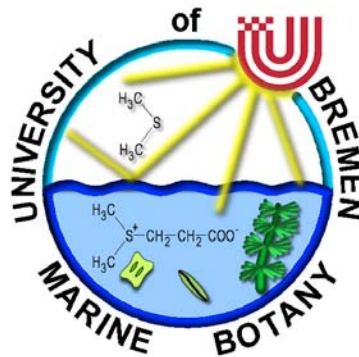


Wechselwirkungen zwischen der  
antarktischen Eisdiatomee  
*Amphiprora kufferathii* MANGUIN  
und epiphytischen Bakterien unter besonderer  
Berücksichtigung des Oxidationsschutzes



**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. Nat. -

dem Fachbereich 2 (Biologie/Chemie)  
vorgelegt von

**Mark Hünken**  
Bremen

April 2004

Abkürzungsverzeichnis	V
Zusammenfassung	VII
<b>A Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1 Meereis</b>	<b>1</b>
<b>2 Lebensgemeinschaften im Eis</b>	<b>2</b>
2.1 Meereisgesellschaften	2
2.2 Eisdiatomeen	4
2.3 <i>Amphiprora kufferathii</i> MANGUIN	5
2.4 Eisbakterien	6
2.5 Bakterien-Diatomeen-Interaktionen	9
<b>3 Oxidativer Stress</b>	<b>10</b>
3.1 Reaktive Sauerstoffspezies in höheren Pflanzen	10
3.2 Wasserstoffperoxid in der Antarktis	11
<b>4 Oxidationsschutz</b>	<b>12</b>
4.1 Enzymatischer Oxidationsschutz in Pflanzen	12
4.2 Oxidationsschutz in Diatomeen	15
4.3 Oxidationsschutz in Bakterien	16
<b>5 Zielsetzung</b>	<b>17</b>
<b>B Material und Methoden</b>	<b>18</b>
<b>1 Kultivierungsmethoden</b>	<b>18</b>
1.1 Kultivierung von <i>Amphiprora kufferathii</i>	18
1.2 Kultivierung der Bakterien	20
1.3 Definiertes Medium für Nährstoffmangelversuche	20
1.4 Herstellen einer axenischen Kultur von <i>Amphiprora kufferathii</i>	21
1.5 Medien für Isolationsversuche	22
1.6 Lichtmikroskopie	22
1.7 Bestimmung der Zelldichte und Wachstumsraten in Algenkulturen	23
1.8 Bestimmung der Zelldichte in Bakterienkulturen	23
<b>2 Molekularbiologische Methoden</b>	<b>23</b>
2.1 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	23
2.1.1 FISH mit Bakterienkulturen	26
2.1.2 FISH mit Mischkulturen	26

2.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	27
2.2.1 PCR Bedingungen für 16S rDNS Gene	27
2.2.2 PCR Bedingungen für Plasmidinserts	29
2.3 Klonierung	29
2.4 Amplified Ribosomal DANN Restriction Analysis (ARDRA)	31
2.5 Sequenzierung	32
2.6 Phylogenetische Analyse	33
<b>3 Biochemische Methoden</b>	<b>34</b>
3.1 Proteinextraktion	34
3.2 Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)	34
3.3 Gelfärbungen	36
3.3.1 Coomassie	36
3.3.2 Katalase	36
3.3.3 Superoxid Dismutase	37
3.3.4 Glutathion Reduktase	37
<b>4 Analytische Methoden</b>	<b>37</b>
4.1 Photometrische Wasserstoffperoxid Bestimmung	37
4.2 Chlorophyllbestimmung	40
4.3 Messung der Chlorophyllfluoreszenz (Pulse Amplitude Modulation)	40
4.4 Bestimmung von Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP)	42
4.5 Nährstoffbestimmung	42
<b>5 Isolationsversuche</b>	<b>44</b>
5.1 Isolierung von Bakterien aus der Mischkultur	44
<b>6 Physiologische Experimente</b>	<b>45</b>
6.1 Wachstumsversuche	45
6.2 Stoffwechselleistungen der Bakterien	45
6.2.1 Abbau von Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP)	45
6.2.2 Biolog	46
6.3 Reaktionen auf oxidativen Stress	46
6.3.1 Abbau von extern zugefügtem Wasserstoffperoxid	46
6.3.2 Induktion von oxidativem Stress durch hohe Lichtintensität	46
6.3.3 Einfluss von induziertem oxidativem Stress	47
6.4 Reaktionen auf osmotischen Stress	47
6.5 Reaktionen auf Temperatur-Stress	47
6.6 Nährstoffentwicklung in bakterienfreien und bakterienbehafteten Kulturen von <i>Amphiprora kufferathii</i>	47

<b>7 Elektronenmikroskopische Methoden</b>	48
7.1 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	48
7.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)	49
<b>C Ergebnisse</b>	
<b>1 Kulturversuche</b>	51
1.1 Etablierung einer axenischen Algenkultur	51
<b>2 Struktur der Mischkultur und Identifizierung der Bakterien</b>	52
2.1 Isolierung von Bakterien aus der Mischkultur	52
2.2 Identifizierung der Bakterien über Klonierungen	54
2.3 Identifizierung der Bakterien über Fluoreszenz in situ	
Hybridisierung	58
<b>3 Wachstumsversuche</b>	61
3.1 Wachstum unter Standardbedingungen	62
2.3 Wachstum bei Zugabe von Glycin und Glycylglycin	63
3.3 Wachstum bei Zugabe von Katalase	64
<b>4 Biochemische Untersuchungen zu enzymatischen Oxidationsschutz</b>	65
4.1 Oxidationsschutzenzyme in <i>Amphiprora kufferathii</i>	65
4.2 Oxidationsschutzenzyme im isolierten <i>Sulfitobacter</i> -Stamm	
AHALF1A	66
4.3 Oxidationsschutzenzyme im isolierten <i>Cellulophaga</i> im isolierten	
AHCF1A	67
4.4 Oxidationsschutzenzyme im isolierten <i>Colwellia</i> -Stamm	
AHGAM01	68
<b>5 Physiologische Untersuchungen</b>	69
5.1 StoffwechsellLeistungen der Bakterien	69
5.1.1 Durch die Bakterien nutzbare Kohlenstoffquellen (BIOLOG)	69
5.1.2 Abbau von Dimethylsulfoniumpropionat	71
5.2 Reaktionen auf oxidativen Stress	72
5.2.1 Abbau von Wasserstoffperoxid durch epiphytische Bakterien	72
5.2.2 Induktion von oxidativem Stress durch hohe Lichtintensität	73
5.2.3 Einfluss von induziertem oxidativem Stress auf die	
Photosynthese	73
5.3 Reaktionen auf osmotischen Stress	78
5.3.1 Einfluss von hyper- und hypoosmotischen Stress auf die	
Chlorophyllfluoreszenz von <i>Amphiprora kufferathii</i>	78

5.4 Reaktionen auf Temperatur-Stress	81
5.4.1 Einfluss von hyperthermischem Stress auf den Chlorophyll a -Gehalt von <i>Amphiprora kufferathii</i>	81
5.4.2 Einfluss von hyperthermischem Stress auf die Chlorophyllfluoreszenz von <i>Amphiprora kufferathii</i>	83
5.5 Nährstoffentwicklung in bakterienfreien und bakterienbehafteten Kulturen von <i>Amphiprora kufferathii</i>	86
<b>6 Elektronenmikroskopie</b>	<b>93</b>
<b>D Diskussion</b>	<b>95</b>
<b>1 Die Mischkultur als Modellsystem</b>	<b>95</b>
1.1 Etablierung einer axenischen Kultur von <i>Amphiprora kufferathii</i>	95
1.2 Bakterien der Mischkultur	96
1.3 Häufigkeit der Bakterien in der Mischkultur und Eignung als Modellsystem	99
<b>2 Wechselwirkungen zwischen <i>Amphiprora kufferathii</i> und den epiphytischen Bakterien</b>	<b>101</b>
2.1 Wechselwirkungen beim Oxidationsschutz	101
2.2 Oxidationsschutzenzyme	102
2.2.1 Oxidationsschutzenzyme der Bakterien	103
2.2.2 Oxidationsschutzenzyme von <i>Amphiprora kufferathii</i>	104
2.3 Postulierung eines spezieübergreifenden Oxidationsschutzsystems	106
<b>3 Weitere Wechselwirkungen zwischen <i>Amphiprora kufferathii</i> und den Epibakterien</b>	<b>107</b>
3.1 Stress durch erhöhte Temperatur	107
3.2 Osmotischer Stress	108
3.3 Nährstoffe	109
3.3.1 Stickstoff	109
3.3.2 Phosphat	110
3.3.3 Silikat	111
<b>4 Biofilme und Mikrogenmatten</b>	<b>112</b>
<b>5 Symbiotische Beziehung</b>	<b>114</b>
<b>6 Abschlussdiskussion und Ausblick</b>	<b>116</b>
Literatur	118
Anhang	137

## Abkürzungsverzeichnis

AHL	N-Acyl-Homoserinlacton
APS	Ammoniumperoxidsulfat
APX	Ascorbat-Peroxidase
AsA	Ascorbat
BIS	N,N'-Methylendiacylamid
BSA	Kälberserum-Albumin
CAT	Katalase
Cy3	Cyanine™3
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DHA	Dehydroascorbat
DHAR	Dehydroascorbat-Reduktase
DMS	Dimethylsulfit
DMSP	Dimethylsulfoniumpropionat
DPD	N,N-Diethyl-p-phenylen-diamin
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)-tetraessigsäure
EPS	Exopolymere Substanzen
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
GPX	Glutathion-Peroxidase
GR	Glutathion-Reduktase
GSH	Glutathion (reduziert)
GSSG	Glutathion (oxidiert)
HP I	Hydroperoxidase 1
HP II	Hydroperoxidase 2
IPTG	Isopropyl-Beta-D-Thiogalactopyranosid
kDa	kilo-Dalton
LHC	Lichtsammelkomplexe
MDH	Monodihydroascorbat
MES	2-[N-Morpholino]ethan-sulfonsäure
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAM	Puls-Amplituden-Modulation
PAR	Photosynthetisch aktives Licht
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

## **Abkürzungsverzeichnis**

---

POD	Peroxidase
POM	Partikuläre organische Substanz
PS I	Photosystem 1
PS II	Photosystem 2
PSU	Practical Salinity Units
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SIMCO	Sea Ice Microbial Community (Meereisgesellschaft)
SOD	Superoxid-Dismutase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
UVR	Ultraviolette Strahlung
WWSP	Winter Weddell Sea Project
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Beta-D-Galactopyranosid

## Zusammenfassung

Die antarktische Eisdiatomee *Amphiprora kufferathii* MANGUIN ist in ihren natürlichen Lebensräumen dicht mit Bakterien besiedelt. Diese Lebensgemeinschaft wird unter Kulturbedingungen aufrechterhalten. In der vorliegenden Arbeit wurden Wechselwirkungen zwischen der Eisdiatomee und den Epibakterien, insbesondere beim Oxidationsschutz, anhand einer Mischkultur und einer axenischen Reinkultur untersucht.

Phylogenetische Analysen ergaben Hinweise auf eine Besiedlung der Diatomee mit Alphaproteobakterien der Gattungen *Octadecabacter* und *Sulfitobacter* und mit Vertretern der Bacteroidetes-Gruppe der Gattungen *Psychroflexus* und *Cellulophaga*. Vorwiegend freilebende Bakterien in der Mischkultur gehörten zu Gammaproteobakterien der Gattung *Collwellia*. Bakterien der Gattungen *Sulfitobacter*, *Cellulophaga* und *Colwellia* konnten aus der Mischkultur isoliert werden. Quantitative *in situ* Hybridisierungen zeigten eine Besiedlung von *A. kufferathii* mit *Octadecabacter* in 70 % der Fälle. Bacteroidetes und Gammaproteobakterien machten nur 13 % bzw. 10% der Epibakterien aus. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Anheftung der epiphytischen Bakterien an *A. kufferathii* hauptsächlich über exopolymere Substanzen erfolgt.

Mit Hilfe des Antibiotikums Ampicillin (2mg/ml) wurde eine axenische Kultur von *A. kufferathii* hergestellt. Diese Kultur und die isolierten Bakterien wurden auf ihre Ausstattung mit antioxidativen Enzymen untersucht. In *A. kufferathii* konnten zwei Superoxid-Dismutasen und zwei Glutathion-Reduktasen nachgewiesen werden, während Katalase fehlte.

Mehrere Isoenzyme der Superoxid-Dismutase konnten in den Bakterien der Gattungen *Sulfitobacter* und *Cellulophaga* gezeigt werden, jedoch nicht im *Colwellia*-Isolat. Katalase und Glutathion-Reduktase wurde in allen isolierten Bakterien gefunden.

Die epiphytischen Bakterien haben einen stimulierenden Effekt auf das Wachstum von *A. kufferathii*. Versuche unter Nährstoffmangelbedingungen zeigten, dass dieser Effekt auch bei Stickstoff- und Silikatmangel zu beobachten ist. Die Stimulierung des Wachstums kann über die vermehrte Remobilisierung dieser Nährstoffe durch die Bakterien erfolgen.

Physiologische Untersuchungen zum Oxidationsschutz mit der axenischen Kultur und der Mischkultur zeigten eine Beteiligung der Bakterien am Abbau des von der Diatomee produzierten Wasserstoffperoxids. Die Besiedlung mit Epibakterien führt auch dazu, dass die Eisdiatomee bei Stress durch hohe Temperaturen (15°C) weniger beeinträchtigt wird. Bei starker hypo- und hyperosmotischer Belastung zeigten bakterienbehaftete Kulturen von *A. kufferathii* eine verminderte Photosyntheseeffizienz gegenüber den axenischen Kulturen.

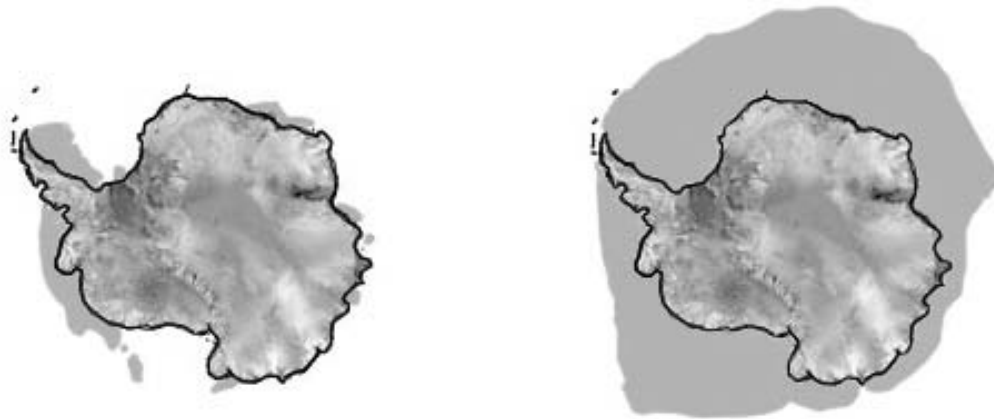


# A Einleitung

## 1 Meereis

Die Erdoberfläche ist durchschnittlich zu 7% mit Meereis bedeckt. Das entspricht 10% der Ozeanoberfläche (Staley und Gosink 1999). Die Eisbedeckung des Südpolarmeeres variiert zwischen 4.000.000 km<sup>2</sup> am Ende des antarktischen Sommers (Februar) und 20.000.000 km<sup>2</sup> am Ende des antarktischen Winters (September) (Zwally *et al.* 1983). Im Vergleich dazu bedeckt das arktische Eis am Ende des Winters 16.000.000 km<sup>2</sup> (Abb. 1) (Eicken 1995).

Die Eisflächen der Polargebiete beeinflussen durch ihre Ausdehnung den Wärme- und Gasaustausch zwischen Ozean und Atmosphäre und haben somit einen großen Einfluss auf das globale Klima (Wadhams 1994).



**Abb. 1: Minimale Eisausdehnung in der Antarktis gegen Ende des antarktischen Sommers (links) und maximale Ausdehnung (rechts) am Ende des antarktischen Winters (adaptiert nach Eicken 1995).**

80% des antarktischen Meereises sind saisonal (Abb. 1) und werden jährlich neu gebildet (Zwally *et al.* 1983). Der dominierende Prozess bei der Eis-Neubildung ist der sogenannte „Pfannkucheneis-Zyklus“ (Lange *et al.* 1989; Weeks und Ackley 1982). Dabei werden charakteristische Stadien der Eisbildung durchlaufen: Zunächst entstehen in der Wassersäule kleine Eiskristalle, die sich an der Wasseroberfläche ansammeln und dort das sogenannte Breieis- oder Körncheneisstadium bilden. Durch weiteres Gefrieren entstehen kleinere Schollen von wenigen Dezimetern Durchmesser, die „Eispfannkuchen“. Durch das Zusammenlagern und Stapeln dieser kleinen Schollen entsteht schließlich eine geschlossene Eisdecke (Spindler und Dieckmann 1991).

Wenn der Tempuraustausch zwischen Ozean und Atmosphäre durch die Eisbedeckung erschwert ist, wächst das Eis langsamer und führt dadurch zu einer länglicheren Struktur der Eiskristalle (Spindler und Dieckmann 1991). Einjähriges Meereis weist eine durchschnittliche Dicke von einem Meter auf (Thomas und Dieckmann 2002). Innerhalb der Eissäule bilden sich starke Gradienten von Salzgehalt, Licht und Temperatur (Abb. 2). Abhängig von Eisdicke und Schneebedeckung sinkt die eintreffende Lichtintensität von bis zu  $1500 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  an der Oberfläche auf Werte um  $0,2 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  an der Eisunterseite ab (Nothnagel 1995). An der Oberfläche können im Tageszyklus stark schwankende Temperaturen bis  $-30^\circ\text{C}$  vorliegen, während an der Unterseite, am Übergang zum Meerwasser, stabile Werte um  $-2^\circ\text{C}$  vorherrschen (Spindler und Dieckmann 1991).

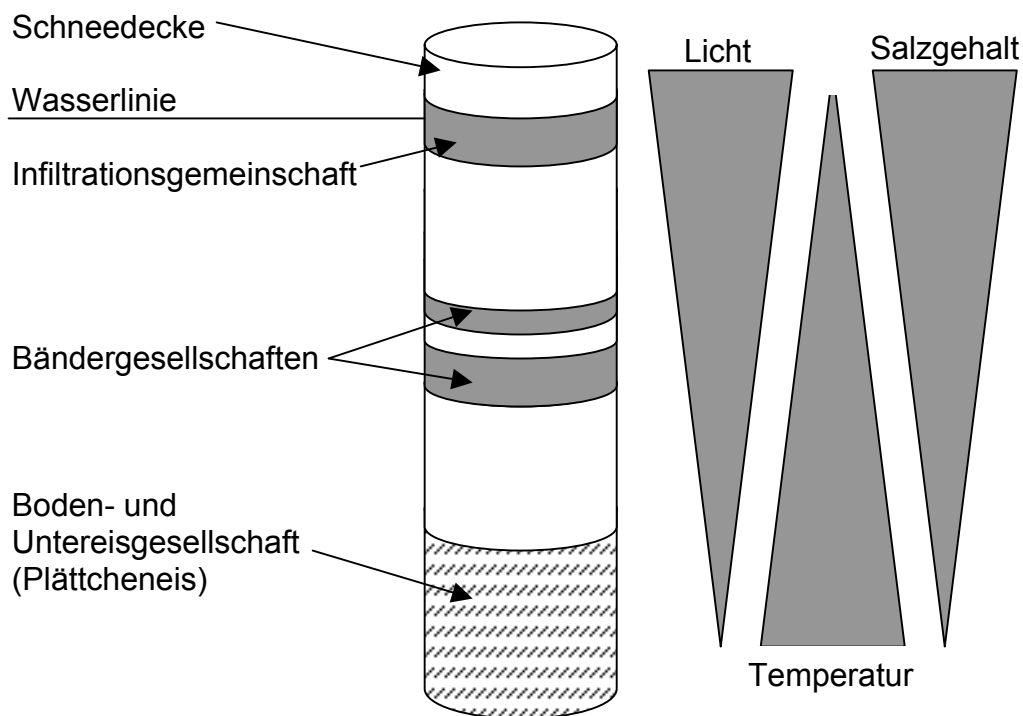
Bei der Eisbildung gefriert nur der Süßwasseranteil des Meerwassers. Das Salz wird im verbleibenden Wasser-Eisgemisch angereichert. Der Salzgehalt kann so Werte bis zu 205 PSU (Practical Salinity Units), entsprechend 205 ‰, annehmen (Weissenberger 1992). Diese sogenannte Salzlauge verbleibt in einem komplexen System aus Kanälchen und Taschen im Eis eingeschlossen zurück (Krembs *et al.* 2000).

Das stark salzhaltige Wasser ist schwerer, sinkt in der Eissäule ab und tritt über die Eislaugenkanäle ins freie Wasser aus. Dieser Prozess wird als Aussüßung des Meereises bezeichnet (Spindler und Dieckmann 1991).

## **2 Lebensgemeinschaften im Eis**

### **2.1 Meereisgesellschaften**

Trotz der extremen Bedingungen innerhalb des Meereises bietet es einen Lebensraum für eine besondere Gemeinschaft von Organismen. Die im Eis lebenden Mikroorganismen werden als „Sea ice microbial community“ (SIMCO) bezeichnet (Sullivan und Palmisano 1981). Diese Gemeinschaft extremophiler und extremotoleranter Organismen besteht aus Viren, Bakterien, Mikroalgen, Protozoen und Metazoen.



**Abb. 2: Schematische Darstellung jungen Meereises mit den vorherrschenden physikalischen Bedingungen sowie die Verteilung der einzelnen Lebensgemeinschaften (modifiziert nach Horner 1988).**

Viele der im Eis vorkommenden Organismen werden schon während der Eisbildung eingeschlossen. Durch Wellenbewegung wird Wasser auf die Breieisschicht aufgetragen. Dieses sickert zurück in die Wassersäule, während Organismen und Partikel im Eis zurückbleiben (Ackermann *et al.* 1994; Garrison *et al.* 1983; Garrison *et al.* 1989). In 24 Stunden altem Neueis können so bis zu 50fach höhere Chlorophyllkonzentrationen gemessen werden als im Meerwasser.

Nicht alle Organismen überleben im Eis. Einige tolerieren die Bedingungen und passen sich der Umgebung soweit an, dass sie zur Reproduktion fähig sind (Gleiz und Thomas 1993). Andere Arten erreichen im Eis höhere Zelldichten als bei Blüten im offenen Wasser (Garrison und Buck 1989). Die Chlorophyllkonzentration im Eis kann bis zu 390fach höher sein als in der darunter liegenden Wassersäule (Kirst *et al.* 1991).

Die SIMCO im antarktischen Meereis liefert einen großen Teil der Primärproduktion des Südpolarmeeres (Staley und Gosink 1999). Damit hat diese Mikrobengemeinschaft einen starken Einfluss auf die globalen Energiehaushalte sowie auf Ozean-Atmosphäre Interaktionen (Horner *et al.* 1992).

Dem im Eis eingeschlossenen Phytoplankton steht nur wenig Licht zur Verfügung. Durch Schneebedeckung und Reflektion des Sonnenlichtes (Albedo) nimmt die Lichtintensität in der Eissäule rapide ab (Spindler und Dieckmann 1991).

Innerhalb des Eises kann zwischen verschiedenen SIMCO-Gesellschaften unterschieden werden (Abb. 2). Bei Überspülung der Eisschollen durch Wellenbewegung kommt es zum Eintrag von Organismen aus dem Meerwasser auf das Eis. Die zurückbleibenden Organismen bilden im oberen Bereich der Eissäule die sogenannte Infiltrationsgesellschaft (Horner *et al.* 1992). Im Verlauf der Eisneubildung und Überschichtung mit Schnee und anderen Eisschollen werden derartige Gesellschaften in die Mitte der Eissäule verfrachtet und bilden dann sogenannte Bändergemeinschaften (Abb. 2). Zusammen mit den Organismen, die in dem System aus Laugenkanälchen vorkommen, stellen sie die sogenannten Zwischeneisgemeinschaften dar.

Im unteren Teil der Eissäule befindet sich die Bodeneisgesellschaft. Sie besteht aus Organismen, die aus dem Meerwasser eingewandert sind. Angeheftet am Eis lebt die sogenannte Untereisgesellschaft (Horner *et al.* 1988; Horner *et al.* 1992).

Im kontinentnahen Festeis (Fast-ice) wird der untere Bereich der Eissäule von kleinen Eisplättchen gebildet. Diese Eisscheiben sind wenige Millimeter dick und können Durchmesser von bis zu 15 cm erreichen (Dieckmann *et al.* 1992). Die Eisplättchen bilden sich in der Wassersäule und sammeln sich unterhalb des Fest- oder Packeises. Die locker gepackte Schicht kann Dicken von wenigen Zentimetern bis zu mehreren Metern erreichen (Foldvik und Kvinge 1974; Kipfstuhl 1991). Der Raum zwischen den Eisplättchen ist dicht besiedelt. Organismen, die speziell in dieser Region leben, werden als Plättcheneisgesellschaft bezeichnet (Horner *et al.* 1992).

## **2.2 Eisdiatomeen**

Die vorherrschende Algengruppe des Meereises sind die Diatomeen. Die Angaben über ihre maximalen Abundanzen schwanken zwischen 75% (Garrison *et al.* 1986) und 88% (Kang und Fryxell 1992). Im Meereis dominieren pennate Diatomeen. Zentrische Arten sind auch anzutreffen, ihr Anteil ist in der freien Wassersäule höher (Spindler und Dieckmann 1991).

In der Eissäule bildet sich eine vertikale Zonierung der Diatomeenarten aus (Bartsch 1989). Im oberen Bereich des Eises sind kleinere Vertreter der Bacillariophyceae, beispielsweise *Chaetoceros* sp. und *Fragillariopsis* sp., zu finden. Die Boden-, Untereis- und Eisplättchengemeinschaften werden von größeren Arten wie *Actinocyclus* sp., *Odontella* sp. und *Amphiprora* sp. dominiert. Somit besteht eine direkte Korrelation zwischen der Algengröße und dem Durchmesser der Eiskanälchen (Günther und Dieckmann 2001).

Lichtbedarf und Nährstoffangebot führen ebenfalls zur Zonierung der Algen (Gosselin *et al.* 1990; Kirst und Wiencke 1995; Robinson *et al.* 1998). Weitere Faktoren sind die

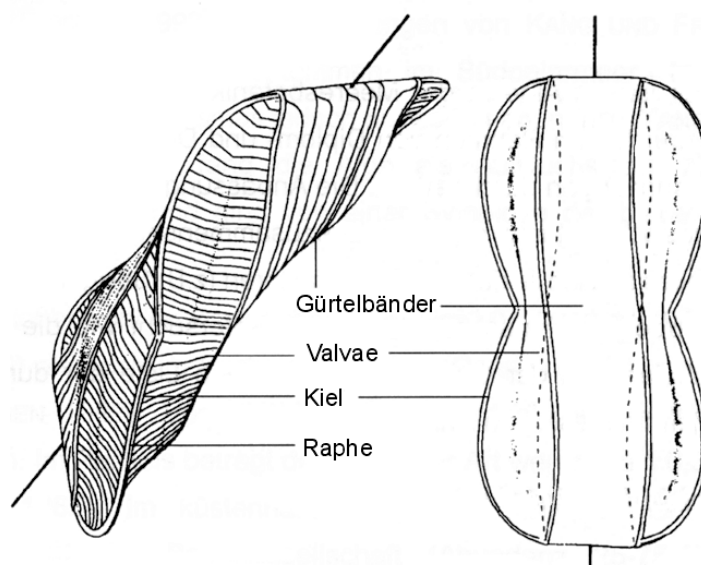
physiologische Anpassungsfähigkeit der Organismen, verschiedene Wachstumsraten, selektiver Fraßdruck der Mikrofauna, selektive Mechanismen und Planktonzusammensetzung zum Zeitpunkt der Eisbildung (Gleiz *et al.* 1998).

Ein Zusammenhang zwischen vertikaler Verteilung der Algen im Eis und ihrer physiologischen Eigenschaften wurde bereits vermutet (McGrath Grossi und Sullivan 1985). Durch Versuche zur osmotischen Adaptation und Temperaturtoleranz ist es gelungen, einen experimentellen Nachweis über den Zusammenhang zwischen Zonierung und Physiologie der Algen zu erbringen. Die Diatomeen der Unter- und Bodeneisgesellschaften *Amphiprora kufferathii* und *Corethraon pennatum* weisen geringe Toleranzen gegenüber Veränderungen in Temperatur und Salzgehalt auf. Diatomeen der Bändergesellschaften wie *Chaetoceros* sp. und *Nitzschia lecontei* tolerieren dagegen größere Schwankungen in Temperatur und Salzgehalt, was die Bedingungen ihrer Lebensräume widerspiegelt (Plettner 2002).

### **2.3 *Amphiprora kufferathii* MANGUIN**

Die antarktische Eisalge *Amphiprora kufferathii* gehört in der Abteilung der Heterokontophyta zur Klasse der Bacillariophyceae (Kieselalgen). Diese enthält zwei Ordnungen: Die Centrales zeichnen sich im Idealfall durch einen radiärsymmetrischen Aufbau aus. Die Pennales zu denen die Gattung *Amphiprora* gezählt wird, hat einen bilateralsymmetrischen Aufbau (van den Hoek 1993).

Die Form von *Amphiprora kufferathii* ist von einem S-förmig geschwungenen Kiel geprägt, der sich im Lichtmikroskop als Höcker in unterschiedlichen optischen Ebenen an den Seiten bemerkbar macht. Die Raphe verläuft entlang dieses Kiels (Abb. 3).



**Abb. 3: *Amphiprora* sp. in einer dreidimensionalen Darstellung links und in der Gürtelbandansicht rechts (modifiziert nach Round *et al.*, 1990).**

Die taxonomische Position von *A. kufferathii* ist noch nicht endgültig geklärt. Reimer (1975) löste die Gattung *Amphiprora* auf und übertrug ihre Vertreter in die Gattung *Entomoneis*. Dadurch ist *A. kufferathii* in einigen Veröffentlichungen unter dem Namen *Entomoneis kufferathii* zu finden. Diese systematische Neuordnung ist noch nicht endgültig abgeschlossen. Hierzu müssen noch eingehendere Untersuchungen erfolgen (Günther und Dieckmann 2001).

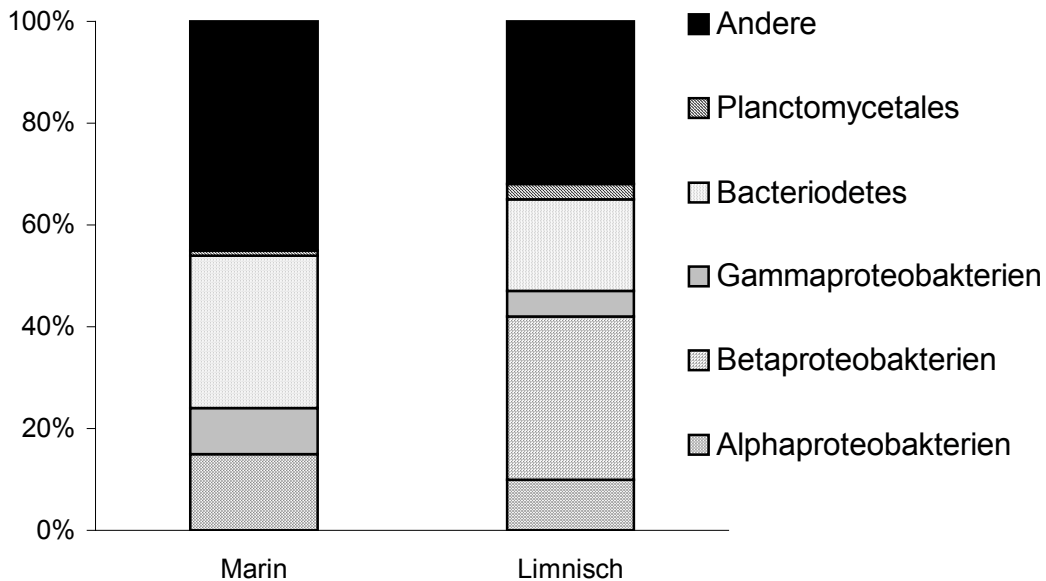
*A. kufferathii* ist eine dominierende Spezies der Boden- und Untereisgesellschaften des antarktischen Meereises (Bartsch 1989; Horner *et al.* 1992; Moro *et al.* 2000; Pakhomov *et al.* 2001; Watanabe *et al.* 1990). Unter dem Eis wächst die Diatomee in Ketten (Bartsch 1989; McGrath Grossi *et al.* 1984), verliert diese Eigenschaft aber unter Kulturbedingungen. In der Eissäule und im darunter liegenden Wasserkörper ist *A. kufferathii* nur vereinzelt anzutreffen (Grossi und Sullivan 1985). In den Sommermonaten überdauert die Alge vermutlich im sogenannten Resteis oder auf dem Schelfboden (Garrison *et al.* 1993; Scharek 1991).

Die in dieser Arbeit verwendete Diatomee wurde im Rahmen des „Winter Weddell Sea Projektes“ (WWSP) 1986 aus Proben der Polarsternexpedition ANT V2/3 isoliert und seither in der Arbeitsgruppe Meeresbotanik an der Universität Bremen kultiviert. Zahlreiche ökophysiologische Untersuchungen sind zusammenfassend in der Arbeit von Lehmal (1999) aufgeführt.

## 2.4 Eisbakterien

Durch molekularbiologische Verfahren wie der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) ist es möglich geworden die bakterielle Diversität eines Lebensraumes zu erfassen, ohne die Bakterien zuvor isolieren zu müssen (Amann 2000).

In aquatischen Lebensräumen sind Vertreter fast aller bisher beschriebenen Bakterienabteilungen zu finden (Hugenholz *et al.* 1998; Kirchmann 2002). Einen Überblick über die Verteilung der unterschiedlichen Bakteriengruppen ergaben Untersuchungen zu ihrem Vorkommen in marinen und limnischen Gewässern. Die Ozeane werden von Angehörigen der Bacteroidetes-Gruppe dominiert (Glöckner *et al.* 1999), gefolgt von Alpha- und Gammaproteobakterien (Abb. 4). In Küstenregionen kann sich das Verhältnis verschieben, so dass Alphaproteobakterien die dominierende Gruppe darstellen (Gonzalez und Moran 1997). Betaproteobakterien dominieren limnische Gewässer (Abb. 4). Sie wurden nur in marinen Lebensräumen nachgewiesen, die unter starkem Süßwassereinfluss stehen. Archaea kommen sowohl limnisch als auch marin, zumeist in geringen Abundanzen, vor (Glöckner *et al.* 1999).



**Abb.4: Vergleich der Abundanzen der Eubakteriengruppen in marinen und limnischen Lebensräumen (modifiziert nach Glöckner *et al.* 1999 und Eilers *et al.* 2000).**

Alle typischen marinen Bakteriengruppen kommen auch im Meereis vor (Staley und Gosink 1999). Wie im Meerwasser dominieren auch im Eis die Bacteriodetes-Gruppe sowie die Alpha- und Gammaproteobakterien. Gram-Positive Bakterien sowie Arten aus den Ordnungen Chlamydiales und Verrucomicrobiales wurden im Meereis ebenfalls identifiziert (Brown und Bowman 2001). Archaea, die im freien Meerwasser der Antarktis häufiger vorkommen, wurden im Eis nicht (Brown und Bowman 2001) oder nur selten angetroffen (Brinkmeyer *et al.* 2003).

Hinsichtlich der Artenzusammensetzung sind große Unterschiede zwischen polaren und anderen Ozeanen zu verzeichnen (Bano und Hollibaugh 2002). Bakterien mit Gasvakuolen, die einen bedeutenden Anteil des antarktischen Bakterioplanktons darstellen, sind in anderen marinen Habitaten bisher nicht beschrieben worden (Walsby 1994).

Bakterien mit Gasvakuolen kommen in 6 der 11 Bakteriengruppen vor, darunter die Alpha-, Beta-, Gammaproteobakterien sowie Arten der Bacteriodetes-Gruppe (Gosink und Staley 1995). Den Gasvakuolen wird eine Funktion bei der Regulierung des Auftriebs zugeschrieben (Walsby 1994). Ihr Nutzen und der Grund für die Anreicherung von Bakterien mit Gasvakuolen innerhalb der SIMCO ist noch nicht geklärt (Gosink und Staley 1995).

Im antarktischen Meereis konnten viele neue Bakterienspezies gefunden werden (Staley und Gosink 1999). Darunter zahlreiche psychrophile Arten mit einer optimalen Wachstumstemperatur unter 15°C. Zu ihnen zählen *Octadecabacter antarcticus*

(Gosink *et al.* 1997) sowie Arten aus den Gattungen *Colwellia*, *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Psychroflexus* und *Sphingomonas* (Staley und Gosink 1999). Bisher wurden ca. 30 neue Bakterienarten in der Antarktis isoliert, die noch an keinen anderen Orten gefunden wurden (Michaud *et al.* 2004).

Im Gegensatz zum Phytoplankton werden Bakterien nicht über das Breieisstadium aus dem Meerwasser im Eis angereichert (Weissenberger und Grossmann 1998). Dennoch sind die Bakterienzahlen im Eis höher als in der freien Wassersäule (Bowman *et al.* 1997b). In zahlreichen Untersuchungen zeigte sich eine enge Korrelation zwischen Bakterienzahl und Chlorophyllkonzentration (Bowman *et al.* 1999). Es wird angenommen, dass sich während der Eisbildung nur schnellwachsende oder an Partikel oder Phytoplankton angeheftete Bakterien im Eis ansammeln und so eine stabile bakterielle SIMCO bilden (Bowman *et al.* 1997b; Grossmann und Gleiz 1993).

Die Bacteriodetesgruppe ist auch im Meereis dominierend. Vor allem in älteren SIMCO's mit hoher Diatomeendichte nimmt ihre Zahl zu (Brown und Bowman 2001), insbesondere in *Amphiprora* sp. dominierten Gesellschaften (Bowman *et al.* 1997b; McGrath Grossi *et al.* 1984). Die Gründe für das gehäufte Vorkommen dieser Bakterien in der SIMCO sind noch nicht geklärt (Bowman *et al.* 1998). Es wird angenommen, dass erhöhte Nährstoffverfügbarkeit und ein größeres Angebot verschiedener Oberflächen beispielsweise für die Kolonisierung einen entscheidenden Einfluss haben (Delille 1996; Helmke und Weyland 1995). Möglicherweise bieten Eisdiatomeen-Gemeinschaften eine Nische sowohl für epiphytische als auch für freilebende, psychrophile Bakterien und könnte ihr gehäuftes Auftreten im Meereis gegenüber der freien Wassersäule erklären (Bowman *et al.* 1997a; Bowman *et al.* 1997b).

Sowohl die Nord- als auch Südpolargebiete sind relativ junge Ökosysteme und sollten sich aufgrund ihrer geografischen Distanz unabhängig voneinander entwickelt haben (Brown und Bowman 2001). Dennoch sind einige Bakterienarten beider Polargebiete nahe miteinander verwandt. Ein Beispiel sind die Rhodobacteraceae *Octadecabacter antarcticus* und *Octadecabacter arcticensis* (Abb. 12).

Die Polargebiete verbindet eine kalte Tiefseeströmung (Eicken 1995). Ob ein Austausch von Bakterien von Nord- zu Südpol über diese Strömung stattfinden kann, ist nicht geklärt (Brinkmeyer *et al.* 2003).



## **2.5 Bakterien-Diatomeen-Interaktionen**

Interaktionen zwischen Mikroalgen und Bakterien reichen von mutualistisch über kommensalisch bis zu parasitisch (Cole 1982). Zahlreiche Assoziationen von Mikroalgen und Bakterien sind bisher beschrieben und beobachtet worden. Diese umfassen „Marine Snow“ (Azam und Long 2001; Kiorboe und Jackson 2001), Biofilme und Aggregate (Brehm *et al.* 2003) sowie Bakterien in Algenkulturen (Schäfer *et al.* 2002).

Hauptsächlich werden Mikroalgen als Quelle für organische Substanzen oder als Substrat für angeheftet lebende Bakterien angesehen. Exsudate der Mikroalgen bestimmen in der sogenannten „Phycosphäre“ das Wachstum von Bakterien (Schäfer *et al.* 2002). Enge Assoziationen mit Bakterien sind bei Dinoflagellaten (Alverca *et al.* 2002; Biegala *et al.* 2002; Imai und Nishitani 2000), Diatomeen (Ashen und Goff 2000; Riemann *et al.* 2000; Schäfer und Schmid 1993) und Cyanobakterien (Brehm *et al.* 2003) beobachtet worden.

Endosymbiotische Bakterien kommen sowohl bei Dinoflagellaten (Alverca *et al.* 2002) als auch bei Diatomeen vor (Schmid 2003a; Schmid 2003b).

Auch innerhalb der SIMCO sind Diatomeen-Bakterien-Gemeinschaften beobachtet worden, beispielsweise mit *Amphiprora kufferathii* (McGrath Grossi *et al.* 1984; Sullivan und Palmisano 1984).

In einer Studie von 1984 waren fast 54% aller angeheftet lebenden Bakterien auf *Amphiprora kufferathii* zu finden. Es schien, dass diese Art bevorzugt von Bakterien besiedelt wurde. Da die Algen trotz dichter Besiedlung offenbar nicht beeinträchtigt werden, ist eine bakterielle Attacke ausgeschlossen worden (Sullivan und Palmisano 1984).

Verschiedene Interaktionen zwischen *A. kufferathii* und den Bakterien werden in Betracht gezogen. Es wird vermutet, dass die Bakterien an abgestorbene Biomasse gebundene Mineralstoffe remobilisieren und umgekehrt von der Alge organische Substanzen in Form von Polysacchariden erhalten (Sullivan und Palmisano 1984). Bisher wurden die Interaktionen zwischen Eisdiatomeen und epiphytischen Bakterien noch nicht untersucht. Dies mag vor allem am Mangel an geeigneten Modellsystemen liegen. Die Interaktionen zwischen Bakterien und Diatomeen können weit umfangreicher sein. Schriek (2000) postulierte im Rahmen von Untersuchungen zum Oxidationsschutz bei *A. kufferarhii* eine Beteiligung der epiphytischen Bakterien an der Beseitigung von Wasserstoffperoxid. Hierzu ist eine genauere Untersuchung des Oxidationsschutzes der Diatomee und der Epibakterien notwendig.

### 3 Oxidativer Stress

#### 3.1 Reaktive Sauerstoffspezies in höheren Pflanzen

Bei aerober Lebensweise kommt es zur Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species = ROS). ROS entstehen während der Photosynthese, der Atmung in den Mitochondrien (Rich und Bonner 1978) sowie in Microbodies wie Oleosomen (Elstner und Osswald 1994).

In grünen Pflanzen sind die Chloroplasten der Ort mit der höchsten Produktion von ROS. Bei Anregung des Chlorophylls über den Singulettzustand hinaus kann es in den sogenannten Triplettzustand übergehen (Heldt 1999). Dies führt in einer Folgereaktion mit Sauerstoff zu einem Singulettzustand ( $^1\text{O}_2$ ). Singulett-Sauerstoff ist sehr reaktiv und reagiert mit zahlreichen Biomolekülen (Arora *et al.* 2002). Singulett-Sauerstoff kann nicht aktiv entfernt, aber seine Bildung kann reduziert werden. Dies geschieht durch Regulation der Anregungsenergie (Excitonen) über Light-harvesting-Komplexe (LHC) oder durch Ableitung der Energie auf Carotinoide (Arora *et al.* 2002).

Am Ende der Elektronentransportkette des Photosystems I (PS I) werden bei einem hohen Reduktionsgrad des Ferredoxins Elektronen auf Sauerstoff übertragen (Mehler-Reaktion) (Heldt 1999; Mehler 1951). Bei diesem Prozess entsteht das Superoxidradikal ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ). Es gibt Hinweise auf eine Freisetzung von Superoxidradikalen bei hohen Lichtintensitäten auch am Photosystem II (PS II) (Landgraf *et al.* 1995).

Superoxid kann in höheren Konzentrationen einen zyklischen Elektronentransport am PS I auslösen (Asada 1994). Zudem ist es in der Lage, metallhaltige Enzyme wie Nitrat-Reduktase, Katalase oder Peroxidasen zu hemmen (Asada und Takahashi 1987). Durch Superoxid kommt es zur Reduktion von Metallionen wie  $\text{Fe}^{3+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  (Abb. 4). Weitere Schädigungen treten auf, wenn Superoxidradikale in das Thylakoidlumen diffundieren und dort aufgrund des vorherrschenden niedrigen pH zu Perhydroxylradikalen protoniert werden. Perhydroxylradikale oxidieren Lipide und rufen so Membranschädigungen hervor (Asada und Takahashi 1987).

Superoxid kann an der Stroma-Membran über enzymatische oder nichtenzymatische Prozesse zu Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) disproportioniert werden.  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist eine nicht radikale, reaktive Sauerstoffverbindung und hemmt in Konzentrationen von  $1 \mu\text{M}$  thiolmodulierte Enzyme des Calvin-Zyklus (Charles und Halliwell 1981; Polle 1996; Tanaka *et al.* 1982). Ab  $10 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  wird die  $\text{CO}_2$ -Fixierung inhibiert (Kaiser 1979).

Wasserstoffperoxid ist in der Lage, mit den durch das Superoxid reduzierten Metallionen das Hydroxylradikal ( $\bullet\text{OH}$ ) zu bilden (Abb. 5) (Haber-Weiss-Reaktion) (Arora *et al.* 2002). Das Hydroxylradikal ist äußerst aggressiv und schädigt Lipide, Proteine und DNS (Mishra und Singhal 1992; Shah *et al.* 1992). Es kann nicht aktiv, d.

h. auf enzymatischem Wege beseitigt werden (Halliwell und Gutteridge 1999). Allerdings gibt es Hinweise, dass phenolische Substanzen in der Lage sind, die Hydroxylradikalbildung zu unterdrücken (Burkitt und Duncan 2000). Es wurde gezeigt, dass auch Glutathion mit Hydroxylradikalen reagiert (Arora *et al.* 2002).

### **3.2 Wasserstoffperoxid in der Antarktis**

Wasserstoffperoxid ist in Wasser löslich und kann in aquatischen Lebensräumen angereichert werden (Weller und Schrems 1993). Innerhalb der Wassersäule nimmt die  $H_2O_2$ -Konzentration mit zunehmender Tiefe ab. An der Oberfläche sind Konzentrationen zwischen 10 und 400 nM messbar, während mit zunehmender Tiefe die Konzentrationen unter 1 nM sinkt. Es zeigte sich eine enge Korrelation mit dem Salzgehalt und mit der Dichte des Wassers (Abele *et al.* 1999; Resing *et al.* 1993).

Wasserstoffperoxid kann über drei Wege in das Meereis gelangen. Durch Schneefall werden Aerosole wie  $H_2O_2$  aus der Atmosphäre gelöst und im Schnee gebunden (Kamiyama *et al.* 1996). Dabei variiert der Eintrag durch die Atmosphäre jahreszeitlich: Die  $H_2O_2$ -Konzentrationen steigen im antarktischen Sommer und sinken im Winter. Damit spiegelt der Wasserstoffperoxidgehalt im Schnee die Aktivität ultravioletter Strahlung (UVR) im Jahresgang wieder (Kamiyama *et al.* 1996). Studien an Inland-Eisbohrkernen zeigten, dass die  $H_2O_2$ -Konzentrationen in den vergangenen 20 Jahren stark angestiegen sind und mit dem Auftreten des antarktischen „Ozonlochs“ korrelieren (Sigg und Neftel 1991). Zudem konnte ein 19-42% Anstieg der  $H_2O_2$ -Konzentration während eines Abfalls des stratosphärischen Ozons von 336 auf 151 Dobson Units gezeigt werden (Yocis *et al.* 2000).

Wasserstoffperoxid ist ein Intermediat oder ein Produkt bei Reaktionen von Sauerstoff mit organischen Substanzen (Cooper und Zika 1983; Karl und Resing 1993; Scully *et al.* 1996; Zafiriou 1983) und kann auch auf diese Weise in das Meereis eingetragen werden. Ausserdem entsteht  $H_2O_2$  durch die Stoffwechselaktivität von SIMCO-Organismen und reichert sich im Eis an (Palenik *et al.* 1987).

Meines Wissens liegen Wasserstoffperoxid-Daten von Bohrkernen aus dem Packeis nicht vor. Es ist jedoch anzunehmen, dass durch Austauschprozesse die  $H_2O_2$ -Konzentration im Oberflächenwasser mit denen der unteren Eisschichten korrelieren.

## 4 Oxidationsschutz

### 4.1 Enzymatischer Oxidationsschutz in Pflanzen

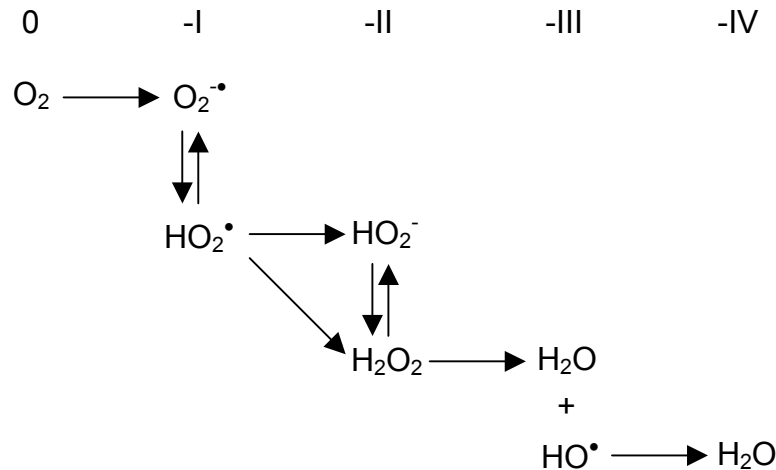
Mit Auftreten des aeroben Stoffwechsels und der Anreicherung von Sauerstoff in der Atmosphäre mussten die Organismen im Laufe der Evolution Methoden entwickeln, mit denen die reaktiven Sauerstoffverbindungen aktiv oder passiv beseitigt werden konnten.

Superoxid-Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) baut Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff ab (Abb. 5). Bisher ist kein weiteres Enzym bekannt, das Superoxid angreift (Bowler *et al.* 1992). Bis auf wenige Ausnahmen ist es in allen aeroben Organismen und in allen zellulären Kompartimenten vorhanden, in denen ROS vermehrt auftreten (Bannister *et al.* 1987; Fridovich 1989).

Es können drei verschiedenen SOD-Formen unterschieden werden, die über ihre Metall-Kofaktoren charakterisiert werden (Bannister *et al.* 1987). Mangan-SOD (MnSOD) ist bei Pflanzen im Allgemeinen in den Mitochondrien und Peroxisomen lokalisiert (Bowler *et al.* 1992). Jüngere Untersuchungen haben Hinweise auf cytosolische MnSOD geliefert (Hernandez *et al.* 2000). Kupfer/Zink-SOD (Cu/Zn-SOD) befindet sich hauptsächlich im Cytosol (Hernandez *et al.* 1999; Hernandez *et al.* 2000), wurde aber auch in Chloroplasten (Hernandez *et al.* 1999) und in Mitochondrien (Hamilton und Heckathorn 2001) nachgewiesen. Eisen-SOD (FeSOD) wird zumeist in Chloroplasten gefunden, konnte aber auch im Cytosol (Arora *et al.* 2002), in den Mitochondrien (Salin 1988) sowie in Peroxisomen (Arora *et al.* 2002) detektiert werden. Alle Algen besitzen eine MnSOD und eine FeSOD, aber keine Cu/ZnSOD (Bowler *et al.* 1992; Kanematsu und Asada 1989). Cu/ZnSOD wurde bisher hauptsächlich in höheren Pflanzen sowie im Tierreich nachgewiesen (Bannister *et al.* 1987). Diese phylogenetische Verteilung führte zu der Schlussfolgerung, dass die MnSOD und FeSOD ursprüngliche Enzyme sind und die Cu/ZnSOD erst kurz vor Beginn der Eukaryoten-Linie auftrat. Das bedeutet, dass die SOD im Laufe der Evolution zweimal unabhängig voneinander entwickelt wurde (Bowler *et al.* 1992).

