zentimeter vom oxidierenden zum reduzierenden.

Das Sediment unterliegt dabei einem Gleichgewicht von Erosion (Wellenschlag, Strömung, Gezeitenströmung) und Sedimentation. Sedimentpartikel können somit nacheinander verschiedenen O₂-Konzentrationen ausgesetzt sein.

Auch ohne Lageänderung der Sedimentpartikel kann, durch Bioturbation (z.B. durch Pierwürmer: *Arenicola marina*) die O₂-Konzentration in tiefliegenden Sedimentschichten ansteigen (Binnerup *et al.*, 1992).

Bakterien auf einem Sedimentpartikel sehen sich daher u.U. mit Schwankungen der O₂-Konzentration konfrontiert.

Der Austausch von Salzwasser mit Atlantik und Ostsee, einmündende Flüsse, sowie landseitige Winde tragen Nährstoffe in die Nordsee und das Wattenmeer ein. Zudem ist das Wattenmeer ein Gebiet mit hoher Primärproduktion. Begünstigt wird diese durch die, mit der geringen Wassertiefe verbundene gute Lichtverfügbarkeit (Kuipers *et al.*, 1981). Das Wattenmeer ist somit sowohl ein Gebiet mit hoher Produktivität, als auch ein Ablagerungsraum für organische Substanzen aus dem Einzugsgebiet der einmündenden Flußsysteme.

Bakterielle Gemeinschaften werden von den chemisch-physikalischen Bedingungen ihres Lebensraums geprägt (Madigan *et al.*, 2006). Die Versorgung mit organischen Nährstoffen, sowie die besonderen physikalischen Bedingungen des Lebensraumes Wattenmeer (v.a. die steilen O₂- und Redoxgradienten) führen zur Bildung unterschiedlichster bakterieller Gemeinschaften auf engem Raum. Kurze Diffusionsstrecken der Nährstoffe zwischen oxischem zum anoxischem Milieu, bzw. der Änderungen in der O₂-Konzentration (Bioturbation, Erosion / Sedimentation) begünstigen die Remineralisierung organischer Substanzen. Den Bakterien des Wattenmeeres kommt damit eine Schlüsselrolle in den Stoffkreisläufen von Schwefel, Stick- und Kohlenstoff zu.

1.2. Bedeutung bakterieller Gemeinschaften für die globalen Stoffkreisläufe

Die Bedeutung der Stoffwechsellleistungen bakterieller Gemeinschaften für die Aufrechterhaltung der globalen Stoffkreisläufe wird nachfolgend anhand des Kohlenstoff-, Stickstoff- und Schwefelkreislaufes erläutert.

Kohlenstoffkreislauf

Global existieren ca. 75 Billionen Tonnen Kohlenstoff. Diese sind wie folgt verteilt: 99,94 % sind in der Lithosphäre gebunden (davon 80 % als Carbonate in Sedimenten, 20 % als Kerogen). Die verbleibenden 0,06 % verteilen sich zu 1,6 % auf die Atmosphäre, zu 4,4 % auf die Biosphäre, zu 9,1 % auf fossile Brennstoffe und zu 84,9 % auf gelösten Kohlenstoff in den Ozeanen (davon 97,4 % anorganisch, 2,6 % organisch). Die fossilen Brennstoffe bestehen zum größten Teil aus Kohle (85,0 %), gefolgt von Torf (6,1 %), Öl (5,6 %) und Erdgas (3,4 %) (Falkowski *et al.*, 2000).

99,99 % des globalen Kohlenstoffs sind in der Lithosphäre, Tiefsee oder fossilen Brennstoffen gebunden (Falkowski *et al.*, 2000). Ihre Ablagerung, bzw. Mobilisierung findet nur in geologischen Zeitdimensionen statt. Durch die anthropogene, intensive Nutzung (und letztlich Verbrennung) fossiler Brennstoffe überwiegt jedoch z.Zt. die Mobilisierung der Ablagerung. Es gelangt vermehrt CO₂ in der Atmosphäre. Als Treibhausgas ist es von besonderer Bedeutung für die Entwicklung des globalen Klimas. In diesem Zusammenhang erhält auch die Fixierung von CO₂ und die Remineralisierung organisch gebundenen Kohlenstoffs besondere Bedeutung:

C-Fixierung

Organische Kohlenstoffverbindungen entstehen mittels Photo- oder Chemosynthese aus anorganischen. Den Hauptteil der Energie für diese Syntheseleistung liefert die Photosynthese. Mikroorganismen dominieren die Photosynthese in aquatischen Lebensräumen (Madigan *et al.*, 2006). Anoxygene Photosynthese wird von Purpur- und Grünen Schwefelbakterien betrieben, bakterielle, oxygene ausschließlich von (meist obligat) phototrophen Cyanobakterien. Der Primärproduktion kommt aufgrund der geringen Wassertiefe, und der damit einhergehenden guten Lichtverfügbarkeit, im niederländisch-deutsch-dänische Wattenmeer eine bedeutende Rolle zu. Sie unterliegt allerdings, Licht- und Nährstoff-bedingt, ausgeprägten saisonalen Schwankungen (Tillman *et al.*, 2000).

C-Mineralisierung

Zur Aufrechterhaltung des Energiestoffwechsels werden organische Kohlenstoffverbindungen zu CO₂ und H₂O oxidiert. Diese Mineralisierung regeneriert anorganischen Kohlenstoff für die Primärproduktion: Die Mineralisierung durch aerobe Respiration setzt 99 % des fixierten Kohlenstoffs als CO₂ in die Atmosphäre frei.

Global gesehen wird 1 % des fixierten Kohlenstoffs anaerob von methanogenen Bakterien zu CH_4 reduziert (Eikmanns *et al.*, 2001). Methan, das aus anoxischen Sedimenten in die Atmosphäre entweicht, verursacht neben CO_2 ca. 15 – 19 % des Treibhauseffekts (Fent, 2003). In terrestrischen Habitaten wurde eine positive Korrelation zwischen der CO_2 -Konzentration der Atmosphäre und der Methan-Emission festgestellt (Dacey *et al.*, 1994). In aquatischen Systemen wird der Großteil des Methans aus anoxischen Sedimentschichten von methanotrophen Bakterien (aerobe α - und γ -Proteobakterien) zu CO_2 oxidiert (Madigan *et al.*, 2006). Methanotrophe Bakterien sind im oxischen Bereich oberhalb anoxischer Sedimentschichten weit verbreitet. Ihre ökologische Funktion besteht in der Rückführung des Methan-Kohlenstoffs in den Kreislauf der Biosphäre (Heyer *et al.*, 1984).

Bakterien haben entscheidenden Einfluß auf den globalen Kohlenstoffkreislauf: Sie leisten einen Großteil der Remineralisierung organischer Substanzen. Der Hauptteil der aeroben Respiration, sowie die gesamte anaerobe Respiration (Cole, 1999) wird von Bakterien geleistet. Letztere kann in marinen Systemen eine bedeutende Rolle spielen: In küstennahen, marinen Sedimenten wird bis zu 50 % des organischen Materials von Sulfat-reduzierenden Bakterien oxidiert (Jørgensen, 1977).

Der bakterielle C-Stoffwechsel hat zudem Einfluß auf das globale Klima: Bakterielle Gemeinschaften anoxischer Sedimentzonen reduzieren organischen Kohlenstoff zu Methan. Methanotrophe Bakterien der oxischen Sedimentzonen, bzw. der Wassersäule oxidieren aufsteigendes CH_4 zu CO_2 . Von den Stoffwechselraten der aeroben und anaeroben Gemeinschaften hängt daher ab, welche Mengen CO_2 oder CH_4 aus dem Sediment in die Atmosphäre emittieren. Da der Einfluß von CH_4 auf den Treibhauseffekt 23-fach höher ist, als der Einfluß von CO_2 (Smith *et al.*, 2003), ist die Stoffwechselleistung methanotropher Bakterien von entscheidender Bedeutung für das globale Klima.

Stickstoffkreislauf

Abbildung 1.1 stellt den Stickstoffkreislauf vereinfacht dar. Ein entscheidender Anteil der N-Fixierung, Nitrifikation, Denitrifikation und Nitrat-Ammonifikation wird von bakteriellen Gemeinschaften geleistet.

N-Fixierung: Stickstoff macht etwa 15 % der Biomasse aus (Madigan *et al.*, 2006). Ammonium ist die einzige anorganische Stickstoffverbindung,

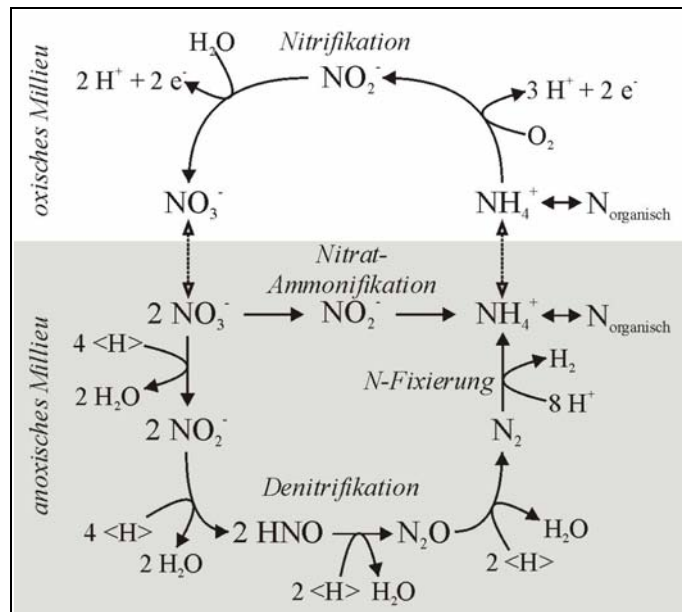


Abbildung 1.1.: Stickstoffkreislauf im Sediment des Wattenmeeres.

aus der Lebewesen Stickstoff assimilieren. Es besetzt somit eine Schlüsselposition im N-Kreislauf. Der überwiegende Teil des Stickstoffs der Erde liegt jedoch als N_2 gasförmig in der Atmosphäre vor. Die Bildung von Ammonium aus N_2 und H_2 ist zwar exotherm, jedoch auch kinetisch gehemmt. Insgesamt sind nur wenige Prokaryonten in der Lage N_2 zu NH_3 zu reduzieren. Stickstoff-Fixierung ist aber sowohl in oxischen, als auch in anoxischen Lebensräumen nachweisbar (Burris, 1991). Die meisten N-Fixierer leben symbiotisch mit höheren Pflanzen assoziiert. In marinen Sedimenten spielt die N-Fixierung dagegen nur eine untergeordnete Rolle (Howarth *et al.*, 1988) und wurde v.a. im Zusammenhang mit Blüten von Cyanobakterien nachgewiesen (Wasmund *et al.*, 2001).

Nitrifikation: Die bakterielle Gemeinschaft des Wattenmeeres ist für die Nitrifikation von großer Bedeutung (Ebrahimipour, 1998). Die Nitrifikation erfolgt in zwei Schritten, der Oxidation von Ammonium zu Nitrit und der Oxidation von Nitrit zu Nitrat. Nitrifizierende Bakterien katalysieren i.d.R. nur einen der Schritte (Schlegel, 1992): Ammonium wird u.a. von Bakterien der Gattungen *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira* oder *Nitrosolobus* (Schlegel, 1992) zu Nitrit oxidiert. Nitrit wird u.a. von Bakterien der Gattungen *Nitrobacter* (Boon *et al.*, 1962), *Nitrospira*, *Nitrococcus* oder *Nitrospina* (Watson *et al.*, 1986) zu Nitrat oxidiert.

Nitrifizierer sind im Böden und Gewässern weit verbreitet. Ebenso sind sie in küstennahen marinen Sedimenten zu finden (Binnerup *et al.*, 1992; Koike und Hattori, 1978).

Denitrifikation: Die Denitrifikation ist der einzige biologische Prozeß, der N_2 regeneriert (Madigan, *et al.*, 2006). NO_3^- wird über NO_2^- , HNO und N_2O zu N_2 reduziert (Zumft, 1997). Denitrifizierer sind weit verbreitet. Es sind überwiegend fakultativ aerobe Proteobakterien, die oft noch weitere Elektronenakzeptoren nutzen (Madigan *et al.*, 2006). Für die Reduktion von Nitrat zu N_2 sind Ästuare und küstennahe marine Sedimente (Sørensen *et al.*, 1978a, b, c), wie das Wattenmeer (Ebrahimipour, 1998) von großer Bedeutung. Nitrat kommt im Meerwasser in hohen Konzentrationen vor. Durch Denitrifikation wird es aus dem Ökosystem entfernt (Lindenlaub, 1998).

Nitrat-Ammonifikation: Bei der Nitratammonifikation wird Nitrat direkt anaerob zu Ammonium reduziert. Elementarer Stickstoff ist kein Intermediat der Reaktion. Nitratammonifikation kann in marinen Sedimenten bis zu 80 % des Nitrat-Umsatzes ausmachen (Bonin, 1996).

Schwefelkreislauf

Bakterielle Gemeinschaften des Wattsediments sind auf vielfältige Weise am globalen Schwefelkreislauf beteiligt. Abb. 1.2 stellt die Reaktionen des Schwefelkreislaufs vereinfacht dar. Im Folgenden werden die Reaktionen, sowie der Anteil der bakteriellen Gemeinschaft daran erläutert.

① **Assimilation des Schwefels:** Schwefel wird von Prokaryonten, Pilzen und Pflanzen als Sulfat assimiliert: Sulfat wird zu Sulfid reduziert und auf unterschiedliche Akzeptoren übertragen. Pflanzen nutzen

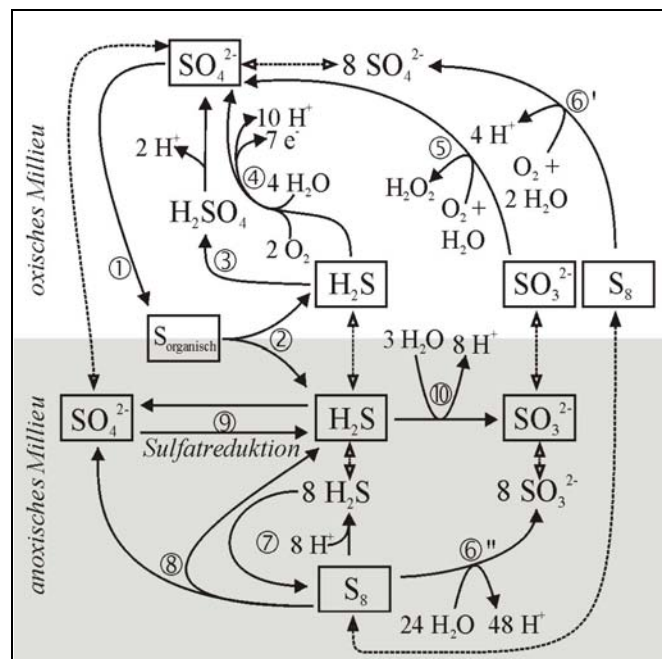


Abbildung 1.2.: Schwefelkreislauf. Die Reaktionen ① - ⑩ sind im Text erläutert.

O-Acetyl-L-Serin, Hefen dagegen O-Acetyl-Homocystein als Akzeptoren (Thomas und Surdin-Kerjan, 1997). *Chlorella* nutzt Glutathion als H₂S-Akzeptor (Schmidt, 1972). Als Methionin und Cystein wird assimilierter Schwefel in Biomasse integriert.

② **Dissimilation des Schwefels:** Die Sulfhydrylgruppe der schwefelhaltigen Aminosäuren L-Cystein und L-Methionin wird bei der Dissimilation letztlich als Sulfid frei. Aerobe Bakterien können Sulfid über verschiedene Wege zum Sulfat oxidieren (vgl. ③ und ④). Sulfid unterliegt unter oxischen Bedingungen jedoch auch der Auto-Oxidation zu Sulfat (Pfennig, 1975). Das Sulfat steht somit assimilierenden Organismen wieder zur Verfügung. Durch anaerobe Bakterien kann Sulfid einerseits zu elementarem Schwefel (S₈) oxidiert werden. Andererseits kann umgekehrt S₈ anaerob zu H₂S reduziert werden (vgl. ⑦).

③ **Aerobe Sulfid-Oxidation bei Nutzung von Thiocyanat als N-Quelle:** Einige sowohl heterotrophe (*Halomonas spec.*), als auch autotrophe (*Thioalkalivibrio spec.*) alkaliphile γ -*Proteobacteria* aus alkalischen Seen können Thiocyanat als Stickstoffquelle nutzen. Das dabei entstehende Sulfid oxidieren sie im oxischen Milieu zur Schwefelsäure (Sorokin *et al.*, 2001). Bei Dissoziation der H₂SO₄ in der alkalischen Umgebung wird SO₄²⁻ frei, welches für die Assimilation von Schwefel genutzt werden kann.

④ **Sulfid-Oxidation:** Gram-negative, heterotrophe Bakterien des Stamms 26B, nutzen Thiocyanat als Stickstoffquelle. Beim Thiocyanatabbau entstehendes Sulfid wird aerob über Thiosulfat zu Tetrathionat oxidiert (Stratford *et al.*, 1994). Polythionate, wie Tetrathionat unterliegen dem aeroben, bakteriellen Abbau zu Sulfat. *Thiobacillus tepidarius* ist ein Beispiel für ein Polythionat-verwertendes Bakterium (Friedrich *et al.*, 2001).

⑤ **Sulfit-Oxidation:** Sulfit entsteht unter anoxischen Bedingungen bei der Reduktiven CO₂-Fixierung (vgl. ⑩), oder bei der anaeroben Oxidation elementaren Schwefels (vgl. ⑥“). Sulfit wird aerob zu Sulfat oxidiert: Hansen (1994) beschrieb die Reaktion bei *Desulfovibrio gigas*. Katalysiert wird sie von der Sulfit-Oxidase (KAS.: 1.8.3.1). Das Enzym wurde auch bei anderen Bakterien, wie *Mycobacterium bovis* oder *Rhodopseudomonas palustris* nachgewiesen. *R. palustris* wurde in marinen Lebensräumen in Assoziation mit Schwämmen nachgewiesen (Imhoff und Trüper,

1976).

ⓐ **Aerobe Oxidation von elementarem Schwefel zu Sulfat:** Elementarer Schwefel S_8 wird unter oxidischen Bedingungen von *Thiobacillus spec.*, *Beggiatoa spec.* u.a. zu SO_4^{2-} oxidiert (Madigan *et al.*, 2006). Der elementare Schwefel S_8 dient als Elektronendonator. Der Schwefel wird somit für die Assimilation verfügbar.

ⓑ **Anoxische Sulfid-Oxidation / anoxische Reduktion elementaren Schwefels:** H_2S wird von phototrophen Purpur- und Grünen Schwefelbakterien als Elektronendonator in der reduktiven CO_2 -Fixierung genutzt. Das Sulfid wird dabei zu elementarem Schwefel (S_8) oxidiert (Brune, 1989). Beschrieben wurde die Reaktion für *Rhodobacter capsulatus*, *Pelodictyon luteolum* und *Chlorobium spec.* (Friedrich *et al.*, 2001). Elementarer Schwefel wird ggf. intrazellulär eingelagert (Pott *et al.*, 1998). Umgekehrt nutzt das chemolithotrophe Archaeobakterium *Pyrodicticum abyssi* S_8 als Energiequelle, indem es den Schwefel mit Wasserstoff zu Sulfid reduziert (Dirmeier *et al.*, 1998).

ⓒ **Disproportionierung von S_8 zu H_2S und Thiosulfat:** Finster *et al.* (1998) beschrieben die anaerobe Disproportionierung von S_8 durch *Desulfocapsa sulfoexigens* zu H_2S und SO_4^{2-} . *D. sulfoexigens* konnte mit elementarem Schwefel als einziger Energiequelle wachsen. Das Bakterium wurde marinem Sediment entnommen. Jackson und McInerney (2000) beschrieben analog dazu die anaerobe Disproportionierung von S_8 zu Sulfid und Thiosulfat durch *Rhodopseudomonas palustris*. Thiosulfat kann ebenfalls von *D. sulfoexigens* anaerob zu Sulfid und Sulfat disproportioniert werden (Finster *et al.*, 1998).

ⓓ **Sulfatreduktion:** Bei der Sulfatreduktion ist zwischen assimilatorischer und dissimilatorischer Sulfatreduktion zu unterscheiden:

Die assimilatorische S_{\sim} wird von Algen, höheren Pflanzen, Pilzen und den meisten Prokaryonten genutzt (Madigan *et al.*, 2006) (vgl. ①).

In der dissimilatorischen S_{\sim} wird mehr Sulfat reduziert, als in der assimilatorischen. Das entstehende Sulfid wird freigesetzt. Die Fähigkeit zur dissimilatorischen S_{\sim} ist auf sulfatreduzierende Bakterien beschränkt. Sie stellen eine sehr heterogene Gruppe dar (Hansen, 1994; Madigan *et al.*, 2006). Das Sulfat dient als Elektronenakzeptor der anaeroben Atmung.

Desulfovibrio gigas kehrt die Sulfatreduktion unter anoxischen Bedingungen um

(Hansen, 1994).

⑩ Nutzung von H₂S/S₈ als Elektronendonator für die Reduktive CO₂-Fixierung:

Phototrophe Purpur- und Grüne Schwefelbakterien nutzen unter anoxischen Bedingungen H₂S als Elektronendonator in der reduktiven Fixierung von CO₂ (Brune, 1989; Pfennig, 1975) als Acetat (Diekert und Wohlfahrt, 1994). Das Sulfid wird zu Sulfit oxidiert. Der Eingang der Elektronen in die Elektronentransportkette ist allerdings noch unklar (Reinartz *et al.*, 1998).

Alternativ zu H₂S kann auch S₈ als Elektronenquelle in der Reduktiven CO₂-Fixierung genutzt werden. Der elementare Schwefel wird zu Sulfit oxidiert (Brune, 1989).

1.3. Anthropogene Einflüsse auf das Wattenmeer und seine bakteriellen Gemeinschaften

Die landwirtschaftliche und industrielle Bewirtschaftung der Küstenregionen führt zum Eintrag von Umweltchemikalien in das Wattenmeer. Ebenso belasten Ab- und Sickerwässer aus den Einzugsgebieten der einmündenden Flußsysteme die Nordsee und das Wattenmeer. Zudem wird das Ökosystem Wattenmeer mit Einflüssen konfrontiert, die von der internationalen Seeschifffahrt herrühren (Ölschlämme, hohe SO₂-Emissionen (Brenke, 2003) oder verlorene Ladungen). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Wirkung von Schwermetallen und lipo-, bzw. amphiphilen Substanzen auf bakterielle Gemeinschaften. Wegen seiner Umweltrelevanz wurde Cadmium als Schwermetall für den Einsatz in vorliegender Arbeit ausgewählt. Als amphiphile, membrantoxische Substanz wurde wegen seiner breiten Anwendung Natriumdodecylsulfat verwendet.

1.3.1. Cadmium

Vorkommen von Cadmium, Quellen der Cadmiumbelastung

Cadmium kommt in vielen Mineralien der Erdkruste, und somit natürlicherweise (in unterschiedlichen Konzentrationen) in vielen Lebensräumen vor: Neben der Erosion von Mineralien durch Oberflächengewässer und dem damit verbundenen Auswaschen von Cadmium in Flüsse, Seen und Ozeane, wird Cadmium auch durch vulkanische Aktivität in die Atmosphäre gebracht (Yost, 1984).

Die anthropogene Freisetzung von Cadmium übertrifft allerdings den natürlichen Zyklus bei weitem (Babich und Stotzky, 1978). Durch die Nutzung vieler Miner-

alien, wird Cadmium als deren Bestandteil in die Umwelt gebracht:

- Cadmiumsulfid (CdS) ist als Verunreinigung Bestandteil der Zinkblende (ZnS). Bei der Zinkverhüttung wird nach dem Rösten und Laugen der Zinkblende das Zink vom Cd^{2+} und anderen Begleitelementen getrennt und elektrolytisch aufkonzentriert. Die dabei anfallenden Cd^{2+} -haltigen Abwässer gelangen normalerweise nicht in die Umwelt, können aber bei Unfällen freigesetzt werden. So gelangten z.B. am 20.12.2005 aus einer Schmelzhütte nahe Foshan und Kanton (Provinz Guandong, China), und am 6.01.2006 aus einer Gießerei in Zhuzhou (Provinz Hunan, China) große Mengen Cd^{2+} -haltiger Abwässer in die Flüsse Beijiang und Xiangjiang.
- Zinkdächer sind bei Feuersbrünsten unempfindlich gegen Funkenflug. Daher wurden sie v.a. in der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts - nachdem 1805 das erste Verfahren entwickelt wurde, Zink zu Blechen zu walzen - vielfach verbaut. Chebbo *et al.* (1999) wiesen Cadmium im Regenwasser nach, welches von verwitternden Zinkdächern im Quartier Le Marais (Paris) ablief.
- Bei der Verbrennung von Kohle und Öl wird das darin enthaltene Cadmium freigesetzt (Ron *et al.*, 1992).
- Mineralische Phosphatdünger enthalten Cadmium als Verunreinigung (Ron *et al.*, 1992). Beim Düngen gelangt somit Cadmium auf das Feld, und wird entweder von Pflanzen aufgenommen (und gelangt somit in die Nahrungskette) oder vom Regen in Oberflächengewässer oder das Grundwasser ausgewaschen.

Cadmium wird nicht nur als Verunreinigung von Metallen/Mineralien in die Umwelt freigesetzt, es findet auch technische Anwendung: So dient es als Stabilisator in Vinyl-Kunststoffen und wird in Anoden von NiCd-Akkumulatoren eingesetzt (Ron *et al.*, 1992). Ferner findet es Verwendung in der Produktion von Halbleitern oder als Farbpigment (Cadmiumgelb: CdS, bzw. Cadmiumrot: CdSe). Aus di-Natriumtetracyanocadmat ($\text{Na}_2[\text{Cd}(\text{CN})_4]$ - mit Cadmiumanoden) wird es galvanisch als Korrosionsschutz auf Eisen und Stahl aufgebracht (Vercadmung).

Cadmiumkonzentrationen im Wattenmeer

Marine, küstennahe Sedimente sind Lagerstätten für Schwermetalle. Ihre Schwermetallkonzentrationen übertreffen die der Wassersäule um Größenordnungen.

(Bryan und Langson, 1992; Chapman *et al.*, 1998). U.a. wiesen Iverson und Brinckman (1978), Haarich und Schmidt, (1986), sowie Schulze (2001) Cadmium in aquatischen Lebensräumen nach: Iverson und Brinckman (1978) gaben 0,1 ppb ($0,89 \text{ nmol l}^{-1}$) für die durchschnittliche Cadmiumbelastung von Seewasser an. Die Belastung des Sediments der Deutschen Nordseeküste mit Cadmium wurde von Haarich und Schmidt (1993) im Rahmen der ZISCH-Studie (Zirkulation und Schadstofftransport in der Nordsee) untersucht: Für die Deutsche Bucht fanden sie eine durchschnittliche Cadmiumbelastung von $0,1 \text{ nmol kg}^{-1}$ Wattsediment. Die maximale Cadmiumkonzentration gaben sie mit $0,16 \text{ nmol kg}^{-1}$ an.

Insgesamt zählt die südöstliche Nordsee zu den Gebieten mit erhöhter Schwermetallbelastung (Haarich und Schmidt, 1993). Das Umweltbundesamt (2003) gab für den Zeitraum von 1998 bis 2001 für die Feinkornfraktion ($\leq 20 \mu\text{m}$) des Sediments (bis 2 cm Tiefe) Cadmiumbelastungen von 0,6 bis $3,0 \text{ mg/kg}$ an.

Cd^{2+} wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Konzentrationen bis 5 mmol l^{-1} verwendet. Bei 5 g l^{-1} Wattsediment entsprachen diese dem 37.500- bis 187.000-fachen der von Haarich und Schmidt (1993) nachgewiesenen Cd^{2+} -Konzentrationen im Wattsediment. Sie sind daher mit Unfallsituationen zu vergleichen.

Wirkung von Cadmium

Obwohl Cadmium praktisch ubiquitär verfügbar ist, ist keine biologische Funktion bekannt. Es gehört demnach nicht zu den essentiellen Metallen (Babich und Stotzky, 1978). Allerdings wurde die bakterielle Konversion von anorganischem Cadmiumchlorid zum metallorganischen Dimethylcadmium in mediterranen Sedimenten nachgewiesen (Yannai und Berdicevsky, 1995).

Auf molekularer Ebene wirkt Cadmium, indem es irreversible Komplexe mit Sulfhydrylgruppen von Proteinen bildet. Die Proteine können ihre Funktion nicht mehr entfalten. Eine Inaktivierung von Enzymen kann zudem über den Austausch zweiwertiger Metallionen der aktiven Zentren gegen Cd^{2+} stattfinden. Da DNA-Bindedomänen vieler Enzyme der DNA-Reparatur Zn^{2+} enthalten (Zinkfinger), wird die DNA-Reparatur durch Cd^{2+} inhibiert. Cd^{2+} wirkt somit mutagen und cancerogen (Jin *et al.*, 2003; Banerjee und Flores-Rozas, 2005). Die Proteininaktivierende Wirkung von Cadmium spiegelt sich auch darin wieder, daß Cadmium die Bildung von Hitzeschockproteinen *hsp* induziert (van Bogelen, *et al.*,

1987). Viele *hsp* sichern als Chaperone die korrekte posttranslationale Faltung von Proteinen. Pickett *et al.* (1976) wiesen nach Cd^{2+} -Applikation Veränderungen in der bakteriellen Enzymaktivität nach, Kremer und Markham (1982) die Inhibierung der bakteriellen Proteinsynthese.

Bei Bakterien wurde, neben der Zunahme von Einzelstrangbrüchen (Mitra *et al.*, 1978), die Abnahme der Nitrifikation, Glucose-Oxidation und Photosynthese als toxische Effekte nachgewiesen (Mills *et al.*, 1977). Zudem verringert Cadmium den NADPH-Pool von Bakterien (De Filippis *et al.*, 1981).

Zur Entfaltung seiner toxischen Wirkung muß Cadmium bioverfügbar sein: Um auf aquatische Organismen zu wirken muß es in gelöster Form vorliegen (Dell'Anno *et al.*, 2003). Bei höheren, luftatmenden Organismen kann es zudem als Staub eingeatmet werden und Lungenödeme verursachen.

Bakterielle Resistenzmechanismen gegen Cadmium

Ganz generell sind bakterielle Schwermetallresistenzen häufig plasmid-codiert (Ron *et al.*, 1992; Trevors *et al.*, 1985). Schwermetalle dringen über Kationentransporter in Bakterien ein (Mn^{2+} -Transporter (Tynecka *et al.*, 1981), Mg^{2+} -Transporter (Nies, 1999)). Die intrazelluläre Schwermetallkonzentration wird vor allem über die Regulation des Schwermetall-Effluxes kontrolliert (Nies und Silver, 1995). Zusätzlich werden Schwermetallkonzentrationen in den Zellen u.a. auch über Resistenzen reguliert, die auf einer Reduzierung der Schwermetallaufnahme gründen (Trevors *et al.*, 1986). Bakterien unterscheiden sich bezüglich des Vorhandenseins von Resistenzmechanismen. Beschriebene Mechanismen sind: Schwermetall-Efflux, Schwermetall-Bindung, Verhinderung der Schwermetallaufnahme, d.h. Membranimpermeabilität:

1. Efflux

Das Gram-positive Bakterium *Staphylococcus aureus* nutzt für den Cd^{2+} -Efflux P-Typ-ATPasen (CadA) (Silver, 1996). CadA wird hauptsächlich durch Cd^{2+} induziert (Yoon und Silver, 1991). Es katalysiert den ATP-abhängigen Efflux von Cd^{2+} aus dem Cytosol (Nucifora *et al.*, 1989; Tsai *et al.*, 1992).

Gram-negative Bakterien, wie das β -Proteobacterium *Ralstonia eutropha* nutzen dagegen Kationen-Protonen-Antiporter (CzcA) für den Efflux von Schwermetallionen. CzcA alleine ist ein Kobalt-Protonen-Antiporter. Durch die Untereinheiten

CzcB, CzcC und CzcD wird die Spezifität des Antiporters auf Cadmium- und Zinkionen erweitert (Nies und Silver, 1995; Nies *et al.*, 1987; Nies, 1992; Nies, 1995).

Im Gegensatz zu CadA ist das Czc-System keine ATPase. Durch den Einstrom von Protonen beim Antiport gegen Schwermetallionen wird jedoch die protonenmotorische Kraft für die ATP-Synthese verringert. Somit sind beide Efflux-Systeme energieabhängig.

2. Bindung von Schwermetallen

Metallochaperone sind lösliche Metallbindeproteine (O'Halloran *et al.*, 2000). Sie verringern durch Bindung die Konzentration gelöster Metalle (Vallee, 1987). Eukaryotische Metallbindeproteine wurden zahlreich nachgewiesen (Blindauer *et al.*, 2002). Jedoch besitzen auch Prokaryoten Metallbindeproteine. Sie wurden in Spezies der Gattungen *Anabaena*, *Pseudomonas* oder *Escherichia* nachgewiesen (Blindauer *et al.*, 2002; Higham *et al.*, 1984). Sie binden Metalle an Sulfhydrylgruppen von Polythiolen (Hamer, 1986), aber auch an komplexere Strukturen, wie Zinkfinger-ähnliche Domänen (Blindauer *et al.*, 2002).

Bei *Citrobacter spec.* wurde die Bindung von Cadmium als CdHPO_4 beobachtet (Macaskie *et al.*, 1987).

3. Impermeabilität der Membran

Die Phospholipid-Doppelschicht der Zellmembran ist prinzipiell impermeabel für Ionen. Metalle gelangen daher über Ionenkanäle in die Zelle. Laddaga *et al.* (1985) und Surowitz *et al.* (1984) wiesen für Mutanten von *Bacillus subtilis* eine verringerte Cd^{2+} -Aufnahme nach. Laddaga *et al.* (1985) zeigten zudem, daß die von ihnen untersuchte Mutante signifikant weniger Mangan aufnahm. Die Cadmiumresistenz der Mutanten beruhte demnach auf einem defekten Mangantransportsystem von *B. subtilis* (Laddaga *et al.*, 1985, Ron *et al.*, 1992).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß sich Resistenzmechanismen verschiedener Bakterien gegen Cadmium voneinander unterscheiden. Unterschiede bestehen sowohl zwischen bakteriellen Spezies, aber auch zwischen Bakterien derselben Spezies.

1.3.2. Wirkung lipo-, bzw. amphiphiler Substanzen

Lipophile Substanzen sammeln sich aufgrund ihrer hohen Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log P_{O/W}$) in der hydrophoben mittleren Zone von Zellmembranen an. Durch Interaktion mit lipophilen Bestandteilen der Membran (Acylreste der Phospholipide, lipophile Domänen von Membranproteinen, etc.), verändern sich die Eigenschaften der Zellmembran (Ahlers *et al.*, 1991): Die Struktur der Membran wird gestört, membrangebundene Proteine werden in ihrer Funktion eingeschränkt und die Permeabilität für Ionen steigt an. (Bitton *et al.*, 1988; Sikkema *et al.*, 1995). Vor dem Hintergrund des aktiven Transports (Efflux) durch membrangebundene Proteine als wichtigstem Mechanismus der Cadmiumresistenz (Kap. 1.3.1) haben lipophile Substanzen somit das Potential, als Modulator der Schwermetalltoxizität zu wirken.

Für die Experimente in vorliegender Arbeit wurde eine Substanz gewählt, die einerseits das oben beschriebene membrantoxische Potential hat (sich als lipophile, bzw. amphiphile Substanz in der Membran einlagert) und die andererseits in ökologisch relevanten Mengen in die Umwelt gelangt. Die Wahl fiel auf Natriumdocylsulfat (SDS):

Obwohl SDS zu Hautirritationen führen kann (Agner und Serup, 1990), findet es (als Laurylsulfat) breite Anwendung in vielen Produkten des täglichen Bedarfs, wie etwa in Spül- und Waschmitteln, Flüssigseifen, Shampoos, Reinigungsmitteln oder Zahnpasta. Ferner spielt SDS eine Rolle als Emulgator in Crèmes und Salben. Dies mag, neben der biologischen Abbaubarkeit, auch daran liegen, daß SDS sehr kostengünstig herzustellen (durch Sulfatierung von 1-Dodecanol mit Schwefelsäure) ist. Die vielfältige Anwendung führt letztlich zum Einleiten großer SDS-Mengen in Abwässer und Oberflächengewässer. SDS stellt demnach eine amphiphile Substanz mit hoher Umweltrelevanz dar und schien somit für den Einsatz in der vorliegenden Arbeit geeignet zu sein.

1.4. Bewertung von Kombinationswirkungen auf Gemeinschaften

Die klassische Toxikologie befaßt sich mit der dosisabhängigen Wirkung **einer** Substanz auf **einen** Organismus. Mithilfe der daraus folgenden Dosis-Wirkungs-Beziehung werden Rückschlüsse auf die Wirkung der Substanz auf den Organismus in seiner natürlichen Umgebung gezogen. Diese Annäherung berücksichtigt

allerdings weder, daß Organismen in ihrer natürlichen Umgebung selten isoliert vorkommen, noch, daß sie selten nur einer einzigen Noxe ausgesetzt sind. In der Regel ist in der Umwelt eine Gemeinschaft verschiedener Organismen der Kombination mehrerer Noxen ausgesetzt.

Daher wurden verschiedene Konzepte entwickelt, um die Kombinationswirkung mehrerer Noxen abzuschätzen. Diese sind in Kap. 1.4.1 zusammengefaßt.

Die Bewertung der Wirkung von Noxen auf Gemeinschaften von Organismen unterscheidet sich von der Bewertung der Wirkung auf einzelne Spezies: Einerseits können Noxen artspezifisch unterschiedlich wirken, andererseits können intrakommunale Interaktionen wie Syntrophie, Konkurrenz oder Antagonismus die Wirkung der Noxen auf Ebene der Gemeinschaft beeinflussen. Die Beurteilung toxischer (Kombinations-)Wirkungen auf Gemeinschaftsebene kann auf Basis von Diversitäts-Indices geschehen. Die gebräuchlichsten Diversitäts-Indices, ihre Anwendung und Grenzen sind in Kap. 1.4.2 zusammengestellt.

1.4.1. Konzepte zur Erfassung von Kombinationswirkungen

➤ **Effektsummation**

Nach dem Konzept der Effektsummation wird die kombinierte Wirkung mehrerer Substanzen als Summe der Einzeleffekte approximiert.

$$E(S_1 + S_2 + \dots + S_n) = \sum_{i=1}^n E(S_i)$$

Rechnerisch erlaubt die Effektsummation damit allerdings Gesamteffekte von mehr als 100 % (Grimme *et al.*, 1998). Daher wurden alternative Konzepte zur Abschätzung von Kombinationseffekten entwickelt. Die Auswahl des zu verwendenden Konzepts hängt von der Frage ab, ob die Noxen den gleichen Wirkmechanismus besitzen, und somit am gleichen Wirkort wirken, oder unabhängig voneinander an verschiedenen Wirkorten wirken. Bei gleicher Wirkung wird das Konzept der Konzentrations-Additivität angewandt, bei unterschiedlichen Wirkorten das der unabhängigen Wirkung.

➤ **Konzentrations-Additivität (CA)**

Wirken zwei Substanzen am selben Wirkort, so konkurrieren sie um diesen. Eine Substanz verhält sich somit wie eine Verdünnung der anderen (Walter, 2002). Für die kombinierte Wirkung zweier Substanzen gilt daher folgende

Beziehung (Berenbaum, 1985):

$$\frac{c_{S_1}}{EC_x(S_1)} + \frac{c_{S_2}}{EC_x(S_2)} = 1$$

c_s bezeichnet die Konzentrationen der Substanzen S_1 und S_2 , $EC_x(S)$ die Konzentration, die erforderlich ist, um einen bestimmten Effekt x durch die Substanz S hervorzurufen (Grimme *et al.*, 1998).

Die Kombinationswirkung von S_1 und S_2 wird nach dem Konzept der IA wie folgt berechnet (Altenburger *et al.*, 2004):

$$EC_{x(\text{Mix})} = \left(\sum_{i=1}^n \frac{p_i}{EC_{x_i}} \right)^{-1}$$

$EC_{x(\text{Mix})}$ ist die Konzentration der Mischung, die einen Effekt von x % verursacht. EC_{x_i} ist die Konzentration der Komponente i , die einen Einzeleffekt von x % verursacht. p_i bezeichnet den Anteil der Komponente i in der Mischung.

➤ **Unabhängige Wirkung (IA: Independant joint action)**

Dem Konzept der IA liegt die Annahme unähnlicher Wirkungen der Substanzen zugrunde. D.h. die Substanzen interagieren primär mit unterschiedlichen Wirkorten und führen über unterschiedliche Wirkketten zu einem gemeinsamen Effekt (Grimme *et al.*, 1989). Ähnlich der Effektsummation werden die Einzelwirkungen im Konzept der IA aufsummiert. Allerdings werden Effektüberlagerungen der Substanzen von der Summe subtrahiert. Somit kann der Gesamteffekt maximal 100 % erreichen. Der nach IA zu erwartende Gesamt-Effekt wird wie folgt berechnet (Grimme *et al.*, 1998).

$$E(c_{S_1} + c_{S_2}) = E(c_{S_1}) + E(c_{S_2}) - E(c_{S_1}) \cdot E(c_{S_2})$$

$E(c_{S_x})$ bezeichnet den Effekt der Substanz S_x , die in der Konzentration c appliziert wurde.

Die Konzepte der Konzentrationsadditivität und der unabhängigen Wirkung können ggf. genutzt werden, um Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus zu ziehen. Stimmt die beobachtete Kombinationswirkung mit der mittels CA, bzw. IA aus den Einzelwirkungen der Noxen vorhergesagten Kombinationswirkung überein, so kann auf die Wirkung am gleichen, bzw. an unterschiedlichen Wirkorten geschlossen werden.

1.4.2. Konzepte zur Beschreibung der Diversität von Gemeinschaften:

Verschiedene Konzepte zur mathematischen Erfassung der Spezies-Diversität von Ökosystemen wurden entwickelt (Hill *et al.*, 2003). Die Konzepte ließen sich auch auf andere Fragestellungen (z.B.: metabolische, physiologische, genetische oder phylogenetische Diversität) übertragen. Nachfolgend werden die wichtigsten Konzepte, sowie ihre Grenzen dargestellt:

a) Grundlegende Konzepte zur Beschreibung von Diversität:

➤ Artenvielfalt (Spezies richness):

Bei gleichen Abundanzen aller Spezies ist die **Anzahl der Spezies** (Artenvielfalt) S bzw. SR (species richness) einer Gemeinschaft gut geeignet, die Diversität zu erfassen: In einer Gemeinschaft der Spezies A, B und C, mit jeweils gleichen Abundanzen, beträgt die Wahrscheinlichkeit zum Antreffen eines Individuums der Spezies A, B oder C jeweils $1/3$. $SR = 3$ beschreibt die Gemeinschaft demnach hinreichend genau. Gehören dagegen 98 % der Individuen der Spezies A und jeweils 1 % der Individuen B und C an, so ist die Wahrscheinlichkeit ein Individuum B oder C anzutreffen 98-fach geringer, als die für ein Individuum A. In diesem Fall beschreibt $SR = 3$ die Gemeinschaft also nur ungenügend. Wiener (1948) und Shannon *et al.* (1949), sowie Simpson (1949) entwickelten Diversitäts-Indices, die die Abundanzen der Spezies berücksichtigen.

➤ Shannon-Wiener- und Simpson-Index:

Sowohl der Shannon-Wiener-, als auch der Simpson-Index verwenden den Term p_i . Er beschreibt - als Quotient aus der Anzahl der Individuen der i -ten Spezies n_i und der Gesamtzahl der Individuen aller Spezies N - die Wahrscheinlichkeit ein Individuum der i -ten Spezies anzutreffen. Beide Indices berücksichtigen damit neben der Anzahl der Spezies auch deren Abundanzen.

$$H_{Sh} = - \sum_{i=1}^s p_i \cdot \ln p_i \quad \text{Shannon-Wiener-Index}$$

$$D = \sum_{i=1}^s p_i^2 = \sum_{i=1}^s \frac{n_i \cdot (n_i - 1)}{N \cdot (N - 1)} \quad \text{Simpson-Index}$$

Shannon-Wiener- oder Simpson-Indices unterschiedlich artenreicher Gemeinschaften sind allerdings nicht direkt miteinander vergleichbar. Daher muß die Evenness E berechnet werden um den Vergleich zu führen.

$$E = \frac{H_{Sh}}{\ln SR}$$

Diversitäts-Indices, wie der Shannon-Wiener-Index H_{Sh} , der Simpson-Index D und die Evenness E sind gebräuchliche Kenngrößen für die Beschreibung der Biodiversität von Flächen oder Volumina (Patil und Taillie, 1982). Sie bedingen allerdings, daß die Wahrscheinlichkeiten zum Erfassen von Individuen aller Spezies gleich sind (nicht-selektive Probenahme).

➤ **Brillouin-Index:**

Bei ungleichen Wahrscheinlichkeiten der Erfassung von Individuen unterschiedlicher Spezies (selektive Probenahme: Individuen einer/weniger Spezies werden bevorzugt erfaßt) ist der Brillouin-Index (Brillouin, 1962) geeignet, die Diversität der Gemeinschaft zu beschreiben:

$$H_B = \frac{\ln(N!) - \sum_{i=1}^s \ln(n_i!)}{N} \quad \text{mit der Brillouin-Evenness: } E_B = \frac{H_B}{H_{B \max}}$$

Die Anwendung des Brillouin-Index beschränkt sich jedoch auf relativ kleine N und n_i , da bei der Berechnung der Fakultäten sehr großer N und n_i extrem große Zahlen entstehen, die in der Praxis kaum zu handhaben sind.

Hill *et al.* (2003) beschrieben weitere Diversitäts-Indices, sowie die aus ihrer Anwendung auf bakterielle Gemeinschaften erwachsenden Probleme oder Nutzen.

b) Vergleich der Diversität mehrerer Gemeinschaften:

Zum Vergleich zweier Gemeinschaften kann der Jaccard-Koeffizient S_j verwendet werden. Er stellt den Quotienten aus der Anzahl der Spezies, die in beiden Gemeinschaften vorkommen, und der Anzahl der Spezies, die in nur einer Gemeinschaft vorkommen, dar. Der Matching Coeffizient S_{SM} berücksichtigt zusätzlich die Spezies, die in keiner der Gemeinschaften vorkommen. Zum Vergleich von mehr als zwei Gemeinschaften können weder S_j , noch S_{SM} verwendet werden. Dieser kann mittels Clusteranalyse oder Hauptkomponentenanalyse (PCA) durchgeführt werden.

Einige der Konzepte kamen bei der Beurteilung der Diversität in vorliegender Arbeit zur Anwendung (Kap. 3.9):

Die **metabolische Diversität** der Gemeinschaft wurden mittels Ecolog[®]-Test bestimmt (Kap. 3.5.5). Die qualitative Auswertung der Substratverwertungsspektren erfaßte nur, ob ein Substrat S_i verwertet wurde, nicht aber den Grad der Verwertung (über die Intensität des Farbumschlags). Da somit nur die Anzahl der verwerteten Substrate in einer Probe bekannt war, wurde das Konzept der Artenvielfalt SR zur Ermittlung der metabolischen Diversität angewandt. Der Vergleich der metabolischen Diversität verschiedener Proben wurde mittels Clusteranalyse durchgeführt.

Die **Spezies-Diversität** der Gemeinschaft wurde über die DNA-Präsenz mittels DGGE ermittelt (Kap. 3.5.2.4). Ebenso, wie bei der metabolischen Diversität, wurden die DNA-Bandenmuster der DGGE-Gele nur qualitativ ausgewertet. Daher konnten zwar Aussagen über das Vorhandensein einer bestimmten Spezies in einer Probe, nicht aber über deren Abundanz gemacht werden. Die Spezies-Diversität der Gemeinschaften wurde folglich ebenfalls mit dem Konzept der Artenvielfalt SR beurteilt. Die Spezies-Diversitäten verschiedener Proben wurden einerseits mittels Clusteranalyse (Kap. 4.1.1), und andererseits mittels Hauptkomponentenanalyse (Kap. 4.2.4.3) miteinander verglichen. Der Vergleich zweier Proben wurde über die Ermittlung Euklidischer Distanzen durchgeführt.

Die **physiologische Diversität** wurde mittels MPN ermittelt (Kap. 3.5.4). Die MPN-Methode lieferte Daten über die Abundanz von Mitgliedern der untersuchten physiologischen Gruppen in den Proben. Daher wurde die physiologische Diversität mittels Shannon-Wiener-Index berechnet (Kap. 4.2.2.2).

1.5. Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Wirkung von membran-toxischen Substanzen (SDS) und Cadmium auf autochthone bakterielle Gemeinschaften des Wattenmeeres. Änderungen der Struktur und Aktivität der Gemeinschaft sollten in Abhängigkeit von den Konzentrationen der Noxen Cd^{2+} und SDS ermittelt werden. Die Noxen sollten dabei sowohl einzeln, als auch in Kombination auf die Gemeinschaft einwirken. Mechanistische Fragestellungen standen dabei nicht im Vordergrund.

Es sollten sowohl die Stoffwechsel-Aktivität und -Diversität, als auch die Struktur

der Gemeinschaften ermittelt und auf die Konzentrationen der Noxen bezogen werden.

Wechselnde Umweltparameter, wie Salinität, Temperatur, Nährstoffkonzentration (vgl. Kap. 1.1), sowie der Einfluß weiterer im Wattenmeer vorhandener Noxen (vgl. Kap. 1.3) ließen Einflüsse auf die Aktivität und Struktur der bakteriellen Gemeinschaft erwarten. Um die Kulturbedingungen konstant halten zu können, wurden die Versuche daher nicht *in situ*, sondern *ex situ* unter den kontrollierten Bedingungen einer Batchkultur im Fermenter durchgeführt: Die Gemeinschaft wurde in Seewasserbouillon X-2 (Acetat, Pyruvat und Casaminoacids) 240 Stunden kultiviert. Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffkonzentration ($100 \% \geq pO_2 \geq 70 \%$) und Durchmischungsrate wurden konstant gehalten. Die Aktivität der Gemeinschaft wurde über die Bestimmung der O_2 - und CO_2 -Konzentrationen in der Zu- und Abluft bestimmt. Um Einflüsse der Photosynthese auf die Aktivitätsbestimmung auszuschließen wurde die Gemeinschaft daher dunkel kultiviert.

Das Verhalten der Gemeinschaft in der Batchkultur wurde über unbelastete Kontrollversuche ($[Cd^{2+}] = [SDS] = 0,0 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) ermittelt. Cadmiumacetat wurde in variierenden Konzentrationen von $0,005$ bis $5,0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ eingesetzt. SDS-begiftete Gemeinschaften wurden $43,34 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ SDS ausgesetzt. Cadmiumacetat wurde in Kombination mit SDS in Konzentrationen von $0,005$ bis $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ eingesetzt.

2. Material

2.1. Chemikalien

Alle Substanzen wurden - soweit verfügbar - im Reinheitsgrad p.a. verwendet. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Substanzen sind nachfolgend aufgelistet.

Substanz	Lieferant	Substanz	Lieferant
Agar Agar	Fluka	Magnesiumchlorid · 6 H ₂ O	Roth
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth	Magnesiumsulfat · 7 H ₂ O	Riedel-de-Haën
p-Aminobenzoësäure	Merck	Manganchlorid · 4 H ₂ O	Merck
Ammoniumchlorid	Roth	Methanol	Roth
Ammoniumpersulfat	Roth	Na-Acetat (wasserfrei)	Roth
Bacto-Pepton	Difco	Na-Chlorid	Riedel-de-Haën
Borsäure	Janssen Chimica	Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Calciumchlorid · 2 H ₂ O	Riedel-de-Haën	di-Natriumhydrogenphosphat · 2 H ₂ O	Merck
Casamino acids (vitaminfrei)	Difco	Natriumhydroxid	Riedel-de-Haën
Cobalamin	Merck	Na-DL-Lactat-Lösung	Fluka
Cobaltchlorid · 6 H ₂ O	Merck	Na-Molybdat · H ₂ O	Merck
Biotin	Biomol	Na-Nitrat	J.T. Baker
4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)	Sigma	Na-Nitrit	J.T. Baker
1,4-Diazabicyclo-[2,2,2]-oktan	Sigma	Na-Polyphosphat	Merck
Didesoxynucleotide (dNTPs)	Fermentas	Na-Pyruvat	Fluka
Eisenchlorid · 4 H ₂ O	Fluka	Na-Sulfat	Roth
Eisensulfat · 7 H ₂ O	k.a.	Nickelchlorid · 6 H ₂ O	Merck
Fleischextrakt, trocken	Merck	Nicotinsäure	Merck
Enhancer (PCR)	OMNI Life Science	Panθοthenat	Aldrich
Essigsäure (Eisessig)	Merck	Pyridoxamin Dihydrochlorid	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure Tetranatriumsalz (EDTA)	Roth	Resazurin	Sigma
Ethanol (absolut)	Roth	Rotiphorese® Gel 40	Roth
Ethidiumbromid	Fluka	Salzsäure, 37 %	Riedel-de-Haën
Formamid	Fluka	Stickstoff	Messer Griesheim
Gelatine	Riedel-de-Haën	SYBR®-Gold	MobiTec
Glycerin	Roth	synthetische Luft	Messer Griesheim
Harnstoff	Roth	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED)	Roth
Hefeextrakt	Difco	Thiamindichlorid	Merck

Substanz	Lieferant	Substanz	Lieferant
Kaliumchlorid	Merck	Tris-(hydroxymethyl)-amino- methan (Base)	Roth
Kaliumchrom(III)-sulfat	Fluka	Tris-(hydroxymethyl)-amino- methanhydrochlorid	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	Tween 80	Fluka
Loading Dye, 6x	Fermentas	Zinkchlorid	Merck
Magnesiumchlorid (PCR)	OMNI Life Science		

2.2. Geräte

2.2.1. Geräte allgemein

Gerät / Material	Hersteller	Bezeichnung
★ Atom-Absorptions-Spektrometer	Varian	Spectr AA
★ Digitalkameras	Olympus Praktika	Camedia C-4000 Zoom luxmedia 5003
★ Mikroskop	Zeiss	Axiostar plus
★ Photometer	Pharmacia	UV visible Spectrometer
★ Polarisationsfilter	Hama	ROWI Polarizing 49 mm
★ Reinstwasseranlage	ELGA	LabWater Elgastat® UHQPS
★ Sonifiziergerät	Branson	Sonifier 5210
★ Stereolupen	Zeiss	47 50 22 und 47 50 06
★ Sterilfilter	Sartorius	Cellulosenitrat, 0,2 µm
★ Zentrifugen	Heraeus Eppendorf Beckmann	Biofuge A (Rot.: 1378) 5417 R (Rot.: FA 45-30-11) TJ-6 (Rot.: TH-4)

2.2.2. Fermentation

Gerät / Material	Hersteller	Bezeichnung
★ Bioreaktor	Braun Biotech	Biostat MD
★ Durchflußmeßgerät	Bronkhorst	Massflowmeter (0-500 ml/min)
★ Gasanalytik	Maihak GLP mbH	Unor 6 N SONOS
★ Kühlung	Julabo Labortechnik	Julabo FE 1800
★ Luftfilter	Sartorius	Millipore SA
★ Meß- und Regelsystem	Braun Infors	Biostat MD, Biostat DCU Labfors HT
★ pH-Elektrode	Mettler-Toledo	405-DPAS SC
★ pO ₂ -Elektrode	Mettler-Toledo	Sauerstoffsensoren
★ Software: Fermentationsdaten	Braun Infors	Micro-MFCS Version 3.2 Iris NT PRO Version 4.49

2.2.3. PCR / DGGE

Gerät / Material	Hersteller	Bezeichnung
★ DGGE-Anlage	INGENY Int.	INGENYphorU-2
★ Elektrophoresekammer	Amersham Pharmacia Biotech BIO-RAD	Hoefel HE33 WIDE MINI SUB™ CELL
★ Power Supply	PEQLAB	Consort E143
★ Thermocycler	Biometra Biometra Amersham Pharmacia Biotech	TGradient Personal Cyclor Consort EPS 300
★ UV-Transilluminator	Biostep GmbH	

2.2.4. Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung / DAPI

Gerät / Material	Hersteller	Bezeichnung
★ Feuchte Kammer	Greiner Bio-One	50 ml Röhrchen
★ Fluoreszenzmikroskop	Zeiss	Axioskop HBO50
★ Hybridisierungssofen	Biometra	OV3
★ Objektträger	OMNILAB	Diagnostika-OT 8KA. Epoxy
★ Sonifiziergerät	Branson	Sonifier BT-12
★ Zählkular	Beyersdörfer	MIC 1146

2.2.5. Substratverwertungsspektren - Biolog® EcoPlate™

Gerät / Material	Hersteller	Bezeichnung
★ Testplatten	Biolog	EcoPlate™
★ UV/Vis-Transilluminator	lth Labortechnik	TFP - M / WL

2.3. Lösungen

2.3.1. Vitaminlösung nach Schlegel (1992, modifiziert)

Biotin, Nikotinsäure, Thiamin, Panto-
thensäure, p-Aminobenzoësäure und
Pyridoxamin wurden gemäß den Kon-
zentrationsangaben in Tabelle 2.1 in
Aqua dest. gelöst. Die Vitaminlösung
wurde sterilfiltriert (0,2 µm) und bei
4°C gelagert.

