

**Experimentelle Überprüfung der
„Intermediate Disturbance Hypothesis“
(Connell 1978)
an Modell-Lebensgemeinschaften
planktischer Bakterienisolate**

Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel**

**vorgelegt von
Kristin Beck**

Kiel 2000

Meinem Vater

Reinhard Beck

gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	iv
Tabellenverzeichnis	vi
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	10
2.1 Gewinnung und Kultivierung der Versuchsorganismen	10
2.1.1 Gewinnung der Isolate	11
2.1.2 Langzeitlagerung der Organismen und Dauerkulturen	11
2.1.3 Kultivierung in Flüssigkultur	11
2.2 Denaturierungs-Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE)	12
2.2.1 DNA-Extraktion	12
2.2.2 Herstellung der PCR-Produkte	13
2.2.3 DGGE	14
2.3 Taxonomische Einordnung der Versuchsorganismen	15
2.3.1 Sequenzierung	15
2.3.2 Phylogenetische Analyse	16
2.4 Bestimmung der minimalen Generationszeit der Versuchsorganismen	17
2.4.1 Kultivierung während der Wachstumsversuche	17
2.4.2 Probennahme und Messung der optischen Dichte (OD)	18
2.4.3 Bestimmung von μ_{\max} und g_{\min}	18
2.5 Konstruktion des Chemostat-Modellökosystems	18
2.5.1 Chemostataufbau und Kulturbedingungen	20
2.5.2 Inokulum	21
2.5.3 Phosphorpulse	21
2.5.4 Experimentaldauer und Probennahme	22
2.6 Abundanzbestimmung der Versuchsorganismen	23
2.6.1 Bestimmung der Gesamtabundanzen mittels DAPI-Färbung	25
2.6.2 Stammspezifische Quantifizierung durch Koloniezählung auf Agarplatten	25
2.6.3 Stammspezifische Quantifizierung durch Immunfluoreszenz	26
2.6.3.1 Gewinnung der polyklonalen, stammspezifischen Antikörper	26

2.6.3.2	Immunfluoreszenzmarkierung	26
2.6.3.3	Detektion und Quantifizierung durch Durchflusszytometrie	28
2.7	Datenauswertung	29
2.7.1	Diversitätsmaß	29
2.7.2	Probengröße	31
2.7.3	Statistische Auswertung	32
2.7.3.1	Vergleich von Stichproben	32
2.7.3.2	Relation von Störungsregime und Diversität	32
2.8	Geräte- und Materialien	33
2.8.1	Gewinnung und Kultivierung der Versuchsorganismen	33
2.8.2	DGGE	34
2.8.3	Sequenzierung der 16S rDNA der Versuchsorganismen	36
2.8.4	Chemostat-Modellökosystem	36
2.8.5	Abundanzbestimmung der Versuchsorganismen	37
3	Ergebnisse	39
3.1	Charakterisierung der Isolate	40
3.1.1	DGGE-Screening und taxonomische Einordnung	40
3.1.2	Wachstumsversuche	46
3.2	Methoden zur Abundanzermittlung	47
3.2.1	CFU-Kultivierbarkeit auf Agarplatten	47
3.2.2	DAPI- und Cy3-Detektierbarkeit im Durchflusszytometer	49
3.2.3	Vergleich von CFU-Zählung und durchflusszytometrischer Direktzählung antikörpermarkierter Zellen	52
3.3	Einfluss von Störung auf Zusammensetzung und Diversität der Chemostat-Lebensgemeinschaften	56
3.3.1	Einfluss der gepulsten P-Zufuhr auf die Gesamtabundanzentwicklung	56
3.3.2	Einfluss der gepulsten P-Zufuhr auf die Zusammensetzung der Chemostat-Lebensgemeinschaften	58
3.3.2.1	Taxonomische Aspekte	58
3.3.2.2	Gildenaspekte	66
3.3.3	Einfluss der gepulsten P-Zufuhr auf Diversität der Chemostat-Lebensgemeinschaften	71

4	Diskussion	80
4.1	Methoden der Abundanzermittlung: Direktzählung und Kultivierung auf Agarplatten reflektieren unterschiedliche Aspekte der Chemostat-Lebensgemeinschaften	81
4.2	Störung und Diversität	89
4.2.1	Einfluss des Störungsregimes auf die Zusammensetzung der Modell-Bakteriengemeinschaft: Taxonomische und funktionelle Aspekte	89
4.2.2	Einfluss des Störungsregimes auf die Diversität: Relevanz von Beobachtungsparameter und Beobachtungsskalen	97
4.2.2.1	Adäquate Beobachtungsparameter und Beobachtungszeiträume	97
4.2.2.2	Adäquate Skalierung der zeitlichen Dimensionen von Störungsregimes	104
4.2.2.3	Störung und Diversität planktischer Bakteriengemeinschaften	108
4.3	Schlussbetrachtung	111
5	Zusammenfassung	112
6	Literaturverzeichnis	115

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Graphische Darstellung der „ <i>Intermediate Disturbance Hypothesis</i> “	4
Abb. 2.1:	Schematische Darstellung der Chemostatsysteme	20
Abb. 3.1:	Koloniemorphologie der 14 als Versuchsorganismen verwendeten Isolate	41
Abb. 3.2:	DGGE-Gel der der V3-Region der 16S rDNA der 14 Isolate	42
Abb. 3.3:	<i>Neighbor-Joining</i> -Stammbaum der 14 Isolate und ihrer nächsten Verwandten	43
Abb. 3.4:	Wachstumskinetiken der 14 Isolate	45
Abb. 3.5:	Minimale Generationszeiten der 14 Isolate	46
Abb. 3.6:	Relative Kultivierbarkeit der Versuchsorganismen auf Agarplatten	48
Abb. 3.7:	Relative Abundanz von <i>Ghosts</i> an der Gesamtzellzahl	50
Abb. 3.8:	Stammspezifisches relatives Defizit der durchflusszytometrischen Cy3-Detektierbarkeit im Vergleich zur DAPI-Detektion	51
Abb. 3.9:	Rarefaktionsanalyse basierend auf den durchflusszytometrisch ermittelten Artenzahlen und Artenabundanzverteilungen	53
Abb. 3.10:	Vergleich der mittels Durchflusszytometerzählung stammspezifisch antikörpermarkierter Zellen und CFU-Zählung bestimmten relativen Abundanzen	55
Abb. 3.11:	Abundanzdynamik der Chemostat-Lebensgemeinschaften (DAPI-Zählung) im zeitlichen Verlauf der Experimente	57
Abb. 3.12:	Relative Abundanzen der Isolate im Verlauf der Experimente (CFU-Zählung)	59
Abb. 3.13:	Relative Abundanzen taxonomischer Großgruppen in Abhängigkeit von der Intervalllänge zwischen den P-Pulsen am Endpunkt der Chemostatexperimente (Tag 25, CFU-Zählung)	61
Abb. 3.14:	Relative Abundanzen der Isolate an den Tagen 17, 19 und 25 der Chemostatexperimente (Durchflusszytometerzählung)	63
Abb. 3.15:	Relative Abundanzen taxonomischer Großgruppen in Abhängigkeit von der Intervalllänge zwischen den P-Pulsen am Endpunkt der Chemostatexperimente (Durchflusszytometerzählung)	65

-
- Abb. 3.16:** Relative Abundanz der Gilden für g_{\min} in Abhängigkeit von der Intervalllänge zwischen den P-Pulsen am Endpunkt der Chemostatexperimente (CFU-Zählung) **66**
- Abb. 3.17:** Abundanz der Gilden für g_{\min} im Verlauf der Chemostatexperimente (CFU-Zählung) bei 4-d-Pulsintervalllänge und 8-d-Pulsintervalllänge **68**
- Abb. 3.18:** Relative Abundanz der Gilden für g_{\min} in Abhängigkeit von der Intervalllänge zwischen den P-Pulsen am Endpunkt der Chemostatexperimente (Durchflusszytometerzählung) **69**
- Abb. 3.19:** Mittlere minimale Generationszeit (g_{\min}) der Versuchsorganismen in Abhängigkeit von der Intervalllänge zwischen den P-Pulsen am Endpunkt der Chemostatexperimente **70**
- Abb. 3.20:** Artenzahl S und effektive Artenzahl $1/D$ in Abhängigkeit von der Intervalllänge zwischen den P-Pulsen **72**
- Abb. 3.21:** Simpsons Kompliment $1-D$ und taxonomische Diversität D in Abhängigkeit von der Intervalllänge zwischen den P-Pulsen **74**
- Abb. 3.22:** Entwicklung von Artenzahl S , Simpsons Kompliment $1-D$ und taxonomischer Diversität D im zeitlichen Verlauf der Intervalle zwischen den P-Pulsen, zusammengefasst für ein Replikat des 4-d- und drei Replikate des 8-d-*Treatments* **77**
- Abb. 3.23:** Relation verschiedener Diversitätsparameter zueinander **79**

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Übersicht über Kulturbedingungen, experimentelles Design und Beprobung der Chemostatexperimente	23
Tab. 2.2:	Geräte und Materialien für die Gewinnung und Kultivierung der Versuchsorganismen	33
Tab. 2.3:	Geräte und Materialien für DNA-Extraktion und PCR zur Vorberitung für die DGGE-Analyse bzw. Sequenzierung der Versuchsorganismen	34
Tab. 2.4:	Geräte und Materialien für die Agarose-Gel-Elektrophorese zur Aufarbeitung von DNA-Extrakten und PCR-Produkten	35
Tab. 2.5:	Geräte und Materialien für die DGGE-Analyse	35
Tab. 2.6:	Geräte und Materialien für die Sequenzierung der 16S rDNA der Versuchsorganismen	36
Tab. 2.7:	Geräte und Materialien für Chemostataufbau, Beimpfung und Beprobung der Experimente	36
Tab. 2.8:	Geräte und Materialien für die Bestimmung der Zelldichte der Versuchsorganismen mittels DAPI-Färbung und epifluoreszenzmikroskopischer Direktzählung	37
Tab. 2.9:	Geräte und Materialien für die stammspezifische Immunfluoreszenzmarkierung der Versuchsorganismen	37
Tab. 2.10:	Geräte und Materialien für die durchflusszytometrische Direktzählung der stammspezifisch immunfluoreszenzmarkierten Versuchsorganismen	38
Tab. 3.1:	Sequenzähnlichkeit der 14 als Versuchsorganismen verwendeten Isolate mit bekannten Referenzorganismen	40
Tab. 3.2:	Auflistung der aus der Literatur bekannten Habitate der nächst verwandten Referenzorganismen der 14 in den Chemostatexperimenten eingesetzten Isolate	44
Tab. 3.3:	Korrelationszusammenhang der durch CFU- und Durchflusszytometerzählung antikörpermarkierter Zellen ermittelten Diversitätsparameter S , $1/D$, $1-D$ und D	52

Tab. 3.4: Test auf Unterschiedlichkeit der durch CFU- und Durchflusszytometerzählung antikörpermarkierter Zellen ermittelten Diversitätsparameter S , $1/D$, $1-D$ und D	52
Tab. 3.5: Test auf Unterschiedlichkeit der durch Simulation kleiner Probengrößen gewonnenen und durch CFU- bzw. Durchflusszytometerzählung ermittelten Diversitätsparameter S , $1/D$, $1-D$ und D am Endpunkt der Chemostatexperimente (Tag 25)	54
Tab. 3.6: Korrelationszusammenhang von relativen Abundanzen der taxonomischen Großgruppen (CFU-Zählung, Endpunkt der Chemostatexperimente) und der Länge des P-Puls-Intervalls	60
Tab. 3.7: Bedeutung der relativen Abundanz der Isolate für die relative Abundanz der Großgruppen (CFU-Zählung, Endpunkt der Chemostatexperimente)	60
Tab. 3.8: Korrelationszusammenhang von relativen Abundanzen der taxonomischen Großgruppen (Durchflusszytometerzählung, Endpunkt der Chemostatexperimente) und der Länge des P-Puls-Intervalls	64
Tab. 3.9: Bedeutung der relativen Abundanz der Isolate für die relative Abundanz der Großgruppen (Durchflusszytometerzählung, Endpunkt der Chemostatexperimente)	64
Tab. 3.10: Bedeutung der relativen Abundanz der Isolate für die relative Abundanz der Gilden von g_{\min} (CFU-Zählung, Endpunkt der Chemostatexperimente)	67
Tab. 3.11: Bedeutung der relativen Abundanz der Isolate für die relative Abundanz der Gilden von g_{\min} (Durchflusszytometerzählung, Endpunkt der Chemostatexperimente)	69
Tab. 3.12: Korrelationszusammenhang des mittleren Wertes für g_{\min} (CFU- und Durchflusszytometerzählung antikörpermarkierter Zellen, Endpunkt der Chemostatexperimente) und der Länge des P-Puls-Intervalls	71
Tab. 3.13: Korrelationszusammenhang der durch CFU- und Durchflusszytometerzählung ermittelten Diversitätsparameter S , $1/D$, $1-D$ und D mit der Länge des P-Puls-Intervalls	75
Tab. 3.14: Länge der P-Pulsintervalle, die, entsprechend der ermittelten Korrelationen maximale Diversität in den Chemostat-Lebensgemeinschaften erzeugten	76
Tab. 3.15: Korrelationszusammenhang der Diversitätsparameter S , $1-D$ und D mit dem zeitlichen Verlauf des Intervalls zwischen den P-Pulsen, zusammengefasst für ein 4-d- und drei 8-d- <i>Treatments</i>	78

1 Einleitung

Diversität von Lebensgemeinschaften – ein Paradoxon?

Die Detektion unterschiedlicher Muster in der Verteilung und Häufigkeit von Organismen sowie die Suche nach Mechanismen, die eine kausale Erklärungen dieser Muster erlauben, gehören zu den zentralen Themen der Ökologie (KREBS 1985; BEGON *et al.* 1990). Aus diesem Grund hat die Artenvielfalt oder auch Diversität¹ als ein evidentestes Charakteristikum von Lebensgemeinschaften, für das sich in unterschiedlichen Lebensräumen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten im selben Lebensraum augenfällige Differenzen beobachten lassen, Ökologen seit jeher beschäftigt. Das Phänomen der Koexistenz verschiedener Arten, welches durch alltägliche Beobachtung zunächst selbstverständlich erscheint, stellt, spätestens seit der Formulierung des im wesentlichen auf den Ergebnissen von GAUSES Konkurrenzversuchen (GAUSE 1937) basierenden Konkurrenz-Ausschluss-Prinzips (HARDIN 1960), vom theoretischen Standpunkt aus ein nicht selbstverständlich zu lösendes Problem dar. Durch seine Experimente an Modell-Lebensgemeinschaften verschiedener *Paramecium*-Arten konnte GAUSE nämlich zeigen, dass Konkurrenz um eine limitierende Ressource zur Selektion des stärksten Konkurrenten und zum Ausschluss aller weniger konkurrenzstarken Organismen führt. Es stellt sich daher die grundsätzliche, von HUTCHINSON in seinem berühmten „Santa Rosalia“-Artikel aufgegriffene Frage, warum in einem System überhaupt verschiedene Arten koexistieren können (HUTCHINSON 1959).

Der Versuch, das „Paradoxon“ der Koexistenz verschiedener Arten (HUTCHINSON 1961) und Unterschiede in der Diversität von Lebensgemeinschaften zu deuten, hat, im Gegensatz zu den meisten übrigen in der Ökologie untersuchten Phänomenen, eine Vielzahl unterschiedlicher Erklärungsansätze hervorgebracht. Allein ein cursorischer Literaturüberblick von PALMER (1994) konnte 120 verschiedene, wenn auch in ihren Annahmen z. T. überlappende, Hypothesen identifizieren, die auf die Deutung der Unterschiede von Artenzahl bzw. Diversität Bezug nehmen. Grundsätzlich lassen sich zwei verschiedene Konzepte unterscheiden, die sich in der historischen Entwicklung der diesbezüglichen theoretischen Ansätzen ablösen. Zunächst wurde davon ausgegangen, dass sich die Populationen der verschiedenen Organismen unter stabilen Umweltbedingungen in bezug auf die konkurrenzbestimmenden Parameter in einem Gleichgewichtszustand² (*Equilibrium*) befinden und die Koexistenz von Arten

¹ Der Begriff Diversität wird im Folgenden als Synonym für Artenvielfalt verwendet. Diversität von Lebensgemeinschaften ist durch Diversitätsparameter quantifizierbar. Der einfachste Parameter ist die Zahl der koexistierenden Arten; andere Parameter kombinieren in einem Index die Information über die Artenzahl und die Artenabundanzverteilung.

² Gleichgewicht im ökologischen Kontext bedeutet, dass eine Population oder mehrere Populationen von Organismen, deren Populationsgröße ein bestimmtes Niveau in einem Ökosystem aufweisen, tendenziell dieses Populationsniveau halten und nach geringfügigen Abweichungen zu diesem Niveau zurückkehren (BEGON *et al.* 1990).

durch die Vielzahl ökologischer Nischen und eine dementsprechend hochgradige Spezialisierung der Organismen zu erklären ist (z. B. HUTCHINSON 1957; HUTCHINSON 1959; MACARTHUR & LEVINS 1967; MAY 1973; TILMAN 1982 in BEGON *et al.* 1990). Neuere Erklärungsansätze zeichnen sich dadurch aus, dass sie gerade die Grundannahme eines *Equilibrium* in Frage stellen und in der Dynamik von Umweltparametern, die ein Erreichen des Endzustandes im Konkurrenzausschlussprozess verhindern, die Hauptursache für mögliche Koexistenz sehen (z. B. HUTCHINSON 1961; RICHESON *et al.* 1970; ARMSTRONG & MCGEHEE 1976; CONNELL 1978; LEVINS 1979; PETRAITIS *et al.* 1989). Die Tatsache, dass HUTCHINSON in seinen beiden bekanntesten Artikeln zum Thema Diversität Argumente zunächst vor allem für die eine (1959), später für die andere grundsätzliche Sichtweise (1961) anführt, illustriert diesen scheinbaren Paradigmenwechsel. Die grundlegenden Übereinstimmungen der existierenden Hypothesen versucht PALMER (1994) zu verdeutlichen, indem er das Konkurrenz-Ausschluss-Prinzip, Ursache für die Bewertung der Koexistenz unterschiedlicher Arten als Paradoxon, als den logischen Ausgangspunkt des Problems der Artenvielfalt deutet. Analog zum konzeptionellen Ansatz des Hardy-Weinberg-Prinzips zur Analyse der Bedingungen, die Evolution ermöglichen (HARDY 1908 in PALMER 1994), definiert er Bedingungen, die als Voraussetzung für das Eintreten von Konkurrenzausschluss erfüllt sein müssen. Tritt Konkurrenzausschluss nicht auf, wurde wenigstens eine dieser Bedingungen nicht erfüllt. Zu den wichtigsten von PALMER genannten Bedingungen, bei deren Verletzung Koexistenz zu beobachten ist, zählen sowohl zeitliche als auch räumliche Konstanz der Umweltbedingungen sowie Gleichheit der Organismen in ihren Ressourcenansprüchen, ihrer Überlebensfähigkeit und ihrer Rekrutierungsfähigkeit durch Wachstum bzw. Immigration.

Wann immer also Konkurrenz um limitierende Ressourcen durchbrochen wird, kann durch die Ermöglichung von Koexistenz mit Auswirkungen auf die Diversität von Lebensgemeinschaften gerechnet werden.

Connells „Intermediate Disturbance Hypothesis“ – eine mögliche Erklärung des Paradoxons?

Die „*Intermediate Disturbance Hypothesis*“ (IDH), die von CONNELL (1978) ursprünglich für tropische Regenwälder und Korallenriffe formuliert wurde, sieht im Auftreten von Störungsereignissen, die das Absterben bzw. eine Schädigung von Organismen in Lebensgemeinschaften zur Folge haben, eine wesentliche Ursache für die zeitweilige Durchbrechung von Konkurrenz und betrachtet Störungen somit als bestimmenden Faktor, der auf die Diversität von Lebensgemeinschaften Einfluss nimmt.

Ausgangspunkt für CONNELLS Hypothese sind vor allem Beobachtungen, die in bezug auf den Verlauf von Sukzessionen in den beiden genannten Ökosystemen nach Störungsereignissen, wie Rodungen und Stürmen, gemacht wurden. Derartige Störungen wirken sich durch die Ausdünnung der Organismendichte vor allem auf die Verfügbarkeit von Besiedlungsraum

aus, der in solchen sessilen Lebensgemeinschaften in vielen Fällen die limitierende Ressource darstellt. Die in Folge solcher Störungen einsetzende Neubesiedlung zeichnet sich durch eine charakteristische Sukzession funktioneller Organismengruppen aus. Bestimmt wird sie zum einen durch die Zeit, die für die Rekrutierung sich neu ansiedelnder Organismen nötig ist, und zum anderen durch die Konkurrenz um die im Verlauf der Sukzession abnehmend zur Verfügung stehenden Ressourcen im Besiedlungsraum. So dominieren unmittelbar nach Störungen Organismen, die sich im allgemeinen durch gute Kolonisierungsfähigkeit und kurze Generationszeiten auszeichnen, jedoch häufig konkurrenzschwach sind. Mit zunehmender Fortdauer ungestörter Bedingungen nimmt zum einen die Rekrutierung neuer, typischerweise später in Sukzessionen auftretender Arten, aber auch die Konkurrenz um limitierende Ressourcen zu. Bei lang anhaltenden störungsfreien Zeiträumen sind Lebensgemeinschaften vor allem durch eine Dominanz von Klimax-typischen, häufig langlebigen Organismen gekennzeichnet, die sich als erfolgreiche Konkurrenten oder als besonders resistent gegen Absterben erwiesen haben.

Dieser Sukzessionsverlauf ist begleitet von einer charakteristischen Änderung in der Diversität der Lebensgemeinschaft. Zu Beginn ist das Spektrum der vorhandenen Arten beschränkt durch die geringe Zeit, die für eine Besiedlung zur Verfügung stand, aber auch durch geringe Anzahl spezialisierter Pionier-Arten. In der Endphase führt Konkurrenzausschluss zu einer geringen Diversität durch die Dominanz einiger weniger konkurrenzstarker Klimax-Arten. Eine besonders hohe Diversität ist dagegen für die mittlere Sukzessionsphase kennzeichnend, die sich durch die größte Vielfalt funktioneller Gruppen und somit verschiedener Arten auszeichnet. In dieser Phase reichte die Zeit für einen konkurrenzbedingten Ausschluss der Besiedlungsspezialisten noch nicht aus, war jedoch lang genug, um eine Ansiedelung von effizienten Konkurrenten zu ermöglichen. Die störungsbedingte zeitliche Fluktuation der limitierenden Ressource, aber auch die Unterschiede der Organismen in bezug auf Konkurrenz- und Besiedlungsstrategien wirkten im Verlauf der Sukzession zeitweilig einem Konkurrenzausschluss entgegen (vergl. PALMER 1994). Das resultierende unimodale Diversitätsmuster ist nach CONNELL charakteristisch für die Entwicklung einer Lebensgemeinschaft zwischen zwei Störungsereignissen, die lange genug auseinander liegen, so dass Klimaxgesellschaften annähernd erreicht werden (Abb. 1.1).

Störungsereignisse treten im allgemeinen mit einer standorttypischen Häufigkeit und Intensität auf, so dass Lebensgemeinschaften einem für das Habitat typischen Störungsregime ausgesetzt sind. Ein Gradient dieser zwei Aspekte eines Störungsregimes erzeugt nach CONNELL ebenfalls ein unimodales Diversitätsmuster, welches die jeweilige Diversität desjenigen Sukzessionsstatus widerspiegelt, an dem im Mittel der Sukzessionsverlauf durch die Störungen unterbrochen wird:

Sind Störungen häufig bzw. sehr intensiv, können sich nur einige wenige Pionier-Arten in der Lebensgemeinschaft etablieren. Bei völliger Abwesenheit von Störungen oder langen Störungsintervallen reduziert Konkurrenzausschluss die Diversität. Ein Störungsregime, welches

durch mittlere Störungshäufigkeit bzw. Intensität gekennzeichnet ist, erlaubt eine Koexistenz sowohl der konkurrenzstarken Klimax-Arten als auch der weniger konkurrenzstarken Pionier-Arten, da die ersteren nach jeder Störung genügend Zeit, die letzteren eine wiederholte Möglichkeit für eine Etablierung haben. Unter diesen Bedingungen sollte nach CONNELL eine maximale Diversität möglich sein (Abb. 1.1).

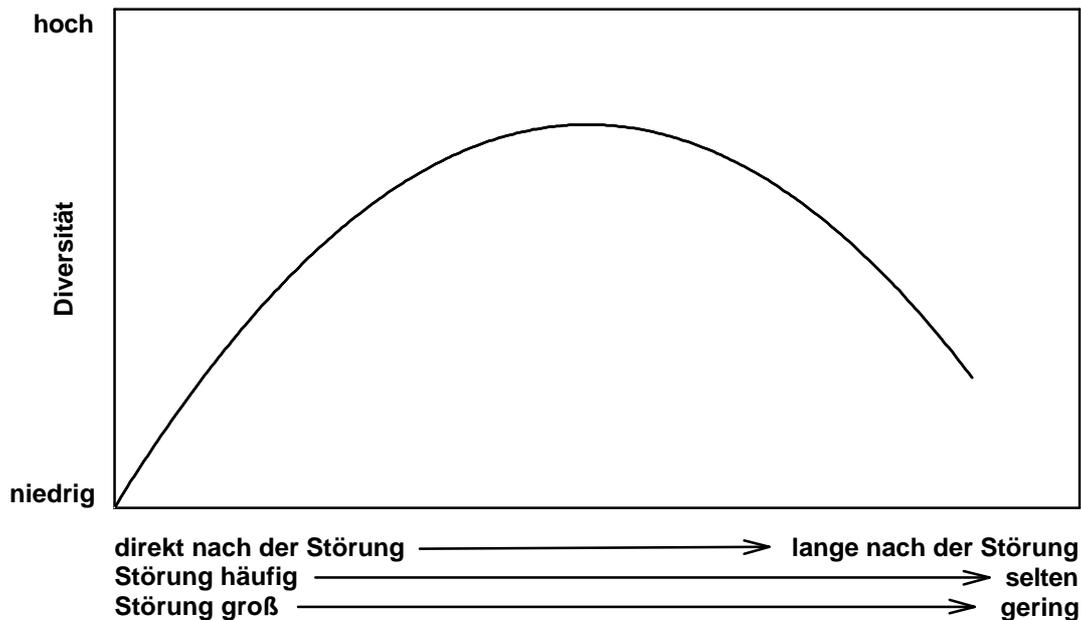


Abb. 1.1: Graphische Darstellung der „Intermediate Disturbance Hypothesis“, verändert nach CONNELL (1978)

Die Existenz von Störungsereignissen, die verhindern, dass der Prozess des Konkurrenzausschlusses seinen Endpunkt erreicht, lässt sich praktisch für jede Lebensgemeinschaft annehmen, weshalb die IDH auch besonders geeignet erscheint, die „paradoxe“ Koexistenz vieler Arten zu erklären (REYNOLDS *et al.* 1993). Dies und unter Umständen auch die einfache Form als Wortmodell haben dazu beigetragen, dass die IDH außerordentlich häufig und weit über den ursprünglichen Bereich sessiler tropischer Organismengemeinschaften hinaus zur Erklärung von Diversitätsunterschieden herangezogen wurde. So existieren aus dem Bereich der aquatischen Ökologie, neben weiteren Studien zur Diversität von sessilen Lebensgemeinschaften in Korallenriffen (z. B. HIXON & BROSTOFF 1983; DOLLAR & TIBBLE 1993; ARONSON & PRECHT 1995), Arbeiten für Makroalgengemeinschaften marinen Geröllitorals (SOUSA 1979), Weichboden-Benthoslebensgemeinschaften (z. B. KUKERT & SMITH 1992; AUSTEN *et al.* 1998; WIDDICOMBE & AUSTEN 1999; FROUIN 2000), Bachzoobenthos (z. B. DOEG *et al.* 1989; DEATH & WINTERBOURN 1995; TOWNSEND *et al.* 1997), Epilithon (FAYOLLE *et al.* 1998), Fischlebensgemeinschaften (z. B. PEARSONS *et al.* 1992), Phytoplankton (z. B. ROBINSON & SANDGREN 1983; GAEDEKE & SOMMER 1986; PADISÁK 1993; SOMMER 1995; BARBIERO *et al.* 1999; FLÖDER & SOMMER 1999; HAMBRIGHT & ZOHARY 2000) und Zooplankton (WEIDER 1992; ECKERT & WALZ

1998), die sich auf die IDH zur Erklärung von beobachteten Diversitätsmustern beziehen. Im Bereich der terrestrischen Ökologie liegen Arbeiten mit Bezug auf die IDH, neben weiteren Studien an tropischen Wäldern (z. B. BURSLEM & WHITMORE 1999), für die unterschiedlichsten Vegetationstypen vor, von Salzmarschen angefangen (HACKER & BERTNESS 1999), über Steppen- und Buschlandvegetation (z. B. ARMESTO & PICKETT 1985; MCINTYRE & LAVOREL 1994; ODGAARD 1994; COLLINS *et al.* 1995; TREBINO *et al.* 1996; SCHWILK *et al.* 1997; BECKAGE & STOUT 2000) bis hin zu Buchenwäldern gemäßiger Breiten (HIURA 1995). Auch Insektendiversität (SZENTKIRÁLYI & KOZÁR 1991) und die Diversität von Vogel-Lebensgemeinschaften (MARONE 1990) wurde anhand der IDH interpretiert.

Die beobachteten Diversitätsmuster werden im allgemeinen als Beleg für einzelne Aspekte der IDH gesehen. Während sich viele Studien ganz allgemein auf die Sukzessionsmuster bzw. die Diversitätsänderungen zwischen zwei Störungen beziehen (z. B. DOEG *et al.* 1989; MARONE 1990; PEARSONS *et al.* 1992; ECKERT & WALZ 1998; LINDENSCHMIDT & CHORUS 1998; BARBIERO *et al.* 1999; BURSLEM & WHITMORE 1999), dienen anderen Arbeiten die Annahmen der IDH entweder bezüglich der Störungshäufigkeit (z. B. SOUSA 1979; GAEDEKE & SOMMER 1986; WEIDER 1992; PADISÁK 1993; FAYOLLE *et al.* 1998; BECKAGE & STOUT 2000) oder der Störungsintensität (z. B. HIXON & BROSTOFF 1983; DOLLAR & TIBBLE 1993; TREBINO *et al.* 1996; AUSTEN *et al.* 1998; WIDDICOMBE & AUSTEN 1999) oder beider Aspekte von Störungsregimes (z. B. ODGAARD 1994; ARONSON & PRECHT 1995; DEATH & WINTERBOURN 1995; HIURA 1995; SOMMER 1995; TOWNSEND *et al.* 1997; FLÖDER & SOMMER 1999) als Referenzrahmen. Die natürlichen oder experimentell herbeigeführten Einflüsse, die als Störungen der Lebensgemeinschaften betrachtet wurden, sind meist, ebenso wie in CONNELLS ursprünglicher Arbeit, mit dem Verlust oder der Schädigung von Organismen verbunden; in manchen Studien sind die Auswirkungen der Störungen jedoch auf die Ressourcen der Organismen, deren Diversität betrachtet wird, beschränkt (z. B. MARONE 1990; ECKERT & WALZ 1998). Als Störungen wurden Einflüsse wie Brandrodung bzw. natürlich auftretende Vegetationsbrände (MARONE 1990; ODGAARD 1994; COLLINS *et al.* 1995; SCHWILK *et al.* 1997; BECKAGE & STOUT 2000), Stürme (DOLLAR & TIBBLE 1993; ARONSON & PRECHT 1995; HIURA 1995; BARBIERO *et al.* 1999), Überflutung (TREBINO *et al.* 1996; HACKER & BERTNESS 1999), flutbedingte Auswaschung und Scherstress (PEARSONS *et al.* 1992; DEATH & WINTERBOURN 1995; TOWNSEND *et al.* 1997; FAYOLLE *et al.* 1998; HAMBRIGHT & ZOHARY 2000), Brandungseinfluss (SOUSA 1979), asaisonale Durchmischungsereignisse in geschichteten Wasserkörpern (PADISÁK 1993; ECKERT & WALZ 1998; FLÖDER & SOMMER 1999), Fraßdruck (HIXON & BROSTOFF 1983; AUSTEN *et al.* 1998), Bioturbation (AUSTEN *et al.* 1998; WIDDICOMBE & AUSTEN 1999), landwirtschaftliche Bearbeitung (SZENTKIRÁLYI & KOZÁR 1991), organische Umweltbelastung (FROUIN 2000) und fluktuierende Versorgung mit Nährstoffen bei gleichzeitiger Populationsausdünnung in experimentellen Mikrokosmen (GAEDEKE & SOMMER 1986; WEIDER 1992; SOMMER 1995) untersucht.

Trotz der fast universellen und häufigen Bezugnahme auf die IDH³ und ihres Lehrbuchstatus als anerkannte Hypothese zur Erklärung von Unterschieden in der Diversität (z. B. KREBS 1985; BEGON *et al.* 1990; LAMPERT & SOMMER 1993) wurde die IDH bisher selten konsequenten Tests unterzogen, die einen statistisch gesicherten Nachweis der jeweils untersuchten Annahme der IDH ermöglichen. Die Ergebnisse der wenigen Studien, die diesbezüglich existieren, sind nicht konsistent. Während einige Arbeiten klare Nachweise für ein erhöhtes Diversitätsniveau unter dem Einfluss von Störungen mittlerer Häufigkeit bzw. mittlerer Intensität und dementsprechend niedrigere Diversitätswerte für die beiden Pole der untersuchten Störungsgradienten liefern (z. B. SOUSA 1979; HIXON & BROSTOFF 1983; GAEDEKE & SOMMER 1986; ODGAARD 1994; ARONSON & PRECHT 1995; HIURA 1995; SOMMER 1995; TOWNSEND *et al.* 1997; FLÖDER & SOMMER 1999), konnten solche unimodalen Diversitätsmuster in anderen Studien nicht bestätigt werden (z. B. ARMESTO & PICKETT 1985; WEIDER 1992; COLLINS *et al.* 1995; TREBINO *et al.* 1996; SCHWILK *et al.* 1997; BECKAGE & STOUT 2000). Gleiches trifft für die vorübergehende Diversitätserhöhung zwischen zwei Störungen zu, die von manchen Studien bestätigt (z. B. KUKERT & SMITH 1992; DESCY 1993; DOLLAR & TIBBLE 1993; COLLINS *et al.* 1995; BARBIERO *et al.* 1999; HAMBRIGHT & ZOHARY 2000), von anderen jedoch nicht belegt werden kann (z. B. DOEG *et al.* 1989; ROGERS 1993; TREBINO *et al.* 1996).

Ferner können die wenigsten Studien klare Hinweise geben, inwieweit die von CONNELL postulierten Mechanismen - Konkurrenz um eine störungsbedingt fluktuierende limitierende Ressource und Resistenz gegen Schädigung durch Störung - tatsächlich ausschlaggebend für die beobachteten Diversitätsmuster sind. Eine funktionelle Charakterisierung der Organismen, die Rückschlüsse diesbezüglich erlaubt, ist aufgrund der Komplexität der untersuchten Systeme und der meist komplexen Auswirkungen der untersuchten Störungen oft nicht möglich (PADISÁK 1993; ODGAARD 1994; COLLINS *et al.* 1995; DEATH & WINTERBOURN 1995; HIURA 1995; TOWNSEND *et al.* 1997). Zudem wird der Begriff der Störung in den wenigsten Studien klar definiert.

Auch sind bisher nur äußerst selten Versuche unternommen worden, die in der IDH verwendeten relativen Klassifizierungen, wie „selten“, „mittelhäufig“, „häufig“ bzw. „gering“, „mittelstark“, „stark“ und „kurz nach“ bzw. „lang nach“ durch die Verwendung allgemein gültiger Skalen zu konkretisieren. Einzig aus dem Bereich der Planktonökologie liegen Arbeiten vor, die als generelle zeitliche Bezugsskala die Generationszeit der untersuchten Organismen verwendeten. Diese Studien konnten so eine kritische Intervalllänge von > 1 Generationszeit und < 4 Generationszeiten zwischen den Störungsereignissen eines Störungsregimes identifizieren, die zu erhöhten Diversitätswerten gegenüber häufigeren bzw. seltener auftretenden Störungen führt (GAEDEKE & SOMMER 1986; PADISÁK 1994; FLÖDER & SOMMER 1999). Eine allge-

³ Seit ihrer Veröffentlichung wurde CONNELLS ursprüngliche Arbeit zur IDH laut *Web of Science*[®] bis heute ca. 1500 mal allein in wissenschaftlichen Zeitschriften zitiert.

meine, durch Korrelationen gestützte Beziehung zwischen Diversität und Störungshäufigkeit, die Generationszeiten als Bezugsskala hat, konnte bisher jedoch noch nicht aufgestellt werden.

Die Inkonsistenz in den Ergebnissen der empirischen Studien zum Einfluss von Störungen auf die Diversität von Lebensgemeinschaften, die bisher weitgehend fehlende Konkretisierung von Bezugsskalen für eine allgemeingültige Dimensionierung von Störungsgradienten sowie die anhand von Modelluntersuchungen belegte Anfälligkeit der Quantifizierung von Diversität für beprobungsbedingte Artefakte sind daher der Grund, dass auch 20 Jahre nach ihrer Formulierung und trotz weitreichender Etablierung in der Diversitätsforschung die allgemeine Gültigkeit und das Erklärungspotential der IDH immer noch in Frage gestellt wird (MACKEY & CURRIE 2000).

Diversität planktischer Bakteriengemeinschaften – ein Fall für die IDH?

Auffällig bei der weitreichenden Bezugnahme der IDH auf die verschiedensten Habitate und die unterschiedlichsten Organismenarten ist das Fehlen von Arbeiten, die sich mit Unterschieden in der Diversität von bakteriellen⁴ Lebensgemeinschaften befassen. Diese Abwesenheit ist nicht durch das Konzept der IDH begründet, sondern erklärt sich aus der generellen Schwierigkeit, die mit der Erforschung bakterieller Diversität verbunden ist. Diese besteht zum einen darin, dass die geringe Größe von Bakterien und das weitgehende Fehlen morphologischer Unterscheidungsmerkmale sowie der vergleichsweise hohe Arbeitsaufwand molekularbiologischer Identifizierungsmethoden (EMBLEY & STACKEBRANDT 1997; GOODFELLOW *et al.* 1997) eine Unterscheidung und spezifische Quantifizierung unterschiedlicher bakterieller Organismen mit hoher taxonomischer Auflösung in Untersuchungen mit hohem Probenaufkommen fast unmöglich machen. Zudem scheint in natürlichen Systemen die Zahl unterschiedlicher bakterieller Organismen nahezu „unbegrenzt“ zu sein (PACE 1997; TORSVIK *et al.* 1998), so dass es bisher kaum möglich war, diese mit den zur Verfügung stehenden Methoden zuverlässig auszuzöten. Diese Tatsache qualifiziert jedoch gerade Bakteriengemeinschaften dazu, HUTCHINSONS (1961) ursprünglich auf das Phytoplankton bezogene Feststellung eines „*Paradox of the Plankton*“ auf Lebensgemeinschaften wie das Bakterioplankton auszudehnen.

Aufgrund der methodischen Problematik sind ökologische Studien, die sich mit der taxonomischen Zusammensetzung von planktischen Bakteriengemeinschaften beschäftigen, bei Verwendung sequenzanalytischer Methoden im allgemeinen auf punktuelle Untersuchungen in Zeit und Raum beschränkt (z. B. BAHR *et al.* 1996; HIORNS *et al.* 1997; DENISOVA *et al.* 1999) oder ermöglichen bei Anwendung von Oligonukleotidsonden nur eine verhältnismäßig grobe

⁴ Der Begriff „bakteriell“ oder „Bakterien“ wird im Folgenden nicht im streng phylogenetischen Sinn auf das Superreich der *Bacteria* (WOESE *et al.* 1990), sondern allgemein auf prokaryotische Organismen bezogen verwendet.

taxonomische Auflösung auf dem Niveau von Ordnungen, Klassen und Stämmen⁵ (z. B. PERNTHALER *et al.* 1997; SIMEK *et al.* 1997; GLÖCKNER *et al.* 1999; JÜRGENS *et al.* 1999). Physiologische (z. B. GARLAND & MILLS 1991; FLIERMANS *et al.* 1997), chemische (z. B. FERREIRA *et al.* 1996; RAJENDRAN *et al.* 1997) und genetische (z. B. HÖFLE 1992; LINDSTRÖM 1998; HÖFLE *et al.* 1999; LEBARON *et al.* 1999; SUZUKI 1999) *Fingerprint-* bzw. *Profiling-*Methoden sowie Methoden zur Abschätzung der Gesamtzahl unterschiedlicher Genome (TORSVIK *et al.* 1998) wurden bisher eingesetzt, um generelle Veränderungen in der Zusammensetzung bakterieller Lebensgemeinschaften unter dem Einfluss sich verändernder Umweltparameter zu detektieren. Die Spezifität dieser Methoden ist jedoch in vieler Hinsicht nicht geklärt und eine Quantifizierung der unterschiedlichen detektierten Organismen ist fast immer unmöglich (HÖFLE 1990; ENGEL *et al.* 1998; KRSEK 1998; NOLD & ZWART 1998). Eine Quantifizierung von Diversität, wie sie für eine Untersuchung der IDH adäquat wäre, ist daher für natürliche Bakteriengemeinschaften bisher praktisch nicht zu realisieren.

Einige wenige Studien befassen sich mit Möglichkeiten der Koexistenz von Bakterien in experimentellen Mikrokosmen, die eine Komplexität von zwei Bakterienstämmen nicht überschreiten (LEEGWATER 1983; VAN DER HOEVEN *et al.* 1985; KURIHARA *et al.* 1990); experimentelle Studien, die quantitativ Veränderungen bakterieller Diversität in Abhängigkeit von einem ebenfalls quantifizierten Umweltparameter demonstrieren können, liegen bisher jedoch auch für solche bakteriellen Modell-Lebensgemeinschaften nicht vor.

Modell-Lebensgemeinschaften planktischer Bakterienisolate zur experimentellen Überprüfung der IDH

Das weitgehende Fehlen von Informationen über Mechanismen, die unterschiedliche Diversitätsmuster bei planktischen Bakterien erzeugen, macht diese Organismen zu interessanten Untersuchungsobjekten für eine experimentelle Überprüfung der IDH. Zudem sind Bakterien aufgrund ihrer geringen Größe und kurzen Generationszeiten generell als Modellorganismen geeignet, da für sie eine Vielzahl replizierbarer miniaturisierter Modell-Lebensgemeinschaften realisiert werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurden Lebensgemeinschaften planktischer Bakterienisolate untersucht, die in ihrer Zusammensetzung definiert waren, jedoch eine höhere Komplexität als die bisher verwendeten 2-Arten-Systeme aufwiesen. Die Kultivierung erfolgte in Chemostaten, die unterschiedlichen Regimes einer pulsartigen Zufuhr der limitierenden Ressource Phosphor ausgesetzt waren. Der Einsatz von Ressourcenpulsen als Störung folgt insofern dem von CONNELL implizierten und von TOWNSEND & HILDREW (1994) definierten Konzept der Störung, als es sich um ein zeitlich diskretes Ereignis handelt, welches die Verfügbarkeit von

⁵ Stamm im Sinn der systematischen Klassifizierung *Phylum*.

limitierenden Ressourcen erhöht und somit die Konkurrenzbedingungen verändert. In dem verwendeten Modell-System war dies jedoch nicht, wie von den genannten Autoren postuliert, mit der Entfernung oder Schädigung von Organismen verbunden.

Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich vor allem auf die These der IDH, die sich mit der Abhängigkeit der Diversität von der Störungshäufigkeit befasst. Jedoch auch die IDH-Annahme von unimodalen Diversitätsmustern zwischen zwei Störungsereignissen konnte betrachtet werden.

Folgenden Fragen, die sich in bezug auf die IDH im Allgemeinen, aber auch speziell für Organismen des Bakterioplankton stellen, sollte in der vorliegenden Arbeit nachgegangen werden:

1. Lässt sich ein unimodales Muster, wie es von der IDH für die Beziehung zwischen Störungsregime und Diversität ursprünglich für tropische Regenwälder und Korallenriffe postuliert wurde, auch für Organismen des Bakterioplanktons statistisch gesichert nachweisen?
2. Lassen sich Muster in der Veränderung der funktionellen Struktur der untersuchten Modell-Lebensgemeinschaften erkennen, die Hinweise auf den Mechanismus geben, der für beobachtete Diversitätsänderungen verantwortlich ist?
3. Kann mit Hilfe des gewählten experimentellen Modell-Systems die Bedeutung einer universellen Bezugsgröße, wie die Generationszeit der untersuchten Organismen, für eine adäquate zeitliche Skalierung der von der IDH postulierten Muster demonstriert werden? Kann unter Verwendung von Generationszeit als Bezugsskala eine durch Korrelationen belegte Relation zwischen Diversität und Störungshäufigkeit aufgestellt werden, deren Charakteristika (Position des Maximalwerts für Diversität, Form) sich zur Überprüfung in anderen Systemen eignen?

Zur Untersuchung der Bakteriengemeinschaften wurde eine Kombination aus klassischen mikrobiologischen und modernen molekularbiologischen Methoden verwendet:

Die in den Chemostatversuchen verwendeten natürlichen Bakterioplanktonisolate wurden einerseits molekularbiologisch durch Denaturierungs-Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE) und Sequenzierung der 16S rDNA, andererseits physiologisch durch die Bestimmung ihrer stammspezifischen minimalen Generationszeit charakterisiert. Als Quantifizierungsmethoden zur spezifischen Abundanzbestimmung der Isolate in den Chemostaten wurden Immunfluoreszenzmarkierung und Durchflusszytometrie sowie die Zählung von Kolonien auf Agarplatten zur Quantifizierung der physiologisch aktiven Populationen verwendet.

2 Material und Methoden

In dem folgenden Überblick über die verwendeten Methoden und Materialien findet sich in jedem Abschnitt neben der Darstellung der Vorgehensweise auch eine kurze einleitende Erörterung der jeweiligen Methoden. Die detaillierte Auflistung der verwendeten Geräte und Reagenzien mit genauer Bezeichnung und Angabe des Herstellers bzw. Lieferanten sowie die Zusammensetzung von Lösungen und Medien ist tabellarisch am Ende des Methodenkapitels (siehe 2.8) zusammengestellt. Wenn nicht anders angegeben, stammten sämtliche verwendeten Chemikalien von den Firmen **Fluka** (Buchs, Schweiz), **Merck** (Darmstadt), **Riedel de Haen** (Seetze), **Serva** (Heidelberg) oder **Sigma** (München) und entsprachen der Qualität *pro analysi*. Ist eine dieser Firmen dennoch gesondert erwähnt, so ist die Verwendung speziell dieses Produktes empfehlenswert. Das zum Ansetzen von Lösungen und Medien benötigte deionisierte Wasser stammte aus Reinstwasseraufbereitungsanlagen der Marken Nanopure (Barnstaed / Sybron) und Millipore (Milli-Q-Water System).

2.1 Gewinnung und Kultivierung der Versuchsorganismen

Um eine definierte Modell-Lebensgemeinschaft aus Bakterien zu erhalten, die gut für die experimentelle Untersuchung in kontrollierten Mikrokosmen geeignet war, galten folgende Kriterien für die Versuchsorganismen:

- Die Isolate sollten Organismen aus dem Bakterioplankton sein, die auch im natürlichen Lebensraum zusammen vorkommen und interagieren können.
- Sie sollten im Chemostat kultivierbar sein, ebenso auf Agarplatten, um während der Experimente eine Möglichkeit zu haben, umgehend Veränderungen in der Zusammensetzung der Lebensgemeinschaft beobachten zu können.
- Um eine zuverlässige Unterscheidung bei der Auswertung der Agarplatten zu gewährleisten, sollten die Isolate deutlich unterschiedliche Koloniemorphologien aufweisen.
- Die Modell-Lebensgemeinschaft sollte kein zu eingeschränktes taxonomisches Spektrum aufweisen, um durch genetische Variabilität möglichst eine physiologische Variabilität der Organismen zu gewährleisten.

2.1.1 Gewinnung der Isolate

Die Isolate, die zur Zusammenstellung der Modell-Lebensgemeinschaft verwendet wurden, stammen aus dem Bakterioplankton des mesotrophen Schöhsees (Schleswig-Holstein) und wurden aus drei verschiedenen Chemostatansätzen isoliert, die in Aufbau und Kulturbedingungen weitgehend den eigentlichen Chemostatversuchen entsprachen (siehe 2.5.1; jedoch wurden andere Phosphor- (P)- und Glucosekonzentrationen eingesetzt: $110 \mu\text{g l}^{-1}$ P, 11.25 mg l^{-1} Glucose).

Als Inokulum für die Chemostaten diente jeweils 1 ml eines $<1 \mu\text{m}$ -Filtrates von Schöhseewasser, das zuvor aus 1 m Wassertiefe mit einem Ruttnerschöpfer aus der Seemitte entnommen worden war. Die Wasserproben wurden zu unterschiedlichen Jahreszeiten entnommen (Juni, November, Dezember) und nach der Probennahme steril weiterverarbeitet.

Proben aus den Chemostaten wurden auf Agarplatten so ausplattiert (siehe 2.6.2), dass einzelne Kolonien isoliert werden konnten.

Optisch gut unterscheidbare Kolonietypen (vergl. 2.6.2) wurden durch Verdünnungsausstriche in Reinkultur gebracht und mit Hilfe von DGGE (siehe 2.2) auf genetische Unterschiedlichkeit geprüft.

2.1.2 Langzeitlagerung der Organismen und Dauerkulturen

Zur Langzeitlagerung der Isolate wurden Kryokulturen angefertigt und bei -70°C gelagert. Hierzu wurden dichte 1-2-Tages-Kulturen in flüssigem Vollmedium (siehe 2.1.3) mit frischem Medium gewaschen und mit 15% (v/v) Glycerin versetzt in Kryoröhrchen eingefroren (MANIATIS *et al.* 1982).

Zusätzlich wurden die Stämme mittelfristig auf Agarplatten bei 20°C ohne Beleuchtung kultiviert und in ca. monatlichen Abständen überimpft. Als Basismedium für die 15 %igen (w/v) Agarplatten diente ein Mineralmedium (WC-Medium, GUILLARD & LORENZEN 1972), siehe 2.8.1), dem 1 g l^{-1} Glucose und 1 g l^{-1} Hefeextrakt hinzugefügt wurden. In der Substratzusammensetzung und -konzentration sind die verwendeten Agarplatten somit vergleichbar mit R2A-Agarplatten, die gegenüber sehr hochkonzentrierten Agarmedien zur Kultivierung aquatischer Bakterien empfohlen werden (REASONER & GELDREICH 1985).

2.1.3 Kultivierung in Flüssigkultur

Zur Gewinnung der Antigene für die Herstellung der stammspezifischen Antikörper (siehe 2.6.3.1) und die vorbereitende Anzucht der Stämme für das in den Versuchen eingesetzte Inokulum (siehe 2.5.2) war das Erreichen von hohen Zelldichten in Flüssigkulturen nötig. Hierzu wurden 100-ml-Erlenmeyerkolben mit 50 ml WC-Medium, dem je 2.5 g l^{-1} Glucose

und 2.5 g l⁻¹ Hefeextrakt zugesetzt waren, befüllt, sterilisiert und nach dem Animpfen 24 – 72 h bis zum Erreichen einer deutlichen Trübung bei 20°C ±1°C bei ca. 100 rpm geschüttelt.

2.2 Denaturierungs-Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE)

Die **Denaturierungs-Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE)** wurde als *Screening*-Methode zur Auswahl geeigneter Bakterienisolate eingesetzt, da mit ihrer Hilfe auf genetische Unterschiede von Organismen getestet werden kann, über die keine Sequenzinformationen vorliegen. In einem Polyacrylamid-Gel werden gleich lange DNA-Fragmente auf Grund von Unterschieden in der Basensequenz aufgetrennt. Die Auftrennung beruht auf der unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilität von intakten Doppelhelix-Fragmenten und partiell einzelsträngigen DNA-Molekülen, deren Wanderung durch das Gel durch die Denaturierung fast vollständig gestoppt wird. Bei gleichbleibender Temperatur während der Elektrophorese sorgt ein linearer Gradient von denaturierenden Substanzen (Harnstoff und Formamid) im Gel dafür, dass die DNA-Fragmente infolge ihres sequenzabhängig unterschiedlichen Schmelzverhaltens an unterschiedlichen Positionen Banden bilden (LERMAN *et al.* 1984).

Bei den in der DGGE verwendeten DNA-Fragmenten handelte es sich um Teilstücke der V3-Region bakterieller 16S rDNA, die auf Grund ihrer genetischen Variabilität geeignet sind, unterschiedliche Organismen in komplexen Bakterien-Lebensgemeinschaften mittels DGGE zu detektieren (MUYZER *et al.* 1993). Sie wurden durch Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, **PCR**, (SAIKI *et al.* 1985) aus genomischer 16S rDNA gewonnen.

Ausgewählt als Versuchsorganismen für spätere Experimente wurden 14 Isolate, die nur eine Bande aufwiesen, deren jeweilige Position auf dem Gradienten-Gel erkennbar unterschiedlich waren.

2.2.1 DNA-Extraktion

Für die Extraktion genomischer DNA aus den Isolaten wurde das kommerzielle Extraktions-Kitt InstaGeneTM Matrix benutzt. Die Extraktion der in Wasser suspendierten Kolonien erfolgte in 500 µl-Reaktionsgefäßen entsprechend den Herstellerangaben und beruht im Prinzip darauf, dass die Zellen durch einen enzymatischen Inkubationsschritt (56°C, 30 min) und Hitze (100°C, 10-15 min) aufgeschlossen werden. Zellyseprodukte, die später die PCR stören könnten, werden durch ein chelatisierendes Harz, Chelex 100, adsorbiert und durch Zentrifugieren aus dem Überstand entfernt; dieser kann direkt als DNA-Matrizenlösung in der PCR-Reaktion eingesetzt werden.

2.2.2 Herstellung der PCR-Produkte

Die Gewinnung der PCR-Produkte, die in der DGGE eingesetzt wurden, folgte im wesentlichen dem von MUYZER vorgeschlagenen Protokoll (MUYZER *et al.* 1993; MUYZER *et al.* 1998). Alle PCR-Ansätze mit Volumina von 50 μ l bzw. 100 μ l wurden folgendermaßen angesetzt (bezogen auf 100 μ l):

DNA-Matrizenlösung (20– 40-fach mit H ₂ O verdünnt)	40 μl
10 X PCR-Puffer (15 mM MgCl ₂)	10 μl
dNTP*-Mix (200 μ M pro dNTP)	2 μl
Forward Primer (0.1 μ M)	2 μl
Reverse Primer (0.1 μ M)	2 μl
Taq**-DNA-Polymerase (1 U)	2 μl
Wasser (deionisiert und autoklaviert)	42 μl

(* dNTP = Deoxyribonukleosid-Triphosphate ATP, CTP, GTP, TTP; ** DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus*)

Der DNA-Gehalt der DNA-Matrizenlösung wurde mit Hilfe von Agarose-Gel-Elektrophorese überprüft (PERBAL 1988); je nach Bandenstärke wurde entschieden, ob und wie die Lösung verdünnt werden musste (1 μ l bzw. 2 μ l auf 40 μ l). Für genomische DNA und PCR-Produkte > 1000 Basenpaare wurden 0.8 %ige (w/v), für kleinere PCR-Produkte 2 %ige (w/v) Agarose-Gele verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 80 – 110 V (je nach Gel-Größe) für 1.5 h in 1 X TAE-Puffer durchgeführt; für die Gel-Färbung wurde Ethidiumbromid (1 mg l⁻¹) verwendet. Die Länge der PCR-Produkte wurde mit Hilfe eines DNA-Fragmentlängen-Markers kontrolliert. Dokumentiert wurden die Gele bei UV-Fluoreszenz mit Hilfe einer Sofortbildkamera oder einem computergestützten Video-Dokumentationssystem.

Um eine möglichst hohe Ausbeute spezifischer PCR-Produkte der V3-Region zu erhalten, wurde eine verschachtelte PCR (HARA *et al.* 1996) in zwei Schritten durchgeführt.

Im ersten PCR-Schritt wurden universelle Eubakterien-Primer eingesetzt, die das ca. 1500 Basenpaare umfassende DNA-Fragment (Position 27 – 1542 auf dem *E. coli* - Chromosom) der 16S rDNA amplifizieren.

Folgendes PCR-Programm mit 35 Zyklen wurde für diese PCR angewendet:

94°C (Denaturierung)	5 min
35 Zyklen:	
57°C (Primeranlagerung)	2 min
72°C (DNA-Strang-Verlängerung)	2 min 30 sec
94°C	2 min
Final-extension-Zyklus:	
57°C	2 min
72°C	5 min
4°C (Lagerung)	konstant

Der zweite PCR-Schritt wurde mit den Primern 2 und 3 (MUYZER *et al.* 1993) durchgeführt, die ein ca. 150 Basenpaare umfassendes Produkt (Position 358 – 515 auf dem *E. coli* - Chromosom) aus dem zuvor gewonnenen Teilstück herausamplifizieren und dem 5'-Ende des Stranges eine 40 Basenpaare umfassende GC-Klammer hinzufügen, die später in der DGGE eine vollständige Denaturierung der DNA-Fragmente verhindern soll (MYERS *et al.* 1985). Die als *Touchdown* - PCR durchgeführte Reaktion mit schrittweise um 1°C absinkenden Primeranlagerungstemperaturen dient der Verbesserung der Produktspezifität (MUYZER *et al.* 1993):

94°C	5 min
20 Zyklen:	
65°C (Erniedrigung um 1°C alle 2 Zyklen)	1 min
72°C	3 min
94°C	1 min
9 Zyklen:	
55°C (erwartete optimale Primeranlagerungstemperatur)	1 min
72°C	3 min
94°C	1 min
Final-Extension-Zyklus:	
55°C	1 min
72°C	5 min
4°C	konstant

Auf einen *Hot Start* (CHOU *et al.* 1992) der Reaktionen wurde verzichtet, da die Reaktionen nie mit geringen Mengen Matrizen-DNA gestartet und alle PCR-Ansätze auf Eis angesetzt wurden, um eine vorzeitige, unspezifische Anlagerung der Primer zu vermeiden.