## (A) Einleitung

---



**Abb. 5: Bildung und Abbau von Superoxid, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikal in Pflanzenzellen. Die Oxidationszahlen sind in römischen Ziffern angegeben.**

Katalase (CAT, EC 1.11.1.6) ist ein Tetramer, zusammengesetzt aus vier gleichen Untereinheiten. Jedes Katalase-Monomer besitzt eine Größe von ca. 60 kDa und trägt eine Häm-Gruppe (Willekens *et al.* 1995). Die Häm-Gruppen liegen in unpolaren Taschen, die durch kleine Kanäle mit der Oberfläche verbunden sind (Halliwell und Gutteridge 1999). Diese Anordnung verhindert, dass Moleküle, die größer sind als Wasserstoffperoxid, Zugang zum aktiven Zentrum erlangen. Gewöhnlich trägt jede Untereinheit ein NADPH-Molekül.

Im Rahmen molekularbiologischer Charakterisierungen der Pflanzenkatalasen wurden in *Zea mays* drei Isoenzyme identifiziert (CAT-1, CAT-2, CAT-3). Im Gegensatz zu Säugetierkatalasen werden Pflanzenkatalasen in mehr als einem Gen kodiert (Scandalios 1994). Mit Ausnahme der CAT-3 von *Z. mays* sind alle anderen Katalasen in den Peroxisomen lokalisiert (Willekens *et al.* 1995).

Der Reaktionsmechanismus der Katalase ist in Ansätzen vergleichbar mit dem der SOD. Grundsätzlich handelt es sich um eine Dismutierung (Disproportionierung), wobei von zwei Wasserstoffperoxidmolekülen eines zu Wasser reduziert und das andere zu reinem Sauerstoff ( $O_2$ ) oxidiert wird (Abb. 5) (Halliwell und Gutteridge 1999). Nicht alle Organismen besitzen Katalasen. So konnte in einigen Bakterien und Cyanobakterien sowie in Euglenophyceae keine Katalaseaktivität gefunden werden (Halliwell und Gutteridge 1999). Auch von Diatomeen wird angenommen, dass sie keine Katalasen besitzen (Gross 1993).

Ascorbat (AsA) ist in den Chloroplasten, dem Cytosol und den Vakuolen in hohen Konzentrationen zu finden (Polle *et al.* 1990) und ist wohl das wichtigste Antioxidanz in Pflanzen (Arora *et al.* 2002). Ascorbat reagiert mit Wasserstoffperoxid zu

Monodehydroascorbat ( $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{AsA} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{MDAsA}$ ). Dieses kann durch das Ferredoxin des PS I wieder zu Ascorbat reduziert werden (Heldt 1999).

Die Oxidation des Ascorbates wird durch die Ascorbat-Peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) katalysiert (Abb 5). APX-Aktivität wurde hauptsächlich im Cytosol (Chen und Asada 1989) aber auch in Mitochondrien (Anderson *et al.* 1995) nachgewiesen. In den Chloroplasten sind sowohl SOD als auch Ascorbat-Peroxidase membrangebunden. So kann das von der SOD gebildete  $\text{H}_2\text{O}_2$  direkt von der Ascorbat-Peroxidase beseitigt werden (Neubauer und Schreiber 1989).

Glutathion (reduzierte Form: GSH) ist die wohl häufigste niedermolekulare Schwefelverbindung in Pflanzen (Foyer *et al.* 1997). Es ist am Schutz von Thiolgruppen von Enzymen und an der Ascorbatregeneration beteiligt. Außerdem reagiert es mit Superoxid Anionen und mit Hydroxyl-Radikalen (Arora *et al.* 2002).

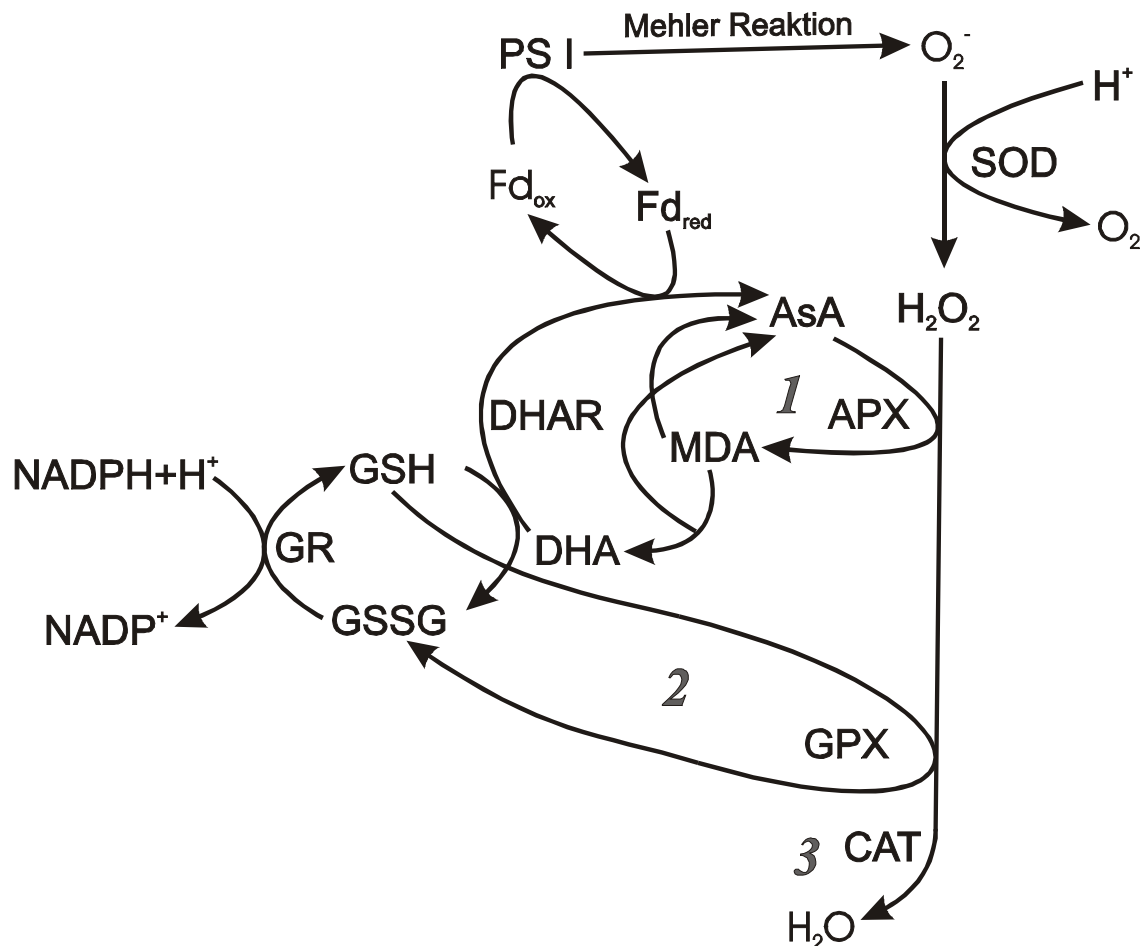


Abb. 6: Asada-Halliwell-Weg zum Abbau von Wasserstoffperoxid.  $\text{H}_2\text{O}_2$  kann auf drei Wegen enzymatisch abgebaut werden: 1) Abbau durch APX, wodurch Monodehydroascorbat (MDH) entsteht. MDH reagiert entweder mit reduziertem Ferredoxin ( $\text{Fd}_{\text{red}}$ ) zu Ascorbat, oder wird nichtenzymatisch zu Dehydroascorbat (DHA) umgewandelt. DHA wird in der DAH-Reduktase (DAHR) katalysierten Reaktion über reduziertem Glutathion (GSH) wieder zu Ascorbat oxidiert. 2) Umsetzung des  $\text{H}_2\text{O}_2$  über Glutathion-Peroxidase (GPX) unter Oxidation von GSH zur oxidierten Form des Glutathions (GSSG). GSSG wird über die Glutathion-Reduktase (GR) erneut zu GSH reduziert. 3) Katalase katalysierte Reaktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu Wasser (Arora *et al.* 2002; Heldt 1999; Mallick und Mohn 2000).

GSH wird von der Glutathion-Peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9) als Substrat zum Abbau von Wasserstoffperoxid genutzt (Abb. 6). Bei Pflanzen ist GPX bisher in den Mitochondrien und im Cytosol nachgewiesen worden (Rennenberg 1982). Beim Abbau von Wasserstoffperoxid über Glutathion-Peroxidase wird das GSH zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert ( $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$ ). Diese oxidierte Form des Glutathions wird über die Glutathion-Reduktase (GR, EC 1.6.4.2) wieder in die GSH-Form überführt (Abb. 6).

### **4.2 Oxidationsschutz in Diatomeen**

Bisher sind nur wenige Studien zum Oxidationsschutz von Diatomeen durchgeführt worden (Rijstenbil 2003). Die benthische Art *Cylindrotheca closterium* (Pennales) besitzt Ascorbat-Peroxidase und Monodehydroascorbat-Reduktase (Rijstenbil 2003). In der planktischen Art *Ditylum brightwellii* wurden Superoxid-Dismutase und Glutathion-Reduktase identifiziert (Rijstenbil 2001).

Mit dem Nachweis dieser Schlüsselenzyme kann angenommen werden, dass der Asada-Halliwell-Weg (Abb. 6) zur Entgiftung von Wasserstoffperoxid auch in Diatomeen abläuft. Untersuchungen zur Lokalisierung der Enzyme wurden bisher nicht durchgeführt.

Schriek (2000) führte erste Untersuchungen zur Ausstattung von *Chaetoceros* sp. (Centrales) und *A. kufferathii* (Pennales) mit Oxidationsschutzenzymen durch. Beide Eisdiatomeen enthielten Superoxid-Dismutase, Glutathion-Peroxidase und Glutathion-Reduktase. *A. kufferathii* hat drei Superoxid-Dismutase Isoenzyme, sie wiesen Molekulargewichte von 46 kDa (SOD1), 41kDa (SOD-2) und 15kDa (SOD-3) auf. Bei SOD-1 und SOD-2 handelt es sich um MnSOD, SOD-3 wurden als FeSOD identifiziert (Schriek 2000).

Die in *A. kufferathii* gefundene Glutathion-Peroxidase wies hohe pH-Optima zwischen 9 und 10 und ein Temperaturoptimum von 45°C auf. Eine Größenbestimmung und Charakterisierung von eventuellen Isoenzymen erfolgte nicht. Die Glutathion-Reduktase in *A. kufferathii* hatte eine Größe von 70 kDa. Das pH-Optimum lag bei 8,0 und wies ein breites Temperaturoptimum zwischen 35° und 45°C auf. Ascorbat-Peroxidase konnte nicht nachgewiesen werden (Schriek 2000).

Untersuchungen zur Lokalisierung der einzelnen Oxidationsschutzenzyme in *A. kufferathii* wurden nicht durchgeführt. Der Nachweis von Katalase in Diatomeen steht weiterhin aus (siehe hierzu Abschnitt D 2.2.2).

### 4.3 Oxidationsschutz in Bakterien

Mit Beginn der Anreicherung der Atmosphäre mit Sauerstoff mussten die Bakterien antioxidative Schutzmechanismen entwickeln oder auf anaerobe Lebensräume beschränkt bleiben (Aldsworth *et al.* 1999). Die wichtigsten Oxidationsschutzenzyme in Bakterien sind Superoxid-Dismutasen und Katalasen (Farr und Kogoma 1991; Loprasert *et al.* 1996; Strohmeier Gort und Imlay 1998). In *Escherichia coli* wurden sowohl MnSOD und FeSOD als auch Cu/ZnSOD nachgewiesen (Benov und Fridovich 1995).

In Bakterien sind bisher zwei Katalasen bekannt. Sie werden als Hydroperoxidase I (HPI) und Hydroperoxidase II (HPII) bezeichnet (Halliwell und Gutteridge 1999). HPI ist ein bifunktionales Enzym, das sowohl Katalase- als auch Peroxidase-Eigenschaften besitzt (Claiborne und Fridowich 1979; Loewen 1996). Diese Katalase-Peroxidase ist ein tetrameres Enzym mit Untereinheiten von je 81 kDa. Jede Untereinheit besitzt eine Häm-Gruppe (González-Flecha und Demple 1997).

HPII ist eine monofunktionale Katalase (Claiborne *et al.* 1979; Loewen *et al.* 1985), die modifizierte Häm-Gruppen trägt (Loewen 1996). Diese Katalase besteht ebenfalls aus vier Untereinheiten, diese haben aber eine Größe von 78 kDa (González-Flecha und Demple 1997).

Im Gegensatz zu Eukaryoten besitzen Bakterien kein Ascorbat und somit auch keine Ascorbat-Peroxidase (Puzon *et al.* 2002; Standeven und Wetterhahn 1991). In Cyanobakterien konnte Ascorbat-Peroxidase hingegen nachgewiesen werden (Asada 1992).

Die Entgiftung von ROS, beispielsweise Wasserstoffperoxid, erfolgt in Bakterien hauptsächlich abiotisch über Glutathion (Puzon *et al.* 2002). Glutathion wurde bisher vor allem in Gram-negativen Bakterien gefunden (Li *et al.* 2003). Neben der Beseitigung von ROS ist Glutathion auch an der Abwehr von osmotischem Stress (Smirnova *et al.* 2001) und der Eliminierung toxischer, elektrophiler Substanzen beteiligt (Ferguson 1999).



## 5 Zielsetzung

Assoziationen zwischen Eisdiatomeen und Epibakterien sind bereits seit langem bekannt. Die Wechselwirkungen zwischen beiden Organismen wurden bisher noch nicht eingehend untersucht. Schriek (2000) postulierte eine Beteiligung der epiphytischen Bakterien am Oxidationsschutz von *Amphiprora kufferathii*.

Die Überprüfung dieser Hypothese ist das Hauptziel dieser Arbeit. Hierzu mussten mehrere Fragen bearbeitet werden.

1. Um welche Bakterienarten handelt es sich in der Mischkultur?
2. Entspricht die Artenzusammensetzung und Verteilung den Verhältnissen im antarktischen Meereis?
3. Kann die Mischkultur als Modellsystem zur Untersuchung der Wechselwirkungen herangezogen werden?
4. Können die epiphytischen Bakterien externes Wasserstoffperoxid abbauen?
5. Gibt es weitere Wechselwirkungen?
6. Wie sind *Amphiprora kufferathii* und die Epibakterien miteinander verbunden?

Zur Identifizierung der Bakterien wurden sowohl kulturabhängige als auch kulturunabhängige Methoden angewendet. Neben der Isolierung von Bakterien wurde eine Klonbank der 16S-rRNS Gene aus der Mischkultur angelegt. Durch die Sequenzierung der 16S-rRNS Gene aus den Isolationsversuchen und der Klonierungen konnte eine phylogenetische Zuordnung der Bakterien erfolgen.

Die Frage nach den Verhältnissen der Artenverteilung in der Mischkultur wurde über Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung beantwortet. Aus den so gewonnenen Daten konnte eine Aussage über die Verwendbarkeit der Mischkultur als Modellsystem getroffen werden.

Um den Einfluss der Bakterien auf den Oxidationsschutz der Alge zu untersuchen wurde eine Methode zur Messung von Wasserstoffperoxid im marinen Kulturmedium etabliert. Um vergleichende physiologische Experimente zum Abbau von Wasserstoffperoxid durchführen zu können, musste eine axenische Kultur von *A. kufferathii* hergestellt werden. Die Beteiligung der Epibakterien am Oxidationsschutz der Alge wurde durch Verfolgen des Abbaus von externem zugefügtem und durch Stress induziertem Wasserstoffperoxid untersucht.

Weitere Wechselwirkungen sollten durch vergleichende Versuche zum osmotischen Stress, zum Temperaturstress und unter Nährstoffmangel gezeigt werden. Die Art der Anheftung zwischen *A. kufferathii* und den epiphytischen Bakterien wurde elektronenmikroskopisch untersucht.

## B Material und Methoden

### Chemikalien und Gase

Alle verwendeten Primer und Sonden für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung wurden von Thermo Hybaid (Ulm) bezogen. Wenn nicht anders angegeben wurden Chemikalien von Merck (Darmstadt) verwendet. Die Gase für die Gaschromatographie wurden von Messer-Griesheim (Ritterhude) geliefert.

## 1 Kultivierungsmethoden

### 1.1 Kultivierung von *Amphiprora kufferathii*

Die Kultivierung von *A. kufferathii* erfolgte in mit WIMEX® (Tabelle 1, Wimex, Krefeld) hergestelltem synthetischem Meerwasser (34PSU). Das Medium wurde mit Nährstoffen für  $\beta$ f/2-Medium (=Standardmedium) nach Guillard (1975) angereichert (Tabelle 2).

**Tabelle 1: Zusammensetzung des WIMEX-Salzes zur Herstellung von synthetischem Meerwasser (<http://www.wiegand.de>).**

Element	Menge	Element	Menge
CL	19,8 g/l	W	92 ng/l
Na	11 g/l	Mn	90 ng/l
SO <sub>4</sub>	2,8 g/l	Fe	75 ng/l
Mg	1,3 g/l	Zr	28 ng/l
Ca	431 mg/l	Ga	22 ng/l
K	410 mg/l	Pb	19 ng/l
Br	72 mg/l	Y	13 ng/l
Sr	8 mg/l	Hf	7 ng/l
B (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	5 mg/l	Au	5 ng/l
Si	3 mg/l	La	4 ng/l
F	1,3 mg/l	Ce	3 ng/l
Li	174 µg/l	Ta	3 ng/l
Rb	123 µg/l	Ge	4 ng/l
Ba	12 µg/l	Co	3 ng/l
Mo	10 µg/l	Nd	2 ng/l
J	5 µg/l	Ag	2 ng/l
As	2 µg/l	Hg	1 ng/l
V	1 µg/l	Dy	871 pg/l
Ti	984 ng/l	Er	871 pg/l
Sn	779 ng/l	Gd	825 pg/l
Al	103 ng/l	Yb	769 pg/l
Ni	410 ng/l	Sc	615 pg/l
Cs	308 ng/l	Pr	574 pg/l
Zn	297 ng/l	Sm	564 pg/l
Cu	205 ng/l	Tm	144 pg/l
Cr	185 ng/l	Cd	103 pg/l
Sb	154 ng/l	In	103 pg/l
Se	113 ng/l	Bi	27 pg/l

## **(B) Material und Methoden**

---

**Tabelle 2: Hauptnährstoffe, Spurenmetalle und Vitamine der  $\beta$ -f/2-Nährlösung (Guillard 1975).**

Hauptnährstoffe	Formel	g / 100ml Stammlsg.	$\mu$ mol/l Medium
<b>Natriumnitrat</b> (Riedel de Haën)	NaNO <sub>3</sub>	7,5	88
<b>Natriumhydrogenphosphat</b> Monohydrat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	0,5	36,3
<b>Natronwasserglas</b> (Riedel de Haën)	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> *9H <sub>2</sub> O	3,0	107
<b>Spurenmetalle</b>			
Eisen(III)-citrat	FeC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	0,3	8,9
Citronensäure Monohydrat	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> *H <sub>2</sub> O	1,68	80,1
Kupfersulfat Pentahydrat	CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	9,8*10 <sup>-4</sup>	0,04
Zinksulfat Heptahydrat	ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,0022	0,08
Kobaltchlorid Hexahydrat (Riedel de Haën, Deisenhofen)	CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,001	0,05
Manganchlorid Tetrahydrat	MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	0,018	0,9
Natriummolybdat Dihydrat	NaMoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	6,3*10 <sup>-4</sup>	0,03
<b>Vitamine</b>			
Thiamin*HCl (Serva, Heidelberg)		1,0*10 <sup>-6</sup>	2,97*10 <sup>-7</sup>
Biotin		1,0*10 <sup>-6</sup>	2,5*10 <sup>-9</sup>
Cyanokobaltamin		0,02	3,69*10 <sup>-10</sup>

Aus den Hauptnährstoffen, Spurenmetallen und Vitaminen wurde je eine separate Stammlösung hergestellt.

Als Puffersubstanz diente 0,66 g/l Glycylglycin. Natriumhydrogenkarbonat (0,2 g/l, Riedel de Haën) wurde als Kohlenstoffquelle beigefügt. Der pH wurde mit NaOH auf einen Wert zwischen 7,8 und 8,0 eingestellt. Die Sterilfiltration bestand aus einem Vorfilter (Sartopure PP2 3 $\mu$ m, Sartorius, Göttingen) und einem Sterilfilter (Sartobran P 0,45 und 0,2  $\mu$ m, Sartorius, Göttingen).

**Tabelle 3: Zusammensetzung des Standardmediums ( $\beta$ f/2-Medium). Menge der Stammlösungen, die zu 10 l WIMEX-Lösung gegeben wurden.**

Stammlösung / Substanz	
Natriumnitrat (Stammlösung)	10 ml
Natriumhydrogenphosphat (Stammlösung)	10 ml
Natronwasserglas (Stammlösung)	10 ml
Spuremetalle (Stammlösung)	10 ml
Vitamine	10 ml
Natriumhydrogenkarbonat	2 g
Glycylglycin	6,6 g

Die Kulturen wurden in Erlenmeyerkolben (250-5000 ml) bei  $0\pm 0,5^\circ\text{C}$  in modifizierten Tiefkühltruhen (Comfort Plus, Siemens) sowie in einem Kühlraum gehalten. Die Lichtintensität lag bei  $\sim 30 \mu\text{mol Photonen} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$  (Leuchtstoffröhre: Lumilux de Luxe, L36W/12-950, Osram, Berlin) und einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 12 h hell / 12 h dunkel. Die Algenkulturen wurden täglich durch manuelles Schwenken der Kulturgefäße bewegt. Nach einer bis zwei Wochen erfolgte ein Wechsel des Mediums: die Diatomeen wurden bei 320 g für 5 Minuten zentrifugiert (Minifuge GL 4400 mit Schwenkrotor 2150, Heraeus, Osterode), das Medium unter einer Sicherheitssterilbank (Inter Med, MDH Ltd., Andover, England) abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Dieser Vorgang wurde vor dem Umfüllen in neue sterile Erlenmeyerkolben dreimal wiederholt (waschen). Dadurch wurden Zelltrümmer ausgespült sowie freilebende Bakterien reduziert.

## 1.2 Kultivierung der Bakterien

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in Standardmedium (Tabelle 3), welches mit 10 g Pepton und 5 g Hefeextrakt angereichert wurde. Anstelle einer Sterilfiltration wurde das Medium autoklaviert. Zur Kultivierung in Petrischalen wurde dem Medium vor der Autoklavierung 1 g / 100 ml Agar (Serva, Heidelberg) hinzugegeben.

## 1.3 Definiertes Medium für Nährstoffmangelversuche

Für die Experimente zum Einfluss der epiphytischen Bakterien auf die Nährstoffumsetzung innerhalb der Mischkulturen wurde ein definiertes Meerwassermedium nach Bidwell und Spotte (1985) verwendet.

**Tabelle 4: Definiertes Meerwassermedium nach Bidwell und Spotte (1985).**

Nährsalze	Formel	g/l
Magnesiumchlorid Hexahydrat (Riedel de Haën, Deisenhofen)	MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	9,8
Kaliumchlorid	KCl	0,67
Natriumbromid	NaBr	0,077
Natriumhydrogencarbonat (Fluka, Deisenhofen)	NaHCO <sub>3</sub>	0,18
Calciumchlorid Dihydrat (Fluka, Deisenhofen)	CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	1,53
Strontiumchlorid Hexahydrat	SrCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,04
Natriumfluorid	NaF	0,003
Kaliumiodid	IK	6,6×10 <sup>-4</sup>
Magnesiumsulfat Heptahydrat	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	6,92
Borsäure	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,027
Natriumchlorid	NaCl	30

Das Medium wurde in entmineralisiertem Wasser angesetzt. Die Einstellung des Salzgehaltes auf 34 PSU erfolgte mit Natriumchlorid. Das Medium wurde mit den Nährstoffen (Tabelle 3) angereichert. Mangelmedien wurden durch Weglassen der einzelnen Nährstoff-Stammlösungen hergestellt. Der pH-Wert wurde mit Natriumhydroxid auf 7,8 - 8,0 eingestellt. Es erfolgte eine Sterilfiltration wie in Abschnitt 1.1 beschrieben.

#### **1.4 Herstellen einer axenischen Kultur von *Amphiprora kufferathii***

Um eine bakterienfreie Kultur von *A. kufferathii* herzustellen, wurden sowohl mechanische Verfahren als auch Antibiotika angewendet. Um die Epibakterien von der Alge zu trennen wurde die Mischkultur durch 100% Percoll zentrifugiert (4000 × g, 0°C, 20 min., Minifuge GL 4400 mit Schwenkrotor 2150, Heraeus, Osterode). Danach wurde das Pellet in Standardmedium überführt und zur Kontrolle des Bakterienbewuchses mikroskopiert.

Vor Beginn dieser Arbeit wurde innerhalb der Arbeitsgruppe Meeresbotanik versucht *A. kufferathii* auf Festmedium zu kultivieren (Standardmedium ,15 g Agar/ml). Ziel war es kolonienbildende Strukturen der Alge so lange zu transferieren, bis eine axenische Kultur entstanden ist.

Bis zum Jahr 2002 waren wahrscheinlich alle Kulturen von *A. kufferathii* mit Bakterien behaftet. Vorangegangene Versuche, die Alge von den Bakterien mit einem Gemisch aus Penicillin (C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>SK, 2,5 - 60 mg/ml), Streptomycin (1,25 - 30 mg/ml) und Chloramphenicol (0,25 - 6 mg/ml) zu befreien (Rosowski und Hoshow 1973), waren ohne Erfolg. Das Antibiotikum Ampicillin (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>SNa, Serva, Heidelberg) zeigte schließlich Wirkung. Um eine erneute Besiedlung der Algen mit Bakterien zu verhindern, wurde eine Stammkultur mit 2 mg/ml Ampicillin gehalten.

Versuchskulturen wurden nach dem Absetzen von Ampicillin regelmäßig mikroskopisch unter Anfärbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma, Taufkirchen) auf erneuten Bakterienbefall untersucht. Dazu wurde ca. 10 µl der Algenkultur mit 1 µl einer 1 µg/ml DAPI-Lösung gemischt und unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Jena) betrachtet (Anregung: 360 nm, Emission: 460 nm).

### 1.5 Medien für Isolationsversuche

Um aus der Mischkultur gezielt Bakterien zu isolieren wurden auf das Standardmedium (Abschnitt 1.1) basierende, selektive Medien mit verschiedenen Kohlenstoffquellen hergestellt. Das Grundmedium enthielt kein Natriumhydrogenkarbonat und kein Glycylglycin.

**Tabelle 5: Aufstellung der für die Isolationsversuche verwendeten Kohlenstoffquellen.**

Kohlenstoffquelle	g/l	Agar g/l
Saccharose	2	10
Mannose	2	10
Glycylglycin (Biomol, Hamburg)	2	10
Fleischextrakt	2	10
Pepton	2 ; 1 ; 0,5 ; 0,2	10
Hefeextrakt	2 ; 1 ; 0,5 ; 0,2	10
Agar		10

### 1.6 Lichtmikroskopie

Vor dem Umsetzen wurden die Algenkulturen lichtmikroskopisch (600×) inspiziert. Um Bakterienbefall zu kontrollieren, wurden Proben aus den Kulturen mit Lugolscher Lösung gefärbt:

**Tabelle 6: Zusammensetzung der Lugolschen Lösung (200 ml).**

Jodkalium	20g
Jod	15g
Eisessig	20g

Zu 1 ml Probe wurden ca. 50 µl der Lugolschen Lösung gegeben. Vormals axenische Kulturen von *A. kufferathii*, die erneuten Bakterienbefall zeigten, wurden verworfen.

### **1.7 Bestimmung der Zelldichte und Wachstumsraten in Algenkulturen**

Die Zelldichte der Algenkulturen wurde mit einem Coulter Counter (Z2, Beckmann-Coulter, Krefeld) bestimmt. Das Messprinzip beruht auf der Änderung des elektrischen Widerstandes bei Passage eines nichtleitenden Partikels durch eine Öffnung in einer ebenfalls nichtleitenden Kapillare. Die verwendete Kapillare hatte einen Durchmesser von 100 µm. Die Proben wurden vor der Messung 1:10 mit ISOTON® (Beckmann-Coulter, Krefeld) verdünnt. Das gemessene Volumen betrug 0,5 ml. Der Zählbereich lag zwischen 7,0 und 23,0 µm. Die gewonnenen Daten wurden mit dem Program Coulter AccuComp 2.01 (Beckmann-Coulter, Krefeld) ausgewertet.

Die Berechnung der spezifischen Wachstumsraten erfolgten nach der Formel  $\mu = [\ln(C_1/C_0)] / [T_1 - T_0]$  (Hazzard *et al.* 1997), wobei  $\mu$  die spezifische Wachstumsrate,  $T_1$  der Zeitpunkt der Messung und  $T_0$  der Zeitpunkt der vorangegangenen Messung darstellt.  $C_1$  und  $C_0$  sind die Ergebnisse der Zählung zu den entsprechenden Zeitpunkten.

### **1.8 Bestimmung der Zelldichte in Bakterienkulturen**

Da die Nachweisgrenze des Coulter Counters bei 3 µm Zelldurchmesser liegt, musste die Zelldichte in den Bakterienkulturen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Brand, Wertheim) bestimmt werden. Hierzu wurden die Bakterien zuvor mit Lugolscher Lösung wie in Abschnitt 1.6 beschrieben fixiert und angefärbt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden in einem Großquadrat die Kleinquadrate einmal quer und einmal diagonal ausgezählt. Bei Bedarf wurden die Proben mit sterilfiltriertem Standardmedium verdünnt.

## **2 Molekularbiologische Methoden**

### **2.1 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)**

Zusammensetzung der verwendeten Lösungen:

Formaldehyd 4 %	aus 37 %Formaldehyd, sterilfiltriert
PBS Puffer pH 7,4	22,8 g/l NaCl 1,16 g/l NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 3,8 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> autoklaviert

5 M NaCl	292,2 g/l NaCl autoklaviert
0,5 M EDTA (Titriplex III) pH 8,0	186,1 g/l EDTA autoklaviert
10 % Natriumdodecylsulfat (SDS)	100 g/l SDS pH 7,2 bei 68°C
1 M TRIS-HCl-Puffer pH 8,0	121,14 g/l TRIS autoklaviert
Hybridisierungspuffer	360 µl 5 M NaCl-Lösung 40 µl 1 M TRIS-HCl-Puffer 700 µl* Formamid 99 % (Fluka, Deisenhofen) *(CF719a = 600 µl, OCT1021 = 525 µl) 900 µl Wasser 2 µl SDS-Lösung
Waschpuffer	1000 µl 1M TRIS-HCl-Puffer 700 µl 5 M NaCl-Lösung 500 µl 0,5 M EDTA-Lösung auffüllen auf 50ml Inkubation bei 48°C
Citifluor-DAPI-Gemisch	Citifluor, Eine Immersionsöl basierte Lösung zum Aufbringen auf Objektträger (Citifluor, London) 1 µg DAPI (Sigma, Taufkirchen) in 1 ml Citifluor

Bei der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) werden spezifische Nucleinsäurebereiche (DNS oder RNS) direkt in fixierten Präparaten lokalisiert. Die Methode geht auf die Arbeiten von Gall und Pardue (1969) zurück und basiert auf der Hybridisierung einzelsträngiger Nucleinsäuren (Lottspeich und Zorbas 1998).

Kurze Nucleinsäure-Ketten mit komplementärer Sequenz zur gesuchten DNS oder RNS (Sonden) sind mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert. In den beschriebenen



## **(B) Material und Methoden**

---

Untersuchungen wurde Cyanine™3 (Cy3) verwendet. Dieser Farbstoff gibt bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 550 nm ein fluoreszierendes Signal bei 565 nm. Auf diese Weise kann die gesuchte DNS oder RNS in Präparaten sehr genau lokalisiert und Arten in einer Freilandprobe oder einer Mischkultur spezifisch nachgewiesen werden (Amann 2000; Glöckner *et al.* 1999). Die Identifizierung der Bakterien erfolgt in Abhängigkeit der verwendeten Sonde mit einer Auflösung auf Phylum- oder Artniveau. Es wurden sieben spezifische Sonden verwendet (Tabelle 7).

**Tabelle 7: Aufstellung der verwendeten Sonden für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung.**

Bezeichnung	Spezifität	Sondensequenz	Quelle
EUB338 II	Eubacteria	5'-GCA GCC ACC CGT AGG TGT-3'	(Daims <i>et al.</i> 1999)
ALF968	$\alpha$ -Proteobacteria	5'-GGT AAG GTT CTG CGC GTT-3'	(Neef 1997)
ROS337	Roseobacter	5'-CAA CGC TAA CCC CCT CC-3'	(Eilers <i>et al.</i> 2001)
BET42a	$\beta$ -Proteobacteria	5'-GCC TTC CCA CTT CGT TT-3'	(Manz <i>et al.</i> 1992)
GAM42a	$\gamma$ -Proteobacteria	5'-GCC TTC CCA CAT CGT TT-3'	(Manz <i>et al.</i> 1992)
CF319a	Bacterioidetes	5'-TGG TCC GTG TCT CAG TAC-3'	(Manz <i>et al.</i> 1992)
CF719a	Bacterioidetes	5'-AGC TGC CTT CGC AAT CGG-3'	(Manz <i>et al.</i> 1992)
OCT1021	<i>Octadecabacter antarcticus</i>	5'-GCG TCC CCT AAG GGA ACT-3'	(Brinkmeyer <i>et al.</i> 2003)

Kompetitoren	Sequenz	Quelle
BET42a	5' -GCC TTC CCA CAT CGT TT-3'	(Manz <i>et al.</i> 1992)
GAM42a	5' -GCC TTC CCA CTT CGT TT-3'	(Manz <i>et al.</i> 1992)

---

Kompetitoren kommen zum Einsatz, wenn sich zwei Organismengruppen in der Zielsequenz der jeweiligen Sonden so ähnlich sind, dass es zu Fehlhybridisierungen kommen kann. Dies hätte falsch-positive Signale zur Folge. Die Kompetitoren

hybridisieren mit dem zelsequenzähnlichen Bereich und blockieren die Anlagerung der FISH-Sonde.

Die Sondenlösungen setzten sich aus 8 µl der jeweiligen Sonde (50 ng/µl) und 64 µl des Hybridisierungspuffers zusammen. Beim Einsatz von Kompetitoren wurden zu den Sonden 56 µl Hybridisierungspuffer und 8 µl des entsprechenden Kompetitors (50 ng/µl) hinzugefügt.

### **2.1.1 FISH mit Bakterien Reinkulturen**

Bakterienmaterial wurde von Plattenkulturen entnommen und für 1 h auf Eis in 4 % Formaldehyd in 1,5 ml Reaktionsgefäßen fixiert. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 12.000 g (Biofuge fresco, Heraeus, Osterode) für fünf Minuten. Der Überstand wurde verworfen und durch PBS-Puffer ersetzt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, um die Zellen zu waschen. Nach dem letzten Schritt wurde der Überstand mit 1:1 PBS-Ethanol ausgetauscht. 15 µl der resuspendierten Proben wurden auf Gelatinebeschichtete Objektträger aufgetragen. Diese waren in sechs Felder aufgeteilt. Es folgte eine Inkubation bei 46°C für 15 min im Hybridisierungsofen (OV5, Biometra, Göttingen), eine Entwässerungsphase von je 3 min in 50 %, 80 %, und 96 % Ethanol und erneuter Inkubation bei 46°C für 15 min. 9 µl der jeweiligen Sondenlösung wurde auf die Proben aufgetragen und 2 h bei 46°C hybridisiert. Danach wurden die Objektträger in 50 ml Waschpuffer (Abschnitt 2.1) bei 48°C inkubiert. Die anschließende Trocknung fand für ca. 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln statt. Abschließend erfolgte die Anfärbung der gesamten DNS in den Proben mit einem 1 µg/ml Citifluor-DAPI-Gemisch (Abschnitt 2.1). Die Proben wurden mit einem Deckglas abgedeckt und mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Jena) untersucht.

### **2.1.2 FISH mit Mischkulturen**

Die Untersuchung der epiphytischen Bakteriengesellschaft erfolgte nach einer modifizierten Methode, die für eine ähnliche Fragestellung bei Dinoflagellaten angewendet wurde (Alverca *et al.* 2002; Biegala *et al.* 2002).

Bakterienbehaftete, fixierte (Abschnitt 2.1.1) Kulturen von *A. kufferathii* wurden mit einem 5 µm Isopore Polycarbonatfilter (Millipore) ohne Vakuum filtriert und dadurch alle freien Bakterien entfernt. Bei Untersuchungen, die freie Bakterien mit einschlossen, wurden 0,2 µm Isopore Polycarbonatfilter verwendet. Die Filter wurden in Stücke geschnitten, auf einem herkömmlichen Objektträger platziert und 10 µl der jeweiligen Sondenlösung (Tabelle 7) auf die Stücke pipettiert. Die Hybridisierung fand für 2 h bei 46°C im Hybridisierungsofen statt. Danach wurden die Filterstücke bei 48°C für 15 min in Waschpuffer überführt und auf Zellstoff im Dunkeln getrocknet. Anschliessend wurden sie

auf herkömmliche Objektträger gelegt, mit 2-3 µl Citifluor-DAPI-Gemisch (1 µg/ml) versehen, und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Untersuchung der Proben erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Jena).

## **2.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

Mit Hilfe der PCR wird die 16S-rRNS Gene der untersuchten Bakterienarten amplifiziert. Die Produkte wurden zur Sequenzierung (Abschnitt 2.10) oder zur Klonierung (Abschnitt 2.8) verwendet. Die erfolgreich in Plasmide klonierten DNS-Abschnitte wurden ebenfalls durch PCR vervielfältigt. Bei allen PCR's wurde das Verfahren der sogenannten „Hot-Start-PCR“ angewendet, d. h. Polymerase wurde erst nach dem ersten Denaturierungsschritt hinzugefügt. Diese Methode erlaubt eine höhere Spezifität der PCR (Mühlhardt 2000; Newton und Graham 1994).

### **2.2.1 PCR Bedingungen für 16S-rRNS Gene**

**Tabelle 8: Verwendete Primer für die Amplifizierung der bakteriellen 16S-rRNS Gene.**

Bezeichnung	Sequenz	Quelle
GM3 fwd	5'-AGA GTT TGA TCM TGG C-3'	(Muyzer <i>et al.</i> 1995)
GM4 rev	5'-TAC CTT GTT ACG ACT T-3'	(Muyzer <i>et al.</i> 1995)

**Tabelle 9: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes zur Amplifizierung der bakteriellen 16S-rRNS Gene.**

Reagenz	Menge (µl)	Konzentration
10×Taq Puffer (Sigma, Taufkirchen)	4	100 mM TRIS-HCl (pH 8,3) 500 mM KCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> 0,01 % Gelatine
PCR-Wasser (Gibco, Karlsruhe)	38,5	
Desoxyribonukleotide (dNTP)-Mix (Sigma, Taufkirchen)	10	10 mM
Template (extrahierte DNS)	1	15 bis 30 µg/µl
Primer GM3	0,5	20 pmol
Primer GM4	0,5	20 pmol
Red Taq Polymerase (Sigma, Taufkirchen) oder Polymerase (Promega, Mannheim)	2,5	1 U/µl

PCR's wurden mit einem Mastercycler *gradient* (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt:

Erste Denaturierung	94°C	5 min
Denaturierung	94°C	1 min
Annealing	40°C	1 min
Elongation	72°C	2 min
Letzte Elongation	72°C	10 min

Anzahl der Zyklen: 31

Die Kontrolle der PCR erfolgte anhand von Agarosegelen (8×10cm, 1%) in Tris-Borat-EDTA (TBE) Puffer bei 120 Volt.

#### TBE-Puffer

Tris	10,8 g/l
Borsäure	5,5 g/l
EDTA (Titriplex III)	0,93 g/l

Die gewonnenen PCR-Produkte wurden vor der Weiterverwendung mit dem QIAquick PCR-Purification Kit (Quiagen, Hilden) aufgereinigt.

## 2.2.2 PCR Bedingungen für Plasmidinserts

**Tabelle 10: Verwendete Primer für die Amplifizierung der in das Plasmid eingefügten DNS.**

Bezeichnung	Sequenz	Quelle
M13 fwd	5'-GTT GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'	Manual zum TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe)
M13 rev	5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3'	Manual zum TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe)

Die Primer M13 fwd und M13 rev haben ihre Zielsequenzen auf dem Plasmid links und rechts vom eingefügten DNS abschnitt.

Die Zusammensetzung der PCR entspricht den Angaben in Abschnitt 2.2.1 (Tabelle 9). Für PCR Ansätze in 96er Platten wurde das Template nicht pipettiert, sondern mit einem Stempel übertragen.

Die PCR wurde mit einem Mastercycler *gradient* (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt:

Erste Denaturierung	94°C	5min
Denaturierung	94°C	30sek
Annealing	60°C	45sek
Elongation	72°C	90sek
Letzte Elongation	72°C	10min

Anzahl der Zyklen: 35

Die gewonnenen PCR-Produkte wurden vor der Weiterverwendung mit dem QIAquick PCR-Purification Kit (Quiagen, Hilden) aufgereinigt

## 2.3 Klonierung

### Zusammensetzung NZY<sup>+</sup>-Broth Medium

10 g/l NZ-amin, Casein Hydrolysat (Riedel de Haën)

5 g/l Hefeextrakt

5 g/l Natriumchlorid

4 g/l Glukose

12,5 ml 1M Magnesiumchlorid

12,5 ml 1M Magnesiumsulfat

Zusammensetzung LB-AMP Agarplatten:

20 g/l Luria-Broth (Difco, BD Diagnostic Systems, Sparks, USA)

10 g/l Agar (Sigma, Taufkirchen)

50 µg/ml Ampicillin (Serva, Heidelberg)

Vor Gebrauch wurden 40 µl 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Beta-D-Galactopyranosid (X-Gal 40 µg/µl, Promega, Mannheim) und 40 µl Isopropyl-Beta-D-Thiogalactopyranosid (IPTG, 100 mM, Promega, Mannheim) auf die Agarplatten aufgetragen.

Mit Hilfe der Klonierung von 16S-rRNS Gene aus einer Mischkultur ist es möglich Bakterien zu identifizieren, ohne dass diese in Reinkultur vorliegen. Eine bakterienbehaftete Kultur von *A. kufferathii* wurde 10 × gewaschen (Abschnitt 1.1), um freilebende Bakterien zu reduzieren. Die Lyse sowohl der Bakterien- als auch der Diatomeenzellen erfolgte durch wiederholtes Einfrieren in flüssigen Stickstoff und Auftauen bei 4°C. Die 16S-rRNS Gene wurden, wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben, amplifiziert.

Die Klonierung erfolgte mit dem TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe). Bakterielle DNS wurde über eine Topomerase in den künstlichen Vektor (Plasmid) TOPO pCR 2.1 eingefügt (Insert). Dieser Vektor enthält gebundene Topoisomerase des Typs 1 und wird daher auch als aktivierter Vektor bezeichnet. Topoisomerasen regulieren in Organismen das Verwinden oder Entwinden der DNS (Lehninger *et al.* 1998). Hier findet die an den Vektor gebundene Topoisomerase Anwendung um die Einbindung der PCR-Produkte in das künstliche Plasmid zu beschleunigen.

Das Ligationsprodukt wurde daraufhin in ultrakompetente *Escherichia coli* Zellen (XL-10 Gold, Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Die Bakterien wurden in 900 µl NZY<sup>+</sup>-Broth Medium für 1 h bei 37°C vorkultiviert. 20 µl der Vorkultur wurden auf LB-AMP Agarplatten aufgetragen und über Nacht bei 37°C kultiviert.

Künstliche Vektoren tragen Gene für eine Reihe von Antibiotikaresistenzen. *E. coli*-Zellen, die den verwendeten Vektor (pCR 2.1) aufgenommen haben, sind resistent gegen Kanamycin und Ampicillin. Somit können nur Zellen mit aufgenommenem Vektor auf den Ampicillin-Agarplatten wachsen. Zusätzlich zu den Antibiotikaresistenzen trägt das Plasmid das Gen für das N-terminale α-Fragment der β-Galaktosidase (Mühlhardt 2000). Bei Einbringung dieses Vektors in einen geeigneten Wirtstamm kommt es zur Expression von β-Galaktosidase. Dieses Enzym spaltet glykosidische Bindungen. Bei der Spaltung der glykosidischen Bindung in 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid (XGAL, Invitrogen, Karlsruhe) entsteht ein blauer Farbstoff. *E. coli*-Zellen, die auf X-GAL wachsen und eine intakte β-Galaktosidase aufweisen, erscheinen somit blau. Diesen Umstand wird genutzt, indem die zu klonierenden DNS Fragmente in das β-Galaktosidase-Gen

eingefügt werden, wodurch dieses inaktiviert wird. Dadurch bleiben die Zellen mit einem erfolgreich eingefügten DNS-Fragment weiß (blau/weiß-Selektion).

Kolonien mit einem aufgenommenen Vektor, in dem erfolgreich DNS eingebaut wurde, sind in 250 µl LB-Ampicillin-Flüssigmedium überimpft worden. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Insgesamt wurde mit 288 Klonen, die ein Plasmid mit eingefügter DNS aufwiesen, eine neue PCR durchgeführt.

In 96er PCR-Platten (0,2 ml) wurden alle Reagenzien pipettiert, wie in Abschnitt 2.2 beschrieben. Das Bakterienmaterial wurde mit Hilfe eines Stempels mit 96 Zinken in die einzelnen PCR Gefäße übertragen. Die Kulturen wurden mit Glycerin gemischt (1:3), in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die PCR wurde, wie in Abschnitt 2.2.3 dargestellt, durchgeführt.

### **2.4 Amplified Ribosomal DNS Restriction Analysis (ARDRA)**

Die ARDRA dient der Vorselektion der Klone. Durch die ARDRA kann die Anzahl der anfallenden Sequenzierungen drastisch reduziert werden. Diese Methode basiert auf der Spaltung von DNS durch Restriktionsenzyme. Bei der Aufspaltung von 16S-rRNS Genamplikons verschiedener Bakterienspezies durch gleiche Restriktionsenzyme entstehen so für die unterschiedlichen Spezies DNS-Fragmente verschiedener Länge. Durch Auftragen auf Agarosegele erhält man für jede Spezies ein spezifisches Bandenmuster. Auf diese Weise kann mit den in Abschnitt 2.8 gewonnenen PCR Produkten eine Vorselektion der Klone durchgeführt werden.

Für die ARDRA wurden die Restriktionsenzyme *HaeIII* (Schnittstellen GG↓CC) und *RsaI* (Schnittstellen CA↓TG) verwendet.

Der Restriktionsansatz wurde 3 h bei 37°C inkubiert. Die Auftrennung der verdauten DNS erfolgte in 3 %igen Agarosegelen (GT NuSieve Agarose, BioZym, Hessisch Oldendorf) bei 120 Volt für 2,5 h. Die DNS-Fragmente wurden mit Hilfe von Größenstandards (GeneRuler™, Fermentas, St. Leon) und dem Gelanalyseprogramm LabImage V2.62 (Kapelan, Halle) analysiert.

**Tabelle 11: Zusammensetzung des Restriktionsansatzes.**

Bezeichnung	Menge (µl)	Konzentration
Template (PCR Produkt M13 fwd/rev)	5	10 bis 30 ng
Restriktionsenzym <i>HaeIII</i> (Promega, Mannheim)	0,75	10 U/µl
Restriktionsenzym <i>RsaI</i> (Promega, Mannheim)	0,75	10 U/µl
Puffer C (Promega, Mannheim)	1,5	10 mM TRIS-HCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 50 mM NaCl 1 mM Dithiotreitol (DTT)
Wasser (Gibco, Karlsruhe)	15	

## 2.5 Sequenzierung

**Tabelle 12: Zusammensetzung der Sequenzierreaktion für 16S-rRNS Gene.**

Bezeichnung	Menge (µl)	Konzentration
BigDye (Applied Biosystems, Foster City, USA)	1	
Sequenzierprimer	1	5 pmol/µl
2,5× Puffer (Applied Biosystems, Foster City, USA)	1	200 mM TRIS-HCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> pH 9,0
Template	2	~10 ng/µl

Die Reaktion wurde mit einem Mastercycler *gradient* (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt:

Erste Denaturierung	96°C	20 sek
Denaturierung	96°C	10 sek
Annealing	55°C	5 sek
Elongation	60°C	4 min

Anzahl der Zyklen: 39

**Tabelle 13: Verwendete Sequenzierprimer für die 16S-rRNS Gene.**

Bezeichnung	Sequenz	Quelle
517F	5'-CCA GCA GCC GCG GTA ATA C-3'	(Wilmotte <i>et al.</i> 1993)
1099F	5'-GCA ACG AGC GCA ACC C-3'	(Wilmotte <i>et al.</i> 1993)
534R	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GGC-3'	(Wilmotte <i>et al.</i> 1993)
803R	5'-CTA CAA GGG TAT CTA ATC C-3'	(Wilmotte <i>et al.</i> 1993)



Die Produkte der Sequenzierreaktion wurden zur Entsalzung auf eine 96er Multiscreen HV-Platte (Eppendorf, Hamburg, Hamburg) aufgetragen, die zuvor mit 45 µl Sephadex® G-50 (Sigma, Taufkirchen) pro Kammer beladen worden war. Zu dem Pulver wurden 300 µl PCR-Wasser gegeben und 3h bei Raumtemperatur gequollen. Das Wasser wurde durch Zentrifugation bei 910 g für 5 min (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg, Hamburg) entfernt und verworfen. Um Kontaminationen des Sephadex®-Materials zu reduzieren wurden zusätzlich 150 µl PCR-Wasser aufgetragen und erneut zentrifugiert.

Zu den Produkten der Sequenzierreaktion wurden 15 µl PCR-Wasser gegeben. Diese wurden auf die Sephadex®-Säulen aufgetragen und erneut bei 910 g für 5 min zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde in einer sterilen 96er Platte aufgefangen und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert.

Die Proben wurden auf einen Sequenzer (ABI-Prism 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, USA) aufgetragen. Zur Nacheditierung und für das Zusammenfügen der Einzelsequenzen wurde das Programm Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) verwendet.

### **2.6 Phylogenetische Analyse**

Eine erste Zuordnung der Sequenzen erfolgte mittels BLAST-Suche in der Genbank Internet-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Die Stammbäume wurden mit dem Computerprogramm Arb (<http://www.arb-home.de>) berechnet. Für die Berechnung der Stammbäume wurde die Maximum Likelihood Methode angewendet. Ziel dieses Verfahrens ist es, den wahrscheinlichsten Baum für die untersuchten Sequenzen zu finden. In einer Sequenz kann eine einzelne Position mit 4 verschiedenen Möglichkeiten beschrieben werden, eine für jede Base. Bei der Maximum Likelihood Methode wird vorausgesetzt, dass alle Mutationen unabhängig voneinander erfolgt sind. Für jede Position der untersuchten Sequenz kann ein eigener Baum berechnet werden. Ziel ist es, den wahrscheinlichsten Baum zu finden. Dazu werden für alle Bäume der einzelnen Positionen Einzelwahrscheinlichkeiten berechnet. Der endgültige Baum ist das mathematische Produkt der Einzelwahrscheinlichkeiten ist (Hansen 1997).

