

# Kombinationswirkungen von Schwermetallen und UVA/B-Strahlung auf die 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 einer Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) angenommene Dissertation

von Frau Simone Geyer

geboren am 01.05.1973 in Rodewisch

Erstgutachterin:H. Doz. Dr. Luise Berthe-CortiZweitgutachter:Dr. Thomas Backhaus

Tag der Disputation: 02.05.2006

# Inhaltsverzeichnis

Ι	Abkürzungsverzeichnis	
Π	Abbildungsverzeichnis	
III	Tabellenverzeichnis	
1	Einleitung	1
1.1	Das Wattenmeer der Deutschen Nordseeküste und seine besondere	
	ökologische Bedeutung	1
1.1.1	Habitatbeschreibung	1
1.1.2	Kohlenstoffkreislauf	2
1.1.3	Stickstoffkreislauf	5
1.1.4	Schwefelkreislauf/Schwefeltransformation	7
1.2	Anthropogene und abiotische Störungen	8
1.2.1	UV-Strahlung als abiotischer Umweltfaktor	8
1.2.2	Schwermetallbelastung als abiotischer Faktor	11
1.3	Kombinationswirkungen	13
1.3.1	Vorstellung der Konzepte	14
1.4	Ziel der Arbeit	15
2	Material	16
2.1	Geräte	16
2.2	Chemikalien	17
2.3	Enzyme und Testkits	19
2.4	Kulturmedien	19
2.5	Puffer und Lösungen	23
2.5.1	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)	23
2.5.2	Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)	24
2.5.3	Substratverwertungsspektrum	25
2.6	Oligonukleotide	26

2.7	Bakterienstämme	27
2.8	Größenstandards für die Elektrophorese	27
2.9	Computersoftware, Internetanwendungen und Datenbanken	28
3	Methoden	29
3.1	Probennahme und Probennahmeort	29
3.2	Auswahl der Noxen	29
3.2.1	Auswahl geeigneter Strahlungsquellen	29
3.2.2	Auswahl eines geeigneten Schwermetalls	32
3.3	Fermentationen	33
3.3.1	Versuchsdesign	33
3.3.2	Versuchsansätze	36
3.4	Analytik der kultivierten Bakteriengemeinschaft	37
3.4.1	Gasanalytik	37
3.4.2	Bestimmung der Gesamtzellzahl	38
3.4.3	Bestimmung der phylogenetischen Gruppen	39
3.4.4	Bestimmung der wahrscheinlichsten Lebendzellzahl	42
3.4.5	Bestimmung des Substratverwertungsspektrums	43
3.4.6	Isolierung der Gesamt-DNA	44
3.4.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	45
3.4.8	Reinigung von PCR-Produkten	46
3.4.9	Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel	46
3.4.10	Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese	47
3.4.11	Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden, DNA und RNA	48
3.4.12	DNA-Sequenzanalyse	48
3.5	Charakterisierung von Isolaten	48
3.6	Bestimmung der Bakteriochlorophylle a, c, d und e	49
3.7	Statistik	49

4	Ergebnisse	51
4.1	Einfluss von polychromatischem Licht auf die Aktivität	
	und Zusammensetzung bakterieller Gemeinschaften	51
4.1.1	Stoffwechselaktivität	51
4.1.2	Wachstum (Gesamtzellzahl und Lebendzellzahl)	54
4.1.3	Wachstum mit verschiedenen C-Quellen und Elektronenakzeptoren	
	(metabolische Diversität)	57
4.1.4	Substratverwertungsspektrum	62
4.1.5	Phylogenetische Zusammensetzung	65
4.1.6	Struktur der Bakteriengemeinschaft und Präsenz unterschiedlicher	
	Spezies	70
4.1.7	Überblick über das Zusammenspiel der Effekte	76
4.2	Einfluss von Cadmium auf die Aktivität und	
	Zusammensetzung bakterieller Gemeinschaften	77
4.2.1	Stoffwechselaktivität	77
4.2.2	Wachstum (Gesamtzellzahl und Lebendzellzahl)	79
4.2.3	Wachstum mit verschiedenen C-Quellen und Elektronenakzeptoren	
	(metabolische Diversität)	81
4.2.4	Substratverwertungsspektrum	85
4.2.5	Phylogenetische Zusammensetzung	88
4.2.6	Struktur der Bakteriengemeinschaft und Präsenz unterschiedlicher	
	Spezies	92
4.2.7	Überblick über das Zusammenspiel der Effekte	94
4.3	Einfluss der kombinierten Einwirkung von Cadmium und	
	polychromatischem Licht auf die Aktivität und Zusammensetzung	
	bakterieller Gemeinschaften	95
4.3.1	Stoffwechselaktivität	95
4.3.2	Wachstum (Gesamtzellzahl und Lebendzellzahl)	98
4.3.3	Wachstum mit verschiedenen C-Quellen und Elektronenakzeptoren	
	(metabolische Diversität)	101
4.3.4	Substratverwertungsspektrum	106
4.3.5	Phylogenetische Zusammensetzung	109

4.3.6	Struktur der Bakteriengemeinschaft und Präsenz unterschiedlicher	
	Spezies	112
4.3.7	Überblick über das Zusammenspiel der Effekte	117
4.4	Methanol-konsumierende Bakterien (MKB) – eine neue Spezies?	118
5	Diskussion	120
5.1	Wachstum	121
5.2	Stoffwechselaktivität	125
5.3	Metabolische Diversität	129
5.3.1	Wachstum auf verschiedenen C-Quellen	130
5.3.2	Substratverwertungsspektrum	134
5.4	Struktur der Gemeinschaft	134
5.5	Fazit und Ausblick	137
6	Zusammenfassung	139
7	Literaturliste	144

# I Abkürzungsverzeichnis

APB	Acetat-Pyruvat-konsumierende Bakterien
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
bp	Basenpaare
BLAST	"Basic Local Alignment Search Tool"
BSA	"Bovine Serum Albumine"
CA	Konzentrations-Additiviät
$CO_2$	Kohlendioxid
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
ddH <sub>2</sub> O	doppelt deionisiertes Wasser
DGGE	Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNB	denitrifizierende Bakterien
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOM	"Dissolved Organic Matter"
ECOLOG	Substratverwertungsspektrum
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
IA	Unabhängige Wirkung
MKB	Methanol-konsumierende Bakterien
mM	mmol/l
MPN	"Most Probable Number"
p. a.	pro analysis
PBS	"Phosphate Buffered Saline"
PCR	Polymerasekettenreaktion

Phase I – III	Einteilung des	Wachstums und	der Stoff	fwechselaktiv	viät der	Bakterien
---------------	----------------	---------------	-----------	---------------	----------	-----------

- p.L. polychromatisches Licht
- pO<sub>2</sub> Sauerstoffpartialdruck
- QCO<sub>2</sub> Kohlendioxidproduktionsrate
- QO<sub>2</sub> Sauerstoffverbrauchsrate
- RNA Ribonukleinsäure
- rRNA ribosomale RNA
- RQ Respiratorischer Quotient
- SOD Superoxid-Dismutase
- SRB sulfatreduzierende Bakterien
- SWB-X2 Seewasserbouillon-X2 Medium
- UV Ultraviolett
- Vol % Volumen Prozent

# II Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Vereinfachte Übersicht mikrobieller Stoffwechselwege unter Berücksichtigung der Zonierung des Habitats	2
Abb. 2.1:	Größenstandards für Gelelektrophoresen	28
Abb. 3.1:	Integrierte Bestrahlungsstärke der verwendeten Lampen und im Freiland (Sylt, August 2004)	30
Abb. 3.2:	Einfluss gelöster und ungelöster Wasserinhaltsstoffe auf die UV-Desinfektion von Abwasser	31
Abb. 3.3:	Aufbau eines Fermenters mit Lampe Typ TL (Biostat S 5 l, Braun Biotech)	34
Abb. 3.4:	Analyse der kultivierten Bakteriengemeinschaft	36
Abb. 4.1:	CO <sub>2</sub> -Produktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis und Kultivierungszeit	52
Abb. 4.2:	O <sub>2</sub> -Verbrauch in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis und Kultivierungszeit	54
Abb. 4.3:	Zellkonzentration in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis und der Kultivierungszeit	56
Abb. 4.4:	Lebendzellzahlen der <b>(A)</b> denitrifizierenden Bakterien (DNB) und <b>(B)</b> Methanol-konsumierenden Bakterien (MKB) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis und der Kultivierungszeit	58
Abb. 4.5:	Partielle Komponentenanalyse (PCA) des Substratverwertungs- spektrums an ausgewählten Kultivierungstagen (1, 2 und 8 d) in Abhängigkeit von der Bestrahlungdosis	65
Abb. 4.6:	Phylogenetische Zusammensetzung der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis	66
Abb. 4.7:	Clusteranalyse der phylogenetischen Zusammensetzung der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis	70
Abb. 4.8:	DNA-Banden-Muster des 16S rRNA Genfragments der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis	71
Abb. 4.9:	Anzahl der DNA-Banden (Spezies) der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit und der Bestrahlungsdosis	72
Abb. 4.10:	Clusteranalyse des DNA-Banden-Musters der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis	75
Abb. 4.11:	CO <sub>2</sub> -Produktion in Abhängigkeit von der Cadmiumbelastung und Kultivierungszeit	77

Abb. 4.12:	O <sub>2</sub> -Verbrauch in Abhängigkeit von der Cadmiumbelastung und der Kultivierungszeit	79
Abb. 4.13:	Zellkonzentration in Abhängigkeit von der Cadmiumbelastung und der Kultivierungszeit	80
Abb. 4.14:	Lebendzellzahlen der <b>(A)</b> denitrifizierenden Bakterien (DNB) und <b>(B)</b> Methanol-konsumierenden Bakterien (MKB) in Abhängigkeit von der Cadmiumbelastung und der Kultivierungszeit	84
Abb. 4.15:	Partielle Komponentenanalyse (PCA) des Substratverwertungsspektrums an ausgewählten Kultivierungstagen (1, 2, 3 und 8 d) in Abhängigkeit von der Cadmiumbelastung	87
Abb. 4.16:	Phylogenetische Zusammensetzung der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Cadmiumbelastung	91
Abb. 4.17:	DNA-Banden-Muster des 16S rRNA Genfragments der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Cadmiumbelastung	92
Abb. 4.18:	Anzahl der DNA-Banden (Spezies) der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit und der Cadmiumbelastung	93
Abb. 4.19:	Clusteranalyse des DNA-Banden-Musters der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Cadmiumbelastung	94
Abb. 4.20:	CO <sub>2</sub> -Produktion in Abhängigkeit von der Noxe bzw. Kombination der Noxen und der Kultivierungszeit	96
Abb. 4.21:	O <sub>2</sub> -Verbrauch in Abhängigkeit von der Noxe bzw. Kombination der Noxen und der Kultivierungszeit	98
Abb. 4.22:	Zellkonzentration in Abhängigkeit von der Noxe bzw. Kombination der Noxen und der Kultivierungszeit	99
Abb. 4.23:	Lebendzellzahlen der <b>(A)</b> denitrifizierenden Bakterien (DNB) und <b>(B)</b> Methanol-konsumierenden Bakterien (MKB) in Abhängigkeit von der Noxe bzw. Kombination der Noxen und der Kultivierungszeit	105
Abb. 4.24:	Partielle Komponentenanalyse (PCA) des Substratverwertungsspektrums an ausgewählten Kultivierungstagen (1, 2, 3 und 8 d) in Abhängigkeit von den Noxen bzw. Kombination der Noxen	108
Abb. 4.25:	Phylogenetische Zusammensetzung der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Kombination der Noxen	112
Abb. 4.26:	DNA-Banden-Muster des 16S rRNA Genfragments der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Kombination der Noxen und der Kultivierungszeit	113
Abb. 4.27:	Anzahl der DNA-Banden (Spezies) der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Noxe bzw. Kombination der Noxen und der Kultivierungszeit	114
Abb. 4.28:	Clusteranalyse des DNA-Banden-Musters der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Kombination der Noxen	116

Abb. 4.29:	DGGE-Banden-Muster des 16S rRNA Genfragments der Gemeinschaften und der charakterisierten Isolate nach 8 Kultivierungstagen	119
Abb. 5.1:	Gesamt-CO <sub>2</sub> -Produktion der belasteten Gemeinschaften, im Vergleich zur Dunkelkontrolle	128
Abb. 5.2:	Zeitabhängiger Einfluss der Noxen auf die Stoffwechselaktivität und das Wachstum der untersuchten Gemeinschaft	129

### **III Tabellenverzeichnis**

Tab. 2.1:	Geräte und Materialien	16
<b>Tab. 2.2</b> :	Chemikalien, Substanzen und Gase	17
<b>Tab. 2.3</b> :	Enzyme und Testkits	19
Tab 2.4:	Oligonukleotide für PCR und FISH	26
Tab. 2.5:	Computersoftware, Datenbanken und Internetanwendungen	28
Tab 3.1:	Gesamtstrahlungsdosis in Abhängigkeit vom Lampen- und Fermentertyp	32
Tab. 3.2:	Konzentration der eingesetzten Cadmiummenge	33
Tab. 3.3:	Kulturbedingungen während einer Fermentation	35
Tab. 3.4:	Überblick über die durchgeführten Fermentationen	37
Tab. 3.5:	Phylogenetische Gruppen und die zur Detektion eingesetzten rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden	40
Tab. 3.6:	Medien der MPN-Bestimmung und Einordnung der Lebendzellzahl der Bakterien in physiologische Gruppen	42
Tab. 3.7:	Kohlenstoffquellen des Substratverwertungsspektrums (EcoPlate $^{TM}$ )	43
Tab. 3.8:	Pipettierschema der 16S rDNA-PCR für die DGGE-Analyse	45
Tab. 3.9:	Pipettierschema der 16S rDNA-PCR für die Sequenzanalyse	46
Tab. 4.1:	Länge der Phase I (lag-Phase) und II (höchste CO <sub>2</sub> -Produktionsrate) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis	53
Tab. 4.2:	Lebendzellzahlen der Acetat-Pyruvat-konsumierenden- (APB), denitrifizierenden- (DNB), sulfatreduzierenden- (SRB) und Methanol-konsumierenden Bakterien (MKB) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis und der Kultivierungszeit	60
Tab. 4.3:	Substratverwertungsspektren an ausgewählten Kultivierungstagen (1, 2 und 8 d) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis	63
Tab. 4.4:	Phylogenetische Zusammensetzung der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis und der Kultivierungszeit	67
Tab. 4.5:	Taxonomische Einordnung der sequenzierten 16S rRNA Genfragmente	73
Tab. 4.6:	Länge der Phase I (lag Phase) und II (höchste CO <sub>2</sub> -Produktionsrate) in Abhängigkeit von der Cadmiumbelastung	78
Tab. 4.7:	Lebendzellzahlen der Acetat-Pyruvat-konsumierenden- (APB), denitrifizierenden- (DNB), sulfatreduzierenden- (SRB) und Methanol-konsumierenden Bakterien (MKB) in Abhängigkeit von der Cadmiumbelastung und der Kultivierungszeit	83

Tab. 4.8:	Substratverwertungsspektren an ausgewählten Kultivierungstagen (1, 2, 3 und 8 d) in Abhängigkeit von der Cadmiumbelastung	86
Tab. 4.9:	Phylogenetische Zusammensetzung der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Cadmiumbelastung und der Kultivierungszeit	90
Tab. 4.10:	Einfluss von Cadmiumacetat [0,05mM] auf die Gesamtzellzahl (GZ) und die Hybridisierbarkeit der Targetzellen	89
Tab. 4.11:	Länge der Phase I (lag-Phase) und Phase II (höchste CO <sub>2</sub> -Produktionsrate) in Abhängigkeit von der Noxe bzw. Kombination der Noxen	97
Tab. 4.12:	Lebendzellzahlen der Acetat-Pyruvat-konsumierenden- (APB), denitrifizierenden- (DNB), sulfatreduzierenden- (SRB) und Methanol-konsumierenden Bakterien (MKB) in Abhängigkeit von der Noxe bzw. Kombination der Noxen und der Kultivierungszeit	103
Tab. 4.13:	Substratverwertungsspektren an ausgewählten Kultivierungstagen (1, 2, 3 und 8 d) in Abhängigkeit von der Kombination der Noxen	107
Tab. 4.14:	Phylogenetische Zusammensetzung der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Noxe bzw. Noxenkombination und der Kultivierungszeit	110
Tab. 4.15:	Taxonomische Einordnung der sequenzierten 16S rRNA Genfragmente	115
Tab. 4.16:	Taxonomische Einordnung der sequenzierten 16S rRNA Genfragmente	118
Tab. 5.1:	Respiratorischer Quotient aller untersuchten Gemeinschaften nach 10 Kultivierungstagen	125

### 1 Einleitung

# 1.1 Das Wattenmeer der Deutschen Nordseeküste und seine besondere ökologische Bedeutung

#### 1.1.1 Habitatbeschreibung

Das niederländisch-deutsch-dänische Wattenmeer ist mit 9.300 km² das größte zusammenhängende Wattenmeergebiet der Erde und sowohl ein Ablagerungsraum als auch ein Gebiet hoher Primärproduktion, das durch Tidenzyklen ständigen Veränderungen unterliegt (Kuipers et al., 1981). Die niedrige Wassersäule, die dadurch bestimmte Lichtverfügbarkeit und der ständige Austausch von Nährstoffen mit Land, Flüssen und angrenzenden Meeren schaffen gute Voraussetzungen für eine hohe Primärproduktion. In den Sedimenten des Wattenmeeres spielen bakterielle Gemeinschaften eine entscheidende Rolle bei der Remineralisierung organischer Substanzen, die zu einem nicht geringen Teil aerob abgebaut werden. Die O2-Eindringtiefe in das Sediment wird von der Sauerstoffkonzentration in der Wassersäule, der Photosyntheseaktivität benthischer Organismen, der Bioturbation und der Strömung beeinflusst (Binnerup et al., 1992; Lassen et al., 1992; Lohse et al., 1996). Grundlegende komplexe Stoffwechselwege der Mikroorganismen unter Berücksichtigung der Zonierung des Habitats Wattsediment sind in Abbildung 1.1 grob skizziert. Die Probennahme der in dieser Arbeit untersuchten mikrobiellen Gemeinschaften erfolgte aus dem Wattsediment an der Grenzschicht Wasser/oxische Zone. Durch die hohe bakterielle Stoffwechseldiversität müssen vielfältige Stoffwechselwege und deren Relevanz im Kohlenstoff-, Stickstoffund Schwefelkreislauf berücksichtigt werden. Dabei hängt die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft in starkem Maße von den chemischen und physikalischen Charakteristika des Lebensraums ab (Madigan et al., 2000). Gerade im Wattsediment der Deutschen Nordseeküste, das durch steile Sauerstoff- und Redoxgradienten gekennzeichnet ist, bilden sich unterschiedliche Gemeinschaften auf engstem Raum. Deshalb können Untersuchungen zur Variation einer Gemeinschaft als Folge der Veränderung eines einzelnen Parameters nicht in situ unter sich ständig ändernden Umweltbedingungen, sondern nur unter definierten Bedingungen im Labor erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde die mikrobielle Gemeinschaft aus dem

1

Wattsediment (Grenzschicht zwischen Wasser und oxischer Sedimentschicht) im Fermenter kultiviert und unter den Aspekten der Stoffwechseldiversität und Zusammensetzung analysiert. Die ökologische Relevanz einzelner Gruppen wurde im Kontext mit den Stoffkreisläufen betrachtet.



Abb. 1.1: Vereinfachte Übersicht mikrobieller Stoffwechselwege unter Berücksichtigung der Zonierung des Habitats. Die gelb markierte Zone stellt die potentiell möglichen Stoffwechselwege der untersuchten Gemeinschaft am Probennahmeort dar. Die grau markierten Zonen stellen die untersuchten Stoffwechselwege der kultivierten Gemeinschaft dar. I = aerobe chemoorganotrophe und methylotrophe Bakterien; II = denitrifizierende Bakterien; III = sulfatreduziererende Bakterien; Kohlenstoffkreislauf = schwarz; Stickstoffkreislauf = blau; Schwefelkreislauf = rot

#### 1.1.2 Kohlenstoffkreislauf

Einer der größten Anteile am Kohlenstoffumsatz in fast allen Ökosystemen ist der von Mikroorganismen umgesetzte Anteil organischen Materials. Bakterien führen einen Großteil der aeroben Respiration, die gesamte anaerobe Respiration und einen Großteil der Remineralisierung der organischen Nährstoffe durch (Cole, 1999). Da in der vorliegenden Arbeit die Gemeinschaft unter oxischen Bedingungen kultiviert wurde, kommt den aeroben chemoorganotrophen Bakterien die größte Bedeutung zu. Als Substrate wurden Acetat, Pyruvat und Casaminoacids verwendet. Jedoch sind durch die enge Verknüpfung mit der Wassersäule und der anoxischen Zone auch phototrophe und anaerobe chemoorganotrophe Bakterien involviert. So ist in küstennahen marinen Sedimenten die bakterielle Sulfatreduktion ein bedeutender anaerober respiratorischer Prozess, der mit bis zu 50 % an der Oxidation von organischem Material beteiligt ist (Jørgensen, 1987).

#### Mineralisierung

Die von den Primärproduzenten gebildete Biomasse dient allen chemoorganotrophen Organismen als Nahrung, die diese zu einem Teil zur Energiekonservierung abbauen und zu einem anderen Teil in zelleigene Verbindungen umwandeln (Abb. 1.1-I). Der Abbau der gebildeten Biomasse zu CO<sub>2</sub> und Wasser wird von chemoorganotrophen Mikroorganismen in Boden und Sedimenten sowie in Gewässern durchgeführt (Eikmanns et al., 2001). Durch die Mineralisation werden Ausgangsverbindungen für die Primärproduktion regeneriert. Unter oxischen Bedingungen, mit O<sub>2</sub> als Elektronenakzeptor, wird letztlich der allergrößte Teil des von den Primärproduzenten in organischen Kohlenstoffverbindungen fixierten Kohlendioxids (99%) oxidiert und in die Atmosphäre entlassen (Eikmanns et al., 2001). Die Reduktion des Sauerstoffs ist in allen Fällen mit Energiekonservierung durch Elektronentransportphosphorylierung gekoppelt.

Eine Besonderheit ist die Mineralisierung von organischen Substanzen ohne Kohlenstoff-Kohlenstoffbindung (C1-Körper). Methan und einige andere C1-Körper werden als Elektronendonor für die Energiegewinnung und als Kohlenstoffquelle genutzt (Madigan et al., 2000). Methan, das als zentrales Endprodukt des anaeroben Abbaus von organischem Material entsteht, spielt in Sedimenten eine besondere Rolle. Etwa 1 % der Gesamtmenge des bei der Mineralisation umgesetzten Kohlenstoffs wird in Form von Methan frei (Eikmanns et al., 2001). Methan verursacht neben CO<sub>2</sub> ca. 15 - 19 % des anthropogenen Treibhauseffekts (Fent, 2003). Zur Methanbildung sind ausschließlich anaerob lebende Archaea (methanogene Bakterien) in der Lage. Die Methan-Assimilation kann durch zwei Stoffwechselwege erfolgen: Ribulose Monophosphatweg (Typ I) und Serinweg (Typ II). Methanooxidierende Bakterien sind aerobe Gammaoder Alphaproteobakterien, die das von den anaeroben Bakterien in der Reduktionsschicht des Sediments gebildete Methan oxidieren können. Methanotrophe Bakterien sind weit verbreitet und kommen in Sedimenten oberhalb der anoxischen Schicht vor. Ihre Tätigkeit reduziert die Methanemissionen beträchtlich (Madigan et al., 2000). Beteiligt sind methylotrophe und methanotrophe Bakterien, die sich in ihrem Substratnutzungsspektrum unterscheiden. Methylotrophe Bakterien wachsen zwar mit Methanol, Methylamin oder Formiat, jedoch nicht mit Methan. Einige Mitglieder verschiedener chemoorganotropher Spezies, wie z.B. Hyphomicrobium, Pseudomonas, Bacillus und Vibrio, sind fakultativ methylotroph (Madigan et al., 2000). Ihre ökologische Funktion besteht in der Rückführung des Methankohlenstoffs in den Kohlenstoffkreislauf der Biosphäre (Heyer *et al.*, 1984).

#### Primärproduktion

(Primärproduzenten) Phototrophe Mikroorganismen erbringen die größte Photosyntheseleistung in aquatischen Ökosystemen (Madigan et al., 2000). Für das Wattenmeer der Deutschen Nordsee ist eine ausgeprägte saisonale Abhängigkeit der Primärproduktion nachgewiesen, die durch Lichtverhältnisse und Nährstoffangebot reguliert ist (Tillman et al., 2000). Phototrophe Mikroorganismen können in 2 große Gruppen unterteilt werden: Die Purpur- und grünen Schwefelbakterien, die anoxygene Photosynthese betreiben, und die Cyanobakterien, die oxygene Photosynthese betreiben. Cyanobakterien sind die einzigen autotrophen Prokaryoten, die O<sub>2</sub> freisetzen. Die meisten Cyanobakterien sind obligat phototroph und können nicht in Abwesenheit von Licht auf organischem Substrat wachsen. Jedoch können einige Spezies einfache organische Substrate wie Glucose und Acetat in Abwesenheit von Licht assimilieren. Die Photosynthese betreibenden Bakterien sind zusammen mit den chemolithotrophen Bakterien in der Lage CO<sub>2</sub> zu fixieren. Autotrophe Bakterien haben vier verschiedene Mechanismen der CO<sub>2</sub>-Fixierung entwickelt, mit dem Ziel, CO<sub>2</sub> in die Biosynthese einzuschleusen. Diese Mechanismen sind Calvin-Zyklus, reverser Citratzyklus, Hydroxypropionatzyklus und reduktiver Acetyl-CoA-Weg. Der Calvin-Zylus ist der meistverbreitete Stoffwechselweg und benötigt die (RuBisCo) Schlüsselenzyme Ribulose Biphosphat Carboxylase und Phosphoribulokinase. RuBisCo ist weit verbreitet in Purpurbakterien, Cyanobakterien und vielen chemolithotrophen Bakterien und einigen Archaea. Zu den fakultativ autotrophen Vertretern gehören die Purpurbakterien (photoautotroph). Alphaproteobakterien sind typische Vertreter, die den Calvin-Zyclus zur CO<sub>2</sub>-Fixierung nutzen und anoxygene Photosynthese betreiben können (Yurkov & Beatty 1998). Die anoxygene Photosynthese unterscheidet sich deutlich von der von den Cyanobakterien betriebenen oxygenen Photosynthese, da kein  $O_2$  freigesetzt wird. Das besondere an den Purpurbakterien ist, dass einige Vertreter fakultativ aerob wachsen und somit Respiration im Dunkeln betreiben können. In Anwesenheit von Sauerstoff wird jedoch die Synthese der Photopigmente inhibiert. Dieser Stoffwechselweg ist in dem in vorliegender Arbeit gewählten Kultivierungssystem potentiell möglich, allerdings erst, wenn von den aeroben chemoorganotrophen Bakterien  $CO_2$  produziert wurde. Hingegen sind weder der reduktive Acetyl-CoA-Weg noch der reverse Citratzyklus zu erwarten, da beide Stoffwechselwege nicht oder nur sehr eingeschränkt unter oxischen Bedingungen stattfinden können.

#### 1.1.3 Stickstoffkreislauf

Neben Kohlenstoff stellt Stickstoff das wichtigste Element für alle Lebewesen dar. Der Anteil an Kohlenstoff in der lebenden Biomasse beträgt ungefähr 15 % (Madigan *et al.*, 2000). Die Assimilation des Stickstoffs, also sein Einbau in die Zellsubstanz, geht bei allen Organismen von Ammonium aus. Die Bildung von Ammonium durch die Reduktion des inerten Gases N<sub>2</sub> wird als Stickstoff-Fixierung bezeichnet. Die meisten N<sub>2</sub>-fixierenden Mikroorganismen leben in Symbiose oder enger Assoziation mit Pflanzen, sind also in der oberen Sedimentschicht nicht zu erwarten. Zwei weitere Prozesse mikrobieller Stickstofftransformationen sind die Nitrifikation und die Denitrifikation, die im Wattsediment und der angrenzenden Wasserschicht von großer Bedeutung sind (Ebrahimipour, 1998). Hier wird die besondere Stellung der Prokaryoten deutlich, da die meisten Redoxreaktionen des Stickstoffs nur von ihnen durchgeführt werden können (Madigan *et al.*, 2000).

#### Denitrifikation

Die Denitrifikation (Abb. 1.1-II) ist der einzige biologische Vorgang, durch den gebundener Stickstoff wieder in seine molekulare Form überführt wird (Madigan *et al.*, 2000). Dieser dissimilatorische Redox-Prozess der zur schrittweisen Reduktion von Stickstoffoxiden (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) zu gasförmigen Produkten (NO, N<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>) führt, die dann in die Umgebung entlassen werden (Braker *et. al.*, 2001), ist in Sedimenten von Meeren und Estuaren von besonderer Bedeutung (Sørensen *et al.*, 1978a, b, c).

Denitrifikation ist ein entscheidender Schritt innerhalb des Stickstoffkreislaufs, die den in Form von Nitrat vorliegenden Stickstoff aus dem Ökosystem entfernt (Lindenlaub, 1998). Denitrifizierende Bakterien sind weit verbreitet und gehören physiologisch überwiegend zu den Proteobakterien. Denitrifizierende Bakterien sind fakultativ aerob und können außer Nitrat meist noch andere Elektronenakzeptoren nutzen (Madigan *et al.*, 2000). Die aerobe Respiration findet statt, wenn Sauerstoff und Nitrat im Medium vorhanden sind. Die Gruppe der denitrifizierenden Bakterien ist metabolisch hoch divers und nimmt daher einen besonderen Stellenwert ein.

#### Nitrifikation

Die Oxidation von NH<sub>3</sub> zu NO<sub>3</sub><sup>-</sup> wird von nitrifizierenden Bakterien durchgeführt, wobei man 2 Gruppen unterscheidet. Eine Gruppe oxidiert Ammonium zu Nitrit, eine weitere Gruppe oxidiert Nitrit zu Nitrat. Nitrifizierende Bakterien sind chemolithotroph, und die meisten Vertreter sind in der Lage autotroph zu wachsen. Diese Gruppe ist weit verbreitet in Böden und im Wasser. Im marinen Milieu, insbesonders in küstennahen Sedimenten spielt, Nitrifikation eine große Rolle (Binnerup *et al.*, 1992; Koite & Hattori, 1978). Die meisten anorganischen Stickstoffkomponenten wie NH<sub>3</sub> und NO<sub>2</sub><sup>-</sup> werden aerob durch chemolithotrophe, nitrifizierende Bakterien oxidiert. Die komplette Oxidation von Ammonium zu Nitrat benötigt beide Gruppen. Die meisten Vertreter dieser Gruppe gehören zu den Alphaoder Betaproteobakterien und sind in der Lage, CO<sub>2</sub> zu fixieren.

#### Stickstoff-Fixierung

Gasförmiger  $N_2$  ist die stabilste Form des Stickstoffs und die Atmosphäre der Erde bildet das Hauptreservoir für Stickstoff. Nur eine kleine Anzahl von Prokaryoten ist in der Lage, in einem energieaufwändigen Prozess  $N_2$  zu fixieren und zu Ammoniak (NH<sub>3</sub>) zu reduzieren. Zu diesen Organismen gehören frei lebende aerobe (z.B. Cyanobakterien, methylotrophe Bakterien) und frei lebende anaerobe Bakterien (Deltaproteobakterien). Wegen ihrer Fähigkeit atmosphärischen  $N_2$  zu fixieren nehmen sie eine zentrale Stelle im Nährstoffkreislauf ein.

#### 1.1.4 Schwefelkreislauf/Schwefeltransformation

Ein großer Vorrat an für die Lebewesen relativ zugänglichen Schwefelverbindungen befindet sich im Meerwasser und in marinen Sedimenten in Form von gelöstem Sulfat. Bakterielle Sulfatreduktion ist sowohl für die anoxische Zone des Sediments, als auch für die Grenzschicht zwischen oxischem und anoxischem Milieu nachgewiesen worden (Jørgensen & Bak, 1991). Bis vor ca. 20 Jahren herrschte die Vorstellung, dass sulfatreduzierende Bakteren strikt anaerobe Organismen sind, die in der oxischen Schicht von Sedimenten nur in reduzierten Mikronischen überleben können (Jørgensen, 1977). In neueren Arbeiten konnte jedoch nachgewiesen werden, das Sulfatreduzierer, insbesondere *Desulfovibrio* Spezies, nicht nur sauerstofftolerant sind sondern auch aerob Energiegewinnung betreiben können (Cypionka, 2000). Sulfatreduzierende Bakterien (Deltaproteobakterien) spielen auch in bakteriellen Gemeinschaften in der Grenzschicht zwischen anoxischem und oxischem Milieu eine bedeutende Rolle. Als "Nebenprodukte" des anaeroben Wachstums bilden Sulfatreduzierer H<sub>2</sub>S und HCO<sup>-</sup><sub>3</sub>. H<sub>2</sub>S reagiert mit löslichen Metallionen und bildet unlösliches Metallsulfid (Brierley, 1990).

Im oxischen Bereich sind zusätzlich Sulfid- und Schwefeloxidation durch chemolithotrophe Bakterien und Redoxreaktionen organischer Schwefelverbindungen (DMSO/DMS) von Bedeutung. Dimethylsulfid (DMS) ist ein Abbauprodukt Dimethylsulfoniumpropionat das von (DMSP), ein Hauptosmoregulator in marinen Algen ist (Kirst, 1996). DMSP kann als C- und Energiequelle von Mikroorganismen genutzt und zu DMS und Acrylat abgebaut werden. Acrylat, ein Derivat der Fettsäure Propionat, kann wiederum als C-Quelle genutzt werden (Welsh, 2000). Eine Vielzahl von Bakterien wie Campylobacter, Escherichia und viele Purpurbakterien sind in der Lage DMSO (Dimethylsulfoxid) als Elektronenakzeptor zu nutzen.

7

#### **1.2** Anthropogene und abiotiosche Störungen

Das Intertidalsediment der Deutschen Nordseeküste ist je nach Tidenstand unterschiedlichen Einflüssen, wie z.B. unterschiedlicher Salinität, schwankenden Temperaturen und starker Durchmischung, ausgesetzt. Durch periodisches Trockenfallen der Sedimente sind die Gemeinschaften periodisch starkem Sonnenlicht mit entsprechendem UV-Anteil ausgesetzt. Zusätzlich sind sie verstärkt Umweltchemikalien ausgesetzt, die durch die Bewirtschaftung der Küstenregionen eingetragen werden. Eine Vielzahl anthropogen verursachter Störungen beeinflusst das Ökosystem Nordsee und die darin lebenden Organismen. Die Deutsche Nordsee wird z.B. durch Ölschlämme und hohe SO<sub>2</sub>-Emissionen aus der Seeschifffahrt belastet (Brenk, 2003). Weiterhin tragen Schadstoffeinträge durch Flüsse, Verklappung und Tourismus zur Belastung des Ökosystems Wattenmeer bei. Sollte noch der vom IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) innerhalb der nächsten 100 Jahre prognostizierte Anstieg des Meeresspiegels hinzukommen (IPCC, 2001), könnte die Tidendynamik in der Nordsee und insbesondere in der Deutschen Bucht beeinflusst werden (Weisse & Rosenthal, 2003). Vor allem eine mögliche Erhöhung des Tidenhubs an den Küsten könnte sich ungünstig auf die Erosions- und Sedimentationsraten in einigen Küstenabschnitten auswirken, was zu einem erhöhten Eintrag von Schadstoffen aus der Landwirtschaft und küstennaher Industrie führen könnte (Weisse & Rosenthal, 2003).

#### 1.2.1 UV-Strahlung als abiotischer Umweltfaktor

Das Sonnenlicht besitzt ein Breitbandspektrum, das sich aus kurzwelligen, energiereichem UV-Licht (100 - 380 nm), sichtbarem Licht (380 - 780 nm) und Infrarotlicht (> 780 nm) zusammensetzt. Von der infraroten Strahlung werden vor allem die Wellenlängen > 2000 nm von Wasserdampf und Kohlendioxid absorbiert (von Willert *et al.*, 1995). Die vollständige Absorption der UVC-Strahlung (< 280 nm) erfolgt schon in den obersten Atmosphärenschichten durch Stickoxide, molekularen Sauerstoff und Ozon (Foukal, 1990). Die UVB-Strahlung (280 – 320 nm) wird zum Großteil von der stratosphärischen Ozonschicht absorbiert, deren Absorptionsmaximum bei 260 nm liegt. Die vor einigen Jahrzehnten festgestellte Abnahme der Ozonschicht geht mit einer Zunahme der energiereichen, kurzwelligen UV-Strahlung auf der Erdoberfläche einher. Prognosen für die weitere Entwicklung der UV-Belastung bleiben jedoch schwierig, da in die Modellierungen viele, zum Teil unsichere Parameter einbezogen werden müssen. In Modellsimulationen wurden drei Szenarien für zukünftige Ozongehalte über Mitteleuropa analysiert (Reuder et al., 2001). Insgesamt wird davon ausgegangen, dass die Zunahme der UVB-Strahlung nicht mehr in dem selben Maß fortschreitet, wie in den letzten 30 Jahren. Jedoch bleibt das Auftreten von "Minihole"-Ereignissen, für die in einem nur wenige Tage andauernden Zeitraum die UVB-Bestrahlungsstärke typischerweise um etwa 40% erhöht ist, problematisch. Solche Ereignisse sind in Zukunft vor allem im Frühjahr zu erwarten (Reuder et al., 2001).

Sowohl UVA- als auch UVB-Strahlung können in aquatische Systeme eindringen. Wenn natürliches Gewässer UV-absorbierende Substanzen, wie gelöstes organisches Material (DOM = disolved organic matter) enthält, wird die Eindringtiefe der UV-Strahlung dadurch gemindert. In klares Meerwasser kann UVB-Strahlung einige 10 m tief eindringen. Im Gegensatz dazu wird UVB in trüben Flüssen und Feuchtgebieten bereits in den oberen Dezimetern absorbiert (Bornman & van der Leun, 1998). Je energiereicher das Licht ist, desto höher sind in der Regel die Schäden für Organismen. Neben der schädlichen Wirkung der UV-Strahlung auf Organismen, spaltet das UV-Licht auch das gelöste organische Material photolytisch (Kieber *et al.*, 1990). Einige dieser Photoprodukte können effizient vom Bakterioplankton aufgenommen werden und führen zu einer verstärkten bakteriellen Produktion (Lindell *et al.*, 1995; Reitner *et al.*, 1997), hingegen können andere Photoprodukte, wie freie Radikale, zu determinierenden Effekten der planktonischen Organismen führen (Zafiriou *et al.*, 1984).

#### Strategien zur Vermeidung und Minimierung UV-bedingter Effekte

Die Zellwand und/oder Zellmembran ist der äußere Schutz der Zelle, die mit ihrer Struktur eine erste Barriere gegen die UV-Srahlung bildet (Karentz *et al.*, 1994). Bakterien haben weitere Schutzmechanismen wie Pigmentierungen, Sporenbildung und enzymatische Entsorgung reaktiver Sauerstoffspezies entwickelt (Madigan *et al.*, 2000). Einige Bakterien produzieren Pigmente, die bei der Bestrahlung mit UV-Licht als Quencher fungieren.

Als Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies sind eine Vielzahl enzymatisch katalysierter und anderer Zellmechanismen bekannt. Beispielsweise übt die Superoxid-Dismutase (SOD) eine Schutzwirkung gegenüber Superoxidradikalen aus, indem sie  $O_2^-$  beseitigt, allerdings unter Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Madigan *et al.*, 2000). Durch das Enzym Katalase können sich die Zellen u.a. vor dem für sie toxischen Wasserstoffperoxid schützen. Peroxidasen sorgen für eine breite Schutzwirkung gegenüber vielen reaktiven Sauerstoffspezies (Elstner, 1990). Antioxidantien, wie beispielsweise Glutathion, können in der Zelle als Radikalfänger fungieren.

Treten trotz dieser Schutzmechanismen Schädigungen durch UV-Licht auf, gibt es in den Zellen eine Reihe verschiedener Mechanismen, durch welche die Schäden gegebenenfalls repariert werden können: 1. Photoenzymatische Reparatur (PER), 2. Nukleotid Exzisions Reparatur (NER) Dunkelreparatur, 3. = Rekombinationsreparartur (postreplikativ) (Joux et al., 1999). UV-Strahlung kann an der DNA zur Bildung von Cyclobutan Pyrimidin Dimeren (CPD), (6,4)-Pyrimidon (6,4PD) oder zu Dewar Photoisomeren führen (Jeffrey et al., 1996a). PER ist in die direkte Monomerisation von CPD durch die lichtabhängige (380-450 nm) Photolyase involviert (Sancar, 1994). Dieser Reparaturmechanismus nutzt geschickt aus, dass in der Natur UV-Licht nie ohne sichtbares Licht vorkommt (Balling et al., 1998). Im Gegensatz zur lichtabhängigen Reparatur wird bei der Exzisionsreparatur kein Licht benötigt, sie findet permanent in der Zelle statt. Trotzdem scheint die NER-Reparatur besonders nachts von Bedeutung zu sein (Jeffrey et al., 1996). Dabei werden Verzerrungen der DNA durch uvrABC-Endonuklease erkannt und repariert (Balling et al., 1998). Die Expression von uvrABC und anderen Genen (umuC, umuD, dinA-F, recA) wird auch in der sogenannten SOS Reparatur induziert. Allerdings handelt es sich hierbei um die Gesamtheit der zellulären Antwort auf DNA-Schäden, in der das Überleben der Zelle, notfalls auch mit Mutationen, im Vordergrund steht (Balling et al., 1998). Bei der postreplikativen Reparatur können durch rekombinativen Strangaustausch zwei halbintakte DNA-Kopien hergestellt werden. Dabei dient der jeweils intakte Strang als Matrize für den neu zu synthetisierenden komplementären Strang. RecA fungiert als Regulatorprotein, dass mindestens in den drei Dunkelreparatursystemen (Exzisionsreparatur, postreplikative rekombinante Reparatur, SOS Reparatur) involviert ist (Booth et al., 2000). Das

*rec*A Gen ist ein hoch konserviertes genetisches Element, welches universell in Eubakterien vorkommt (Miller, 2000).

Die Ausstattung der Spezies mit Reparaturmechanismen entscheidet über ihre Anpassungsfähigkeit an UV-Bestrahlung. Treten Mutationen auf, so entscheidet zusätzlich die Weitergabe der genetischen Information über die Anpassungsfähigkeit der Gemeinschaft.

#### **1.2.2** Schwermetallbelastung als abiotischer Faktor

Marine Sedimente der Küsten können als Lagerstätten für Schwermetalle, deren ökologische Konsequenzen wegen der hohen Verweildauer und Toxizität der Metalle beträchtlich sein können, angesehen werden (Bryan & Langson, 1992; Chapman et al., 1998). Dabei haben nur bioverfügbare Schwermetalle einen signifikanten Einfluss auf Organismen (Dell'Anno et al., 2003). Die Bedeutung der Bakterien in marinen Sedimenten liegt in ihrer Schlüsselrolle bei der Wiederaufbereitung anorganischer Nährstoffe, in der frühen Diagenese des organischen Materials und im Energie- und Materialtransfer auf höhere trophische Ebenen (Osinga et al., 1996; Fabiano & Danovaro, 1998). Die südöstliche Nordsee, inklusive der Deutschen Bucht, gehört zu den Gebieten mit erhöhten Schwermetallkonzentrationen (Haarich & Schmidt, 1993). Die Cadmiumkonzentration in der Feinkornfraktion ( $\leq 20 \ \mu m$ ) der oberen 2 cm der Sedimentschicht lagen 1998 - 2001 in der Deutschen Bucht größtenteils bei 0,6 bis 3 mg/kg (Umweltbundesamt, 2003). In ihrer Funktion als europäische Organisation zum Schutz der marinen Umwelt des Nord-Ost-Atlantik legte die OSPAR Kommission im Jahr 2000 einen Statusbericht über den Zustand des Überwachungsgebietes vor (OSPAR, 2000). Neben Quecksilber ist auch für Cadmium, Zink und Silber die Deutsche Bucht ein Belastungsschwerpunkt. An den meisten Mess-Stationen in der Deutschen Bucht scheint die Cadmiumkonzentration erratisch zu variieren (Albrecht & Schmolke, 2000). Vielfältige Auswirkungen von Cadmium sowohl auf eukaryotische als auch auf prokaryotische Mikroorganismen sind bekannt: Störungen auf chromosomaler Ebene (Mitra & Bernstein, 1978), Veränderung der Enzymaktivität (Pickett et al., 1976), Inhibierung der Proteinsynthese (Kremer & Markham, 1982), Verringerung des NADPH-Pools (De Filippis *et al.*, 1981) und Vakuolenbildung in der Zelle (Mitra & Bernstein, 1977). Mikroorganismen sind in der Lage diesen Prozessen durch Immobilisieren, Mobilisieren oder Transformieren der Metalle, durch extrazelluläre Präzipitation, intrazelluläre Akkumulation, Redoxreaktionen, Methylation/Demethylationen und extrazelluläre Bindung und Komplexbildung entgegen zu wirken (Brierley, 1990).