Tabelle 2.1.: Zusammensetzung der Vitaminlös-
ung nach Schlegel (1992, modifiziert).

Vitamin	Konzentration
p-Aminobenzoësäure	36,46 µmol l ⁻¹
Biotin	2,05 µmol l ⁻¹
Niktotinsäure	40,61 µmol l ⁻¹
Pantothensäure	5,70 µmol l ⁻¹
Pyridoxamin	74,32 µmol l ⁻¹
Thiamin	7,41 µmol l ⁻¹

2.3.2. Spurenelementlösung (DSMZ 124, modifiziert)

Eisen(II)chlorid, Zinkchlorid, Manganchlorid, Borsäure, Kobaltchlorid, Kupferchlorid, Nickelchlorid sowie Natriummolybdat wurden nach den Konzentrationsangaben in Tabelle 2.2 in Aqua dest. gelöst und bei 121°C 20 min autoklaviert.

Tabelle 2.2.: Zusammensetzung der Spurenelementlösung (DSMZ 124, mod.).

Spurenelement	Konzentration
CoCl ₂	0,50 mmol l ⁻¹
CuCl ₂	99,71 µmol l ⁻¹
FeCl ₂	7,54 mmol l ⁻¹
H ₃ BO ₃	1,00 mmol l ⁻¹
MnCl ₂	0,51 mmol l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄	99,19 µmol l ⁻¹
NiCl ₂	0,10 mmol l ⁻¹
ZnCl ₂	0,50 mmol l ⁻¹

2.3.3. Artifizielles Seewasser nach Levring (1946), 4-fach konzentriert

94,40 g Natriumchlorid, 2,56 g Kaliumchlorid, 18,12 g Magnesiumchlorid (Hexahydrat) und 23,76 g Magnesiumsulfat (Heptahydrat) wurden in 800 ml Aqua dest. gelöst, bei 121°C 20 min autoklaviert. 100 ml einer separat autoklavierten Calciumchlorid-Lösung (467,63 mM) wurden nach dem Abkühlen beider Lösungen zugegeben. Die resultierende Lösung wurde mit sterilem Aqua dest. auf ein Volumen von 1 l aufgefüllt.

In Tabelle 2.3 sind die Endkonzentrationen der Salze im 4-fach konzentrierten Seewasser nach Levring zusammengestellt.

Tabelle 2.3: Endkonzentration der Salze im 4-fach konzentrierten Seewasser (Levring, 1946).

Substanz	Konzentration
CaCl ₂	46,76 mmol l ⁻¹
KCl	34,34 mmol l ⁻¹
MgCl ₂	89,13 mmol l ⁻¹
MgSO ₄	96,41 mmol l ⁻¹
NaCl	1,62 mol l ⁻¹

2.3.4. Artifizielles Seewasser nach Grasshoff (1983)

32 g Natriumchlorid und 14 g Magnesiumsulfat wurden in 800 ml Aqua dest gelöst und 20 min bei 121°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde 1 ml Natriumhydrogencarbonat [0,457 mol l⁻¹] zugegeben. Das Volumen wurde mit sterilem Aqua dest auf 1 l aufgefüllt. Der pH-Wert lag zwischen 7,2 und 7,5.

2.4. Medien

Alle Medien wurden bei 121 °C 20 min autoklaviert (1,2 bar). Medien, die aus mehreren separat zu sterilisierenden Komponenten bestanden, wurden nach dem Abkühlen der Komponenten vereint. Glasgeräte wurden 4 h bei 180 °C sterilisiert.

2.4.1. Seewasserbouillon X-2

0,50 g Natriumpyruvat, 2,08 g Natriumacetat, sowie 0,50 g Casaminoacids (vitaminfrei) wurden in 779 ml Aqua dest. gelöst und autoklaviert. Der abgekühlten Lösung wurden 190 ml 4-fach konzentriertes Seewasser nach Levring (Kap. 2.3.3), 3 ml Vitaminlösung (Kap. 2.3.1), 1 ml Spurenelementlösung (Kap. 2.3.2), 8 ml Natriumnitrat [$2,1 \text{ mol l}^{-1}$], 8 ml di-Natriumhydrogenphosphat [$0,1 \text{ mol l}^{-1}$], 3 ml Natriumhydroxid [$0,1 \text{ mol l}^{-1}$], sowie 8 ml Ammoniumchlorid [$2,3 \text{ mol l}^{-1}$] steril zugefügt.

Tabelle 2.4 stellt die Endkonzentrationen der in der Seewasserbouillon X-2 enthaltenen Stoffe zusammen.

Tabelle 2.4: Zusammensetzung der Seewasserbouillon X-2.

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>
Ammoniumchlorid	$18,400 \text{ mmol l}^{-1}$	Natriumacetat	$25,000 \text{ mmol l}^{-1}$
Biotin	$6,150 \text{ nmol l}^{-1}$	Natriumchlorid	$0,304 \text{ mol l}^{-1}$
Borsäure	$1,000 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$	Natriumhydroxid	$0,300 \text{ mmol l}^{-1}$
Calciumchlorid	$6,718 \text{ mmol l}^{-1}$	Natriummolybdat	$99,190 \text{ nmol l}^{-1}$
Casaminoacids	$0,500 \text{ g l}^{-1}$	Natriumnitrat	$16,800 \text{ mmol l}^{-1}$
di-Natriumhydrogenphosphat	$0,800 \text{ mmol l}^{-1}$	Natriumpyruvat	$4,500 \text{ mmol l}^{-1}$
Eisen(II)chlorid	$7,540 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$	Nickelchlorid	$0,100 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$
Kaliumchlorid	$6,521 \text{ mmol l}^{-1}$	Nikotinsäure	$121,830 \text{ nmol l}^{-1}$
Kobaldchlorid	$0,500 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$	p-Aminobenzoësäure	$109,380 \text{ nmol l}^{-1}$
Kupferchlorid	$99,710 \text{ nmol l}^{-1}$	Pantothensäure	$17,100 \text{ nmol l}^{-1}$
Magnesiumchlorid	$16,933 \text{ mmol l}^{-1}$	Pyridoxamin	$222,960 \text{ nmol l}^{-1}$
Magnesiumsulfat	$18,316 \text{ mmol l}^{-1}$	Thiamin	$22,230 \text{ nmol l}^{-1}$
Manganchlorid	$0,510 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$	Zinkchlorid	$0,500 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$

2.4.2. Medium zur Kultivierung methanolverwertender Bakterien

700 ml Aqua dest. wurden autoklaviert. Dem abgekühlten Wasser wurden steril 250 ml 4-fach konz. Seewasser nach Levring (Kap. 2.3.3), 3 ml Vitaminlösung (Kap. 2.3.1), 1 ml Spurenelementlösung (Kap. 2.3.2), 2,75 ml Ammoniumchlorid

[2,3 mol^l⁻¹], 2,75 ml di-Natriumhydrogenphosphat [0,1 mol^l⁻¹] und 2,96 ml Natriumhydrogencarbonat [0,46 mol^l⁻¹] steril zugefügt. Der pH-Wert des Mediums wurde mit steriler HCl [1 mol^l⁻¹], bzw. NaOH [1 mol^l⁻¹] auf 7,2 – 7,4 eingestellt. Jeweils 10 ml des Mediums wurden in sterile Reagenzgläser gefüllt, nach dem Animpfen mit je 0,1 ml Methanol versetzt.

2.4.3. Medium zur Kultivierung denitrifizierender Bakterien

4,5 g Pepton, 2,7 g Fleischextrakt und 0,72 g Natriumnitrit wurden in 675 ml Aqua dest. gelöst und autoklaviert. Der abgekühlten Lösung wurden 225 ml Seewasser nach Levring (4-fach konzentriert - Kap. 2.3.3), sowie 2,1 ml Natriumhydrogencarbonat [0,46 mol^l⁻¹] steril zugefügt. Der pH-Wert des Mediums wurde mit steriler HCl- [1 mol^l⁻¹], bzw. NaOH-Lösung [1 mol^l⁻¹] auf 7,3 – 7,4 eingestellt. Das Medium wurde steril in 10 ml Glasschraubdeckelröhrchen mit Durham-Röhrchen (luftblasenfrei) abgefüllt.

2.4.4. Medium zur Kultivierung sulfatreduzierender Bakterien

0,8 g Hefeextrakt, 0,4 g Ammoniumchlorid, 0,146 g Eisensulfat (Heptahydrat), 0,4 g Natriumsulfat, 0,8 g di-Kaliumhydrogenphosphat und 6,4 ml einer Natriumlactatlösung [50 %_{w/v}] wurden in 600 ml Aqua dest. gelöst und autoklaviert. Der abgekühlten Lösung wurden 200 ml Seewasser nach Levring (4-fach konzentriert - Kap. 2.3.3) und 2 ml NaHCO₃ [0,46 mol^l⁻¹] steril zugefügt. Der pH-Wert des Mediums wurde mit steriler HCl- [1 mol^l⁻¹], bzw. NaOH-Lösung [1 mol^l⁻¹] auf 7,5 eingestellt. Das Medium wurde steril in 10 ml Glasschraubdeckelröhrchen mit Durham-Röhrchen (luftblasenfrei) abgefüllt.

2.4.5. Sonifiziermedium

0,4 g di-Natriumhydrogenphosphat (Dihydrat) und 1 g Tween 80 wurden in 0,75 l Aqua dest gelöst und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden 250 ml Seewasser nach Levring (4-fach konz. - Kap. 2.3.3) zugegeben.

2.5. Bakterienstämme

In Tabelle 2.5 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Referenzstämme für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) zusammengestellt.

Tabelle 2.5: Referenzstämme der mittels FISH untersuchten Phyla der Gemeinschaft.

<i>Phyla</i>	<i>Bezeichnung</i>	<i>DSMZ-Nr.</i>
Eubacteria	<i>Alcanivorax jadensis</i> T9	12178 ^T
Cytophaga / Flavobacteria	<i>Muricauda ruestringensis</i> B1	13258 ^T
Gram-positive (HGC)	<i>Dietzia maris</i>	43672 ^T
α -Proteobacteria	marines Isolat 12.15.70	--
γ -Proteobacteria	<i>Alcanivorax jadensis</i> T9	12178 ^T

2.6. Größenstandard für die Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Größe der PCR-Produkte wurde die Fermentas GeneRuler™ 1kb DNA Ladder genutzt: Das Produkt enthielt DNA-Fragmente der Größen 0,25 kb, 0,50 kb, 0,75 kb, 1,00 kb, 1,50 kb, 2,00 kb, 2,50 kb, 3,00 kb, 3,50 kb, 4,00 kb, 5,00 kb, 6,00 kb, 8,00 kb und 10,00 kb.

2.7. Software, Internetanwendungen, Datenbanken

In Tabelle 2.6 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Datenbanken und Internetanwendungen, sowie die verwendete Software zusammengestellt.

Tabelle 2.6: Software, Internetanwendungen und Datenbanken.

<i>Programm</i>	<i>Anwendung</i>	<i>Hersteller / Website</i>
Photoshop 7.0	Bildbearbeitung	Adobe®
Corel-Draw 9.0	Graphik	Corel Corporation
Isis-Draw 2.4	Strukturformeln	MDL Information Systems, Inc.
WinStat 2001.1	Statistik	Robert K. Fitch
Excel 10	Tabellenkalkulation	Microsoft Corporation
SigmaPlot 9.0	Graphen	Systat Software, Inc.
StarOffice 8	Textverarbeitung	Sun Microsystems, Inc.
Canoco 4.5	Multivarianzanalyse	Biometris - Plant Research International
MPN Calculator 4.04	MPN Berechnung	Albert J. Klee, EPA
ChemIDplus	Chemikalien Recherche	http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/
ExPASy	Metabolismus Recherche	http://www.expasy.ch/
MetaCyc	Metabolismus Recherche	http://biocyc.org/
Brenda	Enzym Recherche	http://www.brenda.uni-koeln.de/
NCBI Entrez	molekularbiol. Recherche	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/
probeBase	Oligonucleotid-Recherche	http://www.microbial-ecology.net/probebase/
CD-Römpp 9. Aufl.	Chemie-Lexikon	Thieme Verlag
GoogleEarth 3.07	Luftbilder (Abb. 3.1)	http://earth.google.com/

2.8. Nucleotide

In Tabelle 2.7 sind die für Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (Kap. 3.5.3), bzw. Polymerase-Kettenreaktion (Kap. 3.5.2.2) verwendeten Nucleotide zusammengestellt.

Tabelle 2.7: Aufstellung der in vorliegender Arbeit verwendeten Nucleotide: Bezeichnung, Sequenz, Anwendung, Schmelztemperatur, Target, rRNA-Position nach *E. coli* rRNA-Nucleotidnummerierung, Referenz und Zielorganismus.

Bezeichnung	Sequenz	Anwendung	Target	rRNA-Position	Referenz	Zielorganismus
Eub 338	5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'	FISH	16S-rRNA	338 - 355	Amann <i>et al.</i> , 1990	<i>Eubacteria</i>
Arch 915	5'-GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT-3'	FISH	16S-rRNA	915 - 934	Stahl <i>et al.</i> , 1991	<i>Archaea</i>
CF319a	5'-TGG TCC GTG TCT CAG TAC-3'	FISH	16S-rRNA	319 - 336	Manz <i>et al.</i> , 1992	<i>Flavobacteria, Bacteroidetes, Sphingobacteria</i>
HGC69a	5'-TAT AGT TAC CAC CGC CGT-3'	FISH	23S-rRNA	1901 - 1918	Roller <i>et al.</i> , 1994	<i>Actinobacteria</i> (Gram-positive, GC-reich)
ALF 1bC	5'-CGT TCG CTC TGA GCC AG-3'	FISH	16S-rRNA	19 - 35	Manz <i>et al.</i> , 1992	<i>α-Proteobacteria</i> , einige <i>δ-Proteobacteria</i> , einige Spirochaeten
ALF 1bT	5'-CGT TCG TTC TGA GCC AG-3'	FISH	16S-rRNA	19 - 35	Manz <i>et al.</i> , 1992	
Bet42a	5'-GCC TTC CCA CTT CGT TT-3'	FISH	23S-rRNA	1027 – 1043	Manz <i>et al.</i> , 1992	<i>β-Proteobacteria</i>
Bet42a-C	5'-GCC TTC CCA CAT CGT TT-3'	FISH	23S-rRNA	1027 – 1043	Manz <i>et al.</i> , 1992	<i>γ-Proteobacteria</i>
Gam42a	5'-GCC TTC CCA CAT CGT TT-3'	FISH	23S-rRNA	1027 – 1043	Manz <i>et al.</i> , 1992	<i>γ-Proteobacteria</i>
Gam42a-C	5'-GCC TTC CCA CTT CGT TT-3'	FISH	23S-rRNA	1027 – 1043	Manz <i>et al.</i> , 1992	<i>β-Proteobacteria</i>
SRB385	5'-CGG CGT CGC TGC GTC AGG-3'	FISH	16S-rRNA	385 - 402	Amann <i>et al.</i> , 1990	<i>δ-Proteobacteria</i> , Gram-positive Bakterien
907 r	5'- CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT -3'	PCR	16S-rRNA	907	Muyzer <i>et al.</i> , 1995	<i>Eubacteria</i>
341 f	5'- CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'	PCR	16S-rRNA	341	Muyzer <i>et al.</i> , 1995	<i>Eubacteria</i>

3. Methoden

3.1. Gewinnung des Inokulums

Im April 2004 wurde Sediment der oxischen Schicht (Entnahmetiefe: max. 2 cm) des Wattsediments bei Dangast entnommen (Abb. 3.1), durch intensives Rühren homogenisiert, in Aliquots geteilt und bis zur Verwendung als Inokulum der Begiftungsversuche bei -20°C gelagert.



Abbildung 3.1.: Ort der Entnahme des Wattsediments:
 $53,4475^{\circ}\text{N} / 8,1139^{\circ}\text{O}$ (Luftbild: GoogleEarth)

3.2. Kultivierung der bakteriellen Gemeinschaft

Die Versuche zur Begiftung der bakteriellen Gemeinschaft wurden als Batchkulturen in Fermentern mit einem maximalen Arbeitsvolumen von 2 l durchgeführt: 2 l Seewasserbouillon X-2 (Kap. 2.4.1) wurden mit 0,5 %_{vol.} des bei -20°C gelagerten Inokulums angeimpft und 240 h bei 20°C inkubiert. Der pH-Wert wurde on-line gemessen und durch automatische Zudosierung steriler HCl (1 mol l^{-1}), bzw. NaOH (1 mol l^{-1}) bei konstant $7,2 \pm 0,2$ gehalten. Die Drehfrequenz des Rührers (Kombination aus drei Scheibenblattrührern) betrug 500 min^{-1} . Die Kultur wurden mit $v_{vm} = 0,05\text{ min}^{-1}$ Luft begast. Sowohl Zu-, als auch Abluft wurden durch Sterilfilter ($0,2\text{ }\mu\text{m}$) geleitet. Die Abluft wurde gekühlt, um die Bildung von Kondensationsfeuchte im Abluftsterilfilter zu vermeiden und um den Flüssigkeitsverlust in der Kultur durch die Begasung zu minimieren. O_2 - und CO_2 -Konzentration von Zu- und Abluft wurden während der gesamten Kultivierungszeit on-line ermittelt und zur Bestimmung der metabolischen Aktivität (Kap. 3.5.1) der Gemeinschaft verwendet.

3.3. Konzeption der Begiftungsversuche

Die Kulturen wurden in **Begiftungsversuchen** mit Cadmium und Natriumdodecylsulfat (SDS), sowie der Kombination aus Cadmium und SDS begiftet.

Cadmium wurde als Diacetat in Konzentrationen von $0,005 \text{ mmol l}^{-1}$, $0,050 \text{ mmol l}^{-1}$, $0,500 \text{ mmol l}^{-1}$ und $5,000 \text{ mmol l}^{-1}$ eingesetzt (Kap. 3.4.1). Die SDS-Konzentration betrug $43,34 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ (Kap. 3.4.2). Die Versuche mit Cd^{2+} -Konzentrationen zwischen 0 und $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ wurden sowohl ohne, als auch mit $43,34 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ SDS jeweils *in duplo* durchgeführt. Zusätzlich wurde eine SDS-freie Fermentation mit $5,0 \text{ mmol l}^{-1}$ Cd^{2+} durchgeführt. Die Wirkung von SDS wurde in Cadmium-freien Kulturen, die $43,34 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ SDS enthielten, ermittelt.

Alle Kulturen wurden täglich beprobt. Die Proben wurden aufgeteilt, um

- die Struktur der bakteriellen Gemeinschaft über die DNA-Präsenz zu ermitteln (Kap. 3.5.2).
- die Gesamtzellzahl, sowie die phylogenetische Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft mittels DAPI-Färbung und Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung zu bestimmen (Kap. 3.5.3).
- die Lebendzellzahl und die physiologische Diversität der bakteriellen Gemeinschaft mittels MPN (most probable number) zu bestimmen (Kap. 3.5.4).
- die metabolische Diversität mithilfe des Ecolog[®]-Tests zu ermitteln (Kap. 3.5.5).
- die Gesamtaktivität der Dehydrogenasen der Gemeinschaft zu bestimmen (Kap. 3.5.6).

Die metabolische Aktivität der Gemeinschaft wurde mittels Abgasanalyse aus den on-line ermittelten O_2 - und CO_2 -Konzentrationen des Abgases bestimmt (Kap. 3.5.1).

Abbildung 3.2 stellt die Struktur der Begiftungsversuche schematisch dar.

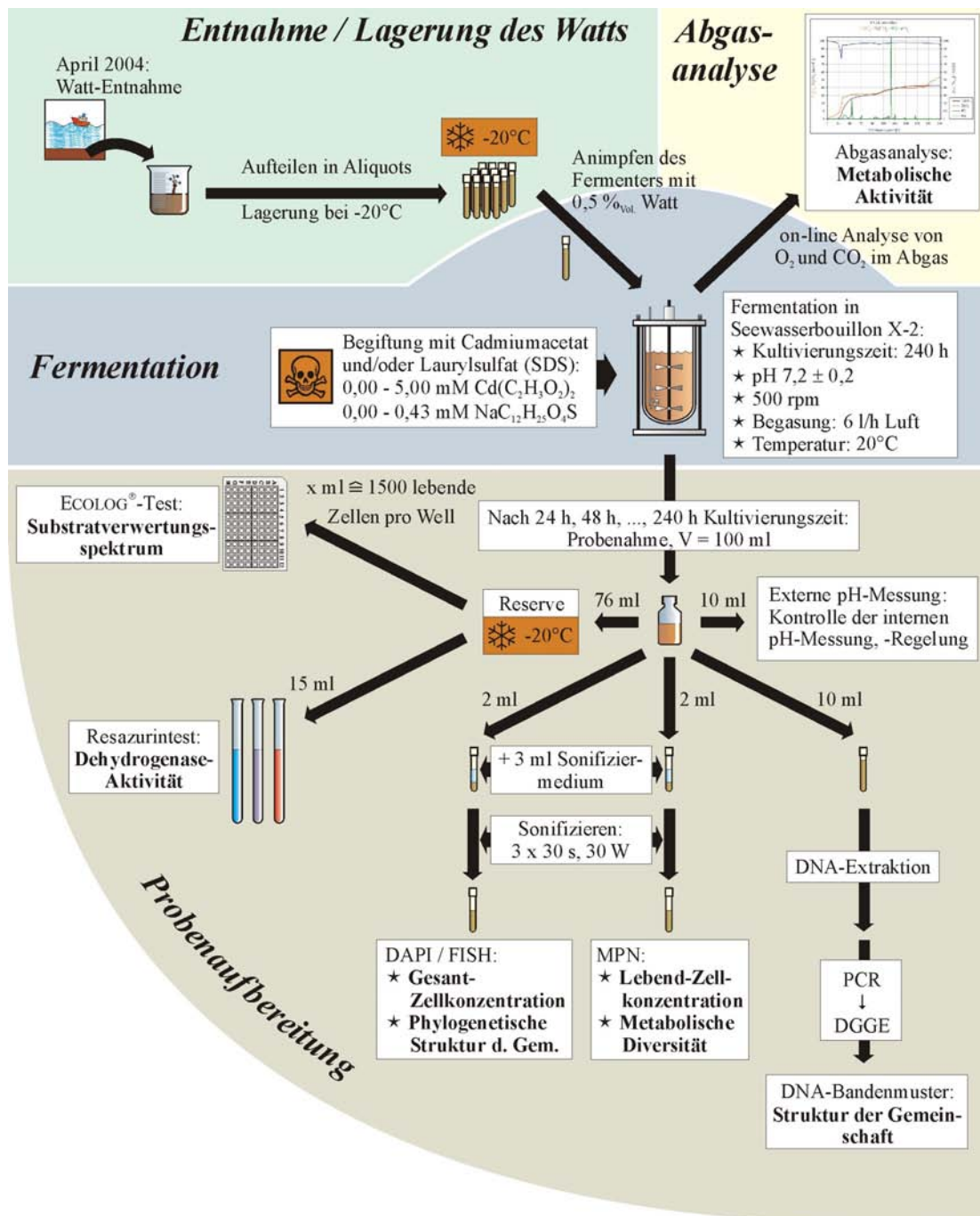


Abbildung 3.2.: Schematische Übersicht der Struktur der Begiftungsversuche.

3.4. Einsatz der Noxen

3.4.1. Cadmiumacetat

Cadmium wurde in allen Versuchsansätzen als Cadmiumdiacetat eingesetzt. Jeweils frisch angesetzte Cadmiumacetatlösungen [2,5 - 0,25 mol l⁻¹] wurden separat autoklaviert (20 min, 121°C). Die Lösungen wurden dem Kulturmedium unmittelbar vor Versuchsbeginn zudosiert. Die zudosierten Volumina wurden jeweils auf

die Cadmiumkonzentration des Versuchs abgestimmt. Die Cadmiumkonzentration in den Ansätzen betrug 0,005; 0,05; 0,5 und 5,0 mmol l⁻¹.

Um die Acetat-Konzentration (25,355 mmol l⁻¹) der Begiftungsversuche durch Zugabe des Cadmiumacetats nicht zu erhöhen, wurde die Menge des einzuwiegenden Natriumacetats wie folgt berechnet:

$$m_{\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2} = 2,08 \text{ g} - \left[\frac{(25,355 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} - 2 \cdot c_{\text{Cd}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2})}{1000} \cdot M_{\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2} \right] \quad [\text{g} \cdot \text{l}^{-1}]$$

Die Cd²⁺-Konzentration wurde in Stichproben zu Versuchsbeginn und -ende atomabsorptionsspektrometrisch bestimmt (AG Bodenkunde, Universität Oldenburg). Dafür wurde durch Zentrifugation (15 min, 10.000 g) das Sediment aus den Proben entfernt. Das Cd²⁺ im Überstand wurde durch Ansäuern auf pH 4,5 (1 M HCl) in Lösung gehalten. Die Proben wurden bis zur Cd²⁺-Bestimmung bei -20°C gelagert.

3.4.2. Natriumdodecylsulfat

Das membrantoxische Potential, sowie die Umweltrelevanz aufgrund der vielfältigen Anwendung (vgl. Kap. 1.3.2) waren Gründe, Natriumdodecylsulfat (SDS) als lipo-, bzw. amphiphile Noxe einzusetzen. SDS wurde im Kulturgefäß zusammen mit Pyruvat, Natriumacetat und Casaminoacids in Aqua dest. gelöst und autoklaviert (Kap. 2.4.1). Die SDS-Konzentration war wegen der Schaumentwicklung auf maximal 0,00125 % (43,34 µmol l⁻¹) begrenzt (Kap. 4.1.2).

3.5. Analysen im Detail

3.5.1. Abgasanalyse

Aus den O₂- und CO₂-Konzentrationen der Zuluft und des Abgases, dem Kulturvolumen im Fermenter, sowie dem Volumenstrom der Zuluft wurden die volumenbezogenen O₂-Aufnahme- und CO₂-Bildungsraten Q_{O_2} und Q_{CO_2} , sowie der Respirationsquotient RQ berechnet. Ferner wurden Q_{O_2} und Q_{CO_2} über die Kultivierungszeit zu $\sum Q_{\text{O}_2}$ und $\sum Q_{\text{CO}_2}$ aufsummiert.

Nachfolgend wird die Berechnung der o.g. Größen erläutert. Dabei gilt in den Gleichungen:

\dot{V}'_G :	Volumenstrom der Zuluft im Normzustand	$[\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}]$
V_R :	Kulturvolumen im Reaktor	$[1]$
V_m :	molares Gasvolumen	$[22,4140 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}]$
M_{O_2} :	molare Masse von O_2	$[31,9988 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}]$
M_{CO_2} :	molare Masse von CO_2	$[44,0095 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}]$
X'_{Gas} :	Molanteil des Gases im einströmenden Gasgemisch	$[\text{mol}_{\text{Gas}} \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{Gemisch}}]$
X''_{Gas} :	Molanteil des Gases im ausströmenden Gasgemisch	$[\text{mol}_{\text{Gas}} \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{Gemisch}}]$
Q_{O_2} :	volumenbezogene O_2 -Aufnahmerate	$[\text{mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$
Q_{CO_2} :	volumenbezogene CO_2 -Bildungsrate	$[\text{mg}_{\text{CO}_2} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$
$\sum Q_{(\text{C})\text{O}_2}$:	aufsummierte $Q_{(\text{C})\text{O}_2}$	$[\text{mg}_{(\text{C})\text{O}_2} \cdot \text{l}^{-1}]$

- Die **volumenbezogene Sauerstoffaufnahme** Q_{O_2} wurde wie folgt berechnet:

$$Q_{\text{O}_2} = \frac{M_{\text{O}_2}}{V_m} \cdot \frac{\dot{V}'_G}{V_R} \cdot [X'_{\text{O}_2} - X''_{\text{O}_2}]$$

- Die **volumenbezogene CO_2 -Bildungsrate** Q_{CO_2} wurde wie folgt berechnet:

$$Q_{\text{CO}_2} = \frac{M_{\text{CO}_2}}{V_m} \cdot \frac{\dot{V}'_G}{V_R} \cdot [X''_{\text{CO}_2} - X'_{\text{CO}_2}]$$

- Die **aufsummierten** $\sum Q_{\text{O}_2}$ und $\sum Q_{\text{CO}_2}$ zum Zeitpunkt t_n wurden wie folgt aus den Meßwerten der Abgasanalyse berechnet:

$$\sum Q_{\text{O}_2} = \left[Q_{\text{O}_2(t_0)} + \sum_{k=1}^k (Q_{\text{O}_2(t_k)} \cdot (t_n - t_{n-1}))_k \right]$$

$$\sum Q_{\text{CO}_2} = \left[Q_{\text{CO}_2(t_0)} + \sum_{k=1}^k (Q_{\text{CO}_2(t_k)} \cdot (t_n - t_{n-1}))_k \right]$$

- Der **Respirationsquotient RQ** wurde aus Q_{O_2} und Q_{CO_2} wie folgt berechnet:

$$\text{RQ} = \frac{Q_{\text{CO}_2}}{Q_{\text{O}_2}} \cdot \frac{M_{\text{O}_2}}{M_{\text{CO}_2}}$$

- Die **Mineralisierungsrate** R_M wurde aus der volumenbezogenen CO_2 -Bildungsrate $\sum Q_{\text{CO}_2}$ sowie aus der bei vollständiger Mineralisation des Substrats zu erwartenden CO_2 -Bildungsrate $\sum Q_{\text{CO}_2, \text{total}}$ errechnet:

$$R_M = \frac{\sum Q_{\text{CO}_2} \cdot 100}{\sum Q_{\text{CO}_2, \text{total}}}$$

Die zu erwartende CO_2 -Bildungsrate $\sum Q_{\text{CO}_2, \text{total}}$ wurde aus der Zusammensetzung des Mediums errechnet:

Ein Liter Seewasserbouillon X-2 enthielt 0,5 g Na-Pyruvat ($4,54 \text{ mmol l}^{-1}$), 2,08 g Na-Acetat ($25,36 \text{ mmol l}^{-1}$), sowie 0,5 g Casaminoacids (Kap. 2.4.1). Casaminoacids werden durch saure Hydrolyse aus Casein hergestellt. Casein besteht aus α - (70 %), β - (27 %) und γ -Casein (3 %), mit jeweils unterschiedlichen Anteilen der 20 kanonischen Aminosäuren (Römpp, 1995). Tabelle 3.1 stellt die daraus resultierenden relativen Anteile der Aminosäuren am Casein zusammen.

Tabelle 3.1.: Anteile der Aminosäuren am Casein. Die mit einem * gekennzeichneten Aminosäuren wurden von Römpp nicht explizit erwähnt, sondern kumulativ als „Rest“ bezeichnet. Näherungsweise wurden daher die relativen Anteile dieser Aminosäuren zu gleichen Teilen aus dem „Rest“ errechnet.

Aminosäure	Casein [%]	Aminosäure	Casein [%]	Aminosäure	Casein [%]
Ala	3,118	Val	7,479	His*	4,476
Asp	7,323	Lys*	4,476	Ile*	4,476
Cys	0,328	Arg*	4,476	Met*	4,476
Leu	9,022	Asn*	4,476	Phe*	4,476
Pro	10,57	Glu*	4,476	Ser*	4,476
Trp	1,800	Gln*	4,476	Thr*	4,476
Tyr	6,645	Gly*	4,476		

Demnach enthielt die Seewasserbouillon X-2 die 20 kanonischen Aminosäuren, sowie Acetat und Pyruvat in den in Tabelle 3.2 zusammengestellten Konzentrationen.

Unter Berücksichtigung der Summenformeln der Substrate waren demnach in der Seewasserbouillon X-2 $83,91 \text{ mmol l}^{-1}$ C, $152,62 \text{ mmol l}^{-1}$ H, $5,10 \text{ mmol l}^{-1}$ N, $73,89 \text{ mmol l}^{-1}$ O und $0,16 \text{ mmol l}^{-1}$ S enthalten. Die bakterielle Gemeinschaft hätte demnach bei vollständiger Mineralisierung der gebotenen

C-Quellen 85,1 mmol⁻¹ O₂ verbraucht und 83,9 mmol⁻¹ CO₂ produziert. Die Mineralisationsrate R_M wurde daher wie folgt berechnet:

$$R_M = \frac{\sum Q_{CO_2} \cdot 100}{83,9 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot 44,01 \text{ mg} \cdot \text{mmol}^{-1}} \quad [\%]$$

Tabelle 3.2.: Konzentrationen der Substrate in der Seewasserbouillon X-2.

Substanz	Konzentration	Substanz	Konzentration	Substanz	Konzentration
Pyruvat	4,544 mmol ⁻¹	Trp	0,044 mmol ⁻¹	Tyr	0,183 mmol ⁻¹
Acetat	25,357 mmol ⁻¹	Pro	0,459 mmol ⁻¹	Phe	0,136 mmol ⁻¹
Ala	0,175 mmol ⁻¹	His	0,144 mmol ⁻¹	Leu	0,344 mmol ⁻¹
Cys	0,014 mmol ⁻¹	Glu	0,152 mmol ⁻¹	Arg	0,129 mmol ⁻¹
Ser	0,213 mmol ⁻¹	Gln	0,153 mmol ⁻¹	Met	0,150 mmol ⁻¹
Gly	0,298 mmol ⁻¹	Asp	0,275 mmol ⁻¹	Val	0,319 mmol ⁻¹
Thr	0,188 mmol ⁻¹	Asn	0,186 mmol ⁻¹		
Lys	0,153 mmol ⁻¹	Iso	0,171 mmol ⁻¹		

3.5.2. Untersuchung der DNA-Präsenz innerhalb der Gemeinschaft

3.5.2.1. DNA-Extraktion

- Die **Chromosomale DNA der bakteriellen Gemeinschaft** wurde mit einem DNA-Extraktions-Kit (NucleoSpin® Food, Macherey-Nagel) extrahiert. Die Methode des Herstellers wurde wie folgt modifiziert:
Anstelle von 0,2 g eines Nahrungsmittels wurden 0,2 g des durch Zentrifugation (10 min, 12000 g) aus der Probe gewonnenen Niederschlags für die DNA-Extraktion verwendet, und die DNA wurde mit 4°C kaltem Ethanol (99,9 %) gefällt. Die komplette Methode ist den Angaben des Herstellers zu entnehmen.
- Für die Extraktion **chromosomaler DNA aus Reinkulturen** - zur Gewinnung der DGGE-Standards - wurde das High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche - Kat.Nr.: 1 796 828) verwendet. Die Durchführung ist den Angaben des Herstellers für die Extraktion von DNA aus Bakterien und Hefen zu entnehmen.

3.5.2.2. Polymerase-chain-reaction (PCR)

Eine Teilsequenz der 16S-rRNA-Gene der bakteriellen Gemeinschaft wurde per PCR amplifiziert. Dafür wurden die Primer 341f und 907r verwendet (Tab. 2.7). In Tabelle 3.3 ist die Zusammensetzung der PCR-Ansätze zusammengestellt, Tabelle 3.4 gibt das Temperaturprogramm des Thermocyclers wieder.

Tabelle 3.3.: Zusammensetzung der PCR-Ansätze.

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration im Ansatz</i>
Polymerase (Moltag)	0,05 U μ l ⁻¹
Puffer	1x
MgCl₂	1 mmol l ⁻¹
dNTPs	je 0,2 mmol l ⁻¹
Oligonucleotid-Primer	je 0,2 μ mol l ⁻¹
Template	1 μ l
BSA	200 mg l ⁻¹
Enhancer	1 μ l
ddH₂O	ad. 50 μ l

Tabelle 3.4.: Struktur des PCR-Programms zur Amplifizierung der 16S-rDNA aus der DNA der bakteriellen Gemeinschaft.

<i>Programmschritt</i>	<i>Anzahl der Wiederholungen</i>	<i>Temperatur [°C]</i>	<i>Zeit [s]</i>
Initiale Denaturierung	1 x	95°C	240 s
Denaturierung	10 x	94°C	30 s
Annealing		62°C	45 s
Extension		72°C	60 s
Denaturierung	25 x	94°C	30 s
Annealing		55°C	60 s
Extension		72°C	60 s
Finale Extension	1 x	72°C	600 s
Programmende	1 x	4°C	

3.5.2.3. Elektrophorese von DNA-Fragmenten im Agarosegel

Die Verwendung der Primer 907r und 341f-GC sollte bei erfolgreicher PCR der 16S-rDNA-Gene 0,55 kb lange DNA-Fragmente amplifizieren. Zur Überprüfung der PCR wurde die Länge des PCR-Produktes gelelektrophoretisch bestimmt:

50 μ l des PCR-Produkts wurden mit 10 μ l Loading-Dye (Fermentas: 10 mM

Tris-HCl (pH 7,6), 0,03 % Bromphenol Blau, 0,03 % Xylen-Cyanol FF, 60 % Glycerin, 60 mM EDTA) versetzt und im Agarosegel (1 % Agarose in 1 x TAE-Puffer) in 1 x TAE-Puffer bei 90 V aufgetrennt. Zur Ermittlung der Größe des PCR-Produkts wurde zudem ein Vergleichsstandard (GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, Fermentas) im Agarosegel aufgetrennt.

Die aufgetrennte DNA im Gel wurde 30 min mit Ethidiumbromid [10 g l^{-1}] gefärbt. Das Gel wurde danach mit ddH₂O gewaschen und auf einem UV-Transilluminator betrachtet. Mit Hilfe des Größenstandards konnte die Größe des PCR-Produkts überprüft werden.

3.5.2.4. Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE)

Ein Teil der 16S rRNA-Gene der bakteriellen Gemeinschaft wurde mittels PCR amplifiziert (Kap. 3.5.2.2) und per DGGE nach dem GC-Gehalt der Amplifikate aufgetrennt:

Das Gel der DGGE bestand aus dem Sammelgel (10 ml, 6 % Polyacrylamid), welches über das Trenngel (48 ml, 6 % Polyacrylamid, Gradient: 40 - 70 % Formamid) geschichtet wurde. Die PCR-Amplifikate wurden eine halbe Stunde bei 50 V ins Sammelgel eingebracht und anschließend 18 Stunden bei 130 V im Trenngel aufgetrennt. Die Gel- und Puffertemperatur betrug bei beiden Schritten 60°C. Nach Auftrennung der PCR-Amplifikate wurde das Gel 60 min in Sybr®-Gold gefärbt. Die Entfärbung erfolgte im Anschluß daran für 20 min in Aqua dest.

Das Sybr®-Gold im Gel wurde auf einem UV-Transilluminator ($\lambda_{\text{max}} = 365 \text{ nm}$) angeregt, das resultierende Bild wurde mit einer Digitalkamera (Camedia C-4000 Zoom, Olympus) photographiert.

Amplifikate von Teilsequenzen der 16S rRNA-Gene *Alcanivorax jadensis* T9^T und *Muricauda ruestringensis* B1^T wurden ebenfalls in den DGGE-Gelen aufgetrennt. Anhand ihrer Laufstrecken wurden die relativen Laufstrecken R_x der Banden in den Proben ermittelt:

$$R_x = \frac{\text{Laufstrecke der Bande [cm]}}{\text{Laufstrecke des Standards [cm]}}$$

Allen im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgetretenen R_x -Werten wurden die R_x -Werte der einzelnen Proben in einer binären Matrix zugeordnet. Die Matrix wurde mittels Clusteranalyse untersucht (Kap. 3.8).

3.5.3. Untersuchung der phylogenetischen Zusammensetzung mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) - Bestimmung der Gesamtzellkonzentration (DAPI)

Die Bakterien der Gemeinschaften wurden wie von Bruns und Berthe-Corti (1998) beschrieben, behandelt:

Mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid) wurde die DNA der Zellen gefärbt, mit einer CY3-markierten rRNA-gerichteten Oligonucleotidsonde wurden spezifische phylogenetischen Gruppen hybridisiert. Eingesetzt wurden Hybridisierungssonden für *Eubacteria*, *Archaea*, *Cytophaga/Flavobacteria*, Gram-positive (hoher GC-Gehalt), α -*Proteobacteria*, β -*Proteobacteria*, γ -*Proteobacteria* und δ -*Proteobacteria* (Tab. 3.5). Die Formamid-, SDS-, Tris/HCl- und Natriumchlorid-Konzentrationen der verwendeten Hybridisierungs- und Waschpuffer, sowie die Hybridisierungstemperatur und -zeit entsprachen denen von Bruns und Berthe-Corti (1998).

Die hybridisierten und DAPI-markierten Zellen wurden im Epifluoreszenzmikroskop bei den Anregungswellenlängen $\lambda = 365$ nm (DAPI) und $\lambda = 546$ nm (CY3) bei 1000-facher Vergrößerung mithilfe eines Zähllokulars gezählt. Aus den Ergebnissen der Zählung wurde die Gesamt-Zellkonzentration (DAPI), sowie die Konzentration der untersuchten Phyla (CY3-markierte Oligonucleotidsonden) in der Probe errechnet. Die Berechnung der Zellzahlen beruhte auf zwei Näherungen:

1. Auf dem Objektträger aufgebrauchte Tropfen aus der Probe bildeten einen Flüssigkeitszylinder der Höhe h_{Tropfen} und der Fläche A_{Feld} der Felder auf dem Objektträger ($r = 3$ mm $\Rightarrow A_{\text{Feld}} = \pi \cdot 9$ mm²):

$$h_{\text{Tropfen}} = \frac{V_{\text{Tropfen}}}{\pi \cdot r^2}$$

2. Die Bakterien waren nach dem Sonifizieren gleichmäßig in der Probe verteilt. Das Zählfeld überdeckte bei 1000-facher Vergrößerung eine Fläche von 0,01 mm². Vor dem Austrocknen des Tropfens war daher die Zellzahl unter dem Zählfeld in einem Flüssigkeitsvolumen der Höhe h_{Tropfen} und der Grundfläche 0,01 mm² enthalten. Unter Berücksichtigung der Verdünnung von 2 ml Probe mit 3 ml Sonifiziermedium wurde die Zellzahl N [ml⁻¹] aus dem Zählwert x wie folgt berechnet:

$$V_{\text{Tropfen}} = 3 \mu\text{l} \Rightarrow N = 2356196,6 \cdot x$$

$$V_{\text{Tropfen}} = 5 \mu\text{l} \Rightarrow N = 1413716,7 \cdot x$$

Tabelle 3.5.: Oligonukleotidsonden der Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung.

<i>Phylogenetische Gruppe</i>	<i>Sonde</i>	<i>Formamid [%]</i>	<i>Competitor</i>
<i>Eubacteria</i> (Eub)	Eub 338	35	--
<i>Archaea</i> (Arch)	Arch 915	20	--
<i>Cytophaga/Flavobacteria</i> (CFB)	CF319a	35	--
Gram-positive, GC-reich (GPHGC)	HGC69a	35	--
<i>α-Proteobacteria</i> (Alf)	ALF 1bC	20	--
	ALF 1bT		
<i>β-Proteobacteria</i> (Bet)	Bet42a	35	Gam42a-C
<i>γ-Proteobacteria</i> (Gam)	Gam42a	35	Bet42a-C
<i>δ-Proteobacteria</i> (Beta)	SRB385	35	--

3.5.4. Bestimmung der Lebendzellzahl und der physiologischen Diversität der Gemeinschaft mittels MPN

Mithilfe der Methode der most probable number (MPN) wurde über ein statistisches Verfahren die wahrscheinlichste Lebendzellzahl ermittelt:

2 ml der Proben wurden mit 3 ml Sonifiziermedium (Kap. 2.4.5) verdünnt und 3 · 30 s mit jeweils 30 s Pause im Eisbad sonifiziert (30 W). Aus den sonifizierten Proben wurden dezimale Verdünnungsreihen mit Seewasser (Levring, 1-fach - Kap. 2.3.3) erstellt. Aus jeder Verdünnungsstufe der Reihe wurden jeweils fünf Reagenzgläser eines geeigneten Mediums mit 0,1 ml der verdünnten Probe angeimpft. Nach Ablauf der Kultivierungszeit wurden aus der Anzahl der bewachsenen Reagenzgläser pro Verdünnungsstufe mithilfe des MPN-Calculators von Klee (1993) die wahrscheinlichste Lebendzellkonzentration sowie das zugehörige 95 %-ige Konfidenzintervall (Loyer und Hamilton, 1984) errechnet.

Durch den Einsatz selektiver Medien und Kulturbedingungen konnte zudem die physiologische Diversität der Gemeinschaft untersucht werden. In Tabelle 3.6 sind die untersuchten physiologischen Gruppen, die verwendeten Medien, sowie die Kultivierungsbedingungen zusammengestellt. Anoxische Kulturbedingungen wurden durch Inkubation der Proben in gasdichten, N₂-gefüllten Behältern gewährleistet.

Tabelle 3.6.: Medien, Kultivierungszeiten (*t*) in Tagen [d] und Kulturbedingungen zur Ermittlung der wahrscheinlichsten Lebendzellzahl unterschiedlicher physiologischer Gruppen.

Physiologische Gruppe	Medium	T [°C]	t [d]	Bedingungen
Acetat-Pyruvat-konsumierende Bakterien (APB)	2.4.1	18	10	oxisch, dunkel
Methanol-verwertende Bakterien (MetB)	2.4.2	18	21	oxisch, dunkel
Denitrifizierende Bakterien (DNB)	2.4.3	18	21	anoxisch, dunkel
Sulfat-reduzierende Bakterien (SRB)	2.4.4	18	21	anoxisch, dunkel

3.5.5. Bestimmung der metabolischen Diversität mittels EcoPlate™

Mittels EcoPlate™ Test (Oxoid) wurden Substratverwertungsspektren der bakteriellen Gemeinschaft nach 48, 72 und 192 h Kultivierungszeit ermittelt. Der Test enthielt 31 Substrate, die häufig von bakteriellen Gemeinschaften des Bodens genutzt werden. In Tabelle 3.7 sind die Substrate des Tests nach Stoffklassen sortiert zusammengestellt.

Durchführung: 2 ml der Probe wurden mit 3 ml einer 0,2 %igen Natriumpolyphosphat-Lösung gemischt und 30 min bei 20°C aktiviert (Berthe-Corti und Bruns, 1999). Anschließend wurde die Probe mit Seewasser nach Grasshoff (Kap. 2.3.4) bis auf eine Lebendzellzahl (Lebendzellzahl der APB - Kap. 3.5.4) von 10^4 ml^{-1} verdünnt. Jedes Well der Testplatte wurden mit 150 µl der aktivierten und verdünnten Probe befüllt. Die Platten wurden 8 Tage bei 20°C dunkel inkubiert.

Waren die Zellen in der Lage ein Substrat zu verwerten, so reduzierten sie das farblose Triphenyltetrazoliumchlorid zum roten 1,3,5-Triphenylformazan (Abb. 3.3) (Borchner und Savageau, 1977). Am Ende der Inkubationszeit wurde für jedes Substrat der relative Anteil [%] der Wells mit Farbreaktion ermittelt. Die Daten wurden in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit, bzw. der Konzentrationen der Noxen aufgetragen. Die Substratverwertungsspektren wurden mittels Clusteranalyse untersucht (Kovach Computing Service: MVSP).

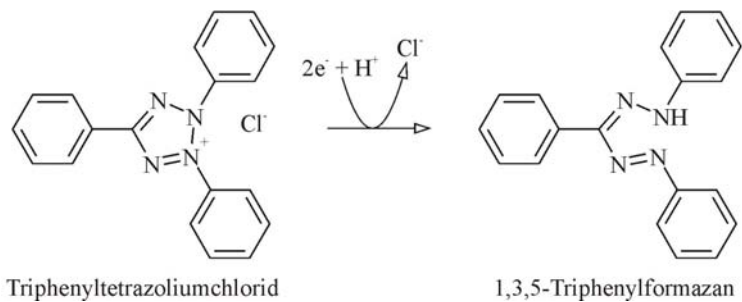


Abbildung 3.3.: Reduktion von Triphenyltetrazoliumchlorid zu 1,3,5-Triphenylformazan.

Tabelle 3.7.: Substrate des Substratverwertungstests (EcoPlate™).

<i>Stoffklasse</i>	<i>Substrat</i>	<i>Wells</i>
Tenside	Tween 40	C1 / C5 / C9
	Tween 80	D1 / D5 / D9
Monosaccharide	β -Methyl-D-Glucosid	A2 / A6 / A10
	D-Xylose	B2 / B6 / B10
Polysaccharide	α -Cyclodextrin	E1 / E5 / E9
	Glycogen	F1 / F5 / F9
	D-Cellobiose	G1 / G5 / G9
	α -D-Laktose	H1 / H5 / H9
Zuckerderivate	N-Acetyl-D-Glucosamin	E2 / E6 / E10
	D-Glucosaminsäure	F2 / F6 / F10
	Glucose-1-Phosphat	G2 / G6 / G10
	D-Galacturonsäure	B3 / B7 / B11
Zuckeralkohole	i-Erythritol	C2 / C6 / C10
	D-Mannitol	D2 / D6 / D10
	D,L- α -Glycerin-Phosphat	H2 / H6 / H10
Aromaten	2-Hydroxybenzoësäure	C3 / C7 / C11
	4-Hydroxybenzoësäure	D3 / D7 / D11
Carbonsäuren	Brenztraubensäure-Methylester	B1 / B5 / B9
	4-Hydroxybuttersäure	E3 / E7 / E11
	Itaconsäure	F3 / F7 / F11
	α -Ketobuttersäure	G3 / G7 / G11
	D-Apfelsäure	H3 / H7 / H11
	D-Galactonsäure- γ -lacton	A3 / A7 / A11
Aminosäuren	L-Arginin	A4 / A8 / A12
	L-Asparagin	B4 / B8 / B12
	L-Phenylalanin	C4 / C8 / C12
	L-Serin	D4 / D8 / D12
	L-Threonin	E4 / E8 / E12
Amine	Glycyl-L-Glutaminsäure	F4 / F8 / F12
	Phenethylamin	G4 / G8 / G12
	Putrescin	H4 / H8 / H12

3.5.6. Ermittlung der Gesamt-Dehydrogenase-Aktivität - Resazurintest

Die Aktivität der Dehydrogenasen der bakteriellen Gemeinschaft nach 24, 48, 72, 120, 168, 216 und 240 h Kultivierungszeit wurde mithilfe der Reduktion von Resazurin zu Resorufin (Abb. 3.4) bestimmt:

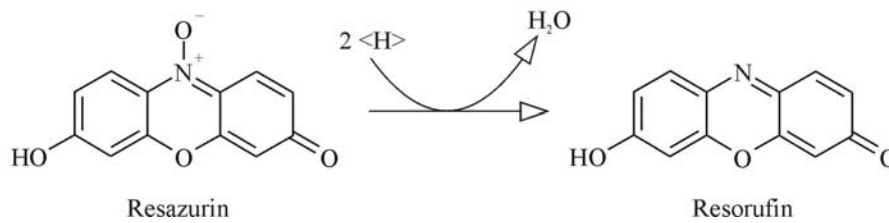


Abbildung 3.4.: Reaktion von Resazurin zu Resorufin.

Proben der Kulturen wurden in Reagenzgläsern mit Resazurin (Endkonzentration: $2 \mu\text{mol l}^{-1}$) versetzt. Nach 24 h Reaktionszeit bei 18°C wurden die Kulturen durchmischt, Zellen und Sedimentpartikel wurden abzentrifugiert (12000 g, 20 Min.). Im klaren Kulturüberstand wurden photometrisch die Konzentrationen von Resazurin und Resorufin ermittelt und daraus der relative Anteil des Resorufins am eingesetzten Resazurin errechnet:

Aus den VIS-Spektren von Resazurin- und Resorufinlösungen in Seewasserbouillon X-2 wurden geeignete Wellenlängen (500 und 600 nm) für den Nachweis beider Stoffe, sowie deren molare Absorptionskoeffizienten ϵ für diese Wellenlängen abgeleitet (Tab. 3.8).

Tabelle 3.8.: Molare Extinktionskoeffizienten ϵ für Resazurin, Resorufin bei 500 nm und 600 nm.

	$\epsilon_{500} [\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}]$	$\epsilon_{600} [\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}]$
Resazurin	0,00	43,72
Resorufin	21,11	3,01

Mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz wurden die Resazurin- und Resorufin-Konzentrationen berechnet. Die Absorption des Resorufins bei $\lambda = 500 \text{ nm}$ (Tab. 3.8), wurde bei der Berechnung der Resazurin berücksichtigt:

$$c_{\text{Resorufin}} = \frac{E_{500 \text{ nm}}}{\epsilon_{500 \text{ nm Resorufin}} \cdot d}$$

$$c_{\text{Resazurin}} = \frac{E_{600 \text{ nm}} - \left(\epsilon_{600 \text{ nm Resorufin}} \cdot \frac{E_{500 \text{ nm}}}{\epsilon_{500 \text{ nm Resorufin}}} \right)}{\epsilon_{600 \text{ nm Resazurin}} \cdot d}$$

Der relative Anteil des Resorufins am ursprünglich eingesetzten Resazurin wurde wie folgt berechnet:

$$x = \frac{c_{\text{Resorufin}} \cdot 100}{c_{\text{Resorufin}} + c_{\text{Resazurin}}} \quad [\%]$$

3.6. Verwertung von SDS durch die marine bakterielle Gemeinschaft

Die marine bakterielle Gemeinschaft wurde hinsichtlich ihrer Fähigkeit, SDS als einzige C- und Energiequelle zu nutzen, untersucht:

Die Herstellung und Zusammensetzung des Mediums entsprach der von Seewasserbouillon X-2 (Kap. 2.4.1). Das Medium enthielt jedoch statt Pyruvat, Acetat und Casaminoacids SDS ($3,47 \text{ mmol l}^{-1}$ bzw. $43,35 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$) als einzige C- und Energiequelle. Die Positivkontrollen enthielten Seewasserbouillon X-2. Die Nullkontrollen enthielten Salze, Spurenelemente und Vitamine der Seewasserbouillon X-2, jedoch keine C- und Energiequellen.

Je 5 parallele Ansätze der Positiv- und Nullkontrollen, sowie der Versuchsansätze mit $3,47 \text{ mmol l}^{-1}$ und $43,34 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ SDS wurden mit 0,5 %_{vol.} gefrorenem Watt angeimpft und 240 h bei 20°C in Erlenmeyerkolben auf einem Rundschüttler kultiviert. Nach 240 h Kultivierungszeit wurde die Aktivität der Dehydrogenasen der Gemeinschaft bestimmt: Den Kulturen wurde Resazurin (Endkonzentration: $21,8 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$) zugegeben. Nach weiteren 24 h Inkubation wurden photometrisch die Konzentrationen des Resazurins, bzw. Resorufins ermittelt (vgl. Kap. 3.5.6)

Zusätzlich zur Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität wurde nach 240 h die Trübung der Kulturen durch Messung der Absorption bei $\lambda = 740 \text{ nm}$ bestimmt.

3.7. Bestimmung der Oberflächenspannung SDS-haltiger Seewasserbouillon X-2

Zur Eingrenzung der im Fermenter einsetzbaren SDS-Konzentration wurde die Oberflächenspannung σ_L SDS-haltiger Seewasserbouillon X-2 ermittelt, um auf die kritische Mizellenbildungskonzentration cmc zurückzuschließen.

Zwei Methoden kamen dabei zum Einsatz:

3.7.1. Drop-collapse-Test nach Bodour *et al.* (1998)

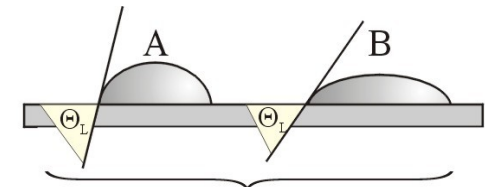
Die Oberflächenspannung σ_L hat neben der Oberflächenenergie σ_S und der Grenzflächenenergie σ_{LS} Auswirkungen auf den Kontaktwinkel Θ_L (Young, 1805):

$$\cos \Theta_L = \frac{\sigma_S - \sigma_{LS}}{\sigma_L}$$

Der Kontaktwinkel Θ_L nimmt danach für alle $\sigma_S > \sigma_{LS}$ Werte zwischen 0° und 90°, für alle $\sigma_S < \sigma_{LS}$ Werte zwischen 90° und 180° an. Steigende σ_L lassen den

Kontaktwinkel Θ_L dabei gegen 90° streben, sinkende σ_L lassen ihn dagegen gegen 0° , bzw. 180° streben (s. Abb. 3.5). Dies hat Auswirkungen auf den Durchmesser s , sowie die Höhe h des Tropfens.