### **3 Biochemische Methoden**

#### **3.1 Proteinextraktion**

##### Extraktionspuffer pH 6,5

MES (Sigma, Taufkirchen)	100 mM
Manganchlorid (Fluka, Deisenhofen)	50 mM
Magnesiumchlorid (Fluka, Deisenhofen)	10 mM
Calciumchlorid	10 mM
EGTA (Sigma, Taufkirchen)	1 mM
Complete Protease Inhibitortablette (Roche, Mannheim)	1/50 ml

Zur Herstellung von Rohextrakten wurden Bakterien- (Agar-Kulturen) oder Diatomeen-Kulturen (sedimentiert) in 1,5 ml Reaktionsgefäße gefüllt und für 5 min bei 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt, wenn größere Mengen an Biomaterial benötigt wurden. Das Pellet wurde mit etwas Quarzsand in 1 ml Extraktionspuffer gegeben und mit einem Minipistill zerrieben. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 12000 g. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die Proteinbestimmung wurde mit einem Bradford Proteinassay (Bio-Rad, München) und Rinderserumalbumin (Sigma, Taufkirchen) als Standardprotein durchgeführt (Bradford 1976).

#### **3.2 Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)**

Die angewendete Zusammensetzung der Gele basiert auf der Methode von Laemmli (1970).

##### Acrylamid Stammlösung

Acrylamid	50 % w/v
N,N'-Methylen-diacrylamid, BIS	0,8 % w/v

Die Stammlösung wurde 1 h mit 0,4 g / 100 ml Aktivkohle (Fluka, Deisenhofen) gerührt, anschließend über einen Papierfilter und einen 0,45 µm Membranfilter filtriert und bei 4°C gelagert.

##### Puffer für Sammelgele

0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8

##### Puffer für Trenngele

1 M TRIS-HCl, pH 8,6

## **(B) Material und Methoden**

---

### Ammoniumperoxidsulfat-Lösung (APS)

10 % w/v Ammoniumperoxidsulfat

### Probenpuffer

1 M TRIS-HCl, pH 6,8	3,1 ml
Glycerin (Biomol, Hamburg)	5,0 ml
1 % Bromphenolblau (Sigma, Taufkirchen)	0,5 ml
Bidest	1,4 ml

### Kathodenpuffer 5fach

50 mM TRIS-Glycerin, pH 8,3

Vor Anwendung wurde der Puffer 1:5 mit bidestilliertem Wasser verdünnt.

### Anodenpuffer 10fach

50 mM TRIS-HCl, pH 8,3

Vor Anwendung wurde der Puffer 1:10 mit bidestilliertem Wasser verdünnt.

### Zusammensetzung 10 % Trenngel 14 × 18 cm

Bidest	10,85 ml
Puffer für Trenngele	5 ml
Acrylamid Stammlösung	4 ml
APS	0,1 ml
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, TEMED (Fluka, Deisenhofen)	0,01 ml

Als Größenstandard diente der Precision plus Protein Standard (BioRad, München). Dieser enthält 10 rekombinante Proteine von 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 und 25 kDa, zur Orientierung sind die 25, 50 und 75 kDa Proteine in erhöhter Konzentration enthalten und treten im Gel deutlich hervor.

Vor Zugabe von APS und TEMED wurde die Lösung unter Vakuum (Wasserstrahlpumpe) und Ultraschall (Ultraschallbad, Sonopure Super RK 106, Bandelin Elektronik, Berlin) entgast.

**Zusammensetzung 4 % Sammelgel**

Bidest	3,65 ml
Puffer für Sammelgele	2,5 ml
Acrylamid Stammlösung	0,8 ml
APS	0,05 ml
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, TEMED (Fluka, Deisenhofen)	0,005 ml

Die Lösung wurde wie oben beschrieben mit Ultraschall und Vakuum entgast.

Die Gele wurden vor Gebrauch 12 h bei 1 mA (konstant), 3 W und 750 V über Nacht equilibriert. Die Bedingungen für die Elektrophorese der einzelnen Oxidationsschutzenzyme sind im Abschnitt C unter den entsprechenden Abbildungen der Gele aufgeführt.

**3.3 Gelfärbungen****3.3.1 Coomassie****Coomassie-Färbelösung**

Coomassie Brilliant Blau G250 (Serva, Heidelberg)	0,04 % w/v
Essigsäure	10 % w/v
Bidest	90 % w/v

**Entfärber**

Essigsäure	8 % w/v
Ethanol	25 % w/v
Bidest	67 % w/v

Die Gele wurden über Nacht in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Danach wurden die Gele so lange im Entfärber geschwenkt bis die Hintergrundfärbung verschwunden war.

**3.3.2 Katalase (CAT)**

Die Katalaseaktivität wurde nach Woodbury *et al.* (1971) bestimmt. Native Gele wurden nach der Elektrophorese für 10 min in 0,03 % Wasserstoffperoxid (Fluka, Deisenhofen) inkubiert. Nach kurzem Abspülen mit Bidest wurden sie 5 min in einer 1:1 Lösung aus 2 % w/v Kaliumhexacyanoferrat (Merck, Darmstadt) und 2 % w/v Eisen(III)-chlorid (Riedel-de-Haën) gegeben. Katalaseaktivität zeigte sich als helle Banden auf blauem Hintergrund.

### 3.3.3 Superoxid Dismutase (SOD)

Die Gele wurden für 10 min in 0,1 % w/v Nitro Blue Tetrazolium (NBT, Sigma, Taufkirchen) inkubiert. Danach wurden sie für weitere 10 min in einen 36 mM Phosphatpuffer (pH 8,0) mit 28 mM TEMED und 28  $\mu$ M Riboflavin (Sigma, Taufkirchen) überführt (Beauchamp und Fridowich 1971).

Die Entwicklung der Gele erfolgte auf einem Fototisch über Nacht (Wellenlänge: 560 nm). Eine SOD-Aktivität zeigte sich als helle Banden auf blau/violetterem Hintergrund. Die Unterscheidung zwischen Cu/Zn-, Mn- und Fe-SOD erfolgte durch Inkubation der Gele in 1 mM Kaliumzyanid für die Hemmung von Cu/Zn-SOD (Merck, Darmstadt) bzw. 2 mM Wasserstoffperoxid (Fluka, Deisenhofen) für die Hemmung von Cu/Zn- und Fe-SOD.

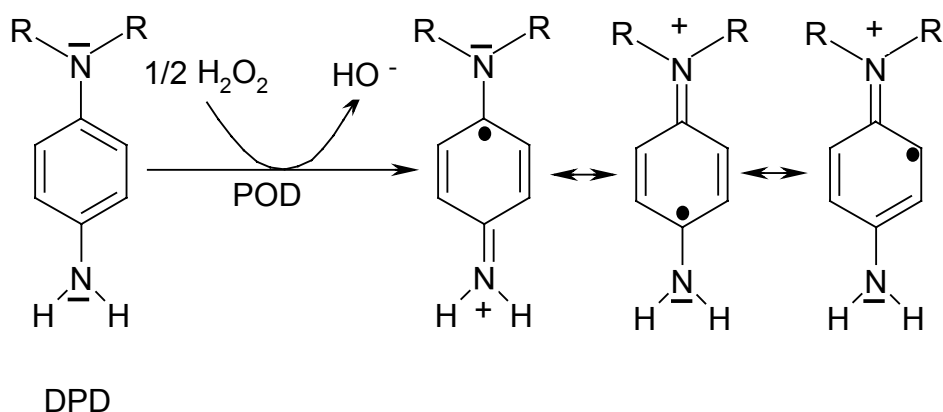
### 3.3.4 Glutathion Reduktase (GR)

Die Methode für die Anfärbung von Glutathion Reduktase stammt von Foyer et al. (1991). Die Färbung erfolgte in 250 mM TRIS-HCl-Puffer (Merck, Darmstadt) versetzt mit 10 mM oxidiertem Glutathion (GSSG, Roche, Mannheim), 2 mM NADPH und 2 mM 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (Sigma, Taufkirchen) bei pH 8,0. Die GR-Aktivität zeigte sich als gelbe Banden auf klarem Hintergrund. Zur Kontrolle wurden die Gele wie beschrieben ohne GSSG gefärbt.

## 4 Analytische Methoden

### 4.1 Photometrische Wasserstoffperoxid Bestimmung

Zur Bestimmung von Wasserstoffperoxid in wässrigen Lösungen sind bisher zahlreiche Methoden beschrieben, die auf der Umsetzung von  $H_2O_2$  durch eine Peroxidase (POD) basieren. Auch die hier angewendete Methode basiert auf der Umsetzung von *n,n*-Diethyl-*p*-phenylen-diamin (DPD) und  $H_2O_2$  durch Peroxidase (Bader et al. 1988).



**Abb.7.** Darstellung der POD katalysierten Reaktion von  $H_2O_2$  mit DPD (Adaptiert nach Bader et al. 1988).

Durch die POD katalysierte Reaktion von Wasserstoffperoxid mit DPD entsteht ein DPD-Radikalkation. Dieses ist stabil und bewirkt eine photometrisch messbare Verfärbung, die sich proportional zur  $H_2O_2$ -Konzentration verhält. Die Absorptionsmaxima des stabilen Radikals liegen bei 510 nm und 551 nm.

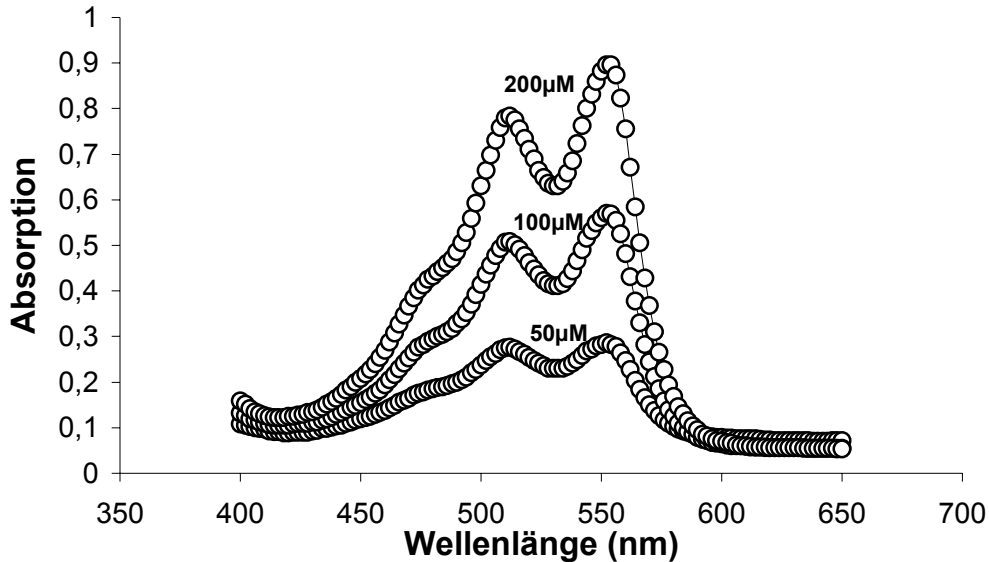


Abb 8: Spektren des DPD-Radikals bei verschiedenen  $H_2O_2$ -Konzentrationen

Im Unterschied zur Methode von Bader *et al.* (1989) erfolgte die Messung bei 551 nicht in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 10 cm sondern von 5 cm (Jürgens, Bremen). Die Berechnung der Wasserstoffperoxid-Konzentration erfolgte anhand von Standards. Die Nachweisgrenze lag unter 50 nM/l  $H_2O_2$ .

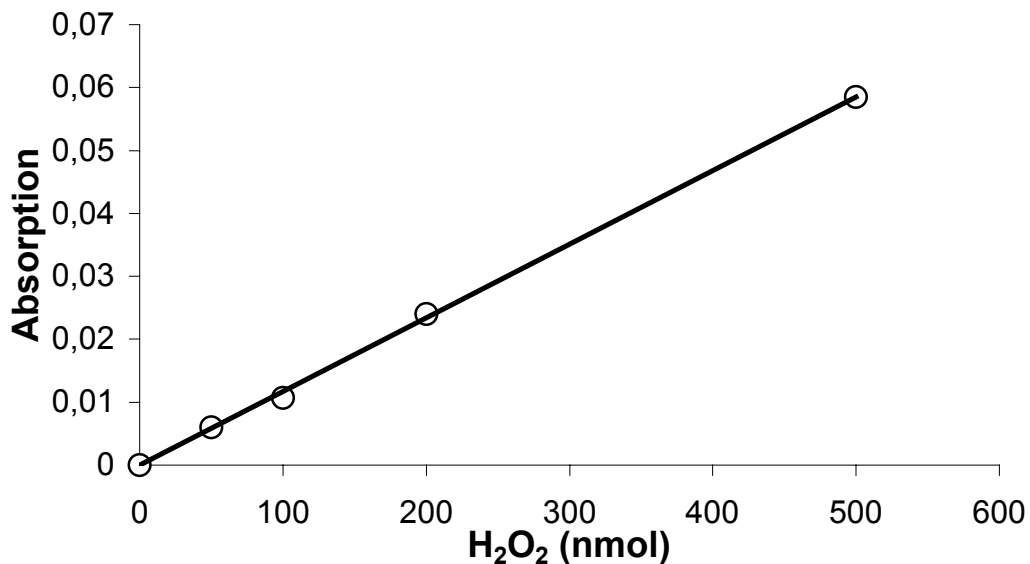


Abb. 9: Kalibrierung mit  $H_2O_2$  Standardlösungen in Standardmedium ( $y = 0,0001x$ ;  $R = 0,9993$ )

Der photometrische Test ist über einen weiten Konzentrationsbereich linear und kann angeblich auf alle Wasserproben übertragen werden (Bader *et al.* 1988).

## **(B) Material und Methoden**

---

### Phosphatpuffer

Dinatriumhydrogenphosphat	0,5 M
Natriumdihydrogenphosphat	0,5 M

### DPD-Reagenz

Schwefelsäure	0,1 N
n,n-Diethyl-p-phenylen-diamin (Sigma, Taufkirchen) 0,1 g/10ml	

### POD-Reagenz

Meerrettich Peroxidase (Roche, Mannheim)	1 mg/ml
--	---------

### Schwefelsäure-Lösung

Schwefelsäure	1 N
---------------	-----

### Natriumsulfit-Lösung

Natriumsulfit	48 mM
---------------	-------

Im Unterschied zur Methode von Bader et al. (1989) wurden die Proben nicht filtriert sondern zentrifugiert. Dazu wurden 50 ml Kultur entnommen und bei  $3000 \times g$  für 5 min bei  $0^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert (Minifuge GL, Schwenkrotor, Heraeus, Osterode). Der Überstand wurde mit Glaspipetten zu je 12 ml in vier Szintillationsgefäße pipettiert. Zu drei Proben wurde je 3 ml Puffer, 20  $\mu\text{l}$  DPD-Reagenz und 20  $\mu\text{l}$  POD-Reagenz gegeben. Die Lösung wurde gut durchmischt, 30 sek inkubiert, in die Küvette umgefüllt und gemessen. Die vierte Probe wurde zur Bestimmung des Nullwertes verwendet. Dazu wurde die Probe mit 20  $\mu\text{l}$  Schwefelsäure-Lösung angesäuert und 20  $\mu\text{l}$  Natriumsulfit-Lösung hinzugefügt. Danach wurde die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -reduzierte Probe wie beschrieben gemessen.

Der Test wird durch die Anwesenheit größerer Mengen gelöster organischer Substanz beeinträchtigt (Fukushima und Tatsumi 1994). Exudate der Bakterien und Diatomeen führten zu einer Herabsetzung der Signals des DPD-Radikalkations (Fukushima und Tatsumi 1994).

Eine Reduktion des gelösten organischen Materials über mit Sephadex A25 Ionenaustauscher beladenen Säulen wäre zu aufwändig gewesen. Die Reduzierung des DPD-Signals ließ sich umgehen, indem die verwendeten Kulturen einen Tag vor Versuchsbeginn gewaschen wurden (Abschnitt 1.1), um die gelöste organische Substanz

zu entfernen. Kalibrierungen mit internen Wasserstoffperoxid-Standards zeigten danach keine Beeinträchtigung an, sodass die Vergleichbarkeit zwischen den Proben gewährleistet war.

## **4.2 Chlorophyllbestimmung**

Der Chlorophyllgehalt bezogen auf Biomasse von pflanzlichen Organismen wird als Maß für den physiologischen Status verwendet. Die Bestimmung der Konzentrationen von Chlorophyll a (Chl a) sowie Chlorophyll c<sub>1</sub> und c<sub>2</sub> (Chl c<sub>1</sub>, c<sub>2</sub>) erfolgte nach der Methode vom Jeffrey und Humphrey (1975). Diese Methode ist speziell für Diatomeen und andere Mikroalgen entwickelt worden.

10 ml Algenkultur wurden über einen GF/C-Filter (Durchmesser 47 mm, Whatman International Ltd., Maidstone, UK) abfiltriert, in 10 ml Polypropylen-Röhrchen (Greiner, Solingen) überführt und bis zur Analyse im Dunkeln bei -20°C gelagert. Zu dem Filter wurden Glasperlen mit einem Durchmesser von 2 und 4 mm gegeben. Nach Zugabe von 5 ml 90 % Aceton wurden die Algen in einer Zelmühle (Vibrogen-Zelmühle Vi, Eden Bühler, Tübingen) mit beigelegten Glasperlen von 2 und 4 mm Durchmesser für 3 min zerkleinert. Daraufhin wurden die Röhrchen bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Messung erfolgte photometrisch in Makroküvetten mit einem Spektralphotometer (UV-160A, Shimadzu, Kyoto, Japan).

Die Konzentrationen von Chl a wurden nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Chl a } [\mu\text{g/ml}]: \quad 11,47 \times E_{664-750} - 0,4 \times E_{630-750}$$

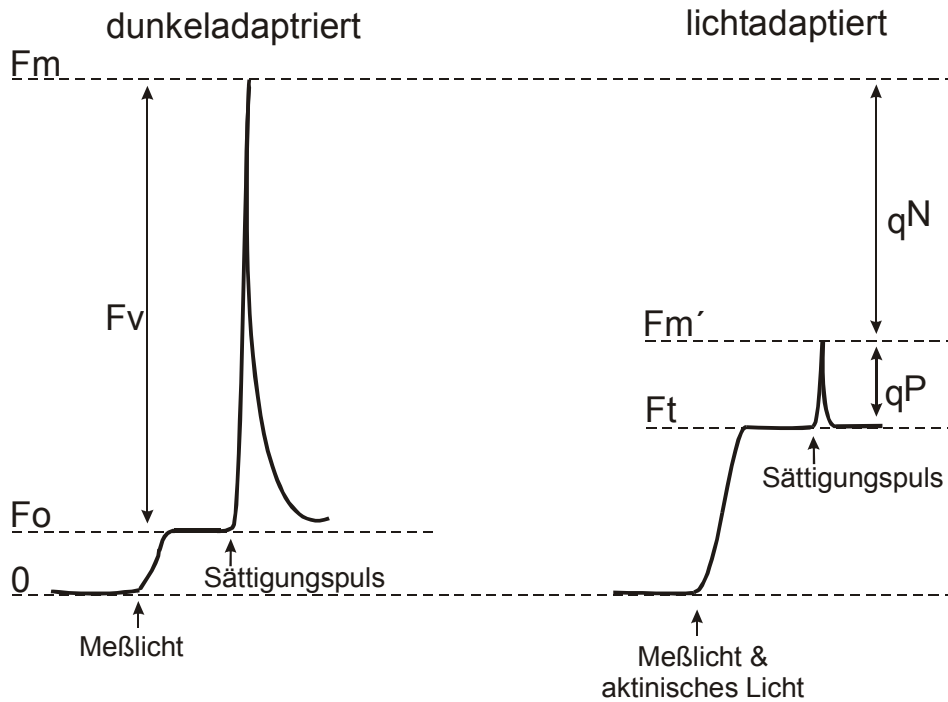
## **4.3 Messung der Chlorophyllfluoreszenz (Pulse Amplitude Modulation, PAM)**

Die Chlorophyllfluoreszenz ist ein Indikator für die photosynthetische Energieumwandlung in Pflanzen, Algen und Bakterien. Die Energie eines angeregten Chlorophyllmoleküls kann entweder in photochemische Energie umgewandelt werden oder in Form von Fluoreszenz bzw. Wärme abgegeben werden (Schreiber 1983). Mit Hilfe von PAM-Fluorometern kann der Anteil an Energie, die als Fluoreszenz abgegeben wird, bestimmt werden. Die Wärmedissipation der Photosynthese ist konstant und wird mit dem Wert 1 angegeben (Schreiber *et al.* 1994). Über diese Konstante und dem gemessenen Fluoreszenzwert kann auf den Anteil der photochemisch genutzten Energie (photochemical quenching) geschlossen werden und ist ein Indikator für die Effizienz der Photosynthese.

Für die Bestimmung der photochemischen Auslöschung („photochemical quenching“) werden verschiedene Parameter gemessen. Die Grundfluoreszenz F<sub>0</sub> (Abb. 10) wird



ermittelt, wenn die Pflanze dunkeladaptiert ist und alle Reaktionszentren der Photosysteme (PS) oxidiert (offen) sind. Die Bestimmung von  $F_0$  erfolgt bei einem Messlicht geringer Intensität, so dass in den PS keine Ladungstrennung induziert wird. Durch Aussendung eines kurzen, starken Sättigungspuls kommt es zu maximaler Ladungstrennung und alle PS liegen reduziert vor. Dadurch wird die maximale Fluoreszenz ( $F_m$ ) emittiert (Abb. 10).



**Abbildung 10: Schematische Darstellung der Fluoreszenzparameter Grundfluoreszenz ( $F_0$ ), variable Fluoreszenz ( $F_v$ ), maximale Fluoreszenz ( $F_m$ ), maximale Fluoreszenz bei lichtadaptiertem Zustand ( $F_m'$ ), momentane Fluoreszenz ( $F_t$ ), photochemische Löschung (photochemical quenching,  $q_P$ ) und nicht photochemische Löschung (non-photochemical quenching,  $q_N$ ) (Bischof 1996).**

Die Relation zwischen maximaler- und Grundfluoreszenz ( $F_v/F_m$ ) gilt als Indikator für die Effizienz der Photosynthese einer dunkeladaptierten Pflanze. Sie gibt an, mit welcher relativen Ausbeute die Anregungsenergie von den Antennenkomplexen in die Reaktionszentren des PS II übertragen werden (Schreiber *et al.* 1994).

Bei zusätzlicher Bestrahlung der Proben mit aktinischem Licht (Lichtadaption) wird die momentane Fluoreszenz ( $F_t$ ) bestimmt. Nach einem Sättigungspuls kann auch hier die maximale Fluoreszenz ( $F_m'$ ) ermittelt werden. Mit Hilfe dieser Daten kann die relative Quantenausbeute der Photosynthese lichtadaptierter Organismen berechnet werden. Sie wird als Yield ( $Y=(F_m'-F_t)/F_m$ ) angegeben.

Die Messung der Fluoreszenzdaten der axenischen sowie der Mischkultur von *A. kufferathii* wurde mit dem WATER-PAM der Firma Walz (Effeltrich) durchgeführt. Für die Messungen mussten die Kulturen stark verdünnt werden. Die Messküvette enthielt 4

ml des Mediums der jeweiligen experimentellen Ansätze verwendet wurde. Von den Kulturen wurden 20 - 100 µl hinzugefügt. Das aktinische Licht wurde auf Stufe 3 ( $37 \mu\text{M}$  Photonen  $\times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ ) eingestellt und entsprach somit den Standardkulturbedingungen. Für die Bestimmung von Fv/Fm wurden Unterproben der Versuchskulturen vor der Messung für 30 min abgedunkelt (Rijstenbil 2003).

#### **4.4 Bestimmung von Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP)**

Die Messung von Dimethylsulfoniumpropionat erfolgte indirekt (Steinke *et al.* 1998) über die Aufspaltung von DMSP durch Natriumhydroxid zu Acrylsäure und Dimethylsulfid (DMS). Das Verhältnis von Acrylsäure zu DMS beträgt 1:1 (Challenger 1959). DMS reichert sich in der Gasphase der Probengefäße an (Kawabe *et al.* 1989) und kann gaschromatographisch bestimmt werden.

In die gasdichten Probengefäße wurden 3 ml einer 10,4 M Natriumhydroxid-Lösung vorgelegt, 2 ml der Versuchskultur hinzugefügt und über Nacht dunkel bei Raumtemperatur inkubiert.

Mit einer gasdichten Spritze wurden 50 - 500 µl aus dem Gasraum der Probengefäße entnommen und in einen Gaschromatographen injiziert.

Gaschromatograph:	CG9A (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Säule:	Chromosil 2,4 m (Supelco, Sigma-Aldrich, München)
Ofentemperatur:	60°C
Injektortemperatur:	150°C
Detektortemperatur:	175°C
Trägergas:	Stickstoff
Flussrate:	60 ml/min
Brenngas:	Wasserstoff
Detektor:	UV-1201V (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Integrator:	C-R3A (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Die Retentionszeit betrug 0,9 min. Die Berechnung der DMSP-Konzentration erfolgte über die Kalibrierungen mit Standardlösungen. Diese wurden aus DMSP hergestellt, das in der Arbeitsgruppe Meeresbotanik nach Steinke *et al.* (1998) synthetisiert wurde.

#### **4.5 Nährstoffbestimmung**

Die Nährstoffe Nitrat, Nitrit, Ammonium, Phosphat und Silikat wurden in einem Autoanalyzer (SAN<sup>plus</sup> System, Skalar, Breda, Niederlande) am Zentrum für Marine Tropenökologie (ZMT, Bremen) bestimmt.

***Nitrat- und Nitritbestimmung:***

Inidazol-Puffer pH 7,5

Imidazol 0,25 M

Farbreagenz

85 % Phosphorsäure 50 ml

Sulfanilamid 60 mM

N-(1-Naphtyl)ethyldiamin -

Dihydrochlorid 0,2 mM

**Ammonium-Bestimmung**

Pufferlösung pH 5,0

KaliumNartiumtartrat-4-hydrat

(Riedel de Haën) 116 mM

*tri*-Natriumcitrat-2-hydrat (Riedel de Haën) 80 mM

EDTA (Titriplex III) 1,4 mM

99 % Schwefelsäure 1 ml/l

30 % Brij 1 ml/l

Phenol-Reagenz

Phenol 12,2 g

20 % Natriumhydroxid 26,5 ml

Milli-Q-Wasser (Millipore) 20 ml

2,5 % Natriumhypochlorid-Lösung

Nitroprussid-Natrium-Reagenz

Nitroprussid-Natrium Dihydrat 1,6 mM

**Phosphatbestimmung**

Arbeitslösungen:

Schwefelsäure 4,9 N

Ammoniummolybdat (Riedel de Haën) 32,4 mM

Ascorbinsäure 100 mM

Kaliumantimon(III)-oxid-tartrat 7,5 mM

**Mix-Reagenz**

4,9 N Schwefelsäure	100 ml
Ammoniummolybdat-Lösung	30 ml
Ascorbinsäure-Lösung	60 ml
Kaliumantimon(III)-oxid-tartrat-Lösung	10 ml

Alle unterstrichenen Reagenzien wurden an die entsprechenden Kanäle des Autoanalyzers angeschlossen. Der Phosphatkanal wurde mit einem Wasserbad bei 50°C temperiert. Die Proben für den NO<sub>x</sub>-Kanal (Nitrat und Nitrit) durchliefen vor Zuführung des Farbreagenzes eine mit 10 g granuliertem Cadmium befüllte Glassäule (Reduktor). Die Detektion erfolgte photometrisch.

**Tabelle 14: Aufstellung der analysierten Nährstoffe mit den einzelnen Wellenlängen, bei denen die photometrische Detektion erfolgte.**

Parameter	Wellenlänge
Nitrat und Nitrit	540 nm
Nitrit	540 nm
Phosphat	660 nm
Ammonium	630 nm
Silikat	880 nm

Die Werte wurden an einen angeschlossenen Computer übermittelt und über die Skalar-Software ausgewertet. Die Berechnung der Probenkonzentration erfolgte über Kalibrierungen mit Standardlösungen.

## **5 Isolationsversuche**

### **5.1 Isolierung von Bakterien aus der Mischkultur**

Um aus der Mischkultur gezielt Bakterien zu isolieren, wurden basierend auf dem Standardmedium selektive Medien mit verschiedenen Kohlenstoffquellen hergestellt. Das Grundmedium enthielt kein Natriumhydrogenkarbonat und kein Glycylglycin. Die Zusammensetzung der einzelnen Isolationsmedien kann aus Tabelle 5 entnommen werden.

2 ml der Mischkultur mit einer Dichte von 50.000 Algenzellen / ml wurden für 1 min. in einem Ultraschallbad (Bandelin Sonorex Super RK, Berlin) behandelt um die epiphytischen Bakterien von der Alge zu lösen. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 0°C für 2 min. bei 3000 × g (Biofuge fresco, Heraeus, Osterode). Der Überstand wurde 1:5, 1:50, 1:500 und unverdünnt auf die selektiven Festmedien aufgetragen.

Die Isolationsversuche wurden in Petrischalen im 0°C Kühlraum durchgeführt. Die Identifizierung der Isolate erfolgte zunächst über Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (Abschnitt 2.1.1). Interessante Isolate wurden sequenziert (Abschnitt 2.5).

## **6 Physiologische Experimente**

### **6.1 Wachstumsversuche**

Für Experimente unter Standardbedingungen wurden bakterienfreie und bakterienbehaftete Kulturen von *A. kufferathii* aus gewaschenen Stammkulturen zu 20.000 Zellen/ml in 300 ml Erlenmeyerkolben angesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 40  $\mu\text{mol Photonen} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ , 0°C, (Standardmedium) in modifizierten Tiefkühltruhen (Comfort Plus, Siemens).

Die gleichen Bedingungen galten für den Versuch zum Einfluss von Glycin und Glycylglycin auf das Wachstum von *A. kufferathii* vor. Dabei wurden den Versuchskulturen entweder 0,2 g/l Glycylglycin oder 0,2 g/l Glycin zugefügt

Für die Untersuchung zur Wirkung von Katalase auf das Wachstum von *A. kufferathii* wurden den Versuchskulturen täglich 20  $\mu\text{g}$  Katalase aus Rinderleber (Sigma, Taufkirchen) hinzugefügt. Die Zelldichte der Kulturen wurde mit dem Coulter Counter bestimmt (Abschnitt 1.7).

### **6.2 Stoffwechselleistungen der Bakterien**

#### **6.2.1 Abbau von Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP)**

Kulturen von *Sulfitobacter* sp., *Colwellia* sp. und *Cellulophaga* sp. wurden in Standardmedium ohne Glycylglycin und Natriumhydrogenkarbonat überführt. Als Kohlenstoffquelle wurde dem Medium 10  $\mu\text{mol/l}$  Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP) hinzugefügt. Die Kultivierung erfolgte in 15 ml Glasröhrchen mit Septum-Verschluss. Die Kulturen wurden bei 0°C mechanisch bewegt (SM25, Edmund Bühler Laborgrätebau, Tübingen).

Direkt nach der Zugabe des DMSP wurden Proben entnommen. Weitere Beprobungen fanden nach sechs und nach 11 Tagen statt. Die Konzentration an DMSP in den Proben wurde wie in Abschnitt 4.4 bestimmt. Das Wachstum der Bakterien wurde photometrisch verfolgt (UV1201V Spektralphotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan).

## **6.2.2 BIOLOG**

Die Substratnutzung der isolierten Bakterien wurde mit Hilfe von Testplatten (GN MicroPlate™, Oxoid, Wesel) untersucht. Auf diese Weise wurden 95 verschiedene Kohlenstoffquellen auf ihre Nutzbarkeit durch die isolierten Bakterien überprüft (Tabelle 23).

Flüssigkulturen der isolierten Bakterien wurden bei  $3000 \times g$  und  $0^\circ\text{C}$  für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in einer WIMEX-Lösung (40 g/l, 34 PSU) dreimal gewaschen, um das Bakterienmedium zu entfernen. Anschließend wurden die Bakteriensuspensionen in die Testplatten überführt und für 3 bis 5 Wochen bei  $0^\circ\text{C}$  und  $8^\circ\text{C}$  inkubiert.

Die Nutzung eines Substrates wurde durch Violettfärbung des Inhaltes der entsprechenden Reaktionskammer angezeigt.

## **6.3 Reaktionen auf oxidativen Stress**

Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Kultivierung unter Standardbedingungen ( $0^\circ\text{C}$ ,  $40 \mu\text{mol Photonen} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 12 h Licht / 12 h Dunkel, Standardmedium). Die Zelldichte der Kulturen wurde mit dem Coulter Counter bestimmt. Die Messungen des Chlorophyllgehaltes und der Chlorophyllfluoreszenz erfolgten wie in den Abschnitten 4.2 und 4.3 beschrieben.

### **6.3.1 Abbau von extern zugefügtem Wasserstoffperoxid**

Bakterienbehaftete und axenische Kulturen von *A. kufferathii* wurde extern Wasserstoffperoxid hinzugefügt. Die Kulturen wurden am Versuchstag mit einer Dichte von 50.000 Algenzellen/ml in 1 l Erlenmeyerkolben mit je 600 ml aus gewaschenen (Abschnitt 1.1) Stammkulturen angesetzt. Die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration im Medium wurde vor der Zugabe von externem Wasserstoffperoxid mit der in Abschnitt 4.1 dargestellten Methode bestimmt. Die Erhöhung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration um 500 nmol erfolgte durch Zufügen von 300  $\mu\text{l}$  einer  $1 \mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -Stammlösung. Dies entsprach einer Dosiserhöhung von 6,5 pmol pro Algenzelle. Der Abbau von  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurde über einen Zeitraum von 24 h verfolgt.

### **6.3.2 Induktion von oxidativem Stress durch hohe Lichtintensität**

Bakterienbehaftete und axenische Kulturen von *A. kufferathii* wurden wie in Abschnitt 6.3.1 beschrieben angesetzt. Die Kultivierung erfolgte in modifizierten Tiefkühltruhen (Comfort Plus, Siemens) bei Standardbedingungen und einer erhöhten Lichtintensität von  $80 \mu\text{mol Photonen} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ .

Die ersten Probennahmen zur Bestimmung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration begann 1 h vor Beginn der Lichtphase. Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration wurde über 15 h mit der in Abschnitt 4.1 beschriebenen photometrischen Methode verfolgt.

### **6.3.3 Einfluss von induziertem oxidativem Stress**

Bakterienfreie und bakterienbehaftete Kulturen von *A. kufferathii* wurden in 300 ml Erlenmeyerkolben mit einer Dichte von 20.000 Zellen/ml angesetzt. Den Kulturen wurde extern Wasserstoffperoxid in Konzentrationen von 0,5 µmol/l, 1 µmol/l und 2 µmol/l hinzugefügt.

### **6.4 Reaktionen auf hyper- und hypoosmotischem Stress**

Die Kulturen wurden am Versuchstag mit einer Dichte von 50.000 Algenzellen/ml in 1 l Erlenmeyerkolben mit je 600 ml aus zuvor gewaschenen (Abschnitt 1.1) Stammkulturen angesetzt. Die Versuchsmedien wurden mit WIMEX auf die gewünschten Salzgehalte eingestellt (5, 25, 70, 80, und 90 PSU).

### **6.5 Reaktionen auf Temperatur-Stress**

Aus bakterienfreien und bakterienbehafteten Stammkulturen wurde nach drei Waschsritten 200 ml Versuchskulturen mit einer Dichte von 150.000 Algenzellen/ml angesetzt. Diese wurden zur Kontrolle bei 0°C und zur Untersuchung des Effektes von hyperthermischem Stress bei 8°C und 15°C kultiviert.

### **6.6 Nährstoffentwicklung in bakterienfreien und bakterienbehafteten Kulturen von *Amphiprora kufferathii*.**

Aus bakterienfreien und bakterienbehafteten Stammkulturen wurde nach drei Waschsritten 200 ml Versuchskulturen zu 90.000 Algenzellen/ml angesetzt. Die Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen im 0°C-Raum. Die Kontrollansätze wurden im Vollmedium kultiviert (Abschnitt 1.3). Die Kultivierung der Versuchsansätze erfolgte in Stickstoff, Phosphat und Silikat-Mangelmedien (Abschnitt 1.3). Das Wachstum der Kulturen wurde mit dem Coulter Counter verfolgt (Abschnitt 1.7). Die Konzentrationen von Nitrat, Nitrit, Ammonium und Silikat wurden bestimmt wie in Abschnitt 4.5 beschrieben.

## 7 Elektronenmikroskopische Methoden

### 7.1 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Bakterienbehaftete Kulturen wurden für 2 h in 4 % Glutaraldehyd (Plano, Wetzlar) in Cacodylatpuffer (pH 7) auf Eis fixiert. Glutaraldehyd reagiert mit den Proteinen der Probe und stellt Quervernetzungen her (Robinson *et al.* 1985). Daraufhin erfolgte eine Nachfixierung mit 4 % Osmiumtetroxid (Plano, Wetzlar) in Cacodylatpuffer (pH 7) für 1 h auf Eis. Osmiumtetroxid ( $\text{OsO}_4$ ) reagiert hauptsächlich mit Lipiden. Es kommt zur Bildung von Glycolosmaten. Aufgrund des Metallatoms ist  $\text{OsO}_4$  elektronendicht und besitzt neben der fixierenden auch eine kontrastgebende Wirkung (Robinson *et al.* 1985). Es erfolgte eine Entwässerung mit Ethanol und anschließender Einbettung der Proben in LR-White-Harz (medium grade, Plano, Wetzlar).

**Tabelle 15: Programm für die Entwässerung der Proben mit Ethanol und anschließender Einbettung in LR-White-Harz.**

Lösung	Zeit
10 % Ethanol	30 min
20 % Ethanol	30 min
40 % Ethanol	30 min
60 % Ethanol	30 min
80 % Ethanol	30 min
96 % Ethanol	30 min
LR-White : 96 % Ethanol     1 : 2	1 h
LR-White : 96 % Ethanol     1 : 1	1 h
LR-White : 96 % Ethanol     2 : 1	12 h
LR-White (konzentriert)	12 h
LR-White (konzentriert)	12 h

Nach der Einbettung wurden die Proben in BEEM<sup>®</sup> Kapseln (Plano, Wetzlar ) überführt und das Harz über Nacht bei 60°C ausgehärtet. Im Anschluß wurden die gehärteten Blöcke zugestimmt und mit einem Ultramikrotom unter Verwendung selbst hergestellter Glasmesser auf eine Stärke von ca. 0,7  $\mu\text{m}$  geschnitten. Die Schnitte wurden auf Kupfernetzchen (150 Maschen, Plano, Wetzlar) übertragen.

Um den Kontrast der Proben zu erhöhen, erfolgte eine Nachkontrastierung nach Reynolds (1963) mit 2 % Uranylacetat und 2,6 % Bleicitrat. Dazu wurden die Proben auf den Netzchen für 30 min bei Raumtemperatur mit der Objektseite auf einen Tropfen der Uranylacetat-Lösung gelegt. Uranylacetat reagiert mit Membranstrukturen, DNS und Proteinen und führt zu einer weiteren Erhöhung des Kontrastes (Robinson *et al.* 1985).



Nachdem die Proben sorgfältig mit bidestilliertem Wasser (Bidest) gespült wurden, erfolgte eine Inkubation für 30 min mit der Objektseite auf einem Bleicitrat-Tropfen. Dabei ist auf eine Kohlendioxid-reduzierte Atmosphäre zu achten, da sich ansonsten Bleicarbonatniederschläge bilden, die sich auf dem Objekt absetzen. Die Beseitigung des atmosphärischen CO<sub>2</sub> wird durch die Bleicitratinkubation in einem verschlossenen Gefäß mit Natriumhydroxid-Plättchen erreicht (Robinson *et al.* 1985).

Anschließend erfolgte die Betrachtung der Präparate unter dem Transmissions-elektronenmikroskop (EM10, Zeiss, Jena).

### **7.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)**

Diatomeenkulturen mit anheftenden Bakterien wurden für 2 h in 2 % Glutaraldehyd in Standardmedium auf Eis fixiert. Daraufhin erfolgte ein schrittweises Waschen der Proben mit anschließender Entwässerung.

**Tabelle 16 : Waschen und Entwässern der Proben für die Rasterelektronenmikroskopie.**

Lösung		Zeit
Bidest : Standardmedium	1 : 2	10 min
Bidest : Standardmedium	1 : 1	10 min
Bidest : Standardmedium	2 : 1	10 min
Bidest		10 min
Aceton 5 %		10 min
Aceton 10 %		10 min
Aceton 20 %		10 min
Aceton 30 %		10 min
Aceton 50 %		10 min
Aceton 70 %		10 min
Aceton 90 %		10 min
Aceton 100 %		15 min
Aceton 100 %		15 min

Im Anschluss an die Entwässerung mit Aceton erfolgte die Trocknung der Proben in der sogenannten Kritischen Punkt Trocknung. Bei diesem Verfahren wird in einer Druckkammer (CPD 030, Baltec, Liechtenstein) das Entwässerungsmittel Aceton gegen ein flüssiges Übergangsmedium (hier Kohlendioxid) ausgetauscht. Nach Abschluss der Substitution wird die Kammer erhitzt, bis das CO<sub>2</sub> den Kritischen Punkt erreicht und es in flüssiger- wie in Gasform die gleiche Dichte aufweist. Das CO<sub>2</sub> wird dann als Gas aus der Kammer abgelassen.

Es erfolgte die Fixierung der Proben auf Objektträgern für die Rasterelektronenmikroskopie (Plano) mit anschließender Goldbeschichtung (Stärke: 7 nm) in einem Sputter (Lineon SCD 040, Balzers, Bingen). Die Präparate wurden in einem Rasterelektronen-mikroskop (ISI 100B, Zeiss, Jena) untersucht.

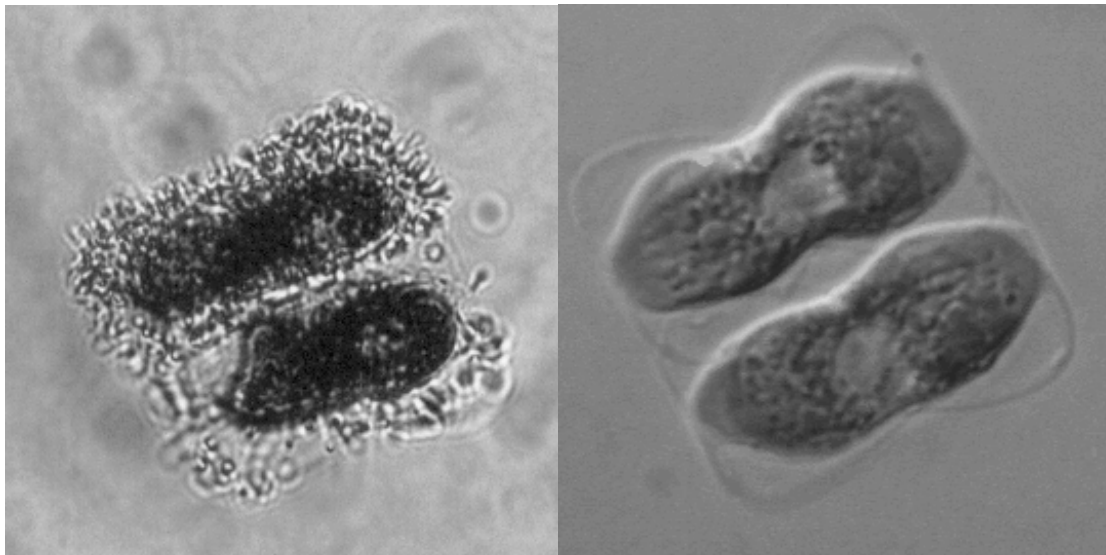
## C Ergebnisse

### 1 Kulturversuche

#### 1.1 Etablierung einer axenischen Algenkultur

Eine wichtige Voraussetzung für vergleichende Studien war die Etablierung einer axenischen Kultur von *A. kufferathii*. Nur durch den Vergleich der Reaktionen bakterienfreier und bakterienbehafteter Kulturen auf unterschiedliche Stressoren können detaillierte Aussagen über den Einfluss der epiphytischen Bakterien auf die Diatomee getroffen werden.

Axenische Algenkulturen können nach verschiedenen Methoden hergestellt werden, zum einen die Reduzierung von Bakterien durch mechanische Verfahren, wie Dichtegradientenzentrifugation oder dem Ausplattieren auf Festmedien, zum anderen die Behandlung der Mischkultur mit Antibiotika.



**Abbildung 11: Lichtmikroskopische Aufnahme von bakterienbehafteten Zellen (links, Färbung mit Lugolscher Lösung, Faktor 600) und bakterienfreien Zellen von *A. kufferathii* (rechts, ungefärbt, Eintauchobjektiv) nach Behandlung mit Ampicillin (Faktor 1000).**

*A. kufferathii* ist für die Kultivierung auf Festmedien nicht geeignet. Wenige Tage nach dem Überimpfen auf Standard-Agarmedium kam es zum Absterben der Diatomee. Auch die Zentrifugation durch 100% Percoll führte nicht zur Reduzierung der Bakterien und war für die Alge letal.

Die Anwendung der Antibiotika Streptomycin und Chloramphenicol (Abschnitt B 1.4) führten zum Absterben der Diatomee bei Konzentrationen über 1,25 mg/ml bzw. 0,5 mg/ml. Penicillin brachte in Dosen, die für die Alge nicht letal waren (2,5 - 15 mg/ml), keinen Erfolg.

Nach Behandlung der Mischkultur mit dem Antibiotikum Ampicillin (Abschnitt B 1.4) ist es gelungen, eine axenische Kultur von *Amphiprora kufferathii* zu gewinnen. Die

Überprüfung mittels DAPI-Färbung (Abschnitt B 2.1) ergab keine weitere Bakterienkontamination der Reinkultur. Somit stand eine bakterienfreie Kultur für die weiteren physiologischen und biochemischen Untersuchungen zur Verfügung.

## 2 Struktur der Mischkultur und Identifizierung der Bakterien

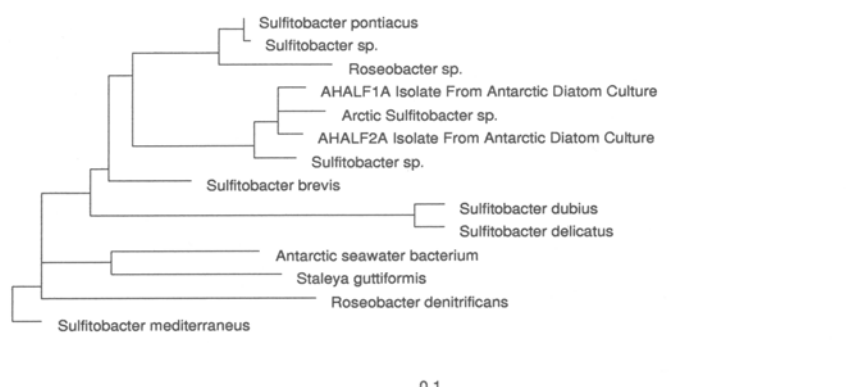
Um abzuschätzen, ob die Mischkultur als Modellsystem für die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen den epiphytischen Bakterien und *A. kufferathii* herangezogen werden kann, mussten die Bakterien zunächst identifiziert werden. Durch die Identifizierung der Bakterien können Aussagen darüber getroffen werden, ob sich die Mischkultur im naturnahen Zustand befindet oder ob sich durch die lange Kulturhaltung im Labor ein artifizielles System etabliert hat.

Zur Identifizierung der Bakterien wurden sowohl klassisch mikrobiologische Techniken sowie molekularbiologische Verfahren angewendet.

### 2.1 Isolierung von Bakterien aus der Mischkultur

Zur Identifizierung und zur Untersuchung des Oxidationsschutzes sollten die Bakterien der Mischkultur isoliert werden. Hierzu wurden Verdünnungen der Mischkultur auf Festmedium ausplattiert (Abschnitt B 1.5).

Aus den Isolationsversuchen (Abschnitt B 5) wurden drei Isolate gewonnen. Diese gingen aus den 1:5 und 1:50 Verdünnungen hervor. Die Identifizierung erfolgte über FISH und über Sequenzierungen. Untersuchungen mit FISH-Sonden ergaben Anreicherungen von Alphaproteobakterien auf Glycylglycin, Fleischextrakt und *A. kufferathii* (AHALF1A und AHALF2A). Es folgte die Sequenzierung der 16S-rRNS Gene mit anschließender bioinformatischer Analyse.



**Abbildung 12: Phylogenetische Position der aus der Mischkultur gewonnenen Isolate innerhalb der Klasse Alphaproteobacteria (Maximum Likelihood). Die unten angegebene Distanz entspricht 10% Unterschied in der Nucleotidsequenz.**

## (C) Ergebnisse

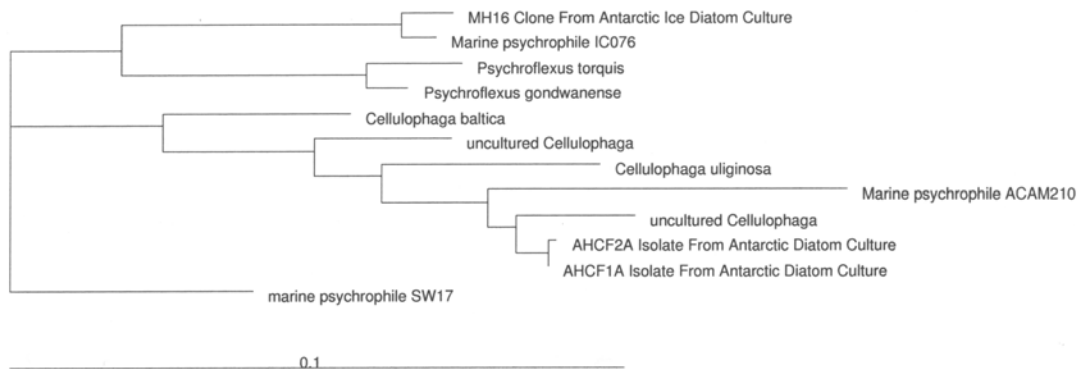
Die Isolate aus der Klasse der Alphaproteobakterien sind von dem Programm „Arb“ in die Familie der *Rhodobacteriaceae* in verwandtschaftlicher Nähe zur Gattung *Sulfitobacter* eingeordnet worden.

Der Abgleich mit der EBI-Datenbank über BLAST-Suche führte ebenfalls die Gattung *Sulfitobacter* als nächsten Verwandten an. Der Grad der Verwandtschaft ist in Tabelle 17 angegeben.