2.2.3 DGGE

Aufbau und Durchführung der DGGE entsprachen im wesentlichen dem von MUYZER beschriebenen System (MUYZER *et al.* 1993; MUYZER *et al.* 1998). Die Denaturierungsgradienten der 7.5 %igen (w/v.) Polyacrylamid-Gele lagen in einem Bereich von 20 % - 70 % und wurden mit Hilfe eines Gradientenmischers beim Gießen der Gele aus zwei Polyacrylamid-Stammlösungen erzeugt, die jeweils 0 % Harnstoff bzw. 100 % Harnstoff und 40 % (w/v) deionisiertes Formamid enthielten. Vor dem Auftragen in die Geltaschen wurden die PCR-Produkte mit harnstofffreiem Ladepuffer vermischt. Die Elektrophorese wurde bei konstant 200 V und 60°C in 0.5 X TAE-Puffer durchgeführt. Die Laufzeit variierte zwischen 4.5 h und 6 h. Die Gele wurden mit Ethidiumbromid (2 mg l⁻¹, 20 - 30 min Färbezeit) unter sanftem Schwenken auf einem Horizontalschüttler (20 – 30 Bewegungen/min) gefärbt und bei UV-Durchlicht dokumentiert.

2.3 Taxonomische Einordnung der Versuchsorganismen

Da die moderne Bakterientaxonomie weitgehend auf der phylogenetischen Analyse der 16S rRNA als Marker fußt und Vergleichsdatenbanken für dieses Molekül zum jetzigen Zeitpunkt am umfangreichsten sind (BUSSE *et al.* 1996; LUDWIG *et al.* 1998), wurde eine taxonomische Einordnung der in den Versuchen eingesetzten Isolate anhand ihrer vollständigen 16S rDNA-Sequenz vorgenommen. Hierzu wurde aus Sequenzen bekannter, möglichst nah mit den ausgewählten Bakterienisolaten verwandten Organismen und den ermittelten Sequenzen der Versuchsorganismen ein Stammbaum nach der *Neighbor-Joining*-Methode (SAITOU & NEI 1987) erstellt. Die phylogenetische Analyse dieser Methode beruht darauf, dass homologe Sequenzabschnitte auf Ähnlichkeit überprüft und evolutionäre Distanzen berechnet werden. Um evolutionäre Distanzen zu erhalten, werden genetische Distanzen (prozentuale Ähnlichkeit bezogen auf den untersuchten Sequenzabschnitt) unter der Annahme korrigiert, dass der beobachtbare Effekt von Mutationsereignissen, d. h. eine Sequenzänderung, auf Grund von möglichen Reversionen bzw. Parallelismen nicht linear mit der Mutationshäufigkeit zunimmt. Die korrigierten Distanzen reflektieren so die geschätzte mittlere Anzahl von Basenpaaränderungen pro homologer Genposition seit der Divergenz vom gemeinsamen Vorfahren. Aus der auf diese Weise entstandenen Distanzmatrix wird ein additiver Stammbaum rekonstruiert, dessen Optimalitätskriterium auf der Annahme minimaler Evolution beruht, was in diesem Fall bedeutet, dass die Summe aller evolutionärer Distanzen von Versuchs- und Referenzorganismen minimiert wird. Das Maß für evolutionäre Distanzen in der Stammbaumdarstellung ist die aufsummierte Länge der die Organismen verbindenden Stammbaumäste. Die Stammbaumtopologie erlaubt eine grobe Klassifizierung der Organismen.

Die Aufbereitung und Sequenzierung der 16S rDNA der Isolate, das *Alignment* der Sequenzen und die Berechnung des Stammbaumes wurden freundlicherweise von Dr. Mary A. Voytek, U. S. Geological Survey, Reston; USA, durchgeführt.

2.3.1 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip der Dideoxynukleotid-Kettenabbruch-Sequenzierung (SANGER *et al.* 1977) und wurde als zyklische Sequenzierung mit terminaler Fluoreszenzmarkierung der Produkte durchgeführt. Aufgetrennt und analysiert wurden die Produkte mit Hilfe eines automatischen Sequenzierers (TRACY & MULCAHY 1991).

Als Matrizen für die Sequenzierung wurden die gereinigten und klonierten PCR-Produkte eingesetzt, die mit universellen Eubakterien-Primern gewonnen wurden (siehe 2.2.2). Klonierungs- und Sequenzierungsprotokoll entsprachen der von den Herstellern des Klonierungskitts und des Sequenzierers empfohlenen Vorgehensweise, die verwendeten Sequenzierungsprimer den von LANE (1991) beschriebenen.

2.3.2 Phylogenetische Analyse

Referenzorganismen, die auf Grund ihrer Sequenzähnlichkeit der 16S rDNA als nahe Verwandte der in den Versuchen eingesetzten Bakterienisolate eingestuft wurden, wurden mit Hilfe der *Shareware* **BLAST 2.0** (*Basic Local Alignment Search Tool*, ALTSCHUL *et al.* 1990) ermittelt, die auf das umfangreiche internationale Sequenzdatenmaterial von GenBank™ (BENSON *et al.* 2000) zugreift. Mit Hilfe eines heuristischen Algorithmus, der über die Optimierung eines lokalen Ähnlichkeitsmaßes, des *maximal segment pair (msp) score Alignments* erstellt, ermöglicht BLAST 2.0 die Suche nach Sequenzähnlichkeiten, selbst wenn die Sequenzen nur begrenzte übereinstimmende Abschnitte aufweisen. Für die Suche nach geeigneten Referenzorganismen wurde der *Gapped* BLAST-Algorithmus verwendet, der im *Alignment* Lücken für mögliche Deletionen oder Insertionen zulässt (ALTSCHUL *et al.* 1997).

Zur Erstellung des Stammbaumes wurden nur Sequenzen verwendet, die von taxonomisch bis zur Art klassifizierten Organismen stammen. Auswahlkriterium war eine möglichst große Sequenzähnlichkeit mit den entsprechenden Versuchsorganismen ($\geq 95\%$; hoher *msp score*); bevorzugt wurden Organismen gewählt, deren Habitate in der Literatur erwähnt werden. *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* wurden als allgemein bekannte Referenzorganismen, *Thermotoga maritima* als *Outgroup* in die Analyse aufgenommen. Die Benennung der Referenzorganismen richtet sich nach der vom **National Center of Biotechnology Information** vorgeschlagenen (Bethesda, USA; **NCBI**-Taxonomy Database; BENSON *et al.* 2000; WHEELER *et al.* 2000) Nomenklatur.

Die Sequenzen der Referenzorganismen konnten weitgehend aus dem Ribosomal Database Project (LARSEN *et al.* 1993) zusammengestellt werden, welches die Möglichkeit bietet, Sequenz-*Alignments* nicht nur nach Primär-, sondern auch nach Sekundärstrukturgesichtspunkten vorzunehmen. Für die übrigen Sequenzen, einschließlich die der Versuchsorganismen, wurde das *Alignment* manuell, ebenfalls unter Einbeziehung der Sekundärstruktur, mit Hilfe des **GDE-** (*genetic data environment*) Sequenzeditors (SMITH *et al.* 1994) vorgenommen. Positionen, die nicht zweifelsfrei zugeordnet werden konnten, wurden von der phylogenetischen Analyse ausgeschlossen; zur Berechnung der evolutionären Distanzen wurde der Kimura-2-Parameter-Test (KIMURA 1980) des DNA DIST-Programmes des Programmpaketes **PHYLIP 3.5** (*Phylogeny Inference Package*, FELSENSTEIN 1993) verwendet. Die Berechnung des Stammbaumes nach der *Neighbor-Joining*-Methode wurde ebenfalls mit Hilfe von PHYLIP 3.5 vorgenommen. Der abschließende Stammbaum beruht auf der *Bootstrap*-Analyse von 100 verschiedenen vorläufigen Stammbaumtopologien, die durch Hinzufügen der Taxa in zufälliger Reihenfolge und dem Zulassen von globalen Tausch von Stammbaumästen konstruiert wurden. Die statistische Stammbaumvalidierung durch *Bootstrapping* wurde mit Hilfe der Programme SEQBOOT und CONSENSE (PHYLIP 3.5) durchgeführt.

2.4 Bestimmung der minimalen Generationszeit der Versuchsorganismen

Die in den Versuchen eingesetzten Isolate wurden physiologisch näher charakterisiert, indem die maximale Wachstumsrate (μ_{\max}) als eine für einen Organismus spezifische Größe bestimmt wurde, die seine Wachstumsstrategie unter Bedingungen ohne Ressourcenlimitierung kennzeichnet. Sie beschreibt die maximale Biomassezuwachsrates, deren der Organismus unter gegebenen Umweltbedingungen (Temperatur, pH etc.) fähig ist (LAMPERT & SOMMER 1993). Da bei Mikroorganismen mit der Verdoppelung der Biomasse im Allgemeinen eine Verdoppelung der Individuen durch Teilung erfolgt, kann von μ_{\max} auf maximale Verdopplungsraten bzw. minimale Generationszeiten (g_{\min}) geschlossen werden.

Die Biomassezunahme zur Erfassung der Wachstumskinetik und Berechnung von μ_{\max} wurde in Wachstumsversuchen an statischen Reinkulturen der Versuchsorganismen durch photometrische Messung der optischen Dichte (**OD**) bestimmt (KOCH 1981).

2.4.1 Kultivierung während der Wachstumsversuche

Die statischen Kulturen zur Durchführung der Wachstumsversuche wurden in 300-ml-Erlenmeyerkolben mit 100 ml Medium angesetzt, dessen Kohlenstoff (**C**): Phosphor (**P**)-Verhältnis sich an dem in den Chemostatversuchen verwendeten modifizierten WC-Medium (siehe 2.5.1) orientierte. Um Bakteriendichten zu erzielen, die in einem für die OD-Messung erfassbaren Bereich liegen, wurde jedoch die ursprüngliche P-Konzentration des WC-Mediums ($1550 \mu\text{g l}^{-1}$) eingesetzt, die ca. 30-fach höher ist, als in den Chemostatversuchen; der C-Gehalt wurde entsprechend angepasst (248 mg l^{-1} C als Glucose). Da sich die Reinkultivierung bei einigen Isolaten, die nach dem Animpfen keinerlei Wachstum zeigten, als problematisch erwies, wurde in allen Versuchen dem Medium ein geringer Zusatz an Hefeextrakt ($20 \mu\text{g l}^{-1}$) hinzugefügt, der jedoch nicht messbar das C:P-Verhältnis beeinflusste. Die Kulturkolben wurden bei $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ohne Beleuchtung bei ca. 100 rpm geschüttelt. Der Wachstumsversuch wurde für jedes Isolat in 3 Replikaten durchgeführt.

Zum Animpfen der eigentlichen Versuchskulturen wurden 5 % (v/v) des Kulturvolumens aus einer Vorkultur zugesetzt, die zuvor 24 - 48 h unter identischen Kulturbedingungen aus einem von Agarplatten stammenden Inokulum der jeweiligen Isolate angezogen worden war. Sowohl die Vorkulturen als auch die Versuchskulturen (am Versuchsende) wurden anhand eines Kontrollausstriches auf Agarplatten (siehe 2.1.2) auf Reinheit überprüft.

2.4.2 Probennahme und Messung der optischen Dichte (OD)

Die Probennahme erfolgte steril und wurde zu Beginn des Experimentes in dreistündigem Abstand durchgeführt. Beprobte wurde mindestens bis zum Erreichen der stationären Phase, wobei die Abstände der Beprobung, je nach Entwicklung des Wachstums, gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase verlängert wurden.

Die Extinktion wurde mit dem Spectrophotometer Uvikon 930 (Kontron Instruments, Schweiz) bei 1 cm Schichtdicke gemessen. Um die Lichtabsorption während der OD-Messung, die im Idealfall nur die Trübung durch Partikel erfassen soll, zu minimieren, wurden, je nach Farbe der Zellen, drei verschiedene Wellenlängen für die Messung verwendet: 479 nm, 570 nm und 600 nm. Ermittelt wurden diese Wellenlängen aus lokalen Absorptionsminima des Mediums ohne Zellen und den empfohlenen Wellenlängenbereichen für farblose/weiße Zellen, gelbe Zellen und rötliche/bräunliche Zellen (EBERHARDT *et al.* 1981).

2.4.3 Bestimmung von μ_{\max} und g_{\min}

Bestimmt wurde μ_{\max} für jede Kultur als Steigung der durch halblogarithmische Darstellung linearisierten exponentiellen Wachstumsphase der Wachstumskinetik (SCHLEGEL 1992). Die stammspezifische maximale Wachstumsrate wurde für jedes Isolat als Mittelwert aus den für die drei replizierten Kulturen ermittelten μ_{\max} -Werten berechnet.

Daraus ableiten lässt sich g_{\min} als

$$g_{\min} = \frac{\ln 2}{m_{\max}}$$

(SCHLEGEL 1992).

2.5 Konstruktion des Chemostat-Modellökosystems

Ziel bei der Konstruktion des Modellökosystems war es, ein experimentelles System zu schaffen, welches den Anforderungen entspricht, wie sie von BROCK (1987) formuliert wurden: Klar definierte Kulturbedingungen (insbesondere der Einsatz von definierten Versuchskulturen anstelle von undefinierten Anreicherungskulturen) sollen zudem Eigenschaften aufweisen, die bis zu einem gewissen Grad die Bedingungen im natürlichen Habitat widerspiegeln, wie etwa gemäßigte Substratkonzentrationen, Bakteriendichten und Wachstumsraten, die für aquatische Lebensräume typisch sind.

Als gut replizierbare Labormikrokosmen wurden Chemostaten (MONOD 1950) gewählt. Um gezielt die Verfügbarkeit der limitierenden Ressource durch diskontinuierliche Zugabe manipulieren zu können sind sie besonders geeignet, da ihr Funktionsprinzip konstante Kulturbe-

dingungen für Mikroorganismen über längere Zeiträume ermöglicht, die durch deren physiologische Aktivität praktisch nicht verändert werden. Erreicht wird dies durch Zufluss frischen Mediums mit konstanter Zuflussrate in das Kulturgefäß und einen gleich großen konstanten Abfluss von verbrauchtem Medium, mit dem außerdem Versuchsorganismen ausgewaschen werden. Sofern die Kultur optimal durchmischt und die Durchflussrate D nicht höher als μ_{\max} der kultivierten Organismen ist, stellt sich ein Fließgleichgewicht (*Steady State*) ein, bei dem die spezifische Wachstumsrate μ der Kulturorganismen der Durchflussrate entspricht und ihre Abundanz (Biomasse) durch die Verfügbarkeit der limitierenden Ressource im Medium bestimmt wird (PFENNIG & JANNASCH 1962). Im Gegensatz zu statischen Kulturen ist es in kontinuierlichen Chemostatkulturen daher möglich, gezielt Einfluss auf Wachstumsraten und somit Generationszeiten der Kulturorganismen zu nehmen und so auch Kulturen mit niedrigen Dichten und langsamem Wachstum aufrecht zu erhalten, wie sie für Bakterien in natürlichen Habitaten typisch sind (JANNASCH & MATELES 1974).

Der Einsatz einer Modell-Lebensgemeinschaft mit definierter Zusammensetzung aus planktischen Bakterienisolaten ermöglichte es zum einen, vergleichbare Ausgangspopulationen in unterschiedlichen Ansätzen der Chemostatexperimente zu erzielen; zum anderen konnten durch die Entwicklung von stammspezifischen Detektionsmethoden (siehe 2.2.2 und 2.2.3) alle Organismen in den Proben nicht nur qualitativ erfaßt, sondern auch quantifiziert werden.

Modifiziertes WC-Medium (vergl. 2.1.3) mit Glucose als Kohlenstoffquelle, das sich für die Kultivierung von limnischen Mikroorganismen bewährt hat (z. B. STEMBERGER 1981; ROTHHAUPT 1992; ROTHHAUPT 1997), wurde als Basismedium ohne P verwendet. Durch den Einsatz eines einfachen Minimalmediums ohne komplexe, undefinierte Bestandteile war es möglich, P als einzige limitierende Ressource zu manipulieren. Hauptsächlich verfügbare P-Quelle für planktische Bakterien ist Orthophosphat (TORRIANI-GORINI *et al.* 1987), das schon vielfach als limitierend für Wachstum und Produktivität des Bakterioplanktons nachgewiesen wurde (z. B. VADSTEIN *et al.* 1993; SCHWEITZER & SIMON 1995; JANSSON *et al.* 1996; THINGSTAD *et al.* 1998), so auch phasenweise für den Schöhsee, aus dem die Versuchsorganismen stammen (ROTHHAUPT, unveröff.). Als limitierendes Modellsubstrat wurde daher Phosphat in gleichbleibender Dosis, jedoch in diskontinuierlichen Pulsen unterschiedlicher Frequenz eingesetzt. Die Dosierung orientierte sich an P-Konzentrationen, wie sie in mäßig eutrophen Seen als löslicher reaktiver Phosphor (*soluble reactive phosphorus*; **SRP**) zu Beginn der Sommerstagnation gemessen werden (RAI & JACOBSEN 1990).

Eine Übersichtstabelle der Kulturbedingungen, des experimentellen Designs und der Probenahme findet sich unter 2.5.4 (Tab. 2.1).

2.5.1 Chemostataufbau und Kulturbedingungen

Für den Versuchsaufbau wurden einstufige Chemostaten verwendet, die im wesentlichen dem klassischen Aufbau (SCHLEGEL 1992) entsprachen. Pro Versuchsansatz wurden 7 - 10 baugleiche Kulturgefäße gleichzeitig über eine Mehrkanalperistaltikpumpe betrieben; an jede Mediumsvorratsflasche (20 l) wurden zwei Kulturgefäße angeschlossen (Abb. 2.1). Alle Bestandteile der Anlage bestanden aus Glas, Silikon, Metall oder hitzebeständigem Kunststoff, so dass die Kulturgefäße komplett mit Schläuchen und Überlaufgefäß im Autoklaven sterilisiert werden konnten. Die Vorratsgefäße wurden zusammen mit dem Medium autoklaviert und steril an die Kulturgefäße angeschlossen. Die Anlage befand sich in einem temperierten Kilnraum ($20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$) mit konstanter, diffuser Beleuchtung. Die konische Form des Kulturgefäßbodens und die Zuleitung des frischen Mediums durch das Belüftungsrohr mit Öffnung am Gefäßgrund sollten für eine möglichst gute Durchmischung der Kultur sorgen. Die Chemostaten mit 700 ml Kulturvolumen wurden mit $D \approx 0.69\text{ d}^{-1}$ betrieben; die Ableitung des Mediums aus dem Kulturgefäß erfolgte nach dem *Air-Lift*-Prinzip. Die Durchflussmenge wurde täglich kontrolliert, um geringfügige Unterschiede von D der einzelnen Kulturgefäße zu erfassen.

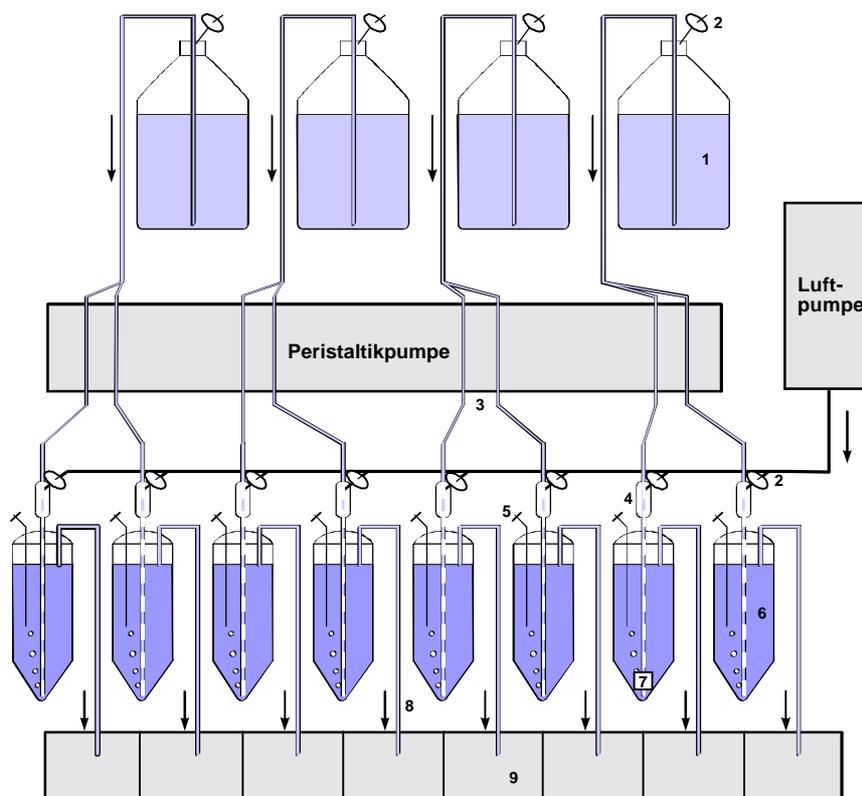


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Chemostatsysteme; (1) Mediumsvorratsgefäß, 20 l; (2) Sterilluftfilter; (3) Mediumszuleitungsschläuche aus Kautschuk; (4) Bakterientropffalle; (5) verschließbare Kanüle zur Beprobung und P-Pulszufuhr; (6) Chemostatkulturgefäß, 700 ml; (7) Mediumszuleitungs- und Belüftungsrohr; (8) Überlaufrohr; (9) Überlaufgefäß; Pfeile zeigen Mediums- und Luftfließrichtung an.

2.5.2 Inokulum

Für annähernd identische Inokula bei jedem neuen Versuchsansatz und möglichst gleiche Ausgangsbedingungen für jeden der eingesetzten Stämme sorgte eine Standardisierung bei der Zusammenstellung der Inokula:

In einer ersten Vorkultur mit hohen Substratkonzentrationen (siehe 2.1.3) wurde jeder Stamm bis zum Erreichen hoher Dichten angezogen. Um den Effekt der Umstellung von hohen auf die niedrigen Substratkonzentrationen der Versuchsbedingungen zu minimieren, wurden die Stämme dann in ein P-limitierendes Medium überimpft, dessen P-Konzentration so gewählt war, dass sie mit der P-Dosierung (siehe 2.5.3) im Versuch übereinstimmte. Die Adaptation wurde für 48 h durchgeführt.

Ein Inokulum mit möglichst gleichen Zellanteilen pro Isolat ließ sich herstellen, indem unmittelbar vor Versuchsbeginn die Zelldichte der 2. Vorkultur jedes Stammes ermittelt (DAPI-Färbung, siehe 2.6.1) und, entsprechend ihrer Dichte, unterschiedlich große Volumina jeder Kultur vermischt wurden. Zu Versuchsbeginn wurde 1 ml dieser Mischung unter sterilen Bedingungen (vergl. 2.5.3, Injektion der P-Pulse) in jedes Kulturgefäß injiziert.

2.5.3 Phosphorpulse

Entsprechend der Problemstellung einer Dosis-Reaktions-Funktion (LIBER *et al.* 1992) war das experimentelle Design zur Ermittlung des Einflusses von unterschiedlicher Störungshäufigkeit auf die Diversität einer Lebensgemeinschaft als Gradienten-Design mit anschließender Regressionsanalyse angelegt. Der Gradient umfasste Pulsintervalle unterschiedlicher Länge („*Treatments*“), wobei die über die gesamte Dauer des Experiments verabreichte P-Dosis gleich blieb.

Ausgehend von einer mittleren Tagesdosis von $24.15 \mu\text{g d}^{-1}$ P pro Chemostat, was bei kontinuierlicher P-Zufuhr einer Konzentration von $50 \mu\text{g l}^{-1}$ P im Medium entspräche, wurde die P-Menge pro P-Puls so dosiert, dass sie derjenigen P-Menge entsprach, die während eines Pulsintervalls des jeweiligen *Treatments* bei kontinuierlicher P-Zufuhr in das Kulturgefäß gelangt wäre. Verabreicht wurde P in folgenden Pulsintervallen:

0.5 d, 1 d, 2 d, 3 d, 4 d, 6 d und 8 d.

Mit Ausnahme des 6-d-Intervalls wurden alle *Treatments* 2 - 3 mal repliziert, aufgeteilt auf drei verschiedene Versuchsansätze. Die Verteilung der *Treatments* auf die Kulturgefäße war zufällig.

Die P-Pulse wurden gesetzt, indem durch eine permanent installierte, verschließbare Metallkanüle steril 1 ml einer P-Stammlösung direkt in die Kultur injiziert wurde, deren P-Gehalt pro ml der gewünschten Pulsdosis entsprach. Durch die direkte Injektion eines geringen Volumens sollte eine schnelle gleichmäßige Verteilung in der gesamten Kultur gewährleistet

werden. Um den geringfügigen Unterschieden von D zwischen den einzelnen Kulturgefäßen Rechnung zu tragen, wurde die Dauer der Pulsintervalle in theoretische Generationszeiten umgerechnet, welche die Kulturorganismen unter *Steady-State*-Bedingungen entsprechend der tatsächlich gemessenen Durchflussraten erreichen würden.

P-Limitation als Versuchsvoraussetzung wurde erreicht, indem die Konzentration der Kohlenstoffquelle Glucose so gewählt wurde, dass das Redfield-Verhältnis C:P (molar) von 106:1 (GOLDMAN *et al.* 1979) in fast allen Phasen des Versuches deutlich überschritten wurde: Dem Medium zugesetzt wurden 20 mg l^{-1} Glukose, was bei kontinuierlicher P-Versorgung ein molares C:P-Verhältnis von 413:1 bedeuten würde. Auf diese Weise wurde das Redfield-Verhältnis nur für die 4-d-, 6-d- und 8-d-*Treatments* unterschritten und dies auch nur unmittelbar nach Setzen des P-Pulses. Eine Kontamination des P-freien Mediums durch die Chemostatapparatur wurde vermieden, indem alle Bestandteile, die mit dem Medium und der Kultur in Kontakt kamen, vor der Inbetriebnahme mit 2 %iger Salzsäure gespült wurden. Dementsprechend lag der P-Gehalt des Mediums in den Vorratsgefäßen bei exemplarisch durchgeführten Kontrollen nach Ablauf der Versuche immer unterhalb der Nachweisgrenze ($< 2 \mu\text{g l}^{-1}$ P; ALBRECHT & OVERBECK 1969; ALBRECHT 1973).

2.5.4 Experimentaldauer und Probennahme

Die Dauer der Versuche betrug 24 Tage (Bezeichnung: Tag 1–25). Auf diese Weise konnten für alle *Treatments* mindestens drei Pulszyklen durchgeführt werden. Eine längere Versuchsdauer erschien nicht empfehlenswert, da mit Wandbewuchs zu rechnen war, der, im Gegensatz zu den frei in der Kultur suspendierte Zellen, nicht der gleichen „Mortalität“ durch Auswaschung unterworfen ist und nicht repräsentativ durch die Beprobung erfasst wird. Wandbewuchs durch periphytische Mikroorganismen kann in aquatischen Modellökosystemen schon innerhalb weniger Wochen (2 - 4) einen deutlichen Einfluss auf die Ressourcenverfügbarkeit und Wachstumsbedingungen haben (CHEN *et al.* 1997), und die Bildung von sich anheftenden Formen potentiell sessiler Organismen wird speziell durch Chemostatbedingungen gefördert (OLSEN *et al.* 1983).

Die Probennahme erfolgte immer unmittelbar vor der nächsten P-Pulsgabe, um die Endpunkte der Pulsintervalle vergleichen zu können; bei längeren Pulsintervallen (4 d, 6 d, 8 d) wurde z.T. in kürzeren Abständen beprobt. 20 ml Probenvolumen wurde mit Hilfe einer sterilisierten Glasspritze aus einer fest installierten, in die Kultur hineinragenden Metallkanüle entnommen. Ein Teil der Probe wurde mit Formol fixiert (2 % Endkonzentration) und bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C dunkel gelagert; der Rest wurde zur Bestimmung der Koloniebundanz (siehe 2.6.2) verwendet.

Tab. 2.1: Übersicht über Kulturbedingungen, experimentelles Design und Beprobung der Chemostatexperimente

Kulturbedingungen			
Licht	diffuses Dauerlicht		
Temperatur	20 °C ± 1°C		
Kulturvolumen	700 ml		
Medium	WC-Medium, modifiziert (P-frei; 20 mg l ⁻¹ Glucose)		
Durchflussrate D	~ 0.69 d ⁻¹		
Inokulum	14 Isolate aus dem Schöhsee zu in etwa gleichen Anteilen		
P-Dosis	24.15 µg d ⁻¹		
Versuchsdauer	24 d		
Beprobung	jeweils vor P-Pulsgabe		
	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3
Treatments	0.5 d (2 X)	0.5 d (1 X)	0.5 d (2 X)
(Replikate)	1 d (2 X)	1 d (1 X)	1 d (2 X)
	2 d (2 X)	2 d (1 X)	
		3 d (1 X)	3 d (2 X)
	4 d (1 X)	4 d (2 X)	
			6 d (1 X)
	8 d (1 X)	8 d (2 X)	

2.6 Abundanzbestimmung der Versuchsorganismen

Für die Quantifizierung von Diversität einer Lebensgemeinschaft werden im Allgemeinen zwei Parameter erhoben: Artenzahl und Abundanzverteilung der Arten. Da eine direkte Art- bzw. stammspezifische Abundanzermittlung in mikrobiellen Lebensgemeinschaften aufgrund mangelnder morphologischer Unterscheidbarkeit auf der Ebene der Individuen problematisch ist, wurde zunächst die Gesamtabundanz aller Bakterienzellen in den Proben ermittelt, die weiterhin als Bezugsgröße bei der Bestimmung von stammspezifischen Abundanzen diente. Dies geschah mit Hilfe von Fluoreszenzfärbung und anschließender epifluoreszenzmikroskopischer Direktzählung. Der hierzu verwendete Fluoreszenzfarbstoff 4,6-Diamidino-2-phenylindol (**DAPI**), der mit DNA-Molekülen einen bei UV-Licht-Anregung blau fluoreszierenden Komplex bildet, gilt als spezifische Markierung für DNA-haltige Zellen (PORTER & FEIG 1980).

Als klassische Methode zur Abundanzermittlung lebensfähiger Bakterienzellen wurde die Kultivierung und Quantifizierung von koloniebildenden Zelleinheiten (*colony forming units*, **CFU**) auf Agarplatten durchgeführt, die den Vorteil bietet, die Versuchsorganismen in einer definierten Lebensgemeinschaft zuverlässig makroskopisch unterscheiden und somit stammspezifisch quantifizieren zu können. Es wurde ein auf das Chemostatmedium abgestimmtes

Plattenmedium verwendet, dessen Anwendung auf Kulturbakterien aus Chemostatsystemen eine hohe, repräsentative Kultivierbarkeit erwarten lässt (HAHN & HÖFLE 1999).

Ergänzend hierzu wurden an ausgewählten Proben Detektion und relative Quantifizierung der einzelnen Stämme mittels indirekter stammspezifischer Immunfluoreszenzfärbung und anschließender Durchflusszytometerzählung durchgeführt. Die Untersuchung konzentrierte sich dabei auf das letzte Drittel des Experimentes (Tage 17, 19 und 25); einige Replikate der *Treatments*, für die an diesen Tagen CFU-Zählungen vorliegen, konnten aus technischen bzw. zeitlichen Gründen nicht durchflusszytometrisch bearbeitet werden.

Eingesetzt wurden primäre polyklonale Antikörper, die durch Immunisierung von Kaninchen gegen Zelloberflächenepitope ganzer Zellen für jedes Isolat gewonnen wurden, und sekundäre, gegen Kaninchenimmunglobulin G gerichtete Ziegenantikörper mit Fluoreszenzmarkierung. Bei indirekter Immunfluoreszenzfärbung lagert sich in einem ersten Inkubationsschritt der spezifische primäre Antikörper an die Zellen in den Proben an, die homologe Antigene aufweisen. Während der zweiten Inkubation wird der primäre von dem sekundären, mit einem Fluorochrom konjugierten Antikörper markiert, der spezifisch auf Antikörper des Tieres reagiert, welches den primären Antikörper produziert hat. Diese Methode erlaubt eine hoch spezifische Fluoreszenzmarkierung individueller Zellen, wobei der Einsatz polyklonaler Antisera zugunsten einer detektierbaren Markierungsintensität gegenüber monoklonalen Antisera vorzuziehen ist (CHANTLER & McILLMURRAY 1987). Bei dem verwendeten sekundären Ziegenantikörper handelte es sich um Konjugate des Fluorochroms **Cy3.180Su** (XVI) (MUJUMDAR *et al.* 1993), das typischerweise bei Grünlichtanregung im rot-orangen Emissionsbereich detektiert wird (SHAPIRO 1995).

Das Prinzip der durchflusszytometrischen Detektion und Quantifizierung unterschiedlicher Zellpopulationen in komplexen Zellsuspensionen beruht darauf, dass die Zellen in einem Flüssigkeitsstrahl fokussiert werden und dadurch möglichst vereinzelt Sensoren passieren, die deren chemische und/oder physikalische Eigenschaften erfassen und die Signale unterschiedlicher Kategorien zählen. Bei modernen Durchflusszytometern geschieht dies, indem die Zellen mit monochromem Licht, im allgemeinen Laserlicht, bestrahlt und verschiedene Parameter, sowohl resultierendes Streulicht als auch ein gegebenenfalls erzeugtes Fluoreszenzsignal, erfasst werden. (SHAPIRO 1995) Bei der Bearbeitung der Chemostatproben wurden DAPI-Fluoreszenz und 90°-Streulicht (*orthogonal* bzw. *side scatter*, **SSC**) zur Charakterisierung aller Zellen und die Anregungsfluoreszenz des mit dem sekundären Antikörpers konjugierten Fluorochroms zur Erfassung der Populationsgröße des jeweils spezifisch markierten Bakterienstammes benutzt. Da keine definierten Probenvolumina gemessen werden konnten, wurden keine absoluten Abundanzen, sondern jeweils der relative Anteil antikörpermarkierter Zellen an der Gesamtzellzahl erfasst.

Die Immunisierung der Kaninchen zur Gewinnung der primären, stammspezifischen Antisera wurde von der Firma Eurogentec, Seraing, Belgien, vorgenommen.

Die Durchflusszytometermessungen zur relativen Abundanzbestimmung der immunfluoreszenzmarkierten Isolate wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Jakob Pernthaler in der Arbeitsgruppe „Molekulare Ökologie“ der Abteilung Mikrobiologie des Max-Planck-Institutes für Marine Mikrobiologie, Bremen, durchgeführt.

2.6.1 Bestimmung der Gesamtabundanzen mittels DAPI-Färbung

Die epifluoreszenzmikroskopische Zählung der Bakterienzellen wurde, geringfügig modifiziert, nach der von PORTER & FEIG (1980) entwickelten DAPI-Methode durchgeführt.

Zur Färbung wurde ein geeignetes Probenvolumen (je nach Zelldichte 0.5 ml bzw. 1 ml) mit 5 ml partikelfreiem Leitungswasser verdünnt. Nach Zugabe von 200 µl einer DAPI-Stammlösung ($125 \mu\text{g ml}^{-1}$) wurde die Probe 3 min inkubiert und anschließend auf einen schwarzen Polycarbonat-Membranfilter mit 0.2 µm Porengröße und einem Unterlegfilter (1.2µm Porengröße) abfiltriert (-200 mbar). Der Filter wurde auf einem Objektträger unter einem Deckglas in fluoreszenzfreiem Öl eingebettet. Wurden die Proben nicht unmittelbar nach der Färbung ausgezählt, wurden die eingebetteten Filter bei $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren gelagert. Die Zählung erfolgte bei 400 - 1000-facher Vergrößerung am Epifluoreszenzmikroskop; je Probe wurden mindestens 400 Zellen erfasst.

Die Bakterienabundanzen wurden unter Berücksichtigung von ausgezählter Fläche, aktiver Filterfläche und abfiltriertem Probenvolumen errechnet.

2.6.2 Stammspezifische Quantifizierung durch Koloniezählung auf Agarplatten

Die angewandte Prozedur zur Ermittlung der CFU-Abundanzen entsprach im Prinzip der von KOCH (1981) beschriebenen.

Von den Chemostatproben wurde unter sterilen Bedingungen mit P-freiem, sterilen WC-Medium eine Dezimalverdünnungsreihe angelegt. Auf je 3 Agarplatten (modifiziertes WC-Medium, siehe 2.1.2) wurden jeweils 100 µl der Verdünnungsschritte 10^{-2} , 10^{-3} und 10^{-4} ausplattiert.

Die Platten wurden im Dunkeln bei $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 5 - 7 Tage inkubiert. Nach diesem Zeitraum war keine Veränderung mehr in der Anzahl und der wesentlichen Entwicklung der zur morphologischen Unterscheidung der Kolonietypen herangezogenen Merkmale zu beobachten.

Ausgewertet wurden die Platten von jeweils zwei Verdünnungen, wobei diejenigen gewählt wurden, bei denen die Anzahl der Kolonien zwischen 20 und 200 lag. Die Auszählung der Platten erfolgte unter einer Lupenlampe.

Zur optischen, makroskopischen Unterscheidung der Isolate anhand ihrer Koloniemorphologie wurden Farbe, Form, Größe, Oberflächenbeschaffenheit, Durchsichtigkeit und die Beschaffenheit des Kolonierandes als Merkmale herangezogen.

Die Ergebnisse aus beiden Verdünnungsschritten wurden bei der Abundanzberechnung durch Mittelwertbildung kombiniert; die relative Kultivierbarkeit der Bakterien auf den Agarplatten wurde aus dem Vergleich von DAPI- und CFU-Abundanzen abgeleitet.

2.6.3 Stammspezifische Quantifizierung durch Immunfluoreszenz

2.6.3.1 Gewinnung der polyklonalen, stammspezifischen Antikörper

Zur Gewinnung der stammspezifischen, polyklonalen Antisera wurden ganze Zellen aus dichten Flüssigkulturen (siehe 2.1.3) eingesetzt, deren Präparation, leicht modifiziert, der Methode von CHANTLER & MCILLMURRAY (1987) entsprach. Die Kulturen, mit Hilfe von Kontrollausstrichen auf Agarplatten auf Reinheit geprüft, wurden mit 2 % Formol (Endkonzentration) über Nacht fixiert und anschließend 2 X mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, **PBS**; pH 7.4) gewaschen. Die Zellen wurden in PBS suspendiert und auf eine Dichte der Größenordnung $10^9 - 10^{10} \text{ ml}^{-1}$ Zellen eingestellt (Überprüfung mittels DAPI-Färbung).

Diese Zellsuspension wurde, 1:1 mit unvollständigem Freund'schen Adjuvanz (FREUND & McDERMOTT 1942; FREUND 1956) versetzt, zur intradermalen Immunisierung von Kaninchen verwendet. Immunisierungsinjektionen (1 ml auf mehrere Injektionsstellen verteilt) wurden am 1., 14. und 28. Tag des Immunisierungsvorganges vorgenommen. Die Blutabnahmen zur Gewinnung der später verwendeten Antisera erfolgten am 38. und 58. Immunisierungstag. Eine Aufreinigung erfolgte insoweit, als das Blutserum von allen zellulären Bestandteilen befreit wurde. Bis zur Verwendung wurden die Antisera bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.6.3.2 Immunfluoreszenzmarkierung

Die stammspezifische Immunfluoreszenzmarkierung der Bakterien wurde an den formolfixierten Chemostatproben vorgenommen, wobei die Markierung für jede Probe jeweils mit jedem der 14 Primärantisera einzeln durchgeführt wurde.

Das Protokoll orientierte sich an dem von HARLOW & LANE (1988) vorgeschlagenen und wurde bei Raumtemperatur mit Hilfe einer Filtrationsanlage auf 0.2- μm -Polycarbonat-Membranfiltern (1.2- μm -Unterlegfilter) durchgeführt. Das zwischen den Inkubationsschritten nötige Waschen der abfiltrierten Zellen und Filter erfolgte durch Zugabe und anschließendes Abfiltrieren von PBS (pH 7.4).

Die Inkubation der Bakterien mit dem sekundären Antikörper konnte gleichzeitig mit der DAPI-Färbung durchgeführt werden, da es keine Interferenzen zwischen beiden Vorgängen gibt (HOFF 1988). Um unspezifische Hintergrundfluoreszenz zu vermeiden, wurde den primären und sekundären Antikörperlösungen jeweils 5 % (w/v) Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*, **BSA**) als Blockierungsreagenz hinzugefügt; eine Kontamination mit Fremdpartikeln

wurde verhindert, indem alle verwendeten Lösungen bei der Zugabe durch 0.2- μ m-Spritzenfilter filtriert wurden. Während der Inkubationszeiten wurde darauf geachtet, dass die Filter nicht trocken fielen.

Um Detektion und Quantifizierung durch Durchflusszytometrie mit mikroskopischer Direktzählung vergleichen zu können, wurde je eine Filterhälfte entsprechend der später angewandten Detektionsmethode präpariert.

Das Markierungsprotokoll wurde auf minimalen Zeitaufwand optimiert, indem Reinkulturen der Versuchsorganismen sowohl mit DAPI als auch mit Cy3-markierten Antikörpern gefärbt und epifluoreszenzmikroskopisch DAPI- und Cy3-Markierung verglichen wurde. Die sehr guten Anregungsfluoreszenzeigenschaften des für die sekundäre Antikörpermarkierung verwendeten Fluorochroms Cy3 mit hoher relativer Quantenausbeute (YUROV *et al.* 1996) erlaubte es, die üblichen Mindestinkubationszeiten für den 1. und 2. Markierungsschritt (20 – 30 min, HARLOW & LANE 1988) deutlich auf wenige Minuten zu verkürzen (vergl. MUJUMDAR *et al.* 1993).

Folgendes Markierungsprotokoll wurde für die stammspezifische Immunfluoreszenzmarkierung der Chemostatproben durchgeführt:

1. Auffiltrieren der Probe (je nach Zelldichte **0.5** bzw. **1 ml**) auf den Membranfilter
2. **1 X** waschen mit **1 ml** PBS (**pH 7.4**)
3. **5 min** Inkubation mit primärem, stammspezifischen Antikörper (optimale PBS-Verdünnung, **5 %** (w/v) BSA-Zusatz, **2-3 ml** Lösungsüberstand)
4. **3 X** waschen mit je **1 ml** PBS
5. **3 min** Inkubation mit sekundärem, Cy3-markierten Antikörper (**1:500**-PBS-Verdünnung, **5 %** (w/v) BSA-Zusatz, **2 - 3 ml** Lösungsüberstand) und DAPI (**50 μ l** Stammlösung, siehe 2.6.1)
6. **3 X** waschen mit je **1 ml** PBS
7. Transfer einer Filterhälfte in ein 1.5-ml-Reaktionsgefäß zur späteren Aufarbeitung für die durchflusszytometrische Auswertung bzw. Einbetten einer Filterhälfte auf einem Objektträger (siehe 2.6.1) für mikroskopische Untersuchungen
8. Lagerung der präparierten Filter bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Die optimale Verdünnung der stammspezifischen Primärantisera mit möglichst hohem Verdünnungsfaktor zur Spezifitätsverbesserung bei dennoch ausreichender Markierung wurde für jedes Antiserum durch Austesten von PBS-Exponentialverdünnungsreihen ermittelt. Als ausreichende Markierung wurde eine klare, vollständige Ringfluoreszenz um jede Zelle bei epifluoreszenzmikroskopischer Untersuchung des Präparates gewertet.

Jedes Antiserum wurde zudem auf Kreuzreaktivität mit allen übrigen, im Versuch eingesetzten Organismen getestet. Es wurden nur wenige einseitige, keine reziproken Kreuzreaktivitäten festgestellt.

2.6.3.3 Detektion und Quantifizierung durch Durchflusszytometrie

Zur Vorbereitung auf die durchflusszytometrische Analyse wurden die auf den Filtern eingefrorenen, antikörpermarkierten Proben unmittelbar vor der Messung in Suspension gebracht, indem die Zellen mit 1 ml partikelfreier PBS durch Vortexen (45 s) vom Filter abgewaschen wurden. Um eine mögliche Aggregation der Zellen zu vermeiden, wurde die Zellsuspension 1 min einer Ultraschallbehandlung ausgesetzt. Eine mikroskopische Inspektion von einigen exemplarisch ausgewählten Proben zeigte eine erfolgreiche Zellvereinzelung durch die Ultraschallbehandlung. Einem Nachlassen des DAPI-Fluoreszenzsignals wurde vorgebeugt, indem die Proben anschließend noch einmal in Suspension mit DAPI nachgefärbt wurden.

Das verwendete Durchflusszytometer, in abgewandelter Ausstattung von ZUBKOV *et al.* (1999) beschrieben, war mit zwei Lasern als Anregungslichtquellen ausgerüstet. Der erste, ein wassergekühlter Argonlaser, diente der Erzeugung des SSC-Signals und der DAPI-Fluoreszenzanregung und war bei einer Emissionsleistung von 200 mW auf eine UV-Emission von 364 nm eingestellt. Die blaue DAPI-Fluoreszenz wurde durch einen 460 nm \pm 50 nm BP-Filter detektiert. Bei dem zweiten Laser handelte es sich um einen gepumpten Diodenlaser mit einer Emission von 532 nm und 200 mW Emissionsleistung. Die Fluoreszenz der Cy3-markierten Zellen wurde durch einen 595 nm \pm 40 nm BP-Filter detektiert. Als Hüllstrahlflüssigkeit wurde 0.1 %ige, partikelfreie NaCl-Lösung verwendet.

Zu Beginn jeden Messtages wurde die Ausrichtung der Durchflusszytometeroptik mit Hilfe von Fluoreszenzpartikeln (λ 0.5 μ m und 2 μ m) optimiert und damit die gemessenen Fluoreszenzintensitäten maximiert.

Auslösendes Signal für die Detektion positiver Ereignisse war das SSC-Signal oberhalb einer Intensitätsschwelle, die Hintergrundsignale partikelfreier Kontrolllösungen ausblendet. Über 1024 Kanäle wurde die SSC- bzw. Fluoreszenzintensität (DAPI, Cy3) in logarithmischer Skalierung über 4 Dekaden gemessen. Die Datenaufnahme erfolgte im Listenmodus mit Hilfe eines Programmpaketes des Durchflusszytometerherstellers, ebenso, wie die Auswertung der Daten.

Die Bereichsdefinition für die Datenaufnahme wurde an zweidimensionalen Punkt- und Konturdiagrammen (SSC-Signale gegen DAPI- bzw. Cy3-Signale) durchgeführt. Anhand von Kontrolllösungen (partikelfreie PBS mit DAPI-Lösung) wurde sowohl für die DAPI-Fluoreszenz als auch die Cy3-Fluoreszenz eine Intensitätsschwelle bestimmt, oberhalb derer Signale als DAPI- bzw. Cy3-positive Ereignisse gewertet wurden. Da das Verhältnis von DAPI-positiven und DAPI-negativen Ereignissen („Rauschen“ durch Nicht-Bakterien-Partikel) in den verschiedenen Proben sehr unterschiedlich war (ca. 1:1 - 1:100), wurde der Umfang der Zählung konstant gehalten, indem bereits bei der Aufnahme eine Mindestanzahl zu zählender DAPI-positiver Ereignisse (5000) festgelegt wurde. Die endgültige Abgrenzung aller Zellsignale von

den Hintergrundsignalen wurde nach Beendigung der Messung durch das Setzen von polygonalen Fenstern (*Gates*) in zweidimensionalen Abundanzkonturliniendiagrammen (SSC-Signale gegen DAPI-Fluoreszenzsignale) vorgenommen. Zellen mit positivem Cy3- und SSC-Signal ohne DAPI-Fluoreszenz wurden ebenfalls als zur Gesamtzellpopulation gehörig bewertet. Pro Chemostatprobe wurden jeweils 14 durchflusszytometrische Zählungen, je eine pro stammspezifischer Antikörpermarkierung, durchgeführt. Die Gesamtzahl aller erfassten Zellen pro Probe setzt sich somit aus den Cy3-positiven Signalen der 14 Einzelmessungen der stammspezifischen Antikörpermarkierungen zusammen und betrug im Mittel 5511 (± 127 s.e.) Zellen pro Probe.

Zur Berechnung der relativen Abundanz der Stämme wurde zunächst, sofern erforderlich, eine Kreuzreaktivitätskorrektur vorgenommen. Da die Addition der relativen Abundanzwerte, bedingt durch die 14 Einzelmessungen, im Allgemeinen nicht genau 100 % ergab, sondern im Mittel Abweichungen von ± 20 % auftraten, wurde weiterhin eine Normalisierung der Werte auf die Endsumme 100 % vorgenommen.

Um zu untersuchen, ob die Detektierbarkeit der Zellen durch das Cy3-Signal stammsspezifische Unterschiede aufweist, wurden Proben von Reinkulturen der 14, als Versuchorganismen verwendeten Isolate immunfluoreszenzmarkiert und die durchflusszytometrische Cy3-Detektionsrate mit der DAPI-Detektion der Gesamtzellzahl verglichen. Durchschnittlich wurden 7027 Zellen (± 1169 s.e.) pro Stamm in Bezug auf ihre Cy3-Detektierbarkeit überprüft.

2.7 Datenauswertung

2.7.1 Diversitätsmaß

Die Quantifizierung von Diversität einer Lebensgemeinschaft erfordert eine Einteilung der erfassten Individuen in sich nicht überschneidende Klassen, die entsprechend qualifizierender Kriterien unterschieden werden. Grundlegende Einheit bei der Betrachtung von Diversität ist im Allgemeinen die Art (CLARIDGE *et al.* 1997). Ohne zunächst das Problem des Artkonzeptes bei Mikroorganismen berühren zu wollen, werden im Folgenden die 14 Isolate bei der Bestimmung von Diversitätsparametern wie Arten behandelt.

Bei der Formulierung der IDH (CONNELL 1978) wird nicht explizit festgelegt, welches Diversitätsmaß zur Überprüfung der Hypothese zu betrachten ist; die aufgeführten Beispiele beziehen sich jedoch alle auf die Artenzahl (*species richness*, **S**). Die Zuverlässigkeit der Schätzung von *S* ist jedoch stark von der Beprobungsintensität und der Abundanzverteilung der Arten (*Evenness*) abhängig (KINKEL *et al.* 1992) und vernachlässigt die Information über die *Evenness*, die generell ebenso als grundlegende Komponente zur Definition der Diversität einer Lebensgemeinschaft gilt (WASHINGTON 1984). Als weiteres Diversitätsmaß wurde daher der Simpson-Index **D** berechnet, der nicht nur einer der am häufigsten verwendeten Indizes

ist, sondern dessen Komplementärwert, $1-D$, statistische Eigenschaften aufweist, die sich in Bezug auf Probengröße und Artenabundanzverteilung im Vergleich zu anderen Indizes als am robustesten erwiesen haben (LANDE 1996; MOUILLOT & LEPRETRE 1999).

D wurde bestimmt nach der Formel

$$D = \sum_{i=1}^S p_i^2$$

wobei für begrenzte Populationen

$$p_i = \frac{n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

(KREBS 1998) gilt.

p_i = Anteil der Individuen der i ten Art an der Gesamtpopulation

n_i = Anzahl der Individuen der i ten Art in der Probe

N = Gesamtindividuenzahl in der Probe

S = Artenzahl in der Probe

D wurde mit Hilfe des Programmpaketes *Alpha Diversity & Richness* (Pisces Conservation Ltd., Lymington, UK) berechnet, welches den Kehrwert von D , $1/D$, ermittelt und

$$p_i^2 = \left(\frac{n_i}{N} \right)^2$$

approximiert.

Betrachtet wurden Simpsons Komplementärwert $1-D$, der ein Maß für die Wahrscheinlichkeit ist, mit der zwei Individuen, die zufällig aus einer Population ausgewählt werden, unterschiedlichen Arten angehören, und Simpsons Kehrwert $1/D$, der als effektive Artenzahl bezeichnet wird und die Artenzahl in der Probe angibt, die bei Gleichverteilung der Abundanzen auf die Arten den selben Diversitätswert erzeugen würde, wie der beobachtete (LUDWIG & REYNOLDS 1988).

Eine Erweiterung von Simpsons D durch Einbeziehung von phylogenetischer Information ist der von Clarke und Warwick eingeführte taxonomische Diversitätsindex D , der die durchschnittliche taxonomische bzw. phylogenetische Distanz zwischen zwei zufällig aus der Probe ausgewählten Individuen beschreibt (CLARKE & WARWICK 1998).

D wird berechnet nach:

$$D = \frac{\sum \sum_{i < j} w_{ij} x_i x_j + \sum_i 0 \cdot x_i (x_i - 1) / 2}{\sum \sum_{i < j} x_i x_j + \sum_i x_i (x_i - 1) / 2} \quad (\text{CLARKE \& WARWICK 1998})$$

x_i = Abundanz der i ten Art

x_j = Abundanz der j ten Art

w_{ij} = taxonomische Distanzgewichtung entsprechend der aufsummierten Länge der Stammbaumäste, die die i te mit der j ten Art verbinden

Als taxonomische Distanzgewichtung wurden die sequenzanalytisch ermittelten phylogenetischen Distanzen (siehe 2.3.2) verwendet.

2.7.2 Probengröße

Um zu testen, ob unterschiedliche Ergebnisse bei der Diversitätsermittlung durch die beiden angewandten Methoden der stammspezifischen Abundanzfassung vor allem durch die unterschiedliche Probengröße (vergl. 2.6.2 und 2.6.3) bedingt sind, wurde, exemplarisch für einen Probennahmetag (Tag 25), eine Rarefaktionsanalyse (KREBS 1998) durchgeführt. Diese Analyse erlaubt es, anhand der jeweils ermittelten Artenzahl und Abundanzverteilung die zu erwartende Artenzahl bei einer vorgegebenen Standard-Probengröße zu schätzen:

$$E(\hat{S}_n) = \sum_{i=1}^S \left[1 - \frac{(N - N_i)! / n! (N - N_i - n)!}{N! / n! (N - n)!} \right] \quad (\text{KREBS 1998})$$

$E(\hat{S}_n)$ = erwartete Artenzahl einer zufälligen Probe mit n Individuen

S = nachgewiesene Gesamtartenzahl

N = Gesamtabundanz der durch die Beprobung erfassten Individuen

N_i = Abundanz der i ten Art

n = für die Standardisierung gewählte Probengröße

Mit Hilfe einer Monte-Carlo-Simulation wurde weiterhin untersucht, ob ein geringerer Beprobungsaufwand, vergleichbar dem der CFU-Zählung, bei der durch Immunfluoreszenzdetektion ermittelten Abundanzverteilung der Individuen (Tag 25) einen Einfluss auf die ermittelten Diversitätsparameter hat. Die Zufallsstichprobe umfasste 100 Individuen pro Simulation. Es wurden 5 Simulationen pro Probe durchgeführt, vergleichbar mit der Anzahl der replizierten Agarplatten.

2.7.3 Statistische Auswertung

2.7.3.1 Vergleich von Stichproben

Als Standardmethode zum Vergleich von unabhängigen Stichproben wurde die Einwegvarianzanalyse (ANOVA) angewendet. Als Voraussetzung hierfür wurden die Homogenität der Varianzen (Hartley-, Cochran-, Bartlett-Test) und die Normalverteilung der Daten (Kolmogorov-Smirnov- bzw. Median-Test) überprüft. Fast immer war eine Transformation der Daten nötig, die meist als In-Transformation durchgeführt wurde (SACHS 1992; SOKAL & ROHLF 1995).

Post-hoc-Analysen wurden entweder als Tukey-Test (bei einer geringen Anzahl von Stichproben: $k < 10$) oder als Newman-Keuls-Test (bei $k \geq 10$) ausgeführt (LOZÁN 1992).

Konnte keine Normalverteilung der Daten erreicht werden, wurden im Allgemeinen der Kruskal-Wallis-Test (aber auch der Median-Test) angewendet (SOKAL & ROHLF 1995).

Sollten verbundene Stichproben auf Unterschiedlichkeit getestet werden wurde als parametrisches Verfahren der *t*-Test und als nicht parametrisches Verfahren der Wilcoxon-*Matched-Pairs*-Test eingesetzt (SOKAL & ROHLF 1995).

Für alle zuvor genannten statistischen Analysen wurde das Programmpaket STATISTICA (STATSOFT 1995) verwendet.

2.7.3.2 Relation von Störungsregime und Diversität

Um zu prüfen, ob die IDH für die Modell-Lebensgemeinschaften in den Chemostaten bestätigt werden kann, wurden mit Hilfe von multipler Regressionsanalyse Polynome 2. Ordnung als einfachste Modelle untersucht, die eine unimodale Antwort im Sinne der IDH erzeugen können (TOWNSEND *et al.* 1997). Hierfür sollte der lineare Term der Funktion signifikant positiv, der quadratische Term signifikant negativ sein. Eine rückwärts gerichtete schrittweise multiple Regressionsanalyse (SOKAL & ROHLF 1995) sollte testen, ob sich das Bestimmtheitsmaß r^2 durch die Einbeziehung beider Terme signifikant erhöht; die *F-to-remove*-Werte wurden hierbei so gewählt, dass sie ein Signifikanzniveau von $p \leq 0.05$ erfüllten ($4.5 \leq F_{v1,v2} \leq 5$). Für die Regressionsanalyse wurden die Ergebnisse aus den drei Versuchsansätzen zusammengefasst.

Ebenso, wie alle übrigen Berechnungen von Regressionsanalysen, wurden diese Analysen mit Hilfe des Statistikprogramms STATISTICA durchgeführt (STATSOFT 1995).