Der modifizierte drop-collapse-Test nach Bodour *et al.* (1998) - abgeleitet von Jain *et al.* (1991) nutzt den Einfluß der Oberflächenspannung auf den Tropfendurchmesser:



$$\sigma_L(A) > \sigma_L(B) \Rightarrow \Theta_L(A) > \Theta_L(B)$$

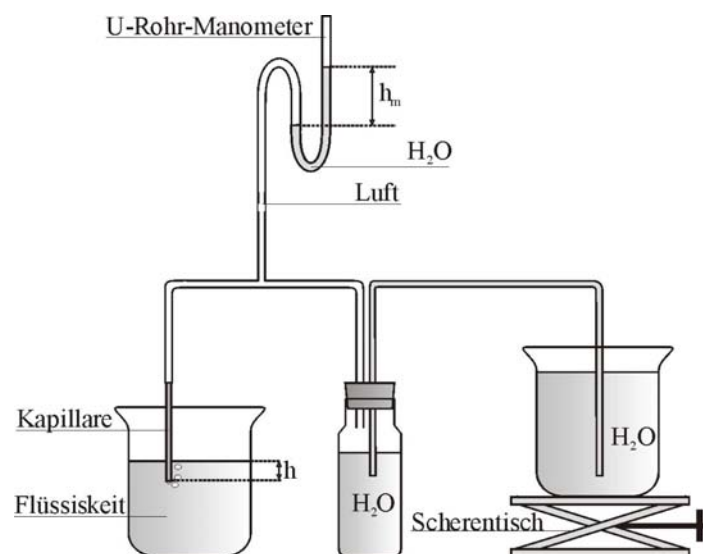
Je 5 ml einer SDS-Lösung in Seewasserbouillon X-2 (0%, 0,00125 %, 0,0025 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,05 %

und 0,1 %) wurden auf die Innenseite eines Polystyroldeckels einer 96-Well-Platte aufgetragen. Die Tropfen wurden in den im Deckel eingearbeiteten Dichtungsringen positioniert. Nach 60 s wurden die Tropfendurchmesser durch eine Stereolupe mit Meßokular vermessen. Jede SDS-Lösung wurde in 16 Tropfen vermessen und die Änderung der mittleren Tropfendurchmesser gegen die SDS-Konzentration aufgetragen. Bei Erreichen der kritischen Mizellenbildungskonzentration cmc sollte die weitere Erhöhung der SDS-Konzentration nicht zur weiteren Vergrößerung der Tropfendurchmesser führen.

Abbildung 3.5.: Abhängigkeit von Tropfendurchmesser, Tropfenhöhe und Kontaktwinkel Θ_L .

3.7.2. Blasendruck-Methode

Die Oberflächenspannung σ_L wurde mit einer modifizierten Blasendruckmethode nach Cuny und Wolf (1956) [Methode basierend auf Linebarger (1896), Berechnung nach Schrödinger (1915)] bestimmt. Abb. 3.6 stellt die Versuchsanordnung dar:



Eine plangeschliffene, entfettete Stahlkapillare wur-

Abbildung 3.6.: Bestimmung der Oberflächenspannung σ_L mit der Blasendruckmethode.

de in die zu untersuchende Flüssigkeit getaucht. Die Luft in der Kapillare stand sowohl mit einem wassergefüllten U-Rohr-Manometer, als auch mit einer luftdicht verschlossenen Flasche in Verbindung. Die Flasche war teilweise mit Wasser gefüllt, welches über ein wassergefülltes Rohr mit einem Vorratsgefäß kommunizierte. Beim Anheben des Vorratsgefäßes (Scherentisch) wurde Wasser aus diesem in die Flasche gepreßt und verdrängte dort Luft. Der Luftdruck in der Kapillare und im U-Rohr-Manometer stieg. Somit konnte mit dieser Anordnung der Luftdruck bestimmt werden, der zum Auspressen einer Luftblase aus der Kapillare in die Flüssigkeit notwendig war (Abb. 3.6).

Die Oberflächenspannung σ_L wurde wie folgt bestimmt: Die Druckdifferenz Δp , die gerade noch zur Bildung von Blasen führte, wurde wie folgt berechnet:

$$\Delta p = (\rho_m \cdot h_m - \rho \cdot h) \cdot g$$

ρ_m war dabei die Dichte des Wassers im U-Rohr-Manometer, h_m die Differenz der beiden Flüssigkeitspegel im Manometer (Abb. 3.6). Durch Auswiegen der untersuchten Flüssigkeiten in Meßkolben wurden ihre Dichten ρ ermittelt. Die Eintauchtiefe h der Kapillare wurde vor dem Versuch auf der Kapillare markiert und vermessen. Die Erdbeschleunigung g wurde den Angaben für die Erdbeschleunigung am Fallturm Bremen (Entfernung zum Versuchsort: 46,62 km) entnommen. Sie betrug $g = 9,81341 \text{ m/s}^2$.

Die Druckdifferenz Δp wurde zur Berechnung der Oberflächenspannung verwendet. Für kleine (einige Zehntel Millimeter) Kapillardurchmesser gilt:

$$\sigma_L = \frac{r \cdot \Delta p}{2}$$

Zur Ermittlung des Kapillarradius r wurde Δp von Aqua bidest bestimmt, und r mit Hilfe von Literaturdaten für σ_L des Wassers errechnet. Die Meßanordnung wurde somit gleichzeitig geeicht. Zusätzlich wurde r unter einer Stereolupe mit Meßokular vermessen.

Die Oberflächenspannung σ_L von SDS-Lösung in Seewasserbouillon X-2 (0%, 0,00125 %, 0,0025 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,05 % und 0,1 %) wurde mit der Blasendruckmethode bestimmt. Die kritische Mizellenbildungskonzentration cmc war erreicht, wenn die weitere Erhöhung der SDS-Konzentration nicht zur weiteren Verringerung der Oberflächenspannung σ_L führte.

3.8. Statistik

Aufgrund des hohen Zeitaufwands pro Begiftungsversuch war die Anzahl der Versuche stark begrenzt. Die Durchführung eines Begiftungsversuchs nahm etwa 2 Monate in Anspruch. Pro Versuchstyp wurden 2 parallele Versuche durchgeführt.

Die Ergebnisse aller Versuche wurden in einem ersten Schritt mittels Kolmogoroff-Smirnov-Test (Kolmogoroff, 1933; Smirnov, 1939) auf Normalverteilung geprüft. Bei normalverteilten Daten wurde das arithmetische Mittel mit Standardabweichung angegeben, bei nicht normalverteilten Daten wurde der Median, sowie das 25. und das 75. Perzentil verwendet.

Bei Stichprobenumfängen $N < 30$ wurden Ausreißer nach Nalimov (Gottwald, 2000) ermittelt. Bei Stichprobenumfängen $N > 30$ wurde der Ausreißertest nach Grubbs (1969) verwendet.

Normalverteilte Daten eines Versuchstyps wurden mittels Student-Newman-Keuls-Test (Gosset, 1907; Newman, 1939; Keuls, 1952) auf Zugehörigkeit zur gleichen Grundgesamtheit überprüft. Nicht normalverteilte Daten wurden mittels ANOVA on ranks (Kruskal, 1952; Kruskal und Wallis, 1952) auf Gleichheit überprüft. Nicht-normalverteilte Daten wurden mittels U-Test (Mann-Whitney-Test) (Sachs, 1999) auf Zugehörigkeit zur gleichen Grundgesamtheit überprüft.

Daten, die auf einem Umfang der Messungen von $n = 2$ beruhten (Bsp. MPNs der *in duplo* durchgeführten Begiftungsversuche) wurden wie folgt verglichen. Die Spannweite der Daten ergab sich mit $n = 2$ aus der Differenz der Meßwerte. Die Spannweite wurde genutzt, um nach Guterman (1962) die maximale Standardabweichung $\hat{\sigma}_{\max}$ zu bestimmen. Überlappten die Intervalle $\bar{n} \pm \hat{\sigma}_{\max}$ beider Werte, so wurden die Werte als gleich, überlappten die Intervalle dagegen nicht, so wurden sie als signifikant verschieden gewertet.

Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) wurde nach Jongman *et al.* (1987) durchgeführt (Programm: CANOCO for Windows 4.5, Biometrics Plant Research Int.). Clusteranalysen wurden mithilfe des Programms Multi Variate Statistical Package MVSP (Kovach Computing Service) erstellt. Nicht-lineare Regressionsanalysen wurden nach einem iterativen Verfahren von Marquardt (1963) durchgeführt (Programm: SigmaPlot 9.0): Verschiedene Funktionstypen (z.B. sigmoidale Funktionen, Funktionen mit exponentiellem Anstieg oder Abfall, lineare Kurven, etc.) wurden getestet und ggf. ausgewählt. Kriterium für die Auswahl der Funktionstypen war die

Korrelation der Funktionen mit den Daten (Einzelmessungen). Aufschluß darüber gab der Korrelationskoeffizient R^2 , der den Anteil der von der Funktion erklärten Varianz an der Varianz der Daten angibt. Für $R^2 \leq 0,5$ wurde keine Korrelation, für $R^2 \leq 0,8$ wurde eine mittlere Korrelation und für $R^2 > 0,8$ wurde eine hohe Korrelation der Kurven mit den Daten angenommen.

3.9. Diversität

Die Definition des Begriffs "Diversität" ist schwierig, da er vielfältige Verwendung findet: Diversität wird auf Moleküle, Gene, Lebewesen, Arten, Lebensräume, Ökosysteme, u.v.m. bezogen. Verschiedene Methoden der Ermittlung erweitern zusätzlich die möglichen Beschreibungen der Diversität.

Beurteilung der Diversität der Gemeinschaft in vorliegender Arbeit

Die genetische und phylogenetische Diversität der bakteriellen Gemeinschaft wurde mittels DGGE und FISH untersucht. Die metabolische Diversität der Gemeinschaft wurde mittels Ecolog[®] und MPN bestimmt.

- **DGGE:** Die DNA-Bandenmuster wurden einer Hauptkomponentenanalyse (PCA) unterzogen. Relative Ähnlichkeiten der DNA-Bandenmuster wurden zudem als Euklidische Distanzen ermittelt.

$$d(\mathbf{x}, \mathbf{y}) = \sqrt{\sum_{i=1}^s (x_i - y_i)^2} = \sum_{i=1}^s |x_i - y_i| \quad \text{Euklidische Distanzen (Pruscha, 2006)}$$

Der Einfluß des Einfrierens auf die Struktur der bakteriellen Gemeinschaft (Kap. 4.1.1) wurde über die Präsenz von Spezies mittels DGGE-Analysen ermittelt. Die DNA-Bandenmuster der Gele wurden mittels Clusteranalyse untersucht.

- **Ecolog[®]:** Die metabolische Diversität der Gemeinschaften wurde mittels Clusteranalyse untersucht. Analog zum Konzept der Artenvielfalt SR (Kap. 1.4.2) wurde die metabolische Diversität zudem als Anzahl der verwerteten Substrate ermittelt.
- **MPN:** Die physiologische Diversität der Gemeinschaften wurde über die Abundanzen der lebenden APB, MetB, SRB und DNB (Kap. 3.5.4) mithilfe von Shannon-Wiener-Indices (Kap. 1.4.2) bestimmt.

4. Ergebnisse

4.1. Versuche zur Ermittlung geeigneter Kulturparameter

4.1.1. Frisches oder gefrorenes Wattsediment als Inokulum für die Begiftungsversuche?

Um zu klären, ob sich die bakteriellen Gemeinschaften von Kulturen grundsätzlich unterscheiden, wenn die Kulturen mit gefrorenem Sediment, statt mit frisch aus dem Watt entnommenem Sediment inokuliert werden, wurden die Struktur von Gemeinschaften des frisch entnommenen, unkultivierten Sediments, sowie von Kulturen (240 h in Seewasserbouillon X-2, 20°C), die mit frisch entnommenem Sediment (nachfolgend: "Frischwattkulturen") und solchen, die mit gefrorenem Wattsediment (nachfolgend: "Gefrierwattkulturen") angeimpft waren, untersucht. Die Struktur der Gemeinschaften wurde über die DNA-Präsenz (Kap. 3.5.2) untersucht.

Dem frisch entnommenem Wattsediment einerseits, sowie den Frisch- und Gefrierwattkulturen (nach 240 h Kultivierung) andererseits wurden Proben entnommen. Aus diesen wurde DNA extrahiert (Kap. 3.5.2.1), amplifiziert (Kap. 3.5.2.2) und das Amplifikat per DGGE aufgetrennt (Kap. 3.5.2.3). Mittels Clusteranalyse wurden Ähnlichkeiten der DNA-Bandenmuster des unkultivierten Watts, sowie der Frischwatt- und Gefrierwattkulturen ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.1 dargestellt.

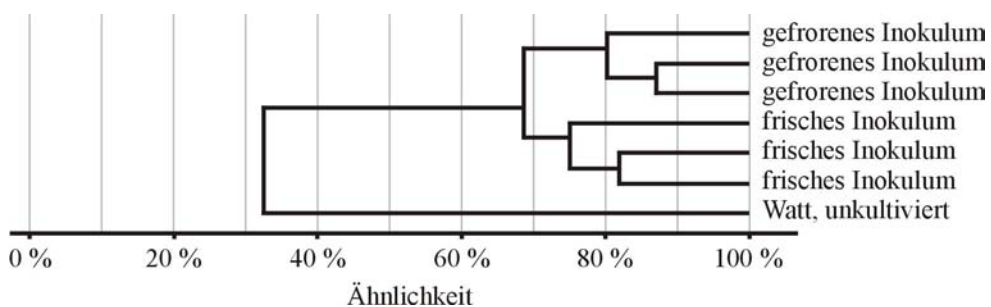


Abbildung 4.1.: Relative Ähnlichkeit der Zusammensetzung bakterieller Gemeinschaften aus dem unkultivierten, bzw. aus mit frischem und gefrorenem Watt beimpften Kulturen.

Die DGGE-Bandenmuster der drei Frischwattkulturen ähnelten sich zu 75,1%. Die Muster der Gefrierwattkulturen wiesen Ähnlichkeiten von 80,3% auf. Die Ähnlichkeit zwischen den Bandenmustern der Frischwattkulturen und der Gefrierwattkulturen betrug 68,7%. Dagegen ähnelten die DNA-Bandenmuster der Frischwatt-

und Gefrierwattkulturen dem des unkultivierten Watts nur zu 32,6 %. Die Untersuchung der Struktur der Gemeinschaften über die DNA-Präsenz zeigte somit:

- Die bakteriellen Gemeinschaften der Frischwattkulturen waren sich untereinander ähnlicher, als den Gemeinschaften der Gefrierwattkulturen. Umgekehrt galt dasselbe.
- Die Gemeinschaften der Frisch- und Gefrierwattkulturen unterschieden sich voneinander weniger, als sie sich von der Gemeinschaft des unkultivierten Watts unterschieden.

Zwar beeinflusste das Einfrieren des Watts demnach die Struktur der Gemeinschaft. Dieser Einfluß war jedoch geringer, als der der Kultivierung des Wattsediments in Seewasserbouillon X-2.

4.1.2. Bestimmung der kritischen Mizellenbildungskonzentration (cmc) über die Oberflächenspannung σ_L

Die cmc wurde über die Oberflächenspannung σ_L nach der Blasendruckmethode (Linebarger (1896), Schrödinger (1915), Cuny und Wolf (1956)) (Kap. 3.7.2), und mittels drop-collapse-Test (Wintermann, 2006) bestimmt (Kap. 3.7.1). Die Ergebnisse der cmc-Bestimmungen von SDS in Seewasser sind in Abbildung 4.2 dargestellt.

Die cmc ließ sich aus den Ergebnisse des drop-collapse-Tests nicht mit hinreichender Genauigkeit ermitteln: Zwar war die Zunahme des mittleren Tropfendurchmessers der Seewasserbouillon X-2 bei steigender SDS-Konzentration von 347 auf 3467 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ statistisch signifikant (2 σ -Regel) nachweisbar. Dagegen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den mittleren Durchmessern der Tropfen mit 347 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ und 1733 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ SDS einerseits und zwischen den Durchmessern der Tropfen mit 1733 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ und 3467 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ SDS andererseits festgestellt werden. Eine Stagnation der Tropfengröße bei zunehmender SDS-Konzentration wurde somit nicht nachgewiesen.

Über die Bestimmung der Oberflächenspannung σ_L mit der Blasendruckmethode konnte die cmc dagegen hinreichend genau bestimmt werden: Die minimale Oberflächenspannung σ_L von 45,6 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ wurde bei einer SDS-Konzentration von 1733 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ erreicht: Die Verdopplung der SDS-Konzentration auf 3467 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ hatte keinen signifikanten (t-Test, P = 95 %) Einfluß mehr auf die Oberflächen-

spannung. Die mittels Blasendruckmethode ermittelte kritische Mizellenbildungskonzentration betrug daher $1733 \mu\text{mol l}^{-1}$.

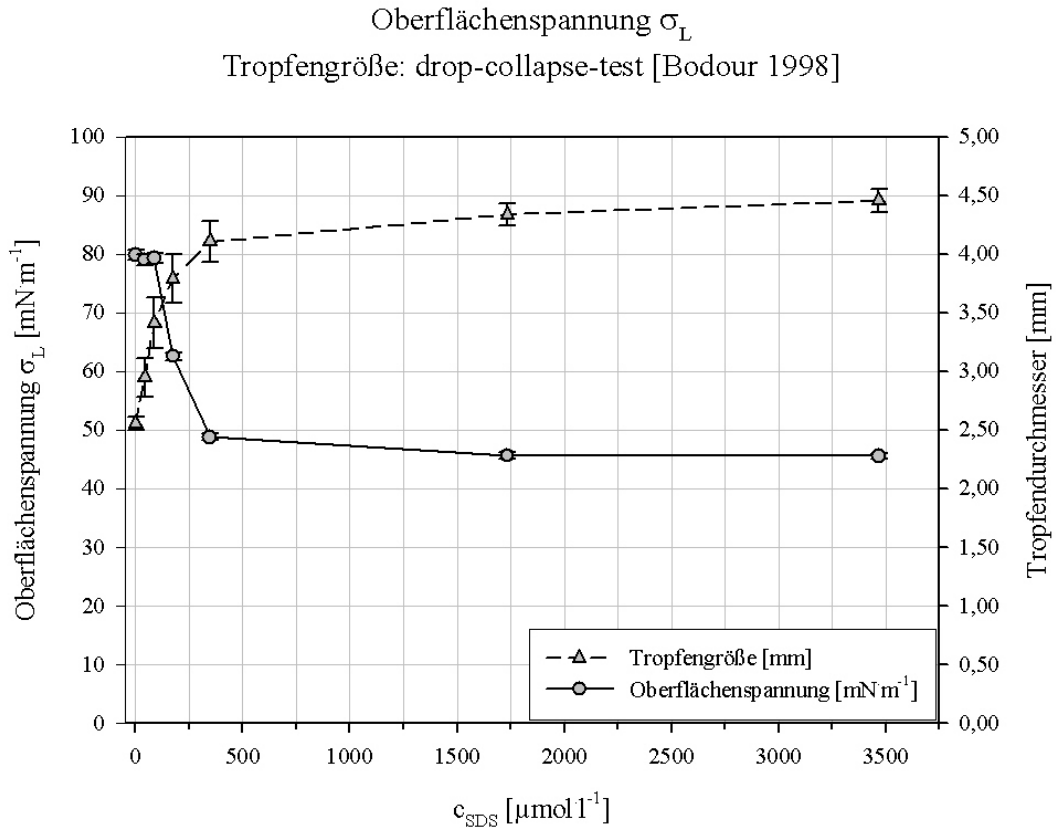


Abbildung 4.2.: Kritische Mizellenbildungskonzentration *cmc* als Funktion
 a) des Durchmessers der Tropfen, ermittelt mit der drop-collapse-Methode.
 b) der Oberflächenspannung σ_L , ermittelt mittels Blasendruckmethode.

Die maximal im Fermenter einsetzbare SDS-Konzentration wurde in Versuchen mit variierender SDS-Konzentration in Seewasserbouillon X-2 empirisch ermittelt. Sie betrug mit $43,34 \mu\text{mol l}^{-1}$ lediglich $1/40$ der *cmc*.

4.1.3. Verwertung von SDS durch die bakterielle Gemeinschaft

Die Verwertung von SDS als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle durch die bakterielle Gemeinschaft wurde, wie in Kap. 3.6 beschrieben, untersucht:

Es wurden Kulturen angelegt, die 0,1 %, bzw. 0,00125 % SDS als alleinige C- und Energiequelle enthielten. Salze, Vitamine und Spurenelemente entsprachen der Seewasserbouillon X-2. Um Verfälschungen durch das Aufwachsen von C-autotrophen Spezies auszuschließen wurden Ansätze, die nur Salze, Vitamine und Spurenelemente der Seewasserbouillon X-2 (Kap. 2.4.1), jedoch keine C- und

Energiequellen enthielten („Nullkontrollen“), mitgeführt. Als „Positivkontrollen“ für gutes Wachstum wurden zusätzlich Kulturen mit Seewasserbouillon X-2 mitgeführt. Alle Kulturen wurden in 3 Parallelen angesetzt und 240 h bei 20°C kultiviert. Die Reduktion von Resazurin zu Resorufin (nach 240 h: Inkubation mit Resazurin für 24 h bei 18°C) wurde als Indikator für mikrobielle Elektronentransport-Aktivität genutzt.

Die Trübung der Kulturen wurde als Indikator für Zellwachstum verwendet. Zusätzlich wurde versucht aus den SDS-haltigen Versuchsansätzen Bakterienstämme auf SDS-Agarplatten zu isolieren. Abbildung 4.3 stellt die Ergebnisse des Resazurintests dar: Metabolische Aktivität der bakteriellen Gemeinschaft führte zu erhöhter Resazurinreduktion:

In den Positivkontrollen war der relative Anteil des Resorufins am eingesetzten Resazurin ($97,5 \pm 1,9 \%$) statistisch signifikant (U-Test, 95 %) größer, als in den Nullkontrollen ($57,7 \pm 4,9 \%$), die zwar angeimpft wurden, aber keine C-Quellen enthielten. Der Anteil des reduzierten Resazurins in Versuchsansätzen mit 0,1 % SDS ($32,5 \pm 21,9 \%$) unterschied sich nicht statistisch signifikant (U-Test, 95 %) von dem der Nullkontrollen. Der Anteil des reduzierten Resazurins war in den Kulturen mit

0,00125 % SDS ($43,34 \mu\text{mol l}^{-1}$) mit $47,0 \pm 4,7 \%$ statistisch signifikant (U-Test, 95 %) geringer, als in den Nullkontrollen. Somit war mittels Resazurintest keine Dehydrogenase-Aktivität in SDS-haltigen Versuchsansätzen nachweisbar. Die Ergebnisse des Resazurintests sprechen somit gegen eine metabolische Aktivität der bakteriellen Gemeinschaft mit SDS als alleiniger C- und Energiequelle.

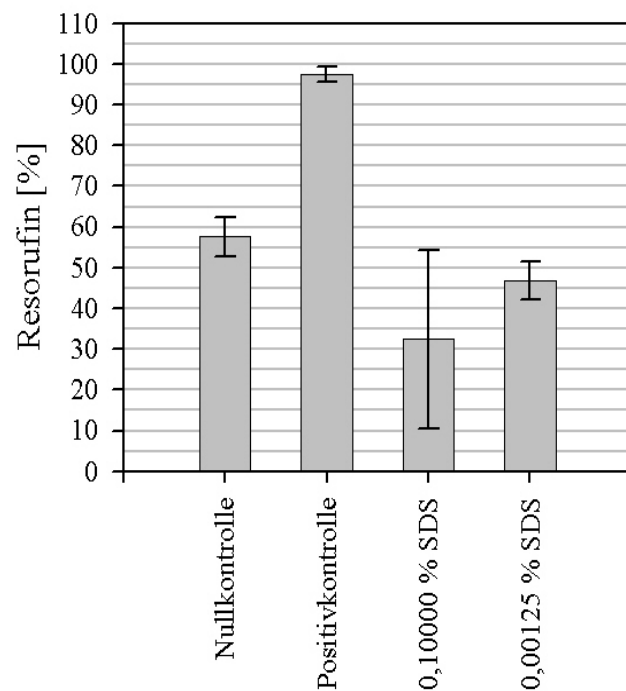
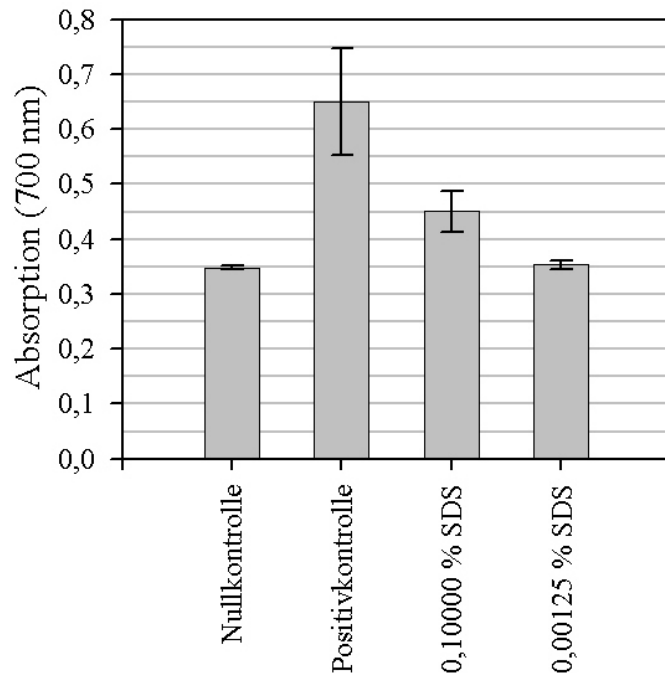


Abbildung 4.3.: Relativer Anteil des Resorufins am eingesetzten Resazurin. Dargestellt ist das arithmetische Mittel aus 5 Meßwerten mit der zugehörigen Standardabweichung.

Abbildung 4.4 stellt die Ergebnisse der Trübungsmessung der Kulturen dar:

Die Positivkontrollen waren trüber, als die Nullkontrollen: Mit $0,65 \pm 0,10$ absorbierten sie ($\lambda = 700 \text{ nm}$) etwa doppelt so stark, wie die Nullkontrollen ($0,34 \pm 0,01$). Die Absorption der Nullkontrollen unterschied sich nicht statistisch signifikant (U-Test, 95 %) von der Absorption der Kulturen mit 0,00125 % SDS ($0,35 \pm 0,01$).



Die Absorption der Kulturen mit 0,1 % SDS betrug $0,45 \pm 0,04$. Damit war sie

Abbildung 4.4.: Absorption bei $\lambda = 700 \text{ nm}$ als Maß der Trübung der Kulturen. Dargestellt ist das arithmetische Mittel aus 5 Meßwerten mit der zugehörigen Standardabweichung.

statistisch signifikant (U-Test, 95 %) größer, als die, der Nullkontrollen. Nur 1,8 % der Differenz kann durch die Absorption des SDS erklärt werden: Der molare Absorptionskoeffizient von SDS beträgt $\epsilon_{700 \text{ nm}} = 0,577 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. 0,1 % SDS erzeugten somit eine zusätzliche Absorption von 0,002. Allerdings entsprechen 0,1 % SDS ($3,467 \text{ mmol l}^{-1}$) der zweifachen cmc (vgl. Kap. 4.1.2). Neben der Zunahme der Trübung durch Zellwachstum ist die Brechung (und somit Streuung) des Lichts an den Grenzflächen zwischen Kulturmedium und Mizellen demnach eine weitere mögliche Erklärung der stärkeren Absorption.

Die Trübungsmessungen wiesen demnach möglicherweise auf Wachstum in den Kulturen mit 0,1 % SDS hin. Daher wurde versucht aus den SDS-haltigen Kulturen Bakterien auf Agarplatten mit 0,1 %, bzw. 0,00125 % SDS in Seewasser zu isolieren. Tatsächlich konnten auf diese Weise 5 Stämme isoliert werden, jedoch waren diese nicht in der Lage in Flüssigkulturen mit SDS als alleiniger C- und Energiequelle zu wachsen. Der Umstand, daß drei der Stämme nicht auf, sondern im Agar der Platten wuchsen (und entsprechend schwierig zu überimpfen waren) läßt vermuten, daß es sich um Isolate handelte, die in den Flüssigkulturen inaktiv

waren, jedoch auf den Agarplatten den Agar, und nicht das SDS als C- und Energiequelle nutzten.

Insgesamt sprechen Resazurintest, Kultivierungsversuche und Trübungsmessungen (abgesehen von der erhöhten Absorption der Kulturen mit 0,1 % SDS) gegen die Verwertung von SDS durch die marine bakterielle Gemeinschaft.

4.1.4. Löslichkeit des Cadmiumacetats

0,05 mmol l⁻¹ Cadmiumacetat wurden 240 h mit sterilisiertem Wattsediment (0,5 % (w/v)) in Seewasserbouillon X-2 inkubiert. Dem Versuchsansatz wurden jeden Tag Proben zur Bestimmung der Konzentration des im Medium gelösten Cadmiums entnommen.

Abbildung 4.5 stellt die Änderung der Cd²⁺-Konzentration im Medium als Funktion der Zeit, sowie den Verlauf des pH-Werts (gestrichelt) dar.

Die Konzentration des Cd²⁺ im Kulturmedium war nicht konstant, sondern schwankte im zeitlichen Verlauf des Versuches. Eine klare Begründung dafür ist nicht möglich, da einerseits der pH-Wert konstant, und andererseits das Medium steril war. Die anfängliche Abnahme der Cd²⁺-Konzentration könnte auf die Adsorption von Cd²⁺ an Sedimentpartikel, sowie auf die Bildung unlöslichen Cadmiumhydroxids zurückzuführen sein.

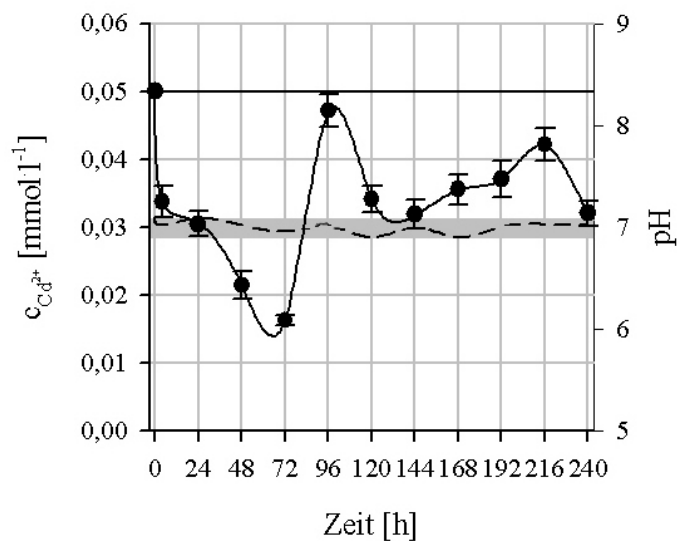


Abbildung 4.5.: Änderung der gelösten Cd²⁺-Konzentration im Verlauf von 240 h Inkubationszeit. Der pH-Wert ist gestrichelt dargestellt (grau unterlegt: Schwankungsbreite der Elektrode). Die Werte repräsentieren das arithmetische Mittel aus 3 Messungen incl. der Standardabweichung. Die schwarze Linie gibt die Startkonzentration des Cd²⁺ an.

4.2. Begiftungsversuche

Die autochthone bakterielle Gemeinschaft wurde in Sedimentsuspensionskulturen mit Cadmium und SDS, sowie der Kombination aus Cadmium und SDS begiftet. Cadmium wurde in Konzentrationen bis $5,0 \text{ mmol l}^{-1}$ eingesetzt. In Kulturen ohne Zugabe von Cadmium (nachfolgend mit $0,0 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ bezeichnet) waren aufgrund des Cadmiumgehaltes des verwendeten Sediments $1,2 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ enthalten. Kulturen, denen SDS zugefügt wurde, enthielten $43,34 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ SDS.

4.2.1. Gesamtzellkonzentration / wahrscheinlichste Lebendzellzahl

Gesamtzellkonzentration und Lebendzellzahl sind wichtige Größen zur Charakterisierung mikrobieller Gemeinschaften. Die Gesamtzellkonzentration aller Begiftungsversuche wurde durch mikroskopische Zählung DAPI-gefärbter Zellen ermittelt. Die Lebendzellzahl wurde mittels MPN bestimmt. Aus Lebendzellzahl und Gesamtzellkonzentration wurde die Kultivierbarkeit der Bakterien der Gemeinschaft errechnet.

4.2.1.1. Gesamtzellkonzentration der bakteriellen Gemeinschaft

Die Gesamtzellkonzentrationen schwankten zwischen $3,0 \cdot 10^7$ und $1,5 \cdot 10^9 \text{ ml}^{-1}$. Die Werte sind in Tabelle 4.1 zusammengestellt.

Der Einfluß der Kultivierungsdauer auf die Gesamtzellkonzentration war gering (Abb. 4.6). Zu Beginn der Versuche betrug sie $5,6 \cdot 10^7 \text{ ml}^{-1}$. Nach 72 h Kultivierung betrug sie $1,3 \cdot 10^9 \text{ ml}^{-1}$ in Kulturen ohne, bzw. $5,4 \cdot 10^8 \text{ ml}^{-1}$ in Kulturen mit $43,34 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ SDS. Nach 240 h Kultivierung betrug die mittlere Gesamtzellkonzentration in Kulturen ohne SDS $1,6 \cdot 10^8 \text{ ml}^{-1}$, in Kulturen mit SDS $2,0 \cdot 10^8 \text{ ml}^{-1}$. Korrelationen mit der Cd^{2+} -Konzentration konnten nicht nachgewiesen werden.

Mit Ausnahme der Ansätze mit $0,05 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ nach 24 h Kultivierung, konnten keine statistisch signifikant unterschiedliche Gesamtzellkonzentrationen der Begiftungsversuche ohne und mit SDS belegt werden (t-Test, 95 %) (Tab. 4.1).

Tabelle 4.1.: Gesamtzellkonzentration nach verschiedenen Kultivierungszeiten in Abhängigkeit von der Cd²⁺- und SDS-Konzentration. Dargestellt sind die Mediane aus 2 unabhängigen Versuchen, sowie das 25. (25. P.) und 75. Percentil (75. P.).

Cd ²⁺ [mmol l ⁻¹]	24 h		48 h		72 h		120 h		168 h		216 h		240 h	
	\bar{n} ml	25. P. [Z/ml]	\bar{n} ml	25. P. [Z/ml]	\bar{n} ml	25. P. [Z/ml]	\bar{n} ml	25. P. [Z/ml]	\bar{n} ml	25. P. [Z/ml]	\bar{n} ml	25. P. [Z/ml]	\bar{n} ml	25. P. [Z/ml]
		75. P. [Z/ml]		75. P. [Z/ml]		75. P. [Z/ml]		75. P. [Z/ml]		75. P. [Z/ml]		75. P. [Z/ml]		75. P. [Z/ml]
Kulturen ohne SDS														
0,000	1,32·10 ⁸	1,04·10 ⁸	2,40·10 ⁸	1,83·10 ⁸	2,36·10 ⁸	1,98·10 ⁸	2,12·10 ⁸	1,72·10 ⁸	2,12·10 ⁸	1,65·10 ⁸	1,49·10 ⁸	8,45·10 ⁷	2,26·10 ⁸	1,88·10 ⁸
		2,23·10 ⁸		2,97·10 ⁸		2,64·10 ⁸		2,47·10 ⁸		2,59·10 ⁸		2,45·10 ⁸		2,54·10 ⁸
0,005	5,94·10 ⁷	2,69·10 ⁷	2,16·10 ⁸	1,74·10 ⁸	2,08·10 ⁸	1,66·10 ⁸	1,70·10 ⁸	1,00·10 ⁸	1,84·10 ⁸	1,38·10 ⁸	1,68·10 ⁸	1,03·10 ⁸	1,58·10 ⁸	9,75·10 ⁷
		9,66·10 ⁷		2,69·10 ⁸		2,42·10 ⁸		2,17·10 ⁸		2,40·10 ⁸		2,12·10 ⁸		2,21·10 ⁸
0,050	8,95·10 ⁷	7,28·10 ⁷	2,40·10 ⁸	1,93·10 ⁸	2,21·10 ⁸	1,66·10 ⁸	1,93·10 ⁸	1,59·10 ⁸	1,56·10 ⁸	1,27·10 ⁸	1,13·10 ⁸	9,26·10 ⁷	1,36·10 ⁸	8,48·10 ⁷
		1,08·10 ⁸		3,00·10 ⁸		2,88·10 ⁸		2,30·10 ⁸		1,86·10 ⁸		1,38·10 ⁸		2,55·10 ⁸
0,500	9,61·10 ⁷	5,51·10 ⁷	1,32·10 ⁸	1,05·10 ⁸	2,97·10 ⁸	1,02·10 ⁸	1,37·10 ⁸	1,04·10 ⁸	1,23·10 ⁸	9,93·10 ⁷	6,93·10 ⁷	4,59·10 ⁷	7,49·10 ⁷	5,09·10 ⁷
		1,23·10 ⁸		1,60·10 ⁸		1,33·10 ⁹		2,30·10 ⁸		1,41·10 ⁸		1,04·10 ⁸		1,04·10 ⁸
5,000	1,15·10 ⁸	8,31·10 ⁷	1,50·10 ⁸	1,20·10 ⁸	1,18·10 ⁸	9,47·10 ⁷	1,50·10 ⁸	1,24·10 ⁸	6,50·10 ⁷	5,05·10 ⁷	4,38·10 ⁷	3,53·10 ⁷	1,22·10 ⁸	1,00·10 ⁸
		1,40·10 ⁸		1,84·10 ⁸		1,50·10 ⁸		1,82·10 ⁸		7,78·10 ⁷		5,37·10 ⁷		1,82·10 ⁸
Kulturen mit 43,34 µmol l⁻¹ SDS														
0,000	8,36·10 ⁷	5,51·10 ⁷	2,94·10 ⁸	1,77·10 ⁸	2,64·10 ⁸	1,59·10 ⁸	2,52·10 ⁸	1,46·10 ⁸	2,50·10 ⁸	1,56·10 ⁸	2,21·10 ⁸	1,65·10 ⁸	2,26·10 ⁸	1,54·10 ⁸
		1,27·10 ⁸		4,13·10 ⁸		5,37·10 ⁸		3,56·10 ⁸		4,01·10 ⁸		3,00·10 ⁸		3,02·10 ⁸
0,005	1,32·10 ⁸	9,90·10 ⁷	1,56·10 ⁸	1,23·10 ⁸	1,84·10 ⁸	1,46·10 ⁸	2,50·10 ⁸	2,03·10 ⁸	1,98·10 ⁸	1,74·10 ⁸	1,88·10 ⁸	1,56·10 ⁸	1,70·10 ⁸	1,37·10 ⁸
		2,03·10 ⁸		2,80·10 ⁸		2,73·10 ⁸		2,97·10 ⁸		2,37·10 ⁸		2,40·10 ⁸		2,45·10 ⁸
0,050	2,43·10 ⁸	2,05·10 ⁸	2,45·10 ⁸	1,82·10 ⁸	2,69·10 ⁸	2,40·10 ⁸	2,64·10 ⁸	2,26·10 ⁸	2,26·10 ⁸	1,92·10 ⁸	2,07·10 ⁸	1,84·10 ⁸	2,26·10 ⁸	1,98·10 ⁸
		2,78·10 ⁸		3,02·10 ⁸		3,06·10 ⁸		3,28·10 ⁸		2,65·10 ⁸		2,36·10 ⁸		2,59·10 ⁸
0,500	8,08·10 ⁷	3,36·10 ⁷	7,56·10 ⁷	3,11·10 ⁷	9,19·10 ⁷	5,94·10 ⁷	1,11·10 ⁸	5,23·10 ⁷	1,60·10 ⁸	1,15·10 ⁸	1,51·10 ⁸	8,06·10 ⁷	1,65·10 ⁸	1,09·10 ⁸
		2,78·10 ⁸		1,63·10 ⁸		2,57·10 ⁸		2,18·10 ⁸		2,29·10 ⁸		2,50·10 ⁸		2,24·10 ⁸

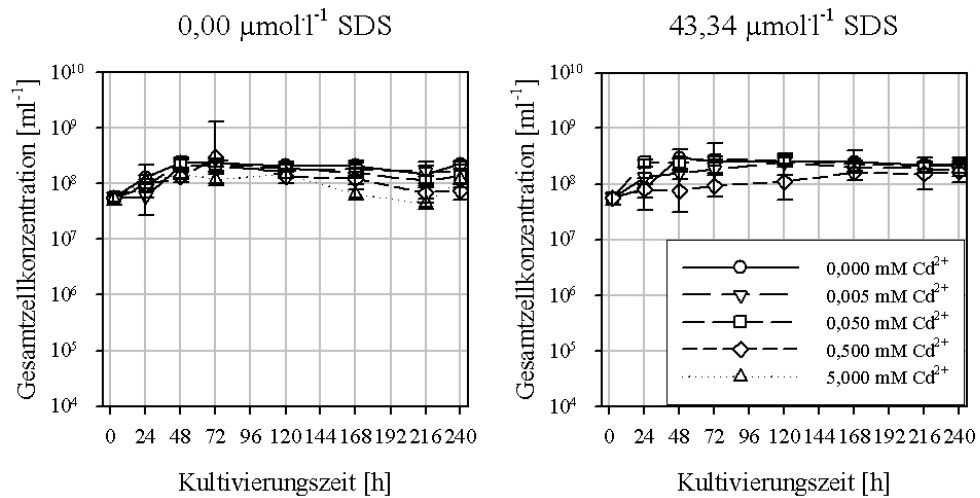


Abbildung 4.6.: Gesamtzellkonzentration der bakteriellen Gemeinschaft als Funktion der Kultivierungszeit für $[Cd^{2+}]$ von 0 bis 5 $mmol\ l^{-1}$, sowie 0 bzw. 43,34 $\mu mol\ l^{-1}$ SDS. Jeder Wert repräsentiert den Median 2-er unabhängiger Versuche mit je 80 Einzelmessungen. Die Fehlerbalken markieren das Intervall zwischen dem 25. und 75. Perzentil.

4.2.1.2. Wahrscheinlichste Lebendzellzahl der bakteriellen Gemeinschaft

Im Gegensatz zur Gesamtzellkonzentration (Kap. 4.2.1.1) verringerte sich die wahrscheinlichste Lebendzellzahl (MPN) der bakteriellen Gemeinschaft mit steigender Cd^{2+} -Konzentration.

In Abbildung 4.7 ist die Lebendzellzahl der Acetat-Pyruvat-verwertenden Bakterien (APB) in SDS-freien und SDS-haltigen Kulturen als Funktion der Cadmiumkonzentration dargestellt. Cd^{2+} beeinflusste die Lebendzellzahl der APB. In Kulturen ohne SDS wurde eine signifikante Verringerung der mittleren MPNs nach 48 h Kultivierung mit 0,5 und 5 $mmol\ l^{-1}$ Cd^{2+} , nach 216 h mit 0,005, 0,5 und 5 $mmol\ l^{-1}$ Cd^{2+} , sowie nach 240 h mit 5 $mmol\ l^{-1}$ Cd^{2+} nachgewiesen. In Kulturen mit 43,34 $\mu mol\ l^{-1}$ SDS wurden zwischen 72 und 120 h mit 0,005 und 0,5 $mmol\ l^{-1}$ Cd^{2+} , sowie nach 168 h mit 0,5 $mmol\ l^{-1}$ Cd^{2+} signifikante Verringerungen der MPNs (gegenüber den MPNs Cd^{2+} -freier Kulturen) nachgewiesen. Cadmium verringerte somit tendenziell vor allem bei Konzentrationen ab 0,5, jedoch auch vereinzelt ab 0,005 $mmol\ l^{-1}$ die Lebendzellzahlen der APB. Signifikant erhöhte MPNs wurden lediglich in SDS-freien Kulturen mit 0,05 $mmol\ l^{-1}$ Cd^{2+} , nach 240 h Kultivierung festgestellt.

In Abbildung 4.8 ist die MPN der APB als Funktion der Kultivierungszeit dargestellt.

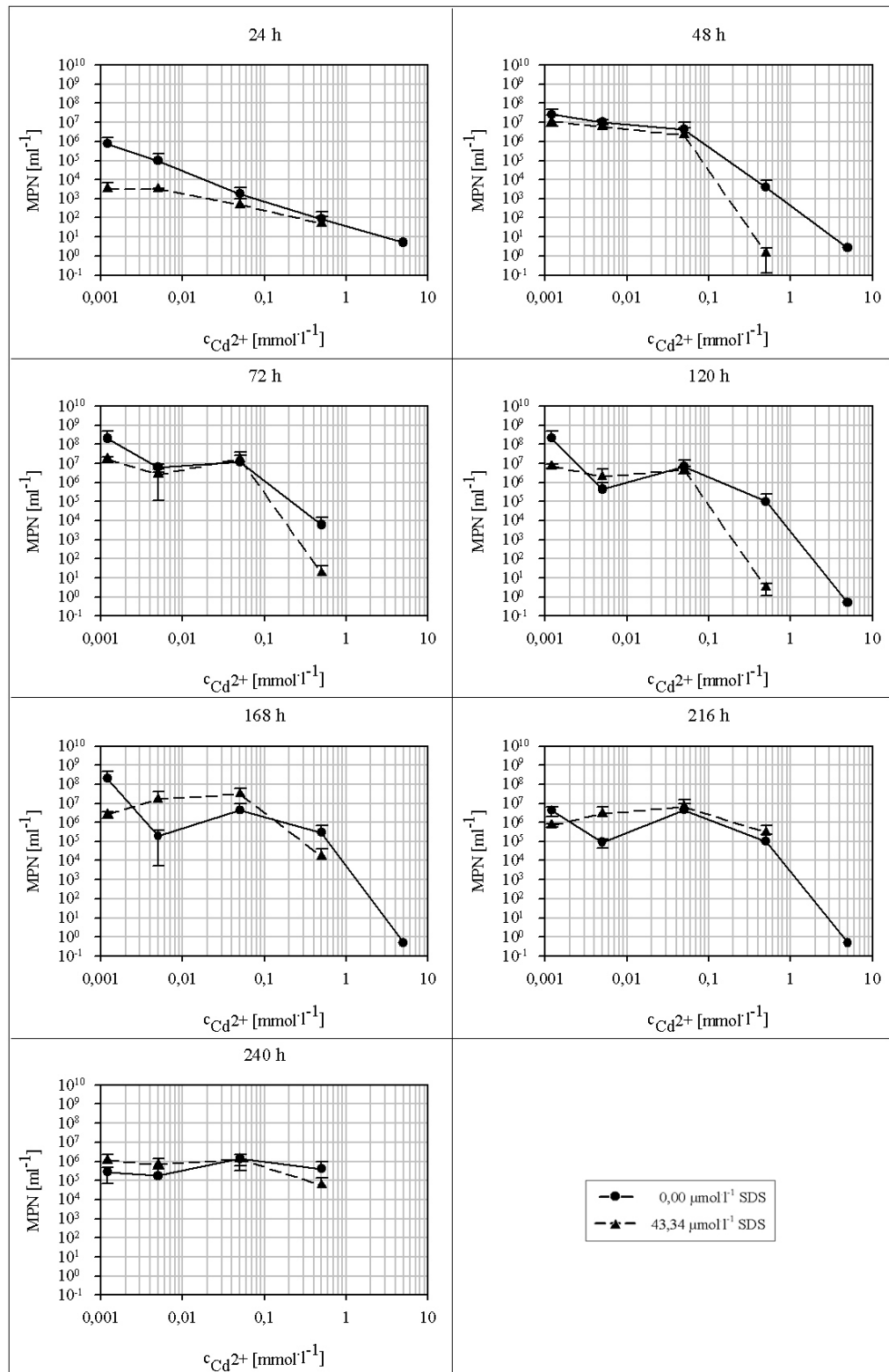


Abbildung 4.7.: Wahrscheinlichste Lebendzellkonzentration (MPN) der Acetat-Pyruvat-verwertenden Bakterien (APB) der Gemeinschaft nach 24, 48, 72, 120, 168, 216 und 240 h Kultivierungszeit. Die Werte repräsentieren den Mittelwert der MPNs aus 2 unabhängigen Versuchen. Die Fehlerbalken repräsentieren die nach Guterman (1962) (Kap. 3.8) ermittelte maximale Standardabweichung.

Sowohl in Kulturen mit, als auch ohne SDS stiegen die MPNs der APB in Kulturen mit bis zu $0,05 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ innerhalb der ersten 48 h der Kultivierungszeit auf ein Maximum und sanken zwischen 72 und 240 h leicht ab. In Kulturen mit $0,5$ und $5 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ erreichten die MPNs deutlich verzögert ein geringeres Maximum. In Kulturen mit SDS schien sich der initiale Anstieg der MPNs um etwa 24 h zu verzögern, jedoch konnte dieser Effekt aufgrund der großen Streuung der Werte nicht signifikant nachgewiesen werden.

In Tabelle 4.2 sind die mittleren Lebendzellzahlen, sowie die nach Guteman (1962) ermittelten maximalen Standardabweichungen $\hat{\sigma}_{\text{max}}$ zusammengestellt.

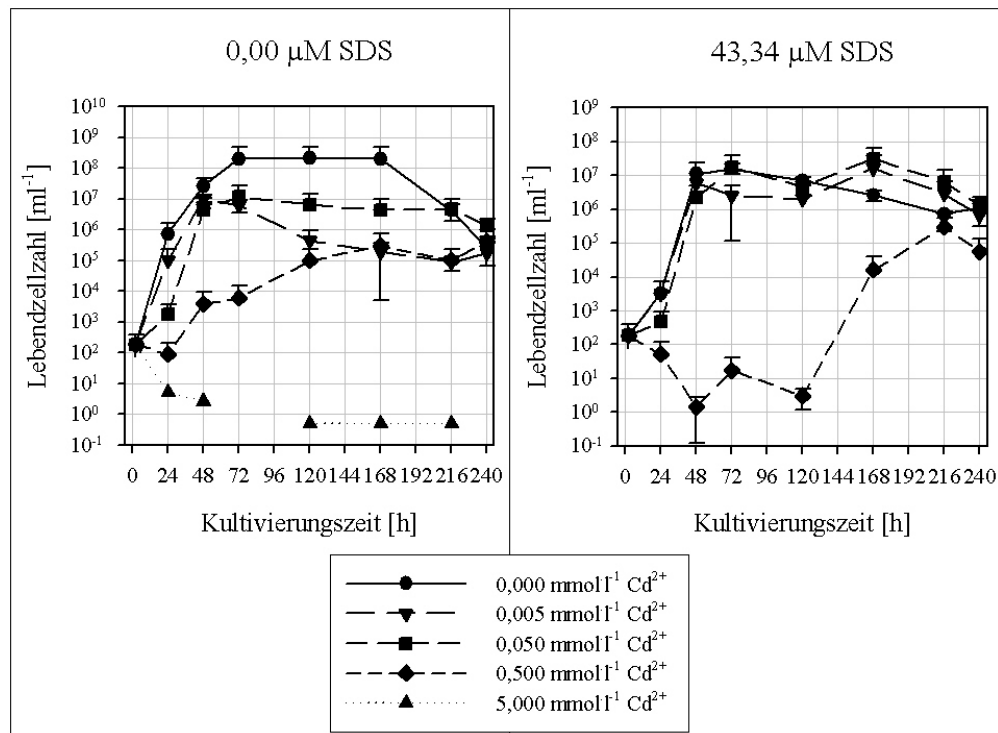


Abbildung 4.8.: MPNs der bakteriellen Gemeinschaft mit verschiedenen Cd^{2+} - und SDS-Konzentrationen als Funktion der Kultivierungszeit. Die Werte repräsentieren den Mittelwert der MPNs aus 2 unabhängigen Versuchen und das 95 %-ige Konfidenzintervall.

Tabelle 4.2: Lebendzellzahlen der APB in Abhängigkeit von Cd²⁺- und SDS-Konzentration, sowie der Kultivierungszeit t [h]. Dargestellt sind die Mittelwerte der MPNs aus zwei unabhängigen Versuchen, sowie die maximale Standardabweichung $\hat{\sigma}_{\max}$ nach Guteman (1962) (Kap. 3.8).

APB	Cd ²⁺ [mmol l ⁻¹]									
	0,000		0,005		0,050		0,500		5,000	
Cd ²⁺ [mM]										
t [h]	\bar{n} ml	$\hat{\sigma}_{\max}$	\bar{n} ml	$\hat{\sigma}_{\max}$	\bar{n} ml	$\hat{\sigma}_{\max}$	\bar{n} ml	$\hat{\sigma}_{\max}$	\bar{n} ml	$\hat{\sigma}_{\max}$
Kulturen ohne SDS										
24 h	7,4·10 ⁵	8,7·10 ⁵	9,9·10 ⁴	1,4·10 ⁵	1,8·10 ³	2,1·10 ³	8,9·10 ¹	1,2·10 ²	5,1	--
48 h	2,6·10 ⁷	2,0·10 ⁷	1,1·10 ⁷	2,6·10 ⁶	4,4·10 ⁶	6,1·10 ⁶	3,9·10 ³	5,6·10 ³	2,7	--
72 h	2,0·10 ⁸	2,8·10 ⁸	6,3·10 ⁶	2,8·10 ⁶	1,2·10 ⁷	1,6·10 ⁷	6,2·10 ³	8,7·10 ³	0,0	--
120 h	2,1·10 ⁸	2,7·10 ⁸	4,4·10 ⁵	5,4·10 ⁵	6,6·10 ⁶	8,1·10 ⁶	9,9·10 ⁴	1,4·10 ⁵	0,5	--
168 h	2,0·10 ⁸	2,8·10 ⁸	1,9·10 ⁵	1,9·10 ⁵	4,4·10 ⁶	5,4·10 ⁶	3,0·10 ⁵	4,2·10 ⁵	0,5	--
216 h	4,3·10 ⁶	2,4·10 ⁶	9,2·10 ⁴	4,5·10 ⁴	4,6·10 ⁶	5,2·10 ⁶	9,9·10 ⁴	1,4·10 ⁵	0,5	--
240 h	2,8·10 ⁵	2,1·10 ⁵	1,8·10 ⁵	2,1·10 ⁵	1,4·10 ⁶	8,2·10 ⁵	4,1·10 ⁵	5,8·10 ⁵	0,0	--
Kulturen mit 43,34 μmol l⁻¹ SDS										
24 h	3,3·10 ³	3,9·10 ³	3,3·10 ³	3,5·10 ¹	4,7·10 ²	5,0·10 ²	5,1	68,6	--	--
48 h	1,1·10 ⁷	1,3·10 ⁷	6,0·10 ⁶	0	2,2·10 ⁶	3,0·10 ⁶	1,4	1,3	--	--
72 h	1,6·10 ⁷	5,3·10 ⁶	2,5·10 ⁶	2,4·10 ⁶	1,70·10 ⁷	2,2·10 ⁷	1,8	24,1	--	--
120 h	7,1·10 ⁶	1,6·10 ⁶	2,0·10 ⁶	2,8·10 ⁶	4,6·10 ⁶	1,9·10 ⁶	3,0	1,8	--	--
168 h	2,6·10 ⁶	9,0·10 ⁵	1,6·10 ⁷	2,3·10 ⁷	3,1·10 ⁷	3,2·10 ⁷	1,6·10 ⁴	2,3·10 ⁴	--	--
216 h	7,1·10 ⁵	1,6·10 ⁵	2,9·10 ⁶	3,8·10 ⁶	6,6·10 ⁶	8,1·10 ⁶	3,0·10 ⁵	4,2·10 ⁵	--	--
240 h	1,1·10 ⁶	1,2·10 ⁶	6,8·10 ⁵	7,9·10 ⁵	1,3·10 ⁶	9,8·10 ⁵	5,6·10 ⁴	7,9·10 ⁴	--	--

4.2.1.3. Kultivierbarkeit C der bakteriellen Gemeinschaft

Cadmium verringerte die Lebendzellzahl Acetat-Pyruvat-konsumierender Bakterien (APB) (Kap. 4.2.1.2), wirkte jedoch nicht auf die Gesamtzellkonzentration (Kap. 4.2.1.1). Daher wurde die Größe Kultivierbarkeit (C: culturability) als relativer Anteil der Zahl lebender (n_{lebend}) APB an der Gesamtzellkonzentration (n_{gesamt}) berechnet:

$$C = \frac{\bar{n}_{\text{lebend}} \cdot 100}{\bar{n}_{\text{gesamt}}} \quad [\%]$$

Die mittlere Kultivierbarkeit \bar{C} der APB (nach unterschiedlicher Kultivierungsdauer) ist in Abbildung 4.9 als Funktion der Cd²⁺-Konzentration dargestellt. Steigende Cd²⁺-Konzentrationen verringerten die C. In Kulturen ohne Noxen erreichten die MPNs zwischen 0,1 (+0,4/-0,2) und 119 (+322/-149) % der Gesamtzellkonzentration. In Kulturen, die Cd²⁺ enthielten, führten steigende Cd²⁺-Konzentrationen zum Sinken der Kultivierbarkeit.