**Tabelle 17: Übereinstimmung der Sequenzen der Isolate innerhalb der Alphaproteobakterien und ihrer nächsten Verwandten.**

	AHALF1A	AHALF2A	Arctic <i>Sulfitobacter</i> sp.	<i>Sulfitobacter</i> sp.
AHALF1A		99,43%	99,09%	98,9%
AHALF2A	99,43%		99,14%	98,95%
Arctic <i>Sulfitobacter</i> sp.	99,09%	99,14%		98,66%
<i>Sulfitobacter</i> sp.	98,9%	98,95%	98,66%	

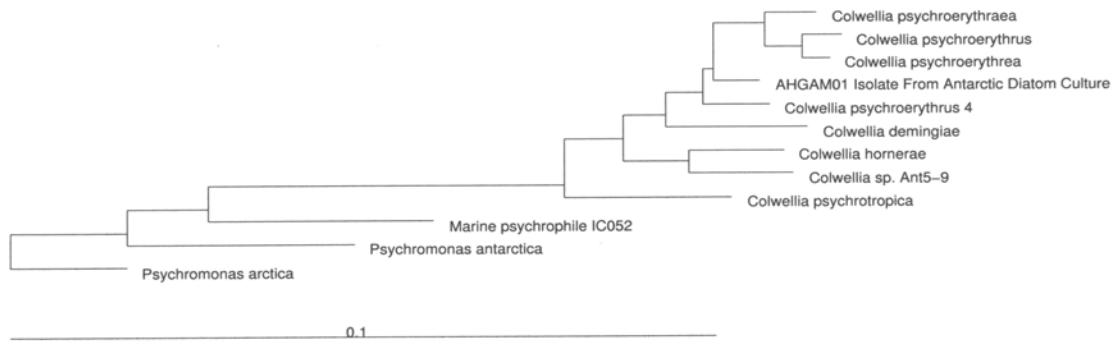
Auf mit Pepton angereichertem Festmedium wurden Vertreter der Bacterioidetes-Gruppe (AHCF1A und AHCF2A) isoliert. Auch hier erfolgte die Identifizierung über FISH und Sequenzierungen.



**Abbildung 13: Phylogenetische Position der aus der Mischkultur gewonnenen Isolate innerhalb der Bacterioidetes-Gruppe (Maximum Likelihood). Die unten angegebene Distanz entspricht 10% Unterschied in der Nucleotidsequenz.**

Die phylogenetische Analyse gab die Position der Isolate mit der Gattung *Cellulophaga* innerhalb der Familie *Flavobacteriaceae* an (Abb. 13). Die Überprüfung dieses Ergebnisses über eine BLAST-Suche in der EBI-Datenbank erbrachte das selbe Resultat.

Gemäß der FISH-Analyse und der Sequenzierungen wurden auf Festmedium mit Hefeextrakt Gammaproteobakterien (AHGAM01) angereichert.



**Abbildung 14: Phylogenetische Position der aus der Mischkultur gewonnenen Isolate innerhalb der Gammaproteobakterien (Maximum Likelihood). Die unten angegebene Distanz entspricht 10% Unterschied in der Nucleotidsequenz.**

Die isolierten Gammaproteobakterien gehören zur Gattung *Colwellia* innerhalb der Familie der *Alteromonaceae*. *Colwellia psychoerythrus* wurde als nächster Verwandter des Isolates AHGAM01 angegeben (Abb 14). Die Überprüfung mit der EBI-Datenbank erbrachte das selbe Resultat.

Über Isolationsversuche wurden also aus der Mischkultur drei Bakterienarten aus drei verschiedenen Klassen angereichert werden. Nach Untersuchungen ihrer 16S-rRNS Gene wurden sie innerhalb ihrer Familien und Gattungen in der Nähe von psychrophilen und psychrotoleranten Bakterienarten eingeordnet. Diese Arten stammen offenbar noch aus der Originalprobe aus der Antarktis (1986) und wurden in der *Amphiprora kufferathii* Kultur mit kultiviert. Die Isolate AHALF1A und AHALF2A weisen die größte Sequenz-Übereinstimmung mit einer arktischen Bakterienart auf. Hierbei handelt es sich vermutlich um einen psychrophilen bzw. psychrotoleranten Vertreter der in der Antarktis noch nicht isoliert wurde.

## 2.2 Identifizierung der Bakterien über Klonierungen

Nur wenige marine Bakterien sind in Standardmedien kultivierbar. Die Abstimmung spezieller oligotropher Medien gestaltet sich im Labor oft schwierig, vor allem wenn man die genauen Bedürfnisse der gesuchten Bakterien nicht kennt. Aussagen über das Vorkommen und die Verbreitung mariner Bakterien sind über Kultivierungs- und Isolationsversuche schwierig.

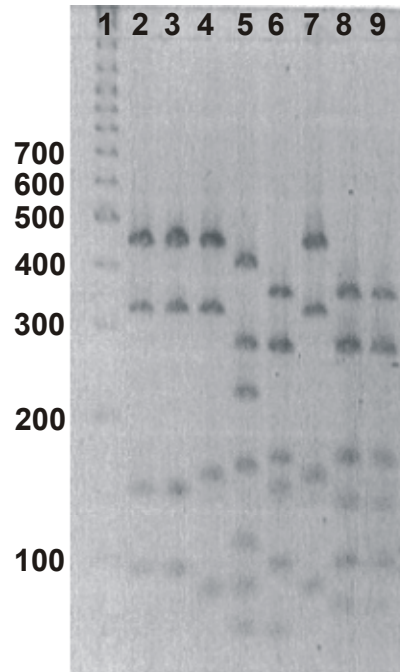
Eine Möglichkeit diese Bakterien zu erfassen, bietet die Analyse der gesamten 16S-rRNS Gene einer Umweltprobe mit anschließender Sequenzierung.

Zur kulturunabhängigen Identifizierung der epiphytischen Bakterien wurden 16S-rRNS Gene aus einer Mischkultur amplifiziert (Abschnitt B 2.2.1) und in *E. coli* kloniert

### (C) Ergebnisse

---

(Abschnitt B 2.3). Zur Reduzierung der Sequenzieransätze wurde nach der Amplifizierung der in die *E. coli*-Plasmide insertierten DNS eine Restriktionsverdauanalyse (ARDRA) durchgeführt (Abschnitt B 2.4).

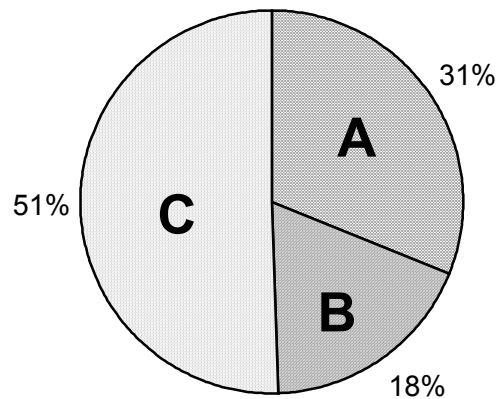


**Abbildung 15: Gelelektrophoretische Auftrennung nach Restriktionsverdau am Beispiel von 8 Klonierungsansätzen ( 3% Agarose in TBE-Puffer, 120 Volt, 3 h). Weitere Erklärung imText.**

Innerhalb der 96 analysierten Klone brachte die ARDRA drei unterschiedliche Bandenmuster hervor. Die Bahnen 6, 8 und 9 (Abb. 15) sind der Gruppe A zugeordnet. Das Bandenmuster auf Bahn 5 gehört der Gruppe B an. Die Bahnen 2 bis 4 sowie 7 entsprechen einem Bandenmuster, das als Gruppe C zusammengefasst wurde. Die unterschiedlichen DNS-Fragmentgrößen in den einzelnen Gruppen sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

**Tabelle 18: Zusammenstellung der Fragmentgrößen nach der Restriktionsanalyse mit Zuordnung zur entsprechenden phylogenetischen Gruppe**

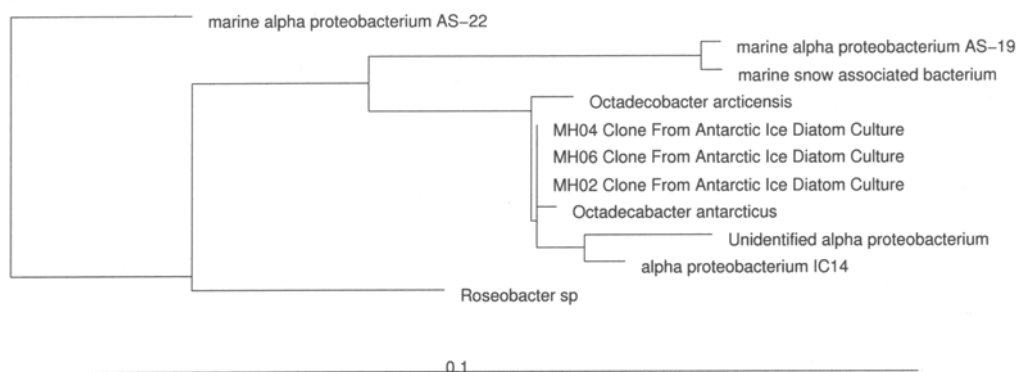
Gruppe	Fragmentgrößen kb							Zuordnung
A	415	281	221	157	108	90	74	$\alpha$ -Proteobacteria
B	352	277	164	135	98	79		Bacteroidetes
C	457	326	144	94				Organelle



**Abbildung 16:** Verteilung der ARDRA-Gruppen in 96 analysierten Klonen. A= Alphaproteobakterien (*Octadecabacter antarcticus*), B = Bacteroidetes-Gruppe (*Psychroflexus* sp.), C = Organelle (Chloroplast).

Über die Hälfte der untersuchten Klone wurden als Chloroplasten-DNS angesprochen. Den größten Anteil der Bakterien bestritten mit 33,28% die Alphaproteobakterien (Abb. 16).

Klone aus allen Gruppen wurden sequenziert (Abschnitt B 2.5). Nach der Auswertung der gewonnenen Sequenzen wurden die Ergebnisse mit bekannten Sequenzen in der EBI-Datenbank (BLAST-Suche) verglichen. Zusätzlich erfolgte eine phylogenetische Einordnung der bakteriellen Sequenzen mit dem Programm Arb (Abb. 17 und 18).

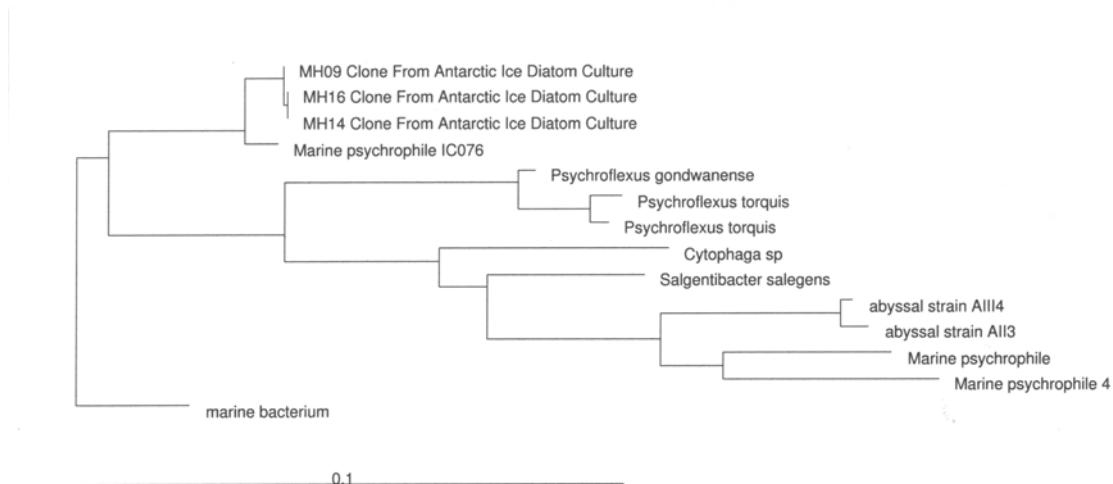


**Abbildung 17:** Phylogenetische Position der aus der Mischkultur gewonnenen Klone innerhalb der Alphaproteobakterien (Maximum Likelihood). Die unten angegebene Distanz entspricht 10% Unterschied in der Nucleotidsequenz.



## (C) Ergebnisse

Die Klone aus der Gruppe der Alphaproteobakterien wurden vom Arb-Programm phylogenetisch nahe der arktischen Spezies *Octadecabacter arcticensi* (Gosink *et al.* 1997) und den antarktischen Vertreter *Octadecabacter antarcticus* (Gosink *et al.* 1997) eingeordnet. Die stärkste verwandtschaftliche Beziehung besteht mit der antarktischen Art. Dieses Ergebnis wurde über die EBI-BLAST-Suche verifiziert.



**Abbildung 18: Phylogenetische Position der aus der Mischkultur gewonnenen Klone innerhalb der Bacteriodetes-Gruppe (Maximum Likelihood). Die unten angegebene Distanz entspricht 10% Unterschied in der Nucleotidsequenz.**

Sowohl die phylogenetische Einordnung über Arb als auch die EBI-BLAST-Suche ergaben die engste verwandtschaftliche Beziehung der gewonnenen Bacteriodetes-Klone zu dem Isolat IC076, einem in der Antarktis identifiziertem, psychrophilen Bakterium (Bowman *et al.* 1997).

Insgesamt wurden somit 5 Bakterienspezies innerhalb der Mischkultur identifiziert. Drei davon konnten isoliert werden (Tab. 19).

**Tabelle 19: Zusammenstellung der identifizierten Bakterienspezies**

Gruppe	Art (wahrscheinlich)	Lebensweise	Isolat
Alphaproteobacteria	<i>Octadecabacter antarcticus</i>	angeheftet	nein
Alphaproteobacteria	<i>Sulfitobacter</i> sp.	angeheftet	ja
Bacteriodetes	<i>Psychroflexus</i> sp.	angeheftet	nein
Bacteriodetes	<i>Cellulophaga</i> sp.	angeheftet	ja
Gammaproteobacteria	<i>Colwellia psychroerythrus</i>	freilebend	ja

Bis auf *Sulfitobacter* sp. stammen alle identifizierten Bakterien aus antarktischen Gebieten. Es wird angenommen, dass diese seit Beginn in der Kultur von *A. kufferathii*

enthalten blieben. Aufgrund dieses Ergebnis kann nun eine Aussage über die Qualität der Mischkultur als Modellsystem zur Untersuchung der Bakterien-Diatomeen-Wechselwirkung getroffen werden (Abschnitt D 1.2). Die Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse der Isolationsversuche im Vergleich zur kulturunabhängigen Klonierung werden in Abschnitt D 1.2 diskutiert.

### **2.3 Identifizierung der Bakterien über Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung**

Nach Identifizierung der Bakterien sollte ihre Verteilung in der Mischkultur untersucht werden. Die Bestimmung der Abundanzen einzelner Bakterienarten in einer Umweltprobe über Isolationsversuche und über Klonierungen sind mit Ungenauigkeiten belastet (Abschnitt D 1.2). Direkte Zählungen mit Hilfe der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungstechnik (FISH) gibt die Möglichkeit, die Verteilung einzelner Bakteriengruppen in einer Probe zu bestimmen. Diese kann bis auf Artniveau betrieben werden.

Mit FISH wurde die Mischkultur aus *A. kufferathii* und den epiphytischen sowie den freilebenden Bakterien untersucht. Dabei wurden gruppenspezifische Sonden eingesetzt, die Alpha-, Beta-, und Gammaproteobakterien sowie die Bacteroidetes-Gruppe detektieren. Als Kontrolle der FISH wurde die Eubakteriensonde Eub338 II verwendet (Abb. 19A).

Mit der Sonde ALF968 wurden in der Mischkultur Alphaproteobakterien nachgewiesen (Abb. 20A). Die spezifische Sonde ROS337 ließ eine Eingrenzung dieser Bakterien auf die Familie Rhodobacteraceae zu (Abb. 21A). Nach den Ergebnissen der Klonierung wurde die Gattung *Octadecabacter* in der Mischkultur identifiziert. Dies konnte über die von Brinkmeyer (2003) entwickelte Sonde OCT1021 mit der FISH verifiziert werden (Abb. 22A).

Freilebende Gammaproteobakterien (Abb. 23A) und Angehörige der Bacteroidetes-gruppe (Abb. 24A) waren ebenfalls in der Kultur nachzuweisen. Betaproteobakterien wurden dagegen in der Mischkultur nicht gefunden.

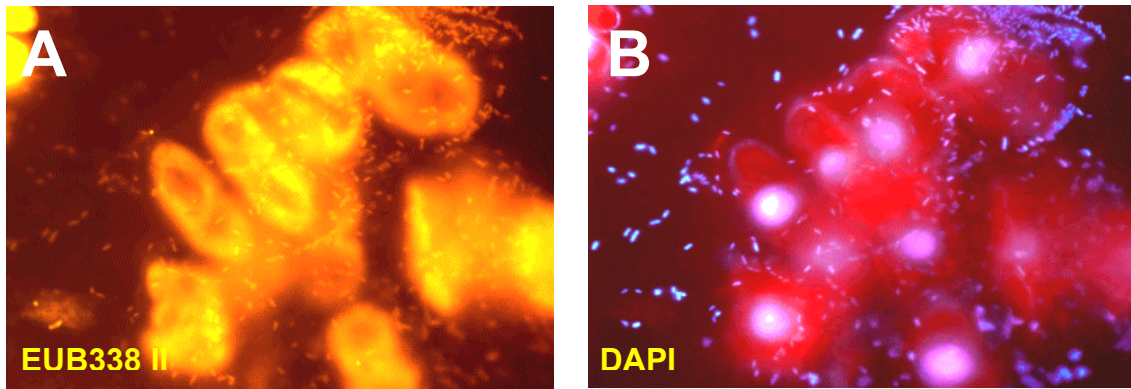


Abbildung 19: A) Signale nach Hybridisierung mit der Sonde EUB338 II (Spezifität : Eubacteria), B) Darstellung der DAPI-Signale.

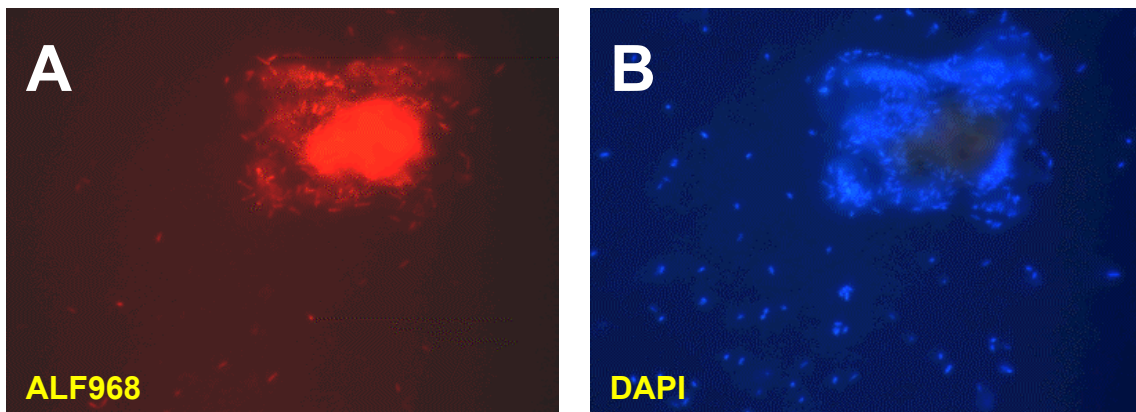


Abbildung 20: A) Signale nach Hybridisierung mit der Sonde ALF968 (Spezifität : Alphaproteobacteria), B) Darstellung der DAPI-Signale.

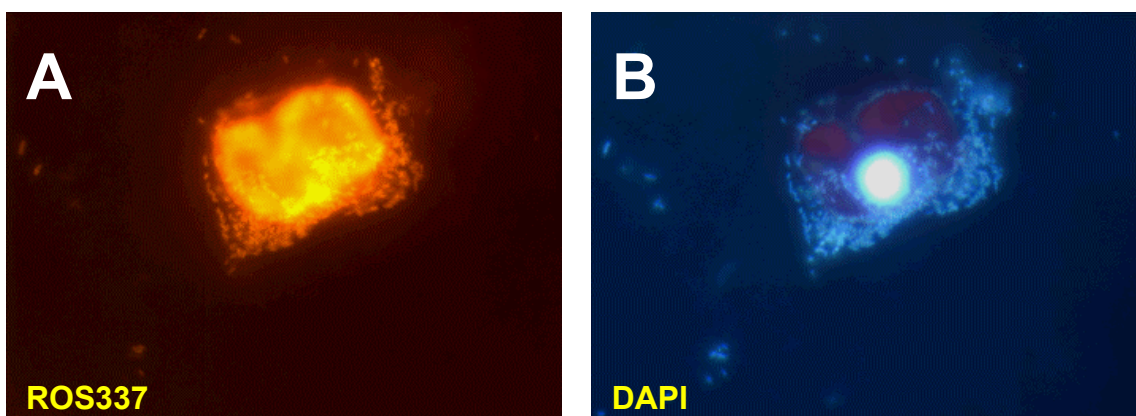


Abbildung 21: A) Signale nach Hybridisierung mit der Sonde ROS337 (Spezifität: Roseobacter), B) Darstellung der DAPI-Signale.

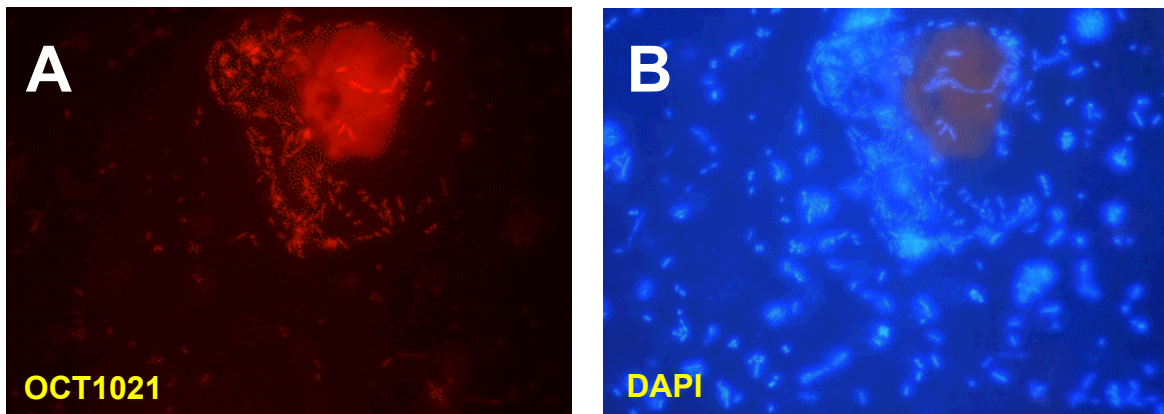


Abbildung 22: A) Signale nach Hybridisierung mit der Sonde OCT1021 (Spezifität: *Octadecabacter*), B) Darstellung der DAPI-Signale.

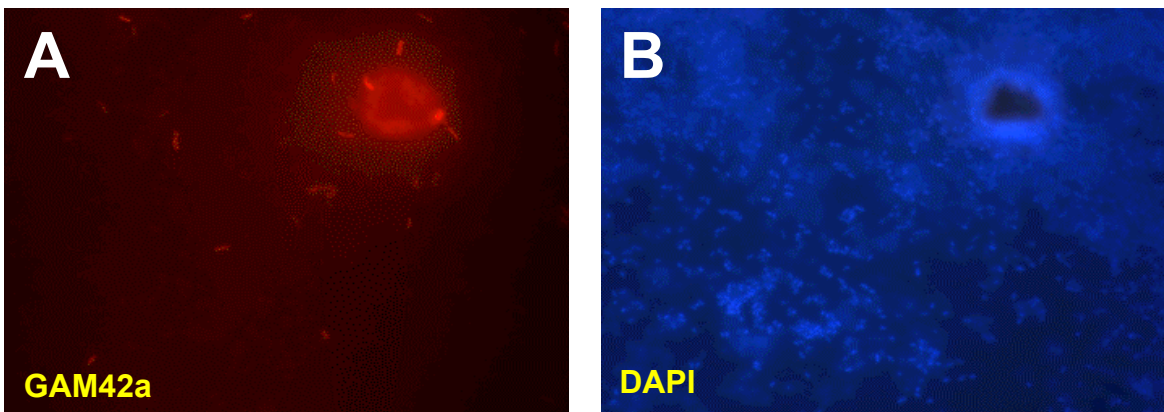


Abbildung 23: A) Signale nach Hybridisierung mit der Sonde GAM42a (Spezifität: *Gammaproteobacteria*), B) Darstellung der DAPI-Signale.

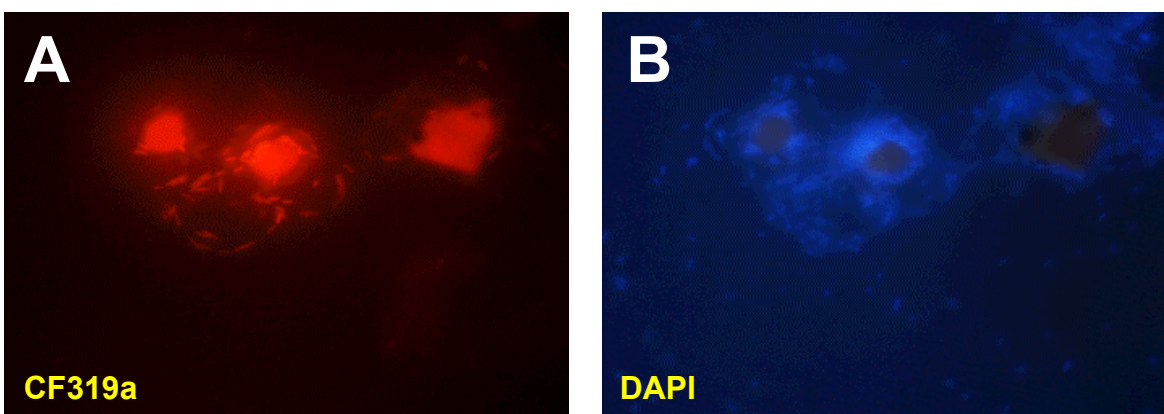
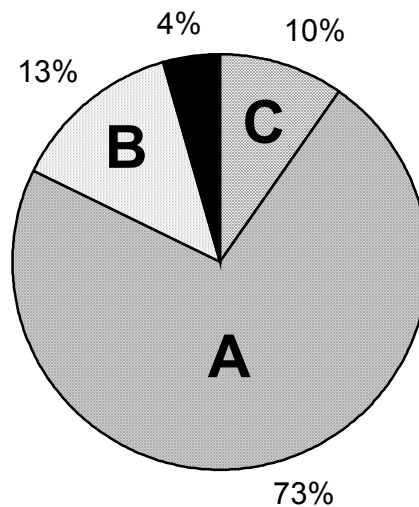


Abbildung 24: A) Signale nach Hybridisierung mit der Sonde CF319a (Spezifität: *Bacterioidetes*), B) Darstellung der DAPI-Signale.



**Abbildung 25: Verteilung der identifizierten Bakteriengruppen innerhalb der Mischkultur. Bestimmung über Fluoreszenz in situ Hybridisierung. A = Alphaproteobakterien (1134 ausgezählte Bakterienzellen), B = Bacteroidetes-Gruppe (845 ausgezählte Bakterienzellen), C = Gammaproteobakterien (798 ausgezählte Bakterienzellen).**

Die Auszählungen ergaben eine Dominanz der Alphaproteobakterien innerhalb der Mischkultur (Abb. 25). Der Anteil der Bacteroidetesgruppe mit  $13 \pm 4$  % und den Gammaproteobakterien mit  $10 \pm 4$  % ist fast gleich groß. Fast vier Prozent der Bakterien die mit DAPI nachgewiesen wurden, konnten mit spezifischen Sonden nicht wiedergefunden werden. Dies kann auf Fehlhybridisierungen, Signalüberlagerungen durch Autofluoreszenz und Zählfehler zurückgeführt werden.

Die Zählung der mit der OCT1021 Sonde spezifisch gefärbten Zellen von *Octadecabacter* ergaben einen Anteil von bis zu  $70 \pm 8$  %. Dieses Bakterium ist somit in der Mischkultur dominierend. Über die FISH konnte zudem festgestellt werden, dass mit Ausnahme der Gammaproteobakterien alle anderen Bakterien angeheftet auf *Amphiprora kufferathii* wachsen.

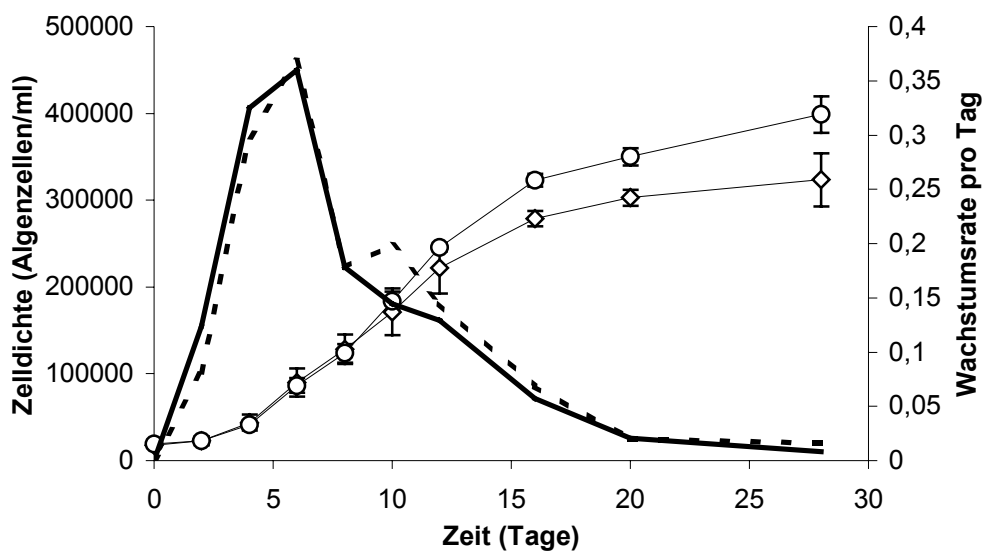
### 3. Wachstumsversuche

Um den Einfluss der epiphytischen Bakterien auf *Amphiprora kufferathii* zu untersuchen, wurde das Wachstum von axenischen und bakterienbehafteten Kulturen unter verschiedenen Bedingungen miteinander verglichen.

### 3.1 Wachstum unter Standardbedingungen

Bakterien können auf Algen stimulierend oder inhibierend einwirken. Eine stimulierende Wirkung der Bakterien auf *A. kufferathii* würde auf eine kommensalische oder sogar mutualistische Beziehung hindeuten. Eine Inhibierung des Wachstums der Alge ließe auf eine parasitische Beziehung schließen. Ist keine Beeinflussung erkennbar, würde dies auf eine neutrale Lebensgemeinschaft hindeuten.

Mit der axenischen Diatomeenkultur wurden vergleichende Wachstumsexperimente durchgeführt. Das Wachstum von bakterienfreien und bakterienbehafteten Kulturen wurde unter Standardbedingungen (Standardmedium,  $40 \mu\text{mol Photonen} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ , 12 h Licht / 12 h Dunkel) über 28 Tage verfolgt.



**Abbildung 26: Wachstum von bakterienfreien und bakterienbehafteten Kulturen von *A. kufferathii* unter Standardbedingungen ( $\diamond$  Zellzahl bakterienfrei,  $\circ$  Zellzahl bakterienbehaftet, — Wachstumsrate bakterienfrei, -- Wachstumsrate bakterienbehaftet, Wachstumsrate = Verdopplung pro Tag,  $n=5$ )**

Alle Kulturen wuchsen bis zum achten Tag nahezu synchron. Am 10. Tag beginnt die bakterienbehaftete Kultur schneller zu wachsen, was sich bis zum Versuchsende fortsetzt. Die Wachstumsraten unterscheiden sich nur geringfügig voneinander. Zwischen dem 8. und dem 20. Tag liegt die Wachstumsrate der bakterienbehafteten Kultur etwas höher als die der bakterienfreien Kultur (Abb. 26).

Diese stimulierende Wirkung wurde bei fast allen weiteren Experimenten beobachtet. Dies deutet auf eine mutualistische Beziehung zwischen *A. kufferathii* und den epiphytischen Bakterien hin.

### 3.2 Wachstum bei Zugabe von Glycin und Glycylglycin

Ein zumindest stimulierender Effekt der Bakterien auf das Wachstum von *A. kufferathii* konnte gezeigt werden. Zur Untersuchung der Ursache für diesen Effekt wurden weitere Wachstumsversuche durchgeführt.

Einige Bakterien sind in der Lage Glycylglycin abzubauen und zu verwerten. Das Abbauprodukt Glycin könnte für das gesteigerte Wachstum der bakterienbehafteten gegenüber der bakterienfreien Kultur verantwortlich sein.

Zur Überprüfung des Effektes der Puffersubstanz Glycylglycin wurden die Versuchskulturen in ungepuffertem Medium, in Standardmedium mit Glycylglycin und in ungepuffertem Medium mit Glycin-Zusatz kultiviert.

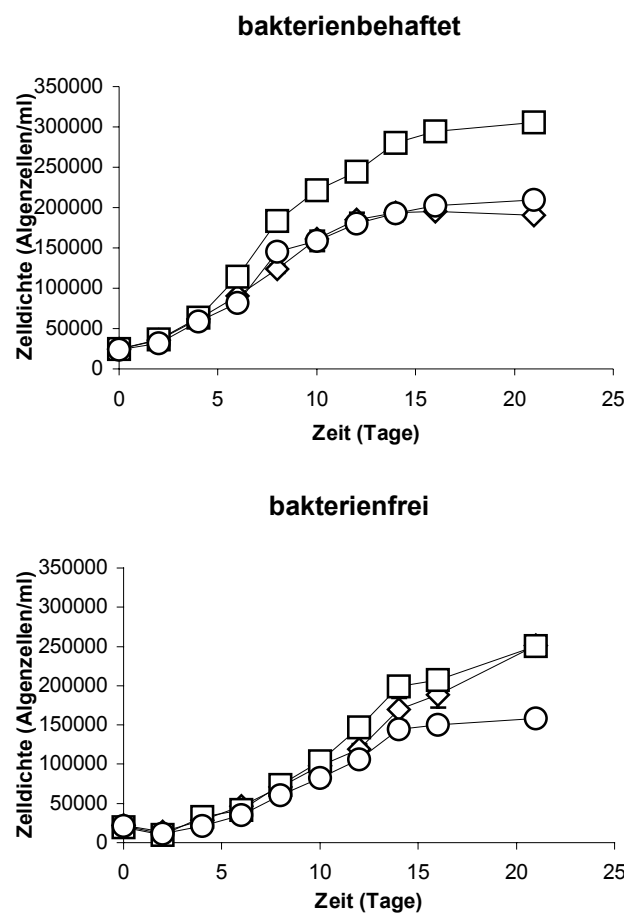


Abbildung 27: Oben: Wachstum bakterienbehafteter Kulturen von *Amphiprora kufferathii* unter Zugabe von Glycin und Glycylglycin. Unten: Wachstum bakterienfreier Kulturen von *Amphiprora kufferathii* unter Zugabe von Glycin und Glycylglycin (◇ ungepuffert, □ Glycin, ○ Glycylglycin, n=3).

Hinsichtlich des Wachstums unterscheiden sich die bakterienfreien Kulturen von *A. kufferathii* bei Glycin-Zugabe und im ungepufferten Medium geringfügig voneinander. Die bakterienfreien Kulturen in Glycylglycin gepufferten Medium weisen



mit Beginn der stationären Phase deutlich geringere Zellzahlen auf als die anderen Versuchsansätze (Abb. 27).

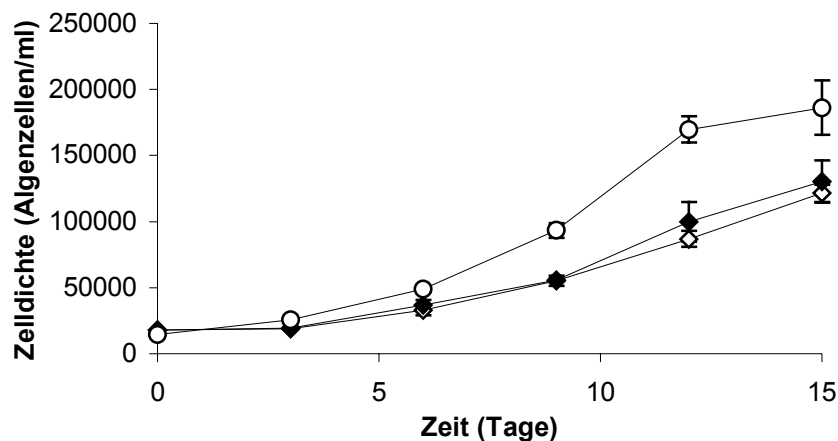
Bei den bakterienbehafteten Kulturen von *A. kufferathii* zeigte der Ansatz nach Glycin-Zugabe ab dem vierten Versuchstag das schnellste Wachstum und die höchsten Zellzahlen. Der ungepufferte- und der Glycylglycin-Ansatz unterscheiden sich am achten und am 21. Versuchstag geringfügig.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass der stimulierende Effekt der Bakterien auf das Wachstum von *A. kufferathii* nicht auf den Abbau von Glycylglycin zu Glycin zurückzuführen ist.

### 3.3 Wachstum bei Zugabe von Katalase

Durch die Photosynthese der Algen wird Wasserstoffperoxid freigesetzt. Neben den Algen sind auch Bakterien befähigt,  $H_2O_2$  aktiv zu beseitigen. Um zu untersuchen, ob der stimulierende Effekt auf das Wachstum von *A. kufferathii* durch den Abbau von  $H_2O_2$  durch die Bakterien ausgelöst wird, wurde dem Medium einer bakterienfreien Kultur der Diatomee Katalase hinzugefügt. Dieses Enzym baut  $H_2O_2$  zu Wasser ab und kann so den potentiellen Einfluss der Bakterien simulieren.

Zum entsprechenden Ansatz wurden täglich 20  $\mu g$  Katalase hinzugefügt. Zur Kontrolle diente eine bakterienfreie *A. kufferathii* Kultur unter Standardbedingungen.



**Abbildung 28:** Effekt extern zugefügter Katalase auf das Wachstum einer bakterienfreien Kultur von *Amphiprora kufferathii* im Vergleich zu einer bakterienfreien Kultur ohne Katalase und einer bakterienbehafteten Kultur (○ bakterienbehaftet, ◇ bakterienfrei, ◆ bakterienfrei + Katalase, n=4).

Durch die extern zugefügte Katalase wurde kein erhöhtes Wachstum der *A. kufferathii* Kultur ausgelöst. Am 12. und am 15. Versuchstag lag die Zellzahl der Versuchskulturen nur wenig über dem der bakterienfreien Kontrolle (Abb. 28). Beide wurden aber vom Wachstum der bakterienbehafteten Diatomeenkultur deutlich



übertroffen. Durch eine Erhöhung der Katalasedosis auf täglich 50 µg brachte ebenfalls keine Effektsteigerung (Daten nicht gezeigt). Somit ist der wachstumsfördernde Effekt bei *A. kufferathii* wahrscheinlich nicht auf den Abbau von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch die Bakterien zurückzuführen.

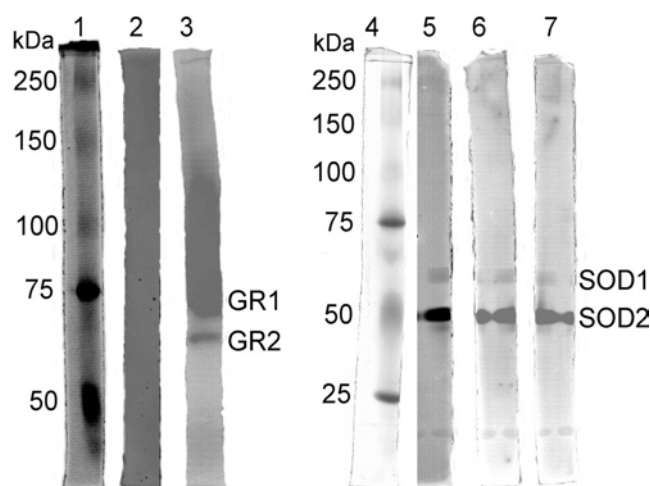
## **4 Biochemische Untersuchungen zum enzymatischen Oxidationsschutz**

Für eine Bestandsaufnahme wurde der enzymatische Oxidationsschutz der Diatomee und der isolierten Bakterien untersucht. Die Oxidationsschutzenzyme geben Aufschluss, auf welche Weise der entsprechende Organismus reaktive Sauerstoffspezies beseitigt.

Zur Untersuchung der Ausstattung von *A. kufferathii* und den isolierten Bakterien mit Oxidationsschutzenzymen wurden native Polyacrylamid Gelelektrophoresen (PAGE) durchgeführt (Abschnitt B 3.2), die spezifisch für Katalase, Superoxid-Dismutase und Glutathion-Reduktase angefärbt wurden (Abschnitt B 3.3). Die nachgewiesenen Oxidationsschutzenzyme mit den apparenten Molekulargewichten sind zusammenfassend in Tabelle 20 dargestellt.

### **4.1 Oxidationsschutzenzyme in *Amphiprora kufferathii***

In Rohextrakten aus *A. kufferathii* wurden die Proteine nativ über PAGE aufgetrennt und spezifisch gefärbt. Zur Größenbestimmung wurde der Precision plus Protein Standard (Bio Rad, München) verwendet. Die Berechnung der Molekulargewichte erfolgte über das Programm LabImage (Kapelan, Halle).



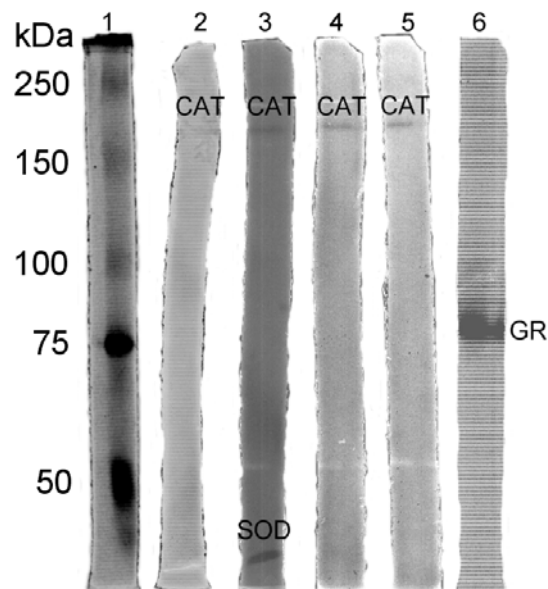
**Abbildung 29:** Rohextrakte aus *A. kufferathii* nach nativer Auftrennung in einem 12% PAA-Gel (Bahn 1-3: 25mA, 12h, 4°C; Bahn 4-7: 25mA, 10h, 4°C). Bahn 1: Proteinstandard, Bahn 2: Katalase, Bahn 6: Glutathion-Reduktase, Bahn 4 Proteinstandard 5: Superoxid-Dismutase, Bahn 6: Superoxid-Dismutase nach Inhibition mit Kaliumzyanid, Bahn 7: Superoxid-Dismutase nach Inhibition mit Wasserstoffperoxid.

In axenischen Kulturen von *A. kufferathii* wurde keine Katalaseaktivität nachgewiesen (Abb. 29, Bahn 2), jedoch waren zwei Superoxid-Dismutasen vorhanden (Bahn 5). Bei den Enzymen mit apparenten Molekulargewichten von 59 kDa und 46 kDa war eine Inhibition mit Kaliumzyanid und Wasserstoffperoxid nicht möglich. Daher wird angenommen, dass Mangan als prosthetische Gruppe vorliegt.

Glutathion-Reduktase (Bahn 3) kommt in zwei Isoformen mit einer Größe von 71 und 62 kDa in *A. kufferathii* vor.

#### 4.2 Oxidationsschutzenzyme im isolierten *Sulfitobacter*-Stamm AHALF1A

Anhand von Rohextrakten aus *Sulfitobacter* sp. wurden die Proteine nativ über PAGE aufgetrennt und spezifisch gefärbt.



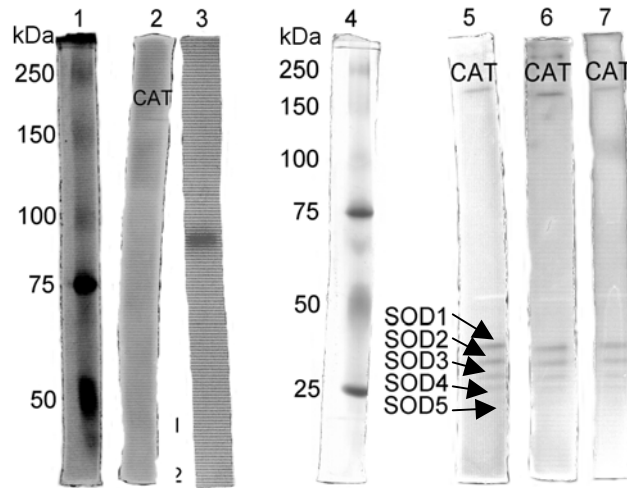
**Abbildung 30:** Rohextrakte aus *Sulfitobacter* sp. nach nativer Auftrennung in einem 12% PAA-Gel (25mA, 12h, 4°C). Bahn 1: Proteinstandard, Bahn 2: Katalase, Bahn 3: Superoxid-Dismutase, Bahn 4: Superoxid-Dismutase nach Inhibition mit Kaliumzyanid, Bahn 5: Superoxid-Dismutase nach Inhibition mit Wasserstoffperoxid, Bahn 6: Glutathion-Reduktase.

*Sulfitobacter* sp. enthält ein Enzym mit Katalaseaktivität (Abbildung 30, Bahn 2). Es hat ein Molekulargewicht von ca. 141 kDa. Superoxid-Dismutase war in *Sulfitobacter* sp. ebenfalls nachweisbar. Das Molekulargewicht wurde mit ca. 40 kDa bestimmt. Dieses Enzym war sowohl mit Kaliumzyanid als auch mit Wasserstoffperoxid hemmbar, was auf Eisen als prosthetische Gruppe hindeutet.

In dem Extrakt aus *Sulfitobacter* sp. wurde eine Glutathion-Reduktase mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 79 kDa nachgewiesen.

### 4.3 Oxidationsschutzenzyme im isolierten *Cellulophaga*-Stamm AHCF1A

Anhand von Rohextrakten aus *Cellulophaga* sp. wurden die Proteine nativ über PAGE aufgetrennt und spezifisch gefärbt.



**Abbildung 31:** Rohextrakte aus *Cellulophaga* sp. nach nativer Auftrennung in einem 12% PAA-Gel (Bahn 1-3: 25mA, 12h, 4°C; Bahn 4-7: 25mA, 10h, 4°C). Bahn 1: Proteinstandard, Bahn 2: Katalase, Bahn 6: Glutathion-Reduktase, Bahn 4: Proteinstandard, Bahn 5: Superoxid-Dismutase, Bahn 6: Superoxid-Dismutase nach Inhibition mit Kaliumzyanid, Bahn 7: Superoxid-Dismutase nach Inhibition mit Wasserstoffperoxid.

Katalaseaktivität konnte in einem Rohextrakt aus *Cellulophaga* sp. nachgewiesen werden. Das apparente Molekulargewicht des detektierten Proteins betrug ca. 138 kDa (Abb 31).

Fünf Isoenzyme der Superoxid-Dismutase wurden in *Cellulophaga* sp. nachgewiesen. Weder SOD1 (36 kDa), SOD2 (31 kDa), SOD3 (28 kDa), SOD4 (26 kDa) noch SOD5 (23 kDa) waren mit Kaliumzyanid oder Wasserstoffperoxid hemmbar, was auf Mangan als prosthetische Gruppe hinweist.

Eine Glutathion-Reduktase mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 90 kDa wurde in *Cellulophaga* sp. detektiert.

#### 4.4 Oxidationsschutzenzyme im isolierten *Colwellia*-Stamm AHGAM01

Anhand von Rohextrakten aus *Colwellia* sp. wurden die Proteine nativ über PAGE aufgetrennt und spezifisch gefärbt.

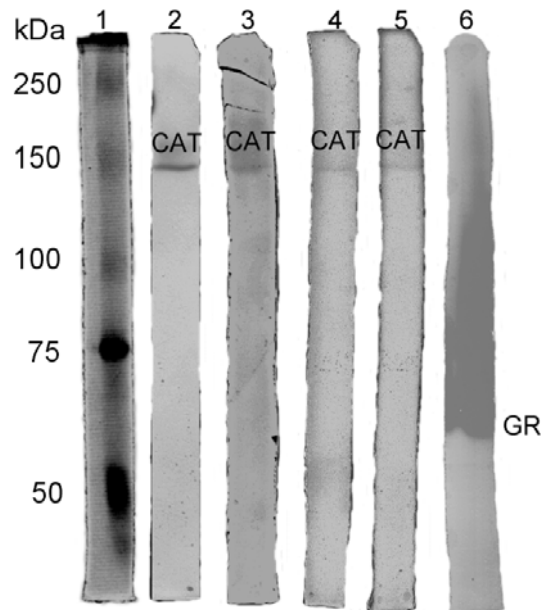


Abbildung 32: Rohextrakte aus *Colwellia* sp. nach nativer Auftrennung in einem 12% PAA-Gel (25mA, 12h, 4°C). Bahn 1: Proteinstandard, Bahn 2: Katalase, Bahn 3: Superoxid-Dismutase, Bahn 4: Superoxid-Dismutase nach Inhibition mit Kaliumzyanid, Bahn 5: Superoxid-Dismutase nach Inhibition mit Wasserstoffperoxid, Bahn 6: Glutathion-Reduktase.

Das in *Colwellia* sp. detektierte Enzym mit Katalaseaktivität wies ein apparentes Molekulargewicht von ca. 124 kDa auf (Abb 32). SOD-Aktivität konnte in *Colwellia* sp. nicht gezeigt werden. Das apparente Molekulargewicht einer Glutathion-Reduktase in *Colwellia* sp. betrug 61 kDa.

Tabelle 20: Zusammenfassung der apparenten Molekulargewichte der identifizierten Oxidationsschutzenzyme in den untersuchten Algen- und Bakterienspezies

	<i>Amphiprora kufferathii</i>	<i>Sulfitobacter AHALF1A</i>	<i>Cellulophaga AHCF1A</i>	<i>Colwellia AHGAM01</i>
CAT	n.n.	185 kDa	170 kDa	145 kDa
SOD1	59 kDa (Mn)	40 kDa (Fe)	36 kDa (Mn)	
SOD2	46 kDa (Mn)		31 kDa (Mn)	
SOD3			28 kDa (Mn)	
SOD4			26 kDa (Mn)	
SOD5			23 kDa (Mn)	
GR1	71 kDa	79 kDa	90 kDa	61 kDa
GR2	62 kDa			

Katalase konnte in *Amphiprora kufferathii* nicht nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass der Abbau von Wasserstoffperoxid in der Diatomee durch andere Wege erfolgen muss (Abschnitt D 2.2.2). Die isolierten Bakterien enthielten alle Enzyme mit Katalase-Aktivität. Somit sind diese in der Lage Wasserstoffperoxid ohne weitere Substrate abzubauen.

In *A. kufferathii* wurden zwei SOD-Isoenzyme nachgewiesen, was die Diatomee befähigt, das in der Mehler-Reaktion freiwerdende Superoxid abzubauen und die Bildung von Hydroxylradikalen zu unterdrücken. Auch *Cellulophaga sp.* und *Sulfitobacter sp.* enthalten Superoxid-Dismutase. Während das Alphaproteobakterium Fe-SOD aufweist, besitzt das Flavobakterium fünf Mn-SOD Isoenzyme. In *Colwellia sp.* konnte keine SOD nachgewiesen werden.

In allen Bakterien wurde Glutathion-Reduktase gefunden, was auf das Vorhandensein eines Glutathion-Zyklus schließen lässt. In *A. kufferathii* wurden zwei GR Isoenzyme gezeigt. Diese könnten auf eine dominante Rolle des Glutathion-Zyklus in der Diatomee hinweisen.

## **5 Physiologische Untersuchungen**

### **5.1 Stoffwechselleistungen der Bakterien**

Es wird vermutet, dass die epiphytischen Bakterien Exudate der Diatomee als Kohlenstoffquelle nutzen. Die Untersuchung der Stoffwechselleistungen der Bakterien soll Aufschluss darüber geben, welche Art von Polysacchariden *A. kufferathii* für die Bakterien bereitstellt.