2.8 Geräte- und Materialien

2.8.1 Gewinnung und Kultivierung der Versuchsorganismen

Tab. 2.2: Geräte und Materialien für die Gewinnung und Kultivierung der Versuchsorganismen

Geräte:	Bezeichnung	Hersteller / Lieferant
Sterilbank	Clan LAF® HF 1806	Claus Damm, Fredensborg, Dänemark
Klimaschrank	Rumed 244	Rubarth Apparate GmbH
Filtrationseinheit (sterilisierbar)	Filtrationseinheit Typ 16510, 250 ml, Polycarbonat	Sartorius, Göttingen
Reagenzien u. Materialien:		
Agar	Bacto-Agar, „Difco“ certified	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Glucose	β-D(+) Glucose	Sigma, Steinheim
Hefeextrakt	Yeast Extract, „Difco“ certified	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Polycarbonat-Membranfilter, Porengröße 1 µm, Ø 47 mm	Nucleopore® PC MB 47 MM	Costar, Tübingen
Kryoröhrchen	Nunc CryoTube™ Vials; 3.6 ml	Nalge Nunc International, Dänemark
Lösungen:	Zusammensetzung:	
WC-Medium (1000 X)	85.00 g l⁻¹ NaNO₃; 37.00 g l⁻¹ MgSO₄ · 7 H₂O; 36.80 g l⁻¹ CaCl₂ · 2 H₂O; 21.20 g l⁻¹ Na₂SiO₃ · 5 H₂O; 12.60 g l⁻¹ NaHCO₃; 11.40 g l⁻¹ K₂HPO₄ · 3 H₂O Spurenelemente: 4.36 g l⁻¹ Na₂EDTA; 3.15 g l⁻¹ FeCl₃ · 6 H₂O; 1.00 g l⁻¹ H₃BO₃; 0.18 g l⁻¹ MnCl₂ · 4 H₂O; 0.022 g l⁻¹ ZnSO₄ · 7 H₂O; 0.01 g l⁻¹ CuSO₄ · 5 H₂O; 0.01 g l⁻¹ CoCl₂ · 6 H₂O; 0.006 g l⁻¹ NaMoO₄ · 2 H₂O Puffer: 0.115 g l⁻¹ TES [pH 7.4]	

2.8.2 DGGE

Tab. 2.3: Geräte und Materialien für DNA-Extraktion und PCR zur Gewinnung der 16S rDNA- und V3-Region-Fragmente zur anschließenden DGGE-Analyse bzw. Sequenzierung der Versuchsorganismen

DNA-Extraktion			
Geräte:	Bezeichnung	Hersteller / Lieferant	Bemerkungen
Zentrifugen	Centrifuge 5417R; Sorvall® RC-5B	Eppendorf, Hamburg; Du Pont Instruments	
Thermocycler für Temperaturinkubationen	Perkin Elmer Cetus 480	Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA	
Reagenzien u. Materialien:			
Extraktionskitt	InstaGene™ Matrix	BioRad, München	
500 µl-Reaktionsgefäße		Biozym, Hess. Oldendorf	DNase- u. RNasefrei
PCR			
Geräte:			
Thermocycler	Perkin Elmer GeneAmp 2400	Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA	
Reagenzien u. Materialien:			
PCR-Puffer	10 X PCR-Puffer	Boehringer, Mannheim	Zusammensetzung: 100 mM Tris; 15 mM MgCl ₂ ; 500 mM KCl; pH 8.3
dNTPs		MBI Fermentas, St. Leon-Rot	
Taq-DNA-Polymerase		Boehringer, Mannheim	
Eubakterien-Primer I (<i>E.coli</i> -Position 9 - 27)		Pharmacia Biotech, Freiburg	
Eubakterien-Primer II (<i>E.coli</i> -Position 1542 - 1562)		Pharmacia Biotech, Freiburg	
Primer 3 (<i>E.coli</i> -Position 341 - 358)		Pharmacia Biotech, Freiburg	+ 40 bp GC-Klammer
Primer 2 (<i>E.coli</i> -Position 515 - 534)		Pharmacia Biotech, Freiburg	
100-µl-Reaktionsgefäße		Biozym, Hess. Oldendorf	DNase- u. RNasefrei
Filterpipettenspitzen	Safeseal-Tips	Biozym, Hess. Oldendorf	Dnase-, Rnase-, Pyrogenfrei

Tab. 2.4: Geräte und Materialien für die Agarose-Gel-Elektrophorese zur Aufarbeitung von DNA-Extrakten und PCR-Produkten

Agarose-Gel-Elektrophorese			
Geräte:	Bezeichnung	Hersteller / Lieferant	Bemerkungen
Horizontalgelkammern		AGS, Heidelberg; Pharmacia, Freiburg	
Spannungsnetzgeräte	Power Pac 300 bzw. 1000	BioRad, München	
Transilluminator	UVT 2035	Herolab	UV-Licht-Wellenlänge 302 nm
Sofortbildkamera		Polaroid	
Computergestütztes Gel-Dokumentationssystem (Videokamera, Stativtisch, Digital Drucker)		zusammengestellt von BioRad, München	
Software	BioRad Molekular Analyst ®	BioRad, München	
Reagenzien u. Materialien:			
Agarose		Serva, Heidelberg	
DNA-Fragmentlängen-Marker	1 kb DNA <i>ladder</i> Marker	GIBCO BRL, Eggenstein	23 Eichfragmente; Längen von 75-12216 Basenpaaren
Sofortbildfilm	Filmtyp 607	Polaroid	
Lösungen:	Zusammensetzung:		
50 X TAE-Puffer	242.0 g Tris; 51.7 ml Eisessig; 100 ml 0.5 M EDTA, pH 8; ad 1 l H ₂ O		
5 X Probenauftragspuffer	50% (w/v) Saccharose; 4 M Harnstoff; 0.05 mM EDTA; 0.1% (w/v) Bromphenolblau		

Tab. 2.5: Geräte und Materialien für die DGGE-Analyse

DGGE			
Geräte:	Bezeichnung	Hersteller / Lieferant	Bemerkungen
DGGE-Gelapparatur	D-Gene™ System	BioRad, München	
Spannungsnetzgerät	Model 200	BioRad, München	
Gradientenmischer		Desaga, Heidelberg	
Horizontalschüttler	Promax 1020	Heidolph	
Reagenzien u. Materialien:			
Deionisierungsgranulat	AG ® 501-X8	BioRad, München	20 – 50 mesh; 50 gl ⁻¹ Formamid
Polyacrylamid	40 %iges Acrylamid/ Bisacrylamid (37.5 : 1)	BioRad, München	
Polymerisierungsstarter	TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylen-diamin)	BioRad, München	
Polymerisierungsstarter	APS (Ammoniumpersulfat)	BioRad, München	
Lösungen:	Zusammensetzung:		
Polyacrylamidlösung 0 % Harnstoff	18.8 ml Acrylamid/ Bisacrylamid; 2 ml 50 X TAE-Puffer; ad 1 l H ₂ O		
Polyacrylamidlösung 100 % Harnstoff + 40 % Formamid	18.8 ml Acrylamid/ Bisacrylamid; 2 ml 50 X TAE-Puffer; 40 ml Formamid; 42 g Harnstoff; ad 1 l H ₂ O		
10 X Ladepuffer	100 % (w/v) Saccharose; 100 mM EDTA; 0.4% (w/v) Bromphenolblau		

2.8.3 Sequenzierung der 16S rDNA der Versuchsorganismen

Tab. 2.6: Geräte und Materialien für die Sequenzierung der 16S rDNA der Versuchsorganismen

Geräte:	Bezeichnung	Hersteller
Automatischer Sequenzierer	Model 310	Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Thermocycler	Perkin Elmer GeneAmp 2400	Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Reagenzien u. Materialien:		
DNA-Reinigungskitts	QIAquick Spin Purification Kit Promega Wizard PCR preps	Qiagen, Hilden Promega, Madison, Wisconsin, USA
Klonierungskitt	TA cloning kit No. K200-01, plasmid PCR 2.1, <i>E. coli</i> strain INFalpha F	Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA
Sequenzierungsprimer		Bioserve, MD, USA
sequenzierungskitt	'big dye' Dye Terminator Ready Reaction Kit	Applied Biosystems (Perkin Elmer), Foster City, CA, USA

2.8.4 Chemostat-Modellökosystem

Tab. 2.7: Geräte und Materialien für Chemostataufbau, Beimpfung und Beprobung der Experimente zur Abhängigkeit von Zusammensetzung und Diversität der Versuchsorganismen von der P-Puls-Intervalllänge

Chemostataufbau			
Geräte u. Materialien:	Bezeichnung	Hersteller / Lieferant	Bemerkungen
Mehrkanalperistaltikpumpe	Ismatec MV Pumpsystem, Typ MV-MS CA 8 C	Ismatec SA Laborsystemtechnik, Glattbrugg-Zürich, Schweiz	Andruckstärke kann für jeden Kanal einzeln reguliert werden
Luftpumpe	Modell 1000, Typ 504.00.010.0	Wisa	
Kulturgefäße		Schmizo, Zofingen, Schweiz	
Tropffallen		Eydam, Kiel	ovale Form
Silikonschläuche (Medi-umszuleitung)		Harry Wegner Gummi-Kunststoff-Technik, Hamburg	Wandstärke 1 mm; Ø 1 mm
Luftfilter	Midisart 2000	Eydam, Kiel	0.2 µm Porengröße
Beimpfung u. Beprobung			
Geräte u. Materialien:			
Ganzglasspritzen	Fortuna Optima ®, 50 ml	Eydam, Kiel	mit Luer-Lock-Konus
Beprobungskanüle	Unimed ® 2R2	Eydam, Kiel	Luer-Lock-Ansatz; Ø 2 mm; Länge 15 cm
Injektionsspritzen, 1 ml (Inokulum, P-Pulse)	Omnican ® Tuberkulinspritzen	Eydam, Kiel	steril verpackt
Injektionskanülen	Pravatz 1	Eydam, Kiel	steril verpackt; Ø 0.9 mm; Länge 4 cm

2.8.5 Abundanzbestimmung der Versuchsorganismen

Tab. 2.8: Geräte und Materialien für die Bestimmung der Zelldichte der Versuchsorganismen mittels DAPI-Färbung und epifluoreszenzmikroskopischer Direktzählung

DAPI-Färbung			
Geräte:	Bezeichnung	Hersteller / Lieferant	Bemerkungen
Filtrationsanlage	SM 168 29	Sartorius, Göttingen	
Vakuumpumpe	N 022 AN.18	Eydam, Kiel	
Reagenzien u. Materialien:			
DAPI-Farbstoff	4,6-Diamidino-2-phenylindol	Sigma, München	
Einbettungsöl	Melting Point Bath Oil M-9389	Sigma, München	
Polycarbonat-Membranfilter Porenweite 0.2 µm	Filter type GTBP 02500	Millipore, Eschborn	Ø 25 mm; schwarz
Unterlegfilter	Cellulose Acetate Filter, Porengröße 1.2 µm	Sartorius, Göttingen	
Mikroskop-Direktzählung			
Geräte:			
Epifluoreszenzmikroskop	Axioskop	Zeiss, Jena	
DAPI-Detektionsfilter	Filtersatz 01	Zeiss, Jena	Anregung: 365 nm Emission: 397 nm
Cy3-Detektionsfilter	Filtersatz 00	Zeiss, Jena	Anregung: 530 - 585 nm Emission: 615 nm

Tab. 2.9: Geräte und Materialien für die stammspezifische Immunfluoreszenzmarkierung der Versuchsorganismen

Immunfluoreszenzmarkierung			
Geräte:	Bezeichnung	Hersteller / Lieferant	Bemerkungen
Filtration			s. o.: DAPI-Färbung
Reagenzien u. Materialien:			
primäre, stammspezifische Antikörper		Eurogentec, Seraing, Belgien	
sekundäre, Cy3-konjugierte Antikörper	Cy3-conjugated Affinipure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Dianova, Hamburg	
Rinderserumalbumin (BSA)	Albumin bovine Fraction V; standard grade	Serva, Heidelberg	pH 7.0; lyophilisiert
Filter und Einbettung			s. o.: DAPI-Färbung
1 X Spritzenfilter, 0.2 µm	Filtropur S 0.2	Sarstedt, Nümbrecht	
Spritzen	Plastipak®, 20 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NY, USA	
1.5-ml-Reaktionsgefäße		Biozym, Hess. Oldendorf	
Lösungen:	Zusammensetzung:		
Phosphat-gepufferte Saline (PBS) 10 X	80.0 g l ⁻¹ NaCl 14.4 g l ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ 2.4 g l ⁻¹ KH ₂ PO ₄ 2.0 g l ⁻¹ KCl		eingestellt auf pH 7.4

Tab. 2.10: Geräte und Materialien für die durchflusszytometrische Direktzählung der stammspezifisch immunfluoreszenzmarkierten Versuchsorganismen

Durchflusszytometrie			
Geräte:	Bezeichnung	Hersteller / Lieferant	Bemerkungen
Durchflusszytometer	FACStar Plus	Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA	
1. Argonlaser	Innova 90	Coherent Inc., Palo Alto, CA, USA	
2. Diodenlaser		"	
Datenaufnahme- u. Auswertungssoftware	CellQuest	Becton Dickinson Mountain View, CA, USA	
Ultraschallbad	Bandelin Omnilab 080		Frequenz: 35 kHz
Reagenzien u. Materialien:			
Fluoreszenzpartikel	0.5 µm red; 2 µm yellow-green	Molecular Probes, Leiden, NL	

3 Ergebnisse

Das folgende Kapitel ist in drei Abschnitte gegliedert: Zunächst werden die Ergebnisse der Charakterisierung der in Chemostatversuchen verwendeten Bakterienisolate präsentiert (3.1). Neben der taxonomischen Einordnung wurde eine Zuordnung der 14 Isolate in Gilden vorgenommen, die sich bezüglich des mittleren Wertes ihrer stammspezifischen minimalen Generationszeit (g_{\min}) unterscheiden.

In Abschnitt 3.2 werden einzelne Aspekte der beiden Methoden untersucht, die zur stamm-spezifischen Quantifizierung der Isolate in den Chemostatexperimenten verwendet wurden, und beide Methoden miteinander verglichen. Geprüft wurde, inwieweit durch unterschiedliche Probengröße bedingte bzw. systematische Abweichungen zwischen den Ergebnissen beider Methoden bestehen, sowohl in Bezug auf die detektierte Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaften als auch auf die daraus ermittelten Diversitätsparameter.

In Abschnitt 3.3 werden die Ergebnisse der Chemostatexperimente zur Untersuchung des Einflusses gepulster Zufuhr der limitierenden Ressource Phosphor auf die Zusammensetzung und Diversität der Chemostat-Modell-Lebensgemeinschaften vorgestellt.

Veränderungen in Abhängigkeit von der Intervalldauer zwischen den P-Pulsen werden sowohl in Hinblick auf die taxonomische Zusammensetzung der Lebensgemeinschaften als auch ihre funktionelle Struktur in Hinblick auf die Gilden beleuchtet (siehe 3.1.2).

Abschließend wird der Einfluss des Störungsregimes auf die mittels unterschiedlicher Parameter quantifizierte Diversität der Chemostat-Lebensgemeinschaften überprüft.

Unter der Annahme, dass Unterschiede zwischen den beiden Quantifizierungsmethoden Ausdruck von unterschiedlichen durch sie reflektierten Aspekten der Lebensgemeinschaften bezüglich der physiologischen Aktivität bzw. Lebensfähigkeit der Organismen ist, werden beide Datensätze parallel präsentiert (für eine ausführliche Diskussion dieser Annahme siehe 4.1).

3.1 Charakterisierung der Isolate

3.1.1 DGGE-Screening und taxonomische Einordnung

Mit Hilfe von DGGE als *Screening*-Methode sollten Bakterienisolate aus dem Schöhsee unterschiedlicher Koloniemorphologie auf genetische Unterschiedlichkeit überprüft werden. Von 35 getesteten Isolate wurden 14 zur späteren Verwendung in den Chemostatversuchen ausgewählt. Sie zeichneten sich durch gute Unterscheidbarkeit auf Agarplatten aus (Abb. 3.1) und wiesen distinkte Unterschiede in ihrer Bandenposition auf dem DGGE-Gel auf (Abb. 3.2).

Bei der phylogenetischen Analyse der Sequenzen der 16S rDNA konnte für keines der ausgewählten Isolate eine vollständige Übereinstimmung mit Sequenzen bekannter Organismen festgestellt werden. Die prozentuale Sequenzähnlichkeit mit den nächst verwandten bekannten Organismen war jedoch z. T. groß; sie variierte zwischen 95.0 % und 99.9 % (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Sequenzähnlichkeit der 14 als Versuchsorganismen verwendeten Isolate mit bekannten Referenzorganismen basierend auf der Analyse (*Gapped* BLAST-Algorithmus) der 16S rRNA; maximal möglicher *mSP-score* für das 16S rRNA-Molekül beträgt 3084 Bits bei einer Länge von 1542 Basenpaaren (Ludwig *et al.* 1998).

Isolat	Länge des sequenzierten Abschnittes [bp]	Nächst verwandter, bekannter Referenzorganismus	Ähnlichkeit	
			[%]	<i>mSP-score</i> [bit]
KB 06	1500	<i>Pseudomonas pavonaceae</i>	99.5	2882
KB 09	1474	<i>Flavobacterium columnare</i>	96.7	2508
KB 10	1494	<i>Comamonas acidovorans</i>	99.2	2859
KB 11	1480	<i>Pedobacter heparinus</i>	95.0	2206
KB 12	1439	<i>Sinorhizobium fredii</i>	98.7	2642
KB 16	1421	<i>Brevundimonas aurantiaca</i>	98.4	2591
KB 20	1488	<i>Acidovorax facilis</i>	98.3	2742
KB 23	1491	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	99.0	2807
KB 24	1478	<i>Pedobacter heparinus</i>	96.0	2296
KB 27	1491	<i>Janthinobacterium lividum</i>	99.0	2764
KB 30	1494	<i>Arthrobacter agilis</i>	99.9	2922
KB 31	1485	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	98.2	2660
KB 33	1416	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	99.5	2704
KB 34	1496	<i>Nocardioides plantarum</i>	99.3	2839

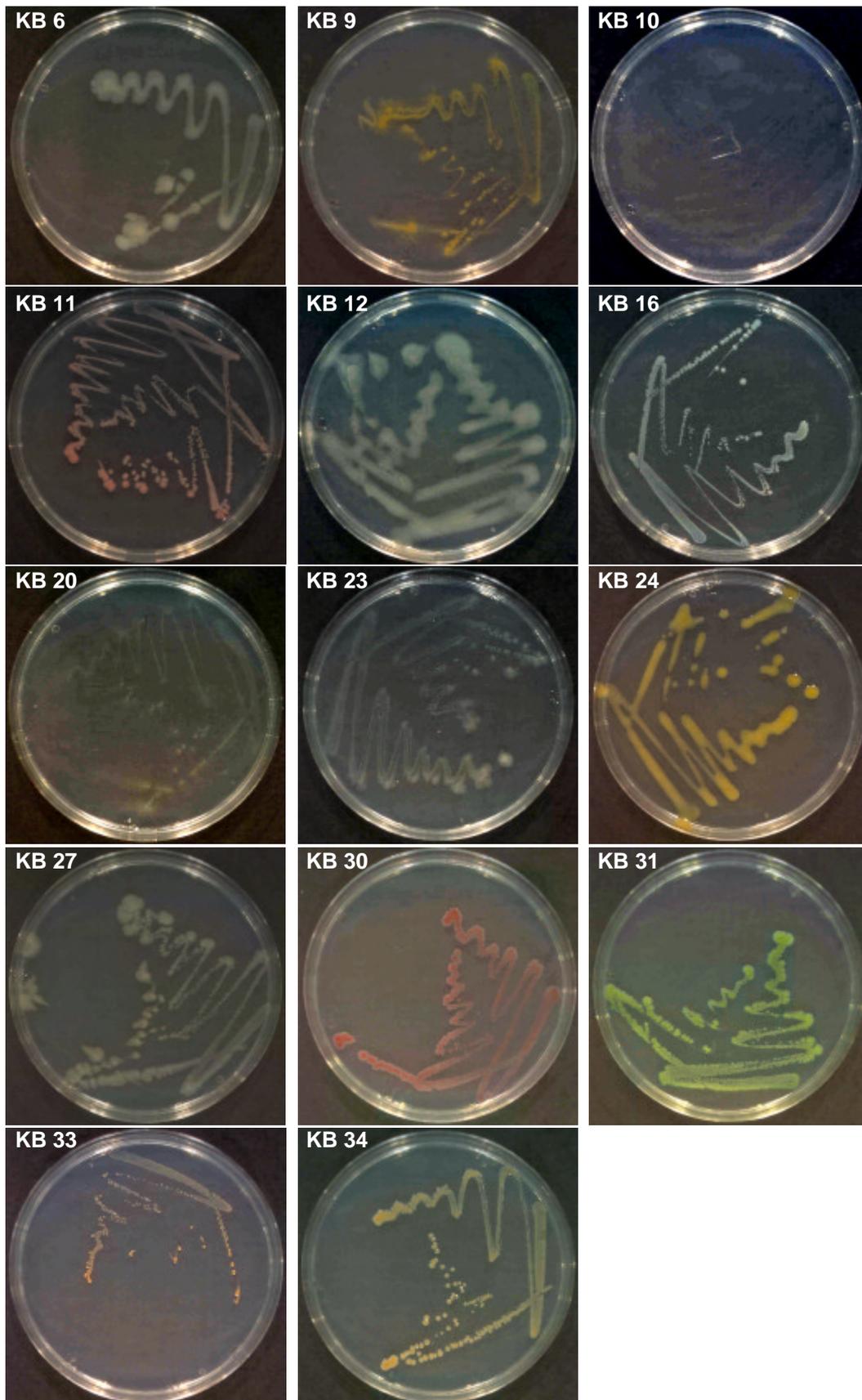


Abb. 3.1: Koloniemorphologie der 14 als Versuchsorganismen verwendeten Isolate; Reinkulturen auf WC-Medium-Agar (+ 1 g l⁻¹ Glucose u. 1 g l⁻¹ Hefeextrakt) nach 7 d Inkubation bei 20 °C.

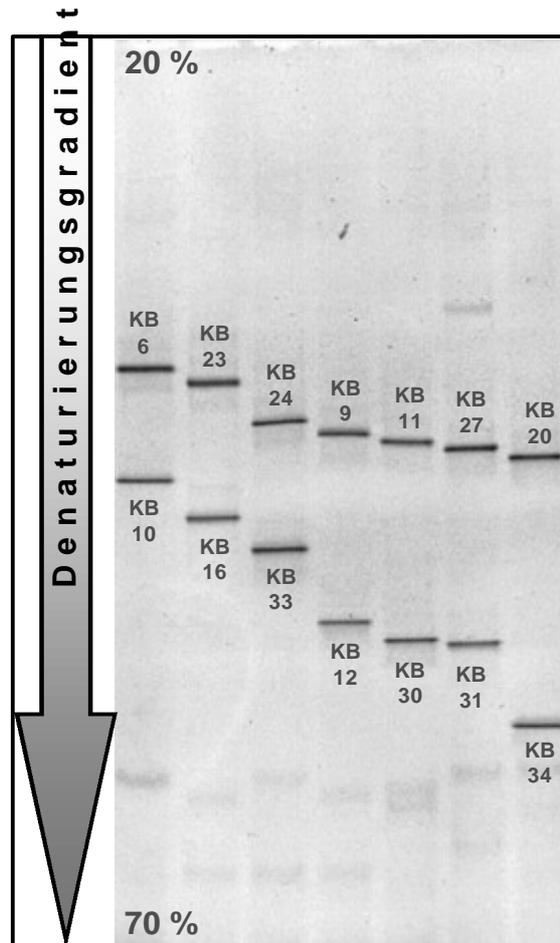


Abb. 3.2: DGGE-Gel der durch PCR gewonnenen Fragmente der V3-Region der 16S rDNA der 14 als Versuchorganismen verwendeten Isolate (Inversdarstellung des mit Ethidiumbromid gefärbten Gels); Harnstoff-Formamid-Denaturierungsgradient 20-70 %, Laufzeit 4.5 h, Temperatur 60 °C, Spannung 200 V.

In Abb. 3.3 ist der mittels *Neighbor Joining* erstellte Stammbaum dargestellt, der die 14 in den Chemostatversuchen eingesetzten Isolate in ihrem phylogenetischen Verhältnis zu bekannten Organismen zeigt. Die hohen *Bootstrap*-Werte vor allem an den inneren Knoten (im Allg. > 80) zeigen, dass die Stammbaumtopologie als stabil angesehen werden kann. Deutlich zu erkennen ist, dass die ausgewählten Isolate ein sehr breites taxonomisches Spektrum abdecken. Vertreten waren fünf taxonomische Großgruppen (Benennung und Zuordnung der taxonomischen Ränge nach BENSON *et al.* 2000 und WHEELER *et al.* 2000): Die **Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides-Gruppe (CFB-Gruppe)**, die Klassen der α -, β - und γ -Unterabteilungen aus dem Stamm der Proteobakterien und die Ordnung der Actinomyceten aus dem Stamm der *Actinobacteria* (die häufig auch als grampositive Bakterien mit hohem G+C-Gehalt klassifiziert werden; BENSON *et al.* 2000; WHEELER *et al.* 2000). Die Topologie des Stammbaumes innerhalb der Großgruppen zusammen mit den z. T. hohen Sequenzübereinstimmungen mit bekannten Organismen weist darauf hin, dass die 14 Isolate bis zu 11 verschiedene Gattungen repräsentieren.

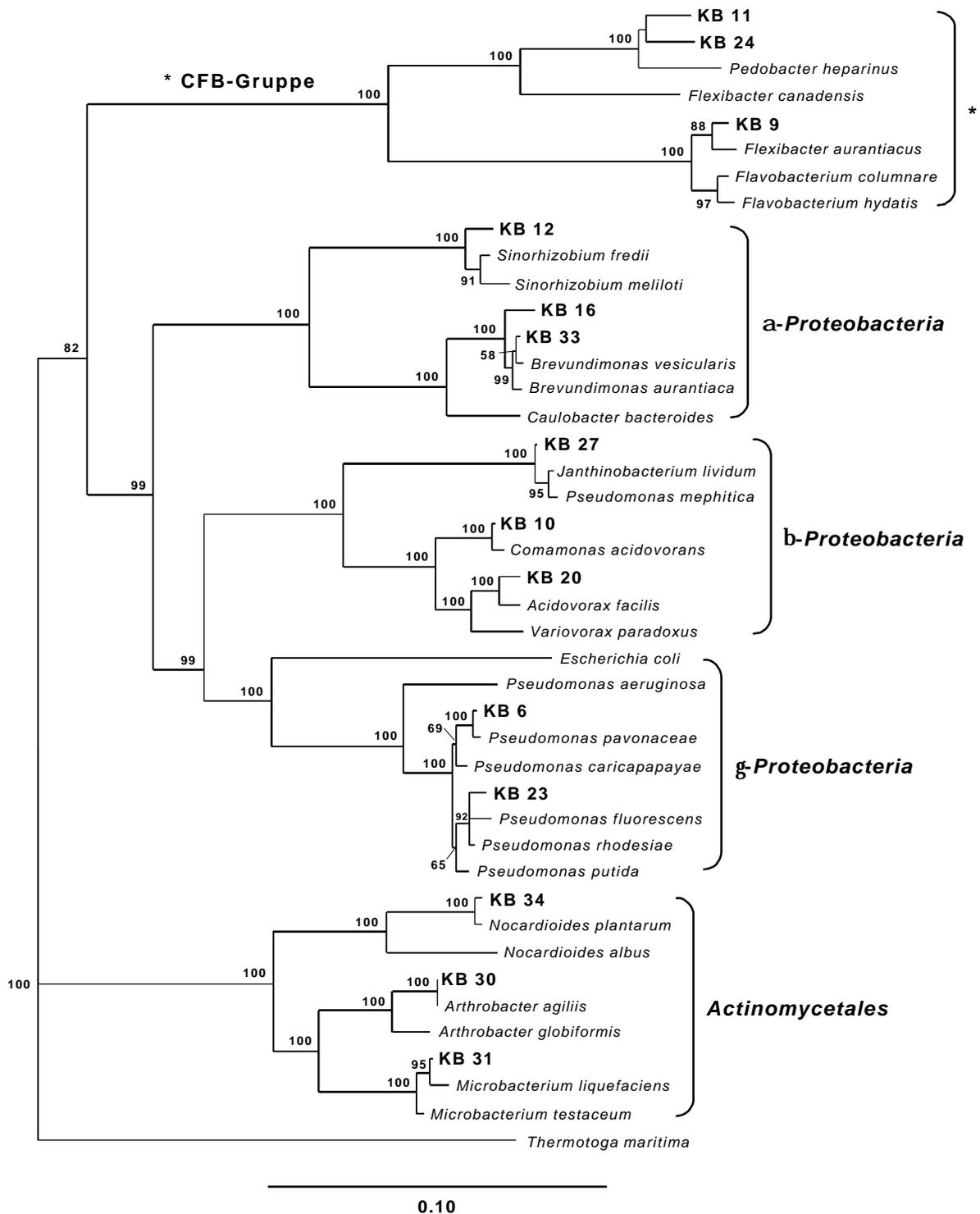


Abb. 3.3: Neighbor-Joining-Stammbaum der 14 als Versuchsorganismen verwendeten Isolate und der nächst verwandten bekannten Organismen basierend auf der Sequenzanalyse der 16S rDNA; Bootstrap-Werte > 50 (von 100 replizierten Analysen) sind an den Knoten angegeben; der Maßstab für die phylogenetische Distanz (unterhalb des Baumes) entspricht 10 Nukleotidsubstitutionen pro 100 Nukleotidpositionen. Die Benennung der Taxa erfolgte entsprechend der von der NCBI-Taxonomie-Datenbank (BENSON *et al.* 2000; WHEELER *et al.* 2000) vorgeschlagenen Nomenklatur.

Tab. 3.2 gibt einen Überblick über die aus der Literatur bekannten Habitate der für die Erstellung des Stammbaumes (Abb. 3.3) ausgewählten Referenzorganismen (Sequenzähnlichkeit $\geq 95\%$). Alle Referenzorganismen wurden entweder in aquatischen Habitaten nachgewiesen oder stammten aus terrestrischen Habitaten, bei denen ein Eintrag terrigener Bakterien in benachbarte aquatische Habitate denkbar ist. Während manche Isolate eine enge Verwandtschaft mit Organismen aufwiesen, die als ubiquitär für wässrige Umgebungen angesehen werden können (KB 10, KB 20, KB 23, KB 30), erwiesen sich die nächst verwandten Organismen einiger Isolate als typisch für gewässerähnliche Habitate (KB 09, KB 16, KB 27, KB 33).

Tab. 3.2: Auflistung der aus der Literatur bekannten Habitate der nächst verwandten Referenzorganismen der 14 in den Chemostatexperimenten eingesetzten Isolate; die Literaturzitate beziehen sich auf die im *Neighbor-Joining*-Stammbaum (Abb. 3.3) erfassten Organismen, z. T. auch unter Verwendung von synonymen Artnamen.

Isolat	Habitat der nächst verwandten Referenzorganismen	Literatur
KB 06	Sediment, Pflanzen	5, 10, 25
KB 09	Fischpathogen, oligotropher See, limnische u. marine Habitate	4, 5, 8, 26
KB 10	Trinkwasser, Klärschlamm, Mineralwasser	23, 24, 28, 29
KB 11	Klärschlamm, Boden, Mundflora	5, 14, 22, 27
KB 12	Boden, Wurzelknöllchen	2, 5, 11
KB 16	oligotrophe Gewässer, Mineralwasser, oligotrophe Biofilme, Fische	1, 9, 12, 13, 28, 30
KB 20	Süßwasser, Sediment, Mineralwasser, Klärschlamm, Boden	5, 12, 13, 15, 16, 17
KB 23	ubiquitär in aquatischen Habitaten, Trinkwasser, Mineralwasser, Fische, Klärschlamm, Boden, Nahrung	5, 6, 9, 12, 16, 19, 24, 28, 30
KB 24	Klärschlamm, Boden, Mundflora	5, 14, 22, 27
KB 27	Süßwasser, aquatische Biofilme, Mineralwasser, Fische, Boden	3, 5, 9, 18, 21
KB 30	oligotropher See, Klärschlamm, Fische, Boden, Pflanzen, Mineralwasser	4, 5, 9
KB 31	Boden, Nahrung	5
KB 33	Mineralwasser, Algenkultur, Fische	12, 13, 20, 28, 30
KB 34	Pflanzen	7

[1] (ABRAHAM *et al.* 1999); [2] (ANDRADE *et al.* 1997); [3] (AULICINO *et al.* 1996); [4] (BAHR *et al.* 1996); [5] (BALOWS *et al.* 1991); [6] (BINNERUP & THORDAL-CHRISTENSEN 1993); [7] (COLLINS *et al.* 1994); [8] (DECOSTERE *et al.* 1998); [9] (GONZALEZ *et al.* 1987); [10] (HU *et al.* 1998); [11] (JARVIS & TIGHE 1994); [12] (JAYASEKARA *et al.* 1998); [13] (JAYASEKARA *et al.* 1999); [14] (JONES *et al.* 1990); [15] (JOSHI & WALIA 1995); [16] (KAMPFER *et al.* 1996); [17] (LEMMER *et al.* 1998); [18] (LOGAN 1989); [19] (MOLIN & TERNSTROM 1986); [20] (MOUGET *et al.* 1995); [21] (MUDARRIS & AUSTIN 1988); [22] (NAKAMURA *et al.* 1988); [23] (PATEL *et al.* 1998); [24] (ROMANO *et al.* 1997); [25] (SAKAI *et al.* 1997); [26] (SHAMSUDIN & PLUMB 1996); [27] (STEYN *et al.* 1992); [28] (VACHEE *et al.* 1997); [29] (VANBRABANT *et al.* 1993); [30] (YOO *et al.* 1990).

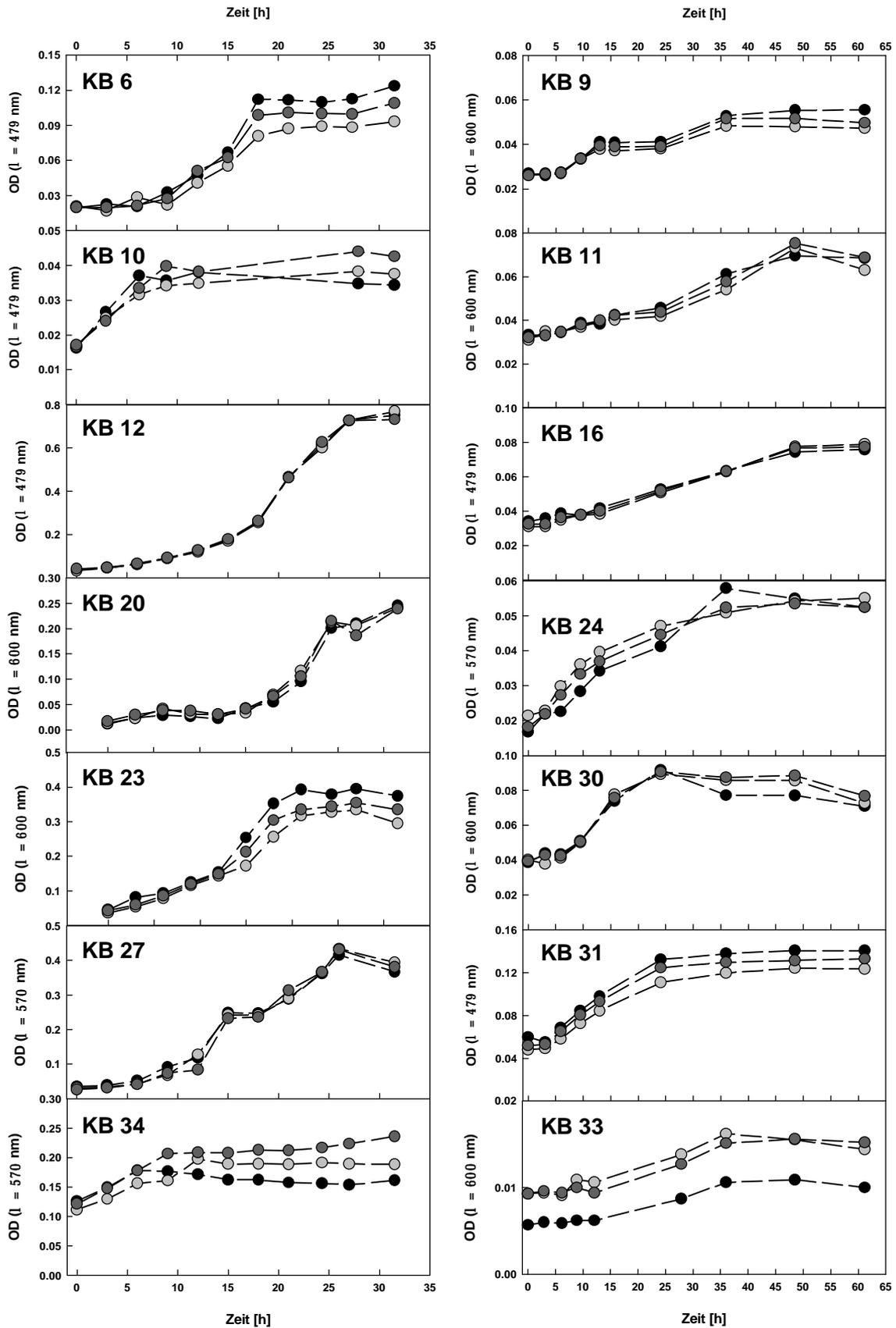


Abb. 3.4: Wachstumskinetiken der 14 als Versuchsorganismen verwendeten Isolate; je 3 Replikate statischer Kulturen in abgewandeltem WC-Medium (+ 620 mg l⁻¹ Glucose u. 20 µg l⁻¹ Hefeextrakt); Biomasse bzw. Zelldichte angegeben als optische Dichte (OD) der Kulturen.

3.1.2 Wachstumsversuche

An statischen Reinkulturen wurden Versuche zur Aufnahme der Wachstumskinetik durchgeführt, um die ausgewählten Isolate bezüglich ihres stammspezifischen Parameters g_{\min} zu charakterisieren.

Hinsichtlich der Dauer von *Lag*- bzw. *log*-Phase erwiesen sich die beobachteten Wachstumskinetiken der einzelnen Stämme als z. T. sehr unterschiedlich mit einer in einigen Fällen deutlichen Variabilität zwischen den Replikaten (Abb. 3.4). Der kritische Bereich (*log*-Phase) zur Bestimmung von μ_{\max} und des abgeleiteten Parameters g_{\min} war jedoch in jedem Fall gut durch die Beprobung erfasst; die Variabilität von g_{\min} zwischen den Replikaten erwies sich im allgemeinen als gering (Abb. 3.5).

Deutlich lassen sich distinkte Gruppen bezüglich des Parameters g_{\min} erkennen. Um mit Hilfe einer ANOVA und anschließender *Post-hoc*-Analyse (Tukey-Test) auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen testen zu können, wurde eine Wurzeltransformation der Werte von g_{\min} zur Erreichung annähernder Normalverteilung durchgeführt (Homogenität der Varianzen: $F_{\max} = 261.2$, $c^2 = 19.1$, $df = 13$, $p = 0.121$; Kolmogorov-Smirnov-Test: $D = 0.160 < D_{k(n=42; \alpha=0.05)} = 0.205$). Das Ergebnis der Varianzanalyse bestätigte, dass die untersuchten Stämme signifikante Unterschiede bezüglich g_{\min} aufweisen ($F_{(13,28)} = 129.2$; $p < 0.00001$).

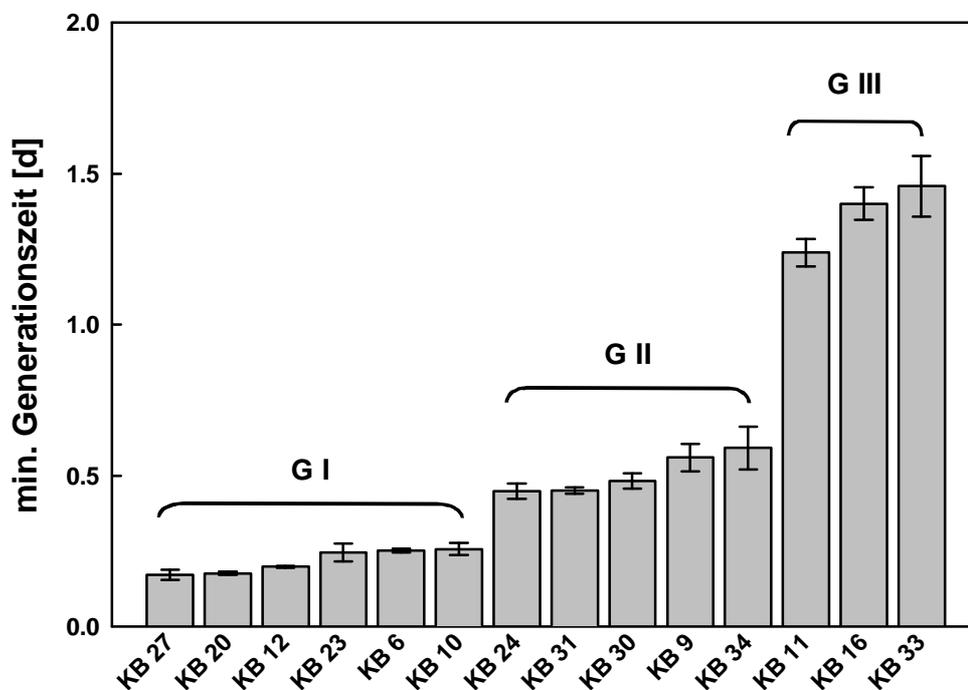


Abb. 3.5: Minimale Generationszeiten der 14, als Versuchsorganismen verwendeten Isolate; Balken repräsentieren den Mittelwert aus den 3 Replikaten der Wachstumsversuche, die Fehlerbalken den Standardfehler; Gilden mit signifikant unterschiedlichen minimalen Generationszeiten sind als G I, II und III gekennzeichnet (s. Text).

Der Tukey-Test identifizierte drei Gruppen von Stämmen, deren Werte für g_{\min} innerhalb der Gruppe keine signifikanten Unterschiede aufwiesen, sich aber hochsignifikant ($p < 0.005$) von denen der jeweiligen anderen beiden Gruppen unterschieden. Diese drei Gruppen können als drei verschiedene Gilden im Sinne von ROOTS Definition (ROOT 1967 in BEGON *et al.* 1990) in Bezug auf den physiologischen Parameter g_{\min} angesehen werden (Mittelwerte \pm s.e. für g_{\min} der Gilden: G I = 0.22 ± 0.01 d; G II = 0.51 ± 0.02 d, G III = 1.37 ± 0.05 d; Abb. 3.5).

3.2 Methoden zur Abundanzermittlung

3.2.1 CFU-Kultivierbarkeit auf Agarplatten

Um die relative Kultivierbarkeit der Versuchsorganismen auf Agarplatten und somit ihre Erfassung durch die CFU-Zählungen zu beurteilen, wurden die durch die DAPI-Zählung am Epifluoreszenzmikroskop ermittelten Abundanzen mit den CFU-Abundanzen verglichen.

Für alle Experimente zusammen betrug die CFU-Kultivierbarkeit im Mittel 51.8 % (± 26.7 % s.e.). Die mittleren Werte für die relative CFU-Kultivierbarkeit der drei Experimente waren unterschiedlich hoch (Abb. 3.6 A); eine Varianzanalyse der In-transformierten Werte konnte jedoch keine signifikanten Unterschiede feststellen ($F_{(2,135)} = 2.6$; $p = 0.08$).

Im Verlauf der Experimente war die relative Kultivierbarkeit uneinheitlich und zeigte keinen allgemeinen Trend (Abb. 3.6 B). Eine Varianzanalyse nach In-Transformation wies einen signifikanten Effekt des Probennahmetages auf die relative Kultivierbarkeit nach ($F_{(10,127)} = 3.9$; $p < 0.0001$); die anschließende *Post-hoc*-Analyse (Newman-Keuls-Test) identifizierte vor allem zu Beginn (Tag 7 u. 9) und gegen Ende (Tag 21) Probennahmetage, die sich durch ihre vergleichsweise hohe relative Kultivierbarkeit signifikant ($p < 0.05$) von Tagen mit vergleichsweise niedriger Kultivierbarkeit unterschieden.

Für die verschiedenen *Treatments* erwies sich die relative CFU-Kultivierbarkeit als weitgehend einheitlich (Abb. 3.6 C). Die Varianzanalyse (nach In-Transformation) detektierte zwar einen signifikanten Effekt ($F_{(6,131)} = 2.4$; $p < 0.03$); die *Post-hoc*-Analyse (Tukey-Test) stellte jedoch nur für zwei *Treatments* (0.5 d u. 4 d) einen signifikanten Unterschied ($p < 0.01$) fest.

Um zu untersuchen, inwieweit die relative Kultivierbarkeit von Faktoren wie der absoluten Abundanz der Organismen (DAPI-Zählung), der Anzahl der Kolonien auf den Agarplatten (*Crowding*-Effekt), der relativen Häufigkeit von *Ghosts* (siehe 3.2.2) bzw. von der relativen Abundanz der 14 Isolate beeinflusst wird, wurde eine rückwärts gerichtete schrittweise multiple Regressionsanalyse durchgeführt mit $F\text{-to-}remove = 4$ ($p < 0.05$). Keiner der genannten Faktoren hatte einen starken Einfluss auf die Kultivierbarkeit. Als einzige Variablen mit signifikantem Einfluss wurden DAPI-Abundanz ($p < 0.00001$) und Koloniedichte pro Platte

($p < 0.00001$) identifiziert ($\ln \% \text{ CFU} = 13.28 - 0.66 \ln \text{ DAPI} + 0.006 \ln \text{ Kol}$, $F_{(2,135)} = 117.2$; $p < 0.00001$; $r^2 = 0.63$). Eine zunehmende Organismendichte in den Proben war schwach negativ ($r = -0.42$), eine erhöhte Anzahl von Kolonien pro Platte schwach positiv ($r = 0.36$) mit der relativen CFU-Kultivierbarkeit korreliert, was zu erwarten ist, wenn kein *Crowding* – Effekt für die Platten vorliegt.

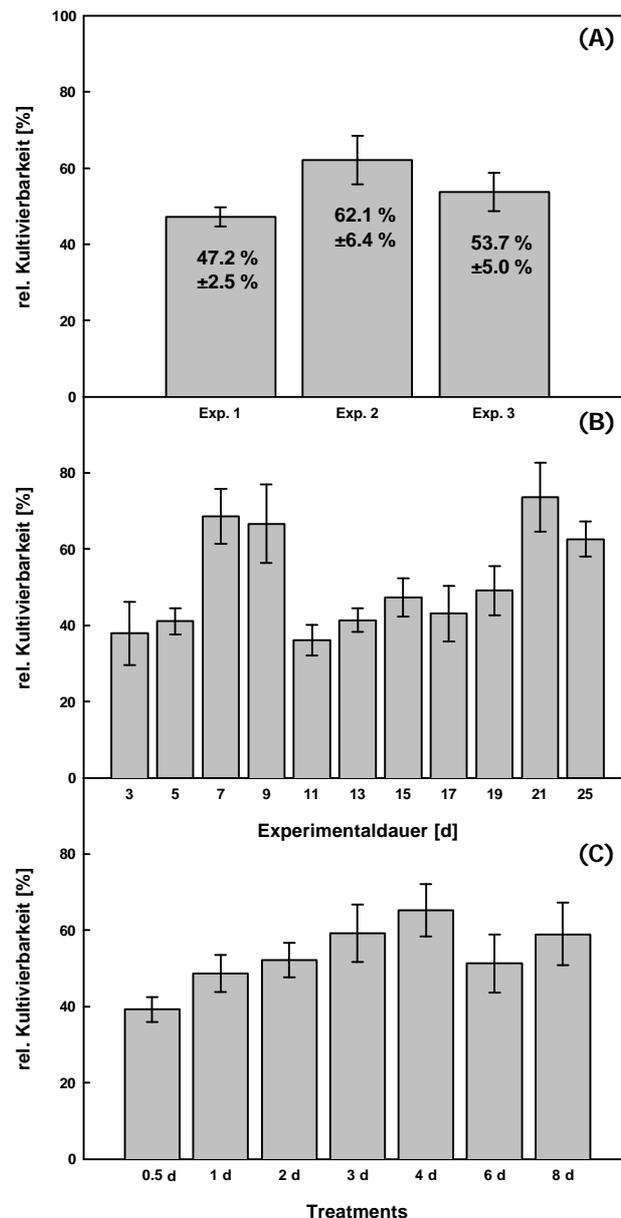


Abb. 3.6: Relative Kultivierbarkeit der Versuchsorganismen auf Agarplatten (CFU-Abundanz als relative Abundanz der durch DAPI-Zählung ermittelten Abundanz), (A) bezogen auf die drei getrennt durchgeführten Experimente, (B) im zeitlichen Verlauf der Experimente und (C) in Abhängigkeit von den *Treatments* unterschiedlicher Intervalllänge zwischen den P-Pulsen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aller Ergebnisse der jeweiligen Kategorie, die Fehlerbalken den Standardfehler.

3.2.2 DAPI- und Cy3-Detektierbarkeit im Durchflusszytometer

Bei der Durchflusszytometerzählung stammspezifisch markierter Zellen war zu beobachten, dass die Proben Partikel enthielten, die durch SSC und Cy3-Fluoreszenz als antikörpermarkierte Bakterienzellen charakterisiert waren, jedoch kein positives DAPI-Signal aufwiesen. Bei mikroskopischer Untersuchung waren diese Objekte jedoch eindeutig als Bakterienzellen mit sehr schwacher oder keiner DAPI-Fluoreszenz erkennbar („Ghosts“).

Die relative Anzahl der *Ghosts* an der Gesamtzellzahl variierte für die Untersuchungstage, für die durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt wurden (Tage 17, 19 und 25) zwischen 0.6 % und 8.1 % und betrug im Mittel $2 \% \pm 0.27 \%$ (s.e.). Abb. 3.7 A zeigt die mittlere relative Häufigkeit der *Ghosts* in Abhängigkeit von der Lagerungszeit der Proben bis zur Durchflusszytometermessung. Deutlich ist zu erkennen, dass mit zunehmender Lagerungsdauer die relative Anzahl der *Ghosts* zunimmt. Eine signifikante Zunahme zeigt sich jedoch erst zwischen 11 und 19 Monaten Lagerung (ANOVA der %-Anteile nach In-Transformation; $F_{(2,34)} = 17.02$; $p = 0.000008$; *Post-hoc*-Analyse mittels Tukey-Test, $p < 0.0002$).

Ein signifikanter Effekt des *Treatments* auf den %-Anteil der *Ghosts* in den Proben insgesamt war nicht zu erkennen (ANOVA der %-Anteile nach In-Transformation; $F_{(6, 30)} = 0.88$; $p = 0.52$), wenngleich das 2-d-Pulsintervall-*Treatment* mit $3.26 \% \pm 1.28 \%$ (s.e.) einen deutlich höheren *Ghost*-Anteil als die übrigen *Treatments* aufwies (Abb. 3.7 B).

Nicht alle Isolate waren in gleicher Weise von der Ausprägung von *Ghosts* betroffen. Abb. 3.7 C zeigt den mittleren relativen Anteil an *Ghosts* für die 14 Isolate. Auffällig ist der überdurchschnittlich hohe *Ghost*-Anteil des Isolates KB 20, der sich als einziger hochsignifikant von dem *Ghost*-Anteil aller übrigen Stämme unterschied (ANOVA der In-transformierten Werte; $F_{(13,502)} = 21.23$, $p < 0.001$; *Post-hoc*-Analyse mittels Newman-Keuls-Test, $p < 0.00004$). Im Mittel lag er bei 8.5 % und wies eine große Schwankungsbreite (1.5 – 30.6 %) auf. Einzig bei diesem Isolat waren auch für die verschiedenen *Treatments* deutliche Unterschiede zu erkennen: War die P-Pulsintervalllänge ≥ 4 d, war der relative Anteil der *Ghosts* signifikant höher ($F_{(1,35)} = 8.10$; $p < 0.008$) als bei *Treatments* mit Pulsintervallen < 4 d (Abb. 3.7 B).

Die zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführten Experimente wiesen signifikante Unterschiede in der relativen Häufigkeit der Isolate auf (Varianzanalyse der %-Anteile nach In-Transformation; Wilk's $I_{(28,40)} = 0.17$, Rao's $r = 2.1$; $p = 0.02$). Für die Isolate mit den höchsten *Ghost*-Anteilen (KB 20, KB 16, KB 23) konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede bezüglich ihrer relativen Abundanz in den verschiedenen Experimenten festgestellt werden (ANOVA der %-Anteile nach In-Transformation; $F_{(2,33)} > 2.0$; $p > 0.079$); nur 2 Isolate (KB 27, KB 31) waren betroffen (Varianzanalyse der %-Anteile nach In-Transformation; $F_{(2,33)} > 3.9$; $p < 0.03$), wobei die *Post-hoc*-Analyse (Tukey-Test, $p > 0.05$) keine signifikanten Unter-

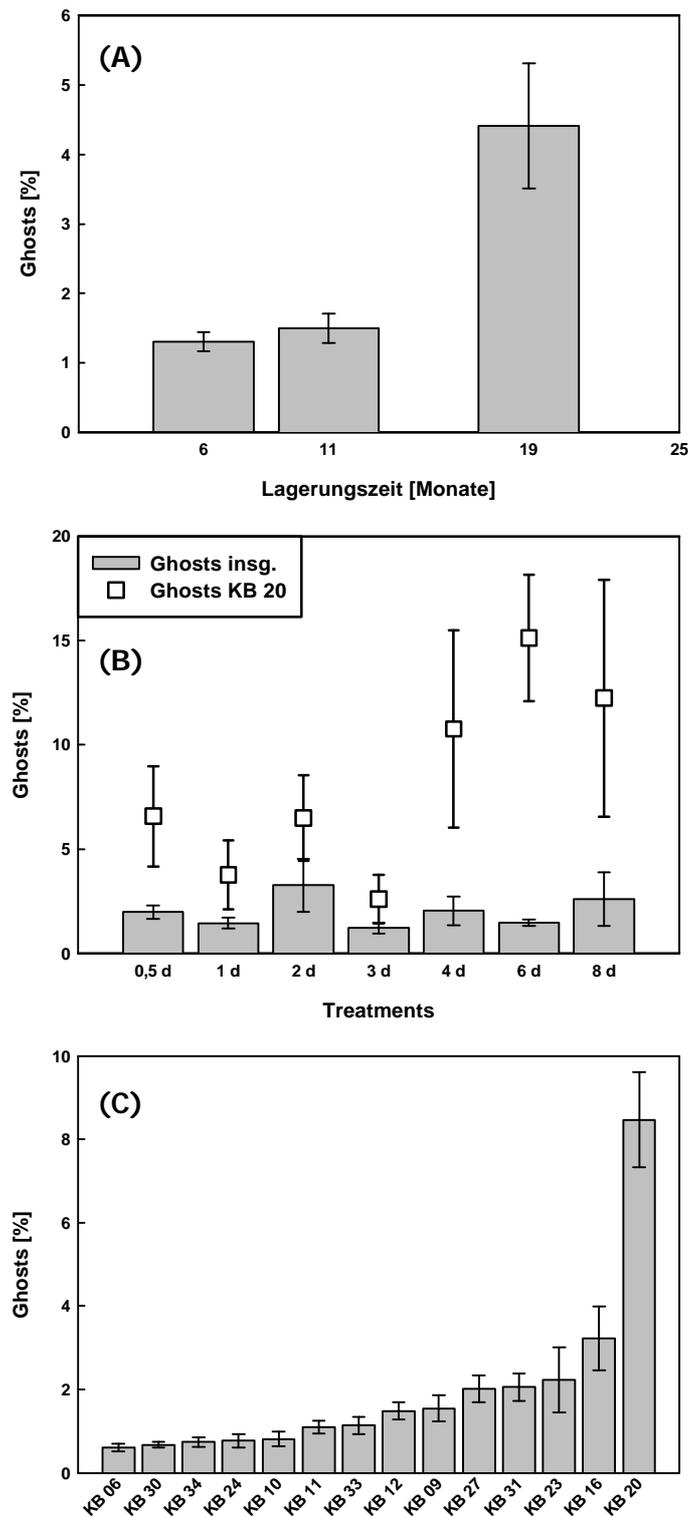


Abb. 3.7: Relative Abundanz von *Ghosts* (Zellen, die bei der durchflusszytometrischen Direktzählung positive SSC- und Cy3-Signale, jedoch keine DAPI-Fluoreszenz aufwiesen) in Abhängigkeit von (A) der Lagerungszeit der Proben bis zur durchflusszytometrischen Bearbeitung, (B) den verschiedenen *Treatments* der Intervalllänge zwischen den P-Pulsen und (C) den 14 als Versuchsorganismen verwendeten Isolaten. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aller Ergebnisse der jeweiligen Kategorie, die Fehlerbalken den Standardfehler.

schiede zwischen den jüngsten und den ältesten Proben feststellen konnte. Es ist daher davon auszugehen, dass die beobachteten stammspezifischen Unterschiede nicht auf unterschiedlich lange Probenlagerung bzw. die als Lagerungseffekt eingeschätzten Unterschiede nicht auf signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung der Proben zurückzuführen ist.

Auf Grund des als deutlich bewerteten Effektes der Lagerungsdauer auf die Detektierbarkeit der DAPI-Fluoreszenz wurden die *Ghosts* bei der späteren Berechnung der relativen Anteile der Isolate anhand der durchflusszytometrischen Direktzählung als Bestandteil der jeweiligen stammspezifischen Population gewertet (siehe auch 4.1).

Inwieweit die Detektierbarkeit der Zellen durch das Cy3-Signal mit derjenigen durch das DAPI-Signal übereinstimmt, wurde anhand von stammspezifisch immunfluoreszenzmarkierten Reinkulturen untersucht. Insgesamt erwies sich die Cy3-Detektion im Vergleich zur DAPI-Detektion als sehr hoch. Im Mittel betrug sie für alle Isolate 90.3 % (± 3.5 % s.e.); für die Mehrzahl der Stämme war sie sogar > 95 %. 3 der 14 Stämme (KB 33, KB 24 u. KB 16) zeichneten sich jedoch durch eine deutlich verringerte Cy3-Detektierbarkeit aus (Abb. 3.8); hier lag das beobachtete Defizit zwischen 30 % und 36 %.