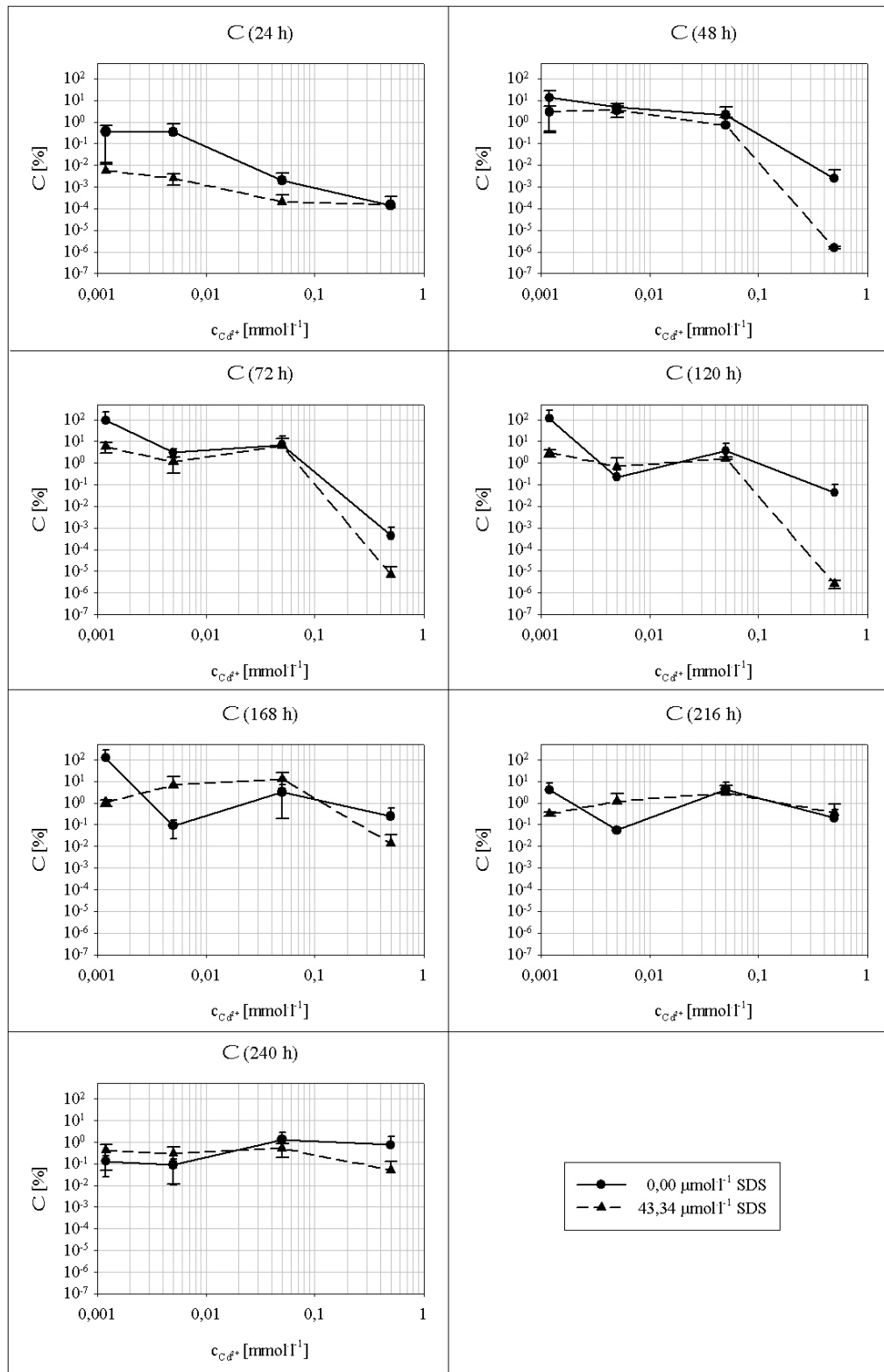


Abbildung 4.9.: Kultivierbarkeit C nach 24, 48, 72, 120, 168, 216 und 240 h Kultivierungsdauer als Funktion der Cd^{2+} -Konzentration. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert aus 2 unabhängigen Versuchen. Die Fehlerbalken markieren die zugehörigen maximalen Standardabweichungen nach Guteman (1962).

Die Ausprägung des toxischen Effekts variierte im Kulturverlauf. In Kulturen, die eine Kombination aus Cd^{2+} und SDS, war im frühen Kulturstadium eine eindeutige Verstärkung des toxischen Effekts durch SDS zu sehen, während in alten Kulturen (≥ 168 h) keine Toxizität mehr nachweisbar war. Die Signifikanz dieser Effekte wurde mithilfe der maximalen Standardabweichung nach Guteman (1962) abgeschätzt (Kap. 3.8): Es wurde ermittelt, ob die \bar{C} Cd^{2+} -haltiger Kulturen signifikant gegenüber der \bar{C} Cd^{2+} -freier Kulturen vergleichbarer Kultivierungszeit und SDS-Konzentration verringert war. In Tabelle 4.3 sind die Ergebnisse dieses qualitativen Nachweises der Effekte von Cadmium und der Kombination von Cadmium mit SDS zusammengefaßt.

Tabelle 4.3.: Kultivierbarkeit: Bestimmung der niedrigsten Effektkonzentration (LOEC) des Cadmiums:

- ⬇ signifikant (Kap. 3.8) verringerte C .
- ⬆ signifikant erhöhte C .
- keine signifikante Veränderung der C .

[SDS]	0,00 μM			43,34 μM		
[Cd^{2+}]	0,005 mM	0,050 mM	0,500 mM	0,005 mM	0,050 mM	0,500 mM
24 h	•	⬇	⬇	•	•	•
48 h	•	•	⬇	•	•	⬇
72 h	•	•	•	⬇	•	⬇
120 h	•	•	•	⬇	⬇	⬇
168 h	•	•	•	•	•	⬇
216 h	•	•	•	•	•	•
240 h	•	•	•	•	•	•

Aus Tabelle 4.3 lassen sich die niedrigsten Konzentrationen von Cd^{2+} und der Kombination von Cd^{2+} und SDS ableiten, bei denen ein Effekt auf die Kultivierbarkeit der APB im Kulturverlauf nachweisbar war (LOECs - lowest observed effect concentrations). Die LOECs variierten abhängig von der SDS-Konzentration und Kultivierungsdauer zwischen 0,005 und 0,500 mmol l^{-1} Cd^{2+} .

Ebenso, wie die LOEC, variierte die Cd^{2+} -Toxizität auf die \bar{C} im Verlauf der Kultivierung: Sei F der Faktor, um den die \bar{C} durch Erhöhung der Cd^{2+} -Konzentration von 0,0 auf 0,5 mmol l^{-1} verringert wurde.

$$C_{0,0\text{mM Cd}^{2+}} = F \cdot C_{0,5\text{mM Cd}^{2+}} \Leftrightarrow F = \frac{C_{0,0\text{mM Cd}^{2+}}}{C_{0,5\text{mM Cd}^{2+}}}$$

In Abbildung 4.10 ist der Faktor F als Funktion der Kultivierungsdauer dargestellt. Die größte Toxizität hatte Cd^{2+} zwischen 48 und 120 h Kultivierungszeit. Ab 216 h wurde die Kultivierbarkeit nicht mehr nachweisbar verringert.

Zudem war F in Kulturen mit $43,34 \mu\text{mol l}^{-1}$ SDS, von 48 bis 120 h Kulturdauer größer, als in vergleichbaren Kulturen ohne SDS. SDS verstärkte somit in diesem Zeitraum die (zeitabhängige) Toxizität von Cd^{2+} auf die Kultivierbarkeit der APB.

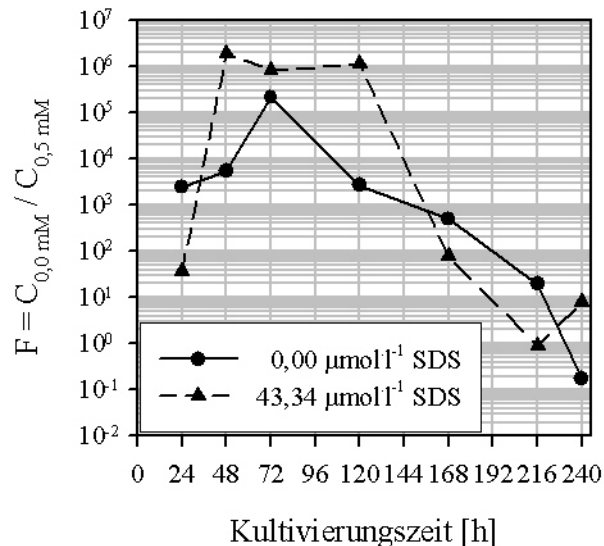


Abbildung 4.10.: Verringerung der \bar{C} um den Faktor F durch Erhöhung der Cd^{2+} -Konzentration von 0,0 auf 0,5 mM als Funktion der Kultivierungsdauer.

Weder Cadmium noch SDS beeinflussten die Gesamtzellzahl der bakteriellen Gemeinschaft. Die Lebendzellzahl sank dagegen mit steigender Cd^{2+} -Konzentration und variierte zudem mit der Kultivierungsdauer. Mithilfe der Größe der Kultivierbarkeit konnte die zeitliche Variation des toxischen Effekts des Cd^{2+} auf die Lebendzellzahl ermittelt werden. Die Toxizität des Cadmiums war zwischen 48 und 120 h Kultivierung am größten. SDS verstärkte diesen Effekt.

4.2.2. Metabolische Diversität der Gemeinschaft

Die Metabolische Diversität der bakteriellen Gemeinschaft wurde über die Erstellung von Substratverwertungsspektren mit der Ecolog[®]-Methode, sowie über die Ermittlung der wahrscheinlichsten Lebendzellzahl der Acetat-Pyruvat-verwertenden, denitrifizierenden, Sulfat-reduzierenden sowie Methanol-verwertenden Bakterien (MPN) bestimmt.

In Kapitel 4.2.2.1 werden die Substratverwertungsspektren, in Kapitel 4.2.2.2 die Ergebnisse der MPN beschrieben.

4.2.2.1. Substratverwertungsspektren - Ecolog®

In Abbildung 4.11 ist das Substratverwertungsspektrum in Kulturen mit unterschiedlicher Cd^{2+} - und SDS-Konzentration im Verlauf der Kultivierungszeit dargestellt. Dargestellt sind jeweils die arithmetischen Mittel der Anzahl der verwerteten Substrate aus 2 unabhängigen Versuchen mit jeweils 3 parallelen Messungen pro Probe, sowie die zugehörige Standardabweichung. Da die Lebendzellzahlen einiger Begiftungsversuche mit $0,5 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ zu gering waren, um Substratverwertungsspektren bestimmen zu können, wurde in diesen Fällen nicht mit $n = 6$, sondern mit weniger Ansätzen gearbeitet. Für jeden Wert ist n daher über den Balken angegeben.

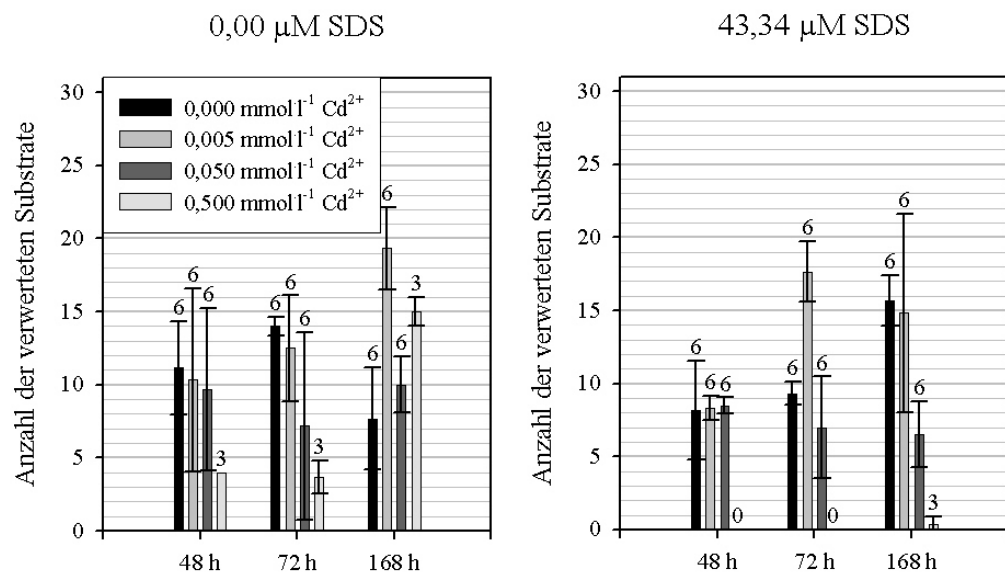


Abbildung 4.11.: Anzahl der von der bakteriellen Gemeinschaft verwerteten Substrate. Die Daten basieren auf 1 - 2 unabhängigen Versuchen à 3 parallelen Messungen pro Cd^{2+} - und SDS-Konzentration. Die daraus resultierende Anzahl der Messungen n ist jeweils über den Balken der Standardabweichung angegeben.

In allen Kulturen änderte sich die Zahl der verwerteten Substrate im Kulturverlauf. Obwohl die Unterschiede der Anzahl der verwerteten Substrate in parallelen Begiftungsversuchen z.T. sehr groß waren (6,7 bis 92,3 % der jeweils verwerteten Substrate), konnten Einflüsse von SDS, Cd^{2+} und Kultivierungszeit auf die Substratverwertung nachgewiesen werden.

Cadmium: In Cd^{2+} -haltigen Kulturen ohne SDS konnte nach 48 und 72 h, in Kulturen mit Cd^{2+} + SDS nach 168 h eine verringerte Anzahl der verwerteten Substrate gegenüber vergleichbaren Kulturen ohne Cd^{2+} nachgewiesen werden.

Der Effekt war statistisch signifikant (t-Test, 95 %). In 48 h alten Kulturen ohne SDS sank die Anzahl der verwerteten Substrate von $11,2 \pm 3,2$ (ohne Cd^{2+}) auf $4,0 \pm 0,0$ ($0,5 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$). In 72 h alten Kulturen ohne SDS sank sie von $14,0 \pm 0,6$ (ohne Cd^{2+}) auf $3,7 \pm 1,2$ ($0,5 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$), in 168 h alten Kulturen mit SDS sank sie von $15,7 \pm 1,8$ (ohne Cd^{2+}) auf $0,3 \pm 0,6$ ($0,5 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$). In 168 h alten Kulturen ohne SDS, sowie in 48 und 72 h alten Kulturen mit SDS konnten entweder keine Unterschiede zwischen Cd^{2+} -freien und -haltigen Kulturen nachgewiesen werden (48 h, ohne SDS), oder die Änderungen korrelierten nicht mit der Cd^{2+} -Konzentration (168 h, ohne SDS; 72 h mit SDS).

SDS: In Kulturen, die $43,34 \mu\text{mol l}^{-1}$ SDS enthielten, konnten nur unsystematische Änderungen der Zahl der verwerteten Substrate statistisch signifikant (t-Test, 95 %) nachgewiesen werden. In Anwesenheit von SDS verwerteten Gemeinschaften aus 168 h alten Kulturen (ohne Cd^{2+}) mehr ($15,7 \pm 1,8$) Substrate, als in vergleichbaren Kulturen ohne SDS ($7,7 \pm 3,5$). Dagegen wurde in SDS-haltigen Kulturen (ohne Cd^{2+}) nach 72 h Kultivierung eine geringere Zahl ($9,3 \pm 0,8$) verwerteter Substrate nachgewiesen, als in vergleichbaren Kulturen ohne SDS ($14,0 \pm 0,6$). Ebenso wurde in SDS-haltigen, 168 h alten Kulturen mit $0,5 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ eine geringere Zahl ($0,3 \pm 0,6$) der Substrate verwertet, als in vergleichbaren Kulturen ohne SDS ($15,0 \pm 1,0$).

Kultivierungszeit: Änderungen der Zahl der verwerteten Substrate im Verlauf der Kultivierungszeit konnten statistisch signifikant (t-Test, 95 %) konnten nur in Kulturen ohne Cd^{2+} , mit $43,34 \mu\text{mol l}^{-1}$ SDS (Zunahme der Anzahl von $8,2 \pm 3,4$ (48 h), bzw. $9,3 \pm 0,8$ (72 h) auf $15,7 \pm 1,8$ (168h)), sowie in Kulturen mit $0,5 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$, ohne SDS (Zunahme der Anzahl von $4,0 \pm 0,0$ (48 h), bzw. $3,7 \pm 1,2$ (72 h) auf $15,0 \pm 1,0$ (168 h)) nachgewiesen werden.

Auswertung der Substratverwertungsspektren *en detail*:

In Abbildung 4.12 sind die Substratverwertungsspektren der bakteriellen Gemeinschaften nach 48, 72 und 168 h Kultivierung *en detail* dargestellt.

Die Verwertung 31 verschiedener Substrate wurde für jeden der *in duplo* durchgeführten Begiftungsversuche in 3 parallelen Messungen erfaßt. Für jedes der Substrate wurde die Anzahl der Testfelder mit nachgewiesener Verwertung

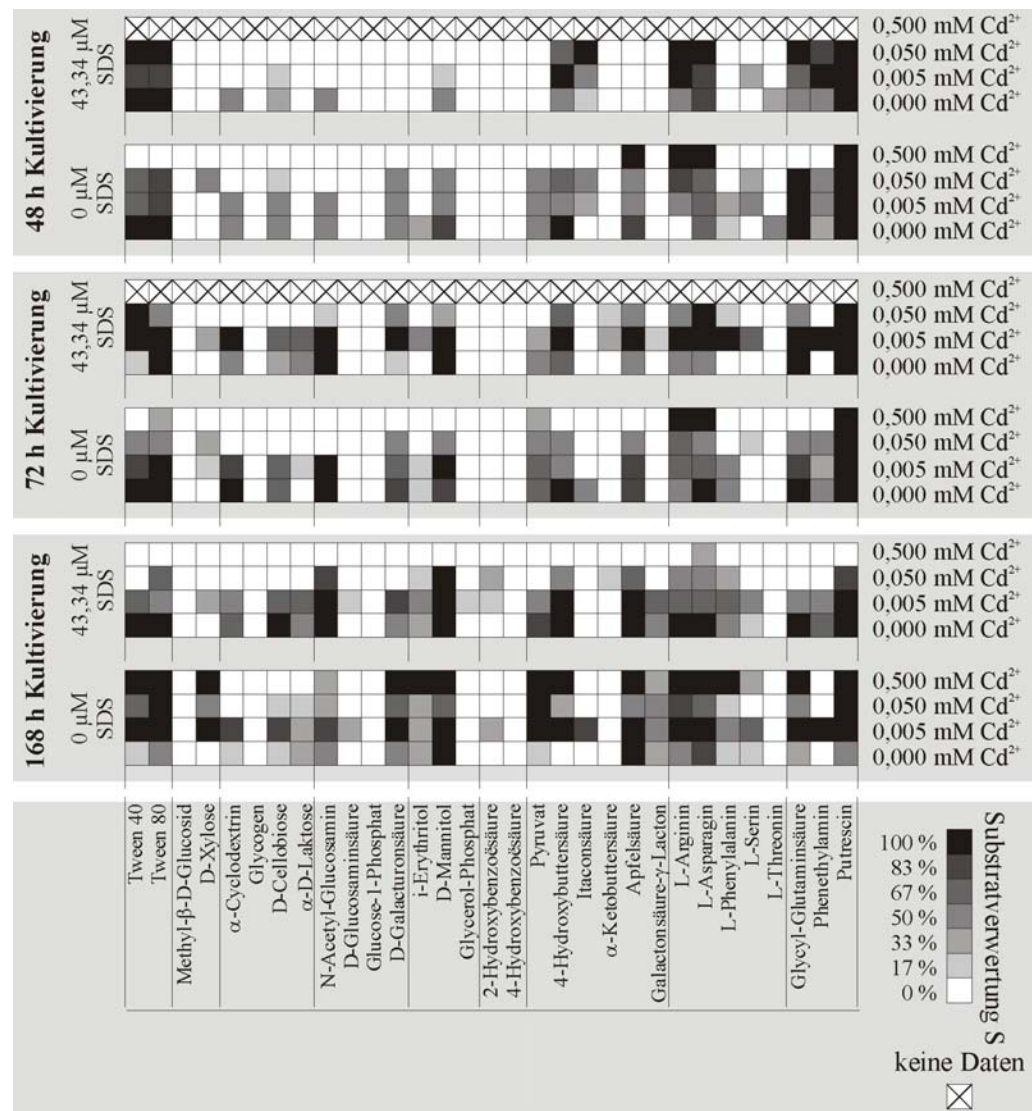


Abbildung 4.12.: Substratverwertungsspektren (Ecolog®) der Gemeinschaft nach 48 h, 72 h und 168 h in Kulturen mit 43,34 μM SDS, bzw. ohne SDS in Abhängigkeit von der Cd²⁺-Konzentration. Daten aus 2 unabhängigen Versuchen à 3 parallelen Messungen. Die Graustufen repräsentieren für jedes Substrat die Substratverwertung S als relativen Anteil [%] der positiven Messungen.

der Substrate als relativer Anteil [%] der (2 × 3) Testfelder berechnet (Abb. 4.12).

Asparagin und Putrescin wurde von allen Kulturen durchgängig verwertet. Vier der 31 Substrate wurden zu keinem Zeitpunkt verwertet (Methyl-D-Glukosid, Glycogen, Glucose-1-Phosphat, 4-Hydroxybenzoësäure). Drei weitere Substrate wurden erst nach 72 h Kultivierung verwertet (Laktose, α-Ketobuttersäure, Galactonsäure-γ-Lacton). Wiederum drei Substrate wurden erst nach 72 h Kultivierung verwendet (D-Glucosaminsäure, Glycerol-Phosphat, 2-Hydroxy-

benzoësäure). Nur für ein Substrat (Threonin) wurde die Verwertung ausschließlich nach 48 h nachgewiesen. Für alle weiteren Substrate konnte ein sehr differenziertes Verwertungsspektrum nachgewiesen werden.

Zur Ermittlung der Wirkung von Cd²⁺, SDS, sowie Cd²⁺ in Kombination mit SDS wurden die Differenzen (ΔS) der Substratverwertung (S) wie folgt errechnet:

$$\Delta S = S_{\text{Noxe}} - S_{\text{Nullkontrolle}} \quad \text{mit} \quad S = \text{Substratverwertung [\%]}$$

ΔS = Differenz der Substratverwertung

In Abbildung 4.13 sind die Differenzen ΔS der Kulturen mit 43,34 μM SDS zu Kulturen ohne SDS dargestellt. In Abb. 4.14 ist die Differenz ΔS der Cd²⁺-haltigen Kulturen zu den S der Nullkontrollen und in Abb. 4.15 die der Kulturen mit Cd²⁺ und SDS dargestellt.

Die Zuordnung der Substratnummern in Abb. 4.13 - 4.15 ist Tabelle 4.4 zu entnehmen.

Tabelle 4.4.: Zuordnung der Nummern in Abb. 4.13 - 4.15 zu den jeweiligen Substraten.

Nr.	Substrat	Nr.	Substrat	Nr.	Substrat
1	Tween 40	13	i-Erythritol	23	D-Galactonsäure-γ-lacton
2	Tween 80	14	D-Mannitol		
3	β-Methyl-D-Glucosid	15	D,L-α-Glycerin-Phosphat	24	L-Arginin
4	D-Xylose			25	L-Asparagin
5	α-Cyclodextrin	16	2-Hydroxybenzoësäure	26	L-Phenylalanin
6	Glycogen	17	4-Hydroxybenzoësäure	27	L-Serin
7	D-Cellobiose	18	Brenztraubensäure-Methylester	28	L-Threonin
8	α-D-Laktose			29	Glycyl-L-Glutaminsäure
9	N-Acetyl-D-Glucosamin	19	4-Hydroxybuttersäure	30	Phenethylamin
10	D-Glucosaminsäure	20	Itaconsäure	31	Putrescin
11	Glucose-1-Phosphat	21	α-Ketobuttersäure		
12	D-Galacturonsäure	22	D-Apfelsäure		

Wirkung von SDS auf die metabolische Diversität der Gemeinschaft in Cd²⁺-freien Kulturen

In Abbildung 4.13 sind die Differenzen ΔS der Substratverwertungsspektren SDS-haltiger und SDS-freier Kulturen nach 48, 72 und 168 h Kultivierung dargestellt.

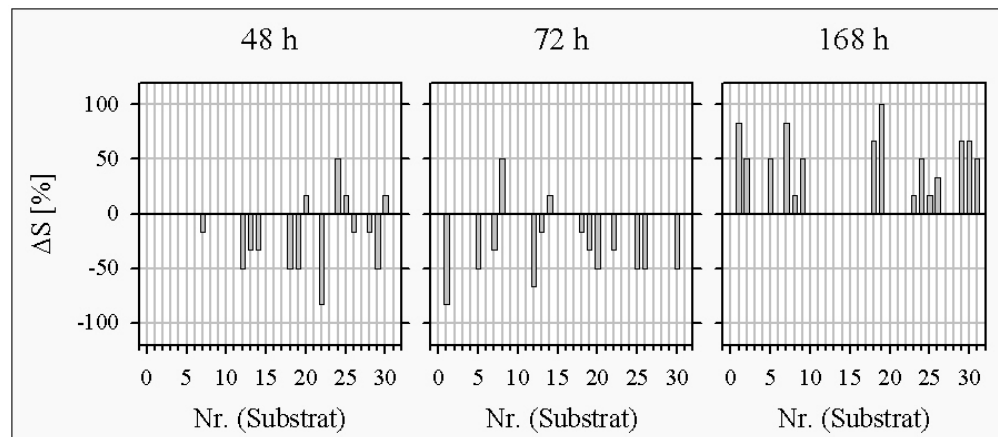


Abbildung 4.13.: Einfluß von SDS auf die Substratverwertung S der bakteriellen Gemeinschaft. Die Balken repräsentieren für jedes der 31 Substrate (Zuordnung der Nummern: Tab. 4.4) die Differenz ΔS der Verwertung in Kulturen ohne und in Kulturen mit $43,34 \mu\text{M}$ SDS:

$$\Delta S = S(43,34 \mu\text{M SDS}) - S(0,00 \mu\text{M SDS}).$$

Die Wirkung von SDS war abhängig von der Kultivierungszeit. Während SDS in 48 und 72 h alten Kulturen SDS vor allem hemmend auf die Substratverwertung wirkte, konnten in 168 h alten Kulturen ausschließlich verwertungsfördernde Effekte nachgewiesen werden.

Wirkung von Cadmium auf die metabolische Diversität der Gemeinschaft

In Abbildung 4.14 sind die Differenzen ΔS der Substratverwertungsspektren Cd²⁺-haltiger (0,005, 0,050 und 0,500 mM Cd²⁺) und Cd²⁺-freier Kulturen nach 48, 72 und 168 h Kultivierung dargestellt.

Mit zunehmender Cd²⁺-Konzentration verringerte sich die Anzahl der verwerteten Substrate und die relative Verwertung der Substrate (Abb. 4.14). Dieser Effekt verstärkte sich mit zunehmender Kulturzeit bis 72 h. Nach 168 h Kulturdauer zeigten die Gemeinschaften wieder ein erhöhtes Substratverwertungsspektrum und eine erhöhte relative Verwertung der Substrate. Der Effekt war abhängig von der Cd²⁺-Konzentration und in Kulturen mit 0,5 mM Cd²⁺ am geringsten ausgeprägt.

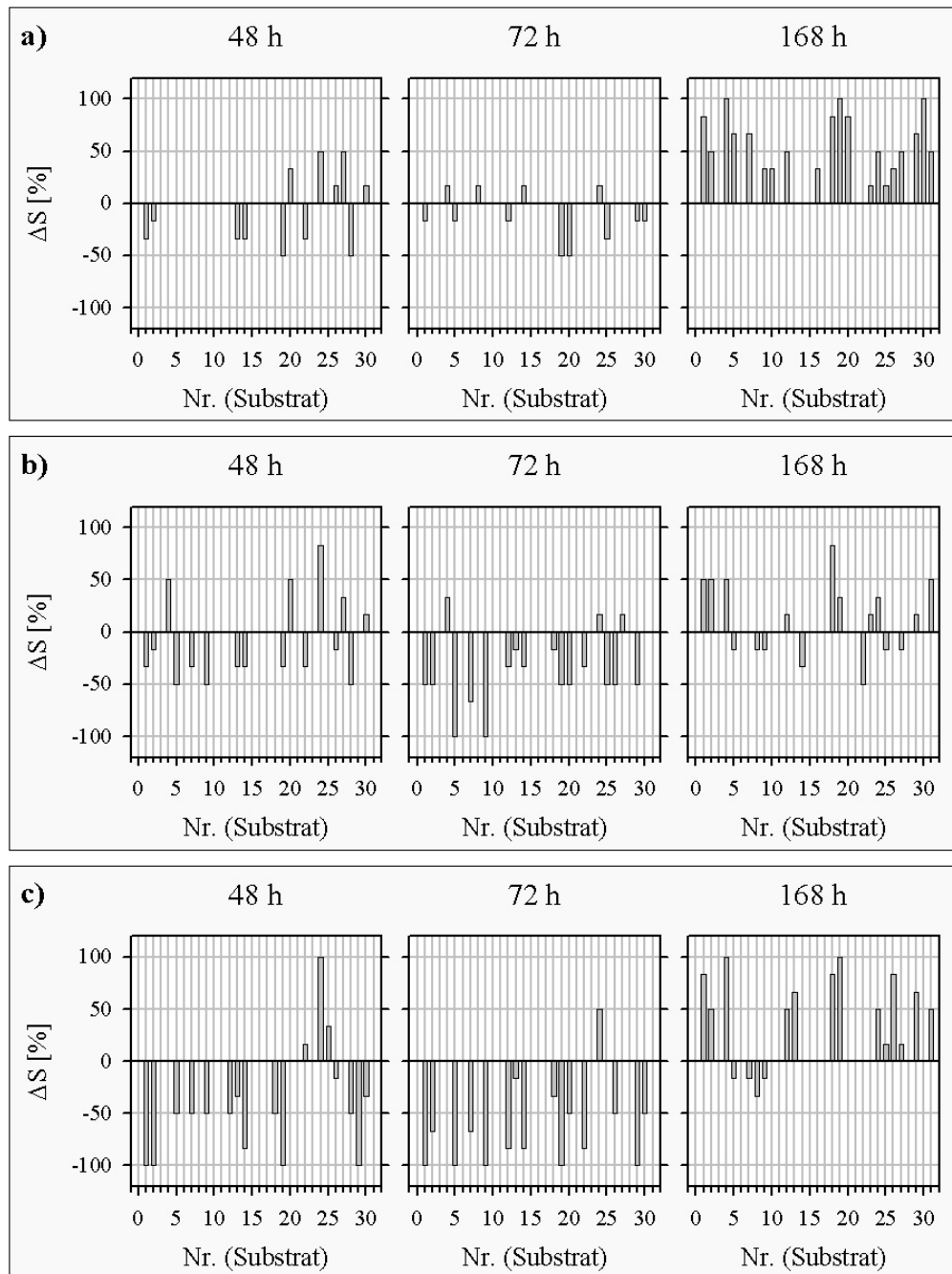


Abbildung 4.14.: Einfluß von Cd^{2+} auf die Substratverwertung S der bakteriellen Gemeinschaft. Die Balken repräsentieren für jedes der 31 Substrate (Zuordnung der Nummern: Tab. 4.4) die Differenz ΔS der Verwertung in Kulturen ohne und in Kulturen mit $43,34 \mu M$ SDS:

$$\Delta S = S(x \text{ mM } Cd^{2+}) - S(0,00 \text{ mM } Cd^{2+}).$$

a) $0,005 \text{ mM } Cd^{2+}$

b) $0,050 \text{ mM } Cd^{2+}$

c) $0,500 \text{ mM } Cd^{2+}$

Kombinationswirkung von Cd²⁺ und SDS auf die metabolische Diversität der Gemeinschaft

In Abbildung 4.15 sind die Differenzen der Substratverwertungsspektren (ΔS) von Kulturen dargestellt, die alle 43,34 μM SDS und variierende Cd²⁺-Konzentrationen (0,005, 0,050 und 0,500 mM Cd²⁺) enthielten. Die Substratverwertungsspektren wurden nach 48, 72 und 168 h Kulturzeit erhoben. Als Referenz ($S_{\text{Nullkontrolle}}$) wurden Proben aus SDS- und Cd²⁺-freien Kulturen eingesetzt.

Analog zu den Substratverwertungsspektren der Kulturen mit Cd²⁺, stieg nach 72 h Kulturzeit auch in den Begiftungsversuchen mit SDS und Cd²⁺ die Anzahl der Substrate mit gehemmter Verwertung mit steigender Cd²⁺-Konzentration an. In den Substratverwertungsspektren der Begiftungsversuche mit Cd²⁺ und SDS nach 168 h Kultivierung nahm ebenfalls die Zahl der Substrate mit gehemmter Verwertung zu.

Dagegen wirkte sich in 168 h alten Kulturen, die 0,500 mM Cd²⁺, jedoch kein SDS enthielten, das Cd²⁺ in einer verringerten Anzahl an Substraten mit erhöhter Verwertung aus, nicht aber in einer erhöhten Anzahl von Substraten, deren Verwertung gehemmt war.

Zusammenfassend führte die kombinierte Wirkung von Cd²⁺ und SDS zu komplexen Reaktionen der Substratverwertungsspektren der bakteriellen Gemeinschaft. Die Reaktion variierte zudem mit der Kultivierungsdauer. Die Reaktion der Gemeinschaft nach 48 und 72 h Kultivierung unterschied sich tendenziell von der der Gemeinschaft nach 168 h Kultivierung.

Änderungen der Substratverwertungsspektren der bakteriellen Gemeinschaft konnten nicht eindeutig nur einem der drei Faktoren Cd²⁺, SDS und Kultivierungsdauer zugeordnet werden: Zu- oder Abnahme der nachgewiesenen Substratverwertung variierten sowohl mit der SDS-, als auch der Cd²⁺-Konzentration und dem Alter der Kulturen. Eine Verwertung von Methyl-D-Glukosid, Glycogen, Glucose-1-Phosphat und 4-Hydroxybenzoësäure durch die bakterielle Gemeinschaft konnte unabhängig von der Cd²⁺- und SDS-Konzentration, sowie dem Alter der Kulturen nicht nachgewiesen werden. Putrescin wurde dagegen durchgängig von der Gemeinschaft in allen Kulturen verwertet, was auf einen hohen Anteil an Destruenten von tierischer Biomasse schließen läßt.

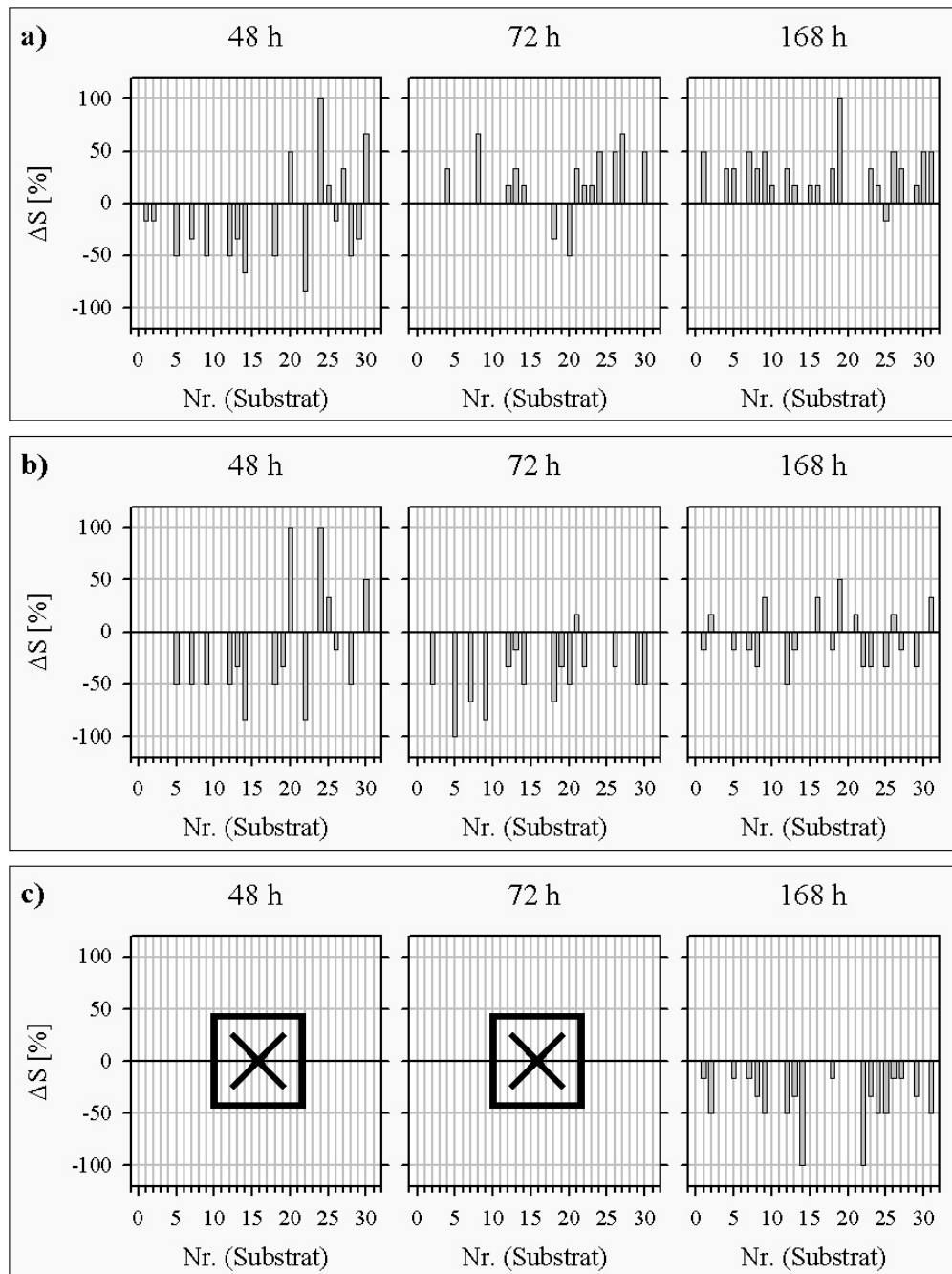


Abbildung 4.15.: Einfluß von Cd^{2+} + SDS auf die Substratverwertung S der bakteriellen Gemeinschaft. Die Balken repräsentieren für jedes der 31 Substrate (Zuordnung der Nummern: Tab. 4.4) die Differenz ΔS der Verwertung in Kulturen ohne und in Kulturen mit $43,34 \mu M$ SDS:

$$\Delta S = S(x \text{ mM } Cd^{2+} + 43,34 \mu M \text{ SDS}) - S(0,00 \text{ mM } Cd^{2+}/0,00 \mu M \text{ SDS}).$$

☒ = keine Daten.

Clusteranalyse der Substratverwertungsspektren

Für jedes der 31 Substrate des Ecolog[®]-Tests (Tab. 3.7) wurde der relative Anteil der Wells mit positiver Farbreaktion bestimmt. Die Daten dienten einerseits als Grundlage für die Erstellung von Substratverwertungsspektren (vgl. Abb. 4.12 a-c) und wurden andererseits genutzt, um mittels Clusteranalyse die relativen Ähnlichkeiten zwischen den Substratverwertungsspektren zu ermitteln. In Abbildung 4.16 sind die relativen Ähnlichkeiten der Substratverwertungsspektren dargestellt.

Im Dendrogramm der Clusteranalyse konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen den relativen Ähnlichkeiten der Substratverwertungsspektren und der Cd²⁺-Konzentration, der SDS-Konzentration, oder der Kultivierungszeit identifiziert werden:

- **Cd²⁺:** Die mittlere Ähnlichkeit der Spektren der Cd²⁺-freien Kulturen betrug $72,1 \pm 8,7$ %, die der Kulturen mit $0,005 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ $67,3 \pm 21,4$ %. Kulturen mit $0,050 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ ähnelten sich im Mittel zu $72,5 \pm 9,9$ %, Kulturen mit $0,500 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ zu $56,0 \pm 26,0$ %.
- **SDS:** Die Substratverwertungsspektren der SDS-freien Kulturen besaßen untereinander eine mittlere Ähnlichkeit von $66,0 \pm 18,2$ %, die Kulturen mit $43,34 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1} \text{ SDS}$ eine von $64,1 \pm 14,9$ %.
- **Kultivierungszeit:** Die Ähnlichkeiten der Spektren der Gemeinschaften nach 48 h Kultivierung ähnelten sich im Mittel zu $63,7 \pm 16,8$ %. Nach 72 h Kultivierung betrug die mittlere Ähnlichkeit $62,2 \pm 21,8$ %, nach 168 h Kultivierung $72,9 \pm 10,6$ %.

Somit konnte kein Faktor identifiziert werden, der alleine die relativen Ähnlichkeiten der Substratverwertungsspektren beeinflusst und somit zur Bildung von Clustern geführt hätte. Insgesamt variierten die Ähnlichkeiten zwischen den Spektren zwischen 41 und 100 %.

Die Auswertung der Substratverwertungsspektren, sowohl *en detail*, als auch mittels Clusteranalyse, konnte keinen allgemeinen Trend in der Wirkung von Cd²⁺ oder SDS auf die Substratverwertung der Gemeinschaft ermitteln. Die Auswirkungen von Cd²⁺ und SDS variierten sowohl von Substrat zu Substrat, mit der Cd²⁺-Konzentration als auch mit der Kultivierungszeit.

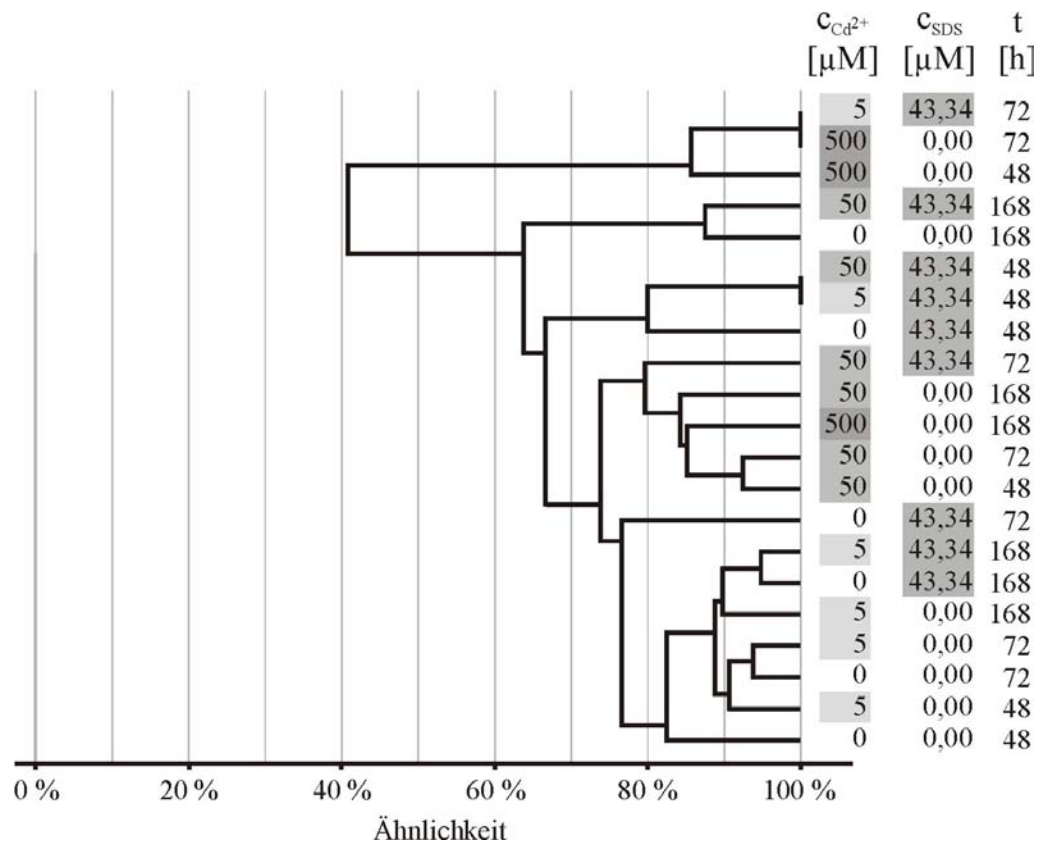


Abbildung 4.16.: Clusteranalyse der Substratverwertungsspektren: Dendrogramm der relativen Ähnlichkeiten der Substratverwertungsspektren.

4.2.2.2. Bestimmung der physiologischen Diversität mittels MPN

Die Methode der MPN (Kap. 3.5.4) wurde neben der Bestimmung der wahrscheinlichsten Lebendzellzahl der bakteriellen Gemeinschaft (als MPN der Acetat-Pyruvat-konsumierenden Bakterien (APB)) zur Bestimmung der physiologischen Diversität genutzt, indem mit selektiven Medien, bzw. Elektronenakzeptoren die Konzentration der denitrifizierenden (DNB), der Sulfat-reduzierenden (SRB), sowie der Methanol-konsumierenden Bakterien (MetB) ermittelt wurde.

- **APB:** Die wahrscheinlichste Lebendzellzahl der APB wurden bereits in Kap. 4.2.1.2 als MPN der bakteriellen Gemeinschaft beschrieben.
- **MetB:** In Tabelle 4.5 sind die Ergebnisse der Lebendzellzahlbestimmung der MetB zusammengestellt:

Die Lebendzellzahlen der MetB in den Kulturen waren insgesamt gering: Es wurden maximal $2,1 \cdot 10^3$ Zellen/ml nachgewiesen.

Die Lebendzellzahlen der MetB nahmen in 120 h alten, SDS-freien Kul-

turen ab $0,500 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$, sowie in 216 h alten, SDS-freien Kulturen ab $0,050 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ in, sowie in 216 h alten Kulturen mit $0,050 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ signifikant ab.

Ein statistisch signifikanter Einfluß von SDS auf die MPN der MetB konnte nur vereinzelt festgestellt werden: Nach 216 h Kultivierungsdauer übertrafen die MPNs SDS-haltiger Kulturen ohne Cd^{2+} signifikant die MPNs von vergleichbaren, SDS-freien Kulturen. Nach 120 h waren dagegen die MPNs SDS-haltiger Kulturen mit $0,050 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ signifikant geringer, als die von SDS-freien Kulturen.

Die Lebendzellzahl der MetB in der Gemeinschaft wurde demnach durch Cd^{2+} verringert. Die Auswirkungen von SDS auf die MetB waren dagegen unsystematisch und z.T. gegenläufig. Dies läßt vermuten, daß es sich bei den Unterschieden zwischen den MPNs der MetB in Kulturen ohne und mit SDS um methodisch bedingte Artefakte handelte.

- **SRB:** In Tabelle 4.6 sind die Ergebnisse der Lebendzellzahlbestimmung der SRB zusammengestellt:

Die wahrscheinlichste Lebendzellzahl der SRB in der bakteriellen Gemeinschaft betrug maximal 12 Zellen/ml. Sie lag nahe der Nachweisgrenze der verwendeten MPN-Methode (0,5 Zellen/ml). Die Lebendzellzahl der SRB wurde nicht erkennbar durch die Kulturdauer beeinflusst. Da die MPNs der SRB nur in einer Serie von Begiftungsversuchen bestimmt wurden, konnte $\hat{\sigma}_{\max}$ nicht bestimmt, und der Vergleich zwischen den MPNs der SRB verschiedener Kulturen nicht abgesichert geführt werden.

- **DNB:** In Tabelle 4.7 sind die Ergebnisse der Lebendzellzahlbestimmung der DNB zusammengestellt:

Mit steigender Cd^{2+} -Konzentration konnte ein Absinken der MPNs der DNB beobachtet werden. Sowohl in Kulturen ohne, als auch mit SDS konnten signifikant verringerte Lebendzellzahlen gegenüber den Lebendzellzahlen vergleichbarer, Cd^{2+} -freier Kulturen nachgewiesen werden. Dies galt für SDS-freie, 24 und 120 h alte Kulturen ab $0,005 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$, für 72 und 216 h alte Kulturen mit $5,000 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$, sowie für 168 h alte Kulturen mit $0,005$ und $5,000 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$. In Kulturen mit SDS wurden Cd^{2+} -vermittelte, signifikante Verringerungen der MPNs in 72 und 240 h

alten Kulturen mit $0,005 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ nachgewiesen.

Vereinzelt konnten statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Lebendzellzahlen SDS-freier und SDS-haltiger Kulturen gleicher Cd^{2+} -Konzentration nachgewiesen werden: Nach 24 h in Cd^{2+} -freien Kulturen und in Kulturen mit $0,005 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$, sowie zwischen 72 und 120 h in Kulturen mit $0,500 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ führte SDS zu geringeren MPNs. Nach 240 h in Cd^{2+} -freien, und nach 168 h in Kulturen mit $0,005 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ führte SDS zu signifikant höheren Lebendzellzahlen. Maximal wurden $1,0 \cdot 10^5$ DNB pro Milliliter nachgewiesen.

Somit waren - nach den APB - die DNB die physiologische Gruppe mit der zweitgrößten Abundanz in der Gemeinschaft. Ihre Lebendzellzahlen wurden durch Cadmium verringert. Systematische Effekte von SDS auf die MPNs der DNB konnten nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 4.5.: Lebendzellzahlen Methanol-verwertender Bakterien nach verschiedenen Kultivierungszeiten in Abhängigkeit von der Cd^{2+} - und SDS-Konzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte der MPNs aus 2 unabhängigen Versuchen, sowie die maximale Standardabweichung nach Guteman (1962) $\bar{n} \pm \hat{\sigma}_{\max}$ (Kap. 3.8) der MPN der MetB. Alle Werte haben die Dimension Zellen ml^{-1} .

MetB	24 h		48 h		72 h		120 h		168 h		216 h		240 h	
Cd^{2+} [$mmol\ l^{-1}$]	\bar{n} ml	$\hat{\sigma}_{\max}$	\bar{n} ml	$\hat{\sigma}_{\max}$	\bar{n} ml	$\hat{\sigma}_{\max}$	\bar{n} ml	$\hat{\sigma}_{\max}$	\bar{n} ml	$\hat{\sigma}_{\max}$	\bar{n} ml	$\hat{\sigma}_{\max}$	\bar{n} ml	$\hat{\sigma}_{\max}$
Kulturen ohne SDS														
0,000	2	2	99	140	3	4	51	44	222	296	26	9	0	0
0,005	0	0	300	424	435	615	162	230	27	38	162	230	34	48
0,050	0	0	3	4	21	30	8	6	24	26	4	6	42	57
0,500	0	0	0	0	300	424	0	0	9	12	3	4	1	1
5,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kulturen mit 43,34 $\mu mol\ l^{-1}$ SDS														
0,000	0	0	1	2	740	872	2111	2705	170	218	140	82	16	23
0,005	0	0	0	0	0	0	2012	2845	678	958	176	248	162	230
0,050	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3	0	0
0,500	0	0	0	0	0	0	0	0	4	6	162	230	2012	2845

Tabelle 4.6.: Lebendzellzahlen Sulfat-reduzierender Bakterien nach verschiedenen Kultivierungszeiten in Abhängigkeit von der Cd^{2+} - und SDS-Konzentration. Die MPN der SRB in Kulturen ohne SDS und Cd^{2+} wurden in duplo bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der MPNs aus 2 unabhängigen Versuchen, sowie die maximale Standardabweichung nach Guteman (1962) $\bar{n} \pm \hat{\sigma}_{max}$ (Kap. 3.8) der MPN der SRB. Die MPNs von Kulturen mit 0,005 bis 5 $mmol\ l^{-1}$ Cd^{2+} ohne SDS, sowie aller Versuche mit SDS wurden dagegen nur einfach bestimmt. Dargestellt sind daher nur die MPNs. Alle Werte haben die Dimension $Zellen\ ml^{-1}$.

SRB	24 h		48 h		72 h		120 h		168 h		216 h		240 h	
Cd^{2+} [$mmol\ l^{-1}$]	\bar{n} ml	$\hat{\sigma}_{max}$	\bar{n} ml	$\hat{\sigma}_{max}$	\bar{n} ml	$\hat{\sigma}_{max}$	\bar{n} ml	$\hat{\sigma}_{max}$	\bar{n} ml	$\hat{\sigma}_{max}$	\bar{n} ml	$\hat{\sigma}_{max}$	\bar{n} ml	$\hat{\sigma}_{max}$
Kulturen ohne SDS														
0,000	4	3	5	3	2	1	2	0	1	0	2	2	1	0
0,005	2	--	2	--	1	--	2	--	2	--	4	--	1	--
0,050	1	--	1	--	2	--	3	--	1	--	2	--	3	--
0,500	8	--	2	--	3	--	1	--	3	--	3	--	0	--
5,000	3	--	1	--	1	--	2	--	1	--	1	--	1	--
Kulturen mit 43,34 $\mu mol\ l^{-1}$ SDS														
0,000	2	--	1	--	1	--	1	--	1	--	1	--	1	--
0,005	1	--	1	--	3	--	1	--	3	--	3	--	1	--
0,050	5	--	12	--	7	--	7	--	3	--	3	--	8	--
0,500	0	--	0	--	2	--	1	--	8	--	8	--	11	--

Tabelle 4.7.: Lebendzellzahlen denitrifizierender Bakterien nach verschiedenen Kultivierungszeiten in Abhängigkeit von der Cd^{2+} - und SDS-Konzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte der MPNs aus 2 unabhängigen Versuchen, sowie die maximale Standardabweichung nach Guteman (1962) $\bar{n} \pm \hat{\sigma}_{\max}$ (Kap. 3.8) der MPN der DNB. Alle Werte haben die Dimension Zellen ml^{-1} .

DNB	24 h		48 h		72 h		120 h		168 h		216 h		240 h	
	\bar{n} [mmol l ⁻¹]	$\hat{\sigma}_{\max}$	\bar{n} ml	$\hat{\sigma}_{\max}$	\bar{n} ml	$\hat{\sigma}_{\max}$	\bar{n} ml	$\hat{\sigma}_{\max}$	\bar{n} ml	$\hat{\sigma}_{\max}$	\bar{n} ml	$\hat{\sigma}_{\max}$	\bar{n} ml	$\hat{\sigma}_{\max}$
Kulturen ohne SDS														
0,000	101	72	17581	21077	701	607	10113	3136	9163	4480	6609	6559	1169	1593
0,005	3	0	70	66	350	488	780	255	899	86	4260	5609	11244	12116
0,050	0	1	92	117	365	467	735	879	2146	2656	545	162	3112	3238
0,500	8	10	25	35	126	108	398	80	22001	29830	16242	22970	61653	87188
5,000	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	1	0
Kulturen mit 43,34 $\mu\text{mol l}^{-1}$ SDS														
0,000	0	0	13679	19066	5013	3797	64292	83456	100785	137638	64874	82632	21862	6453
0,005	1	0	309	277	87	122	3556	2611	14095	8084	29163	35156	910	1254
0,050	1	0	1	1	181	241	2013	2845	3274	3848	3437	4715	4781	5532
0,500	0	1	0	0	0	0	1	0	1731	2446	251	354	1164	1646

Physiologische Diversität nach Shannon (1949) und Wiener (1948) aus den MPN

Die physiologische Diversität der bakteriellen Gemeinschaft wurde mithilfe von Shannon-Wiener Indices (H_{Sh}) aus den MPN-Daten der APB, MetB, DNB und SRB beurteilt:

$$H_{Sh} = - \sum_{i=1}^s p_i \cdot \ln p_i \quad \text{mit} \quad p_i = \frac{n_i}{N}$$

Dabei war n_i die MPN der i -ten physiologischen Gruppe (APB, MetB, DNB oder SRB) und N die Summe der MPNs aller Gruppen.