#### Strategien zur Vermeidung und Minimierung Cd(II)-bedingter Effekte

drei verschiedene bakterielle Detoxifikationsmechanismen Bislang wurden beschrieben: 1. ATP-abhängige Effluxpumpen in Bacillus (Ivey et al., 1992), Listeria (Lebrun et al., 1994) und Staphylococcus (Crupper et al., 1999; Silver & Phung, 1996), 2. Chemiosmotische Kationen-Protonen Antiporter in gramnegativen Bodenbakterien (Anton et al., 1999) und 3. Metallbindeproteine, die Thiolatliganden besitzen (Hamer, 1986). Ein bekanntes und gut untersuchtes Resistenzsystem ist das plasmidkodierte cad Operon in Staphylococcus aureus (Nucifora et al., 1989). CadA katalysiert den ATP-abhängigen Efflux durch Cd<sup>2+</sup> aus dem Zellzytosol, indem durch einen elektroneutralen Austausch ein Cadmiumion aus der Zelle transportiert wird, während zwei Protonen akkumulieren (Nucifora et al., 1989; Tsai et al., 1992). Dieses Resistenzoperon wird hauptsächlich von Cd(II) induziert (Yoon & Silver, 1991). In dem zur phylogenetischen Gruppe der Betaproteobakterien gehörenden Bakterium Alcaligenes eutrophus wurde ein plasmidkodiertes Schwermetallresistenzoperon gefunden (*czc*) welches Resistenzen für  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  und Cd<sup>2+</sup> kodiert (Nies et al., 1987; Nies, 1992). Das czc-Operon kodiert fünf Polypeptide, die für die Ausbildung des membrangebundenen Kationen-Efflux Protein-Komplex CzcABC verantwortlich sind (Nies, 1992). Wenn diese Metalle über das Magnesiumaufnahmesystem in die Zelle eindringen (Nies & Silver, 1989b), wird die Transkription von *cdz* induziert und Cd<sup>2+</sup> wird aktiv ausgeschleust (Nies & Silver, 1989a). Eine Familie der löslichen Metallbindeproteine sind Metallochaperone (O'Halloran et al., 2000), welche in der Lage sind, toxische Metalle zu binden (Vallee, 1987) und somit als eine Art "Schwamm" fungieren.

#### 1.3 Kombinationswirkungen

Der Eingriff des Menschen in die globalen Kreisläufe ist mit Auswirkungen auf diverse Ökosysteme verbunden. Durch die zunehmende anthropogen verursachte Schadstoffbelastung ist es notwendig, den Einfluss von Noxen auf die belebte Natur zu untersuchen. Dabei tragen hauptsächlich drei Eigenschaften zur kritischen Bewertung von Noxen bei: 1. biologische Wirksamkeit mit entsprechender Toxizität, 2. hohe Persistenz in der Umwelt und 3. hohes Potential zur Bioakkumulation und Anreicherung in der Nahrungskette (Fent, 2003). Die meisten ökotoxikologischen Standardtests befassen sich mit dem Einfluss einer Noxe auf bestimmte Organsimen. Das Ziel dieser Lang- oder Kurzzeittests ist, das Gefahrenpotential für Ökosystem und Mensch abzuschätzen bzw. vorherzusagen. In der Natur tritt aber in den seltesten Fällen nur eine Noxe oder ein Organismus auf. In der Regel sind Organismengemeinschaften einer Vielzahl unterschiedlicher Noxen ausgesetzt. Idealerweise sollten sich die Vorhersagen und Beurteilungen der Toxizität von Noxenkombinationen auf detaillierte Kenntnisse der Aufnahme, Verteilung und Elimination sowie der molekularen Wirkmechanismen und der Wirkungsweisen von Mischungskomponenten in den untersuchten Organismen stützen (Grimme et al., 1998). Darüber hinaus sollte vor allem auch das Wirkungsnetz auf der Ebene des Ökosystems berücksichtigt werden. Derartige Kenntnisse sind für die meisten Umweltnoxen nicht vorhanden. Die biologische Wirkung einer Umweltnoxe kann durch die Anwesenheit einer oder mehrerer Substanzen in qualitativer oder quantitativer Weise verändert werden. Eine klassische Vorgehensweise in der Toxikologie bei der Einschätzung der Toxizität von Noxen ist die Ermittlung von Konzentrations- und Dosis-Wirkungsbeziehungen. Dabei wird die biologische Reaktion als Funktion der einwirkenden Stoffmenge/Dosis betrachtet, während alle anderen Einflussgrößen konstant gehalten werden (Grimme et al., 1998).

#### 1.3.1 Vorstellung der Konzepte

#### **Effekt-Summation**

Im Zusammenhang mit Kombinationswirkungen wird häufig davon gesprochen, dass Effekte von Kombinationen größer oder geringer sind als die Summe der Einzeleffekte. Der Nachteil ist, dass bei der Kombination mehrerer Stoffe rein rechnerisch summierte Effekte von > 100 % entstehen (Grimme *et al.*, 1998). Deshalb wird den im Folgenden vorgestellten Konzepten der Vorzug gegeben.

#### Konzentrations-Addidivität (CA)

In allgemeiner Formulierung bezeichnet Konzentrations-Additivität das Phänomen, daß sich eine Substanz in Bezug auf den untersuchten Wirkungsparameter wie die Verdünnung einer anderen verhält. CA ist ein geeignetes Konzept für die Prognose der Mischungstoxizität von Stoffen mit ähnlicher Wirkung (Altenburger *et al.*, 1996). Die Konzentrations-Additivität für ein binäres Gemisch berechnet sich nach

folgender Formel:  $\frac{c_{SI}}{(EC_x SI)} + \frac{c_{S2}}{(EC_x S2)} = 1$ 

c bezeichnet die Konzentrationen der Substanzen S1 und S2, E die betrachteten Effekte und  $EC_x$  die Konzentration, die erforderlich sind, um einen bestimmten Effekt x hervorzurufen (Grimme *et al.*, 1998).

#### Unabhängige Wirkung (IA)

Im Gegensatz zur Konzentrations-Additivität geht das Konzept der unabhängigen Wirkung (IA) von der Annahme einer unähnlichen Wirkung der Substanzen in einem Gemisch aus. Unähnlich meint die primäre Interaktion mit unterschiedlichen Wirkorten und die Auslösung eines gemeinsamen Effekts über unterschiedliche Wirkketten (Grimme *et al.*, 1989). Die unabhängige Wirkung für ein binäres Gemisch berechnet sich nach folgender Formel:

$$E(c_{SI}+c_{S2})=E(c_{SI})+E(c_{S2})-E(c_{SI})*E(c_{S2})$$

c bezeichnet die Konzentrationen der Substanzen S1 und S2, E die betrachteten Effekte und  $EC_x$  die Konzentrationen, die erforderlich sind, um einen bestimmten Effekt x hervorzurufen (Grimme *et al.*, 1989).

#### **1.4 Ziel der Arbeit**

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, den Einfluss von polychromatischem Licht und Cadmium auf mikrobielle Gemeinschaften des Wattenmeeres zu analysieren und eine eventuelle Verschiebung der Struktur dieser Gemeinschaft zu erfassen. Der Effekt sollte sowohl einzeln als auch in Kombination erfasst werden. Es wurden daher parallel Aspekte der Stoffwechselaktivität und Struktur der Gemeinschaften sowie taxonomische Eigenschaften bakterieller Isolate aus den Kulturen betrachtet und es wurde versucht, die Ergebnisse miteinander zu verknüpfen.

Als Kulturform wurde die kontrollierte Batchkultur im Fermenter gewählt. Um die gewünschten "Umweltbedingungen" im Fermenter gezielt einzustellen, wurden die Gemeinschaften in Seewasserbouillon-X2 (Acetat, Pyruvat und Casaminoacids) in einem Fermenter 10 Tage kultiviert. Die Kulturen wurden mit konstantem pH-Wert, konstanter Durchmischungsverhältnis Temperatur, und geregelten Sauerstoffbedingungen (pO<sub>2</sub> $\ge$  80 %) im Dunkeln kultiviert. Die unbelastete Dunkelkontrolle wurde als Referenz für das Verhalten der Gemeinschaft in diesem System verwendet. Der Einfluss von polychromatischem Licht mit variierendem UVB-Anteil wurde ebenso wie der Einfluss von Cadmiumactetat [0,05 mM] einzeln untersucht. Im Anschluß daran wurden zwei Kombinationen dieser Noxen gewählt, in denen die Cadmiumkonzentration konstant blieb und die Bestrahlungsdosis variierte.

# 2 Material

## 2.1 Geräte

Spezielle in dieser Arbeit verwendete Geräte sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tab. 2.1:	Geräte	und	Mater	ialien

Arbeitsschritt	Gerät/Material	Hersteller	Bezeichnung
Allgemein	Atom-Absorptions-	Varian	Spectr AA
	Spektrometer (AAS)		
	Digitalkamera	Olympus Deutschland	Camedia C-4000 Zoom
	Feinwaage	Sartorius	Sartorius 2472
	Filtrationseinheit	Sartorius	S19 16510
	pH-Meter	WTW	Microprocessor pH 539
		Metrohm	pH-Meter E588
	Photometer	Pharmacia	UV visible Spectrometer
	Polarisationsfilter	Hama	ROWI Polarizing 49 mm
	Reinstwasseranlage	ELGA LabWater	Elgastat <sup>®</sup> UHQPS
	Spektralradiometer	TriOS	Ramses MMS 003794
			Ramses MMS 300414
	Sterilfilter	Sartorius	Cellulose Nitrat Filter, 0,2 µm
	Thermocycler	Biometra	Tgradient
Elektrophorese	DGGE-Anlage	INGENY International	INGENYphorU-2
	Elektrophoresekammer	Amersham Pharmacia	Hoefer HE33
		Biotech	
	Power Supply	PEQLAB Biotechnologie	Consort E143
		Amersham Pharmacia	EPS 300
		Biotech	
Fermentation	Durchflussmessgerät	Bronkhorst	Massflowmeter (0-500 ml/min)
	Bioreaktoren	Braun Biotech	Biostat S 51 bzw. 101
		Infors	Labfors HT 7,5 l
	Gasanalytik	GLPmbH	SONOS
	Kühlung	Julabo Labortechnik	Julabo FE 1800
	Leuchtstoffröhren	PHLILIPS	Typ TL 29 D 16/09N
		New Technology	Independence SR plus
	Luftfilter	Sartorius	Millipore SA
	Mess- und Regelsystem	Infors	Labfors HT
	Netzgerät für Leucht-	Elektronikwerkstatt der	500 mA

Arbeitsschritt	Gerät/Material	Hersteller	Bezeichnung
Fermentation	stoffröhren	Universität Oldenburg	
	pH-Elektrode	Mettler-Toledo	405-DPAS SC
	pO <sub>2</sub> -Elektrode	Mettler-Toledo	Sauerstoffsensor
	Quarzrohr	Glaswerkstatt der	
		Universität Oldenburg	
FISH	Fluoreszenzmikroskop	Zeiss	Axioskop HBO50
	Feuchte Kammer	Greiner Bio-One	50 ml Röhrchen
	Hybridisierungsofen	Biometra	OV3
	Objektträger	OMNILAB	Diagnostika-OT 8KA. Epoxy
	Sonifizierer	Branson	Sonifier 5210
	Mech. Handzähler	Westfalia®	Upgreen Counter

### 2.2 Chemikalien

Wenn möglich wurden alle Chemikalien mit höchstem Reinheitsgrad (p.a.) verwendet. Eine Auflistung der in der Arbeit verwendeten Chemikalien, Substanzen und Gase ist in Tabelle 2.2 dargestellt.

Chemikalien/ Substanzen/ Gase	Hersteller
Agar Agar	Fluka
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth
4-Aminobenzoat	Merck
Ammoniumchlorid	Roth
Ammoniumpersulfat	Roth
Bacto-Pepton	Difco
Borsäure	Janssen Chimica
Bovine Serume Albumine [20 mg/ml]	Fermentas
Calciumchlorid Dihydrat	Riedel-de-Haën
Casaminoacids (vitamine free)	Difco
Cobaltchlorid Hexahydrat	Merck
Cyanobalamin	Merck
d-Biotin	Biomol
4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid	Sigma

Chemikalien/ Substanzen/ Gase	Hersteller
1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan	Sigma
Didesoxynukleotide (dNTPs)	Fermentas
Eisenchlorid Tetrahydrat	Fluka
Eisensulfat Heptahydrat	ohne Angabe
Fleischextrakt trocken	Merck
Enhancer für PCR	OMNI Life Science
Essigsäure (Eisessig)	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure-Tetranatriumsalz	Roth
Ethanol absolut	Roth
Ethidiumbromid	Fluka
Formamid	Fluka
Gelatine	Riedel-de-Haën
Glycerin	Roth
Harnstoff	Roth
Hefeextrakt	Difco
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumchrom(III)-sulfat	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Loading Dye 6x Solution	Fermentas
Magnesiumchlorid [100 mM] für PCR	OMNI Life Science
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Roth
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Riedel-de-Haën
Manganchlorid Tetrahydrat	Merck
Methanol	Roth
Natriumacetat, wasserfrei	Roth
Natriumchlorid	Riedel-de-Haën
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Bernd Kraft
di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat	Merck
Natriumhydroxid, Plätzchen	Riedel-de-Haën
Natrium-DL-Lactat-Lösung	Fluka
Natriummolybdat Dihydrat	Merck
Natriumnitrat	J.T. Baker
Natriumnitrit	J.T. Baker
Natriumpolyphosphat (Grahamsches Salz)	Merck
Natriumpyruvat	Fluka
Natriumsulfat	Roth
Nickelchlorid Hexahydrat	Merck
Nicotinsäure	Merck
Panthothenat	Aldrich

Chemikalien/ Substanzen	Hersteller
Pyridoxamindihydrochlorid	Merck
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 40	Roth
Salzsäure, 37 %	Riedel-de-Haën
Stickstoff	Messer Griesheim
SYBR <sup>®</sup> -Gold	MobiTec
Synthetische Luft	Messer Griesheim
TEMED	Roth
Thiamindichlorid	Merck
Tris-(hydroxamethyl-)- aminomethan (Base)	Roth
Tris-(hydroxymethyl-) aminomethanhydrochlorid	Fluka
Tween 80	Fluka
Zinkchlorid	Merck

### 2.3 Enzyme und Testkits

Die in der Arbeit verwendeten Enzyme und Testkits sind in Tabelle 2.3 aufgelistet.

Enzym/ Kit	Hersteller
EcoPlate <sup>™</sup>	OXOID
E.Z.N.A Cycle-Pure Kit	PEQLAB Biotechnologie
Moltaq-Polymerase	OMNI Life Science
NucleoSpin Food Kit	Macherey-Nagel
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche
Pfu DNA Polymerase	Promega
Proteinase K	OMNI Life Science

Tab. 2.3: Enzyme und Testkits

### 2.4 Kulturmedien

Alle Medien für Flüssigkulturen werden bei 121 °C und 1,2 bar 20 Minuten autoklaviert. Für Medien, die mehrere separat sterilisierte Komponenten enthalten, werden nach dem Abkühlen der Lösungen die entsprechenden Komponenten vereint.

Die Glasgeräte werden 4 h bei 180 °C mit Heißluft sterilisiert.

Seewasserbouillon-X2 (SWB-X2)	
Na-Pyruvat	0,5 g
Na-Acetat	2,08 g
Casaminoacids (vitamine free)	0,5 g
VE-Wasser (vollentsalztes Wasser)	780 ml
Nach dem Autoklavieren werden folgende Rea	agenzien hinzugegeben:
Artifizielles Seewasser nach Levring [4-fach]	190 ml
Vitaminlösung	3 ml
Spurenelementlösung	1 ml
NaNO <sub>3</sub> [2,14 M]	8 ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O [0,1 M]	3 ml
NaOH [0,1 mol/l]	3 ml
NH <sub>4</sub> Cl [2,3 M]	8 ml
pH-Wert: 7,2 - 7,4	

Zur Herstellung von festen Nährmedien werden pro Liter 20 g Agar Agar hinzugefügt.

Artifizielles Seewasser nach Levring (Levring, 1946) 30 ‰ Salinität [4-fach konzentriert]

NaCl	94,40 g
KCl	2,56 g
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	18,12 g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	23,76 g
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	5,19 g

Die Salze werden in 800 ml VE-Wasser gelöst. CaCl<sub>2</sub>, wird separat in 100 ml gelöst und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen werden beide Lösungen vereinigt und auf 1000 ml mit sterilem VE-Wasser aufgefüllt.

Seewasser nach Grasshoff (Grasshoff, 1983)

NaCl	32 g
$Mg_2SO_4$	14 g

Die Salze werden in 800 ml VE-Wasser autoklaviert, nach dem Abkühlen wird 1 ml NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. (1,92 g/50 ml) zugegeben und die Lösung auf 1000 ml auffüllen. pH-Wert: 7,2 - 7,5

#### Spurenelementelösung nach DSMZ-Katalog (2001), Medium Nr. 124

FeCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	1,5 g
ZnCl <sub>2</sub>	68 mg
MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	100 mg
CoCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	120 mg
NiCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	24 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	24 mg

In 1000 ml VE-Wasser auflösen und anschließend autoklavieren.

#### Vitamin-Stammlösung nach Schlegel (1992)

Biotin	0,5 mg
Nikotinsäure	5 mg
Thiamin	2,5 mg
4-Aminobenzoat	2,5 mg
Pantothenat	1,25 mg
Pyricloxacuin	12,5 mg
Cyanocobalamin	5 mg
VE-Wasser	250 ml
Staniliziant wind dwash Filtration (Soutaning, 0.7	1

Sterilisiert wird durch Filtration (Sartorius: 0,2 µm)

#### Medien für die Lebendzellzahlbestimmung

Denitrifizierende Bakterien (DNB)	
Pepton	1,5 g
Fleischextrakt	0,9 g
NaNO <sub>2</sub>	0,24 g
VE-Wasser	225 ml

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen werden folgende Lösungen steril hinzugegeben:

Artifizielles Seewasser nach Levring [4-fach]	/5 ml
NaHCO <sub>3</sub> [0,5 M]	0,7 ml
n H Wart: 7.2 7.1	

pH-Wert: 7,3 – 7,4

Anschließend wird das Medium in sterile Reagenzgläser mit Schraubdeckelkappen und Durhamröhrchen luftblasenfrei abgefüllt.

Surfar cauzier chae Danier ich (SID)
--------------------------------------

Hefeextrakt	0,4 g
Na-Lactat-Lsg. [50% in H <sub>2</sub> O]	3,2 ml
NH <sub>4</sub> Cl	0,2 g
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,07 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,4 g
VE-Wasser	300 ml

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen werden folgende Lösungen steril hinzugegeben:

Artifizielles Seewasser nach Levring [4-fach]	100 ml
NaHCO <sub>3</sub> [0,5 M]	1 ml
KOH [1%]	1,45 ml
pH-Wert: 7,3 - 7,4	

Anschließend wird das Medium in sterile Reagenzgläser mit Schraubdeckelkappen und Durhamröhrchen luftblasenfrei abgefüllt.

Methanol-konsumierende Bakterien (MKB)

736,9 ml
,

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen werden folgende Lösungen steril hinzugegeben:

Artifizielles Seewasser nach Levring [4-fach] 250,5 ml

Vitaminlösung	3,18 ml
Spurenelemente	1,06 ml
NH <sub>4</sub> Cl [2,3 M]	2,75 ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> [0,1 M]	2,75 ml
NaHCO <sub>3</sub> [0,5 M]	2,96 ml
pH-Wert: 7.2 - 7.4	

Anschließend werden jeweils 10 ml Medium in sterile Reagenzgläser überführt. Nach Inoculumzugabe wird in jedes Röhrchen 0,1 ml Methanol steril hinzugegeben.

Sonifiziermedium	
$Na_2HPO_4 \ge 2H_2O$	0,16 g
Tween 80	0,40 g
VE-Wasser	300 ml

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen werden 100 ml artifizielles Seewasser nach Levring [4-fach] steril hinzugegeben

# 2.5 Puffer und Lösungen

### 2.5.1 Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)

Waschpuffer mit	35 %	20 % Formamid
Tris/HCl [1 M]	10 ml	10 ml
SDS [1 %]	5 ml	5 ml
NaCl [5 M]	8 ml	24 ml

Abschließend wird der Puffer auf 500 ml ddH<sub>2</sub>O (doppelt deionisiertes Wasser) aufgefülltn und autoklaviert.

35 %	20 %
175 µl	100 µl
90 µl	90 µl
10 µl	10 µl
5 µl	5 µl
220 µl	295 µl
	<b>35 %</b> 175 μl 90 μl 10 μl 5 μl 220 μl

### DAPI/DAPCO

DAPI	
4', 6'-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	1 µg
ddH <sub>2</sub> O	1 ml
DAPCO1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan25 mgPBS-Puffer1 mlGlycerin9 mlDie Lösung wird dunkel im Külschrank aufbewahrt.

Die Losung wird dunker im Kulschrank autoewann.

PBS-Puffer (,,Phosphate Buffered Saline")	
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1,8 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g
Mit ddH <sub>2</sub> O auf 1000 ml auffüllen	
pH-Wert: 7,4	

Für die Färbung wird jeweils eine frisch angesetzte 1:1 DAPI/DAPCO Mischung verwendet.

## 2.5.2 Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)

50 x Tris-Acetat-Puffer (TAE)	
Tris (Base)	242,2 g
EDTA	18,6 g
Die Lösung wird auf 1000 ml mit ddH <sub>2</sub> O aufg	gefüllt. Die pH-Wert Einstellung erfolgt
mit Eisessig auf pH 7,4.	

Stammlösung A [0 % - Denaturierungslösung]				
50 x TAE [pH 7,4]	3 ml			
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 40	22,5 ml			
Die Lösung wird mit ddH2O auf 150 ml aufgef	üllt.			

## Stammlösung B [80 % - Denaturierungslösung]

50 x TAE [pH 7,4]	3,0 ml
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 40	22,5 ml
Harnstoff	50,4 g
Formamid	48 ml

Die Lösung wird mit ddH2O auf 150 ml aufgefüllt.

## 2.5.3 Substratverwertungsspektrum

Natriumpolyphosphat-Stammlösung (NaPP-Lösung)				
NaPP	2 g			
ddH <sub>2</sub> O	10 ml			
Nach dem Autoklavieren und Abkühlen wird	eine 0,2 % NaPP-Lösung hergestellt.			

## 0,2% NaPP-Lösung

NaPP-Stammlösung	1 ml
Seewasser nach Grasshoff	99 ml

# 2.6 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten cy3 markierten Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Electron bezogen, die Oligonukleotide für die PCR von MWG (Tab. 2.4).

|--|

Name	Sequenz $5' \rightarrow 3'$	Methode	$T_{m}$	Target	rRNA-	Referenz	Spezifität
			[°C]	[rRNA]	Position*		
ALF1bc	CGT TCG CTC TGA GCC AG	FISH	51,9	16S	19-35	Manz et al., 1992	Alphaproteobakterien, einige Deltaproteobakterien,
ALF1bt	CGT TCG TTC TGA GCC AG	FISH	49,7	16S	19-35		Spirochaetes
ARCH915	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	FISH	61,8	16S	915-93	Stahl et al., 1991	Archaea
BET42a	GCC TTC CCA CTT CGT TT	FISH	47,4	23S	1027-1043	Manz et al., 1992	Betaproteobakterien
BET42a-C	GCC TTC CCA CAT CGT TT	FISH	47,4	23S			
EUB338	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	FISH	51,5	16S	338-35	Amann et al., 1999	meisten Eubakterien
EUK516	ACC AGA CTT GCC CTC C	FISH	43,9	18S	502-517	Amann et al., 1990	Eukaryoten
GAM42a	GCC TTC CCA CAT CGT TT	FISH	47,5	23S	1027-1043	Manz et al., 1992	Gammaproteobakterien
GAM42a-C	GCC TTC CCA CTT CGT TT	FISH	43,5	238			
SRB385	CGG CGT CCC TGC GTC AGG	FISH	59,1	16S	385-402	Amann et al.,1990	Deltaproteobakterien, Grampositive Bakterien
HGC69a	TAT AGT TAC CAC CGC CGT	FISH	48,3	238	1901-1918	Roller et al., 1994	Actinobakterien
CF319a	TGG TCC GTG TCT CAG TAC	FISH	42,2	16S	319-336	Manz et al., 1996	Cytophaga-Flavobakterien Gruppe
907r	CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT	PCR	53,2	16S	907	Muyzer et al., 1995	Eubakterien
341f	CCT ACG GGA GGC AGC AG	PCR	60,0	16S	341	Muyzer et al., 1995	Eubakterien
(GC)341f	(CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC	PCR	>75	16S	341	Muyzer et al., 1995	Eubakterien
	GGC CCG CCC CCG CCC C)CCT ACG	GGA GGC A	AGC A	AG			

### 2.7 Bakterienstämme

Für die Kontrolle der Hybridisierungssonden werden folgende Testorganismen verwendet:

Phyla	Bezeichnung	DSMZ-Nr.
Gammaproteobakterien	Alcanivorax jadensis T9 <sup>T</sup>	$12178^{T}$
Grampositive Bakterien mit hohem	Dietzia maris	43672 <sup>T</sup>
GC-Gehalt		
Cytophaga-Flavobakterien Gruppe	Muricauda ruestringensis B1	13258 <sup>T</sup>
Betaproteobakterien	Alcaligenes eutrophus	1105
Deltaproteobakterien	Desulfovibrio cuneatus	11391 <sup>T</sup>
Alphaproteobakterien	Isolat 12.15.70	
Eukraryoten	Saccharomyces cerevisiae	70449 <sup>T</sup>

## 2.8 Größenstandards für die Elektrophorese

Um die Größe und Konzentration von aufgetrennten DNA-Fragmenten in Agarosegelen zu bestimmen, werden folgende DNA-Größenstandards eingesetzt:

MassRuler<sup>TM</sup> DNA Ladder, Low Range, ready-to-use (Fermentas GmbH): 1031 bp/200 ng 20  $\mu$ l<sup>-1</sup>, 900 bp/180 ng 20  $\mu$ l<sup>-1</sup>, 800 bp/160 ng 20  $\mu$ l<sup>-1</sup>, 700 bp/140 ng 20  $\mu$ l<sup>-1</sup>, 600 bp/120 ng 20  $\mu$ l<sup>-1</sup>, 500 bp/200 ng 20  $\mu$ l<sup>-1</sup>, 400 bp/80 ng 20  $\mu$ l<sup>-1</sup>, 300 bp/60 ng 20  $\mu$ l<sup>-1</sup>, 200 bp/40 ng 20  $\mu$ l<sup>-1</sup>, 100 bp/20 ng 20  $\mu$ l<sup>-1</sup>, 80 bp/16 ng 20  $\mu$ l<sup>-1</sup> (Abb. 2.1).

GeneRuler<sup>™</sup> 1 kb DNA Ladder (Fermentas GmbH): 10 kb, 8 kb, 6 kb, 5 kb, 4 kb, 3,5 kb, 3 kb, 2,5 kb, 2 kb, 1,5 kb, 1 kb, 750 bp, 500 bp, 250 bp (Abb. 2.1).



**Abb. 2.1:** Größenstandards für Gelelektrophoresen. **(A)** MassRuler<sup>™</sup> DNA Ladder, Low Range, ready-to-use (Fermentas GmbH); **(B)** GeneRuler<sup>™</sup> 1 kb DNA Ladder (Fermentas GmbH)

## 2.9 Computersoftware, Internetanwendungen und Datenbanken

Alle in dieser Arbeit verwendeten Computerprogramme und Internetanwendungen sind in Tabelle 2.6 aufgelistet.

Tab. 2.5: Computersoftware, Datenbanken und Internetanwendungen

Programm	Anwendung	Referenz
Basic Local Alignment	Nukleotidsequenz Datenbankver-	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
Search Tool (BLAST)	gleiche	
BioEdit Version 5.0.9	Bearbeitung von Nukleotid-	http://www.molbiol.bbsrc.ac.uk/
	Sequenzen	reviews/bioedit_review.html
Canoco Version 4.5	Multivarianz Analyse	Plant Research International
	Ökologischer Daten	
LabImage Version 3.0	Gelauswertungsprogramm	Kapelan
MVSP Version 3.13	Clusteranalyse, Diversitätsindizes	Kovach Computing System
NCBI Genbank	Sequenzdatenbank	http://www.ncbi.nih.gov/
Photoshop Version 7.0	Bildbearbeitung	Adobe
ProbeBase	Suchmaschine targetspezifischer	http:/www.microbial-ecology.net/
	Oligonukleotide	probebase
SigmaPlot Version 9.0	Erstellung graphischer	SPSS
	Auswertung	
SigmaStat Version 2.03	Statistik Software	SPSS

## 3 Methoden

#### 3.1 Probennahme und Probennahmeort

Sedimentproben aus der oxischen Schicht des Wattsediments der Deutschen Nordseeküste (Dangast, Jadebusen) wurden im Frühjahr 2004 bei Niedrigwasser entnommen, anschließend homogenisiert und zu Aliquots von je 35 g bei –20 °C in sterilen Petrischalen eingefroren. Die Korngrößenuntersuchung (Bielefeld, 2005) klassifizierte das verwendete Wattsediment als schluffigen Sand (Schachtschabel *et al.*, 1998).

#### 3.2 Auswahl der Noxen

#### 3.2.1 Auswahl geeigneter Strahlungsquellen

Für die Bestrahlungsversuche wurden zwei verschiedene Leuchtstofflampen, die polychromatisches Licht emittieren ausgewählt (Typ TL 29 D 16/09N und Starter Philips Typ S2 = polychromatisches Licht 1 [15 W] und UV-Röhre Independence SR plus = polychromatisches Licht 2 [25 W]). Die Lampen besitzen ein breitbandiges Spektrum, das sowohl Anteile im ultravioletten als auch im sichtbaren Spektralbereich hat. Aus früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe war bereits bekannt, dass das Spektrum des polychromatischen Lichts 1 (Lampe vom Typ TL) dem Sonnenlicht in Orlando, Florida bei einem Zenith von 20 °C und klarem Himmel entspricht (Daniel, 1995). Die spektrale Bestrahlungsstärke des UV-Bereichs (280 – 400 nm) der verwendeten Lampen wurde an der Universität Oldenburg (Arbeitsgruppe Meeresphysik) mittels UV/VIS Spektralradiometer (MMS 300414; TriOS) und UV-Spektralradiometer (MMS 003794; TriOS) ermittelt. Nach Integration der gemessenen Bestrahlungsstärke hat eine Lampe, die p.L.1 [15 W] emitiert (Typ TL), bei einer Distanz von 10 cm einen UVB-Anteil von 2,8 W m<sup>-2</sup> und einen UVA-Anteil von 90,4 W m<sup>-2</sup>. Die Lampe, die p.L.2 [25 W] (Typ SR) emittiert, hat einen UVB-Anteil von 3,34 W m<sup>-2</sup> und einen UVA-Anteil von 60,99 W m<sup>-2</sup>. Diese gemessenen UV-Bestrahlungsstärken wurden mit der Mittagssonne (UVB-Anteil von

1,068 W m<sup>-2</sup> und UVA-Anteil von 47,69 W m<sup>-1</sup>) im August 2004 an der Norddeutschen Küste verglichen (Medizinische Klimatologie, Westerland, Sylt, Deutschland) (Abb. 3.1).



Abb. 3.1: Integrierte Bestrahlungsstärke der verwendeten Lampen und im Freiland (Sylt, August 2004). (A) UVB-Bereich (280 – 320 nm); (B) UVA-Bereich (320 - 400 nm) der verwendeten Lampen Typ TL und Typ SR; (C) UV-Bereich (280 - 400 nm) über den Tagesverlauf am 02.08.2004 (sonnigster Tag) auf Sylt

Es wurde versucht, eine Abschätzung der theoretisch auf die Bakteriengemeinschaft einwirkenden Strahlungsdosis in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit (12 h/d), des Fermentervolumens und der Transmissionseigenschaften des Mediums zu treffen (Tabelle 3.1). Im verwendeten Versuchsansatz muss der Lichtstrahl zunächst die Quarzglashülle und anschließend den mit Medium gefüllten Raum passieren. Jedoch ist bekannt, dass es zu einem hohen Gesamtverlust der Strahlungsstärke in der Flüssigkeit kommt, diese Verluste werden nach dem Lambert-Beer Gesetz beschrieben:

$$T = 10^{-E} * 100 = e^{-\alpha} * 100$$
 [%]

T = Transmission; E = Extinktion;  $\alpha$  = Absorptionskoeffizient

Die Trübung, die u.a. auf Lichtbrechung an Partikeln im Medium basiert, hat ebenfalls einen Einfluß auf die Strahlungsdosis (Abb. 3.2). Als Partikel wird jedes dreidimensionale Gebilde definiert, das einen anderen Brechungsindex als das Trägermedium hat. Deshalb zählen neben Feststoffen, auch Fett-Protein-Komplexe und Luftblasen zu diesen Partikeln. Die in Abbildung 3.2 gezeigten partikelbedingten Effekte bei der UV-Desinfektion von Abwasser sind nur schwer voneinander trennbar und nur mit hohem Stichprobenaufwand einzeln zu quantifizieren (Nelle, 1994). Daher wurden diese bei der Berechnung der theoretischen Dosis nicht berücksichtigt.



**Abb. 3.2:** Einfluss gelöster und ungelöster Wasserinhaltsstoffe auf die UV-Desinfektion von Abwasser (Nelle, 1994).

Die Berechnung der mittleren Bestrahlungsstärken sowie der mittleren Srahlungsdosis erfolgte nach folgender Formel (Nelle, 1994):

$$I_{mittel} = \frac{\frac{T_{QR} * S}{100}}{(\Pi * (r_a + r_i) * 1)} * T_W - \frac{\frac{1}{100}}{(\ln \frac{T_W}{100})} \quad [mW \text{ cm}^{-2}]$$

 $I_{Mittel}$  = mittlere Bestrahlungsstärke [mW cm<sup>-2</sup>];  $T_{QR}$  = Transmission des Quarzrohrs (100 %); S = Leistung der Strahlungsquelle [mW];  $r_a$  = Außendurchmesser des Fermenters;  $r_i$  = Durchmesser des Quarzrohres; 1 = Länge des Fermenters;  $T_W$  = Transmission des Mediums im UV-Bereich (75 %)

Die Gesamtstrahlungsdosis D ist als applizierte Energie pro Fläche definiert und ist das Produkt aus Bestrahlungsstärke I und Bestrahlungsdauer  $t_B$  (s).

 $D = I * t_B [mJ/cm^2]$ 

**Tab 3.1:** Gesamtstrahlungsdosis in Abhängigkeit vom Lampen- und Fermentertyp. $r_a$  = Außendurchmesser des Fermenters;  $r_i$  = Durchmesser des Quarzrohrs;  $I_{Mittel}$  = mittlereBestrahlungsstärke

Fermenter	r <sub>a</sub>	$\mathbf{r}_{i}$	Höhe	Leistung	IMittel	Dosis
	[cm]	[cm]	[cm]	[mW]	[mW cm <sup>-2</sup> ]	[mJ cm <sup>-2</sup> ]
Biostat S 5 1	7,85	1,0	29,5	15000	18,41	7,95E+05
Biostat S 101	10,25	1,0	39,5	25000	86,62	3,74E+06

#### 3.2.2 Auswahl eines geeigneten Schwermetalls

Aufgrund der Schwermetallbelastung des Sediments der Deutschen Nordseeküste wurde Cadmium als Noxe ausgewählt. Als Grundlage für diese Auswahl wurde die ZISCH-Studie verwendet (Haarich & Schmidt, 1986), die für die Deutsche Bucht eine maximale Cadmiumbelastung im Sediment von 0,16 nmol kg<sup>-1</sup> angibt. Die durchschnittliche Cadmiumbelastung in der Deutschen Nordsee betrug hingegen 0,1 nmol kg<sup>-1</sup>. Die in den Versuchen verwendete Cadmiumkonzentration [Cd<sup>2+</sup>0,05 mM] entspricht einer Konzentration, die mit einer Unfallsituation vergleichbar wäre. Jedoch waren nur mit Konzentrationen von 0,05 mM Cd<sup>2+</sup> und höher im Laborversuch signifikante Effekte nachweisbar (Nachtkamp, persönliche Mitteilung; Bielefeld, 2005). In allen Versuchsansätzen wurde Cd<sup>2+</sup> in Form von Cadmiumacetat eingesetzt. Um die entsprechende Endkonzentration an Acetat [25 mM] und Cadmium [0,05 mM] im Medium zu erhalten, wurde für diese Versuche eine 5 M Natriumacetat- und 1 M Cadmiumacetat-Stammlösung angesetzt und entsprechend steril dem Medium (SWB-X2) zugegeben. Die eingesetzte Cadmiumkonzentration wurde vor Versuchsbeginn und am Versuchsende mittels Atomabsorptionsspektroskopie (AG Bodenkunde der Universität Oldenburg). überprüft (Tabelle 3.2). Dafür wurde nach der Probennahme der Sedimentanteil durch Zentrifugation (15 min, 10000 g) abgetrennt. Der Überstand wurde mit 1 M HCl auf pH 4,5 angesäuert.

**Tab. 3.2:** Konzentration der eingesetzten Cadmiummenge.  $Cd^{2+}_{theoretisch}$  = Medium mit 0,05 mM Cadmiumacetat;  $Cd^{2+}_{Anfang}$  = gemessene  $Cd^{2+}$  Konzentration vor Inoculation;  $Cd^{2+}_{Ende}$  = gemessene  $Cd^{2+}$  Konzentration nach Kultivierungsende

Versuchsbezeichnung	$\mathbf{Cd}^{2^+}$ theoretisch	Cd <sup>2+</sup> Anfang	Cd <sup>2+</sup> Ende	
	[mM]	[mM]	[mM]	
S10	0,05	0,048	0,020	
S11	0,05	0,054	0,015	
S16	0,05	0,049	fehlt	

#### **3.3 Fermentationen**

#### 3.3.1 Versuchsdesign

Um den Einfluss der Noxen sowohl einzeln als auch in Kombination auf eine bakterielle Gemeinschaft zu analysieren wurde eine Kultivierungsmethode gewählt, bei der so viele Parameter wie möglich geregelt werden konnten. Hierfür war die in der Arbeitsgruppe Mikrobiologie/Biotechnologie entwickelte Methode der Fermentation mit Sediment-Suspensionskulturen (Berthe-Corti et al., 1997) geeignet. Bei allen Bestrahlungsversuchen wurden jeweils zwei Lampen entweder vom Typ TL (polychromatisches Licht 1 [15 W]) oder SR (polychromatisches Licht 2 [25 W]) verwendet. Diese Lampen wurden in einem UV-durchlässigen Quarzrohr in den Fermenter eingebaut und direkt von der umgebenden Sedimentsuspensionskultur umspült (Abb. 3.3). Im Gegensatz dazu wurden bei den Dunkelkontrollen und bei den Versuchen mit Cadmiumacetat als alleiniger Noxe die Lampen durch Einsetzen von Blindstopfen ersetzt. Um unkontrollierte Einflüsse durch Tageslicht zu vermeiden, wurden die Fermenter während der Versuchsdauer mit einer lichtdichten Folie umwickelt.



Abb. 3.3: Aufbau eines Fermenters mit Lampe Typ TL (Biostat S 5 l, Braun Biotech)

Die Kultivierung der Bakteriengemeinschaft erfolgte in Batch-Fermentationen, bestehend Seewasser-Sediment-Suspension (SWB-X2) mit aus Pyruvat, Casaminoacids (jeweils in einer Endkonzentration von 0,05 % w vol<sup>-1</sup>) und Acetat (Endkonzentration von 0,2 % w vol<sup>-1</sup>) als Kohlenstoff- und Energiequellen. Das artifizielle Seewasser (Levring, 1946) wurde mit 0,14 g l<sup>1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O und 0,98 g l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl und 1,43 g l<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> ergänzt (Bruns & Berthe-Corti, 1999). Der Trockensedimentanteil betrug 0,1 % (w vol<sup>-1</sup>). Alle geregelten Kulturbedingungen sind in Tabelle 3.3 aufgelistet. Die Regelung des pH-Wertes erfolgte durch Zugabe von 1 M HCl bzw. 0,5 M NaOH. Täglich wurde bei jeder Probennahme der pH-Wert extern kontrolliert. Der gelöst-Sauerstoffpartialdruck (pO<sub>2</sub>) wurde mit einer pO<sub>2</sub>-Elektrode kontrolliert und so geregelt, dass er stets größer 40 % war. Für die gleichmäßige Durchmischung wurden jeweils ein Propellerrührer und ein Scheibenblattrührer verwendet.

Bedingungen/Regelung	Eigenschaft
Temperatur	20 °C
pH-Wert	$7,4 \pm 0,2$
Rührerdrehzahl	500 rpm
Trockenwattanteil als Besiedlungsfläche	0,1 % (w v <sup>-1</sup> )
Inoculum	5 g/l
Medium	SWB-X2, modifiziert nach Bruns & Berthe-Corti
	(1999)
Kulturzeit	ca. 200 – 264 h
pO <sub>2</sub>	40 - 100 %

Tab. 3.3: Kulturbedingungen während einer Fermentation.

Für die Inoculation wurden die Aliquots der Sedimentproben über Nacht bei 4 °C aufgetaut und am nächsten Tag nach Homogenisierung in einer Konzentration von 5 g l<sup>-1</sup> in den Fermenter gegeben. Der Trockenwattanteil lag bei 0,1 %, dies gewährleistete eine Transmission des Lichtes von 75 – 98 % im UV-Bereich. Direkt nach Inoculumzugabe wurden drei unabhängige Proben entnommen, um die Ausgangsbedingungen der Gemeinschaft zu erfassen. Die Kultur wurde 24 - 28 h, bis zum Erreichen eines Gesamtzelltiters von ca. 1 \* 10<sup>8</sup> Zellen/ml inkubiert (Dunkelkontrolle), dann erfolgte die erste Probennahme (45 - 50 ml). Der anschließende Bestrahlungszeitraum entsprach einem simulierten Tag-Nacht-Rhythmus, d.h. nach 12 h Bestrahlung folgten 12 h Dunkelheit. Weitere Proben wurden täglich, direkt nach dem Bestrahlungsende bzw. bei den Dunkelkontrollen in der entsprechenden Zeit entnommen. Die Aufarbeitung der entnommenen Proben erfolgte nach dem in Abbildung 3.4 dargestellten Schema. Die entnommenen Proben wurden in mehreren Aliquots zu je 5 ml aufgeteilt und bei –20 °C eingefroren, bzw. sofort aufgearbeitet.



Abb. 3.4: Analyse der kultivierten Bakteriengemeinschaft. DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindol + 1,4diazabicyclo [2.2.2]octan (Bestimmung der Gesamtzellzahl); FISH: Fluoreszenz-*In-Situ*-Hybridisierung (phylogenetische Zusammensetzung); MPN: Most Probable Number (Bestimmung der wahrscheinlichsten Lebendzellzahl); DGGE: Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese zur Erfassung der Struktur der Gemeinschaft; ECOLOG: Erfassung des Substratverwertungsspektrums mittels EcoPlate<sup>™</sup>.