#### **5.1.1 Durch die Bakterien nutzbare Kohlenstoffquellen (BIOLOG)**

Mit Hilfe kommerziell verfügbarer Testplatten für gram-negative Bakterien wurden 95 verschiedene Kohlenstoffquellen auf ihre Nutzbarkeit für die isolierten Bakterien getestet (Tab. 21).

Tabelle 21: Aufstellung der getesteten Kohlenstoffquellen und ihre Nutzung durch die isolierten Bakterien.

Substrat	<i>Cellulophaga</i> sp.	<i>Colwellia</i> sp.	Substrat	<i>Cellulophaga</i> sp.	<i>Colwellia</i> sp.
Cyclodextrin	-	-	Itaconsäure	-	-
Dextrin	+	-	$\alpha$ -Ketobuttersäure	-	-
Glycogen	-	-	$\alpha$ -Ketoglutarinsäure	-	-
Tween 40	-	-	$\alpha$ -Ketovalerinsäure	-	-
Tween 80	-	-	D,L-Milchsäure	-	-
N-acetyl-D-galactosamine	+	-	Malonsäure	-	-
N-acetyl-D-glucosamine	+	-	Propionsäure	-	-
Adonitol	-	-	Chinasäure	-	-
L-Arabinose	-	-	D-Sacchtrinsäure	-	-
D-Arabitol	-	-	Sebacinsäure	-	-
Cellobiose	+	-	Bernsteinsäure	-	-
i-Erythritol	-	-	Bromobernsteinsäure	-	-
D-Fructose	-	-	Succinaminsäure	-	-
L-Fructose	-	-	Glucuronamid	-	-
D-Galactose	+	-	Alaninamid	-	-
Gentiobiose	+	-	D-Alanin	-	-
$\alpha$ -D-Glucose	+	-	L-Alanin	-	-
m-Inositol	-	-	L-Alanylglycin	-	-
$\alpha$ -D-Lactose	+	-	L-Asparagin	-	-
Lactulose	+	-	L-Asparaginsäure	+	-
Maltose	+	-	L-Glutaminsäure	+	+
Mannitol	+	+	Glycyl-L-	-	-
			Aspoaraginsäure		
Mannose	+	-	Glycyl-L-Glutaminsäure	-	-
D-Melibiose	+	-	L-Histidin	-	-
$\beta$ -methyl-D-Glycosid	+	-	Hydroxy-L-Prolin	-	-
D-Psicose	-	-	L-Leucin	-	-
D-Raffinose	+	-	L-Ornithin	-	-
L-Rhamnose	-	-	L-Phenylalanin	-	-
D-Sorbitol	-	-	L-Prolin	-	+
Sucrose	+	-	L-Pyroglutaminsäure	-	-
D-Trehalose	+	-	D-Serin	-	-
Turanose	+	-	L-Serin	-	-
Xylitol	-	-	L-Threonin	-	-
Methylpyruvat	-	-	D,L-Carnitin	-	-
Monomethylsuccinat	-	-	$\gamma$ -Aminobuttersäure	-	-
Essigsäure	-	-	Urucansäure	-	-
Cis-Aconitsäure	-	-	Inosin	-	-
Zitronensäure	-	-	Uridin	-	-
Ameisensäure	-	-	Thymidin	-	-
D-Galactonsäure-Lacton	-	-	Phenylethylamin	-	-
D-Galacturonsäure	+	-	Putrescin	-	-
D-Gluconsäure	-	-	2-Aminoethanol	-	-
D-Glucosaminsäure	-	-	2,3-Butandiol	-	-
D-Glucuronsäure	+	-	Glycerin	-	-
$\alpha$ -Hydroxybuttersäure	-	-	D,L,- $\alpha$ -	-	-
			Glycerinphosphat		
$\beta$ -Hydroxybuttersäure	-	-	Glucose-1-phosphat	+	-
$\gamma$ -Hydroxybuttersäure	-	-	Glucose-6-phosphat	-	-
p-Hydroxyphenylsäure	-	-			

## (C) Ergebnisse

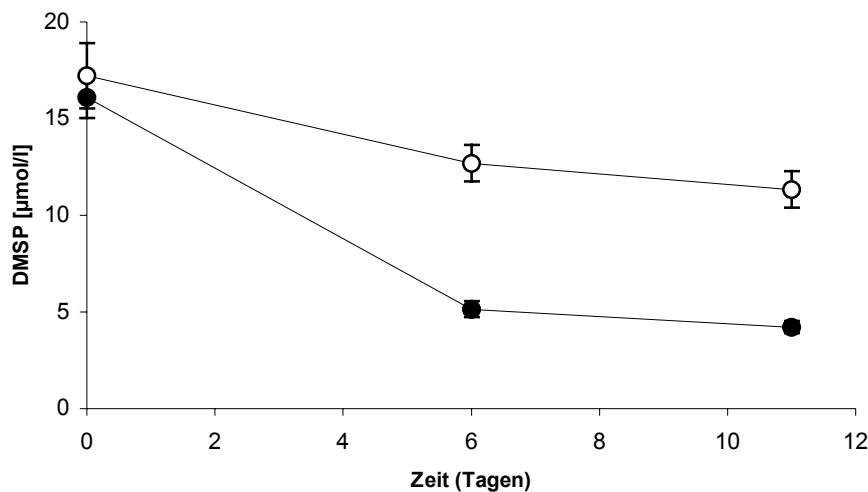
Die Auswertung der Testplatten hat gezeigt, dass *Cellulophaga* sp. hauptsächlich verschiedene Zucker und Aminosäuren als Kohlenstoffquelle nutzen kann.

Die Identifizierung von nur drei Kohlenstoffquellen bei *Colwellia* sp. hat vermutlich methodische Gründe. Hier war eventuell die Zelldichte nicht ausreichend, um auswertbare Signale hervorzubringen.

### 5.1.2 Abbau von Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP)

Dimethylsulfoniumpropionat ist eine von vielen marinen Algen produzierte Verbindung. Einige Bakterien sind in der Lage, DMSP als Kohlenstoffquelle zu nutzen oder zu akkumulieren.

Kulturen von *Sulfitobacter* sp., *Colwellia* sp. und *Cellulophaga* sp. wurden auf die Fähigkeit getestet, DMSP umsetzen zu können. Dazu wurde dem Kohlenstoff-Mangelmedium DMSP hinzugefügt und das Wachstum sowie die DMSP-Konzentration über einen Zeitraum von 11 Tagen verfolgt (Abschnitt B 6.2.1).



**Abbildung 33: DMSP-Konzentration in einer Kultur von *Sulfitobacter* sp. über einen Zeitraum von 11 Tagen (●=*Sulfitobacter* sp., ○=Kontrolle, n=6).**

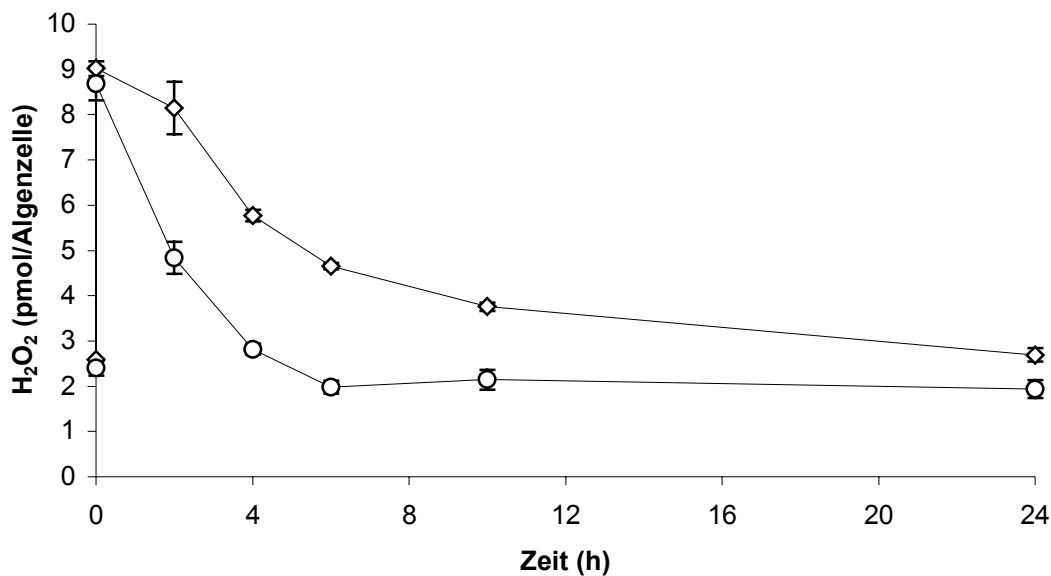
In den Kulturen von *Colwellia* sp. und *Cellulophaga* sp. entsprach der Verlauf der DMSP-Konzentration dem der Kontrollansätze ohne Inokulum (Daten nicht gezeigt).

Bei *Sulfitobacter* sp. zeigte sich innerhalb der ersten sechs Tage eine deutliche Abnahme der DMSP-Konzentration gegenüber der Kontrolle. Dies deutet darauf hin, dass *Sulfitobacter* sp. DMSP als Kohlenstoffquelle nutzen kann (Abb. 33). Es besteht die Möglichkeit, dass das von *A. kufferathii* produzierte DMSP von diesem epiphytischen Bakterium genutzt wird.

## 5.2 Reaktionen auf oxidativen Stress

### 5.2.1 Abbau von Wasserstoffperoxid durch epiphytische Bakterien

Eine zentrale Frage dieser Arbeit war, ob die epiphytischen Bakterien am Oxidationsschutz der Eisdiatomee *A. kufferathii* beteiligt sind. Als erster Schritt zur Beantwortung dieser Frage sollte gezeigt werden, dass die Epibakterien in der Lage sind Wasserstoffperoxid abzubauen. Dazu wurde eine definierte Menge an  $\text{H}_2\text{O}_2$  extern zu den Versuchskulturen gegeben und der zeitliche Verlauf der Wasserstoffperoxid-Konzentration verfolgt.



**Abbildung 34: Vergleich des Wasserstoffperoxid-Abbaus zwischen bakterienbehafteten (○) und axenischen Kulturen (◇) von *Amphipora kufferathii* (n=3).**

Nach Zugabe des externen Wasserstoffperoxids ist in beiden Ansätzen ein Abbauvorgang zu beobachten (Abb. 34). Die bakterienbehafteten Kulturen bauen das extern zugefügte  $\text{H}_2\text{O}_2$  innerhalb der ersten 6 Versuchsstunden um >50% schneller ab als die axenischen Kulturen von *A. kufferathii*. Die bakterienbehafteten Kulturen erreichen den Ausgangswert bereits nach 6 h. In den axenischen Kulturen liegt die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration nach 24 h noch ca. 0,5 pmol/Algenzelle über dem Ausgangswert. Epibakterien bauen extern zugefügtes Wasserstoffperoxid ab. Dies stützt die These von einer Beteiligung am Oxidationsschutz der Alge.



### 5.2.2 Induktion von oxidativem Stress durch hohe Lichtintensität

Nachdem gezeigt wurde, dass die epiphytischen Bakterien Wasserstoffperoxid im Medium abbauen können, sollte nun untersucht werden, ob sie auch  $H_2O_2$  abbauen, das von *A. kufferathii* produziert wurde.

Durch hohe Lichtintensität wird während der Photosynthese verstärkt Superoxid gebildet. Dieses wird über Superoxid-Dismutase zu Wasserstoffperoxid umgewandelt, was sollte sich in der  $H_2O_2$ -Konzentration des Kulturmediums widerspiegeln. Sollten bakterienbehaftete Kulturen geringere  $H_2O_2$ -Werte aufweisen, wäre dies ein Indiz für eine aktive Beteiligung der Epibakterien am Oxidationsschutz von *A. kufferathii*. Hierzu wurden axenische und bakterienbehaftete Kulturen einer erhöhten Lichtintensität ausgesetzt. Die  $H_2O_2$ -Konzentration wurde über einen Zeitraum von 15 h verfolgt.

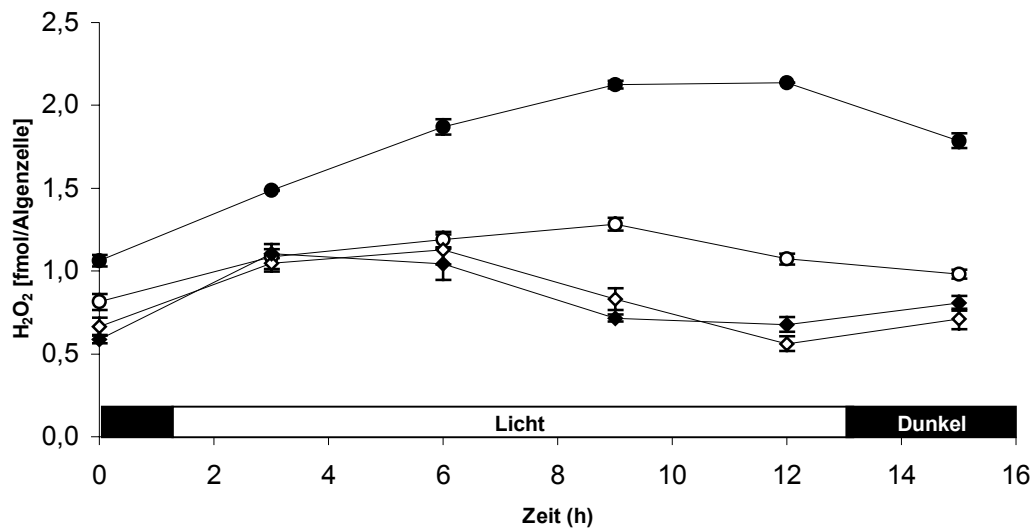


Abbildung 35: Entwicklung der Wasserstoffperoxid-Konzentration im Medium von bakterienfreien und bakterienbehafteten Kulturen von *Amphiprora kufferathii* unter normaler- und erhöhter Lichtintensität. ○ = axenisch  $40 \mu\text{mol Photonen} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ , ● = axenisch  $80 \mu\text{mol Photonen} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ , ◆ = bakterienbehaftet  $80 \mu\text{mol Photonen} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ , ◇ = bakterienbehaftet  $40 \mu\text{mol Photonen} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ , (n=3).

In allen Versuchskulturen war mit Beginn der Lichtphase ein Anstieg der  $H_2O_2$ -Konzentration um ca.  $0,5 \text{ pmol/Algenzelle}$  zu beobachten. Bei den bakterienbehafteten Ansätzen, sowohl unter Standardbedingungen als auch unter erhöhter Lichtintensität, blieb der erreichte Wert bis zur sechsten Stunde des Versuches konstant (Abb. 35). Danach sank die  $H_2O_2$ -Konzentration in den bakterienbehafteten Kulturen. Die Werte der  $H_2O_2$ -Konzentration lagen nach 12 h nahe den Ausgangswerten zu Beginn des Versuches. Zwischen der 12. und der 16. Stunde des Versuches war in den bakterienbehafteten Kulturen ein erneuter leichter Anstieg

der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration zu beobachten. Die erreichten Werte entsprachen den Anfangswerten.

Im Gegensatz zu den bakterienbehafteten Kulturen nahm die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration in den axenischen Kulturen von *A. kufferathii* nach der dritten Versuchstunde weiter zu. Die axenische Kultur unter hoher Lichtintensität erreichte nach 12 h das Maximum von 2,14 pmol/Algenzelle, was dem Doppelten des Ausgangswertes entspricht. Mit Einsetzen der Dunkelphase nahm die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration in diesem Ansatz ab.

Die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Belastung der axenischen Kultur unter Standardbedingungen erreichte mit 1,28 pmol/Algenzelle das Maximum nach 8 h. Danach sank die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration ab, ohne vor Versuchsende die Ausgangswerte zu erreichen.

In diesem Versuch war eine Reduktion der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Belastung der Alge in Gegenwart epiphytischer Bakterien zu beobachten. Die Bakterien bauen offenbar das von *A. kufferathii* gebildete Wasserstoffperoxid ab. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese zur Beteiligung der Epibakterien am Oxidationsschutz der Alge.

### **5.2.3 Einfluss von induziertem oxidativem Stress auf die Photosynthese**

Als Weiterentwicklung der Hypothese zur Beteiligung der Epibakterien am Abbau des von *A. kufferathii* gebildeten  $\text{H}_2\text{O}_2$  sollte nun der positive Effekt für die Alge nachgewiesen werden. Wasserstoffperoxid greift zahlreiche Biomoleküle an und inhibiert in höheren Konzentrationen wichtige Stoffwechselprozesse, wie z. B. die Photosynthese. Im Vergleich zu axenischen Kulturen müsste die Gegenwart der Epibakterien unter oxidativen Stress durch Wasserstoffperoxid einen messbaren Effekt auf die Photosyntheseeffizienz haben. Dies würde ebenfalls eine symbiotische (mutualistische) Beziehung zwischen den Epibakterien und der Diatomee belegen.

Zur Untersuchung dieses Einflusses wurden axenischen und bakterienbehafteten Kulturen von *A. kufferathii* extern 0,5, 1, und 2  $\mu\text{mol/l}$  Wasserstoffperoxid hinzugefügt und das Wachstum und die Chlorophyllfluoreszenz verfolgt.

### (C) Ergebnisse

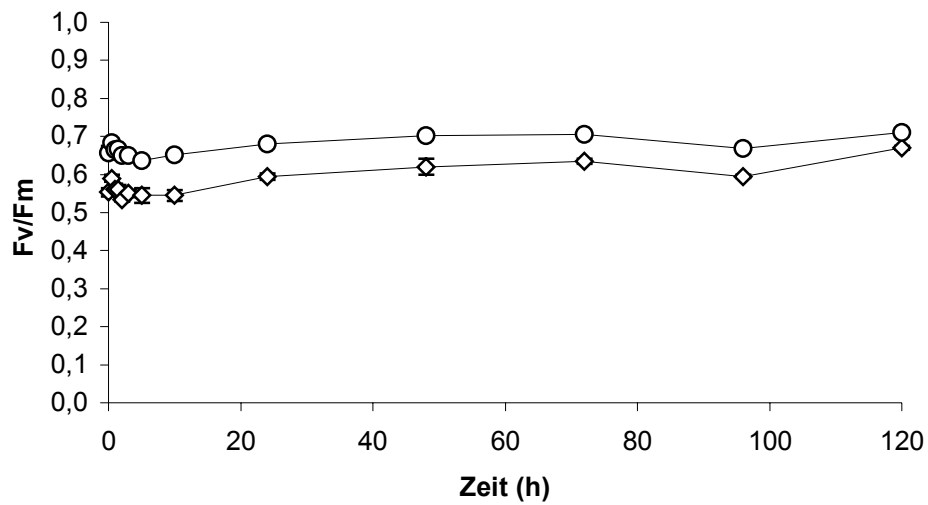


Abbildung 36: Effizienz der Photosynthese, dargestellt als Verhältnis zwischen minimaler und maximaler Chlorophyllfluoreszenz ( $F_v/F_m$ ) von *Amphiprora kufferathii*. Kontrollansatz ohne externe Zugabe von Wasserstoffperoxid (◇=bakterienfreien, ○=bakterienbehafteten, n=3).

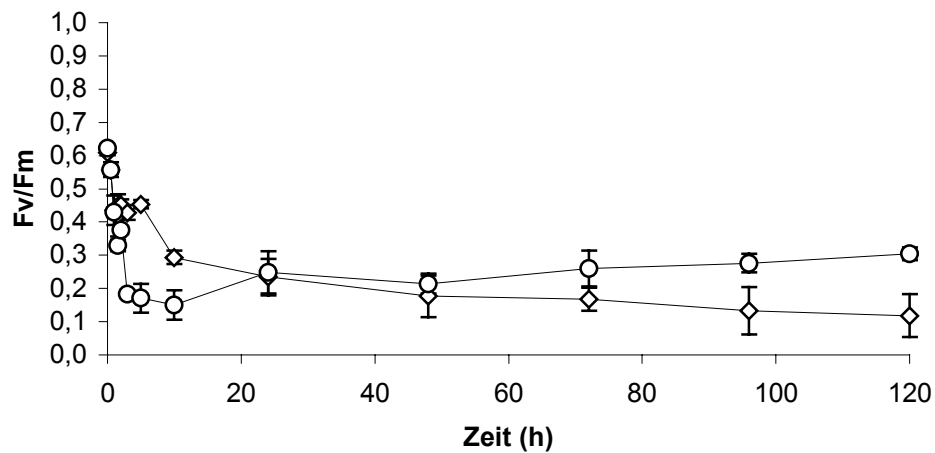


Abbildung 37: Effizienz der Photosynthese, dargestellt als Verhältnis zwischen minimaler und maximaler Chlorophyllfluoreszenz ( $F_v/F_m$ ) von *Amphiprora kufferathii*. Ansatz mit  $0,5 \mu\text{mol/l}$  extern zugegebenem Wasserstoffperoxid (◇=bakterienfreien, ○=bakterienbehafteten, n=3).

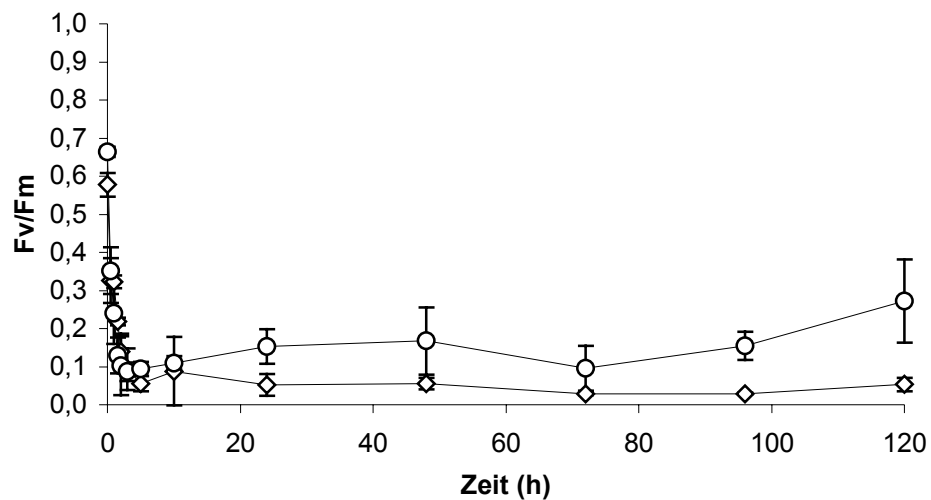


Abbildung 38: Effizienz der Photosynthese, dargestellt als Verhältnis zwischen minimaler und maximaler Chlorophyllfluoreszenz ( $F_v/F_m$ ) von *Amphiprora kufferathii*. Ansatz mit 1  $\mu\text{mol/l}$  extern zugegebenem Wasserstoffperoxid ( $\diamond$ =bakterienfreien,  $\circ$ =bakterienbehafteten,  $n=3$ ).

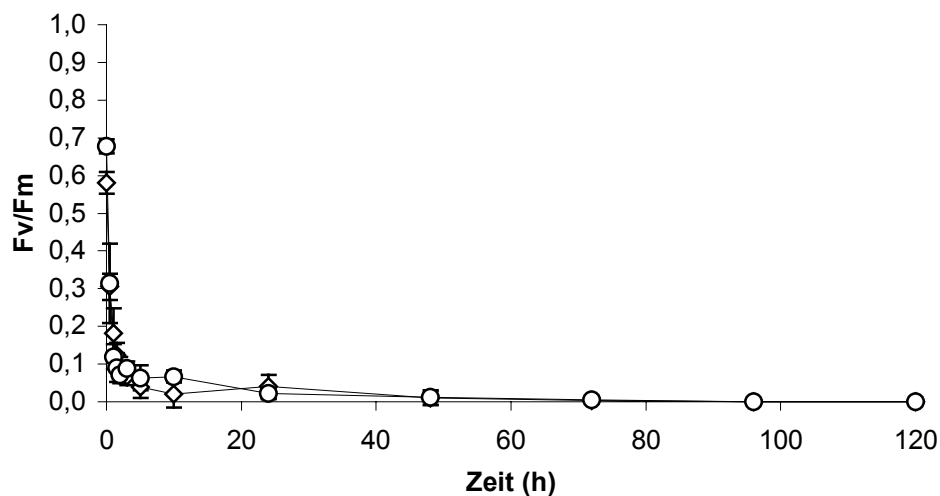


Abbildung 39: Effizienz der Photosynthese, dargestellt als Verhältnis zwischen minimaler und maximaler Chlorophyllfluoreszenz ( $F_v/F_m$ ) von *Amphiprora kufferathii*. Ansatz mit 2  $\mu\text{mol/l}$  extern zugegebenem Wasserstoffperoxid ( $\diamond$ =bakterienfreien,  $\circ$ =bakterienbehafteten,  $n=3$ ).

Nach Zugabe von Wasserstoffperoxid ist in den axenischen als auch in den bakterienbehafteten Kulturen von *A. kufferathii* eine Abnahme der Photosyntheseeffizienz zu beobachten (Abb. 37 – 39).

## (C) Ergebnisse

---

Die Hemmung der Photosyntheseeffizienz in den einzelnen Versuchsansätzen ist in Tabelle 22 zusammengefasst.

**Tabelle 22: Prozentuale Hemmung der Photosyntheseeffizienz bei unterschiedlichen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen in axenischen und bakterienbehafteten Kulturen von *A. kufferathii*.**

Stunden	0,5 µmol		1 µmol		2 µmol	
	axen.	bakt.	axen.	bakt.	axen.	bakt.
0	0	5	0	0	0	0
0,5	5	18	45	48	48	54
1	23	36	43	64	68	82
1,5	25	51	61	81	78	86
2	16	42	74	84	82	89
3	22	72	83	87	88	86
5	17	73	90	85	93	90
10	46	77	84	83	96	90
24	61	64	91	78	93	97
48	72	69	91	76	98	98
72	74	63	95	86	100	99
96	78	59	95	77	100	100
120	82	57	92	62	100	100

Bei 0,5 µmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sank die Effizienz der Photosynthese der bakterienbehafteten Kulturen schneller ab als die der bakterienfreien Kulturen (Abb. 37). Die bakterienbehafteten Kulturen zeigten nach 10 h eine Erholungsphase, die bis zum Versuchsende nach fünf Tagen anhält. Bei den bakterienfreien Kulturen führte die externe Zugabe von 0,5 µmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einer Absenkung der Fv/Fm-Werte. Bis zum Versuchsende war hier keine Erholung zu beobachten.

Im Versuchsansatz mit 1 µmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Abb. 38) sanken die Werte für Fv/Fm bei den bakterienbehafteten Kulturen nicht so weit wie die der axenischen Kulturen. Insgesamt lag die Effizienz der Photosynthese bei den bakterienbehafteten Kulturen in diesem Ansatz bis zu 30 % höher als bei den axenischen Kulturen. Nach drei Tagen setzte bei den bakterienbehafteten Kulturen eine Erholung ein, während bei den bakterienfreien Kulturen erst nach vier Tagen ein leichter Anstieg der Photosyntheseeffizienz zu beobachten war.

In dem Ansatz mit 2 µmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sank die Photosyntheseeffizienz ebenso rapide ab wie beim 1 µmol/l-Ansatz (Abb. 39). Hier kam es jedoch bis zum Versuchsende zu keiner Erholungsphase.

Der positive Effekt der Bakterien auf die Photosyntheseeffizienz von *A. kufferathii* unter  $H_2O_2$ -Stress konnte bestätigt werden. Dies belegt zusätzlich die These, dass die Epibakterien aktiv am Oxidationsschutz der Alge teilnehmen.

### 5.3 Reaktionen auf osmotischen Stress

Der Einfluss der Bakterien bei der Reaktion der Algen auf andere Stressoren wurde untersucht, um einen umfassenderen Einblick in die Wechselwirkungen zwischen beiden Organismen zu erhalten.

#### 5.3.1 Einfluss von hyper- und hypoosmotischen Stress auf die Chlorophyllfluoreszenz von *Amphiprora kufferathii*

Die Photosyntheseeffizienz gibt Auskunft über die physiologischen Status der Alge. Positive oder negative Effekte der Epibakterien auf *A. kufferathii* bei der Reaktion auf osmotischen Stress sind in der Chlorophyllfluoreszenz nachweisbar.

Hyperosmotischer Stress wurde durch Steigerung der Salinität auf 70 und 90 PSU erzeugt, hypoosmotische Belastung wurde mit 5 und 25 PSU Medien erzielt. Als Maß für die Photosyntheseeffizienz diente die Relation zwischen maximaler- und Grundfluoreszenz des Chlorophylls ( $F_v/F_m$ ).

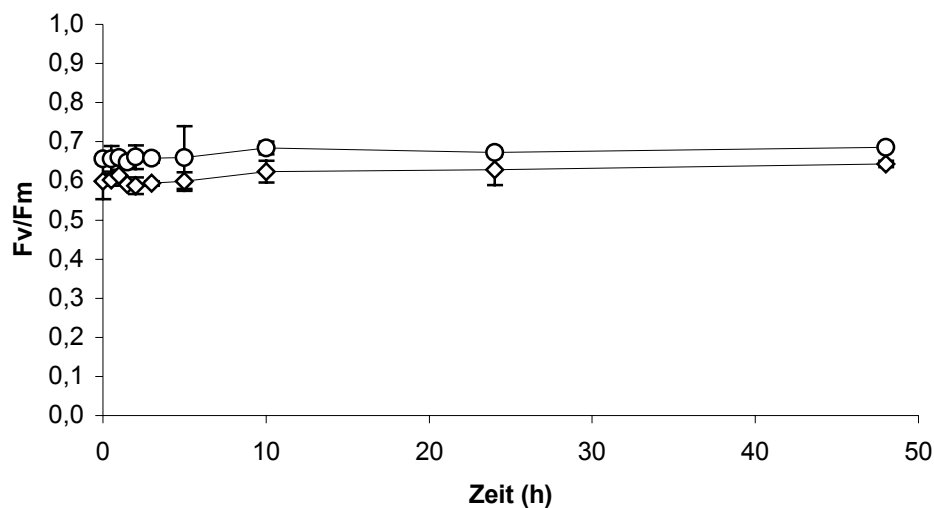


Abbildung 40: Effizienz der Photosynthese, dargestellt als Verhältnis zwischen minimaler und maximaler Chlorophyllfluoreszenz ( $F_v/F_m$ ) von *Amphiprora kufferathii*. Kontrollansatz bei 34 PSU (◇=bakterienfreien, ○=bakterienbehafteten, n=3).

(C) Ergebnisse

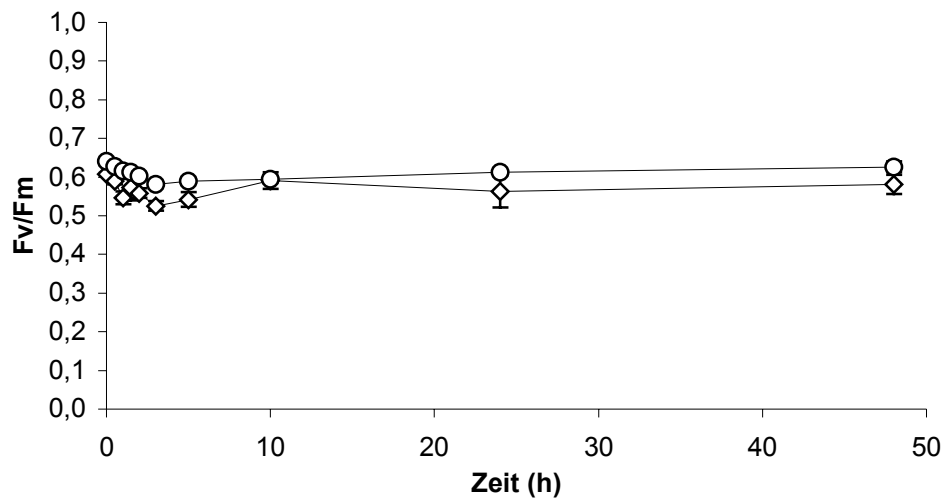


Abbildung 41: Effizienz der Photosynthese, dargestellt als Verhältnis zwischen minimaler und maximaler Chlorophyllfluoreszenz ( $F_v/F_m$ ) von *Amphiprora kufferathii*. Versuchsansatz bei 25 PSU ( $\diamond$ =bakterienfreien,  $\circ$ =bakterienbehafteten,  $n=3$ ).

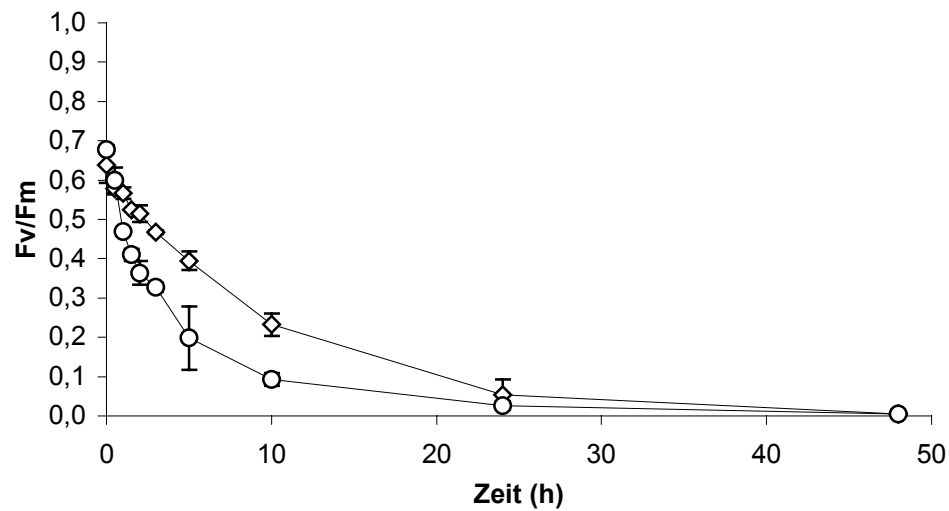
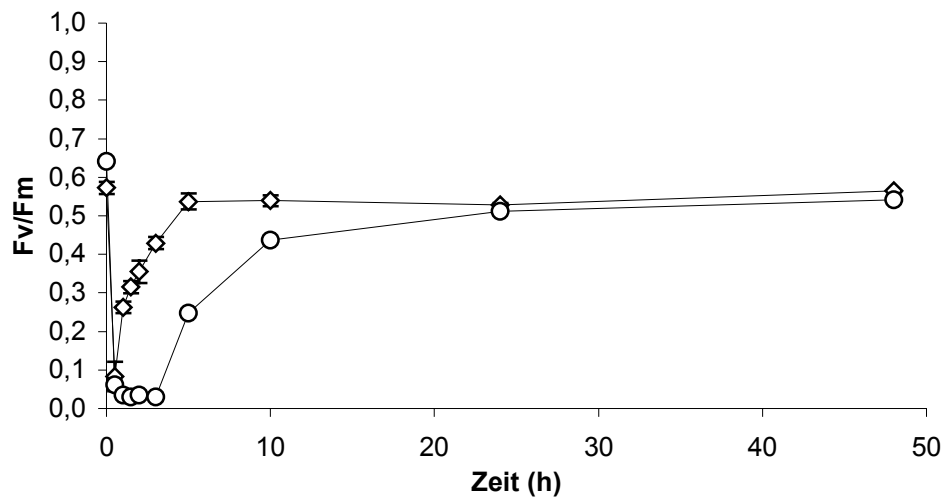


Abbildung 42: Effizienz der Photosynthese, dargestellt als Verhältnis zwischen minimaler und maximaler Chlorophyllfluoreszenz ( $F_v/F_m$ ) von *Amphiprora kufferathii*. Versuchsansatz bei 5 PSU ( $\diamond$ =bakterienfreien,  $\circ$ =bakterienbehafteten,  $n=3$ ).



**Abbildung 43:** Effizienz der Photosynthese, dargestellt als Verhältnis zwischen minimaler und maximaler Chlorophyllfluoreszenz ( $F_v/F_m$ ) von *Amphiprora kufferathii*. Versuchsansatz bei 70 PSU (◇=bakterienfrei, ○=bakterienbehafteten, n=3).

Die Hemmung der Photosyntheseeffizienz in den einzelnen Versuchsansätzen ist in Tabelle 23 zusammengefasst.

**Tabelle 23:** Prozentuale Hemmung der Photosyntheseeffizienz bei unterschiedlichen Salzgehalten in axenischen und bakterienbehafteten Kulturen von *A. kufferathii* (Kontrolle = 34PSU).

Stunden	5 PSU		25 PSU		70 PSU	
	axen.	bakt.	axen.	bakt.	axen.	bakt.
0	0	0	0	2	4	2
0,5	4	9	2	4	86	91
1	8	29	11	7	57	95
1,5	11	37	3	5	47	95
2	12	45	5	9	40	95
3	21	50	11	12	28	95
5	34	70	9	11	10	62
10	63	86	5	13	13	36
24	91	96	10	9	16	24
48	99	99	9	9	12	21

Die Kulturen in 5 PSU Medium zeigten ein sinken der  $F_v/F_m$  Werte in beiden Ansätzen (Abb. 42). Dabei nahmen die Photosyntheseeffizienz bei den bakterienfreien Parallelen langsamer ab als in den bakterienbehafteten Kulturen von *A. kufferathii*. Nach zwei Tagen war der  $F_v/F_m$  in beiden Ansätzen nicht mehr bestimmbar.



In den ersten drei Stunden nach Versuchsbeginn war in den bakterienbehafteten und in den bakterienfreien Kulturen des 25 PSU-Ansatzes eine Verminderung der Photosyntheseeffizienz zu beobachten. Dabei sanken die Fv/Fm-Werte der bakterienbehafteten Kulturen langsamer als die der bakterienfreien Kulturen. Nach 10 h hatte sich die bakterienbehaftete Kultur ihren Anfangswerten weitgehend angenähert. Die bakterienfreie Kultur verblieb etwas unter ihren Ausgangswerten.

Unter hyperosmotischen Stress bei 70 PSU sinken sowohl in den bakterienfreien als auch in den bakterienbehafteten Kulturen die Fv/Fm-Werte rapide ab. Es kam zu einer fast 90 %igen Hemmung der Photosyntheseeffizienz nach 30 min. (Tab. 23). In den axenischen Kulturen von *A. kufferathii* begann bereits nach 90 min eine Erholung einzusetzen. In den bakterienbehafteten Kulturen hingegen verblieben der Fv/Fm-Werte bis zur dritten Stunde nach Versuchsbeginn auf niedrigem Niveau um  $0,04 \pm 0,01$ . Danach begann auch in diesen Kulturen eine Erholungsphase. Nach 24 h hatten die Kulturen beider Ansätze Werte um  $0,5 \pm 0,05$  angenommen und verblieben dort bis zum Versuchsende nach 48 h.

Bei 90 PSU war in beiden Ansätzen eine starke Hemmung der Photosyntheseeffizienz zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Bereits nach einer Stunde waren die Fv/Fm-Werte nicht mehr zu bestimmen. Bis zum Versuchsende nach 48h trat sowohl in den bakterienfreien als auch in den bakterienbehafteten Kulturen keine Erholungsphase ein.

Die Gegenwart der Bakterien hat unterschiedliche Effekte auf die Algen unter osmotischem Stress. Bei geringer hypoosmotischer Belastung (25 PSU) haben die Bakterien einen positiven Effekt. Die Photosyntheseeffizienz sinkt langsamer als in der axenischen Kultur. Anscheinend gilt dies nur für geringfügige Schwankungen der Salinität. Bei starkem hypoosmotischen (5 PSU) und hyperosmotischen Stress (70 und 90 PSU) behindern die Epibakterien die Anpassung von *A. kufferathii* an die neue Salinität.

## **5.4 Reaktionen auf Temperatur-Stress**

### **5.4.1 Einfluss von hyperthermischen Stress auf den Chlorophyll a -Gehalt von *Amphiprora kufferathii***

Durch die jahreszeitlichen Schwankungen sind die SIMCO-Organismen Temperaturschwankungen ausgesetzt. Durch Abschmelzen des Meereises treten starke Temperaturerhöhungen auf.

Zur Untersuchung des Effektes der epiphytischen Bakterien auf *A. kufferathii* unter hyperthermischen Stress, wurden bakterienbehaftete und axenische Kulturen der

Diatomee bei 8°C und 15°C kultiviert. Das Wachstum und der Chlorophyllgehalt wurden über einen Zeitraum von fünf Tagen verfolgt.

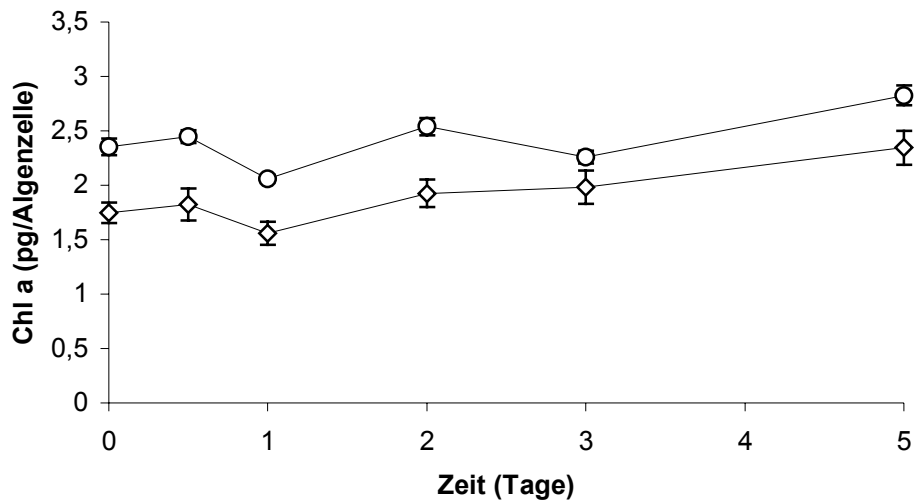


Abbildung 44: Einfluss der Temperatur auf den Chlorophyll a -Gehalt von *Amphiprora kufferathii*. Vergleich zwischen bakterienfreien und bakterienbehafteten Kulturen. Kontrollansatz bei 0°C (◇=bakterienfreien, ○=bakterienbehafteten, n=5).

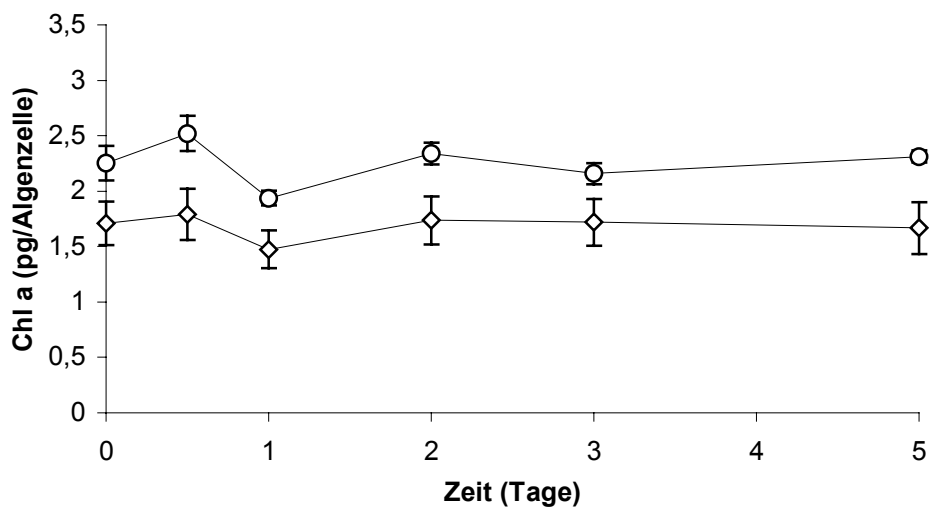
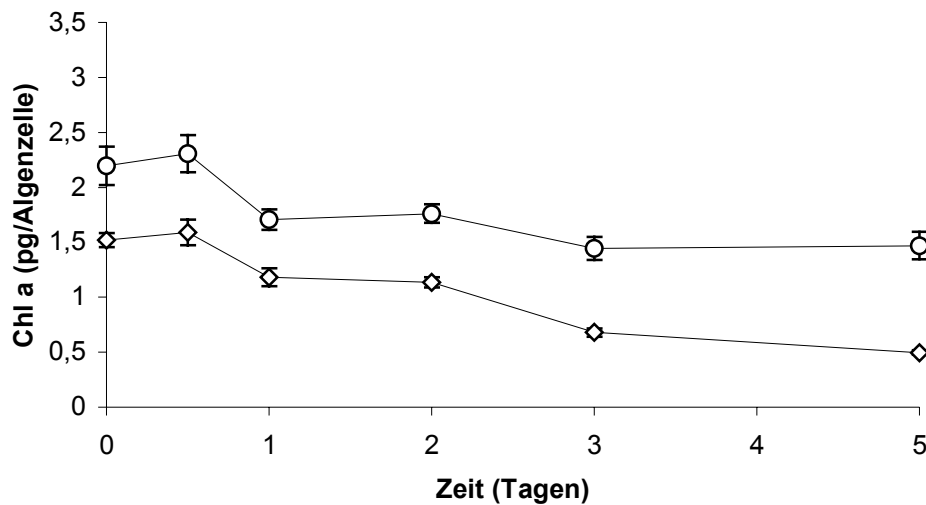


Abbildung 45: Einfluss der Temperatur auf den Chlorophyll a -Gehalt von *Amphiprora kufferathii*. Vergleich zwischen bakterienfreien und bakterienbehafteten Kulturen. Versuchsansatz bei 8°C (◇=bakterienfreien, ○=bakterienbehafteten, n=5).



**Abbildung 46: Einfluss der Temperatur auf den Chlorophyll a -Gehalt von *Amphiprora kufferathii*. Vergleich zwischen bakterienfreien und bakterienbehafteten Kulturen. Versuchsansatz bei 15°C (◇=bakterienfreien, ○=bakterienbehafteten, n=5).**

In den bakterienbehafteten und den bakterienfreien Kontrollkulturen bei 0°C (Abb. 44) stieg der Chlorophyll a -Gehalt während des Versuchszeitraumes an (Abb. 45). Dies war in beiden Kulturen mit einem geringen Wachstum begleitet.

Bei 8°C ist in beiden Ansätzen (bakterienbehaftet und bakterienfrei) nach dem ersten Versuchstag ein geringer Abfall der Chlorophyll a Konzentration zu verzeichnen. Danach stieg diese wieder an und verharrte bis zum Versuchsende in den bakterienbehafteten Kulturen um  $2,4 \pm 0,1$  pg Chlorophyll a/Algenzelle und den bakterienfreien Kulturen bei  $1,7 \pm 0,2$  pg Chlorophyll a/Algenzelle.

Sowohl in den axenischen als auch in den bakterienbehafteten Kulturen ist bei 15°C (Abb. 46) bis zum dritten Versuchstag eine Abnahme des Chlorophyll a -Gehaltes zu beobachten. Danach ändert sich der Chlorophyll a -Gehalt in dem bakterienbehafteten Kulturen nur geringfügig, während er in den bakterienfreien Kulturen weiter absinkt.

Die Epibakterien haben bei Erhöhung der Temperatur anscheinend einen schützenden Effekt auf *A. kufferathii*.

#### **5.4.2 Einfluss von hyperthermischem Stress auf die Chlorophyllfluoreszenz von *Amphiprora kufferathii***

Änderungen im Chlorophyllgehalt spiegeln langfristige Reaktionen der Alge auf Stress wieder. Kurzfristige Veränderungen im physiologischen Status lassen sich über die Chlorophyllfluoreszenz verfolgen. Unter den gleichen Bedingungen wie in Abschnitt 5.4.1 wurde der Versuch zum Einfluss der epiphytischen Bakterien auf die Reaktion der Diatomeen auf hyperthermischen Stress wiederholt. Als Maß für die

Photosyntheseeffizienz diente die Relation zwischen maximaler- und Grundfluoreszenz (Fv/Fm).

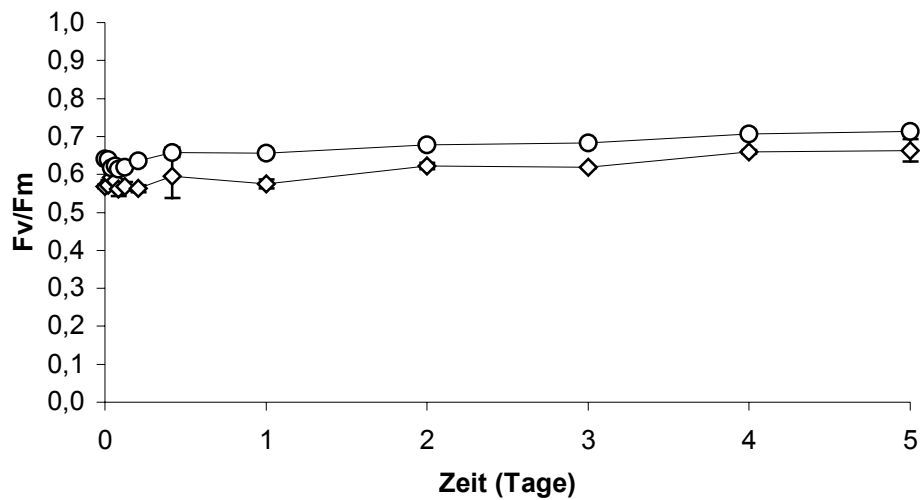


Abbildung 47: Effizienz der Photosynthese, dargestellt als Verhältnis zwischen minimaler und maximaler Chlorophyllfluoreszenz (Fv/Fm) von *Amphiprora kufferathii*. Vergleich zwischen bakterienfreien und bakterienbehafteten Kulturen. Kontrollansatz bei 0°C (◇=bakterienfreien, ○=bakterienbehafteten, n=3).

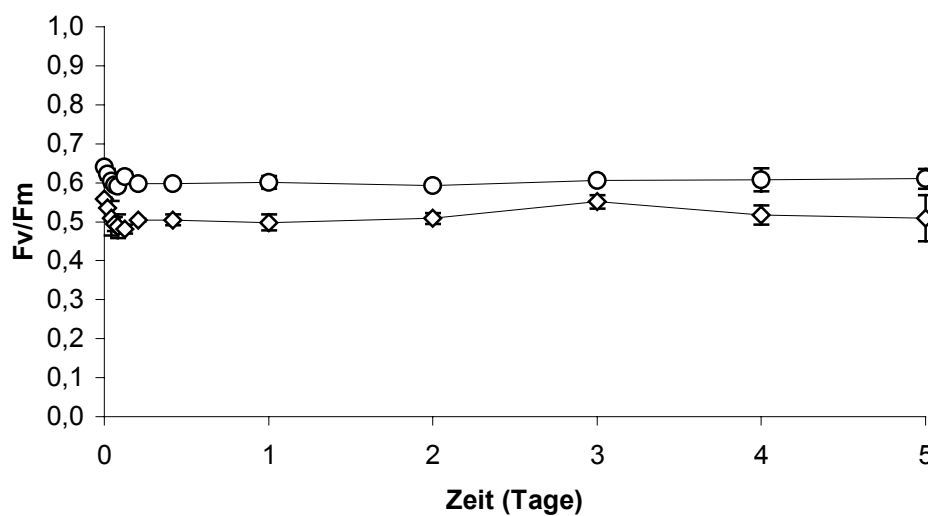
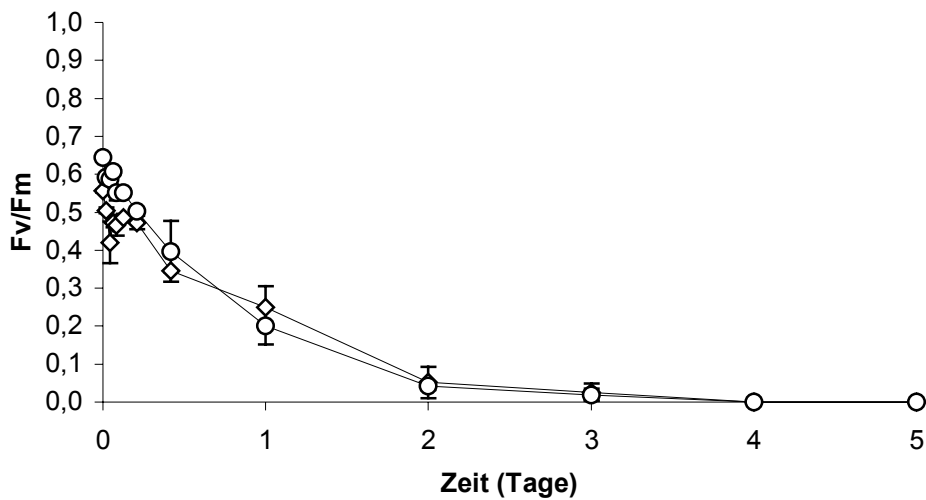


Abbildung 48: Effizienz der Photosynthese, dargestellt als Verhältnis zwischen minimaler und maximaler Chlorophyllfluoreszenz (Fv/Fm) von *Amphiprora kufferathii*. Vergleich zwischen bakterienfreien und bakterienbehafteten Kulturen. Versuchsansatz bei 8°C (◇=bakterienfreien, ○=bakterienbehafteten, n=3).