In Abb. 4.17 ist der H_{Sh} in Abhängigkeit von der Cadmium- und SDS-Konzentration dargestellt. Dargestellt sind die H_{Sh} der *in duplo* durchgeführten Begiftungsversuche bis $0,5 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$, sowohl ohne, als auch mit $43,34 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ SDS, und der H_{Sh} eines Begiftungsversuchs mit $5 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$, ohne SDS. Die Linien der Graphen repräsentieren die Ergebnisse der nicht-linearen Regressionsanalyse nach Marquardt (1963). Den Regressionskurven liegt die Funktion einer Hyperbel zugrunde:

$$y = \frac{a \cdot x}{b + x} + \frac{d \cdot x}{e + x} + e \cdot x$$

In Tabelle 4.8 sind die jeweiligen a, b, c, d und e der verwendeten Funktionen zusammengefaßt.

Tabelle 4.8.: Variablen der Regressionsanalyse der physiologischen Diversität.

t [h]	Kulturen ohne SDS					Kulturen mit $43,34 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ SDS				
	a	b	c	d	e	a	b	c	d	e
24	0,25	0,14	0,27	0,14	$2,7 \cdot 10^{-10}$	0,15	0,14	0,31	0,13	$2,7 \cdot 10^{-2}$
48	0,36	1,01	0,36	1,01	$6,1 \cdot 10^{-11}$	$8,9 \cdot 10^{-17}$	0,04	$1,2 \cdot 10^{-16}$	0,19	0,53
72	0,26	1,81	0,26	1,81	$-5,5 \cdot 10^{-3}$	$-4,8 \cdot 10^{-3}$	$-3,0 \cdot 10^{-11}$	$-4,9 \cdot 10^{-3}$	$-4,4 \cdot 10^{-11}$	0,61
120	$2,0 \cdot 10^{-2}$	$9,7 \cdot 10^{-20}$	0,97	15,62	$-7,0 \cdot 10^{-17}$	$1,2 \cdot 10^{-8}$	0,30	$-4,0 \cdot 10^{-9}$	0,15	1,13
168	$2,8 \cdot 10^{-2}$	$-3,1 \cdot 10^{-19}$	0,30	1,46	$1,4 \cdot 10^{-17}$	$2,4 \cdot 10^{-2}$	$-3,2 \cdot 10^{-7}$	$2,5 \cdot 10^{-2}$	$3,2 \cdot 10^{-7}$	0,47
216	$3,4 \cdot 10^{-2}$	$-3,5 \cdot 10^{-7}$	$3,2 \cdot 10^{-2}$	$-3,4 \cdot 10^{-7}$	0,10	$5,5 \cdot 10^{-2}$	$-1,4 \cdot 10^{-7}$	$5,6 \cdot 10^{-2}$	$1,3 \cdot 10^{-7}$	$1,4 \cdot 10^{-1}$
240	$2,7 \cdot 10^{-2}$	$-1,5 \cdot 10^{-19}$	0,43	1,63	$2,3 \cdot 10^{-17}$	$6,3 \cdot 10^{-3}$	$-5,4 \cdot 10^{-7}$	$6,4 \cdot 10^{-3}$	$5,3 \cdot 10^{-7}$	0,53

Die Korrelation der Regressionskurven mit den H_{Sh} wird durch den Korrelationskoeffizienten R^2 ausgedrückt. Für $R^2 \leq 0,5$ wurde keine Korrelation, für $R^2 \leq 0,8$ wurde eine mittlere Korrelation und für $R^2 > 0,8$ wurde eine hohe Korrelation der Kurven mit den H_{Sh} angenommen.

In Kulturen ohne SDS konnte zwischen 48 und 216 h Kultivierungsdauer mittels Regressionsanalyse eine Zunahme der H_{Sh} mit steigender Cd^{2+} -Konzentration nachgewiesen werden: Ab $0,5 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ stiegen die H_{Sh} der Kulturen an. Die Regressionskurven konnten die Varianz der physiologischen Diversität zu 71 - 91 % erklären. Die Varianzen der H_{Sh} mit $0,005 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ nach 24 h und 240 h Kultivierung waren zu groß, um eine Zunahme der H_{Sh} mit steigender Cd^{2+} -Konzentration nachweisen zu können.

In SDS-haltigen Kulturen konnte bis 72 h Kultivierungsdauer eine Zunahme der H_{Sh} ab $0,05 \text{ mmol l}^{-1}$ (24 h), bzw. $0,5 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ (48, 72 h) nachgewiesen werden. Die Regressionskurven korrelierten zu 69 - 93 % mit dem Trend der H_{Sh} . Ab 120 h Kultivierungsdauer konnte dagegen mittels Regressionsanalyse kein eindeutiger Trend in der Entwicklung der H_{Sh} mit steigender Cd^{2+} -Konzentration nachgewiesen werden. Die Korrelationskoeffizienten der Regressionskurven betragen lediglich zwischen 0,05 und 0,53.

Die H_{Sh} aller Cd^{2+} -freien Kulturen lagen, gemittelt über aller Kultivierungszeiten und SDS-Konzentrationen, bei $0,04 \pm 0,08$. Ausgedrückt als Shannon-Evenness E entsprach dies einem Wert von $0,04 \pm 0,08$. E gibt unabhängig von der Anzahl der Spezies Auskunft über die Verteilung der Spezies-Abundanzen in Gemeinschaften: E kann Werte zwischen 0 (alle Individuen gehören nur einer Spezies an = keine Diversität) und 1 (alle Spezies haben gleiche Abundanzen) annehmen (vgl. Kap. 1.4.2). In unbegifteten Kulturen überstiegen die Lebendzellzahlen der APB die der MetB, DNB und SRB um mehrere Größenordnungen. Daß somit fast jedes Individuum der Gemeinschaft in unbegifteten Kulturen ein APB war, erklärt die ausgesprochen geringe Shannon-Evenness. Mit zunehmender Cd^{2+} -Konzentration stiegen H_{Sh} und E an. E erreichte max. 0,84 (Cd^{2+} : $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ / SDS: $43,34 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ / t: 24 h). Dies entspricht einer Gemeinschaft mit hoher Diversität. Die Diversität nahm demnach mit steigender Cadmiumkonzentration zu, obwohl die MPNs der APB, MetB und DNB abnahmen, und die der SRB nicht beeinflußt wurden. Dies bedeutet, daß die Anteile der Individuen der APB an der Gesamtzahl aller Individuen N stärker abnahm, als die Anteile der Individuen der MetB, SRB und DNB. Die MPNs der MetB, SRB und DNB erreichten somit höhere relative Anteile an der (abnehmenden) Summe der MPNs aller physiologischen Gruppen. APB

reagierten demnach empfindlicher auf Cd^{2+} als MetB, SRB und DNB.

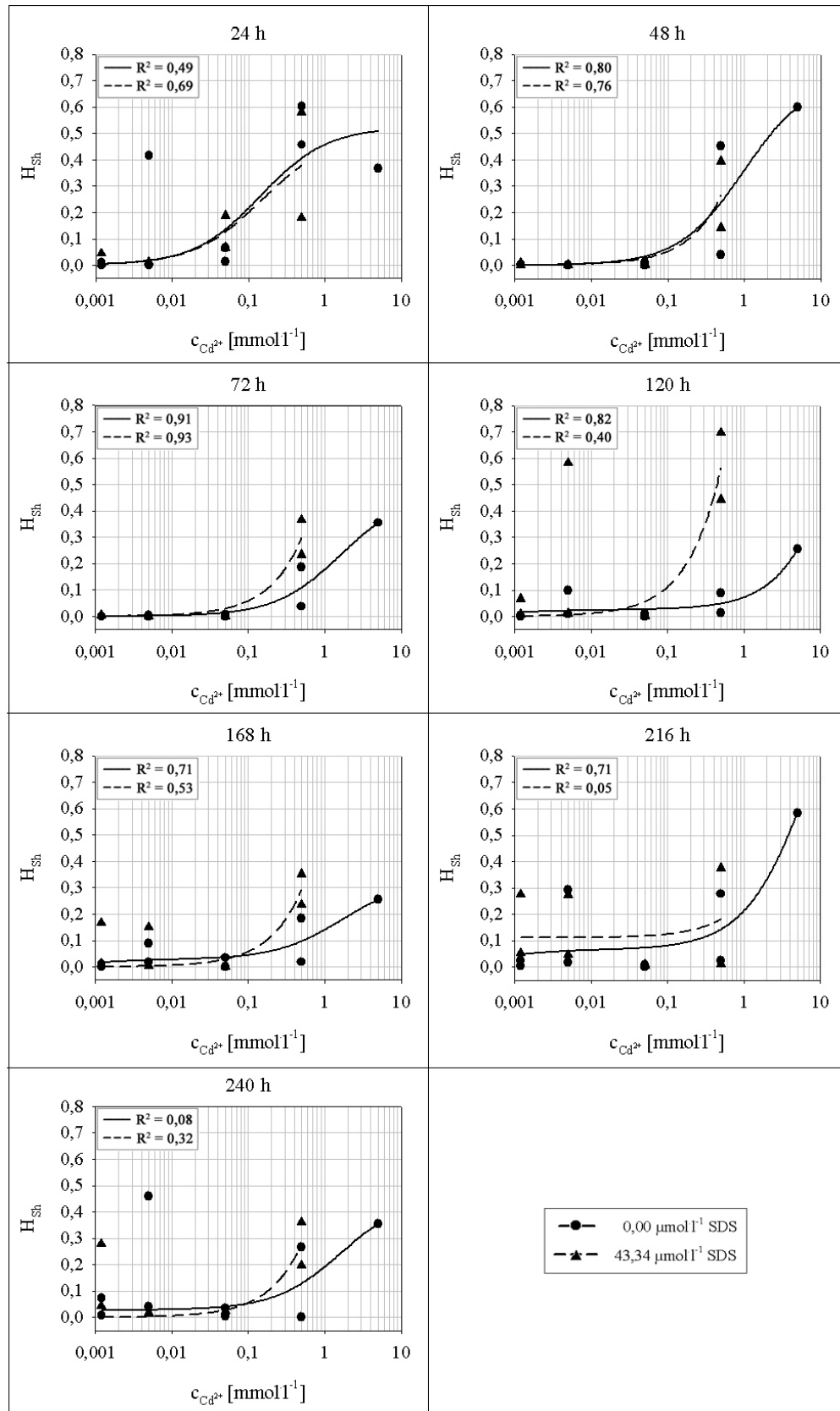


Abbildung 4.17.: Physiologische Diversität der Gemeinschaft, berechnet mittels Shannon-Wiener Diversitäts-Indices aus den MPN der APB, MetB, SRB und DNB.

4.2.3. Metabolische Aktivität der Gemeinschaft

Die metabolische Aktivität der bakteriellen Gemeinschaft wurde anhand der CO₂-Produktion und des O₂-Konsums (Kap. 4.2.3.1), sowie über die Dehydrogenase-Aktivität der Kulturen (Kap. 4.2.3.3) ermittelt.

4.2.3.1. O₂-Konsum / CO₂-Produktion

In Abbildung 4.18 a/b sind die aufsummierten, volumenbezogenen O₂-Aufnahme- (ΣQ_{O_2} 4.18 b) und CO₂-Produktionsraten (ΣQ_{CO_2} 4.18 a) als Funktionen der Cd²⁺-Konzentration dargestellt: Die Graphen zeigen die Aufnahme- und Produktionsraten der *in duplo* durchgeführten Begiftungsversuche nach 240 h Kultivierung als Funktionen der Cd²⁺-Konzentration.

Die metabolische Aktivität der bakteriellen Gemeinschaft wurde mit steigender Cd²⁺-Konzentration verringert. Allerdings konnten aufgrund der z.T. großen Unterschiede zwischen den ΣQ_{O_2} und ΣQ_{CO_2} paralleler Begiftungsversuche nur Verringerungen über große Konzentrationsdifferenzen nachgewiesen werden: Das Aufsummieren von Q_{O_2} und Q_{CO_2} über 240 h Kultivierungszeit bildete aus relativ kleinen Ungenauigkeiten in der Messung der O₂- und CO₂-Konzentration in der Ab- und Zuluft große Abweichungen in der Endsumme. Da zusätzlich noch die metabolische Aktivität paralleler Fermentationen variieren kann, wichen die Endsummen von Q_{O_2} und Q_{CO_2} paralleler Begiftungsversuche z.T. erheblich voneinander ab. Unterschiede zwischen den Werten konnten nur nachgewiesen werden, wenn sich Spannweiten der Daten nicht überlagerten.

Die Entwicklung der ΣQ_{O_2} und ΣQ_{CO_2} mit steigender Cadmiumkonzentration wurde mittels Regressionsanalyse nach Marquardt (1963) untersucht (Kap. 3.8). In Abbildung 4.18 sind die ermittelten Regressionskurven mit den jeweils höchsten ermittelten Korrelationskoeffizienten R² eingetragen. Alle Gleichungen folgten der Funktion: $y = a \cdot e^{-b \cdot x} + c \cdot e^{-d \cdot x}$

In Tabelle 4.9 sind die Variablen der Funktion zusammengestellt.

Zur vollständigen Mineralisierung aller C-Quellen der Seewasserbouillon X-2 benötigt die Gemeinschaft 83,91 mmol l⁻¹ O₂, bzw. produziert 83,91 mmol l⁻¹ CO₂ (Kap. 3.5.1). Die Mineralisierungsraten R_M ist daher mit dem Faktor 0,8391 proportional zu ΣQ_{O_2} und ΣQ_{CO_2} .

ΣQ_{CO_2} : Unabhängig von der Zugabe von $43,34 \mu\text{mol l}^{-1}$ SDS sanken die aufsummierten, volumenbezogenen CO_2 -Bildungsraten ab $0,5 \text{ mmol l}^{-1} Cd^{2+}$ ab. Unterschiede bei kleineren Cd^{2+} -Konzentrationen, bzw. zwischen SDS-freien, und -haltigen Begiftungsversuchen konnten nicht nachgewiesen werden. Die Regressionskurven konnten nur 57 % (SDS-freie Kulturen), bzw. 51 % (Kulturen mit $43,34 \mu\text{mol l}^{-1}$ SDS) der Variation der Daten erklären. Nah benachbarte Regressionskurven korrelierten nur geringfügig schlechter mit den Daten. Somit ergab sich ein unscharfes Bild von der Änderung der CO_2 -Bildungsrate mit steigender Cd^{2+} -Konzentration: Zwar war eine Abnahme der ΣQ_{CO_2} ab $0,5 \text{ mmol l}^{-1} Cd^{2+}$ nachweisbar, die genaue Lage der Regressionskurve blieb jedoch unklar.

ΣQ_{O_2} : Die Variationsbreiten der aufsummierten, volumenbezogenen O_2 -Verbrauchsraten waren kleiner, als die der CO_2 -Bildungsraten. Eine Abnahme der metabolischen Aktivität SDS-freier Kulturen konnte schon ab $0,05 \text{ mmol l}^{-1} Cd^{2+}$ nachgewiesen werden. Die Regressionskurve der O_2 -Verbrauchsrate SDS-freier Kulturen in Abbildung 4.18 b konnte dementsprechend 95 % der Variation der Werte erklären.

Aufgrund der großen Unterschiede zwischen den Versuchen mit $0,005 \text{ mmol l}^{-1} Cd^{2+}$ und $43,34 \mu\text{mol l}^{-1}$ SDS konnte eine Abnahme der metabolischen Aktivität erst ab $0,5 \text{ mmol l}^{-1} Cd^{2+}$ beobachtet werden. Die Regressionskurve der ΣQ_{O_2} der Kulturen mit $43,34 \mu\text{mol l}^{-1}$ SDS konnte daher nur 58 % der Variation der Werte erklären.

Unterschiede in der metabolischen Aktivität von SDS-haltigen und SDS-freien Begiftungsversuchen konnten nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 4.9.: Ergebnisse der nicht-linearen Regressionsanalyse der aufsummierten O_2 -Verbrauchs- und CO_2 -Bildungsraten.

	a	b	c	d	R ²
ΣQ_{O_2} 0,00 $\mu\text{mol l}^{-1}$ SDS	$8,40 \cdot 10^1$	$1,13 \cdot 10^1$	$1,75 \cdot 10^1$	$4,10 \cdot 10^{-1}$	0,98
ΣQ_{O_2} 43,34 $\mu\text{mol l}^{-1}$ SDS	$4,32 \cdot 10^1$	1,52	$4,43 \cdot 10^1$	1,52	0,41
ΣQ_{CO_2} 0,00 $\mu\text{mol l}^{-1}$ SDS	$5,95 \cdot 10^1$	2,80	$5,79 \cdot 10^1$	2,80	0,57
ΣQ_{CO_2} 43,34 $\mu\text{mol l}^{-1}$ SDS	$8,25 \cdot 10^1$	2,40	$8,33 \cdot 10^1$	2,40	0,43

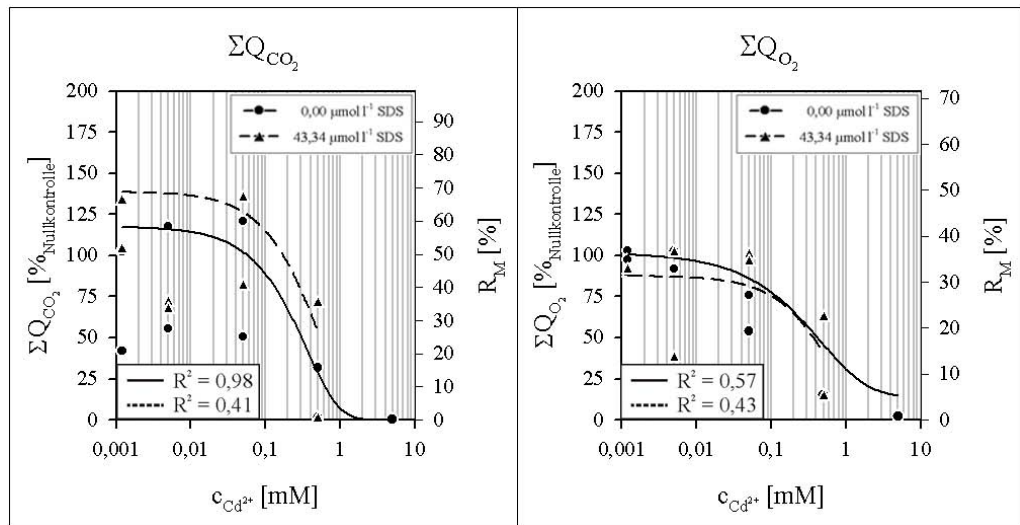


Abbildung 4.18.: Aufsummierte CO₂-Produktion, bzw. aufsummierte O₂-Konsumtion in 240 h, sowie Mineralisierungsrate R_M als Funktionen der Cd²⁺-Konzentration.

4.2.3.2. Metabolische Kern-Phasen

Mittels Abgasanalyse wurde der Zeitpunkt der maximalen metabolischen Aktivität der bakteriellen Gemeinschaft bestimmt. Er wurde näherungsweise als Endpunkt der metabolisch aktiven Phase der Kulturen (Kern-Phase) betrachtet. In Abb. 4.19 sind die Zeitpunkte der Aktivitätsmaxima als Funktion der Cd²⁺-Konzentration dargestellt.

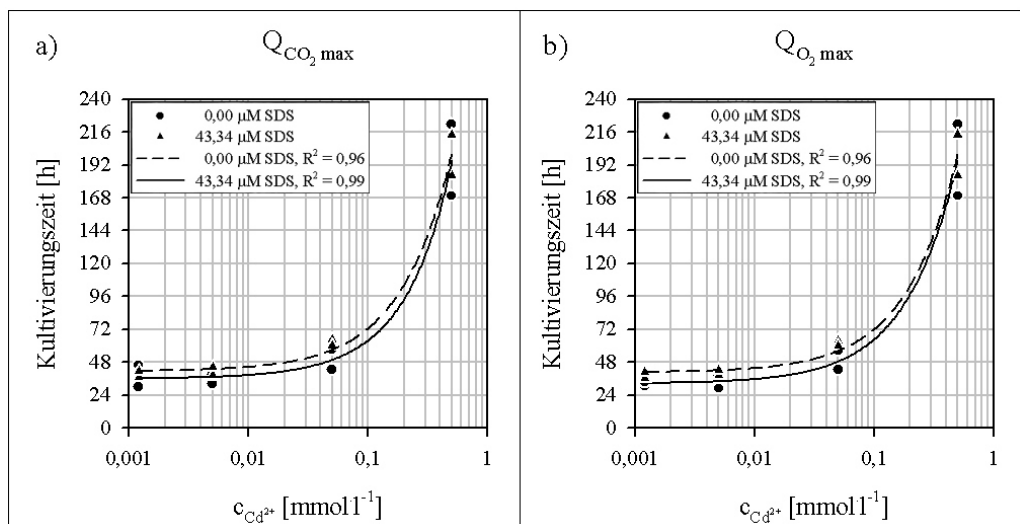


Abbildung 4.19.: Zeitpunkte der maximalen O₂-Konsumtion, bzw. CO₂-Produktion.

Steigende Cd²⁺-Konzentrationen verzögerten die maximale metabolische Aktivität der Gemeinschaft. Dies war sowohl für die CO₂-Produktion, als auch für den O₂-Konsum nachweisbar. Kulturen ohne, bzw. mit 0,005 mmol l⁻¹ Cd²⁺

erreichten das Aktivitätsmaximum nach ca. 36 bis 40 h Kultivierung. Das Aktivitätsmaximum von Kulturen mit $0,05 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ wurde nach ca. 48 h, das von Kulturen mit $0,5 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ erst nach ca. 200 h erreicht. Unterschiede zwischen den metabolischen Lag-Phasen SDS-freier und SDS-haltiger Kulturen konnten nicht nachgewiesen werden. Ebenso wenig war eine Zeitverzögerung zwischen maximalem O_2 -Verbrauch und maximaler CO_2 -Produktion nachweisbar.

Dies deutet darauf hin, daß Cd^{2+} (sowie die Kombination von Cd^{2+} und SDS) ab $0,05 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ verzögernd auf den Stoffwechsel der Zellen wirkte. SDS allein hatte keine verzögernde Wirkung.

Tabelle 4.10.: Ergebnisse der nicht-linearen Regressionsanalyse der Zeitpunkte der metabolischen Kernphasen.

	y_0	a	b	R^2
$Q_{\text{O}_2, \text{max}}$ 0,00 $\mu\text{mol l}^{-1}$ SDS	$-3,95 \cdot 10^5$	$3,95 \cdot 10^5$	$8,24 \cdot 10^{-4}$	0,99
$Q_{\text{O}_2, \text{max}}$ 43,34 $\mu\text{mol l}^{-1}$ SDS	$-3,39 \cdot 10^5$	$3,39 \cdot 10^5$	$9,38 \cdot 10^{-4}$	0,96
$Q_{\text{CO}_2, \text{max}}$ 0,00 $\mu\text{mol l}^{-1}$ SDS	$-4,15 \cdot 10^5$	$4,15 \cdot 10^5$	$7,61 \cdot 10^{-4}$	0,99
$Q_{\text{CO}_2, \text{max}}$ 43,34 $\mu\text{mol l}^{-1}$ SDS	-451,5	487,3	0,56	0,96

4.2.3.3. Aktivität der Dehydrogenasen - Resazurintest

Die Aktivität der Dehydrogenasen DHA der bakteriellen Gemeinschaft wurde über die Reduktion von Resazurin zu Resorufin bestimmt. Proben aus den Begiftungsversuchen wurden mit Resazurin versetzt. Nach 24 h wurden die Konzentrationen von Resazurin und Resorufin photometrisch bestimmt und die relativen Anteile des Resorufins am eingesetzten Resazurin errechnet (vgl. Kap. 3.5.6).

In Abb. 4.20 ist die Dehydrogenaseaktivität DHA als Funktion der Cd^{2+} -Konzentration dargestellt. Zur Bestimmung der DHA wurden Proben aus 2 unabhängigen Versuchen nach 24, 48, 72, 120, 168, 216 und 240 h Kultivierungszeit entnommen. Die Bestimmung der Enzymaktivität jeder Probe wurde dreifach durchgeführt. Begiftungsversuche bis $0,5 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ wurden sowohl ohne, als auch mit Zugabe von $43,34 \mu\text{mol l}^{-1}$ SDS *in duplo* durchgeführt. Die Konzentration von $5 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ wurde nur einfach, und ohne SDS-Zugabe

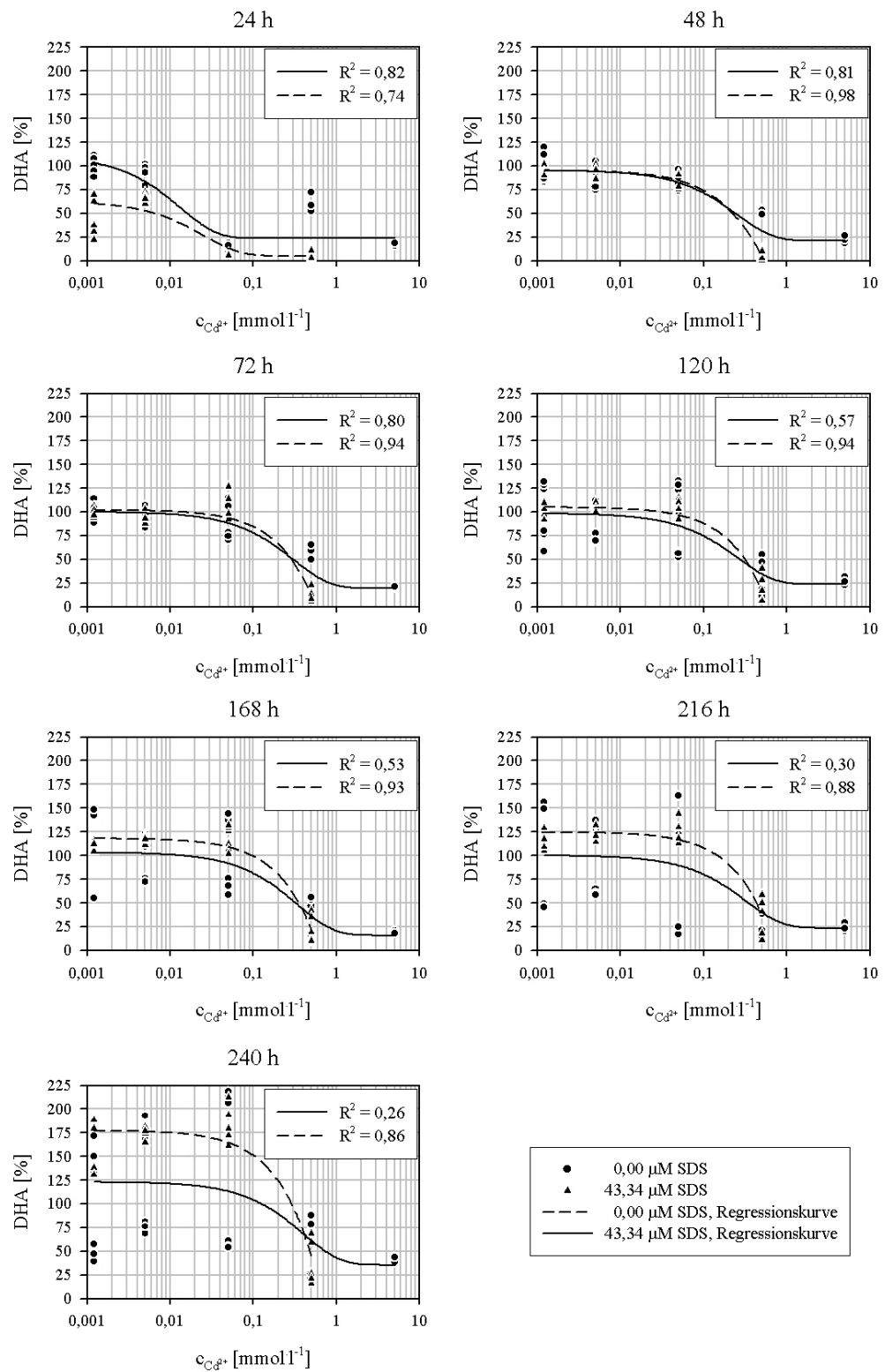


Abbildung 4.20.: DHA als Funktion der Cd^{2+} -Konzentration: Bis 0,5 mM Cd^{2+} sind 3 Meßwerte aus je 2 unabhängigen Versuchen ohne, sowie mit 43,34 μM SDS dargestellt. 3 Meßwerte für 5 mM Cd^{2+} stammen aus einem SDS-freien Versuch. Alle Werte sind bezogen [%] auf die mittlere DHA der Nullkontrollen nach 24 h Kultivierung. Die Linien stellen die Ergebnisse einer Regressionsanalyse dar.

eingesetzt. In Abb. 4.20 sind die je 3 Meßwerte, der 2 unabhängigen Versuchen für jede Cd²⁺- und SDS-Konzentration als Punktwolke, dargestellt. Die Linien repräsentieren die, mittels nicht-linearer Regression nach Marquardt (1963) ermittelten Funktionen, der höchsten nachgewiesenen Korrelation mit den Meßwerten. Die Korrelationskoeffizienten R² geben Auskunft über den Anteil der Varianz der Meßwerte, der durch die Funktion der Regressionskurve erklärt wird (s. Kap. 3.8). Alle Funktionen folgten der Gleichung:

$$\text{DHA} = a + b \cdot e^{-c \cdot [\text{Cd}^{2+}]} \quad [\%]$$

In Tabelle 4.11 sind die Werte für a, b und c, sowie für R² zusammengestellt.

Tabelle 4.11.: DHA der bakteriellen Gemeinschaft: Zusammenstellung der Regressionsgleichungen der Regressionsanalyse nach Marquardt (1963). t = Kultivierungszeit.

[SDS]	0,00 µmol l ⁻¹				[SDS]	43,34 µmol l ⁻¹			
t [h]	a	b	c	R ²	t [h]	a	b	c	R ²
24	23,5	87,0	74,2	0,82	24	5,0	57,7	39,0	0,74
48	21,0	74,6	3,9	0,81	48	-123,6	219,2	1,0	0,98
72	19,4	80,7	3,2	0,80	72	2,5 · 10 ⁵	2,6 · 10 ⁵	7,0 · 10 ⁻⁴	0,94
120	23,6	75,0	3,8	0,57	120	-1,9 · 10 ⁵	1,9 · 10 ⁵	9,0 · 10 ⁻⁴	0,94
168	15,8	87,7	2,9	0,53	168	-2,7 · 10 ⁵	2,7 · 10 ⁵	7,2 · 10 ⁻⁴	0,93
216	23,5	76,8	3,0	0,30	216	-1,5 · 10 ⁵	1,5 · 10 ⁵	1,1 · 10 ⁻³	0,88
240	35,6	87,7	2,4	0,26	240	-3,0 · 10 ⁵	3,0 · 10 ⁵	8,8 · 10 ⁻⁴	0,86

Die DHA von Kulturen ohne SDS, sowie von Kulturen mit 43,34 µmol l⁻¹ SDS verringerte sich signifikant nach 24 h Kultivierung bei Einsatz von Cd²⁺-Konzentrationen von 0,05 mmol l⁻¹ und höher. In SDS-freien Kulturen konnten signifikante Unterschiede der DHA zur DHA Cd²⁺-freier Kulturen nur in Kulturen mit 5 mmol l⁻¹ Cd²⁺ nachgewiesen werden. Dies lag an der großen Varianz der Meßwerte in Kulturen mit 0,5 mmol l⁻¹ Cd²⁺. Dieser Effekt spiegelte sich auch in den Korrelationskoeffizienten der Regressionskurven wieder: Die Regressionskurven der DHA SDS-freier Kulturen konnten zwischen 24 und 120 h Kultivierung 81 bis 82 % der Varianzen erklären. Ab 168 h Kultivierung sank der Anteil der durch die Regressionsanalyse erklärten Varianz auf bis zu 26 %. Die Regressionskurven der DHA SDS-haltiger Kulturen konnten über die gesamte Kultivierungszeit 74 bis 98 % der Varianzen der DHA erklären.

Signifikante Unterschiede (Verringerung der DHA durch SDS) der DHA Kulturen mit und ohne SDS konnten nur nach 24 h Kultivierung in Begiftungs-

versuchen mit Cd^{2+} -Konzentrationen bis $0,005 \text{ mmol l}^{-1}$ nachgewiesen werden.

Cd^{2+} führte demnach zur Verringerung der DHA. Die Cd^{2+} -Konzentration, ab der eine Verringerung nachweisbar war, variierte abhängig von der Kultivierungsdauer zwischen $0,05$ und 5 mmol l^{-1} . Unterschiede zwischen den DHA SDS-haltiger und -freier Kulturen konnten nur bei geringen Cd^{2+} -Konzentrationen nach 24 h Kultivierung nachgewiesen werden.

4.2.4. Zusammensetzung der Gemeinschaft

4.2.4.1. Phylogenetische Zusammensetzung der Gemeinschaft

Einfluß der Noxen auf die Hybridisierbarkeit der Phyla

Aus Untersuchungen von Geyer (2006) war bekannt, daß Zellen, die Cd^{2+} ausgesetzt waren, nicht in gleichem Maße hybridisierbar waren, wie unbegiftete Zellen. Der Einfluß der Noxen Cadmiumacetat und Natrium-Dodecylsulfat (SDS) auf die Hybridisierbarkeit der Zellen unterschiedlicher phylogenetischer Gruppen wurde untersucht:

Reinkulturen der Referenzstämme (Tab. 2.5, Kap. 2.5) wurden für 24 h bei 18°C mit $0,05 \text{ mmol l}^{-1}$ Cadmiumacetat oder $43,34 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ SDS, bzw. der Kombination beider Noxen begiftet. Die Nullkontrollen wurden analog dazu, jedoch ohne Noxen inkubiert. Proben der Kulturen wurden mit fluoreszenz-markierten Oligonukleotidsonden selektiv hybridisiert (Kap. 3.5.3). Der relative Anteil der hybridisierten Zellen an der Gesamtzellkonzentration (DAPI-Färbung) wurde gemäß Kap. 3.5.3 ermittelt (Abb. 4.21).

In Abb. 4.21 sind neben dem Anteil der hybridisierten Zellen (als Balken-graphik) zusätzlich die Gesamtzellkonzentration (Punktgraphik) der untersuchten Proben dargestellt, da bedingt durch die Methode die Hybridisierungen für die einzelnen Sonden mit unterschiedlichen Gesamtzellzahlen durchgeführt wurden.

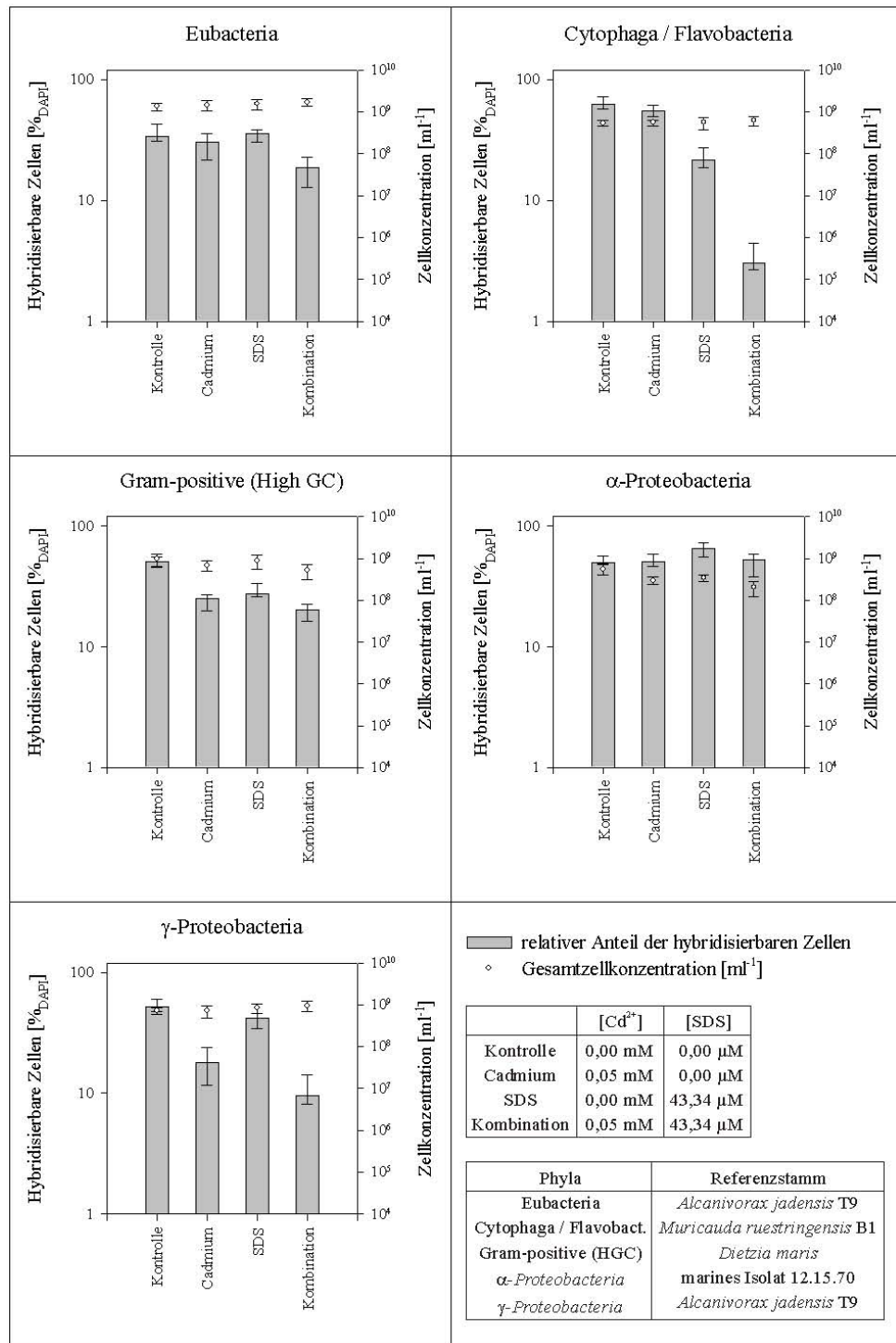


Abbildung 4.21.: Einfluß von Cd²⁺ und SDS auf die Hybridisierbarkeit der phylogenetischen Gruppen. Die Werte repräsentieren das arithmetische Mittel aus 10 Messungen, sowie die zugehörige Standardabweichung. Die Gesamtzellkonzentration gibt die Zahl DAPI-färbbarer Zellen an.

Die Noxen hatten unterschiedlichen Einfluß auf die Hybridisierbarkeit der Zellen verschiedener Phyla/Reiche:

- Der Anteil der hybridisierten *Alcanivorax jadensis* T9 (Eubacteria)

wurde weder durch Cd^{2+} , noch durch SDS, dagegen aber durch die Kombination beider Noxen verringert.

- Der Anteil der hybridisierten *Muricauda ruestringensis* B1 (*Cytophaga Flavobacteria*) wurde nicht durch Cd^{2+} , dafür aber durch SDS verringert. Die Verringerung der Hybridisierbarkeit wurde in Kombination von SDS mit Cd^{2+} verstärkt.
- Der Anteil der hybridisierten *Dietzia maris* (Gram-positive mit hohem GC-Anteil) wurde sowohl durch Cd^{2+} , SDS, als auch die Kombination beider Noxen verringert.
- Der Anteil der hybridisierbaren α -*Proteobacteria* (marines Isolat 12.15.70) wurde weder durch Cd^{2+} , SDS, noch die Kombination beider Noxen beeinflusst.
- Der Anteil der hybridisierten γ -*Proteobacteria* (*Alcanivorax jadensis* T9) wurde durch Cd^{2+} , sowie die Kombination von Cd^{2+} und SDS verringert. SDS allein hatte dagegen keinen Einfluß auf die Hybridisierbarkeit.

Die Versuche zeigten, daß die untersuchten phylogenetischen Gruppen grundsätzlich mit den angewandten Methoden hybridisierbar waren. Allerdings konnte die Hybridisierbarkeit durch Einwirkung der Noxen Cd^{2+} und SDS negativ beeinflusst werden. Dieser Effekt kann Spezies-, bzw. Stammspezifisch sein. Allgemeine Schlüsse über den Einfluß der Noxen auf die Hybridisierbarkeit der untersuchten Phyla konnten aus den Ergebnissen nicht gezogen werden, da pro Phylum jeweils nur ein Referenzstamm eingesetzt wurde.

4.2.4.2. Einfluß der Noxen auf die phylogenetische Zusammensetzung der Gemeinschaft

Aus allen Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen Proben zur Bestimmung der phylogenetischen Zusammensetzung gezogen. Die Bestimmung erfolgte gemäß Kap. 3.5.3.

Die Daten waren nicht normalverteilt. In Tab. 4.16 - 4.17 sowie 4.20 - 4.25 sind die Anteile der *Eubacteria* und *Archaea* an der Gesamtzellkonzentration, bzw. die Anteile der *Cytophaga/Flavobacteria*, der GC-reichen Gram-

positiven, sowie der α - , β - , γ und δ -*Proteobacteria* an den *Eubacteria* daher als Mediane mit 25. und 75. Perzentilen angegeben. Aufgrund der fehlenden Normalverteilung der Daten wurden Unterschiede mittels Mann-Whitney-Test (U-Test, P = 95 %) ermittelt.

Anteile der *Archaea* und *Eubacteria* an der Gesamtzellkonzentration

Die Anteile der *Archaea* und *Eubacteria* an der Gesamtzellkonzentration wurden als relative Anteile [%] an der Gesamtzellzahl DAPI-färbbarer Zellen erfaßt. Aus je 2 unabhängigen Versuchen mit 10 parallelen Messungen wurde der Median, sowie das 25. und 75. Perzentil errechnet (Tab. 4.16 und 4.17). Zusätzlich wurde untersucht, ob die Kulturparameter (Kultivierungszeit, Cd²⁺-Konzentration und SDS-Präsenz) einen Einfluß auf die Konzentration der *Eubacteria* und *Archaea* hatten. Die statistische Signifikanz von Unterschieden zwischen den Anteilen der *Eubacteria* und *Archaea* verschiedener Proben wurden mittels Mann-Whitney-Test (Signifikanz-Niveau: 95 %) überprüft.

***Archaea*:** Die Anteile der *Archaea* an der Gesamtzellkonzentration stiegen zu keinem Zeitpunkt über 11 %. Sowohl SDS, als auch Cd²⁺ beeinflussten tendenziell den Anteil der *Archaea*. Der Effekt war jedoch nicht signifikant. In Tabelle 4.12 sind statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kulturen ohne SDS und Kulturen mit 43,34 µM SDS (jeweils gleicher Cd²⁺-Konzentration und Kultivierungszeit) zusammengestellt. Häufig erhöhte SDS den Anteil der *Archaea* an der Gesamtzellkonzentration.

Tabelle 4.12.: Vergleich der Anteile der *Archaea* an der Gesamtzellkonzentration mittels Mann-Whitney-Test (P = 95 %). Verglichen wurden SDS-freie und SDS-haltige Kulturen jeweils gleicher Cd²⁺-Konzentration nach gleicher Kultivierungszeit.

- ↗: Signifikant höherer Anteil der *Archaea* in SDS-haltigen Kulturen
- ↘: Signifikant geringerer Anteil der *Archaea* in SDS-haltigen Kulturen
- : kein signifikanter Unterschied nachweisbar.

<i>Archaea</i>	Kultivierungszeit						
	[Cd ²⁺]	24 h	48 h	72 h	120 h	168 h	216 h
0,000 mM	•	↗	↗	•	•	↗	•
0,005 mM	↗	↗	•	•	•	↗	•
0,050 mM	↗	•	•	↗	↗	↗	•
0,500 mM	•	•	↘	•	•	↗	↗

In Tabelle 4.13 sind statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kulturen ohne Cd²⁺ einerseits und Kulturen mit 0,005 bis 0,500 mM Cd²⁺ andererseits zusammengefaßt.

Die Anteile der *Archaea* waren in Kulturen ohne SDS zwischen 24 und 72 h Kultivierung in Cd²⁺-haltigen (0,005 - 0,500 mM) Kulturen statistisch signifikant höher, als in Kulturen ohne Cd²⁺. Ausnahmen bildeten Kulturen mit 0,005 mM Cd²⁺ nach 24 h, mit 0,500 mM Cd²⁺ nach 48 h und mit 5,000 mM Cd²⁺ nach 72 h Kultivierung, in denen keine signifikanten Unterschiede zu Kulturen ohne Cd²⁺ nachgewiesen werden konnten. Ab 120 h Kultivierungsdauer wurden statistisch signifikante Zunahmen des Anteils der *Archaea* in Kulturen mit 0,005 mM Cd²⁺ nach 216 h Kultivierung ebenso festgestellt, wie die Verringerung des Anteils in Kulturen mit 0,050 mM Cd²⁺ nach 168 h und mit 0,050 bis 0,500 mM Cd²⁺ nach 240 h Kultivierung. Weitere Unterschiede zwischen SDS-freien Kulturen ohne Cd²⁺ und SDS-freien Kulturen mit Cd²⁺ konnten zwischen 120 und 240 h Kultivierungsdauer nicht ermittelt werden.

Tabelle 4.13.: Vergleich der Anteile der *Archaea* an der Gesamtzellkonzentration mittels Mann-Whitney-Test ($P = 95\%$). Verglichen wurden jeweils Cd²⁺-freie und Cd²⁺-haltige Kulturen gleicher SDS-Konzentration nach gleicher Kultivierungszeit.

↗: Signifikant höherer Anteil der *Archaea* in Cd²⁺-haltigen Kulturen

↘: Signifikant geringerer Anteil der *Archaea* in Cd²⁺-haltigen Kulturen

•: kein signifikanter Unterschied nachweisbar.

<i>Archaea</i>		Kultivierungszeit						
[SDS]	[Cd ²⁺]	24 h	48 h	72 h	120 h	168 h	216 h	240 h
0,00 µM	0,005 mM	•	↗	↗	•	•	↗	•
	0,050 mM	↗	↗	↗	•	↘	•	•
	0,500 mM	↗	•	↗	•	•	•	↘
	5,000 mM	↗	↗	•	•	•	•	↘
[SDS]	[Cd ²⁺]	24 h	48 h	72 h	120 h	168 h	216 h	240 h
43,34 µM	0,005 mM	↗	↗	↗	↗	↗	↗	•
	0,050 mM	↗	↗	•	↗	•	•	•
	0,500 mM	•	•	↘	•	•	•	•

In SDS-haltigen Kulturen hatten die *Archaea* in Kulturen mit 0,005 und 0,050 mM Cd²⁺ tendenziell größeren Anteil an der Gesamtzellkonzentration, als in SDS-haltigen Kulturen ohne Cd²⁺. Lediglich nach 240 h Kultivierung

mit 0,005 mM Cd²⁺, sowie nach 72, 168, 216 und 240 h Kultivierung mit 0,050 mM Cd²⁺ konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Cd²⁺-haltigen und Kulturen ohne Cd²⁺ ermittelt werden. In Kulturen mit 43,34 µM SDS und 0,500 mM Cd²⁺ konnten - bis auf eine Verringerung des Anteils der *Archaea* nach 72 h Kultivierung - keine statistisch signifikanten Unterschiede zu Kulturen ohne Cd²⁺ nachgewiesen werden.

Eubacteria: Der Anteil der *Eubacteria* an der Gesamtzellkonzentration wurde sowohl von SDS, als auch von Cd²⁺ beeinflusst. Sowohl SDS, als auch Cd²⁺ hatten tendenziell Einfluß auf den Anteil der *Eubacteria* an der Gesamtzellkonzentration. In Tabelle 4.14 sind statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kulturen ohne SDS und Kulturen mit 43,34 µM SDS (jeweils gleicher Cd²⁺-Konzentration und Kultivierungszeit) zusammengestellt. In Tabelle 4.15 sind statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kulturen ohne Cd²⁺ einerseits und Kulturen mit 0,005 bis 5,000 mM Cd²⁺ andererseits zusammengefaßt.

Tabelle 4.14.: Vergleich der Anteile der *Eubacteria* an der Gesamtzellkonzentration mittels Mann-Whitney-Test (P = 95 %). Verglichen wurden SDS-freie und SDS-haltige Kulturen jeweils gleicher Cd²⁺-Konzentration nach gleicher Kultivierungszeit.

- ↗: Signifikant höherer Anteil der *Eubacteria* in SDS-haltigen Kulturen
- ↘: Signifikant geringerer Anteil der *Eubacteria* in SDS-haltigen Kulturen
- : kein signifikanter Unterschied nachweisbar.

EUB [Cd ²⁺]	Kultivierungszeit						
	24 h	48 h	72 h	120 h	168 h	216 h	240 h
0,000 mM	↗	↗	↗	↗	•	•	↗
0,005 mM	↗	↗	•	↗	•	•	↗
0,050 mM	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗
0,500 mM	•	•	↘	•	↗	↗	•

Der Anteil der *Eubacteria* an der Gesamtzellkonzentration war in Kulturen mit 43,34 µM SDS tendenziell höher, als in Kulturen ohne SDS. Mit Ausnahme der Kulturen ohne Cd²⁺ nach 168 und 216 h Kultivierung, sowie der Kulturen mit 0,005 mM Cd²⁺ nach 72, 168 und 216 h Kultivierung, konnten in allen SDS-haltigen Kulturen mit 0,000 bis 0,050 mM Cd²⁺ statistisch signifikant erhöhte Anteile der *Eubacteria* ermittelt werden. In Kulturen mit 0,500 mM Cd²⁺ war der Anteil der *Eubacteria* nach 72 h signifikant gering-

er, und zwischen 168 und 216 h Kultivierung signifikant höher als in Kulturen ohne SDS.

Tabelle 4.15.: Vergleich der Anteile der Eubacteria an der Gesamtzellkonzentration mittels Mann-Whitney-Test (P = 95 %). Verglichen wurden jeweils Cd²⁺-freie und Cd²⁺-haltige Kulturen gleicher SDS-Konzentration nach gleicher Kultivierungszeit.

↗: Signifikant höherer Anteil der Eubacteria in Cd²⁺-haltigen Kulturen

↘: Signifikant geringerer Anteil der Eubacteria in Cd²⁺-haltigen Kulturen

•: kein signifikanter Unterschied nachweisbar.

EUB		Kultivierungszeit						
[SDS]	[Cd ²⁺]	24 h	48 h	72 h	120 h	168 h	216 h	240 h
0,00 µM	0,005 mM	•	•	•	•	•	•	•
	0,050 mM	↗	•	↘	•	•	•	•
	0,500 mM	•	↘	•	↘	↘	↘	↘
	5,000 mM	•	↘	↘	↘	↘	↘	↘
[SDS]	[Cd ²⁺]	24 h	48 h	72 h	120 h	168 h	216 h	240 h
43,34 µM	0,005 mM	↗	•	↗	•	↗	↗	•
	0,050 mM	•	•	•	•	↗	↗	•
	0,500 mM	↘	↘	↘	↘	•	•	↘

Tendenziell sanken die Anteile der *Eubacteria* an der Gesamtzellkonzentration sowohl in Kulturen mit, als auch ohne SDS ab 0,500 mM Cd²⁺. Lediglich nach 24 und 72 h Kultivierung mit 0,500 mM Cd²⁺ (ohne SDS), nach 24 h mit 5,000 mM Cd²⁺ (ohne SDS), sowie nach 168 und 216 h Kultivierung mit 0,500 mM Cd²⁺ (mit 43,34 µM SDS) konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zu Kulturen ohne Cd²⁺ nachgewiesen werden.

In Kulturen ohne SDS konnten außer nach 24 und 72 h Kultivierung mit 0,050 mM Cd²⁺ keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Kulturen ohne Cd²⁺ und mit 0,005, bzw. 0,050 mM Cd²⁺ nachgewiesen werden.

In Kulturen mit 43,34 µM SDS konnten statistisch signifikante Erhöhungen des Anteils der *Eubacteria* nach 24, 72, 168 und 216 h Kultivierung mit 0,005 mM Cd²⁺, sowie nach 168 und 216 h mit 0,050 mM Cd²⁺ nachgewiesen werden. Dagegen nahmen die Anteile der *Eubacteria* an der Gesamtzellkonzentration in Kulturen mit 43,34 µM SDS und 0,500 mM Cd²⁺ tendenziell ab.

Tabelle 4.16.: Relativer Anteil der *Eubacteria* an der Gesamtzellkonzentration [%] in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer, sowie der Cd²⁺- und SDS-Konzentration. Die Gesamtzellkonzentrationen (Absolutwerte) sind in Abb. 4.6 und Tab. 4.1 dargestellt. Angegeben sind jeweils der Median, sowie das 25. Percentil (25. Perc.) und das 75. Percentil (75. Perc.) aus 2 unabhängigen Versuchen mit je 10 Messungen.

Cd ²⁺ [mmol ⁻¹]	24 h		48 h		72 h		120 h		168 h		216 h		240 h	
	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.
		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.
Kulturen ohne SDS														
0,000	13,19	0,13	31,29	27,22	46,97	20,11	28,85	16,98	50,00	9,18	30,19	6,34	20,25	8,52
		35,33		43,41		62,50		46,80		61,02		50,49		55,49
0,005	10,00	2,00	13,57	9,27	39,51	6,75	36,62	5,39	33,81	2,00	7,55	3,92	15,09	8,66
		39,44		53,24		81,44		65,05		71,82		72,87		68,42
0,050	32,56	11,76	29,41	21,08	15,60	0,40	18,39	0,00	21,03	9,72	13,95	6,40	23,53	4,19
		50,00		35,60		45,54		36,90		31,72		29,68		34,31
0,500	26,47	12,51	10,53	8,70	26,42	14,91	6,59	2,11	8,57	5,27	9,09	3,77	14,05	5,52
		40,66		12,70		44,95		18,77		12,29		14,29		25,77
5,000	22,00	9,21	6,31	4,32	1,52	0,21	2,44	2,13	1,23	0,00	2,56	0,00	1,42	1,14
		23,73		14,29		2,17		3,85		1,89		5,45		1,93
Kulturen mit 43,34 µmol⁻¹ SDS														
0,000	50,36	29,85	65,06	59,24	69,3	62,29	70,83	62,62	46,39	36,46	44,92	33,21	46,81	24,89
		68,59		68,93		79,42		76,46		54,52		58,10		73,82
0,005	61,10	54,37	64,52	54,42	76,19	71,31	73,68	70,37	63,31	55,76	65,29	57,95	62,68	48,83
		79,52		75,00		81,70		79,42		66,48		72,03		72,81
0,050	57,89	50,29	68,91	62,13	64,20	57,94	63,04	55,42	62,07	57,63	76,53	72,60	66,29	59,09
		63,41		78,23		67,89		73,48		66,67		79,81		72,14
0,500	32,94	0,00	23,04	0,00	5,56	1,00	46,81	0,00	44,16	28,49	51,42	41,40	9,26	5,30
		64,24		49,64		36,69		63,55		55,03		58,20		55,48

Tabelle 4.17.: Relativer Anteil der Archaea an der Gesamtzellkonzentration [%] in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer, sowie der Cd²⁺- und SDS-Konzentration. Die Gesamtzellkonzentrationen (Absolutwerte) sind in Abb. 4.6 und Tab. 4.1 dargestellt. Angegeben sind jeweils der Median, sowie das 25. Perzentil (25. Perc.) und das 75. Perzentil (75. Perc.) aus 2 unabhängigen Versuchen mit je 10 Messungen.

Cd ²⁺ [mmol ⁻¹]	24 h		48 h		72 h		120 h		168 h		216 h		240 h	
	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.
		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.
Kulturen ohne SDS														
0,000	0,00	0,00	1,13	0,11	0,00	0,00	1,61	0,00	1,00	0,68	0,00	0,00	2,99	1,46
		4,26		1,95		2,02		2,22		4,55		0,00		4,15
0,005	0,00	0,00	4,11	3,02	6,49	1,10	6,00	0,00	2,31	0,00	1,28	0,00	2,38	1,30
		3,92		5,92		8,74		9,48		6,72		4,97		10,09
0,050	4,90	2,38	6,82	1,19	4,55	0,77	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,53	0,00
		6,97		12,13		10,00		2,41		1,63		1,24		7,14
0,500	4,01	0,00	0,71	0,00	13,29	1,00	1,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		7,73		4,15		28,20		4,21		3,45		0,00		1,88
5,000	9,76	4,11	4,76	3,77	0,00	0,00	0,88	0,00	1,37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		14,29		11,11		1,11		1,55		2,25		0,00		0,68
Kulturen mit 43,34 µmol⁻¹ SDS														
0,000	2,94	0,00	3,92	2,83	4,00	1,09	0,00	0,00	3,90	2,00	3,03	1,57	4,46	1,00
		3,78		5,79		6,70		2,83		5,48		4,88		10,77
0,005	4,95	3,99	8,33	6,61	6,78	6,25	3,33	2,96	4,94	3,48	6,25	5,28	6,90	5,96
		6,99		9,90		8,73		4,43		7,23		7,84		9,21
0,050	7,13	6,26	6,10	4,86	3,57	2,00	4,50	3,11	4,64	2,78	3,49	2,47	2,56	1,98
		8,03		7,92		8,28		6,28		6,03		4,13		3,93
0,500	4,29	0,00	4,58	0,00	1,52	0,00	4,44	0,00	2,50	0,00	1,89	0,00	3,06	0,00
		12,18		7,71		3,54		8,96		9,80		9,58		7,06

Phylogenetische Zusammensetzung der *Eubacteria*:

Neben den Anteilen der Reiche *Eubacteria* und *Archaea* an der Gesamtzellkonzentration wurde die phylogenetische Zusammensetzung der *Eubacteria* bestimmt. Mittels FISH wurden die relativen Anteile der *Cytophaga/Flavobacteria* (CFB) und GC-reichen Gram-positiven (GPHGC), sowie der α - (α -PB), β - (β -PB), γ - (γ -PB) und δ -*Proteobacteria* (δ -PB) an den *Eubacteria* ermittelt. Die Anteile der Phyla sind in den Tabellen 4.20 - 4.25 zusammengestellt.