#### 3.3.2 Versuchsansätze

Insgesamt wurden 11 Fermentationen mit unterschiedlichen Noxen-Kombinationen durchgeführt (Tab. 3.4). Die Versuchsdauer betrug mindestens 200 - 240 h. In zwei Vorversuchen wurde getestet, ob die Bestrahlungsbedingungen Einfluss auf die nachweisbare Konzentration an CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> im System haben. Dafür wurden die Kultivierungsbedingungen und die Medienzusammensetzung wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben eingestellt. Anschließend wurde mit 1,38 % CO<sub>2</sub> und 20,85 % O<sub>2</sub> begast und über einen Zeitraum von drei Tagen jeweils im 12 h Rhythmus bestrahlt. Es konnten keine Veränderung in der CO<sub>2</sub>-Konzentration und O<sub>2</sub>-Konzentration in Abhängigkeit von dem Bestrahlungsrhythmus festgestellt werden. Zusätzlich wurde in diesem Versuch gezeigt, dass erst nach ca. 10 h Inkubation die eingesetzte CO<sub>2</sub>-Menge im Abgas nachweisbar war. Bis dahin wurde das CO<sub>2</sub> vom Medium als CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> gepuffert. Durch Zugabe von NaOH [0,5 M], das zur Regelung des pH-Wertes diente, wurde das CO<sub>2</sub> wieder aus dem Medium ausgetrieben und konnte im Abgasstrom vollständig nachgewiesen werden.

Bezeichnung	Noxe	Fermenter	Kulturvolumen [l]
S7	Dunkelkontrolle	Infors 7,5 l	3,5
S9	Dunkelkontrolle	Infors 7,5 l	3,5
S14	Dunkelkontrolle	Biostat S 101	10
S6	p.L.1 [15 W]	Biostat S 5 1	3,5
S8	p.L.1 [15 W]	Biostat S 5 1	3,5
S11	Cd <sup>2+</sup> [0,05 mM]	Infors 7,5 l	3,5
S12	Cd <sup>2+</sup> [0,05 mM]	Biostat S 5 1	3,5
S15	p.L.2 [25 W]	Biostat S 101	10
FW2	p.L.2 [25 W]	Biostat S 101	7
S10	Kombi 1 (p.L.1 [15 W]		
	und Cd <sup>2+</sup> [0,05 mM])	Biostat S 5 1	3,5
S16	Kombi 2 (p.L.2 [25 W]		
	und Cd <sup>2+</sup> [0,05mM])	Biostat S 101	7
CO <sub>2</sub> -2	p.L.1 [15 W]	Biostat S 51	3,5

**Tab. 3.4:** Überblick über die durchgeführten Fermentationen. FW2 und CO<sub>2</sub>-2: Fermentationen wurden von Herrn Hulsch und Herrn Wintermann betreut

#### 3.4 Analytik der kultivierten Bakteriengemeinschaft

#### 3.4.1 Gasanalytik

Die aktuelle metabolische Aktivität der Kulturen wurde über die Parameter Sauerstoffverbrauch (QO<sub>2</sub>) und Kohlendioxidproduktion (QCO<sub>2</sub>) on-line mittels SONOS-Gasanalysensystem (Gesellschaft für Labor- und Prozessanalytik) ermittelt. Aus der Zusammensetzung der Gasanteile in der Zuluft und der Messung der Volumenanteile von O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> in der trockenen Fermenterabluft konnten die volumetrische Sauerstoffsverbrauchsrate (QO<sub>2</sub> in mg/l h) und Kohlendioxidproduktionsrate (QCO<sub>2</sub> in mg/l h) folgendermaßen ermittelt und kontrolliert werden (Lehmann *et al.*, 1982):

$$QO_{2} = \frac{32}{(22,4*V_{R})} * [xO_{2}*V_{E} - xO_{2A}\frac{(0,7902*V_{E})}{(1 - xO_{2a} - xCO_{2A})}]$$
$$QCO_{2} = \frac{44,01}{(22.4*V_{R})} * [xCO_{2A}\frac{(0,7902*V_{E})}{(1 - xO_{2A} - xCO_{2A})} - xCO_{2E}*V_{E}]$$

Aus QO<sub>2</sub> und QCO<sub>2</sub> ergibt sich für den Respirationsquotienten RQ:

$$RQ = \frac{(QCO_2 * mol O_2)}{(QO_2 * mol CO_2)}$$

$QO_2$	Sauerstoffverbrauchsrate	[mg O <sub>2</sub> /l * h]
QCO <sub>2</sub>	Kohlendioxidproduktionsrate	[mg CO <sub>2</sub> /l *h]
$V_{E}$	O <sub>2</sub> -Gas (Luft bzw. Prüfgas)-Volumenstrom im	
	Reaktoreintritt	[ml/min]
VR	Reaktor-Flüssigkeitsvolumen	
xi <sub>A</sub>	Molenbruch der Komponente i im Reaktoreintritt	[mol/mol Gas]
xi <sub>E</sub>	Molenbruch der Komponente i im Reaktoraustritt	[mol/mol Gas]
RQ	Respirationsquotient	

Die aufsummierte CO<sub>2</sub>-Produktion wurde mit folgender Formel ermittelt:

$$\begin{split} &\sum CO_2 = \sum_{t=0}^{T=n} CO_{2(t=0)} + [QCO_{2(t0)}*(t_1-t_0)] + CO_{2(t)}*[QCO_{2(tt)}*(t_2-t_1)] \\ &+ CO_{2(tn)}*[QCO_{2(tn)}*(t_n-t_{n-1})] \\ &\sum CO_2 & \text{aufsummierte CO}_2\text{-Produktion in mg/l oder mmol/l} \\ &\text{CO}_{2(t)} & \text{produziertes CO}_2 \text{ zum Zeitpunkt t} \\ &\text{QCO}_2 & \text{CO}_2\text{-Produktionsrate in mg/l*h oder mmol/l*h} \end{split}$$

Für die Auswertung der Abgasanalytik wurden die Parameter (QO<sub>2</sub> und QCO<sub>2</sub>) über die gesamte Kultivierungszeit summiert. In die graphische Darstellung gingen somit nur die Werte CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Menge in [mmol/l] ein.

#### 3.4.2 Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die direkte Zählung von Mikroorganismen erfolgte mit Hilfe der Epifluoreszenzmikroskopie. Dabei wurden die Mikroorganismen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbt. Der Farbstoff besteht aus einer 1:1 Mischung von DAPI-Lösung und DAPCO-Lösung (siehe 3.5.1). DAPI reagiert mit doppelsträngiger DNA und gefärbte Bakterien fluoreszieren blassblau. Die Ermittlung der Zellzahl/ml erfolgte nach folgender Formel (Bruns & Berthe-Corti, 1998):

Die Aufarbeitung der Proben zur Ermittlung der Gesamtzellzahl wurde immer direkt und parallel mit der Fluoreszenz-*In-Situ*-Hybridisierung durchgeführt.

#### 3.4.3 Bestimmung der phylogenetischen Gruppen

Die Technik der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) mit rRNA-Oligonukleotid-Sonden bietet die Möglichkeit der Charakterisierung von Prokaryoten (Bakterien und Archaea) und Eukaryoten auf verschiedenen phylogenetischen Bei Ebenen. der Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten (cy3)Oligonukleotidsonden kommt es zur Bindung der Sonde an die 16S rRNA, 23S rRNA oder 18S rRNA. Für die spezifische Detektion der im marinen Sediment vorhandenen Phyla wurden 2 ml der direkt entnommenen Proben mit Sonifiziermedium (3 ml) verdünnt und drei mal 30 Sekunden bei 30 Watt sonifiziert, um die Bakterien von den Sedimentpartikeln zu lösen (Bruns & Berthe-Corti, 1998). Um eine genaue Zellzahlbestimmung zu ermöglichen, erwies sich eine Zellzahl von 40 - 80 Zellen pro Gesichtsfeld als sinnvoll. Diese wurde mittels geeigneter Verdünnungsschritte in artifiziellem Seewasser nach Levring [1-fach] eingestellt. Jeweils 3 µl der entsprechenden Verdünnungsstufe wurden auf beschichtete (0,1 % Gelantine + 0.01 % KCr(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) Objektträger mit acht Probenfeldern aufgetragen. Während die Suspension an der Luft trocknete, wurden die Hybridisierungskammern vorbereitet, indem der Zellstoff in den Kammern mit 1,5 ml Waschpuffer beträufelt wurde. Anschließend inkubierten die Hybridisierungskammern und der vorbereitete Hybridisierungspuffer 10 - 15 min bei 48 °C. Der Hybridisierungspuffer wurde immer frisch hergestellt und der darin enthaltene Formamidgehalt (www.microbialecology.net/probebase) richtete sich nach der verwendeten Sonde. Nach dem Trocknen der Suspension auf dem Objektträger folgte eine Hitzefixierung. Anschließend wurden die Proben mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 %, 80 %, 96 - 98 % Ethanol) für jeweils 3 Minuten dehydriert. Nach dem Trocknen der Objektträger wurden jeweils 7 µl Hybridisierungspuffer und 0,75 µl der entsprechenden Hybridisierungssonde [100 µg/ml] auf jedes Probenfeld pipettiert. Bei größeren Probenzahlen ist die Herstellung eines "Mastermix", bestehend aus Hybridisierungspuffer und Sonde, sinnvoll. Die anschließende Hybridisierung erfolgte für eine Stunde bei 48 °C. Danach wurde der Objektträger kurz in kaltem

(4 °C) doppelt deionisierten Wasser (ddH<sub>2</sub>O) geschwenkt, um die Hybridisierung zu stoppen. Um unspezifisch gebundene Sonden zu entfernen, folgte eine Inkubierung

stoppen. Um unspezifisch gebundene Sonden zu entfernen, folgte eine Inkubierung im vorgewärmten (48 °C) Waschpuffer für 20 Minuten bei 48 °C. Nach diesem Waschschritt wurde der Objektträger kurz mit ddH<sub>2</sub>O gespült und getrocknet. Im letzten Schritt wurden 4 µl eines DAPI/DAPCO Gemisches (1:1) pro Probenfeld aufgetropft und danach ein Deckglas luftblasenfrei aufgelegt. Gezählt wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop. Begonnen wurde mit der Ermittlung der Anzahl der DAPI gefärbten Zellen (395 nm) und danach erfolgt die Auszählung der durch die jeweilige Sonde markierten Zellen (495 nm). Für jede Probe wurden 3 Parallelen angesetzt und jeweils pro Probenfeld drei Gesichtsfelder ausgezählt. Berechnet wurden die Anteile der phylogenetischen Gruppen in Bezug auf die DAPI-gefärbten Zellen (Gesamtzellzahl). Alle Ergebnisse wurden auf Normalverteilung mit Hilfe des Kolmogrov-Smirnov-Test geprüft (Kolmogoroff, 1933; Smirnoff, 1939). Die Konzentrationsangabe der phylogenetischen Gruppen erfolgte mit Hilfe des Medians. Die in Tabelle 3.5 aufgelisteten Sonden zur Detektion phylogenetischer Gruppen wurden zur Analyse aller entnommenen Proben verwendet.

Phylogenetische Gruppe	Sonde	Competitor	Formamidgehalt (%)
Eubakterien	EUB338		35
Archaea	Arch915		20
Eukaryoten	EUK516		20
Alphaproteobakterien	ALF1bc	ALF1bt	20
Betaproteobakterien	BET42a	BET42a-C	35
Gammaproteobakterien	GAM42a	GAM42a-C	35
Deltaproteobakterien	SRB385		35
Cytophaga-Flavobakterien Gruppe	CF319		35
Grampositive Bakterien mit hohem	HGC69a		35
GC-Gehalt			

 Tab.
 3.5:
 Phylogenetische Gruppen und die zur Detektion eingesetzten rRNA-gerichteten

 Oligonukleotidsonden.
 Image: Comparison of the second seco

Mit Hilfe einer Clusteranalyse wurde die phylogenetische Zusammensetzung der Gemeinschaften in diskrete Gruppen in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit unterteilt. Diese Gruppenbildung basierte auf der charakteristischen (Anteil der phylogenetischen Spezieszusammensetzung Gruppen an der Gesamtzellzahl in %). Grundlage war die Vermutung, dass diese Gruppen in einer

Art signifikanten Relation zur formulierten Fragestellung stehen. Zu klären war: Gibt es Unterschiede in der phylogenetischen Zusammensetzung in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit und von der eingesetzten Noxe? Es wurde die "Average linkange" Methode (UPGMA = unweighted pair group method of average) verwendet. Dabei wird die Distanz zwischen zwei Punktpaaren in zwei Clustern gemessen und dann der Mittelwert dieser Distanz als Distanz zwischen den Clustern gebildet. In der ungewichteten Methode existiert ein Gleichgewicht zwischen jedem Punkt in jedem Cluster. Die Bestimmung der Clusteranalyse wurden mit dem Programm MultiVariate Statistical Packet (MVSP Version 3.13) durchgeführt.

#### Problematik der Methode

Die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung ist eine weit verbreitete Methode um die phylogenetische Zusammensetzung von Bakteriengemeinschaften zu erfassen. Es handelt sich um eine der wenigen kultivierungsunabhängigen Methoden, die es ermöglichen, erste Einblicke in die mikrobielle Zusammensetzung eines unbekannten Habitats zu gewinnen. Die Limitierung dieser Technik liegt in der Effektivität der Detektion der Targetzellen. Bouvier and del Giorgio (2003) analysierten die bisher veröffentlichten Daten, die mit der EUB338-Sonde im aquatischen System gewonnen wurden. Sie stellten fest, dass der mit der EUB338-Sonde detektierte Anteil an der Gesamtzellzahl zwischen 1 – 100 % (Median = 56 %) variierte. Mittels Varianzanalyse wurden 8 Faktoren identifiziert, die eine Varianz von 72 % erklärten. Vier davon hatten einen signifikanten Einfluss. Während die Eigenschaften des Ökosystems und das verwendete Fluorochrom der Sonde 47 % der Varianz erklärten, beeinflussten methodische Unterschiede (Formamidgehalt und die Salzkonzentration der Pufferlösungen) die Varianz ebenfalls signifikant. Da in dieser Arbeit immer die selbe Methode und alle Hybridisierungssonden das Fluorochrom (cy3) mit der höchsten Effizient hatten, spielte die methodische Varianz eine kleinere Rolle. Jedoch ist der Einfluss des Habitats, besonders durch die gezielte Änderung zweier "Umweltparameter", wahrscheinlich sehr hoch. Trotzdem wurde diese Methode angewandt, um erste Hinweise über die phylogenetische Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft und deren Änderung über die Kultivierungszeit zu erhalten. Jedoch sollte die Interpretation der folgenden Ergebnisse immer im Kontext mit den anderen Methoden stehen.

#### 3.4.4 Bestimmung der wahrscheinlichsten Lebendzellzahl

Die Bestimmung der wahrscheinlichsten Lebendzellzahl (Most Probable Number = MPN) einer Probe beruht auf einem statistischen Verfahren, dem ein Erstellen einer geeigneten Verdünnungsreihe (stufenweise 1:10) in Flüssigmedium (artifizielles Seewasser nach Levring, [1-fach]) vorausgeht. Von vier aufeinander folgenden Verdünnungsstufen wurden je 0,1 ml in fünf Parallelen mit jeweils 10 ml Medium verdünnt und hinreichend lange inkubiert (Tabelle 3.6). Aus der Anzahl der bewachsenen Röhrchen wurde mit Hilfe des Programms Most Probable Number Calculator Version 2.7 (Klee, 1993) der so genannte MPN-Index (Zellen/ml) bestimmt. Zusätzlich wurde das 95 %-ige Konfidenzintervall (Loyer & Hamilton, 1984) angegeben. Die Konzentration an lebenden Zellen wurde in den Kulturen mittels unterschiedlicher flüssiger Nährmedien analysiert (Berthe-Corti & Bruns, 1999). Dabei wurden sowohl die C-Quellen als auch die Elektronenakzeptoren variiert (Tab. 3.6).

**Tab. 3.6:** Medien der MPN-Bestimmung und Einordnung der Lebendzellzahl der Bakterien in physiologische Gruppen. C-Quelle = Kohlenstoffquelle; PG = Physiologische Gruppe; IZ = Inkubationszeit in Tagen

Medium	C-Quelle	Elektronenakzeptor	PG	IZ [d]
SWB-X2	Pyruvat, Acetat,	Sauerstoff	Acetat-Pyruvat-	10
	Casaminoacids		konsumiernde Bakterien	
			(APB)	
Methanol	Methanol	Sauerstoff	Methanol-konsu-	21
			mierende Bakterien	
			(MKB)	
SRB (Sulfat-	Pepton,	Sulfat	Sulfatreduzierende	21
reduzierer)	Fleischextrakt		Bakterien (SRB)	
DNB (Denitri-	Hefeextrakt	Nitrit	Dentitrifizierende	21
fizierer)			Bakterien (DNB)	

#### 3.4.5 Bestimmung des Substratverwertungsspektrums

Das Substratverwertungsspektrum der bakteriellen Gemeinschaft wurde mittels EcoPlate<sup>™</sup> (Oxoid) für 31 unterschiedliche C-Quellen in jeweils drei Parallelen bestimmt (Tab. 3.7). Bei den 31 C-Quellen handelte es sich um häufig von mikrobiellen Gemeinschaften in Böden genutzte Subtrate. Dabei wurde die Fähigkeit der Gemeinschaften zur metabolischen Nutzung verschiedener Stoffklassen (z.B. Aminosäuren, Mono-, Di- und Polysaccharide, Zuckeralkohole, Tenside) untersucht. Dazu wurden aus der Fermentation Proben nach 24 h, 48 h bzw. 72 h und nach 192 h verwendet. Nach dem Durchmischen der Probe wurden 2 ml der Bakteriensuspension mit 3 ml NaPP-Lösung (30 min, 20 °C) geschüttelt (Berthe-Corti & Bruns 1998). Alle folgenden Verdünnungsschritte wurden mit Seewasser nach Grasshoff (1983) durchgeführt, bis zu einem Zelltiter von 1 \* 10<sup>6</sup> Zellen/ml. Von dieser Verdünnung wurden 150 µl/Testfeld pipettiert. Als Grundlage für die Inoculation wurden die Lebendzellzahlen der APB verwendet, so dass ca.  $1.5 * 10^5$  Zellen in jedem Testfeld enthalten waren. Die Inkubation erfolgte bei 20 °C im Dunkeln, für 10 Tage. Die Auswertung erfolgte täglich, indem die Intensität des Farbumschlages in vier Stufen (negativ, schwach, mittel und stark positiv) eingeteilt wurde. Auf Grund der Stärke des Farbumschlages und der Bildung eines Mittelwertes aus den drei Parallelen wurde mit Hilfe einer Partiellen Komponentenanalyse (PCA) ein zweidimensionaler Raum erstellt, der die Lage der unterschiedlichen Proben zueinander beschreibt (Hacket & Griffiths, 1997). Die Grundlage ist ein indirektes lineares Modell in dem der Faktor x eine theoretische Variable, die durch einen iterativen Algorithmus gefunden wurde, beschreibt. Diese statistische Analyse wurde mit Hilfe des Programms Canoco 4.5 für Windows durchgeführt.

Stoffklasse	Kohlenstoffquelle	Nr.
Aminosäuren	L-Arginin	3
	L-Asparagin	7
	L-Phenylalanin	11
	L-Serin	15
	L-Threonin	19
Tenside	Tween 40	8
	Tween 80	12

Tab. 3.7: Kohlenstoffquellen des Substratverwertungsspektrums (EcoPlate<sup>TM</sup>).

Stoffklasse	Kohlenstoffquelle	Nr.
Ester	Pyruvatsäure Methylester	4
Amine	Phenylethylamin	27
	D-Galacturonsäure γ-Lacton	6
	Putrescin	
Kohlenhydratverbindungen	Itaconsäure	22
	γ–Hydroxybuttersäure	18
	D-Glucosaminsäure	21
	α-Ketobuttersäure	26
	D-Galacturonsäure	6
	D-Mannitol	13
	i-Erythrol	9
	β-Methyl-D-Glucosid	1
	D-Xylose	5
	α-D-Lactose	28
	D-Cellobiose	24
	Glygogen	20
	α-Cyclodextrin	16
	N-Acetyl-D-Glucosamin	17
	D-Malonsäure	30
Aromaten	4-Hydroxybenzoesäure	14
	2-Hydroxybenzoesäure	10
Phosphorilierte Kohlenhydrate	Glucose-1-Phosphat	25
	D,L-α-Glycerolphosphat	29

#### 3.4.6 Isolierung der Gesamt-DNA

Für die Gewinnung der Gesamt-DNA aus der Gemeinschaft wurde das NucleoSpin<sup>®</sup> Food Kit (MACHEREY-NAGEL) verwendet. Dabei wurden folgende Modifizierungen vorgenommen: eingesetzt wurden 0,2 g eines Pellets, das aus der entnommenen Probe durch Zentrifugation (5 min, 13000 g) gewonnen wurde. Des Weiteren wurde die DNA mit eiskaltem Ethanol [99,9 %] gefällt. Die komplette Durchführung ist den Angaben des Herstellers zu entnehmen. Für die Gewinnung der Gesamt-DNA aus Isolaten wurde das High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) verwendet. Die Durchführung ist den Angaben des Herstellers zu entnehmen.

#### 3.4.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR handelt es sich um eine Methode zur *in vitro* Amplifizierung von DNA unter Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase.

#### 16S rDNA-PCR für die DGGE-Analyse

Als Template diente gereinigte chromosomale DNA. Für alle PCR-Ansätze, in denen ein ca. 550 bp großen 16S rDNA-Gen-Fragment mit den Primern 907r und 341f-GC (Muyzer *et al.*, 1995) amplifiziert wurde, galt das in Tabelle 3.8 dargestellte Pipettierschema.

Substanz	Ausgangskonzentration	Endkonzentration	
Moltaq-Polymerase	5u/µl	0,05 u/µl	
10x Puffer	10x	1x	
MgCl <sub>2</sub>	100 mM	1 mM	
dNTPs	je 100 mM	je 0,2 mM	
Oligonukleotide	je 10 pmol/µl	je 0,2 pM	
Template		1 µl	
BSA	20 mg/ml	0,4 mg/ml	
Enhancer		1 µl	
ddH <sub>2</sub> O		ad 50 µl	

Tab. 3.8: Pipettierschema der 16S rDNA-PCR für die DGGE-Analyse

Zur Optimierung der PCR kann die MgCl2-Konzentration variiert und die Annealing-Temperatur verändert werden. Die Bedingungen für die 16S rDNA-PCR im Thermocycler waren: initiale Denaturierung (4 min, 96 °C), Denaturierung (30 s, 94 °C), Annealing (45 s, 62 °C), Extension (1 min, 72 °C), insgesamt 10 Zyklen; Denaturierung (30 s, 94 °C), Annealing (1 min, 55 °C), Extension (1 min, 72 °C), insgesamt 25 Zyklen; final Extension (10 min, 72 °C).

#### PCR für 16S rDNA-Sequenzierung

Der Ansatz für die Reamplifikation des 16S rDNA-Fragments aus den ausgeschnittenen Gel-Banden der DGGE mit den Primern 907r und 341f erfolgte wie in Tabelle 3.9 dargestellt.

Substanz	Ausgangskonzentration	Endkonzentration
PFU–Polymerase	3 u/µl	0,05 u/µl
10x Puffer + MgSO <sub>4</sub>	10x	1x
dNTPs	je 100 mM	je 0,2 mM
Oligonukleotide	je 10 pmol/µl	je 0,2 pM
Template		5 µl
ddH <sub>2</sub> O		ad 50 µl

Tab. 3.9: Pipettierschema der 16S rDNA-PCR für die Sequenzanalyse

Die Bedingungen für die 16S rDNA-PCR im Thermocycler waren: initiale Denaturierung (2 min, 95 °C), Denaturierung (1 min, 95 °C), Annealing (30 s,53 °C), Extension (35 s, 72 °C), insgesamt 30 Zyklen; final Extension (5 min, 72 °C).

Nach Beendigung der PCR wurde die Reaktion mit 6  $\mu$ l Loading Dye [6 x] beendet und auf einem Agarosegel überprüft.

#### 3.4.8 Reinigung von PCR–Produkten

Zur Abtrennung von Primern, Nukleotiden, Enzymen und Salzen von den PCR-Produkten wurde der E.Z.N.A. Cycle pure Kit verwendet (Peqlab Biotechnologie). Da Oligonukleotide bis zu einer Länge von 40 bp abgetrennt werden, eignet sich diese Methode auch zum Entfernen von Bruchstücken, die nach einer Restriktion von PCR-Produkten entstehen. Alle benötigten Puffer sowie Ionenaustauschsäulchen sind im Kit enthalten. Die genaue Versuchsdurchführung ist den Angaben des Herstellers zu entnehmen.

#### 3.4.9 Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel

Die DNA der zu untersuchenden Fragmente wurden mit 6 µl Loading Dye versetzt und in 1 % Agarosegelen in 1 x TAE bei 90 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Agarosegele wurden mit Ethidiumbromid [10 mg/ml] gefärbt, mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und unter einem UV-Transilluminator fotografiert.

#### 3.4.10 Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese

Für die Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) wurden 16S rDNA Fragmente mittels 16S rDNA spezifischen "GC-clamp" Primern amplifiziert (siehe 3.4.7). Anschließend wurden diese über 6 % Polyacrylamidgele 18 h bei 130 V und 60 °C im INGENYphorU-2-System aufgetrennt (Ingeny International B.V.) (Muyzer et al., 1993). Jedes Gel wurde mit einem denaturierenden Harnstoffgradienten von 40-70 % gegossen. Anschließend wurden die Gele mindestens eine Stunde mit SYBR®-Gold (MoBiTec) gefärbt und unter einem UV-Transilluminator mit einer Digitalkamera (Olympus Deutschland) und Polarisationsfilter (Hama) fotografiert. Ausgewählte 16S rDNA Fragmente wurden mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in 25 µl ddH<sub>2</sub>O gelegt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden diese Fragmente via PCR einzeln reamplifiziert (siehe 3.4.7) und nach Konzentrationsbestimmung (siehe 3.4.11) direkt zur Sequenzierung (3.4.12) eingeschickt. Die Auswertung der DGGE erfolgte mit Hilfe einer Clusteranalyse. Zunächst wurden alle Gele, mit Hilfe des internen Markers (bestehend aus Alcanivorax jadensis T9<sup>T</sup> und Muricauda ruestringensis B1) skaliert und anschließend die Lage der einzelnen Banden vermessen. Nach Bestimmen der Lauflänge jeder Bande [cm] wurde eine Matrix nach einem 0/1 Schema für jedes Gel erstellt. Nach Beendigung der Versuche war somit eine Gesamt-Matrix vorhanden, die alle potentiell möglichen Banden beinhaltete. Dabei wurde jeder vorhandenen Bande die 1 und jeder nichtvorhandenen Bande die 0 zugeordnet. Diese erhaltene 0/1 Matrix wurde pro Versuchstyp, wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben, in der Clusteranalyse ausgewertet.

#### 3.4.11 Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden, DNA und RNA

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch, bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Die Menge an doppelsträngiger DNA (ds-DNA) bzw. Oligonukleotiden (ss-DNA) kann wie folgt berechnet werden:

1 Einheit bei OD260 entspricht einer ds-DNA Konzentration von 50 µg/ml

1 Einheit bei OD280 entspricht einer ss-DNA Konzentration von 33 µg/ml

Der Quotient von OD260/OD280 gibt den Reinheitsgrad an und liegt idealerweise zwischen 1,7 und 2,0. Proteine wirken in der zu messenden Lösung störend. Bei geringen DNA-Mengen wurde die DNA-Konzentrationen nach der Gelelektrophorese mittels Gene-Ruler<sup>™</sup> 1kb DNA-Leiter (MBI-Fermentas) oder Mass-Ruler<sup>™</sup> (MBI-Fermentas) bestimmt.

#### 3.4.12 DNA-Sequenzanalyse

Zur Bestimmung einer Teilsequenz der 16S rDNA-Sequenz wurden 20 ng luftgetrocknete und gereinigte (siehe 3.4.8) DNA/100 bp eingeschickt (MWG-Biotech AG). MWG-Biotech verwendet die Methode der zyklischen Sequenzierung. Mit Hilfe des Programms BioEdit Sequence Alignment Editor Version 5.0.9 (Hall, 1999) wurden die Sequenzierungen kontrolliert und evtl. Fehler korrigiert. Sequenzhomologien wurde mit Hilfe von Datenbanken (NCBI) und BLAST2.0 ermittelt (Altschul *et al.*,1997). Die in dieser Arbeit charakterisierten DNA-Sequenzen sind in der NCBI Datenbank (Genbank) eingetragen und die Accession Nummern werden im jeweiligen Kapitel erwähnt.

#### **3.5** Charakterisierung von Isolaten

Die Isolate wurden aus der Bestimmung der Lebendzellzahl der Methanolkonsumierenden Bakterien von Versuch S8 [15 W] (schwache Bestrahlungsdosis) nach acht Kultivierungstagen gewonnen (Hartmann, 2006). Die DNA-Isolierung erfolgte mit dem "High Pure PCR Template Preparation Kit" (Roche). Die anschließende Aufarbeitung der DNA bis zur Sequenzierung erfolgte wie in den Kapiteln 3.4.7 - 3.4.12 beschrieben.

#### 3.6 Bestimmung der Bakteriochlorophylle a, c, d und e

Eine Probe aus der Kultur (2 bis 5 ml) wird über einen Glasfaserfilter über einen Membranfilter (Porenweite  $0,2 \ \mu m$ ) abfiltriert. Nach Überführen in 3 ml Aceton wird im Dunkeln bei 4 °C über Nacht extrahiert. Die Messung erfolgt gegen reines Extraktionsmittel für Bchl a bei 771 nm Bchl c bei 663 nm Bchl d bei 652 nm Bchl e bei 647 nm. Die Pigmentkonzentration errechnet sich nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

 $E = c * d * \varepsilon mit$ 

E = Extinktion am Absorptionsmaximumc = Pigmentkonzentrationd = Schichtdicke der Küvette (1 cm)e = Extinktionskoeffizient am Absorptionsmaximum fürBchl a = 92.3 ml \* mg-1 \* cm-1Bchl c = 92.6 ml \* mg-1 \* cm-1Bchl d = 98.0 ml \* mg-1 \* cm-1 (dito anzunehmen für Bchl e)

#### 3.7 Statistik

Alle Daten wurden auf Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test (Kolmogoroff, 1933; Smirnoff, 1939) getestet. Als normalverteilt wurden alle Werte P > 0,05 gewertet. Zusätzlich wurden alle Daten auf Ausreißer getestet. Der durchgeführte Test richtete sich nach der Stichprobenzahl. Bei einem Stichprobenumfang bis zu n = 8 wurde der Test nach Dixon (1950), bei n > 8 der Grubbs Test (Grubbs, 1969) durchgeführt. Waren die Daten normalverteilt, wurde der Mittelwert mit der Standardabweichung oder dem 95 %igen Konfidenzintervall angegeben. Bei nichtnormalverteilten Daten wurde der Median mit zugehörigem 25.

und 75. % Perzentil angegeben. Die Daten eines Versuchstyps wurden mittels Einbzw. Zweifaktorieller Multivarianzanalyse (ANOVA) auf signifikante Unterschiede geprüft. Im Fall von statistischer Signifikanz wurden die Gruppen paarweise verglichen, wobei der Student-Newman-Keuls Test (Gosset, 1907; Newman, 1939; Keuls, 1952) benutzt wurde. Bei nichtnormalverteilten Daten wurde ein ANOVA on ranks nach Kruskal-Wallis (Kruskal, 1952; Wallis, 1952) durchgeführt und im Falle von statistischer Signifikanz ein paarweiser Vergleich der Gruppen mit der Methode nach Dunn (1992) abgeschlossen. Von statistisch signifikanten Unterschieden wurde dann ausgegangen, wenn P < 0.05 war. Wenn der Begriff "signifikant" anders verwendet wurde, dann ist dies im Text vermerkt. Dies war dann der Fall, wenn die drei unabhängigen Referenzversuche (Dunkelkontrolle) zu hohe Varianzen hatten. Dann wurde die Schwankungsbreite dieser drei Versuche als Maß für die Fehlerbreite der Methode gewertet. Die aufgeführten statistischen Testverfahren wurden mit dem Programm SigmaStat 2.0 (SPSS Software) durchgeführt. Die graphische Darstellung der Daten erfolgte mit dem Programm SigmaPlot 9.0 (SPSS Software). Weitere statistische Verfahren, die bereits in den entsprechenden Methodenkapiteln erklärt wurden, waren die Prinzipielle Komponentenanalyse (Jongman et al., 1987) mit dem Programm Canoco für Windows 4.5 (Biometrics-Plant Research International) und die Clusteranalyse mit dem Programm MultiVariate Statistical Package 3.13 (Kovach Computing Service).

## 4 Ergebnisse

# 4.1 Einfluss von polychromatischem Licht auf die Aktivität und Zusammensetzung bakterieller Gemeinschaften

#### 4.1.1 Stoffwechselaktivität

Autochthone mikrobielle Gemeinschaften aus dem Wattsediment der Nordseeküste bei Dangast wurden im Bioreaktor unter definierten Bedingungen (Kapitel 3.3.1) kultiviert. Der aktuelle Kulturzustand, d.h. die Stoffwechselaktivität der Gemeinschaften, wurde on-line über die Parameter Kohlendioxidproduktion (CO<sub>2</sub>-Produktion) und Sauerstoffverbrauch (O<sub>2</sub>-Verbrauch) verfolgt.

Die Kontrollversuche (Dunkelkontrolle ohne Noxen) wurden als Referenz für einen typischen Kulturverlauf dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Nach Ermittlung der maximalen Schwankungsbreite der Stoffwechselaktivität (CO<sub>2</sub>- Produktion und O<sub>2</sub>-Verbrauch) der Dunkelkontrolle wurden alle Werte innerhalb dieses Bereiches als nicht signifikant verschieden betrachtet. Das Verhalten der Gemeinschaften über den gesamten Kulturverlauf konnte in drei Phasen eingeteilt werden:

- keine bzw. geringe Stoffwechselaktivität (lag-Phase) = Phase I
- hohe Stoffwechselaktivität = Phase II
- geringe Stoffwechselaktivität = Phase III.

#### **CO<sub>2</sub>-Produktion**

In der Dunkelkontrolle dauerte die lag-Phase 24 h (Abb. 4.1). Zum einen adaptierte sich die Gemeinschaft an die Kultivierungsbedingungen im Fermenter und zum anderen wurde ein Teil des produzierten CO<sub>2</sub> vom Medium gepuffert (Kapitel 4.3.2). Somit war die tatsächliche lag-Phase kürzer als 24 h (Tab. 4.1). Die Phase der höchsten CO<sub>2</sub>-Produktionsrate (Kultivierungszeit: 1 – 3 d) dauerte 36 h (Tab. 4.1), mit einer CO<sub>2</sub>-Produktion von  $\Sigma$ CO<sub>2</sub> = 48 mmol/l. Die Merkmale der Phase III (Kultivierungszeit: 3 – 10 d) waren eine geringe CO<sub>2</sub>-Produktionsrate und ein mehrphasiger Anstieg der CO<sub>2</sub>-Produktion der Gemeinschaft (Abb. 4.1). Dafür verantwortlich könnte entweder eine Sukzession in der Zusammensetzung der

Gemeinschaft oder in der Mineralisierung der C-Quellen sein. Nach 10 Kultivierungstagen wurden von der unbelasteten Dunkelkontrolle insgesamt 76 mmol/l CO<sub>2</sub> produziert.



Abb. 4.1: CO<sub>2</sub>-Produktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis und Kultivierungszeit. Gelbmarkierter Bereich = Schwankungsbreite der Dunkelkontrolle; ▲ Start des jeweils 12-stündigen Bestrahlungsrhythmus; ● Dunkelkontrolle (n = 3); ○ polychromatisches Licht 1 [15 W] (n = 2);
polychromatisches Licht 2 [25 W] (n = 2); ... Maximum p.L.2 [25 W]

Die CO<sub>2</sub>-Produktion der bestrahlten Gemeinschaften wurde mit der in den entsprechenden Phasen der Dunkelkontrolle verglichen (Abb. 4.1). Die lag-Phase war in allen Gemeinschaften gleich (Tab. 4.1). In Phase II wurden Unterschiede in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis festgestellt. Mit zunehmender Bestrahlungsdosis verkürzte sich die Länge der höchsten CO<sub>2</sub>-Produktionsrate (Tab. 4.1). In der Gemeinschaft, die polychromatischem Licht 1 [15 W] ausgesetzt war, endete die Phase der höchsten CO<sub>2</sub>-Produktion nach 56 h, in der Gemeinschaft, die polychromatischem Licht 2 [25 W] ausgesetzt war, nach 48 h. Während sich die Gesamt-CO<sub>2</sub>-Produktion der schwach bestrahlten Gemeinschaft (p.L.1 [15 W]) nach Ablauf von 10 Tagen mit 58 mmol/l nicht von der Dunkelkontrolle unterschied, produzierte die stark bestrahlte Gemeinschaft (p.L.2 [25 W]) mit 27 mmol/l signifikant weniger CO<sub>2</sub>. Diese signifikante Verringerung kann als Folge der in Phase II verringerten CO<sub>2</sub>-Produktionsrate gesehen werden, von der sich die Gemeinschaft auch in den Dunkelphasen nicht zu erholen schien. Während in der Dunkelkontrolle der Übergang in Phase III durch Substratlimitierung erklärt werden kann, konnte dies in der stark bestrahlten Gemeinschaft nicht die alleinige Ursache sein. Wegen der verringerten CO<sub>2</sub>-Produktion und den Lichtbedingungen im Fermenter bestand in den bestrahlten Gemeinschaften, potentiell die Möglichkeit, dass CO<sub>2</sub>-fixierende phototrophe Bakterien in der Kultur waren. Deshalb wurden einzelne Proben dieser Gemeinschaften auf das Vorhandensein phototropher Bakterien getestet. Weder in Flüssigkultur, noch auf festem Nährboden wurde ein Wachstum phototropher Bakterien nachgewiesen. Diese Versuche wurden zusammen mit K. Palinska in der AG Geomikrobiologie (Universität Oldenburg) durchgeführt. Eine Aceton Extraktion der Photosynthesepigmente und die anschließende Messung der Absorptionspektren gab keine Hinweise auf das Vorhandensein phototropher Pigmente.

**Tab. 4.1:** Länge der Phase I (lag-Phase) und II (höchste  $CO_2$ -Produktionsrate) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis. Dunkelkontrolle (n = 3); p.L.1 [15 W] = polychromatisches Licht 1 (n = 2); p.L.2 [25 W] = polychromatisches Licht 2 (n = 2); Konzentrationsangabe = Mittelwert ± Standardabweichung (STABW)

Noxe	Phase I	Phase II
	[h] (± STABW)	[h] (± STABW)
Dunkelkontrolle	24 (± 0)	36 (± 4)
p.L.1 [15 W]	24	32
p.L.2 [25 W]	26	22

#### O<sub>2</sub>-Verbrauch

Zusätzlich zur CO<sub>2</sub>-Produktion wurde der O<sub>2</sub>-Verbrauch der Gemeinschaften erfasst. Die Gliederung in drei Phasen (I - III) wurde beibehalten.

Innerhalb der ersten 24 h nach Animpfen (Phase I) adaptierten sich alle Gemeinschaften an die Kultivierungsbedingungen im Fermenter und es wurde ein geringer O<sub>2</sub>-Verbrauch in allen Gemeinschaften gemessen (Abb. 4.2). Die Phase der höchsten O<sub>2</sub>-Verbrauchsrate (1 – 2 d) variierte in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis. Nach zwei Kultivierungstagen verbrauchten sowohl die unbelastete Gemeinschaft  $\Sigma O_2 = 37$  mmol/l als auch die Gemeinschaft, die schwachem Licht (p.L.1 [15W]) ausgesetzt war, ( $\Sigma O_2 = 34$  mmol/l) ähnlich viel O<sub>2</sub>. Im Gegensatz dazu verbrauchte die Gemeinschaft, die starkem Licht (p.L. 2 [25 W]) ausgesetzt war, signifikant mehr O<sub>2</sub> ( $\Sigma$ O<sub>2</sub> = 55 mmol/l) in dieser Phase. Nach 10 Kultivierungstagen lag der Sauerstoffverbrauch aller bestrahlten Gemeinschaften im Schwankungsbereich der Dunkelkontrolle. Vergleicht man den O<sub>2</sub>-Verbrauch und die CO<sub>2</sub>-Produktion der drei Kulturansätze, so weist der hohe Sauerstoffverbrauch bei gleichzeitig geringer CO<sub>2</sub>-Produktion der Kulturen mit starker Bestrahlung (p.L.2 [25 W]) auf ein abweichendes Verhalten in der Mineralisierung der C-Quellen hin.



Abb. 4.2: O<sub>2</sub>-Verbrauch in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis und Kultivierungszeit. Gelbmarkierter Bereich = Schwankungsbereich der Dunkelkontrolle; ▲ Start des jeweils 12-stündigen Bestrahlungsrhythmus; ● Dunkelkontrolle (n = 3); ○ polychromatisches Licht 1 [15 W] (n = 2);
● polychromatisches Licht 2 [25 W] (n = 2); ... Minimum p.L.2 [25 W]

#### 4.1.2 Wachstum (Gesamtzellzahl und Lebendzellzahl)

Die Zunahme der Zellzahl in den Gemeinschaften wurde als Wachstum definiert. Die Gesamtzellzahl der Gemeinschaften (tote und lebende Zellen) wurde mit Hilfe der DAPI-Färbung und die Lebendzellzahl mit Hilfe der MPN-Methode (Most Probable Number) bestimmt. Durch Kultivierung auf selektiven Medien wurden spezifische Gruppen lebender Zellen erfasst. Da die Acetat-Pyruvat-konsumierenden Bakterien (APB) als Vertreter der aeroben chemoorganotrophen Bakterien in allen Gemeinschaften dominant waren, wurde diese Gruppe als Maß für die Lebendzellzahl gewertet und mit der Gesamtzellzahl verglichen. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte mit Proben, die eingefroren (-20 °C) gelagert worden waren. Die geringe Lebendzellzahl am Kultivierungsanfang (0 d) wurde durch die Adaption des Inoculums an die Bedingungen im Fermenter verursacht (Abb. 4.3).

Die maximale Schwankungsbreite der Gesamtzellzahl der drei unabhängigen Dunkelkontrollen wurde durch die maximale und minimale Zellkonzentration angegeben (Abb. 4.3-A). Die Schwankungsbreite der Lebendzellzahl wurde durch das maximale und minimale 95 %ige Konfidenzintervall angegeben (Abb. 4.3-B). Alle Werte innerhalb dieser Schwankungsbereiche wurden als nicht signifikant unterschiedlich definiert. Basierend auf dieser Definition wurden während der gesamten Kultivierungszeit keine signifikanten Unterschiede in der Gesamt- und Lebendzellzahl zwischen Dunkelkontrolle und den bestrahlten Kulturen Der nachgewiesen (Abb. 4.3). Vergleich der Stoffwechselaktivität der Gemeinschaften zeigte, dass die stark bestrahlte Gemeinschaft (p.L.2 [25 W]) mit der gleichen Zellkonzentration APB weniger CO<sub>2</sub> als die Dunkelkontrolle produzierte.

Berücksichtigt man die in Kapitel 4.1.1 beschriebene Einteilung der Gemeinschaften unterschiedliche Phasen (I - III). so Parallelen in waren zwischen Stoffwechselverhalten und Wachstum der Gemeinschaften zu erkennen. Das stärkste Wachstum der Gemeinschaften fand zwischen dem ersten und zweiten Kultivierungstag statt und entsprach somit der Phase II. Im Unterschied zur Stoffwechselaktivität wuchsen die gemessenen Bakterien direkt nach Inoculumzugabe bis zum zweiten Kultivierungstag ohne erkennbare lag-Phase auf. Da die Probennahme nur einmal täglich erfolgte, konnten keine Aussagen über eine mögliche lag-Phase gemacht werden, die wenn vorhanden, deutlich geringer als 24 h war. Nach zwei Kultivierungstagen veränderte sich die Zellzahl bis zum Kultivierungsende (Phase III) kaum noch.