**(C) Ergebnisse**



**Abbildung 49:** Effizienz der Photosynthese, dargestellt als Verhältnis zwischen minimaler und maximaler Chlorophyllfluoreszenz (Fv/Fm) von *Amphiprora kufferathii*. Vergleich zwischen bakterienfreien und bakterienbehafteten Kulturen. Versuchsansatz bei 15°C (◇=bakterienfreien, ○=bakterienbehafteten, n=3).

Die Hemmung der Photosyntheseeffizienz in den einzelnen Versuchsansätzen ist in Tabelle 24 zusammengefasst.

**Tabelle 24:** Prozentuale Hemmung der Photosyntheseeffizienz bei unterschiedlichen Temperaturen in axenischen und bakterienbehafteten Kulturen von *A. kufferathii* (Kontrolle =0°C).

Stunden	8°C		15°C	
	axen.	bakt.	axen.	bakt.
0	2	0	2	0
0,5	6	3	12	7
1	14	2	29	5
1,5	15	4	19	3
2	13	4	17	10
3	15	0	15	11
5	10	6	16	21
10	15	9	42	40
24	13	8	57	69
48	18	12	92	94
72	11	11	96	97
96	21	14	100	100

Bei den bakterienbehafteten und den axenischen Kontrollkulturen (Abb. 47) war über den gesamten Versuchsverlauf ein leichter Anstieg der Photosyntheseeffizienz zu beobachten. Bei 8°C (Abb. 48) sanken die Werte für Fv/Fm in den bakterienbehafteten und in den bakterienfreien Kulturen zunächst ab. Die Werte stabilisierten sich ab der fünften Stunde nach Versuchsbeginn um  $0,6\pm 0,03$  für die bakterienbehafteten und  $0,5\pm 0,1$  für bakterienfreie Kulturen.

Die Effizienz der Photosynthese verringerte sich bei 15°C (Abb. 49) in den bakterienfreien sowie in den bakterienbehafteten Kulturen gleichermaßen. Nach vier Versuchstagen war die Photosyntheseeffizienz in allen Kulturen dieses Ansatzes zu 100 % gehemmt.

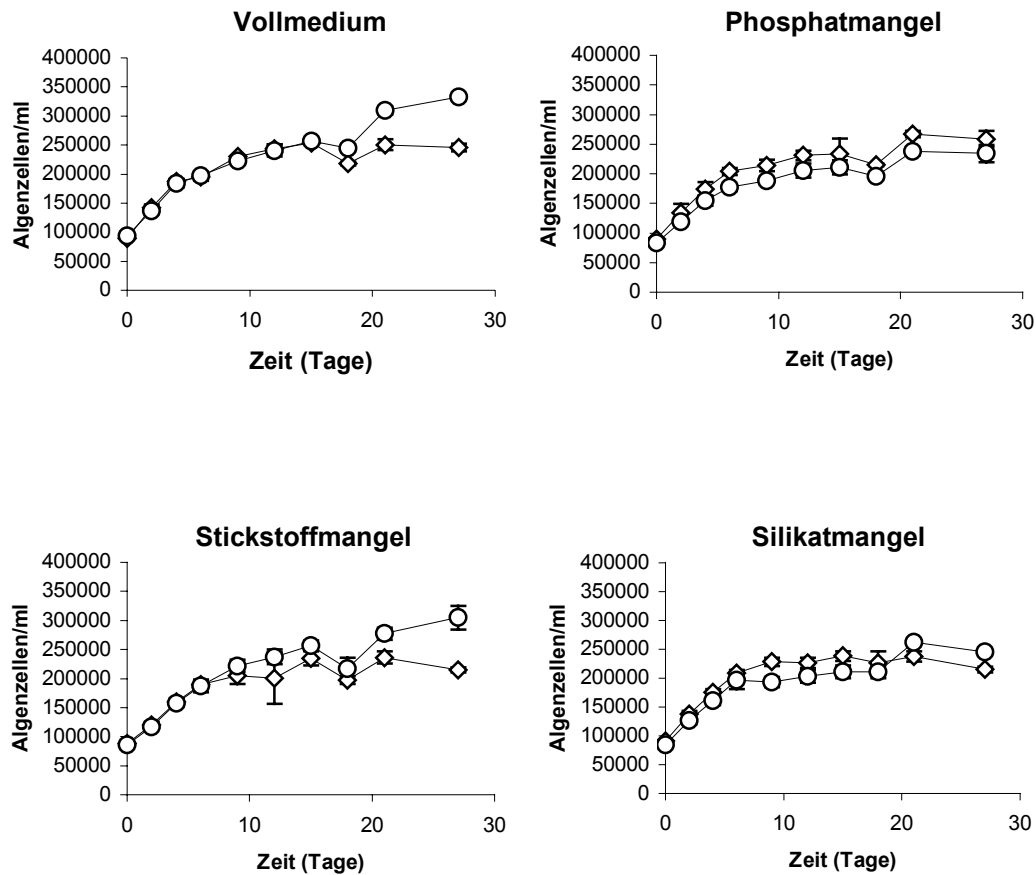
Bei 8°C war ein positiver Effekt der Epibakterien auf die Photosyntheseeffizienz zu verzeichnen. Bei 15°C war ein leichter positiver Effekt nur in den ersten 24h nach Stressbeginn zu beobachten. Diese Ergebnisse lassen aber den Schluss zu, dass die epiphytischen Bakterien einen positiven Einfluss auf die Reaktion von *A. kufferathii* auf hyperthermischen Stress haben.

### **5.5 Nährstoffentwicklung in bakterienfreien und bakterienbehafteten Kulturen von *Amphiprora kufferathii*.**

Eine weitere positive Beeinflussung könnte beim Austausch von Nährstoffen erfolgen. Schon länger wird vermutet, dass die Diatomee die Bakterien mit Kohlenstoffquellen in Form von Polysacchariden versorgen, während die Bakterien ihrerseits anorganische Nährstoffe sowie partikuläre organische Substanz (POM) remobilisieren (Sullivan und Palmisano 1984).

Zur Untersuchung des Einflusses der epiphytischen Bakterien auf den Nährstoffhaushalt wurden bakterienfreie und bakterienbehaftete Kulturen von *Amphiprora kufferathii* unter Stickstoff-, Phosphat- und Silikat-Mangelbedingungen kultiviert (Abschnitt B 6.6) und die Entwicklung der Konzentrationen von Nitrat, Nitrit, Ammonium, Phosphat und Silikat über einen Zeitraum von 27 Tagen verfolgt (Die Konzentrationen der einzelnen Nährstoffe, bezogen auf die Zellzahlen von *A. kufferathii*, befinden sich im Anhang).

WACHSTUM



**Abbildung 50: Wachstum axenischer (◇) und bakterienbehafteter Kulturen (○) von *Amphiprora kufferathii* in Vollmedium und unter Phosphat-, Stickstoff- und Silikatmangel.**

Im Vollmedium wurden von den bakterienbehafteten Kulturen ab dem 18. Versuchstag höhere Zellzahlen erreicht als von den bakterienfreien Kulturen (Abb 50). Bei Phosphatmangel wuchsen die bakterienfreien Kulturen ab dem zweiten Versuchstag besser als die bakterienbehafteten Kulturen. Sowohl unter Stickstoff-, als auch unter Silikatmangel wuchsen die Kulturen mit Epibakterien nach dem sechsten Tag besser als die axenischen Kulturen von *A. kufferathii*.

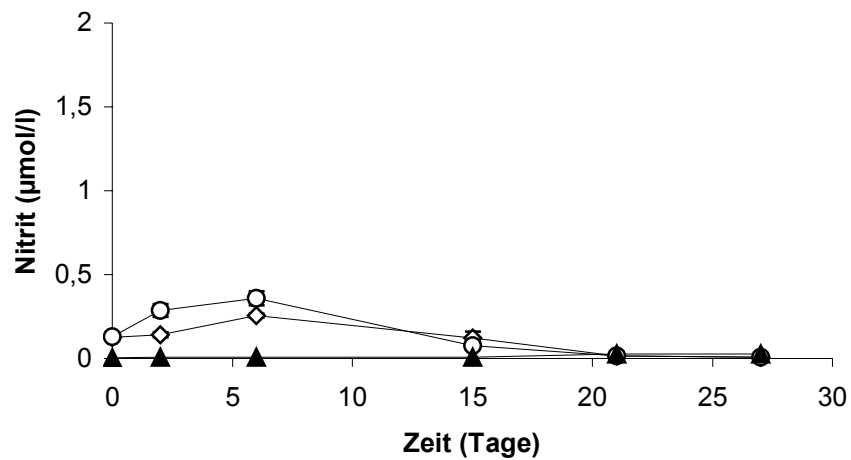
NITRIT

Abbildung 51: Verlauf der Nitrit-Konzentration im Vollmedium. Kontrolle (▲), bakterienfreie (◇) und bakterienbehaftete Kulturen (○) von *Amphiprora kufferathii*.

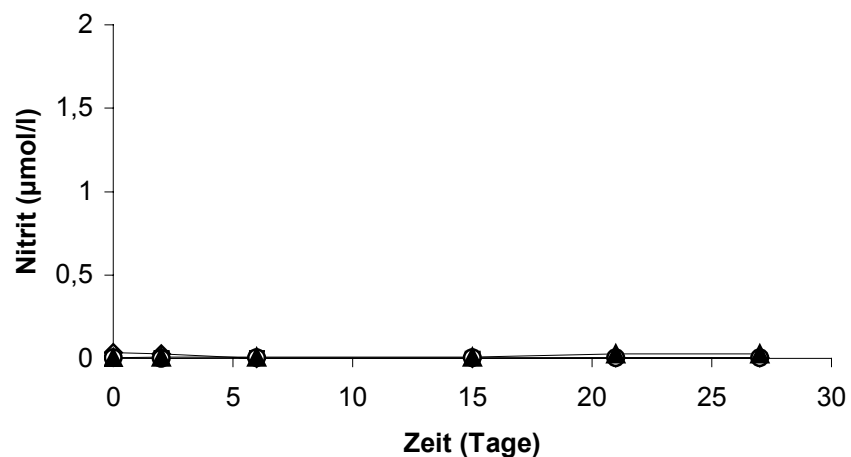


Abbildung 52: Verlauf der Nitrit-Konzentration im Stickstoffmangelmedium. Kontrolle (▲), bakterienfreie (◇) und bakterienbehaftete Kulturen (○) von *Amphiprora kufferathii*.

Im Vollmedium stieg die Nitrit-Konzentration in den bakterienbehafteten Kulturen von *A. kufferathii* nach zwei Tagen an (Abb. 51). In den bakterienfreien Kulturen war zunächst eine geringe Abnahme zu verzeichnen. Nach 21 Tagen war die Nitrit-Konzentration beider Ansätze auf Werte nahe 0 gesunken. Im Stickstoff-Mangelmedium war in beiden Ansätzen nach dem 2. Versuchstag kein Nitrit nachzuweisen (Abb. 52). Sowohl im Vollmedium, als auch im Stickstoffmangelmedium war in den Kontrollen kein Nitrit nachweisbar.



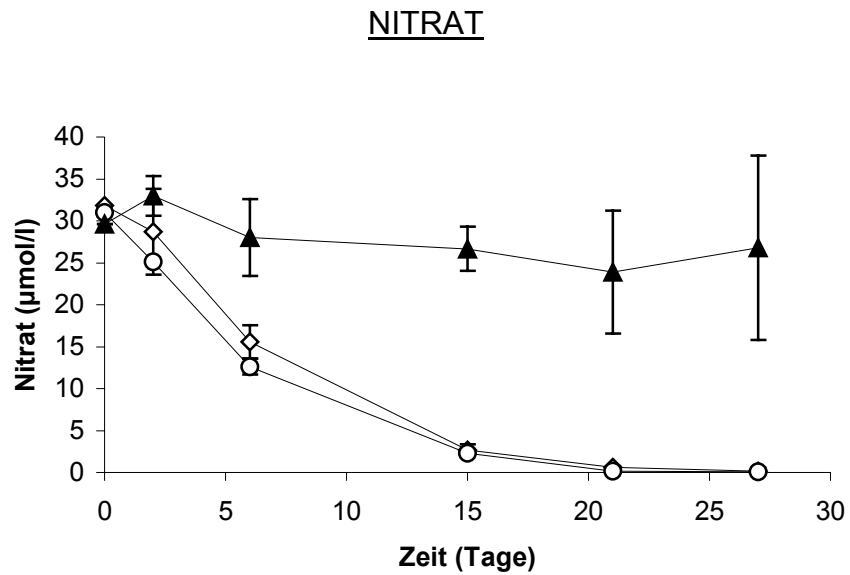


Abbildung 53: Verlauf der Nitrat-Konzentration im Vollmedium. Kontrolle (▲), bakterienfreie (◇) und bakterienbehaftete Kulturen (○) von *Amphiprora kufferathii*.

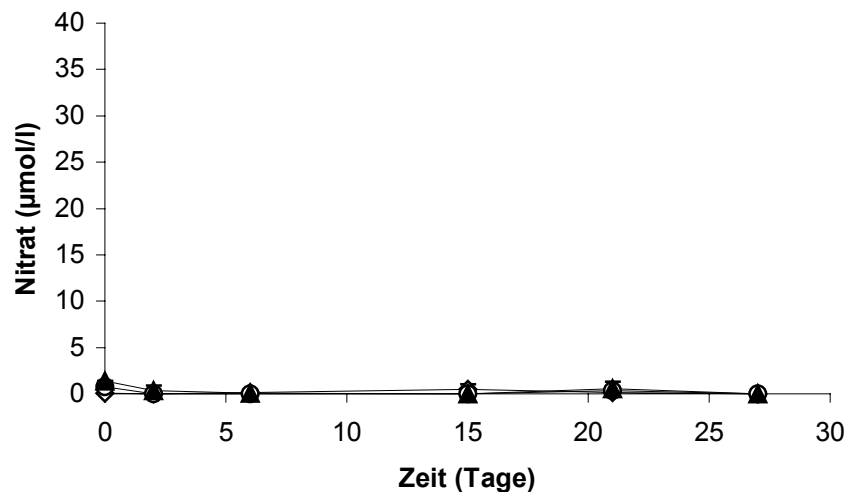


Abbildung 54: Verlauf der Nitrit-Konzentration im Stickstoffmangelmedium. Kontrolle (▲), bakterienfreie (◇) und bakterienbehaftete Kulturen (○) von *Amphiprora kufferathii*.

Im Vollmedium (Abb. 53) sank die Nitrat-Konzentration von Werten um 30 µmol/l (40 pmol/Algenzelle) rapide ab. Sie erreichte in beiden Ansätzen am 15. Tag Werte nahe Null. In den entsprechenden Kontrollen lagen die Nitrat-Werte bis zu Versuchsende um 30 µmol/l.

Im Stickstoff-Mangelmedium (Abb. 54) lagen die Nitratwerte über den gesamten Versuchszeitraum nahe Null. Hier war auch in der Kontrolle kein Nitrat nachweisbar.

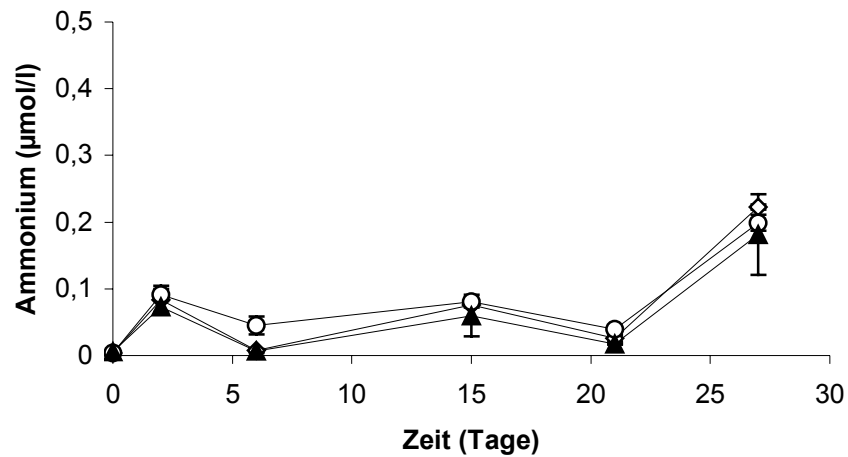
AMMONIUM

Abbildung 55: Verlauf der Ammonium-Konzentration im Vollmedium. Kontrolle (▲), bakterienfreie (◇) und bakterienbehaftete Kulturen (○) von *Amphiprora kufferathii*.

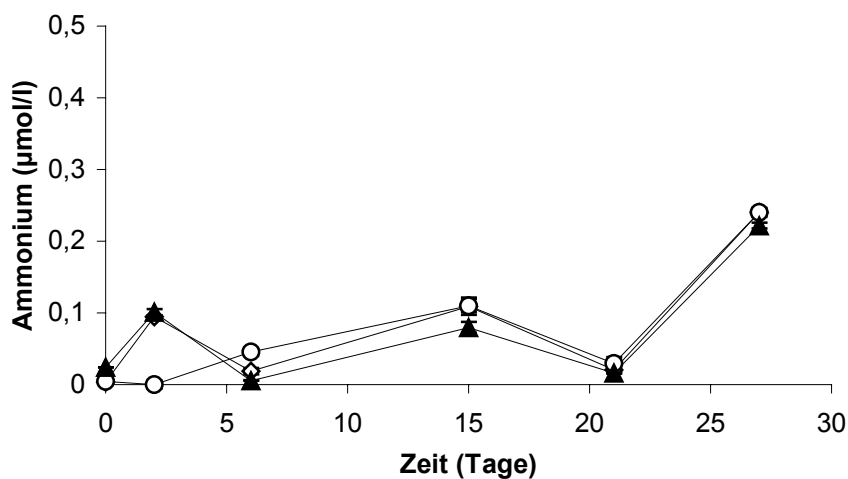


Abbildung 56: Verlauf der Ammonium-Konzentration im Stickstoffmangelmedium. Kontrolle (▲), bakterienfreie (◇) und bakterienbehaftete Kulturen (○) von *Amphiprora kufferathii*.

In allen Medien und allen Ansätzen ähneln die Verläufe der Ammonium-Konzentration stark dem der Kontrollansätze (Abb. 55 und 56). Im Vollmedium, im Stickstoff- und im Silikatmangelmedium steigt die Ammonium-Konzentration auf fast 0,1 µmol/l (0,9 pmol/Algenzelle). Danach sinkt sie wieder auf Werte zwischen 0,03 und 0,01 µmol/l ab. Am 15. Versuchstag steigen die Werte auf fast 0,1 µmol/l. Nach einer erneuten Abnahme am 21. Versuchstag erhöhte sich die Ammonium-Konzentration am 27. Tag auf Werte um 0,3 µmol/l.

PHOSPHAT

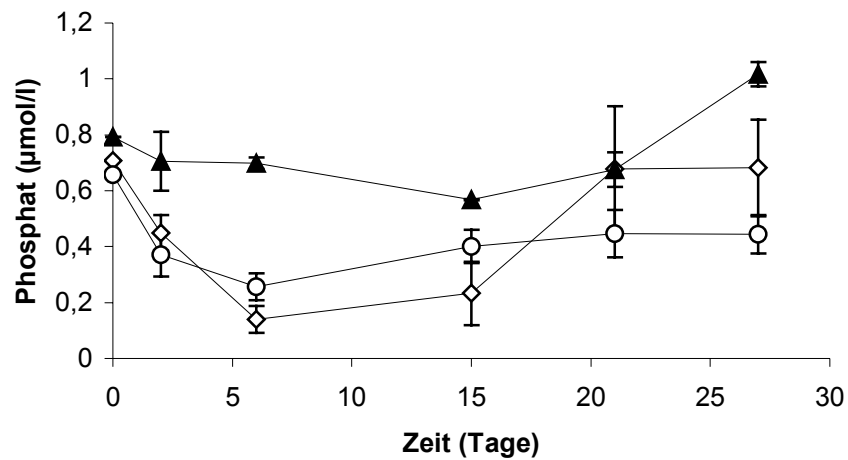


Abbildung 57: Verlauf der Phosphat-Konzentration im Vollmedium. Kontrolle (▲), bakterienfreie (◇) und bakterienbehaftete Kulturen (○) von *Amphiprora kufferathii*.

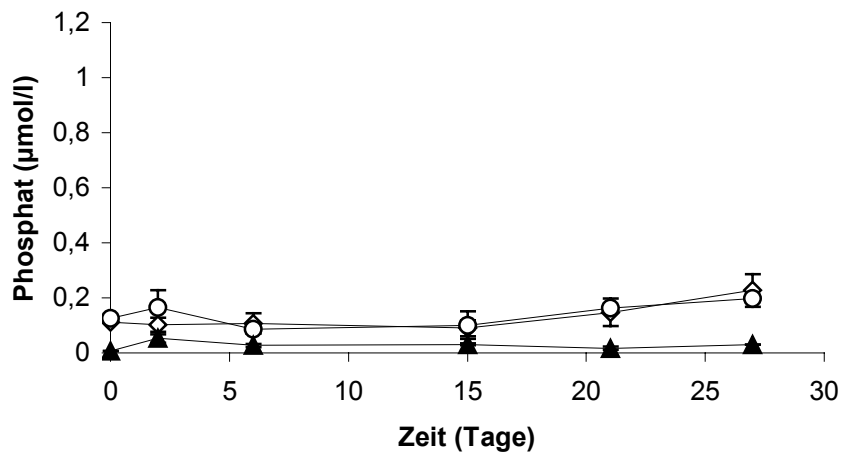


Abbildung 58: Verlauf der Phosphat-Konzentration im Phosphatmangelmedium. Kontrolle (▲), bakterienfreie (◇) und bakterienbehaftete Kulturen (○) von *Amphiprora kufferathii*.

Im Phosphat-Mangelmedium bleibt die Phosphat-Konzentration in den bakterienfreien bei Werten um  $0,1 \mu\text{mol/l}$  bis zum 15. Versuchstag konstant und steigt dann bis zum Versuchsende auf fast  $0,2 \mu\text{mol/l}$  an (Abb 58). In den bakterienbehafteten Kulturen ist am zweiten Versuchstag ein leichter Anstieg zu beobachten. Am sechsten und 15. Tag entsprechen die werte denen in den axenischen Kulturen. Danach ist bis zum 27. Versuchtag ein leichter Anstieg der Phosphat-Konzentration auf Werte um  $0,2 \mu\text{mol/l}$  ( $1 \text{ pmol/Algenzelle}$ ) zu verzeichnen.

Im Vollmedium liegen die Phosphat-Konzentrationen der bakterienbehafteten Kulturen von *A. kufferathii* am sechsten und 15. Versuchstag über denen der axenischen Kulturen (Abb. 57). Am 21 Tag steigt die Phosphat-Konzentration der axenischen

Kulturen auf fast 0,7  $\mu\text{mol/l}$  an wahren die Phosphat-Konzentrationen der bakterienbehafteten Kulturen bei ca. 0,4  $\mu\text{mol/l}$  verbleiben.

### SILIKAT

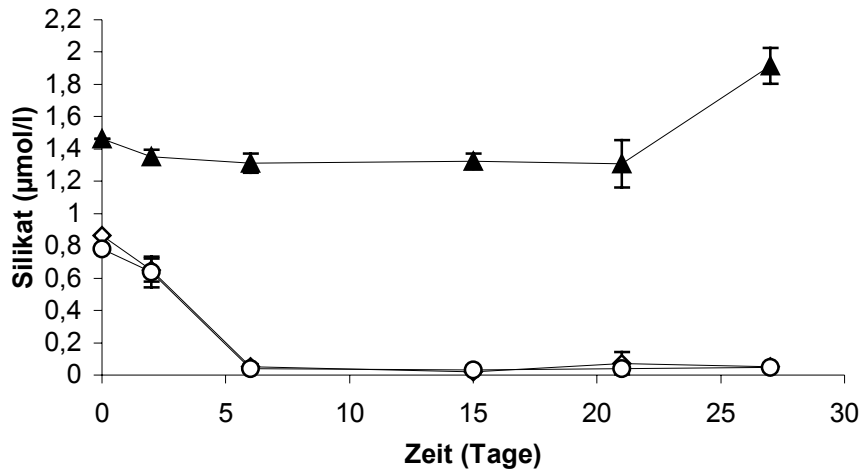


Abbildung 59: Verlauf der Silikat-Konzentration im Vollmedium. Kontrolle (▲), bakterienfrei (◇) und bakterienbehaftete Kulturen (○) von *Amphiprora kufferathii*.

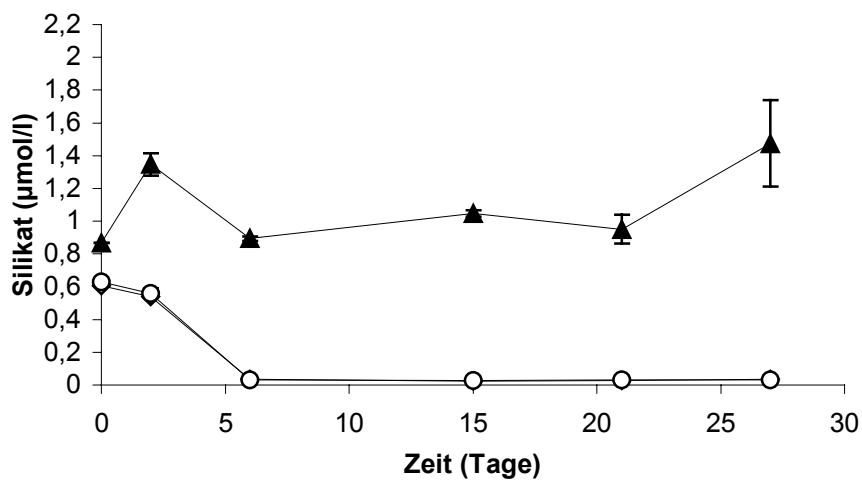


Abbildung 60: Verlauf der Silikat-Konzentration im Silikatmangelmedium. Kontrolle (▲), bakterienfrei (◇) und bakterienbehaftete Kulturen (○) von *Amphiprora kufferathii*.

Die Silikatkonzentration sinkt in allen Versuchsmedien im Vergleich zu den Kontrollen rapide ab (Abb. 59 und 60). Im Vollmedium und im Silikatmangelmedium ist ab den 7. Versuchstag kein Silikat nachweisbar.

### Zusammenfassung:

In allen Versuchsmedien verlaufen die Konzentrationen von Silikat, Ammonium und Nitrat sowohl in den bakterienfreien als auch in den bakterienbehafteten Kulturen nahezu parallel. Ein Einfluss der epiphytischen Bakterien ist in diesen Ansätzen nicht nachweisbar.

Die Nitrit-Konzentrationen der bakterienbehafteten Kulturen von *A. kufferathii* liegen im Vollmedium höher als die der bakterienfreien Kulturen. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die Bakterien einen Einfluss auf den Nitrithaushalt haben.

Im Vollmedium liegen die Phosphat-Konzentrationen der axenischen Kulturen nach dem 15. Versuchstag höher als in den bakterienbehafteten Kulturen von *A. kufferathii*. Dies könnte mit der Konkurrenz zwischen der Bakterien und der Diatomee erklärt werden.

Unter Berücksichtigung der Nährstoff- und Wachstumsdaten scheint zwischen den Bakterien und *A. kufferathii* eine Konkurrenz um Phosphat vorzuliegen. Im Gegensatz zu den wenig aussagekräftigen Nährstoffdaten zum Einfluss der Bakterien auf den Nitrat-, Nitrit-, Ammonium- und Silikatgehalt, sprechen die Wachstumsdaten für einen positiven Effekt der Bakterien unter Stickstoff- und Silikat-Mangelbedingungen.

## **6 Elektronenmikroskopische Untersuchungen**

Pathogene Bakterien sind in der Lage mit Hilfe sogenannter Adhäsine Wirtszellen zu befallen, in sie einzudringen oder zu kolonisieren. Oft sind bei diesen Vorgängen bakterielle Fortsätze beteiligt, die als Pili bezeichnet werden. In Biomatten werden sowohl von Bakterien als auch Mikroalgen Exopolymere Substanzen (EPS) abgegeben, die das Aneinanderkleben der Organismen bewirken. EPS als auch Pili-Strukturen sind bei Bakterien der Antarktis beobachtet worden. Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen sollte festgestellt werden, welche diese Anheftungsmechanismen bei *A. kufferathii* und den Epibakterien vorliegen. Dabei kamen sowohl transmissionselektronische als auch rasterelektronenmikroskopische Verfahren zum Einsatz.

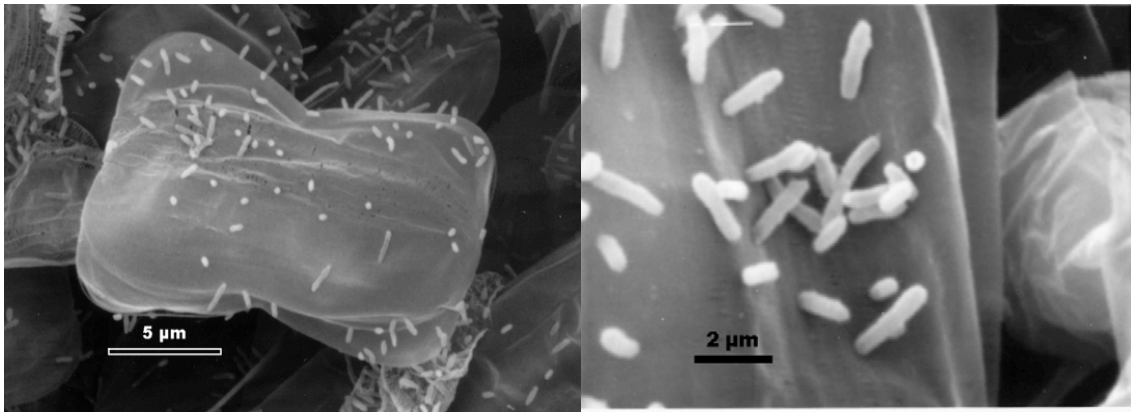


Abbildung 61: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Amphiprora kufferathii* mit epiphytischen Bakterien. Links Übersichtsaufnahme, rechts Detailaufnahme Bakterien.

Auf den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen waren keine Pili-Strukturen zu erkennen. Die Epibakterien scheinen auch nicht in die Schale der Diatomee einzudringen.

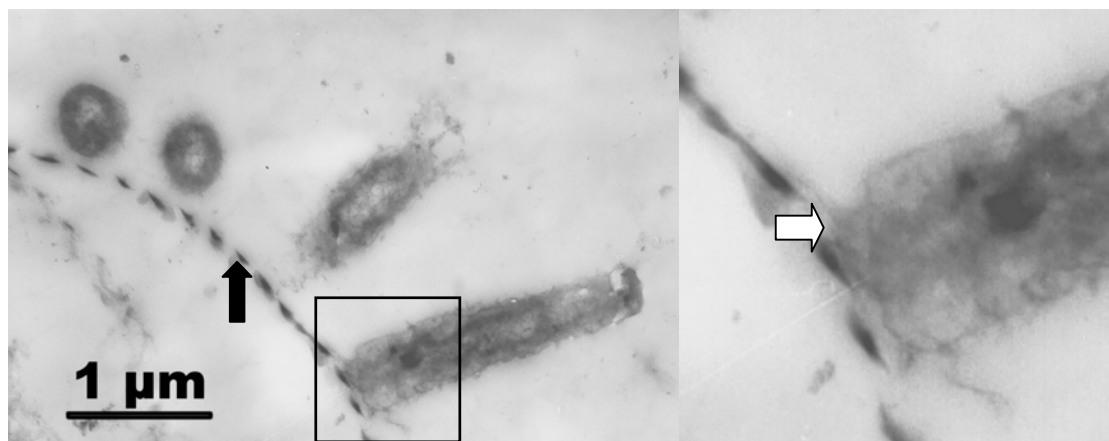


Abbildung 62: Links transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der Kontaktstelle zwischen *Amphiprora kufferathii* und den Epibakterien. Rechts Ausschnittsvergrößerung (↑= Silikatschale (Frustule) von *A. kufferathii*, ⇨= diffuser Bereich an der Kontaktstelle).

Auch bei den transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen waren keine Pili-Strukturen an den Bakterien zu erkennen. Ein Eindringen der Bakterien in die Algenzelle konnte ebenfalls nicht festgestellt werden. Auffallend ist ein diffuser Bereich zwischen Bakterium und der Schale von *A. kufferathii*. Dieser „Schatten“ weist auf die Beteiligung exolopomerer Substanzen bei der Anheftung der Bakterien an die Diatomee hin.

## D Diskussion

### 1 Die Mischkultur als Modellsystem

#### 1.1 Etablierung einer axenischen Kultur von *Amphiprora kufferathii*

Zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Spezies ist es unabdingbar, Reinkulturen der beteiligten Organismen zu etablieren. Aussagen über die gegenseitige Beeinflussung können nur dann getroffen werden, wenn die Reaktionen der einzelnen Organismen auf veränderte Umweltbedingungen bekannt sind.

Um axenische Algenkulturen zu erhalten können unterschiedliche Verfahren eingesetzt und kombiniert werden. Die Dichtegradientenzentrifugation ist eine Methode, um angeheftete und freilebende Bakterien mechanisch von den Algen zu trennen (Cho *et al.* 2002). Diese Methode wurde auch bei der Mischkultur aus *A. kufferathii* und den Bakterien angewendet. Nach der Zentrifugation durch Percoll waren die Diatomeen nicht mehr lebensfähig. Wahrscheinlich wirkten die veränderten osmotischen Bedingungen und die mechanische Belastung letal.

Eine weitere Strategie zur Trennung von Bakterien und Algen ist das Ausplattieren auf Festmedien (Cho *et al.* 2002). Kolonienbildende Strukturen der Alge werden abgenommen und erneut ausplattiert, bis eine axenische Kultur vorliegt. Wie viele nicht benthische Diatomeen ist *A. kufferathii* nicht in der Lage auf Festmedien zu wachsen und somit für dieses Verfahren ungeeignet.

Die häufigste Methode zur Etablierung axenischer Algenkulturen ist die Anwendung von einzelnen oder die Kombination verschiedener Antibiotika (Connell und Cattolico 1996; Cottrell und Suttle 1993; Kim *et al.* 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in bakterienbehafteten Kulturen von *A. kufferathii* Penicillin, Ampicillin, Streptomycin und Chloramphenicol eingesetzt. Sowohl die Kombination aus Penicillin, Streptomycin und Chloramphenicol, als auch die alleinige Anwendung von Streptomycin und von Chloramphenicol führte zum Absterben der Diatomee. *A. kufferathii* reagierte bereits auf geringe Konzentrationen dieser Antibiotika empfindlich. Chloramphenicol wird vor Verwendung in Ethanol gelöst. Dies mag zur schädigenden Wirkung auf Algen beitragen (Choi *et al.* 2002).

Die Behandlung mit Penicillin zeigte im vorliegenden Fall keine Wirkung auf die Bakterien. Schleimfilme, die um die Aggregate aus Algen und Bakterien gebildet werden, können letztere vor dem Antibiotikum schützen (Cho *et al.* 2002).

Ampicillin ist ein halbsynthetisches Penicillin und konnte auch in hohen Konzentrationen der Diatomeenkultur beigefügt werden, ohne dass diese abstarb. Nach einer Woche Inkubation waren in der *A. kufferathii* Kultur keine Bakterien mehr

nachweisbar. Mit der Anwendung hoher Antibiotika-Konzentrationen sollte die Gefahr von Resistenzbildungen minimiert werden (Cho *et al.* 2002). Ampicillin konnte vom mir auch bei weiteren Eisdiatomeen wie *Corethron pennatum*, *Nitzschia lecontei*, *Nitzschia medioconsticta* und *Navicula gelida* erfolgreich angewendet werden.

Mit der Etablierung einer axenischen Kultur von *A. kufferathii* wurde die Voraussetzung für vergleichende Studien geschaffen. Zusammen mit den isolierten Bakterien lag nun ein Modellsystem zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen *A. kufferathii* und den epiphytischen Bakterien vor.

## **1.2 Bakterien der Mischkultur**

Inwieweit die vorhandene Mischkultur als Modellsystem zur Untersuchung der Bakterien-Diatomeen-Wechselwirkungen herangezogen werden kann, hängt der Natürlichkeit der Kultur ab. Die für die Untersuchungen verwendete Mischkultur stammt aus dem Jahr 1986 und wurde vielfach transferiert. Dies könnte zur Veränderung der bakteriellen Artenzusammensetzung in der Kultur geführt haben. Derartige Verschiebungen der Artenzusammensetzung in Mischkulturen aus Diatomeen und Bakterien sind bereits beobachtet worden (Schäfer *et al.* 2002). Entscheidend ist, wie stark die Veränderungen im Vergleich zum natürlichen Zustand sind. Zur Beurteilung des Modellsystems müssen die Bakterien der Mischkultur identifiziert und mit Arten aus dem antarktischen Meereis verglichen werden. Da bis zum Abschluss der Arbeiten keine frischen Proben aus der Antarktis zur Verfügung standen, musste dieser Vergleich an Befunden aus der Literatur erfolgen.

Zur Identifizierung von Bakterien können zwei Wege beschritten werden. Zum einen die klassische Mikrobiologie mit Anreicherungen auf Voll- und Selektivmedien mit anschließender molekularbiologischer Charakterisierung. Zum anderen die kulturunabhängige Identifizierung über Klonierungen (Bitschgi und Giovannoni 1991; Giovannoni *et al.* 1990; Hugenholtz *et al.* 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden beide Methoden angewendet. Drei Bakterienspezies sind in den Isolationsversuchen angereichert worden und über die Sequenzierung ihrer 16S-rRNS Gene identifiziert worden. Die Isolate AHALF1A und AHALF2A wurden in der Klasse Alphaproteobacteria der Familie Rhodobacteraceae zugeordnet. Die engste verwandtschaftliche Beziehung (99,1% Übereinstimmung, Tab. 17) besteht laut phylogenetischen Analyse (Abb. 12) mit einer arktischen *Sulfitobacter* Spezies („Arctic *Sulfitobacter* sp., unveröffentlicht). Innerhalb der Gattung *Sulfitobacter* sind auch antarktische Vertreter bekannt (Labrenz *et al.* 2000).

Die Isolate AHCF1A und AHCF2A gehören laut phylogenetischer Analyse innerhalb der Bacteroidetes-Gruppe zur Familie der Flavobacteriaceae. Diese Isolate zeigen im



## (D) Diskussion

---

Stammbaum (Abb. 13) eine enge Verwandtschaft zu der Sequenz eines bisher unkultivierten *Cellulophaga*-Stammes, welcher im Rahmen einer Studie zur bakteriellen Biodiversität im antarktischen Packeis gewonnen wurde (Brown und Bowman 2001). In näherer Verwandtschaft der Isolate AHCF1A und AHCF2A sind weitere Vertreter aus antarktischen Gewässern zu finden (Bowman *et al.* 1997; Brown und Bowman 2001). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass sich die in der Mischkultur identifizierte *Cellulophaga*-Art seit Isolierung aus dem Meereis im Jahre 1986 in der Kultur befindet.

Das Isolat AHGM01 wurde innerhalb der Gammaproteobakterien in die Familie der Alteromonaceae eingeordnet (Abb. 14). Der nächste Verwandte des Isolates ist *Colwellia psychroerythrus*, ein Bakterium aus dem antarktischen Packeis (Bowman *et al.* 1997). In der Gattung *Colwellia* befinden sich mit *C. psychroerythrea*, *C. demingiae* und *C. hornerae* weitere antarktische Vertreter (Bowman *et al.* 1997; DeLong *et al.* 1993; Eilers *et al.* 2000; Urakawa und Kita-Tsukamoto 1999). Die in der Mischkultur identifizierte *Colwellia*-Art scheint sich somit ebenfalls seit der Probennahme in der Kultur zu befinden.

Zu der Identifizierung über Isolationsversuche wurden auch Klonierungen der gesamten 16S-rRNS Gene aus der Mischkultur vorgenommen. Innerhalb der 96 Klone konnten zwei Bakterienspezies identifiziert werden. Ausgewählte Vertreter dieser Klone wurden analysiert. Die Klone MH02, MH04 und MH06 wurden im Arb-Stammbaum (Abb. 17) in der Klasse der Alphaproteobakterien in der Familie Rhodobacteriaceae eingeordnet. Der nächste Verwandte war *Octadecabacter antarcticus*, ein Bakterium aus dem antarktischen Meereis (Gosink *et al.* 1997). Dieses Ergebnis wurde durch die BLAST-Suche in der EBI-Datenbank bestätigt. Mit einer für *O. antarcticus* spezifischen FISH-Sonde (Abschnitt C 2.3) konnte diese Zuordnung verifiziert werden. Auch hier ist anzunehmen, dass sich die *Octadecabacter*-Art seit der Probennahme in der *A. kufferathii*-Kultur befindet.

Die Klone MH09, MH14 und MH16 wurden der Bacteroidetes-Gruppe innerhalb der Familie Flavobacteriaceae zugeordnet. Der nächste Verwandte ist eine Sequenz mit der Bezeichnung „Marine psychrophie IC076“, einem Isolat aus dem antarktischen Meereis (Bowman *et al.* 1997).

Alle fünf identifizierten Bakterien in der Mischkultur haben nach der phylogenetischen Analyse mit dem Arb-Programm und der BLAST-Suche ihren nächsten Verwandten im Meereis der Arktis oder Antarktis. Bei *Colwellia* sp., *Cellulophaga* sp., *Psychroflexus* sp. und *Octadecabacter antarcticus* handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Bakterien, die auch in der Natur assoziiert mit *A. kufferathii* vorkommen oder sich einen

Lebensraum mit dieser Diatomee teilen. Die identifizierte *Sulfitobacter*-Spezies stammt auch mit hoher Wahrscheinlichkeit aus der Antarktis. Eine Zusammenstellung der identifizierten Bakterien befindet sich in Tabelle 25.

**Tabelle 25: Aufstellung der isolierten Bakterien innerhalb der Mischkultur und ihrer nächsten Verwandten.**

Bezeichnung	Nächster Verwandter	Region	Zugriffsnummer EBI-Datenbank	Quelle
<i>Sulfitobacter</i> sp. (Isolat)	Arctic <i>Sulfitobacter</i> sp.	Meereis Arktis	AY573046	(Lee <i>et al.</i> unveröffentlicht)
<i>Colwellia</i> sp. (Isolat)	<i>Colwellia psychroerythrus</i>	Meereis, Antarktis	AF001375	(Bowman <i>et al.</i> 1997)
<i>Cellulophaga</i> sp. (Isolat)	<i>Cellulophaga</i> sp.	Meereis, Antarktis	AF277558	(Bowman <i>et al.</i> 1997)
<i>Octadecabacter antarcticus</i> (Klon)	<i>Octadecabacter antarcticus</i>	Meereis, Antarktis	U14583	(Gosink <i>et al.</i> 1997)
<i>Psychroflexus</i> sp. (Klon)	Marine psychrophile IC076	Meereis, Antarktis	U85882	(Bowman <i>et al.</i> 1997)

Bakterien, die in den Anreicherungsversuchen isoliert wurden, konnten über die Klonierung in der Mischkultur nicht nachgewiesen werden. Umgekehrt konnten die in der Klonbank identifizierten Bakterien nicht isoliert werden. Hierfür gibt es verschiedene Erklärungen:

99,9% der marinen Bakterien sind nach Ferguson *et al.* (1984) auf marinem Agar 2216 nicht kultivierbar. Durch neue Ansätze in den Kultivierungstechniken ließ sich diese Zahl etwas reduzieren. Im marinen Milieu herrschen vornehmlich oligotrophe Bedingungen vor. Die genaue Abstimmung der Bedingungen für eine erfolgreiche Anreicherung mariner Bakterien gestaltet sich oft schwierig (Schut *et al.* 1997). Nicht nur die Menge an Kohlenstoff ist entscheidend, sondern auch die Zusammensetzung verschiedener Kohlenstoffquellen.

Auf marinen Standardmedien werden zumeist Bakterien angereichert, die in der unrsprünglichen Ausgangsprobe nur in geringen Abundanzen vorkommen (Eilers *et al.* 2000). Weitere Gründe für eine schwierige Kultivierung mariner Bakterien werden mit der Anreicherung toxischer Substanzen und Nährstoffaufzehrung angegeben (Stevenson 1978). Auch virale Infektionen (Weinbauer und Suttle 1996; Wichels *et al.* 1999) und die Unfähigkeit einiger Bakterienarten an der Grenze zwischen Luft und Festmedium Kolonien zu bilden kommen in Betracht (Eilers *et al.* 2000). Diese

Ursachen erklären, warum *Octadecabacter antarcticus* und *Psychroflexus* sp. zwar über die Klonierung identifiziert, aber nicht isoliert werden konnten.

Die isolierten Bakterien *Sulfitobacter* sp. und *Colwellia* sp. wurden hingegen in der Klonbank nicht wiedergefunden. Derartige Diskrepanzen zwischen Klonierungen und Isolationsversuchen sind bereits häufiger beobachtet worden (Eilers *et al.* 2000; Suzuki *et al.* 1997).

Die zur Klonierung verwendete Kultur zuvor intensiv gewaschen (Abschnitt B 1.1) wodurch das freilebende Bakterium *Colwellia* sp. aus der Mischkultur entfernt wurde.

Eine mangelnde Lyse der Bakterien zu Beginn der Klonierungsversuche könnte ebenfalls zu den Abweichenden Ergebnissen beigetragen haben. Dadurch wird die DNS der Bakterien mit robusterer Zellwand wesentlich seltener im Template der ersten PCR vorliegen als die von Bakterien mit weniger starker Zellwand.

Eine unzureichende Primerbindung an die entsprechenden Zielbereiche führt ebenfalls dazu, dass Bakterienarten von einer Klonbank nicht erfasst werden (Glöckner *et al.* 1999). Auch eine zu geringe Anzahl untersuchter Klone kann das Auffinden seltener Bakterienarten der Originalprobe in der Klonbank verhindern (Eilers *et al.* 2000).

Im hier vorliegenden Fall wurden die Bakterien nur durch wiederholtes Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 4°C aufgeschlossen. Zusätzliche Aufschlussmethoden wie Ultraschall oder der Einsatz von Lysozym hätten eventuell zum größeren Erfolg geführt.

Die beschriebenen Vorgänge und Prozesse beeinträchtigen auch die Resultate zu den Abundanzen der einzelnen Bakterienarten. Dies erklärt unterschiedlichen Ergebnisse zwischen der Klonierung und der Untersuchung über FISH (Abb. 16 & 25). Die FISH stellt dabei die zuverlässigste Methode zur Untersuchung der Biodiversität in einer Umweltprobe dar. Über mikroskopische Auszählungen können sichere Angaben über Abundanzen getroffen werden.

### **1.3 Häufigkeit der Bakterien in der Mischkultur und Eignung als Modellsystem**

Um die Eignung der Mischkultur als Modellsystem eingehender zu untersuchen, war es wichtig die Verteilung der Bakteriengruppen in der Kultur zu kennen. Auch in diesem Fall sollte geprüft werden, inwieweit die Verhältnisse in der Mischkultur mit denen im antarktischen Meereis übereinstimmen.

Die Auszählungen der einzelnen Bakteriengruppen in der Mischkultur ergab eine Dominanz der Alphaproteobakterien. Insbesondere *Octadecabacter antarcticus* machte bis zu 70% der Gesamtpopulation aus. Dieses Bakterium lebt angeheftet auf

*Amphiprora kufferathii* und teilt sich diesen Lebensraum mit Vertretern der Bacterioidetes-Gruppe (*Cellulophaga* sp., *Psychroflexus* sp.) und *Sulfitobacter* sp.. *Cellulophaga* sp. und *Psychroflexus* sp. können in der Mischkultur Abundanzen von bis zu 15% erreichen. Die freilebenden Gammaproteobakterien (*Colwellia* sp.) haben einen Anteil von maximal 10% der Bakterienpopulation.

Die Meereisgesellschaften (SIMCO) werden von den Gammaproteobakterien dominiert. Sie haben in SIMCO's der Arktis und Antarktis einen Anteil von 36-50% (Brinkmeyer *et al.* 2003). Alphaproteobakterien und Vertreter der Bacterioidetes-Gruppe können einen Anteil von bis zu 25% erreichen (Brinkmeyer *et al.* 2003).

Damit hat sich das Verhältnis der einzelnen Bakteriengruppen innerhalb der Mischkultur im Vergleich zur Situation in der Antarktis zugunsten von *O. antarcticus* verschoben. In der SIMCO dominieren Gammaproteobakterien und Vertreter der Bacterioidetes-Gruppe (Brown und Bowman 2001). Untersuchungen zur Zusammensetzung der Bakterienpopulationen auf Eisdiatomeen sind mir nicht bekannt. Schäfer *et al.* (2002) untersuchten die Bakterienpopulationen in Kulturen von sechs Diatomeen aus der Nordsee. Hier dominierten die Alphaproteobakterien und Bakterien der Bacterioidetes-Gruppe, Gammaproteobakterien fehlten. Im Vergleich zu der natürlichen Situation (Abb. 4), hat sich auch hier das Verhältnis in Richtung der Alphaproteobakterien verschoben. Wie in der *A. kufferathii*-Bakterien-Mischkultur baute sich in den Untersuchungen von Schäfer *et al.* (2002) eine stabile Bakterienpopulation mit den gleichen dominierenden Gruppen auf. Weitere Untersuchungen sind notwendig um festzustellen, ob die Verschiebung der Abundanzen in Richtung Alphaproteobakterien ein allgemeiner Trend in Diatomeen-Kulturen ist.

Bakterien der Bacterioidetes-Gruppe und der Alphaproteobakterien werden ein großer Anteil an der enzymatischen Aufspaltung von partikulärem (POC) und gelöstem (DOC) Kohlenstoff zugesprochen (Cottrell und Kirchmann 2000). Die Lyse komplexer organischer Kohlenstoffverbindungen wie Polysaccharide durch extrazelluläre Enzyme findet vermutlich vor allem durch Alphaproteobakterien statt (Riemann *et al.* 2000). Diatomeen sondern Exudate aus Polysacchariden und weiteren komplexen Kohlenwasserstoffen ab (Alcoverro *et al.* 2000; Wang *et al.* 1997; Wang *et al.* 2000). Diese könnte der Grund für eine Anreicherung von Alphaproteobakterien in Diatomeenkulturen sein.