Der prozentuale Anteil der analysierten Phyla an den *Eubacteria* variierte stark, sowohl im Verlauf der Kultivierungszeit, als auch zusätzlich in Abhängigkeit von der Präsenz an Cd^{2+} und SDS. Es konnten jedoch keine Korrelationen nachgewiesen werden - weder mit der Kultivierungszeit, noch mit der SDS-Konzentration. In Tabelle 4.18 sind signifikante Unterschiede zwischen den Anteilen der Phyla an den *Eubacteria* in Kulturen mit 43,34 μM SDS und in Kulturen ohne SDS zusammengefaßt.

In Kulturen mit 43,34 μM SDS waren - im Vergleich zu Kulturen ohne SDS, jedoch mit gleicher Cd^{2+} -Konzentration und gleicher Kultivierungsdauer - vereinzelt statistisch signifikante Unterschiede nachweisbar. Diese waren jedoch häufig gegenläufig und korrelierten weder mit der Kultivierungsdauer, noch mit der Cd^{2+} -Konzentration. Einzig die Anteile der β -*Proteobacteria* nahmen tendenziell in SDS-haltigen Kulturen nach 48 und 72 h Kultivierung mit 0,005 mM Cd^{2+} , sowie nach 48, 72, 120, 168 und 240 h mit 0,050 mM Cd^{2+} zu. Die Anteile der CFB, GPHGC, α -, δ - und γ -*Proteobacteria* an den *Eubacteria* folgten keinem erkennbaren Trend.

In Tabelle 4.19 sind signifikante Unterschiede der Anteile der Phyla an den *Eubacteria* in Kulturen mit unterschiedlicher Cd^{2+} -Konzentration Vergleich zu Kulturen ohne Cd^{2+} zusammengefaßt.

Tabelle 4.18.: Vergleich der Anteile der Phyla an den Eubacteria mittels Mann-Whitney-Test ($P = 95\%$). Verglichen wurden SDS-freie und SDS-haltige Kulturen jeweils gleicher Cd^{2+} -Konzentration nach gleicher Kultivierungszeit.

↗: Signifikant höherer Anteil des Phylums in SDS-haltigen Kulturen

↘: Signifikant geringerer Anteil des Phylums in SDS-haltigen Kulturen

•: kein signifikanter Unterschied nachweisbar.

CFB	Kultivierungszeit							GPHGC	Kultivierungszeit						
Cd^{2+} [mM]	24 h	48 h	72 h	120 h	168 h	216 h	240 h	Cd^{2+} [mM]	24 h	48 h	72 h	120 h	168 h	216 h	240 h
0,000	↗	•	↘	↗	↘	•	•	0,000	↗	↗	•	↗	•	↘	↗
0,005	•	•	•	•	↗	↗	•	0,005	•	•	↘	•	↘	•	↘
0,050	•	↗	↘	•	↗	•	↗	0,050	•	•	•	•	•	•	↗
0,500	•	•	•	↘	•	•	•	0,500	•	•	•	•	•	•	•
α -PB	Kultivierungszeit							β -PB	Kultivierungszeit						
Cd^{2+} [mM]	24 h	48 h	72 h	120 h	168 h	216 h	240 h	Cd^{2+} [mM]	24 h	48 h	72 h	120 h	168 h	216 h	240 h
0,000	↗	•	•	↘	•	•	•	0,000	•	•	↘	↘	↘	•	↗
0,005	↘	•	•	↘	↘	•	•	0,005	•	↗	↗	•	•	•	•
0,050	•	•	•	↘	•	•	↗	0,050	•	↗	↗	↗	↗	•	↗
0,500	•	•	↗	↗	•	•	•	0,500	•	↗	↗	↗	•	•	↗
γ -PB	Kultivierungszeit							δ -PB	Kultivierungszeit						
Cd^{2+} [mM]	24 h	48 h	72 h	120 h	168 h	216 h	240 h	Cd^{2+} [mM]	24 h	48 h	72 h	120 h	168 h	216 h	240 h
0,000	↗	•	↘	↘	•	•	↗	0,000	•	•	↘	↘	↘	•	•
0,005	•	•	↗	•	↘	•	•	0,005	↗	↗	•	•	•	↗	•
0,050	•	•	•	↘	•	•	↗	0,050	•	•	↗	↗	•	•	↗
0,500	•	•	•	•	↘	↗	↗	0,500	•	•	•	↘	↘	•	•

Der statistische Nachweis signifikanter Unterschiede zwischen den relativen Anteilen der phylogenetischen Gruppen an den *Eubacteria* in Kulturen ohne Cd^{2+} und in Kulturen mit $0,005$ bis $5,000\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Cd^{2+} scheiterte vielfach an den großen Varianzen der Meßwerte. Trends in der Änderung der Zusammensetzung der *Eubacteria* in Cd^{2+} -haltigen Kulturen konnten somit nur vereinzelt beobachtet werden. Eine tendenzielle Abnahme der Anteile der CFB konnte in Kulturen ohne SDS mit Cd^{2+} -Konzentrationen von $0,005$ bis $0,500\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ebenso beobachtet werden, wie eine Abnahme der β -*Proteobacteria* in Kulturen ohne SDS, sowie in Kulturen mit SDS nach 168 h Kultivierung. Die Anteile der CFB in Kulturen mit SDS bis 120 h Kultivierung, der GPHGC nach 24 bis 48 h Kultivierung mit SDS, der α -*Proteobacteria*

zwischen 48 und 216 h Kultivierung mit SDS, der β -Proteobacteria in Kulturen mit SDS bis 120 h Kultivierung, sowie der δ -Proteobacteria in Kulturen mit SDS zwischen 48 und 120 h nahmen dagegen tendenziell zu.

Tabelle 4.19.: Vergleich der Anteile der Phyla an den Eubacteria mittels Mann-Whitney-Test ($P = 95\%$). Verglichen wurden jeweils Cd^{2+} -freie und Cd^{2+} -haltige Kulturen gleicher SDS-Konzentration nach gleicher Kultivierungszeit.

↗: Signifikant höherer Anteil des Phylums in Cd^{2+} -haltigen Kulturen

↘: Signifikant geringerer Anteil des Phylums in Cd^{2+} -haltigen Kulturen

•: kein signifikanter Unterschied nachweisbar.

CFB		Kultivierungszeit							GPHGC		Kultivierungszeit						
SDS [μM]	Cd ²⁺ [mM]	24 h	48 h	72 h	120 h	168 h	216 h	240 h	SDS [μM]	Cd ²⁺ [mM]	24 h	48 h	72 h	120 h	168 h	216 h	240 h
0,00	0,005	↘	•	•	•	↗	•	•	0,00	0,005	•	•	↗	↗	↗	•	↘
	0,050	↘	•	•	↘	↘	•	•		0,050	•	•	•	•	•	•	•
	0,500	↘	•	↘	↘	•	•	↘		0,500	•	•	•	•	•	•	↘
	5,000	•	↗	•	•	•	•	•		5,000	↗	↗	•	↗	•	•	•
43,34	0,005	↗	↗	↗	↗	•	↗	•	43,34	0,005	↗	↗	•	↗	•	↗	↗
	0,050	↗	↗	↗	↗	•	•	↘		0,050	↗	↗	•	•	•	•	•
	0,500	↗	↗	↗	↗	•	•	•		0,500	↗	↗	•	↗	•	•	•
α -PB		Kultivierungszeit							β -PB		Kultivierungszeit						
SDS [μM]	Cd ²⁺ [mM]	24 h	48 h	72 h	120 h	168 h	216 h	240 h	SDS [μM]	Cd ²⁺ [mM]	24 h	48 h	72 h	120 h	168 h	216 h	240 h
0,00	0,005	↘	•	↗	•	↗	•	•	0,00	0,005	•	•	•	↘	•	•	↘
	0,050	•	↗	•	↗	•	•	•		0,050	•	•	↘	↘	•	•	↘
	0,500	↘	•	•	•	↘	•	↘		0,500	•	↘	↘	↘	•	•	↘
	5,000	↗	↗	↘	•	•	•	•		5,000	•	•	↘	↘	•	•	↘
43,34	0,005	•	↗	↗	↗	↗	↗	•	43,34	0,005	↗	↗	↗	↗	↘	•	•
	0,050	•	↗	↗	↗	↗	•	↘		0,050	•	•	↗	↗	↘	•	•
	0,500	•	↗	↗	↗	•	•	•		0,500	•	•	•	↗	↘	•	•
γ -PB		Kultivierungszeit							δ -PB		Kultivierungszeit						
SDS [μM]	Cd ²⁺ [mM]	24 h	48 h	72 h	120 h	168 h	216 h	240 h	SDS [μM]	Cd ²⁺ [mM]	24 h	48 h	72 h	120 h	168 h	216 h	240 h
0,00	0,005	↘	•	↗	↘	↘	•	•	0,00	0,005	•	↗	↘	•	•	•	•
	0,050	↗	•	•	↗	•	•	•		0,050	•	•	↘	•	↗	•	•
	0,500	•	•	↘	↘	↘	•	↘		0,500	↗	•	↘	↘	•	•	•
	5,000	↗	•	↘	•	•	↘	•		5,000	↗	•	•	↗	•	•	↗
43,34	0,005	•	↘	↘	↗	•	↘	•	43,34	0,005	•	↗	↗	↗	•	↗	•
	0,050	•	•	↗	↘	•	•	•		0,050	•	↗	↗	↗	•	↘	↘
	0,500	•	↗	↗	↗	•	↗	↗		0,500	•	↗	↗	↗	•	↘	•

Tabelle 4.20.: Relativer Anteil der Cytophaga/Flavobacteria an den Eubacteria [%] in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer, sowie der Cd²⁺- und SDS-Konzentration.

Angegeben sind jeweils der Median, sowie das 25. Percentil (25. Perc.) und das 75. Percentil (75. Perc.) aus 2 unabhängigen Versuchen mit je 10 Messungen.

Cd ²⁺ [mmol ⁻¹]	24 h		48 h		72 h		120 h		168 h		216 h		240 h	
	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.
		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.
Kulturen ohne SDS														
0,000	37,50	22,73	15,86	1,55	12,57	7,94	26,06	20,14	21,31	19,57	9,92	0,00	65,94	8,26
		97,99		46,55		104,07		38,26		30,29		15,00		316,71
0,005	11,11	0,00	20,56	4,82	22,28	0,00	16,89	13,51	7,70	2,59	2,72	0,00	10,02	6,83
		21,11		23,75		28,83		30,83		11,06		4,88		14,19
0,050	15,08	8,93	11,91	10,10	24,36	19,47	10,71	9,28	0,00	0,00	8,33	0,00	45,71	24,68
		27,78		20,10		34,65		21,08		7,45		15,97		300,32
0,500	24,49	5,77	27,68	0,00	2,34	0,00	0,00	0,00	20,86	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		40,79		59,26		30,54		26,45		33,41		23,20		13,67
5,000	43,43	24,49	62,17	48,35	34,44	0,00	63,53	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	66,51	18,73
		64,29		76,90		87,72		84,80		46,88		0,00		77,07
Kulturen mit 43,34 µmol⁻¹ SDS														
0,000	4,26	0,00	7,45	4,97	2,88	0,00	3,99	1,93	7,00	2,91	5,57	3,68	13,84	10,70
		7,23		9,11		3,77		7,69		21,43		8,97		23,13
0,005	10,94	10,03	19,44	10,68	6,79	4,81	11,78	8,42	12,91	12,12	14,29	11,68	12,72	8,20
		15,18		24,02		10,86		15,90		20,27		15,30		16,26
0,050	19,92	10,94	29,07	22,30	13,35	10,82	9,41	8,06	9,27	7,70	8,68	3,57	5,77	3,90
		34,07		35,17		17,13		10,65		12,12		11,46		9,27
0,500	21,84	19,21	24,96	22,58	14,81	0,00	29,55	22,29	7,82	0,00	10,52	0,00	13,15	0,00
		23,08		31,30		35,74		35,55		18,15		17,31		20,90

Tabelle 4.21.: Relativer Anteil der Gram-positiven mit hohem GC-Gehalt an den Eubacteria [%] in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer, sowie der Cd²⁺- und SDS-Konzentration. Angegeben sind jeweils der Median, sowie das 25. Percentil (25. Perc.) und das 75. Percentil (75. Perc.) aus 2 unabhängigen Versuchen mit je 10 Messungen.

Cd ²⁺ [mmol ⁻¹]	24 h		48 h		72 h		120 h		168 h		216 h		240 h	
	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.
		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.
Kulturen ohne SDS														
0,000	11,36	0,00	24,45	2,62	11,86	7,63	7,54	4,77	3,30	0,00	3,03	0,00	92,37	4,29
		19,16		31,01		15,26		10,72		10,19		4,19		197,94
0,005	11,86	0,00	21,55	8,13	22,03	0,00	25,29	6,49	23,54	20,55	18,81	0,00	3,07	0,00
		13,35		23,78		26,68		28,50		35,31		26,43		8,66
0,050	13,63	8,69	16,78	9,27	9,36	4,05	9,24	5,94	0,00	0,00	4,00	0,00	44,29	28,57
		22,00		32,25		15,71		18,66		15,09		18,71		71,19
0,500	13,26	0,00	0,00	0,00	15,31	6,11	0,00	0,00	4,70	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		27,86		30,14		32,63		20,42		37,61		21,00		19,05
5,000	21,05	13,17	64,42	41,50	14,48	0,00	52,57	9,94	73,64	0,00	0,00	0,00	65,69	14,35
		56,30		99,05		62,36		58,03		206,32		10,23		160,27
Kulturen mit 43,34 µmol⁻¹ SDS														
0,000	0,00	0,00	3,00	0,00	6,65	0,00	0,00	0,00	7,18	2,74	6,46	2,41	3,75	0,00
		4,92		8,67		14,63		3,91		18,23		16,06		6,49
0,005	15,41	8,51	13,01	11,07	5,05	3,39	11,42	7,60	12,17	10,46	15,48	11,47	15,43	5,97
		19,05		17,76		6,42		15,17		17,54		18,40		23,09
0,050	13,48	10,48	13,16	11,76	6,71	5,15	7,70	6,29	9,12	7,00	9,53	3,83	5,10	3,83
		16,49		17,33		7,92		11,11		16,77		11,39		6,30
0,500	8,54	5,60	15,56	14,04	13,60	0,00	20,11	16,78	5,90	0,00	7,55	0,00	0,00	0,00
		9,33		16,34		28,05		21,66		13,85		17,85		16,43

Tabelle 4.22.: Relativer Anteil der α -Proteobacteria an den Eubacteria [%] in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer, sowie der Cd^{2+} - und SDS-Konzentration. Angegeben sind jeweils der Median, sowie das 25. Percentil (25. Perc.) und das 75. Percentil (75. Perc.) aus 2 unabhängigen Versuchen mit je 10 Messungen.

Cd^{2+} [mmol $^{-1}$]	24 h		48 h		72 h		120 h		168 h		216 h		240 h	
	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.
		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.
Kulturen ohne SDS														
0,000	18,18	8,74	5,05	1,50	6,78	4,66	6,36	0,00	5,71	1,23	8,32	0,69	15,96	6,44
		91,09		10,71		8,67		9,24		9,45		15,07		128,61
0,005	0,00	0,00	11,40	0,00	21,02	14,94	11,39	0,00	29,27	15,56	0,00	0,00	31,50	0,00
		0,00		24,48		27,68		13,39		35,13		35,90		46,31
0,050	8,04	0,00	20,76	10,46	7,88	2,61	9,22	7,58	6,37	0,00	0,00	0,00	21,43	8,21
		17,17		33,15		781,83		13,36		12,32		10,56		148,38
0,500	0,00	0,00	0,00	0,00	3,66	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		19,75		31,67		11,00		15,25		0,00		15,00		9,24
5,000	100,00	64,63	56,62	31,00	0,00	0,00	13,85	0,00	70,69	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		257,94		110,01		0,00		37,00		207,69		42,19		133,12
Kulturen mit 43,34 μmol^{-1} SDS														
0,000	7,57	4,45	3,67	0,48	3,11	0,00	3,85	1,02	4,31	2,51	6,69	3,92	13,50	9,67
		11,24		6,13		5,81		6,51		16,28		8,33		19,82
0,005	6,79	4,27	20,31	16,70	11,67	4,28	16,06	14,65	14,98	10,62	16,95	9,41	19,60	12,23
		11,10		21,74		23,39		18,67		17,99		28,54		31,03
0,050	4,15	2,82	13,20	6,35	8,65	4,28	15,12	14,16	6,96	4,76	8,20	6,06	9,43	6,52
		6,18		19,91		17,24		17,64		8,88		9,08		11,83
0,500	5,87	4,59	19,83	14,77	37,91	0,00	20,59	14,81	0,00	0,00	5,82	0,00	6,21	0,00
		8,73		23,39		42,18		27,99		8,73		12,66		14,87

Tabelle 4.23.: Relativer Anteil der β -Proteobacteria an den Eubacteria [%] in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer, sowie der Cd^{2+} - und SDS-Konzentration. Angegeben sind jeweils der Median, sowie das 25. Percentil (25. Perc.) und das 75. Percentil (75. Perc.) aus 2 unabhängigen Versuchen mit je 10 Messungen.

Cd^{2+} [mmol l^{-1}]	24 h		48 h		72 h		120 h		168 h		216 h		240 h	
	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.
		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.
Kulturen ohne SDS														
0,000	0,0	0,00	2,33	0,00	7,56	3,44	8,77	4,50	1,18	0,00	3,11	0,00	25,46	5,99
		0,00		6,04		102,92		84,05		4,05		6,53		155,00
0,005	5,50	0,00	0,00	0,00	4,37	0,00	2,55	0,00	7,62	0,00	4,11	0,00	0,00	0,00
		14,24		9,53		11,46		7,49		11,87		12,62		26,67
0,050	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		4,09		6,13		4,33		0,00		2,66		10,00		0,00
0,500	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		6,05		0,00		0,00		0,00		7,73		0,00		0,00
5,000	9,81	4,87	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	19,29	0,00	0,00	0,00
		13,47		0,00		0,00		0,00		0,00		40,99		31,00
Kulturen mit 43,34 μmoll^{-1} SDS														
0,000	0,00	0,00	4,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	10,23	8,05	4,90	1,65	0,00	0,00
		5,54		5,21		2,69		2,42		15,55		8,79		25,08
0,005	6,09	2,25	12,32	6,54	8,93	6,48	3,21	0,87	4,11	0,76	7,62	4,56	10,67	9,58
		9,06		15,38		13,99		4,22		9,40		9,48		12,13
0,050	1,93	0,00	3,57	1,80	3,97	3,05	3,60	1,31	7,48	4,28	5,63	3,12	7,83	5,76
		5,74		7,43		6,37		5,11		8,97		9,29		10,40
0,500	5,38	2,69	4,89	4,15	2,44	0,00	5,98	3,53	0,00	0,00	3,88	0,00	7,20	0,00
		8,83		8,00		9,48		15,36		3,56		10,24		13,92

Tabelle 4.24.: Relativer Anteil der γ -Proteobacteria an den Eubacteria [%] in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer, sowie der Cd^{2+} - und SDS-Konzentration. Angegeben sind jeweils der Median, sowie das 25. Percentil (25. Perc.) und das 75. Percentil (75. Perc.) aus 2 unabhängigen Versuchen mit je 10 Messungen.

Cd^{2+} [mmol $^{-1}$]	24 h		48 h		72 h		120 h		168 h		216 h		240 h	
	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.
		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.
Kulturen ohne SDS														
0,000	18,75	17,14	5,74	0,00	11,84	7,12	21,93	14,29	10,33	8,31	10,15	0,00	12,53	8,55
		31,82		14,03		262,52		68,71		14,04		16,15		46,01
0,005	0,00	0,00	10,18	0,00	3,56	0,00	4,47	0,00	0,00	0,00	6,53	0,00	8,60	0,00
		9,88		13,95		10,85		8,50		2,71		10,35		21,88
0,050	7,77	0,00	9,18	5,55	11,19	6,61	0,00	0,00	9,76	0,00	12,17	0,00	25,00	10,11
		16,93		13,05		19,91		0,00		14,77		21,31		151,05
0,500	14,86	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		27,97		12,50		32,74		19,26		0,00		0,00		20,79
5,000	11,15	6,22	11,31	4,17	0,00	0,00	0,00	0,00	31,98	0,00	0,00	0,00	87,32	31,92
		14,26		21,23		0,00		122,39		100,56		0,00		101,90
Kulturen mit 43,34 μmol^{-1} SDS														
0,000	6,41	0,00	3,40	2,05	0,00	0,00	2,90	2,00	11,82	6,09	4,83	0,00	6,11	3,28
		12,01		4,58		0,00		5,45		15,82		7,39		13,39
0,005	8,63	5,25	10,26	7,73	10,88	8,12	10,09	4,41	8,42	4,95	8,95	5,98	11,19	6,12
		11,35		12,19		12,53		11,44		13,66		12,62		13,92
0,050	5,82	4,38	5,07	1,97	9,64	7,80	9,71	4,73	9,25	7,04	6,63	5,60	5,58	4,29
		10,16		8,57		10,54		11,27		13,54		8,95		7,20
0,500	3,40	0,71	9,37	7,74	10,71	0,00	16,05	11,68	13,25	8,48	16,79	13,98	19,32	12,99
		6,51		11,20		14,15		18,11		25,48		23,75		175,70

Tabelle 4.25.: Relativer Anteil der δ -Proteobacteria an den Eubacteria [%] in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer, sowie der Cd^{2+} - und SDS-Konzentration. Angegeben sind jeweils der Median, sowie das 25. Percentil (25. Perc.) und das 75. Percentil (75. Perc.) aus 2 unabhängigen Versuchen mit je 10 Messungen.

Cd^{2+} [mmol $^{-1}$]	24 h		48 h		72 h		120 h		168 h		216 h		240 h	
	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.	Median	25. Perc.
		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.		75. Perc.
Kulturen ohne SDS														
0,000	0,00	0,00	3,26	0,00	7,36	5,20	7,23	4,78	0,00	0,00	3,89	0,00	4,57	1,48
		11,93		6,51		39,90		27,01		4,00		11,50		29,26
0,005	0,00	0,00	7,76	4,83	6,30	0,00	4,15	0,00	0,00	0,00	1,27	0,00	6,06	0,00
		0,00		9,38		8,71		18,71		2,94		4,09		10,67
0,050	0,00	0,00	6,98	3,42	0,00	0,00	12,49	9,45	8,75	0,00	13,52	0,00	13,33	0,00
		8,22		15,71		0,00		16,81		17,31		18,54		65,42
0,500	20,24	3,17	0,00	0,00	0,91	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	8,60	0,00	0,00	0,00
		31,24		36,23		2,08		10,44		0,00		26,78		11,65
5,000	12,90	3,81	0,00	0,00	0,00	0,00	43,90	34,81	0,00	0,00	0,00	0,00	151,96	126,25
		27,08		8,65		39,89		73,24		99,19		50,93		167,41
Kulturen mit 43,34 μmol^{-1} SDS														
0,000	6,36	0,00	2,22	0,00	2,23	0,00	2,93	0,00	7,79	5,37	7,68	5,41	8,49	4,01
		21,81		3,64		3,67		6,72		18,45		10,82		12,77
0,005	8,84	5,43	14,72	11,30	7,43	5,71	5,60	3,77	9,48	0,00	16,50	7,08	7,52	3,12
		12,38		18,20		9,87		7,99		16,16		23,08		21,74
0,050	6,95	2,65	10,80	6,08	7,32	6,39	7,50	4,90	6,19	3,62	4,92	3,05	3,61	0,00
		10,26		18,20		8,91		9,35		15,75		6,97		5,42
0,500	8,06	6,66	21,63	20,28	24,00	0,00	20,72	15,90	6,24	0,00	2,34	0,00	0,00	0,00
		10,69		23,71		40,00		26,39		10,13		5,72		10,71

4.2.4.3. Genetische Diversität der bakteriellen Gemeinschaft

Die Spezieszusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaften aller Kulturen zu verschiedenen Kultivierungszeiten wurde mittels DGGE-Analyse untersucht. Aus Proben der Kulturen wurde DNA extrahiert und amplifiziert. Die DNA-Amplifikate wurden im DGGE-Gel ihrem GC-Gehalt entsprechend aufgetrennt (Kap. 3.5.2). Die DNA-Banden der DGGE-Gele wurden anhand ihrer relativen Laufstrecken R_x sortiert und einander in einer binären Matrix den DNA-Bandenmustern aller Proben gegenübergestellt. Die Matrix ist in den Tabellen 4.27 (Kulturen ohne SDS) und 4.28 (Kulturen mit 43,34 μM SDS) dargestellt. Sie diente als Grundlage für die Berechnung euklidischer Distanzen zur Ermittlung der relativen Ähnlichkeiten der DNA-Bandenmuster, sowie für die Untersuchung der DNA-Bandenmuster mittels Hauptkomponentenanalyse (PCA). Abb. 4.23 stellt die Ergebnisse der PCA dar. Insgesamt wurden 58 verschiedene DNA-Banden ermittelt.

Die DNA-Bandenmuster wurden zudem hinsichtlich der Anzahl der DNA-Banden miteinander verglichen. In Tabelle 4.26 ist die Anzahl der DNA-Banden in den DGGE-Gelen der Begiftungsversuche von 0 bis 5 mM Cd^{2+} , mit und ohne SDS, sortiert nach der Kultivierungszeit angegeben. Dargestellt ist jeweils die Anzahl der DNA-Banden beider paralleler Fermentationen (I. und II.) eines jeden Versuchstyps. Die Anzahl der Banden variierte stark. Sie korrelierte weder mit der Cd^{2+} -, oder SDS-Konzentration, noch mit der Kultivierungszeit.

Die Bildung von Clustern in der PCA wurde nicht nachgewiesen. Zwar konzentrierten sich die Punkte einiger Kulturen (1. Fermentationen der Nullkontrolle, sowie der Versuche mit 0,005 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ohne SDS und 0,050 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Cd^{2+} ohne SDS) jeweils auf engem Raum, jedoch waren ihre Distanzen untereinander nicht geringer, als die zu anderen Proben. Die Distanzen zwischen den DNA-Bandenmustern paralleler Begiftungsversuche waren z.T. größer, als die Distanzen zu den DNA-Bandenmustern aus Kulturen mit anderen Cd^{2+} -, oder SDS-Konzentrationen, bzw. Kultivierungszeiten. Die Mehrheit der Proben konzentrierte sich in der PCA jedoch zwischen -0,4 bis 0,4 (Faktor 1) und -0,5 bis 0,4 (Faktor 2). Auffällig dabei ist, daß v.a. Proben aus den ersten Fermen-

tationen paralleler Begiftungsversuche abseits der Mehrheit der Punkte liegen. Daher wurde der Einfluß der Lagerung des gefrorenen Inokulums auf die genetische Diversität untersucht:

Alle Begiftungsversuche von 0 bis $0,5 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$, mit und ohne SDS, wurden *in duplo* durchgeführt. Zwischen der Durchführung des 1. und 2. Replikats verschiedener Begiftungsversuche lagen dabei unterschiedliche Zeiträume. Die Unterschiede der genetischen Diversität der Replikate nach jeweils 24, 48, ..., 240 h Kultivierung wurden als euklidische Distanzen ermittelt. Das arithmetische Mittel aller euklidischen Distanzen (24, 48, ..., 240 h: $n = 10$) eines Versuchstyps wurde in Beziehung zur Zeit gesetzt, die zwischen der Durchführung der beiden Replikate vergangen war. In Abbildung 4.22 a) ist dieser Zusammenhang graphisch dargestellt.

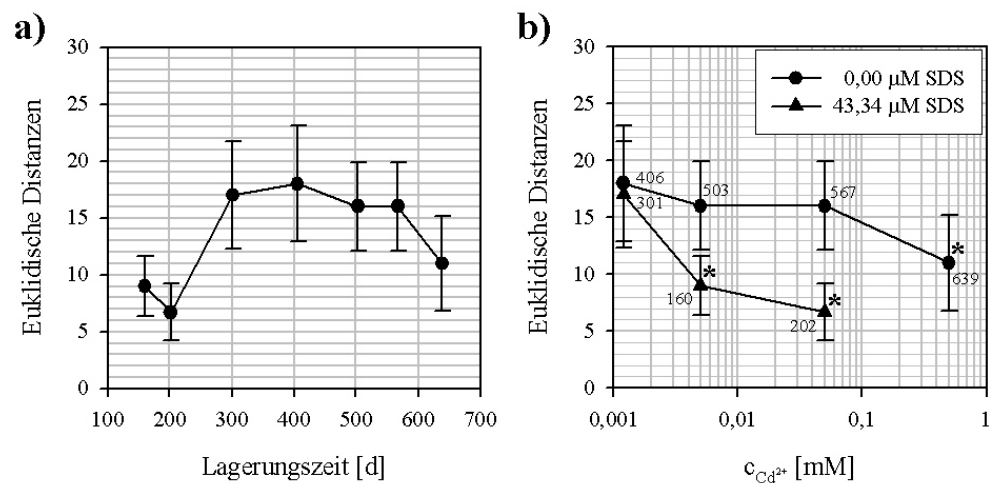


Abbildung 4.22.: a) Euklidischen Distanzen der genetischen Zusammensetzung paralleler Begiftungsversuche als Funktion der Zeit [d], die zwischen der Durchführung der Replikate verging.

b) Euklidische Distanzen der genetischen Zusammensetzung paralleler Begiftungsversuche als Funktion der Cd^{2+} - und SDS-Konzentration.

Die Werte in a) und b) repräsentieren das arithmetische Mittel der euklidischen Distanzen nach jeweils 24, 48, ..., 240 h Kultivierung, sowie die zugehörige Standardabweichung ($n = 10$). Mit einem * gekennzeichnete Werte unterschieden sich statistisch signifikant (U-Test) von denen Cd^{2+} -freier Kulturen (Null-, bzw. SDS-Kontrolle). Die Zahlen in b) entsprechen der Zeit [d] zwischen der Durchführung der Replikate (vgl. a)).

Zwar unterschieden sich die euklidischen Distanzen der Replikate in Abbildung 4.22 a) z.T. statistisch signifikant voneinander, jedoch konnte kein eindeutiger Zusammenhang zur Zeit zwischen der Durchführung beider Replikate

der Begiftungsversuche belegt werden. In Abbildung 4.22 b) sind relative Ähnlichkeiten der DNA-Bandenmuster der Replikate eines Versuchstyps in Form euklidischer Distanzen als Funktionen der Cd^{2+} - und SDS-Konzentration dargestellt. Der Unterschied der genetischen Zusammensetzung der Gemeinschaften sank statistisch signifikant (U-Test, 95 %) mit steigender Cd^{2+} -Konzentration. Signifikant verringerte Unterschiede der Zusammensetzung paralleler Begiftungsversuche wurden in Kulturen ohne SDS ab $0,5 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ nachgewiesen. In Kulturen mit SDS konnte die Abnahme der Unterschiede bereits ab $0,005 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ belegt werden. Ab $0,005 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ waren die Unterschiede der genetischen Zusammensetzung paralleler Begiftungsversuche mit SDS zudem statistisch signifikant ($P = 95 \%$) geringer, als die der Begiftungsversuche ohne SDS.

Nicht die Zeit der Lagerung des gefrorenen Inokulums schränkte somit die Varianz der genetischen Zusammensetzung der Gemeinschaft ein, sondern die Cd^{2+} -Konzentration. SDS im Kulturansatz verstärkte statistisch signifikant diesen Effekt.

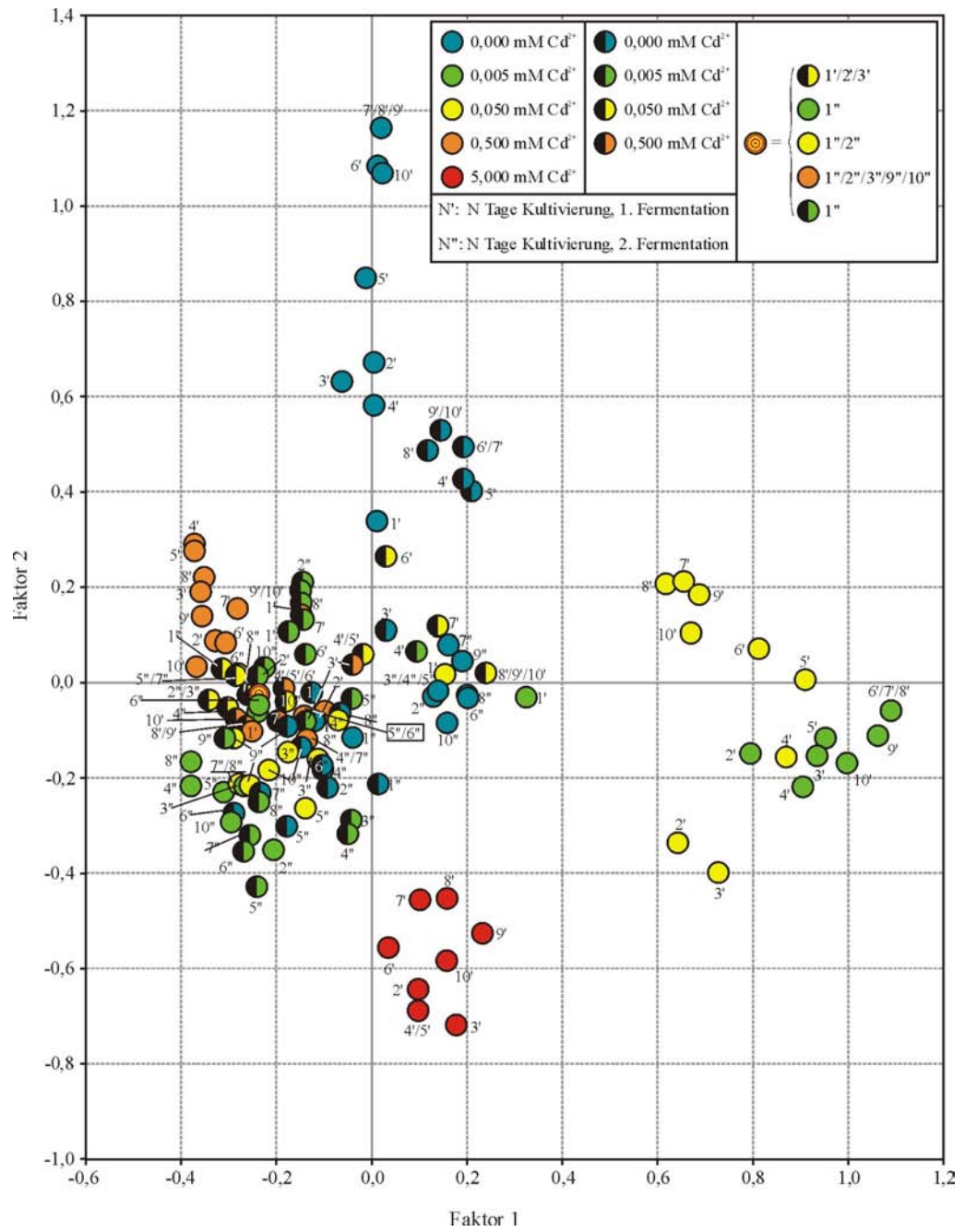


Abbildung 4.23.: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der DGGE-Bandenmuster der bakteriellen Gemeinschaften.

Tabelle 4.26: Anzahl der DNA-Banden in den DGGE-Gelen in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit [h], sowie der Cd^{2+} - [mmol l^{-1}] und SDS-Konzentration [μ mol l^{-1}]. Die Daten der parallelen Fermentationen sind jeweils in Spalte I. und II. aufgeführt. Die Abkürzungen "n.d." bezeichnet nicht durchgeführte Begiftungsversuche, "k.D." steht für "keine Daten".

SDS [μ M]		0,00									
Cd ²⁺ [mM]		0,000		0,005		0,050		0,500		5,000	
Fermentation		I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.
Kultivierungszeit [h]	24	6	2	7	0	6	0	1	0	16	n.d.
	48	13	5	12	6	13	0	9	0	15	n.d.
	72	14	7	12	4	13	4	11	0	16	n.d.
	96	14	7	13	4	14	9	15	1	16	n.d.
	120	11	7	13	6	14	7	14	2	16	n.d.
	144	15	8	15	7	13	8	9	2	14	n.d.
	168	16	10	15	7	13	7	13	1	12	n.d.
	192	16	9	15	5	13	7	12	3	11	n.d.
	216	16	8	14	6	13	6	12	0	12	n.d.
240	15	6	13	7	10	5	10	0	13	n.d.	
SDS [μ M]		43,34									
Cd ²⁺ [mM]		0,000		0,005		0,050		0,500		5,000	
Fermentation		I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.
Kultivierungszeit [h]	24	1	4	2	0	0	3	6	k.D.	n.d.	n.d.
	48	7	13	3	8	0	4	0	k.D.	n.d.	n.d.
	72	6	16	4	8	0	4	5	k.D.	n.d.	n.d.
	96	11	14	8	6	5	4	5	k.D.	n.d.	n.d.
	120	12	11	9	10	5	6	5	k.D.	n.d.	n.d.
	144	14	9	8	7	6	5	5	k.D.	n.d.	n.d.
	168	14	11	7	7	7	6	3	k.D.	n.d.	n.d.
	192	12	3	5	5	8	4	1	k.D.	n.d.	n.d.
	216	10	9	6	5	8	3	1	k.D.	n.d.	n.d.
240	10	8	6	2	8	5	2	k.D.	n.d.	n.d.	

Tabelle 4.28: Binäre Matrix der DNA-Bandenmuster (DGGE) der Gemeinschaft in Kulturen mit 43,34 μ M SDS. In den jeweils 10 Spalten pro Fermentation sind von links nach rechts die DNA-Bandenmuster der Kulturen nach 24, 48, 72, ..., 240 h Kultivierungszeit dargestellt. Die Zeilen der Tabelle entsprechen unterschiedlichen relativen Laufstrecken R_x (vgl. Kap. 3.5.2.4 - R_x -Werte sind nicht dargestellt) der Banden im DGGE-Gel. Dunkelgrau gefüllte Zellen repräsentieren den Nachweis einer DNA-Bande mit einer der Tabellenzeile entsprechenden relativen Laufstrecke im Gel. Aus Proben der 2. Fermentation mit 0,5 mM Cd^{2+} konnte nicht genügend DNA für die DGGE-Analyse extrahiert werden, Versuche mit 5 mM Cd^{2+} und 43,34 μ M SDS wurden nicht durchgeführt.

43,34 μ mol $^{-1}$ SDS									
0,000 mM Cd^{2+}		0,005 mM Cd^{2+}		0,050 mM Cd^{2+}		0,500 mM Cd^{2+}		5,000 mM Cd^{2+}	
Fermentation I.	Fermentation II.	Fermentation I.	Fermentation II.	Fermentation I.	Fermentation II.	Fermentation I.	Fermentation II.	Fermentation I.	
								• keine Daten •	

5. Diskussion

Bakterien und bakterielle Gemeinschaften können auf vielfältige Weise auf ungünstige Umweltbedingungen (Streß) reagieren. Die bakterielle Streßantwort kann auf genetischer, physiologischer, morphologischer, oder auf der Verhaltensebene erfolgen (Nikolaev, 2004; Vorob'eva, 2004). Die Streßantwort kann durch Bildung von Überdauerungsstadien (Feofilova, 2003), Nutzung von Reparaturmechanismen, Immobilisierung toxischer Substanzen, Efflux der Noxen, Nutzung der Noxen als C-Quelle, bzw. Transformation in weniger toxische oder flüchtigere Verbindungen erfolgen (Ford, 2000). Zudem kann die Bildung von Biofilmen eine bakterielle Antwort auf Streß sein (Kaiser und Losick, 1993; LaPaglia und Hartzell, 1997; Davey und O'Toole, 2000). Streß kann sich im Ausschleusen von Proteinen und niedermolekularen Substanzen (Roshchina und Petrov, 1997), in der Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies, in der Bildung von Überdauerungsstadien (Dukan und Nyström, 1998), in der Verzögerung oder Verringerung der Stoffwechselaktivität (Feofilova, 2003), im Abbau von Ribosomen und Nucleinsäuren, in veränderter Enzymaktivität, im Verlust der Koloniebildungsfähigkeit, in Wachstumsverzögerungen, Aggregation und Adhäsion auswirken (Nikolaev, 2004).

In vorliegender Arbeit wurde unter Laborbedingungen die Wirkung von Cd^{2+} und SDS auf bakterielle Gemeinschaften aus dem Wattsediment der deutschen Nordseeküste untersucht. Cd^{2+} und SDS wurden sowohl einzeln, als auch kombiniert appliziert. Als Endpunkte dienten die Gesamtzellkonzentration, die Lebendzellzahl, die Kultivierbarkeit, die Struktur der Gemeinschaft, die metabolische Aktivität, sowie die physiologische und metabolische Diversität. Die Gemeinschaften wurden dabei als Sedimentsuspensionskultur in Kleinfermentern mit Cd^{2+} und SDS begiftet. Bedingt durch die komplexe Versuchsanordnung (Kap. 3.3) erforderten die Begiftungsversuche einen hohen Zeitaufwand. Vorbereitung, Durchführung und Aufbereitung der Proben eines Begiftungsversuchs dauerten durchschnittlich etwa zwei Monate. Damit einhergehend war die Anzahl der durchführbaren Experimente eingeschränkt. Daher wurden mit der phylogenetischen Struktur und der genetischen Zusammensetzung, der metabolischen Aktivität und Diversität, sowie der physiologischen Diversität ein breites Methodenspektrum abgedeckt, um ein möglichst vielfältiges Bild der bakteriellen Gemeinschaft zu erhalten.

5.1. Kultivierung:

Exakt reproduzierbare Untersuchungen zur Auswirkung von Cd^{2+} und SDS auf die Struktur und Aktivität bakterieller Gemeinschaften *in situ* sind nicht durchführbar, da die Zusammensetzung und Aktivität der bakteriellen Gemeinschaft im Wattenmeer starken, durch vielfältige Faktoren bedingten Schwankungen unterliegt. So wiesen Van Duyl und Kop (1994) einen Einfluß der Temperatur auf die Aktivität bakterieller Gemeinschaften der Nordsee nach. Sie zeigten auch, daß die Aktivität vom Standort und von der Substratverfügbarkeit abhing. Van Es (1982) fand ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der Temperatur und der Aktivität mariner Gemeinschaften im Ems-Dollard-Ästuar. Bei Untersuchungen zur Wirkung von Cd^{2+} und SDS auf bakterielle Gemeinschaften hätten saisonale Änderungen der bakteriellen Gemeinschaft demnach von den durch Cd^{2+} und SDS verursachten Änderungen abgegrenzt werden müssen. Daher wurden die Begiftungsversuche mit Cd^{2+} und SDS unter definierten, kontrollierten Bedingungen im Labor durchgeführt. Temperatur, pH und Salinität blieben konstant. Der Sauerstoffpartialdruck sank nicht unter 70 %. Variiert wurden lediglich die Cd^{2+} - und SDS-Konzentration. Die verwendeten Inokula waren Aliquots einer einzigen Sedimententnahme (vgl. Kap. 4.1.1), um die gleiche Zusammensetzungen der bakteriellen Gemeinschaften beim Start der Begiftungsexperimente zu gewährleisten.

5.2. Auswahl und Konzentration der Noxen:

5.2.1. Auswahl des Schwermetalls:

Cadmium wurde wegen seiner Relevanz in aquatischen Lebensräumen und seiner gut untersuchten Wirkung auf Mikroorganismen als Schwermetall für die Begiftung der bakteriellen Gemeinschaft ausgewählt (Kap. 1.3.1). Das Element Cadmium besitzt dort eine hohe Persistenz. Es wird nur sehr langsam durch Bildung sulfidischer Erze dem Lebensraum dauerhaft entzogen. Sulfatreduzierenden Bakterien, als Bildnern von H_2S , kommt dabei eine besondere Rolle zu (Fortin *et al.*, 1995). Die Bioverfügbarkeit von Cadmium in aquatischen Lebensräumen ist schwer abzuschätzen. Durch Bildung von CdS kann gelöstes Cd^{2+} ebenso ausfallen, wie durch Bildung kolloidaler Hydroxide, Carbonate und Phosphate, wenn Eisenionen und Phosphate im Medium enthalten sind (Drbal *et al.*, 1985). Auch durch Bindung von Cd^{2+} an Sedimentpartikel kann die Konzentration des bio-

verfügbaren Cadmiums herabgesetzt werden (Sleck *et al.*, 1999). Fent (2003) schätzte den Anteil frei gelöster Cd^{2+} -Ionen in Seewasser auf 3,5 % der Gesamtkonzentration. Pempkowiak *et al.* (1999) gaben die Bioverfügbarkeit von Schwermetallen in marinen Sedimenten mit bis zu 3,7 % der Gesamt-Schwermetallkonzentration an. Die Bioverfügbarkeit (als Konzentration gelöster Cd^{2+} -Ionen) des Cadmiums in dem in dieser Arbeit verwendeten Kultursystem wurde untersucht. Sie betrug zwischen 32 und 96 % (im Mittel 74 %) der eingesetzten Konzentration (Kap. 4.1.4). Damit war der Anteil des bioverfügbaren Cd^{2+} ca. 20-fach höher, als der von Fent (2003) und Pempkowiak *et al.* (1999) geschätzte Wert. Fent (2003) und Pempkowiak *et al.* (1999) bezogen sich allerdings auf die Meerwasser-Sediment-Verhältnisse *in situ*. Die geringe Sedimentkonzentration (0,5 % w/v) in den hier durchgeführten Begiftungsversuchen, die Tatsache, daß im Fermenter kein Wasseraustausch stattfand, sowie die deutlich höheren Cd^{2+} -Konzentrationen im Kulturmedium führten zu höheren Konzentrationen gelösten Cadmiums.

5.2.2. Eingrenzung der zu verwendenden Cd^{2+} -Konzentrationen:

Da das Wattsediment zum Inokulieren der Begiftungsversuche nicht cadmiumfrei war, gab es strenggenommen keine Null-Kontrolle, da selbst die Versuche ohne Zugabe von Cadmiumacetat schon $1,2 \mu\text{mol l}^{-1} \text{Cd}^{2+}$ enthielten. In vorliegender Arbeit wurde Cadmium demnach in Konzentrationen von $1,2 \mu\text{mol l}^{-1}$ bis $5,0 \text{mmol l}^{-1}$ eingesetzt.

Die für die Nordsee angegebenen Cadmiumkonzentrationen variieren zwischen 0,1 (Haarich und Schmidt, 1993) und $26,7 \text{nmol kg}^{-1}$ Wattsediment (Umweltbundesamt, 2003), bzw. $0,89 \text{nmol l}^{-1}$ Seewasser (Iverson und Brinckman, 1978). Die hier maximal verwendete Cd^{2+} -Konzentration von $5,0 \text{mmol l}^{-1}$ übertraf somit deutlich die Cd^{2+} -Konzentrationen der Nordsee. Die Spannbreite der eingesetzten Konzentrationen lag mit $0,005$ bis $0,5 \text{mmol l}^{-1} \text{Cd}^{2+}$ aber dennoch im Rahmen der von anderen Autoren in bakteriellen Testsystemen verwendeten Konzentrationen: Fulladosa *et al.* (2005) setzten *Vibrio fischeri* 0 bis $0,5 \text{mmol l}^{-1} \text{Cd}^{2+}$ aus, Yannai und Berdicevski (1995) konnten Wachstum bei marinen, mediterranen Gemeinschaften bis $2,2 \text{mmol l}^{-1} \text{Cd}^{2+}$ nachweisen. Roanne und Pepper (2000) wiesen das Wachstum zweier Bakterienstämme mit Cd^{2+} -Konzentrationen bis zu $2,5 \text{mmol l}^{-1}$ nach.

5.2.3. Auswahl der lipophilen/amphiphilen Substanz:

Das anionische Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) findet vielfältige Anwendung in Reinigungsmitteln und gelangt in großen Mengen in die Umwelt (Kap. 1.3.2). Die Einlagerung von SDS in Zellmembranen ist als exothermer Vorgang energetisch begünstigt (Tan *et al.*, 2002). SDS wirkt bakterizid und viruzid. Inuzuka *et al.* (1969) zeigten, daß Hfr-Stämme von *Escherichia coli* K-12 nach SDS-Behandlung ihre Fähigkeit zur Rekombination verloren. Woldringh und van Iterson (1972) wiesen Schäden in der Ultrastruktur SDS-behandelter *E. coli* nach, die zum Verlust von 65 % der Proteine, 25 % der Ribonukleinsäuren, sowie 40 % der Desoxyribonukleinsäuren der Zellen führten. Bestman-Smith *et al.* (2001) belegten die viruzide Wirkung von SDS auf das AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) verursachende Virus HIV-1_{NL4-3} (Humanes Immundefizienz-Virus). SDS verhinderte die Fusion des HIV mit 1G5-Zellen. Piret *et al.* (2002) wiesen die viruzide Wirkung von SDS für weitere, sowohl behüllte (*Herpes simplex* Viren, Semliki Forest Virus), als auch unbehüllte Viren (Papillomaviren, Reoviren, Rotaviren, Poliovirus) nach. Sie führten die Wirkung von SDS auf die Auflösung der Virenhülle, bzw. die Denaturierung viraler Proteine durch SDS zurück.

Den bedeutendsten Mechanismus der Cd²⁺-Resistenz bildet der Efflux der Cd²⁺-Ionen über membranständige Transportproteine. Daher erschien SDS, mit seiner Potenz die Zusammensetzung von Membranen, bzw. die Struktur von Proteinen zu stören, als geeigneter Modulator der Cd²⁺-Toxizität. Zudem können Bakterien durch Änderung der Phospholipid-Komposition der Membran auf membrantoxische Noxen reagieren. Für die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde dies ebenfalls nachgewiesen, und daraus folgend die Abhängigkeit der Cadmiumtoxizität von der Phospholipid-Komposition (Howlett und Avery, 1997).

5.2.4. Eingrenzung der zu verwendenden SDS-Konzentrationen:

Gasblasen, die beim Aufstieg durch Flüssigkeiten die Oberfläche durchbrechen, können zur Schaumbildung führen, wenn die, sich zwischen den Gasblasen bildenden Flüssigkeitslamellen durch Tenside, Proteine, Polysaccharide, etc. stabilisiert werden. Die Ansammlung großer Mengen Schaum im Fermenter hätte die Durchführung der Begiftungsversuche gefährdet.

Die Menge des Schaums im Fermenter wird daher vom Gleichgewicht der Bil-

dungs- und Zerfallsgeschwindigkeit bestimmt. Die Bildungsgeschwindigkeit war aufgrund der konstanten Begasungsrate der Kultur nicht zu beeinflussen. Daher kam der Minimierung der Schaumstabilität, eine besondere Bedeutung bei der Vermeidung von Schaum-Ansammlungen zu.

Schaum wird mit steigender Oberflächenelastizität (Gibbs'sche Elastizität) stabiler (Djabbarah und Wasan, 1985). Djabbarah und Wasan (1985) zeigten, daß die Schaumstabilität mit Tensidkonzentrationen nahe der kritischen Mizellenbildungskonzentration c_{mc} ihr Maximum erreicht. Somit war in Kulturen mit SDS-Konzentrationen nahe der c_{mc} die maximale Schaumansammlung im Fermenter zu erwarten.

Die c_{mc} konnte nicht mittels drop-collapse-Test nach Bodour *et al.* (1998) (Kap. 3.7.1), dagegen jedoch mit einer modifizierten Blasendruckmethode nach Cuny und Wolf (1956) (Kap. 3.7.2) bestimmt werden: Die maximale Oberflächenspannung σ_L ($45,6 \text{ mN m}^{-1}$) wurde in Seewasserbouillon X-2 ab $1733 \mu\text{mol l}^{-1}$ SDS gemessen.

Bodour *et al.* (1998) bestimmten die c_{mc} von SDS in Seewasser mittels du Nouy-Ring und gaben sie mit $6397 \mu\text{mol l}^{-1}$ an. Tan *et al.* (2002) gaben jedoch eine c_{mc} von $1570 \mu\text{mol l}^{-1}$ für SDS in $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ NaCl-Puffer an, Becker *et al.* (1975) publizierten ein Temperatur-Konzentrations-Phasendiagramm, dem eine c_{mc} von $1650 \mu\text{mol l}^{-1}$ (25°C) zu entnehmen ist.

Die maximale SDS-Konzentration im Fermenter wurde durch Versuche mit abgestuft abnehmender SDS-Konzentration ermittelt. Die Betriebsbedingungen entsprachen denen der Begiftungsversuche (Kap. 3.2: 500 rpm; 20°C ; pH $7,2 \pm 0,2$; 6 l h^{-1} Luft; Seewasserbouillon X-2). Bei der verwendeten Begasungsrate konnte mit $43,34 \mu\text{mol l}^{-1}$ SDS maximal $1/40$ der c_{mc} eingesetzt werden, ohne daß Schaum in den Abluftsterilfilter des Reaktors gedrückt wurde.

5.2.5. Verwertung von SDS durch die marine bakterielle Gemeinschaft:

Vor allem bei Pseudomonaden wurde die Nutzung von SDS als C- und Energiequelle nachgewiesen (u.a.: Thomas und White, 1989; Marchesi *et al.*, 1994).

Die Fähigkeit der bakteriellen Gemeinschaft, SDS als alleinige C- und Energiequelle zu nutzen wurde in Kulturen mit $3467 \mu\text{mol l}^{-1}$ und $43,34 \mu\text{mol l}^{-1}$ SDS als alleiniger C- und Energiequelle untersucht (Kap. 4.1.3).

Kulturen mit $43,34 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ SDS unterschieden sich weder in der Trübung, noch im Anteil des reduzierten Resazurins von den Negativkontrollen. Eine Verwertung von SDS kann demnach ausgeschlossen werden. Kulturen mit $3467 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ SDS unterschieden sich ebenfalls nicht im Anteil des reduzierten Resazurins von den Negativkontrollen, wiesen jedoch eine statistisch signifikant höhere Trübung auf. Die Differenz zur Extinktion der Negativkontrollen kann nur zu 1,8 % durch die Absorption des SDS erklärt werden. Einerseits kann sie also für Wachstum in den Kulturen sprechen. Andererseits lag die SDS-Konzentration beim zweifachen der cmc. Die Bildung von Mizellen würde durch die vielfache Lichtbrechung an den Phasengrenzen zwischen Medium und Mizellen ebenfalls zu erhöhter Trübung der Kultur führen.

Aus den SDS-haltigen Kulturen wurde versucht Bakterienstämme auf Agarplatten (mit jeweils gleicher SDS-Konzentration) zu isolieren. Dies scheiterte im Fall der Kulturen mit $3467 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ SDS. Aus Kulturen mit $43,34 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ SDS konnten dagegen 5 Stämmen isoliert werden. Die 5 Stämme konnten allerdings nicht in Flüssigkulturen mit SDS als alleiniger C- und Energiequelle kultiviert werden. Außerdem wuchsen ihre Kolonien nicht auf der Agaroberfläche, sondern im Agar versenkt. Daraus läßt sich schließen, daß die Isolate nicht das SDS, sondern den Agar der Festmedien als C- und Energiequelle nutzten. Die Verwertung von Agar wurde bei vielen marinen Bakterien, wie z.B. bei Spezies des Genus *Pseudoalteromonas* (Holmström und Kjelleberg, 1999), bei *Alteromonas spec.* (Leon *et al.*, 1992), bei *Pseudomonas atlantica* (Morrice *et al.*, 1984) oder *Microscilla spec.* (Zhong *et al.*, 2001) beobachtet. Agar kommt als Substrat in marinen Ökosystemen vor. Es entstammt den Zellwänden von Seegras (z.B.: *Sphaerococcus euchema*).