Abb. 4.3: Zellkonzentration in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis und der Kultivierungszeit. (A) Gesamtzellzahl inkl. Maximum und Minimum; (B) Lebendzellzahl der Acetat-Pyruvat-konsumierenden Bakterien (APB) inkl. maximales und minimales 95 %iges Konfidenzintervall; Gelbmarkierter Bereich = Schwankungsbreite der Dunkelkontrolle; 0 d = Zellzahl des Inoculums (n = 3);
Start des jeweils 12-stündigen Bestrahlungsrhythmus; 

Dunkelkontrolle (n = 3)
polychromatisches Licht 1 [15 W] (n = 2);
polychromatisches Licht 2 [25 W] (n = 2)

# 4.1.3 Wachstum mit verschiedenen C-Quellen und Elektronenakzeptoren (metabolische Diversität)

Differenzierte man die untersuchten Gemeinschaften nach der Verwertung verschiedener C-Quellen und nach den genutzten Elektronenakzeptoren, so konnte man feststellen, dass sowohl die Bestrahlungsdosis als auch die Kultivierungszeit die Häufigkeit bestimmter physiologischer Gruppen beeinflusste.

In allen Gemeinschaften gehörten die Acetat-Pyruvat-konsumierenden Bakterien (APB) und die Denitrifizierer (DNB) zu den dominanten Spezies (Tab. 4.2). Die Sulfatreduzierer (SRB) waren am geringsten vertreten. Die Methanolkonsumierenden Bakterien (MKB) nahmen eine Sonderstellung ein, da sie erst mit zunehmender Kultivierungsdauer aufwuchsen. Wegen der hohen Varianz innerhalb der Dunkelkontrolle wurde auf das Auftragen der Schwankungsbreite der DNB und MKB verzichtet. Die Graphiken beschreiben somit nur 50 % der Daten und sind daher nur als Trends zu sehen.

#### Denitrifizierende Bakterien

In allen Gemeinschaften wurde ein Wachstum der DNB nachgewiesen (Tab. 4.2). Jedoch verlängerte eine Erhöhung der Bestrahlungsdosis die Phase des stärksten Wachstums (Phase II). Die Folge war eine Zunahme der maximalen Zellzahl der DNB (Abb. 4.4-A). In der Dunkelkontrolle fand die stärkste Zunahme der DNB zwischen den ersten beiden Kultivierungstagen statt, mit einem Maximum von 7,0 \* 10<sup>3</sup> Zellen/ml. Dies war auch in der schwach bestrahlten Gemeinschaft (p.L.1 [15 W]) so. Jedoch wurde hier nach 7 Tagen das Maximum der DNB ermittelt (2,9 \* 10<sup>4</sup> Zellen/ml). In der stark bestrahlten Gemeinschaft (p.L.2 [25 W]) wuchsen die DNB kontinuierlich bis zum 7. Kultivierungstag auf (3,0 \* 10<sup>5</sup> Zellen/ml) (Abb. 4.4-A). Als Folge der verlängerten Phase II durch p.L.2 [25 W] war die Phase III verkürzt. Die Zunahme der DNB wies auf eine Veränderung der Substratbedingungen im Medium hin, die entweder durch Licht physikalischchemisch, durch eine Veränderung der Zusammensetzung der Gemeinschaft oder durch eine Änderung der physiologischen Eigenschaften der Zellen hervorgerufen wurden.



Abb. 4.4: Lebendzellzahlen der (A) denitrifizierenden Bakterien (DNB) und (B) Methanol-konsumierenden Bakterien (MKB) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis und der Kultivierungszeit. ▲ Start des jeweils 12-stündigen Bestrahlungsrhythmus; k.D. = keine Daten;
Dunkelkontrolle (n = 3); \_\_\_\_ polychromatisches Licht 1 [15 W] (n = 2); \_\_\_\_\_ polychromatisches Licht 2 [25 W] (n = 2)

#### Methanol-konsumierende Bakterien

In allen Gemeinschaften wuchsen die MKB erst im späteren Kulturverlauf auf (Tab. 4.2). Die Länge der Phase I hing von der Bestrahlungsdosis ab, deren Folge eine Verschiebung der Phasen II – III war (Abb. 4.4-B). Die MKB der Dunkelkontrolle hatten das stärkste Wachstum zwischen dem 7. und dem 10. Tag (Phase II), ähnlich wie die MKB in der schwach bestrahlten Gemeinschaft (p.L.1 [15 W]), deren Zellkonzentration sich jedoch nach 8 Tagen nicht mehr änderte (Phase III). Ein dreiphasiges Wachstumsverhalten der MKB wurde auch in der stark bestrahlten Gemeinschaft (p.L.2 [25 W]) nachgewiesen. Nach der lag-Phase (0 – 2 d) war das stärkste Wachstum der MKB zwischen dem 2. und dem 4. Tag (Phase II). Das erreichte Maximum von 2,4 \* 10<sup>3</sup> Zellen/ml (Tab. 4.2) blieb bis zum Kultivierungsende (Phase III) konstant.
**Tab. 4.2:** Lebendzellzahlen der Acetat-Pyruvat-konsumierenden- (APB), denitrifizierenden- (DNB), sulfatreduzierenden- (SRB) und Methanol-konsumierenden Bakterien (MKB) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis und der Kultivierungszeit. Versuch\_PZ = Versuchstyp mit Probennahmezeitpunkten in Tagen (1 - 10); Inoculum = Zellzahl direkt nach Inoculumzugabe (n = 3); Dunkel = Dunkelkontrolle (n = 3); p.L.1 = polychromatisches Licht 1 [15 W] (n = 2); p.L.2 = polychromatisches Licht 2 [25 W] (n = 2); n.d. = nicht detektierbar; Max/Min = maximales/minimales 95 %iges Konfidenzintervall

Versuch_PZ	Lebendzellzahl [Zellen/ml]											
[d]	APB Modian	Max	Min	DNB Madian	Mox	Min	MKB Modian	Max	Min	SRB Modian	Max	Min
Incoculum	1,12*10 <sup>2</sup>	$2,40*10^3$	1,17*10 <sup>1</sup>	2,64	1,67*10 <sup>1</sup>	2,05*10 <sup>1</sup>	0,00	2,40	0,00	6,09	4,33*10 <sup>1</sup>	2,75*10 <sup>1</sup>
Dunkel_1	5,53*10 <sup>5</sup>	$2,70*10^{6}$	2,56*10 <sup>4</sup>	5,40*10 <sup>2</sup>	7,92*10 <sup>3</sup>	1,17*10 <sup>2</sup>	0,00	4,2	0,00	4,96	9,77*10 <sup>1</sup>	1,17
Dunkel_2	3,51*107	3,61*10 <sup>8</sup>	3,47*105	7,00*10 <sup>3</sup>	7,81*104	0,24	n.d.	n.d.	n.d.	4,50	2,26*10 <sup>1</sup>	0,22
Dunkel_3	1,14*107	4,25*10 <sup>8</sup>	1,33*106	2,67*10 <sup>3</sup>	2,26*104	7,67	0,00	$2,25*10^{2}$	0,00	4,21	2,40*10 <sup>1</sup>	0,34
Dunkel_4	1,13*107	2,85*10 <sup>9</sup>	1,18*104	2,67*10 <sup>3</sup>	2,40*104	7,67	0,00	2,64*10 <sup>3</sup>	0,00	2,05	2,40*10 <sup>1</sup>	0,19
Dunkel_7	2,29*106	6,11*10 <sup>6</sup>	1,86*10 <sup>3</sup>	2,02*103	6,63*105	2,24	0,00	6,62*10 <sup>2</sup>	0,00	2,57	5,89*10 <sup>1</sup>	0,14
Dunkel_8	3,46*105	2,72*10 <sup>6</sup>	2,38*10 <sup>3</sup>	6,85*10 <sup>3</sup>	7,27*104	5,47*10 <sup>2</sup>	2,68*10 <sup>1</sup>	6,63*10 <sup>2</sup>	1,42	1,12*10 <sup>1</sup>	$4,20*10^{2}$	0,20
Dunkel_10	2,30*106	7,27*10 <sup>6</sup>	5,75*10 <sup>4</sup>	2,77*10 <sup>3</sup>	3,14*104	2,07*10 <sup>2</sup>	1,01*10 <sup>2</sup>	6,63*10 <sup>2</sup>	1,17	0,25	2,40	0,00
p.L.1_1	1,50*106	9,75*10 <sup>6</sup>	2,56*104	1,01*10 <sup>3</sup>	5,37*10 <sup>3</sup>	1,17*10 <sup>2</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	4,73	2,41*10 <sup>1</sup>	1,15
p.L.1_2	7,66*106	4,25*107	7,77*10 <sup>5</sup>	2,09*104	2,11*105	<b>3,60*10</b> <sup>1</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	2,71	2,27*10 <sup>1</sup>	0,14
p.L.1_3	5,90*106	4,25*107	1,18*105	5,60*10 <sup>3</sup>	4,21*104	<b>3,86*10</b> <sup>1</sup>	n.d	n.d.	n.d.	2,55*10 <sup>1</sup>	2,41*10 <sup>2</sup>	1,42*10 <sup>1</sup>
p.L.1_4	1,85*106	5,94*10 <sup>7</sup>	1,13*10 <sup>3</sup>	1,34*10 <sup>3</sup>	9,77*10 <sup>3</sup>	2,27*10 <sup>2</sup>	n.d	n.d.	n.d.	2,73	2,40*10 <sup>1</sup>	0,24
p.L.1_7	8,65*106	4,20*106	1,48*105	2,89*104	2,66*105	1,79*10 <sup>2</sup>	5,60	4,20*10 <sup>1</sup>	0,00	0,76	5,33	0,00
p.L.1_8	5,09*106	3,42*107	3,91*10 <sup>5</sup>	2,57*10 <sup>4</sup>	2,17*105	3,50*10 <sup>3</sup>	5,86*10 <sup>2</sup>	4,25*103	3,42	2,98*10 <sup>1</sup>	$2,40*10^{2}$	1,42
p.L.1_10	1,12*106	4,20*106	1,48*105	6,00*10 <sup>3</sup>	2,85*104	6,06*10 <sup>2</sup>	1,13*10 <sup>2</sup>	4,25*10 <sup>2</sup>	1,49*10 <sup>1</sup>	n.d.	n.d.	n.d.

Versuch_PZ	Lebendzell	Lebendzellzahl [Zellen/ml]											
[d]	APB			DNB			MKB	МКВ			SRB		
	Median	Max	Min	Median	Max	Min	Median	Max	Min	Median	Max	Min	
p.L.2_1	4,37*105	3,61*106	$1,17*10^{3}$	3,38*10 <sup>2</sup>	$2,91*10^{3}$	5,37*10 <sup>1</sup>	2,10	1,67*10 <sup>1</sup>	0,14	1,17	7,92	0,00	
p.L.2_2	4,35*106	3,61*107	$1,17*10^{3}$	6,86*10 <sup>3</sup>	4,74*10 <sup>4</sup>	4,20*10 <sup>2</sup>	1,73	7,92	0,150	2,04	7,00	0,19	
p.L.2_3	2,49*105	2,43*106	1,18*105	2,01*104	7,27*104	1,42*10 <sup>1</sup>	3,11*10 <sup>2</sup>	5,76*10 <sup>2</sup>	1,15*10 <sup>1</sup>	0,99	2,27	0,12	
p.L.2_4	1,60*106	1,69*107	2,56*105	2,02*104	7,27*104	1,75*10 <sup>1</sup>	5,89*10 <sup>2</sup>	1,12*10 <sup>3</sup>	5,72	0,50	2,40	0,12	
p.L.2_7	2,01*106	7,27*106	$1,17*10^{3}$	3,00*105	$2,85*10^{6}$	1,65	3,29*10 <sup>2</sup>	6,00*10 <sup>2</sup>	5,72	0,25	2,40	0,00	
p.L.2_8	2,90*106	2,66*107	1,48*10 <sup>3</sup>	3,00*105	$2,85*10^{6}$	1,17*10 <sup>2</sup>	1,20*10 <sup>3</sup>	2,34*10 <sup>3</sup>	5,72	0,75	3,86	0,12	
p.L.2_10	4,31*105	2,29*106	3,47*105	3,00*105	$2,85*10^{6}$	1,42*10 <sup>2</sup>	2,04*10 <sup>3</sup>	7,27*10 <sup>3</sup>	5,72	n.d.	n.d.	n.d.	

Durch die zunehmende Bestrahlungsdosis wurde die Phase des stärksten Wachstums der MKB zu einem früheren Kultivierungszeitpunkt induziert. Die Folge war eine höhere Zellkonzentration als in der Dunkelkontrolle. Da jedoch in allen Versuchen ein deutliches Aufwachsen der MKB im späteren Kulturverlauf nachgewiesen wurde und den Fermentationen keine C1-Verbindung als C-Quelle zugegeben wurde, mussten diese Spezies im Kulturverlauf entstehende Stoffwechselprodukte nutzen, deren Produktion durch die zunehmende Bestrahlungsdosis möglicherweise begünstigt wurde.

#### 4.1.4 Substratverwertungsspektrum

Zur Analyse der Substratverwertungsspektren (metabolischer Fingerprint) wurden die jeweiligen Gemeinschaften auf die Verwertung von 31 verschiedenen C-Quellen getestet. Die Zeitpunkte der Probennnahme wurden so gewählt, dass die mittels EcoPlate<sup>TM</sup> erfassten Substratverwertungsspektren den drei Phasen wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben, zugeordnet werden konnten (1 d = Phase I; 2 d = Phase II; 8 d = Phase III).

Sowohl die Dunkelkontrolle als auch die bestrahlten Gemeinschaften konnten 16 der 31 Substrate verwerten (Pyruvat-Methylester, Tween 40, Tween 80,  $\alpha$ -Cyclodextrin, Glycogen, i-Erythritol, D-Mannitol, N-Acetyl-D-Glucosamin, D-Glucosaminsäure, D-Galactonsäure, Itaconsäure, Malonsäure, L-Arginin, L-Asparagin, L-Phenylalanin, L-Serin). Hydroxybenzoesäure wurde von keiner Gemeinschaft metabolisiert. Die Nutzung der restlichen Substrate variierte in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit und der Bestrahlungsdosis (Tab. 4.3). Problematisch war die Auswertung, da nach einem Kultivierungstag die Substratverwertungsspektren stark streuten, obwohl innerhalb der ersten 24 h die Kulturbedingungen identisch waren. Somit schien das Vermögen der als Inoculum verwendeten Gemeinschaft verschiedene Substrate zu metabolisieren von mehreren Faktoren abhängig zu sein. Im restlichen Kulturverlauf lag die Anzahl der nicht verwerteten Substrate der bestrahlten Gemeinschaften stets über denen der Dunkelkontrolle. Glucose-1-Phosphat konnte nach 24 h von keiner Gemeinschaft metabolisiert werden (Tab. 4.3). Im Gegensatz zu den bestrahlten Gemeinschaften, war nur die Dunkelkontrolle in der Lage, Glucose-1-Phosphat nach

2 und 8 Tagen zu metabolisieren. Glucose-1-Phosphat ist ein Intermediat beim Celluloseabbau und könnte somit als Indikator für eine Störung dieses Stoffwechselweges gewertet werden.

**Tab. 4.3**: Substratverwertungsspektren an ausgewählten Kultivierungstagen (1, 2 und 8 d) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis. Ausgewählte verwertete (+) und nicht verwertete (-) Substrate; D = Dunkelkontrolle (n = 3); p.L.1 = polychromatisches Licht 1 [15 W] (n = 2); p.L.2 = polychromatisches Licht 2 [25 W] (n = 2);  $\Box$ : Substratnutzung <sup>1</sup> durch die Bestrahlung inhibiert und <sup>2</sup> immer inhibiert;  $\Sigma$  (-): Anzahl der nichtverwerteten Substrate pro Kultivierungstag; Nr. = Substratnummer der C-Quellen

Substrate	Nr.	Dunkel	l		p.L.1 [	15 W]		p.L.2 [	25 W]	
		1 d	2 d	8 d	1 d	2 d	8 d	1 d	2 d	8 d
α-Cyclodextrin	16	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycogen	20	+	+	+	+	+	+	-	+	-
D-Cellobiose	24	+	+	+	+	+	+	-	+	+
α-D-Lactose	28	+	+	+	+	+	+	-	+	+
β-Methyl-D-Glycosid	1	+	+	+	+	+	+	-	+	+
D-Xylose	5	+	+	+	+	+	-	+	+	+
i-Erythritol	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N-Acetyl-D- Glucosamin	17	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucosaminsäure	21	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Glucose-1-Phosphat <sup>1</sup>	25	-	+	+	-	-	-	-	-	-
D,L-α-Glyzerol Phosphat	29	-	+	+	+	-	-	+	-	-
D-Galactonsäure γ- Lacton	2	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galactonsäure	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-Hydroxybenzoesäure <sup>2</sup>	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Hydroxybezoesäure	14	+	+	+	-	+	-	-	-	+
γ-Hydroxybuttersäure	18	+	+	+	+	+	+	-	+	+
α-Ketobuttersäure	26	-	-	+	-	-	+	+	-	-

Substrate	Nr. Dunkel				p.L.1 [15 W]			p.L.2 [	25 W]	
		1 d	2 d	8 d	1 d	2 d	8 d	1 d	2 d	8d
D-Malonsäure	30	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phenylethylamin	27	+	+	+	+	+	-	+	+	+
L-Threonin	19	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Σ(-)		6	2	1	5	4	6	9	5	6

Die Substratverwertungsspektren der untersuchten Gemeinschaften wurden mit Hilfe der Partiellen Komponentenanalyse (PCA) ausgewertet (Garland & Mills, 1991). In Abbildung 4.5 ist die PCA der Substratverwertungsspektren der Gemeinschaften unter Bestrahlungseinfluss und das Verwertungsspektrum der Dunkelkontrolle dargestellt. An Hand der Eigenvalues des Faktors x (0,391) und des Faktors y (0,219) konnten 61 % der Daten inklusive deren Varianz mit diesem zweidimensionalen Modell erklärt werden.

Die bereits erwähnten Unterschiede nach einem Tag in den Substratverwertungsspektren der Gemeinschaften werden auch in Abbildung 4.5 deutlich. Die Spezieszusammensetzung der Inocula sowie weitere unbekannte Faktoren könnten dafür verantwortlich sein. Vorstellbar wäre auch, dass sich die Gemeinschaften ohne erkennbaren Selektionsdruck mit optimalen Wachstumsbedingungen ungerichtet entwickelten, was dann zu einer breiten Streuung in der Analyse führte.

Nach Kultivierungstagen 2 lagen die Substratverwertungsspektren aller Gemeinschaften nah beieinander (Abb. 4.6). Die Zusammensetzung der Gemeinschaft wurde in dieser Phase, die mit der höchsten Stoffwechselaktivität und dem höchsten Wachstum zusammenfiel, wahrscheinlich primär durch die Substratverwertung (Pyruvat, Acetat und Casaminoacids) bestimmt. Nach 8 Kultivierungstagen unterschieden sich die Substratverwertungsspektren der Gemeinschaften erneut. Somit musste zwischen 2 und 8 Tagen ein anderer Faktor wirken, der die Entwicklung der Gemeinschaft beeinflusste.



**Abb. 4.5:** Partielle Komponentenanalyse (PCA) des Substratverwertungsspektrums an ausgewählten Kultivierungstagen (1, 2 und 8 d), in Abhängigkeit von der Bestrahlungdosis. • Dunkelkontrolle (n = 3); • polychromatisches Licht 1 [15 W] (n = 2); • polychromatisches Licht 2 [25 W] (n = 2)

Während die Dunkelkontrolle vom Faktor y beeinflusst wurde, wurden die bestrahlten Gemeinschaften von den Faktoren x und y beeinflusst. Der Einfluss des Faktors x nahm mit zunehmender Bestrahlungsdosis zu. Bisher wurde festgestellt, dass in dieser Kultivierungszeit (2 - 8 d) sowohl die Stoffwechselaktivität, als auch das Wachstum (Gesamtzellzahl und APB) in allen Gemeinschaften gering waren. Gleichzeitig wuchsen die MKB und DNB in dieser Zeit stärker in den bestrahlten Gemeinschaften. Somit könnten die unterschiedlichen Anteile der physiologischen Gruppen für die Änderungen im Substratverwertungsspektrum verantwortlich sein.

#### 4.1.5 Phylogenetische Zusammensetzung

Die Methode der FISH wurde eingesetzt, um Hinweise über die phylogenetische Zusammensetzung der Gemeinschaften zu erhalten. Auf Grund der spezifischen Probleme dieser Methode (Kapitel 4.3.4) kann die Interpretation nur in Kombination mit anderen Ergebnissen erfolgen.

Innerhalb der Gruppe der Eubakterien wurde zwischen weiteren 6 phylogenetischen Gruppen unterschieden, die im marinen Milieu von Bedeutung sind. Ein Großteil der Bakterien konnte diesen phylogenetischen Gruppen zugeordnet werden (Tab. 4.4). Bei der Durchführung der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridierung kam es zu den im Kapitel 3.4.3 beschriebenen starken methodische Schwankungen. Trotzdem war es möglich, Aussagen über Tendenzen bestimmter phylogenetischer Gruppen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis zu treffen. Die phylogenetische Zusammensetzung der Gemeinschaften änderte sich sowohl innerhalb der Kultivierungszeit als auch in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis. Diese Abhängigkeit wurde in einer Zu- bzw. Abnahme einzelner phylogenetsicher Gruppen deutlich (Abb. 4.6). Zu Kulturbeginn dominierten die Gammaproteobakterien (Abb. 4.6-A), während nach Kultivierungstagen die phylogenetische 8 Zusammensetzung in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis variierte (Abb. 4.6-B).



Abb. 4.6: Phylogenetische Zusammensetzung der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis. (A) prozentualer Anteil der Phyla an der Gesamtzellzahl nach einem Kultivierungstag; (B) prozentualer Anteil der Phyla an der Gesamtzellzahl nach 8 Kutivierungstagen; von links nach rechts: Dunkelkontrolle (n = 3); p.L.1 = polychromatisches Licht 1 [15 W] (n = 2); p.L.2 = polychromatisches Licht 2 [25 W] (n=2); ○ nicht hybridisierbarer Anteil;
Alphaproteobakterien; ● Betaproteobakterien; ● Gammaproteobakterien; ● Deltaproteobakterien;
Cytophaga-Flavobakterien; ● unbekannte Phyla innerhalb der Eubakterien

**Tab. 4.4:** Phylogenetische Zusammensetzung der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis und der Kultivierungszeit. Versuch\_PZ = Versuchstyp mit Probennahmezeitpunkt in Tagen (1 -10); Inoculum = Zellzahl direkt nach Inoculumzugabe (n = 3); GZ= Gesamtzellzahl; EUB338 = Eubakterien; ALF1b = Alphaproteobakterien; BET42a = Betaproteobakterien; GAM42a = Gammaproteobakterien; SRB385 = Deltaproteobakterien; HGC69a = Grampositive Bakterien mit hohem GC-Gehalt; CF319a = Cytophaga-Flavobakterien; ? EUB = unbekannter Anteil innerhalb der Eubakterien; Dunkel = Dunkelkontrolle (n = 3); p.L.1 = polychromatisches Licht 1 [15 W] (n = 2); p.L.2 = polychromatisches Licht 2 [25 W] (n = 2); k.D. = keine Daten; Konzentrationsangabe = Median (25. - 75. Perzentil)

Versuch_PZ		Anteil der	Phyla an GZ	[%] (25 – 75.	Perzentil)					
[d]	GZ [Zellen/ml]	EUB338	n.h.	AlLF1b	BET42a	GAM42a	SRB385	HGC69a	CF319a	? EUB
Inoculum	4,34*106	8	92	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.
Dunkel_1	1,61*108	48 (36-61)	52	3 (0-7)	7 (3-19)	19 (5-32)	0 (0-0)	0 (0-4)	3 (0-4)	16
Dunkel_2	1,19*10 <sup>9</sup>	75 (49-92)	25	3 (0-7)	20 (11-30)	32 (23-63)	0 (0-2)	0 (0-2)	2 (0-6)	18
Dunkel_3	5,95*10 <sup>8</sup>	62 (44-72)	38	3 (0-5)	15 (3-34)	23 (9-47)	2 (0-5)	0 (0-3)	5 (1-9)	14
Dunkel_4	5,46*10 <sup>8</sup>	46 (32-68)	54	3 (1-4)	15 (9-27)	16 (7-44)	1 (0-3)	2 (0-3)	2 (0-3)	7
Dunkel_7	3,10*10 <sup>8</sup>	41 (31-48)	59	3 (2-8)	14 (4-20)	17 (4-29)	0 (0-3)	0 (0-2)	16 (5-19)	-
Dunkel_8	$2,17*10^{8}$	33 (26-39)	67	7 (3-10)	3 (3-6)	7 (3-12)	0 (0-3)	0 (0-0)	10 (6-13)	6
Dunkel_10	$1,74*10^{8}$	46 (37-56)	54	4 (0-4)	11 (7-20)	25 (16-34)	7 (5-11)	4 (0-4)	11 (4-11)	-
p.L.1 [25 W]_1	1,92*10 <sup>8</sup>	71 (58-85)	29	4 (0-9)	11 (9-12)	30 (18-39)	0 (0-3)	0 (0-3)	2 (0-4)	24
p.L.1 [25 W]_2	1,45*109	61 (50-76)	39	2 (0-3)	39 (3-53)	45 (30-58)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-2)	-
p.L.1 [25 W]_3	5,70*10 <sup>8</sup>	71 (54-87)	29	1 (0-4)	34 (29-41)	47 (35-57)	1 (0-3)	0 (0-2)	6 (1-8)	-
p.L.1 [25 W]_4	4,65*108	50 (28-80)	50	2 (0-2)	14 (0-38)	48 (35-65)	2 (0-2)	0 (0-2)	0 (0-0)	-
p.L.1 [25 W]_7	5,77*10 <sup>8</sup>	30 (16-63)	70	4 (2-8)	14 (0-38)	14 (2-38)	1 (0-2)	0 (0-1)	2 (1-4)	-
p.L.1 [25 W]_8	$2,76*10^{8}$	31 (15-48)	69	6 (3-11)	3 (0-6)	7 (6-16)	3 (0-7)	0 (0-2)	16 (10-20)	-
p.L.1 [25 W]_10	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D

Versuch_PZ		Anteil der Phyla an GZ [%] (25. und 75. Perzentil)								
[d]	GZ [Zellen/ml]	EUB338	n.h.	AlLF1b	BET42a	GAM42a	SRB385	HGC69a	CF319a	? EUB
p.L.2 [25 W]_1	7,67*10 <sup>7</sup>	64 (49-87)	36	1 (0-4)	16 (8-23)	26 (8-38)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	21
p.L.2 [25 W]_2	3,23*10 <sup>8</sup>	84 (67-98)	16	1 (0-4)	3 (1-15)	62 (54-87)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	18
p.L.2 [25 W]_3	2,04*108	79 (64-92)	21	1 (0-4)	8 (1-15)	72 (53-92)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	-
p.L.2 [25 W]_4	$1,82*10^8$	65 (53-81)	35	0 (0-2)	4 (3-10)	23 (9-43)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-0)	38
p.L.2 [25 W]_7	$1,88*10^8$	71 (59-82)	29	2 (1-5)	32 (21-43)	29 (13-63)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	8
p.L.2 [25 W]_8	$1,89*10^8$	46 (35-66)	54	0 (0-2)	8 (3-44)	1 (0-9)	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-3)	37
p.L.2 [25 W]_10	$1,77*10^{8}$	44 (33-49)	56	0 (0-2)	15 (13-21)	23 (19-27)	0 (0-2)	0 (0-0)	0 (0-2)	6

Die Gruppen der Deltaproteobakterien und grampositiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt nahmen stets einen geringen prozentualen Anteil ein bzw. lagen unterhalb der Nachweisgrenze. Während ein geringer Anteil der Alphaproteobakterien in der Dunkelkontrolle immer nachweisbar war, so war dies in den bestrahlten Gemeinschaften meist nicht der Fall. Gemeinsam war allen Gemeinschaften, dass der Anteil der nicht hybridisierbaren Zellen nach 3 Tagen stetig zunahm (Tab. 4.4), andere nicht untersuchte phylogenetische Gruppen, wie z.B. Planktomyceten und grampositive Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt, könnten dabei eine Rolle spielen.

In der Dunkelkontrolle und der Gemeinschaft unter schwacher Bestrahlungseinwirkung war am Kultivierungsende ein breites phylogenetisches Spektrum nachweisbar, mit einem dominanten Anteil der CFB-Gruppe (Abb. 4.6-B). Im Gegensatz dazu war in der stark bestrahlten Gemeinschaft (p.L.2 [25 W]) die phylogenetische Zusammensetzung stark eingeschränkt, die dominanten Vertreter gehörten zu den Betaproteobakterien. Die CFB-Gruppe schien durch polychromatisches Licht 2 [25 W] stark beeinflusst.

Mit Hilfe einer Clusteranalyse wurde die Quantität der 6 phylogenetischen Gruppen an jedem Kultivierungstag verglichen (Abb. 4.7). Unabhängig von der Bestrahlungsdosis war eine Einteilung in mindestens zwei Cluster möglich, in denen sich die phylogenetische Zusammensetzung am Kultivierungsanfang von dem 8. Kultivierungstag unterschied. Während die Clusterbildung der Dunkelkontrolle und der Gemeinschaft, die schwach bestrahlt (p.L.1 [15 W]) wurde, identisch war (Abb. 4.7-A/B), bildete die Zusammensetzung der stark bestrahlten Gemeinschaft (p.L. 2 [25 W]) drei Cluster. Die Zusammensetzung an den Kultivierungstagen 2 und 3 unterschied sich von denen der anderer Gemeinschaften.



Abb. 4.7: Clusteranalyse der phylogenetischen Zusammensetzung der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis. 1 - 10 = Kultivierungszeit in Tagen. (A) D = Dunkelkontrolle (n = 3); (B) p.L.1 = polychromatisches Licht 1 [15 W] (n = 2); (C) p.L.2 = polychromatisches Licht 2 [25 W] (n = 2); Methode: UPMG = unweighted pair group method of average; Skalierung in Prozent Similarität

# 4.1.6 Struktur der Bakteriengemeinschaft und Präsenz unterschiedlicher Spezies

Um die Struktur der Gemeinschaften und deren Veränderungen auf Speziesebene zu erfassen, wurde an jedem Kultivierungstag DNA isoliert und mittels PCR ein Teilbereich der 16S rRNA (ca. 550 bp) amplifiziert. Anschließend wurde der "genetische Fingerprint" mittels DGGE erfasst und visualisiert. Die DGGE-Analyse zeigte unabhängig von der Bestrahlungsdosis eine Zunahme in der Anzahl der Spezies (Spezieszahl = Anzahl der DNA-Banden) in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit. Dabei waren auch Unterschiede im DNA-Banden-Muster der Gemeinschaften zu erkennen, die den gleichen Kulturbedingungen ausgesetzt waren. Trotzdem waren die dominanten Spezies in allen parallelen Kulturansätzen einer Versuchsart präsent (Abb. 4.8).



**Abb. 4.8:** DNA-Banden-Muster des 16S rRNA Genfragments der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis. Von oben nach unten: Dunkel = Dunkelkontrolle (n = 3); p.L.1 [15 W] = polychromatisches Licht 1 [15 W] (n = 2); p.L.2 [25 W] = polychromatisches Licht 2 [25 W] (n = 2); M = interner DNA-Marker mit B1 = *Muricauda ruestringensis* und T9 = *Alcanivorax jadensis*; 1 - 10 = Kultivierungszeit in Tagen; SB = sequenzierte Banden (1 - 10 = Identifikation (ID) der DNA-Banden; a - c = nicht identifizierte DNA-Banden); rot-markierter Bereich = Banden-ID 5 - 7 inkl. B1 und T9; blau-markierter Bereich = nicht identifizierte DNA-Banden a - c und ID 10/1

Durch die Auswertung des DNA-Banden-Musters konnte gezeigt werden, dass unabhängig von der Bestrahlungsdosis die Anzahl der DNA-Banden bis zum 6. Kultivierungstag zunahm (Abb. 4.9).



Abb. 4.9: Anzahl der DNA-Banden (Spezies) der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit und der Bestrahlungsdosis. Gelb-markierter Bereich = Standardabweichung der Dunkelkontrolle; ● Dunkelkontrolle (n = 3); ○ polychromatisches Licht 1 [15 W] (n = 2);
polychromatisches Licht 2 [25 W] (n = 2)

Beim Vergleich der DNA-Banden-Muster der unterschiedlich behandelten Gemeinschaften ließen sich leichte Unterschiede in der Speziesverteilung feststellen. Eine klare Verschiebung der Zusammensetzung der Gemeinschaft in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis war jedoch nicht nachweisbar (Abb. 4.8). Zur Idendifizierung von einigen Spezies wurden einzelne DNA-Banden aus den DGGE-Gelen ausgeschnitten, amplifiziert und das Amplifikat sequenziert und taxonomisch eingeordnet (Tab. 4.5).

**Tab. 4.5:** Taxonomische Einordnung der sequenzierten 16S rRNA Genfragmente. Band-ID = Nummer der Bande aus dem DGGE (Abb. 4.8); bp = Zahl der sequenzierten Basenpaare; Acc. Number = accession number;  $\gamma$ -Proteo = Gammaproteobakterien; CFB = Cytophaga-Flavobakterien Gruppe.

Phyla	Band-ID (bp)	Acc. Number	Nächster phyl. Nachbar Übereinstimmung [%]	Merkmal des nächsten Nachbarn
γ-Proteo	2 (564)	AY847474	Vibrio chagasii [99]	marines Milieu
CFB	3 (560)	AY847471	Flavobacterium sp. 7BT [98]	Muricauda ruestringensis [1]
Firmicutes	5 (539)	AY847469	Bacillus sp. JMM-4 [98]	
CFB	7 (529)	AY847467	uncultured <i>CFB</i> group <i>bacterium</i> clone ML310-46 [95]	Umweltprobe
CFB	10/1 (495)	AY847473	unculterd <i>Bacteroidetes</i> <i>Bacterium</i> clone Flo-32 [100]	Umweltprobe
CFB	10/2 (410)	AY847472	Brumimicrobium glaciale [99]	Isolat aus Polargegend

Die sequenzierten Amplifikate wurden durch Identifikationsnummern (Band-ID: 1-10) in Abbildung 4.8 gekennzeichnet. Eine Sequenz konnte den Gammaproteobakterien (Band-ID: 2), vier Sequenzen den Cytophagen-Flavobakterien (Band-ID: 3, 7, 10/1, 10/2) und eine weitere Sequenz den Firmicutes (Band-ID: 5) zugeordnet werden. Nicht identifizierte Banden, die zum Teil zu den dominanten Spezies gehörten, wurden durch Buchstaben gekennzeichnet (a - c).

Die Präsenz einzelner Spezies (DNA-Banden-Muster) war von der Bestrahlungsdosis abhängig. Einige **Spezies** hatten eine hohe Toleranz gegenüber der Bestrahlungsdosis, andere Spezies variierten in ihrem Vorkommen und ihrer Intensität (Abb. 4.8). Der rotmarkierte Bereich in Abbildung 4.8 wurde so gewählt, dass er beide Markerstämme umfasste. M. ruestringensis konnte unabhängig von der Bestrahlungsdosis immer nachgewiesen werden, war also gegenüber den Bestrahlungsverhältnissen tolerant. Hingegen wurde A. jadensis nur in einer der drei Dunkelkontrollen nachgewiesen und sporadisch in den Gemeinschaften unter Bestrahlungseinfluss. Auffällig im rotmarkierten Bereich war die Zusammensetzung

der Gemeinschaft nach einem Kultivierungstag, in der in allen Gemeinschaften *Bacillus sp.* (ID = 5) nachgewiesen wurde, der jedoch mit zunehmender Kultivierungsdauer verschwand. Dies könnte die Spezies sein, die zu dem für marine Bakterien untypischen, extrem schnellen Aufwachsen der APB innerhalb des ersten Kultivierungstages führte (Abb. 4.3-B; 4.4-A).

Im blaumarkierten Bereich dominierten die nicht identifizierten Spezies (a, b, c), die unabhängig von der Bestrahlungsdosis auftraten (Abb. 4.9). Jedoch schienen diese Spezies erst nach ca. 5 Kultivierungstagen aufzuwachsen. Diese Spezies hatten entweder eine lange Generationszeit oder waren auf Soffwechselprodukte/Metabolite angewiesen, die erst mit zunehmender Kultivierung entstanden. Besonders in der Gemeinschaft, die der starken Bestrahlungsdosis ausgesetzt war, nahm die Intensität der Banden im blaumarkierten Bereich deutlich zu und zwischen a und b trat eine neue Bande (Spezies) auf. Vergleicht man den zeitlichen Verlauf dieser Speziesverschiebung so fällt auf, dass dies die Phase stärksten Wachstums der DNB und MKB der stark bestrahlten Gemeinschaft war (Abb. 4.4).

Die Clusteranalyse der DGGE-Bandenmuster der verschiedenen Kultivierungsansätze zeigte, dass sich die Gemeinschaft in ihrer Struktur am 2. Kultivierungstag und den restlichen Kultivierungstagen deutlich unterschied (Abb. 4.10). In der Dunkelkontrolle bildete die Struktur der Gemeinschaft zwischen 2 und 8 Kultivierungstagen ein vom ersten Tag abweichendes Cluster und am Kultivierungstag 9 ein weiteres (Abb. 4.10-A). Diese Clusterbildung wurde auch in der schwach bestrahlten Gemeinschaft (p.L.1 [15 W]) nachgewiesen (Abb. 4.10-B). Im Gegensatz dazu wurden für die stark bestrahlte Gemeinschaft (p.L.2 [25 W]) drei Cluster festgestellt (1 d, 2 – 3 d und 4 – 10 d ). Das bedeutete, dass sich die Gemeinschaft nach 2 - 3 Tagen anders entwickelte als die Dunkelkontrolle. Dagegen erfolgte im mittleren Verlauf eine Differenzierung der Gemeinschaft vergleichbar zur Dunkelkontrolle (Abb. 4.10-C).



Abb. 4.10: Clusteranalyse des DNA-Banden-Musters der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis. 1 - 10 = Kultivierungszeit in Tagen (A) D = Dunkelkontrolle (n = 3); (B) p.L.1 = polychromatisches Licht 1 [15 W] (n = 2); (C) p.L.2 = polychromatisches Licht 2 [25 W] (n = 2); Methode: UPMG = unweighted pair group method of average; Skalierung in Prozent Similarität

Vergleicht man die Clusterbildung der unterschiedlich bestrahlten Gemeinschaften, die sich aus der phylogenetischen Zusammensetzung (Abb. 4.7) und aus dem DGGE-Bandenmuster (Abb. 4.10) ergeben, so fallen Gemeinsamkeiten auf. Die Struktur und die phylogenetische Zusammensetzung der Dunkelkontrolle war ähnlich der schwach bestrahlten Gemeinschaft (p.L.1 [15 W]), da sie identische Cluster sowohl in der phylogenetischen als auch in der Spezieszusammensetzung bildeten. Die Zusammensetzung der stark bestrahlten Gemeinschaft (p.L.2 [25 W]) unterschied sich an den Kultivierungstagen 2 und 3 sowohl von der Dunkelkontrolle als auch von der schwach bestrahlten Gemeinschaft (p.L.1 [15 W]). Somit schien die starke Bestrahlungsdosis die Zusammensetzung der Gemeinschaft zwischen 2 und 3 Kultivierungstagen zu verschieben.

## 4.1.7 Überblick über das Zusammenspiel der Effekte

Der Einsatz vielfältiger Methoden ermöglichte einen umfassenden Einblick in die Reaktion der Gemeinschaften auf unterschiedlich starke Bestrahlungsdosen in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit. Da die Methoden häufig starken Schwankungen unterlagen, war es sehr schwierig einen oder mehrere mögliche signifikante Effekte nachzuweisen. Durch die Kombination der Methoden konnte folgendes gezeigt werden:

- Polychromatisches Licht 2 (p.L.2 [25 W]) beeinflußte die Stoffwechselaktivität der Gemeinschaft signifikant. In der stark bestrahlten Gemeinschaft war die CO<sub>2</sub>-Produktion nach zwei Tagen signifikant verringert und der O<sub>2</sub>-Verbrauch am Kultivierungsanfang signifikant erhöht.
- Die Gemeinschaften konnten sich an die unterschiedlichen Bestrahlungsbedingungen anpassen, weil sowohl die Konzentration der Gesamtzellzahl als auch die Lebendzellzahl der Acetat-Pyruvat-konsumierenden Bakterien nicht beeinflusst wurde.
- Mit zunehmender Bestrahlungsdosis wurde das Wachstum der Methanolkonsumierenden- und denitrifizierenden Bakterien stimuliert.
- Das Substratverwertungsspektrum wurde mit zunehmender Bestrahlungsdosis geringer und die Verwertung von Glucose-1-Phosphat wurde inhibiert.
- Mit zunehmender Bestrahlungsdosis veränderte sich die phylogenetische und die Spezieszusammensetzung, jedoch war keine klare Verschiebung erkennbar.

# 4.2 Einfluss von Cadmium auf die Aktivität und Zusammensetzung bakterieller Gemeinschaften

# 4.2.1 Stoffwechselaktivität

Um einen möglichen Einfluss von Cadmiumacetat  $[Cd^{2+} 0,05 \text{ mM}]$  auf die Stoffwechselaktivität der Gemeinschaft zu ermitteln, wurden wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben die Parameter CO<sub>2</sub>-Produktion und O<sub>2</sub>-Verbrauch erfasst und mit denen der unbelasteten Dunkelkontrolle verglichen.

#### **CO<sub>2</sub>-Produktion**

Beim Vergleich der CO<sub>2</sub>-Produktion der cadmiumbelasteten Gemeinschaft mit der in den entsprechenden Phasen der Dunkelkontrolle, wurde festgestellt, dass Cd<sup>2+</sup> die lag-Phase der CO<sub>2</sub>-Produktion verlängerte (Abb. 4.11). Während in der Dunkelkontrolle die lag-Phase 24 h dauerte, war diese Phase in der cadmiumbelasteten Gemeinschaft mit einer Dauer von 48 h signifikant verlängert (Tab. 4.6).



Abb. 4.11:  $CO_2$ -Produktion in Abhängigkeit von der Cadmiumbelastung und Kultivierungszeit. Gelbmarkierter Bereich = Schwankungsbreite der Dunkelkontrolle; • Dunkelkontrolle (n = 3); • cadmiumbelastete Gemeinschaft [Cd<sup>2+</sup> 0,05 mM] (n = 2); ... Maximum der cadmiumbelasteten Gemeinschaft

Als Folge dieser Verlängerung begann die Phase der höchsten CO<sub>2</sub>-Produktionsrate nach 48 h (Phase II). Die Phase II unterschied sich weder in der Länge (34 h) noch in der Menge des produzierten CO<sub>2</sub> von der Dunkelkontrolle ( $\Sigma$ CO<sub>2</sub>: Dunkelkontrolle = 48 mmol/l; Cd<sup>2+</sup>[0,05 mM] = 41 mmol/l).

**Tab. 4.6:** Länge der Phase I (lag Phase) und II (höchste CO<sub>2</sub>-Produktionsrate) in Abhängigkeit von der Cadmiumbelastung. Dunkelkontrolle (n = 3);  $Cd^{2+}$  [0,05 mM] = cadmiumbelastete Gemeinschaft (n = 2); Konzentrationsangabe = Mittelwert ± Standardabweichung (STABW)

Noxe	Phase I	Phase II		
	[h] (± STABW)	[h] (± STABW)		
Dunkelkontrolle	24 (0)	36 (4)		
Cd <sup>2+</sup> [0,05 mM]	48	34		

Eine weitere Folge der signifikant verlängerten lag-Phase war der spätere Übergang in Phase III (geringe Stoffwechselaktivtät) nach 82 h, der in der unbelasteten Dunkelkontrolle nach 60 h erfolgte (Abb. 4.11). Merkmale der Phase III waren wie in der Dunkelkontrolle eine geringe CO<sub>2</sub>-Produktionsrate und ein mehrphasiger Anstieg der CO<sub>2</sub>-Produktion der Gemeinschaft. Nach 10 Kultivierungstagen lag die Gesamt-CO<sub>2</sub>-Produktion der cadmiumbelasteten Gemeinschaft mit 53 mmol/l im unteren Schwankungsbereich der Dunkelkontrolle. Die Präsenz von Cadmiumacetat verlängerte die Adaptionsphase der Gemeinschaft die somit an Kultivierungsbedingungen signifikant, Folge deren eine Selection cadmiumresistenter Spezies sein könnte. Jedoch veränderte sich die grundsätzliche CO<sub>2</sub>-Produktionsrate der Gemeinschaft in Anwesenheit von Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] nicht.