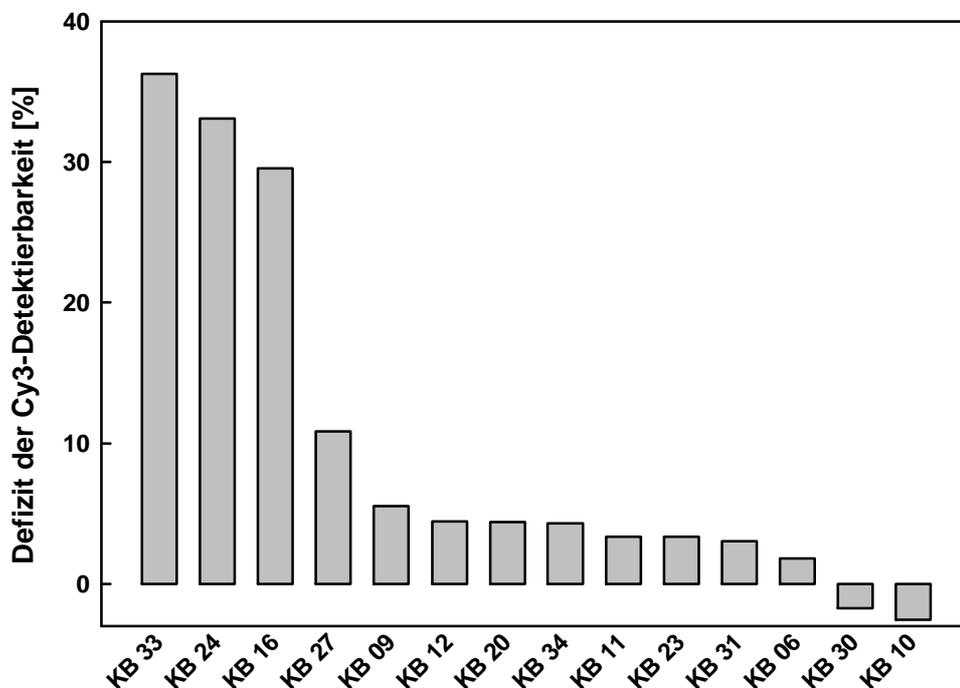


Abb. 3.8: Relatives Defizit der durchflusszytometrischen Cy3-Detektierbarkeit (im Vergleich zur DAPI-Detektion) von stammspezifisch immunfluoreszenzmarkierten Reinkulturen der 14 als Versuchsorganismen verwendeten Isolate.

3.2.3 Vergleich von CFU-Zählung und durchflusszytometrischer Direktzählung antikörpermarkierter Zellen

Ein Vergleich der aus den Ergebnissen der beiden verschiedenen Abundanzbestimmungsmethoden ermittelten Diversitätsparameter sollte prüfen, inwieweit die beiden unterschiedlichen Methoden der stammspezifischen Abundanzermittlung übereinstimmende Ergebnisse liefern.

Während alle Diversitätsparameter, die die *Evenness* der detektierten Arten berücksichtigen (effektive Artenzahl $1/D$, Simpsons Komplementärwert $1-D$, taxonomischer Diversitätsindex D) beider Methoden signifikant positiv miteinander korreliert waren, war für die Artenzahl S keine signifikante Korrelation festzustellen (Tab. 3.3). Der Korrelationszusammenhang zwischen den Ergebnissen von CFU-Zählung und Durchflusszytometerzählung war für keinen der Diversitätsparameter sehr stark und so erwiesen sich die Unterschiede zwischen den beiden Methoden für alle vier Parameter als hoch signifikant (Tab. 3.4).

Ein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Methoden zur Ermittlung der relativen Abundanzen der Isolate in den Proben war der unterschiedliche Probenumfang. Während bei der Durchflusszytometerzählung im Mittel 5511 (± 127 s.e.) Zellen pro Probe berücksichtigt wurden, erfasste die CFU-Zählung durchschnittlich 110 (± 11 s.e.) Kolonien pro Probe. Eine exemplarisch für einige Proben durchgeführte Rarefaktionsanalyse sollte Aufschluss darüber geben, inwieweit der Probenumfang die detektierte Artenzahl beeinflusst. Zugrunde gelegt wurden die Artenzahlen und Abundanzverteilungen, die für den letzten Untersuchungstag (Tag 25) der Chemostatexperimente mittels Durchflusszytometer ermittelt wurden.

Tab. 3.3: Korrelationszusammenhang der durch CFU- und Durchflusszytometerzählung antikörpermarkierter Zellen ermittelten Diversitätsparameter S , $1/D$, $1-D$ und D .

Diversitätsparameter	Korrelationskoeffizient r	Bestimmtheitsmaß r^2	F-Wert $(1,31)$	Signifikanzniveau p
Artenzahl S	0.14	0.02	0.69	0.41 n.s.
Effektive Artenzahl $1/D$	0.46	0.21	8.48	0.007 ***
Simpsons Kompliment $1-D$	0.53	0.29	12.40	0.002 ***
Taxonomische Diversität D	0.58	0.34	15.96	0.0004 ***

Tab. 3.4: Test auf Unterschiedlichkeit der durch CFU- und Durchflusszytometerzählung antikörpermarkierter Zellen ermittelten Diversitätsparameter S , $1/D$, $1-D$ und D .

Diversitätsparameter	Prüfgröße	Signifikanzniveau p
Artenzahl S	$H_{(1,n=66)} = 50.0$	< 0.00001 ***
Effektive Artenzahl $1/D$	$H_{(1,n=66)} = 31.9$	< 0.00001 ***
Simpsons Kompliment $1-D$	$F_{(1,64)} = 13.3$	< 0.0006 ***
Taxonomische Diversität D	$F_{(1,64)} = 19.2$	< 0.00005 ***

Standard-Probengrößen zur Schätzung der zu erwartenden Artenzahlen waren 100, 1000 und 2500 Individuen, sowie die jeweilige Koloniezahl, die für die entsprechende Probe durch die CFU-Zählung erfasst wurde.

Abb. 3.9 zeigt das Ergebnis der Rarefaktionsanalyse, zusammengefasst für alle 15 untersuchten Proben. Probengrößen, die, entsprechend der ermittelten Funktion, 100 % aller durch die Durchflusszytometerzählung detektierten Arten erfassen, müssten mindestens 15 % der Durchflusszytometerzählung umfassen, was Individuenzahlen von 750-850 entspräche. Die Probengröße der CFU-Zählung entsprach für den exemplarisch untersuchten Tag 25 im Mittel 2.9 % (± 0.5 % s.e.) der Probengröße der Durchflusszytometerzählung, die erwartete Arten-detektion der für die Probengrößen der CFU-Zählung im Mittel 87 % (± 2.9 % s.e.). Tatsächlich detektierte die CFU-Zählung jedoch nur durchschnittlich 42.4 % (± 3.2 % s.e.) der durchflusszytometrisch für den Tag 25 erfassten Arten, was darauf hinweist, dass Unterschiede in den Ergebnissen der beiden zur Abundanzermittlung der Isolate verwendeten Methoden nicht ausschließlich auf der unterschiedlichen Probengröße beruhen.

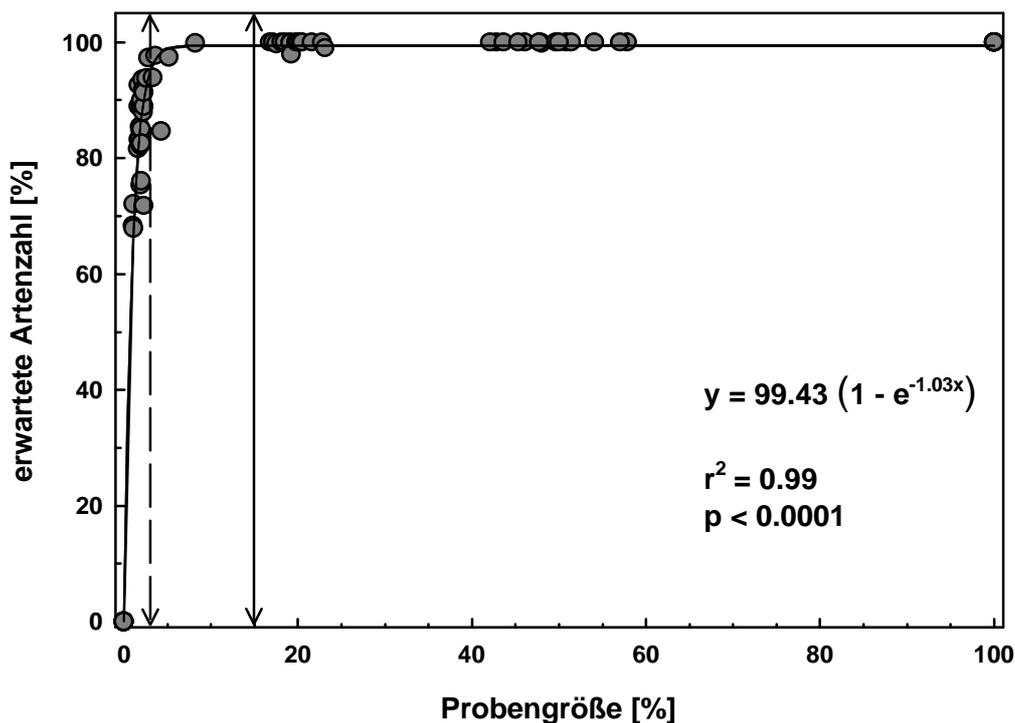


Abb. 3.9: Rarefaktionsanalyse basierend auf den durchflusszytometrisch ermittelten Artenzahlen und Artenabundanzverteilungen für den Tag 25 der Chemostatexperimente (mittlere Zellzahl pro Probe: 5511 ± 127 s.e.); Standardprobengrößen und erwartete Artenzahlen sind jeweils als %-Anteil der tatsächlichen Probengrößen und der beobachteten maximalen Artenzahl ausgedrückt. Der gestrichelte Pfeil repräsentiert die mittlere durch die CFU-Zählung realisierte Probengröße (3 % der durchflusszytometrisch bearbeiteten Probengrößen), der durchgehende Pfeil die Probenmindestgröße, die zur Erfassung aller mittels Durchflusszytometer detektierten Arten nötig wäre (15 %).

Bestätigt wird dies, nicht nur für die Anzahl der detektierten Arten, sondern auch für die übrigen Diversitätsparameter, auch durch das Ergebnis der durchgeführten Monte-Carlo-Simulation. Ebenfalls exemplarisch wurden anhand der durchflusszytometrisch ermittelten Artenzahl und Abundanzverteilung des Beprobungstages 25 je 5 Zufallsstichproben mit je 100 Individuen pro Probe gezogen und die hieraus ermittelten Diversitätsparameter mit den aus CFU- und Durchflusszytometerzählung gewonnenen Daten verglichen.

Außer für den Parameter S war für keinen der anderen Diversitätsparameter ein signifikanter Einfluss der Probengröße zu erkennen, da sich die simulierten Werte für einen kleineren Probenumfang nicht signifikant von den durchflusszytometrisch bestimmten unterschieden (Tab. 3.5, $p > 0.2$); die mittels CFU-Zählung bestimmten Parameter erwiesen sich jedoch in allen Fällen als signifikant verschieden sowohl von den durchflusszytometrisch (ANOVA: $F_{(2,42)} = 13.2$, $p < 0.0001$; *Post-hoc*-Analyse mittels Tukey-Test: $p < 0.01$) als auch den durch die Simulation gewonnenen Werten (Tab. 3.5, $p < 0.01$).

Die Werte der relativen Abundanzen, die jeweils durch CFU- bzw. Durchflusszytometerzählung bestimmt wurden, erwiesen sich im Vergleich insgesamt als signifikant unterschiedlich zwischen beiden Methoden (Kruskal-Wallis-Test; $H_{(1, n = 924)} = 126.6$, $p < 0.0001$). Bezogen auf die fünf in den Proben repräsentierten taxonomischen Großgruppen waren keine gruppenspezifisch unterschiedlichen Trends zu beobachten (Abb. 3.10 A). Für alle Gruppen lagen tendenziell immer die durchflusszytometrisch ermittelten Werte (bezogen auf den Median) höher und dieser Unterschied war, bis auf die Klasse der α -Proteobakterien, immer signifikant (Kruskal-Wallis- u. Median-Test, $p \leq 0.0001$); die Größenordnungen der ermittelten Werte stimmten jedoch recht gut überein. Für die einzelnen Isolate erwies sich dieser Effekt allerdings nicht als einheitlich (Abb. 3.10 B). Die Werte für die detektierte mittlere relative Häufigkeit der einzelnen Stämme konnte sowohl bei der CFU- als auch bei der Durchflusszytometerzählung höher sein; für 4 von den 14 Isolaten waren keine signifikanten Unterschiede zwischen CFU- und Durchflusszytometerzählung nachzuweisen (Median- bzw. Kruskal-Wallis-Test, $p > 0.09$).

Tab. 3.5: Test auf Unterschiedlichkeit der durch Simulation kleiner Probengrößen gewonnenen (vergl. Text) und durch CFU- bzw. Durchflusszytometerzählung antikörpermarkierter Zellen ermittelten Diversitätsparameter S , $1/D$, $1-D$ und D (Tag 25 der Chemostatexperimente).

Simulation	Messung	Test	Prüfgröße	Signifikanzniveau p
Artenzahl S	S (Antikörper)	Wilcoxon-Test	$z = 3.41$	0.0007 ***
"	S (CFU)	Kruskal-Wallis-Test	$H_{(1, n = 30)} = 21.18$	< 0.0001 ***
Effektiv Artenzahl $1/D$	$1/D$ (Antikörper)	Wilcoxon-Test	$z = 1.25$	0.21 n.s.
"	$1/D$ (CFU)	Kruskal-Wallis-Test	$H_{(1, n = 30)} = 6.72$	0.01 *
Simpsons Kompliment $1-D$	$1-D$ (Antikörper)	t -Test	$t_{(14)} = -0.54$	0.60 n.s.
"	$1-D$ (CFU)	ANOVA	$F_{(1,28)} = 8.81$	0.007 **
Tax. Diversität D	D (Antikörper)	t -Test	$t_{(14)} = -0.74$	0.47 n.s.
"	D (CFU)	ANOVA	$F_{(1,28)} = 19.20$	0.0002 ***

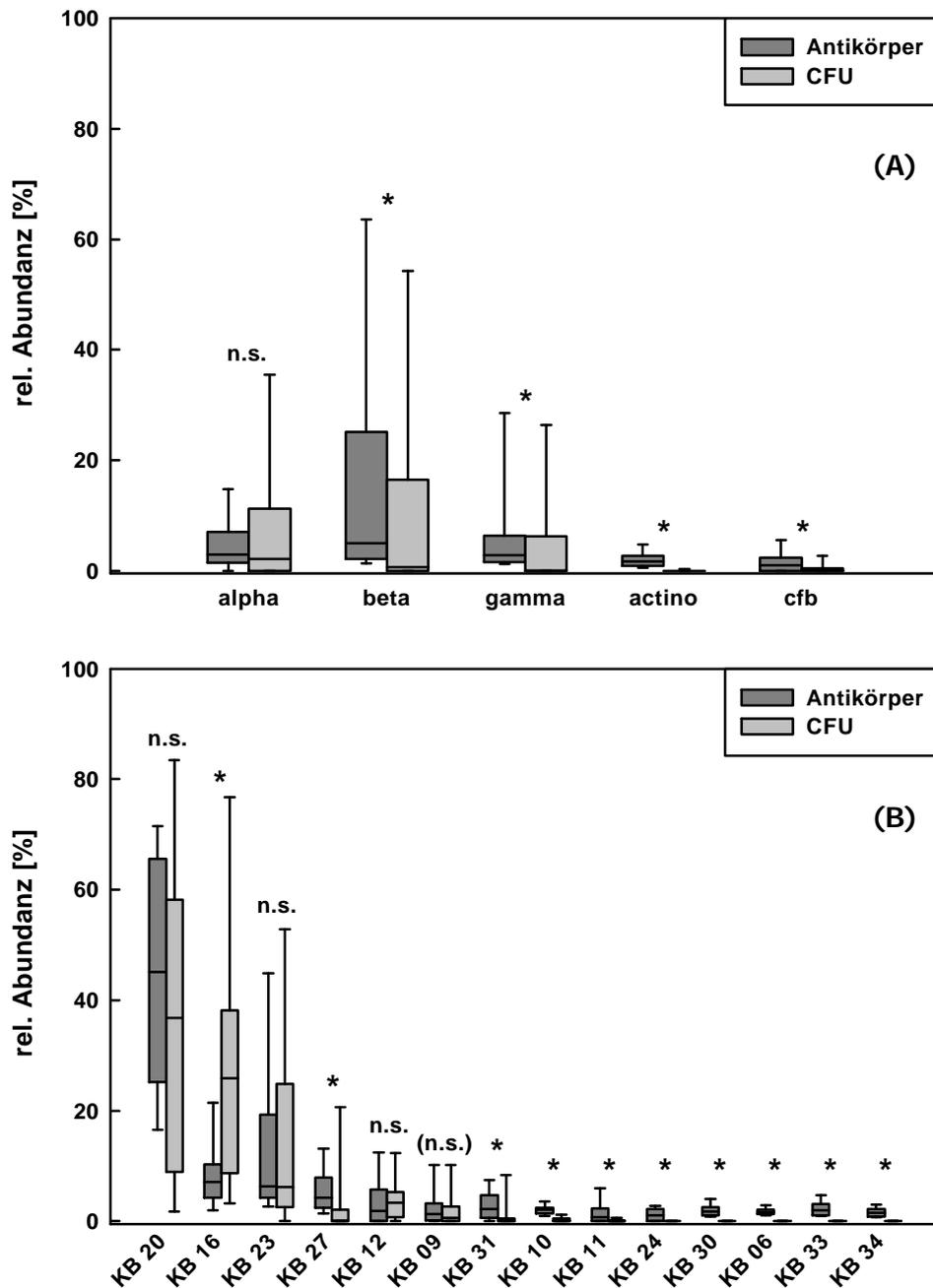


Abb. 3.10: Vergleich der mittels Durchflusszytometerzählung stammspezifisch antikörpermarkierter Zellen und CFU-Zählung bestimmten relativen Abundanzen (A) der fünf, in den Chemostatproben vertretenen taxonomischen Großgruppen, (B) der 14, als Versuchsorganismen verwendeten Isolate (*Box-and-Whisker-Plot*); n.s. bezeichnet diejenigen Stämme, deren Ergebnisse beider Zählmethoden sich nicht signifikant unterscheiden (Kruskal-Wallis-Test, Median-Test); für Isolat KB 09 war nur der Kruskal-Wallis-Test nicht signifikant. * kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0.05$).

Besonders auffällig ist der große Unterschied in der Detektion des Stammes KB 16, der insgesamt durch die CFU-Zählung als zweithäufigster Stamm nachgewiesen wurde, dessen Detektion durch die durchflusszytometrische Messung jedoch deutlich geringer war. Ebenfalls

deutlich, wenn auch nicht signifikant, ist der Unterschied für das Isolat KB 20, das mit beiden Methoden als häufigster Stamm nachgewiesen wurde. Hier liegt die Detektionsrate durch das Durchflusszytometer (Median) über derjenigen der CFU-Zählung. Bei den insgesamt selten detektierten Stämmen (KB 06, KB 10, KB 11, KB 24, KB 30, KB 33, KB 34) wurden bei den zum Vergleich herangezogenen Proben häufig gar keine Kolonien auf den Agarplatten beobachtet, während das Durchflusszytometer diese Stämme in geringen %-Anteilen nachweisen konnte.

Als Ergebnis des Vergleiches beider Quantifizierungsmethoden kann zusammenfassend festgestellt werden, dass die Ergebnisse bezüglich Zusammensetzung und Diversität der Proben deutliche Unterschiede zwischen beiden Methoden aufwiesen, die offensichtlich systematischer Natur und nicht ausschließlich durch unterschiedliche Probengrößen bedingt waren.

3.3 Einfluss von Störung auf Zusammensetzung und Diversität der Chemostat-Lebensgemeinschaften

3.3.1 Einfluss der gepulsten P-Zufuhr auf die Gesamtabundanzentwicklung

Abb. 3.11 zeigt den zeitlichen Verlauf der durch DAPI-Zählung ermittelten Bakterienabundanz für die verschiedenen *Treatments* der P-Zufuhr. Für *Treatments* mit kurzen und mittleren Pulsintervallen (0.5 – 3 d) waren im allgemeinen keine großen Abundanzschwankungen zu beobachten. Einige Replikate wiesen zu Beginn höhere Abundanz auf; in der zweiten Hälfte des Experimentes stabilisierten sich die Abundanz jedoch auf einem vergleichsweise einheitlichen Niveau. Abundanzschwankungen, die direkt auf die P-Pulse zurückzuführen waren, wurden nicht erfasst, da das Probennahmeraster für diese *Treatments* (außer bei einem Replikat des 3-d-*Treatments*) nicht eng genug war, um Zeitpunkte zwischen zwei P-Pulsgaben zu dokumentieren.

Deutlich ist der Zusammenhang von erhöhter Zelldichte und P-Pulsen mit größeren Pulsintervallen (4 d, 6 d, 8 d). Die Abundanzschwankungen reflektieren erkennbar das Muster der P-Pulse, was als Beleg für das P-limitierte Wachstum der Bakterien gewertet werden kann.

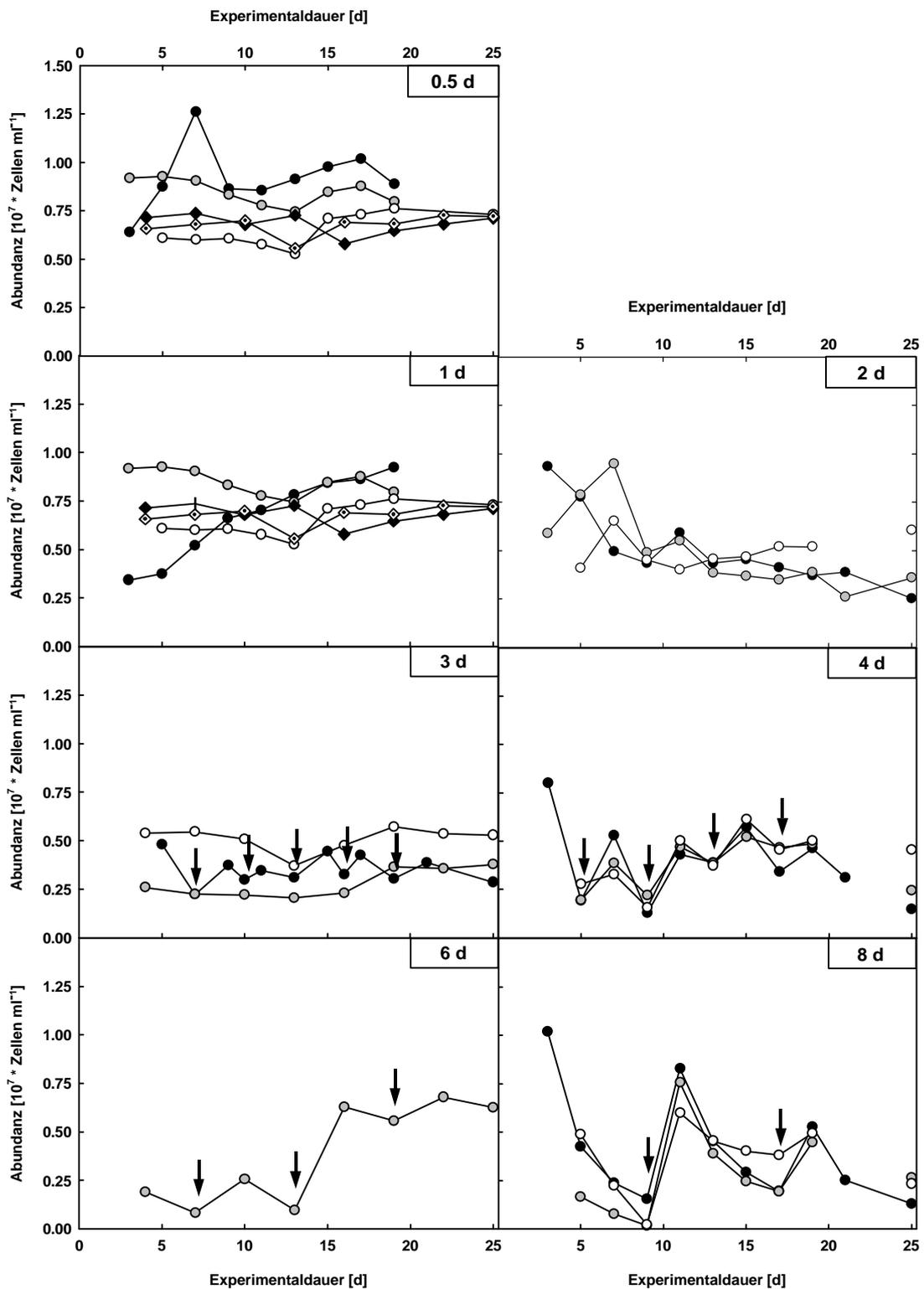


Abb. 3.11: Abundanzdynamik der Chemostat-Lebensgemeinschaften (basierend auf DAPI-Zählung) im zeitlichen Verlauf der Experimente für die verschiedenen *Treatments* der Intervalllänge zwischen den P-Pulsen; Pfeile bezeichnen die Zeitpunkte der P-Pulsgabe unmittelbar nach der zuvor erfolgten Probennahme an dem entsprechenden Versuchstag.

3.3.2 Einfluss der gepulsten P-Zufuhr auf die Zusammensetzung der Chemostat-Lebensgemeinschaften

3.3.2.1 Taxonomische Aspekte

Um zu untersuchen, inwieweit die unterschiedlichen *Treatments* der P-Zufuhr einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Lebensgemeinschaften haben, müssen vergleichbare Zeitpunkte in deren Entwicklung betrachtet werden. Daher können nur Probennahmetage verglichen werden, die am Ende eines Pulszyklus liegen und somit den Endpunkt der Sukzession zwischen zwei Pulsen darstellen.

Abb. 3.12 zeigt die relative, durch CFU-Zählung ermittelte Abundanz der Isolate im Verlauf des Experiments für die verschiedenen *Treatments* an einigen der Pulszyklusendpunkte. Insgesamt betrachtet waren es nur wenige Isolate, vor allem KB 20, KB 16 und KB 23, die hohe relative Abundanzen erreichten. Klar erkennbar ist die Veränderung der Artenzusammensetzung an den Endpunkten der Pulsintervalle mit Fortschreiten des Experimentes. Einige Isolate, z. B. KB 06, die zu Beginn in allen *Treatments* mit z. T. hohen relativen Anteilen nachgewiesen werden konnten, wurden vollständig verdrängt. Vor allem bei den *Treatments* mit mittleren und großen Pulsintervallen (2 d – 8 d) änderte sich die Dominanzstruktur deutlich. Besonders auffällig ist die Zunahme der relativen Häufigkeit des Isolates KB 16 bei zunehmender Länge des P-Pulsintervalls. Dieser Effekt ist für die längeren Pulsintervalle (4 d – 8 d) jedoch erst am letzten Tag des Experimentes (Tag 25) deutlich zu erkennen.

Für den Tag 25 wurde untersucht, ob sich taxonomische Trends in Abhängigkeit von der Pulsintervalllänge der *Treatments* nachweisen lassen. Um einen möglichen Effekt, den geringfügige Unterschiede in der Durchflussrate der Chemostaten hervorrufen könnten, zu korrigieren, wurde die Intervalllänge in theoretische Generationszeiten umgerechnet (vergl. 2.5.3).

Hochsignifikant positiv mit der zunehmenden Länge der Pulsintervalle war die Gruppe der α -Proteobakterien korreliert (Abb. 3.13 A, Tab. 3.6). Dieser Effekt war jedoch fast ausschließlich auf die Präsenz des Stammes KB 16 zurückzuführen, der einzige Stamm, dessen relative Häufigkeit eine signifikante Beziehung zur Pulsintervalllänge aufwies (Abb. 3.13 A) und der in den meisten Fällen den wesentlichen Anteil der α -Proteobakterien repräsentierte (Tab. 3.7).

Auch für die relative Abundanz der β -Proteobakterien konnte eine signifikante Beziehung zur Länge der P-Pulsintervalle nachgewiesen werden (Abb. 3.13 B, Tab. 3.6). Eine zunehmende Intervalllänge war negativ mit der relativen Abundanz der β -Proteobakterien korreliert, wobei diese Beziehung nicht linear ist. Im Unterschied zu den α -Proteobakterien war dies jedoch nicht auf einen einzigen, sondern auf zwei Stämme (KB 20, KB 27) als wesentliche Bestandteile dieser Gruppe zurückzuführen (Tab. 3.7).

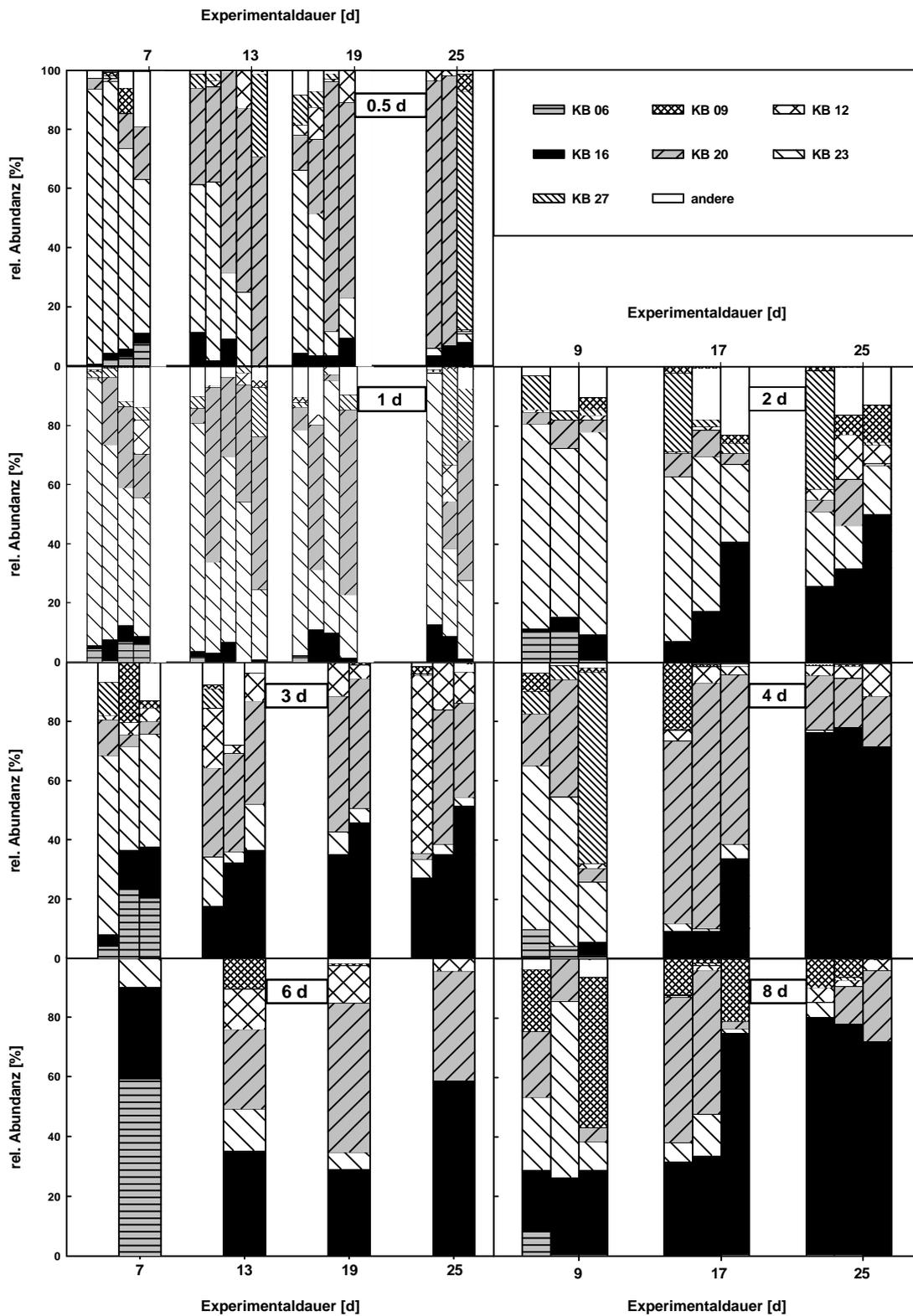


Abb. 3.12: Relative Abundanzen der Isolate für die verschiedenen *Treatments* der Intervalllänge zwischen den P-Pulsen im Verlauf der Experimente (basierend auf CFU-Zählung); die gruppierten Balken repräsentieren jeweils die Replikate der *Treatments* an einigen der Pulszyklusendpunkte; Balken an gleicher relativer Position innerhalb der Gruppierung repräsentieren jeweils das selbe Replikate eines *Treatments* zu den verschiedenen Zeitpunkten.

Die übrigen taxonomischen Großgruppen wiesen in ihrer relativen Häufigkeit keine signifikanten Beziehungen zu der Länge der Pulsintervalle auf; die γ -Proteobakterien zeigten jedoch, mit Ausnahme des kürzesten Intervalls (0.5 d), tendenziell eine Abnahme der relativen Abundanzen mit zunehmender Pulsintervalllänge (Abb. 3.13 C). Repräsentiert wurden sie ausschließlich von einem Isolat (KB 23, Tab. 3.7).

Tab. 3.6: Korrelationszusammenhang von relativen Abundanzen der taxonomischen Großgruppen (CFU-Zählung, Tag 25 der Chemostatexperimente) und der Länge des P-Puls-Intervalls der verschiedenen *Treatments*.

Taxonomische Großgruppe	Term	Regressionskoeffizient	t - Wert	Bestimmtheitsmaß r^2	Signifikanzniveau p
a-Proteobakterien	Intercept	24.29	$t_{(17)} = 5.63$	0.82	= 0.00003 ***
	ln x	30.50	$t_{(17)} = 8.71$		< 0.00001 ***
	gesamt				< 0.00001 ***
b-Proteobakterien	Intercept	48.26	$t_{(16)} = 7.73$	0.65	< 0.00001 ***
	ln x	-43.02	$t_{(16)} = -4.69$		= 0.00025 ***
	(ln x) ²	14.37	$t_{(16)} = 2.53$		= 0.022 *
	gesamt				< 0.0002 ***
g-Proteobakterien	Intercept	17.88	$t_{(17)} = 2.93$	-	= 0.009 ***
	ln x	-7.54	$t_{(17)} = -1.52$		= 0.15 n.s.
	gesamt				-
Actinomyceten	Intercept	1.86	$t_{(17)} = 1.26$	-	= 0.22 n.s.
	ln x	-0.15	$t_{(17)} = -0.13$		= 0.90 n.s.
	gesamt				-
CFB-Gruppe	Intercept	2.36	$t_{(17)} = 2.00$	-	= 0.06 n.s.
	ln x	0.39	$t_{(17)} = 0.41$		= 0.69 n.s.
	gesamt				-

Tab. 3.7: Bedeutung der relativen Abundanz der Isolate für die relative Abundanz der Großgruppen (CFU-Zählung, Tag 25 der Chemostatexperimente) entsprechend ihres partiellen Korrelationskoeffizienten. Gekennzeichnet sind jeweils diejenigen Isolate (fettgedruckt, unterstrichen), deren relative Häufigkeit insgesamt $\geq 80\%$ der Varianz der relativen Abundanz der jeweiligen taxonomischen Gruppe erklärt. Das angegebene r^2 bezieht sich auf den gemeinsamen Korrelationszusammenhang der relativen Häufigkeit dieser Isolate und derjenigen der jeweiligen taxonomischen Gruppe.

Taxonomische Großgruppe	Isolat	part. Korrelationskoeffizient	t - Wert	Bestimmtheitsmaß r^2	Signifikanzniveau p
a-Proteobakterien	KB 12	0.42	$t_{(16)} = 38.2 * 10^7$	0.82	< 0.01 **
	KB 16	0.91	$t_{(17)} = 8.79$		< 0.00001 ***
					< 0.00001 ***
b-Proteobakterien	KB 10	0.03	$t_{(15)} = 12.6 * 10^7$	0.999	< 0.01 **
	KB 20	0.88	$t_{(16)} = 102.57$		< 0.00001 ***
	KB 27	0.68	$t_{(16)} = 78.68$		< 0.00001 ***
g-Proteobakterien	KB 23	-	-	1.0	-
Actinomyceten	KB 30	0.16	-	0.97	-
	KB 31	0.99	$t_{(17)} = 25.75$		< 0.00001 ***
CFB-Gruppe	KB 09	0.99	$t_{(17)} = 24.47$	0.97	< 0.00001 ***
	KB 11	0.17	-		< 0.00001 ***

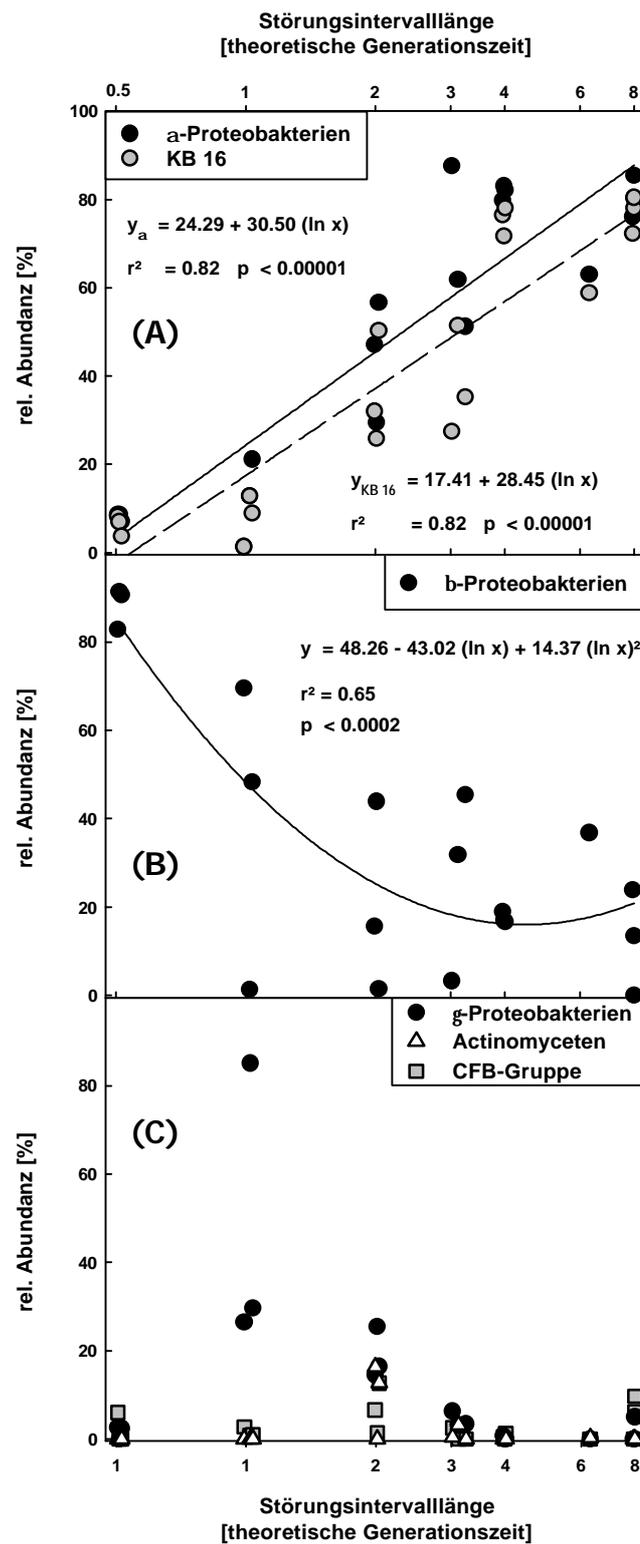


Abb. 3.13: Relative Abundanzen taxonomischer Großgruppen in Abhängigkeit von der Intervalllänge zwischen den P-Pulsen am Tag 25 der Chemostatexperimente (basierend auf CFU-Zählung). Die Parameter der als signifikant ermittelten Beziehungen finden sich in Tab. 15. (A) α -Proteobakterien und Isolat KB 16, (B) β -Proteobakterien, (C) γ -Proteobakterien, Actinomyceten und CFB-Gruppe.

In Abb. 3.14 sind die relativen Abundanzen der Isolate für die drei mittels stammspezifischer Antikörperfärbung und Durchflusszytometerzählung untersuchten Probennahmetage im letzten Drittel des Experimentes (Tage 17, 19 und 25) in Abhängigkeit von der Länge des P-Pulsintervalls dargestellt. Im Unterschied zur CFU-Zählung ist keine deutliche Zunahme der relativen Häufigkeit des Isolates KB 16 mit zunehmender P-Pulsintervalllänge zu beobachten. Dominant ist in den meisten *Treatments* der Stamm KB 20; am Tag 25 ist jedoch zu erkennen, dass vor allem für *Treatments* mit mittellangen P-Pulsintervallen (2 d – 4 d) ein Rückgang dieses Stammes zu verzeichnen war.

Anders als bei den Ergebnissen der CFU-Zählung ließ sich anhand der durchflusszytometrisch ermittelten Ergebnisse für den Tag 25 keine signifikante Beziehung der relativen Abundanzen der α -Proteobakterien zu der Länge der Pulsintervalle nachweisen (Abb. 3.15 A). Auch waren die α -Proteobakterien hauptsächlich durch das Isolat KB 12 und nicht, wie bei der CFU-Zählung, durch KB 16 repräsentiert (Tab. 3.9).

Die relative Häufigkeit der β -Proteobakterien wies eine nichtlineare, signifikante Korrelation zur Pulsintervalllänge mit hohen relativen Abundanzen für kurze (0.5 d, 1 d) und lange (4 d – 8 d) Intervalle und vergleichsweise niedrigen relativen Abundanzen für mittellange Intervalle (2 d, 3 d) auf). Bedingt war dies fast ausschließlich durch die Präsenz des Stammes KB 20, für dessen relative Häufigkeit ebenfalls eine signifikante, unimodale Beziehung zur Länge der Pulsintervalle nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.15 B), und der Hauptbestandteil der β -Proteobakterien war (Tab. 3.9).

Ebenso, wie bei der CFU-Zählung ließen sich für die relativen Abundanzen von γ -Proteobakterien, Actinomyceten und die CFB-Gruppe keine signifikanten Beziehungen zur Länge der Pulsintervalle beobachten (Abb. 3.15 C).

Als einziger Stamm neben KB 20 wies KB 24 eine signifikante Beziehung zur Länge der Pulsintervalle auf ($y_{KB24} = 1.05 - 1.39 (\ln x) + 0.77 (\ln x)^2$; $p < 0.014$), war jedoch in allen Proben nur in sehr geringen relativen Anteilen vertreten ($< 3\%$).

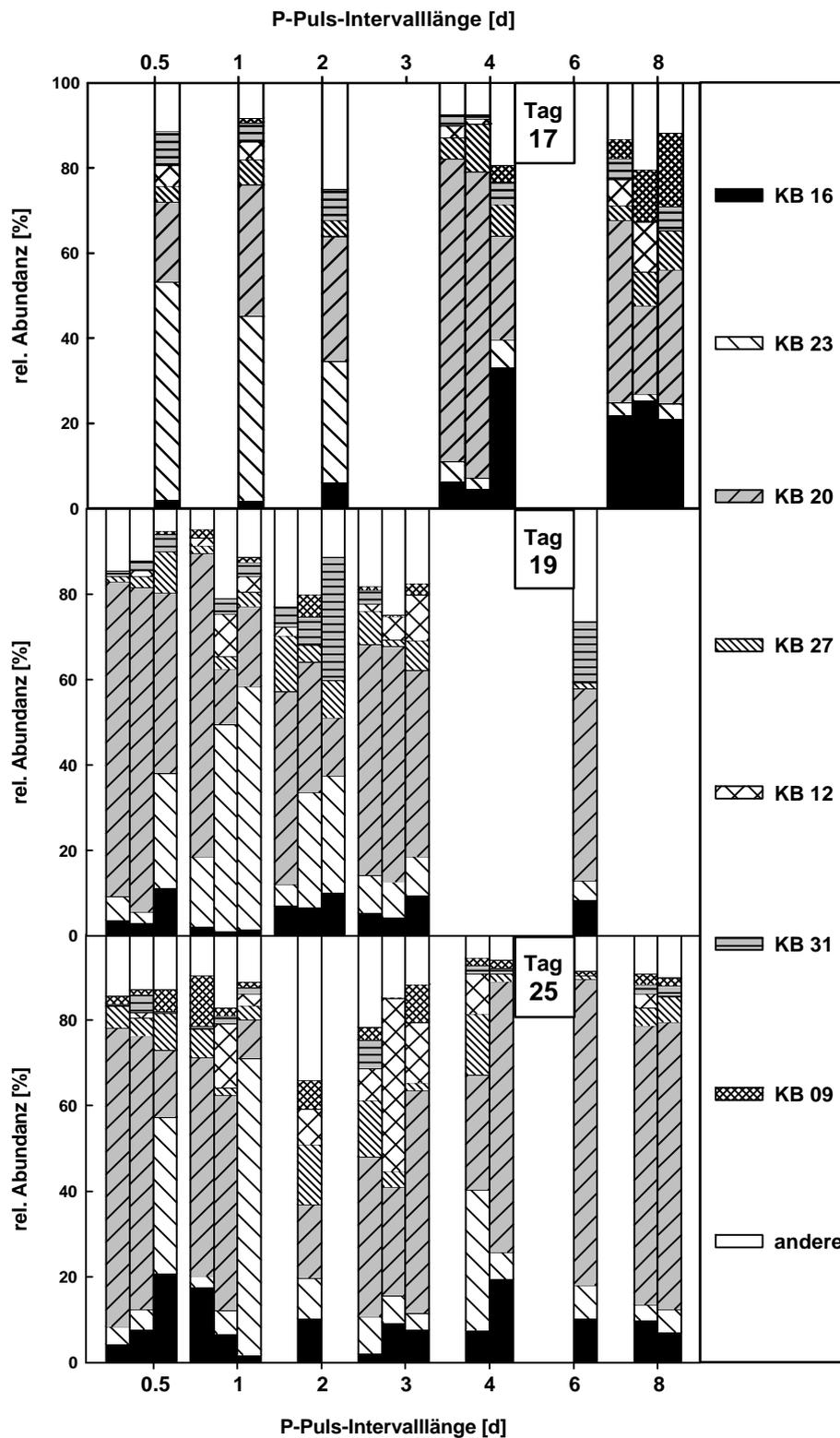


Abb. 3.14: Relative Abundanzen der Isolate in Abhängigkeit von der Intervalllänge zwischen den P-Pulsen an den Tagen 17, 19 und 25 der Chemostatexperimente (basierend auf Durchflusszytometerzählung antikörpermarkierter Zellen); die gruppierten Balken repräsentieren jeweils die Replikate der *Treatments* an den Pulszyklusendpunkten dieser Versuchstage; Balken an gleicher relativer Position innerhalb der Gruppierung repräsentieren jeweils das selbe Replikat eines *Treatments* zu den verschiedenen Zeitpunkten.

Tab. 3.8: Korrelationszusammenhang von relativen Abundanzen der taxonomischen Großgruppen (Durchflusszytometerzählung antikörpermarkierter Zellen, Tag 25 der Chemostatexperimente) und der Länge des P-Pulsintervalls der verschiedenen *Treatments*.

Taxonomische Großgruppe	Term	Regressionskoeffizient	t-Wert	Bestimmtheitsmaß r^2	Signifikanzniveau p
a-Proteobakterien	Intercept	17.69	$t_{(13)} = 4.80$	-	= 0.0003 ***
	ln x	0.84	$t_{(13)} = 0.27$		= 0.79 n.s.
	gesamt				-
b-Proteobakterien	Intercept	43.50	$t_{(12)} = 8.01$	0.54	< 0.00001 ***
	ln x	-23.38	$t_{(12)} = -3.02$		= 0.011 *
	(ln x) ²	19.14	$t_{(12)} = 3.72$		= 0.003 **
	gesamt				= 0.01 *
g-Proteobakterien	Intercept	15.84	$t_{(13)} = 2.52$	-	= 0.03 *
	ln x	-0.49	$t_{(13)} = -0.09$		= 0.93 n.s.
	gesamt				-
Actinomyceten	Intercept	5.19	$t_{(13)} = 6.90$	-	= 0.0001 ***
	ln x	-0.10	$t_{(13)} = -0.15$		= 0.88 n.s.
	gesamt				-
CFB-Gruppe	Intercept	8.14	$t_{(13)} = 3.87$	-	= 0.002 **
	ln x	-1.52	$t_{(13)} = -0.86$		= 0.40 n.s.
	gesamt				-

Tab. 3.9: Bedeutung der relativen Abundanz der Isolate für die relative Abundanz der Großgruppen (Durchflusszytometerzählung antikörpermarkierter Zellen, Tag 25 der Chemostatexperimente) entsprechend ihres partiellen Korrelationskoeffizienten. Gekennzeichnet sind jeweils diejenigen Isolate (fettgedruckt, unterstrichen), deren relative Häufigkeit insgesamt $\geq 80\%$ der Varianz der relativen Abundanz der jeweiligen taxonomischen Gruppe erklärt. Das angegebene r^2 bezieht sich auf den gemeinsamen Korrelationszusammenhang der relativen Häufigkeit dieser Isolate und derjenigen der jeweiligen taxonomischen Gruppe.

Taxonomische Großgruppe	Isolat	part. Korrelationskoeffizient	t-Wert	Bestimmtheitsmaß r^2	Signifikanzniveau p
a-Proteobakterien	<u>KB 12</u>	0.95	$t_{(12)} = 32.89$	0.98	< 0.01 **
	<u>KB 16</u>	0.47	$t_{(12)} = 16.41$		< 0.00001 ***
	KB 33	0.10	$t_{(11)} = 15.8 * 10^6$		< 0.00001 ***
b-Proteobakterien	KB 10	0.05	$t_{(13)} = 0.81$	0.96	= 0.43 n.s.
	<u>KB 20</u>	0.97	$t_{(12)} = 17.55$		< 0.00001 ***
	KB 27	0.19	$t_{(13)} = 10.82$		< 0.00001 ***
					< 0.00001 ***
g-Proteobakterien	KB 06	0.03	$t_{(12)} = 43.7 * 10^5$	0.9994	< 0.01 *
	<u>KB 23</u>	0.9996	$t_{(13)} = 144.14$		< 0.00001 ***
					< 0.00001 ***
Actinomyceten	KB 30	0.41	$t_{(11)} = 17.4 * 10^7$	0.83	< 0.01 *
	<u>KB 31</u>	0.52	$t_{(12)} = 4.39$		< 0.0009 ***
	<u>KB 34</u>	0.48	$t_{(12)} = 4.09$		< 0.0015 **
CFB-Gruppe	<u>KB 09</u>	0.51	$t_{(12)} = 11.66$	0.98	< 0.00001 ***
	<u>KB 11</u>	0.71	$t_{(12)} = 16.34$		< 0.00001 ***
	KB 24	0.15	$t_{(11)} = 78.8 * 10^6$		< 0.01 *

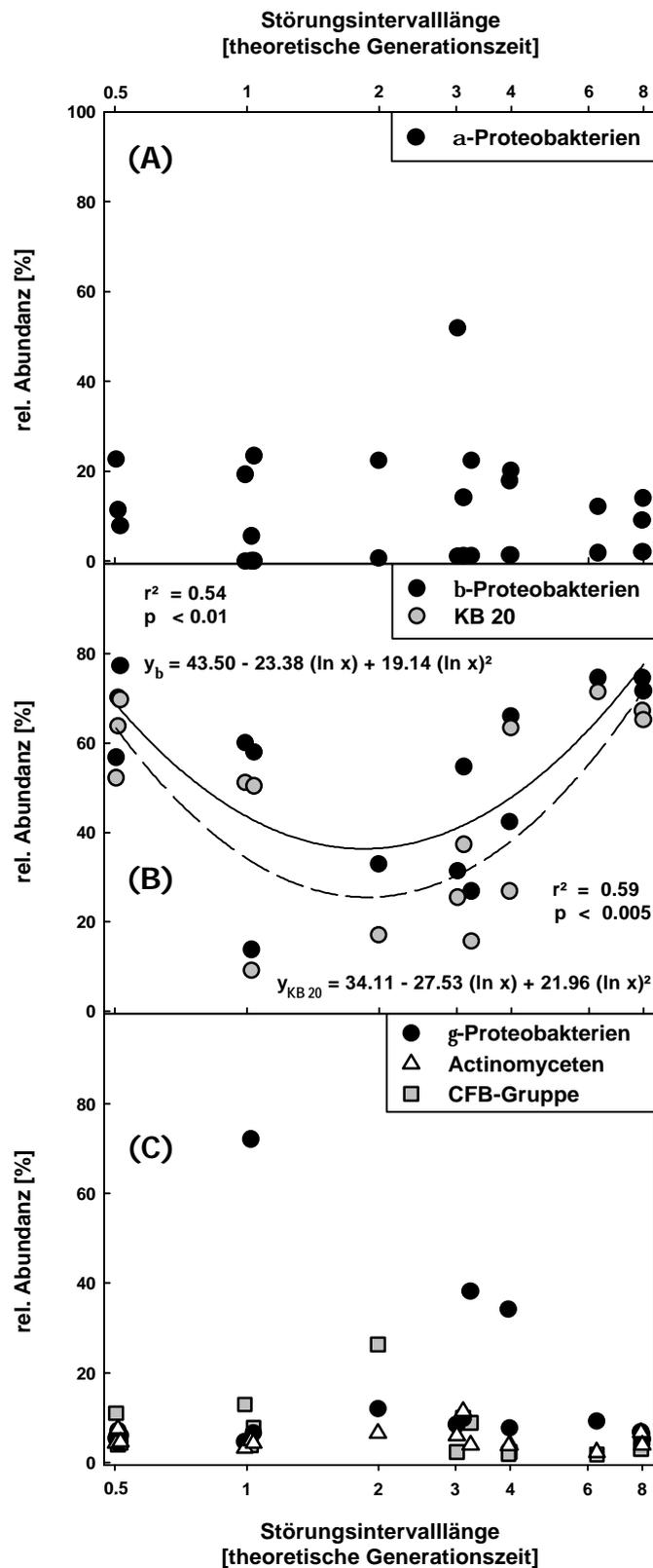


Abb. 3.15: Relative Abundanzen taxonomischer Großgruppen in Abhängigkeit von der Intervalllänge zwischen den P-Pulsen am Tag 25 der Chemostatexperimente (basierend auf Durchflusszytometerzählung antikörpermarkierter Zellen). Die Parameter der als signifikant ermittelten Beziehungen finden sich in Tab. 17. (A) α -Proteobakterien, (B) β -Proteobakterien und Isolat KB 20, (C) γ -Proteobakterien, Actinomyceten und CFB-Gruppe.

3.3.2.2 Gildenaspekte

Wie in Abschnitt 3.1.2 gezeigt, lassen sich die 14 Isolate in drei distinkte Gilden bezüglich ihrer stammspezifischen minimalen Generationszeit g_{\min} einteilen.

Für den Endpunkt des Experimentes, den Tag 25, wurde untersucht, inwieweit die relative Häufigkeit dieser drei Gilden nachweisbar in Beziehungen zur Länge der P-Pulsintervalle steht.

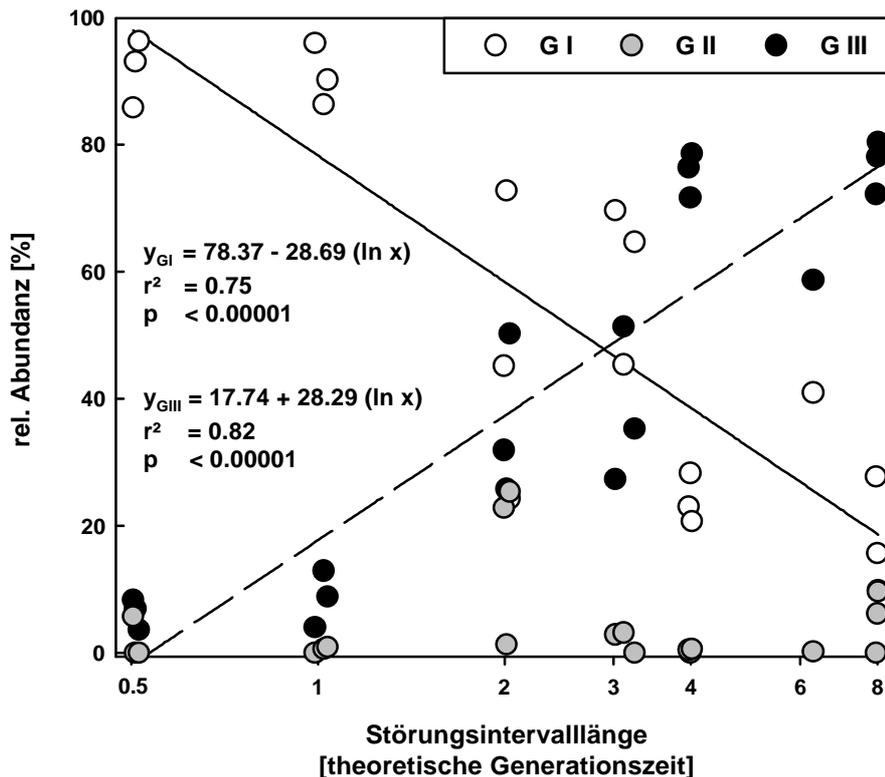


Abb. 3.16: Relative Abundanz der Gilden für g_{\min} in Abhängigkeit von der Intervalllänge zwischen den P-Pulsen am Tag 25 der Chemostatexperimente (basierend auf CFU-Zählung).