Die dominierende Bakterienart *Octadecabacter antarcticus* und die restlichen identifizierten Bakterien, bis auf *Sulfitobacter* sp., sind Vertreter der SIMCO. Die Mischkultur kann durch den hohen Anteil antarktischer Meereis-Bakterien als Modellsystem für die Untersuchungen der Bakterien-Diatomeen-Wechselwirkungen in der SIMCO herangezogen werden.

Die Wechselwirkungen zwischen Bakterien und Diatomeen können anhand der Mischkultur untersucht werden, unter Berücksichtigung, dass durch die Reduzierung der Diversität die spezifischen Effekte der Bakterien verstärkt oder abgeschwächt werden können. Trotz dieser Einschränkungen ist die Mischkultur zusammen mit der axenischen Kultur von *Amphiprora kufferathii* ein geeignetes Instrument zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen der Diatomee und den epiphytischen Bakterien.

## **2 Wechselwirkungen zwischen *Amphiprora kufferathii* und den epiphytischen Bakterien beim Oxidationsschutz**

### **2.1 Wechselwirkungen beim Oxidationsschutz**

Wasserstoffperoxid hat innerhalb von Pflanzenzellen Einfluss auf zahlreiche Prozesse. Durch  $H_2O_2$  wird die Photosynthese gehemmt, unter anderem durch das Herauslösen von Mn aus dem Wasserspaltungsapparat am PS II (Samuilov *et al.* 2001). Zudem ist Wasserstoffperoxid an der Induzierung des programmierten Zelltodes (PCD, Apoptose) beteiligt (Orozco-Cárdenas *et al.* 2001). Zur Beseitigung von Wasserstoffperoxid stehen Pflanzenzellen eine Reihe von enzymatischen und nicht enzymatischen Prozessen zur Verfügung (Abschnitt A 4.1).

Schriek (2000) postulierte eine aktive Beteiligung der epiphytischen Bakterien am Abbau von Wasserstoffperoxid bei *A. kufferathii*. Nach Anpassung einer photometrischen Methode zur Bestimmung von  $H_2O_2$  in Meerwasser (Abschnitt B 4.1) wurde diese Hypothese bestätigt.

Vergleichende Messungen wurden an axenischen und bakterienbehafteten Kulturen von *A. kufferathii* nach Zugabe von 6,5 pmol/Algenzelle  $H_2O_2$  durchgeführt. Dieses wurde von der bakterienbehafteten Kultur bis zu 30% schneller abgebaut als von der axenischen Kultur. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass die Bakterien einen Einfluss auf die Wasserstoffperoxid-Konzentration im Medium haben (Abb. 35).

Zum gleichen Ergebnis kam eine Studie zum Einfluss von *Pseudomonas* ssp. auf Flüssigkulturen von Pflanzenzellen (Baker *et al.* 1997). Auch hier erfolgte ein schnellerer Abbau von Wasserstoffperoxid durch die Aktivität von Bakterien. Dabei sind Bakterien in der stationären Phase dazu in der Lage,  $H_2O_2$  schneller abzubauen als in der logarithmischen Phase (Katzuwon und Anderson 1992; Klotz und Hutcheson 1992).

Bakterien bauen nicht nur ihr eigenes, intern gebildetes Wasserstoffperoxid ab.  $H_2O_2$  ist hochgradig membranpermeabel und diffundiert leicht in die Bakterien, wo es abgebaut wird (Baker *et al.* 1997).

Um den Nachweis zu erbringen, dass von *A. kufferathii* gebildetes Wasserstoffperoxid durch die epiphytischen Bakterien abgebaut wird, wurden bakterienfreie und bakterienbehaftete Kulturen erhöhten Lichtintensitäten ausgesetzt.

Durch starke Bestrahlung mit photosynthetisch aktivem Licht (PAR), aber auch durch ultraviolette Strahlung (UVR), kommt es am Photosystem II zu einem hohem Reduktionsgrad des Ferredoxins, wodurch Elektronen verstärkt auf Sauerstoff übertragen werden (Mehler-Reaktion). Dadurch entsteht das Superoxid-Radikal, welches durch SOD zu  $H_2O_2$  abgebaut wird (Fryer *et al.* 2003; Yoshimura *et al.* 2000).

Oxidativer Stress in *A. kufferathii* ist durch hohe Lichtintensität induzierbar. Die Wasserstoffperoxid-Konzentration nahm in der axenischen Kultur deutlich zu und lag mit 295 nmol/l Medium doppelt so hoch wie in der bakterienbehafteten Kultur. Die *A. kufferathii*-Kultur mit Epibakterien unterschied sich hingegen kaum von der Kontrolle (Abb. 35). Damit wurde nachgewiesen, dass die epiphytischen Bakterien das von der Alge produzierte Wasserstoffperoxid abbauen. Hinsichtlich des Oxidationsschutzes könnte *A. kufferathii* somit von den epiphytischen Bakterien profitieren.

Die Membrangängigkeit des Wasserstoffperoxids begünstigt dessen Diffusion aus der Alge in das Medium. Von dort diffundiert das  $H_2O_2$  in die Epibakterien und wird von ihnen abgebaut. Entlang des entstehenden Konzentrationsgefälles kann neu gebildetes  $H_2O_2$  nachdiffundieren.

Durch Versuche zum Einfluss erhöhter Wasserstoffperoxid-Konzentration auf die Photosynthese unterstützt die Hypothese, dass *A. kufferathii* von den Bakterien beim Oxidationsschutz profitiert.

Mit zunehmender  $H_2O_2$ -Dosis (bis 1  $\mu\text{mol/l}$ ) nahm die Effizienz der Photosynthese in axenischen und bakterienbehafteten Kulturen rapide ab (Abb. 37 bis 39). In bakterienbehafteten Kulturen erholte sich die Photosynthese schneller als in den bakterienfreien. Dies ist auf den Abbau des Wasserstoffperoxids durch die Bakterien zurückzuführen. Erhöhte  $H_2O_2$ -Konzentrationen müssen umgehend beseitigt werden, damit die Photosyntheseaktivität aufrecht erhalten werden kann (Asada 1992; Takeda *et al.* 1995).

## **2.2 Oxidationsschutzenzyme**

Die epiphytischen Bakterien sind am Oxidationsschutz von *A. kufferathii* beteiligt. Zum Beleg wurden die Wege des Abbaus reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in den isolierten Bakterien und *A. kufferathii* untersucht. Katalase, Glutathion-Reduktase und Superoxid-Dismutase sind wichtige Oxidationsschutzenzyme, die an der Beseitigung von ROS beteiligt sind (Abschnitt C 4).

### **2.2.1 Oxidationsschutzenzyme der Bakterien**

Superoxid-Dismutasen sind in Bakterien ubiquitär (Loprasert *et al.* 1996). Drei verschiedene SODs mit unterschiedlichen prosthetischen Gruppen wurden bisher in Bakterien identifiziert. Mn- und Fe-SOD sind in Bakterien vornehmlich im Zytoplasma lokalisiert, während Cu/Zn-SOD periplasmatisch oder an die Aussenseite der Zellmembran gebunden ist (Battistoni 2003; Forest *et al.* 2000; Sansone *et al.* 2002). In den isolierten Bakterien wurden hauptsächlich Mn-SODs identifiziert (Tab 20). *Sulfitobacter* sp. wies als einziges Isolat eine Fe-SOD auf. Es ist anzunehmen, dass die gefundenen bakteriellen SODs aufgrund dieser Zuordnung ebenfalls im Cytoplasma lokalisiert sind.

In *Colwellia* sp. konnte keine SOD nachgewiesen werden. Dennoch müsste das Bakterium eine oder mehrere SODs besitzen. SOD ist das bislang einzige Enzym, das Superoxid beseitigen kann (Bowler *et al.* 1992). Es wurde gezeigt, dass bakterielle SOD-Mangelmутanten unter aeroben Bedingungen kaum überlebensfähig sind (Fridovich 1997; Strohmeier Gort und Imlay 1998). Vermutlich war der Anteil des Enzyms im Rohextrakt aus *Colwellia* sp. zu gering, um einen Nachweis über native PAGE zu erbringen.

In den epiphytischen Bakterien *Cellulophaga* sp. und *Sulfitobacter* sp. sowie im freilebenden Bakterium *Colwellia* sp. waren Enzyme mit Katalaseaktivität nachweisbar. Katalasen sind in Bakterien wichtige Enzyme zur Beseitigung von Wasserstoffperoxid (Cabiscol *et al.* 2000). Sie sind effektiver als Peroxidasen, da sie kein Co-Substrat benötigen. Katalasen haben einen hohen  $K_m$ -Wert und sind deswegen vor allem bei niedrigen  $H_2O_2$ -Konzentrationen besonders effizient (Baker *et al.* 1997). In vielen Bakterien wird Katalase hauptsächlich während des Übergangs von der Wachstums- in die stationäre Phase gebildet. Dies geschieht vermutlich, um das Genom und anderen wichtige Zellkomponenten gegen Oxidation während einer längeren Phase der Wachstumsstagnation zu schützen (Loprasert *et al.* 1996; Mongkulsuk und Helmann 2002).

Bakterielle Katalasen haben wahrscheinlich den größten Anteil am Abbau des von *A. kufferathii* produzierten Wasserstoffperoxids. Um hier gesicherte Aussagen treffen zu können, müsste eine Methode zur Bestimmung der intrazellulären  $H_2O_2$ -Konzentration in *A. kufferathii* entwickelt werden. Ob es sich bei den gefundenen bakteriellen Enzymen um monofunktionale Katalasen (HP11) oder um Katalasen-Peroxidasen (HP1) handelt, konnte nicht festgestellt werden.

Glutathion ist das wichtigste Antioxidanz in Bakterien (Puzon *et al.* 2002; Standeven und Wetterhahn 1991). Demnach kommt Glutathion-Reduktase als regenerierendes Enzym in Bakterien eine besondere Bedeutung zu. GRs wurden in allen

Bakterienisolaten gezeigt. Somit steht den Bakterien neben Katalasen auch der Glutathion-Zyklus zum Abbau von Wasserstoffperoxid zur Verfügung.

### 2.2.2 Oxidationsschutzenzyme von *Amphiprora kufferathii*

Die bisherigen Erkenntnisse bezüglich Superoxid-Dismutasen in *A. kufferathii* müssen korrigiert werden. Schriek (2000) berichtete von bis zu 13 SOD Isoenzymen in *A. kufferathii*, während in der vorliegenden axenischen Diatomeen-Kultur nur zwei SODs nachgewiesen werden konnten. Die anderen von Schriek identifizierten SOD's gehören zu den Bakterien. So gehört die von Schriek in *A. kufferathii* identifizierte Fe-SOD zu *Sulfitobacter* sp. (Abb.30).

Ob Diatomeen Katalasen besitzen, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Überwiegend wird davon ausgegangen, dass in den Bacillariophyceae keine Katalasen vorkommen. Eine ausführliche Zusammenstellung der Literatur befindet sich in Schriek (2000). Hazzard *et al.* (1997) berichteten erstmals von einer Katalaseaktivität in *Chaetoceros gracile*, ebenso Schriek (2000) in *Amphiprora (Entomoneis) kufferathii*.

Im Rahmen der Untersuchungen zu dieser Arbeit stellte sich heraus, dass in der axenischen Kultur von *A. kufferathii* keine Katalase vorhanden ist (Abb. 29). Schriek stand für seine Untersuchungen keine axenische Kultur zur Verfügung, weshalb sein Befund auf die Aktivität der Bakterien zurückzuführen ist. Ein Muster von zwei dicht übereinanderliegenden Banden mit Katalaseaktivität wurde von Schriek in nativen PAGE Gelen gezeigt (Abb. 63).

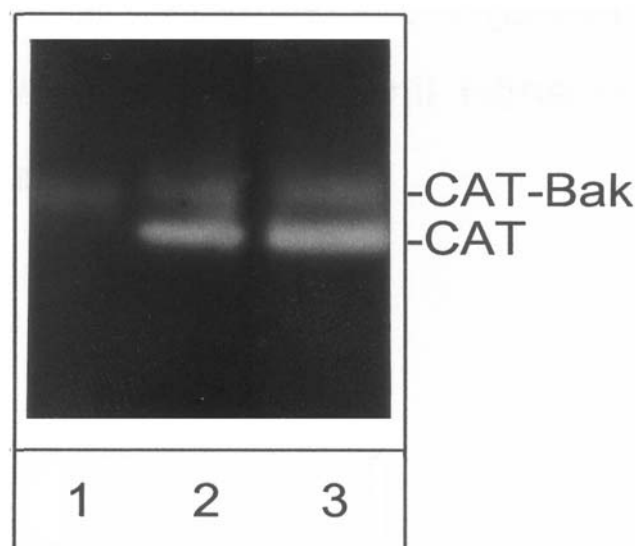


Abbildung 63: Katalaseaktivität in Extrakten aus *Amphiprora (Entomoneis) kufferathii* nach 0-80% Ammoniumsulfatfällung. Bahn1= Extrakt aus isolierten Bakterien, Bahn 2 und 3 Extrakt aus *A. kufferathii*-Kultur Schriek (2000).



## (D) Diskussion

---

Nach Isolationsversuchen erhielt Schriek ein Bakterium, dessen Katalaseaktivität der oberen Bande entsprach (Abb. 63, Bahn 1) und ordnete die untere Bande der Diatomee zu.

Die Fortsetzung der Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zeigte jedoch, dass in der *A. kufferathii*-Bakterien-Mischkultur, die von Schriek verwendet wurde nicht eine, sondern fünf Bakterienarten enthalten waren. Das in Abbildung 63 gezeigte Bandenmuster ergibt sich aus den Katalasen der einzelnen Bakterien zusammenfügen, z. B. aus den Katalasebanden von *Colwellia* sp. und *Cellulophaga* sp (Abb. 31 & 32).

Dies hebt die Bedeutung der Verwendung axenischer Kulturen hervor. Schon geringe bakterielle Kontaminationen verursachen irreführende Ergebnisse und Fehlinterpretationen. In der Studie von Hazzard *et al.* (1997) wurde für den Nachweis von Katalase *Chaetoceros*-Kulturen verwendet, die 20 Jahre zuvor isoliert wurden. In der Veröffentlichung gibt es keinen Hinweis darauf, dass Antibiotika zur Dekontamination der Diatomeen-Kultur verwendet wurden. Somit ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass auch hier bakterielle Katalaseaktivität gemessen wurde.

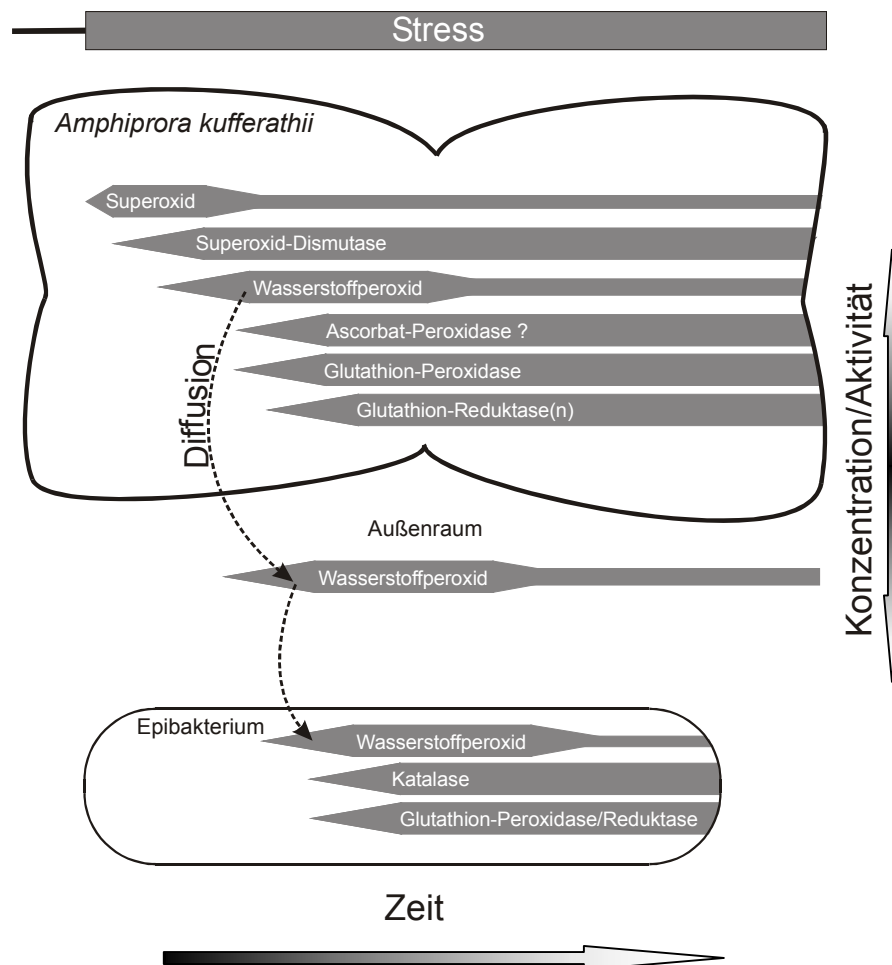
Aguilera *et al.* (2002) untersuchten den enzymatischen Oxidationsschutz polarer Makroalgen. In zehn untersuchten Braunalgen (Phaeophyceae) wurde nur bei zwei (*Fucus distichus* und *Laminaria saccharina*) Katalaseaktivität gefunden. Bei den verwendeten Proben handelte es sich um Freilandmaterial (pers. Mitteilung A. Dummermuth), somit ist eine Besiedlung mit Epibakterien wahrscheinlich. Phaeophyceae gehören wie die Bacillariophyceae zur Abteilung Heterokontophyta. Die Hypothese, dass Diatomeen keine Katalasen besitzen, könnte auf die Phaeophyceae und damit auf die Abteilung Heterokontophyta ausgeweitet werden.

Da Katalase ein evolutiv altes Enzym ist (Klotz *et al.* 1997), wäre von einem nachträglichen Verlust oder Inaktivierung des Katalase-Gens auszugehen. In Euglenophyceaeen konnte im Gegensatz zu anderen Chlorophyta ebenfalls keine Katalase nachgewiesen werden (Gross 1993; Yokota 1992), ein Hinweis, dass dieser Verlust im Laufe der Evolution eventuell mehrmals aufgetreten sein könnte.

Durch die Abwesenheit von Katalase muss der Abbau von Wasserstoffperoxid auf anderem Wege erfolgen. Dies könnte über den Ascorbat-Glutathion-Zyklus geschehen. Ascorbat-Peroxidase konnte von Schriek (2000) in *A. kufferathii* nicht gezeigt werden. Hingegen weist *A. kufferathii* zwei Glutathion-Reduktasen auf. Dadurch könnte auf einen erhöhten Umsatz von Glutathion schließen lassen, was ein Hinweis auf die Bedeutung des Glutathions bei der Beseitigung von Wasserstoffperoxid in *A. kufferathii* sein könnte.

### 2.3 Postulierung eines speziesübergreifenden Oxidationsschutzsystems

Die neu gewonnenen Erkenntnisse zur Beteiligung der epiphytischen Bakterien am Oxidationsschutz der Alge sowie die Ergebnisse der biochemischen Untersuchung der Oxidationsschutzenzyme lässt die Konzeption eines speziesübergreifenden Oxidationsschutzsystems zu (Abb. 64).



**Abbildung 64: Konzept des speziesübergreifenden Oxidationsschutzsystems**

Stress (z. B. hohe Lichtintensität) führt bei der Photosynthese von *A. kufferathii* zu einer erhöhten Produktion von Superoxid Anionen ( $O_2^-$ ), gefolgt von einer Aktivitätserhöhung der SOD (Abb. 64). Da SOD die Superoxid Anionen zu  $H_2O_2$  umsetzt, führt dies zu einer  $H_2O_2$ -Anreicherung in den Algenzellen, gefolgt von einer Aktivitätserhöhung von Glutathion-Peroxidase, Glutathion-Reduktase und Ascorbat-Peroxidase. Wasserstoffperoxid ist leicht membrangängig und diffundiert in den Außenraum. Dort wirkt das von der Alge produzierte  $H_2O_2$  als Stressor für die epiphytischen Bakterien, welche mit einer Erhöhung der Katalase- sowie Glutathion

Peroxidase- und Glutathion-Reduktase-Aktivität reagieren. Durch die Entfernung des extrazellulären Wasserstoffperoxids durch die Bakterien kann weiteres H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entlang des entstandenen Konzentrationsgefälles aus den Algen in den Außenraum diffundieren. Die Bakterien sind somit aktiv an der Entgiftung des photosynthetisch produzierten Wasserstoffperoxids beteiligt.

### **3 Weitere Wechselwirkungen zwischen *Amphiprora kufferathii* und Epibakterien**

#### **3.1 Stress durch erhöhte Temperatur**

Sowohl niedrige als auch hohe Temperaturen lösen oxidativen Stress aus. In Pflanzen ist eine Erhöhung der Temperatur auch mit einer steigenden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration und eine Aktivitätserhöhung antioxidativer Enzyme verbunden (Dat *et al.* 2000).

Das Photosystem II (PS II) ist der hitzelabileste Bestandteil des Photosyntheseapparates (Salucci und Crafts-Brandner 2004). Durch hohe Temperaturen wird der photosynthetische Elektronentransport von PS II gehemmt, während der von PS I gesteigert wird, was wahrscheinlich auf eine Permeabilitätsänderung der Thylakodmembranen zurückzuführen ist (Venkataramanaiah *et al.* 2003). PS I wird durch niedrige Temperaturen gehemmt (Sato *et al.* 1996).

Vor der Beeinträchtigung des photosynthetischen Elektronentransportes wird bereits die CO<sub>2</sub>-Fixierung durch Rubisco gehemmt (Salucci und Crafts-Brandner 2004). Bei Verminderung der Kohlenstoffdioxidfixierung werden in der Mehler Reaktion mehr Elektronen auf Sauerstoff übertragen, wodurch Superoxid entsteht (Dat *et al.* 2000).

Eine schützende Wirkung der epiphytischen Bakterien auf *A. kufferathii* bei erhöhten Temperaturen konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden (Abschnitt C 5.4). *A. kufferathii* hat ihr physiologisches Temperaturoptimum bei 2°C (Wanzek 1994). Temperatursenkung (Burdon *et al.* 1994; Hendry und Crawford 1994) als auch Temperaturerhöhung führen zu oxidativem Stress in Pflanzen (Larkindale und Knight 2002; Lesser 1996b). Es ist anzunehmen, dass durch erhöhte Temperaturen auch in *A. kufferathii* vermehrt reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden. Temperaturänderungen führen sowohl in höheren Pflanzen als auch in Algen zu einer erhöhten Freisetzung von Superoxid (Mishra *et al.* 1993; Mishra und Singhal 1992; Rao *et al.* 1996). Superoxid wird von *A. kufferathii* durch SODs zu Wasserstoffperoxid abgebaut.

Erhöhung der Temperatur und oxidativer Stress führen zu einer Denaturierung von Proteinen, DNS und Lipiden (Chase *et al.* 1998; Lesser 1996a). Dies bewirkt eine

Änderung der Membranstruktur in den Thylakoiden, wodurch die Photosynthese weiter beeinträchtigt wird (Asada und Takahashi 1987; Ludlow 1987).

Es ist zu vermuten, dass die schützende Wirkung der Epibakterien bei Temperaturerhöhung auf ihre Rolle beim Oxidationsschutz zurückzuführen ist. Das bei erhöhter Temperatur gebildete Wasserstoffperoxid in der Alge wird durch die epiphytische Bakterien teilweise beseitigt (Abschnitt 2.3). Dadurch werden die beschriebenen Schädigungen verhindert oder verzögert. Die bakterienbehaftete ist gegenüber der axenischen Kultur im Vorteil, wie auch in der Photosyntheseeffizienz erkennbar wird (Abb. 46 bis 49).

### **3.2 Osmotischer Stress**

Auf osmotischen Stress reagieren höhere Pflanzen wie bei Trockenheit. Dabei ist ebenfalls ein Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies zu beobachten (Dat *et al.* 2000). Auch bei osmotischen Stress kommt es zur Beeinträchtigung der Photosynthese (Morant-Manceau *et al.* 2004).

Pflanzen regulieren ihren osmotischen Druck durch Abgabe oder Aufnahme von anorganischen Ionen. Bei steigender Na<sup>+</sup> Konzentration im Außenmilieu sinkt die K<sup>+</sup> Konzentration in den Pflanzen, was Effekte auf zahlreiche Stoffwechselprozesse in den Zellen hat (Morant-Manceau *et al.* 2004).

Die Regulierung über anorganische Ionen stellt eine kurzfristige Lösung dar. Durch die Änderungen im Ionenhaushalt der Zellen werden zahlreiche Stoffwechselprozesse beeinträchtigt und Enzyme inhibiert. Synthese und Akkululation von osmotisch wirksamen organischen Substanzen wie Dimethylsulfoniompropionat (DMSP), Prolin oder Glycinbetain (compatible solutes) gleichen das osmotische Potential aus. Diese Stoffe haben zusätzlich stabilisierende Effekte auf Zellmembranen und Enzyme (Kirst 1996; Morant-Manceau *et al.* 2004).

Neben der Photosynthese wird auch der CO<sub>2</sub>-Stoffwechsel beeinträchtigt. Durch Verminderung der Kohlendioxidfixierung werden mehr Elektronen auf Sauerstoff übertragen (Mehler Reaktion), was zur Bildung von Superoxid führt (Dat *et al.* 2000).

In Kontrollkulturen liegt die Photosyntheseeffizienz bakterienbehafteter Kulturen etwas höher als die axenischer Kulturen. Bei leicht hypoosmotischem Stress (Abb. 41) war dies auch der Fall. Bei Überführung in stark hypersalines (90 PSU) oder stark hyposalines (5 PSU) Medium sinkt die Effizienz der Photosynthese in bakterienbehafteten Kulturen schneller ab als in den axenischen. Bei 70 PSU setzt die Erholungsphase nach den Salzschock in den bakterienbehafteten Kulturen fast 4 h später ein als in den axenischen Parallelen (Abb. 43).

In benthischen Diatomeen kommt es ab 50 PSU zu einer Hemmung des Wachstums und der Photosynthese (Visscher und Van Gernerden 1991). Salzstress führt zur erhöhten Produktion von Sauerstoffradikalen in Pflanzen und Algen (Hoekstra *et al.* 2001; Lee *et al.* 2001; Lutts und Guerrier 1995; Rijstenbil 2003). Das vorgeschlagene speziesübergreifende Oxidationsschutzsystem scheint hier in der Mischkultur nicht zu funktionieren. Bakterienbehaftete Kulturen sind bei starkem hypo- und hyperosmotischem Stress gegenüber axenischer Kulturen benachteiligt.

Es gibt zwei Möglichkeiten diesen Effekt zu erklären: 1) Diatomeen sind von einer Schicht aus Polysacchariden und Proteinen umgeben (Abschnitt 4). Diese Schleimschicht aus exopolymeren Substanzen (EPS) wird vor allem von pennaten Kieselalgen zur Fortbewegung und zur Anheftung an Substrate genutzt (van den Hoek 1993). Sie wird auch als Schutz vor Austrocknung in Lebensräumen angesehen, die zeitweise trocken fallen, da sie Wasser in den Zellen zurückhält (Decho 1990; Flemming und Wingender 2001a). Durch hyperosmotischen Stress diffundiert Wasser aus der Zelle in das Medium (Bisson und Kirst 1995). Bei hypoosmotischem Stress ist dies umgekehrt. Wenn die EPS-Schicht ein Schutz vor ein- oder austretendem Wasser ist, könnte der Besatz mit epiphytischen Bakterien einen Nachteil darstellen. Die Epibakterien reduzieren die Schutzschicht, indem sie sich von den EPS ernähren. Diese wird damit durchlässiger und Wasser kann leichter in die Zelle hinein- oder aus der Zelle herausdiffundieren.

2) Bei einem osmotischen Schock müssen die Epibakterien diesen ebenso regulieren wie die Kieselalge. Dies geschieht über die Aufnahme oder Abgabe von Ionen (Bisson und Kirst 1995). Es kommt zu einer Konkurrenzsituation zwischen *A. kufferathii* und den Bakterien, bei der den bakterienbehafteten Zellen weniger Ionen zur Verfügung stehen als den bakterienfreien Zellen.

Die beschriebenen Prozesse können die in Abschnitt C 5.3 gemachten Beobachtungen erklären. Hierzu sind aber noch weitere Untersuchungen erforderlich. Die schützende Wirkung der Bakterien durch das speziesübergreifende Oxidationsschutzsystem werden durch die oben beschriebenen Effekte aufgehoben oder überlagert.

### **3.3 Nährstoffe**

#### **3.3.1 Stickstoff**

Stickstoff ist ein wichtiger Bestandteil von Proteinen und Nukleinsäuren. Proteine enthalten bis zu 15% und Nukleinsäuren bis 13% Stickstoff (Shehawy und Kleiner 2001). Sowohl Algen als auch Bakterien können ihren Stickstoffbedarf über die Aufnahme von Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ), Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ), Harnstoff ( $\text{OC}(\text{NH}_2)_2$ ) und

Aminosäuren ( $\text{H}_2\text{N-R-COOH}$ ) decken. Ammonium und Nitrat werden dabei bevorzugt (Shehawy und Kleiner 2001).

Stickstoffverbindungen stellen einen essentiellen Nährstoff für Phytoplankton dar und limitieren im Meer oft das Wachstum von Mikroorganismen (Hasager *et al.* 2003). Da nur Cyanobakterien zur Fixierung von Luftstickstoff ( $\text{N}_2$ ) befähigt sind (Mulholland und Capone 2000), muss der Hauptanteil des bereits assimilierten Stickstoffs aus abgestorbenen Organismen und Exkrementen zurückgewonnen werden. Die Remineralisierung des an organischem Material gebundenen Stickstoffs erfolgt über bakterielle Zersetzung im Pelagial und in Sedimenten (Hasager *et al.* 2003; Herbert 1999). Der von den Bakterien regenerierte organische Stickstoff wird als Ammonium abgegeben und steht dem Phytoplankton wieder zur Verfügung (Ott 1996).

Der Abbau von Makromolekülen findet außerhalb der Bakterienzellen durch hydrolytische Enzyme statt (Pedersen *et al.* 1999).

Der Nährstoffversuch (Abschnitt C 5.5) hat gezeigt, dass bakterienbehaftete Kulturen von *A. kufferathii* höhere Zelldichten erreichen als axenische Kulturen. Nitrat und Nitrit nahmen sowohl in der Kontrollkultur (Vollmedium) als auch bei Stickstoffmangel innerhalb von 15 Tagen schnell ab. Die Ammoniumkonzentration war in allen Ansätzen gering und fluktuierte im Rahmen von Meßungenauigkeiten. Da Ammonium in geringen Konzentrationen vorlag, waren Nitrat und Nitrit die wichtigsten Stickstoffquellen innerhalb der Kulturen. In den Kontrollkulturen mit Vollmedium war nach 15 Tagen das Nitrat und Nitrit aufgebraucht (Abb. 51 - 53). Zu diesem Zeitpunkt beginnen die bakterienbehafteten Algenkulturen schneller zu wachsen als die axenischen Kontrollkulturen von *A. kufferathii*. In den Kulturen mit Stickstoffmangelmedium waren Nitrat und Nitrit bereits nach zwei Tagen aufgebraucht. Auch hier zeigen die Wachstumsdaten (Abb. 52 - 54) ab diesem Zeitpunkt ein besseres Wachstum der bakterienbehafteten im Vergleich zu den axenischen Kulturen. Dies wird damit erklärt, dass die Bakterien durch die Remineralisierung von Stickstoff aus abgestorbenem Material und Exudaten für die Diatomeen einen Vorteil darstellen und deren Wachstum stimulieren.

### **3.3.2 Phosphat**

Phosphat ist in Nukleinsäuren, Phospholipiden und komplexen Kohlenwasserstoffen enthalten. Zudem spielt es eine wichtige Rolle im Energiemetabolismus (Wagner und Falkner 2001). Im Gegensatz zum Stickstoff besitzt Phosphat kein atmosphärisches Reservoir, weshalb es im marinen Stoffkreislauf eine schnelle Umsatzrate (bis wenige Stunden) aufweist (Ott 1996). Die Organismen nehmen Phosphat in Form des Orthophosphat auf ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) auf. Auch Phosphat wird von Bakterien aus organischem

Material remobilisiert. Die Abspaltung des Phosphates von organischen Verbindungen erfolgt außerhalb der Bakterien durch enzymatische Hydrolyse (Wagner und Falkner 2001).

In allen untersuchten Kulturen des Nährstoffversuches (Abschnitt C 5.5) war das Phosphat nach sechs Tagen stark abgesunken. Ab dem zweiten Tag zeigten die axenischen gegenüber den bakterienbehafteten Kulturen unter Phosphatmangel ein etwas besseres Wachstum (Abb. 50). Das Verhältnis war somit umgekehrt zum Stickstoff. Es schien zu einer Konkurrenz zwischen *A. kufferathii* und den epiphytischen Bakterien gekommen zu sein.

Unter Phosphatmangelbedingungen sind Algen sowie Bakterien in der Lage, das vorhandene Phosphat in Form von Polyphosphaten zu speichern um den eigenen Bedarf so lange wie möglich zu decken (Kronberg *et al.* 1999). Bakterien besitzen eine höhere Affinität für anorganische Nährstoffe wie Stickstoff und Phosphat als andere Planktonorganismen (Kisand *et al.* 2001). Dadurch können sie das von ihnen remobilisierte Phosphat schneller aufnehmen als *A. kufferathii*. Dieser Prozess würde das verminderte Wachstum der bakterienbehafteten im Vergleich zu den axenischen Kulturen unter Phosphatmangel erklären.

### **3.3.3 Silikat**

Silikat ( $\text{SiO}_2$ ) ist im Meerwasser vor allem für Diatomeen von Bedeutung. Ihre filigranen Schalenstrukturen sind aus Silikat aufgebaut (van den Hoek 1993). Für diese Gruppe von Planktonorganismen stellt Silikat bei der Ausbildung von Blüten den limitierenden Faktor da (Smetacek 1999). Es wird vermutet, dass das dem Meerwasser durch die Diatomeen entzogene Silikat über Bakterien remobilisiert wird (Bidle *et al.* 2002; Bidle und Azam 1999). Dabei wird das die Silikatschale umgebende organische Material durch die Bakterien entfernt, so dass das Silikat vom Meerwasser gelöst werden kann (Bidle *et al.* 2003).

Der in dieser Arbeit durchgeführte Nährstoffversuch (Abschnitt C 5.5) zeigte, dass bakterienbehaftete Kulturen unter Silikatmangel höhere Zelldichten erreichen als axenische Kulturen von *A. kufferathii* (Abb. 50). In dem Versuch wurden Glasgefäße benutzt, daher konnte kein absolut silikatfreies Medium hergestellt werden. Es zeigte sich aber, dass in allen untersuchten Kulturen nach dem sechsten Versuchstag fast das gesamte Silikat aufgebraucht war und sowohl im Vollmedium als auch in den anderen Medien ab diesem Tag Silikatmangel herrschte. Das Wachstum bakterienbehafteter Kulturen im Silikatmangelmedium stieg erst ab dem 20. Versuchstag über das der axenischen Kultur. Vorher lag die Zelldichte der axenischen Diatomeen leicht über denen mit Epibakterien. Es könnte vermutet werden, dass mit

zunehmendem Alter der Kultur der Anteil abgestorbener Kieselalgen steigt. Durch den Abbau des organischen Materials werden die Diatomeenschalen besser löslich. Dadurch könnte der zeitliche Versatz des gesteigerten Wachstums bakterienbehafteter Kulturen von *A. kufferathii* unter Silikatmangel erklärt werden.

Der Nährstoffversuch hat gezeigt, dass die Bakterien den Nährstoffgehalt in der Mischkultur beeinflussen. Außer bei Phosphatmangel hat die beschleunigte Remobilisierung von Nährstoffen einen positiven Effekt auf das Wachstum von *A. kufferathii*. Die bakterielle Umsetzung der Puffersubstanz Glycylglycin zu Glycin hat keinen Einfluss auf das Wachstum von *A. kufferathii*. Auch die Beteiligung der epiphytischen Bakterien am Oxidationsschutz konnten die wachstumsfördernde Wirkung der Bakterien nicht erklären. Die bessere Verfügbarkeit von Stickstoff und Silikat hat meines Erachtens den größten Anteil am positiven Effekt der Epibakterien auf das Wachstum von *A. kufferathii*.

#### **4 Biofilme und Mikrobenmatten**

*Amphiprora kufferathii* wächst zusammen mit anderen Eisdiatomeen wie *Corethron pennatum*, *Nitzschia* - und *Navicula*-Arten in dichten Matten unter dem antarktischen Meereis (Horner *et al.* 1992). Auch Bakterien kommen hier gehäuft vor (Staley und Gosink 1999).

Biomatten und Biofilme sind ubiquitär. In der Umwelt gibt es praktisch keine Grenzflächen, die nicht von Biomatten besiedelt sind (Flemming und Wingender 2001a). Biofilme bilden sich nicht nur an Grenzflächen zwischen Wasser und festen Substraten, sondern auch zwischen Wasser und Atmosphäre (Nekton), zwischen festem Substrat und Atmosphäre sowie zwischen Flüssigkeiten verschiedener Dichte (Flemming und Wingender 2001a).

Lange wurde die Bedeutung der Biomatten als universelle Lebensform der Mikroorganismen übersehen (Borchardt *et al.* 2001). Die älteste bislang bekannte Form von Lebensgemeinschaften sind mineralisierte Biomatten, die fossilen Stromatolithe (3,5 Milliarden Jahre) (Flemming und Wingender 2001a)

Die enge Anordnung von Mikroorganismen in Biofilmen lassen Umsetzungsprozesse organischer und anorganischer Verbindungen schneller ablaufen als in pelagischen Systemen (Sutherland 2001). Die Diffusion wird innerhalb der Biomatten nicht so stark behindert wie angenommen werden könnte. Dennoch kann es in tieferen Schichten ausgeprägter Biofilme zu anaeroben Bedingungen kommen (Flemming und Wingender 2001a).



## (D) Diskussion

Das Zusammenleben in Biomatten bringt einige Vorteile: Der Biofilm bietet Schutz vor pH-Extremen, Salzbelastungen, hydraulischer Belastung und toxischen Metallionen durch deren Bindung an exopolymere Substanzen (EPS). Zudem kommt es in der gelartigen Matrix aus EPS zur Anreicherung von Nährstoffen (Jang *et al.* 2001; Wuerz *et al.* 2001).

Alle Formen von Biofilmen und Biomatten werden von EPS zusammengehalten. Ihre Zusammensetzung schwankt je nach äußeren Bedingungen wie z. B. Nährstoffangebot. EPS bestehen zum größten Teil aus anionisch geladenen oder neutralen Polysacchariden, Proteinen, DNS und Lipiden (Wuerz *et al.* 2001).

**Tabelle 26: Zusammensetzung der exopolymeren Substanzen und Anteil der Komponenten (Flemming und Wingender 2001b).**

Komponente	Gehalt in EPS
Polysaccharide	40-95%
Proteine	<1-60%
Nukleinsäuren	<1-10%
Lipide	<1-40%

EPS dienen Diatomeen zur Anheftung und Bewegung (Cooksey und Wigglesworth-Cooksey 1995; Wang *et al.* 1997; Wang *et al.* 2000). Die exopolymeren Substanzen von Diatomeen sind an der Bildung von Aggregaten wie dem „Marine Snow“ beteiligt (Alcoverro *et al.* 2000).

Bakterien können die Diatomeen-Exudate als Kohlenstoffquellen nutzen (Ploug und Grossart 2000; Smith und Underwood 1998). Es wird angenommen, dass dies auch zwischen *Amphiprora kufferathii* und den epiphytischen Bakterien der Fall ist (McGrath Grossi *et al.* 1984). Die Untersuchung der durch die epiphytischen Bakterien nutzbaren Kohlenstoffquellen (Abschnitt C 5.1.1) sprechen für eine derartige Beziehung. *Cellulophaga* sp. kann eine Vielzahl von Zuckern verwerten. Darunter auch Mannose und Glucuronsäure, wichtige Bestandteile der Diatomeenzellwand (van den Hoek 1993). Aminosäuren wie Glutaminsäure und Asparaginsäure, gewonnen aus den Proteinbestandteilen der Diatomeen-Exudate, können von *Cellulophaga* sp. ebenfalls umgesetzt werden. Daten zu den nutzbaren Kohlenstoffquellen der anderen Bakterien liegen leider nicht vor.

Bakterien benutzen ihrerseits zwei Formen von Anheftungsmechanismen. Einerseits EPS, um sich an die Diatomeen anzuheften, andererseits wurden Fortsätze beobachtet (McGrath Grossi *et al.* 1984). Bakterielle Fortsätze wie Flagellen, Pili und Zelloberflächenproteine spielen bei der Biofilmbildung eine wichtige Rolle (Flemming und Wingender 2001a). Es gibt verschiedenen Typen von Pili. Die sogenannten Typ IV

Pili sind für Anheftung und Fortbewegung zuständig. Hauptsächlich werden Pili aber bei Infektionsprozessen beobachtet (Soto und Hultgren 1999).

Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit, konnten Pili-Strukturen bei den Epibakterien auf *A. kufferathii* nicht beobachtet werden (Abschnitt C 6). Die Anheftung an die Diatomee erfolgt hier über EPS.

In Biofilmen befinden sich die Organismen zusammen auf engstem Raum und können Wechselwirkungen ausbilden. Hohe Zelldichten erlauben den Informationsaustausch in Form von horizontalem Gentransfer und niedermolekularen Signalmolekülen (Flemming und Wingender 2001a). Zell-Zell-Kommunikation über niedermolekulare Signalmoleküle wie N-Acyl-Homoserinlactone (AHL) sind bei Bakterien beobachtet worden (Borchardt *et al.* 2001). Durch diese Signalstoffe erhalten Bakterien Informationen über die Zelldichte ihrer Artgenossen und verändern ggf. ihre physiologischen Eigenschaften (quorum sensing) (Flemming und Wingender 2001a). Ob eine derartige Kommunikation zwischen Bakterien und Diatomeen auch abläuft, ist noch nicht untersucht. Bei Makroalgen konnte eine Interaktion mit Epibakterien über niedermolekulare Signalstoffe gezeigt werden. Hier diente sie aber der Reduzierung epiphytischen Bewuchses (Steinberg und de Nys 2002).

## **5 Symbiotische Beziehung**

Der Begriff Symbiose wurde von H. A. de Bary 1879 als Bezeichnung für jegliches Zusammenleben von artverschiedenen Organismen eingeführt (Arnheim *et al.* 1994). Im ursprünglichen Sinn umfasst die Symbiose sowohl parasitische, kommensalische und mutualistische Vergesellschaftungen (Wilkinson 2001). Bis heute wird der Begriff im allgemeinen Sprachgebrauch als auch in der Wissenschaft missverständlich gebraucht. Während in Den USA mit dem Symbiose-Begriff die von Bary eingeführte Definition gemeint ist, werden im europäischen Raum mit Symbiose vornehmlich mutualistische Beziehungen beschrieben (Wilkinson 2001). In der vorliegenden Arbeit wird der Symbiose-Begriff für Beziehungen verwendet in denen beide Organismen Vorteile aus der Vergesellschaftung erzielen (Mutualismus).

Bisher sind zahlreiche Interaktionen zwischen Bakterien und Pflanzen beschrieben worden. Sie reichen von pathogen (Jakob *et al.* 2002) bis symbiotisch (Van Rhijn und Vanderlayden 1995).

Bei Symbiosen zwischen Bakterien und Algen kommt es zu hochgradigen Spezialisierungen. Zwischen stark wirtsspezifischen bakteriellen Endosymbionten in der marinen Rotalge *Prionitis* sp. hat eine Coevolution stattgefunden. Die symbiotischen Alphaproteobakterien können andere *Prionitis*-Arten nicht besiedeln

(Ashen und Goff 2000). Alphaproteobakterien und Angehörige der Bacteroidetes-Gruppe können die Bakteriengemeinschaft auf Seegrass Blättern (*Halophila*) dominieren (Weidner *et al.* 2000)

Phytoplanktische Organismen sind häufig mit Epibakterien besiedelt. Dabei kommen auch hier den Alphaproteobakterien sowie der Bacteroidetes-Gruppe eine besondere Bedeutung zu (Riemann *et al.* 2000). Auch auf *A. kufferathii* sind Alphaproteobakterien die dominierende Gruppe (Abschnitt C 2.3).

Eine Ausnahme stellen Dinoflagellaten dar. Sie weisen sowohl endosymbiotische und epiphytische Bakterien auf. Hier handelt es sich hauptsächlich um Betaproteobakterien während Alphaproteobakterien nicht vorhanden sind (Alverca *et al.* 2002).

Viele Epibakterien haben eine stimulierende Wirkung auf das Wachstum von Phytoplankton. Die Diatomee *Asterionella glacialis* zeigt in axenischer Kultur nur geringes Wachstum. Durch Zufügen des Bakteriums *Pseudomonas* sp. wird ihr Wachstum stark beschleunigt. Das Bakterium *Vibrio* sp. hingegen zeigt keinen Effekt (Riquelme *et al.* 1988)

Nicht alle Bakterien haben stimulierende Effekte auf das Wachstum von Algen. Einige Bakterien können das Wachstum von Algen sogar inhibieren (Fukami *et al.* 1997). Diese hemmenden Effekte haben vermutlich einen entscheidenden Anteil an schnellen Änderungen der Phytoplanktonzusammensetzung im Meer, die im Jahresgang häufiger beobachtet werden können (Fukami *et al.* 1997). Vermutlich wird die Inhibierung des Wachstums durch Proteine verursacht, die lytisch auf die Algen wirken (Mitsutani *et al.* 2001).

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Epibakterien hatten einen stimulierenden Effekt auf das Wachstum von *Amphiprora kufferathii* (Abschnitt C 3). Es wird vermutet, dass die Bakterien anorganische Nährstoffe remobilisieren, die der Alge so schneller wieder zur Verfügung stehen (McGrath Grossi *et al.* 1984; Steward *et al.* 1997). Die Lieferung von Vitaminen für die Algen durch die Bakterien wird auch diskutiert (Fukami *et al.* 1997).

Der wachstumsfördernde Effekt der epiphytischen Bakterien war auch unter Stickstoff- und Silikat-Mangelbedingungen zu beobachten (Abschnitt C 5.5). Daraus lässt sich schließen, dass hier eine Remobilisierung dieser Nährstoffe durch die Bakterien beschleunigt wird. Aus den direkten Nährstoffdaten war dies jedoch nicht abzulesen.

Die Beteiligung der Bakterien am Abbau von Wasserstoffperoxid konnte nachgewiesen werden. Es zeigte sich aber, dass dies keine Auswirkung auf das Wachstum von *A. kufferathii* unter Normalbedingungen hat (Abschnitt C 3). Überprüft wurde ebenfalls, ob der positive Effekt auf die Umsetzung der verwendeten Puffersubstanz Glycylglycin zu Glycin durch die Bakterien zurückzuführen und somit artifiziell ist. Es kam zu einer

Stimulierung des Wachstums von axenischen *A. kufferathii* Kulturen durch Glycin, sie erreichte aber nicht das Ausmaß wie in der Mischkultur (Abschnitt C 3). In Untersuchungen an der Diatomee *Pseudo-nitzschia multiseriis* konnte durch Glycin ebenfalls keine Förderung des Wachstums erzielt werden. Diese zeigte sich aber durch das Zufügen von Prolin (Steward *et al.* 1997).

*Sulfitobacter* sp. ist in der Lage, Dimethylsulfoniompropionat (DMSP) abzubauen (Abschnitt C 5.1.2). DMSP ist ein organisches Osmolyt, das bei hyperosmotischem Stress verstärkt von Algen gebildet wird (Kirst *et al.* 1991; Kirst 1995). Die Fähigkeit DMSP abzubauen und als Kohlenstoffquelle zu nutzen ist in einigen Bakterien beschrieben worden (Gonzelez *et al.* 2003; Ledyard *et al.* 1993).

*Sulfitobacter* sp. ist als antarktische Art beurteilt worden (Abschnitt 1.2) und somit Bestandteil der SIMCO. Berichte über Eisbakterien die DMSP verwerten können liegen noch nicht vor.

Bei oxidativem (Abschnitt 2.1) und Temperaturstress (Abschnitt C 5.4) zeigte sich ein positiver Effekt der Bakterien auf *A. kufferathii*.

Diese Befunde lassen die Klassifizierung der Beziehung zwischen *A. kufferathii* und den epiphytischen Bakterien als symbiotisch zu. Der negative Effekt bei extremem hypo- und hypersalinen Stress fällt meines Erachtens nicht besonders ins Gewicht, da derartige Stress-Situationen unter natürlichen Bedingungen kaum vorkommen.

## **6 Abschlussdiskussion und Ausblick**

Es ist gelungen eine axenische Kultur von *Amphiprora kufferathii* herzustellen. Die Bakterien der Mischkultur wurden identifiziert und teilweise isoliert. Damit stand ein System zur Untersuchung der Bakterien-Diatomeen-Wechselwirkungen zur Verfügung. Vier der fünf identifizierten Bakterienspezies stammen aus der Antarktis, was die Übertragung der gewonnenen Erkenntnisse auf die Situation unter dem antarktischen Meereis zulässt.

Eine aktive Beteiligung der Epibakterien auf *A. kufferathii* am Abbau des von der Diatomee freigesetzten Wasserstoffperoxids konnte nachgewiesen werden. Weitere Wechselwirkungen bei Temperatur- und osmotischem Stress sowie unter Nährstoffmangel wurden untersucht. Dabei zeigten sich weitere positive Effekte der Bakterien auf *A. kufferathii*.

Das Interesse an Algen-Bakterien-Assoziationen hat in den vergangenen Jahren zugenommen. Massenkulturen von Diatomeen und Dinoflagellaten werden zur Aufzucht von wirtschaftlich genutzten Muscheln, Krebstieren und Fischen verwendet. Effektive Futter-Kulturen sind hier unverzichtbar. Eine Stimulierung des

## (D) Diskussion

---

Phytoplanktonwachstums durch Bakterien bei industrieller Massenkultur wird verstärkt erforscht, um die Produktivität zu steigern (Riquelme *et al.* 1988).

Die Epibakterien sind am Oxidationsschutz von *Amphiprora kufferathii* aktiv beteiligt. Das Konzept eines speziesübergreifenden Oxidationsschutzsystems wurde vorgestellt, bei dem das von den Diatomeen gebildete Wasserstoffperoxid von den Bakterien abgebaut wird.

Die bisherigen Ergebnisse zum Oxidationsschutz in *A. kufferathii* (Schriek 2000) wurden mit der neuen, axenischen Kultur überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass *A. kufferathii* im Gegensatz zu den ersten Befunden keine Katalase aufweist. Dies spricht für das Konzept des speziesübergreifenden Oxidationsschutzsystems, da der Abbau von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in der Diatomee nicht über dieses Enzym erfolgen kann, sondern über die Bakterien oder Glutathion und Ascorbat erfolgt.

Durch Vergleiche mit der Literatur wurde die These über das generelle Fehlen von Katalase in Bacillariophyceae auf die gesamte Abteilung Heterokontophyta ausgedehnt.

Insgesamt gaben die durchgeführten Untersuchungen einen Einblick in die umfassenden Wechselwirkungen zwischen *A. kufferathii* und den epiphytischen Bakterien bei verschiedenen Stressbedingungen.

Die gewonnenen Ergebnisse müssen nun mit den tatsächlichen Verhältnissen in der Antarktis verglichen werden. Dazu ist der Nachweis nötig, dass die in dieser Arbeit identifizierten Bakterien auch in der SIMCO auf *A. kufferathii* wachsen.