## O<sub>2</sub>-Verbrauch

Die Anwesenheit von  $Cd^{2+}$  [0,05 mM] in der Kultur verzögerte den Start der höchsten O<sub>2</sub>-Verbrauchsrate signifikant um ca. 24 h (Abb. 4.12). Dies war in Einklang mit der CO<sub>2</sub>-Produktion der cadmiumbelasteten Gemeinschaft. Die O<sub>2</sub>-Verbrauchsrate unterschied sich in der cadmiumbelasteten Gemeinschaft in der Phase I und II von der Dunkelkontrolle. Nach 10 Kultivierungstagen wurde jedoch sowohl von der Dunkelkontrolle ( $\Sigma O_2$ : 85 mmo/l) als auch von der belasteten Gemeinschaft ( $\Sigma O_2$ : 73 mmol/l) ähnlich viel O<sub>2</sub> verbraucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Cadmium  $[Cd^{2+} 0,05 \text{ mM}]$  toxisch auf die Gemeinschaft in der Anfangsphase der Kultur wirkte. Durch die Zugabe von 0,05 mM Cd<sup>2+</sup> verlängerte sich die lag-Phase um ca. 24 h. Dieser Effekt war sowohl an Hand der CO<sub>2</sub>-Produktion als auch an Hand des O<sub>2</sub>-Verbrauchs nachweisbar.



Abb. 4.12:  $O_2$ -Verbrauch in Abhängigkeit von der Cadmiumbelastung und Kultivierungszeit. Gelbmarkierter Bereich = Schwankungsbreite der Dunkelkontrolle; • Dunkelkontrolle (n = 3); • cadmiumbelastete Gemeinschaft [Cd<sup>2+</sup> 0,05 mM] (n = 2); ... Maximum der cadmiumbelasteten Gemeinschaft

#### 4.2.2 Wachstum (Gesamtzellzahl und Lebendzellzahl)

Mit Hilfe der Bestimmung der Gesamtzellzahl und Lebendzellzahl der Acetat-Pyruvat-konsumierenden Bakterien (APB) sollte festgestellt werden, ob Cadmiumacetat [Cd<sup>2+</sup> 0,05 mM] einen Einfluss auf das Wachstum der Gemeinschaft hatte. Wie auch schon in Kapitel 4.1.2 beschrieben, lag die Konzentration der Lebendzellzahlen unter der Konzentration der Gesamtzellzahl. Die Anwesenheit von Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] in der Kultur, verstärkte diese Differenz an den ersten zwei Kultivierungstagen (Abb. 4.13). Dies führte im Unterschied zur Dunkelkontrolle in der cadmiumbelasteten Gemeinschaft zum Nachweis einer ausgeprägten lag-Phase (von ca. 24 h). Dieser toxische Effekt, der zur Wachstumsverzögerung am Kultivierungsanfang (Phase I) führte, wurde bereits in der Stoffwechselaktivität dieser Gemeinschaft festgestellt. Nach Adaption, fand das stärkste Wachstum (Phase II) der cadmiumbelasteten Gemeinschaft zwischen dem zweiten und dritten Kultivierungstag statt. mit einem Maximum der Gesamtzellzahl von  $1,67 * 10^8$  Zellen/ml (Tab. 4.9) und der Lebendzellzahl der APB von 2,16 \* 10<sup>7</sup> Zellen/ml (Tab. 4.7). Nach drei Tagen blieb die Zellzahl annähernd konstant und lag unter Berücksichtigung der Schwankungsbreite (Tab. 4.7 und 4.9) im Bereich der unbelasteten Dunkelkontrolle (Abb. 4.13).

Parallelen gab es beim Vergleich der Lebendzellzahl der APB (Abb. 4.13-B) und der CO<sub>2</sub>-Produktion der cadmiumbelasteten Gemeinschaft (Abb. 4.11). In beiden Fällen lagen die Werte der Phase III im unteren Bereich der Schwankungsbreite der Dunkelkontrolle. Wenn sowohl die Lebendzellzahl, als auch die CO<sub>2</sub>-Produktion in Anwesenheit von Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] verringert war, war dies ein Hinweis auf nicht mehr teilungsfähige Zellen.



Abb. 4.13: Zellkonzentration in Abhängigkeit von der Cadmiumbelastung und Kultivierungszeit. (A) Gesamtzellzahl inkl. Maximum und Minimum; (B) Lebendzellzahl der Acetat-Pyruvat-konsumierenden Bakterien (APB) inkl. maximales und minimales 95 %iges Konfidenzintervall; Gelbmarkierter Bereich = Schwankungsbreite der Dunkelkontrollen 0 d = Zellzahl des Inoculums;
Dunkelkontrollen (n = 3); • cadmiumbelastete Gemeinschaft [Cd<sup>2+</sup> 0,05 mM] (n = 2)



Abb. 4.13: Zellkonzentration in Abhängigkeit von der Cadmiumbelastung und Kultivierungszeit. (A) Gesamtzellzahl inkl. Maximum und Minimum; (B) Lebendzellzahl der Acetat-Pyruvatkonsumierenden Bakterien (APB) inkl. maximales- und minimales 95 %iges Konfidenzintervall; Gelbmarkierter Bereich = Schwankungsbreite der Dunkelkontrollen; 0 d = Zellzahl des Inoculums; • Dunkelkontrollen (n = 3); • cadmiumbelastete Gemeinschaft [Cd<sup>2+</sup> 0,05 mM] (n = 2)

# 4.2.3 Wachstum mit verschiedenen C-Quellen und Nutzung von Elektronenakzeptoren

In den cadmiumbelasteten Gemeinschaften  $[Cd^{2+} 0,05 \text{ mM}]$  gehörten sowohl die APB als auch die DNB zu den dominanten physiologischen Gruppen. Die sulfatreduzierenden Bakterien (SRB) waren in geringen Konzentrationen vertreten und die MKB wuchsen erst im späteren Kulturverlauf auf (Tab. 4.7).

#### **Denitrifizierende Bakterien (DNB)**

Die Anwesenheit von Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] verzögerte das Wachstum der DNB in der Gemeinschaft am Anfang der Kultivierung signifikant (Abb. 4.14-A). Dies führte im Unterschied zur Dunkelkontrolle zu einer ausgeprägten lag-Phase (Phase I). Die Folge war eine signifikante Verzögerung der stärksten Wachstumsphase der DNB (Phase II) um ca. 24 h. Nach drei Kultivierungstagen erreichten die DNB eine maximale Zellzahl von 6,8 \*  $10^3$  Zellen/ml, die sich der maximal erreichten Zellzahl der DNB der Dunkelkontrolle anglich (2,67 \*  $10^3$  Zellen/ml) (Tab. 4.7). In der anschließenden Phase III (3 – 10 d) veränderte sich die Zellkonzentration der DNB unwesentlich.

**Tab. 4.7:** Lebendzellzahlen der Acetat-Pyruvat-konsumierenden- (APB), denitrifizierenden- (DNB), sulfatreduzierenden- (SRB) und Methanol-konsumierende Bakterien (MKB) in Abhängigkeit von der Cadmiumbelastung und der Kultivierungszeit. Versuch\_PZ = Versuchstyp mit Probennahmezeitpunkten in Tagen (1 - 10); Inoculum = Zellzahl direkt nach Inoculumzugabe (n = 3); Dunkel = Dunkelkontrolle (n = 3); Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] = cadmiumbelastete Gemeinschaft (n = 2); n.d. = nicht detektierbar; Max/Min = maximales/minimales 95 %iges Konfidenzintervall

Versuch_PZ	Lebendzellzahl [Zellen/ml]											
	APB			DNB			МКВ			SRB		
[d]	Median	Max	Min	Median	Max	Min	Median	Max	Min	Median	Max	Min
Incoculum	$1,1*10^{2}$	$2,40*10^3$	$1,17*10^{1}$	2,64	$1,67*10^{1}$	0,21	0,00	2,40	0,00	6,09	4,33*10 <sup>1</sup>	$2,75*10^{1}$
Dunkel_1	5,53*105	$2,70*10^{6}$	2,56*10 <sup>4</sup>	5,40*10 <sup>2</sup>	7,92*10 <sup>3</sup>	1,17*102	0,00	4,20	0,00	4,96	9,77*10 <sup>1</sup>	1,17
Dunkel_2	3,51*107	3,61*108	3,47*105	7,00*10 <sup>3</sup>	7,81*10 <sup>4</sup>	0,240	n.d.	n.d.	n.d.	4,50	2,26*10 <sup>1</sup>	0,22
Dunkel_3	1,14*107	4,25*108	1,33*106	2,67*10 <sup>3</sup>	2,26*104	7,67	0,00	2,25*10 <sup>2</sup>	0,00	4,21	2,40*10 <sup>1</sup>	0,34
Dunkel_4	1,13*107	2,85*109	1,18*10 <sup>4</sup>	2,67*103	2,40*104	7,67	0,0	2,64*10 <sup>3</sup>	0,00	2,05	2,40*10 <sup>1</sup>	0,19
Dunkel_7	2,29*106	6,11*106	1,86*10 <sup>3</sup>	2,02*103	6,63*105	2,24	0,0	6,62*10 <sup>2</sup>	0,00	2,57	5,89*10 <sup>1</sup>	0,14
Dunkel_8	3,46*105	$2,72*10^{6}$	2,38*10 <sup>3</sup>	6,85*10 <sup>3</sup>	7,27*104	5,47*10 <sup>2</sup>	2,68*10 <sup>1</sup>	6,63*10 <sup>2</sup>	1,42	1,12*101	4,20*10 <sup>2</sup>	0,20
Dunkel_10	2,30*106	7,27*106	5,75*10 <sup>4</sup>	2,77*10 <sup>3</sup>	3,14*104	2,07*10 <sup>2</sup>	1,01*10 <sup>2</sup>	6,63*10 <sup>2</sup>	1,17	0,25	2,40	0,00
$Cd^{2+}_{1}$	2,17*10 <sup>2</sup>	2,29*10 <sup>3</sup>	0,22	7,26	4,89*10 <sup>1</sup>	0,14	n.d.	n.d.	n.d.	3,49	1,87*10 <sup>1</sup>	0,28
$Cd^{2+}_{2}$	1,17*103	6,11*10 <sup>3</sup>	$1,17*10^{1}$	5,84	3,86*10 <sup>1</sup>	0,17	n.d.	n.d.	n.d.	3,10	1,87*10 <sup>1</sup>	0,28
$Cd^{2+}_{3}$	2,16*107	2,14*108	1,44*105	6,80*10 <sup>3</sup>	4,47*104	0,00	n.d.	n.d.	n.d.	0,56	4,20	0,00
$Cd^{2+}_{4}$	1,66*106	6,11*106	1,44*105	4,07*10 <sup>1</sup>	3,34*10 <sup>2</sup>	0,00	1,34	9,77	0,00	1,17	7,92	0,00
$Cd^{2+}_{7}$	1,72*105	2,14*108	1,86*10 <sup>3</sup>	9,90*10 <sup>2</sup>	6,63*10 <sup>3</sup>	1,42	2,51*10 <sup>1</sup>	2,43*10 <sup>2</sup>	0,00	3,23	2,40*10 <sup>1</sup>	0,17
Cd <sup>2+</sup> _8	3,09*105	6,11*106	1,88*10 <sup>3</sup>	2,29*10 <sup>3</sup>	$2,27*10^{4}$	2,38	4,32*10 <sup>2</sup>	3,60*10 <sup>3</sup>	0,00	1,34	9,77	0,00
Cd <sup>2+</sup> _10	1,30*105	6,11*10 <sup>5</sup>	2,56*10 <sup>3</sup>	1,15*104	6,11*10 <sup>4</sup>	2,24	2,89*10 <sup>1</sup>	2,66*10 <sup>2</sup>	0,00	3,98	2,27*101	0,27



Abb. 4.14: Lebendzellzahlen der (A) denitrifizierenden Bakterien (DNB) und (B) Methanolkonsumierenden Bakterien (MKB) in Abhängigkeit von der Cadmiumbelastung und der Kultivierungszeit. k.D. = keine Daten;  $\blacksquare$  Dunkelkontrolle (n = 3);  $\blacksquare$  cadmiumbelastete Gemeinschaft [0,05mM] (n = 2)

#### Methanol-konsumierende Bakterien (MKB)

Sowohl in der cadmiumbelasteten Gemeinschaft als auch in der unbelasteten Dunkelkontrolle wuchsen die MKB erst im späteren Kulturverlauf auf und waren durch eine ausgeprägte lag-Phase I gekennzeichnet (Tab. 4.7). Erstmals konnten die MKB in der cadmiumbelasteten Gemeinschaft nach vier Kultivierungstagen nachgewiesen werden. Die Phase des stärksten Wachstums (Phase II) fand zwischen 4 und 8 Tagen statt, mit einer maximalen Zellkonzentration von  $4,32 * 10^2$  Zellen/ml, die sich der maximal erreichten Zellkonzentration der Dunkelkontrolle  $(1,01 * 10^2$  Zellen/ml) anglich (Abb. 4.14-B).

#### 4.2.4 Substratverwertungsspektrum

Die Fähigkeit der Gemeinschaft zur metabolischen Nutzung verschiedener Stoffklassen wurde mit Hilfe der Analyse des Substratverwertungsspektrums (metabolischer Fingerprint) bestimmt. Die Zeitpunkte der Probennahme wurden so gewählt, dass die mittels EcoPlate<sup>TM</sup> erfassten Substratverwertungsspektren an den Kultivierungstagen 2, 3 und 8 den drei in Abschnitt 4.2.1 beschriebenen Phasen zugeordnet werden konnten (2 d = Phase I; 3 d = Phase II und 8 d = Phase III).

Sowohl die Dunkelkontrolle als auch die cadmiumbelastete Gemeinschaft konnte 20 der angebotenen 31 Substrate verwerten (Pyruvat-Methylester, Tween 40, Tween 80, α-Cyclodextrin, D-Cellobiose, D-Xylose, i-Erythritol, D-Mannitol, N-Acetyl-D-Glucosamin, β-Hydroxybuttersäure, Itaconsäure, D-Malonsäure, L-Arginin, L-Asparagin, L-Phenylalanin, L-Serin, L-Threonin, Glycyl-L-Glutaminsäure, Phenylethylamin, Putrescin). Wie schon in Abschnitt 4.1.4 für die Substratverwertungsspektren der Dunkelkontrolle und der bestrahlten Gemeinschaften festgestellt, war auch die cadmiumbelastete Gemeinschaft nicht in der Lage 2-Hydroxybenzoesäure zu metabolisieren (Tab. 4.8). Jedoch galt für diese Gemeinschaften, dass mit zunehmender Kultivierungszeit die Anzahl der nicht genutzten Substrate abnahm. Dabei war die Anzahl der Substrate, die von der cadmiumbelasteten Gemeinschaft nicht metabolisiert werden konnten, stets größer als die in der Dunkelkontrolle. Zu keinem Zeitpunkt wurde Glucose-1-Phosphat, D,L-Glycin-1-Phosphat und  $\alpha$ -Ketobuttersäure genutzt. Im Gegensatz dazu, metabolisierte die unbelastete Gemeinschaft (Dunkelkontrolle) diese Substrate bereits nach zwei Tagen. Diese Einschränkung hing entweder mit der Inhibierung der entsprechenden Enzyme zusammen oder war mit einer Änderung der Spezieszusammensetzung der Gemeinschaft verbunden. Weiterhin schien die Kultivierungszeit und damit die Fähigkeit zur Anpassung an die Kulturbedingungen von Bedeutung zu sein. Einige Substrate wurden in der Dunkelkontrolle von Anfang an metabolisiert, konnten in der cadmiumbelasteten Gemeinschaft jedoch erst mit zunehmender Kultivierungszeit genutzt werden (Glycogen, a-Cyclodextrin, b-Methyl-D-Glycosid und 4-Hydroxybenzoesäure).

**Tab. 4.8:** Substratverwertungsspektren ausgewählter Kultivierungstage (1, 2, 3 und 8 d) in Abhängigkeit von der Cadmiumbelastung. Ausgewählte verwertete (+) und nicht verwertete Substrate (-); D = Dunkelkontrolle (n = 3); Cd<sup>2+</sup> = cadmiumbelastete Gemeinschaft (n = 2);  $\Box$ : Substratnutzung, <sup>1</sup> durch Cadmium [Cd<sup>2+</sup> 0,05 mM] inhibiert und <sup>2</sup> immer inhibiert;  $\Sigma$  (-): Anzahl der nichtverwerteten Substrate pro Kultivierungstag; Nr. = Substratnutzung der 31 C-Quellen;

		Dunkel			Cd <sup>2+</sup> [0,0	5 mM]	
Substrate	Nr.	1 d	2 d	8 d	2 d	3 d	8 d
α-Cyclodextrin	16	+	+	+	-	+	+
Glycogen	20	+	+	+	-	+	+
D_Cellobiose	24	+	+	+	+	+	+
α-D-Lactose	28	+	+	+	+	+	-
β-Methyl-D-Glycosid	1	+	+	+	-	-	+
D-Xylose	5	+	+	+	+	+	+
i-Erythritol	9	+	+	+	+	+	+
N-Acetyl-D-Glucosamin	17	+	+	+	+	+	+
D-Glucosaminsäure	21	-	+	+	-	+	+
Glucose-1-Phosphat <sup>1</sup>	25	-	+	+	-	-	-
D,L-α-Glyzerolphosphat <sup>1</sup>	29	-	+	+	-	-	-
D-Galactonsäure-y-Lacton	2	-	+	+	-	+	+
D-Galacturonsäure	6	+	+	+	+	+	+
2-Hydroxybenzoesäure <sup>2</sup>	10	-	-	-	-	-	-
4-Hydroxybenzoesäure	14	+	+	+	-	+	+
γ-Hydroxybuttersäure	18	+	+	+	+	+	+
α-Ketobuttersäure <sup>1</sup>	26	-	-	+	-	-	-
D-Malonsäure	+	+	+	+	+	+	+

		Dunkel			Cd <sup>2+</sup> [0,05 mM]		
	Nr.	1 d	2 d	8 d	2 d	3 d	8 d
Phenylethylamin	27	+	+	+	+	+	+
L-Threonin	19	+	+	+	+	+	+
Σ(-)		6	2	1	10	5	5

Das Substratverwertungsspektrum der cadmiumbelasteten Gemeinschaft wurde mit dem der unbelasteten Dunkelkontrolle mittels PCA verglichen (Abb. 4.15). An Hand der Eigenvalues des Faktors x (0,560) und des Faktors y (0,182) konnten 74 % der Daten inklusive deren Varianz in dem zweidimensionalen Modell erklärt werden, wobei der größte Teil der Varianz durch den Faktor x erklärt wurde.



Abb. 4.15: Partielle Komponentenanalyse (PCA) des Substratverwertungsspektrums an ausgewählten Kultivierungstagen (1, 2, 3 und 8 d), in Abhängigkeit von der Cadmiumbelastung. ● Dunkelkontrolle (n = 3); ● cadmiumbelastete Gemeinschaft [0,05 mM] (n = 2)

Die PCA zeigte, dass das Substratverwertungsspektrum der cadmiumbelasteten Gemeinschaft deutlich vom Faktor x beeinflusst wurde und dass der Unterschied zwischen dem 2. und 8. Tag am größten war. Während die Dunkelkontrolle von beiden Faktoren beeinflusst wurde, dominierte in der cadmiumbelasteten Gemeinschaft der Einfluss des Faktors x. Nach drei Kultivierungstagen unterschied sich das Substratverwertungsspektrum der cadmiumbelasteten Gemeinschaft nicht von dem Spektrum der Dunkelkontrolle nach 2 Tagen. Die Zusammensetzung beider Gemeinschaften wurde in dieser Phase, die mit einer Phase hoher Stoffwechselaktivität zusammenfiel, und starken Wachstums durch das

Substratangebot in der Kultur (Acetat, Pyruvat und Casaminoacids) bestimmt. In der anschießenden Phase geringerer Stoffwechselaktivität (Phase III) war der Faktor y derjenige, der den Abstand bestimmte. Die Zusammensetzung der Gemeinschaften, die sich als Folge des in Phase I wirkenden Selektionsdrucks verschieden entwickelte, könnte möglicherweise diesem Faktor zugeordnet werden.

### 4.2.5 Phylogenetische Zusammensetzung

Neben der in Kapitel 4.1.5 diskutierten Problematik der hohen Varianz kam ein weiteres Problem durch die Präsenz von Cadmium hinzu. Der Prozentsatz der Zellen, der mit der Eubakterien-Sonde EUB338 detektiert wurde, blieb deutlich unter dem Anteil in der unbelasteten Dunkelkontrolle (Tab. 4.9). Besonders an den ersten beiden Kultivierungstagen war der Anteil der hybridisierten Eubakterien an der Gesamtzellzahl  $\leq 10$  %. Wegen des niedrigen Ausgangswertes nahm, im Gegensatz zu Dunkelkontrolle, der Anteil der hybridisierten Eubakterien bis zum siebten Kultivierungstag stetig zu und blieb dann annähernd gleich. Maximal 24 % der Gesamtzellen konnten den Eubakterien zugeordnet werden. Dieser Wert lag aber immer noch deutlich unter dem niedrigsten detektierten Eubakterienanteil der Dunkelkontrolle (33 %).

Um zu testen, ob die Präsenz von 0,05 mM Cadmiumacetat in den Kulturen einen Einfluss auf die Hybridisierbarkeit der Bakterien hatte, wurde eine definierte Zellzahl eines typischen Gammaproteobakteriums des Wattsediments (*A. jadensis*) mit und ohne Cadmium [Cd<sup>2+</sup> 0,05 mM] einen Tag kultiviert und anschließend hybridisiert. Es zeigte sich, dass Cadmium [Cd<sup>2+</sup> 0,05 mM] sowohl die Hybridisierbarkeit mit der EUB338-Sonde, als auch mit der GAM42a-Sonde signifikant verringerte (Tab. 4.10).

**Tab. 4.10:** Einfluss von Cadmiumacetat [0,05mM] auf die Gesamtzellzahl (GZ) und die Hybridisierbarkeit der Targetzellen. Anteil der Eubakterien (EUB) und Gammaproteobakterien (GAM) bezogen auf die Gesamtzellzahl [%] unter Verwendung des Referenzstammes *A. jadensis*. Konzentrationsangabe: Median (25. und 75. Perzentil);  $-Cd^{2+} =$  ohne Cadmium (n = 3);  $+Cd^{2+} =$  Cadmiumhaltig [Cd<sup>2+</sup> 0,05 mM] (n = 3)

Probe	GZ [Zellen/ml]	Anteil EUB an GZ [%]	Anteil GAM an GZ [%]
A. jadenisis -Cd <sup>2+</sup>	2,39E+07	47 (41-59)	56 (29-100)
<i>A. jadenisis</i> +Cd <sup>2+</sup>	2,32E+07	0 (0-0)	6 (6-12)

Die Ursachen konnten mit diesem Versuchsansatz nicht geklärt werden. Jedoch sind folgende Erklärungen möglich:

- Die Anwesenheit von Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] führte zu einer verringerten ribosomalen Kopienzahl in den Zellen, die zur Herabsetzung der Detektierbarkeit mittels rRNA gerichteter Oligonukleotidsonden führte.
- Durch morphologische Änderungen der Zelle konnten die Sonden das Target nicht erreichen.
- 3. Das Fluorochrom der Sonde reagierte mit Cd<sup>2+</sup>.

Eine grundsätzliche Erhöhung der Hybridisierungseffizienz um ca. 50 % wurde mit CARD-FISH (catalyzed reporter deposition) nachgewiesen (Ishii *et al.* 2004). Allerdings wurde diese Methode noch nicht für Zellen unter Schwermetalleinfluss eingesetzt. Auf Grund der Problematik der angewandten Methode sind alle Hybridisierungsdaten der cadmiumbelasteten Gemeinschaften unter Vorbehalt zu betrachten.

**Tab. 4.9:** Phylogenetische Zusammensetzung der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Cadmiumbelastung und der Kultivierungszeit. Versuch\_PZ = Versuchstyp mit Probennahmezeitpunkt in Tagen (1-10); Inoculum = Zellzahl direkt nach Inoculumzugabe; GZ = Gesamtzellzahl; EUB338 = Eubakterien; ALF1b = Alphaproteobakterien;BET42a = Betaproteobakterien; GAM42a = Gammaproteobakterien; SRB385 = Deltaproteobakterien; HGC69a = Grampositive Bakterien mit hohem GC-Gehalt;CF319a = Cytophaga- Flavobakterien; ? EUB = unbekannter Anteil innerhalb der Eubakterien; Dunkel = Dunkelkontrolle (n = 3); Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] = cadmiumbelastete Gemeinschaft(n = 2); n.h. = nicht hybridisierbar; Konzentrationsangabe = Median (25.-75. Perzentil).

Versuch_PZ		Anteil der Phyla an GZ [%] (25. und 75. Perzentil)								
[d]	GZ [Zellen/ml]	EUB338	n.h.	AlLF1b	BET42a	GAM42a	SRB385	HGC69a	CF319a	? EUB
Inoculum	4,34*106	8	92	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.
Dunkel_1	1,61*108	48 (36-61)	52	3 (0-7)	7 (3-19)	19 (5-32)	0 (0-0)	0 (0-4)	3 (0-4)	16
Dunkel_2	1,19*10 <sup>9</sup>	75 (49-92)	25	3 (0-7)	20 (11-30)	32 (23-63)	0 (0-2)	0 (0-2)	2 (0-6)	18
Dunkel_3	5,95*10 <sup>8</sup>	62 (44-72)	38	3 (0-5)	15 (3-34)	23 (9-47)	2 (0-5)	0 (0-3)	5 (1-9)	14
Dunkel_4	5,46*10 <sup>8</sup>	46 (32-68)	54	3 (1-4)	15 (9-27)	16 (7-44)	1 (0-3)	2 (0-3)	2 (0-3)	7
Dunkel_7	3,10*108	41 (31-48)	59	3 (2-8)	14 (4-20)	17 (4-29)	0 (0-3)	0 (0-2)	16 (5-19)	-
Dunkel_8	2,17*108	33 (26-39)	67	7 (3-10)	3 (3-6)	7 (3-12)	0 (0-3)	0 (0-0)	10 (6-13)	6
Dunkel_10	$1,74*10^{8}$	46 (37-56)	54	4 (0-4)	11 (7-20)	25 (16-34)	7 (5-11)	4 (0-4)	11 (4-11)	-
Cd <sup>2+</sup> [0,05 mM]_1	9,92*106	6 (0-13)	94	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-6)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	6
Cd <sup>2+</sup> [0,05 mM]_2	1,18*107	10 (0-13)	90,0	0 (0-0)	4 (0-10)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-7)	6
Cd <sup>2+</sup> [0,05 mM]_3	1,67*108	24 (10-36)	76	0 (0-10)	0 (0-0)	0 (0-20)	0 (0-6)	0 (0-0)	0 (0-0)	24
Cd <sup>2+</sup> [0,05 mM]_4	1,49*109	17 (8-25)	83	8 (0-10)	0 (0-0)	0 (0-8)	0 (0-2)	0 (0-0)	0 (0-8)	9
Cd <sup>2+</sup> [0,05 mM]_7	1,12*108	22 (17-33)	78	17 (11-22)	0 (0-0)	0 (0-6)	0 (0-0)	0 (0-0)	6 (0-6)	-
Cd <sup>2+</sup> [0,05 mM]_8	7,69*10 <sup>7</sup>	18 (15-25)	82	10 (7-15)	0 (0-2)	2 (0-4)	0 (0-2)	0 (0-0)	2 (2-3)	4
Cd <sup>2+</sup> [0,05 mM]_10	1,36*108	20 (12-27)	80	13 (7-16)	0 (0-3)	2 (0-4)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-3)	5

Nach einem Kultivierungstag konnten 6 % der Gesamtzellzahl den Eubakterien zugeordnet werden, die wiederum nicht phylogenetisch eingeordnet werden konnten (Abb. 4.16-A). Die in dieser Arbeit nicht aufgelisteten Archaea und Eukarya nahmen jeweils einen Anteil von  $\leq$  5 % ein. Somit war ein Großteil der Gesamtzellzahl keiner der drei existierenden Phyla (Eubakterien, Archaea, Eukarya) zuzuordnen. Da dieser Kultivierungszeitraum sowohl mit der lag-Phase der Stoffwechselaktivität als auch des Wachstums in der cadmiumbelasteten Gemeinschaft zusammenfiel, könnte eine zu geringe Kopienzahl der Ribosomen in den Bakterienzellen die Hybridisierbarkeit der Zellen verhindern. Erst nach vier Kultivierungstagen konnten Alphaproteobakterien kontinuierlich nachgewiesen werden, die mit 10 % den größten Anteil innerhalb der phylogenetischen Gruppen bis zum Kultivierungsende ausmachten (Abb. 4.16-B). Jedoch konnte nicht ausgeschlossen werden, dass andere phylogenetische Gruppen in der Gemeinschaft vorhanden waren, die morphologisch so verändert waren, dass sie nicht detektiert werden konnten.



Abb. 4.16: Phylogenetische Zusammensetzung der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Cadmiumbelastung. (A) prozentualer Anteil der Phyla an der Gesamtzellzahl nach einem Kultivierungstag; (B) prozentualer Anteil der Phyla an der Gesamtzellzahl nach 8 Kutivierungstagen; von links nach rechts: Dunkelkontrolle (n = 3); Cd<sup>2+</sup> = cadmiumbelastete Gemeinschaft [0,05 mM]);
nicht hybridisierbarer Anteil; Alphaproteobakterien; Betaproteobakterien;
Gammaproteobakterien; Deltaproteobakterien; Cytophaga-Flavobakterien; unbekannte Phyla innerhalb der Eubakterien

# 4.2.6 Struktur der Bakteriengemeinschaft und Präsenz unterschiedlicher Spezies

Das DNA-Banden-Muster der Dunkelkontrolle und der Gemeinschaften, die der Noxenkombination ausgesetzt waren, wurde in Abbildung 4.17 verglichen. Wie auch in der Dunkelkontrolle nahm die Anzahl der DNA-Banden in der cadmiumbelasteten Gemeinschaft mit zunehmender Kultivierungszeit zu. Obwohl die Struktur der DNA-Banden-Muster in den parallel geführten cadmiumbelasteten Gemeinschaften variierten, waren in beiden Gemeinschaften die selben Spezies dominant.



Abb. 4.17: DNA-Banden-Muster des 16S rRNA Genfragments der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Cadmiumbelastung. Von oben nach unten: Dunkel = Dunkelkontrolle (n = 3); Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] = cadmiumbelastete Gemeinschaft [0,05 mM] (n = 2); M = interner DNA-Marker mit B1 = *Muricauda ruestringensis* und T9 = *Alanivorax jadensis*; 1 – 10 = Kultivierungszeit in Tagen; SB = sequenzierte Banden (1 – 10 = Identifikation (ID) der DNA-Banden; a – c = dominante nicht identifizierte Banden); rot-markierter Bereich = Banden-ID 5 – 7 incl. B1 und T9; blau-markierter Bereich = nicht identifizierte Spezies a – c und Banden-ID 10/1

Die toxische Wirkung von Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] bestätigte sich in der Anfangsphase der Kultivierung auch in Bezug auf die Anzahl der nachweisbaren Spezies im DGGE (Abb. 4.18). Nach Adaption der Gemeinschaft kam es bis zum 7. Kultivierungstag zu einer kontinuierlichen Zunahme der Speziesanzahl. Gleichzeitig wurde an diesem Tag das Maximum der Anzahl der DNA-Banden sowohl in der Dunkelkontrolle als auch in der cadmiumbelasteten Gemeinschaft erreicht, die sich anschließend nicht mehr von der Dunkelkontrolle unterschied.



**Abb. 4.18:** Anzahl der DNA-Banden (Spezies) der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit und der Cadmiumbelastung. Gelb-markierter Bereich = Standardabweichung der Dunkelkontrolle;  $\bullet$  Dunkelkontrolle (n = 3);  $\bullet$  cadmiumbelastete Gemeinschaft [0,05 mM] (n = 2)

Vergleicht man das DNA-Banden-Muster der unterschiedlich behandelten Gemeinschaften, so ließen sich Veränderungen in der Speziesverteilung feststellen (Abb. 4.17). Im Vergleich zur Dunkelkontrolle war eine Verschiebung der dominanten Spezies zum rot-markierten Bereich erkennbar (Abb. 4.17). Dieser Bereich umfasste auch das DNA-Banden-Muster der beiden Markerstämme *M. ruestringensis* und *A. jadensis*, die beide in den cadmiumbelasteten Gemeinschaften nachweisbar waren, aber nicht dominierten. Jedoch wuchsen nach drei bis vier Tagen dominante Spezies in diesem Bereich auf. Wagt man den Vergleich zu den Ergebnissen der Fluoreszenz-*In-Situ*-Hybridiseirung, so müssten dies die

Alphaproteobakterien sein. Beim Vergleich der DNA-Banden-Muster der Gemeinschaften des blau markierten Bereichs in Abbildung 4.17 fällt auf, dass zwar einige schwache DNA-Banden nachweisbar waren, dass jedoch nach 7 Kultivierungstagen die Spezies, die durch Bande-ID 7 (uncultured *CFB bacterium*) repräsentiert wurde, dominierte. In der Dunkelkontrolle konnte diese Bande bereits nach 5 Kultivierungstagen nachgewiesen werden. Trotz der veränderten Zusammensetzung dieser Gemeinschaft, erreichte sie in der Phase höchster Stoffwechselaktivität, eine ebenso hohe Zellzahl wie die Dunkelkontrolle (Abb. 4.14).

Mittels Clusteranalyse wurde geprüft, ob sich die Zusammensetzung der Gemeinschaft in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit und der Cadmiumbelastung änderte. Im Gegensatz zur Dunkelkontrolle (Abb. 4.19-A), war die Struktur der cadmiumbelasteten Gemeinschaft am 1. und 2. Kultivierungstag identisch und unterschied sich von der Struktur der Gemeinschaft an den Tagen 3 –10 (Abb. 4.19–B).



**Abb. 4.19:** Clusteranalyse des DNA-Banden-Musters der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Cadmiumbelastung.1 -10 = Kultivierungszeit in Tagen; (A) D = Dunkelkontrolle (n = 3); (B) Cd = cadmiumbelastete Gemeinschaft [Cd<sup>2+</sup> 0,05 mM] (n = 2); Methode: UPMG = unweighted pair group method of average; Skalierung in Prozent Similarität

# 4.2.7 Überblick über Zusammenspiel der Effekte

Unabhängig von der Methode konnte immmer ein toxischer Einfluss von Cadmium [Cd<sup>2+</sup> 0,05 mM] innerhalb der ersten zwei Kultivierungstage nachgewiesen werden, von dem sich die Gemeinschaft im weiteren Kulturverlauf erholte. Es konnte gezeigt werden, dass

• die Abundanz der SRB und MKB nicht beeinflusst waren,

• die metabolische Diversität mit zunehmender Kultivierungszeit abnahm und

• die Alphaproteobakterien die dominante nachweisbare phylogenetsiche Gruppe war.

# 4.3 Einfluss der kombinierten Einwirkung von Cadmium und polychromatischem Licht auf die Aktivität und Zusammensetzung bakterieller Gemeinschaften

### 4.3.1 Stoffwechselaktivität

Der mögliche Einfluss der kombinierten Einwirkung von Cadmiumacetat  $[Cd^{2+}0,05 \text{ mM}]$  und Bestrahlung auf die Stoffwechselaktivität der Gemeinschaften wurde mit den Parametern  $CO_2$ -Produktion und  $O_2$ -Verbrauch erfasst. Die Daten wurden mit denen der unbelasteten Dunkelkontrolle sowie mit denen der Gemeinschaften unter Einzeleinwirkung verglichen. Untersucht wurden folgende Kombinationen von Noxen: Kombination 1 = p.L.1 [15 W] + Cd^{2+} [0,05 mM] und Kombination 2 = p.L.2 [25 W] + Cd^{2+} [0,05 mM].

## CO<sub>2</sub>-Produktion

Die lag-Phase (Phase I) wurde durch die Präsenz von  $Cd^+$  [0,05 mM] in allen Gemeinschaften signifikant um 24 h verlängert (Abb. 4.20). Hingegen war die Dauer der Phase höchster CO<sub>2</sub>-Produktionsrate (Phase II) von der Bestrahlungsdosis abhängig (Tab. 4.11). Die Folge dieser unterschiedlichen Wirkungen waren unterschiedliche Gesamt-CO<sub>2</sub>-Produktionen in Phase III (Abb. 4.20). Die Menge des insgesamt produzierten CO<sub>2</sub> war in allen belasteten Gemeinschaften geringer als in der Dunkelkontrolle, die nach 10 Tagen Kultivierung 76 mmol/l CO<sub>2</sub> betrug. In den Gemeinschaften, die einer Kombination von Noxen ausgesetzt waren, lag die
produzierte CO<sub>2</sub>-Menge ( $\sum$ CO<sub>2</sub>: Kombination 1 = 44 mmol/l; Kombination 2 = 22 mmol/l) nach 10 Tagen stets unterhalb der von den Gemeinschaften unter Einzelbelastung produzierten CO<sub>2</sub>-Menge ( $\sum$ CO<sub>2</sub>: p.L.1 = 58 mmol/l; p.L.2 = 27 mmol/l; Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] = 61 mmol/l). Durch die Kombination der Noxen kam es in jedem Fall zu einer signifikanten Verringerung der Gesamt-CO<sub>2</sub>-Produktion der Gemeinschaften, deren Ursache mit einer unterschiedlichen Mineralisierung der C-Quellen erklärt werden kann.



Abb. 4.20: CO<sub>2</sub>-Produktion in Abhängigkeit von der Noxe bzw. Kombination der Noxen und Kultivierungszeit. Gelb-markierter Bereich = Schwankungsbreite der Dunkelkontrolle;  $\checkmark$  Start des jeweils 12-stündigen Bestrahlungsrhythmus;  $\bullet$  Dunkelkontrolle (n = 3);  $\circ$  polychromatisches Licht 1 [15 W] (n = 2);  $\bullet$  polychromatisches Licht 2 [25 W] (n = 2);  $\bullet$  cadmiumbelastete Gemeinschaft [Cd<sup>2+</sup> 0,05 mM] (n = 2);  $\circ$  Kombination 1 (p.L.1 [15 W] + Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM]) (n = 1);  $\bullet$  Kombination 2 (p.L.2 [25 W] + Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM]) (n = 1)

**Tab. 4.11:** Länge der Phase I (lag-Phase) und Phase II (höchste CO<sub>2</sub>-Produktionsrate) in Abhängigkeit von der Noxe bzw. Kombination der Noxen. Dunkelkontrolle (n = 3); p.L.1 [15 W] = polychromatisches Licht 1 (n = 2); p.L.2 [25 W] = polychromatisches Licht 2 (n = 2); Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] = cadmiumbelastete Gemeinschaft (n = 2); Kombi 1 = Kombination 1 (p.L.1 [15 W] + Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM]); Kombi 2 = Kombination 2 (p.L.2 [25 W] + Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM]); Konzentrationsangabe: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (STABW)

Noxe	Phase I	Phase II
	[h] (± STABW)	[h] (± STABW)
Dunkelkontrolle	24 (0)	36 (4)
p.L.1 [15 W]	24	32
p.L.2 [25 W]	26	22
Cd <sup>2+</sup> [0,05 mM]	48	34
Kombi 1	42	35
Kombi 2	48	17

## O<sub>2</sub>-Verbrauch

Vergleicht man den  $O_2$ -Verbrauch der Gemeinschaften, wurde eine signifikante Verlängerung der lag-Phase aller cadmiumbelasteten Gemeinschaften festgestellt (Abb. 4.21). Als Folge dieser um 24 h verlängerten Phase I, begann die Phase der höchsten  $O_2$ -Verbrauchsrate erst nach 2 Tagen. Die kombinierte Einwirkung von Cadmium und variierender Bestrahlungsdosis hatte jedoch keinen Einfluss auf den Gesamt- $O_2$ -Verbrauch der Gemeinschaften ( $\sum O_2$ : Dunkelkontrolle = 85 mmol/l; p.L.1 = 88 mmol/l; p.L.2 = 104 mmol/l; Cd<sup>2+</sup> = 74 mmol/l; Kombination 1 = 75 mmol/l; Kombination 2 = 70 mmol/l).

Der einzige signifikante Unterschied wurde in Phase II (höchste O<sub>2</sub>-Verbrauchsrate) der Gemeinschaft unter starker Bestrahlungsdosis (p.L.2) festgestellt. Hier war die O<sub>2</sub>-Verbrauchsrate signifikant höher als in den anderen Kulturansätzen. In der Gemeinschaft unter kombinierter Einwirkung mit Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] und p.L.2 [25 W] war der Effekt nicht nachweisbar.



Abb. 4.21: O<sub>2</sub>-Verbrauch in Abhängigkeit von der Noxe bzw. Kombination der Noxen und Kultivierungszeit. Gelb-markierter Bereich = Schwankungsbreite der Dunkelkontrolle;  $\blacktriangle$  Start des jeweils 12-stündigen Bestrahlungsrhythmus;  $\bullet$  Dunkelkontrolle (n = 3);  $\bigcirc$  polychromatisches Licht 1 [15 W] (n = 2);  $\bullet$  polychromatisches Licht 2 [25 W] (n = 2);  $\bullet$  cadmiumbelastete Gemeinschaft [Cd<sup>2+</sup> 0,05 mM] (n = 2);  $\bigcirc$  Kombination 1 (p.L.1 [15 W] + Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM]) (n = 1);  $\bullet$  Kombination 2 (p.L.2 [25 W] +Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM])

## 4.3.2 Wachstum (Gesamtzellzahl und Lebendzellzahl)

Das Wachstum der Gemeinschaften (Gesamtzellzahl und APB) unter Einwirkung kombinierter Noxen wurde mit dem der Dunkelkontrolle (Kap.4.2.1) und dem der Gemeinschaften, die der Einzelbelastung ausgesetzt waren (Kap. 4.2.1 und 4.2.2), verglichen. Die Lebendzellzahlen aller Gemeinschaften lagen stets unter den Gesamtzellzahlen der jeweiligen Kulturansätze. Die Differenz der Zellkonzentration hing sowohl von der Kultivierungszeit als auch von der Noxe ab (Abb. 4.22).



Abb. 4.22: Zellkonzentrationen in Abhängigkeit von der Noxe bzw. Kombination der Noxen. (A) Gesamtzellzahl inkl. Maximum und Minimum und (B) Lebendzellzahl der Acetat-Pyruvatkonsumierenden Bakterien (APB) inkl. maximales und minimales 95 %iges Konfidenzintervall; Gelbmarkierter Bereich = Schwankungsbreite der Dunkelkontrolle; 0 d = Zellzahl des Inoculums (n = 3); Start des jeweils 12-stündigen Bestrahlungsrhythmus; Dunkelkontrolle (n = 3); polychromatisches Licht 1 [15 W] (n = 2); polychromatisches Licht 2 [25 W] (n = 2); cadmiumbelastete Gemeinschaft [Cd<sup>2+</sup> 0,05 mM] (n = 2); Kombination 1 (p.L.1 [15 W]+ Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM]) (n = 1); Kombination 2 (p.L.2 [25 W] + Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM]) (n = 1)

## Kombination 1 (p.L.1 [15 W] + Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM])

Cadmiumacetat bewirkte, wie schon in den einzeln belasteten Gemeinschaften festgestellt, auch in Kombination mit p.L.1 [15 W] eine signifikante Verlängerung der lag-Phase um ca. 24 h (Abb. 4.22). Weder in der Entwicklung der Zellzahl der Dunkelkontrolle, noch in der bestrahlten Gemeinschaft war die Phase I nachweisbar. Die Folge der unterschiedlichen Entwicklung der Gemeinschaften am Kultivierungsanfang zeigte sich in einer Verschiebung der Phasen II und III. Während sowohl in der Dunkelkontrolle als auch in den bestrahlten Gemeinschaften die Phase des stärksten Wachstum bis zum zweiten Tag anhielt, fand die Phase des stärksten Wachstums in allen cadmiumbelasteten Gemeinschaften erst vom 2. auf den 3. Kultivierungstag statt. Trotz dieser Unterschiede wurden gleiche Maxima, sowohl in der Gesamtzellzahl (Dunkelkontrolle =  $1,19 \times 10^9$  Zellen/ml;  $p.L.1 = 1,45 * 10^9$  Zellen/ml;  $Cd^{2+}$  = 1,49  $10^{9}$ \* Zellen/ml; Kombination  $1 = 2,23 * 10^8$  Zellen/ml) (Tab. 4.4, 4.9 und 4.14), als auch in der = 3,51 Lebendzellzahl der APB (Dunkelkontrolle \*  $10^{7}$ Zellen/ml;  $p.L.1 = 8,56 * 10^{6}$  Zellen/ml; Cd<sup>2+</sup>: 10<sup>7</sup> 2.16 \* Zellen/ml; Kombination  $1 = 8,69 \times 10^{6}$  Zellen/ml) (Tab. 4.2, 4.7 und 4.12) nachgewiesen. In der anschließenden Phase III blieb die Gesamtzellzahl nahezu unverändert und unterschied sich somit nicht von der der Dunkelkontrolle (Abb. 4.22-A). Jedoch wirkte in Phase III die Kombination der Noxen toxisch auf die Lebendzellzahl der APB (Abb. 4.22-B). Während sich die Konzentration der APB in den Gemeinschaften, die der Einzelbelastung ausgesetzt waren, nicht von der der Dunkelkontrolle unterschied, war die Konzentration der APB in der Gemeinschaft, die Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] und p.L.1 [15 W] ausgesetzt war, zwischen dem 7. und 10. Kultivierungstag signifikant verringert. Diese Abnahme der APB konnte nicht mit einer Zell-Lyse erklärt werden, da die Gesamtzellzahl nicht beeinflusst war. Da dieses Phänomen mit einer signifikanten Verringerung der CO2-Produktion im Vergleich zur Dunkelkontrolle einherging (Abb. 4.1), kann man schließen, dass ein Teil der APB inaktiv oder nicht teilungsfähig war.