Die mittels CFU-Zählung gewonnenen Ergebnisse weisen sowohl für die Gilde mit kurzen g_{\min} (G I; 0.22 d) als auch für G III (Gilde mit langen g_{\min} ; 1.37 d) auf hochsignifikante Korrelationen der jeweiligen relativen Abundanzen mit der Pulsintervalllänge hin (Abb. 3.16). Je größer das Pulsintervall umso geringer war der relative Anteil von G I und um so stärker war G III vertreten. Die beiden ermittelten Funktionen überschneiden sich bei einer mittleren Intervalllänge von ca. 3 d, was bedeutet, dass bei dieser Länge des Pulsintervalls keine der beiden Gilden dominant ist, sondern beide etwa gleich stark vertreten sind. Für G II mit mittellangen g_{\min} (0.51 d) konnte keine signifikante Beziehung der relativen Abundanzen zur Pulsintervalllänge nachgewiesen werden; vergleichsweise hohe Anteile waren jedoch für 2 von 3 Replikaten des 2-d-Pulsintervalls zu beobachten. Die *Treatments* mit mittellangen Pulsintervallen von 2 - 3 theoretischen Generationszeiten zeichneten sich demnach durch die

Präsenz aller drei Gilden in meist ähnlich hohen relativen Anteilen aus, während *Treatments* mit kurzen bzw. langen Pulsintervallen von je einer Gilde dominiert wurden. Außer bei G III, die fast ausschließlich durch KB 16 repräsentiert war, war dieser Effekt nicht auf einzelne Isolate als dominante Repräsentanten der Gilden zurückzuführen (Tab. 3.10).

Tab. 3.10: Bedeutung der relativen Abundanz der Isolate für die relative Abundanz der Gilden von g_{\min} (CFU-Zählung, Tag 25 der Chemostatexperimente) entsprechend ihres partiellen Korrelationskoeffizienten. Gekennzeichnet sind jeweils diejenigen Isolate (fettgedruckt, unterstrichen), deren relative Häufigkeit insgesamt $\geq 80\%$ der Varianz der relativen Abundanz der jeweiligen Gilden erklärt. Das angegebene r^2 bezieht sich auf den gemeinsamen Korrelationszusammenhang der relativen Häufigkeit dieser Isolate und derjenigen der jeweiligen Gilden.

Gilde	Isolat	part. Korrelationskoeffizient	t - Wert	Bestimmtheitsmaß r^2	Signifikanzniveau p
G I ($g_{\min} = 0.22$ d ± 0.01 d)	KB 10	0.08	$t_{(14)} = 0.72$	0.83	= 0.49 n.s.
	KB 12	0.41	$t_{(14)} = 47.78$		< 0.00001 ***
	KB 20	0.70	$t_{(15)} = 6.67$		< 0.00001 ***
	KB 23	0.56	$t_{(15)} = 5.30$		< 0.0001 ***
	KB 27	0.56	$t_{(15)} = 5.33$		< 0.0001 ***
G II ($g_{\min} = 0.51$ d ± 0.02 d)	KB 09	0.38	$t_{(16)} = 15.99$	0.991	< 0.00001 ***
	KB 30	0.10	-		-
	KB 31	0.49	$t_{(16)} = 20.18$		< 0.00001 ***
G III ($g_{\min} = 1.37$ d ± 0.05 d)	KB 11	0.02	-	0.9996	-
	KB 16	0.9998	$t_{(17)} = 199.88$		< 0.00001 ***

Für einige der *Treatments* mit längeren P-Pulsintervallen (4 d, 8 d) war das Beprobungsrastrer für die Koloniezählung eng genug gewählt, um die Abundanzdynamik der Gilden zwischen den P-Pulsen verfolgen zu können (Abb. 3.17 A+B). Ebenso, wie bei der Abundanzentwicklung der durch DAPI-Zählung ermittelten Zelldichten war nach jeder P-Pulsgabe ein deutlicher Anstieg der CFU-Dichten zu verzeichnen; bei den 8-d-*Treatments* war ein exponentieller Rückgang von vergleichsweise hohen CFU-Abundanzen 48 h nach jeder P-Gabe auf niedrige CFU-Abundanzen unmittelbar vor der nächsten P-Gabe zu beobachten. Die starken Abundanzschwankungen der CFU zwischen den Pulsen beruhte im wesentlichen auf der Zu- und Abnahme von schnell bis mittelschnell wachsenden Isolaten (Gilden I und II), während die Abundanz von G III kaum Veränderungen zeigte (4-d-*Treatment*) oder sich vergleichsweise wenig änderte (8-d-*Treatment*).

Die durch Antikörperfärbung und Durchflusszytometermessung ermittelten Ergebnisse ließen für den Tag 25 keinen Schluss auf eine signifikante Beziehung zwischen der relativen Abundanz der Gilden und der Länge der P-Pulsintervalle zu (Abb. 3.18). G I dominierte alle *Treatments*; die niedrigste relative Häufigkeit von G I war für das 2-d-*Treatment* zu beobachten. G III war in *Treatments* mit mittleren P-Pulsintervalllängen (2-4 theoretische Generationszeiten) in einigen Replikaten vergleichsweise häufiger vertreten, als in *Treatments* mit kurzen bzw. langen Pulsintervallen; G II trat in allen *Treatments* gleichmäßig mit vergleichsweise

geringen relativen Abundanzen auf. Keine der Gilden wurde von der Präsenz einzelner Stämme dominiert (Tab. 3.11).

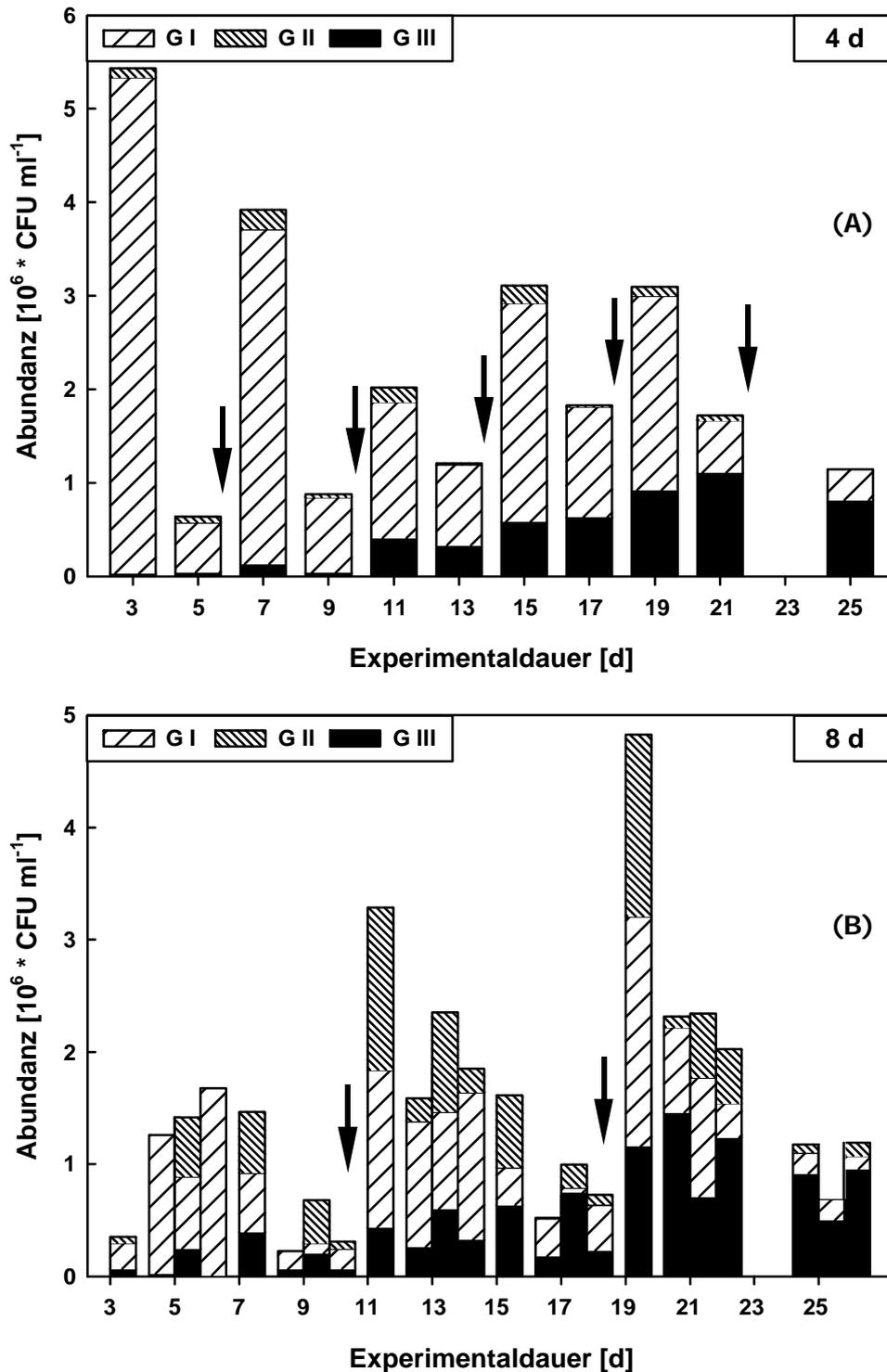


Abb. 3.17: Abundanz der Gilden für g_{\min} im Verlauf der Chemostatexperimente (basierend auf CFU-Zählung); Pfeile bezeichnen die Zeitpunkte der P-Pulsgabe unmittelbar nach der zuvor erfolgten Probennahme an dem entsprechenden Versuchstag. (A) *Treatment* mit 4 d Pulsintervalllänge; (B) *Treatment* mit 8 d Pulsintervalllänge; gruppierte Balken repräsentieren die Replikate des *Treatments* an den jeweiligen Probennahmetagen; Balken an gleicher relativer Position innerhalb der Gruppierung repräsentieren jeweils das selbe Replikat eines *treatments* zu den verschiedenen Zeitpunkten.

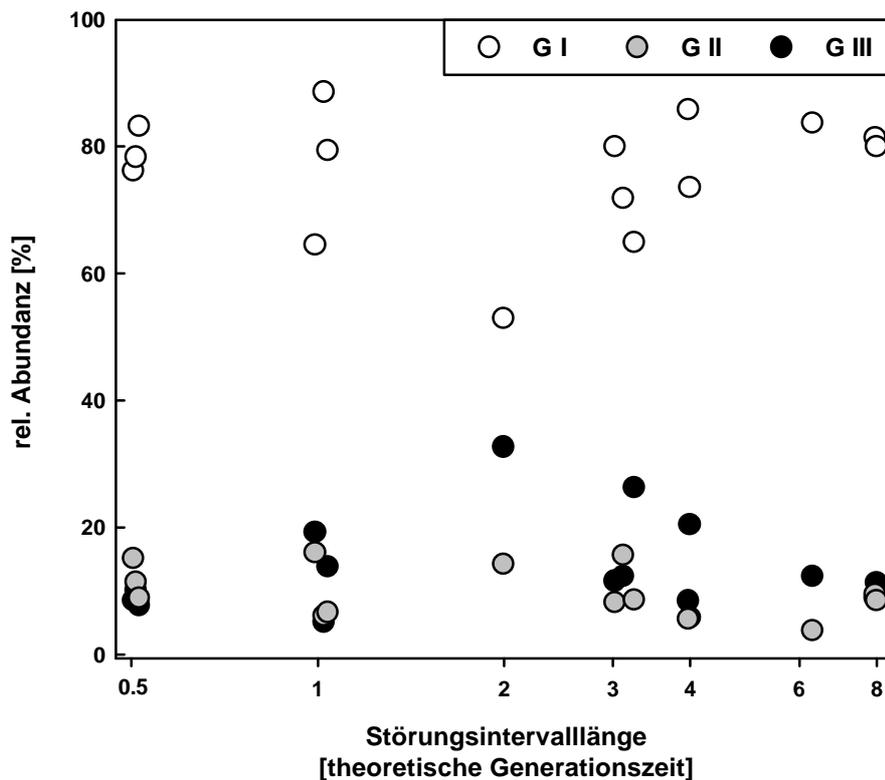


Abb. 3.18: Relative Abundanz der Gilden für g_{\min} in Abhängigkeit von der Intervalllänge zwischen den P-Pulsen am Tag 25 der Chemostatexperimente (basierend auf Durchflusszytometerzählung antikörpermarkierter Zellen).

Tab. 3.11: Bedeutung der relativen Abundanz der Isolate für die relative Abundanz der Gilden von g_{\min} (Durchflusszytometerzählung antikörpermarkierter Zellen, Tag 25 der Chemostatexperimente) entsprechend ihres partiellen Korrelationskoeffizienten. Gekennzeichnet sind jeweils diejenigen Isolate (fettgedruckt, unterstrichen), deren relative Häufigkeit insgesamt $\geq 80\%$ der Varianz der relativen Abundanz der jeweiligen Gilden erklärt. Das angegebene r^2 bezieht sich auf den gemeinsamen Korrelationszusammenhang der relativen Häufigkeit dieser Isolate und derjenigen der jeweiligen Gilden.

Gilde	Isolat	part. Korrelationskoeffizient	t - Wert	Bestimmtheitsmaß r^2	Signifikanzniveau p
G I ($g_{\min} = 0.22$ d ± 0.01 d)	KB 06	-0.09	$t_{(10)} = -1.04$	0.91	= 0.32 n.s.
	KB 10	0.05	$t_{(10)} = 0.58$		= 0.57 n.s.
	<u>KB 12</u>	0.65	$t_{(11)} = 7.20$		< 0.00002 ***
	<u>KB 20</u>	0.91	$t_{(11)} = 10.04$		< 0.00001 ***
	<u>KB 23</u>	0.89	$t_{(11)} = 9.79$		< 0.00001 ***
	KB 27	0.28	$t_{(10)} = 8.34$		< 0.00001 ***
G II ($g_{\min} = 0.51$ d ± 0.02 d)	<u>KB 09</u>	0.77	$t_{(11)} = 9.18$	0.92	< 0.00001 ***
	KB 24	0.25	$t_{(10)} = 6.09$		< 0.0002 ***
	<u>KB 30</u>	0.39	$t_{(11)} = 4.67$		< 0.0007 ***
	<u>KB 31</u>	0.56	$t_{(11)} = 6.70$		< 0.00001 ***
	KB 34	0.15	$t_{(10)} = 2.05$		= 0.07 n.s.
G III ($g_{\min} = 1.37$ d ± 0.05 d)	<u>KB 11</u>	0.73	$t_{(12)} = 20.87$	0.99	< 0.00001 ***
	<u>KB 16</u>	0.70	$t_{(12)} = 20.17$		< 0.00001 ***
	KB 33	0.12	-		-
					< 0.00001 ***

Berechnet man für den Endpunkt des Experimentes (Tag 25) den mittleren Wert für g_{\min} entsprechend der relativen Abundanz der in den Proben auftretenden Isolate, so lässt sich auch für die Ergebnisse der Antikörperzählung ein Muster bezüglich der minimalen Generationszeit als Merkmal der Organismen und der Länge der Pulsintervalle der *Treatments* erkennen (Abb. 3.19). In *Treatments* mit kurzen bzw. langen Pulsintervallen sind vor allem schnellwachsende Organismen zu finden, während die Organismen in *Treatments* mit mittleren P-Pulsintervalllängen (2 - 3 theoretische Generationszeiten) im Mittel deutlich höhere Werte für g_{\min} aufweisen. Die ermittelte unimodale Funktion besitzt insgesamt zwar nur ein niedriges Signifikanzniveau ($p = 0.087$); der Achsenabschnitt und die lineare und die quadratische Komponente der Funktion sind jedoch alle signifikant auf dem Niveau von $p < 0.05$ (Tab. 3.12).

Die auf den Ergebnissen der CFU-Zählung basierenden mittleren Werte für g_{\min} sind hoch signifikant positiv mit dem Zunehmen der Pulsintervalllänge korreliert (Abb. 3.19). Ein Vergleich der Ergebnisse beider Methoden macht deutlich, dass eine Diskrepanz der Ergebnisse vor allem für *Treatments* mit längeren Pulsintervallen (≥ 3 theoretische Generationszeiten) besteht.

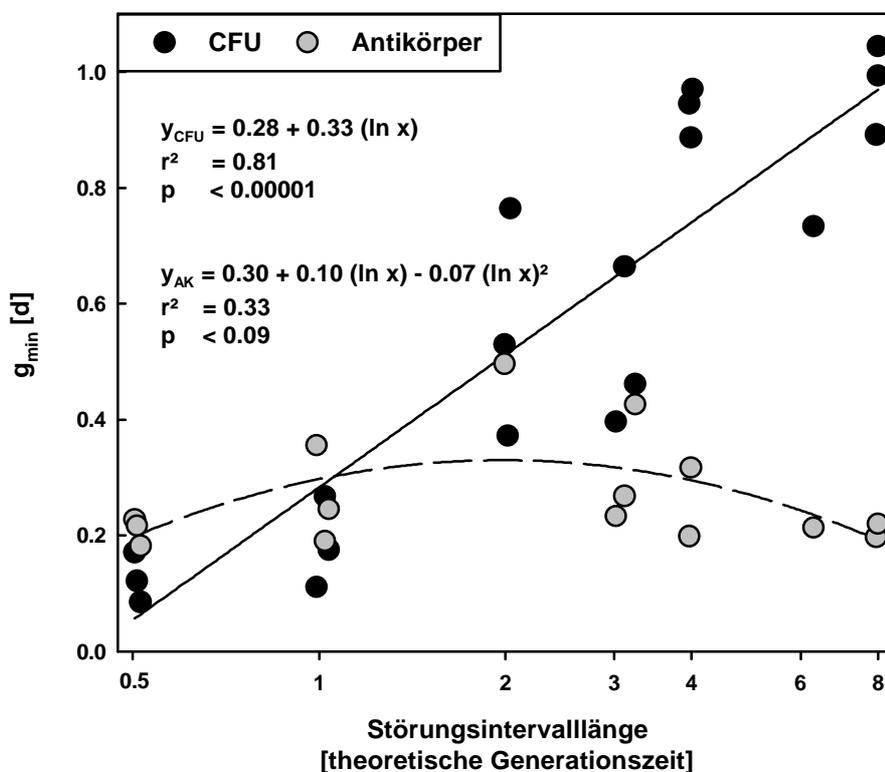


Abb. 3.19: Mittlere minimale Generationszeit (g_{\min}) der Versuchsorganismen in Abhängigkeit von der Intervalllänge zwischen den P-Pulsen am Tag 25 der Chemostatexperimente; die Parameter der ermittelten Beziehungen finden sich in Tab. 3.12.

Tab. 3.12: Korrelationszusammenhang des mittleren Wertes für g_{\min} (CFU- und Durchflusszytometerzählung antikörpermarkierter Zellen, Tag 25 der Chemostatexperimente) und der Länge des P-Puls-Intervalls der verschiedenen *Treatments*.

Methode	Term	Regressions- koeffizient	t - Wert	Bestimmtheits- maß r^2	Signifikanzniveau p
CFU-Zählung	Intercept	0.28	$t_{(17)} = 5.93$		= 0.00002 ***
	ln x	0.33	$t_{(17)} = 8.50$		< 0.00001 ***
	gesamt			0.81	< 0.00001 ***
Durchflusszyto- meterzählung	Intercept	0.30	$t_{(12)} = 7.73$		< 0.00001 ***
	ln x	0.10	$t_{(12)} = -4.69$		= 0.047 *
	(ln x) ²	-0.07	$t_{(12)} = 2.53$		= 0.031 *
	gesamt			0.33	= 0.087 n.s.

3.3.3 Einfluss der gepulsten P-Zufuhr auf Diversität der Chemostat-Lebensgemeinschaften

Die zeitliche Entwicklung der vier untersuchten Diversitätsparameter S (Artenzahl), $1/D$ (effektive Artenzahl), $1-D$ (Simpsons Komplementärwert) und D (taxonomische Diversität) in Abhängigkeit von der Länge der P-Pulsintervalle ist in den Abb. 3.20 A+B und Abb. 3.21 A+B dargestellt. Gezeigt sind jeweils die Versuchstage, die die Endpunkte auch der längsten Intervalle, 6 d bzw. 8 d, erfassen. Die Ergebnisse für die erste Hälfte des Experimentes (Tage 7, 9 und 13) beruhen ausschließlich auf der CFU-Zählung, während für die Tage 17, 19 und 25 zusätzlich durchflusszytometrische Zählungen antikörpermarkierter Zellen vorliegen. Wie bereits in 3.3.2 erwähnt, wurde die Länge der Pulsintervalle in theoretische Generationszeiten umgerechnet, um für Unterschiede in der Durchflussgeschwindigkeit der Chemostaten zu korrigieren.

Zu Beginn des Experimentes (Tag 7) am Ende des ersten 6-d-Pulszyklus zeigte der Parameter S eine signifikante unimodale Beziehung zu der Pulsintervalllänge, die, mit abnehmender Tendenz, bis zum Tag 13 zu beobachten war (Tab. 3.13). Die höchsten Artenzahlen wurden in diesem Zeitraum vor allem in den *Treatments* mit ca. 2 theoretischen Generationszeiten als Pulsintervall gefunden. Am Tag 9 wurde zwar kein Signifikanzniveau von $p < 0.05$ für die gesamte Funktion, wohl aber für alle an der Funktion beteiligten Terme erreicht; für Tag 13 konnte der negative quadratische Term der unimodale Funktion nicht auf dem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ bestätigt werden, obwohl sich die gesamte Funktion als signifikant erwies ($p = 0.024$). Die zur Annahme einer unimodalen Antwort im Sinne der IDH definierten Voraussetzungen (siehe 2.7.3.2) waren für diese Tage für den Parameter S demnach nicht streng erfüllt, das unimodale Muster ist jedoch trotzdem recht gut belegt.

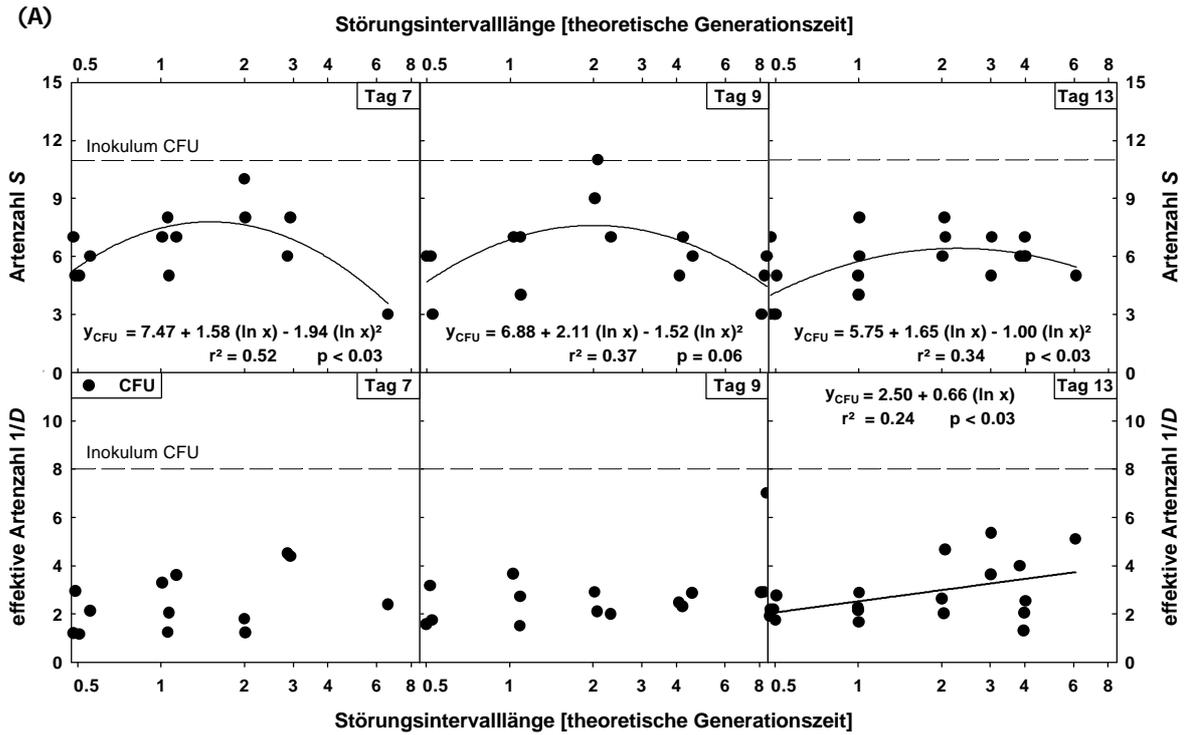
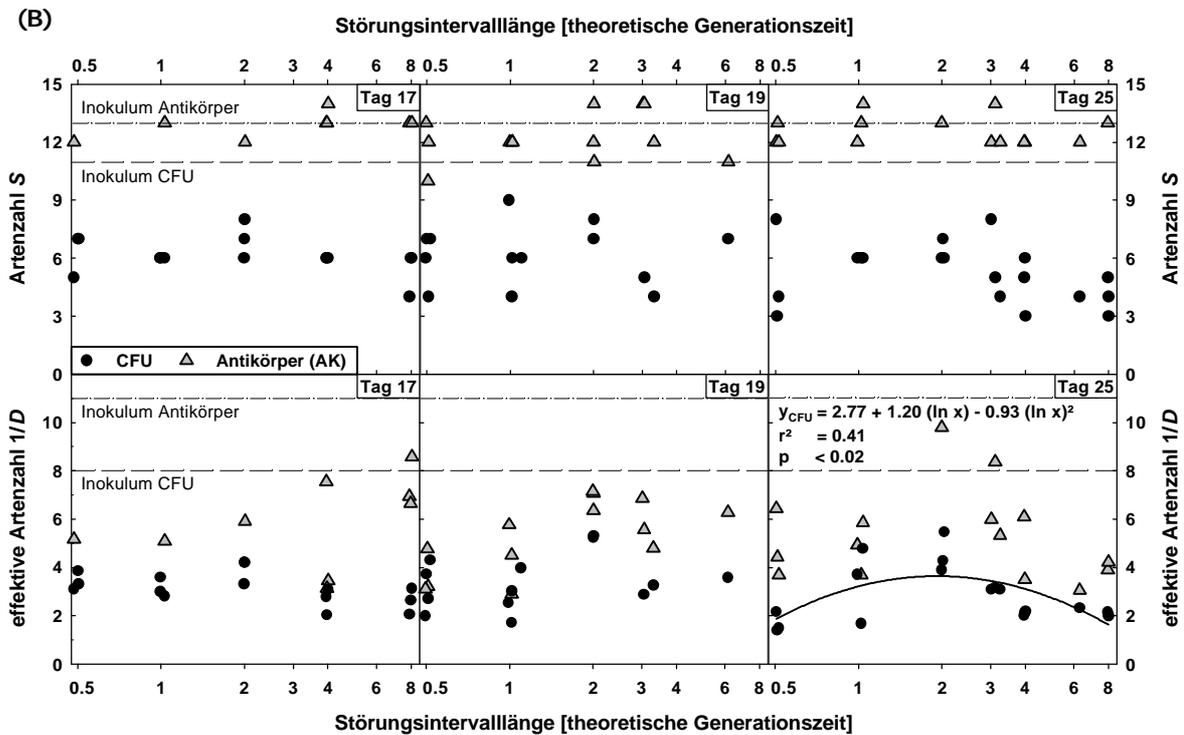


Abb. 3.20: Artenzahl S und effektive Artenzahl $1/D$ in Abhängigkeit von der Intervalllänge zwischen den P-Pulsen (A) für die Tage 7, 9 und 13, (B) für die Tage 17, 19 und 25 der Chemostatexperimente. Die gestrichelten Linien markieren den mittleren Wert des jeweiligen Diversitätsparameters für die Inokula der drei verschiedenen Experimente: $S_{CFU} = 11.3 (\pm 0.88 \text{ s.e.})$; $S_{AK} = 13 (\pm 0 \text{ s.e.})$; $1/D_{CFU} = 8.1 (\pm 1.18 \text{ s.e.})$; $1/D_{AK} = 11.2 (\pm 0.15 \text{ s.e.})$. Die Parameter der ermittelten Beziehungen finden sich in Tab. 3.13. Dargestellt wurden nur Funktionen, die insgesamt bzw. deren Terme und y-Achsenabschnitt eine Signifikanz auf dem Niveau $p \leq 0.05$ aufwiesen.



In der zweiten Hälfte des Experimentes war weder für die Ergebnisse der CFU-Zählung noch für die der durchflusszytometrischen Zählung ein signifikanter Trend für S nachzuweisen. Während die Zählung der Arten mit Hilfe des Durchflusszytometers nur geringe Unterschiede zwischen den *Treatments* ermittelte und das Artenzahlniveau sich nur wenig von dem durchflusszytometrisch für das Inokulum bestimmten unterschied, lag das Niveau der durch CFU-Zählung ermittelten Artenzahlen deutlich unterhalb des für das Inokulum bestimmten Niveaus. Für alle übrigen Diversitätsparameter, die zusätzlich zur Artenzahl die *Evenness* der Arten berücksichtigen, waren, bis auf den letzten Untersuchungstag (Tag 25), entweder keine signifikanten Trends oder eine signifikante, mehr oder weniger ausgeprägte positive Korrelation der Diversität zu der Länge der P-Pulsintervalle zu erkennen (Tab. 3.13).

Während die auf Durchflusszytometerzählung beruhenden Ergebnisse für die effektive Artenzahl im Allgemeinen ein deutlich höheres Diversitätsniveau aufwiesen, als die mittels CFU-Zählung gewonnenen, war dieser Unterschied für $1-D$ und D nicht so stark ausgeprägt. Alle Werte der Diversitätsparameter $1/D$, $1-D$ und D lagen bei den Ergebnissen beider Methoden unterhalb des Diversitätsniveaus, welches für das Inokulum nachgewiesen wurde.

Am Endpunkt des Experimentes, welcher als einziger Untersuchungstag Intervallendpunkte für alle *Treatments* erfasst, konnte für die Ergebnisse der CFU-Zählung sowohl für $1/D$, als auch $1-D$ und D signifikante unimodale Antworten der Diversität beobachtet werden (Tab. 3.13). Auch hier wurden maximale Diversitäten vor allem in *Treatments* mit Pulsintervalllängen von ca. 2 theoretischen Generationszeiten gefunden. Einzig für den Parameter D ließ sich in ähnlicher Weise auch für die durchflusszytometrisch ermittelten Ergebnisse eine signifikante unimodale Beziehung der Diversität zu der Länge der P-Pulsintervalle nachweisen (Tab. 3.13). Tendenziell zeigten jedoch auch die beiden anderen Parameter ein Muster mit jeweils niedrigen Diversitätswerten für *Treatments* mit langen und kurzen Pulsintervallen und deutlich erhöhter Diversität für *Treatments* mittlerer Intervalllänge. Hierbei ist zu beachten, dass nur ein Replikat des *Treatments* der Pulsintervalllänge von 2 theoretischen Generationszeiten, welches die CFU-Zählung als *Treatment* mit besonders hoher Diversität identifizierte, durchflusszytometrisch bearbeitet werden konnte.

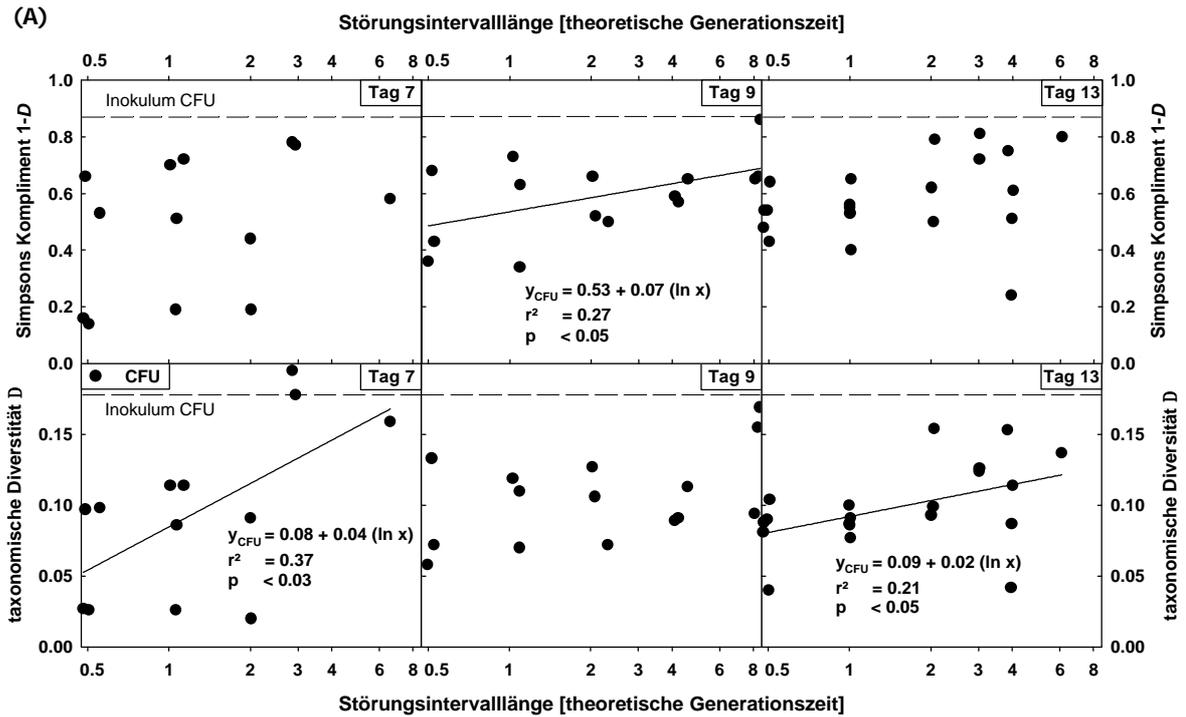
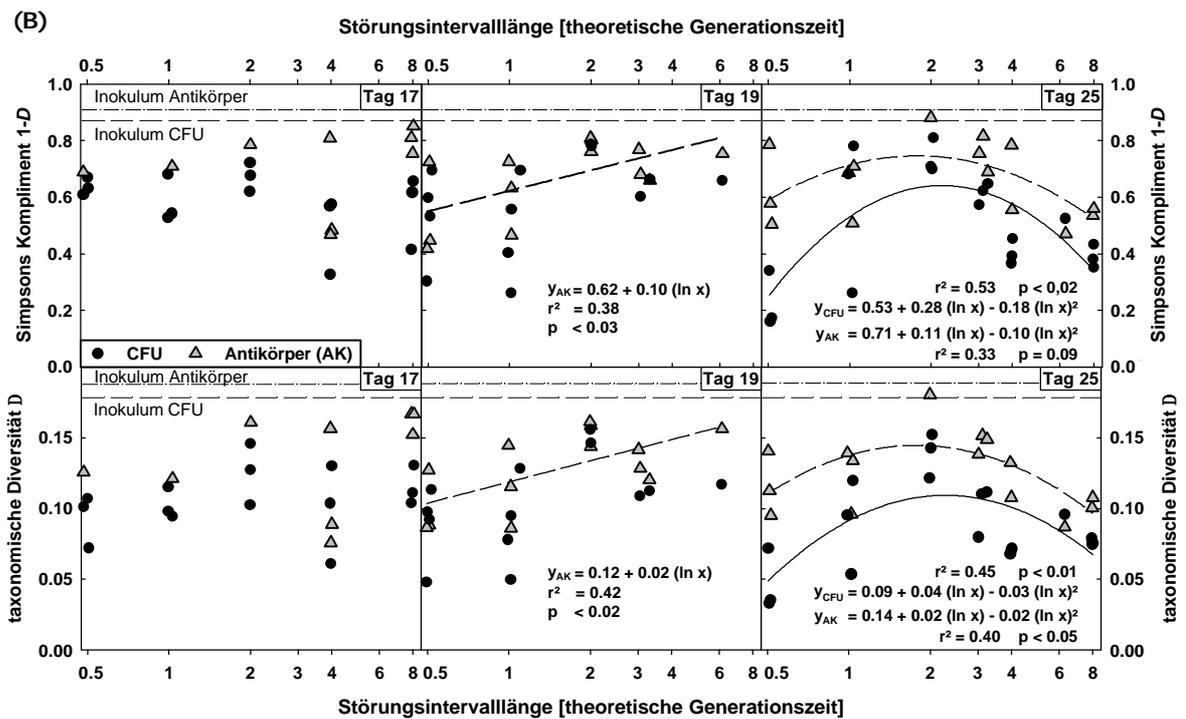


Abb. 3.21: Simpsons Kompliment 1-*D* und taxonomische Diversität *D* in Abhängigkeit von der Intervalllänge zwischen den P-Pulsen (A) für die Tage 7, 9 und 13, (B) für die Tage 17, 19 und 25 der Chemostatexperimente. Die dünne gestrichelten Linien markieren den mittleren Wert des jeweiligen Diversitätsparameters für die Inokula der drei verschiedenen Experimente: $1-D_{CFU} = 0.87 (\pm 0.02 \text{ s.e.})$; $1-D_{AK} = 0.91 (\pm 0.001 \text{ s.e.})$; $D_{CFU} = 0.178 (\pm 0.02 \text{ s.e.})$; $D_{AK} = 0.188 (\pm 0.004 \text{ s.e.})$. Die Parameter der ermittelten Beziehungen finden sich in Tab. 3.13. Dar- gestellt wurden nur Funktionen, die insgesamt bzw. deren Terme und y-Achsenabschnitt eine Signifikanz auf dem Niveau $p \leq 0.05$ aufwiesen (Ausnahme: $1-D_{AK}$, Tag 25).



Tab. 3.13: Korrelationszusammenhang der durch CFU- und Durchflusszytometerzählung antikörpermarkierter Zellen (AK) ermittelten Diversitätsparameter S , $1/D$, $1-D$ und D mit der Länge des P-Puls-Intervalls der verschiedenen *Treatments* zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Chemostatexperimente.

Tag	Methode	Parameter	Term	Regressions- koeffizient	t - Wert	Bestimmt- heitsmaß r^2	Signifikanz- niveau p
7	CFU	S	Intercept	7.47	$t_{(10)} = 15.25$	0.52	< 0.00001 ***
			ln x	1.58	$t_{(10)} = 2.30$		= 0.044 *
			(ln x) ²	-1.94	$t_{(10)} = -3.27$		= 0.008 **
			gesamt				< 0.026 *
7	CFU	D	Intercept	0.08	$t_{(11)} = 6.03$	0.37	< 0.0001 ***
			ln x	0.04	$t_{(11)} = 2.56$		= 0.027 *
			gesamt				< 0.027 *
9	CFU	S	Intercept	6.88	$t_{(12)} = 10.81$	0.37	< 0.00001 ***
			ln x	2.11	$t_{(12)} = 2.20$		= 0.048 *
			(ln x) ²	-1.52	$t_{(12)} = -2.65$		= 0.021 *
			gesamt				= 0.060 n.s.
9	CFU	$1-D$	Intercept	0.53	$t_{(13)} = 13.30$	0.27	< 0.00001 ***
			ln x	0.07	$t_{(13)} = 2.20$		= 0.047 *
			gesamt				< 0.047 *
13	CFU	S	Intercept	5.75	$t_{(17)} = 12.78$	0.34	< 0.00001 ***
			ln x	1.65	$t_{(17)} = 2.86$		= 0.01 *
			(ln x) ²	-1.00	$t_{(17)} = -1.80$		= 0.089 n.s.
			gesamt				< 0.03 *
13	CFU	$1/D$	Intercept	2.50	$t_{(18)} = 9.59$	0.24	< 0.00001 ***
			ln x	0.66	$t_{(18)} = 2.37$		= 0.029 *
			gesamt				< 0.029 *
13	CFU	$1-D$	Intercept	0.09	$t_{(18)} = 13.43$	0.21	< 0.00001 ***
			ln x	0.02	$t_{(18)} = 2.18$		= 0.043 *
			gesamt				< 0.043 *
19	AK	$1-D$	Intercept	0.62	$t_{(11)} = 17.76$	0.38	< 0.00001 ***
			ln x	0.10	$t_{(11)} = 2.61$		= 0.024 *
			gesamt				< 0.024 *
19	AK	D	Intercept	0.12	$t_{(11)} = 17.55$	0.42	< 0.00001 ***
			ln x	0.02	$t_{(11)} = 2.81$		= 0.017 *
			gesamt				< 0.017 *
25	CFU	$1/D$	Intercept	2.77	$t_{(16)} = 9.08$	0.41	< 0.00001 ***
			ln x	1.20	$t_{(16)} = 2.68$		= 0.016 *
			(ln x) ²	-0.93	$t_{(16)} = -3.35$		= 0.004 **
			gesamt				< 0.014 *
25	CFU	$1-D$	Intercept	0.53	$t_{(16)} = 11.15$	0.53	< 0.00001 ***
			ln x	0.28	$t_{(16)} = 4.01$		= 0.001 **
			(ln x) ²	-0.18	$t_{(16)} = -4.13$		= 0.0008 ***
			gesamt				< 0.002 *
25	CFU	D	Intercept	0.09	$t_{(16)} = 10.79$	0.45	< 0.00001 ***
			ln x	0.04	$t_{(16)} = 3.50$		= 0.003 **
			(ln x) ²	-0.03	$t_{(16)} = -3.44$		= 0.003 **
			gesamt				< 0.009 **
25	AK	$1-D$	Intercept	0.71	$t_{(12)} = 16.59$	0.33	< 0.00001 ***
			ln x	0.11	$t_{(12)} = 1.83$		= 0.093 n.s.
			(ln x) ²	-0.10	$t_{(12)} = -2.40$		= 0.034 *
			gesamt				= 0.089 n.s.
25	AK	D	Intercept	0.13	$t_{(12)} = 16.94$	0.40	< 0.00001 ***
			ln x	0.02	$t_{(12)} = 2.20$		= 0.046 *
			(ln x) ²	-0.02	$t_{(12)} = -2.76$		= 0.017 *
			gesamt				< 0.049 *

In Tab. 3.14 sind die Werte für P-Pulsintervalllängen aufgelistet, die, entsprechend der als signifikant ermittelten Funktionen, maximale Diversität in den Chemostat-Lebensgemeinschaften bewirkten. Die Länge der Pulsintervalle, die bei unimodalen Funktionen mit maximalen Diversitäten korreliert waren, variierten zwischen 1.50 und 2.28 theoretischen Generationszeiten; der mittlere Wert für den Tag 25 betrug 2.03 ± 0.12 (s.e.) theoretische Generationszeiten. Die Werte für die Pulsintervalllänge, die in den linearen, positiven Beziehungen mit maximalen Diversitätswerten korreliert waren, lagen zwischen 6.11 und 8.47 theoretischen Generationszeiten, je nachdem, welche *Treatments* mit maximaler Intervalllänge in die Berechnung einbezogen werden konnten.

Tab. 3.14: Länge der P-Pulsintervalle, die, entsprechend der ermittelten Korrelationen (vergl. Tab 22) maximale Diversität in den Chemostat-Lebensgemeinschaften erzeugten. Die Intervalllänge ist angegeben als theoretische Generationszeit [d] (vergl. Text); gekennzeichnet (fett, *) sind diejenigen Werte, die auf unimodale Funktionen zurückgehen.

Tag		7		9		13			17	19		25		
Methode		Pulsintervalllänge für maximale Diversität [d]												
CFU-Zählung	Parameter	S	Δ	S	1-D	S	1/D	Δ	-	-	-	1/D	1-D	Δ
	Max.	1.50*	6.60	2.01*	8.47	2.28*	6.11	6.11	-	-	-	1.92*	2.19*	2.26*
Durchflusszyt.-Zählung	Parameter	-	-	-	-	-	-	-	-	1-D	Δ	-	-	Δ
	Max.	-	-	-	-	-	-	-	-	6.14	6.14	-	-	1.76*

Für drei Replikate des 8-d- und ein Replikat des 4-d-*Treatments* war es auf Grund des Probennahmerasters der Koloniezählung möglich, die zeitliche Entwicklung der Diversität zwischen den P-Pulsen zu verfolgen. In Abb. 3.22 ist sie für die drei Diversitätsparameter (S, 1-D, **D**) dargestellt, die sich wesentlich in den von ihnen erfassten Aspekten unterscheiden. Abgebildet sind die letzten beiden Pulszyklen im Verlauf des Experimentes, für die Messungen jeweils am Startpunkt (unmittelbar vor der Pulsgabe), am Endpunkt (unmittelbar vor der nächsten Pulsgabe) und mindestens eine Messung zwischen diesen beiden Zeitpunkten vorlagen. Die Werte für die Diversitätsparameter wurden standardisiert als %-Anteile des jeweils für das Inokulum bestimmten Wertes; der zeitliche Verlauf des Pulsintervalls wurde ausgedrückt als relativer Anteil des bis zum Probennahmezeitpunkt verstrichenen Zeitraumes an der Intervallgesamtlänge.

Für den ersten betrachteten Pulszyklus konnte keine signifikante Beziehung zwischen der Höhe der Diversität und der Fortdauer des Intervalls zwischen den Pulsen beobachtet werden. Die niedrigsten Diversitätswerte wurden jedoch entweder am Start- oder am Endpunkt des Pulszyklus beobachtet, während die Diversität zwischen Start und Ende tendenziell höher lag.

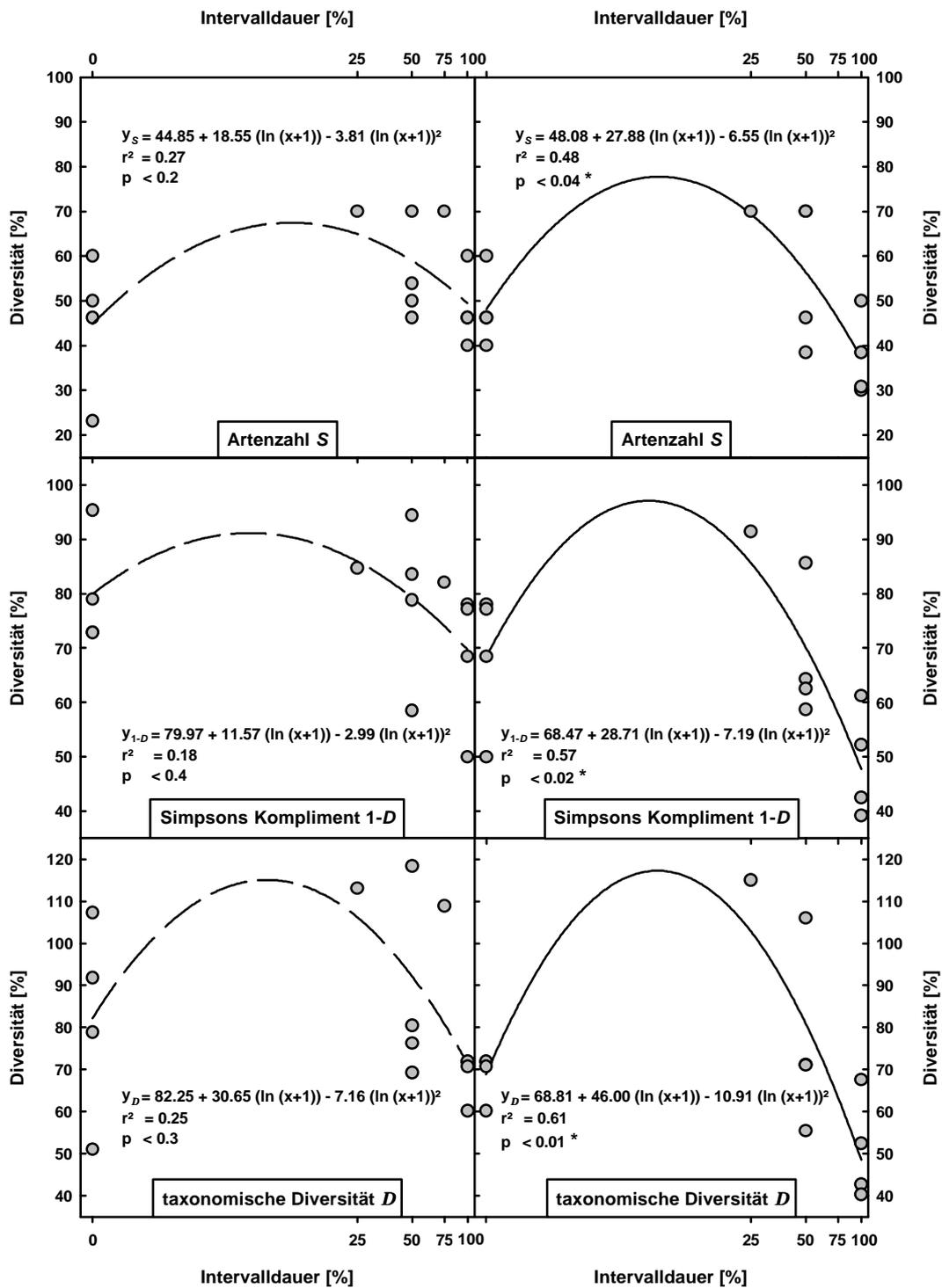


Abb. 3.22: Entwicklung von Artenzahl S , Simpsons Kompliment $1-D$ und taxonomischer Diversität D im zeitlichen Verlauf der Intervalle zwischen den P-Pulsen, zusammengefasst für ein Replikat des 4-d- und drei Replikate des 8-d-treatments. Dargestellt sind jeweils die letzten beiden Pulszyklen. Die Diversität ist ausgedrückt als %-Anteil der Inokulumsdiversität; der zeitliche Verlauf des Intervalls als %-Anteil der Intervallgesamtlänge. Die Parameter der dargestellten Beziehungen finden sich in Tab. 3.15.

Für den letzten Pulszyklus zeigten alle drei Parameter signifikante unimodale Antworten in Relation zum zeitlichen Verlauf des Pulsintervalls (Tab. 25). Am stärksten ausgeprägt war dies für den Parameter **D**. Gemessen wurden die höchsten Diversitätswerte nach Verstreichen des ersten Viertels des Intervalls; die als signifikant ermittelten Funktionen weisen aber darauf hin, dass die höchsten Werte für die Diversität bereits früher auftreten. Die Maximalwerte der Funktionen lagen zwischen 5.88 % und 10.40 % der Intervalllänge; der mittlere Wert für alle drei Parameter betrug $7.94 \% \pm 1.32 \%$ (s.e.) der Gesamtlänge des Intervalls. Bei einer Pulsintervalllänge von 4 d würde dies ein Erreichen von maximalen Diversitätswerten nach bereits 7.6 h, für ein 8-d-Pulsintervall-*Treatment* nach 15.2 h bedeuten. Die geschätzten Maximalwerte für die Diversität lagen hierbei auf dem Niveau des Inokulums.

Tab. 3.15: Korrelationszusammenhang der Diversitätsparameter *S*, *1-D* und *D* mit dem zeitlichen Verlauf des Intervalls zwischen den P-Pulsen, zusammengefasst für ein Replikat des 4-d- und drei Replikate des 8-d-*Treatments* (CFU-Zählung, vorletzter und letzter Pulszyklus). Die Diversität ist ausgedrückt als %-Anteil der Inokulumsdiversität; der zeitliche Verlauf des Intervalls als %-Anteil der Intervallgesamtlänge.

Pulszyklus	Parameter	Term	Regressions- koeffizient	t - Wert	Bestimm- theitsmaß r^2	Signifikanzniveau p
1	S	Intercept	44.85	$t_{(11)} = 7.36$	0.27	< 0.00002 ***
		$\ln(x+1)$	18.55	$t_{(11)} = 1.80$		= 0.099 n.s.
		$(\ln(x+1))^2$	-3.81	$t_{(11)} = -1.64$		= 0.13 n.s.
		gesamt				= 0.18 n.s.
1	1-D	Intercept	79.97	$t_{(11)} = 13.25$	0.18	< 0.0001 ***
		$\ln(x+1)$	11.57	$t_{(11)} = 1.13$		= 0.28 n.s.
		$(\ln(x+1))^2$	-2.99	$t_{(11)} = -1.30$		= 0.22 n.s.
		gesamt				= 0.33 n.s.
1	D	Intercept	82.25	$t_{(11)} = 8.35$	0.25	< 0.00001 ***
		$\ln(x+1)$	30.65	$t_{(11)} = 1.84$		= 0.092 n.s.
		$(\ln(x+1))^2$	-7.16	$t_{(11)} = -1.90$		= 0.084 n.s.
		gesamt				= 0.21 n.s.
2	S	Intercept	48.08	$t_{(10)} = 8.53$	0.48	< 0.00001 ***
		$\ln(x+1)$	27.88	$t_{(10)} = 2.93$		= 0.015 *
		$(\ln(x+1))^2$	-6.55	$t_{(10)} = -3.04$		= 0.012 *
		gesamt				< 0.036 *
2	1-D	Intercept	68.47	$t_{(10)} = 11.96$	0.57	< 0.00001 ***
		$\ln(x+1)$	28.71	$t_{(10)} = 2.97$		= 0.014 *
		$(\ln(x+1))^2$	-7.19	$t_{(10)} = -3.29$		= 0.008 **
		gesamt				< 0.014 *
2	D	Intercept	68.81	$t_{(10)} = 9.29$	0.61	< 0.00001 ***
		$\ln(x+1)$	46.00	$t_{(10)} = 3.68$		= 0.004 **
		$(\ln(x+1))^2$	-10.91	$t_{(10)} = -3.85$		= 0.003 **
		gesamt				< 0.01 **

Insgesamt betrachtet stimmten die Diversitätsmuster, die durch die Diversitätsindizes zu verschiedenen Zeitpunkten des Experiments detektiert wurden, weitgehend überein. Die durch den Parameter Artenzahl für die selben Zeitpunkte detektierten Trends wiesen z.T. jedoch deutliche Unterschiede auf. Dies spiegelt sich auch in der Relation der Parameter zueinander wieder, die für *S*, *1-D* und *D* untersucht wurde (Abb. 3.23 A+B). So war für *S* und

1-*D* keine einheitliche Beziehung zu erkennen. Die Detektion von hohen Werten für 1-*D* war nicht an hohe Artenzahlen gebunden, ebenso wenig wie niedrige Werte für 1-*D* nur für niedrige Artenzahlen kennzeichnend waren. In der Tendenz unterschieden sich die Ergebnisse der CFU-Zählung nicht von denen der Durchflusszytometerzählung; die Ergebnisse der Durchflusszytometerzählung spiegeln jedoch das generell höhere Niveau der durch diese Methode detektierten Artenzahlen wieder, welches insgesamt auch höhere Werte für 1-*D* bedingte. Eine hochsignifikante positive lineare Korrelation dagegen zeigte 1-*D* mit dem taxonomischen Diversitätsindex *D*. Die Ergebnisse von CFU- und Durchflusszytometerzählung zeigten in dieser Beziehung ein hohes Maß an Übereinstimmung (Abb. 3.23 B). Die Relation zwischen *S* und *D* (nicht abgebildet) verhielt sich ähnlich, wie die zwischen *S* und 1-*D*, was auf Grund des proportionalen Verhältnisses von 1-*D* und *D* nicht anders zu erwarten war.

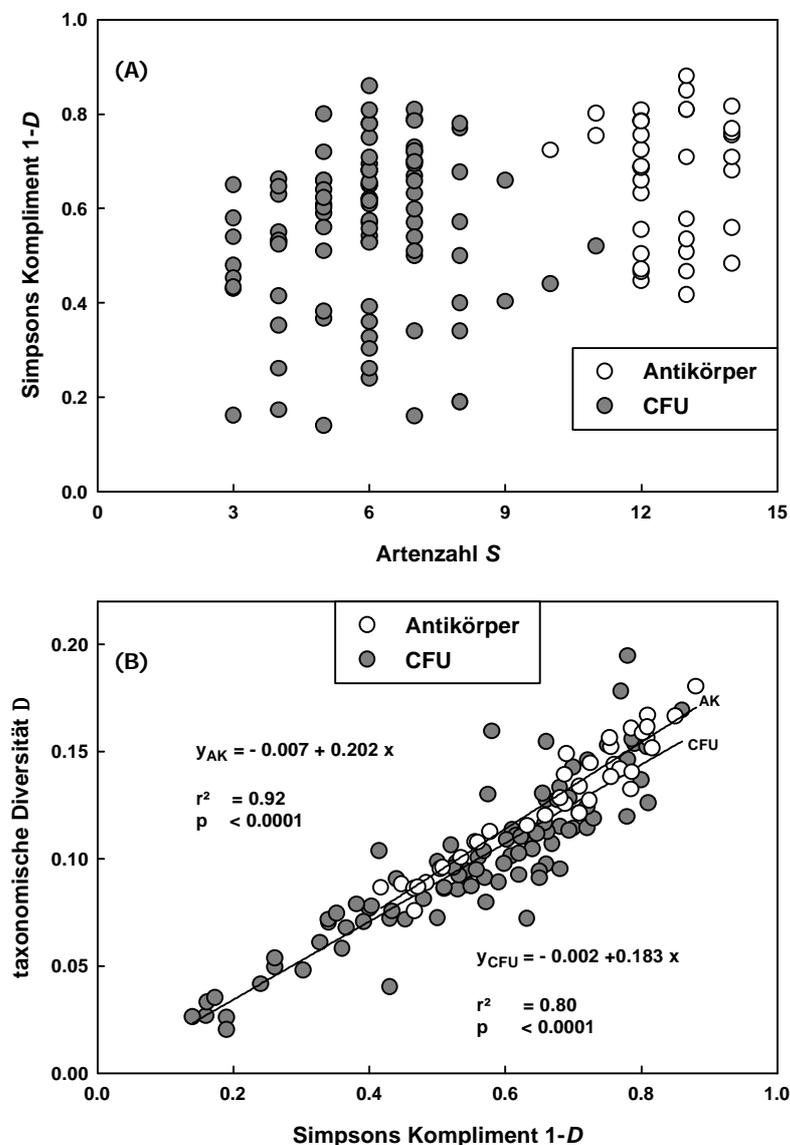


Abb. 3.23: Relation verschiedener Diversitätsparameter zueinander. (A) Simpsons Komplement 1-*D* in Abhängigkeit von der Artenzahl *S*, (B) taxonomische Diversität *D* in Abhängigkeit von Simpsons Komplement 1-*D*.