Insgesamt sprechen somit sowohl der Resazurintest, als auch die Trübungsmessungen in Kombination mit den Kultivierungsversuchen auf Fest- und Flüssigmedien gegen die Verwertung von SDS durch die bakterielle Gemeinschaft.

5.3. Einfluß von Cd²⁺ und SDS auf die Gesamtzellkonzentration, Lebendzellzahl und Kultivierbarkeit der bakteriellen Gemeinschaft

5.3.1. Wirkung von Cd²⁺ und SDS auf Lebendzellzahl und

Gesamtzellkonzentration:

Es konnten keine statistisch signifikanten Einflüsse von Cadmium und SDS auf die Gesamtzellkonzentration der bakteriellen Gemeinschaft nachgewiesen werden. Die Kultivierungsdauer hatte einen leichten Einfluß auf die Gesamtzellkonzentration (Kap. 4.2.1.1). Die Gesamtzellkonzentration betrug nach 2 h Kultivierung $5,6 \cdot 10^7 \text{ ml}^{-1}$. Sie stieg bis 72 h auf Werte zwischen $5,4 \cdot 10^8$ und $1,3 \cdot 10^9 \text{ ml}^{-1}$ und sank bis 240 h Kultivierungszeit auf $1,6 \cdot 10^8$ bis $2,0 \cdot 10^8 \text{ ml}^{-1}$.

Mit Ausnahme 24 und 240 h alter Kulturen mit SDS, wurde in allen Kulturen eine statistisch signifikante Verringerung der Lebendzellzahl mit steigender Cadmiumkonzentration nachgewiesen. Die Lebendzellzahlen der Kulturen ohne und mit $43,34 \mu\text{mol l}^{-1}$ SDS unterschieden sich dabei nicht statistisch signifikant. Ein Einfluß von SDS auf die Lebendzellzahl der Gemeinschaft konnte somit nicht nachgewiesen werden.

5.3.1.1. Wirkung von Cd²⁺ auf Lebendzellzahl und

Gesamtzellkonzentration:

Cadmium wirkt vor allem durch Inaktivierung von Proteinen (Montuelle *et al.*, 1994), indem es irreversibel an Sulfhydrylgruppen bindet oder per Ionenaustausch Metall-Kationen aus aktiven Zentren von Enzymen verdrängt (Kap. 1.3.1). Dies kann zu reduziertem Wachstum führen, wie es u.a. von Rossbach *et al.* (2000) für *Pseudomonas fluorescens* und Fulladosa *et al.* (2005) für *Vibrio fischeri* beobachtet wurde. Hinweise auf Zell-Lyse als unmittelbare Wirkung von Cadmium bietet die Literatur nicht. Geringere Biomasse in Proben aus chronisch Schwermetall-kontaminierten Habitaten, wie sie u.a. von Brookes und McGrath (1984), sowie Roane und Kellogg (1996) für Böden, und Fabiano *et al.* (1994) für marine Sedimente beschrieben wurden, sind somit wahrscheinlich eher eine langfristige Folge reduzierten Wachstums, als der kurzfristigen, unmittelbaren Zerstörung von Zellen durch Cadmium. Cadmium wird von Bakterien innerhalb weniger Minuten aufgenommen (Ladagga *et al.*, 1985; Ron *et al.*, 1992). Wachstums-hemmende Effekte hätten demnach in den Begiftungsversuchen auch innerhalb der ersten 24 h der Kultivierung auftreten

können. Allerdings stiegen die Gesamtzellkonzentrationen insgesamt nur geringfügig an: Die Gesamtzellkonzentration der Kulturen in den Begiftungsversuchen nach 2 h Kultivierung betrug $5,6 \cdot 10^7$ Z/ml. Bei einer Fehlerbreite der Methode von ca. 45 % wären ein Anstieg der Gesamtzellkonzentrationen auf weniger $1,5 \cdot 10^8$ Z/ml nicht statistisch signifikant nachweisbar. In unbegifteten Kulturen stieg die Gesamtzellkonzentration im Mittel auf $2,0 \cdot 10^8$ Z/ml an. Eine geringfügig verminderte Wachstumsraten lag demnach möglicherweise auch in vorliegender Arbeit vor, war jedoch aufgrund des insgesamt geringen Wachstums nicht nachweisbar.

Die Gesamtzellkonzentration wurde durch Cadmium in den Batchkulturen der Begiftungsversuche nicht signifikant beeinflusst, während die Lebendzellzahl mit steigender Cadmiumkonzentration abnahm. Schwermetall-vermittelte Reduktion der Teilungsfähigkeit (Verringerung der Lebendzellzahl) wurde von anderen Autoren ebenfalls beschrieben (u.a. Rossbach *et al.*, 2000; Fulladosa *et al.*, 2005).

Mit zunehmender Cd^{2+} -Konzentration verloren die Bakterien der Gemeinschaft somit ihre Teilungsfähigkeit. Ihre Zellstruktur blieb dagegen intakt. Da die Begiftungsversuche als Batchkultur geführt wurden, blieben inaktivierte Zellen im Fermenter erhalten und waren mittels DAPI-Färbung nachweisbar.

5.3.1.2. Wirkung von SDS auf Lebendzellzahl und

Gesamtzellkonzentration:

Die SDS-vermittelte Auflösung von Membranen, und damit die Lyse von Bakterien, ist ein bekannter Effekt. Neben der Denaturierung von Proteinen ist die membrantoxische Wirkung ein wichtiger Aspekt der bakteriziden und viruziden Wirkung von SDS (Kap. 5.2.3). Die Gesamtzellkonzentrationen SDS-freier und SDS-haltiger Begiftungsversuche unterschieden sich allerdings nicht. Dies spricht gegen die Lyse von Bakterien. Allerdings wurde die Auflösung von Zellmembranen erst bei wesentlich höheren SDS-Konzentration beschrieben. Woldringh und van Iterson (1972) belegten die Lyse von *Escherichia coli* durch $1,7 \text{ mmol l}^{-1}$ SDS. Für die Auflösung von Biomembranen wurde von Helenius und Simons (1975) eine SDS-Konzentration von $1,6 \pm 0,3 \text{ mmol l}^{-1}$ vorausgesetzt. Die SDS-Konzentration der Begiftungsversuche

betrug bis zu $43,34 \mu\text{mol l}^{-1}$ SDS. Dies entsprach demnach $1/44$ bis $1/30$ der erforderlichen SDS-Konzentration zur Lyse von Bakterien. Ein Effekt von SDS auf die Gesamtzellkonzentration war somit nicht zu erwarten.

In Kulturen mit $43,34 \mu\text{mol l}^{-1}$ SDS und ohne Cd^{2+} war die Lebendzellzahl nach 24 h Kultivierung signifikant geringer, als in Kulturen ohne Cd^{2+} und SDS (Tab. 4.2). Nach längerer Kultivierungszeit waren keine signifikanten Unterschiede zu SDS-freien Kulturen nachweisbar. Möglicherweise beruhte diese Verzögerung des Anstiegs der Lebendzellzahl auf der Adaption der Gemeinschaft an SDS. Isken und de Bont (1998) beschrieben die Möglichkeiten bakterieller Adaption an membrantoxische Substanzen. Bakterien können über Änderungen der hydrophilen Gruppen und des Sättigungsgrades der Phospholipide die Komposition der Zellmembranen ändern. Für *Pseudomonas spec.* beschrieben sie zudem einen Efflux-Mechanismus als Reaktion auf membrantoxische Substanzen.

5.3.2. Einfluß von Cd^{2+} und SDS auf die Kultivierbarkeit:

Allgemein ist nur ein Bruchteil der in einer Probe vorhandenen Bakterien kultivierbar. Lee und Fuhrmann (1991) konnten den Anteil der kultivierbaren Bakterien zwar durch 2-tägige Lagerung ihrer Seewasserproben 4- bis 23-fach erhöhen, jedoch betrug dieser dennoch weniger als 2 % der Gesamtzellkonzentration. Zimmermann *et al.* (1978) konnten dagegen Stoffwechselaktivität bei 6 - 12 % der Bakterien aus Seewasserproben der Ostsee nachweisen. Button *et al.* (1993) gelang es sogar 2 bis 60 % der Gesamtzellkonzentration zu kultivieren. Die Kultivierbarkeit von Bakterien kann zudem durch Wachstumsfaktoren beeinflusst werden. Bruns *et al.* (2002, 2003) wiesen die Stimulation der Kultivierbarkeit mariner Bakterien (2002) und von Bakterien aus Süßwasserproben (2003) nach. Die Kultivierbarkeit wurde durch Acyl-Homoserinlactone, v.a., jedoch durch zyklisches AMP gefördert.

Die Kultivierbarkeit C der bakteriellen Gemeinschaft wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestimmt (Kap. 4.2.1.3). In unbegifteten Kulturen variierte sie zwischen 0,2 und 100 %. Mit steigender Cd^{2+} -Konzentration nahm die Kultivierbarkeit Acetat-Pyruvat-verwertender Bakterien in allen Cd^{2+} -haltigen, bis zu 168 h alten Kulturen ab (Abb. 4.9). Zwischen 216 und 240 h konnte keine Abnahme der

C mit zunehmender Cd^{2+} -Konzentration mehr nachgewiesen werden. Die niedrigste Effektkonzentrationen (LOEC) für Cd^{2+} variierte abhängig von der Kultivierungsdauer.

Der Faktor, um den die C durch Zugabe von $0,5 \text{ mmol l}^{-1} Cd^{2+}$ im Vergleich zur C der Nullkontrollen verringert wurde, erreichte sowohl in Kulturen mit SDS, als auch ohne SDS ein Maximum zwischen 48 und 72 h. Nach 216 h nicht mehr nachweisbar war. Das bedeutet, daß die C in der Phase der höchsten metabolischen Aktivität am meisten beeinflusst wurde (Kap. 4.2.3.2). Gadd (1990) beschrieb die Abhängigkeit der Schwermetall-Biosorption von der metabolischen Aktivität der Zellen. Aktive Zellen nahmen größere Mengen an Schwermetallen auf. Dies läßt den Schluß zu, daß in den Begiftungsversuchen aus vorliegender Arbeit möglicherweise die intrazelluläre Cadmiumkonzentration in der Phase der höchsten metabolischen Aktivität am höchsten war. In Kulturen mit $43,34 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ SDS wurde die C in der Phase der größten metabolischen Aktivität signifikant stärker verringert, als in Kulturen ohne SDS. Ob dies ein unmittelbarer Effekt des SDS war, oder eine Modulation der Cd^{2+} -Wirkung durch SDS, konnte nicht geklärt werden.

McDougald *et al.* (1998) beschrieben das Phänomen der nicht kultivierbaren, jedoch lebenden Zellen (VBNC - viable but nonculturable). Sie vermuteten, daß VBNC Überdauerungsstadien sind, die, inaktiv, Streß-Situationen überstehen. Nilsson *et al.* (1991), Ravel *et al.* (1995), sowie Wai *et al.* (1996) konnten VBNC durch Temperaturerhöhung, bzw. Hitzeschock reaktivieren. Dabei handelte es sich allerdings um VBNC, die unter Substratmangel erzeugt wurden. Die Bildung von VBNC, als Folge des Einflusses von Cd^{2+} -, bzw. $Cd^{2+} + SDS$, wäre eine mögliche Erklärung für das beobachtete Phänomen der Abnahme der Kultivierbarkeit. Ob VBNC als Reaktion auf die Gegenwart von Cadmium tatsächlich entstehen, und ob diese reaktiviert werden können, müssen jedoch weitere Untersuchungen klären.

5.4. Auswirkung von Cd^{2+} und SDS auf die Struktur der Gemeinschaft

5.4.1. Phylogenetische Zusammensetzung

Sowohl *Archaea* als auch *Eubacteria* hatten in Kulturen mit $43,34 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ SDS tendenziell höhere Anteile an der Gesamtzellkonzentration als in Kulturen ohne

SDS. Verglichen mit Kulturen ohne Cadmium, war in Kulturen mit Cadmium der Anteil der *Archaea* an der Gesamtzellkonzentration tendenziell höher, der der *Eubacteria* dagegen tendenziell geringer.

Vereinzelt konnten Änderungen der Zusammensetzung der *Eubacteria* aufgezeigt werden: In Kulturen mit SDS stiegen tendenziell die Anteile der β -*Proteobacteria*. In Kulturen mit Cadmium und SDS wiesen tendenziell die GPHGC, CFB, α -*Proteobacteria*, β -*Proteobacteria* und δ -*Proteobacteria* höhere Anteile an den *Eubacteria* auf, als SDS-haltige Kulturen ohne Cd^{2+} . Die Anteile der CFB und β -*Proteobacteria* waren dagegen in SDS-freien Kulturen mit Cd^{2+} tendenziell geringer als in Kulturen ohne SDS und Cd^{2+} . Somit wurde die Zusammensetzung der marinen bakteriellen Gemeinschaft tendenziell sowohl durch Cd^{2+} , SDS, als auch Cd^{2+} und SDS beeinflusst.

Llobet-Brossa *et al.* (1998) untersuchten ebenfalls die phylogenetische Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft aus dem Dangaster Schlickwatt. Geyer (2006) kultivierte dasselbe Wattsediment, wie es in vorliegender Arbeit verwendet wurde. In Tab. 5.1 sind die Ergebnisse von Llobet-Brossa *et al.* (1998) für oberflächennahes Sediment (max. 2 cm), die Ergebnisse von Geyer (2006) nach 24, 72 und 240 h Kultivierung den Ergebnissen aus vorliegender Arbeit aus 2, 24, 72 und 240 h alten, unbegifteten Kulturen gegenübergestellt.

Tabelle 5.1: Vergleich der phylogenetischen Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft, wie sie

- von Llobet-Brossa *et al.* (1998) aus Sedimentkernen (unkultiviert)
- in vorliegender Arbeit nach 2, 24, 72 und 240 h Kultivierung (eign. Daten)
- von Geyer (2006) nach 24, 72 und 240 h Kultivierung ermittelt wurde.

	Llobet-Brossa <i>et al.</i> (1998)	eign. Daten 2 h	eign. Daten 24 h	eign. Daten 72 h	eign. Daten 240 h	Geyer (2006) 24 h	Geyer (2006) 72 h	Geyer (2006) 240 h
DAPI [Z/ml]	$4,5 \cdot 10^9$	$5,6 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^8$	$2,4 \cdot 10^8$	$2,3 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^8$	$6,0 \cdot 10^8$	$1,7 \cdot 10^8$
<i>Eubacteria</i> [% _{DAPI}]	59	7	30	55	54	48	62	46
<i>Archaea</i> [% _{DAPI}]	1	0	2	2	4	--	--	--
CFB [% _{DAPI}]	15	4	9	6	5	3	2	11
GPHGC [% _{DAPI}]	3	0	5	7	3	0	0	4
α - <i>Proteobacteria</i> [% _{DAPI}]	4	2	5	4	5	3	3	4
β - <i>Proteobacteria</i> [% _{DAPI}]	4	3	0	4	4	7	15	11
γ - <i>Proteobacteria</i> [% _{DAPI}]	4	3	5	6	5	19	23	25
δ - <i>Proteobacteria</i> [% _{DAPI}]	5	2	0	4	3	0	0	7

Die Gesamtzellkonzentrationen (DAPI) von Llobet-Brossa (1998) betragen etwa

das 100-fache der 2 h alten Kulturen aus vorliegender Arbeit, sowie das 10-fache der 24, 72 und 240 h alten Kulturen aus vorliegender Arbeit, sowie der Kulturen von Geyer (2006). Dies lag möglicherweise daran, daß das Inokulum der Kulturen aus vorliegender Arbeit und der Kulturen von Geyer (2006) vor der Verwendung eingefroren wurde. Gestützt wird diese These von Daten, die Mußmann *et al.* (2005) veröffentlichten. Sie gaben – in Übereinstimmung mit Llobet-Brossa *et al.* (1998) - die Gesamtzellkonzentration oberflächennaher Schichten des Dangaster Wattsediments mit $4,6 \cdot 10^9$ bis $6,4 \cdot 10^9$ Z/ml an. Die Gesamtzellkonzentrationen der Kulturen von Geyer (2006) und der Kulturen aus vorliegender Arbeit unterschieden sich nicht.

Signifikante Unterschiede zwischen der von Geyer (2006) und der in vorliegender Arbeit bestimmten phylogenetischen Zusammensetzung konnten aufgrund des großen Fehlers der Methode nicht ermittelt werden. Im Fall der Literaturdaten von Llobet-Brossa *et al.* (1998) konnte der Vergleich nicht durchgeführt werden, da Varianzen der Daten nicht angegeben waren.

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) umgeht als kultivierungsunabhängige Methode das Problem der unbekanntem Kultivierbarkeit (vgl. Kap. 5.3.2). Sie ist daher eine weit verbreitete Methode zur Untersuchung der phylogenetischen Zusammensetzung von bakteriellen Gemeinschaften. Allerdings ist die FISH anfällig für Fehler:

- **Ghosts** sind durch Protozoen oder Viren geschädigte Bakterien, die ihr Nucleoid verloren haben. Sie sind per FISH, nicht jedoch mit DAPI nachweisbar und können daher zur Überschätzung des Anteils der hybridisierbaren Zellen führen. Zweifel und Hagström (1995) identifizierten in Proben aus dem Skagerrak 68 - 98 % der Bakterien als Ghosts.
- Der **rRNA-Gehalt** von Bakterien hängt von ihrem physiologischen Status ab. Die Hybridisierbarkeit ist abhängig vom rRNA-Gehalt der Zellen (Karner und Fuhrmann, 1997; Oda *et al.*, 2000). Hungernde, oder geschwächte Bakterien sind schlechter mittels FISH nachweisbar.
- Die Präzision der FISH ist abhängig von der **Gesamtzellkonzentration** der Proben. In ungenügend verdünnten Proben besteht die Gefahr der Überlagerung von Zellen, und damit der Unterschätzung der Zellkonzentrationen. In zu stark verdünnten Proben besteht dagegen die Gefahr, daß phylogenetische

Gruppen unter die Nachweisgrenze verdünnt werden.

- Bouvier und del Giorgio (2003) analysierten bisher veröffentlichte Daten von Autoren, die Eub 338 als Sonde verwendeten. Sie forderten, daß die Konzentration der *Eubacteria* etwa der Gesamtzellkonzentration entsprechen sollte, da der Anteil der *Archaea* in den untersuchten Studien im Mittel bei 1,8 % lag. Dagegen variierten die Anteile der *Eubacteria* zwischen 1 und 100 % (Median: 56 %). Mittels Varianzanalyse identifizierten sie 8 Faktoren, die zusammen 72 % dieser Varianz erklären konnten. Vier davon waren der **Typ des Ökosystems**, das verwendete **Fluorochrom**, sowie die **Formamid-** und **Salzkonzentration** bei der Hybridisierung.

Für die FISH in vorliegender Arbeit wurden stets die gleichen Salz- und Formamidkonzentrationen verwendet. Alle verwendeten Sonden waren mit Cy3 markiert. Durch die Doppelmarkierung der Bakterien mit DAPI und der Cy3-markierten Nucleotidsonde konnten Ghosts identifiziert, und beim Zählen ausgeschlossen werden. Die Gemeinschaften wurden stets unter gleichen Bedingungen kultiviert. Ghosts, der Einfluß des Fluorochroms, sowie die Formamid- und Salzkonzentrationen wurden somit als Fehlerquellen ausgeschlossen.

Der Typ des Ökosystems kann die Ergebnisse der FISH beeinflussen. Bouvier und del Giorgio (2003) gaben den Anteil der *Eubacteria* an der Gesamtzellkonzentration für marine snow mit > 60 %, für Ästuare, marine Sedimente und Eis dagegen mit < 40 % an. Llobet-Brossa et al. (1998) gaben den Anteil der *Eubacteria* dagegen mit 59 % an. In küstennahen Sedimenten gaben sie den Anteil mit etwa 50 % an. Die Anteile der *Eubacteria* lagen in unbegifteten Kulturen bei 30 bis 55 % (s. Tab. 5.1). Somit entsprachen sie den Typen Ästuar/marines Sediment und küstennahe Sedimente.

Zusätzlich zu den oben aufgeführten Faktoren, muß man davon ausgehen, daß die eingesetzten Noxen die Hybridisierbarkeit beeinflussten. Daher wurde in vorliegender Arbeit ein möglicher Einfluß von Cd^{2+} und SDS untersucht (Kap. 4.2.4.1). Vereinzelt wurden Auswirkungen der Noxen auf die Hybridisierbarkeit festgestellt. Spezies-spezifische Unterschiede der Hybridisierbarkeit innerhalb phylogenetischer Gruppen konnten zudem nicht ausgeschlossen werden, da pro Domäne, bzw. Phylum jeweils nur ein Referenzstamm zur Verfügung stand. Geyer (2006) wies ebenfalls eine Störung der Hybridisierbarkeit von *γ -Proteobacteria* in Kul-

turen mit $0,05 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ nach.

Für den Nachweis von Korrelationen der Änderungen der phylogenetischen Zusammensetzung der Gemeinschaft mit der Kultivierungszeit, bzw. der Cd^{2+} - oder SDS-Konzentration mußte demnach der Effekt der Noxen groß genug sein, um trotz der beeinträchtigten Präzision der Methode statistisch signifikant nachweisbar zu sein. Die Untersuchung der phylogenetischen Zusammensetzung der Gemeinschaft mittels FISH konnte trotz großer Varianzen vereinzelt signifikante Unterschiede aufdecken. Allerdings konnten damit bestenfalls Tendenzen in der Wirkung der Noxen auf die phylogenetische Zusammensetzung ermittelt werden, da die Unterschiede nicht durchgehend mit der Zunahme der Noxenkonzentrationen korrelierten. Zum Teil waren die Effekte in ähnlichen Konzentrationsbereichen oder nach ähnlicher Kultivierungszeit gegenläufig, sodaß Tendenzen nicht erkennbar waren.

5.4.2. Genetische Diversität:

Die genetische Diversität wurde gemäß Kap. 3.5.2 mittels DGGE untersucht. Insgesamt wurden 58 verschiedene DNA-Banden nachgewiesen. In Proben aus den Begiftungsversuchen waren mittels DGGE zwischen 0 und 16, im Mittel 7,8 DNA-Banden nachweisbar. Korrelationen der Anzahl der DNA-Banden mit der Cd^{2+} - und SDS-Konzentration, bzw. der Kultivierungszeit konnten nicht nachgewiesen werden.

Mittels Hauptkomponentenanalyse (PCA) wurden die Bandenmuster der DGGE-Gele verglichen. Dabei konnte keine Bildung von Clustern ermittelt werden, die auf die Wirkung von Cd^{2+} oder SDS zurückzuführen gewesen wäre (Abb. 4.23). Die Ermittlung der relativen Ähnlichkeit der Replikate eines Versuchstyps über euklidische Distanzen zeigte allerdings einen klaren Zusammenhang: Mit steigender Cd^{2+} -Konzentration verringerten sich die euklidischen Distanzen zwischen den Gemeinschaften verschiedener Replikate eines Versuchstyps. Die relative Ähnlichkeit der Zusammensetzung der Gemeinschaften stieg somit mit der Cd^{2+} -Konzentration an. SDS verstärkte diesen Effekt statistisch signifikant.

Die Entwicklung der genetischen Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft unterlag einer Variation. Die Entwicklung der genetischen Diversität paralleler Begiftungsversuche war nicht identisch. Zunehmender Streß durch Cd^{2+} und SDS schränkte diese nachweisbar ein. Dies kann möglicherweise wie folgt erklärt

werden:

Das Inokulum enthielt eine Anzahl Spezies, die in der Lage waren, in Seewasserbouillon X-2 zu wachsen. Diese wuchsen nicht isoliert voneinander, sondern interagierten miteinander. Sie können einerseits um das enthaltene Acetat und Pyruvat, sowie um die enthaltenen Aminosäuren konkurrieren, andererseits konnten sie auch ggf. voneinander abhängen (Syntrophie). Die Gemeinschaft hatte je nach Anzahl und Interaktion der enthaltenen Spezies verschiedene Möglichkeiten der Entwicklung. Daraus ergab sich eine Variation in der genetischen Zusammensetzung der Replikate eines Versuchstyps. Mit steigender Cd^{2+} - und SDS-Konzentration hatten vermutlich weniger Spezies die Möglichkeit zu wachsen, da nicht alle im Inokulum enthaltenen Spezies SDS- und Cd^{2+} -resistent waren. Die Zusammensetzung der Gemeinschaft reduzierte sich auf die unempfindlichen Spezies. Daher sank die Zahl der möglichen Entwicklungen der Gemeinschaft, und somit wurden die Unterschiede der Zusammensetzung der Replikate geringer. Gillan *et al.* (2005) untersuchten die Struktur bakterieller Gemeinschaften in Cadmium-kontaminierten marinen Sedimenten. Sie konnten keine Auswirkungen auf die Diversität der Gemeinschaften nachweisen. Allerdings untersuchten Gillan *et al.* (2005) die Gemeinschaften *in situ*, an vier verschiedenen Probennahmeorten. Die Ergebnisse sind daher nicht ohne weiteres mit den Ergebnissen in vorliegender Arbeit vergleichbar. Bakterielle Gemeinschaften werden von den chemisch physikalischen Bedingungen ihres Habitats geprägt (Madigan *et al.*, 2006). Da sich die Bedingungen an vier verschiedenen Orten voneinander unterscheiden können, ist von einer Variation in der Gemeinschaftsstruktur an verschiedenen Orten auszugehen. Dies würde den Nachweis von strukturellen Veränderungen erschweren, da geringe Änderungen in der Struktur nicht von der ortsabhängigen Variation der Gemeinschaften abgegrenzt werden könnte.

5.5. Auswirkung von Cd^{2+} und SDS auf die metabolische Aktivität

5.5.1. Auswirkung der Noxen auf O_2 -Verbrauch und CO_2 -Produktion

Sowohl in Kulturen mit, als auch ohne SDS nahmen die aufsummierten, volumenbezogenen O_2 -Verbrauchs- und CO_2 -Bildungsraten mit zunehmender Cd^{2+} -Konzentration ab. Die Abnahme der CO_2 -Bildungsrate bedeutete zudem die Abnahme der Mineralisierungsrate R_M . Die volumenbezogenen, aufsummierten CO_2 -

Bildungs-, bzw. O₂-Verbrauchsrate, sowie die Mineralisierungsraten der Kulturen ohne SDS unterschieden sich nicht signifikant von denen der Kulturen (jeweils gleicher Cd²⁺-Konzentration) mit SDS. Effekte von SDS auf die metabolische Aktivität konnten somit nicht nachgewiesen werden.

Zusätzlich zur Abnahme des metabolischen Aktivität konnte eine statistisch signifikante verzögert einsetzende metabolische Kern-Phase mit zunehmender Cd²⁺-Konzentration nachgewiesen werden. Die Verzögerung der Kern-Phasen SDS-haltiger und -freier Kulturen unterschied sich nicht, sodaß kein Effekt von SDS auf die Länge der lag-Phasen nachgewiesen werden konnte.

Ähnliche Effekte von Cd²⁺ auf die metabolische Aktivität, bzw. auf metabolische Kern-Phasen wurden bereits von anderen Autoren publiziert: Chan und Dean (1988) wiesen bei *Pseudomonas marina* sowohl eine Abnahme der O₂-Aufnahmerate, als auch eine Verlängerung der lag-Phasen in Anwesenheit von Cadmium nach. Reduzierte Respirationsraten cadmiumbelasteter Böden wurden u.a. von Fritze *et al.* (1995) beschrieben. Geyer (2006) nutzte die gleiche Versuchsanordnung, wie sie in vorliegender Arbeit genutzt wurde, und beschrieb eine Verzögerung der metabolischen Aktivität in Kulturen mit 0,05 mmol l⁻¹ Cd²⁺.

Die zunehmende Länge der Lag-Phasen mit steigender Cd²⁺-Konzentration deutet auf wachsende Schwierigkeiten der bakteriellen Gemeinschaft hin, an höhere Schwermetall-Konzentration zu adaptieren. Eine Adaption durch Selektion cadmiumresistenter Spezies, oder durch Induktion von Resistenzfaktoren (Expression von cad- oder czc-Genen zur Aktivierung des Cd²⁺-Effluxes) wären denkbare Szenarien der Streßantwort, die Zeit benötigten.

5.5.2. Einfluß der Noxen auf die Dehydrogenase-Aktivität der Gemeinschaft

In vorliegender Arbeit wurde die Dehydrogenase-Aktivität DHA mittels Resazurintest untersucht (Kap. 3.5.6). Untersucht wurde mit der verwendeten Methode die DHA der gesamten Gemeinschaft, und nicht die Aktivität isolierter Enzyme. Sowohl in Kulturen ohne, als auch mit SDS konnte eine statistisch signifikante Abnahme der DHA mit zunehmender Cd²⁺-Konzentration nachgewiesen werden. Unabhängig von der SDS-Konzentration nahm die DHA in 24 h alten Kulturen ab 0,05 mmol l⁻¹ Cd²⁺, in 48 und 120 h alten Kulturen ab 0,5 mmol l⁻¹ Cd²⁺ ab. In 168 bis 240 h alten Kulturen mit SDS wurde die DHA ab 0,5 mmol l⁻¹ Cd²⁺ verringert, in gleich alten Kulturen ohne SDS gelang der Nachweis der verringerten DHA

erst ab $5 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$.

Montuelle *et al.* (1994) publizierten eine Reduktion der DHA bei Bakterien aus Flußsedimenten. Allerdings setzten sie, nach 36 h Vorinkubation bei 20°C in Schüttelflaschen, $3,33 \text{ mmol l}^{-1} \text{ CdCl}_2$ ein, um eine 20 %-ige Hemmung der DHA zu erreichen. Die DHA der in vorliegender Arbeit untersuchten bakteriellen Gemeinschaften war nach 24 h Kultivierung bereits mit $0,005 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ zu 20 % inhibiert. Zwischen 48 und 240 h trat eine 20 %-ige Hemmung bei $0,07 \pm 0,008 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ ein. Die DHA der Gemeinschaft aus dem Wattsediment reagierte demnach viel empfindlicher auf Cd^{2+} , als die von Montuelle *et al.* (1994) untersuchten Gemeinschaften der Flußsedimente.

Möglicherweise störte Cadmium somit das Elektronen-Transport-System ETS der bakteriellen Gemeinschaft. In vielen Enzymen sind Metall-Ionen essentiell für die Katalyse. Sie dienen dabei als Koordinationszentrum, als Lewis-Säure, bzw. als Partner in Redoxreaktionen. Auch viele Dehydrogenasen enthalten zweiwertige Kationen. Daher interagierte das Cadmium möglicherweise über einen Ionenaustausch mit den Enzymen. Denkbar ist jedoch auch eine irreversible Bindung des Cd^{2+} an Sulfhydrylgruppen der Enzyme als Ursache der Hemmung. Die Literatur bietet viele Beispiele der Hemmung von Dehydrogenasen durch Cadmium. So inhibiert Cd^{2+} z.B. die NAD^+ -abhängige Opin Dehydrogenase von *Arthrobacter spec.* Stamm 1C (Asano *et al.*, 1989), oder Lactatdehydrogenasen von *Lactobacillus helveticus* (Savijoki und Palva, 1997) und *Alcaligenes eutrophus* (Steinbüchel und Schlegel, 1983). Cd^{2+} war jedoch auch in der Lage einen Teil der Aktivität der Lactatdehydrogenase von *Lactobacillus casei* wiederherzustellen, wenn diese durch Hitze deaktiviert worden war (Hensel *et al.*, 1977). Ebenso konnte durch Cd^{2+} die durch Hitze deaktivierte Quinoprotein-Glucose-Dehydrogenase von *Acinetobacter calcoaceticus* reaktiviert werden (Geiger und Görisch, 1989). Die Möglichkeit der partiellen Reaktivierung von Dehydrogenasen läßt den Mechanismus des Ionenaustausches wahrscheinlicher erscheinen. Das verwendete Testsystem ist jedoch nicht in der Lage molekulare Mechanismen des Effekts von Cd^{2+} auf die DHA der bakteriellen Gemeinschaft aufzuklären. Zur Aufdeckung von Wirkmechanismen sind Experimente mit Cadmium und isolierten Dehydrogenasen unumgänglich.

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der DHA in Kulturen mit und ohne

SDS konnten nur nach 24 h Kultivierung ohne und mit $0,005 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ beobachtet werden. Die DHA der Kulturen mit SDS war geringer, als die der Kulturen ohne SDS. Im weiteren Verlauf der Kultivierung (120 - 240 h) schien die DHA der SDS-haltigen Kulturen mit geringen Cd^{2+} -Konzentrationen dagegen die der Kulturen ohne SDS zunehmend zu übertreffen - allerdings konnte dies aufgrund der großen Varianzen der DHA in SDS-freien Kulturen nicht statistisch abgesichert werden.

5.5.3. Einfluß von Noxen auf die Substratverwertung der Gemeinschaft

Mittels Ecolog[®]-Test wurden Substratverwertungsspektren der Gemeinschaft ermittelt. Zwar änderten sich die Substratverwertungsspektren im Verlauf der Kultivierungszeit. Zusätzlich schienen sie von Cd^{2+} und SDS beeinflusst zu sein. Die Änderungen in der Gemeinschaft korrelierten jedoch weder mit der Kultivierungszeit, noch mit der Konzentration der Noxen, sodaß systematische Auswirkungen auf die Substratverwertung nicht erkennbar waren (Abb. 4.13 - 4.15).

Die Analyse der Daten *en detail* ließ ebensowenig klare Tendenzen in der Substratverwertung der Kulturen erkennen. In Abb. 4.12 sind die Substrate des Tests nach Substanzklassen sortiert (**Tenside:** Tween 40, Tween 80; **Monosaccharide:** Methyl-D-Glucosid, Xylose; **Polysaccharide:** Cyclodextrin, Glycogen, Cellobiose, Laktose; **Zuckerderivate:** N-Acetyl-Glucosamin, Glucosaminsäure, Glucose-1-Phosphat, Galacturonsäure; **Zuckeralkohole:** Erythritol, Mannitol, Glycerol-Phosphat; **aromatische Verbindungen:** 2-Hydroxybenzoësäure, 4-Hydroxybenzoësäure; **Carbonsäuren:** Pyruvat, 4-Hydroxybuttersäure, Itaconsäure, α -Keto-buttersäure, Apfelsäure, Galactonsäure- γ -lacton; **Aminosäuren:** Arginin, Asparagin, Phenylalanin, Serin, Threonin; **Amine:** Glycyl-Glutaminsäure, Phenethylamin, Putrescin). Weder auf der Ebene der Substanzklassen, noch auf der Ebene der Einzelsubstanzen waren Gesetzmäßigkeiten erkennbar, nach denen die Substratverwertung der Gemeinschaft von der Kultivierungszeit, bzw. von der Cd^{2+} - oder SDS-Konzentration beeinflusst wurde.

Eine Clusteranalyse der Substratverwertungsspektren (Abb. 4.23) ergab ebenfalls kein klares Bild. Die Bildung diskreter Cluster konnte nicht beobachtet werden. Die Ähnlichkeiten der Substratverwertungsspektren der Gemeinschaft mit unterschiedlichen Noxenkonzentrationen nach unterschiedlichen Kultivierungszeiten

korrelierten weder mit der Cd^{2+} - oder SDS-Konzentration, noch mit dem Alter der Kulturen.

Die Wirkung und Kombinationswirkung von Cd^{2+} und SDS auf das Substratverwertungsspektrum der Gemeinschaft blieb somit im Unklaren. Systematische Wirkungen konnten nicht beobachtet werden.

5.5.4. Einfluß von Cd^{2+} und SDS auf die physiologische Diversität (MPN)

5.5.4.1. Acetat-Pyruvat-verwertende Bakterien (APB):

Die Lebendzellzahlen der APB wurden bereits in Kap. 5.3 als Lebendzellzahl diskutiert. Ihre Abundanz nahm sowohl in Kulturen mit, als auch ohne SDS mit steigender Cadmiumkonzentration ab.

5.5.4.2. Methanol-verwertende Bakterien (MetB):

MetB wurden in Kulturen ohne SDS zwischen 120 und 240 h Kultivierung, und in Kulturen mit $43,34 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ SDS zwischen 72 und 216 h nachgewiesen. Ihre Abundanz war mit maximal 2100 ml^{-1} gering. Sie sank mit steigender Cd^{2+} -Konzentration zwischen 120 und 216 h in Kulturen ohne SDS. In Kulturen mit SDS konnte eine Abnahme der Abundanz nach 72 und 120 h Kultivierung statistisch signifikant nachgewiesen werden. Eine Korrelation der Abundanz der MetB mit der SDS-Konzentration konnte nicht belegt werden.

Geyer (2006) wies ebenfalls MetB in Wattsedimentsuspensionskulturen nach. Deren Abundanz nahmen ebenfalls tendenziell mit steigender Cadmiumkonzentration ab. Hartmann (2006) isolierte MetB aus Geyer's Kulturen und konnte Wachstum der Isolate ausschließlich auf C_1 -Verbindungen nachweisen. Das Wattsediment für die Inokulation von Geyer's Versuchen stammte aus derselben Wattprobe, wie das in vorliegender Arbeit verwendete Wattsediment. Daher ist mit hoher Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, daß die nachgewiesenen MetB dasselbe eingeschränkte Substratspektrum hatten. Da das Kulturmedium der Begiftungsversuche keine C_1 -Verbindungen enthielt, bleibt jedoch unklar, welches Substrat die MetB nutzten.

5.5.4.3. Sulfat-reduzierenden Bakterien (SRB):

SRB sind in marinen Ökosystemen von besonderer Bedeutung, da sie als Sulfidbildner das Substrat für die Ausfällung von Schwermetallionen liefern. Sie verringern somit die Konzentration bioverfügbarer Schwermetalle. SRB waren

in nahezu allen Kulturen, zu allen Kultivierungszeiten nachweisbar. Ausnahmen bildeten Kulturen mit $0,5 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ nach 240 h ohne SDS, nach 24 h mit SDS, sowie nach 48 h mit SDS. Allerdings waren die SRB nur in geringer Abundanz (nahe der Nachweisgrenze von $0,5 \text{ ml}^{-1}$) nachweisbar. Ihre maximale Zellzahl betrug 12 ml^{-1} . Es konnte weder Wachstum, noch ein mit der SDS- oder Cd^{2+} -Konzentration korrelierter Effekt auf die Lebendzellzahl der SRB nachgewiesen werden. Geyer (2006) erhielt in einem identischen Testsystem die gleichen Ergebnisse: SRB waren in geringer Abundanz nachweisbar, Wachstum der SRB wurde ebenfalls nicht beobachtet.

SRB werden in 4 phylogenetische Gruppen unterteilt (Castro *et al.*, 2000):

1. Gram-negative, mesophile SRB: Sie gehören den Familien *Desulfovibrionaceae* oder *Desulfobacteriaceae* an, welche den δ -*Proteobacteria* zugeordnet werden. Von allen SRB wachsen sie bei den niedrigsten Temperaturen ($20 - 40^\circ\text{C}$).
2. Gram-positive Sporenbildner: Sie gehören der Gattung *Desulfotomaculum* an und zeichnen sich durch einen niedrigen GC-Gehalt aus. Sie wachsen bei $25 - 65^\circ\text{C}$.
3. Thermophile, sulfatreduzierende Bakterien: Sie gehören v.a. den Genera *Thermodesulfobacterium* und *Thermodesulfovibrio* an und wachsen zwischen 65 und 70°C .
4. Thermophile, sulfatreduzierende *Archaea*: Bisher wurden nur zwei Spezies beschrieben, die dieser Gruppe angehören: *Archaeoglobus fulgidus* und *Archaeoglobus profundus*. Sie wachsen bei $65 - 92^\circ\text{C}$.

Die Kulturen für die Bestimmung der MPN der SRB wurden bei 18°C inkubiert. Daher handelte es sich bei den nachgewiesenen SRB möglicherweise um δ -*Proteobacteria* der Gattungen *Desulfobacter* und/oder *Desulfobacterium*, da diese von allen bekannten SRB bei den niedrigsten Temperaturen wachsen können (Castro *et al.*, 2000). Die Ergebnisse der FISH sprechen nicht prinzipiell gegen diese Hypothese, da in nahezu allen Kulturen δ -*Proteobacteria* in geringer Konzentration nachgewiesen werden konnten (Kap. 4.2.4.1).

Mittels MPN konnte kein Wachstum der SRB in den Begiftungsversuchen nachgewiesen werden. Die Gemeinschaften der Begiftungsversuche wurden unter oxidischen Bedingungen kultiviert: Die Gelöstsauerstoffkonzentration be-

trug zu jedem Zeitpunkt zwischen 70 % und 100 %. Berthe-Corti und Bruns (1999) wiesen eine ausgeprägte Abhängigkeit des Wachstums sulfatreduzierender Bakterien von der Sauerstoffkonzentration nach. SRB sind anaerob (Madigan et al., 2006), können jedoch auch aerotolerant sein (Dilling und Cypionka, 1990; Johnson *et al.*, 1997). Vermutlich handelte es sich bei den nachgewiesenen SRB in den Begiftungsversuchen daher um inaktive Zellen im Überdauerungsstadium.

5.5.4.4. Denitrifizierende Bakterien (DNB):

Die DNB hatten nach den APB die zweitgrößten Abundanzen. Sie betrug bis zu $1 \cdot 10^5 \text{ ml}^{-1}$. Die Denitrifikation spielt im Wattenmeer (Ebrahimipour, 1998), und allgemein, in marinen Sedimenten und Ästuaren (Sørensen et al.; 1978 a, b, c) eine große Rolle, da mit den Flüssen eingetragenes Nitrat zu Distickstoff reduziert wird. Somit wird, bei der Stickstoff-Fixierung der Atmosphäre entzogenes N_2 regeneriert. Mit Ausnahme der Kulturen mit $43,34 \mu\text{mol l}^{-1}$ SDS nach 24 h (keine Abnahme) und 168 h (Abnahme nicht statistisch signifikant) Kultivierung konnten mit zunehmender Cd^{2+} -Konzentration statistisch signifikant abnehmende Abundanzen der DNB sowohl in Kulturen ohne, als auch mit SDS nachgewiesen werden. Babich und Stotzky (1985) konnten die Hemmung denitrifizierender Bakterien und die daraus folgende Akkumulation von Nitrit in Schwermetall-belasteten Böden nachweisen. Bollag und Barabasz (1979) wiesen die Hemmung der Denitrifikation über die Akkumulation von NO_2 in Schwermetall-belasteten Böden nach. Geyer (2006) wies die Cd^{2+} -vermittelte Abnahme der Abundanzen der DNB in marinem Wattsediment nach.

Signifikante Unterschiede zwischen den Abundanzen der DNB in Kulturen ohne und mit SDS konnten vereinzelt nachgewiesen werden: Nach 24 h Kultivierung ohne Cd^{2+} , sowie zwischen 72 und 120 h mit $0,005 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ war die Abundanz der DNB in SDS-haltigen Kulturen geringer, nach 216 h Kultivierung mit $0,005 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$, sowie nach 240 h ohne Cd^{2+} war sie dagegen signifikant höher, als in Kulturen ohne SDS. Ein allgemeiner Trend der Wirkung von SDS auf die DNB der bakteriellen Gemeinschaft ließ sich daraus jedoch nicht ableiten.

5.5.4.5. Ermittlung der physiologischen Diversität mittels Shannon-Wiener-Indices:

Zwischen 48 und 216 h Kultivierung konnte in Kulturen ohne SDS eine Zunahme der physiologischen Diversität mit steigender Cd^{2+} -Konzentration nachgewiesen werden. In 24 und 240 h alten Kulturen konnte eine Zunahme der H_{Sh} aufgrund der großen Varianzen nicht nachgewiesen werden. In Kulturen mit $43,34 \mu\text{mol l}^{-1}$ SDS konnte zwischen 24 und 72 h eine Zunahme der H_{Sh} nachgewiesen werden. Ab 120 h Kultivierung konnte in Kulturen mit SDS aufgrund der großen Varianz der Daten keine Zunahme der H_{Sh} nachgewiesen werden.

In vorliegender Arbeit wurden 4 physiologische Gruppen untersucht. Mit vier unterschiedlichen physiologischen Gruppen kann der H_{Sh} Werte zwischen 0,00 (alle Individuen gehören einer Gruppe an) und 1,39 (die Individuen verteilen sich gleichmäßig auf vier Gruppen) betragen. Die H_{Sh} cadmiumfreier Kulturen lagen nahe Null. Mit zunehmender Cd^{2+} -Konzentration erreichten die mittleren H_{Sh} maximal 0,60. Bezogen auf die Shannon-Evenness entspricht dies einem Wert von $E = 0,43$ und steht somit für eine mittlere Diversität ($0 < E < 1$).

Weder die Abundanzen der APB, noch der SRB, DNB oder MetB stiegen mit zunehmender Cd^{2+} -Konzentration an. Die der SRB blieben unverändert, die der APB, MetB und DNB nahmen ab. Die Zunahme der physiologischen Diversität bedeutete, daß sich die Abundanzen aller physiologischen Gruppen in Kulturen mit hoher Cd^{2+} -Konzentration einander angleichen. Das bedeutet, daß die Abundanzen der APB stärker mit steigender Cd^{2+} -Konzentration sanken, als die der anderen physiologischen Gruppen.

Geyer (2006) wies ebenfalls nach, daß Acetat-Pyruvat-verwertende Bakterien in unbelasteten Kulturen in Seewasserbouillon X-2 die physiologisch dominante Gruppe waren.

5.6. Bewertung der Kombinationswirkung

Die Begiftung der bakteriellen Gemeinschaft mit Cd^{2+} und SDS wirkte sich unterschiedlichen auf verschiedene Endpunkte der Untersuchungen aus. Weder Cd^{2+} , noch SDS hatten Auswirkungen auf die Gesamtzellkonzentration. Sie reduzierten jedoch die Lebendzellzahl und Kultivierbarkeit. Klare Auswirkungen auf die Struktur der bakteriellen Gemeinschaft ließen weder die Analyse der phylogenetischen Zusam-

mensetzung mittels FISH, noch die Untersuchung der DNA-Struktur mittels DGGE-Analyse erkennen. Die Analyse der phylogenetischen Zusammensetzung wies jedoch auf tendenzielle, durch Cd^{2+} verursachte Änderungen hin. Die Analyse der genetischen Diversität mittels DGGE führte zu der Erkenntnis, daß steigende Cd^{2+} -Konzentrationen die Spezieszusammensetzung der Gemeinschaft einschränkten. SDS verstärkte diesen Effekt.

Auf Verschiebungen in der Gemeinschaft wies die Untersuchung der physiologischen Diversität mittels MPN hin. Die Lebendzellzahlen der APB wurden gegenüber den Lebendzellzahlen der DNB, SRB und MetB überproportional mit steigender Cd^{2+} -Konzentration verringert. Sowohl die metabolische Aktivität der Gemeinschaft insgesamt, als auch die DHA wurden mit steigender Cd^{2+} -Konzentration verringert. Zudem führte die Zugabe von Cd^{2+} zu einer Verlängerung der metabolischen lag-Phase. Die metabolische Diversität der Gemeinschaft, bestimmt als Ecolog[®]-Substratverwertungsspektren, zeigte komplexe Reaktionen auf die Noxen, die zudem im Verlauf der Kultivierung variierten.

Ein Problem bei der Bewertung von Kombinationswirkungen auf Ebene von Gemeinschaften ist demnach die Auswahl eines geeigneten Endpunktes. Da die in vorliegender Arbeit untersuchten Endpunkte unterschiedlich sensibel auf die Noxenkonzentrationen reagierten, wäre das Ergebnis von Untersuchungen, die nur einen Endpunkt betrachtet hätten, vor allem von der Auswahl des Endpunktes abhängig gewesen.

Ein weiteres Problem bei der Bewertung toxischer Wirkungen auf Gemeinschaften ist die mögliche Kooperation der Mitglieder der Gemeinschaft.

Da Gemeinschaften *per definitionem* aus verschiedenen Organismen bestehen, kann die Wirkung der Noxen innerhalb der Gemeinschaft Spezies-abhängig variieren. Demnach kann eine Noxen-Konzentration verschiedenen ECs bei verschiedenen Spezies entsprechen. Ist nur ein Teil der Individuen einer Spezies resistent gegen die Noxe(n), so kann ihre Wirkung sogar innerhalb der Spezies variieren. Aufgrund der vielfältigen Interaktionen in bakteriellen Gemeinschaften kann dies unterschiedliche Konsequenzen haben:

1. **Syntrophie:** C- und Energiequellen werden nicht zwangsläufig von nur einer Spezies mineralisiert. Es sind, ganz im Gegensatz, zahlreiche Beispiele bakterieller Syntrophie bekannt (Madigan *et al.*, 2006). Somit können Noxen indirekt

auf resistente, syntrophe Spezies wirken, wenn diese von Sekundärmetaboliten nicht-resistenter Spezies abhängig sind.

2. **Konkurrenz:** Resistente Organismen können von der Hemmung nicht-resistenter Konkurrenten profitieren, da ihnen somit mehr Ressourcen (C- und Energiequellen, Raum, Vitamine, Spurenelemente, etc.) zur Verfügung stehen.
3. **Bakterieller Antagonismus:** Long und Azam (2001) untersuchten 86 marine Isolate hinsichtlich der gegenseitigen Wachstumshemmung. Für 46 der Isolate wiesen sie bakteriellen Antagonismus nach. Unter Oberflächen-assoziierten Bakterien war bakterieller Antagonismus verbreiteter, als unter freilebenden. Burgess *et al.* (1999) wiesen antibakterielle Aktivität bei 35 % der Oberflächen-assoziierten Bakterien küstennaher Habitate nach. Grossart *et al.* (2004) belegten bakteriellen Antagonismus bei mehr als 50 % ihrer Isolate von marinen Aggregaten nach. Somit scheint bakterieller Antagonismus - vor allem bei Oberflächen-assoziierten - marinen Bakterien weit verbreitet zu sein.

Die antagonistische Hemmung einer Spezies bliebe aus, wenn durch Einwirkung der Noxe(n) die hemmende, nicht aber die gehemmte Spezies unterdrückt würde.

Bei der Untersuchung bakterieller Gemeinschaften werden häufig Summenparameter (Respiration, Gesamtzellkonzentration, o.ä.) als toxische Endpunkte betrachtet. Beispielsweise stellen in vorliegender Arbeit der O₂-Verbrauch, die CO₂-Produktion, die Mineralisierungsrate, die Dehydrogenase-Aktivität, die Gesamtzellkonzentration, die Kultivierbarkeit, sowie die Substratverwertung (Ecolog[®]) Summenparameter dar. Summenparameter können durch intrakommunale Interaktionen wie Syntrophie, Konkurrenz oder Antagonismus beeinflusst werden. Die indirekte Wirkung der Noxen kann im Fall der Syntrophie dazu führen, daß auch die Abundanzen von Spezies, die gegen alle verwendeten Noxen resistent sind, sinken, sofern sie von Metaboliten nicht-resistenter Spezies abhängig sind. Im Fall der ausgeschalteten Konkurrenz, bzw. des wegfallenden Antagonismus kann die ausbleibende Inhibierung bei resistenten Spezies zu höherer Abundanz und Stoffwechselaktivität führen. Einerseits kann die Gemeinschaft somit empfindlicher reagieren, als Toxizitätstests mit isolierten Spezies aus der Gemeinschaft erwarten ließen, andererseits haben Gemeinschaften mit einem Anteil resistenter Spezies u.U. ein Potential die Wirkung von Noxen auf Summenparameter zu kompensieren.

In Kapitel 1.4.1 wurden Konzepte zur Bewertung von Kombinationswirkungen vorgestellt. Den Konzepten der Konzentrationsadditivität (CA) und der Unabhängigen Wirkung (IA) liegen unterschiedliche Annahmen bezüglich der Wirkorte der Noxen zugrunde (CA: alle Noxen wirken am gleichen Ort; IA: die Noxen haben unterschiedliche Wirkorte). Daher können sie u.U. verwendet werden, um Rückschlüsse auf den Wirkort, bzw. die Wirkorte der Noxen zu ziehen (Junghans *et al.*, 2003). Entspricht der beobachtete Kombinationseffekt dem mittels CA aus den Einzelwirkungen der Noxen vorhergesagten Effekt, so kann die Wirkung der Noxen am gleichen Wirkort angenommen werden. Entspricht dagegen die Kombinationswirkung der mittels IA aus den Einzelwirkungen vorhergesagten Kombinationswirkung, so sind unterschiedliche Wirkorte der Noxen anzunehmen. Diese Abschätzung ist jedoch in der Praxis nicht immer möglich. Die Differenz der vorhergesagten Kombinationswirkungen nach IA und CA hängt von mehreren Faktoren ab (Junghans *et al.*, 2003). Die Anzahl der kombinierten Noxen hat ebenso Einfluß auf die Differenz, wie der Effekt-Level und die Steigung der Dosis-Wirkungs-Beziehungen der eingesetzten Substanzen (Junghans *et al.*, 2003; Boedecker *et al.*, 1993; Drescher *et al.*, 1995). Geringe Differenzen von CA und IA, kombiniert mit großen Varianzen können mitunter dazu führen, daß die beobachtete Kombinationswirkung weder dem Konzept der CA, noch dem der IA zugeordnet werden kann (Backhaus *et al.*, 2003).

Ziel der vorliegenden Arbeit war nicht die mechanistische Untersuchung von Kombinationswirkungen auf bakterielle Gemeinschaften. Die Ergebnisse legen jedoch den Schluß nahe, daß die Nutzung der (bei der Untersuchung von Kombinationswirkungen auf isolierte Spezies bewährten) Konzepte CA und IA zur Aufklärung mechanistischer Fragestellungen bei Gemeinschaften problematisch sein können. Eine zuverlässige Unterscheidung zwischen CA und IA ist im Fall intrakommunaler Interaktionen nicht möglich. Andererseits könnte zudem die Unterscheidung zwischen CA und IA bei Summenparametern in Gemeinschaften dadurch erschwert werden, daß Noxen bei einem Teil der Organismen am selben Ort, und bei einem Teil der Organismen an verschiedenen Orten wirken.

Gemeinschaften eignen sich folglich nicht, um mechanistische Fragestellungen, wie die nach dem gemeinsamen Wirkort zu klären. Um die vielfältigen intrakommunalen Interaktionen, sowie die Gefahr der Mischung verschiedener Mechanismen in der

Gemeinschaft und damit die Beeinflussung von Summenparametern zu umgehen, sind Untersuchungen an isolierten Spezies unvermeidbar.

Ein weiteres Problem bei der Untersuchung toxischer (Kombinations-) Wirkungen auf Gemeinschaften ist die Übertragbarkeit der Erkenntnisse auf das Ökosystem vor Ort:

Die Begiftungsversuche in vorliegender Arbeit wurden *ex situ* in Fermentern durchgeführt. Einerseits ermöglichten diese erst, daß mit definierten Kulturbedingungen gearbeitet werden konnte. Dies war unabdingbar, um Veränderungen in der Struktur und Aktivität der bakteriellen Gemeinschaften auf die Wirkung der Noxen zurückführen zu können. Zudem ermöglichte erst die Durchführung der Versuche unter Laborbedingungen den praktikablen und verantwortungsbewußten Umgang mit derart hohen Schwermetallkonzentrationen, wie sie in vorliegender Arbeit eingesetzt wurden. Andererseits erschwert der Umstand, daß die Begiftungsversuche in einem Modellsystem für das Wattenmeer kultiviert wurden die Übertragung der Erkenntnisse auf das Ökosystem Wattenmeer: Gerade die im Fermenter ausgeschlossenen variierenden Umweltbedingungen haben Einfluß auf die Aktivität und Zusammensetzung der marinen bakteriellen Gemeinschaft. Zudem erlaubte die angewandte Versuchsanordnung im Fermenter nicht die Berücksichtigung, bzw. Simulation von Aspekten, wie dem permanenten Wasseraustausch mit der Nordsee, oder die Zu- und Abwanderung von Spezies.

Die Vorhersage von Kombinationswirkungen auf Gemeinschaften erfordert Modelle, die die intrakommunale Interaktion berücksichtigen, und ist auf die Untersuchung unterschiedlicher Endpunkte angewiesen. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das Ökosystem bleibt dennoch schwierig.