## Kombination 2 (p.L.2 [25 W] + Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM])

Cadmiumacetat [Cd<sup>2+</sup> 0,05 mM] bewirkte auch in Kombination mit p.L.2 [25 W] eine signifikante Verlängerung der lag-Phase der Gesamtzellzahl um ca. 24 h (Abb. 4.23-A). Die Phase des stärksten Wachstums (Phase II) folgte vom zweiten auf

den dritten Kultivierungstag. Die maximal erreichte Gesamtzellzahl  $(8,06 * 10^7 \text{ Zellen/ml})$  unterschied sich nicht signifikant von der der Dunkelkontrolle  $(1,19 * 10^9 \text{ Zellen/ml})$  und der der einzeln belasteten Gemeinschaften (p.L.2 = 3,23 \*  $10^8$  Zellen/ml; Cd<sup>2+</sup> = 1,49 \* 10<sup>8</sup> Zellen/ml) (Tab. 4.4, 4.9 und 4.14). In der anschließenden Phase III änderte sich die Gesamtzellzahl kaum und lag unter Berücksichtigung der Schwankungsbreite (Tab. 4.12) innerhalb der Grenzen der Dunkelkontrolle. In der Gemeinschaft unter kombinierter Einwirkung mit p.L.2 [25 W] und Cd<sup>2+</sup> [0.05 mM] konnte keine ausgeprägte lag-Phase in der Lebendzellzahlbestimmung nachgewiesen werden. Die Zellzahlen lagen jedoch, wie in allen cadmiumbelasteten Gemeinschaften, signifikant unter den Konzentrationen der Dunkelkontrolle (Abb. 4.22-B). Trotz der fehlenden lag-Phase war das Erreichen der maximalen Zellzahl der APB um ca. 24 h verzögert und entsprach dem Wachstumsverhalten aller Gemeinschaften, in denen Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] in der Kultur präsent war. Die maximal erreichte Lebendzellzahl lag in allen Gemeinschaften im Schwankungsbereich der Dunkelkontrolle (Dunkelkontrolle =  $3.51 \times 10^7$  Zellen/ml;  $p.L.2 = 4.35 * 10^{6}$  Zellen/ml;  $Cd^{2+} = 2.16 * 10^{7}$  Zellen/ml; Kombination  $2 = 1.37 * 10^7$  Zellen/ml) (Tab. 4.2; 4.7 und 4.12). In der folgenden Phase III änderte sich die Konzentration der APB kaum und blieb im Schwankungsbereich der Dunkelkontrolle (Abb. 4.22-B). Im Unterschied zur Gemeinschaft, die der kombinierten Einwirkung von Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] und p.L.1 [15 W] ausgesetzt war, war die Lebendzellzahl der APB in der Gemeinschaft, die Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] und p.L.2 [25 W] ausgesetzt war, in der Phase III nicht beeinflusst. Gemeinsam war beiden Gemeinschaften eine signifikant verringerte Menge des insgesamt produziertem CO<sub>2</sub> nach 10 Tagen (Abb. 4.20).

# 4.3.3 Wachstum mit verschiedenen C-Quellen und Elektronenakzeptoren (metabolische Diversität)

Wie in der Dunkelkontrolle und den mit Einzelnoxen belasteten Gemeinschaften, gehörten die APB und DNB zu den dominanten Spezies (Tab. 4.12). Die sulfatreduzierenden Bakterien (SRB) waren am geringsten vertreten und die MKB wuchsen erst im späteren Kulturverlauf auf.

#### **Denitrifizierende Bakterien (DNB)**

In allen untersuchten Gemeinschaften wurde ein Wachstum der DNB nachgewiesen (Tab. 4.2; 4.7 und 4.12). Jedoch hing die Entwicklung der DNB von den Kulturbedingungen ab. Die Anwesenheit von  $Cd^{2+}$  [0,05 mM] verzögerte das Wachstum der DNB am Anfang der Kultivierung signifikant (Abb. 4.23-A). Dies führte im Unterschied zur Dunkelkontrolle und den bestrahlten Gemeinschaften zum Nachweis einer ausgeprägten lag-Phase (Phase I). Dieser toxische Effekt des Cadmiums [ $Cd^{2+}0,05$  mM] wurde auch in der Stoffwechselaktivität und in der Zellzahl dieser Gemeinschaften festgestellt (Abb. 4.20, 4.21 und 4.22). Die Folge war eine Verzögerung der Phase des stärksten Wachstums um ca. 24 h (Abb. 4.23-A). In Phase II erreichten die DNB in allen cadmiumbelasteten Gemeinschaften ein Maximum nach drei Tagen ( $Cd^{2+} = 6,80 \times 10^3$  Zellen/ml; Kombination 1 = 1,13 \times 10^3 Zellen/ml; Kombination 2 = 1,94 \times 10^3 Zellen/ml), das sich nicht von der maximalen Konzentration der DNB der Dunkelkontrolle unterschied (Dunkelkontrolle = 7,0 \times 10^3 Zellen/ml) (Tab. 4.7 und 4.12). In Phase III unterschied sich das Verhalten der DNB in Abhängigkeit von der Kombination der Noxen.

# *Kombination 1 (p.L.1* [15 W] + $Cd^{2+}$ [0,05 mM])

In der Phase III war die Konzentration der DNB in der Gemeinschaft, die Cd<sup>+</sup> [0,05 mM] und p.L.1 [15 W] ausgesetzt war, im Vergleich zur Dunkelkontrolle signifikant verringert (Abb. 4.23-A). Eine toxische Wirkung der kombiniert eingesetzten Noxen wurde in dieser Phase der Kultur bereits mehrfach festgestellt. In der Phase III wirkte die Kombination mit schwacher Bestrahlungsdosis (p.L.1 [15 W] und Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM]) toxischer, sowohl auf die CO<sub>2</sub>-Produktion (Abb. 4.20) als auch auf die Lebendzellzahl der APB (Abb. 4.22-B).

**Tab. 4.12:** Lebendzellzahlen der Acetat-Pyruvat-konsumierenden- (APB), denitrifizierenden- (DNB), sulfatreduzierenden- (SRB) und Methanol-konsumierenden Bakterien (MKB) in Abhängigkeit von der Kombination der Noxen und der Kultivierungszeit. Versuch\_PZ = Versuchstyp mit den Probennahmezeitpunkt in Tagen (1 – 10); Inoculum = Zellzahl direkt nach Inoculumzugabe (n = 3); Dunkel = Dunkelkontrolle (n = 3); p.L.1 = polychromatisches Licht 1 [15 W] (n = 2); p.L.2 = polychromatisches Licht 2 [25 W] (n = 2); Cd<sup>+</sup> [0,05 mM] = cadmiumbelastete Gemeinschaft (n = 2); Kombi 1 = Kombination 1 (p.L.1 [15 W] + Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM]) (n = 1); Kombi 2 = Kombination 2 (p.L.2 [25 W] + Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM]) (n = 1); n.d. = nicht detektierbar; Max/Min = maximales/minimales 95 %iges Konfidenzintervall

	Lebendzellzahl [Zellem/ml]											
Versuch_PZ	APB			DNB			MKB			SRB		
[d]	Median	Max	Min	Median	Max	Min	Median	Max	Min	Median	Max	Min
Incoculum	$1,12*10^{2}$	$2,40*10^3$	1,17*10 <sup>1</sup>	2,64	1,67*10 <sup>1</sup>	0,205	0,00	2,40	0,00	6,09	4,33*10 <sup>1</sup>	2,75*10 <sup>1</sup>
Dunkel_1	5,53*105	$2,70*10^{6}$	2,56*104	5,40*10 <sup>2</sup>	7,92*10 <sup>3</sup>	$1,17*10^{2}$	0,00	4,20	0,00	4,96	9,77*10 <sup>1</sup>	1,17
Dunkel_2	3,51*107	3,61*108	3,47*105	7,00*10 <sup>3</sup>	7,81*104	0,420	n.d.	n.d.	n.d.	4,50	2,26*101	0,22
Dunkel_3	1,14*107	4,25*108	1,33*106	2,67*10 <sup>3</sup>	2,26*104	7,67	0,00	$2,25*10^{2}$	0,00	4,21	2,40*101	0,34
Dunkel_4	1,13*107	2,85*109	1,18*104	2,67*10 <sup>3</sup>	2,40*104	7,67	0,00	2,64*10 <sup>3</sup>	0,00	2,05	2,40*101	0,19
Dunkel_7	2,29*106	6,11*106	1,86*10 <sup>3</sup>	2,02*103	6,63*10 <sup>5</sup>	2,24	0,00	6,62*10 <sup>2</sup>	0,00	2,57	5,89*10 <sup>1</sup>	0,14
Dunkel_8	3,46*105	$2,72*10^{6}$	2,38*10 <sup>3</sup>	6,85*10 <sup>3</sup>	7,27*104	5,47*10 <sup>2</sup>	2,68*101	6,63*10 <sup>2</sup>	1,42	0,11*10 <sup>1</sup>	4,20*10 <sup>2</sup>	0,20
Dunkel_10	2,30*106	7,27*106	5,75*10 <sup>4</sup>	$2,77*10^{3}$	3,14*104	$2,07*10^{2}$	1,01*10 <sup>2</sup>	6,63*10 <sup>2</sup>	1,17	0,25	2,40	0,00
Kombi 1_1	2,94	1,78*10 <sup>1</sup>	0,24	9,00	3,59*10 <sup>1</sup>	1,38	0,50	2,40	0,12	1,12	4,20	0,150
Kombi 1_2	4,20*10 <sup>1</sup>	2,13*10 <sup>2</sup>	3,42	0,20	6,81*10 <sup>1</sup>	1,89	n.d.	n.d.	n.d.	1,01	3,89	0,140
Kombi 1_3	8,69*106	3,61*107	1,33*106	1,13*10 <sup>3</sup>	4,25*10 <sup>3</sup>	1,49*10 <sup>2</sup>	3,19*10 <sup>1</sup>	$1,69*10^2$	2,56	2,67	9,77	0,22
Kombi 1_4	1,36*106	$4,74*10^{6}$	7,27*105	4,96	2,40*10 <sup>1</sup>	1,170	1,69	5,83	0,17	2,33	7,92	0,21
Kombi 1_7	1,12*103	4,20*10 <sup>3</sup>	$1,48*10^{2}$	9,96	3,86*10 <sup>1</sup>	1,42	n.d.	n.d.	n.d.	1,50	5,28	0,17

	Lebendzellzahl [Zellen/ml]												
Versuch_PZ	APB			DNB			МКВ			SRB			
[d]	Median	Max	Min	Median	Max	Min	Median	Max	Min	Median	Max	Min	
Kombi 1_8	$1,94*10^{3}$	$6,60*10^3$	$1,86*10^{2}$	9,97	3,86*10 <sup>1</sup>	1,42	n.d.	n.d.	n.d.	3,52	1,85*10 <sup>1</sup>	0,28	
Kombi 1_10	1,12*10 <sup>3</sup>	4,20*10 <sup>3</sup>	1,48*10 <sup>2</sup>	2,67*10 <sup>1</sup>	9,77*10 <sup>1</sup>	2,24	n.d.	n.d.	n.d.	3,41	1,80*10 <sup>1</sup>	0,27	
Kombi 2_1	5,78*10 <sup>3</sup>	2,65*104	5,75*10 <sup>2</sup>	1,12	4,20	1,50*10 <sup>1</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	1,94*10 <sup>1</sup>	6,60*10 <sup>1</sup>	1,86	
Kombi 2_2	1,73*105	5,93*10 <sup>5</sup>	1,76*104	1,94*10 <sup>2</sup>	6,60*10 <sup>2</sup>	1,89*10 <sup>1</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	1,12*10 <sup>1</sup>	4,20*10 <sup>1</sup>	1,48	
Kombi 2_3	1,37*107	4,74*107	$2,72*10^{6}$	1,94*10 <sup>3</sup>	6,60*10 <sup>3</sup>	1,86*10 <sup>2</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	1,71	5,89	0,18	
Kombi 2_4	8,69*106	3,61*107	1,33*106	5,23*10 <sup>2</sup>	2,70*10 <sup>3</sup>	5,16*10 <sup>1</sup>	4,31*10 <sup>2</sup>	2,29*10 <sup>3</sup>	3,48*10 <sup>1</sup>	1,51	5,33	0,17	
Kombi 2_7	3,25*105	1,16*106	2,59*104	3,25*10 <sup>3</sup>	1,16*104	2,59*10 <sup>2</sup>	8,69*10 <sup>2</sup>	3,61*10 <sup>3</sup>	1,33*10 <sup>2</sup>	0,50	2,40	0,12	
Kombi 2_8	2,72*105	9,44*10 <sup>5</sup>	2,26*10 <sup>4</sup>	6,00*10 <sup>3</sup>	2,85*10 <sup>4</sup>	6,06*10 <sup>2</sup>	8,69*10 <sup>2</sup>	3,61*10 <sup>3</sup>	1,33*10 <sup>2</sup>	1,00	3,86	0,14	
Kombi 2_10	3,25*105	1,16*106	2,49*10 <sup>4</sup>	1,36*104	4,74*10 <sup>4</sup>	2,72*10 <sup>3</sup>	2,30*10 <sup>3</sup>	6,11*10 <sup>3</sup>	4,90*10 <sup>2</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	



Abb. 4.23: Lebendzellzahlen der (A) denitrifizierenden Bakterien (DNB) und (B) Methanolkonsumierenden Bakterien (MKB) in Abhängigkeit von der Noxe bzw. Kombination der Noxen und der Kultivierungszeit.  $\checkmark$  Start des jeweils 12-stündigen Bestrahlungsrhythmus; k.D. = keine Daten; Dunkelkontrolle (n = 3);  $\square$  polychromatisches Licht 1 [15 W] (n = 2);  $\blacksquare$  polychromatisches Licht 2 [25 W] (n = 2);  $\square$  cadmiumbelastete Gemeinschaft [Cd<sup>2+</sup> 0,05 mM] (n = 2)  $\square$  Kombination 1 (p.L.1 [15 W] + Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM]) (n = 1);  $\square$  Kombination 2 (p.L.2 [25 W] + Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM])

## *Kombination 2 (p.L.2* [25 *W*] + $Cd^{2+}$ [0,05 *mM*])

Nach der Phase des stärksten Wachstums der DNB, stagnierte die Konzentration der DNB bis zum siebten Kultivierungstag (Phase III) (Abb. 4.23-A). Nach sieben Tagen wuchsen die DNB erneut bis zum 10. Tag auf und erreichten ein Maximum von 1,36 \* 10<sup>4</sup> Zellen/ml (Tab. 4.12). Diese Konzentration unterschied sich signifikant von der erreichten Zellzahl der DNB in der Gemeinschaft die Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] und p.L. 1 [15 W] ausgesetzt war (Tab. 4.12).

## Methanol-konsumierende Bakterien (MKB)

In allen Gemeinschaften konnten die MKB erst mit zunehmender Kultivierungszeit nachgewiesen werden, somit war eine lag-Phase immer nachweisbar (Tab. 4.2; 4.7 und 4.12). In der Gemeinschaft, die Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] und p.L.1 [15 W] ausgesetzt war, wurden die MKB ausschließlich an den Kultivierungstagen 3 und 5 nachgewiesen (Abb. 4.23-B). Im Gegensatz dazu nahm die Konzentration der MKB in der Gemeinschaft, die Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] und p.L.2 [25 W] ausgesetzt war, vom dritten Kultivierungstag bis zum 10. Tag zu (4,02 \* 10<sup>3</sup> Zellen/ml) (Tab. 4.12). Somit schienen die MKB durch die starke Bestrahlungsdosis (p.L.2 [25 W]) in ihrem Wachstum gefördert zu werden, auch dann, wenn Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] als zweite Noxe zusätzlich appliziert wurde.

#### 4.3.4 Substratverwertungsspektrum

Der metabolische Fingerprint (Verwertung von 31 Substraten) der Gemeinschaften, die der Kombination der Noxen ausgesetzt waren, wurde nach den Kultivierungstagen 2 (Phase I), 3 (Phase II) und 8 (Phase III) erfasst und mit dem der unbelasteten Dunkelkontrolle und den Gemeinschaften, die der Einzelbelastung ausgesetzt waren, verglichen.

Von den angebotenen 31 Substraten konnten 13 Substrate von allen untersuchten Gemeinschaften genutzt werden (Pyruvat-Methylester, Tween 40, Tween 80,  $\alpha$ -D-Lactose, D-Mannitol,  $\beta$ -Hydroxybuttersäure, Itaconsäure, L-Arginin, L-Asparagin, L-Serin, Glycil-L-Glutaminsäure, Phenylethylamin, Putrescin). 2-Hydroxybenzoesäure wurde von keiner Gemeinschaft metabolisiert (Tab. 4.3, 4.8 und 4.13). Alle

cadmiumbelasteten Gemeinschaften konnten Glucose-1-Phosphat, D, L-Glycerol-1-Phosphat und  $\alpha$ -Ketobuttersäure nicht metabolisieren (Tab. 4.8 und 4.23). Dies unterschied sie von der Dunkelkontrolle und von den bestrahlten Gemeinschaften (Tab. 4.3). Gemeinsam war allen Gemeinschaften, dass mit zunehmender Kultivierungszeit die Anzahl der nicht metabolisierten Substrate abnahm.

**Tab. 4.13:** Substratverwertungsspektren an ausgewählten Kultivierungstagen (1, 2, 3 und 8 d) in Abhängigkeit von der Kombination der Noxen. Ausgewählte verwertete (+) und nicht verwertete Substrate (-); D = Dunkelkontrolle (n = 3); Kombi 1 = Kombination 1 (p.L.1 [15 W] +  $Cd^{2+}$  [0,05 mM]) (n = 1); Kombi 2 = Kombination 2 (p.L.2 [25 W] +  $Cd^{2+}$  [0,05 mM]) (n = 1);  $\Box$ : Substratnutzung <sup>1</sup> durch die Kombination der Noxen inhibiert und <sup>2</sup> immer inhibiert;  $\Sigma$  (-): Anzahl der nichtverwertbaren Substrate pro Kultivierungstag; Nr. = Substratnutzung 31 C-Quellen

Substrate	Nr.	Dunkel			Kombi 1			Kombi 2		
		1d	2d	8d	2d	3d	8d	2d	3d	8d
$\alpha$ -Cyclodextrin <sup>1</sup>	16	+	+	+	-	-	+	-	-	+
Glycogen <sup>1</sup>	20	+	+	+	-	-	+	-	-	+
D-Cellobiose	24	+	+	+	-	+	+	+	+	+
α-D-Lactose	28	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β-Methyl-D-Glycosid <sup>1</sup>	1	+	+	+	-	-	+	-	-	+
D-Xylose	5	+	+	+	+	-	+	+	+	+
i-Erythritol	9	+	+	+	-	+	+	+	+	+
N-Acetyl-D- Glucosamin	17	+	+	+	-	+	+	+	+	+
D-Glucosaminsäure	21	-	+	+	-	+	+	-	+	+
Glucose-1-Phosphat <sup>1</sup>	25	-	+	+	-	-	-	-	-	-
D,L-α-Glyzerol Phosphat <sup>1</sup>	29	-	+	+	-	-	-	-	-	-
D-Galactonsäure γ- Lacton	2	-	+	+	-	-	+	-	+	+
D-Galactonsäure	6	+	+	+	-	+	+	+	+	+
2-Hydroxybenzoesäure <sup>2</sup>	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Hydroxybezoesäure <sup>1</sup>	14	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Substrate	Nr.	Dunkel			Kombi 1			Kombi 2		
		1 d	2 d	8 d	2 d	3 d	8 d	2 d	3 d	8 d
γ-Hydroxybuttersäure	18	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-Ketobuttersäure	26	-	-	+	-	-	+	+	+	+
D-Malonsäure	30	+	+	+	-	+	-	+	+	+
Phenylethylamin	27	+	+	+	-	+	+	+	+	+
L-Threonin <sup>1</sup>	19	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Σ(-)		6	2	1	16	11	5	9	8	5

Die Substratverwertungsspektren aller Gemeinschaften wurden mit Hilfe der Partiellen Komponentenanalyse (PCA) ausgewertet (Abb. 4.24). An Hand der Eigenvalues des Faktors x (0,363) und des Faktors y (0,173) konnten 54 % der Daten inklusive deren Varianz mit diesem zweidimensionalen Modell erkklärt werden, wobei der größte Teil der Varianz durch den Faktor x erklärt wurde.



Abb. 4.24: Partielle Komponentenanalyse (PCA) des Substratverwertungsspektrums an ausgewählten Kultivierungstagen (1, 2, 3 und 8 d), in Abhängigkeit von den Noxen bzw. Kombination der Noxen. • Dunkelkontrolle (n = 3); • polychromatisches Licht 1 [15 W] (n = 2); • polychromatisches Licht 2 [25 W] (n = 2); • cadmiumbelastete Gemeinschaft [Cd<sup>2+</sup> 0,05mM] (n = 2); • Kombination 1 (p.L.1 [15 W] + Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM]) (n = 1); • Kombination 2 (p.L.2 [25 W] + Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM]) (n = 1)

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Substratverwertungsspektren der Gemeinschaften mit zunehmender Kultivierungszeit ähnelten (Abb. 4.24). Weiterhin wurde deutlich, dass sich die Substratverwertungsspektren der Dunkelkontrolle und der Gemeinschaft die der schwachen Bestrahlungsdosis ausgesetzt war kaum unterschieden. Bei allen anderen Gemeinschaften variierten die Substratverwertungsspektren in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit und der Noxe.

## 4.3.5 Phylogenetische Zusammensetzung

Die in Abschnitt 4.2.5 diskutierte Problematik der verringerten Detektierbarkeit der Zellen durch die Präsenz von Cadmium war auch in den Gemeinschaften, die der kombinierten Einwirkung der Noxen ausgesetzt waren, vorhanden (Tab 4.14).

Nach einem Kultivierungstag konnten zwischen 7 und 13 % der Gesamtzellzahl den Eubakterien zugeordnet werden. Innerhalb der Eubakterien konnte jedoch keine phylogentische Zuordnung erfolgen (Abb. 4.25-A). Somit war ein Großteil der Gesamtzellzahl keiner der drei existierenden Phyla (Eubakterien, Archaea, Eukarya) zuzuordnen. Dabei gab es keine Unterschiede zwischen den Gemeinschaften in denen Cadmium einzeln oder kombiniert appliziert wurde.

Erst nach vier Kultivierungstagen, nach der Phase der höchsten Stoffwechselaktivität und des stärksten Wachstums, war eine Zuordnung phylogenetsicher Gruppen möglich (Tab. 4.14). Betrachtet man die phylogenetische Zusammensetzung nach 8 Kultivierungstagen, so konnten Alpha-, Beta- und Gammaproteobakterien nachgewiesen werden (Abb. 4.25-B). Auf Grund der geringen Hybridisierbarkeit konnte ein Vorhandensein anderer phylogenetischer Gruppen nicht ausgeschlossen werden. **Tab. 4.14:** Phylogenetische Zusammensetzung der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Kombination der Noxen und der Kultivierungszeit. Versuch\_PZ = Versuchstyp mit Probenahmezeitpunkt in Tagen (1 -10 d); Inoculum = Zellzahl direkt nach Inoculumzugabe; GZ= Gesamtzellzahl; EUB338 = Eubakteria; ALF1b = Alphaproteobakterien; BET42a = Betaproteobakterien; GAM42a = Gammaproteobakterien; SRB385 = Deltaproteobakterien; HGC69a = Grampositive Bakterien mit hohem GC-Gehalt; CF319a = Cytophaga-Flavobakterien; ? EUB = unbekannter Anteil innerhalb der Eubakterien; Dunkel = Dunkelkontrolle (n = 3); p.L.1 = polychromatisches Licht 1 [15 W] (n = 2); p.L.2 = polychromatisches Licht 2 [25 W] (n = 2); Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] = cadmiumbelastete Gemeinschaft (n = 2); Kombi 1 = Kombination 1 (p.L.1 [15 W] + Cd<sup>2+</sup> 0,05 mM]) (n = 1); Kombi 2 = Kombi-nation 2 (p.L.2 [25 W] + Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM]) (n = 1); n.h. = nicht hybridisierbar; Konzentrationsangabe = Median (25. und 75. Perzentil)

		Anteil der l	Anteil der Phyla an GZ [%] (25. und 75. Perzentil)										
Probe [d]	GZ [Zellen/ml]	EUB338	n.h.	AlLF1b	BET42a	GAM42a	SRB385	HGC69a	CF319a	? EUB			
Inoculum	4,34*106	8	92	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.			
Dunkel_1	1,61*10 <sup>8</sup>	48 (36-61)	52	3 (0-7)	7 (3-19)	19 (5-32)	0 (0-0)	0 (0-4)	3 (0-4)	16			
Dunkel_2	1,19*10 <sup>9</sup>	75 (49-92)	25	3 (0-7)	20 (11-30)	32 (23-63)	0 (0-2)	0 (0-2)	2 (0-6)	18			
Dunkel_3	5,95*10 <sup>8</sup>	62 (44-72)	38	3 (0-5)	15 (3-34)	23 (9-47)	2 (0-5)	0 (0-3)	5 (5-9)	14			
Dunkel_4	5,46*10 <sup>8</sup>	46 (32-68)	54	3 (1-4)	15 (9-27)	16 (7-44)	1 (0-3)	2 (0-3)	2 (0-3)	7			
Dunkel_7	3,10*10 <sup>8</sup>	41 (31-48)	59	3 (2-8)	14 (4-20)	17 (4-29)	0 (0-3)	0 (0-2)	16 (5-49)	-			
Dunkel_8	$2,17*10^8$	33 (26-39)	67	7 (3-10)	3 (3-6)	7 (3-12)	0 (0-3)	0 (0-0)	10 (6-13)	6			
Dunkel_10	$1,74*10^{8}$	46 (37-56)	54	4 (0-4)	11 (7-20)	25 (16-34)	7 (5-11)	4 (0-4)	11 (4-11)	-			
Kombi 1_1	9,30*10 <sup>6</sup>	7 (5-13)	93	0 (0-0)	0 (0-7)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	7			
Kombi 1_2	1,12*108	22 (17-28)	78	0 (0-6)	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-3)	0 (0-0)	0 (0-6)	22			
Kombi 1_3	2,23*10 <sup>8</sup>	22 (0-44)	78	0 (0-11)	0 (0-3)	0 (0-3)	0 (0-2)	0 (0-11)	0 (0-3)	22			
Kombi 1_4	1,86*108	20 (13-22)	80	0 (0-11)	7 (0-7)	0 (0-8)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	13			

		Anteil der	Anteil der Phyla an GZ [%]									
Probe [d]	GZ [Zellen/ml]	EUB338	n.h.	AlLF1b	BET42a	GAM42a	SRB385	HGC69a	CF319a	? EUB		
Kombi 1_7	1,67*10 <sup>8</sup>	41 (31-49)	59	4 (4-8)	0 (0-4)	7 (4-11)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	30		
Kombi 1_8	7,69*10 <sup>7</sup>	27 (17-49)	73	8 (4-14)	0 (0-4)	7 (5-12)	0 (0-0)	0 (0-2)	0 (0-2)	12		
Kombi 1_10	$1,57*10^8$	65 (44-87)	35	6 (5-8)	38 (24-60)	57 (45-106)	0 (0-0)	0 (0-0)	2 (1-5)	-		
Kombi 2_1	9,30*106	13 (7-15)	87	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	13		
Kombi 2_2	4,67*107	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.		
Kombi 2_3	8,06*107	31 (31-54)	69	0 (0-2)	0 (0-23)	8 (0-8)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-8)	23		
Kombi 2_4	8,06*107	31 (23-81)	69	0 (0-8)	0 (0-39)	0 (0-15)	0 (0-0)	0 (0-2)	0 (0-0)	31		
Kombi 2_7	6,70*10 <sup>7</sup>	65 (33-80)	35	4 (2-7)	0 (0-46)	2 (0-12)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	32		
Kombi 2_8	4,09*10 <sup>7</sup>	61 (42-73)	39	6 (0-14)	6 (0-10)	21 (14-61)	0 (0-1)	0 (0-3)	0 (0-0)	28		
Kombi 2_10	<b>4,09*</b> 10 <sup>7</sup>	3 (3-6)	97	0 (0-3)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	3		



Abb. 4.25: Phylogenetische Zusammensetzung der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Kombination der Noxen. (A) prozentualer Anteil der Phyla an der Gesamtzellzahl nach einem Kultivierungstag; (B) prozentualer Anteil der Phyla an der Gesamtzellzahl nach 8 Kutivierungstagen; von links nach rechts: Dunkelkontrolle (n = 3); Kombi 1 = Kombination 1 (p.L.1 [15 W] +  $Cd^{2+}[0,05 \text{ mM}]$ ); Kombi 2 = Kombination 2 (p.L.2 [25 W] +  $Cd^{2+}$  [0,05 mM]);  $\odot$  nicht hybridisierbarer Anteil; Alphaproteobakterien; Betaproteobakterien; Gammaproteobakterien; Deltaproteobakterien; Cytophaga-Flavobakterien; unbekannte Phyla innerhalb der Eubakterien

# 4.3.6 Struktur der Bakteriengemeinschaft und Präsenz unterschiedlicher Spezies

Um Unterschiede in der Struktur (genetischer Fingerprint) zwischen den Gemeinschaften mit kombinierter Noxeneinwirkung und der unbelasteten Dunkelkontrolle zu erfassen, wurde, wie schon in Abschnitt 4.1.6 beschrieben, das DNA-Banden-Muster der 16S rRNA Genfragments der Gemeinschaften verglichen (Abb. 4.26).



**Abb. 4.26:** DNA-Banden-Muster des 16S rRNA Genfragments der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Kombination der Noxen und Kultivierungszeit. Von oben nach unten: Dunkel= Dunkel-kontrolle (n = 3); Kombi 1 = Kombination 1 (p.L.1 [15 W] + Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM]) (n = 1); Kombi 2 = Kombination 2 (p.L.2 [25 W] + Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM]) (n = 1); M = interner DNA-Marker mit B1 = *M. ruestringensis* und T9 = *A. jadensis*; 1-10 = Kultivierungszeit in Tagen; SB = sequenzierte Banden (Zahlen = Identifikation (ID) der Banden; a - c = nicht identifizierte Banden); rot-markierter Bereich = Banden-ID 5-7 und 13-16 inkl. B1 und T9 und; blau-markierter Bereich = nicht identifizierte Spezies a – c und Banden ID 10/1

Wie der Nachweis DNA-Bandenzahl zeigte, fand in allen untersuchten Gemeinschaften mit zunehmender Kultivierungszeit eine Zunahme der Spezieszahl statt (Abb. 4.27).



Abb. 4.27: Anzahl der DNA-Banden (Spezies) der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Noxe bzw. Kombination der Noxen und der Kultivierungszeit. Gelb-markierter Bereich = Standardabweichung der Dunkelkontrolle; • Dunkelkontrolle (n = 3); • polychromatisches Licht 1 [15 W] (n = 2); • polychromatisches Licht 2 [25 W] (n = 2); • cadmiumbelastete Gemeinschaft [Cd<sup>2+</sup>0,05 mM] (n = 2); • Kombination 1 (p.L.1 [15 W] + Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM]) (n = 1); • Kombination 2 (p.L.2 [25 W] + Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM]) (n = 1)

Vergleicht man die DNA-Banden-Muster (Abb. 4.26) und somit die Struktur der Gemeinschaft, so ist eine Verschiebung der dominanten Spezies in den rot markierten Bereich der Abbildung 4.26 zu erkennen. Die Zusammensetzung der Gemeinschaften unter Kombinationseinwirkung verhielt sich somit ähnlich wie die Gemeinschaft, die nur mit Cadmium belastet war (Abb. 4.17).

Während in der Gemeinschaft unter Kombinationseinwirkung mit starker Dosis (p.L.2 [25 W] + Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM) im rot markierten Bereich im Prinzip nur zwei Banden dominierten, wovon eine wahrscheinlich den *Firmicutes* zuzuordnen war und die andere auf Höhe von *M. ruestringensis* lag, waren in der Gemeinschaft unter Kombinationseinwirkung mit schwacher Dosis (p.L.1 [15 W] + Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM]) mindestens vier DNA-Banden dominant. Für die Identifizierung dieser Spezies wurden die DNA-Banden (13, 14, 15, 16) aus dem DGGE ausgeschnitten, erneut amplifiziert und das Amplifikat sequenziert (Tab. 4.15). Bis auf eine Sequenz (ID = 14) konnten alle als Alphaproteobakterien identifiziert werden. Diese Dominanz wurde auch schon bei der Bestimmung der phylogenetischen Zusammensetzung festgestellt (Tab. 4.14). Die Sequenz ID = 13 konnte *Rosebacter* zugeordnet werden. Roseobacter sind bekannt für ihre hoch diversen Stoffwechselwege und sind in der Lage anoxygene Photosynthese zu betreiben. Die Sequenz ID = 14 konnte den *Firmicutes* zugeordnet werden, diese Spezies gehören zu den grampositiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt. Diese Gruppe konnte mit den verwendeten Hybridisierungssonden mittels FISH nicht nachgewiesen werden. Dies könnte die Begründung dafür sein, dass teilweise ein hoher Anteil nicht zu zuordnenter Phyla innerhalb der Eubakterien auftrat. Besonders augenscheinlich war diese Problematik in der Gemeinschaft, die kombinierter Einwirkung mit starker Dosis ausgesetzt war (Abb. 4.26). Die Lage der Banden im DGGE deutete darauf hin, dass Firmicutes eine dominante Rolle in dieser Gemeinschaft spielte.

**Tab. 4.15:** Taxonomische Einordnung der sequenzierten 16S rRNA Genfragmente. Band-ID = Nummer der Bande aus dem DGGE (Abb. 4.26); bp = Zahl der sequenzierten Basenpaare; Acc. Number = accession number;  $\alpha$ -Proteo = Alphaproteobakterium

Phyla	Band-ID (bp)	Acc. Number	Nächster phyl. Nachbar	Merkmal des
			Übereinstimmung [%]	nächsten Nachbarn
α-Proteo	13 (482)	DQ414396	Roseobacter sp. [100]	Isolat aus marinen Millieu
Firmicutes	14 (510)	DQ414397	Planococcus citreus [99]	Isolat aus dem Wattenmeer in
α-Proteo	15 (493)	DQ414398	Sulfitobacter sp. [99]	Korea Isolat aus der Nordsee (10 m Tiefe)
α-Proteo	16 (491)	DQ414399	Sulfitobacter sp.[100]	Isolat aus dem Wattsediment von Incheon North Harbor

Die Spezies Anzahl im blau markierten Bereich von Abbildung 4.26 war in beiden Gemeinschaften die der Kombinationswirkung ausgesetzt waren, deutlich reduziert und z.T. nicht nachweisbar.

Die Clusteranalyse der DGGE-Banden-Muster der verschiedenen Kultivierungsansätze zeigte, dass sich die Struktur der Gemeinschaft in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit und der Kombination der Noxen änderte. Im Gegensatz zur Dunkelkontrolle, in der sich die Struktur der Gemeinschaft nach einem Kultivierungstag von der restlichen Kultivierungszeit unterschieden hat (Abb. 4.28-A), veränderte sich die Struktur der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Kombination der Noxen (Abb. 4.28-B, C). In beiden Gemeinschaften, die einer kombinierten Wirkung ausgesetzt waren, differenzierte sich die Gemeinschaft innerhalb eines Tages. Eine Differenzierung innerhalb der ersten 24 h war auch in der Dunkelkontrolle nachgewiesen worden. Zusätzlich unterschied sich die Zusammensetzung der Gemeinschaften unter kombinierter Wirkung am 2. Tag von der restlichen Kultvierungszeit. Somit war die Sukzession, im Vergleich zur Dunkelkontrolle, deutlich verringert. Denn in der Dunkelkontrolle wurde eine weitere Strukturänderung in der letzten Kultivierungsphase (9 – 10 d) nachgewiesen.



**Abb. 4.28:** Clusteranalyse des DNA-Banden-Musters der Gemeinschaften in Abhängigkeit von der Kombination der Noxen. (A) D = Dunkelkontrolle (n = 3); (B) K1 = Kombination 1 (p.L.1 [15 W] +  $Cd^{2+}$  [0,05 mM]) (n = 1); (C) K2 = Kombination 2 (p.L.2 [25 W] +  $Cd^{2+}$  [0,05 mM]); Kultivierungszeit = 1 - 10 d; Methode: UPMG = unweighted pair group method of average; Skalierung in Prozent Similarität

## 4.3.7 Überblick über das Zusammenspiel der Effekte

Zusammenfassend konnte folgendes gezeigt werden:

- Cadmiumacetat [Cd<sup>2+</sup> 0,05 mM] wirkte in der Anfangsphase der Kultivierung toxisch auf die Gemeinschaften. Dies führte zu einer um 24 h verlängerten lag-Phase, sowohl in der Stoffwechselaktivität als auch in der Gesamt- und Lebendzellzahl (APB und DNB). Des weiteren war in dieser Phase das Substratverwertungs-spektrum verringert und eine phyologenetische Zuordnung der Gesamtzellzahl nicht möglich.
- Alle Kulturen, in denen Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] präsent war, zeigten ein hohes Anpassungvermögen. Zu erkennen war dies an der an die lag-Phase anschließende Phase hoher Stoffwechselaktivität und starken Wachstums. Die Alphaproteobakterein gehörten zu der dominaten phylogentischen Gruppe in der cadmiumbelasteten Gemeinschaft und in der Gemeinschaft, die Cd<sup>2+</sup>[0,05 mM] und p.L.1 [15 W] ausgesetzt waren.
- Licht starker Intensität (p.L.2 [25 W]) bewirkte in Kombination mit Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] verschiedene Effekte. Die Phase höchster Stoffwechselaktivität war deutlich verkürzt. Die insgesamt produzierte Menge an CO<sub>2</sub> war signifikant verringert. Eine Verringerung der Gesamtzellzahl und der APB konnte jedoch nicht festgestellt werden. Jedoch schien das Wachstum der DNB und MKB durch die Bestrahlungsdosis stimuliert zu werden.
- Licht schwacher Intensität (p.L.1 [15 W]) zeigte in Kombination mit Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] eine andere Wirkung als die Einzelnoxe. In Kombination war die Gesamt-CO<sub>2</sub>-Produktion sowie die Lebendzellzahl (APB, DNB und MKB) signifikant verringert.

# 4.4 Methanol-konsumierende Bakterien (MKB) – eine neue Spezies?

Eine interessante Gruppe innerhalb der verschiedenen getesteten physiologischen Gruppen, bildeten die Methanol-konsumierenden Bakterien (MKB). Da besonders unter Bestrahlungseinfluss eine relativ hohe Zellkonzentration mit zunehmender Kultivierungszeit nachgewiesen wurde, jedoch kein Methanol dem Kulturmedium im Fermenter zugegeben worden war, wurden im Rahmen einer Diplomarbeit (Hartmann, 2006) diese Spezies isoliert und charakterisiert. Die von Hartmann gewonnenen Isolate waren alle Katalase-positive, gramnegative, bewegliche Stäbchen. Nach Isolation der DNA, Amplifizierung und Sequenzanalyse konnten die Isolate der Gattung *Methylophaga* zugeordnet werden (Tab. 4.16).

**Tab. 4.16:** Taxonomische Einordnung der sequenzierten 16S rRNA Genfragmente. Isolat-ID = Nummer des Isolats; bp = Zahl der sequenzierten Basenpaare; Acc. Number = accession number;  $\gamma$  = Gammaproteobakterien

Phyla	ID (bp)	Acc. Number	Nächster phyl. Nachbar Übereinstimmung [%]	Merkmal des nächsten Nachbarn
γ	ME01 (431)	DQ414390	<i>Methylophaga sp.</i> Tcg-14 [100]	
γ	ME02 (493)	DQ4143931	Methylophaga sp. V4.MO.19 [99]	Bakterioplankton des westlichen Mittelmeeres
γ	ME02 (444)	DQ414392	Methylophaga sp. Tcg-14	
γ	ME07 (499)	DQ414394	Methylophaga sp. V4.MO.19 [99]	Bakterioplankton des westlichen Mittelmeeres
γ	ME14 (492)	DQ414395	Methylophaga sp. V4.MO.19 [99]	Bakterioplankton des westlichen Mittelmeeres

Ein Teilbereich des 16S rRNA-Gens wurde erneut amplifiziert und mittels DGGE mit dem DNA-Banden-Muster aller in dieser Arbeit untersuchten Gemeinschaften verglichen (Abb. 4.29). Jedoch konnten die DNA-Banden der Isolate in keiner der untersuchten Gemeinschaften nachgewiesen werden. Betrachtet man jedoch die Region (rote Markierung) in Abbildung 4.29, in der die DNA-Banden der Isolate

visualisiert wurden, so fällt auf, dass in den cadmiumbelasteten Gemeinschaften an der entsprechenden Stelle keine DNA-Banden sichtbar waren und dass in den Gemeinschaften unter Kombinationseinwirkung in diesem Bereich keine klaren Einzelbanden nachgewiesen werden konnten. Jedoch wurden sowohl in der Dunkelkontrolle als auch in den bestrahlten Gemeinschaften 2-3 DNA-Banden nachgewiesen, die als nahe Verwandte der *Methylophaga* in Betracht gezogen werden könnten. Auffällig war auch, dass sich mit zunehmender Bestrahlungsdosis in dieser Region die für die Gemeinschaft typischen, dominanten Vertreter aufhielten.



Abb. 4.29: DNA-Banden-Muster des 16S rRNA Genfragments der Gemeinschaften und der charakterisierten Isolate nach 8 Kultivierungstagen. M = interner DNA-Marker inkl. *M. ruestringensis* und *A. jadensis*; p.L.1 = polychromatisches Licht 1 [15 W]; p.L.2 = polychromatisches Licht 2 [25 W]; Cd<sup>2</sup> = cadmiumbelastete Gemeinschaft [0,05 mM]; K1 = Kombination 1 (p.L.1 (15 W] + Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM]); K2 = Kombination 2 (p.L.2 [25 W] + Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM]); Isolate = ID ME01/ME02 = Methylophaga sp.

Diese Spezies stellen eine interessante Gruppe dar, weil nicht klar ist, welches Substrat im Fermenter während der Kultivierung genutzt wurde und warum das Wachstum durch polychromatisches Licht stimuliert wurde.