4 Diskussion

Für das untersuchte Modellsystem bestehend aus Lebensgemeinschaften aquatischer Bakterien in Chemostatkulturen konnte dargelegt werden, dass sich in Abhängigkeit von der Häufigkeit von Störungen, hier diskontinuierliche P-Zufuhr mit unterschiedlichen Intervalllängen zwischen den P-Pulsen, sowohl die taxonomische als auch die funktionelle Struktur der Lebensgemeinschaften verändert. Obschon beide Methoden, die zur Untersuchung der Zusammensetzung der Lebensgemeinschaften verwendet wurden, zeigen konnten, dass Regimes von Störungen mittlerer Häufigkeit höhere Diversitätsniveaus bedingen, als seltene oder häufige Störungen, lieferte vor allem die kultivierungsabhängige Methode der CFU-Zählung einen klaren signifikanten Nachweis der IDH-Annahme bezüglich der Störungshäufigkeit. Ein Zeitraum von ca. 2 Generationszeiten der untersuchten Organismen konnte als mittellanges Störungsintervall identifiziert werden, welches maximale Diversität erzeugt. Auch die Annahme der IDH, dass die Entwicklung der Diversität einer Lebensgemeinschaft zwischen zwei Störungen einem unimodalen Muster folgt, konnte unterstützt werden.

Zwischen den Ergebnissen der Durchflusszytometerzählung stammspezifisch immunfluoreszenzmarkierter Zellen und der CFU-Zählung bestanden augenfällige Differenzen. In Abschnitt 4.1 soll daher eine Erörterung der unterschiedlichen Aspekte erfolgen, die beide Methoden hinsichtlich der von ihnen erfassten Organismen erkennen lassen.

Abschnitt 4.2 befasst sich mit den Auswirkungen, die die Regimes unterschiedlicher Störungsintervalllänge auf die Chemostat-Modell-Lebensgemeinschaften hatte. In 4.2.1 werden taxonomische und funktionelle Aspekte der unterschiedlichen Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaften diskutiert. Die Muster, die für die funktionellen Strukturveränderungen der Lebensgemeinschaften zu beobachten waren, werden herangezogen, um die Organismen hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Strategien im Umgang mit fluktuierender Ressourcenverfügbarkeit zu charakterisieren und so den wahrscheinlichen Mechanismus für die Diversitätsänderungen in Abhängigkeit vom Störungsregime zu beleuchten.

Das Diversitätsmuster, das durch die unterschiedlichen Störungsregimes und im Anschluss an eine Störung erzeugt wurde, wird in Abschnitt 4.2.2 diskutiert. Vor allem Aspekte adäquater Beobachtungsparameter und -skalen sollen in diesem Abschnitt erörtert werden. Als wichtigster Gesichtspunkt in diesem Zusammenhang wird die Bedeutung zeitlicher Skalen angesehen, sowohl bei der Untersuchung der Annahmen der IDH als auch in Hinblick auf ökologisch relevante zeitliche Skalierung von Störung.

Eine kurze Schlussbetrachtung, die die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in einen erweiterten Rahmen heutiger Diversitätsforschung einordnen soll, erfolgt in Abschnitt 4.3.

4.1 Methoden der Abundanzermittlung: Direktzählung und Kultivierung auf Agarplatten reflektieren unterschiedliche Aspekte der Chemostat-Lebensgemeinschaften

Zur Quantifizierung der Versuchsorganismen in Chemostatexperimente wurden Methoden eingesetzt, die sich prinzipiell hinsichtlich der Beschaffenheit der resultierenden Ergebnisse unterscheiden: Zum einen wurden in fixierten Proben individuelle Zellen direkt gezählt, entweder mittels Epifluoreszenzmikroskopie (Bestimmung der Zelldichten insgesamt) oder mittels Durchflusszytometrie (Bestimmung der relativen Abundanzen der Isolate). Die Klassifizierung der Organismen erfolgte anhand spezifischer Markierungen: DAPI-Fluoreszenz wurde als Kennzeichen DNA-haltiger Partikel (= Bakterienzellen), Cy3-Fluoreszenz als hochspezifische Immunmarkierung für die Populationen der verschiedenen, in den Versuchen eingesetzten Isolate gewertet.

Zum anderen wurde ein Kultivierungsschritt auf Agarplatten durchgeführt, um die Organismen in nicht fixierten Proben zu detektieren und zu quantifizieren. Eine zuverlässige Identifizierung der detektierten Organismen war auf Grund der definierten Zusammensetzung der beprobten Lebensgemeinschaften und der distinkten Koloniemorphologie der Isolate auch bei dieser Vorgehensweise möglich. Die Detektion an sich setzte jedoch die Lebensfähigkeit und Kultivierbarkeit unter den gewählten Kulturbedingungen voraus und erfasst somit eine zusätzliche Qualität der detektierten Organismen.

Sowohl qualitativ, in Bezug auf die Detektion der Isolate, als auch quantitativ, in Bezug auf die detektierte Gesamtzahl der Organismen und die relative Häufigkeit der Isolate, lieferten die beiden Methoden unterschiedliche Ergebnisse. In der folgenden Erörterung soll dargelegt werden, welche ökologische Relevanz die durch DAPI-Zählung bzw. Immunfluoreszenzmarkierung und CFU-Kultivierung erfassten Parameter für die Charakterisierung von Bakterienlebensgemeinschaften haben und inwieweit sich gerade die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen beider Quantifizierungsweisen als geeignet erwies, zusätzliche Aspekte speziell in Kulturen, wie den Chemostat-Bakteriengemeinschaften zu beleuchten.

Gesamtzellzahl und Anteil metabolisch aktiver Zellen aquatischer Bakteriengemeinschaften

Seit der Einführung von Fluoreszenzfarbstoffen in die aquatische mikrobielle Ökologie, die eine erleichterte direkte Zählung von fluoreszenzmarkierten Bakterienzellen unter dem Epifluoreszenzmikroskop ermöglichen, ist bekannt, dass zwischen den durch mikroskopische Direktzählung und durch Plattenzählung ermittelten Bakterienabundanzen eine mehr oder weniger große Diskrepanz besteht. Während sie besonders ausgeprägt für Freilandproben zu beobachten ist und 1-3 Zehnerpotenzen umfassen kann („*the great plate count anomaly*“, STALEY & KONOPKA 1985), ist dieses Phänomen weniger deutlich für Kulturproben, bei denen die Ergebnisse von Plattenzählungen häufig 50 % und mehr der mikroskopischen Direktzähl-

lungen ausmachen können (z. B. DIAPER & EDWARDS 1994; ZWEIFEL & HAGSTRÖM 1995; SIMEK *et al.* 1997; HAHN & HÖFLE 1999). Als Gründe für diese Diskrepanz werden Selektivität der Plattenmedien (WAGNER *et al.* 1993; KÄMPFER *et al.* 1996) und der physiologische Status der suspendierten Zellen angenommen, der eine Kultivierung auf festen Medien nicht ermöglicht (STRASKRABOVA 1983; GAUTHIER *et al.* 1993; KRAGELUND & NYBROE 1994; BARCINA *et al.* 1997). Zudem beruht die Bildung einer Kolonie nicht immer auf dem Wachstum einer einzigen Zelle, sondern kann auch auf das Wachstum von Zellhaufen aus mehreren Zellen („*colony forming units*“) zurückgehen (MADIGAN *et al.* 1997), während bei mikroskopischer Zählung die Unterscheidung einzelner Zellen innerhalb von Aggregaten möglich ist (z. B. HAHN & HÖFLE 1999). Zur Bestimmung von Bakterienabundanz hat sich daher die direkte Zählung von fluoreszenzmarkierten Zellen, entweder mit DAPI oder Acridine Orange als Farbstoff, als Standard- und Referenzmethode durchgesetzt.

Das Vorhandensein von Populationen mit unterschiedlichem physiologischen Status innerhalb der Gesamtpopulationen wirft die Frage auf, ob alle detektierten Zellen an den Stoffumsetzungen der betrachteten Ökosysteme beteiligt sind, und wenn nicht, wie groß der tatsächliche Anteil aktiver Bakterien ist. In den letzten drei Jahrzehnten wurden die unterschiedlichsten physiologischen Parameter und dem entsprechend die unterschiedlichsten Methoden herangezogen, um spezifische metabolische Aktivität und Lebensfähigkeit der insgesamt detektierten Mikroorganismen nachzuweisen.

Mit Hilfe von Mikroautoradiographie konnte MEYER-REIL (1978) zeigen, dass in marinen Proben nur zwischen 2.3 % und 56.2 % (im Mittel 31.3 %) aller mikroskopisch gezählten Bakterienzellen die Fähigkeit besaßen, radioaktiv markierte Glucose zu metabolisieren. TABOR & NEIHOF (1984), die Aminosäuren, Thymidin und Acetat als markierte Substrate verwendeten, beobachteten, ebenfalls in marinen Proben, durchschnittlich einen höheren (ca. 43 %), wenn auch sehr variablen (7 - 95 %) Anteil von metabolisch aktiven Zellen im Bakterioplankton. Als Indikator für ein intaktes und aktives Elektronentransportsystem gilt die Fähigkeit von Bakterien, nicht-fluoreszierende Tetrazolium-Salze durch Respiration zu farbigen bzw. fluoreszierenden Niederschlägen zu reduzieren (INTC- und CTC-Essays). Die relativen Anteile des auf diese Weise als aktiv befundenen Bakterioplanktons weisen sowohl für limnische als auch für marine Habitate eine große Variabilität (0.4 – 95 %) auf, überschreiten aber selten einen Wert von 30 % der Gesamtpopulation (ZIMMERMAN *et al.* 1978; TABOR & NEIHOF 1984; DEL GIORGIO & SCARBOROUGH 1995; CHOI *et al.* 1996; DEL GIORGIO *et al.* 1997; KARNER & FUHRMAN 1997; BARTSCHT *et al.* 1999); der Trophiestatus des jeweiligen Gewässers wird hierbei als ein wesentlicher Faktor angesehen, der sowohl die absolute als auch die relative Häufigkeit der CTC-aktiven Zellen beeinflusst (DEL GIORGIO & SCARBOROUGH 1995; DEL GIORGIO *et al.* 1997). Die Wahrscheinlichkeit von respiratorischer Inaktivität von Bakterioplankton ist signifikant negativ mit der Zellgröße korreliert, inaktive Zellen werden jedoch in allen Größenklassen beobachtet (GASOL *et al.* 1995).

Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität mit Hilfe von farblosen Estern, die bei enzymatischer Spaltung in der Zelle ein Fluoreszenzsignal erzeugen (CFDA, Chem B), lieferten vergleichbare Ergebnisse bezüglich des relativen aktiven Anteils (7 – 75 %) des Bakterioplanktons und ebenfalls Hinweise auf einen Zusammenhang mit dem Trophiestatus der untersuchten Gewässer (PORTER *et al.* 1995).

Auch korrelieren metabolische Raten, wie die bakterielle Produktion, besser mit der absoluten bzw. relativen Abundanz der als aktiv eingestuftten Zellen als mit der Gesamtzellzahl des Bakterioplanktons (DEL GIORGIO *et al.* 1997; LEBARON *et al.* 1999).

Ungeklärt ist bisher die Frage, ob die beobachtete metabolische Inaktivität bedeutet, dass diese Bakterienzellen als tot bzw. nicht lebensfähig oder eher als zwar intakte, jedoch inaktive Ruhestadien zu betrachten sind. Als Indikatoren für intakte Membranpotentiale und somit intakte Membranen lebensfähiger Organismen gelten Farbstoffe, wie Rhodamin 123 (DIAPER & EDWARDS 1994) oder das LIVE/DEAD BacLight-Reagenz, welches bei der Untersuchung von natürlichen marinen bakteriellen Lebensgemeinschaften und Kulturen mariner Isolate Ergebnisse lieferte, die praktisch identisch mit den Ergebnissen der ebenfalls durchgeführten CTC-Essays waren (8 – 39 % als aktiv/intakt markierte Zellen, CHOI *et al.* 1996).

ZWEIFEL & HAGSTRÖM (1995) entwickelten eine Methode, die durch einen Waschschriff mit Isopropanol unspezifische Färbungen aus DAPI-Präparaten entfernen soll, so dass ausschließlich Zellen detektiert werden, die ein durch Fluoreszenz deutlich sichtbares Nukleoid aufweisen. Sie gehen davon aus, dass alle übrigen, sonst in DAPI-Präparaten detektierten Zellen nur Reste von DNA enthalten und mit großer Wahrscheinlichkeit nicht lebensfähige leere Zellhüllen („Ghosts“) repräsentieren. In natürlichen Meerwasserproben variierte die von ihnen gefundene relative Häufigkeit der Bakterien mit sichtbaren Nukleoiden zwischen 2 % und 32 % und entspricht damit in der Größenordnung dem typischerweise mit anderen Methoden in marinen Proben nachgewiesenen Anteil aktiver Zellen.

Dass der Status von Zellen ohne Nukleoid jedoch nicht prinzipiell irreversibel und diese Zellen somit nicht grundsätzlich als tote *Ghosts* zu betrachten sind, zeigte eine Untersuchung von CHOI *et al.* (1996), die nach Substratzugabe in eine unter Substratmangel stehende Kultur mariner Bakterienisolate einen deutlichen Zuwachs an Zellen mit sichtbarem Nukleoid beobachteten, ohne dass sich die Gesamtzahl der Zellen veränderte. KARNER & FUHRMAN (1997), die mittels *In-situ*-Hybridisierung von marinen Bakterioplanktonproben mit einer universellen 16S rRNA-Sonde durchschnittlich 56 % aller DAPI-gefärbten Zellen markieren konnten, im Mittel jedoch nur 29 % aller Zellen als nukleoidpositiv detektierten, kamen ebenfalls zu dem Schluss, dass nicht alle Zellen ohne Nukleoid irreversibel inaktiv bzw. tot sind.

Als Bilanz aller, meist an natürlichen Gewässerproben bzw. an statischen Kulturen gemachten Beobachtungen bezüglich der Aktivität bzw. Inaktivität von Bakterienzellen kann festgehalten werden, dass die Standardmethoden der Epifluoreszenzfärbung im Allgemeinen die Zahl der stoffwechselaktiven Bakterioplanktonzellen überschätzen, nicht alle als inaktiv ein-

gestuften Zellen jedoch irreversibel von allen Stoffumsetzungen ausgeschlossen sind und die gesamte Bandbreite möglicher physiologischer Zustände zwischen tot und kurzzeitig ruhend repräsentieren können (BARCINA *et al.* 1997; MCDUGALD *et al.* 1998).

Lebensfähigkeit und Kultivierbarkeit aquatischer Bakterien

Der Nachweis von Lebensfähigkeit und metabolischer Aktivität durch Kultivierung der Proben auf Agarplatten und CFU-Zählung gilt für Freilandproben nach wie vor als unbefriedigend, da die ermittelten CFU-Abundanzen im Allgemeinen deutlich geringer sind, als diejenigen der mit den unterschiedlichen Methoden als aktiv eingestuften Bakterien (MCDUGALD *et al.* 1998). Verschiedene Untersuchungen vor allem an statischen Kulturen, aber auch an einigen natürlichen Bakterioplanktongemeinschaften zeigen jedoch, dass hier die ermittelten CFU-Abundanzen gut bis sehr gut mit dem durch andere Parameter bestimmten Anteil der lebensfähigen/aktiven Zellen übereinstimmt.

So fanden ZWEIFEL & HAGSTRÖM (1995) eine perfekte Übereinstimmung der Abundanzen von CFU und Zellen mit sichtbaren Nukleoiden, sowohl in Reinkulturen von marinen Isolaten als auch in Mischkulturen aus natürlichen Inokula, deren mittels DAPI-Färbung bestimmte Gesamtzellzahl z.T. 2 - 3 mal höher war, als die Zahl der Nukleoidpositiven Zellen. In einer Reinkultur von *Staphylococcus aureus* in natürlichem Seewasser konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl Rhodamin-123-gefärbter (membranintakter) Zellen und der CFU-Zahl festgestellt werden (DIAPER & EDWARDS 1994). PYLE *et al.* (1995) beobachteten in verschiedenen Reinkulturen und natürlichen Quellwasserproben eine hochsignifikante Korrelation zwischen der Abundanz der CTC-aktiven Zellen und der CFU-Abundanz, deren Steigung (0.96) eine fast vollständige Übereinstimmung beider Parameter belegt. In eutrophem Flusswasser war die Anzahl der CFU nicht signifikant verschieden von der Anzahl der mit Hilfe von Chem B als enzymatisch aktiv bestimmten Bakterien und übertraf sogar die Zahl der mittels CFDA als aktiv klassifizierten Zellen (PORTER *et al.* 1995).

Der Verlust der Kultivierbarkeit konnte vor allem als eine Reaktion auf Umweltstress beobachtet werden, in erster Linie ausgeprägter Substratmangel, der in natürlichen Gewässerproben als häufig vorherrschender Zustand angenommen wird, was zu der Formulierung des **VBNC**-Konzeptes (*viable but nonculturable*) für Bakterien in natürlichen Habitaten führte (MCDUGALD *et al.* 1998; MCDUGALD *et al.* 1999). Dies erklärt auch, warum in Kulturen kaum eine Diskrepanz zwischen den aktiven und den kultivierbaren Zellen besteht, da im Allgemeinen ein vergleichbar extremer Substratmangel für einen gesicherten Fortbestand der Kultur vermieden wird. Speziell für Chemostatkulturen mit kontinuierlicher Substratzufuhr und Auswaschung nicht wachsender Zellen ist anzunehmen, dass der physiologische Zustand der verbleibenden, sich im Wachstum befindlichen Zellen ein hohes Maß an Kultivierbarkeit aller Zellen erlaubt. Unterstützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass Kulturen, die sich in der log-Wachstumsphase befinden, annähernd zu 100 % CTC-aktive Zellen aufweisen (CHOI

et al. 1996; SHERR *et al.* 1999). Hohe relative Kultivierbarkeit in Chemostaten (bezogen auf die Gesamtzellzahl) scheint vor allem dann aufzutreten, wenn die Chemostat-Bakteriengemeinschaften nicht durch die Substratzufuhr, sondern durch *Grazing* von Protozoen limitiert werden (SIMEK *et al.* 1997; HAHN & HÖFLE 1999). Während in diesen Chemostatsystemen, die sich durch niedrige Durchfluss- und daraus resultierende niedrige Wachstumsraten natürlicher Größenordnung auszeichnen, die Anzahl der CFU in hohem Maß mit der mittels DAPI detektierten Gesamtzellzahl übereinstimmte (zu ca. 80-100 %), erwies sich die Kultivierbarkeit in den substratlimitierten Chemostaten als deutlich geringer (ca. 30 %). Untersuchungen über den tatsächlich aktiven Anteil von Zellen in Chemostatkulturen mit Hilfe der zuvor erwähnten Methoden wurden bisher nicht durchgeführt, Modellsimulationen bestätigen jedoch die mögliche Persistenz von inaktiven bzw. langsam wachsenden Zellen in Chemostatsystemen unter der Voraussetzung, dass Inaktivität bzw. langsames Wachstum ein reversibler adaptiver Zustand in Bezug auf wechselnde Substratkonzentrationen ist (JÄGER *et al.* 1994; TANG *et al.* 1997).

Populationen aktiver, kultivierbarer Zellen und Rekrutierungspotential für aktive Zellen in den Chemostat-Lebensgemeinschaften

In den Chemostatexperimenten wiesen die Gesamtzellzahl (DAPI-Färbung) und die Anzahl der CFU ebenfalls die für diese zwei Parameter zuvor als charakteristisch beschriebene Diskrepanz auf. Die CFU-Abundanz betrug im Durchschnitt nur ca. 50 % der mittels DAPI detektierten Gesamtabundanz der Zellen. Diese Differenz entspricht in der Größenordnung, wie zuvor diskutiert, der Differenz, die vornehmlich unter Kulturbedingungen, aber auch im Freiland (vor allem in eutrophen Situationen), zwischen physiologisch aktiven und inaktiven Zellen aquatischer Bakterien beobachtet wurde.

Der physiologische Status der Zellen in den Chemostatproben wurde nicht direkt anhand einer der zuvor diskutierten Methoden überprüft; die in anderen Studien hauptsächlich für Kulturen belegte gute Übereinstimmung von plattenkultivierbaren und auf verschiedenste Weise als aktiv bzw. intakt charakterisierten Zellen erlaubt jedoch die Annahme, dass die CFU-Zählung eine gute Wiedergabe der aktiven, lebensfähigen Bakterienpopulation in den Chemostaten darstellt.

Als ein weiteres Indiz für die Existenz von Zellen unterschiedlichen physiologischen Status, der sich in reduzierter Kultivierbarkeit bemerkbar gemacht haben könnte, kann die Präsenz von *Ghosts* in den Proben gewertet werden. Als *Ghosts* wurden hier Zellen bezeichnet, die nach mehrmonatiger Lagerung der Proben bei DAPI-Färbung so geringe oder gar keine Fluoreszenz aufwiesen, dass sie im Durchflusszytometer ausschließlich durch ihr SSC- und Cy3-Signal als Bakterienzellen detektiert wurden. Die Antikörpermarkierbarkeit der Zelloberflächenepitope kann dabei als unabhängig von physiologischer Aktivität bzw. der Lebensfähigkeit der Zelle gelten (BOHLOOL & SCHMIDT 1980). Die *Ghosts* entsprachen also nicht ganz

der Definition von ZWEIFEL & HAGSTRÖM (1995), die diese von Zellen mit sichtbaren Nukleoiden abgrenzen.

Ein lagerungsbedingter Rückgang von DAPI-detektierbaren Bakterienzellen in Gewässerproben, die nicht tiefgefroren sondern Kühschranktemperaturen ausgesetzt sind, ist ein gut belegtes Phänomen, welches sich z. T., jedoch nicht ausschließlich, durch den Verlust von Zellen aus der Probensuspension durch Adhäsion an der Probengefäßwand erklären lässt (TURLEY & HUGHES 1992; TURLEY & HUGHES 1994; TROUSSELLIER *et al.* 1995; VOSJAN & VANNOORT 1998). Bei Formalinfixierung beträgt der Verlust typischerweise ca. 30 % (TROUSSELLIER *et al.* 1995; VOSJAN & VANNOORT 1998). Erkennbar bereits nach 1-2 Wochen, scheint für die mangelnde Färbbarkeit vor allem eine strukturelle Degeneration der DNA verantwortlich zu sein (VOSJAN & VANNOORT 1998). Die Untersuchung von VOSJAN & VAN NOORT (1998) ergab, dass praktisch ausschließlich Zellen ohne Nukleoid durch den Verlust von DAPI-markierbarer DNA betroffen waren, so dass sie längere Probenlagerung (≥ 7 Monate) als eine mögliche Alternative zur Bestimmung der Abundanz der nukleoidpositiven Zellen ansahen.

Die Bestimmung der Gesamtabundanzen für die Proben der Chemostatexperimente erfolgte am Epifluoreszenzmikroskop unmittelbar nach Beendigung der Experimente, also etwa nach 4 Wochen. Dies lässt erwarten, dass zu diesem Zeitpunkt zwar bereits mit einem gewissen Verlust der DAPI-Detektierbarkeit der Zellen zu rechnen, dieser jedoch noch nicht maximal ausgeprägt war. Zum Zeitpunkt der durchflusszytometrischen Bearbeitung der Proben (≥ 6 Monate Lagerung) war der Zeitraum überschritten, nach dem sich eine Stabilisierung der Abundanz der DAPI-detektierbaren Zellen beobachten lässt (ca. 2–3 Monate TURLEY & HUGHES 1994; TROUSSELLIER *et al.* 1995; VOSJAN & VANNOORT 1998). Dies legt den Schluss nahe, dass die durchflusszytometrisch als *Ghosts* klassifizierten Zellen bei der zuvor erfolgten Bestimmung der Gesamtabundanz mit erfasst wurden, möglicherweise jedoch Zellen repräsentieren, die zum Zeitpunkt der Probennahme keine Nukleide bzw. vergleichsweise geringe DNA-Mengen enthielten.

Das Phänomen von heterogenen Populationen bezüglich des zellspezifischen DNA-Gehaltes in Bakteriengemeinschaften ist sowohl aus Freilandbeobachtungen (BUTTON *et al.* 1996) als auch von Kultorexperimenten (DIAPER & EDWARDS 1994, siehe auch CHOI *et al.* 1996) bekannt und wurde als Folge von Substratlimitation beobachtet. Ein Auftreten von vergleichbaren Substratmangelerscheinungen war auch in den Chemostatexperimenten zu erwarten, besonders für die *Treatments* mit langen P-Pulsintervallen. Signifikante, treatmentspezifische Unterschiede in der relativen Häufigkeit der *Ghosts* insgesamt gab es nicht. Für KB 20 jedoch, den Stamm, der mit beiden stammspezifischen Quantifizierungsmethoden durchschnittlich mit den größten relativen Abundanzen detektiert wurde und zudem mit > 8 % im Mittel den höchsten relativen Anteil an *Ghosts* aufwies, war der *Ghost*-Anteil in *Treatments* mit langen (≥ 4 d) Pulsintervallen zwei- bis dreimal höher, als für *Treatments* mit kürzeren Pulsinterval-

len. Es ist also durchaus möglich, dass diese Beobachtung auf einer spezifischen Reaktion dieses Stammes auf Stress durch Substratmangel beruht.

Insgesamt betrachtet war der relative Anteil der *Ghosts* an der Gesamtzellzahl (durchschnittlich 2 %) nicht sehr hoch und kann die Diskrepanz zwischen CFU-Zählung und Direktzählung nicht vollständig erklären. Das Muster ihres Auftretens für den häufig dominanten Stamm KB 20 lässt jedoch vermuten, dass in den Bakterienpopulationen der Chemostaten nicht generell treatmentspezifische sondern auch stammspezifische Unterschiede in der Reaktion auf die fluktuierende P-Zufuhr auftraten, die entsprechend auch durch die Kultivierbarkeit der Zellen auf Agarplatten reflektiert wird.

Auffällig in diesem Zusammenhang ist, dass KB 20 bei der Kultivierung auf den Agarplatten deutlich (wenn auch nicht signifikant) gegenüber den Ergebnissen der Durchflusszytometerzählung unterrepräsentiert war. Die anderen Stämme, für die eine signifikant verringerte Detektierbarkeit durch CFU-Kultivierung zu beobachten war, traten alle nur in geringen Abundanzen auf, so dass die beobachteten Unterschiede möglicherweise auch auf den unterschiedlichen Probenumfang beider Quantifizierungsmethoden zurück zu führen ist.

Agarplatten mit hochkonzentrierten Medien im Vergleich zu den Flüssigkulturen, aus denen die ausplattierten Proben stammen, sollen eine ausgeprägte Selektivität bezüglich der taxonomischen Zusammensetzung der Kolonien aufweisen (WAGNER *et al.* 1993; KÄMPFER *et al.* 1996; SIMEK *et al.* 1997). In den drei genannten Untersuchungen wurde jeweils der gleiche Trend registriert: β -Proteobakterien waren, verglichen mit Ergebnissen der ebenfalls durchgeführten *In-situ*-Hybridisierung, stark unterrepräsentiert, während γ -Proteobakterien deutlich überrepräsentiert waren. Andere Studien wiederum belegen eine sehr gute Wiedergabe der taxonomischen Zusammensetzung von Proben durch CFU-Zählung, sowohl für die Klasse der β -Proteobakterien, als auch für die der γ -Proteobakterien (HAHN & HÖFLE 1998; HAHN & HÖFLE 1999). Für die β -Proteobakterien insgesamt, speziell auch für das β -Proteobakterium KB 20, war der in den Proben der Chemostatexperimente durch CFU-Kultivierung bestimmte relative Anteil ebenfalls niedriger, als der durch Direktzählung individuell markierter Zellen ermittelte. Der Unterschied war jedoch bedeutend geringer (Verhältnis 1:1.2) als der in den Freilandstudien von WAGNER *et al.* (1993; Verhältnis ca. 1:4) und KÄMPFER *et al.* (1996; Verhältnis ca. 1:7 bzw. 0:1). Die von ihnen beobachtete Verschiebung der relativen Häufigkeiten zugunsten der γ -Proteobakterien (Verhältnis ca. 2:1 bzw. 6:1) konnte für die Proben der Chemostatexperimente nicht bestätigt werden. Hier waren die mittels CFU-Zählung bestimmten relativen Anteile sogar geringfügig niedriger (Verhältnis 1:1.01).

Für alle α -Proteobakterien gemeinsam war in den Chemostatexperimenten, ebenso, wie in den zuvor genannten Studien von WAGNER *et al.* (1993), KÄMPFER *et al.* (1996) und SIMEK *et al.* (1997), kein signifikanter Unterschied zwischen den mit Hilfe von Direktzählung und Plattenzählungen gewonnenen Ergebnissen der relativen Abundanzen nachzuweisen. Eine äußerst markante Differenz war bei einzelner Betrachtung jedoch für das α -Proteobakterium KB 16 zu beobachten, welches durch die CFU-Zählung mit z. T. wesentlich höheren relativen

Abundanzen detektiert wurde, als mittels Durchflusszytometer. Dieses Missverhältnis trat vor allem in *Treatments* mit langen P-Pulsintervallen (≥ 4 d) auf, wenn gleichzeitig KB 20 durchflusszytometrisch in hoher relativer Häufigkeit nachgewiesen wurde. Eine Ursache hierfür liegt daher sicherlich in der zuvor für diesen Stamm diskutierten Diskrepanz, da eine Verschiebung der Werte zu höherer relativer Häufigkeit eines Organismus automatisch zu niedrigeren Werte für alle übrigen Organismus führt.

Ein weiterer Grund könnte eine vergleichsweise schlechtere Detektierbarkeit des Isolates KB 16 durch das Durchflusszytometer sein. KB 16 gehörte zu den Stämmen, die bei der Untersuchung der relativen Detektierbarkeit des Cy3-Signals von markierten Reinkulturen einen vergleichsweise niedrigen Wert aufwies (ca. 70 % gegenüber ca. 90 % im Durchschnitt). Zwei der drei schlechter detektierbaren Stämme (KB 16 u. KB 33) zeichneten sich durch vergleichsweise kleine Zellen aus, eine mögliche Erklärung für die eingeschränkte Detektierbarkeit durch geringere Intensität des Cy3-Signals.

Diese Beobachtungen legen nahe, dass in Kultursystemen, wie den Chemostaten, die in anderen Studien beobachtete taxonomische Verschiebung zwischen den Ergebnissen von Plattenzählung und Direktzählung nicht generell, wie angenommen (WAGNER *et al.* 1993; KÄMPFER *et al.* 1996), auf spezifischen funktionellen Unterschieden taxonomischer Großgruppen beruht. Erkennbar erst bei entsprechender taxonomischer Auflösung, sind vermutlich eher die spezifischen Eigenschaften einzelner Stämme maßgebend, die sowohl physiologischer Natur sein können als auch methodenbedingt Auswirkungen auf ihre Detektierbarkeit haben können.

Als Fazit der bisherigen Betrachtungen bezüglich der beiden auf die Chemostat-Lebensgemeinschaften angewandten stammspezifischen Quantifizierungsmethoden kann also folgende Annahme gelten:

Während die CFU-Zählungen im wesentlichen nur die zum Zeitpunkt der Probennahme aktive Population der Bakteriengemeinschaft erfasste, detektierte die Direktzählung der stammspezifisch immunfluoreszenzmarkierten Zellen die gesamte Population mit Individuen jedweden physiologischen Zustandes und beleuchtete somit, eine potentielle Reversibilität physiologischer Inaktivität vorausgesetzt, das Rekrutierungspotential für die aktiven Zellen.

4.2 Störung und Diversität

4.2.1 Einfluss des Störungsregimes auf die Zusammensetzung der Modell-Bakteriengemeinschaft: Taxonomische und funktionelle Aspekte

Die Organismen, die als die nächsten Verwandten der 14, in den Chemostatexperimenten eingesetzten Isolate ermittelt wurden, können auf Grund ihrer in der Literatur beschriebenen Herkunft als durchaus typische Vertreter einer planktischen Süßwasserbakterienlebensgemeinschaft angesehen werden. Ein Auftreten von ursprünglich eher als terrestrisch klassifizierten Organismen in Bakterioplanktonproben wird in diesem Zusammenhang als Ergebnis von Einspülung aus benachbarten terrestrischen Habitaten bewertet (BAHR *et al.* 1996). Aufgrund der durchgehend hohen genetischen Ähnlichkeit mit den Versuchsisolaten in Bezug auf das 16S-rRNA-Molekül ist es daher wahrscheinlich, dass auch die Versuchsorganismen für eine Süßwasserbakterioplanktongemeinschaft nicht untypisch sind. Die fünf taxonomischen Großgruppen, denen die Isolate angehören, sind ebenfalls typisch für planktische Bakteriengemeinschaften. Sequenzanalytische Untersuchungen von Bakterioplankton verschiedener limnischer Habitate zeigten, dass diese fünf Großtaxa üblicherweise zwischen 50 % und 80 % aller Planktonbakterien stellen (METHÉ *et al.* 1998). Die proportionale Zusammensetzung der Inokula spiegelte dagegen nicht die für Süßgewässer typischen Verhältnisse wider, was aufgrund der Art der Zusammenstellung auch nicht anders zu erwarten war. Alle Gruppen waren gleich stark vertreten (im Mittel 20 % \pm 3 % s.e.). Im Süßwasser dominieren im allgemeinen jedoch die β -Proteobakterien (METHÉ *et al.* 1998; GLÖCKNER *et al.* 1999), während die anderen Großtaxa vergleichsweise selten detektiert werden. Sequenzanalytischen Studien zufolge zählen die α -Proteobakterien nach den β -Proteobakterien jedoch zu den am häufigsten detektierten Planktonbakterien (METHÉ *et al.* 1998). Dieser Trend war, insgesamt betrachtet, auch kennzeichnend für die taxonomische Zusammensetzung der Chemostat-Lebensgemeinschaften.

Taxonomische Trends, die in Abhängigkeit von der Intervalldauer zwischen den P-Pulsen als signifikant für ein Großtaxon detektiert wurden, erwiesen sich vorwiegend als stammspezifisch bedingtes Phänomen. Auch zeigten die als funktionelle Gilden zusammengefassten Isolate keine einheitliche Struktur, was ihre jeweilige Zugehörigkeit zu den fünf vertretenen Großtaxa betraf. Bis zu drei verschiedene taxonomische Großgruppen konnten in einer Gilde vertreten sein. Ohne eine entsprechende taxonomische Auflösung bzw. nähere funktionelle Charakterisierung ist demnach von einer begrenzten Aussagekraft der in vielen Studien gemachten verallgemeinerten Angaben in Bezug auf die entsprechenden Großtaxa auszugehen. Als eine geeignete verallgemeinernde Betrachtungsebene, die über die rein taxonomische Beschreibung der Veränderungen der Zusammensetzung der Chemostat-Lebensgemeinschaften durch unterschiedliche Störungsregimes hinausgeht, wurde daher die funktionelle Struktur der Lebensgemeinschaften im Hinblick auf die stammspezifische minimale Generati-

onszeit g_{\min} angesehen. Als Ausdruck einer spezifischen Wachstumsstrategie der Isolate ist dieser Parameter auch geeignet, Hinweise auf die Mechanismen zu geben, die den Veränderungen der Lebensgemeinschaften zugrunde liegen.

In einem System, wie den Chemostaten, in dem die „Mortalität“ der kultivierten Organismen durch eine konstante Auswaschungsrate bestimmt ist, werden vor allem die Organismen aus dem Kulturgefäß entfernt, die kein Wachstum oder eine Wachstumsrate kleiner als die Auswaschungsrate aufweisen. Eine vollständige Entfernung von bestimmten Organismen aus der Lebensgemeinschaft ist demnach ein Prozess, der eine gewisse Zeit in Anspruch nimmt, bei fehlendem Wachstum jedoch exponentiell entsprechend der Durchflussrate des Chemostaten verläuft. Bei diskontinuierlicher Versorgung mit der limitierenden Ressource sind daher verschiedene Strategien denkbar, die ein Überdauern der Zeiträume ohne Nachschub der limitierenden Ressourcen und somit ein Verbleiben im System ermöglichen (SOMMER 1985; GAEDEKE & SOMMER 1986): Die „*Fast Growers*“ monopolisieren mit Hilfe hoher Substrataufnahmegeschwindigkeiten große Teile der vorübergehend zur Verfügung stehenden Ressource und setzen diese mit Hilfe von hohen Wachstumsraten in hohe Populationsdichten um. In Phasen ohne Wachstum können die vorher erreichten hohen Dichten die Verluste durch Auswaschung kompensieren. Die „*Storage Specialists*“ sind ebenfalls in der Lage, schnell große Mengen des limitierenden Substrates aufzunehmen, entkoppeln aber bis zu einem gewissen Grad die Aufnahme und das Wachstum. So ist es ihnen möglich, positive Nettowachstumsraten über intern gespeicherte Substrate aufrecht zu erhalten, wenn dies die externe Substratverfügbarkeit nicht mehr zulässt. Die Strategie der „*Affinity Specialists*“ besteht darin, dass ihre maximale Wachstumsrate zwar im Vergleich zu anderen Organismen sehr niedrig ist, sie aber eine so hohe Affinität für die Aufnahme des Substrates besitzen, dass sie ein Wachstum auch noch bei sehr niedrigen externen Substratkonzentrationen aufrecht erhalten können. Dass prinzipiell vergleichbare Strategien auch für planktische Bakterien speziell in Hinblick auf Phosphor als limitierende Ressource existieren, konnte VADSTEIN (1998) durch eine detaillierte Untersuchung wachstums- und substrataufnahmekinetischer Parameter an zwei Süßwasserisolaten bestätigen. Während die *Fast Growers* im r-K-Kontinuum (LAMPERT & SOMMER 1993) eher als r-Strategen zu bezeichnen sind, repräsentieren *Storage* und *Affinity Specialists* eher den Aspekt der K-Strategie.

Unterschiede in der Zusammensetzung der P-limitierten Chemostat-Lebensgemeinschaften in Abhängigkeit von der P-Pulsintervalllänge der *Treatments* lassen also erwarten, dass die verschiedenen *Treatments* die möglichen Strategien in unterschiedlicher Weise fördern.

Als eindeutiger Hinweis, dass die Entwicklung der Bakteriengemeinschaften in den Chemostaten in der Tat maßgeblich durch P-Limitation und die diskontinuierlich in Pulsen verabreichte Ressource P gesteuert war, können die Abundanzschwankungen sowohl der CFU als auch der Gesamtzellzahl gewertet werden, da sie, wenn es das Probennahmeraster zuließ, offensichtlich das zeitliche Muster der P-Pulse widerspiegeln. Es kann davon ausgegangen

werden, dass der pulsartig zugefügte Phosphor innerhalb kurzer Zeit (≤ 24 h, SHAFIK *et al.* 1998) praktisch vollständig von den Organismen aufgenommen wurde. Bei Pulsintervalllängen > 1 d stand diese Ressource zwischen zwei Pulsen, wenn überhaupt, also nur in äußerst geringen Konzentrationen zur Verfügung. Substratmangelstress war folglich umso ausgeprägter, je länger die Dauer des P-Pulsintervalls war.

Am Endpunkt der Experimente (nach mindestens 3 Pulszyklen für jedes *Treatment*) zeigten die Bakterioplanktongemeinschaften der Chemostatexperimente in Abhängigkeit von der P-Pulsintervalllänge der diskontinuierlichen P-Zufuhr deutliche Unterschiede in ihrer Zusammensetzung.

Die Ergebnisse beider zur Quantifizierung der Isolate verwendeten Methoden stimmten insofern überein, dass sie für beide Pole des Störungsgradienten (0.5 d, 1 d und ≥ 4 d) jeweils nur eine Gruppe von Spezialisten als die dominante detektierten, für ein mittellanges Intervall (ca. 2 d) dagegen eine Koexistenz von mindestens zwei funktionellen Gruppen zu beobachten war. Während beide Methoden jedoch übereinstimmend die Lebensgemeinschaften der *Treatments* mit kurzen Pulsintervallen (0.5 d, 1 d) als weitgehend von schnellwüchsigen Stämmen (Gilde G I) dominiert charakterisierten, wichen ihre Ergebnisse bei zunehmender Intervalllänge voneinander ab: Die Quantifizierung kultivierbarer Zellen dokumentierte bei ansteigenden Pulsintervalllängen vor allem eine signifikante Zunahme der relativen Häufigkeit langsam wachsender Stämme (Gilde G III), die Zählung aller vorhandenen Zellen wies bei Pulsintervalllängen ≥ 4 d dagegen erneut auf eine Dominanz schnellwachsender G-I-Organismen hin. Eine tendenziell erhöhte relative Abundanz einer dritten funktionellen Gruppe von mittelschnell wachsenden Bakterienstämmen (Gilde G II) bei mittellangen Pulsintervallen (2 d) wird nur durch die Ergebnisse der CFU-Zählung gestützt.

Eindeutig belegt scheint demnach nur zu sein, dass die Strategie der *Fast Growers* vor allem in *Treatments* mit kurzen Pulsintervallen erfolgreich ist und zu einer Dominanz dieser Organismen führt. Werden die Unterschiede in den Ergebnissen jedoch dahingehend interpretiert, dass die durch Kultivierung auf Agarplatten erfassten Zellen vor allem den physiologisch aktiven Teil der Gesamtpopulation widerspiegeln (vergl. 4.1), erschließen sich zusätzliche Hinweise auf unterschiedliche Strategien, die den Organismen bei längeren Pulsintervallen im Umgang mit der zeitlich heterogenen Ressourcenversorgung zur Verfügung standen.

Eine zunehmende relative Häufigkeit von G-III-Organismen bei zunehmender Intervalllänge zwischen den P-Pulsen, wie sie die Ergebnisse der CFU-Zählung aufzeigen, kann als ein Indiz für die Präsenz von zwei möglichen Strategien gewertet werden, die ein Minimum an Aktivität (und somit Kultivierbarkeit) trotz wachsendem Substratmangelstress ermöglichen: *Affinity Specialists* könnten bei geringster Substratverfügbarkeit Wachstumsraten aufrecht erhalten, die zumindest die Verluste durch Auswaschung ausgleichen, während *Storage Specialists* eine Wachstumsaktivität über intern gespeicherte Ressourcenvorräte des zuletzt verabreichten Pulses aufrechterhalten.

Die zunehmende durch die CFU-Zählung belegte Dominanz von G III in *Treatments* mit zunehmender P-Pulsintervalldauer war vor allem auf die Gegenwart des Isolates KB 16 zurückzuführen. Dieses Isolat wies in der phylogenetischen Analyse eine hohe Sequenzähnlichkeit mit den Organismen *Brevundimonas aurantiaca* (98.4 %) und *B. vesicularis* (97.9 %) auf und lag, was für Arten dieser Gattung typisch ist, innerhalb des *Caulobacter-Clusters* (ABRAHAM *et al.* 1999; SLY *et al.* 1999). Die Vertreter der Gattung *Caulobacter* (im engeren Sinn ausschließlich auf Süßwasserorganismen bezogen) gelten als typische Bewohner oligotropher Habitats (ABRAHAM *et al.* 1999) und auch *B. vesicularis* wurde vor allem aus nährstoffarmen Umgebungen isoliert (z. B. VACHEE *et al.* 1997; JAYASEKARA *et al.* 1998; ABRAHAM *et al.* 1999; JAYASEKARA *et al.* 1999). Es ist daher durchaus wahrscheinlich, dass KB 16 als ein Vertreter der *Affinity Specialists*, möglicherweise auch als *Storage Specialist*, in jedem Fall jedoch als ein Spezialist für Substratmangelsituationen angesehen werden kann. Dieser Stamm wies außerdem bei mikroskopischer Inspektion die beiden unterschiedlichen Zelltypen auf, die für den obligaten dimorphen Zellzyklus vieler Vertreter dieser taxonomischen Gruppe typisch sind (ABRAHAM *et al.* 1999): einen gestielten Zelltyp, der sessil und ausschließlich für die Reproduktion verantwortlich ist und nicht-reproduktive, begeißelte Schwärmerzellen. Besonders ausgeprägt ist die Ausbildung des Zellstieles (Prostheca) unter P-Mangel. Sie wird als eine spezielle Anpassung betrachtet, die über die Erhöhung des Oberflächen-/Volumenverhältnisses die Effektivität der P-Aufnahme steigern soll (GONIN *et al.* 1999); KB 16 ist demnach wahrscheinlich als *Affinity Specialist* anzusehen. Einen direkten Hinweis, inwieweit dieses Isolat auch auf die Speicherung von Phosphor spezialisiert ist, gibt es nicht; KAWAHARASAKI *et al.* (1999) konnten in Klärschlamm jedoch, neben der Gruppe der grampositiven Bakterien mit hohem G+C-Gehalt, nur für α -Proteobakterien Polyphosphatspeicherung nachweisen, nicht jedoch für die zahlenmäßig dominanten β -Proteobakterien und seltenen γ -Proteobakterien.

Die halb sessile Lebensweise von KB 16 mit der Möglichkeit zur Rekolonisation des gesamten Kulturvolumens bietet diesem Organismus außerdem ein Refugium vor der Auswaschung aus dem Chemostatsystem, was seine Anreicherung bei zunehmendem Substratmangel plausibel macht. Anheftung an die Oberflächen des Kulturgefäßes und mögliche Rekolonisation des Kulturvolumens erklärt auch, warum Organismen, deren minimale Generationszeit als > 1 d bestimmt wurde (alle Vertreter von G III) sich in Chemostaten halten können, deren Durchflussrate ca. 0.69 d^{-1} beträgt und theoretisch somit nur eine Präsenz von Organismen mit $g_{\min} \leq 1 \text{ d}$ zulassen.

G-I-Organismen waren, wie durch die Immunofluoreszenzmarkierung gezeigt wurde, auch in den *Treatments* mit längeren Pulsintervallen ($\geq 4 \text{ d}$) abundant in den Lebensgemeinschaften vorhanden. Wird die Kultivierbarkeit als ein Maß für die physiologische Aktivität der Bakterienzellen in den Chemostatkulturen gedeutet, bedeutete ihre mangelnde Kultivierbarkeit jedoch, dass sie aufgrund von Stress durch Substratmangel am Ende des Pulszyklus zum großen Teil nicht aktiv waren. Unterstützt wird dies durch die Tatsache, dass der relative Anteil

der *Ghosts* des Isolates KB 20, dessen Abundanz am stärksten mit der Abundanz von G I korreliert war, in den *Treatments* ≥ 4 d signifikant gegenüber *Treatments* mit kürzeren P-Pulsintervallen erhöht war und dieses Isolat von den abundanten Stämmen gleichzeitig die schlechteste Kultivierbarkeit in diesen *Treatments* aufwies. Die deutliche Zunahme kultivierbarer (= aktiver) Zellen, die nach der Gabe von P-Pulsen in einem 4-d- und zwei 8-d-*Treatments* zu beobachten war, rekrutierte sich jedoch vor allem aus den Gilden der schnellwüchsigen und mittelschnellwachsenden Organismen. Dies bedeutet, dass entweder der Zustand der Inaktivität reversibel war oder die Rekrutierung auf einen sehr geringen Teil aktiver/lebensfähiger Zellen dieser Gilden zurückging. Eine mögliche Strategie, in *Treatments* mit länger andauernden Intervallen zwischen Pulsen der limitierenden Ressource zu überdauern, scheint also ein „Refugium“ aus hohen Abundanzen zu sein, das die *Fast Growers* unmittelbar nach einer pulsartigen Substratzufuhr aufbauen. Dies verhindert, dass die betreffenden Organismen, trotz Stagnation des Wachstums, vollständig ausgewaschen werden und so ein Potential rekolonisierungsfähiger Zellen bis zum Auftreten des nächsten Ressourcenpulses vorhanden ist.

Für ein „Überleben“ der Organismen in *Treatments* mit langen Pulsintervallen (≥ 4 d) gab es demnach nicht nur eine mögliche erfolgreiche Strategie. Sowohl G-III-Organismen mit langsamem Wachstum und vermutlich hoher Affinität für Phosphor bzw. P-Speicherkapazität (*Affinity* bzw. *Storage Specialists*) als auch Vertreter von G I (*Fast Growers*) war ein Verbleiben im Chemostatsystem bis zum nächsten Ressourcenpuls möglich. Zahlenmäßig dominierten in diesen *Treatments* an den Endpunkten der Sukzession zwischen den P-Pulsen die G-I-Organismen, typische r-Strategen. Die metabolische Aktivität der Bakteriengemeinschaften wurde zu diesen Zeitpunkten vermutlich jedoch von G-III-Organismen, Vertretern der K-Strategie, dominiert.

Die Tatsache, dass sich die funktionelle Struktur der Bakteriengemeinschaften bezüglich ihrer Wachstumstypen in Abhängigkeit von der Intervalldauer zwischen den P-Pulsen veränderte, liefert eine klare Bestätigung von Konkurrenz um die limitierende Ressource als einen grundlegenden Mechanismus, der für die Veränderungen der taxonomischen Zusammensetzung und somit der Diversität in den Chemostat-Modell-Lebensgemeinschaften verantwortlich war. Somit wird auch der diskrete Wechsel der Konkurrenzbedingungen, der durch die pulsartige P-Zufuhr erreicht wurde, als maßgebliche Störung identifiziert, die Unterschiede in der Diversität dieser Lebensgemeinschaften erzeugte.

Das beobachtete Muster der funktionellen Strukturveränderung der Chemostat-Lebensgemeinschaften, wie es insbesondere durch die Untersuchung der als metabolisch aktiv bewerteten Bakterien belegt ist, stimmt mit dem von der IDH als Grund für störungsregimebedingte Diversitätsänderungen angenommenen überein. CONNELL (1978), der die funktionellen Organismengruppen im Hinblick auf ihr charakteristisches Auftreten im Ablauf von Sukzessionen bewertet, beschreibt eine Dominanz von Kolonisierungsspezialisten mit kurzen Gene-

rationszeiten für häufig gestörte und ein Vorherrschen von klimatypischen Organismen mit hoher Effizienz in der Konkurrenz um limitierende Ressourcen bzw. Resistenz gegen Absterben für selten gestörte Lebensgemeinschaften. Bei mittlerer Störungshäufigkeit können Vertreter beider Strategien koexistieren und eine Rekrutierung zusätzlicher Organismen, die keinen der beiden Gegenpole verkörpern, ist möglich (CONNELL 1978). Die durch Immunfluoreszenz belegte abundante Persistenz von schnellwüchsigen G-I-Organismen auch bei langen Störungsintervallen belegt dabei den interessanten Aspekt, dass eine Resistenz gegen Mortalität (im Chemostaten Eliminierung aus dem System), die typischerweise mit späten Sukzessionsstadien und K-Strategen assoziiert wird, durchaus auch mit Hilfe einer „klassischen“ r-Strategie erreicht werden kann.

Während Beschreibungen von einer Änderung der taxonomischen Zusammensetzung von Lebensgemeinschaften im Zusammenhang mit Störungen zahlreich sind, gibt es vergleichsweise wenige Studien, die über eine funktionelle Charakterisierung der untersuchten Organismen direkte Anhaltspunkte für die zugrunde liegenden Mechanismen von Diversitätsveränderungen liefern können. Viele Studien dieser Art stammen aus dem Bereich der limnischen Ökologie.

So konnte SOMMER (1985) die Unterschiede der Artenzusammensetzung und Diversität von Phytoplanktongemeinschaften in Chemostaten mit gepulster und kontinuierlicher P-Zufuhr durch die in einer zuvor durchgeführten Studie erfolgte Charakterisierung der Algen hinsichtlich ihrer wachstumskinetischen Parameter und ihre dadurch verkörperten unterschiedlichen Konkurrenzstrategien erklären. FLÖDER (1999) untersuchte natürliche Phytoplanktongemeinschaften in Mesokosmen, die mit unterschiedlicher Frequenz künstlich durchmischt wurden, bezüglich der möglichen vertikalen Mobilität der Phytoplankter und beobachtete eine signifikante positive Korrelation von Mobilität mit zunehmender Durchmischungshäufigkeit. Mobilität als Strategie, durchmischungsbedingte Lichtlimitation zu vermeiden, wurde als eine der möglichen Ursachen interpretiert, die für die Unterschiede der Phytoplanktonzusammensetzung in den unterschiedlichen Durchmischungs-*Treatments* verantwortlich war. In Anlehnung an die Übertragung des Konzeptes der terrestrischen Sukzession auf Phytoplanktongemeinschaften von REYNOLDS (1988) ordneten BARBIERO *et al.* (1999) bestimmten Phytoplanktonassoziationen unter Berücksichtigung von Langzeitbeobachtungen des von ihnen untersuchten Gewässers fixe Positionen in der Sukzessionsentwicklung (durch Zahlen gekennzeichnete „Sukzessionstage“) zu. Bei der Analyse von sukzessionalen Entwicklungen und Diversitätsänderungen des Phytoplanktons nach Sturmereignissen konnten sie auf diese Weise feststellen, dass, unabhängig vom jahreszeitlichen Auftreten der Stürme, die Arten, die zur Diversitätserhöhung nach solchen Ereignissen beitrugen, nur für eine begrenzte Sukzessionsphase (Ende Mai-Anfang Juli in gemäßigten Breiten) typisch sind. Diese Beobachtung verdeutlicht, dass der Effekt von Störungen nicht generell in der Zurücksetzung des normalen Sukzessionsablaufes besteht, sondern dass ganz spezielle funktionelle Organismen, die eine ganz bestimmte Sukzessionsphase kennzeichnen, selektiv profitierten.

Eine Charakterisierung von Zooplanktonorganismen hinsichtlich der Geschwindigkeit, mit der sie in der Lage sind, Abundanzmaxima ihrer Populationen aufzubauen (*population development period, PDP*), wurde von ECKERT & WALZ (1998) vorgenommen. Abundantes Auftreten von Zooplanktern mit kurzen PDP (Rotatorien) war korreliert mit Phasen häufig auftretender starker Windereignisse (Windgeschwindigkeiten $> 2.5 \text{ m s}^{-1}$, keine dauerhafte Etablierung einer Thermokline), während hohe Cladocerenabundanzen, Organismen mit vergleichsweise längeren PDP, mit Phasen seltener stärkerer Windereignisse (stabile Thermokline) gekoppelt war. Zwischen windbedingten Störungsereignissen war eine Sukzessionsabfolge von Organismen mit kurzen PDP hin zu solchen mit längeren PDP zu beobachten. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass auch für Zooplankter, die eine höhere trophische Ebenen als Primärproduzenten repräsentieren, unterschiedliche Strategien im Umgang mit störungsbedingter diskontinuierlicher Ressourcenverfügbarkeit existieren, die unterschiedliche Pole des r-K-Spektrums reflektieren.

Einen Eindruck von der Komplexität möglicher Strategien über das Konzept des r-K-Kontinuums hinaus, die die meist komplexen Auswirkungen natürlicher Störungen berücksichtigt, geben die Studien von BIGGS *et al.*, die unterschiedlich stark von Überflutungsereignissen betroffene Bachperiphytongemeinschaften untersuchten (BIGGS *et al.* 1998 A; BIGGS *et al.* 1998 B). Um den Interaktionen von Ressourcenverfügbarkeit und störungsbedingter Beeinträchtigung der Organismen sowie Interaktionen verschiedener Störungen (hier Scherstress bzw. Auswaschung durch Flutereignisse und *Grazing*) Rechnung zu tragen, entwickelten sie in Anlehnung an GRIMES **C-S-R**-Konzept (*competitive ability, stress tolerance, ruderal strategy*; GRIME 1977) für Konkurrenzstrategien in terrestrischen Sukzessionen ein mehrdimensionales Matrix-Modell. Die anhand dieses Habitat-Matrix-Modells vorgenommene funktionelle Klassifizierung der Periphytonorganismen erwies sich als sehr gut geeignet, die Zusammensetzung und Diversität der Organismengemeinschaften der unterschiedlichen Standorte zu deuten.

In Übereinstimmung mit CONNELLS (1978) Annahmen bestätigen die genannten Studien, dass die funktionellen Eigenschaften von Organismen, die die Zusammensetzung von Lebensgemeinschaften unter dem Einfluss von Störungsregimes bestimmen, zum einen in der Konkurrenzfähigkeit um limitierende Ressourcen entweder durch schnelles Populationswachstum oder hoher Effizienz in der Ressourcennutzung, zum anderen in der Resistenz gegen Schädigung durch Störung bestehen.

Belege für funktionelle Veränderungen von Bakterioplanktongemeinschaften gibt es vor allem im Zusammenhang mit Fraßdruck durch andere Planktonorganismen. So führt die Präsenz von bakterivoren Protozoen (SIMEK *et al.* 1997; HAHN & HÖFLE 1998; HAHN & HÖFLE 1999; SIMEK *et al.* 1999), aber auch die von Metazoen (JÜRGENS 1994; JÜRGENS *et al.* 1999), zu deutlichen Veränderungen der morphologischen Struktur des Bakterioplanktons. Als Strategien der Fraßresistenz in dieser Hinsicht erwiesen sich kleinste oder vergleichsweise große Zellen bzw.

komplexe Wuchsformen. Auch scheint die Fähigkeit, hohe Wachstumsraten zum Ausgleich für hohe Mortalitätsraten zu entwickeln, als Strategie zu existieren (PERNTHALER *et al.* 1997; SIMEK *et al.* 1997). Aber auch andere Resistenzstrategien sind als wahrscheinlich anzunehmen. Einen ausführlichen Überblick zu diesem Thema geben JÜRGENS & GÜDE (1994). Experimente mit kontrollierter Zusammensetzung der untersuchten Modellgemeinschaften (HAHN & HÖFLE 1998; HAHN & HÖFLE 1999) und Untersuchungen mit großtaxonspezifischen Oligonukleotidsonden (PERNTHALER *et al.* 1997; SIMEK *et al.* 1997; JÜRGENS *et al.* 1999; SIMEK *et al.* 1999) weisen darauf hin, dass bei den beobachteten morphologischen Veränderungen taxonomische Verschiebungen in der Lebensgemeinschaft eine Rolle spielen. Generell ist davon auszugehen, dass selektive Prädation ein grundlegender Mechanismus ist, der Bakteriendiversität beeinflusst. Das Ausmaß prädationsbedingter Diversitätsänderungen konnte aufgrund der Schwierigkeiten, Bakteriendiversität zu messen, bisher jedoch noch nicht erfasst werden.