6. Zusammenfassung und Ausblick

In vorliegender Arbeit wurde unter Laborbedingungen die kombinierte Wirkung von SDS und Cd^{2+} auf die Struktur und Aktivität mariner bakterieller Gemeinschaften des Wattsediments der Deutschen Nordseeküste untersucht. Cd^{2+} und SDS als Noxen wurden einerseits wegen ihrer Relevanz in aquatischen Ökosystemen ausgewählt. Andererseits war eine Überlagerung ihrer Wirkungen denkbar: Zum einen war die membrantoxische Wirkung von SDS als Modulator der v.a. membrangestützten Cd^{2+} -Resistenz

denkbar. Zum anderen wirken sowohl Cd^{2+} als auch SDS denaturierend auf Proteine. Cd^{2+} wurde in Konzentrationen bis 5 mM eingesetzt, der Einsatz von SDS im verwendeten Fermentationssystem war auf 43,34 μM beschränkt. Die Konzentration des Cd^{2+} war um Größenordnungen höher, als in der Nordsee nachgewiesen, stand jedoch im Einklang mit Konzentrationen, die von anderen Autoren verwendet wurden. Die Bioverfügbarkeit des Cadmiums *in vitro* war aufgrund der geringen Sedimentkonzentration höher, als *in situ*.

Cd^{2+} beeinflusste nicht die Gesamtzellkonzentration, verringerte jedoch signifikant die Lebendzellzahl und die Kultivierbarkeit der bakteriellen Gemeinschaft. Die Verringerung der Kultivierbarkeit war vor allem auf die Phase der maximalen metabolischen Aktivität beschränkt und wurde in Gegenwart von SDS verstärkt. In Kulturen ohne Cd^{2+} , jedoch mit SDS wurden nach 24 h Kultivierung geringere Lebendzellzahlen als in Kulturen ohne Cd^{2+} und SDS ermittelt. Dies ist möglicherweise eine Folge der Adaption der Gemeinschaft an SDS. Weitergehende Effekte des SDS auf die Lebendzellzahl wurden nicht nachgewiesen.

Die metabolische Aktivität wurde ebenfalls vor allem von Cd^{2+} beeinflusst: Mit steigender Cd^{2+} -Konzentration verlängerte sich signifikant die metabolische lag-Phase. Zudem verringerten sich signifikant die O_2 -Aufnahme- und CO_2 -Produktionsrate, sowie die Aktivität der Dehydrogenasen. SDS verringerte in Kulturen ohne Cd^{2+} nach 24 h Kultivierung die Aktivität der Dehydrogenasen, was ggf. ebenfalls auf die Adaption der Gemeinschaft an SDS zurückzuführen war.

Eindeutige Effekte von Cd^{2+} und SDS auf die metabolische Diversität der Gemeinschaft konnten nicht belegt werden. Die physiologische Diversität stieg dagegen mit zunehmender Cd^{2+} -Konzentration an. Dies war auf den Verlust der physiologischen Dominanz der Acetat-Pyruvat-verwertenden Bakterien zurückzuführen.

Auswirkungen von Cd^{2+} und SDS auf die Struktur der Gemeinschaft konnten mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung nur tendenziell beobachtet werden. Allerdings gab die Untersuchung der DNA-Struktur der Gemeinschaft Hinweise auf eine zunehmend eingeschränkte Varianz in der Entwicklung der Gemeinschaft mit steigender Cd^{2+} -Konzentration. SDS verstärkte diesen Effekt statistisch signifikant.

Somit konnten v.a. Auswirkungen von Cd^{2+} auf die Fitness, metabolisch Aktivität und physiologische Diversität mariner bakterieller Gemeinschaften, sowie vereinzelt Modulationen der Cd^{2+} -Wirkung durch SDS ermittelt werden.

Ausblick:

Der Nachweis von Effekten des Cadmiums, bzw. SDS auf die marine bakterielle Gemeinschaft wurde vielfach (Ecolog[®], FISH, DGGE, MPN) durch hohe Varianzen der Meßwerte erschwert. Eine höhere Anzahl der Replikate einzelner Versuchstypen könnte die Absicherung der Daten evtl. erleichtern. Dem steht jedoch der große Zeitaufwand der Begiftungsversuche entgegen: Die Vorbereitung, Durchführung, Untersuchung (Datenerhebung und Analyse der Daten) einer einzigen Fermentation nahm durchschnittlich 7,5 Wochen in Anspruch. Die Anzahl der durchführbaren Begiftungsversuche ist damit durch die zur Verfügung stehende Zeit stark eingegrenzt.

SDS konnte im verwendeten Fermentationssystem nur in geringer Konzentration eingesetzt werden. Unterschiede zwischen Kulturen ohne und mit SDS waren daher vielfach nicht nachweisbar. Höhere SDS-Konzentrationen konnten jedoch nicht eingesetzt werden, da die daraus resultierende starke Schaumentwicklung die Abluftfilter durchnäßt, und somit die Durchführung der Fermentation gefährdet hätte. Dieses Problem könnte evtl. durch die Verwendung anderer Fermentationsgefäße (größerer Gasraum über dem Medium, andere Rührertypen, -anordnung) abgeschwächt werden. Allerdings tendierte das Sediment bei starker Schaumbildung dazu, sich oberhalb des Schaums an der Wand des Kulturgefäßes anzusammeln. Da abgelagertes Sediment nicht mehr direkt mit dem Medium in Verbindung steht, wären bei Ablagerung großer Anteile des Sediments daher Auswirkungen auf den Verlauf des Experiments zu erwarten gewesen. In sofern bleiben die im verwendeten Fermentationssystem einsetzbaren SDS-Konzentrationen begrenzt.

Die Kultivierbarkeit der Bakterien wurde v.a. durch Cd²⁺ verringert. Der Ermittlung der Kultivierbarkeit lag die Überlegung zugrunde, daß nur kultivierbare Zellen lebende Zellen waren. Der Anteil, bzw. das Vorhandensein von lebenden, jedoch nicht kultivierbaren Zellen (viable but non-culturable - VBNC) wurde nicht untersucht. Der Anteil der VBNC ist jedoch in sofern interessant, als daß die Bildung von VBNC als bakterielle Reaktion auf Streß diskutiert wurde (Nyström, 2003; McDougald *et al.*, 1998). VBNC können - v.a. durch Hitzeschock oder Temperaturerhöhung - ggf. zum Wachsen angeregt werden (Nilsson *et al.*, 1991). Versuche zur Reanimierung evtl. vorhandener VBNC könnten die Anteile der lebenden (kultivierbaren), toten und inaktiven (VBNC) Bakterien in den Begiftungsversuchen genauer voneinander abgrenzen.

Die Untersuchung der phylogenetischen Zusammensetzung mittels FISH gestaltete sich

in sofern schwierig, als daß das Signal der fluoreszenzmarkierten Sonden schwächer war, als das der DAPI-Färbung. Daraus resultierte ein relativ großer Anteil nicht identifizierter Zellen an der Gesamtzellkonzentration, sowie relativ hohe Varianzen der Meßwerte. Pernthaler *et al.* (2002) beschrieben eine Methode zur Identifizierung mariner Bakterien mittels CARD-FISH (catalyzed reporter deposition fluorescence-*in situ*-hybridization), mit der ein höherer Anteil der Zellen identifiziert werden konnte. Die Ermittlung der phylogenetischen Zusammensetzung mittels CARD-FISH wäre möglicherweise weniger fehleranfällig.

Summary

The combined impact of Cd²⁺ and sodium dodecyl sulfate (SDS) on the structure and activity of marine bacterial communities from the mud flats of the German North Sea coast has been investigated under laboratory conditions. Cd²⁺ and SDS have been chosen as noxa because of their relevance in aquatic ecosystems.

Cd²⁺ as well as SDS are able to inactivate proteins. In addition, SDS can disrupt the structure of biological membranes. The latter may be able to influence the membrane-based efflux of Cd²⁺ ions, which is the most important mechanism of bacterial cadmium resistance. One may assume SDS to be a modulator of Cd²⁺ toxicity.

The microbial community was taken from the mud flats of the German Wadden Sea near Dangast. It was cultivated in fermentors containing an artificial seawater medium under addition of cadmium and SDS. The SDS concentration in the fermentor was limited to 43,34 µM. Cadmium was applied as cadmium acetate in concentrations up to 5 mM. These cadmium concentrations were higher than those which occur in the North Sea, but are similar to concentrations used by other authors in toxicological bacterial test systems. Because of the low sediment concentrations used, bioavailability of cadmium in the fermentors was much higher, than it would be *in situ* in the North Sea sediment.

Cadmium did not influence the total cell count of the bacterial communities, but did reduce significantly their viable cell counts. Above all, the viable cell count reduction was limited to the phase of maximum metabolic activity, increasing in the presence of SDS. Within the first 24 hours of cultivation, cultures containing no cadmium, but containing SDS, had lower viable cell counts than cultures without cadmium and without SDS. This was possibly a result of the community adapting to SDS stress.

Further effects of SDS on the viable cell count have not been demonstrated.

Metabolic activity was mainly influenced by Cd^{2+} : Increasing cadmium concentrations resulted in significantly prolonged metabolic lag-phases. In addition, increasing cadmium concentrations led to significantly reduced O_2 -uptake rates and CO_2 -production rates as well, as to a reduced dehydrogenase activity. Dehydrogenase activity was significantly reduced within the first 24 hours of cultivation in cultures containing SDS, when compared to cultures that contained no cadmium nor SDS. This may be interpreted as an adaption of the community to SDS stress.

Clear effects of Cd^{2+} and SDS on the metabolic diversity of the community have not been proven. In contrast, calculating the physiologic diversity an increase was observed as cadmium concentrations increased. This increase, however, was attributed to the loss of physiological dominance of acetate pyruvate consuming bacteria.

The impact of Cd^{2+} and SDS on the structure of the community, as analyzed by fluorescence-*in situ*-hybridization, could only reveal trends. However, the DNA-structure as analyzed by DGGE analysis proved that the variation in the development of the communities decreased significantly with increasing cadmium concentrations. SDS amplified this effect significantly.

Above all, viable cell count, metabolic activity and physiological diversity of marine bacterial communities were influenced by cadmium. SDS strengthened effected the impact of cadmium.

7. Literatur

Agner, T.; Serup, J. (1990). Sodium Lauryl Sulphate for Irritant Patch Testing - A Dose Response Study Using Bioengineering Methods for Determination of Skin Irritation. *J. Invest. Dermatol.*, **95**: 543 - 547.

Ahlers, J.; Cascorbi, I.; Forêt, M.; Gies, A.; Köhler, M.; Pauli, W.; Rösick, E. (1991). Interaction with functional membrane proteins - A common mechanism of toxicity for lipophilic environmental chemicals? *Comp. Biochem. Physiol.*, **100C**: 111 - 113.

Altenburger, R.; Walter, H.; Grote, M. (2004). What Contributes to the Combined Effect of a Complex Mixture? *Environ. Sci. Technol.*, **38**: 6353 - 6362.

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

Asano, Y.; Yamaguchi, K.; Kondo, K. (1989). A new NAD⁺-Dependent Opine Dehydrogenase from *Arthrobacter sp.* Strain 1C. *J. Bacteriol.*, **171**: 4466 - 4471.

Babich, H.; Stotzky, G. (1978). Effect of cadmium on the biota: influence of environmental factors. *Adv. Appl. Microbiol.*, **33**: 1059 - 1066.

Babich, H.; Stotzky, G. (1985). Heavy metal toxicity to microbe-mediated ecologic processes: A Review and potential application to regulatory policies. *Environ. Res.*, **36**: 111 - 137.

Backhaus, T.; Faust, M.; Scholze, M.; Gramatica, P.; Vighi, M.; Grimme, L. H. (2003). Joint algal toxicity of phenylurea herbicides is equally predictable by concentration addition and independent action. *Environ. Toxicol. Chem.*, **23**: 258 - 264.

Banerjee, S.; Flores-Rozas, H. (2005). Cadmium inhibits mismatch repair by blocking the ATPase activity of the MSH2-MSH6 complex. *Nucleic Acids Res.*, **33**: 1410 - 1419.

Becker, R.; Helenius, A.; Simons, K. (1975). Solubilization of the Smliki Forest Virus Membrane with Sodium Dodecyl Sulfate. *Biochemistry*, **9**: 1835 - 1841.

Berenbaum, M. C. (1985). The Expected Effect of a Combination of Agents: the General Solution. *J. Theor. Biol.*, **114**: 413 - 431.

Berthe-Corti, L.; Bruns, A. (1999). The Impact of Oxygen Tension on Cell Density and Metabolic Diversity of Microbial Communities in Alkane Degrading Continuous-Flow Cultures. *Microb. Ecol.* **37**: 70 - 77.

Bestman-Smith, J.; Piret, J.; Désormeaux, A.; Tremblay, M. J.; Omar, R. F.; Bergeron, M. G. (2001). Sodium Lauryl Sulfate Abrogates Human Immunodeficiency Virus Infectivity by Affecting Viral Attachment. *Antimicrob. Agents Ch.*, **45**: 2229 - 2237.

Binnerup, S. J.; Jensen, K.; Revsbech, N. P.; Jensen, M. H.; Sørensen, J. (1992). Denitrification, Dissimilatory Reduction of Nitrate to Ammonium, and Nitrification in a Bioturbated Estuarine Sediment as Measured with ¹⁵N and Microsensor Techniques. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 303 - 313.

Bitton, G.; Dutton, R. J.; Koopman, B. (1988). Cell permeability to toxicants: An important parameter in toxicity tests using bacteria. *CRC Crit. Rev. Env. Contr.*, **18**: 177 - 188.

Blindauer, C. A.; Harrison, M. D.; Robinson, A. K.; Parkinson, J. A.; Bowness, P. W.; Sadler, P. J.; Robinson, N. J. (2002). Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc fingers. *Mol. Microbiol.*, **45**: 1421 - 1432.

Boduor, A. A.; Miller-Maier, A. M. (1998). Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *J. Microbiol. Methods*, **32**: 273 - 280.

Boedecker, W.; Drescher, K.; Altenburger, R.; Faust, M.; Grimme, L. H. (1993). Combined effects of toxicants: The need and soundness of assessment approaches in ecotoxicology. *Sci. Total. Environ.*, 1993 Suppl. 1: 931 - 938.

Bollag, J.; Barabasz, W. (1979). Effect of heavy metals on the denitrification process in soil. *J. Environ. Qual.*, **8**: 196 - 201.

Bonin, P. (1996). Anaerobic nitrate reduction to ammonium in two strains isolated from coastal marine sediment: A dissimilatory pathway. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **19**: 27 - 38.

Boon, B.; Laudelout, H. (1962). Kinetics of Nitrite Oxidation by *Nitrobacter winogradskyi*. *Biochem. J.*, **85**: 440 - 447.

Borchner, B. R.; Savageau, M. A. (1977). Generalized Indicator Plate for Genetic, Metabolic, and Taxonomic Studies with Microorganisms. *Appl. Env. Microbiol.*, **33**: 434 - 444.

Bouvier, T.; del Giorgio, P. A. (2003). Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence *in situ* hybridization (FISH): A quantitative review of published reports. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **44**: 3 - 15.

- Brierley, C. L. (1990).** Bioremediation of metal-contaminated surface and groundwaters. *Geomicrobiol. J.*, **8**: 201 - 223.
- Brillouin, L. (1962).** *Science and Information Theory*, Academic Press, New York.
- Brookes, P. C.; McGrath, S. P. (1984).** Effects of metal toxicity on the size of the soil microbial biomass. *J. Soil Sci.*, **35**: 341 - 346.
- Brune, D. C. (1989).** Sulfur oxidation by phototrophic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **975**: 189 – 221.
- Bruns, A.; Berthe-Corti, L. (1998).** *In situ* detection of bacteria in continuous-flow cultures of seawater sediment. *Microbiology*, **144**: 2783-2790.
- Bruns, A.; Cypionka, H.; Overmann, J. (2002).** Cyclic AMP and Acyl Homoserine Lactones Increase the Cultivation Efficiency of Heterotrophic Bacteria from the Central Baltic Sea. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**: 3978 - 3987.
- Bruns, A.; Nübel, U.; Cypionka, H.; Overmann, J. (2003).** Effect of Signal Compounds and Incubation Conditions on the Culturability of Freshwater Bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**: 1980 - 1989.
- Bryan, G. W.; Langston, W. J. (1992).** Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: a review. *Environ. Pollut.*, **76**: 89 - 131.
- Burgess J. G.; Jordan, E. M.; Bregu, M.; Mearns-Spragg, A.; Boyd, K. G. (1999).** Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. *J. Biotechnol.*, **70**: 27 - 32.
- Burris, R. H. (1991).** Nitrogenases. *J. Biolog. Chem.*, **266**: 9339 - 9342.
- Button, D. K.; Schut, F.; Quang, P.; Martin, R.; Robertson, B. R. (1993).** Viability and Isolation of Marine Bacteria by Dilution Culture: Theory, Procedures, and Initial Results. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 881 – 891.
- Castro, H. F.; Williams, N. H.; Ogram, A. (2000).** Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microb. Ecol.*, **31**: 1 - 9.

- Chapman, P. M.; Wang, F. Y.; Janssen, C.; Persoone, G.; Allen, H. E. (1998).** Ecotoxicology of metals in aquatic sediments: binding and release, bioavailability, risk assessment, and remediation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **55**: 2221 - 2243.
- Chebbo, G.; Gromaire, M.-C.; Garnaud, S.; Gonzalez, A. (1999).** The Experimental Urban Catchment "Le Marais" in Paris. *Proceeding of the 7th ICUSD, Sydney, Australia, 30.08.1999 - 03.09.1999*, Ed.: Joliffe, I. B. & Ball, J. E.. The Institution of Engineers Australia, The International Association for Hydraulic Research, and The International Association on Water Quality: 1520.
- Cole, J. J. (1999).** Aquatic microbiology for ecosystem scientists: New and recycled paradigms in ecological microbiology. *Ecosystems*, **2**: 215 - 225.
- Cuny, K. H.; Wolf, K. L. (1956).** Präzisierung der Blasendruckmethode zur Bestimmung der Oberflächenspannung von Flüssigkeiten. *Ann. Phys.*, **17**: 57 - 77.
- Dacey, J. W. H.; Drake, B. G.; Klug, M. J. (1994).** Stimulation of methane emission by carbon dioxide enrichment of marsh vegetation. *Nature*, **370**: 47 - 49.
- Davey, M. E.; O'Toole, G. A. (2000).** Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol. Mol. Biol. R.*, **64**: 847 - 867.
- De Filippis, L. F.; Hampp, R.; Ziegler, H. (1981).** The effect of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on *Euglena*. Adenylates and energy charge. *Z. Pflanzenphysiol.*, **103**: 1 - 7.
- Dell'Anno, A.; Mei, M. L.; Ianni, C.; Danovaro, R. (2003).** Impact of bioavailable heavy metals on bacterial activities in coastal marine sediments. *World J. Microb. Biot.*, **19**: 93 - 100.
- Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) (2006).** *Catalogue of Strains*. <http://www.dsmz.de/microorganisms/>.
- Diekert, G.; Wolfarth, G. (1994).** Metabolism in homoacetogens. *A. van Leeuw.*, **66**: 209 – 221.
- Dilling, W.; Cypionka, H. (1990).** Aerobic respiration in sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, **71**: 123 - 127.
- Dirmeier, R.; Keller, M.; Frey, G.; Huber, H.; Stetter, K. O. (1998).** Purification and properties of an extremely thermostable membrane-bound sulfur-reducing complex from the hyperthermophilic *Pyrodictium abyssi*. *Eur. J. Biochem.*, **252**: 486 – 491.

- Djabbarah, N. F.; Wasan, D. T. (1985).** Foam Stability: The Effekt of Surface Rheological Properties on the Lamelle Rupture. *AIChE J.*, **31**: 1041 - 1043.
- Drbal, K.; Véber, K.; Zahradník, J. (1985).** Toxicity and Accumulation of Copper and Cadmium in the Alga *Scenedesmus obliquus* LH. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **34**: 904 - 908.
- Drescher, K.; Boedecker, W. (1995).** Assessment of the combined effects of substances: the relationship between concentration addition and independent action. *Biometrics*, **51**: 716 - 730.
- Dukan, S.; Nyström, T. (1998).** Bacterial senescence: stasis results in increased and differential oxidation of cytoplasmatic proteins leading to developmental induction of the heat shock regulon. *Genes Dev.*, **12**: 3431 - 3441.
- Ebrahimipour, G. (1998).** *Denitrifikationspotentiale und Charakterisierung der Denitrifikanten-Lebensgemeinschaften in Wattsedimenten.* Oldenburg: Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.
- Eikmanns, B.; Eikmanns, M.; Fischer, R.; Requena, N.; Jahn, D.; Nethe-Jaenchen, R.; Schultze, B.; Steinmann-Keller, D. (2001).** *Munk - Grundstudium Biologie - Mikrobiologie.* Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Eisma, D.; Kalf, J. (1987).** Dispersal, concentration and deposition of suspended matter in the North Sea. *J. Geol. Soc.*, **144**: 161 - 178.
- Fabiano, M.; Danovaro, R.; Magi, E.; Mazzucotelli, A. (1994).** Effects of heavy metals on benthic bacteria in coastal marine sediments: A field result. *Mar. Pollut. Bull.*, **28**: 18 - 23.
- Falkowski, P.; Scholes, R. J.; Boyle, E.; Canadell, J.; Canfield, D.; Elser, J.; Gruber, N.; Hibbard, K.; Högberg, P.; Linder, S.; Mackenzie, F. T.; Moore 3rd, B.; Pedersen, T.; Rosenthal, Y.; Seitzinger, S.; Smetacek, V.; Steffen, W. (2000).** The Global Carbon Cycle: A Test of Our Knowledge of Earth as a System. *Science*, **290**: 291 - 296.
- Fent, K. (2003).** *Ökotoxikologie.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Feofilova, E. P. (2003).** Deceleration of Vital Activity as a Universal Biochemical Mechanism Ensuring Adaptation of Microorganisms to Stress Factors: A Review. *Appl. Biochem. Microbiol.*, **39**:1 - 18.
- Finster, K.; Liesack, W.; Thamdrup, B. (1998).** Elemental Sulfur and Thiosulfate Disproportionation by *Desulfocapsa sulfoexigens* sp. nov., a New Anaerobis Bacterium Isolated from Marine Surface Sediment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 119 - 125.

- Ford, T. E. (2000).** Response of marine microbial communities to anthropogenic stress. *J. Aquat. Ecosystem Stress and Recovery*, **7**: 75 - 89.
- Fortin, D.; Davis, B.; Southam, G.; Beveridge, T. J. (1995).** Biogeochemical phenomena induced by bacteria within sulfidic mine tailings. *J. Indust. Microbiol.*, **14**: 178 - 185.
- Friedrich, C. G.; Rother, D.; Bardischewsky, F.; Quentmeier, A.; Fischer, J. (2001).** Oxidation of Reduced Inorganic Sulfur Compounds by Bacteria: Emergence of a Common Mechanism? *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**: 2873 – 2882.
- Fritze, H.; Kapanen, A.; Vanhala, P. (1995).** Cadmium Contamination of Wood Ash and Fire-Treated Coniferous Humus: Effect on Soil Respiration. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **54**: 775 - 782.
- Fulladosa, E.; Murat, J. C.; Villaescusa, I. (2005).** Effect of Cadmium(II), Chromium(VI), and Arsenic(V) on Long-Term Viability- and Growth-Inhibition Assays Using *Vibrio fischeri* Marine Bacteria. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **49**: 299 - 306.
- Gadd, G. M. (1990).** Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Experimentia*, **46**: 834 - 840.
- Geiger, O.; Görisch, H. (1989).** Reversible thermal inactivation of the quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*. *Biochem. J.*, **261**: 415 - 421.
- Geyer, S. (2006).** *Kombinationswirkungen von Schwermetallen und UVA/B-Strahlung auf die Zusammensetzung und metabolische Aktivität mariner bakterieller Gemeinschaften*. Oldenburg: Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.
- Gosset W. S. (alias "Student") (1907).** On the error of counting with a Haemocytometer. *Biometrika*, **5**: 351 - 360.
- Gottwald, W. (2000).** *Statistik für Anwender*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Grasshoff, K. (1983).** *Methods of Seawater Analysis*. Weinheim: Verlag Chemie.
- Grimme, H.; Altenburger, R.; Backhaus, T.; Bödeker, W.; Faust, M.; Scholze, M. (1998).** *Vorhersagbarkeit und Beurteilung der aquatischen Toxizität von Stoffgemischen*. Leipzig: Umweltforschungszentrum Leipzig (UFZ).
- Grossart, H.-P.; Schlingloff, A.; Bernhard, M.; Simon, M.; Brinkhoff, T. (2004).** Antagonistic activity of bacteria isolated from organic aggregates of the German Wadden Sea. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **47**: 387 - 396.

- Grubbs, F. E. (1969).** Procedures for detecting outlying observations in samples. *Technometrics*, **11**: 1 – 21.
- Guterman, H. E. (1962).** An upper bound for the standard deviation. *Technometrics*, **4**: 134 - 135.
- Haarich, M.; Schmidt, D. (1993).** Ergebnisse der ZISCH-Großaufnahme vom 2.5. bis 13. 6. 1986. *Dt. Hydrogr. Z.*, **45**: 137 - 201.
- Hamer, D. H. (1986).** Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem.*, **55**: 913 - 951.
- Hansen, T. A. (1994).** Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes. *A. van Leeuw.*, **66**: 165 – 185.
- Hartmann, K. (2006).** *Chemotaxonomische Charakterisierung mariner methylotropher Isolate.* Oldenburg: Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.
- Helenius, A.; Simons, K. (1975).** Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta*, **415**: 29 - 79.
- Hensel, R.; Mayr, U.; Stetter, K. O.; Kandler, O. (1977).** Comparative Studies of Lactic Acid Dehydrogenases in Lactic Acid Bacteria. *Arch. Microbiol.*, **112**: 81 - 93.
- Heyer, J.; Malashenko, Y.; Berger, U.; Budkova, E. (1984).** Distribution of methanotrophic bacteria. *Z. Allg. Mikrobiol.*, **24**: 725 - 744.
- Higham, D. P.; Sadler, P. J. (1984).** Cadmium-Resistant *Pseudomonas putida* Synthesizes Novel Cadmium Proteins. *Nature*, **225**: 1043 - 1046.
- Hill, T. C. J.; Walsh, K. A.; Harris, J. A.; Moffett, B. F. (2003).** Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microb. Ecol.* **43**: 1 - 11.
- Holmström, C.; Kjelleberg, S. (1999).** Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **30**: 285 - 293.
- Howarth, R. W.; Marino, R.; Lane, J. (1988).** Nitrogen fixation in freshwater, estuarine, and marine ecosystems. 1. Rates and importance. *Limnol. Oceanogr.*, **33**: 669 - 687.
- Howlett, N. G.; Avery, S. V. (1997).** Relationship between cadmium sensitivity and degree of plasma membrane fatty acid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **48**: 539 - 545.

- Imhoff, J. F.; Trüper, H. G. (1976).** Marine Sponges as Habitats of Anaerobic Phototrophic Bacteria. *Microb. Ecol.*, **3**: 1 – 9.
- Inuzuka, N.; Nakamura, S.; Inuzuka, M.; Tomoeda, M. (1969).** Specific Action of Sodium Dodecyl Sulfate on the Sex Factor of *Escherichia coli* K-12 Hfr Strains. *J. Bacteriol.*, **100**: 827 - 835.
- Isken, S.; de Bont, J. A. M. (1998).** Bacteria tolerant to organic solvents. *Extremophiles*, **2**: 229 - 238.
- Iverson, W. P.; Brinckman, F. E. (1978).** Microbial metabolism of metals. In Water pollution microbiology. Vol 2. Ed. R. Mitchell. Wiley-Interscience, New York.
- Jackson, B. E.; McInerney, M. J. (2000).** Thiosulfate Disproportionation by *Desulfotomaculum thermobenzoicum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**: 3650 – 3653.
- Jain, D. K.; Collins-Thomsen, D. L.; Lee, H.; Trevors, J. T. (1991).** A Drop-collapsing test for screening biosurfactant-producing microorganisms. *J. Microbiol. Methods*, **13**: 271 - 279.
- Janssen, P. H.; Yates, P. S.; Grinton, B. E.; Taylor, P. M.; Sait, M. (2002).** Improved Culturability of Soil Bacteria and Isolation in Pure Culture of Novel Members of the Divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Appl. Env. Microbiol.*, **68**: 2391 - 2396.
- Jin, Y. H.; Clark, A. B.; Slebos, R. J. C.; Al-Refai, H.; Taylor, J. A.; Kunkel, T. A.; Resnick, M. A.; Gordenin, D. A. (2003).** Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nat. Genet.*, **34**: 326 - 329.
- Johnson, M. S.; Zhulin, I. B.; Gapuzan, M. R.; Taylor, B. L. (1997).** Oxygen-dependent growth of the obligate anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *J. Bacteriol.*, **179**: 5598 – 5601.
- Jongman, R. H. G.; terBraak, C. J. F.; vanTongeren, O. F. R. (1987).** *Data analysis in community and landscape ecology*. Wageningen: Pudoc.
- Jørgensen, B. B. (1977).** The sulfur cycle of a coastal marine sediment (Limfjorden, Denmark). *Limnol. Oceanogr.*, **22**: 814 - 832.
- Junghans, M.; Backhaus, T.; Faust, M.; Scholze, M. (2003).** Predictability of combined effects of eight chloroacetanilide herbicides on algal reproduction. *Pest Manag. Sci.*, **59**: 1101 - 1110.
- Kaiser, D.; Losick, R. (1993).** How and why bacteria talk to each other. *Cell*, **73**: 875 - 885.

- Karner, M.; Fuhrman, J. A. (1997).** Determination of Active Marine Bacterioplankton: a Comparison of Universal 16S rRNA Probes, Autoradiography, and Nucleoid Staining. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 1208 – 1213.
- Keuls, M. (1952).** The use of the "studentized range" in connection with an analysis of variance. *Euphytica*, **1**: 112 - 122.
- Klee, A. J. (1993).** A computer program for the determination of most probable number and its confidence limits. *J. Microbiol. Methods*, **18**: 91 - 98.
- Koike, I.; Hattori, A. (1978).** Simultaneous determination of nitrification and nitrate reduction in coastal sediments by a N-15 dilution technique. *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**: 853 - 857.
- Kolmogoroff, A. N. (1941).** Confidence limits for an unknown distribution function. *Ann. Math. Statist.*, **12**: 461 - 463.
- Kremer, B. P.; Markham, J. W. (1982).** Primary metabolic effects of cadmium in the brown alga, *Laminaria saccharina*. *Z. Pflanzenphysiol.*, **108**: 125 - 130.
- Kruskal, W. H. (1952).** A Nonparametric test for the Several Sample Problem. *Ann. Math. Statist.*, **23**: 525 - 540.
- Kruskal, W. H.; Wallis, W. A. (1952).** Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J. Am. Stat. Assoc.*, **47**: 583 - 621.
- Laddaga, R. A.; Bessen, R.; Silver, S. (1985).** Cadmium-Resistant Mutant of *Bacillus subtilis* 168 with Reduced Cadmium Transport. *J. Bacteriol.*, **162**: 1106 - 1110.
- LaPaglia, C.; Hartzell, P. L. (1997).** Stress-Induced Production of Biofilm in the Hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 3158 - 3163.
- Lassen, C.; Ploug, H.; Barker Jørgensen, B. (1992).** Microalgal photosynthesis and spectral irradiance in coastal marine sediments of Limfjorden, Denmark. *Limnol. Oceanogr.*, **37**: 760 - 772.
- Lee, S. H.; Fuhrman, J. A. (1991).** Species composition shift of confined bacterioplankton studied at the level of community DNA. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **79**: 195 – 201.
- Leon, O.; Quintana, L.; Peruzzo, G.; Slebe, J. C. (1992).** Purification and Properties of an Extracellular Agarase from *Alteromonas* sp. Strain C-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 4060 - 4063.

Levring, T. (1946). Some culture experiments with *Ulva* and artificial sea water. *Kungl. Fysiografiska Sällskapets I Lund Förhandlingar*, **16**: 45 - 56.

Lindenlaub, P. (1998). *Denitrifizierende Bakterien aus unbelastetem und organisch belastetem Wattenmeer-Sediment*. Oldenburg: Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.

Linebarger, C. E. (1896). A Rapid Method of Determining the Molecular Masses of Liquids by Means of their Surface Tension. *J. Amer. Chem. Soc.*, **18**: 514 - 532.

Liu, D. (1983). Resazurin Reduction Method for Activated Sludge Process Control. *Environ. Sci. Technol.*, **17**: 407 - 411.

Liu, D.; Thomson, K. (1986). Biochemical Responses of Bacteria after Short Exposure to Alkyltins. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **36**: 60 - 66.

Llobet-Brossa, E.; Rosselló-Mora, R.; Amann, R. (1998). Microbial Community Composition of Wadden Sea Sediments as Revealed by Fluorescence In Situ Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 2691 - 2696.

Lohse, L.; Epping, E. H. G.; Helder, W.; van Raaphorst, W. (1996). Oxygen pore water profiles in continental shelf sediments of the North Sea: turbulent versus molecular diffusion. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **145**: 63 - 75.

Long, R. A.; Azam, F. (2001). Antagonistic Interactions among Marine Pelagic Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**: 4975 - 4983.

Loyer, M. W.; Hamilton, M. A. (1984). Interval estimation of the density of organisms using a serial-dilution experiment. *Biometrics*, **40**: 907 - 916.

Macaskie, L. E.; Waters, J. M.; Dean, A. C. R. (1987). Cadmium Accumulation by a *Citrobacter sp.* Immobilized on Gel and Solid Supports: Applicability to the Treatment of Liquid Wastes Containing Heavy Metal Cations. *Biotechnol. Bioeng.*, **30**: 66 - 73.

Madigan, M. T.; Martinko, J. M. (2006). Brock *Mikrobiologie*. 11., überarbeitete Auflage, Pearson Studium, Pearson Education Deutschland GmbH.

Manz, W.; Amann, R.; Ludwig, W.; Wagner, M.; Schleifer, K. H. (1992). Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.*, **15**: 593 - 600.

Marchesi, J. R.; Owen, S. A.; White, G. F.; House, W. A.; Russell, N. J. (1994). SDS-degrading bacteria attach to riverine sediment in response to the surfactant or its primary biodegradation product dodecan-1-ol. *Microbiol.*, **140**: 2999 - 3006.

Marquardt, D. W. (1963). An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *J. Soc. Indust. Appl. Math.*, **11**: 431 - 441.

Mills, A. L.; Colwell, R. R. (1977). Microbiological Effects of Metal Ions in Chesapeake Bay Water and Sediment. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **18**: 99 - 103.

Mitra, R. S.; Bernstein, I. A. (1978). Single-Strand Breakage in DNA of *Escherichia coli* Exposed to Cd²⁺. *J. Bacteriol.*, **133**: 75 - 80.

Morrice, L. M.; McLean, M. W.; Long, W. F.; Williamson, F. B. (1984). β -Agarases from *Pseudomonas atlantica*. *Hydrobiologia* **116/117**: 576 - 579.

Mußmann, M.; Ishii, K.; Rabus, R.; Amann, R. (2005). Diversity and vertical distribution of cultured and uncultured Deltaproteobacteria in an intertidal mud flat of the Wadden Sea. *Environ. Microbiol.*, **7**: 405 - 418.

Muyzer, G.; de Waal, E. C.; Uittierlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 695 - 700.

Newman, D. (1939). The distribution of range in samples from a normal population, expressed in terms of an independent estimate of standard deviation. *Biometrika*, **31**: 20 - 30.

Nies, D. H.; Mergeay, M.; Friedrich, B.; Schlegel, H. G. (1987). Cloning of plasmid genes encoding resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J. Bacteriol.*, **169**: 4865 - 4868.

Nies, D. H.; Silver, S. (1989a). Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.*, **171**: 896 - 900.

Nies, D. H.; Silver, S. (1989b). Metal ion uptake by a plasmid-free metal-sensitive *Alcaligenes eutrophus* strain. *J. Bacteriol.*, **171**: 4073 - 4075.

Nies, D. H. (1992). *CzcR* and *CzcD*, gene products affecting regulation of resistance to cobalt, zinc, and cadmium (*czc* System) in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.*, **174**: 8102 - 8110.

- Nies, D. H.; Silver, S. (1995).** Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J. Ind. Microbiol.*, **14**: 186 - 199.
- Nies, D. H. (1999).** Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**: 730 - 750.
- Nikolaev, Y. A. (2004).** Extracellular Factors of Bacterial Adaptation to Unfavorable Environmental Conditions. *Appl. Biochem. Microbiol.*, **40**: 327 - 336.
- Nilsson, L.; Oliver, J. D.; Kjelleberg, S. (1991).** Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the Viable but Nonculturable State. *J. Bacteriol.*, **173**: 5054 - 5059.
- Oda, Y.; Slagman, S.-J.; Meijer, W. G.; Forney, L. J.; Gottschl, J. C. (2000).** Influence of growth rate and starvation on fluorescent in situ hybridisation of *Rhodospseudomonas palustris*. *FEMS Microb. Ecol.*, **32**: 205 – 213.
- O'Halloran, T. V.; Culotta, V. C. (2000).** Metallochaperones, an intracellular service for metal ions. *J. Biol. Chem.*, **275**: 25057 – 25060.
- Patil, G. P.; Taillie, C. (1982).** Diversity as a Concept and its Measurement. *J. Am. Stat. Assoc.*, **77**: 548 - 561.
- Pempkowiak, J.; Sikora, A.; Biernacka, E. (1999).** Speciation of heavy metals in marine sediments vs their bioaccumulation in mussels. *Chemosphere*, **39**: 313 - 321.
- Pernthaler, A.; Pernthaler, J.; Amann, R. (2002).** Fluorescence In Situ Hybridisation and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**: 3094 - 3101.
- Pfennig, N. (1975).** The phototrophic bacteria and their role in the sulfur cycle. *Plant Soil*, **43**: 1 – 16.
- Pickett, A. W.; Carter, I. S.; Dean, A. C. (1976).** Enzymic activities of cadmium and zinc-tolerant strains of *Klebsiella (Aerobacter) aerogenes* growing in glucose-limited chemostats. *Microbios.*, **15**: 105 - 111.
- Piret, J.; Désormeaux, A.; Bergeron, M. G. (2002).** Sodium Lauryl Sulfate, a Microbicide Effective Against Enveloped and Nonenveloped Viruses. *Current Drug Targets*, **3**: 17 - 30.
- Pott, A. S.; Dahl, C. (1998).** Sirohaem sulfite reductase and other proteins encoded by genes at *dsr* locus of *Chromatium vinosum* are involved in the oxidation of intracellular sulfur. *Microbiology*, **144**: 1881 – 1894.

Pruscha, H. (2006). *Statistisches Methodenbuch*. Berlin - Heidelberg - New York: Springer Verlag.

Ravel, J.; Knight, I.T.; Monahan, C. E.; Hill, R. T.; Colwell, R. R. (1995). Temperatur-induced recovery of *Vibrio cholerae* from the viable but nonculturable state: growth or resuscitation? *Microbiology*, **141**: 377 - 383.

Reinartz, M.; Tschäpe, J.; Brüser, T.; Trüper, H. G.; Dahl, C. (1998). Sulfide oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Chromatium vinosum*. *Arch. Microbiol.*, **170**: 59 – 68.

Reinthal, T.; Winter, C.; Herndl, G. J. (2005). Relationship between Bacterioplankton Richness, Respiration, and Production in the Southern North Sea. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**: 2260 - 2266.

Roane, T. M.; Kellogg, S. T. (1996). Characterization of bacterial communities in heavy metal contaminated soils. *Can. J. Microbiol.*, **42**: 593 - 603.

Roane, T. M.; Pepper, I. L. (2000). Microbial Responses to Environmentally Toxic Cadmium. *Microbiol. Ecol.*, **38**: 358 - 364.

Roller, C.; Wagner, M.; Amann, R.; Ludwig, W.; Schleifer, K. H. (1994). *In situ* probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology*, **140**: 2849-2858.

Römpp (1995). *CD-Römpp Chemielexikon. 9. Auflage*. Stuttgart - New York: Georg Thieme Verlag.

Ron, E. Z.; Minz, D.; Finkelstein, N. P.; Rosenberg, E. (1992). Interactions of bacteria with cadmium. *Biodegradation*, **3**: 161 - 170.

Roshchina, E. K.; Petrov, L. N. (1997). Excretion of protein into extracellular medium as a nonspecific response of *Escherichia coli* to stress. *Microbiol.*, **66**: 146 - 150.

Rosbach, S.; Kukuk, M. L.; Wilson, T. L.; Feng, S. F.; Pearson, M. M.; Fisher, M. A. (2000). Cadmium regulated gene fusions in *Pseudomonas fluorescens*. *Environ. Microbiol.*, **2**: 373 - 382.

Sachs, L. (1999). *Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden. 9. Auflage*. Berlin Heidelberg: Springer Verlag.

Savijoki, K.; Palva, A. (1997). Molekular Genetic Characterization of the L-Lactate Dehydrogenase Gene (*ldhL*) of *Lactobacillus helveticus* and Biochemical Characterization of the Enzyme. *Appl. Env. Microbiol.*, **63**: 2850 - 2856.

Schlegel, H. G. (1992). *Allgemeine Mikrobiologie*. Weinheim: Georg Thieme Verlag.

Schmidt, A. (1972). On the Mechanism of Photosynthetic Sulfate Reduction - An APS-Sulfotransferase from *Chlorella*. *Arch. Microbiol.*, **84**: 77 - 86.

Schrödinger, E. (1915). Notiz über den Kapillardruck in Gasblasen. *Ann. Phys.*, **46**: 413 - 419.

Schulze, M., (2001). *NLWK-Schriftenreihe*, Band 1, Niedersächsischer Landesbetrieb für Wasserwirtschaft und Küstenschutz.

Seiss, G.; Plüss, A. (2003). Tideverhältnisse in der Deutschen Bucht. *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Wasserbau*, Nr. 86.

Shannon, C. E.; Weaver, W. (1949). *The Mathematical Theory of Communication*. Univ. of Illinois Press, Urbana, 1949.

Sikkema, J.; DeBont, J. A. M.; Poolman B. (1995). Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. *Microbiol. Rev.*, **59**: 201 - 222.

Silver, S. (1996). Bacterial resistances to toxic metal ions - a review. *Gene*, **179**: 9 - 19.

Simpson, E. H. (1949). Measurement of Diversity. *Nature*, **163**: 688.

Selck, H.; Decho, A. W.; Forbes, V. E. (1999). Effects of chronic metal exposure and sediment organic matter on digestive absorption efficiency of cadmium by deposit-feeding polychaete *Capitella* species I. *Environ. Toxicol. Chem.*, **18**: 1289-1297.

Smirnov, N. (1948). Tables for estimating the goodness of fit of empirical distributions. *Ann. Math. Statist.*, **19**: 279 - 281.

Smith, K. A.; Ball, T.; Conen, F.; Dobbie, K. E.; Massheder, J.; Rey, A. (2003). Exchange of greenhouse gases between soil and atmosphere: interactions of soil physical factors and biological processes. *Eur. J. Soil Sci.*, **54**: 779 - 791.

Sørensen, J. (1978a). Capacity for Denitrification and Reduction of Nitrate to Ammonia in a Coastal Marine Sediment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**: 301 - 305.

Sørensen, J. (1978b). Denitrification Rates in a Marine Sediment as Measured by the Acetylene Inhibition Technique. *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**: 139 - 143.

- Sørensen, J. (1978c).** Occurrence of nitric and nitrous oxides in a coastal marine sediment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**: 809 - 813.
- Sorokin, D. Y.; Tourova, T. P.; Lysenko, A. M.; Kuenen, J. G. (2001).** Microbial Thiocyanate Utilization under Highly Alkaline Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**: 528 – 538.
- Stahl, D.; Amann, R. (1991).** Development and application of nucleic acid probes. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. (ed.) E. Stackebrandt & M. Goodfellow, pp. 205 - 248. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.
- Steinbüchel, A.; Schlegel, G. (1983).** NAD-Linked L(+)-Lactate Dehydrogenase from Strict Aerobe *Alcaligenes eutrophus*. 1. Purification and Properties. *Eur. J. Biochem.*, **130**: 321 - 328.
- Steinbüchel, A.; Schlegel, G. (1983).** NAD-Linked L(+)-Lactate Dehydrogenase from Strict Aerobe *Alcaligenes eutrophus*. 2. Kinetic Properties and Inhibition by Oxaloacetate. *Eur. J. Biochem.*, **130**: 329 - 334.
- Stratford, J.; Dias, A. E.; Knowles, C. J. (1994).** The utilization of thiocyanate as a nitrogen source by a heterotrophic bacterium: the degradative pathway involves formation of ammonia and tetrathionate. *Microbiology*, **140**: 2657 - 2662.
- Surowitz, K. G.; Titus, J. A., Pfister, R. M. (1984).** Effects of cadmium accumulation on growth and respiration of a cadmium-sensitive strain of *Bacillus subtilis* and a selected cadmium resistant mutant. *Arch. Microbiol.*, **140**: 107 - 112.
- Tan, A.; Ziegler, A.; Steinbauer, B.; Seelig, J. (2002).** Thermodynamics of Sodium Dodecyl Sulfate Partitioning into Lipid Membranes. *Biophys. J.*, **83**: 1547 - 1556.
- Thomas, D.; Surdin-Kerjan, Y. (1997).** Metabolism of Sulfur Amino Acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**: 503 - 532.
- Thomas, O. R.; White, G. F. (1989).** Metabolic pathway for the biodegradation of sodium dodecyl sulfate by *Pseudomonas sp.* C12B. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **11**: 318 - 327.
- Tillmann, U.; Hesse, K. J.; Colijn, F. (2000).** Planctonic primary production in the German Wadden Sea, obtained by the photosynthetic light dispensation system. *J. Plankton. Res.*, **22**: 1253 - 1276.
- Tomczak, G. (1952).** Der Einfluß der Küstengestalt und des vorgelagerten Meeresbodens auf den windbedingten Anstau des Wassers an der deutschen Nordseeküste zwischen Ems und Elbe. *Dt. Hydrogr. Z.*, **5**: 277 - 284.

- Trevors, J. T.; Mayfield, C. I.; Inniss, W. E. (1982).** Measurement of Electron Transport System (ETS) Activity in Soil. *Microb. Ecol.*, **8**: 163 - 168.
- Trevors, J. T.; Stratton, G. W.; Gadd, G. M. (1986).** Cadmium transport, resistance, and toxicity in bacteria, algae, and fungi. *Can. J. Microbiol.*, **32**: 447 - 464.
- Umweltbundesamt (2003).** Umweltdaten Deutschland online. Schadstoffe im Meerwasser und in Sedimenten der Nordsee. www.env-it.de/umweltdaten.
- Vallee, B. L. (1987).** Implications and inferences of metallothionein structure. *Experientia. Suppl.*, **52**: 5 - 16.
- Van Bogelen, R. A.; Kelley, P. M.; Neidhardt, F. C. (1987).** Differential Induction of Heat Shock, SOS, and Oxidation Stress Regulons and Accumulation of Nucleotides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **169**: 26 - 32.
- van Duyl, F. C.; Kop, A. J. (1994).** Bacterial production in North Sea sediments: clues to seasonal and spatial variations. *Mar. Biol.*, **120**: 323 - 337.
- van Es, F.B. (1982).** Community Metabolism of Intertidal Flats in the Ems-Dollard Estuary. *Mar. Biol.*, **66**: 95 - 108.
- Vorob'eva, L. I. (2004).** Stressors, Stress Reactions, and Survival of Bacteria: A Review. *Appl. Biochem. Microbiol.*, **40**: 217 - 224.
- Wachholtz, K. (1976).** *Wattenmeer - Ein Naturraum der Niederlande, Deutschlands und Dänemarks*. 1. Auflage, Karl Wachholtz Verlag, Neumünster.
- Wai, S. N.; Moriya, T.; Kondo, K.; Misumi, H.; Amako, K. (1996).** Resuscitation of *Vibrio cholerae* 01 strain TSI-4 from a viable but nonculturable state by heat shock. *FEMS Microb. Lett.*, **136**: 187 - 191.
- Walter, H. A. (2002).** *Kombinationswirkungen von Umweltchemikalien - Zur Analyse der milieuhängigen Mischungstoxizität von Kontaminanten mit unbekanntem Wirkungsmechanismus in umweltrelevanten Konzentrationen*. Halle (Saale): Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Wasmund, N.; Voss, M.; Lochte, K. (2001).** Evidence of nitrogen fixation by non-heterocystous cyanobacteria in the Baltic Sea and re-calculation of a budget of nitrogen fixation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **214**: 1 - 14.

- Watson, S. W.; Bock, E.; Valois, F. W.; Waterbury, J. B.; Schlosser, U. (1986).** *Nitrospira marina* gen. nov. sp. nov.: a chemolithotrophic nitrite-oxidizing bacterium. *Arch. Microbiol.*, **144**: 1 - 7.
- Wiener, N. (1948).** *Cybernetics: or Control and Communication in the Animal and the Machine*, 194 pp. John Wiley & Sons Ltd., New York.
- Wintermann, F. (2006).** *Screening mariner Bakteriengemeinschaften auf die Produktion oberflächenaktiver Substanzen*. Oldenburg: Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.
- Woldringh, C. L.; van Iterson, W. (1972).** Effects of Treatment with Sodium Dodecyl Sulfate on the Ultrastructure of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **111**: 801 - 813.
- Wyrтки, K. (1952).** Der Einfluß des Windes auf den mittleren Wasserstand der Nordsee und ihren Wasserhaushalt. *Dt. Hydrogr. Z.*, **5**: 245 - 252.
- Yannai, S.; Berdicevsky, I. (1995).** Formation of Organic Cadmium by Marine Microorganisms. *Ecotox. Environ. Safe.*, **32**: 209 - 214.
- Yoon, K. P.; Silver, S. (1991).** A second gene in the *Staphylococcus aureus* *cadA* cadmium resistance determinant of plasmid p1258. *J. Bacteriol.*, **173**: 7636 - 7642.
- Yost, K. J. (1984).** Cadmium, the environment and human health: an overview. *Experientia*, **40**: 157 - 164.
- Young, T. (1805).** An Essay on the Cohesion of fluids. *Phil. Trans. Roy. Soc.*, **95**: 65 - 87.
- Zak, J. C.; Willig, M. R.; Moorhead, D. L.; Wildman, H. G. (1994).** Functional Diversity of Microbial Communities: A Quantitative Approach. *Soil Biol. Biochem.*, **26**: 1101 - 1108.
- Zhong, Z.; Toukdarian, A.; Helinski, D.; Knauf, V.; Sykes, S.; Wilkinson, J. E.; O'Bryne, C.; Shea, T.; DeLoughery, C.; Caspi, R. (2001).** Sequence Analysis of a 101-Kilobase Plasmid Required for Agar Degradation by *Microscilla* Isolate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**: 5771 - 5779.
- Zimmermann, R.; Iturriaga, R.; Becker-Birck, J. (1978).** Simultaneous Determination of the Total Number of Aquatic Bacteria and the Number Thereof Involved in Respiration. *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**: 926 - 935.
- Zumft, W. G. (1997).** Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**: 533 - 616.

Zweifel, U. L.; Hagström, Å. (1995). Total Counts of Marine Bacteria Include a Large Fraction of Non-Nucleoid-Containing Bacteria (Ghosts). *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 2180 – 2185.

Tagungsbeiträge

Nachtkamp, M.; Berthe-Corti, L. (2004). Auswirkung von Cadmium auf Zusammensetzung und metabolische Aktivität mariner bakterieller Gemeinschaften.

ToxKom-Symposium, pp. 28 - 29. Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.

Geyer, S.; Nachtkamp, M.; Berthe-Corti, L. (2004). Versuchsstrategien zur Untersuchung von Umwelttoxinen auf Struktur und Aktivität mariner Bakteriengemeinschaften.

ToxKom-Symposium, pp. 20 - 21. Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.

Nachtkamp, M.; Berthe-Corti, L. (2005). Impact of cadmium on abundance and structure of bacterial communities cultivated in sediment suspension cultures.

BioMicro World-International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology 2005, p. 123. Badajoz, Spain.

Nachtkamp, M.; Berthe-Corti, L. (2005). Impact of Cadmium on Metabolic Activity and Metabolic Diversity of Marine Bacterial Communities cultivated in Sediment Suspension Cultures.

IMBC 2005 CIBM (International Marine Biotechnology Conference), p. 307. St. John's, Canada.

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich diese Arbeit selbstständig verfaßt, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, daß die vorliegende Dissertation weder in ihrer Gesamtheit noch in Teilen einer anderen wissenschaftlichen Hochschule zur Begutachtung in einem Promotionsverfahren vorliegt oder vorgelegen hat.

Oldenburg, den 30.11.06

Marcus Nachtkamp

Danksagung

Besonderer Dank gebührt der Hans-Böckler-Stiftung für ihre großartige Unterstützung. Insbesondere möchte ich in diesem Zusammenhang Werner Fiedler und Prof. Dr. Kathryn Nixdorff für die unkomplizierte Zusammenarbeit und ihr Vertrauen danken.

P.D. Dr. Luise Berthe-Corti möchte ich für die ausgezeichnete Betreuung, ihr Vertrauen, ihre Unterstützung, Beratung und nicht zuletzt für die Begutachtung dieser Arbeit danken. Besonderer Dank gebührt auch P. Doz. Dr. Wolfgang Ahlf für die Begutachtung dieser Arbeit. Für ihre Unterstützung und Beratung möchte ich auch Prof. Dr. Irene Witte danken. Für die angenehme und fruchtbare Zusammenarbeit im Promotionskolleg "Toxische Kombinationswirkungen" möchte ich Dr. Thomas Backhaus, Prof. Dr. Detmar Beyersmann, Prof. Dr. Werner Butte, Prof. Dr. Juliane Filser, Enken Hassold, Tanja Juffernholz, Marianne Matzke, Dr. Michael Müller und Dr. Christiane Schmidt danken. Neben der guten Zusammenarbeit im Promotionskolleg möchte ich Harald Ertl, Dr. Simone Geyer, Kathrin Henrichs und Dr. Heike Sommer auch für manch, angenehmes Beisammensein im Büro, zu Hause, oder auch bei Kaffee und Kuchen in einem Meer aus Fell und Pfoten danken.

Ebenso möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Arbeitskreises Mikrobiologie/Biotechnologie der Universität Oldenburg für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Im einzelnen möchte ich Barbara Brunies, Uwe Maschmann und nicht zuletzt Charlotte Versteegen für ihre großartige technisch-logistische Unterstützung danken. Reiner Hulsch gebührt besonderer Dank für seine Unterstützung bei technischen Problemen. Für die gute Zusammenarbeit möchte ich mich bei Maike Focken, Constanze Jenschke, Ulrike Bielefeld, K. Amélie Gutsche, Kirsten Hartmann, Hafid Mosfaoue, Nadja Nasri, Andrea Steigerwald, Frederik Wehrkamp zur Höne und Frank Wintermann danken. Dank für eine angenehmen und gute Zusammenarbeit gebührt natürlich auch Renate Gahl-Janßen aus dem Arbeitskreis Molekulare Mikrobiologie.

Bedanken möchte ich mich auch bei der AG Bodenkunde der Universität Oldenburg, und insbesondere bei Gunda Sänglerlaub für die Cadmiumbestimmung mittels AAS. Dank für die bereitwillige Beratung in Fragen der Schwermetall-Analyse gebührt auch Prof. Dr. Wolfgang Balzer (AG Meereschemie, Universität Bremen).

Meinen Eltern möchte ich danken für ihr Verständnis, ihre Unterstützung und manch schöne, gemeinsame Stunde. Danken möchte ich auch meinem Bruder Carsten, meiner

Schwägerin Bettina und meiner Nichte Vivian für angenehme Stunden.

Allen Freunden und nicht zuletzt Martin Otto, Dirk Schniederjohann, Kathrin und Nora Dierse, Heike Schäfer, Thorsten Grebe, Dunja Bender, Cordula Seglers, Markus Lau, Carolin Farke, sowie allen Freunden, die weiter oben bereits erwähnt wurden, weil wir eine Weile zusammenarbeiten durften, möchte ich für ihre Unterstützung, ihr Verständnis und Freundschaft danken.

Danke!

Lebenslauf

31.05.1974	Geburt (Bielefeld, NRW)	
06/1980 - 07/1994	Schullaufbahn:	06/1980 - 04/1983: Grundsch. Friesenheim, BW 04/1983 - 06/1984: Astrid-Lindgren-Grundschule, Bad Westernkotten, NRW 06/1984 - 07/1994: Ostendorf Gymnasium, Lippstadt, NRW
09/1994 - 12/1995	Zivildienst	Diakonisches Werk, Soest, NRW
10/1995 - 06/2003	Studium:	10/1995 - 03/1998: Grundstudium, Biologie (Dipl.), Universität Konstanz, BW 04/1998 - 06/2003: Hauptstudium, Biologie (Dipl.), Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, NI Abschluß: Diplom Biologe
10/2003 - 11/2006	Promotion	Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, NI