## 5 Diskussion

der Lage, auf ungünstige Lebensbedingungen Mikroorganismen sind in (Umweltstress) zu reagieren und sich anzupassen. Dabei umfasst die Adaption komplexe Reaktionen von Mikroorganismen auf physiologischer, morphologischer, und genetischer Ebene sowie auf der Ebene des Verhaltens, die eine Änderung der Wachstumsrate, des Metabolismus und der Überlebensfähigkeit zur Folge haben können (Nikolaev, 2004; Vorobeva, 2004). Die Wirkung von Umweltstress ist, sowohl von physikalisch-chemischen Eigenschaften der Noxe als auch von abiotischen Faktoren (z.B. Expositionszeit, physikalisch-chemische Eigenschaften des Lebensraums, Nährstofflimitierung, u.v.m.) und biotischen Faktoren (Zusammensetzung der Gemeinschaften, Räuber-Beute-Verhältnis u.v.m.) abhängig. Zusätzlich entscheidet der Wirkungsort im/am Organismus über die Toxizität der Noxe. In Mikroorganismen induzieren Stressbedingungen folgende Reaktionen: Ausschleusen von Proteinen und niedermolekularen Substanzen (Roshichina & Petrov, 1997), Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (Dukan & Nyström, 1998), Verzögerung der Stoffwechselaktivität (Feofilova, 2003), Abbau von Ribosomen und Nukleinsäuren, Verringerung des Sauerstoffverbrauch und Veränderung der Enzymaktivität, Verlust der Koloniebildungsfähigkeit auf festen Medien, Wachstumsverzögerung, Aggregation und Adhäsion (Nikolaev, 2003). Diskutiert wird auch die Möglichkeit der Kommunikation über chemische Botenstoffe oder Zell-Zell-Kontakt innerhalb einer Spezies oder zwischen verschiedenen Spezies, die zu einer Adaption der Gemeinschaft an ungünstige Lebensbedingungen führen. Unter Berücksichtigung dieser Interaktionen wäre es durchaus vorstellbar, eine mikrobielle Gemeinschaft als "Superorganismus" mit Arbeitsund Funktionsteilung zu betrachten. Entsprechend komplexe Differenzierungen sind in einer Reihe biofilmbildender Mikroorganismen nachgewiesen worden (Davey & O'Toole, 2000). Dabei wurde immer wieder die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass sich Bakterien durch interzellulare Interaktion und Kommunikation besser an wechselnde Umweltbedingungen anpassen können (Kaiser & Losick, 1993; Davey & O'Toole, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von polychromatischem Licht unterschiedlicher Intensität und Cadmiumacetat auf die Aktivität und Zusammensetzung bakterieller Gemeinschaften untersucht. Wegen der komplexen Wechselwirkungen sind vielfältige potentielle Mechanismen involviert. Im Folgenden, wird zuerst die Wirkung der Einzelnoxen (polychromatisches Licht [15/25 W]) und Cadmiumacetat [Cd<sup>2+</sup>0,05 mM]), im Anschluss die Wirkung der Kombination der Noxen betrachtet, jeweils in Abhängigkeit der untersuchten Parameter.

## 5.1 Wachstum

In der vorliegenden Untersuchung wurde nachgewiesen, dass während der gesamten Kulturzeit in einer unbelasteten Gemeinschaft mariner Bakterien (Dunkelkontrolle) chemoorganotrophe Bakterien, die ein Gemisch aus Acetat, Pyruvat und Casaminoacids als C-Quelle nutzten, dominierten. Diese Gruppe wurde daher als ein Indikator für das Überleben der Gemeinschaft nach Noxeneinwirkung angesehen.

#### **Polychromatisches Licht**

Das in der vorliegender Arbeit verwendete polychromatische Licht [15/25 W], das im Vergleich zum natürlichen Sonnenlicht einen erhöhten UVB-Anteil hat (vgl. Abb. 3.1), beeinflusste das Wachstum der Gemeinschaft nicht. Das steht im Widerspruch zu Ergebnissen anderer Autoren, die ein signifikant verringertes Wachstum (Gesamtzellzahl) mariner bakterieller Gemeinschaften nach Bestrahlung mit natürlichem und künstlichem Sonnenlicht ( $UVB = 0.05 - 3.42 \text{ W} \text{ * cm}^{-2} \text{ * nm}^{-1}$ ) feststellten (Winter et al., 2001). Jedoch setzten Winter et al. (2001) eine insgesamt geringere Gesamtzellzahl für die Bestrahlungsexperimente ein. die temperaturgeregelt unter Laborbedingungen durchgeführt wurden. Dies könnte ein Hinweis sein, dass Faktoren wie Zelldichte und Spezieszusammensetzung des Inoculums eine Reaktion der Gemeinschaft auf Lichtstress bestimmen. Denn wenn man den UVB-Anteil des polychromatischen Lichts, das in vorliegender Arbeit verwendet wurde (UVB = 2,8 - 3,34 W \* m<sup>-2</sup>), mit dem von Winter *et al.*, (2000) verwendeten UVB-Anteil vergleicht, so ergeben sich keine wesentlichen Unterschiede.

Die meisten Untersuchungen zur Wirkung von UV-Strahlung wurden an Einzelisolaten mit variierender UVB-Dosis durchgeführt (Joux et al., 1999). Dabei erholen sich die Spezies nach der Bestrahlung unterschiedlich gut (Arrieta et al., 2000), wobei die Überlebensrate der Einzelisolate mit zunehmender UVB-Dosis abnimmt (Joux et al., 1999). Wenn jedoch, wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, kein Einfluss mit UVA- und UVB-haltigen polychromatischem Licht, auf die Lebendzellzahl einer Gemeinschaft nachgewiesen werden kann, so muss man daraus schließen, dass vermehrt Schutz- und Reparaturmechanismen induziert wurden. Durch den Einsatz von polychromatischem Licht, ist auch die für die Reparatur notwendige langwellige Strahlung vorhanden und somit auch das Potential zur Reparatur der UV-induzierten Schäden. Um feststellen zu können, ob eine erhöhte Reparaturaktivität stattfindet, müssten die entsprechenden Reparatursysteme untersucht werden. Der Nachweis der DNA-Photoprodukte (Douki et al., 2003; Joux et al., 1999) oder der Quantifizierung von RecA (Booth et al., 2001) können Hinweise auf eine vermehrte Reparatur geben. Neben der Induktion der Reparaturmechanismen können morphologische Änderungen die Zellen vor UV-Strahlung schützen, so z.B. die reversible Ausbildung von Endosporen (Madigan et al., 2000) und die Zunahme der Anzahl pigmentierter Zellen (Thomson et al., 1980). Jedoch konnten in der vorliegenden Arbeit keine pigmentierten Zellen nachgewiesen werden.

In bakteriellen Gemeinschaften kommt auch eine intrazelluläre Regulation zwischen den Spezies als Stressantwort in Frage, die zur Adaption der Gemeinschaft an die Kulturbedingungen beitragen könnte. In marinen *Vibrio* Spezies konnte z.B. nachgewiesen werden, dass die Produktion von extra- und intrazellulären Signalen, eine Adaption der Zellen an Nährstofflimitierung ermöglicht (McDougald *et al.*, 2002). Einige der daran beteiligten Signalmoleküle sind u.a. auch am Quorum Sensing System (Zelldichte regulierendes System) beteiligt und für die Verständigung zwischen den Spezies verantwortlich (McDougald *et al.*, 2002). Eine solche intrazelluläre Regulation wurde auch nach künstlicher Lichtexposition ( $\lambda = 290 - 700$  nm) in überlebenden *Vibrio* Spezies festgestellt (McDougald *et al.*, 2002). Würde die Zunahme der applizierten Lichtintensität den Übergang in die stationäre Phase induzieren, wäre das mit einer Verringerung des CO<sub>2</sub>-Verbrauchs der Gemeinschaft verbunden.

#### Cadmiumacetat

Von Cadmium ist bekannt, dass es eine konzentrationsabhängige wachstumshemmende Wirkung auf Mikroorganismen ausübt (Verlängerung der lag-Phase), von der sich Mikroorganismen jedoch erholen können (Berthe-Corti et al., 1984; Ivanova et al. 2002). Fulladosa et al. (2005) stellten in Vibrio fischeri in Anwesenheit von Cd<sup>2+</sup> zusätzlich einen zeitabhängigen Effekt fest: Es konnten sowohl Dosis-Wirkungskurven in Abhängigkeit von der Cadmiumkonzentration [ $Cd^{2+} 0 - 0.5 mM$ ] als auch von der Inkubationszeit bei gleichbleibender Cd<sup>+</sup>-Konzentration erstellt werden (Fulladosa et al. (2005). Dieses Zusammenspiel von Konzentrations- und Zeitabhängigkeit des toxischen Effekts ist wahrscheinlich für die z.T. sehr unterschiedlichen Ergebnisse im Freiland verantwortlich. So zeigten z.B. Untersuchungen in mit Schwermetallen kontaminierten Böden sowohl eine Verringerung der Gesamtzellzahl als auch der Lebendzellzahl der mikrobiellen Gemeinschaft im Vergleich zu unbelasteten Kontrollböden (Roane & Kellogg, 1996). Im Gegensatz dazu wurde in Freilanduntersuchungen entlang eines Flussbettes mit variierenden Schwermetallkonzentrationen kein Einfluss der Konzentration auf die Lebendzellzahl bakterieller Gemeinschaften festgestellt (Dean-Ross & Mills, 1989). Dell' Anno et al. (2003) wiesen einen signifikanten Einfluss der Bioverfügbarkeit von Cd<sup>2+</sup> auf die Stoffwechselaktivität benthischer mikrobieller Gemeinschaften nach, wobei die Bioverfügbarkeit mit einer signifikanten Beziehung zwischen dem Gehalt organischen Materials und der Gesamtcadmiumkonzentration einhergeht. Die Bestimmung der Bioverfügbarkeit von Cd<sup>2+</sup> gilt als schwierig, weil nicht nur die Aktivität der Organismen sondern auch Schadstoff/Partikel Interaktionen beteiligt sind (Selck et al., 1999). Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Cadmiumkonzentration [Cd<sup>2+</sup> 0,05 mM] war, gemessen an der in natürlichen Umgebungen vorkommenden Konzentration, relativ hoch. Jedoch ist das Gebiet der Deutschen Bucht durchaus hohen  $Cd^{2+}$ -Belastungen (0,6 – 3 mg/kg Sediment) ausgesetzt (Umweltbundesamt, 2003). Es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass Cadmium im Seewasser nur zu etwa 3,5 % als freies Cd<sup>2+</sup>-Aqua-Ion vorliegt, der Rest als Chlorid-Komplex, der deutlich schlechter verfügbar ist (Fent, 2003). Auf die Bestimmung des bioverfügbaren Cadmiums wurde in der vorliegenden Arbeit verzichtet, da Cd<sup>2+</sup> im Fermenter in unterschiedlichen Formen vorliegen kann (z.B. Acetat, Sulfid), die dann je nach Kulturbedingungen ineinander überführt werden können. Die Anpassung der Bakterien an die vorhandenen Cadmiumbedingungen und die daraus resultierende Fähigkeit, unterschiedliche Resistenzmechanismen auszubilden, ist überlebenswichtig und entscheidet über die spätere Spezies-Zusammensetzung der Gemeinschaft. Da Cadmium in der Deutschen Bucht in Konzentrationen von bis zu 0,11 - 0,16 nmol/kg im Sediment vorkommt (Haarich & Schmidt, 1993), kann davon ausgegangen werden, dass in der natürlichen mikrobiellen Gemeinschaft und somit auch im verwendeten Inoculum schwermetallresistente Spezies vorhanden waren. Durch den hohen Cd<sup>2+</sup>-bedingten Selektionsdruck am Anfang der Kultivierung und evtl. auch durch lateralen Gentransfer wäre es möglich, dass die Resistenzgene innerhalb der Gemeinschaft übertragen wurden.

## Kombination

In der vorliegenden Arbeit induzierte die Anwesenheit von Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] innerhalb der ersten 48 Stunden Kulturzeit einen toxischen Effekt und eine erste Adaption, auch in den Gemeinschaften, die der Kombination der Noxen ausgesetzt waren. Durch das zusätzlich applizierte polychromatische Licht kam es zu einer weiteren Veränderung in der Gemeinschaft, die dosisabhängig war. In der Gemeinschaft, die schwachem Licht (p.L.1 [15 W]) und Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] ausgesetzt war, wurde eine Abnahme der Lebendzellzahl der APB festgestellt. Diese Gemeinschaft unterschied sich somit von der Dunkelkontrolle und allen anderen untersuchten Gemeinschaften. Die Wirkung der Kombination Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] und p.L.1 [15 W] auf die Acetat-Pyruvat-konsumierenden Bakterien (APB) war toxischer als die Wirkung der Kombination von Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] und starkem Licht (p.L.2 [25 W]) und mit der jeweiligen Einzelnoxen. Da in den Kulturen die Gesamtzellzahl jedoch immer gleich blieb, konnte eine Zell-Lyse ausgeschlossen werden. Die Abnahme an vermehrungsfähigen Zellen kann entweder mit einem Verlust der Teilungsfähigkeit erklärt werden oder mit einer Umstellung des Stoffwechsels, in dem andere Substrate als die angebotenen genutzt wurden. Auch ist eine Änderung der Spezies-Zusammensetzung und eine damit verbundene Änderung der Toleranz gegenüber den Kulturbedingungen denkbar.

## 5.2 Stoffwechselaktivität

Die Summenparameter Sauerstoffverbrauch und Kohlendioxidproduktion geben einen Hinweis auf die Stoffwechselaktivität der gesamten Gemeinschaft, jedoch nicht einzelner Spezies. Es wurde in vorliegender Arbeit gezeigt, dass sich die Stoffwechselaktivität aller Gemeinschaften in drei Phasen gliedert, die dem klassischen bakteriellen Verhalten in Batch-Kulturen entsprechen (Madigan *et al.*, 2000). Die eingesetzten Noxen wirkten jedoch unterschiedlich auf die Fähigkeit der Gemeinschaften, die angebotenen Substrate zu mineralisieren. Um Rückschlüsse auf die Mineralisation der angebotenen Substrate zu erhalten, wurde zum Kulturende (10 Tage) der Respiratorische Quotient (RQ =  $\Sigma CO_2/\Sigma O_2$ ) errechnet. In der Dunkelkontrolle wurde die höchste Mineralisierungsrate erzielt (Tab. 5.1). In den weiteren Kulturansätzen war die Mineralisation signifikant geringer, wobei folgende Reihenfolge für den Respiratorischen Quotient (RQ-Wert) errechnet werden konnte: Dunkelkontrolle > Cd<sup>2+</sup> > p.L.1 > Kombi 1 > Kombi 2 > p.L.2 (Tab. 5.1).

**Tab. 5.1:** Respiratorischer Quotient (RQ) aller untersuchten Gemeinschaften nach 10 Kultivierungstagen. Dunkel = Dunkelkontrolle (n = 3); p.L.1 = polychromatisches Licht 1 [15 W] (n = 2); p.L.2 = polychromatisches Licht 2 [25 W] (n = 2); Cd<sup>2+</sup> = cadmiumbelastete Gemeinschaft [Cd<sup>2+</sup> 0,05 mM] (n = 2); Kombi 1 = Kombination 1 (p.L.1 [15 W] + Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM]) (n = 1); Kombi 2 = Kombination 2 mit p.L.2 [25 W] + Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] (n = 1).

RQ [-] nach 10 Kultivierungstagen										
Dunkel	p.L.1 [15 W]	p.L.2 [25 W]	Cd <sup>2+</sup> [0,05 mM]	Kombi 1	Kombi 2					
0,82	0,66	0,26	0,72	0,59	0,31					

## **Polychromatisches Licht**

Die Mineralisation der angebotenen Substrate war durch die schwache Bestrahlung (p.L.1 [15W]) verringert und durch die starke Bestrahlung (p.L.2 [25 W]) empfindlich gestört. Das lag daran, dass unter starker Bestrahlung die CO<sub>2</sub>-Produktion signifikant verringert und der O<sub>2</sub>-Verbrauch erhöht war (vgl. Abb. 4.1 und 4.2). Dieses Kulturverhalten legt die Vermutung nahe, dass entweder phototrophe oder chemolithotrophe Bakterien in der Gemeinschaft vorhanden waren, die CO<sub>2</sub> fixierten oder ein Shift im Stoffwechsel der Spezies stattgefunden hat. Die Möglichkeit der oxygenen Photosynthese wurde in vorliegender Arbeit mehrfach

analytisch ausgeschlossen. Von Cyanobakterien ist bekannt, dass besonders die Photosynthesepigmente sehr sensibel auf UV-Strahlung reagieren (Sinha et al., 1995) und dass die meisten Vertreter obligat phototroph sind. Gegen die Anwesenheit von Cyanobakterien spricht auch der signifikante Anstieg des Sauerstoffverbrauchs zwischen dem zweiten und vierten Tag unter Einwirkung von polychromatischem Licht 2 [25 W]. Der hohe Sauerstoffverbrauch lässt eher auf eine Stressreaktion der Gemeinschaften schließen. Pakulski et al. (1998) beschreiben den Einfluss von Lichtstress auf den O<sub>2</sub>-Verbrauch in Abhängigkeit vom Tag-Nacht-Rhythmus. Die Autoren vermuteten eine Erhöhung der Respirationsrate als Antwort auf Lichtstress, in der Dunkelphase. Thomson et al. (1980) beschreiben einen Dosis-abhängigen Anstieg der Respirationsrate in Bakterien, die künstlicher UV-Strahlung ausgesetzt waren. Jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit kein Tag-Nacht-Rhythmus festgestellt werden. Eine potentielle Erholung der Gemeinschaft in der Dunkelphase ging weder mit einem verminderten O2-Verbrauch noch mit einer vermehrten CO2-Produktion einher. Andere Autoren untersuchten die CO<sub>2</sub>-Produktion der Gemeinschaften unter Lichtstress. So wurde z.B. eine signifikante Verringerung der Aktivität. über Thymidinund Leucinaufnahme, gemessen mariner Bakteriengemeinschaften nach Exposition mit natürlicher und künstlicher Sonnenstrahlung nachgewiesen (Kaiser & Herndl, 1997; Aas et al., 1996). Diskutiert ein Zusammenhang zwischen der Anpassung der wurde Zellen an Nährstofflimitierung und oxidativem Stress (McDougald et al., 2002). Dies könnte bedeuten, dass sich Bakterien unter Bestrahlung ähnlich wie Nährstoff limitierte Bakterien verhalten. Die Folge wäre ein vorzeitiger Abbruch der Mineralisation und ein erhöhter Sauerstoffverbrauch. Beides wurde in der vorliegenden Arbeit in den Kulturen mit starker Bestrahlung (p.L.2 [25 W]) nachgewiesen (Tab. 5.1). In marinen Vibrio Stämmen wurde eine erhöhte Stressresistenz beim Übergang in die stationäre Phase (Nährstofflimitierung) nachgewiesen (Nyström & Kjelleberg, 1992), an dem das RelA/SpoT Regulationssytem beteiligt ist (McDougald et al., 2002). Außerdem zeigten an Nährstofflimitation adaptierte Bakterien eine erhöhte Resistenz gegenüber verschiedenen Stressoren (z.B. UV [302 nm] und CdCl<sub>2</sub>[0,4 mM] (Nyström & Kjelleberg, 1992). Dieser Zusammenhang wurde auch in E. coli Kulturen nachgewiesen (Dukan & Nyström, 1998). Dukan & Nyström (1998) vermuteten einen Rückkopplungs-Mechanismus, bei dem die Enzyme des Tricarbonsäurezyklus, die sensibel auf oxidativen Stress reagieren, gehemmt werden, was zu einer Inhibierung der Respiration führt. Dem widerspricht der in Tab. 5.1 aufgeführte hohe O<sub>2</sub>-Verbrauch in der stark bestrahlten Gemeinschaft (p.L.2 [25 W]).

#### Cadmiumacetat

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Anwesenheit von Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] zu einer signifikanten Verzögerung der lag-Phase der Gemeinschaft führt. Das Wachstum ebenso wie die Stoffwechelaktivität waren gegenüber der Dunkelkontrolle um 24 h verzögert. Jedoch war der RQ-Wert der cadmiumbelasteten Gemeinschaft nach 10 Tagen im Vergleich zur Dunkelkontrolle nur leicht verringert. Somit war die Mineralisierung der Substrate kaum durch Cadmium beeinflusst. Demnach wäre eine Anpassung der Gemeinschaft, eventuell auch Selektion cadmiumresistenter Spezies, die zur fast vollständigen Mineralisierung des Substrates in der Lage ist, zu erwarten.

## Kombination

Vergleicht man die  $CO_2$ -Produktion aller Gemeinschaften im Kulturverlauf, so zeigt sich, dass die unterschiedlich belasteten Gemeinschaften eine signifikant voneinander abweichende  $CO_2$ -Produktion hatten (Abb. 5.1). Dabei wird deutlich, dass

- in den Gemeinschaften mit Cd<sup>2+</sup> als alleiniger Noxe, die CO<sub>2</sub>-Produktion am Kultivierungsanfang (2 d) fast vollständig inhibiert wurde, von der sich die Gemeinschaft jedoch mit zunehmender Kultivierungszeit wieder erholte,
- mit zunehmender Bestrahlungsdosis eine die CO<sub>2</sub>-Produktion inhibierende Wirkung nachweisbar war, die in der Gemeinschaft, die starker Bestrahlung (p.L.2 [25 W]) ausgesetzt war, mit zunehmender Kultivierungszeit zunahm und
- sich die Gemeinschaften unter der kombinierten Einwirkung von inhibierenden Wirkungen, die zu Kulturbeginn zu beobachten war, unterschiedlich gut erholten.



**Abb. 5.1:** Gesamt-CO<sub>2</sub>-Produktion der belasteten Gemeinschaften, im Vergleich zur Dunkelkontrolle. CO<sub>2</sub>-Produktion [%] = produzierte Menge CO<sub>2</sub> in Prozent der Dunkelkontrolle (100 %;); dargestellt ist der Unterschied nach 2, 3 und 10 Tagen. p.L.1 = polychromatisches Licht 1 [15 W]; p.L.2 = polychromatisches Licht 2 [25 W]; Cd<sup>2+</sup> = Cadmiumacteat [0,05 mM]; Kombi 1 = Kombination 1 mit p.L.1 [15 W] und Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM]; Kombi 2 = Kombination 2 mit p.L. 2 [25 W] und Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM]

In Abbildung 5.2 ist eine schematische Einordnung der bisher diskutierten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammengefasst. Die vereinfachte Darstellung zeigt, dass das Verhalten der Gemeinschaften von drei Faktoren bestimmt wird. Die Kultivierungszeit ist neben den beiden Noxen der dritte Einflussfaktor. Die Dunkelkontrolle und die cadmiumbelastete Gemeinschaft durchlaufen nach dem Start der Kulturen eine einzige Adaptionsphase und passen sich so den Kulturbedingungen im Fermenter an. Dahingegen durchlaufen alle bestrahlten Gemeinschaften, auch die Gemeinschaften mit kombinierter Einwirkung, mindestens zwei Adaptionsphasen. Am Kultivierungsende haben sich Gemeinschaften entwickelt, die perfekt an die jeweiligen Kulturbedingungen angepasst sind. Die Veränderung der Spezies-Zusammensetzung der Gemeinschaft in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit und den eingesetzten Noxen ist zu erwarten.



Abb. 5.2: Zeitabhängiger Einfluss der Noxen auf die Stoffwechselaktiviät und das Wachstum der untersuchten Gemeinschaften. O<sub>2</sub>-Verbrauch/CO<sub>2</sub>-Produktion = Stoffwechselaktivität; Gesamtzellzahl und Lebendzellzahl der Acetat-Pyruvat-konsumierenden Bakterien (APB) = Wachstum;  $\uparrow/\downarrow$  = Veränderung der untersuchten Parameter im Vergleich zur Dunkelkontrolle; = Einfluss von Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM]; = Dunkelkontrolle; = Einfluss von p.L.1 [15 W]; = Einfluss von p.L.2 [25 W]; gelb = mögliche Adaption und deren Folgen

## 5.3 Metabolische Diversität

In der obersten oxischen Schicht des Wattsediments ist durch die unterschiedlichen Einflüsse des tiefer liegenden Sediments und durch die Wassersäule eine sehr artenreiche mikrobielle Gemeinschaft vorhanden. In der vorliegenden Arbeit wurden über das MPN-Verfahren die Abundanz zentraler metabolischer Gruppen dieses Habitats (chemoorganotrophe Acetat-Pyruvat-konsumierende (APB), denitrifizierende (DNB), sulfatreduzierende (SRB) und Methanol-konsumierende Bakterien) untersucht. Zusätzlich wurden die Substratverwertungsspektren der kultivierten Gemeinschaften erfasst.

## 5.3.1 Wachstum auf verschiedenen C-Quellen

Die im vorangegangenen Abschnitt getroffene Annahme, dass die verschieden belasteten Gemeinschaften im Kulturverlauf unterschiedliche Adaptionen durchlaufen, wird durch Verschiebungen in der Abundanz der untersuchten metabolischen Gemeinschaften gestützt. Sulfatreduzierende Bakterien waren in allen Gemeinschaften in geringer Konzentration präsent, zeigten aber kein Wachstum. Berthe-Corti & Bruns (1999) wiesen für das Wachstum sulfatreduzierender Bakterien aus dem Wattsediment eine ausgeprägte Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration nach. Von verschiedenen Autoren wurde gezeigt, dass Sulfatreduzierer auch aerotolerant sein können (Dilling & Cypionka, 1990; Johnson et al., 1997). Von besonderer Bedeutung für die toxische Wirkung von Cadmium im marinen Milieu sind Sulfatreduzierer wegen ihrer Fähigkeit zur Sulfidbildung. Denn Sulfid kann mit Cadmium unlösliches Cadmiumsulfid bilden, welches nicht bioverfügbar ist und UVB-Strahlung ( $\leq$  360 nm) absorbiert (Eychmüller & Rogach, 2000). Im Gegensatz zu den sulfatreduzierenden Bakterien wurde in der vorliegenden Arbeit für denitrifizierende Methanol-konsumierende Bakterien und Bakterien eine Abhängigkeit von der eingesetzten Bestrahlungsdosis nachgewiesen, die sich auch in den Versuchen, die der kombinierten Einwirkung ausgesetzt waren, auswirkte.

## **Polychromatisches Licht**

Der Einfluss von Licht auf die Denitrifikation bakterieller Gemeinschaften, ist bisher wenig untersucht. Mancinelli & White (2000) beschreiben, dass UV-Strahlung die Denitrifikation von *Pseudomonas fluorescence* und *Lyngbya* (Cyanobakterien) inhibiert. Allerdings bestrahlten die Autoren nur 3 h mit UV-Licht und nicht mit polychromatischem Licht (Mancinelli & White, 2000). Andere Autoren wiesen einen Effekt von Licht auf *Pseudomonas* sp. Stamm JR12 (nichtphototropher Denitrifizierer) nach, indem Licht die Oxidation von Cytochrom c unter anoxischen Bedingungen reversibel störte, was zu einer Nitritakkumulation in den Zellen führte (Barak & van Rijin, 1998). Im Gegensatz dazu war die aerobe Respiration von *Pseudomonas* sp. Stamm JR12 nicht durch Licht beeinflusst. Die Arbeiten legen folgende Hypothese zur Wirkung von polychromatischem Licht nahe: Durch Licht kommt es unter oxischen Bedingungen zu einer Nitritakkumulation, die das Wachstum der Spezies fördert, die Nitritreduktion durchführen können. Dies wäre eine potentielle Erklärung dafür, dass in der vorliegenden Arbeit mit zunehmender Kultivierungszeit und zunehmender Bestrahlung eine erhöhte Konzentration an Nitritreduzierenden Bakterien nachweisbar war.

In allen Kulturansätzen wurden Gemeinschaften nachgewiesen, die Methanol als alleinige C-Quelle nutzen konnten, obwohl dem Kulturmedium kein Methanol zugesetzt worden war. Zwar scheint polychromatisches Licht auf die Methanolkonsumierenden Bakterien (MKB) einen positiven Selektionsdruck auszuüben, ein signifikanter Effekt konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Da methylotrophe Bakterien in marinen Sedimenten am Umsatz klimarelevanter Verbindungen (z.B. Methan, DMS) beteiligt sind, war die Charakterisierung dieser Gruppe von besonderem Interesse. Zur Charakterisierung der Gemeinschaft methylotropher Bakterien wurden einzelne Stämme, die schwacher Bestrahlung (p.L.1 [15 W]) ausgesetzt waren, isoliert und charakterisiert. Die Isolate müssen als methylotroph angesehen werden, da sie nur auf den für MKB typischen C-Quellen wachsen (Hartmann, persönliche Mitteilung). Anhand der Sequenzanalyse von ca. 500 bp konnten die von Hartmann isolierten Stämme den Gammaproteobakterien zugeordnet werden (Ordnung Thiotrichales, Familie Piscirickettsiaceae, Gattung Methylophaga). Da dem Medium im Fermenter weder Methanol, noch eine andere C1-Quelle zugeführt worden war, musste ein geeignetes Substrat im Laufe der Kultivierung als metabolisches Produkt entstanden sein. Dieser Effekt scheint durch Lichteinfluss begünstig zu werden. Denkbar wären zwei Erklärungsansätze:

Szenario 1: Nicht identifizierte extrazelluläre Adaptionsfaktoren (EAFs) sind verantwortlich für die Adaption von Bakterien an eine neue Umgebung, spielen eine Rolle bei der Initialisierung der expotentiellen und stationären Phase und bei der bakteriellen Kommunikation (Nikolaev, 2004; Welsh, 2000). Diese extrazellulären Metabolite wirken direkt (über physikalisch-chemische Interaktionen mit der Zelle und Makromolekülen) und schützen dadurch die Zelle vor ungünstigen Umweltbedingungen. Vertreter niedrigmolekularer löslicher Stoffe sind z.B. Betain, Ectoin und Aminosäuren (Gilles, 1997; Welsh, 2000). Einige dieser niedrigmolekularen Substanzen werden bei Einwirkung von Umweltstress und UV-Strahlung produziert. Von besonderem Interesse ist dabei Betain. Sowohl gramnegative als auch grampositive Bakterien sind in der Lage, Glycin-Betain zu synthetisieren (Le Rudulier *et al.*, 1984), welches als Schutz vor osmotischem Stress dient und von einer Reihe von Spezies als C- und N-Quelle genutzt werden kann
(Lisa et al., 1983; Smith et al., 1988). Der aerobe Abbau von Glycin-Betain geht mit einer schrittweisen Demethylierung einher (Smith et al., 1988; Bernard et al., 1986). Bei diesem Abbauweg (Krieger et al., 2004) entstehen sowohl Formaldehyd als auch L-Serin, die beide eine Schlüsselstellung im Ribulosemonophosphat- bzw. Serinweg der methanotrophen- und methylotrophen Bakterien einnehmen. Beides sind potentielle Substrate für methylotrophe Bakterien. Scenario 2: Dimethylsulfid (DMS), ein klimaaktives Gas, könnte in den Kulturen von Bedeutung sein und von den MKB als Substrat genutzt werden. DMSP (Dimethylsulfopropionat) wird von vielen Mikro- und Makroalgen synthetisiert (Kirst, 1996). In die Umgebung ausgeschleust, wird es sehr schnell durch DMSP-Lyase in DMS umgewandelt (Welsh, 2000) und entweicht anschließend in die Atmosphäre (Taylor & Keine, 1989; Taylor & Visscher, 1996) oder wird photochemisch zu Dimethylsulfoxid (DMSO) oxidiert (Zeyer *et al.*, 1987). Unter oxischen Bedingungen kann DMS durch methylotrophe Bakterien (Methylophaga sulfidovorans) zu CO<sub>2</sub> und Sulfat bzw. Thiosulfat oxidiert werden (Visscher & Taylor, 1993; De Zwart et al., 1996). DMSP und DMS können über den Demethylierungs-/Demethiolationweg aerob metabolisiert werden (Taylor & Gilchrist, 1991; Taylor & Visscher, 1996;). In diesem Fall müsste noch geklärt werden, ob die Isolate mit DMSP oder DMS als einziger C-Quelle wachsen können. Im Zusammenhang mit der beschriebenen Zunahme an denitrifizierenden Bakterien in den bestrahlten Kulturen muss auch in Betracht gezogen werden, dass in bestrahlten Kulturen Spezies angereichert wurden, die einen sowohl methylotrophen als auch denitrifizierenden Stoffwechsel haben. Ein solcher Vertreter wäre z.B. Hypomicrobium denitrificans, das zu den Alphaproteobakterien gehört (Urakami et al., 1995).

### Cadmiumacetat

Nach dem anfänglichen wachstumshemmenden Effekt von  $Cd^{2+}$  [0,05 mM] auf die denitrifizierenden Bakterien, unterschied sich nach 10 Tagen Kultivierung die cadmiumbelastetete Gemeinschaft in Gesamtzellzahl und Lebendzellzahl (APB) nicht von der Dunkelkontrolle. Im Gegensatz zur mikrobiellen Toxizität von  $Cd^{2+}$  im marinen Milieu ist die mikrobielle Toxizität von  $Cd^{2+}$  auf Denitrifikation in Böden gut untersucht. Babich & Stotzky (1985) wiesen für verschiedene Schwermetalle eine toxische Wirkung in der Reihenfolge Cd > Zn > Cu > Pb nach. Nitrit akkumulierte nicht in unbehandelten Böden, verharrte jedoch bis zu drei Wochen in cadmiumkontaminierten Böden [Cd<sup>2+</sup> 200-500 ppm] (Babich & Stotzky, 1985). Die Stickstoffoxidkonzentration (N<sub>2</sub>O) verringerte sich während der dreiwöchigen Inkubationzeit in unbelasteten Böden, während in Schwermetall kontaminierten Böden N<sub>2</sub>O akkumuliert wurde (Bollag & Barabasz, 1979).

#### Kombination

Ordnet man die Gemeinschaften, die der Kombination von Noxen ausgesetzt waren, in das Schema der Abbildung 5.2 ein, so fällt auf, dass sich die Gemeinschaften an die Cadmiumbedingungen im Fermenter adaptieren müssen. Durch das zusätzlich applizierte Licht ändert sich die Zusammensetzung der Gemeinschaften und die Mineralisation der Substrate verringert sich mit zunehmender Bestrahlungsdosis. Die Gemeinschaft, die p.L.1 [15 W] und Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] ausgesetzt war, verhielt sich grundsätzlich anders. Werden diese zwei Noxen in Kombination appliziert, wirkt dies toxischer auf die Gemeinschaft als die Applikation der jeweiligen Einzelnoxe. Die Folge ist entweder ein Verlust der Überlebensfähigkeit einzelner Spezies und eine damit verbundene verringerte Stoffwechselaktivität oder eine Änderung des Stoffwechsels einzelner Spezies sowie möglicherweise ein Zusammenspiel beider Effekte.

Für die Gemeinschaft, die starker Bestrahlung (p.L.2 [25 W]) und Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM]) ausgesetzt war, wurde dieser toxische Effekt nicht nachgewiesen. Im Gegenteil, vergleicht man die Mineralisation der Substrate, so scheint die toxische Wirkung auf die Mineralisation im Vergleich zur Einzelbelastung mit p.L.2 [25 W] abgeschwächt zu sein (Tab. 5.1). Diese gegensätzlichen Effekte in den Gemeinschaften, die der Kombination von Cd<sup>2+</sup> und Licht ausgesetzt waren, legen nahe, dass eine Interaktionen zwischen den Noxen selbst stattfand. Vorstellbar wäre, dass von den sulfatreduzierenden Bakterien gebildetes Cadmiumsulfid einen Teil der hohen UVB-Strahlung des p.L.2 [25 W] absorbierte und dadurch die toxische Eigenschaft von Cd<sup>2+</sup> abgeschwächt wurde. Trifft diese Erklärung zu, müsste in der Gemeinschaft die Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] und p.L.1 [15 W] ausgesetzt war, nicht der UVB-Anteil, sondern der höhere UVA-Anteil des p.L.1 [15 W] für die toxische Wirkung verantwortlich sein (Abb. 3.1). Die Kombination von Schwermetallen und UV-Licht wurde in Säugerzellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass Metalle wie Nickel (II) und Cadmium (II) die Erkennung von DNA-Schäden, die durch UV-Bestrahlung erzeugt wurden, stören (Hartmann et al., 1998). Wenn man weiterhin davon ausgeht, dass

Zink ein zentrales Atom in den DNA-Reparturenzymen von Säugerzellen (Zinkfingermotiv) und in der Superoxid-Dismutase (SOD) ist, dann wäre es möglich, dass die SOD in der Gemeinschaft, die der kombinierten Wirkung von Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] und p.L.1 [15 W] ausgesetzt war, inhibiert wurde. Möglicherweise erfolgt diese Inhibierung auch bei weiteren Enzymen, die zweiwertige Metallionen als Zentralatom haben, wie z.B. Katalase und Peroxidase.

#### 5.3.2 Substratverwertungsspekrum

In allen Gemeinschaften, die einer Noxe ausgesetzt waren, war die Metabolisierung von Glucose-1-Phosphat inhibiert. Glucose-1-Phosphat spielt eine Rolle bei der Synthese und dem Abbau von Glycogen, Stärke und Zellulose (Michal, 1999). Zusätzlich war keine der bestrahlten Gemeinschaften in Lage, Glucose-1-Phosphat, D,L-Glyzerolphosphat oder  $\alpha$ -Ketobuttersäure zu metabolisieren. Man könnte annehmen, dass sowohl der Speicherstoffwechsel und Energiehaushalt als auch der Aminosäurestoffwechsel durch die applizierten Noxen empfindlich gestört wurden.

## 5.4 Struktur der Gemeinschaft

Aus den in Abbildung 5.2 dargestellten Zusammenhängen geht hervor, dass die unterschiedlichen Adaptionsmechanismen zu einer Änderung der phylogentischen Zusammensetzung und der Struktur der Gemeinschaften führten. So wird deutlich, dass die Gemeinschaften je nach eingesetzten Noxen unterschiedlich beeinflusst waren.

#### **Polychromatisches Licht**

Die phylogenetische Zusammensetzung der Gemeinschaft, die schwacher Bestrahlung (p.L.1 [15 W]) ausgesetzt war, unterschied sich nicht von der Zusammensetzung der Dunkelkontrolle. Zu den dominanten phylogenetischen Gruppen gehörten die Gammaproteobakterien und Bakterien der CFB-Gruppe. Eine ähnliche phylogenetische Zusammensetzung wurde in kontinuierlichen SedimentSuspensions-Kulturen mit bakteriellen Gemeinschaften aus dem Wattsediment der Deutschen Nordseeküste (Bruns & Berthe-Corti, 1998) und *in situ* im Wattsediment (bis zu 5 cm Tiefe) der Deutschen Nordsee bei Dangast (Llobet-Brossa *et al.*, 1998) nachgewiesen.

Unter starker Bestrahlung (p.L.2 [25 W]) hingegen verschob sich die phylogenetische Zusammensetzung der Gemeinschaft. Neben Gamma- und Betaproteobakterien dominierte eine unbekannte phylogentische Gruppe. Alle Gemeinschaften, die in Kulturen mit starker Bestrahlung (p.L.2 [25 W]) aufwuchsen, müssen aufgrund des Spektrums der Bestrahlungslampe eine hohe Toleranz gegen UVB-Bestrahlung haben. Eine Verschiebung der Zusammensetzung der Gemeinschaft unter Licht-Stress war zu erwarten, da große interspezifische Aktivitätsunterschiede in Bezug auf die UVB-Sensibilität und das Erholungsvermögen von marinen Einzelisolaten nachgewiesen wurden (Arrieta et al., 2000). Winter et al. (2001) untersuchten den Einfluss von unterschiedlichem Lichtstress (UV- und Sonnenstrahlung) auf die Zusammensetzung mariner Bakteriengemeinschaften aus der oberen Schicht der Nordsee (Wassersäule) im Laborexperiment. Unter verschiedenen Strahlungsbedingungen wurden nur geringe Änderungen in der Struktur der Gemeinschaft (Präsenz von DNA-Banden im DGGE-Gel) nachgewiesen. Die Autoren konnten jedoch anhand der Sequenzierung von DNA-Banden aus dem DGGE-Gel zeigen, dass es innerhalb der CFB-Gruppe sowohl UV-resistente, als auch UV-sensitive Spezies gab (Winter et al., 2001). Die Gemeinschaft, die von Winter et al. (2001) und die Gemeinschaft, die in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde, stammen beide aus einem ähnlichen Habitat der Nordsee. Es ist also anzunehmen, dass auch in der hier untersuchten Gemeinschaft die Vertreter der CFB-Gruppe ähnliche UV-Sensitivitäten aufwiesen wie die von Winter et al. (2001) beschriebenen.

#### Cadmiumacetat

Bei Anwesenheit von  $Cd^{2+}$  [0,05 mM] waren die Zellen wahrscheinlich morphologisch so verändert sein, dass eine Erfassung (Fluoreszenz-markierte *in situ*-Hybridisierung (FISH) sowie Extraktion und Amplifikation der DNA) der Bakterien kaum möglich war. Dieser störende Einfluss von  $Cd^{2+}$  nahm mit zunehmender Kultivierungszeit ab. Im späteren Kulturverlauf konnten sowohl mittels FISH als auch über die Präsenz von DNA-Banden im DGGE-Gel Alphaproteobakterein als dominante Spezies nachgewiesen werden. Viele Spezies, die zur Gruppe der Alphaproteobakterien gehören, sind zur  $CO_2$ -Fixierung in der Lage, entweder chemolitotroph oder phototroph. Eine entsprechende Umstellung des Stoffwechsels der kultivierten Gemeinschaft insgesamt wäre denkbar. Da unter  $Cd^{2+}$ -Einfluss die  $CO_2$ -Produktion und damit die Substratmineralisation der Gemeinschaften ähnlich hoch war wie in der Dunkelkontrolle, ist eine Fixierung von  $CO_2$  nicht wahrscheinlich. Eine Zunahme der Konzentration an Alphaproteobakterien wurde auch bei der Kultivierung bakterieller Gemeinschaften aus dem Wattsediment unter suboxischen Bedingungen ( $0,4 \% pO_2$ ) nachgewiesen (Bruns & Berthe-Corti, 1998). Möglich wäre daher, dass Alphaproteobakterien nicht sehr sensibel auf bestimmte Umweltfaktoren wie z.B. Sauerstofflimitierung oder Schwermetallbelastung reagieren. Eine Anpassung an die in der vorliegenden Arbeit vorgegebenen Kulturbedingungen ist somit wahrscheinlich.

#### Kombination

Die cadmiumbelasteten Gemeinschaften wurden zusätzlich zwei unterschiedlich intensiven Bestrahlungsintensitäten (p.L.1 [15 W] und p.L.2 [25 W]) ausgesetzt. Entsprechend der Intensität des zusätzlich einwirkenden Lichtstresses unterschieden sich beide Gemeinschaften deutlich in ihrer Zusammensetzung. In der Kombination von Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] mit p.L.1 [15 W] dominierten die Alphaproteobakterien. Somit schien Cadmium der bestimmende Faktor für die Zusammensetzung der Gemeinschaft zu sein. Durch die Analyse ausgewählter DNA-Banden aus den DGGE-Gelen der entsprechenden Gemeinschaften konnten einige Alphaproteobakterien identifiziert werden. Dazu gehörten u.a. Roseobacter und Sulfitobacter. Roseobacter gehört zu den taxonomisch klassifizierten marinen Genera, die zur aeroben anoxygenen Photosynthese in der Lage sind (Yurkov & Beatty, 1998; Allgaier et al., 2003) und wurde bereits aus der Nordsee isoliert (Wagner-Döbler et al., 2003). Merkmale dieser Spezies sind die hoch diversen physiologischen Eigenschaften, die die Metabolisierung u.a. von Dimethylsulfoniopropionat (DMSP) beinhaltet (Zubkov et al., 2001). Hier könnte ein Zusammenhang zu der im vorangegangenen Kapitel diskutierten Zunahme der methylotrophen Bakterien bestehen. Spezies, die zur aeroben anoxygenen Photosynthese in der Lage sind, besitzen pufLM Gene, die verantwortlich für die Ausbildung des Photoreaktionszentrums sind (Allgaier et al., 2003), und exprimieren

Bakteriochlorophyll a, dessen Synthese durch Umweltparameter reguliert wird (Yurkov & Beatty, 1998). Unter oxischen Kultivierungsbedingungen wird die Expression des *puf* Operons von *Roseotales depolymerans* durch Limitierung der C-Quelle induziert und komplett durch Licht inhibiert (Suyama *et al.*, 2002). Für die vorliegenden Untersuchungen könnte dies bedeuten, dass unter oxischen, nährstofflimitierten Bedingungen (stat. Phase) und Lichteinfluss die Bildung von Bchl a (Bakteriochlorophyll) inhibiert und im Dunkeln die Expression von Bchl a vermehrt induziert wurde. Durch die in dieser Arbeit gewählten Simulation des Tag-Nacht-Rhythmus konnte *Roseobacter* möglicherweise keine Photosynthese betreiben und musste chemoorganotroph wachsen. Dies wäre eine Erklärung für das Vorhandensein dieser Spezies sowohl in den cadmiumbelasteten Gemeinschaften ohne Lichtstress, als auch in den Gemeinschaften, die der kombinierten Einwirkung von Cadmium und polychromatischem Licht ausgesetzt waren.