Studien, die zeigen können, dass eine Koexistenz von aquatischen Bakterien bei diskontinuierlicher Ressourcenzufuhr auf unterschiedlichen Konkurrenzstrategien beruht und somit auch die zuvor für andere Systeme diskutierten Mechanismen für Diversitätsänderungen in Bakteriengemeinschaften in Frage kommen, gibt es bisher kaum. Sie beschränken sich auf Modellgemeinschaften geringer Komplexität (jeweils nur zwei der getesteten Stämme in Kokultur) und wurden, mit einer Ausnahme (KURIHARA *et al.* 1990), unter intensiven Kulturbedingungen (hohe Temperaturen von 35 - 37 °C und hohe Chemostatdurchflussraten im Bereich von Stunden) durchgeführt (LEEGWATER 1983; VAN DER HOEVEN *et al.* 1985), die den Bedingungen in natürlichen aquatischen Habitaten wenig vergleichbar sind. VAN DER HOEVEN *et al.* (1985) konnten zeigen, dass sich die Konkurrenzfähigkeit von drei verschiedenen, in Chemostaten kokultivierten *Streptococcus*-Stämmen veränderte, je nachdem, ob das limitierende Substrat Glucose kontinuierlich oder gepulst verabreicht wurde. Dauerhafte Koexistenz zweier Stämme konnte nur unter gepulster Substratzufuhr erreicht werden. Als Ursachen für diesen Befund konnten Unterschiede der drei getesteten Stämme sowohl bezüglich ihrer Substrataffinität als auch der maximalen Aufnahme rate identifiziert werden. Zu ähnlichen Ergebnissen kam LEEGWATER (1983), die, ebenfalls in Chemostaten, die Konkurrenzfähigkeit von *Klebsiella aerogenes*, *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* bei kontinuierlicher bzw. gepulster Glucosezufuhr testete.

Die Verschiebung der Konkurrenzfähigkeit bzw. Koexistenz von planktischen Bakterien durch diskontinuierliche Substratzufuhr ist, abgesehen von Untersuchungen zur Konkurrenz zwischen Phyto- und Bakterioplankton (z. B. ROTHHAUPT & GÜDE 1992; SHAFIK *et al.* 1998), nur durch die Studie von KURIHARA *et al.* (1990) belegt. Sie erreichten durch serielle Verdünnungsschritte im Abstand von drei Tagen für unterschiedliche Kombinationen von je zwei Bakterienstämmen von insgesamt vier getesteten Isolaten aus gemischten aquatischen Langzeitkulturen eine dauerhafte Koexistenz in statischen Kulturen. Wurde ein kürzerer Ver-

dünnungsabstand (12 h) gewählt, war nach einigen Verdünnungsschritten nur noch ein Stamm in der Kultur nachzuweisen. KURIHARA *et al.* identifizierten nicht, wie zuvor beschrieben, unterschiedliche stammspezifische Strategien, sondern konnten für jeden Stamm einzeln einen „Trade off“ zwischen der spezifischen Wachstumsrate r und der erreichten Sättigungszellkonzentration K nachweisen, der, je nach Kombination der koexistierenden Stämme, unterschiedlich stark ausgeprägt war.

In der vorliegenden Arbeit war die wachstumskinetische Charakterisierung der verwendeten Versuchsorganismen nicht so detailliert, wie in den zuvor für Bakterien diskutierten Studien. Die Bestimmung des Parameters g_{\min} erlaubte jedoch eine klare funktionelle Klassifizierung, die auf eine Vergleichbarkeit der durch diese Studien unter Bedingungen diskontinuierlicher Ressourcenverfügbarkeit identifizierten Konkurrenzstrategien und Mechanismen für Artenverschiebungen schließen lässt. Diese Arbeit ist somit bisher die einzige Studie, die eine Veränderung der Diversität durch eine störungsbedingt erleichterte Koexistenz für eine Lebensgemeinschaft natürlicher Bakterioplanktonorganismen nachweisen konnte, deren Komplexität über ein 2-Arten-System deutlich hinausgeht.

4.2.2 Einfluss des Störungsregimes auf die Diversität: Relevanz von Beobachtungsparameter und Beobachtungsskalen

4.2.2.1 Adäquate Beobachtungsparameter und Beobachtungszeiträume

Um zu untersuchen, ob das Auftreten von unimodalen Diversitätsmustern im Sinne der IDH, sowohl in Abhängigkeit von der Störungshäufigkeit als auch im Verlauf der Sukzession zwischen zwei Störungen, für die experimentellen Chemostat-Modellsysteme nachzuweisen war, wurden unterschiedliche Diversitätsparameter herangezogen: Die Artenzahl S , die von Connell bei der Formulierung der IDH in seinen Belegstudien herangezogen wurde, zwei Derivate von Simpsons Diversitätsindex D , die neben der Artenzahl die *Evenness* berücksichtigen ($1/D$, $1-D$) und der taxonomische Diversitätsindex \mathbf{D} , der die durch $1-D$ beschriebene Diversität mit der Information über die durchschnittliche phylogenetische Distanz der Organismen einer Lebensgemeinschaft verbindet.

Die beobachteten Diversitätsmuster waren für die verschiedenen Diversitätsparameter nicht einheitlich. Auch waren unterschiedliche Trends zu beobachten, je nachdem, zu welchem Zeitpunkt des Experimentes das experimentelle System betrachtet wurde.

Während der Parameter S zu Beginn, nach einem Intervallzyklus, der auch die *Treatments* mit den beiden längsten P-Pulsintervallen einschloss, einen signifikanten unimodalen Trend aufwies, verlor sich dieser Trend im weiteren experimentellen Verlauf. Am Endpunkt des Experimentes war für S übereinstimmend durch keine der beiden zur stammspezifischen Quantifizierung der Isolate verwendeten Methoden eine signifikante Beziehung zur Störungshäufigkeit nachzuweisen, weder linear noch unimodal.

Anders verhielt sich dies für die anderen Diversitätsparameter, die neben der Artenzahl auch die Artenabundanzverteilung berücksichtigen. Während $1/D$, $1-D$ und D am Ende des Experimentes eine deutliche unimodale Antwort in Abhängigkeit von der Störungshäufigkeit zeigten, war dieser Trend vor diesem Zeitpunkt nicht nachzuweisen. Wurden signifikante Trends detektiert, handelte es sich um positive lineare Korrelationen des jeweiligen Diversitätsparameters mit der Störungsintervalllänge. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Zählung immunfluoreszenzmarkierter Zellen und der CFU-Zählung stimmten grundsätzlich in den für diese Parameter beobachteten Trends überein; während jedoch die mit Hilfe der CFU-Zählung ermittelten unimodalen Funktionen am Versuchsendpunkt für alle drei Indizes signifikant waren, traf dies bei den Ergebnissen der Durchflusszytometerzählung nur für D zu.

Die Diskrepanz zwischen den durch S und den durch die Diversitätsindizes detektierten Diversitätsmustern spiegelte sich auch in den Relationen der verschiedenen Parameter untereinander wieder. Während $1-D$ und D , als exemplarische Beispiele für Diversitätsparameter mit *Richness*- und *Evenness*-Komponente, eine starke positive Korrelation aufwiesen, war keinerlei signifikante Beziehung für S zu $1-D$ bzw. D zu beobachten.

In Bezug auf die Diversitätsentwicklung zwischen zwei Störungen, die anhand der Ergebnisse der CFU-Zählung für vier Chemostat-Lebensgemeinschaften dokumentiert werden konnte, waren die beobachteten Muster für die drei betrachteten Parameter, S , $1-D$, und D , jedoch einheitlich. Für alle konnte ein signifikanter unimodaler Trend für den letzten Störungszyklus nachgewiesen werden, wobei eine Verstärkung des Trends von S über $1-D$ zu D zu verzeichnen war. Für den Zyklus unmittelbar davor war kein derartiger unimodaler Verlauf der Diversitätsänderung zu verzeichnen.

Ob unimodale Diversitätsmuster, wie sie die IDH postuliert, auch tatsächlich nachgewiesen werden können, scheint demnach davon abzuhängen, welcher Diversitätsparameter als Variable untersucht wird, und zu welchem Zeitpunkt nach Etablierung einer Lebensgemeinschaft bzw. nach wie vielen Störungszyklen die Diversität betrachtet wird.

Dies wirft zunächst die Frage auf, welche Relevanz die verschiedenen Parameter für die Kernaussagen der Hypothese haben. In den meisten Studien, die sich auf die IDH beziehen, wird neben der Artenzahl mindestens noch ein weiterer Diversitätsparameter, der auch die Dominanzstruktur der untersuchten Lebensgemeinschaften erfasst, in die Betrachtung einbezogen. In den meisten Fällen handelt es sich hierbei um Shannon-Weavers H' , der sich als bekanntester und am häufigsten verwendeter Diversitätsindex durchgesetzt hat (WASHINGTON 1984). Ebenso, wie in der vorliegenden Arbeit, erwiesen sich in vielen Fällen die Ergebnisse beider Arten von Diversitätsparametern in Bezug auf eine Bestätigung der IDH als nicht übereinstimmend (z. B. ROBINSON & SANDGREN 1983; ARONSON & PRECHT 1995; DEATH & WINTERBOURN 1995; FAYOLLE *et al.* 1998; PELTZER *et al.* 2000).

CONNELL selbst macht keine explizite Aussage darüber, wie Diversität in bezug auf seine Annahmen am sinnvollsten zu quantifizieren ist. Er sieht die Artenzahl operational als einen

„Indikator für Diversität [...], der fast immer eng mit Indizes korreliert ist, die auf der relativen Abundanz der Arten basieren“ (CONNELL 1978). SOMMER (1995) argumentiert, dass die einzige korrekte Variable, um im Zusammenhang mit der IDH die Koexistenz von Arten zu belegen, die Artenzahl sei, die keine stärkere mathematische Gewichtung der häufigen gegenüber den seltenen Arten bewirkt. CONNELL jedoch sieht nicht in erster Linie Koexistenz als Gegenstand seiner Betrachtung, sondern „[Diversität als] einen Aspekt der Struktur von Lebensgemeinschaft[en]“ (CONNELL 1978). Da Konkurrenz, nach CONNELLS Ansicht ein grundlegender Mechanismus für Diversitätsänderungen, von den einzelnen Organismen einer Lebensgemeinschaft nicht nur inter- sondern auch intraspezifisch erfahren wird, ist die relative Abundanz der Arten als wichtiges Charakteristikum der Struktur einer Lebensgemeinschaft nicht zu vernachlässigen.

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Rarefaktionsanalyse und Monte-Carlo-Simulation demonstrieren zudem anschaulich, dass sich der Parameter Artenzahl in Abhängigkeit vom Probenumfang als am wenigsten robust erweist, was durch andere Studien bestätigt wird (LANDE 1996). Ob eine Antwort der Variable S im Sinne der IDH nachgewiesen wird oder nicht, hängt somit unter Umständen von der Beprobungsintensität ab (MACKEY & CURRIE 1997; MACKEY & CURRIE 2000). Gestützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass die Durchflussszytometerzählung, die sich mit ca. 5000 pro Probe gezählten Individuen durch sehr große Probenumfänge auszeichnete, durchgängig für alle *Treatments* praktisch alle im Inokulum eingesetzten Arten wiederfand. Dies stimmt mit der Beobachtung von PADISÁK (1992) überein, dass seltene Phytoplankter anhand üblicher Probengrößen oft nicht durchgehend detektiert werden, aber dennoch im Phytoplankton vorhanden sind.

Die Bedeutung des Parameters Artenzahl liegt daher bei ausreichender Beprobungsintensität wohl in erster Linie in der Reflektion des Artenpotentials, das zur Rekrutierung zur Verfügung steht. Die Tatsache, dass die Diversität für die Chemostat-Lebensgemeinschaften in den Störungszyklen, in deren Verlauf ein unimodales Diversitätsmuster detektiert werden konnte, kurz nach der Störung ein Niveau erreichte, welches annähernd dem des ursprünglichen Inokulums entsprach, unterstützt diese Annahme.

Von den gebräuchlichen Diversitätsindizes, die neben der Artenzahl auch die *Evenness* der Artenabundanzverteilung berücksichtigen, weist der Index $1-D$ bei unterschiedlichen Abundanzverteilungen die größte Robustheit in Bezug auf unterschiedliche Probengrößen auf (LANDE 1996; MOUILLLOT & LEPRETRE 1999). Auch der taxonomische Diversitätsindex D zeichnet sich auf Grund seiner mathematischen Ähnlichkeit zu $1-D$ durch statistische Robustheit aus (CLARKE & WARWICK 1998). Dieser Befund wird durch die Ergebnisse der für die Chemostatproben durchgeführten Monte-Carlo-Simulation bestätigt, in der die Indizes $1-D$ und D die geringste Beeinflussung durch die Probengröße zeigten. Die effektive Artenzahl $1/D$, die von KREBS (1998) auf Grund der anschaulichen Dimension empfohlen wird, erwies sich dagegen als stärker von der Probengröße beeinflusst.

Die Variablen $1-D$ und D werden daher als adäquate Diversitätsparameter angesehen, um störungsbedingte Diversitätsveränderungen in Lebensgemeinschaften zu untersuchen. Der üblicherweise in vielen Studien gebrauchte Shannon-Weaver-Index H' wurde nicht verwendet, da er auf Grund seiner weniger robusten statistischen Eigenschaften als problematisch gilt (LANDE 1996; MOUILLOT & LEPRETRE 1999). Auch wird die ökologische Relevanz seiner Charakterisierung einer Lebensgemeinschaft bezüglich ihres Informationsgehaltes bezweifelt (HURLBERT 1971; WASHINGTON 1984).

Bisher nur in wenigen Studien eingesetzt, ist für den taxonomischen Diversitätsindex D noch wenig bekannt, inwieweit seine Eigenschaften eine Detektion charakteristischer Unterschiede in der taxonomischen Struktur und Diversität von Lebensgemeinschaften erlauben. Ursprünglich wurde der Index D von WARWICK & CLARKE (1995) entwickelt, um im Zusammenhang mit Umweltbelastung für marine Benthoslebensgemeinschaften Strukturveränderungen zu detektieren, die sich nicht in der Artenzahl und Artenabundanzverteilung widerspiegeln. Die zu Grunde liegende Annahme besteht darin, dass sich die genetische Struktur von Organismengemeinschaften „instabiler“, Umweltstress ausgesetzter Habitate von denen stabiler Habitate unterscheidet. Für marine Nematoden konnten WARWICK & CLARKE (1998) zeigen, dass unterschiedliche trophische Gilden ein charakteristisches Maß an taxonomischer Ähnlichkeit aufwiesen und dass vor allem Gilden hoher taxonomischer Ähnlichkeit in von Abwasserbelastung bzw. starken Salinitätsschwankungen betroffenen Habitaten auftraten. Aus der Tatsache, dass die physiologisch ungünstigen Umweltbedingungen offensichtlich das mögliche taxonomische Spektrum begrenzen, schlossen sie, dass die taxonomische Diversität als Maß geeignet ist, habitatbedingte Selektionsmechanismen (ökologisch und evolutionär) wiederzuspiegeln. Die Autoren, die zur Ermittlung der durchschnittlichen phylogenetischen Distanz eine auf kladistischer Klassifizierung basierende Distanzgewichtung verwenden, betrachten in diesem Zusammenhang eine auf der Analyse genetischer Sequenzähnlichkeit beruhende Distanzgewichtung, wie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, als ebenso geeignet (CLARKE & WARWICK 1998).

Während WARWICK & CLARKE (1995) für die Variable D in Abhängigkeit von Belastungsgradienten eine Reaktion detektieren konnten, für herkömmliche Diversitätsparameter (S , H') jedoch keinen Trend beobachteten, ist in anderen Studien das Ergebnis diesbezüglich nicht konsistent (SOMERFIELD *et al.* 1997; LARDICCI & ROSSI 1998). In den Chemostat-Lebensgemeinschaften war praktisch kein Unterschied für die durch die beiden Parameter D und $1-D$ detektierten Diversitätsmuster zu erkennen. Wie eine hochsignifikante, positive lineare Korrelation der beiden Parameter belegt, veränderte sich die taxonomische Diversität proportional zu Diversitätsänderungen, die durch $1-D$ detektiert wurden. Für ein System mit künstlich begrenztem taxonomischen Spektrum, wie den Chemostaten, ist eine spezifische Reaktion des Index D vermutlich auch nicht zu erwarten. In natürlichen Systemen stellt diese Variable möglicherweise jedoch durchaus einen Indikator für funktionelle Diversität dar. Bei der Ana-

lyse von natürlichen Bakteriengemeinschaften, für deren Organismen häufig genetische, jedoch keine funktionellen Charakterisierungen vorliegen und eine Abgrenzung von taxonomischen Einheiten oft auf operationalen Gesichtspunkten beruht (GOODFELLOW *et al.* 1997), könnte dieser Parameter daher zur Diversitätsquantifizierung von Interesse sein.

Die unterschiedlichen Diversitätsmuster, die für die Artenzahl und die drei Diversitätsindizes zu unterschiedlichen Zeitpunkten im experimentellen Verlauf zu beobachten waren, belegen, dass sich die Dominanzstruktur vor allem der Lebensgemeinschaften, die mittleren und langen Störungsintervallen ausgesetzt waren, mit der Fortdauer des Experimentes veränderte. Während zu Beginn vor allem die detektierbare Präsenz von Isolaten, deren relative Abundanz keine großen Unterschiede aufwies, eine Rolle spielte, wurde am Endpunkt des Experimentes in diesen *Treatments* das Diversitätsniveau vor allem durch deutliche Unterschiede in der Abundanzverteilung einiger weniger Isolate bestimmt. Für experimentelle Mikrokosmen, die den Einfluss von diskontinuierlicher Ressourcenverfügbarkeit auf die Diversität von Modelllebensgemeinschaften untersuchen, scheint diese Entwicklung im experimentellen Verlauf typisch zu sein (ROBINSON & SANDGREN 1983; GAEDEKE & SOMMER 1986; SOMMER 1995, siehe auch HIXON & BROSTOFF 1983). In diesen Modellökosystemen, in denen die Mortalität der Organismen experimentell reguliert wird, ist offensichtlich ein gewisser Zeitraum notwendig, bis sich die Anzahl der effektiv die Diversität beeinflussenden Arten und das durch die Störung erzeugte Diversitätsmuster stabilisiert hat. Inwieweit diese „Metasukzession“ für die Wahl des Untersuchungszeitpunktes auch in natürlichen Systemen relevant ist, hängt davon ab, ob die Studie die integrierte Wirkung vieler Störungsereignisse, die das für das untersuchte Habitat kennzeichnende Störungsregime repräsentieren, oder die Auswirkung einzelner Störungsereignisse bzw. die Wirkung eines veränderten Störungsregimes erfassen soll. Die Ergebnisse des Chemostatexperimentes deuten darauf hin, dass ein Zeitraum von ca. 15–20 Generationszeiten und mindestens drei Störungszyklen erforderlich sind, um das durch ein bestimmtes Störungsregime erzeugte charakteristische Diversitätsmuster zu erfassen.

Studien, die sich ganz allgemein auf den von der IDH postulierten Zusammenhang zwischen Störungshäufigkeit und Diversität beziehen und die IDH durch die beobachteten Diversitätsmuster bestätigt sehen, sind zahlreich. Die Zahl der Studien, die, wie die vorliegende Arbeit, die Gültigkeit der IDH einem direkten Test unterziehen, ist dagegen deutlich geringer. Voraussetzung für einen adäquaten Test ist zum einen eine Quantifizierbarkeit von Störungshäufigkeit, entweder durch experimentelle Kontrolle des Störungsregimes oder durch ein geeignetes Quantifizierungsmaß für die Häufigkeit natürlicher Störungsereignisse. Zum anderen sollte eine statistische Auswertung eine klare Aussage darüber erlauben, ob die Annahme der IDH als belegt oder als nicht belegt gelten kann. Studien dieser Art liegen vor für den Bereich der Planktonökologie (GAEDEKE & SOMMER 1986; WEIDER 1992; SOMMER 1995;

FLÖDER & SOMMER 1999), für halbsessile Epilithon- und Benthoslebensgemeinschaften von Bächen und Flüssen (DEATH & WINTERBOURN 1995; TOWNSEND *et al.* 1997; FAYOLLE *et al.* 1998), für marine sessile Benthosgemeinschaften tidebeeinflusster Geröllstrände und Korallenriffe (SOUSA 1979; ARONSON & PRECHT 1995) und für terrestrische Pflanzengemeinschaften (ARMESTO & PICKETT 1985; ODGAARD 1994; COLLINS *et al.* 1995; HIURA 1995; SCHWILK *et al.* 1997; HACKER & BERTNESS 1999; BECKAGE & STOUT 2000). Eine eindeutige Bestätigung von erhöhter Diversität bei mittlerer Störungshäufigkeit gegenüber Störungsregimes mit seltenen bzw. häufigen Störungsereignisse wird vor allem durch Studien belegt, die Lebensgemeinschaften von Organismen mit vergleichsweise sehr kurzen bis kurzen Generationszeiten untersuchen. Diese Studien befassen sich mit Phytoplankton (GAEDEKE & SOMMER 1986; SOMMER 1995; FLÖDER & SOMMER 1999), Bachzoobenthos (DEATH & WINTERBOURN 1995; TOWNSEND *et al.* 1997), sessilen Makroalgengemeinschaften marinen Gerölllitorals (SOUSA 1979) und Vegetationsgemeinschaften krautiger Pflanzen in Salzmarschen (HACKER & BERTNESS 1999). Arbeiten, deren Ergebnisse im Widerspruch zu der IDH-Annahme bezüglich des diversitätsfördernden Einflusses von Störungen mittlerer Häufigkeit stehen, wurden vor allem an Lebensgemeinschaften mit mittellang- bzw. langlebigen Organismen, wie terrestrischen Vegetationsgemeinschaften, durchgeführt (ARMESTO & PICKETT 1985; COLLINS *et al.* 1995; SCHWILK *et al.* 1997; BECKAGE & STOUT 2000), für die bei experimenteller Manipulation des Störungsregimes zudem eine ausreichende Replikation der *Treatments* für rigorose statistische Untersuchungen oft problematisch ist (BECKAGE & STOUT 2000). Auch die Belege, die CONNELL (1978) in bezug auf die Bedeutung der Störungshäufigkeit für die ursprünglich bei der Formulierung der IDH berücksichtigten tropischen Regenwälder und Korallenriffe anführt, beruhen nicht auf direkten (statistisch gesicherten) Nachweisen, sondern sind aus den beobachteten Sukzessionsmustern nach einzelnen Störungsereignissen abgeleitet. Statistisch gesicherte Nachweise der Gültigkeit dieses Aspekts der IDH für Lebensgemeinschaften, wie Korallenriffe (ARONSON & PRECHT 1995), steppenähnliche Vegetation (ODGAARD 1994) und Wälder (HIURA 1995), sind seltene Ausnahmen.

Wie bereits zuvor diskutiert, scheint eine gewisse Anzahl von Störungsereignissen und ein Zeitraum von > 10 Generationszeiten erforderlich zu sein, um das für ein Störungsregime charakteristische Diversitätsmuster detektieren zu können. Die Schwierigkeit, das Phänomen erhöhter Diversität bei mittlerer Störungshäufigkeit für Lebensgemeinschaften langlebiger Organismen zu detektieren, scheint vor allem in der Realisierbarkeit der erforderlichen Beobachtungszeiträume zu liegen. So liegen Zeiträume, die die Entwicklungszyklen der Diversität im Zusammenhang mit Störungsereignissen erfassen, für Korallenriffe zwischen 40 und 70 Jahren (DOLLAR & TIBBLE 1993), für tropische Regenwälder vermutlich über 200 Jahren (CONNELL 1978). Die Studien, die für derartige Lebensgemeinschaften ein der IDH entsprechendes Diversitätsmuster nachweisen konnten, zeichnen sich daher auch dadurch aus, dass ihre Charakterisierung der unterschiedlichen Störungsregimes auf Parametern beruhen, für die eine Information über lange Zeiträume verfügbar ist und/oder die die Auswirkungen von

aufeinanderfolgenden Störungsereignissen integrativ quantifizieren, so dass sie als habitattypischer Faktor über potentiell lange Zeiträume angesehen werden können. So benutzte HIURA (1995) historische Aufzeichnungen von Sturmereignissen über einen Zeitraum von mehr als 200 Jahren, um die standorttypische Intervalldauer zwischen Sturmstörungsereignissen für verschiedene Buchenwaldhabitate zu bestimmen. Das von ihm beobachtete unimodale Diversitätsmuster der Waldvegetation betrachtete er als Ergebnis des für die unterschiedlichen Habitate charakteristischen Störungsregimes. ODGAARD (1994) konnte anhand paläolimnologischer Untersuchungen für einen Zeitraum von mehreren tausend Jahren eine unimodale Antwort der mit Hilfe von Pollenanalyse bestimmten floristischen Artenzahl in Abhängigkeit von historisch unterschiedlichen Regimes von Vegetationsbränden nachweisen. Das hierbei verwendete Maß zur Charakterisierung der unterschiedlichen Störungsregimes, die Anzahl der Aschepartikel in den unterschiedlich alten Schichten der limnischen Sedimente, konnte jedoch nur eine integrierte Wirkung von Intensität und Häufigkeit der Störungsereignisse erfassen. Auch das von ARONSON & PRECHT (1995) verwendete Maß topographischer Substratkomplexität als Maß für die wellenbedingte Schädigung von Korallen, mit Hilfe dessen sie ein ausgeprägtes störungsbedingtes unimodales Diversitätsmuster für ein Korallenriff belegen konnten, stellt ein integratives Maß für Intensität und Häufigkeit des standorttypischen Störungsregime dar.

Die durch die IDH postulierte vorübergehende Erhöhung der Diversität zwischen zwei Störungsereignissen, wie sie für die Chemostat-Modelllebensgemeinschaften planktischer Bakterien nachgewiesen werden konnte, ist ebenfalls am besten belegt für Organismengemeinschaften mit kurzen Generationszeiten. Sturmbedingte Durchmischungsereignisse in Seen und vorübergehende Erhöhungen der Wasserabflussmengen in Flüssen bzw. Stauseen bewirkten einen signifikanten Anstieg der Diversität des Phytoplanktons (DESCY 1993; BARBIERO *et al.* 1999; HAMBRIGHT & ZOHARY 2000) bzw. des Zooplanktons (ECKERT & WALZ 1998), der sich mit zunehmender Dauer des Störungsintervalls wieder verlor. Belege existieren auch für andere Lebensgemeinschaften, für die längere Beobachtungszeiträume erforderlich sind (CONNELL 1978; KUKERT & SMITH 1992; DOLLAR & TIBBLE 1993; COLLINS *et al.* 1995); die Beobachtungen hinsichtlich dieser Annahme der IDH sind jedoch, vor allem für Korallenriffe (ROGERS 1993), aber auch für Vegetations- (TREBINO *et al.* 1996) und Bachzoobenthosgemeinschaften (DOEG *et al.* 1989), nicht immer konsistent.

Die anhand der Bakterienmodellgemeinschaften ermittelten Funktionen für die Veränderung der Diversität zwischen zwei Störungen weisen darauf hin, dass maximale Diversität schon sehr bald nach der Störung, hier nach ca. 10 % der 4-8 Generationszeiten umfassenden Intervalldauer auftreten können, während ein deutlicher Rückgang erst nach ca. 50 % der Intervalldauer zu beobachten war. Wie zuvor in bezug auf die Bedeutung der von Störungshäufigkeit diskutiert, scheint die Festlegung einer adäquaten Beobachtungsdauer (DOEG *et al.* 1989; ROGERS 1993; TREBINO *et al.* 1996) bzw. eines geeigneten zeitlichen Probennahmera-

sters (ROGERS 1993; TREBINO *et al.* 1996) zur Erfassung des Phänomens der vorübergehenden Diversitätserhöhung nach Störungen für Organismengemeinschaften mit längeren Generationszeiten nicht immer gegeben.

Die übereinstimmenden Beobachtungen, die bei adäquater Wahl von Beobachtungsparameter, Beprobungsskalierung und Beobachtungszeitraum für die unterschiedlichsten Lebensgemeinschaften und Organismengruppen bezüglich der Diversitätsmuster in Abhängigkeit von der Störungshäufigkeit und der Fortdauer des Intervalls zwischen zwei Störungen gemacht wurden, bestätigen klar die allgemeine Gültigkeit der betreffenden Annahmen der IDH. Besonders jedoch die experimentellen Studien von Organismengemeinschaften, deren Diversitätsänderungen über viele Störungszyklen und Generationszeiten verfolgt werden können, wie die Modellgemeinschaft planktischer Bakterien der vorliegenden Arbeit und die Phytoplanktongemeinschaften der zuvor genannten Studien, erwiesen sich als geeignet, einen relevanten Zeitrahmen für die Überprüfung der IDH zu identifizieren.

4.2.2.2 Adäquate Skalierung der zeitlichen Dimensionen von Störungsregimes

In 4.2.2.1 wurde dargelegt, dass für eine Detektion der durch die IDH postulierten Diversitätsmuster Beobachtungszeiträume nötig sind, die sich an der Lebensspanne der untersuchten Organismen orientieren und ein Vielfaches ihrer Generationszeit betragen sollten. Aber auch die qualifizierenden Aussagen der IDH bezüglich des Störungseinflusses, wie „selten“, „mittelhäufig“ und „häufig“ bzw. „bald nach“ und „lang nach“, machen eine zeitliche Dimensionierung der untersuchten Störungsregimes erforderlich.

In dem untersuchten Chemostat-Modellökosystem, in dem die Störung nur Auswirkungen auf die Ressourcenverfügbarkeit, nicht aber auf die Mortalitätsrate der Organismen hatte, und von Konkurrenz, wie in Abschnitt 4.2.1 diskutiert, als ausschlaggebendem Mechanismus für Diversitätsänderungen auszugehen war, waren zwei zeitabhängige Prozesse bestimmend: Unmittelbar nach einer Störung, so auch bei rasch aufeinander folgenden Störungen, spielt die Geschwindigkeit der Ressourcenmonopolisierung (hier vor allem die Wachstumsgeschwindigkeit der Populationen) die entscheidende Rolle in der Konkurrenz, während mit zunehmender Fortdauer geringer Ressourcenverfügbarkeit die Überlebensfähigkeit der Organismen an Bedeutung gewinnt. Dies macht deutlich, dass auch für eine zeitliche Dimensionierung des Störungsregimes an sich die Organismenlebensspanne bzw. -generationszeit ein relevanter universeller Skalierungsmaßstab ist. Diese universelle Skalierung der Störungsintervalldauer in Einheiten von theoretischen Generationszeiten war in den Chemostaten möglich, da die Mortalität der Organismen nahezu unselektiv und durch den quantifizierbaren Zeitfaktor der Auswaschungsrate reguliert war.

Der in den Chemostatexperimenten eingesetzte Störungsgradient war jedoch nicht nur durch in unterschiedlichen Zeitabständen verabreichte P-Pulse gekennzeichnet. Um die P-Gesamtdosis für jedes der unterschiedlichen *Treatments* während des Experimentes konstant zu

halten, variierte die pro Puls verabreichte P-Menge und somit die Intensität der Störung. Das experimentelle Design entsprach also dem, was SOMMER (1995) als „diagonales Design“ bezeichnet, das durch eine negative Relation von Störungshäufigkeit und Störungsintensität gekennzeichnet ist. Eine klare Trennung des Effektes von Häufigkeit und Intensität der Störung ist für ein solches Design nicht möglich. Für sein Experiment an Mikrokosmen mariner Phytoplanktongemeinschaften, die unterschiedlichen Störungsregimes durch Verdünnung mit frischem Medium ausgesetzt waren, konnte SOMMER (1995) zeigen, dass auch, wenn beide Aspekte von Störung unabhängig voneinander variiert werden, sowohl die Störungshäufigkeit als auch die Störungsintensität in der von der IDH postulierten Weise eine unimodale Antwort der Diversität erzeugen. Andere Studien, für die eine eindeutige ursächliche Unabhängigkeit eine getrennte Analyse beider Faktoren erlaubte, bestätigen die Wirksamkeit der Störungsintensität neben der Störungshäufigkeit im Sinne der IDH (TOWNSEND *et al.* 1997) oder konnten auch keinen Zusammenhang feststellen (HIURA 1995). POLISHCHUK (1999) quantifizierte anhand einer von ihm für die Daten von SOMMERS Mikrokosmos-Experiment (SOMMER 1995) durchgeführten „*Contribution Analysis*“ den relativen Beitrag, den die Häufigkeit bzw. Intensität von Störung auf das beobachtete Diversitätsniveau hatte. Ergebnis seiner Analyse war, dass der Einfluss beider Komponenten entlang eines Gradienten der Störungshäufigkeit nicht konstant ist. Während bei hoher Frequenz von Störungen vor allem deren Intensität die Diversität beeinflusst, ist es bei Störungsregimes mit seltenen Störungsereignissen in erster Linie die Dauer des Störungsintervalls, welches bei zunehmender Länge für einen Rückgang der Diversität sorgt. Bei mittleren Störungshäufigkeiten ist der Einfluss beider Komponenten in etwa gleich stark ausgeprägt. POLISHCHUKS Analyse zufolge förderte das in den Chemostatversuchen verwendete „diagonale Design“ des Störungsgradienten vor allem die Detektion der Diversitätsreduktion bei hohen Störungsfrequenzen durch die gleichzeitige Verwendung niedriger Störungsintensitäten. Die Detektion der maximalen Diversität bei mittleren Störungsfrequenzen bzw. die Erniedrigung der Diversität bei langen Störungsintervallen kann dagegen als kaum von der Variabilität der Störungsintensität beeinflusst angesehen werden. In den Chemostatexperimenten hatte die Intensität der Störungen, im Gegensatz zu SOMMERS marinen Phytoplanktonmikrokosmen, keinen Einfluss auf die „Mortalität“ der Organismen, die in seinem Experiment zusätzlich den Effekt der störungsbedingten Erhöhung der Ressourcenverfügbarkeit verstärkte. Der Einfluss der Störungsintensität war daher in den Chemostatexperimenten vermutlich generell geringer. Das in diesen Modell-Lebensgemeinschaften beobachtete unimodale Diversitätsmuster kann also durchaus als ein für den zeitlichen Aspekt des Störungsgradienten typisches angesehen werden.

Dieses Muster zeichnete sich durch eine charakteristische Form aus, unabhängig davon, zu welchem Zeitpunkt des experimentellen Verlaufes und anhand welches Diversitätsparameters es detektiert wurde. Maximale Diversitäten wurden immer in den *Treatments* mit 2-d-Störungsintervallen ermittelt. Deutlich niedrigere Diversitätswerte waren für die *Treatments* längerer Störungsintervalle (≥ 4 d) und die *Treatments* mit dem kürzesten Störungsintervall

(0.5 d) zu beobachten. Charakteristisch war auch die Asymmetrie des unimodalen Diversitätsmusters. Eine logarithmische Transformation der Störungsskalierung war daher erforderlich, um eine möglichst gute Anpassung des als Modellfunktion gewählten quadratischen Polynoms an die Daten zu erreichen. Besonders deutlich ausgeprägt war die asymmetrische „Buckelform“ des Diversitätsmusters am Endpunkt des Experimentes für die beiden Indizes $1-D$ und D . Trotz der geringen Zahl von Datenpunkten ($n < 20$) wurden vergleichsweise hohe Werte (0.33 – 0.53) für das Bestimmtheitsmaß r^2 der ermittelten Funktionen erreicht. Der Wert für die Dauer eines maximale Diversität erzeugenden Störungsintervalls, der anhand der signifikanten Funktionen für die unterschiedlichen Parameter rechnerisch ermittelt wurde, lag am Versuchsendpunkt zwischen 1.76 und 2.26 theoretischen Generationszeiten. Im Mittel betrug er 2.03 ± 0.12 (s.e.) theoretische Generationszeiten.

CONNELL (1978) macht, abgesehen von allgemeinen Bemerkungen im Zusammenhang mit der Charakterisierung der unterschiedlichen Konkurrenzstrategien in der sukzessionalen Artenfolge, keine spezifischen Aussagen darüber, mit welchem Maßstab die zeitbezogenen Annahmen der IDH zu bewerten sind. Dies lässt sich auch über die meisten Studien sagen, die sich auf die IDH beziehen und die sich auf eine allgemeine Charakterisierung der Störungshäufigkeit als „rare“, „intermediate“ und „frequent“ beschränken, wobei der zunehmende Maßstab häufig methodenbedingt ist. Die einzigen Arbeiten, die als universellen zeitlichen Maßstab Generationszeiten für die Skalierung der von ihnen untersuchten Störungsregimes einsetzen, stammen aus dem Bereich der Planktonökologie. Phytoplanktongemeinschaften, die in experimentellen Mikro- und Mesokosmen untersucht wurden, wiesen maximale Diversitätswerte auf, wenn das Intervall zwischen zwei Störungen > 1 Generationszeit und ≤ 4 Generationszeiten war (GAEDEKE & SOMMER 1986; SOMMER 1995; FLÖDER & SOMMER 1999). Freilandbeobachtungen für das Phytoplankton des Plattensees, des Neusiedlersees und von zwei experimentellen Teichen bestätigen, dass ein Störungsregime witterungsbedingter Durchmischungsereignisse bei einem mittleren Intervall dieser Größenordnung maximale Phytoplanktondiversität erzeugt (PADISÁK 1993; PADISÁK 1994). Diese Werte zeigen somit ein hohes Maß an Übereinstimmung mit den für die Chemostat-Bakteriengemeinschaft ermittelten. WEIDER (1992), der die klonale Diversität von *Daphnia pulex* in Abhängigkeit von der Intervalldauer zwischen seriellen Populationsausdünnungen als Störungen untersuchte, deckte einen Störungsgradienten ab, bei dem die Störungsintervalle einer, zwei bzw. drei Generationszeiten dieses Zooplanktonorganismus entsprachen. Obwohl er signifikante störungsbedingte Unterschiede in der klonalen Diversität nachweisen konnte, konnte er für diesen Gradienten in der Störungshäufigkeit kein eindeutiges unimodales Diversitätsmuster beobachten. So zeigte das *Treatment* mit Störungsintervallen von 1 Generationszeit zwar die niedrigsten Diversitätswerte; das Störungsintervall von 3 Generationszeiten war aber offenbar noch nicht lang genug, um dauerhaft Diversitätswerte zu erzeugen, die niedriger waren, als diejenigen des *Treatments* mittellanger Störungsintervalle von 2 Generationszeiten; der untersuchte Störungsgradient war also möglicherweise nicht umfangreich genug. Ohne die

Annahme der IDH in Bezug auf mittlere Störungshäufigkeiten eindeutig belegen zu können, befindet sich das Ergebnis dennoch in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der zuvor genannten Phytoplanktonstudien in bezug auf die kritische Anzahl der Generationszeiten, die ein Störungsintervall zur Erzeugung maximaler Diversität umfassen muss. Eine Fehldimensionierung des untersuchten Störungsgradienten, der die zur Detektion des unimodalen Diversitätsmusters maßgeblichen, an der Generationszeit der untersuchten Organismen orientierten Intervalllängen nicht abdeckt, ist vermutlich auch in anderen Studien eine wahrscheinliche Ursache für einen fehlenden eindeutigen Beleg der IDH (z. B. COLLINS *et al.* 1995; SCHWILK *et al.* 1997; FAYOLLE *et al.* 1998).

Eine weitere mögliche Ursache für die Anwendung inadäquater Störungsgradienten zur Überprüfung der IDH könnte die Asymmetrie der Beziehung von Störungshäufigkeit und Diversitätsniveau sein. Die Form der für die Chemostat-Modelllebensgemeinschaften ermittelten, gut durch das Regressionsmodell belegten Relation weist darauf hin, dass „mittlere“ Störungshäufigkeiten, die maximale Diversitätswerte erzeugen, nicht „in der Mitte“ der relevanten Störungsgradientenspanne liegen. Bisher nur von PADISÁK (1994) ausdrücklich konstatiert, zeigen viele Studien, die eine ausreichende zeitliche Auflösung ihrer Störungsgradienten aufweisen, eine mehr oder weniger deutliche Ausprägung dieser Asymmetrie (GAEDEKE & SOMMER 1986; PADISÁK 1993; DEATH & WINTERBOURN 1995; HIURA 1995; SOMMER 1995; TOWNSEND *et al.* 1997; FLÖDER & SOMMER 1999). Ein zeitliches Raster des untersuchten Störungsgradienten, das dieser, möglicherweise charakteristischen Form der Relation von Diversität und Störungshäufigkeit nicht gerecht wird, könnte ebenfalls dazu führen, dass die entscheidenden Intervalllängen zur Erzeugung maximaler bzw. minimaler Diversität nicht erfasst werden.

Die Generationszeit als Maßstab für die zeitliche Skalierung von Störungsereignissen soll vor allem der Rekrutierungszeit der Organismen Rechnung tragen, mit der sie in der Lage sind, auf die durch Störung veränderten Ressourcenbedingungen zu reagieren. Für die Chemostat-Bakteriengemeinschaften und viele Situationen in Phytoplanktongemeinschaften, in denen die potentiellen „Rekruten“ bereits im System vorhanden sind, ist die Wachstumsgeschwindigkeit und somit die Generationszeit der ausschlaggebende Faktor für die Rekrutierung. Häufig zeichnet sich die Rekrutierung aber auch durch die Immigration mobiler Organismen aus räumlich vom untersuchten System getrennten Habitaten aus (z. B. DOEG *et al.* 1989; MARONE 1990; SZENTKIRÁLYI & KOZÁR 1991; DEATH & WINTERBOURN 1995; TOWNSEND *et al.* 1997; FLÖDER 1999). Auch können bei der Rekrutierung komplexe Lebenszyklen der Organismen eine Rolle spielen (DIAL & ROUGHGARDEN 1998). Die Bestimmung eines universellen Zeitmaßstabes für eine ökologisch relevante Skalierung von Störung sollte diese Umstände berücksichtigen, indem ein der Generationszeit äquivalenter Parameter der generellen Verdopplungszeit der Organismen, unabhängig vom Rekrutierungsmechanismus, für die unterschiedlichen untersuchten Systeme identifiziert wird.

Die im wesentlichen in der Planktonökologie entwickelte universelle zeitliche Skalierung von Störungsregimes zur Bewertung des Einflusses von Störung auf die Diversität von Lebensgemeinschaften ist als erfolgreicher Ansatz zu bewerten, eine Vergleichbarkeit für die unterschiedlichsten untersuchten Systeme zu erreichen. Außerdem kann so überprüft werden, inwieweit die beobachteten zeitlichen Dimensionen von Störungen, die sich für Diversitätsänderungen als relevant erwiesen, Allgemeingültigkeit besitzen. In den Phytoplankton-Studien werden im Allgemeinen generalisierte Werte für die Generationszeit der Phytoplanktonorganismen zur zeitlichen Skalierung von Störungsereignissen verwendet (PADISÁK 1994). In der vorliegenden Arbeit waren die Zeitabstände zwischen den Störungen rigoros durch die Durchflussrate der Chemostaten dimensioniert, was eine klare Umrechnung in Generationszeiten ermöglichte, die in den Chemostaten bei kontinuierlicher Ressourcenversorgung erreicht würden. Durch die Wahl des experimentellen Designs wurde nicht nur versucht, Unterschiede für die *Treatments* unterschiedlicher Störungshäufigkeit zu detektieren, sondern durch Regressionsanalyse auch die typische Form des „Buckel“-Diversitätsmusters näher zu charakterisieren. Von Interesse wäre daher, inwieweit die charakteristischen Eigenschaften der in diesem definierten Modellsystem ermittelten Funktion von Diversität und Störungshäufigkeit auch in anderen Systemen Gültigkeit besitzt.

4.2.2.3 Störung und Diversität planktischer Bakteriengemeinschaften

In Abschnitt 4.2.2.2 wurde gezeigt, dass in den Chemostat-Modell-Lebensgemeinschaften planktischer Bakterienisolate nicht nur die fluktuierende Verfügbarkeit von Ressourcen generell einen Einfluss auf die mögliche Koexistenz mehrerer Arten hatte, sondern dass für die beobachteten Diversitätsveränderungen ebenfalls das für andere Organismengemeinschaften als relevant befundene zeitliche Muster der Störungsereignisse ausschlaggebend war.

Dass prinzipiell die Intervalldauer zwischen Ressourcenpulsen eine Bedeutung für die Konkurrenz von Bakterien hat, wird auch durch die Ergebnisse von Konkurrenzexperimenten in einfachen 2-Arten-Modellsystemen (vergl. 4.2.1) gestützt. So konnte LEEGWATER (1983) zeigen, dass der Effekt, den die gepulste Ressourcenzufuhr auf die Konkurrenzfähigkeit von zwei verschiedenen Bakterienstämmen in Chemostatkokultur hatte, sowohl von der gewählten Intervalldauer an sich, aber auch von der Intervalldauer in Relation zur Generationszeit bzw. Mortalitätsrate der Organismen (unterschiedlicher Effekt bei unterschiedlichen Durchflussraten der Chemostaten) abhängig war. Auch KURIHARA *et al.* (1990), die Möglichkeiten der Koexistenz und unterschiedliche Konkurrenzstrategien an Mischkulturen von jeweils zwei unterschiedlichen Bakterienisolaten untersuchten, stellten fest, dass Kulturverdünnungsschritte im Abstand von 12 h nach mindestens 10 Wiederholungen zu Monokulturen jeweils eines Stammes führten, dass jedoch Verdünnungen desselben Ausmaßes im Abstand von 3 d eine stabile Koexistenz der Isolate ermöglichten.

Aufgrund der Schwierigkeiten, die generell für die Erfassung der Diversität von komplexeren bakteriellen Lebensgemeinschaften oder natürlichen Bakterioplanktongemeinschaften bestehen, gibt es keine Arbeiten, die eine Dynamik der bakteriellen Diversität bei hoher taxonomischer Auflösung („Art“-Niveau) in Abhängigkeit von fluktuierenden Umweltparametern belegen können (NOLD & ZWART 1998). Studien, die sich mit dem Einfluss variabler Umweltparameter auf die Zusammensetzung planktischer Bakteriengemeinschaften beschäftigen, verwenden vor allem molekularbiologische *Profiling*-Techniken oder Oligonukleotidsonden zur Charakterisierung der taxonomischen Struktur des Bakterioplanktons (z. B. HÖFLE 1992; PERNTHALER *et al.* 1997; GLÖCKNER *et al.* 1999; HÖFLE *et al.* 1999; JÜRGENS *et al.* 1999; KONOPKA *et al.* 1999; LEBARON *et al.* 1999; SIMEK *et al.* 1999; SUZUKI 1999). Während letztere im allgemeinen nur eine taxonomische Auflösung auf dem Niveau von Großtaxa wie Ordnungen und Klassen haben bzw. nur für einige wenige Stämme spezifisch entwickelt wurden, ist die Spezifität und Zuverlässigkeit in der Detektion der ersteren bisher nicht endgültig geklärt (HÖFLE 1990; ENGEL *et al.* 1998; KRSEK 1998; NOLD & ZWART 1998). Grundlegende Unterschiede in der taxonomischen Zusammensetzung von Bakteriengemeinschaften werden durch diese Methoden jedoch erfasst.

So konnten Untersuchungen, die mit Hilfe der vorgenannten Techniken an Bakterioplankton unter natürlichen oder naturnahen Bedingungen durchgeführt wurden, zeigen, dass diskrete Veränderungen von Umweltparametern, wie *Grazing* (z. B. JÜRGENS *et al.* 1999; LEBARON *et al.* 1999; SUZUKI 1999) oder Substratzufuhr (z. B. HÖFLE 1992; LEBARON *et al.* 1999; PINHASSI *et al.* 1999) in einem Zeitraum von 24 h bis 4 d deutliche Veränderungen in der taxonomischen Struktur der untersuchten Bakteriengemeinschaften bewirkten. Die in den Chemostatexperimenten untersuchten zeitlichen Dimensionen eines Störungsregimes (0.5 d – 8 d als Störungsintervalldauer) stimmen demnach in der Größenordnung gut überein mit den Zeiträumen, in denen unter natürlichen Bedingungen mit signifikanten Veränderungen der Diversität planktischer Bakterien zu rechnen ist.

Natürliche Ereignisse im Habitat planktischer Bakterien, die innerhalb der zeitlichen Größenordnung des in den Chemostatexperimenten untersuchten Gradienten der Störungshäufigkeit liegen und für eine Fluktuation der Ressourcenlimitierung durch Phosphor sorgen können, sind vor allem asaisonale Durchmischungsereignisse in geschichteten Seen (im Mittel alle 5–15 d; PADISÁK 1993; PADISÁK 1994), aber auch diurnale Prozesse wie die konvektionsbedingte Durchmischung des Epilimnions (IMBERGER 1985), Variabilität der lichtabhängigen C-Produktion und C-Exkretion des Phytoplanktons (Verschiebung des C:P-Verhältnisses; GURUNG *et al.* 1999) und die Vertikalwanderung des Zooplanktons, die eine räumliche Verlagerung der P-Remineralisierung (GULATI *et al.* 1995; CARRILLO *et al.* 1996, siehe auch ROTHHAUPT 1992) bedingt. Auch durch diurnale Verhaltensmuster von Fischen (KREMSER 1995) ist mit Fluktuationen in der Verfügbarkeit von limitierenden Ressourcen planktischer Bakterien zu rechnen (PERSSON 1997).

Da zur Überwindung räumlicher Distanzen der Faktor Zeit eine Rolle spielt, lässt sich generell auch räumliche Heterogenität von Umweltparametern und Ressourcen in einen Maßstab zeitlicher Heterogenität umsetzen. Um Distanzen in der Größenordnung von 2 – 20 m zu überwinden, benötigen Bakterien, je nach Stärke der Eddydiffusion und ihrer eigenen Fähigkeit zur Mobilität, einen Zeitraum von ca. 2 d (MITCHELL & FUHRMAN 1989). Diese Zeitspanne entspricht derjenigen, die in den Chemostatexperimenten als kritische Intervalllänge zwischen den Störungsereignissen eines Störungsregimes ermittelt wurde, bei welchem maximale Werte für die Diversität der Bakterioplanktongemeinschaften beobachtet wurden. Diskrete räumliche Muster in der Verteilung von limitierenden Ressourcen mit diesen Dimensionen, wie sie z. B. durch die Mächtigkeit des Epilimnions geschichteter Seen repräsentiert sind (LAMPERT & SOMMER 1993, siehe auch PLATH 1999), sind demnach dazu geeignet, für den Erhalt eines hohen Diversitätsniveaus des Bakterioplanktons zu sorgen.

Störungsregimes, wie sie in den Chemostatexperimenten untersucht wurden, sind also vermutlich nicht nur in reduzierten Modellsystemen von Bedeutung, sondern können durchaus auch in natürlichen Habitaten für Unterschiede in der Diversität planktischer Bakterien relevant sein.

4.3 Schlussbetrachtung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, aber auch die Diskussion der Ergebnisse anderer Studien machen deutlich, welche Bedeutung das Auftreten von Störungen⁶ für die Diversität von Lebensgemeinschaften hat. Muster in der Diversität von Lebensgemeinschaften sind jedoch nicht nur als Resultat von Prozessen für Ökologen von Interesse; Diversität beeinflusst auch die durch Summenparameter wie Produktivität, Biomasse, Respiration und Widerstandsfähigkeit („*resilience*“) beschriebenen „Eigenschaften“ von Ökosystemen (z. B. TILMAN & DOWNING 1994; TILMAN *et al.* 1996; McGRADY-STEED *et al.* 1997; NAEEM & LI 1997; NAEEM *et al.* 2000). Wann immer also derartige Eigenschaften von Ökosystemen durch Management beeinflusst werden sollen, sind grundlegende Kenntnisse der Prozesse, die die Diversität von Lebensgemeinschaften beeinflussen, Voraussetzung dafür, den gewünschten Effekt zu erzielen (TILMAN 1999). Auch der Erhalt möglichst hoher Biodiversität an sich wird sowohl aus ökonomischen als auch aus ästhetischen und ethischen Gesichtspunkten als wünschenswertes Management-Ziel betrachtet (KIMMINS 1999). Moderne Konzepte des Umweltschutzes und des Managements von Ökosystemen beinhalten daher nicht nur den Schutz einzelner Arten und ihrer Habitate, sondern haben auch die Bedeutung des „Schutzes“ natürlicher Störungsregimes bzw. der Simulation solcher Einflüsse erkannt (z. B. LENT & CAPEN 1995; FULBRIGHT 1996; POWER *et al.* 1996; ANGELSTAM 1998; WARD 1998; PELTZER *et al.* 2000).

Grundlegende Erkenntnisse über die Beeinflussung der Diversität von Lebensgemeinschaften, wie z. B. die Tatsache, dass die Zeiträume zwischen den Störungsereignissen eines Störungsregimes in Abhängigkeit von Generationszeiten bzw. der Rekrutierungsgeschwindigkeit für unterschiedliche Organismen von unterschiedlicher Relevanz sind, sind daher für eine Planung gezielter Maßnahmen zum Erhalt einer möglichst hohen Diversität bestimmter Organismengemeinschaften unverzichtbar.

⁶ Vergl. Definition von Störung in Kapitel 1: „...diskretes Ereignis, welches die Verfügbarkeit von limitierenden Ressourcen erhöht und somit die Konkurrenzbedingungen verändert...“

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der experimentellen Überprüfung der „*Intermediate Disturbance Hypothesis*“ (IDH, CONNELL 1978), die an Modell-Lebensgemeinschaften planktischer Bakterienisolate in Chemostatkulturen durchgeführt wurde.

Die IDH, die ursprünglich für tropische Lebensgemeinschaften sessiler Organismen (Regenwälder und Korallenriffe) formuliert wurde, nimmt als maßgeblichen Einfluss auf die Diversität von Lebensgemeinschaften das habitattypische Störungsregime an, welches durch diskrete Veränderungen der Konkurrenzbedingungen („Störungen“) die autogene Sukzession unterbricht und so Konkurrenzausschluss verhindert. Der IDH zufolge ist maximale Diversität das Ergebnis von Störungen mittlerer Häufigkeit bzw. Intensität und wird vorrübergehend zwischen zwei Störungsereignissen beobachtet.

Bereits auf die unterschiedlichsten Organismen- und Habitattypen angewandt, sind die Ergebnisse bisheriger Studien, die eine Überprüfung der IDH zum Ziel hatten, in bezug auf eine Bestätigung der von der IDH postulierten störungsbedingten Diversitätsmuster nicht immer konsistent. Arbeiten, die den Einfluss von Störungen im Sinne der IDH auf die Diversität von Bakterioplankton untersucht haben, liegen bislang noch nicht vor. Planktische Bakterien als Modellorganismen für einen experimentellen Test der IDH wurden daher aus zwei Gründen verwendet: 1. Durch ihre Kultivierbarkeit in gut definierbaren und gut replizierbaren Mikrokosmen ist ein experimentelles Design möglich, das mittels Regressionsanalyse eine statistische Überprüfung der IDH erlaubt. Zudem ermöglichen ihre kurzen Generationszeiten eine Beobachtung der Modellökosysteme über viele Generationen. 2. Durch die Untersuchung des Einflusses von definierten Störungsregimes auf komplexe Bakterioplanktongemeinschaften in experimentellen Mikrokosmen kann die Bedeutung von Störungen für die Diversität natürlichen Bakterioplanktons demonstriert werden.

Um eine definierte Bakterioplanktongemeinschaft genetisch unterschiedlicher Organismen zu erhalten, wurden Bakterienisolate aus dem Epilimnion des mesotrophen Schöhsees (Schleswig-Holstein) mittels Denaturierungs-Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE) auf genetische Unterschiedlichkeit überprüft und 14 Isolate ausgewählt, die sich, neben Unterschieden in der Position ihrer Banden im Gradientengel, zudem durch eine gute Unterscheidbarkeit ihrer Koloniemorphologie auszeichneten. Diese Isolate wurden genetisch durch Sequenzierung der 16S rDNA und physiologisch durch die Bestimmung ihrer minimalen Generationszeit (g_{\min}) charakterisiert, um eventuelle Spezialisierungen der Organismen für bestimmte Störungsregimes erkennen zu können.

Modell-Lebensgemeinschaften dieser 14 Isolate wurden unter Phosphorlimitation in Chemostaten kultiviert; als Störung wurde gepulste Phosphorzufuhr mit unterschiedlich langen Intervallen zwischen den Pulsen (Gradient zwischen 0.5 und 8 Tagen) verwendet. Die spezifische Quantifizierung der Isolate erfolgte durch Koloniezählung auf Agarplatten und Durchflussszytometerzählung immunfluoreszenzmarkierter Zellen.

Ein unimodales Diversitätsmuster in Abhängigkeit von der Störungshäufigkeit, wie es von der IDH postuliert wird, konnte sowohl durch die Ergebnisse der Koloniezählung, die im wesentlichen den physiologisch aktiven Teil der Bakterienpopulationen erfasste, als auch durch die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Zählung stammspezifisch immunfluoreszenzmarkierter Zellen für verschiedene Diversitätsparameter nachgewiesen werden. Maximale Diversität wurde für ein Störungsregime mit einem Störungsintervall von 2 Tagen nachgewiesen, was in dem Chemostatsystem einer Dauer von 2 theoretischen Generationszeiten entsprach. Charakteristisch war eine asymmetrische Form der durch Regressionsanalysen ermittelten Relation von Diversität und Störungshäufigkeit, die durch einen schnellen Anstieg der Diversitätswerte mit zunehmender Störungsintervalldauer und nach Erreichen des Maximalwertes durch einen vergleichsweise langsameren Rückgang der Diversität für längere Intervalle zwischen den Störungen gekennzeichnet war.

Auch die Annahme der IDH einer vorübergehenden Diversitätserhöhung im sukzessionalen Verlauf zwischen zwei Störungen konnte für die untersuchten Modell-Lebensgemeinschaften planktischer Bakterienisolate bestätigt werden. Auch hier zeichnete sich das beobachtete Diversitätsmuster durch eine markante Asymmetrie aus. In Störungsintervallen, die deutlich länger waren (4 bzw. 8 Tage) als das Intervall, welches bei Wiederholung maximale Diversität erzeugt, wurden die höchsten Werte für die Diversität bereits im ersten Viertel des Intervalls erreicht, während sich der Rückgang der Diversität über die gesamte restliche Dauer des Intervalls hinzog.