In der Gemeinschaft, die zusätzlich starker Bestrahlung (p.L.2 [25W]) ausgesetzt war, dominierten eine unbekannte phylogenetische Gruppe und die Gammaproteobakterien. Anders als in der schwach bestrahlten Kultur schien hier das Licht den entscheidenden selektiven Einfluss zu haben. Zusätzlich gab die Struktur der Gemeinschaft Hinweise auf das Vorhandensein von *Firmicutes*, die aufgrund der gewählten Sonden in der Analyse mittels FISH, einer unbekannten phylogenetischen Gruppe zugeordnet werden können. Da *Firmicutes* zur Sporenbildung befähigt sind, ist daher eine vermehrte Sporenbildung als Schutzreaktion auf die Noxeneinwirkung vorstellbar.

## 5.5 Fazit und Ausblick

Wie aus der vorliegenden Arbeit hervorgeht, sind komplexe Mechanismen und Wechselwirkungen involviert, die das Vermögen einer bakteriellen Gemeinschaft beeinflussen, sich an ungünstige Umweltbedingungen anzupassen. In Abbildung 5.2 wurden die potentiellen Zusammenhänge zwischen Noxeneinwirkung und Reaktion der Gemeinschaften dargestellt. Dabei fallen folgende Zusammenhänge auf: Zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung gibt es mehrere Adaptionsphasen, die durch die Kulturbedingungen und/oder durch das Einwirken der Noxen bestimmt

werden. Die Folge der unterschiedlichen Adaption ist eine Verschiebung der Zusammensetzung der Gemeinschaft und unterschiedliche Mineralisierung.

Zusätzlich zu dem variirenden Selektionsdruck, der durch die Noxen auf die Gemeinschaften wirkte, sind physikalisch-chemische Reaktionen involviert. Die zum Einen das Substratangebot verändern können und zum Anderen die jeweilig andere Noxe in ihrer Toxizität beeinflussen. Somit wäre also entscheidend, welcher Selektionsdruck zuerst oder am stärksten wirkt. Die daraus resultierende Zusammensetzung der Gemeinschaft entscheidet auch über die spätere Entwicklung und Kompensation. Um die in vorliegender Arbeit aufgestellten Hypothesen bestätigen oder verwerfen zu können, wären folgende weitere Untersuchungen denkbar:

- Eine genauere Betrachtung der zwei für den Kohlenstoffkreislauf relevanten Gruppen der Denitrifizierer und Methanol-konsumierenden Bakterien (Stammbeschreibung, Identifikation von Stoffwechsel relevanter Schlüsselgene).
- Nachweis von chemischen Botenstoffen, die an einer Zell-Zell-Kommunikation beteiligt sind und daher die Fähigkeit zur Adaption der Gemeinschaft an ungünstige Umweltbedingungen erhöht.
- Untersuchung der physikalisch-chemischen Interaktionen zwischen Licht und Cadmium.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnten als Grundlage für nachfolgende Kombinationsversuche dienen, um z.B. die Anwendung der Modelle (CA und IA) zu prüfen.

# 6 Zusammenfassung

Bakterioplankton spielt im Kohlenstoff- und Energiefluss mariner Habitate eine große Rolle. Im intertidalen Bereich wird die Planktonaktivität noch durch die Aktivität der im Sediment und auf der Sedimentoberfläche lebenden mikrobiellen Gemeinschaft ergänzt. Intertidale Sedimente sind jedoch je nach Tidenstand unterschiedlichen Einflüssen ausgesetzt. Durch periodisches Trockenfallen der Sedimente sind die Gemeinschaften periodisch starkem Sonnenlicht mit entsprechendem UV-Anteil ausgesetzt. Zusätzlich werden sie verstärkt durch Umweltchemikalien belastet, die durch die Bewirtschaftung der Küstenregionen eingetragen werden. Im Bereich der Deutschen Nordseeküste spielt u.a. Cadmium eine besondere Rolle. Obwohl die mikrobielle Stoffumsetzung im Wattsediment von großer Bedeutung ist, wurden die Einflüsse verschiedener anthropogen verursachter Störungen auf die Bakteriengemeinschaften in diesem Ökosystem nur wenig untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl der Einfluss von polychromatischem Licht mit erhöhtem UV-Anteil als auch von Cadmiumacetat auf die bakterielle Gemeinschaft unter definierten Bedingungen im Labor untersucht.

Die Hauptaussagen dieser Arbeit können wie folgt zusammengefasst werden:

#### **Polychromatisches Licht**

Die Wirkung von polychromatischem Licht (p.L.) auf die Bakteriengemeinschaften war folgendermaßen von der Lichtintensität abhängig:.

Bei der Einwirkung der schwachen Lichtintenisttät (p.L.1 [15 W]) konnten in der Gemeinschaft keine Effekte nachgewiesen werden. Die Gemeinschaft unterschied sich weder in der Stoffwechselaktivität noch in der metabolischen Zusammensetzung von der Dunkelkontrolle.

Bei der Einwirkung der starken Lichtintensität (p.L. 2 [25 W]) kam es zu einem drastischen Einbruch der Mineralisation. Gleichzeitig wurde ein signifikant erhöhter Sauerstoffverbrauch gemessen, der als Stressantwort gedeutet wird. Die Folge war eine Verschiebung der Zusammensetzung, in der eine unbekannte phylogenetische

Gruppe und die Gammaproteobakterien dominierten. Zusätzlich wurde das Wachstum der Denitrifizierer und Methanol-konsumierenden Bakterien stimuliert.

### Cadmiumacetat

Die gewählte Cadmiumkonzentration  $[Cd^{2+} 0,05 \text{ mM}]$  zeigte eine toxische Wirkung in der Anfangsphase der Kultivierung, von der sich die Gemeinschaft mit zunehmender Kultivierungszeit erholte. Die in ihrer phylogenetischen Zusammensetzung zugunsten der Alphaproteobakterien veränderte Gemeinschaft, war dann in der Lage, eine ähnlich hohe Substratmineralisierung wie die unbelastete Gemeinschaft zu leisten.

#### Kombination von polychromatischem Licht und Cadmiumacetat

Bei der kombinierten Einwirkung von Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] und polychromatischem Licht [15 W/25 W] auf die bakteriellen Gemeinschaften traten am Anfang der Kultivierung Cd<sup>2+</sup>-bedingte toxische Effekte auf, die zur Verzögerung der Stoffwechselaktivität und des Wachstums führten. Davon erholten sich diese Gemeinschaften trotz zusätzlichem Bestrahlungsstress. Es wird eine Interaktion der beiden Noxen miteinander vermutet, da unterschiedliche Effekte im Kultivierungsverlauf nachgewiesen wurden.

In der Gemeinschaft, die dem Licht schwacher Intensität (p.L.1 [15 W]) in Kombination mit  $Cd^{2+}$  [0,05 mM] ausgesetzt war, wurde eine Zunahme des toxischen Effekts nachgewiesen, im Vergleich zu den Gemeinschaften, die nur der schwachen Intensität (p.L.1 [15 W]) ausgesetzt waren.

Dagegen wurde keine Änderung bzw. eine Abnahme des toxischen Effekts in den Kulturen nachgewiesen, die der Kombination mit Cd<sup>2+</sup> [0,05 mM] und p.L.2 [25 W] ausgesetzt waren, im Vergleich zu den Gemeinschaften, die nur der starken Intensität (p.L.2 [25 W]) ausgesetzt waren.

Die Folge dieser unterschiedlichen Effekte waren Änderungen in der Zusammensetzung der Gemeinschaften. In der Gemeinschaft, in der  $Cd^{2+}$  [0,05 mM] und p.L.1 [15 W] appliziert wurde, dominierten die Alphaproteobakterien. In der Gemeinschaft, die  $Cd^{2+}$  [0,05 mM] und p.L.2 [25 W] ausgesetzt war, dominierten die Gammaproteobakterien und eine unbekannte phylogenetische Gruppe, die wahrscheinlich den grampositiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt zugeordnet werden kann.

## Summary

Bacterioplancton plays a key role in the carbon cycle of marine habitats. In intertidal zones the microbial communities living in sediments or on the sediment surfaces are of great importance also. Intertidal sediments are exposed to multiple influences which vary with the changing tide. During low tide large parts of the sediment surface fall dry and are exposed to air and sunlight. Depending on weather and season the intensity of the sun light varies considerably. As the intertidal sediment of the German Wadden sea is part of a region with a high industrial and agricultural activity, it is also exposed to anthropogenic influences. Only few investigations deal with the influence of multiple environmental factors on the bacterial activity in the Wadden sediment. In the presented thesis the influence of polychromatic light and of cadmium on the activity of the microbial community of the Wadden sediment was investigated under controlled laboratory conditions

The following essential results are obtained:

#### **Polychromatic light**

Polychromatic light had diverse effects on the microbial communities under investigation. The effects depended on the intensity of the radiation.

Light of low intensity (p.L.1 [15 W]) showed no effects on the community. None of the investigated parameters was significantly different from the control cultures which had been cultivated under dark conditions (dark control). This was also the case for the metabolic activity ( $CO_2$ -production,  $O_2$ -consumption), the metabolic diversity (substrate consumption pattern), as well as the community composition and structure (phylogenetic diversity and species composition).

Light of high intensity (p.L.2 [25 W]) showed multiple effects on the metabolic capacity of the cultures and on the community structure. The carbon dioxide production of the communities was significantly reduced whereas the oxygen consumption increased significantly. As no photosynthetic organisms could be detected the low carbon dioxide production has to be interpreted as a loss in the culture's capacity to mineralize the offered carbon sources. The high oxygen consumption may be interpreted as a stress response to the cultivation conditions. The abundance of different metabolic groups in the community was affected whereas

The density of the acetate-pyruvate-consuming community remained unchanged whereas the density of the denitrifying and the methylotrophic bacteria increased.

#### Cadmiumacetate

Cadmium was added as cadmiumacetate to the cultures in a  $Cd^{2+}$  concentration of 0.05 mM. This  $Cd^{2+}$  concentration showed a pronounced toxic effect on the communities during the first 48 hours of cultivation. Addition of  $Cd^{2+}$  caused a 24 hour-delay of the community's growth and metabolic activity ( $CO_2$ -production,  $O_2$ -consumption). Later on, the community was able to recover and showed the same metabolic activity as did the community in the dark control. The species composition and community structure, however, were clearly distinct from the composition and structure of the dark control. At the end of the cultivation the composition and structure of the cadmium-containing community was significantly different from that of the dark control showing a high abundance of alphaproteobacteria. Parallel to the shift in the species-composition the community containing cadmium also showed a reduced substrate consumption pattern.

## Combination of polychromatic light and cadmiumacetate

The communities which had been exposed to a combined influence of cadmium and polychromatic light showed two main phases of stress response. In the first phase which lasted about 48 hours the effect was mainly caused by the toxicity of cadmium. In this phase the above described delay of growth and of the metabolic activity was observed. In a second phase the response of the communities depended on the intensity of the radiation which was applied.

Cultures which had been exposed to light of low intensity (p.L.1 [15 W]) revealed pronounced toxic effects which could not only be due to the cadmium toxicity. The cell concentration (total concentration and viable cells) did not reach the level of the dark control or of the cultures which suffered only the influence of  $Cd^{2+}$  or light. The metabolic diversity was less than the diversity of the community of the dark control or the cultures treated with  $Cd^{2+}$  or light. The alphaproteobacteria were the predominant species in the cultures which had been exposed to cadmium and light. In cultures which had been exposed to light of high intensity (p.L.2 [25 W]) the toxic effect of cadmium was attenuated whereas the toxic effect of the light (p.L.2 [25 W]) was not compensated. The cultures did not reach the metabolic activity or species composition of the dark control. At the end of the cultivation, the predominant members of this community were the gammaproteobacteria and a group of unknown species which presumably form part of the gram positive spore-forming bacteria which have a low G+C-content.

# 7 Literatur

Aas, P.; Lyons, M.; Pledger, R.; Mitchell, D. L. & Jeffrey, W. H. (1996). Inhibition of bacterial activities by solar radiation in nearshore waters and the Gulf of Mexico. *Aquat Microb Ecol*, 11: 229-238.

Albrecht, H. & Schmolke, S. R. (2003). Belastung der Nordsee mit anorganischen und organischen Schadstoffen. In *Warnsignale aus der Nordsee & Wattenmeer - Eine aktuelle Umweltbilanz.* (ed.) Lozan, J. L.; Rachor, E.; Reise, K.; Sündermann, J.; von Westernhagen, H., Hamburg: Wissenschaftliche Auswertung.

Allgaier, M.; Uphoff, H.; Felske, A. & Wagner-Döbler, I. (2003). Aerobic anoxygenic photosynthesis in *Roseobacter* clade bacteria from marine habitats. *Appl Environ Microbiol*, **69**: 5051-5059.

Altenburger, R.; Boedeker, W.; Faust, M. & Grimme, Horst L. (1996). Regulations for combined effects of pollutants: Consequences from risk assessment in aquatic toxicology. *Food Chem Toxicol*, 34: 1155-1157.

Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäfer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. & Lipman, D. (1997). Grapped BLAST and Psi-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res.* 25: 3389-3402.

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.

Anton, A.; Grosse, C.; Reissmann, J.; Pribyl, T. & Nies, D. H. (1999). CzcD is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia* sp. Strain CH34. *J Bacteriol*, **181**: 6876–6881.

Arrieta, J. M.; Weinbauer, M. G. & Herndl, G. J. (2000). Interspecific variability in sensitivity to UV radiation and subsequent recovery in selected isolates of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 66: 1468-1473.

**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.

Balling, R.; de Couet, H. G.; Fischbach, K. F.; Frey, A.; Gassen, H. G.; Glätzer, K.; Hagemann,
R.; Hess, O.; Hofbauer, M.; Hollenberg, C. P.; Jäckle, H.; Jäger, R.; Jürgens, G.; Krawinkel, U.
& Lachmund, A.; Melchers, I.; Minol, K.; Neiss, H. G.; Nordheim, A.; Sachse, G. E.; Schaefer,
U.; Schartl, M.; Seyffert, W.; Tautz, D. & Weber, P. (1998). Seiffert - Lehrbuch der Genetik. Ulm:
Gustav Fischer.

Barak, Y.; Tal, Y. & van Rijn, J. (1998). Light-mediated nitrite accumulation during denitrification by *Pseudomonas* sp. strain JR12. *Appl Environ Microbiol*, **64**: 813-817.

Bernard, T.; Pocart, J. & Le Rudulier, D. (1986). Variations in the response of salt-stressed *Rhizobium* strains to betaines. *Arch Microbiol*, 143: 359-364.

Berthe-Corti, L.; Pietsch, I.; Mangir, M.; Ehrlich, W & Lochmann, E. R. (1984). Die Wirkung von Cadmium auf Wachstum und Stoffwechsel von Saccharomyces- und Rhodotorula-Zellen. *Chemosphere*, **13**: 107-119.

Berthe-Corti, L.; Bruns, A. & Hulsch, R. (1997). Semi-continuous-flow cultures with marine sediment suspensions containing non-polar carbon sources-culture control by pneumatic sediment suspension dosage system. *J Microbiol Methods*, **29**: 129-137.

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.

**Bielefeld**, U. (2005). *Wachstum und Struktur mariner bakterieller Gemeinschaften in cadmiumhaltiger Sedimentsuspensionskultur*. Oldenburg: Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.

**Binnerup, S. J.; Jensen, K.; Revsbech, N. P.; Jensen, M. H.; Sorensen, J. (1992)**. Denitrification, dissimilatory reduction of nitrate to ammonium, and nitrification in a bioturbated estuarine sediment as measured with N-15 and microsensor techniques. *Appl environ microbiol*, **58**: 303-313.

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

Booth, M. G.; Jeffrey, W. H. & Miller, R. V. (2001). RecA expression in response to solar UVR in the marine bacterium *Vibrio natriegens*. *Microb Ecol*, **42**: 531-539.

Bornman, J. F. & van der Leun, J. C. (1998). Appendix: Frequently asked questions (FAQ). *Photochem Photobiol B, Biol* 46: I-IV.

**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.

**Braker, G.; Ayala-del-Rio, H. L.; Devol, A. H.; Fesefeldt, A. & Tiedje, J. M. (2001)**. Community structure of denitrifiers, bacteria, and archaea along redox gradients in pacific northwest marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of amplified nitrite reductase *(nirS)* and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol*, **67**: 1893-1901.

Brenk, V. (2003). Verschmutzung der Nord- und Ostsee durch die Schifffahrt. In *Warnsignale aus der Nordsee & Wattenmeer - Eine aktuelle Umweltbilianz.* (ed.) Lozan, J.; Rachor, E.; Reise, K.; Sündermann, K.; von Westernhagen, H., Hamburg: Wissenschaftliche Auswertungen.

**Brierley, C. L.** (1990). Bioremediation of metal-contaminated surface and groundwaters. *Geomicrobiol J*, 8: 201-223.

Bruns, A. & Berthe-Corti, L. (1998). In situ detection of bacteria in continuous-flow cultures of seawater sediment. *Microbiology*, 144: 2783-2790.

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.

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.

Cole, J. J. (1999). Aquatic microbiology for ecosystem scientists: New and recycled paradigms in ecological microbiology. *Ecosystem*, 2: 215-225.

Coombs, J. & Barkay, T. (2004). Molecular evidence for the evolution of metal homeostasis genes by lateral gene transfer in bacteria from the deep terrestrial subsurface. *Appl Environ Mirobiol*, 70: 1698-1707.

Crupper, S. S.; Worrell, V.; Stewart, G. C. & Iandolo, J. J. (1999). Cloning and expression of *cadD*, a new cadmium resistance gene of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, **181**: 4071–4075.

Cypionka, H. (2000). Oxygen respiration by desulfovibrio species. Annu Rev Microbiol, 54: 827-848.

**Dang, H. & Lovell, C. R. (2000)**. Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16SrRNA genes. *Appl Environ Microbiol*, **66**: 467-475.

Daniel, T. (1995). Der Einfluss von Salinität und Licht verschiedener Spektalbereiche auf das Koloniebildungsverhalten mariner, kohlenstoffabbauender Mikroorganismen. Oldenburg: Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.

Davey, M. E. & O'Toole, G. A. (2000). Microbial Biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev*, 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.

**Dean-Ross, D. & Mills, A. L. (1989)**. Bacterial community structure and function along a heavy metal gradient. *Appl Environ Microbiol*, **55**: 2002-2009.

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 Microbiol Biotechnol*, **19**: 93-100.

**Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) (2006)** *Catalogue of Strains*. <u>http://www.dsmz.de/microorganisms/</u>.

**De Zwart, J. M.; Nelisse, P. N. & Kuenen, G. J.** (1996). Isolation and characterization of *Methylophaga sulfidovorans* sp. nov.: an obligately methylotrophic, aerobic, dimethylsulfide oxidizing bacterium from a microbial mat. *FEMS Microbiol Ecol*, **20**: 216-270.

Dilling, W. & Cypionka, H. (1990). Aerobic respiration in sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, **71**: 123-127.

Dixon, W. J. (1950). Analysis of extreme values. Ann Math Statist, 21: 488-506.

**Döhler, G.** (1985). Effect of UV-B radiation (290-320 nm) on the nitrogen-metabolism of several marine diatoms. *J Plant Physiol*, 118: 391-400.

**Douki, T.; Laporte, G. & Cadet, J. (2003)**. Inter-strand photoproducts are produced in high yield within A-DNA exposed to UVC radiation. *Nucleic Acids Res*, **31**: 3134-3142.

**Dukan, S. & Nyström, T. (1998)**. Bacterial senescence: stasis results in increased and differential oxidation of cytoplasmic proteins leading to developmental induction of the heat shock regulon. *Genes Dev*, **12**: 3431-3441.

Dunn, G. (1992). Design and Analysis of Reliability Studies. Stat Methods Med Res, 1: 123-127.

Ebrahimipour, G. (1998). Denitrifkationspotentiale 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. S. & Dorothee, (2001). Munk - Grundstudium Biologie - Mikrobiologie. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Elstner, E. F. (1990). Der Sauerstoff. BI - Wissenschftverlag, Mannheim

Fabiano, M. & Danovaro, R. (1998). Enzymatic activity, bacterial distribution, and organic matter composition in sediments of the Ross Sea (Antarctica). *Appl Environ Microbiol*, **64**: 3838-3845.

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.

Foukal P.V. (1990). Die veränderliche Sonne. Spektrum der Wissenschaft 4:66-75.

**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* marina bacteria. *Arch Environ Contam Toxicol*, **49**: 299-306.

Garland, J. L. & Mills, A. L. (1991). Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community level sole-carbon-source utilization. *Appl Environ Microbiol*, **57**: 2351-2359.

Gilles, R. (1997). "Compensatory" organic osmolytes in high osmolarity and dehydration stresses: history and perspectives. *Comp Biochem Physiol*, 117: 279-290.

Gosset, W. S. (1907). On the error of counting with a haemactometer. *Biometrica*, 5: 351-360.

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).

Grubbs, F. E. (1969). Procedures for detecting outlying observations in samples. *Technometrics*. 11: 1-21.

Haarich, M. & Schmidt, D. (1993a). Ergebnisse der ZISCH-Großaufnahme vom 2.5. bis 13. 6. 1986. *Dt. Hydrogr. Z.*, 45: 137-201.

Hacket, C. A. & Griffiths, B. S. (1997). Statistical analysis of the time-course of Biolog substrate utilization. *J Microbiol Methods*, **30**: 63-69.

Hall, T. (1997-2001) BioEdit Sequence Alignment Editor. www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html.

Hamer, D. H. (1986). Metallothionein. Annu Rev Biochem, 55: 913-951.

Hartmann, M.; Hartwig, A. (1998). Disturbance of DNA damage recognition after UV-irradiation by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells. *Carcinogenesis*, **19:** 617-621.

Hartmann, K. (unveröffentlicht). Chemotaxonomische Charakterisierung mariner methylotropher Isolate. Oldenburg: Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.

Heyer, J.; Malashenko, Y.; Berger, U. & Budkova, E. (1984). Distribution of methanotrophic bacteria. Z Allg Mikrobiol, 24: 725-744.

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) (2001). Climate Change. http://www.ipcc.ch.

Ishii, K.; Mußmann, M.; MacGregor, B.; Amann, R. (2004). An improved fluorescence in situ hybridisation protocol for the identification of bacteria and archaea in marine sediments. *FEMS Microbiol Ecol*, **50**: 203-212.

Ivanova, E. P.; Kurilenko, V. V.; Kurilenko, A. V.; Gorshkova, N. M.; Shubin, F. N.; Nicolau, D.
V. & Chelomin, V. P. (2002). Tolerance to cadmium of free-living and associated with marine animals and eelgrass marine gamma-proteobacteria. *Curr Microbiol*, 44: 357-362.

**Ivey, M. D.; Guffanti, A.; Shen, Z.; Kudyan, N. & Krulwich, T. (1992)**. The *cadC* gene product of alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4 partially restores Na+ resistance to an *Escherichia colistrain* lacking an Na+/H+ antiporter (NhaA). *J Bacteriol*, **174**: 4878-4884.

Jeffrey, W. H.; Aas, P.; Maille Lyons, M.; Coffin, R. B.; Pledger, R. J. & Mitchell, D. L. (1996a). Ambient solar radiation-induced photodamage in marine bacterioplankton. *Photoch Photobiol*, 64: 419-427.

Jeffrey, W. H.; Pledger, R. J.; Aas, P.; Hager, S.; Coffin, R. B.; Haven, R. V. & Mitchell, D. L. (1996b). Diel and depth profiles of DNA photodamage in bacterioplankton exposed to ambient solar ultraviolet radiation. *Mar Ecol Prog Ser*, 137: 283-291.

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.

Jørgensen, B. B. (1977): Bacterial Sulfate reduction within reduced microniches of oxidized marine sediments. *Marine Biology*, 41: 7-17.

Jørgensen, B. B.; Bak, F. (1991): Pathways and microbiology of thiosulfate transformation and sulfate reduction in a marine sediment (Kattegat, Denmark). *Appl Environ Microbiol* **57**: 847-856.

Joux, F.; Jeffrey, W. H.; Lebaron, P. & Mitchell, D. L. (1999). Marine bacterial isolates display diverse responses to UV-B radiation. *Appl Environ Microbiol*, **65**: 3820-3827.

Kaiser, D. & Losick, R. (1993). How and why bacteria talk to each other. Cell, 73: 873-885.

Kaiser, E. & Herndl, G. J. (1997). Rapid recovery of marine bacterioplankton activity after inhibition by UV radiation in coastal waters. *Appl Environ Microbiol*, **63**: 4026-4031.

Karentz, D.; Bothwell, M. L.; Coffin, R. B.; Hanson, A.; Herndl, G. J.; Kilham, S. S.; Lesser, M.
P.; Lindell, M.; Moeller, R. E.; Morris, D. P.; Neale, P. J.; Sanders, R. W.; Weiler, C. S. &
Wetzel, R. G. (1994). Impact of UV-B radiation on pelagic freshwater ecosystem: Report of working group on bacteria and phytoplankton. *Arch Hydrobiol Beih*, 43: 31-69.

**Keuls, M.** (1952). The use of the studentized range in connection with an analysis of variance. *Euphytica*, 1: 112-122.

Kieber, R. J. Z. X. L. & Mopper, K. (1990). Formation of carbonyl compounds from UV-induced photodegradation of humic substances in natural waters: Fate of riverine carbon in the Sea. *Limnol Oceanogr*, **35**: 1503-1515.

Kirst, G. O. (1996). Osmotic adjustment in phytoplankton and macroalgae: the use of dimethylsulfoniopropionate (DMSP). In *Biological and Environmental Chemistry of DMSP and Related Sulfonium Compounds*. (ed.) Kiene, R. P.; Visscher, P. T.; Keller, M. D.; Kirst, G. O., pp. 121-129. New York: Plemun Press.

Klee, A. J. (1993). A computer program for the determination of most probable number and its confidence limits. *J Microbiol Methods*, 18: 91-98.

Kolmogoroff, A. N. (1941). Confidence limits for an unknown distribution function. *Ann Math Statist*, 12: 461-463.

Koike, I.; Hattori, A. (1978). Simultaneous determination of nitrification and nitrate reduction in coastal sediments by a N-15 dilution technique. *Appl Environ Microbol*, **35**: 853-857

Kremer, B. P. & Markham, J. W. (1982). Primary metabolic effects of cadmium in the brown alga, *Laminaria saccharina*. *Z Pflanzenphysiol*, 108: 125-130.

Krieger, C. J.; Zhang, P.; Mueller, L. A.; Wang, A.; Paley, S.; Arnaud, M.; Pick, J.; Rhee, S. Y. & Karp, P. D. (2004) *MetaCyc: a multiorganism database of metabolic pathways and enzymes.* <u>http://metacyc.org/</u>.

Kruskal, W. H. (1952). A nonparametric test for the several sampling problem. *Ann Math Statist*, 23: 525-540.

Kuipers, B. R.; Dewilde, P. & Creutzberg, F. (1981). Energy-Flow in a tidal flat ecosystem. *Mar Ecol Prog Ser*, 5: 215-221.

Lara, R. J.; Hubberten, U. & Kattner, G. (1993). Contribution of humic substances of the dissolved nitrogen pool in the greenland sea. *Mar Chem*, 41: 327-336.

Lara, R. J. & Thomas, D. N. (1994). XAD-fractionation of new dissolved organic matter: Is the hydrophobic fraction seriously underestimated? *Mar Chem*, 47: 93-96.

Lassen, C.; Plough, H.; Jorgensen, B. B. (1992). Microalgal photosynthesis and spectral scalar irradiance in coastal marine-sediments of Limfjorden, Denmark. *Limnol Oceanogr* **37**: 760-772.

Le Rudulier, D.; Strom, A. R.; Dandekar, A. M.; Smith, L. T. & Valentine R. C., (1984). Molecular-Biology of osmoregulation. *Science*, **224**: 1064-1068.

Lebrun, M.; Audurier, A. & Cossart, P. (1994). Plasmid-borne cadmium resistance genes in *Listeria monocytogenes* are similar to *cadA* and *cadC* of *Staphylococcus aureus* and are induced by cadmium. *J Bacteriol*, 176: 3040-3048.

Lehmann, J.; Martin, B.; Piehl, G.; Schultze, R. & Steven, W. (ed.) (1982). Vergleichstests für Fermentationen. In: *DECHEMA Studien zur Forschung und Entwicklung: Arbeitsmethoden für die Biotechnologie*, Frankfurt: DECHEMA.

Lehmann, V.; Tubbing, G. M. J. & Admiraal, W. (1999). Induced metal tolerance in microbenthic communities from three lowland rivers with different metal loads. *Arch Environ Contam Toxicol*, **36**: 384-391.

Levring, T. (1946). Some culture experiments with *Ulva* and artificial seawater. *K Fysiogr Sallsk Lund Forh*, 16: 45-56.

Lindell, M. J.; Graneli, W. & Tranvik, L. J. (1995). Enhanced bacterial growth in response to photochemical transformation of dissolved organic matter. *Limnol Oceanogr*, 40: 195-199.

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

Lisa, T. A.; Garrido, M. N. & Domenech, C. E. (1983). Induction of acid phosphatase and cholinesterase activities in *Ps. aeruginosa* and their in-vitro control by choline, acetylcholine and betaine. *Mol Cell Biochem*, **50**: 149-155.

Llobett-Brossa, E.; Rossello-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.

Löffler,H.(2001)Limnologie,VerhaltensforschungundUmwelt.http://www.oeaw.ac.at/shared/pdf/mittelfristiges2001/077-082\_13.pdf.

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

Loy, A.; Horn, M. & Wagner, M. (2003) probeBase - an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes. http://www.microbial-ecology.net/probebase/.

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

Madigan, M. T.; Martinko, J. M. & Parker, J. (2000). Brock - Biology of Microorganisms. New Jersey: Prentice Hall International.

Mancinelli, R. L. & White, M. R. (2000). Inhibition of denitrification by ultraviolet radiation. *Adv Space Res*, **26**: 2041-2046.

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.

Manz. W.; Amann. R.; Ludwig. W.; Vancanneyt. M. & Schleifer. K. H. (1996). Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiol*, **142**: 1097-1106.

McDougald, D.; Gong, L.; Srinivasan, S.; Hild, H.; Thompson, L.; Takayama, K.; Rice, S. A. & Kjelleberg, S. (2002). Defences against oxidative stress during starvation in bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81: 3-13.

Michal, G. (1999). Biochemical Pathways. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Miller, R. V. (2000). recA: The gene and its protein product. In *Encyclopedia of Microbiology*. (ed.) Lederberg, J., pp. 43-54. San Diego: Academic Press.

Mitra, R. S. & Bernstein, I. A. (1977). Nature of the repair process associated with recovery of *Escherichia coli* after exposure to Cd<sup>2+</sup>. *Biochem Biophys Res Commun*, 74: 1450-1455.

Mitra, R. S. & Bernstein, I. A. (1978). Single-strand breakage in DNA of *Escherichia coli* exposed to Cd2+. *J Bacteriol*, 133: 75-80.

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.

Muyzer, G.; Teske, A. & Wirsen, C. O.; W. J. (1995). Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch Microbiol*, **164**: 165-172.

Nachtkamp, M. (unveröffentlicht). Kombinationswirkungen von lipophilen und hydrophilen Substanzen - Auswirkungen auf Zusammensetzung und metabolische Aktivität mariner bakterieller Gemeinschaften. Oldenburg: Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.

Nelle, T. (1994). Abwasserdesinfektion mit UV-Licht und Ozon unter Einbeziehung der vorgeschalteten Reinigungsstufen. Witten: Universität Witten/ Herdecke.

Newmann, D. (1939). The distribution of the range in samples from normal population, expressed in terms of an independent stimate of standard deviation. *Biometrica*, **31**: 20-310.

Newton, J. W.; Tyler, D. D. & Slodki, M. E. (1979). Effect of Ultraviolet-B (280 to 320 nm) radiation on blue-green algae (Cyanobacteria), possible biological indicators of stratospheric ozone depletion. *Appl Environ Microbiol*, **37**: 1137-1141.

Nies, D.; 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.

Nikolaev, Y. A. (2004). Extracellular factors of bacterial adaptation to unfavorable environmental conditions. *Appl Biochem Microbiol*, 40: 387–397.

Nucifora, G.; Chu, L.; Misra, T. K. & Silver, S. (1989). Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 *cadA* gene results from a cadmium-efflux ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 3544-3548.

Nystrom, T.; Olsson, R. M. & Kjelleberg, S. (1992). Survival, stress resistance, and alterations in protein expression in the marine *Vibrio* sp. strain S14 during starvation for different individual nutrients. *Appl Environ Microbiol*, **58**: 55-65.

O'Halloran, T. V. & Culotta, V. C. (2000). Metallochaperones, an intracellular service for metal ions. *J Biol Chem*, 275: 25057–25060.

Osinga, R.; Kop, A. J.; Duineveld, G. C. A.; Prins, R. A. & Van Duyl, F. C. (1996). Benthic mineralization at two locations in the southern North Sea. *J Sea Res*, **36**: 181-191.

**OSPAR Commission** (2000) *Quality Status Report 2000 for the North-East Atlantic.* http://www.ospar.org/eng/html/qsr2000/QSR2000welcome.htm.

Pakulski, J. D.; Aas, P.; Jeffrey, W.; Lyons, M.; Von Waasenbergen, L.; Mitchell, D. & Coffin,
R. (1998). Influence of light on bacterioplankton production and respiration in a subtropical coral reef. *Aquat Microb Ecol*, 14: 137-148.

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.

**Reitner, B.; Herzig, A. & Herndl, G. J. (1997)**. Role of ultraviolet-B-radiation on photochemical and microbial oxygen consumption in a humic-rich shallow lake. *Limnol Oceanogr*, **42**: 950-960.

Reuder, J.; Dameris, M. & Koepke, P. (2001). Future UV radiation in Central Europe modelled from ozone scenarios. J Photochem Photobiol 61: 94-105.

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

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. *Microbiol*, 140: 2849-2858.

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

Sancar, A. (1994). Structure and function of DNA photolyase. Biochemistry (Mosc), 33: 2-9.

Schachtschabel, P.; Blume, H. P.; Brümer, G.; Hartke, K. H.; Schwertmann, U.; Auerswald, K.; Beyer, L.; Fischer, W. R.; Kögel-Knabner, I.; Renger, M. & Strebel, O. (1998). *Lehrbuch der Bodenkunde*. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag.

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

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.

Silver, S. & Phung, L. T. (1996). Bacterial heavy metal resistance: New surprises. *Annu Rev Microbiol*, 50: 753-789.

Sinha, R. P.; Kumar, H. D.; Kumar, A. & Häder, D. P. (1995). Effects of UV-B irradiation on growth, survival, pigmentation and nitrogen metabolism enzymes in *Cyanobacteria*. *Acta Protozool*, 34: 187-192.

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

Smith, R. C. & Baker, K. S. (1981). Optical properties of the clearest natural water (200-800 nm). *Appl Opt*, 20: 177-184.

Smith, T. L.; Pocard, J.; Bernard, T. & Le Rudulier, D. (1988). Osmotic control of glycine betaine biosynthesis and degradation in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol*, **170**: 3142-3149.

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

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

Stahl, D. & Amann, R. (1991). Development and application of nucleic acid probes. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. (ed.) E. Stackebrandt and M. Goodfellow, pp. 205-248. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.

Sterr, H. (2003). Geographische Charakterisierung der Nordseeregion. In *Warnsignale aus der Nordsee & Wattenmeer - Eine Aktuelle Umweltbilanz.* (ed.) Lozan, J. L.; Rachor, E.; Reise, K.; Sündermann, J.; Westernhagen, H., pp. 40-56. Hamburg: Wissenschaftliche Auswertungen.

Suyama, T.; Shigematsu, T.; Suzuki, Y.; Tokiwa, T.; Kanagawa, T.; Nagashima, K. V. & Hanada, S. (2002). Photosynthetic apparatus in *Roseateles depolymerans* 61A is transcriptionally induced by carbon limitation. *Appl Environ Microbiol*, **68**: 1665–1673.

Taylor, B. F. & Kiene, R. P. (1989). Microbial metabolism of dimethyl sulfide. In *Biogenic Sulfur in the Environment*. (ed.) Saltzman, E. S.; Cooper, W. J., pp. 202-221. Washington DC: American Chemical Society.

Taylor, B. F. & Gilchrist, D. (1991). New routes for aerobic biodegradation of dimethylsulfoniopropionate. *Appl Environ Microbiol*, **57**: 3581-3584.

Taylor, B. F. & Visscher, P. T. (1996). Metabolic pathways involved in DMSP degradation. In *Biological and Environmental Chemistry of DMSP and Related Sulfonium Compounds*. (ed.) Kiene, R. P. Visscher, P. T.; Keller, M. D.; Kirst, G. E., pp. 265-276. New York: Plenum Press.

Thomson, B. E.; Van Dyke, H. & Worrest, R. C. (1980). Impact of UV-B radiation (290-320 nm) upon estuarine bacteria. *Oecologia*, 47: 56-60.

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.

Tsai, K.; Yoon, K. P. & Lynn, A. R. (1992). ATP-dependent cadmium transport by the *cadA* cadmium resistance determinant in everted membrane vesicles of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 174: 116-121.

Umweltbundesamt (2003). Umweltdaten Deutschland online. Schadstostoffe im Meerwasser und in Sedimenten der Nordsee. www.env-it.de/umweltdaten/jsp.

Urakami, T.; Sasaki, J.; Suzuki, K. I. & Komagata, K. (1995). Characterization and description of *Hyphomicrobium denitrificans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, **45**: 528-532.

Vallee, B. L. (1987). Implications and inferences of metallothionein structure. *Experientia Suppl*, 52: 5-16.

Visscher, P. T. & Taylor, B. F. (1993). A new mechanism for the aerobic catabolism of dimethyl sulfide. *Appl Environ Microbiol*, **59**: 3784-3789.

Vorobeva, L. I. (2004). Stressors, stress reactions, and survival of bacteria: A Review. *Appl Biochem Microbiol*, 40: 217-224.

von Willert, D. J.; Matyssek, R.; Herpich, W. (1995). Experimentelle Pflanzenökologie: Grundlagen und Anwendungen. Thieme - Verlag, Stuttgart.

Wagner-Döbler, I.; von Canstein, H. & Li, Y. (2000). Bioremediation of mercury-contaminated wastewater. *Bioworld*, 1: 2-6.

Wagner-Döbler, I.; Rheims, H.; Felske, A.; Pukall, R. & Tindall, B. J. (2003). *Jannaschia helgolandensis* gen. nov., sp. nov., a novel abundant member of the marine *Roseobacter* clade from the North Sea. *Int J Syst Evol Microbiol*, **53**: 731–738.

Wallis, W. A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J Amer Statis. Assoc*, 47: 583-621.

Weisse, R. & Rosenthal, W. (2003). Szenarien zukünftiger, klimatisch bedingter Entwicklungen der Nordsee. In *Warnsignale aus der Nordsee & Wattenmeer - Eine aktuelle Umweltbilanz.* (ed.) Lozan, J.; Rachor, E.; Reise, K.; Sündermann, J.; von Westernhagen, H., pp. 51-56. Hamburg: Wissenschaftliche Auswertungen.

Welsh, D. T. (2000). Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiol Rev*, **24**: 263-290.

Winter, C.; Moeseneder, M. M. & Herndl, G. J. (2001). Impact of UV radiation on bacterioplankton community composition. *Appl Environ Microbiol*, **67**: 665-672.

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.

Yurkov, V. V. & Beatty, T. J. (1998). Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**: 695-724.

Zafiriou, O. C.; Joussot-Dubien, J.; Zepp, R. G. & Zika, R. G. (1984). Photochemistry of natural waters. *Environ Sci Technol*, 18: A358-371A.

Zeyer, J.; Eicher, P.; Wakeham, S. G. & Schwarzenbach, R. P. (1987). Oxidation of dimethyl sulfide to dimethyl sulfoxide by phototrophic purple bacteria. *Appl Environ Microbiol*, **53**: 2026-2036.

**Zubkov, M. V.; Fuchs, B. M.; Archer, S. D.; Kiene, R. P.; Amann, R. & Burkill, P. H. (2001)**. Linking the composition of bacterioplankton to rapid turnover of dissolved dimethylsulphoniopropionate in an algal bloom in the North Sea. *Environ Microbiol*, **3**: 301-311.

## Tagungsbeiträge

Geyer, S.; Juffernholz, T.; Schmidt, C. (2003): Toxische Kombinationswirkungen mit Schwermetallen. In: SETAC-GLB-Tagung 2003 pp. 143. Ruprecht-Karl-Universität, Heidelberg.

Geyer, S.; Hulsch, R.; Berthe-Corti, L. (2004). Einfluss von Sonnenstrahlung mit hohem UV-Anteil auf marine Bakteriengemeinschaften aus dem Wattsediment der deutschen Nordsee. In: ToxKom-Symposium pp. 18. Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.

Geyer, S.; Nachtkamp, M.; Berthe-Corti, L. (2004). Versuchsstrategien zur Untersuchung von Umweltnoxen auf Struktur und Aktivität mariner Bakteriengemeinschaften. In: ToxKom-Symposium pp. 20. Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.

Geyer, S.; Berthe-Corti, L. (2005). Bacterial diversity in sediment-suspension cultures under different solar radiation conditions. In: BioMicro World-International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology 2005 pp. 38. Badajoz, Spain.

Geyer, S.; Berthe-Corti, L. (2005). Impact of artificial solar radiation on activity and species diversity of an autochthonous marine bacterial community in sediment-suspension cultures. In: IMBC (International Marine Biotechnology Conference) 2005 pp. 301. 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 28.02.06

Simone Geyer

## Danksagung

Mein herzlicher Dank richtet sich an folgende Personen und Institutionen:

H. Doz. Dr. Luise Berthe-Corti für die Bereitstellung des Themas, ihre stete Diskussionsbereitschaft und die immer freundliche und sehr gute Betreuung der Arbeit;

Dr. Thomas Backhaus für die Erstellung des Zweitgutachtens;

Werner Fiedler, Promotionsreferent der Hans-Böckler Stiftung;

meine Kollegen der Arbeitsgruppe Biotechnologie, Barbara Brunies, Kirsten Hartmann, Reiner Hulsch, Uwe Maschmann, Marcus Nachtkamp, Frank Wintermann, Charlotte Versteegen, mit denen das Arbeiten Spaß machte;

die Mitglieder des Promotionskollegs "Toxische Kombinationswirkungen" in Oldenburg und Bremen;

Heike Sommer, Kathrin Henrichs, Dagmar Rocker, Marcus Nachtkamp und Harald Ertl für die Unterstützung während des Schreibens;

Prof. Dr. Witte, für ihre Hife

meine Freunde,

meine Eltern

die AG Bodenkunde der Universität Oldenburg für die Bestimmung der Cadmiumkonzentration;

die AG Geomikrobiologie der Universität Oldenburg für die Hilfe bei der Suche nach den phototrophen Bakterien;

AG Meeresphysik der Universität Oldenburg für das Vermessen der Strahlungsquellen;

Institut für medizinische Klimatologie der Christian Albrecht Universität Kiel für das Bereitsstellen der Wetterdaten;

der Hans-Böckler-Stiftung für das Promotionsstipendium.

## Lebenslauf

Simone Geyer geboren am 01.05 1973 in Rodewisch

### Promotion

02/2003 - 02/2006

Dissertation: Kombinationswirkungen von Schwermetallen und UVA/B-Strahlung auf die Zusammensetzung und metabolische Aktivität mariner bakterieller Gemeinschaften

## Studium und Ausbildung

10/1997 – 11/2002 Bayerische Julius Maximilians Universität Würzburg, Biologie Diplom

10/1989 – 09/1992 Medizinische Fachschule Zwickau, Medizinisch Technische Laborassistentin

## Berufspraxis

10/1992 – 03/1998 Krankenhaus Harlaching München