Taxonomische Trends für eine Spezialisierung der Isolate hinsichtlich des Einflusses verschiedener Störungsregimes waren auf der Ebene von Großtaxa nicht zu beobachten. Es waren jedoch klare Muster einer funktionellen Strukturveränderungen der Lebensgemeinschaften hinsichtlich ihrer unterschiedlichen (durch den Wachstumsparameter g_{\min} gekennzeichneten) Strategien im Umgang mit der störungsbedingt fluktuierenden Ressourcenverfügbarkeit zu erkennen. Während sich eine hohe Wachstumsgeschwindigkeit als die erfolgreichste Strategie bei häufigen Ressourcenpulsen erwies, schien ein erfolgreiches Überdauern von langen Intervallen zwischen Ressourcenpulsen sowohl durch hohe Konkurrenzeffizienz bei niedrigen Wachstumsraten als auch durch hohe, aufgrund schnellen Wachstums unmittelbar nach Auftreten des Ressourcenpulses erreichte Populationsdichten von im weiteren Verlauf des Intervalls physiologisch inaktiven Zellen gewährleistet zu sein. Lebensgemeinschaften, die sich unter dem Einfluss von Ressourcenpulsen mittlerer Häufigkeit entwickelten, zeichneten sich durch die größte Vielfalt funktioneller Typen aus: Sowohl schnellwüchsige als auch mittelschnell und langsam wachsende Organismen waren unter diesen Bedingungen präsent. Die für die Chemostat-Modell-Lebensgemeinschaften beobachteten Muster ihrer funktionellen Struktur stimmen im wesentlichen mit den von CONNELL in Abhängigkeit von unterschiedlichen Störungsregimes postulierten überein. Dies bestätigt, dass die Konkurrenz um störungsbedingt wechselnd zur Verfügung stehende limitierende Ressourcen, wie von CONNELL angenommen, als grundlegender Mechanismus für die Erzeugung unterschiedlicher Diversitätsmuster anzusehen ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen die Bedeutung, welche die zeitabhängigen Prozesse der Ressourcenmonopolisierung unter wechselnden Bedingungen der Ressourcenverfügbarkeit, im Fall der Modell-Lebensgemeinschaften planktischer Bakterien vor allem die Geschwindigkeit des Populationswachstums, für die Ausbildung der durch die IDH postulierten Diversitätsmuster haben. Als ein universeller zeitlicher Skalierungsmaßstab für Störungsregimes, die für eine Beeinflussung der Diversität der jeweils untersuchten Organismen relevant sind, wird daher die Generationszeit bzw. ein äquivalenter Parameter, der auch andere Rekrutierungsmechanismen wie z. B. Immigration berücksichtigt, diskutiert.

Weiterhin wird erörtert, inwieweit Störungsregimes, wie sie in den Chemostatexperimenten an Modell-Gemeinschaften planktischer Bakterien untersucht wurden, auch für Bakterio-plankton in natürlichen Habitaten von Bedeutung sein können.

6 Literaturverzeichnis

- Abraham, W.-R., Strömpel, C., Meyer, H., Lindholst, S., Moore, E. R. B., Christ, R., Vannanneyt, M., Tindall, B. J., Bennasar, A., Smit, J. & Tesar, M. (1999):** Phylogeny and polyphasic taxonomy of *Caulobacter* species. Proposal of *Maricaulis* gen. nov. with *Maricaulis maris* (Poindexter) comb. nov. as the type species, and emended description of the genera *Brevundimonas* and *Caulobacter*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**: 1053-1073.
- Albrecht, D. (1973):** Verbesserte Methoden zur automatischen Wasseranalyse in der Limnologie. *Vom Wasser* **41**: 129-135.
- Albrecht, D. & Overbeck, J. (1969):** Wasseranalysen in der Limnologie mit Hilfe des Technicon AutoAnalyzers. *Technicon Wasserkolloquium*. T. GmbH. Bad Nauheim: 15.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990):** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**(3): 403-410.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997):** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**(17): 3389-3402.
- Andrade, G., Esteban, E., Velasco, L., Lorite, M. J. & Bedmar, E. J. (1997):** Isolation and identification of N-2-fixing microorganisms from the rhizosphere of *Capparis spinosa* (L.). *Plant & Soil* **197**(1): 19-23.
- Angelstam, P. K. (1998):** Maintaining and restoring biodiversity in European boreal forests by developing natural disturbance regimes. *Journal of Vegetation Science* **9**(4): 593-602.
- Armesto, J. J. & Pickett, S. T. A. (1985):** Experiments in old-field plant communities: impact on species richness and abundance. *Ecology* **66**: 230-240.
- Armstrong, R. A. & McGehee, R. (1976):** Coexistence of competing species for shared resources. *Theoretical Population Biology* **9**: 317-328.
- Aronson, R. B. & Precht, W. F. (1995):** Landscape patterns of reef coral diversity: A test of the intermediate disturbance hypothesis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **192**(1): 1-14.
- Aulicino, F. A., Palin, L. & Orsini, P. (1996):** Presence of biofilm in a drinking water system in Piemonte. *Igiene Moderna* **105**(1): 29-40.
- Austen, M. C., Widdicombe, S. & Villano-Pitacco, N. (1998):** Effects of biological disturbance on diversity and structure of meiobenthic nematode communities. *Marine Ecology Progress Series* **174**: 233-246.
- Bahr, M., Hobbie, J. E. & Sogin, M. L. (1996):** Bacterial diversity in an arctic lake: a freshwater SAR11 cluster. *Aquatic Microbial Ecology* **11**(3): 271-277.
- Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. & (eds.) (1991):** *The Prokaryotes*. New York, Springer Verlag.
- Barbiero, R. P., James, W. F. & Barko, J. W. (1999):** The effect of disturbance events on phytoplankton community structure in a small temperate reservoir. *Freshwater Biology* **42**: 503-512.
- Barcina, I., Lebaron, P. & Vives-Rego, J. (1997):** Survival of allochthonous bacteria in aquatic systems: a biological approach. *FEMS Microbiology Ecology* **23**: 1-9.
- Bartscht, K., Cypionka, H. & Overmann, J. (1999):** Evaluation of cell activity and of methods for the cultivation of bacteria from a natural lake community. *FEMS Microbiology Ecology* **28**(3): 249-259.
- Beckage, B. & Stout, I. J. (2000):** Effects of repeated burnig on species richness in a Florida pine savanna: A test of the intermediate disturbance hypothesis. *Journal of Vegetation Science* **11**: 113-122.
- Begon, M., Harper, J. L. & Townsend, C. R. (1990):** *Ecology - Individuals, Populations and Communities*. Boston, USA, Blackwell Scientific Publications, Inc.
- Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., Rapp, B. A. & Wheeler, D. L. (2000):** GenBank. *Nucleic Acid Research* **28**(1): 15-18.

- Biggs, B. J. F., Kilroy, C. & Lowe, R. L. (1998 a):** Periphyton development in three valley segments of a New Zealand grassland river: test of a habitat matrix conceptual model within a catchment. *Archiv für Hydrobiologie* **143**(2): 147-177.
- Biggs, B. J. F., Stevenson, R. J. & Lowe, R. L. (1998 b):** A habitat matrix conceptual model for stream periphyton. *Archiv für Hydrobiologie* **143**(1): 21-56.
- Binnerup, S. J. J., Dan Funck; & Thordal- Christensen, H. S., Jan; (1993):** Detection of viable, but non-culturable *Pseudomonas fluorescens* DF 57 in soil using a microcolony epifluorescence technique. *Microbiology Ecology* **12**: 97-105.
- Bohlool, B. B. & Schmidt, E. (1980):** The Immunofluorescence Approach in Microbial Ecology. *Advances in Microbial Ecology*. M. Alexander. New York, USA, Plenum Press. **4**: 203-241.
- Brock, T. D. (1987):** The Study of Microorganisms in Situ: Progress and Problems. Symposium of The Society for General Microbiology **41**: 1-17.
- Burslem, D. F. R. P. & Whitmore, T. C. (1999):** Species diversity, susceptibility to disturbance and tree population dynamics in tropical rain forest. *Journal of Vegetation Science* **10**: 767-776.
- Busse, H.-J., Denner, E. B. M. & Lubitz, W. (1996):** Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *Journal of Biotechnology* **47**(1): 3-38.
- Button, D. K., Robertson, B. R. & Jüttner, F. (1996):** Microflora of a subalpine lake: bacterial populations, size and DNA distributions, and their dependence on phosphate. *FEMS Microbiology Ecology* **21**(2): 87-101.
- Carrillo, P., Reche, I. & Cruzpizarro, L. (1996):** Quantification of the phosphorus released by zooplankton in an oligotrophic lake (La Caldera, Spain): regulating factors and adjustment to theoretical models. *Journal of Plankton Research* **18**(9): 1567-1586.
- Chantler, S. M. & McIlmurray, M. B. (1987):** Labelled-Antibody Methods for Detection and Identification of Microorganisms. *Current Methods for Classification and Identification of Microorganisms*. R. R. Colwell and R. Grigova. London, UK, Academic Press. **19**: 273-332.
- Chen, C.-C., Petersen, J. E. & Kemp, W. M. (1997):** Spatial and temporal scaling of periphyton growth on walls of estuarine mesocosms. *Marine Ecology Progress Series* **155**: 1-15.
- Choi, J. W., Sherr, E. B. & Sherr, B. F. (1996):** Relation between presence-absence of a visible nucleoid and metabolic activity in bacterioplankton cells. *Limnology and Oceanography* **41**(6): 1161-1168.
- Chou, Q., Russel, M., Birch, D. E., Raymond, J. & Bloch, W. (1992):** Prevention of pre PCR mis priming and primer demerization improves low copy number amplifications. *Nucleic Acids Research* **20**(7): 1717-1723.
- Claridge, M. F., Dawah, H. A. & Wilson, M. R. (1997):** Practical approaches to species concepts for living organisms. *Species- The units of biodiversity*. M. F. Claridge, H. A. Dawah and M. R. Wilson. London, Chapman & Hall. **54**: 1-15.
- Clarke, K. R. & Warwick, R. M. (1998):** A taxonomic distinctness index and its statistical properties. *Journal of Applied Ecology* **35**(4): 523-531.
- Collins, M. D., Cockcroft, S. & Wallbanks, S. (1994):** Phylogenetic Analysis of a New LL-Diaminopimelic Acid-Containing Coryneform Bacterium from Herbage, *Nocardioides plantarum* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**(3): 523-526.
- Collins, S. L., Glenn, S. M. & Gibson, D. J. (1995):** Experimental analysis of intermediate disturbance and initial floristic composition: decoupling cause and effect. *Ecology* **76**(2): 486-492.
- Connell, J. H. (1978):** Diversity in Tropical Rain Forests and Coral Reefs. *Science* **199**: 1302-1310.
- Death, R. G. & Winterbourn, M. J. (1995):** Diversity patterns in stream benthic invertebrate communities: the influence of habitat stability. *Ecology* **76**(5): 1446-1460.
- Decostere, A., Haesebrouck, F. & Devriese, L. A. (1998):** Characterization of four *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*) strains isolated from tropical fish. *Veterinary Microbiology* **62**(1): 35-45.

- del Giorgio, P. A., Prairie, Y. T. & Bird, D. F. (1997):** Coupling Between Rates of Bacterial Production and the Abundance of Metabolically Active Bacteria in Lakes, Enumerated Using CTC Reduction and Flow Cytometry. *Microbial Ecology* **34**(2): 144-154.
- del Giorgio, P. A. & Scarborough, G. (1995):** Increase in the proportion of metabolically active bacteria along gradients of enrichment in freshwater and marine plankton: implications for estimates of bacterial growth and production rates. *Journal of Plankton Research* **17**(10): 1905-1924.
- Denisova, L. Y., Bel'kova, N. L., Tulokhonov, I. I. & Zaichikov, E. F. (1999):** Bacterial Diversity at Various Depths in the Southern Part of Lake Baikal as Revealed by 16S rDNA Sequencing. *Microbiology* **68**(4): 475-483.
- Descy, J.-P. (1993):** Ecology of the phytoplankton of the River Moselle: effects of disturbances on community structure and diversity. *Hydrobiologia* **249**(1-3): 111-116.
- Dial, R. & Roughgarden, J. (1998):** Theory of marine communities: The intermediate disturbance hypothesis. *Ecology* **79**(4): 1412-1424.
- Diaper, J. P. & Edwards, C. (1994):** Survival of *Staphylococcus aureus* in lakewater monitored by flow cytometry. *Microbiology* **140**: 35-42.
- Doeg, T. J., Lake, P. S. & Marchant, R. (1989):** Colonization of experimentally disturbed patches by stream macroinvertebrates in the Acheron River, Victoria. *Australian Journal of Ecology* **14**: 207-220.
- Dollar, S. J. & Tibble, G. W. (1993):** Recurrent storm disturbance and recovery: a long study of coral communities in Hawaii. *Coral Reefs* **12**: 223-233.
- Eberhardt, U., Reh, M., Klemme, J.-H., Frings, W. & Andresen, J. R. (1981):** Mikrobiologisches Praktikum für Fortgeschrittene, Kurs 2, Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen. **2**.
- Eckert, B. & Walz, N. (1998):** Zooplankton succession and thermal stratification in the polymictic shallow Müggelsee (Berlin, Germany): a case for the intermediate disturbance hypothesis? *Hydrobiologia* **387/388**: 199-206.
- Embley, T. M. & Stackebrandt, E. (1997):** Species in practice: exploring uncultured prokaryote diversity in natural samples. *Species- The units of biodiversity*. M. F. Claridge, H. A. Dawah and M. R. Wilson. London, Chapman & Hall. **54**: 61-81.
- Engel, M., Ludwig, W. & Schleifer, K.-H. (1998):** Determination of Sequence Variations of Multiple rRNA Operons with DGGE. Genetic Fingerprinting of Microbial Communities - present status and future perspectives, MPI f. Marine Microbiology, Bremen, Germany.
- Fayolle, S., Cazaubon, A., Comte, K. & Franquet, E. (1998):** The Intermediate Disturbance Hypothesis: Application of this concept to the response of epilithon in a regulated Mediterranean river (Lower-Durance, southeastern France). *Archiv für Hydrobiologie*. **143**(1): 57-77.
- Felsenstein, J. (1993):** PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Washington.
- Ferreira, A. C., Morais, P. V., Gomes, C. & da Costa, M. S. (1996):** Computer-aided comparison of protein electrophoretic patterns for grouping and identification of heterotrophic bacteria from mineral water. *Journal of Applied Bacteriology* **80**(5): 479-486.
- Fliermans, C. B., Franck, M. M., Hazen, T. C. & Gordon, R. W. (1997):** Ecofunctional enzymes of microbial communities in ground water. *FEMS Microbiology Reviews* **20**(3-4): 379-389.
- Flöder, S. (1999):** The Influence of Mixing Frequency and Depth on Phytoplankton Mobility. *International Review of Hydrobiology* **84**(2): 119-128.
- Flöder, S. & Sommer, U. (1999):** Diversity in planktonic communities: An experimental test of the intermediate disturbance hypothesis. *Limnology and Oceanography* **44**(4): 1114-1119.
- Freund, J. (1956):** The mode of action of immunologic adjuvants. *Advances Tuberculosis Research* **7**: 130-148.
- Freund, J. & McDermott, K. (1942):** Sensitization to horse serum by means of adjuvants. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **49**: 548-553.

- Frouin, P. (2000):** Effects of anthropogenic disturbances of tropical soft-bottom communities. *Marine Ecology Progress Series* **194**: 39-53.
- Fulbright, T. E. (1996):** Viewpoint: A theoretical basis for planning woody plant control to maintain species diversity. *Journal of Range Management* **49**(6): 554-559.
- Gaedeke, A. & Sommer, U. (1986):** The influence of the frequency of periodic disturbances on the maintenance of phytoplankton diversity. *Oecologia (Berlin)* **71**: 25 - 28.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* **57**(8): 2351-2359.
- Gasol, J. M., del Giorgio, P. A., Massana, R. & Duarte, C. M. (1995):** Active versus inactive bacteria: size-dependence in a coastal marine plankton community. *Marine Ecology Progress Series* **128**(1-3): 91-97.
- Gause, G. F. (1937):** Experimental populations of microscopic organisms. *Ecology* **18**: 173-179.
- Gauthier, M. J., Flatau, G. N., Clément, R. L. & Munro, P. M. (1993):** The Loss of Culturability by *Escherichia coli* Cells in Seawater Depends on Availability of Phosphate Ions and Phosphate Transport Systems. *Microbial Ecology* **26**: 29-35.
- Glöckner, F. O., Fuchs, B. M. & Amann, R. (1999):** Bacterioplankton Compositions of Lakes and Oceans: a First Comparison Based on Fluorescence In Situ Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(8): 3721-3726.
- Goldman, J. C., McCarthy, J. J. & Peavey, D. G. (1979):** Growth rate influence on the chemical composition of phytoplankton in oceanic waters. *Nature* **279**: 210-215.
- Gonin, M., Quardokus, E. M., O'Donnol, D., Maddock, J. & Brun, Y. V. (1999):** Regulation of Stalk Elongation by Phosphate in *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology* **182**(2): 337-347.
- Gonzalez, C., Gutierrez, C. & Grande, T. (1987):** Bacterial flora in bottled uncarbonated mineral drinking water. *Canadian Journal of Microbiology* **33**(12): 1120-1125.
- Goodfellow, M., Manfio, G. P. & Chun, J. (1997):** Towards a practical species concept for cultivable bacteria. *Species- The units of biodiversity*. M. F. Claridge, H. A. Dawah and M. R. Wilson. London, Chapman & Hall. **54**: 25-59.
- Grime, J. P. (1977):** Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *The American Naturalist* **111**: 1169-1194.
- Guillard, R. R. L. & Lorenzen, C. J. (1972):** Yellow-green algae with chlorophyllide c. *J. Phycol.* **8**: 10-14.
- Gulati, R. D., Martinez, C. P. & Siewertsen, K. (1995):** Zooplankton as a compound mineralizing and synthesizing system: Phosphorus excretion. *Hydrobiologia* **315**(1): 25-37.
- Gurung, T. B., Urabe, J. & Nakanishi, M. (1999):** Regulation of the relationship between phytoplankton *Scenedesmus acutus* and heterotrophic bacteria by the balance of light and nutrients. *Aquatic Microbial Ecology* **17**(1): 27-35.
- Hacker, S. D. & Bertness, M. D. (1999):** Experimental evidence for factors maintaining plant species diversity in a New England salt marsh. *Ecology* **80**(6): 2064-2073.
- Hahn, M. W. & Höfle, M. G. (1998):** Grazing Pressure by a Bacterivorous Flagellate Reverses the Relative Abundance of *Comamonas acidovorans* PX54 and *Vibrio* strain CB5 in Chemostat Cocultures. *Applied and Environmental Microbiology* **64**(5): 1910-1918.
- Hahn, M. W. & Höfle, M. G. (1999):** Flagellate Predation on a Bacterial Model Community: Interplay of Size-Selective Grazing, Specific Bacterial Cell Size, and Bacterial Community Composition. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(11): 4863-4872.
- Hambright, D. K. & Zohary, T. (2000):** Phytoplankton species diversity control through competitive exclusion and physical disturbance. *Limnology and Oceanography* **45**(1): 110-122.

- Hara, M., Fukuyama, M., Suzuki, Y., Kisikawa, S., Ikeda, T., Kiuchi, A. & Tabuchi, K. (1996):** Detection of feline herpesvirus 1 DNA by the nested polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology* **48**(3-4): 345-352.
- Hardin, G. (1960):** The competitive exclusion principle. *Science* **131**: 1292-1297.
- Hardy, G. H. (1908):** Mendelian proportions in a mixed population. *Science* **28**: 49-50.
- Harlow, E. & Lane, D. (1988):** Antibodies - A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Hiorns, W. D., Methé, B. A., Nierzwicki-Bauer, S. A. & Zehr, J. P. (1997):** Bacterial Diversity in Adirondack Mountain Lakes as Revealed by 16S rRNA Gene Sequences. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(7): 2957-2960.
- Hiura, T. (1995):** Gap formation and species diversity in Japanese beech forests: a test of the intermediate disturbance hypothesis on a geographic scale. *Oecologia* **104**(3): 265-271.
- Hixon, M. A. & Brostoff, W. N. (1983):** Damsel fish as Keystone Species in Reverse: Intermediate Disturbance and Diversity of Reef Algae. *Science* **220**: 511-513.
- Hoff, K. A. (1988):** Rapid and Simple Method for Double Staining of Bacteria with 4', 6-Diamidino-2-Phenylindole and Fluorescein Isothiocyanate-Labeled Antibodies. *Applied and Environmental Microbiology* **54**(12): 2949-2952.
- Höfle, M. G. (1990):** RNA Chemotaxonomy of Bacterial Isolates and Natural Microbial Communities. *Aquatic Microbial Ecology - Biochemical and Molecular Approaches*. J. Overbeck and R. J. Chrost. New York, USA, Springer-Verlag: 129-159.
- Höfle, M. G. (1992):** Bacterioplankton Community Structure and Dynamics after Large-Scale Release of Nonindigenous Bacteria as Revealed by Low-Molecular-Weight-RNA Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **58**(10): 3387-3394.
- Höfle, M. G., Haas, H. & Dominik, K. (1999):** Seasonal Dynamics of Bacterioplankton Community Structure in a Eutrophic Lake as Determined by 5S rRNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(7): 3164-3174.
- Hu, F. P., Young, J. M. & Fletcher, M. J. (1998):** Preliminary description of biocidal (syngomycin) activity in fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas* species. *Journal of Applied Microbiology* **85**(2): 365-371.
- Hurlbert, S. H. (1971):** The Nonconcept of Species Diversity: a Critique and Alternative Parameters. *Ecology* **52**(4): 577-586.
- Hutchinson, G. E. (1957):** Concluding remarks. Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, Cold Spring Harbour.
- Hutchinson, G. E. (1959):** Homage to Santa Rosalia - or - Why are there so many kinds of animals? *The American Naturalist* **93**(870): 145-159.
- Hutchinson, G. E. (1961):** The Paradox of the Plankton. *The American Naturalist* **95**(882): 137-145.
- Imberger, J. (1985):** The diurnal mixed layer. *Limnology and Oceanography* **30**(4): 737-770.
- Jäger, W., Kromker, S. & Tang, B. (1994):** Quiescence and transient growth dynamics in chemostat models. *Mathematical Biosciences* **119**(2): 225-239.
- Jannasch, H. W. & Mateles, R. I. (1974):** Experimental Bacterial Ecology Studied in Continuous Culture. *Advances in Microbial Physiology* **11**: 165-212.
- Jansson, M., Blomqvist, P., Jonsson, A. & Bergstrom, A. K. (1996):** Nutrient limitation of bacterioplankton, autotrophic and mixotrophic phytoplankton, and heterotrophic nanoflagellates in Lake Örträsket. *Limnology and Oceanography* **41**(7): 1552-1559.
- Jarvis, B. D. W. & Tighe, S. W. (1994):** Rapid identification of *Rhizobium* species based on cellular fatty acid analysis. *Plant & Soil* **161**(1): 31-41.

- Jayasekara, N. Y., Heard, G. M., Cox, J. M. & Fleet, G. H. (1998):** Populations of pseudomonads and related bacteria associated with bottled non-carbonated mineral water. *Food Microbiology* **15**(2): 167-176.
- Jayasekara, N. Y., Heard, G. M., Cox, J. M. & Fleet, G. H. (1999):** Association of micro-organisms with the inner surfaces of bottles of non-carbonated mineral waters. *Food Microbiology* **16**: 115-128.
- Jones, A. M., Adkins, A. M., Knowles, R. & Rayat, G. R. (1990):** Identification of a denitrifying gliding bacterium isolated from soil and able to reduce nitrous oxide in the presence of sulfide and acetylene as *Flexibacter canadensis*. *Canadian Journal of Microbiology* **36**(11): 765-770.
- Joshi, B. & Walia, S. (1995):** Characterization by arbitrary primer polymerase chain reaction of polychlorinated biphenyl (PCB)-degrading strains of *Comamonas testosteroni* isolated from PCB-contaminated soil. *Canadian Journal of Microbiology* **41**(7): 612-619.
- Jürgens, K. (1994):** Impact of *Daphnia* on planktonic microbial food webs - A review. *Marine Microbial Food Webs* **8**(1-2): 295-324.
- Jürgens, K., Pernthaler, J., Schalla, S. & Amann, R. (1999):** Morphological and Compositional Changes in a Planktonic Bacterial Community in Response to Enhanced Protozoan Grazing. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(3): 1241-1250.
- Kämpfer, P., Erhart, R., Beimfohr, C., Böhringer, J., Wagner, M. & Amann, R. (1996):** Characterization of Bacterial Communities from Activated Sludge: Culture-Dependent Numerical Identification Versus In Situ Identification Using Group- and Genus-Specific rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes. *Microbial Ecology* **32**(2): 101-121.
- Karner, M. & Fuhrman, J. A. (1997):** Determination of Active Marine Bacterioplankton: a Comparison of Universal 16S rRNA Probes, Autoradiography, and Nucleoid Staining. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(4): 1208-1213.
- Kawaharasaki, M., Tanaka, H., Kanagawa, T. & Nakamura, K. a. (1999):** *In situ* identification of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge by dual staining with rRNA-targeted oligonucleotide probes and 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) at a polyphosphate-probing concentration. *Water Research* **33**(1): 257-265.
- Kimmins, J. P. (1999):** Biodiversity, beauty and the "beast": Are beautiful forests sustainable, are sustainable forests beautiful, and is "small" always ecologically desirable? *Forestry Chronicle* **75**(6): 955-960.
- Kimura, M. (1980):** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**(2): 111-120.
- Kinkel, L. L., Nordheim, E. V. & Andrews, J. H. (1992):** Microbial Community Analysis in Incompletely or Destructively Sampled Systems. *Microbial Ecology* **24**(3): 227-242.
- Koch, A. L. (1981):** Growth Measurement. *Manual of Methods for General Bacteriology*. P. Gerhardt, R. G. E. Murray, R. N. Costilow et al. Washington, DC, American Society for Microbiology: 179-207.
- Konopka, A., Bercot, T. & Nakatsu, C. (1999):** Bacterioplankton Community Diversity in a Series of Thermally Stratified Lakes. *Microbial Ecology* **38**(2): 126-135.
- Kragelund, L. & Nybroe, O. (1994):** Culturability and Expression of Outer Membrane Proteins during Carbon, Nitrogen, or Phosphorus Starvation of *Pseudomonas fluorescens* DF57 and *Pseudomonas putida* DF14. *Applied and Environmental Microbiology* **60**(8): 2944-2948.
- Krebs, C. J. (1985):** *Ecology - The Experimental Analysis of Distribution and Abundance*. New York, USA, Harper and Row.
- Krebs, C. J. (1998):** Species Diversity Measures. *Ecological Methodology*. E. Fogarty, V. McDougal and N. Murray. Menlo Park, CA, USA, Benjamin/Cummings.
- Kremser, A. (1995):** *Nahrungskettenmanipulation im Plußsee: die Regulation der planktivoren Fische (Perca fluviatilis L. und Rutilus rutilus) durch Ressourcen und Konsumenten*. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Christian-Albrechts-Universität, Kiel; 121 S.

- Krsek, M. (1998):** Do we see the real picture?! Selectivity of DNA extraction techniques. Genetic Fingerprinting of Microbial Communities - present status and future perspectives, MPI f. Marine Microbiology, Bremen, Germany.
- Kukert, H. & Smith, C. R. (1992):** Disturbance, colonization and succession in a deep-sea sediment community: artificial-mound experiments. *Deep-Sea Research* **39**(7/8): 1349-1371.
- Kurihara, Y., Shikano, S. & Toda, M. (1990):** Trade-off between interspecific competitive ability and growth rate in bacteria. *Ecology* **71**(2): 645-650.
- Lampert, W. & Sommer, U. (1993):** Limnökologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Lande, R. (1996):** Statistics and partitioning of species diversity, and similarity among multiple communities. *Oikos* **76**: 5-13.
- Lane, D. J. (1991):** 16S/23S rRNA Sequencing. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. E. Stackebrandt and M. Goodfellow. Chichester, UK, John Wiley & Sons Ltd: 115-175.
- Lardicci, C. & Rossi, F. (1998):** Detection of Stress on Macrozoobenthos: Evaluation of Some Methods in a Coastal Mediterranean Lagoon. *Marine Environmental Research* **45**(4/5): 367-386.
- Larsen, N., Olsen, G. J., Maidak, B. L., McCaughey, M. J., Overbeek, R., Macke, T. J., Marsh, T. L. & Woese, C. R. (1993):** The Ribosomal Database Project. *Nucleic Acids Research* **21**(13): 3021-3023.
- Lebaron, P., Servais, P., Troussellier, M., Courties, C., VivesRego, J., Muyzer, G., Bernard, L., Guindulain, T., Schafer, H. & Stackebrandt, E. (1999):** Changes in bacterial community structure in seawater mesocosms differing in their nutrient status. *Aquatic Microbial Ecology* **19**(3): 255-267.
- Leegwater, M. P. M. (1983):** Microbial reactivity: Its relevance to growth in natural and artificial environments. Dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Amsterdam; 195 S.
- Lemmer, H., Lind, G., Schade, M. & Ziegelmayr, B. (1998):** Autecology of scum producing bacteria. *Water Science and Technology* **37**(4-5): 527-530.
- Lent, R. A. & Capen, D. E. (1995):** Effects of small - scale habitat disturbance on the ecology of breeding birds in a Vermont (USA) hardwood forest. *Ecography* **18**: 97 - 108.
- Lerman, L. S., Fischer, S. G., Hurly, I., Silverstein, K. & Lumelsky, N. (1984):** Sequence determined DNA-separation. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **13**: 399-432.
- Levins, R. (1979):** Coexistence in a variable environment. *The American Naturalist* **114**: 765-783.
- Liber, K., Kaushik, N. K., Solomon, K. R. & Carey, J. H. (1992):** Experimental Designs for Aquatic Mesocosm Studies: A Comparison of the "Anova" and "Regression" Design for Assessing the Impact of Tetrachlorophenol on Zooplankton Populations in Limnocorrals. *Environmental Toxicology and Chemistry* **11**: 61-77.
- Lindenschmidt, K.-E. & Chorus, I. (1998):** The effect of water column mixing on phytoplankton succession, diversity and similarity. *Journal of Plankton Research* **20**(10): 1927-1951.
- Lindström, E. S. (1998):** Bacterioplankton community composition in a boreal forest lake. *FEMS Microbiology Ecology* **27**(2): 163-174.
- Logan, N. A. (1989):** Numerical taxonomy of violet-pigmented gram-negative bacteria and description of iodobacter-fluviatile new-genus new-combination. *International Journal of Systematic Bacteriology* **39**(4): 450-456.
- Lozán, J. L. (1992):** Angewandte Statistik für Naturwissenschaftler. Berlin, Verlag Paul Parey.
- Ludwig, J. A. & Reynolds, J. F. (1988):** Diversity Indices. Statistical Ecology - A Primer on Methods and Computing. New York, John Wiley & Sons: 85-103.
- Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M. & Schleifer, K.-H. (1998):** Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19**(4): 554-568.

- MacArthur, R. H. & Levins, R. (1967):** The limiting similarity, convergence, and divergence of coexisting species. *The American Naturalist* **101**(921): 377-385.
- Mackey, R. L. & Currie, D. J. (1997):** The intermediate disturbance hypothesis: Just an artifact of sampling intensity? *Bulletin of the Ecological Society of America*.
- Mackey, R. L. & Currie, D. J. (2000):** A re-examination of the effects of disturbance on diversity. *Oikos* **88**(3): 483-493.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. (1997):** Brock - Biology of Microorganisms. Upper Saddle River, USA, Prentice-Hall, Inc.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1982):** Propagation and Maintenance of Bacterial Strains and Viruses. Molecular Cloning. T. F. Maniatis, E. F.; Sambrook, J.; Cold Spring Harbor Laboratory: 56-73.
- Marone, L. (1990):** Modifications of local and regional bird diversity after a fire in the Monte Desert, Argentina. *Revista Chilena de Historia Natural* **63**: 187-195.
- May, R. M. (1973):** Stability and Complexity in Model Ecosystems. Princeton, USA, Princeton University Press.
- McDougald, D., Rice, S. A. & Kjelleberg, S. (1999):** New perspectives on the viable but nonculturable response. *Biologia* **54**(6): 617-623.
- McDougald, D., Rice, S. A., Weichart, D. & Kjelleberg, S. (1998):** Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiol Ecology* **25**(1): 1-9.
- McGrady-Steed, J., Harris, P., M. & Morin, P., J. (1997):** Biodiversity regulates ecosystem predictability. *Nature* **390**: 162-164.
- McIntyre, S. & Lavorel, S. (1994):** Predicting Richness of Native, Rare, and Exotic Plants in Response to Habitat and Disturbance Variables across a Variegated Landscape. *Conservation Biology* **8**(2): 521-531.
- Methé, B. A., Hiorns, W. D. & Zehr, J. P. (1998):** Contrasts between marine and freshwater bacterial community composition: Analyses of communities in Lake George and six other Adirondack lakes. *Limnology and Oceanography* **43**(2): 368-374.
- Meyer-Reil, L.-A. (1978):** Autoradiography and Epifluorescence Microscopy Combined for the Determination of Number and Spectrum of Actively Metabolizing Bacteria in Natural Waters. *Applied and Environmental Microbiology* **36**(3): 506-512.
- Mitchell, J. G. & Fuhrman, J. A. (1989):** Centimeter scale vertical heterogeneity in bacteria and chlorophyll *a*. *Marine Ecology Progress Series* **54**: 141-148.
- Molin, G. & Ternstrom, A. (1986):** Phenotypically based taxonomy of psychrotrophic pseudomonas isolated from spoiled meat water and soil. *International Journal of Systematic Bacteriology* **36**(2): 257-274.
- Monod, J. (1950):** La technique de culture continue: theorie et applications. *Ann. Inst. Pasteur Paris* **79**: 390-410.
- Mouget, J. L., Dakhama, A., Lavoie, M. C. & De La Noue, J. (1995):** Algal growth enhancement by bacteria: Is consumption of photosynthetic oxygen involved? *FEMS Microbiology Ecology* **18**(1): 35-43.
- Mouillot, D. & Lepretre, A. (1999):** A comparison of species diversity estimators. *Researches on Population Ecology* **41**(2): 203-215.
- Mudarris, M. & Austin, B. (1988):** Quantitative and qualitative studies of the bacterial microflora of turbot *Scophthalmus maximus* l. gills. *Journal of Fish Biology* **32**(2): 223-230.
- Mujumdar, R. B., Ernst, L. A., Mujumdar, S. R., Lewis, C. J. & Waggoner, A. S. (1993):** Cyanine Dye Labeling Reagents: Sulfoindocyanine Succinimidyl Esters. *Bioconjugate Chemistry* **4**(2): 105-111.
- Muyzer, G., DeWaal, E. C. & Uitterlinden, a. G. (1993):** Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59**(3): 695-700.

- Muyzer, G., Nübel, U. & Schäfer, H. (1998):** Protocols: Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR-amplified 16S rDNA. Genetic Fingerprinting of Microbial Communities - present status and future perspectives, MPI f. Marine Microbiology, Bremen, Germany.
- Myers, R. M., Fischer, S. G., Maniatis, T. & Lerman, L. S. (1985):** Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research* **13**(9): 3111-3129.
- Naeem, S., Hahn, D. R. & Schuurman, G. (2000):** Producer-decomposer co-dependency influences biodiversity effects. *Nature* **403**: 762-764.
- Naeem, S. & Li, S. (1997) Biodiversity enhances ecosystem reliability. *Nature* **390**: 507-509.
- Nakamura, T., Shibata, Y. & Fujimura, S. (1988):** Purification and properties of bacteroides-heparinolyticus heparinase heparin lyase ec 4.2.2.7. *Journal of Clinical Microbiology* **26**(5): 1070-1071.
- Nold, S. C. & Zwart, G. (1998):** Patterns and governing forces in aquatic microbial communities. *Aquatic Ecology* **32**: 17-35.
- Odgaard, B. V. (1994):** The Holocene vegetation history of northern West Jutland, Denmark. *Opera Botanica* **123**: 5-171.
- Olsen, Y., Knutsen, G. & Lien, T. (1983):** Characteristics of Phosphorus Limitation in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae) and its Palmelloids. *J. Phycol.* **19**: 313-319.
- Pace, N. R. (1997):** A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276**: 734-740.
- Padisák, J. (1992):** Seasonal succession of phytoplankton in a large shallow lake (Balaton, Hungary) - a dynamic approach to ecological memory, its possible role and mechanisms. *Journal of Ecology* **80**: 217-230.
- Padisák, J. (1993):** The influence of different disturbance frequencies on the species richness, diversity, and equitability of phytoplankton in shallow lakes. *Hydrobiologia* **249**(1-3): 135-156.
- Padisák, J. (1994):** Identification of Relevant Time-Scales in Non-Equilibrium Community Dynamics: Conclusions from Phytoplankton Surveys. *New Zealand Journal of Ecology* **18**(2): 169 - 176.
- Palmer, M. W. (1994):** Variation in species richness: Towards a unification of hypotheses. *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica*. **29**(4): 511-530.
- Patel, D. S., Desai, A. J. & Desai, J. D. (1998):** Biodegradation of dimethylterephthalate by *Comamonas acidovorans* D-4. *Indian Journal of Experimental Biology* **36**(3): 321-324.
- Pearsons, T. N., Li, H. W. & Lamberti, G. A. (1992):** Influence of Complexity on Resistance to Flooding and Resilience of Stream Fish Assemblages. *Transactions of the American Fisheries Society* **121**: 427-436.
- Peltzer, D. A., Bast, M. L., Wilson, S. D. & Gerry, A. K. (2000):** Plant diversity and tree responses following contrasting disturbances in boreal forest. *Forest Ecology and Management* **127**: 191-203.
- Perbal, B. V. (1988):** Separation of DNA fragments by electrophoresis. A practical guide to molecular cloning. New York, John Wiley & Sons, Inc.: 340-362.
- Pernthaler, J., Alfreider, A., Posch, T., Andreatta, S. & Psenner, R. (1997):** In Situ Classification and Image Cytometry of Pelagic Bacteria from a High Mountain Lake (Gossenköllesee, Austria). *Applied and Environmental Microbiology* **63**(12): 4778-4783.
- Pernthaler, J., Posch, T., Simek, K., Vrba, J., Amann, R. & Psenner, R. (1997):** Contrasting bacterial strategies to coexist with a flagellate predator in an experimental microbial assemblage. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(2): 596-601.
- Persson, A. (1997):** Effects of fish predation and excretion on the configuration of aquatic food webs. *Oikos* **79**(1): 137-146.
- Petraitis, P. S., Latham, R. E. & Niesenbaum, R. A. (1989):** The maintenance of species diversity by disturbance. *The Quarterly Review of Biology* **64**(4): 393-418.
- Pfennig, N. & Jannasch, H. W. (1962):** Biologische Grundfragen bei der homokontinuierlichen Kultur von Mikroorganismen. *Ergebnisse der Biologie* **25**: 93-135.

- Pinhassi, J., Azam, F., Hemphala, J., Long, R. A., Martinez, J., Zweifel, U. L. & Hagstrom, A. (1999):** Coupling between bacterioplankton species composition, population dynamics, and organic matter degradation. *Aquatic Microbial Ecology* **17**(1): 13-26.
- Plath, K. (1999):** Filtrierverhalten von *Daphnia*: Anpassungen an die Variabilität des Habitates. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät; Christian-Albrechts-Universität, Kiel; 97 S..
- Polishchuk, L. V. (1999):** Contribution analysis of disturbance-caused changes in phytoplankton diversity. *Ecology* **80** (2): 721-725.
- Porter, J., Diaper, J., Edwards, C. & Pickup, R. (1995):** Direct Measurements of Natural Planktonic Bacterial Community Viability by Flow Cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* **61**(7): 2783-2786.
- Porter, K. G. & Feig, Y. S. (1980):** The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* **25**(5): 943-948.
- Power, M. E., Dietrich, W. E. & Finlay, J. C. (1996):** Dams and Downstream Aquatic Biodiversity: Potential Food Web Consequences of Hydrologic and Geomorphic Change. *Environmental Management* **20**(6): 887-895.
- Pyle, B. H., Broadway, S. C. & McFeters, G. A. (1995):** Factors Affecting the Determination of Respiratory Activity on the Basis of Cyanoditol Tetrazolium Chloride Reduction with Membrane Filtration. *Applied and Environmental Microbiology* **61**(12): 4304-4309.
- Rai, H. & Jacobsen, T. R. (1990):** Phosphate (^{32}P)-uptake capabilities of natural picoplankton and ultraplankton communities in lakes of differing degrees of eutrophication. *Archiv für Hydrobiologie* **118**(4): 421-435.
- Rajendran, N., Matsuda, O., Rajendran, R. & Urushigawa, Y. (1997):** Comparative Description of Microbial Community Structure in Surface Sediments of Eutrophic Bays. *Marine Pollution Bulletin* **34**(1): 26-33.
- Reasoner, D. J. & Geldreich, E. E. (1985):** A New Medium for the Enumeration and Subculture of Bakteria from Potable Water. *Applied and Environmental Microbiology* **49**(1): 1-7.
- Reynolds, C. S. (1988):** The concept of ecological succession applied to seasonal productivity of freshwater phytoplankton. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* **23**: 683-691.
- Reynolds, C. S., Padisák, J. & Sommer, U. (1993):** Intermediate disturbance in the ecology of phytoplankton and the maintenance of species diversity: a synthesis. *Hydrobiologia* **249**(1-3): 183-188.
- Richerson, P., Armstrong, R. & Goldman, C. R. (1970):** Contemporaneous Disequilibrium, a New Hypothesis to Explain the "Paradox of the Plankton". *Proceedings of the National Academy of Sciences* **67**(4): 1710-1714.
- Robinson, J. V. & Sandgren, C. D. (1983):** The effect of temporal environmental heterogeneity on community structure: a replicated experimental study. *Oecologia (Berlin)* **57**: 98 - 102.
- Rogers, C. S. (1993):** Hurricanes and coral reefs: the intermediate disturbance hypothesis revisited. *Coral Reefs* **12**: 127-137.
- Romano, G., Stampi, S., Zanetti, F., De Luca, G. & Tonelli, E. (1997):** Occurrence of gram-negative bacteria in drinking water undergoing softening treatment. *Zentralblatt Fuer Hygiene und Umweltmedizin* **200**(2-3): 152-162.
- Root, R. (1967):** The niche exploitation pattern of the bluegrey gnatcatcher. *Ecological Monographs* **37**: 317-350.
- Rothhaupt, K.-O. (1992):** Stimulation of phosphorus-limited phytoplankton by bacterivorous flagellates in laboratory experiments. *Limnology and Oceanography* **37**(4): 750-759.
- Rothhaupt, K.-O. (1997):** Nutrient turnover by freshwater bacterivorous flagellates: differences between a heterotrophic and a mixotrophic chrysophyte. *Aquatic Microbial Ecology* **12**(1): 65-70.

- Rothhaupt, K.-O. & Güde, H. (1992):** The influence of spatial and temporal concentration gradients on phosphate partitioning between different size fractions of plankton: Further evidence and possible causes. *Limnology and Oceanography* **37**(4): 739-749.
- Sachs, L. (1992):** *Angewandte Statistik*. Berlin, Springer Verlag.
- Saiki, R. K., Scharf, S. J., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. (1985):** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987):** The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**(4): 406-425.
- Sakai, K., Nakamura, K., Wakayama, M. & Moriguchi, M. (1997):** Change in nitrite conversion direction from oxidation to reduction in heterotrophic bacteria depending on the aeration conditions. *Journal of Fermentation & Bioengineering* **84**(1): 47-52.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977):** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Schlegel, H. G. (1992):** *Allgemeine Mikrobiologie*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Schweitzer, B. & Simon, M. (1995):** Growth limitation of planktonic bacteria in a large mesotrophic lake. *Microbial Ecology* **30**(1): 89-104.
- Schwilk, D. W., Keeley, J. E. & Bond, W. J. (1997):** The intermediate disturbance hypothesis does not explain fire and diversity pattern in fynbos. *Plant Ecology* **132**(1): 77-84.
- Shafik, H. M., Mastala, Z. & Vörös, L. (1998):** Competition between Phyto- and Bacterioplankton of Lake Balaton in Continuous Cultures. *International Review of Hydrobiology* **83**(5-6): 449-460.
- Shamsudin, M. N. & Plumb, J. A. (1996):** Morphological, biochemical, and physiological characterization of *Flexibacter columnaris* isolates from four species of fish. *Journal of Aquatic Animal Health* **8**(4): 335-339.
- Shapiro, H. M. (1995):** *Practical Flow Cytometry*. New York, USA, Wiley-Liss, Inc.
- Sherr, B. F., del Giorgio, P. & Sherr, E. B. (1999):** Estimating abundance and single-cell characteristics of respiring bacteria via the redox dye CTC. *Aquatic Microbial Ecology* **18**(2): 117-131.
- Simek, K., Kojecká, P., Nedoma, J., Hartman, P., Vrba, J. & Dolan, J. R. (1999):** Shifts in bacterial composition associated with different microzooplankton size fractions in a eutrophic reservoir. *Limnology and Oceanography* **44**(7): 1634-1644.
- Simek, K., Vrba, J., Pernthaler, J., Posch, T., Hartman, P., Nedoma, J. & Psenner, R. (1997):** Morphological and Compositional Shifts in an Experimental Bacterial Community Influenced by Protists with Contrasting Feeding Modes. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(2): 587-595.
- Sly, L. I., Cox, T. L. & Beckenham, T. B. (1999):** The phylogenetic relationships of *Caulobacter*, *Asticcacaulis* and *Brevundimonas* species and their taxonomic implications. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**: 483-488.
- Smith, S. W., Overbeek, R., Woese, C. R., Gilbert, W. & Gillevet, P. M. (1994):** The Genetic Data Environment: an expandable GUI for multiple sequence analysis. *Computer Applications in the Biosciences* **10**(6): 671-675.
- Sokal, R. R. & Rohlf, F. J. (1995):** *Biometry*. New York, W. H. Freeman & Company.
- Somerfield, P. J., Olsgard, F. & Carr, M. R. (1997):** A further examination of two taxonomic distinctness measures. *Marine Ecology Progress Series* **154**: 303-306.
- Sommer, U. (1985):** Comparison between steady state and non-steady competition: Experiments with natural phytoplankton. *Limnology and Oceanography* **30**(2): 335-346.
- Sommer, U. (1995):** An experimental test of the intermediate disturbance hypothesis using cultures of marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography* **40**(7): 1271-1277.

- Sousa, W. P. (1979):** Experimental investigation of disturbance and ecological succession in a rocky intertidal algal community. *Ecological Monographs* **49**: 227-254.
- Staley, J. T. & Konopka, A. (1985):** Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Microbiology* **39**: 321-346.
- StatSoft (1995):** STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK, USA, StatSoft, Inc.
- Stemberger, R. S. (1981):** A general approach to the culture of planktonic rotifers. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **38**: 721-724.
- Steyn, P. L., Pot, B., Segers, P., Kersters, K. & Joubert, J. J. (1992):** Some novel aerobic heparin-degrading bacterial isolates. *Systematic & Applied Microbiology* **15**(1): 137-143.
- Straskrabova, V. (1983):** The effect of substrate shock on populations of starving aquatic bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* **54**(2): 217-224.
- Suzuki, M. T. (1999):** Effect of protistan bacterivory on coastal bacterioplankton diversity. *Aquatic Microbial Ecology* **20**: 261-272.
- Szentkirályi, F. & Kozár, F. (1991):** How many species are there in apple insect communities?: testing the resource diversity and intermediate disturbance hypothesis. *Ecological Entomology* **16**: 491-503.
- Tabor, P. S. & Neihof, R. A. (1984):** Direct Determination of Activities for Microorganisms of Chesapeake Bay Populations. *Applied and Environmental Microbiology* **48**(5): 1012-1019.
- Tang, B., Sitomer, A. & Jackson, T. (1997):** Population dynamics and competition in chemostat models with adaptive nutrient uptake. *Journal of Mathematical Biology* **35**(4): 453-479.
- Thingstad, T. F., Zweifel, U. L. & Rassoulzadegan, F. (1998):** P limitation of heterotrophic bacteria and phytoplankton in the northwest Mediterranean. *Limnology and Oceanography* **43**(1): 88-94.
- Tilman, D. (1982):** Resource Competition and Community Structure. Princeton, USA, Princeton University Press.
- Tilman, D. (1999):** The ecological consequences of changes in biodiversity: A search for general principles. *Ecology* **80**(5): 1455-1474.
- Tilman, D. & Downing, J., A. (1994):** Biodiversity and stability in grasslands. *Nature* **367**: 363-365.
- Tilman, D., Wedin, D. & Knops, J. (1996):** Productivity and sustainability influenced by biodiversity in grassland ecosystems. *Nature* **379**(6567): 718-720.
- Torriani-Gorini, A., Rothman, F. G., Silver, S., Wright, A., Yagil, E. & (eds.) (1987):** Phosphate Metabolism and Cellular Regulation in Microorganisms. Washington, USA, American Society for Microbiology.
- Torsvik, V., Daae, F. L., Sandaa, R.-A. & Övreas, L. (1998):** Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology* **64**(1): 53-62.
- Townsend, C. R. & Hildrew, A. G. (1994):** Species traits in relation to a habitat template for river systems. *Freshwater Biology* **31**: 265-275.
- Townsend, C. R., Scarsbrook, M. R. & Dolédec, S. (1997):** The intermediate disturbance hypothesis, refugia, and biodiversity in streams. *Limnology and Oceanography* **42**(5): 938-949.
- Tracy, T. E. & Mulcahy, L. S. (1991):** A simple method for direct automated sequencing of PCR fragments. *Biotechniques* **11**(1): 68-70, 74-75.
- Trebino, H. J., Chaneton, E. J. & León, R. J. C. (1996):** Flooding, topography, and successional age as determinants of species diversity in old-field vegetation. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* **74**(4): 582-588.
- Troussellier, M., Courties, C. & Zettelmaier, S. (1995):** Flow Cytometric Analysis of Coastal Lagoon Bacterioplankton and Picophytoplankton: Fixation and Storage Effects. *Estuarine Coastal and Shelf Science* **40**(6): 621-633.
- Turley, C. M. & Hughes, D. J. (1992):** Effects of storage on direct estimates of bacterial numbers of preserved seawater samples. *Deep-Sea Research Part A* **39**(3/4 A): 375-394.

- Turley, C. M. & Hughes, D. J. (1994):** The effect of storage temperature on the enumeration of fluorescence-detectable bacterial cells in preserved sea-water samples. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **74**(1): 259-262.
- Vachee, A., Vincent, P., Struijk, C. B., Mossel, D. A. A. & Leclerc, H. (1997):** A study of the fate of the autochthonous bacterial flora of still mineral waters by analysis of restriction fragment length polymorphism of genes coding for rRNA. *Systematic & Applied Microbiology* **20**(3): 492-503.
- Vadstein, O. (1998):** Evaluation of competitive ability of two heterotrophic planktonic bacteria under phosphorus limitation. *Aquatic Microbial Ecology* **14**(2): 119-127.
- Vadstein, O., Olsen, Y. & Reinertsen, H. (1993):** The role of planktonic bacteria in phosphorus cycling in lakes - Sink and link. *Limnology and Oceanography* **38**(7): 1539-1544.
- van der Hoeven, J. S., de Jong, M. H., Camp, P. J. M. & van den Kieboom, C. W. A. (1985):** Competition between oral *Streptococcus* species in the chemostat under alternating conditions of glucose limitation and excess. *FEMS Microbiology Ecology* **31**: 373-379.
- Vanbrabant, J., De Vos, P., Vancanneyt, M., Liessens, J., Verstraete, W. & Kersters, K. (1993):** Isolation and identification of autotrophic and heterotrophic bacteria from an autohydrogenotrophic pilot-plant for denitrification of drinking water. *Systematic and Applied Microbiology* **16**(3): 471-482.
- Vosjan, J. H. & Vannoort, G. J. (1998):** Enumerating nucleoid-visible marine bacterioplankton: bacterial abundance determined after storage of formalin fixed samples agrees with isopropanol rinsing method. *Aquatic Microbial Ecology* **14**(2): 149-154.
- Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H. & Schleifer, K.-H. (1993):** Probing Activated Sludge with Oligonucleotides Specific for Proteobacteria: Inadequacy of Culture-Dependent Methods for Describing Microbial Community Structure. *Applied and Environmental Microbiology* **59**(5): 1520-1525.
- Ward, J. V. (1998):** Riverine Landscapes: Biodiversity Patterns, Disturbance Regimes, and Aquatic Conservation. *Biological Conservation* **83**(3): 269-278.
- Warwick, R. M. & Clarke, K. R. (1995):** New 'biodiversity' measures reveal a decrease in taxonomic distinctness with increasing stress. *Marine Ecology Progress Series* **129**.
- Warwick, R. M. & Clarke, K. R. (1998):** Taxonomic distinctness and environmental assessment. *Journal of Applied Ecology* **35**(532-543).
- Washington, H. G. (1984):** Diversity, Biotic and Similarity Indices. *Water Research* **18**(6): 653 - 694.
- Weider, L. J. (1992):** Disturbance, competition and the maintenance of clonal diversity in *Daphnia pulex*. *J. evol. Biol.* **5**: 505 - 522.
- Wheeler, D. L., Chappy, C., Lash, A. E., Leipe, D. D., Madden, T. L., Schuler, G. D., Tatusova, T. A. & Rapp, B. A. (2000):** Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acid Research* **28**(1): 10-14.
- Widdicombe, S. & Austen, M. C. (1999):** Mesocosm investigation into the effects of bioturbation on the diversity and structure of a subtidal macrobenthic community. *Marine Ecology Progress Series* **189**: 181-193.
- Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. (1990):** Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria* and *Eucarya*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**(12): 4576-4579.
- Yoo, H. S., Yoon, Y. D., Park, J. M. & Choi, S. H. (1990):** Survey of bacterial pathogens in inland aquaculture fishes. *Research Reports of the Rural Development Administration* **32**(2 Vet.): 52-55.
- Yurov, Y. B., Soloviev, I. V., Vorsanova, S. G., Marçais, B., Roizes, G. & Lewis, R. (1996):** High resolution multicolor fluorescence in situ hybridization using cyanine and fluorescein dyes: rapid chromosome identification by directly fluorescently labeled alphoid DNA probes. *Human Genetics* **97**(3): 390-398.
- Zimmerman, R., Iturriaga, R. & Becker-Birck, J. (1978):** Simultaneous Determination of the Total Number of Aquatic Bacteria and the Number Thereof Involved in Respiration. *Applied and Environmental Microbiology* **36**(6): 926-935.

-
- Zubkov, M. V., Fuchs, B. M., Eilers, H., Burkill, P. H. & Amann, R. (1999):** Determination of Total Protein Content of Bacterial Cells by SYPRO Staining and Flow Cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(7): 3251-3257.
- Zweifel, U. L. & Hagström, A. (1995):** Total Counts of Marine Bacteria Include a Large Fraction of Non-Nucleoid-Containing Bacteria (Ghosts). *Applied and Environmental Microbiology* **61**(6): 2180-2185.

Danksagung

Viele Menschen haben dazu beigetragen, dass ich diese Arbeit (dann doch endlich...) fertig stellen konnte. Einigen möchte ich an dieser Stelle ganz herzlich dafür danken.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. W. Lampert, der mir nicht nur ermöglichte, meine Arbeit in der produktiven Atmosphäre des Max-Planck-Institutes für Limnologie durchzuführen, sondern auch sehr viel Geduld und Entgegenkommen in bezug auf das „Kuckucksei“ in seiner Sammlung bewies.

Karl-Otto Rothhaupt danke ich dafür, dass er mir das Thema meiner Arbeit überließ und auch noch quer durch Deutschland durch finanzielle Unterstützung dafür sorgte, dass ich mein Projekt sinnvoll weiter bearbeiten konnte.

Vor allem Klaus Jürgens, Paul Witzel und Martin Hahn ist es zu verdanken, dass ich mich in die Bearbeitung meiner „ach so kleinen“ Untersuchungsobjekte hineingefunden habe. Sie hatten jederzeit ein offenes Ohr für Fragen und Diskussionen und haben durch ihr Interesse motivierend meine Arbeit unterstützt.

Mary Voytek sei ganz herzlich gedankt für die Sequenzierung der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienisolate, aber auch für hilfreiche fachliche Diskussion.

Jakob Pernthaler machte die Benutzung des Durchflusszytometers im Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie in Bremen möglich, ohne die der Einsatz der Immunfluoreszenztechnik in dieser Arbeit sehr erschwert gewesen wäre.

Abgesehen von seiner fast perfekten Lage und seiner guten Ausstattung, sind es vor allem zwei Dinge, die das Institut in Plön zu einem äußerst angenehmen und interessanten Arbeitsplatz machten:

Für ein reibungsloses Arbeiten und immer freundliche Unterstützung bei allen Arbeitsanliegen sorgten die Menschen in den verschiedenen Labors, in der Bibliothek, der Verwaltung, im Rechenzentrum und in der Werkstatt. Ihnen möchte ich hier ganz ausdrücklich meinen Dank aussprechen.

Die Wissenschaftler, Gäste wie ortsansässige, bereicherten die wissenschaftliche Diskussion genauso, wie die nichtwissenschaftlichen Aktivitäten und erwiesen sich in vieler Hinsicht auch als hilfreiche Freunde.

Für ein Gelingen der Arbeit „auf den letzten Metern“ sorgten zum einen die Korrekturleser, die sich bemühten, die größten Knoten und die längsten Sätze aus meinem Manuskript zu beseitigen: Thorsten Reusch, Maarten Boersma, Klaus Jürgens, Paul Witzel und Michael Kopp.

Klaus Plath, sei für das gedankt, was er besonders gut kann: Helfen, wenn die Zeit wirklich knapp ist.

Meinen Eltern will ich hier auch danken, für alles, was sie mir an Unterstützung haben zukommen lassen!

Referent/in:

Korreferent/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt: Kiel, den

Der Dekan