Das Konzept des speziesübergreifenden Oxidationsschutzsystems muss eingehender untersucht werden. Dabei ist die Anwendung molekularbiologischer Methoden notwendig um das genaue Zusammenwirken von Oxidationsschutzenzymen der beteiligten Organismen zu untersuchen.

Zudem müssen unbeantwortete Fragen angegangen werden: Kommt es bei anhaltenden Stress-Situationen zu einer Verschiebung der bakteriellen Abundanzen auf *A. kufferathii*? Welchen Effekt haben die einzelnen Bakterien bei oxidativem-, osmotischem- und Temperaturstress? Findet eine interspezifische Kommunikation mit Hilfe von Signalstoffen zwischen der Epibakterien und den Diatomeen statt?

Das sind nur einige Fragen die noch beantwortet werden müssen um den Kenntnisstand hinsichtlich der Diatomen-Bakterien-Interaktion zu erweitern.

## Zitierte Literatur

- Abele D., Ferreeyra G.A. und Schloss I. (1999): H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation from photochemical production and atmospheric wet deposition in Antarctic coastal and off-shore waters of Potter Cove, King George Island, South Shetland Islands. *Antarctic science* **11**. 131-139.
- Ackermann N.L., Shen H.T. und Sanders B. (1994): Experimental studies of sediment enrichment of arctic ice covers due to wave action and frazil entrainment. *Journal of Geophysical Research C* **99**. 7761-7770.
- Aguilera J., Dummermuth A., Karsten U., Schriek R. und Wiencke C. (2002): Enzymatic defences against photooxidative stress induced by ultraviolet radiation in Antarctic marine macroalgae. *Polar Biology* **25**. 432-441.
- Alcoverro T., Conte E. und Mazzella L. (2000): Production of mucilage by the adriatic epipellic diatom *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophyceae) under nutrient limitation. *Journal of Phycology* **36**. 1087-1095.
- Aldsworth T.G., Sharman R.L. und Dodd C.E.R. (1999): Bacterial suicide through stress. *Cellular and Molecular Life Sciences* **56**. 378-383.
- Alverca E., Biegala I.C., Kennaway G., Lewis J. und Franca S. (2002): *In situ* identification and localisation of bacteria associated with *Gyrodinium instriatum* (Gymnodiniales, Dinophyceae) by electron and confocal microscopy. *European Journal of Phycology* **37**. 523-530.
- Amann R. (2000): Who is out there? Microbial aspects of biodiversity. *Systematic and Applied Microbiology* **23**. 1-8.
- Anderson M.D., Prasad T.K. und Steward C.R. (1995): Changes in isoenzyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology* **109**. 1247-1257.
- Arnheim, K., Becker-Follmann, J., Besel, J., Bergfeld, R. und Bogenrieder, A. (1994): Lexikon der Biologie, Hrsg. Herder, G., Spektrum, Heidelberg.
- Arora A., Sairam R.K. und Srivastava G.C. (2002): Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science* **82**. 1227-1238.
- Asada K. (1992): Ascorbat peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum* **85**. 235-241.
- Asada, K. (1994): Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*, Hrsg. Foyer, C.H. und Mullineaux, P.M., Seite 77-104. CRC Press, Boca Raton.
- Asada, K. und Takahashi, M. (1987): Production and scavenging of reactive oxygen in photosynthesis. In *Photoinhibition*, Hrsg. Kyle, D.J., Osmond, C.B. und Arntsen, C.J., Seite 227-287. Elsevier, Amsterdam.
- Ashen J.B. und Goff L.J. (2000): Molecular and ecological evidence for species specificity and coevolution in a group of marine algal-bacterial symbioses. *Applied and Environmental Microbiology* **66**. 3024-3030.

- Azam F. und Long R.A. (2001): Sea snow microcosms. *Nature* **414**. 495-498.
- Bader H., Sturzenegger V. und Hoigné J. (1988): Photometric method for the determination of low concentrations of hydrogen peroxide by the peroxidase catalyzed oxidation of n,n-Diethyl-p-phenylene-diamine (DPD). *Water Research* **22**. 1109-1115.
- Baker C.J., Orlandi E.W. und Anderson A.J. (1997): Oxygen metabolism in plant cell culture/bacteria interactions: role of bacterial concentration and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging in survival under biological and artificial oxidative stress. *Physiological and Molecular plant Pathology* **51**. 401-415.
- Bannister J.V., Bannister W.H. und Rotilio G. (1987): Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. *Critical Reviews in Biochemistry* **22**. 111-180.
- Bano N. und Hollibaugh T.J. (2002): Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from the arctic ocean. *Applied and Environmental Microbiology* **68**. 505-518.
- Bartsch A. (1989): Die Eisalgenflora des Weddellmeeres (Antarktis): Artenzusammensetzung und Biomasse sowie Ökophysiologie ausgewählter Arten. *Reports on Polar Research* **63**. 1-110.
- Battistoni A. (2003): Role of prokaryotic Cu,Zn superoxide dismutase in pathogenesis. *Biochemical Society Transactions* **31**. 1326-1329.
- Beauchamp C. und Fridovich I. (1971): Superoxide dismutase: improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **44**. 276-287.
- Benov L. und Fridovich I. (1995): Superoxide dismutase protects against aerobic heat shock in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **177**. 3344-3346.
- Bidle K.D. und Azam F. (1999): Accelerated dissolution of diatom silica by marine bacterial assemblages. *Nature* **397**. 508-512.
- Bidle K.D., Brzezinski M.A., Long J.L. und Azam F. (2003): Diminished efficiency in the oceanic silica pump caused by bacteria-mediated silica dissolution. *Limnology and Oceanography* **48**. 1855-1868.
- Bidle K.D., Maganelli M. und Azam F. (2002): Regulation of oceanic silicon and carbon preservation by temperature control on bacteria. *Science* **298**. 1980-1984.
- Biegala I.C., Kennaway G., Alverca E., Lennon J.F., Vaultot D. und Simon N. (2002): Identification of bacteria associated with dinoflagellates (Dinophyceae) *Alexandrium* spp. using tyramide signal amplification-fluorescent in situ hybridisation and confocal microscopy. *Journal of Phycology* **38**. 404-411.
- Bischof, K. (1996): Einfluß der UV-Strahlung auf die Photosynthese polarer Makroalgen. Diplomarbeit, Universität Osnabrück.
- Bisson M.A. und Kirst G.O. (1995): Osmotic Acclimation and Turgor Pressure Regulation in Algae. *Naturwissenschaften Aufsätze* **82**. 461-471.

- Bitschgi T.B. und Giovannoni S.J. (1991): Phylogenetic analysis of a natural marine bacterioplankton population by rRNA gene cloning and sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* **57**. 1707-1713.
- Borchardt S.A., Allain E.J., Michels G.W., Stearns G.W., Kelly R.F. und McCoy W.F. (2001): Reaction of acylated homoserine lactone bacterial signaling molecules with oxidized halogen antimicrobials. *Applied and Environmental Microbiology* **67**. 3174-3179.
- Bowler C., Van Montagu M. und Inzé D. (1992): Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual review of Plant Physiology and Molecular Biology* **43**. 83-116.
- Bowman J.P., Brown M.V. und Nichols D.S. (1997a): Biodiversity and ecophysiology of bacteria associated with Antarctic sea ice. *Antarctic Science* **9**. 134-142.
- Bowman J.P., McCammon S.A., Brown M.V., Nichols D.S. und McMeekin T.A. (1997b): Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. *Applied and Environmental Microbiology* **63**. 3068-3078.
- Bowman J.P., McCammon S.A., Lewis T., Skerratt J.H., Brown J.L., Nichols D.S. und McMeekin T.A. (1998): *Psychrofleyus torquis* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic species from Antarctic sea ice, and reclassification of *Flavobacterium gondwanense* (Dobson et. al. 1993) as *Psychroflexus gondwanense* gen. nov., comb. nov. *Microbiology* **144**. 1601-1609.
- Bowman, J.P., Rea, S. M., Brown, M. V., McCammon, S. A., Smith, M. C. und McMeekin, T. A. (1999): Community structure and psychrophily in Antarctic microbial ecosystems. In *Proceedings of the 8th international symposium on microbial ecology, 9-14 August 1998*, Hrsg. Bell, C.R., Brylinski, M. und Johnson-Green, P., Seite 287-292. Halifax N.S.
- Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**. 248-254.
- Brehm U., Krumbein W.E. und Palinska K.A. (2003): Microbial spheres: a novel cyanobacterial-diatom symbiosis. *Naturwissenschaften* **90**. 136-140.
- Brinkmeyer R., Knittel K., Jürgens J., Weyland H., Amann R. und Helmke E. (2003): Diversity and structure of bacterial communities in Arctic versus Antarctic pack ice. *Applied and Environmental Microbiology* **69**. 6610-6619.
- Brown M.V. und Bowman J.P. (2001): A molecular phylogenetic survey of sea-ice microbial community. *FEMS Microbiology Ecology* **35**. 267-275.
- Burdon R.H., Gill V., Boyd P.A. und O'Kane D. (1994): Chilling, oxidative stress and antioxidant enzyme response in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* **102B**. 177-185.
- Burkitt M.J. und Duncan J. (2000): Effects of trans-reveratrol on copper-dependent hydroxyl-radical formation and DNA damage: evidence for hydroxyl-radical scavenging and a novel, glutathione sparing mechanism of action. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **381**. 253-263.



- Cabiscol E., Tamarit J. und Ros J. (2000): Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology* **3**. 3-8.
- Challenger, F. (1959): Aspects of the organic chemistry of sulphur, Butterworths Scientific Publications, London.
- Charles B. und Halliwell B. (1981): Light activation of fructose bisphosphatase in isolated spinach chloroplasts and deactivation by hydrogen peroxide - a physiological role for thioredoxin system. *Planta* **151**. 242-246.
- Chase C.A., Bewick T.A. und Shilling D.G. (1998): Differential photosynthetic electron transport and oxidative stress in paraquat resistant and sensitive biotypes of *Solanum americanum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **68**. 83-90.
- Chen G.X. und Asada K. (1989): Ascorbate peroxidase in tea leaves occurrence of two isoenzymes and the difference in their enzymatic and molecular properties. *Plant & Cell Physiology* **30**. 987-998.
- Cho J.-Y., Choi J.-S., Kong I.-S., Park S.-I., Kerr R.G. und Hong Y.-K. (2002): A procedure for axenic isolation of the marine microalga *Isochrysis galbana* from heavily contaminated mass cultures. *Journal of Applied Phycology* **14**. 385-390.
- Choi J.-S., Cho J.-Y., Jin L.-G., Jin H.-J. und Hong Y.-K. (2002): Procedures for the axenic isolation of conchocelis and monospores from the red seaweed *Porphyra yezoensis*. *Journal of Applied Phycology* **14**. 115-121.
- Claiborne A. und Fridowich I. (1979): Purification of the o-dianisidine peroxidase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **254**. 4245-4252.
- Claiborne A., Malinowski D.P. und Fridowich I. (1979): Purification and characterisation of hydroperoxidase II of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **254**. 11664-11668.
- Cole J.J. (1982): Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Annual Reviews of Ecological Systematic* **13**. 291-314.
- Connell L. und Cattolico R.A. (1996): Fragile algae: Axenic culture of field-collected samples of *Heterosigma carterae*. *Marine Biology* **125**. 421-426.
- Cooksey K.E. und Wigglesworth-Cooksey B. (1995): Adhesion of bacteria and diatoms to surfaces in the sea: a review. *Aquatic Microbial Ecology* **9**. 87-96.
- Cooper W.J. und Zika R.G. (1983): Photochemical formation of hydrogen peroxide in surface and ground waters exposed to sunlight. *Science* **220**. 711-712.
- Cottrell M. und Kirchmann D.L. (2000): Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the *Cytophyga-Flavobacter* cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Applied and Environmental Microbiology* **66**. 1692-1697.
- Cottrell M.T. und Suttle C.A. (1993): Production of axenic cultures of *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) using antibiotics. *Journal of Phycology* **29**. 385-387.

- Daims H., Brühl A., Amann R., Schleifer K.-H. und Wagner M. (1999): The domain-specific probe EUB338 is sufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology* **22**. 434-444.
- Dat J., Vandenabeele S., Vranová E., Van Montagu M., Inzé D. und Van Breusegen F. (2000): Dual action of the active oxygen species during plant stress. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**. 779-795.
- Decho A.W. (1990): Microbial exopolymer secretions in oceanic environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanography and Marine Biology Annual Reviews* **28**. 73-153.
- Delille D. (1996): Biodiversity and function of bacteria in the Southern Ocean. *Biodiversity and Conservation* **5**. 1505-1523.
- DeLong E.F., Franks D.G. und Alldredge A.L. (1993): Diversity of aggregate-attached versus free living marine bacterial assemblages. *Limnology and Oceanography* **38**. 924-934.
- Dieckmann G.S., Arrigo K.R. und Sullivan C.W. (1992): A high resolution sampler for nutrient and chlorophyll a profiles of the sea ice platelet layer and underlying water column below fast ice in polar oceans: preliminary results. *Marine Ecology Progress Series* **80**. 291-300.
- Eicken, H. (1995): Wie polar wird ein Polarmeer durch das Meereis. In *Biologie der Polarmeere*, Hrsg. Hempel, I. und Hempel, G., Ausgabe 1. Seite 58-76. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Eilers H., Pernthaler J., Glöckner F.O. und Amann R. (2000): Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the north sea. *Applied and Environmental Microbiology* **66**. 3044-3051.
- Eilers H., Pernthaler J., Peplies J., Glöckner F.O., Gerdt G. und Amann R. (2001): Isolation of novel pelagic bacteria from the German Bight and their seasonal contributions to surface picoplankton. *Applied and Environmental Microbiology* **67**. 5134-5142.
- Elstner E.F. und Osswald W. (1994): Mechanisms of oxygen activation during plant stress. *Proceedings of the Royal Society Edinburgh* **102B**. 131-154.
- Farr S.B. und Kogoma T. (1991): Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhidium*. *Microbiology Reviews* **55**. 561-585.
- Ferguson G.P. (1999): Protective mechanisms against toxic electrophiles in *Escherichia coli*. *Trends in Microbiology* **7**. 242-247.
- Ferguson R.L., Buckley E.N. und Palumbo A.V. (1984): Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement. *Applied and Environmental Microbiology* **47**. 49-55.
- Flemming H.C. und Wingender J. (2001a): Biofilme - die bevorzugte Lebensform der Bakterien. *Biologie In Unserer Zeit* **3**. 169-180.

- Flemming H.C. und Wingender J. (2001b): Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPS)-Part I: Structural and ecological aspects. *Water Science and Technology* **43**. 1-8.
- Foldvik A. und Kvinge T. (1974): Conditional instability of sea water at the freezing point. *Deep Sea Research* **21**. 169-174.
- Forest K.T., Langford P.R., Kroll J.S. und Getzoff E.D. (2000): Cu,Zn superoxide dismutase structure from a microbial pathogen establishes a class with a conserved dimer interface. *Journal of Molecular Biology* **296**. 145-153.
- Foyer C.H., Lelandais M., Galap C. und Kunert K.J. (1991): Effects of elevated cytosolic glutathione reductase activity on the cellular glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions. *Plant Physiology* **97**. 863-872.
- Foyer C.H., Lopezdelgado H., Dat J.F. und Scott I.M. (1997): Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum* **100**. 241-254.
- Fridovich I. (1989): Superoxide dismutases. An adaption to a paramagnetic gas. *Journal of Biological Chemistry* **264** . 7761-7764.
- Fridovich I. (1997): Superoxide anion radical ( $O_2^-$ ), superoxid dismutases, and related matters. *The Journal of Biological Chemistry* **272**. 18515-18517.
- Fryer M.J., Ball L., Oxborough K., Karpinski S., Mullineaux P.M. und Baker N.R. (2003): Control of Ascorbate Peroxidase 2 expression by hydrogen peroxide and leaf waterstatus during excess light stress reveals a functional organisation of Arabidopsis leaves. *Plant Journal* **33**. 691-705.
- Fukami K., Nishijima T. und Ishida Y. (1997): Stimulative and inhibitory effects of bacteria on the growth of microalgae. *Hydrobiologia* **358**. 185-191.
- Fukushima M. und Tatsumi K. (1994): Influence of interfering dissolved organic matter on the determination of hydrogen peroxide by a colorimetric method based on the peroxidase catalyzed oxidation of N,N-diethyl-p-phenylenediamine. *Talanta* **47**. 899-905.
- Garrison D.L., Ackley S.F. und Buck K.R. (1983): A physical mechanism for establishing algal populations in frazil ice. *Nature* **306**. 363-365.
- Garrison D.L. und Buck K.R. (1989): The biota of the Antarctic pack ice in the Weddell Sea and Antarctic Peninsula regions. *Polar Biology* **10**. 211-219.
- Garrison D.L., Buck K.R. und Gowing M.M. (1993): Winter plankton assemblage in the ice edge zone of the Weddel and Scotia seas: composition, biomass and spatial distributions. *Deep Sea Research* **40**. 311-338.
- Garrison D.L., Close A.R. und Reimnitz E. (1989): Algae concentrated by frazil ice: evidence from laboratory experiments and field measurements. *Antarctic Science* **1**. 313-316.
- Garrison D.L., Sullivan C.W. und Ackley S.F. (1986): Sea ice microbial communities in Antarctica. *Bio Science* **36**. 243-250.

- Giovannoni S.J., Bitschgi T.B., Moyer C.L. und Field K.G. (1990): Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* **345**. 60-63.
- Gleiz, M., Bartsch, A., Dieckmann, G. S. und Eicken, H. (1998): Composition and succession of sea ice diatom assemblages in the eastern and southern Weddell Sea, Antarctica. In *Antarctic sea ice: biological processes, interactions and variability*, Hrsg. Lizotte, M.P. und Arrigo, K.R., Seite 107-120. American Geophysical Union, Washington, DC.
- Gleiz M. und Thomas D.N. (1993): Variation in phytoplankton standing stock, chemical composition and physiology during sea ice formation in the south eastern Weddell Sea, Antarctica. *Journal of Experimental Biological Ecology* **173**. 211-230.
- Glöckner F.O., Fuchs B.M. und Amann R. (1999): Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridisation. *Applied and Environmental Microbiology* **65**. 3721-3726.
- Gonzalez J.M. und Moran D.M. (1997): Numerical dominance of a group of marine bacteria in the alpha-subclass of the class proteobacteria in coastal seawater. *Applied and Environmental Microbiology* **63**. 4237-4242.
- González-Flecha B. und Demple B. (1997): Homeostatic regulation of intracellular hydrogen peroxide concentration in aerobically growing *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **179**. 382-388.
- Gonzalez J.M., Covert J.S., Whitmen W.B., Henriksen J.R., Mayer F., Scharf B., Schmitt R., Buchan A., Fuhrman J.A., Kiene R.P. und Moran M.A. (2003): *Silicibacter pomeroyi* sp. nov. and *Roseovarius nubinhibens* sp. nov., dimethylsulfoniumpropionate-demethylating bacteria from marine environments. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology* **53**. 1261 -1269.
- Gosink J.J., Herwig R.P. und Staley J.T. (1997): *Octadecabacter arcticus* gen. nov., sp. nov., and *O. antarcticus*, sp. nov., nonpigmented, psychrophilic gas vacuole bacteria from polar sea ice and water. *Systematic and Applied Microbiology* **20**. 356-365.
- Gosink J.J. und Staley J.T. (1995): Biodiversity of gas vacuolate bacteria from Antarctic sea ice and water. *Applied and Environmental Microbiology* **61**. 3486-3489.
- Gosselin M.L., Legendre L., Therriault J.-C. und Demers S. (1990): Light and nutrient limitation of sea-ice microalgae (Hudson Bay, Canadian Arctic). *Journal of Phycology* **26**. 220-232.
- Gross, W. (1993): Peroxisomes in algae: their distribution, biochemical function and phylogenetic importance. In *Progress in Phycological Research*, Hrsg. Round, F.E. und Chapman, D.J., Seite 47-78. Biopress Ltd., Bristol.
- Grossi S.M. und Sullivan C.W. (1985): Sea ice microbial communities. 5. the vertical zonation of diatoms in an Antarctic fast-ice community. *Journal of Phycology* **21**. 409-
- Grossmann S. und Gleiz M. (1993): Microbial responses to experimental sea ice formation: implication for the establishment of Antarctic sea ice communities. *Journal of Experimental Biological Ecology* **173**. 273-289.

- Guillard, R.R.L. (1975): Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In *Culture of Marine Invertebrate Animals*, Hrsg. Smith, W.L. und Chanley, M.H., Seite 29-60. Plenum Press, New York.
- Günther S. und Dieckmann G.S. (2001): Vertical zonation and community transition of sea-ice diatoms in fast ice and platelet layer, Weddel sea, Antarctica. *Annals of Glaciology* **33**. 287-295.
- Halliwell, B. und Gutteridge, M.C. (1999): Free radicals in biology and medicine, Ausgabe 3, University Press, Oxford.
- Hamilton E.W. und Heckathorn S.A. (2001): Mitochondrial adaptations to NaCl. complex I protected by antioxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. *Plant Physiology* **126**. 1266-1274.
- Hansen, A. (1997): Phylogenetische Analysen. In *Bioanalytik*, Hrsg. Hansen, A., Seite 69-90. Birkhäuser, Basel.
- Hasager C.B., Carstensen J., Ellermann T., Gustafson B.G., Hertel O., Johnsson M., Markager S. und Ambelas Skjoth C. (2003): On extreme atmospheric and marine nitrogen fluxes and chlorophyll-a levels in the Kattegat Strait. *Atmospheric Chemistry and Physics* **3**. 797-812.
- Hazzard C., Lesser M.P. und Kinzie R.A. (1997): Effects of ultraviolet radiation on photosynthesis in the subtropical marine diatom, *Chaetoceros gracilis* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* **33**. 960-968.
- Heldt, H.W. (1999): Pflanzenbiochemie, Ausgabe 2, Spektrum Verlag, Heidelberg.
- Helmke E. und Weyland H. (1995): Bacteria in sea ice and underlying water of the eastern Weddell Sea in midwinter. *Marine Ecology Progress Series* **117**. 269-287.
- Hendry G.A.F. und Crawford R.M.M. (1994): Oxygen and environmental stress in plants-an overview. *Proceedings of the Royal Society Edinburgh* **102B**. 1-10.
- Herbert R.A. (1999): Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* **23**. 563-590.
- Hernandez J.A., Campillo A., Jimenez A., Alarcon J.J. und Sevilla F. (1999): Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants. *New Phytologist* **141**. 241-251.
- Hernandez J.A., Jimenez A., Mullineaux P.M. und Sevilla F. (2000): Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant, Cell and Environment* **23**. 853-862.
- Hoekstra F.A., Golovina E.A. und Buitink J. (2001): Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science* **6**. 431-438.
- Horner R., Ackley S.F., Dieckmann G.S., Gulliksen B., Hoshiai T., Legendre L., Melnikov I.A., Reeburgh W.S., Spindler M. und Sullivan C.W. (1992): Ecology of sea ice biota. *Polar Biology* **12**. 417-427.

- Horner R., Syversten E.E., Thomas D.P. und Lange C. (1988): Proposed terminology and reporting units for sea ice algal assemblages. *Polar Biology* **8**. 249-253.
- Hugenholtz P., Goebel B.M. und Pace N.R. (1998): Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology* **180**. 4765-4774.
- Imai I. und Nishitani G. (2000): Attachment of picophytoplankton to the cell surface of the toxic dinoflagellates *Dinophysis acuminata* and *D. fortii*. *Phycologia* **39**. 456-459.
- Jakob K., Goss E.M., Araki H., Van T., Kreitman M. und Bergelson J. (2002): *Pseudomonas viridiflava* and *P. syringae* - natural pathogens of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**. 1195-1203.
- Jang A., Kim S.M., Kim S.Y., Lee S.G. und Kim I.S. (2001): Effect of heavy metals (Cu, Pb, and Ni) on the compositions of EPS in biofilms. *Water Science and Technology* **43**. 41-48.
- Kaiser W.M. (1979): Reversible inhibition of the calvin cycle and activation of oxidative pentose phosphate cycle in isolated intact chloroplasts by hydrogen peroxide. *Planta* **145**. 377-382.
- Kamiyama K., Motoyama H., Fujii Y. und Watanabe O. (1996): Distribution of hydrogen peroxide in surface snow over antarctic ice sheet. *Atmospheric Environment* **30**. 967-972.
- Kanematsu S. und Asada K. (1989): CuZn-superoxide dismutases from the fern *Equisetum arvense* and the green alga *Spirogyra* sp.: occurrence of chloroplast and cytosol types of enzyme. *Plant Cell Physiology* **30**. 717-727.
- Kang S. und Fryxell G.A. (1992): *Fragilariopsis cylindrus* (Grunow) Krieger: The most abundant diatom in water column assemblages of Antarctic marginal ice-edge zones. *Polar Biology* **12**. 609-627.
- Karl D.M. und Resing J. (1993): Palmer LTER: Hydrogen peroxide in the Palmer LTER region: IV. photochemical interactions with dissolved organic matter. *Antarctic Journal of the United States* **28**. 231-234.
- Katzuwon J. und Anderson A.J. (1992): Characterisation of catalase activities in root-colonizing isolate of *Pseudomonas putida*. *Canadian Journal of Microbiology* **38**. 1026-1032.
- Kawabe T., Nagaoka T., Nagahama G., Morita H. und Ohbayashi A. (1989): Generation of dimethyl sulfide from dimethyl-beta-propiothetin in an extract of green alga *Monostroma nitidum* and its retention by cyclodextrin. *Agricultural and Biological Chemistry* **53**. 2587-2591.
- Kim J.-S., Park Y.-H., Yoon B.-D. und Oh H.-M. (1999): Establishment of axenic cultures of *Anabaena flosaquae* and *Aphanothece nidulans* (Cyanobacteria) by lysozyme treatment. *Journal of Phycology* **35**. 865-869.
- Kiorboe T. und Jackson G.A. (2001): Marine snow, organic solute plumes, and optimal chemosensory behavior for bacteria. *Limnology and Oceanography* **46**. 1309-1318.

- Kipfstuhl J. (1991): Zur Entstehung von Unterwassereis und das Wachstum und die Energiebilanz des Meereises in der Atka Bucht, Antarktis. *Berichte zur Polarforschung* **85**. 1-88.
- Kirchmann D.L. (2002): The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiology Ecology* **39**. 91-100.
- Kirst,G.O. (1995): Halophile Mikroalgen. In *Extremophile*, Hrsg. Hausmann,K. und Kremer,B.P., Ausgabe 2. Seite 159-176. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Kirst,G.O. (1996): Osmotic adjustment in phytoplankton and macroalgae, the use of dimethylsulfidepropionate (DMSP). In *Biological and environmental chemistry of DMSP and related sulfonium compounds*, Hrsg. Kiene,R.P., Visscher,P.T., Keller,M.D. und Kirst,G.O., Seite 121-129. Plenum Press, New York.
- Kirst G.O. und Wiencke C. (1995): Ecophysiology of polar algae. *Journal of Phycology* **31**. 181-199.
- Kirst G.O., Wolff H., Nothnagel J., Wanzek M. und Ulmke R. (1991): Dimethylsulfoniumpropionate (DMSP) in ice-algae and its possible biological role. *Marine Chemistry* **35**. 381-388.
- Kisand V., Tuvikene L. und Noges T. (2001): Role of phosphorus and nitrogen for bacteria and phytoplankton development in a large shallow lake. *Hydrobiologia* **457**. 187-197.
- Klotz M.G. und Hutcheson S.W. (1992): Multiple periplasmic catalases in phytopathogenic strains of *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**. 2468-2473.
- Klotz M.G., Klassen G.R. und Loewen P.C. (1997): Phylogenetic relationships among procaryotic and eucaryotic catalases. *Molecular Biology and Evolution* **14**. 951-958.
- Krembs C., Gradinger R. und Spindler M. (2000): Implications of brine channel geometry and surface area for the interaction of sympagic organisms in Arctic sea ice. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **243**. 55-80.
- Kronberg A., Rao N.N. und Ault-Riche D. (1999): Inorganic phosphate: a molecule of many functions. *Annual Reviews of Biochemistry* **68**. 89-125.
- Labrenz M., Tindall B.J., Lawson P.A., Collins M.D., Schumann P. und Hirsch P. (2000): *Staleyella guttiformis* gen. nov., sp. nov. and *Sulfitobacter brevis* sp. nov., alpha-3-Proteobacteria from hypersaline, heliothermal and meromictic antarctic Ekho Lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**. 303-313.
- Laemmli K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** . 680-685.
- Landgraf,P., Doege, M., Ohmann, E. und Tschiersch, H. (1995): Light stress and reactive oxygen species: consequences for photosynthesis in *Euglena gracilis*. In *Photosynthesis: From Light to Biosphere* , Hrsg. Mathis,P., Seite 465-468. Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

- Lange M.A., Ackley S.F., Wadhams P., Dieckmann G.S. und Eicken H. (1989): Development of sea ice in the Weddell Sea. *Annals of Glaciology* **12**. 92-96.
- Larkindale J. und Knight M.R. (2002): Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiology* **128**. 682-695.
- Ledyard K.M., DeLong E.F. und Dacey J.W.H. (1993): Characterisation of a DMSP-degrading bacterial isolate from Sargasso Sea. *Archives of Microbiology* **160**. 312-318.
- Lee D.H., Kim Y.S. und Lee C.B. (2001): The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Physiology* **158**. 737-745.
- Lehmal H. (1999): Adaption an niedrige Temperaturen: Lipide in Eisdiatomeen. *Reports on Polar Research* **317**. 1-119.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. und Cox, M.M. (1998): Prinzipien der Biochemie, Hrsg. Tschesche, H., Ausgabe 2, Spektrum Verlag, Berlin.
- Lesser M.P. (1996a): Acclimation of phytoplankton to UV-B radiation: oxidative stress and photoinhibition of photosynthesis are not prevented by UV-absorbing compounds in the dinoflagellate *Prorocentrum micans*. *Marine Ecology Progress Series* **132**. 287-297.
- Lesser M.P. (1996b): Elevated temperatures and ultraviolet radiation cause oxidative stress and inhibit photosynthesis in symbiotic dinoflagellates. *Limnology and Oceanography* **41**. 271-283.
- Li Y., Hugenholtz J., Abee T. und Molenaar D. (2003): Glutathione protects *Lactococcus lactis* against oxidative stress. *Applied and Environmental Microbiology* **69**. 5739-5745.
- Loewen P.C. (1996): Probing the structure of catalase HPII of *Escherichia coli* - a review. *Gene* **179**. 39-44.
- Loewen P.C., Switala J. und Triggs-Raine B.L. (1985): Catalases HPI and HPII in *Escherichia coli* are induced independently. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **243**. 144-149.
- Loprasert S., Vattanaviboon P., Praituan W., Chamnongpol S. und Mongkolsuk S. (1996): Regulation of the oxidative stress protective enzymes, catalase and superoxide dismutase in *Xanthomonas* - a review. *Gene* **179**. 33-37.
- Lottspeich, F. und Zorbas, H. (1998): Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Ludlow, M.M. (1987): Light stress at high temperatures. In *Photoinhibition*, Hrsg. Kyle, D.J. und et al, Seite 89-110. Elsevier,
- Lutts S. und Guerrier G. (1995): Peroxidase activities of two rice cultivars differing in salinity tolerance as affected by proline and NaCl. *Biologia Plantarum* **37**. 577-586.



- Mallick N. und Mohn F.H. (2000): Reactive oxygen species: response of algal cells. *Journal of Plant Physiology* **157** . 183-193.
- Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M. und Schleifer K.-H. (1992): Phylogenetic oligonucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology* **15**. 593-600.
- McGrath Grossi S., Kottmeier S.T. und Sullivan C.W. (1984): Sea ice microbial communities. III. Seasonal abundance of microalgae and associated bacteria, McMurdo Sound, Antarctica. *Microbial Ecology* **10**. 231-242.
- McGrath Grossi S. und Sullivan C.W. (1985): Sea ice microbial communities V. the vertical zonation of diatoms in an Antarctic fast ice community. *Journal of Phycology* **21**. 401-409.
- Mehler A.H. (1951): Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **33**. 65-77.
- Michaud L., Di Cello F., Brilli M., Fani R., Lo Giudice A. und Bruni V. (2004): Biodiversity of culturable psychrophilic marine bacteria isolated from Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica). *FEMS Microbiology Letters* **230**. 63-71.
- Mishra N.P., Mishra R.K. und Singhal G.S. (1993): Changes in the activities of antioxidant enzymes during exposure of intact wheat leaves to strong visible light and different temperatures in the presence of protein synthesis inhibitors. *Plant Physiology* **102**. 903-910.
- Mishra R.K. und Singhal G.S. (1992): Function of photosynthetic apparatus of intact wheat leaves under high light and heat stress and its relationship with peroxidation of thylakoid lipids. *Plant Physiology* **98**. 1-6.
- Mitsutani A., Yamasaki I., Kitaguchi H., Kato J., Ishida S.U. und Ishida Y. (2001): Analysis of algicidal proteins of a diatom-lytic marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A25 by two-dimensional electrophoresis. *Phycologia* **40**. 286-291.
- Mongkulsuk S. und Helmann J.D. (2002): Regulation of inducible stress responses. *Molecular Microbiology* **45**. 9-15.
- Morant-Manceau A., Pradier E. und Tremblin G. (2004): Osmotic adjustment, gas exchanges and chlorophyll fluorescence of a hexaploid triticale and its parental species under salt stress. *Journal of Plant Physiology* **161**. 25-33.
- Moro I., Paccagnella R., Barbante C. und Andreoli C. (2000): Microalgal communities of the sea ice, ice covered and ice-free waters of Wood Bay (Ross Sea, Antarctica) during the austral summer 1993/94. *Marine Ecology - Pubblicazioni Della Stazione Zoologica di Napoli* **21**. 233-245.
- Mulholland M.R. und Capone D.G. (2000): The nitrogen physiology of the marine N<sub>2</sub> fixing cyanobacteria *Trichodesmium* spp. *Trends in Plant Science* **5**. 148-153.

- Muyzer G., Teske A., Wirsén C.O. und Jannasch H.W. (1995): Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Archives of Microbiology* **164**. 165-172.
- Mühlhardt, C. (2000): *Der Experimentator: Molekularbiologie*, Ausgabe 2, Spektrum Verlag, Berlin.
- Neef A. (1997): Anwendung der in situ Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen. Dissertation, Technische Universität München
- Neubauer C. und Schreiber U. (1989): Photochemical quenching of chlorophyll fluorescence induced by hydrogen peroxide. *Zeitschrift für Naturforschung C-A Journal of Biosciences* **44**. 262-270.
- Newton, R. und Graham, C.R. (1994): *PCR*, Ausgabe 2, Spektrum Verlag, Berlin.
- Nothnagel J. (1995): Der Einfluß von Salinität und Lichtintensität auf die Osmolytkonzentrationen, die Zellvolumina und die Wachstumsraten der antarktischen Eisdiatomeen *Chaetoceros* sp. und *Navicula* sp. unter besonderer Berücksichtigung der Aminosäure Prolin. *Berichte zur Polarforschung* **161**. 1-115.
- Orozco-Cárdenas M.L., Navaréz-Vásquez J. und Ryan C.A. (2001): Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *The Plant Cell* **13**. 179-191.
- Ott, J. (1996): *Meereskunde*, Ausgabe 2, Ulmer, Stuttgart.
- Pakhomov E.A., Ratkova T.N., Froneman P.W. und Wassmann P. (2001): Phytoplankton dynamics at the ice-edge zone of the Lazarev Sea (Southern Ocean) during the austral summer 1994/1995 drouge study. *Polar Biology* **24**. 422-431.
- Palenik B., Zafiriou O.C. und Morel F.M.M. (1987): Hydrogen peroxide production by a marine phytoplankter. *Limnology and Oceanography* **32**. 1365-1369.
- Patrik, R. und Reimer, C.W. (1975): *Diatoms of the United States of America II*, National Academy of Natural Sciences of Philadelphia, Philadelphia.
- Pedersen A.G., Berntsen J. und Lomstein B.A. (1999): The effect of eelgrass decomposition on sediment carbon and nitrogen cycling: a controlled laboratory experiment. *Limnology and Oceanography* **44**. 1978-1992.
- Plettner, I. (2002): *Streßphysiologie bei antarktischen Diatomeen: Ökophysiologische Untersuchung zur Bedeutung von Prolin bei der Anpassung an hohe Salinitäten und tiefe Temperaturen*. Dissertation, Universität Bremen.
- Ploug H. und Grossart H.P. (2000): Bacterial growth and grazing on diatom aggregates: Respiratory carbon turnover as a function of aggregate size and sinking velocity. *Limnology and Oceanography* **45**. 1467-1475.
- Polle A. (1996): Mehler reaction: friend or foe in photosynthesis. *Botanica acta* **109**. 84-89.

- Polle A., Chakrabarti K., Schuermann W. und Rennenberg H. (1990): Composition and properties of hydrogen peroxide decomposing systems in extracellular and total extracts from needles of Norway spruce *Picea abies* L. Karst. *Plant Physiology* **94**. 312-319.
- Puzon G.J., Petersen J.N., Roberts A.G., Kramer D.M. und Xun L. (2002): A bacterial flavin reductase system reduces chromate to a soluble chromium(III)-NAD<sup>+</sup> complex. *Biochemical and Biophysical Research* **294**. 76-81.
- Rao M.V., Paliyath C. und Ormrod D.P. (1996): Ultraviolet B and ozone induced biochemical changes in antioxidant enzymes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **110**. 125-136.
- Rennenberg H. (1982): Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants. *Phytochemistry* **21**. 2771-2781.
- Resing J., Tien G., Letelier R. und Karl D.M. (1993): Palmer LTER: Hydrogen peroxide in Palmer LTER region. *Antarctic Journal* 225-234.
- Reynolds E.S. (1963): The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **17**. 208-212.
- Rich P.C. und Bonner W.D. (1978): The sites of superoxide anion generation in higher plant mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **188**. 206-213.
- Riemann L., Steward G.F. und Azam F. (2000): Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom. *Applied and Environmental Microbiology* **66**. 578-587.
- Rijstenbil J.W. (2001): Effects of periodic, low UVA radiation on cell characteristics and oxidative stress in the marine planktonic diatom *Ditylum brightwellii*. *European Journal of Phycology* **36**. 1-8.
- Rijstenbil J.W. (2003): Effects of UVB radiation and salt stress on growth, pigments and antioxidative defence of the marine diatom *Cylindrotheca closterium*. *Marine Ecology Progress Series* **254**. 37-48.
- Riquelme C.E., Fukami K. und Ishida Y. (1988): Effects of bacteria on the growth of marine diatom *Asterionella glacialis*. *Bulletin of the Japanese Society for Microbial Ecology* **3**. 29-34.
- Robinson, D.G., Ehlers, U., Herken, R., Herrmann, B., Mayer, F. und Schürmann, F.-W. (1985): Präparationsmethodik in der Elektronenmikroskopie, Springer Verlag, Berlin.
- Robinson D.H., Arrigo K.R., Kolber Z., Gosselin M.L. und Sullivan C.W. (1998): Photophysiological evidence of nutrient limitation of platelet ice algae in McMurdo Sound Antarctica. *Journal of Phycology* **34**. 788-797.
- Rosowski, H. und Hoshov, R. (1973): Culture methods and growth measurements. In *Handbook of Phycological methods*, Hrsg. Stein, J., Seite 53-68. Cambridge University Press, Cambridge.
- Salin M.L. (1988): Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiologia Plantarum* **72**. 681-689.

- Salucci M.E. und Crafts-Brandner S.J. (2004): Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of rubisco as a limiting factor in photosynthesis. *Physiologia Plantarum* **120**. 179-186.
- Samuilov V.D., Bezryadniv D.B., Gusev M.V., Kitashov A.V. und Fredorenko T.A. (2001): Hydrogen peroxide inhibits photosynthetic electron transport in cells of cyanobacteria. *Biochemistry (Moscow)* **66**. 640-645.
- Sansone A., Watson P.R., Wallis T.S., Langford P.R. und Kroll J.S. (2002): The role of two periplasmic copper- and zinc-cofactored superoxide dismutases in the virulence of *Salmonella choleraesuis*. *Microbiology* **148**. 719-726.
- Sato N., Sonoike K., Kawaguchi A. und Tzusuki M. (1996): Contribution of lowered unsaturation levels of chloroplast lipids to high temperature tolerance of photosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **36**. 333-337.
- Scandalios, J.G. (1994): Regulation and properties of plant catalases. In *Causes of oxidative stress & amelioration of defense system in plants*, Hrsg. Foyer, C.H. und Mullineaux, P.M., Seite 275-315. CRC Press, Boca Raton.
- Scharek R. (1991): Die Entwicklung des Phytoplanktons im östlichen Weddelmeer (Antarktis) beim Übergang vom Spätwinter zum Frühjahr. *Reports on Polar Research* **94**. 1-195.
- Schäfer C. und Schmid V. (1993): Pflanzen im Lichtstress. *Biologie In Unsrer Zeit* **1**. 55-62.
- Schäfer H., Abbas B., Witte H. und Muyzer G. (2002): Genetic diversity of 'satellite' bacteria present in cultures of marine diatoms. *FEMS Microbiology Ecology* **42**. 25-35.
- Schmid A.M.M. (2003a): Endobacteria in the diatom *Pinnularia* (Bacillariophyceae) I: "scattered ct-nucleotides" explained: DAPI-DNA complexes stem from exoplastidial bacteria boring into the chloroplasts. *Journal of Phycology* **39**. 122-138.
- Schmid A.M.M. (2003b): Endobacteria in the diatom *Pinnularia* (Bacillariophyceae) II: host cell cycle-dependent translocation and transient chloroplast scars. *Journal of Phycology* **39**. 139-153.
- Schreiber U. (1983): Chlorophyll fluorescence yield changes as a tool in plant physiology I. *Photosynthesis Research* **4**. 361-371.
- Schreiber U., Bilger W. und Neubauer C. (1994): Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis. *Ecological studies* **100**. 49-70.
- Schriek R. (2000): Effects of light and temperature on the enzymatic antioxidative defense systems in the Antarctic ice diatom *Entomoneis kufferathii*. *Reports on Polar Research* **349**. 1-129.
- Schut F., Prins R.A. und Gottschal J.C. (1997): Oligotrophy and pelagic marine bacteria: facts and fiction. *Applied Microbial Ecology* **12**. 177-202.

- Scully N.M., McQueen D.J. und Lean R.R. (1996): Hydrogen peroxide formation: The interaction of ultraviolet radiation and dissolved organic carbon in lake waters along a 43-75°N gradient. *Limnology and Oceanography* **41**. 540-548.
- Shah K., Kumar R.G., Verma S. und Dubey R.S. (1992): Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Science* **161**. 1135-1144.
- Shehawy, R.M. und Kleiner, D. (2001): Nitrogen limitation. In *Algal adaptation to environmental stresses*, Hrsg. Rai, L.C. und Gaur, J.P., Seite 45-64. Springer, Berlin.
- Sigg A. und Neftel A. (1991): Evidenca for a 50% increase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> over past 200 years from Greenland ice cores. *Nature* **351**. 557-559.
- Smetacek V. (1999): Diatoms and the ocean carbon cycle. *Protist* **150**. 25-32.
- Smirnova G.V., Krasnykh T.A. und Oktyabrsky O.N. (2001): Role of glutathione in the response of *Escherichia coli* to osmotic stress. *Biochemistry (Moscow)* **66**. 973-978.
- Smith D.J. und Underwood G.J.C. (1998): Exopolymer production by intertidal epipelagic diatoms. *Limnology and Oceanography* **43**. 1578-1591.
- Soto G.E. und Hultgren S.J. (1999): Bacterial Adhesins: Common themes and variations in architecture and assembly. *Journal of Bacteriology* **181**. 1059-1071.
- Spindler M. und Dieckmann G.S. (1991): Das Meereis als Lebensraum. *Spektrum der Wissenschaft* **2**. 48-57.
- Staley J.T. und Gosink J.J. (1999): Poles apart: biodiversity and biogeography of sea ice bacteria. *Annual Review of Microbiology* **53**. 189-215.
- Standeven A.M. und Wetterhahn K.E. (1991): Ascorbate is the principal reductant of chromium-IV in rat liver and kidney ultrafiltrates. *Carcinogenesis* **12**. 1733-1737.
- Steinberg P.D. und de Nys R. (2002): Chemical mediation of colonisation of seaweed surfaces. *Journal of Phycology* **38**. 621-629.
- Steinke M., Wolfe G.V. und Kirst G.O. (1998): Partial characterisation of dimethylsulfoniopropionate (DMSP) lyase isoenzymes in 6 strains of *Emiliana huxleyi*. *Marine Ecology Progress Series* **175**. 215-225.
- Stevenson L.H. (1978): A case for bacterial dormancy in aquatic systems. *Microbial Ecology* **4**. 127-133.
- Steward J., Marks L.J., Wood C.R., Risser S.M. und Gray S. (1997): Symbiotic relations between bacteria and the domoic acid producing diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* and the capacity of these bacteria for gluconic acid/gluconolactone formation. *Aquatic Microbial Ecology* **12**. 211-221.
- Strohmeier Gort A. und Imlay J.A. (1998): Balance between endogenous superoxide stress and antioxidant defenses. *Journal of Bacteriology* **180**. 1402-1410.

- Sullivan C.W. und Palmisano A.C. (1981): Sea ice microbial communities in McMurdo Sound. *Antarctic Journal of the United States* **16**. 126-127.
- Sullivan C.W. und Palmisano A.C. (1984): Sea Ice Communities: Distribution, Abundance, and Diversity of Ice Bacteria in McMurdo Sound, Antarctica, in 1980. *Applied and Environmental Microbiology* **47**. 788-795.
- Sutherland I.W. (2001): Exopolysaccharides in biofilms, flocs and related structures. *Water Science and Technology* **43**. 77-86.
- Suzuki M.T., Rappé M.S., Haimberger Z.W., Winfield H., Adair N., Ströbel J. und Giovannoni J. (1997): Bacterial diversity among small-subunit rRNA gene clones and cellular isolates from the same seawater sample. *Applied and Environmental Microbiology* **63**. 983-989.
- Takeda T., Yokota A. und Shigeoka S. (1995): Resistance of photosynthesis to hydrogen peroxide in algae. *Plant Cell Physiology* **36**. 1089-1095.
- Tanaka K., Otsubo T. und Kondo N. (1982): Participation of hydrogen peroxide in the inactivation of Calvin cycle SH-enzymes in SO<sub>2</sub> fumigated spinach leaves. *Plant Cell Physiology* **23**. 1009-1018.
- Thomas D.N. und Dieckmann G.S. (2002): Antarctic sea ice a habitat for extremophiles. *Science* **295**. 641-644.
- Urakawa H. und Kita-Tsukamoto K. (1999): A proposal to transfer *Vibrio marinus* (Russel 1891) to a new genus *Moritella* gen. nov. as *Moritella marina* comb. nov. *FEMS Microbiology Letters* **165**. 373-378.
- van den Hoek, C. (1993): Algen, Thieme Verlag, Stuttgart.
- Van Rhijn P. und Vanderlayden J. (1995): The *Rhizobium*-Plant symbiosis. *Microbiological Reviews* **59**. 124-142.
- Venkataramanaiah V., Dushir P. und Murthy S.D.S. (2003): Effect of high temperature on photosynthetic electron transport activities of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Photosynthetica* **41**. 331-334.
- Visscher P.T. und Van Gernerden H. (1991): Production and consumption of dimethylsulfoniumpropionate in marine microbial mats. *Applied and Environmental Microbiology* **57**. 3237-3242.
- Wadhams, P. (1994): The Antarctic sea ice cover. In *Antarctic Science*, Hrsg. Hempel, G., Ausgabe 1. Seite 45-59. Springer Verlag, Berlin.
- Wagner, F. und Falkner, G. (2001): Phosphate limitation. In *Algal adaptation to environmental stresses*, Hrsg. Rai, L.C. und Gaur, J.P., Seite 65-110. Springer, Berlin.
- Walsby A.E. (1994): Gas vesicles. *Microbiological Reviews* **58**. 94-144.
- Wang Y., Chen Y., Lavin C. und Gretz M.R. (2000): Extracellular matrix assembly in diatoms (Bacillariophyceae): ultrastructure of *Achnanthes longipes* and *Cymbella cistula* as revealed by high pressure freezing/freeze substitution and cryo field emission scanning electron microscopy. *Journal of Phycology* **36**. 367-378.

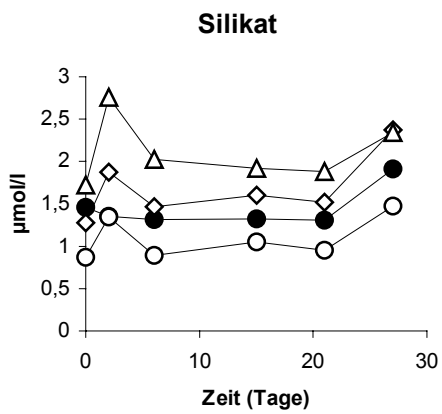
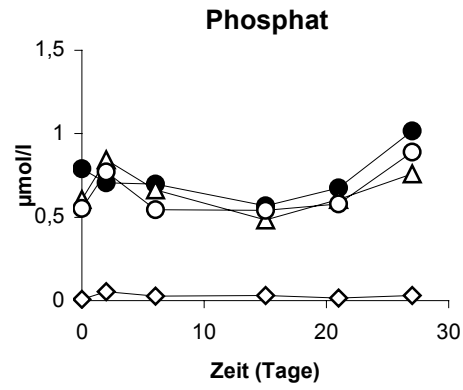
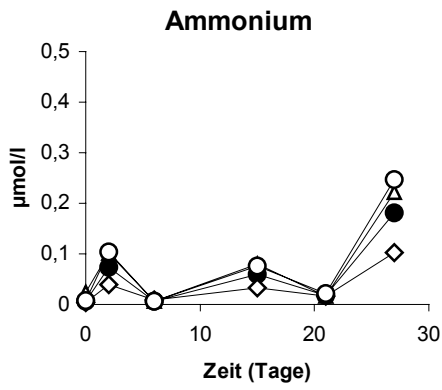
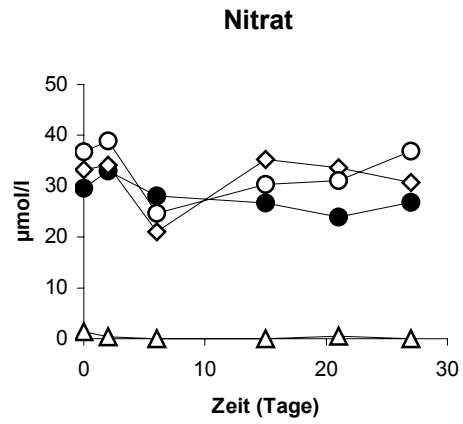
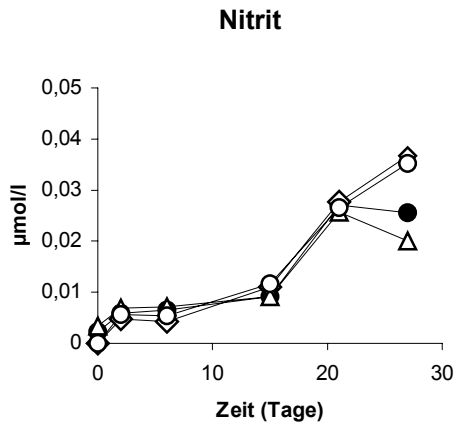
- Wang Y., Lu J., Mollet J.C., Gretz M.R. und Hoagland K.D. (1997): Extracellular matrix assembly in diatoms (Bacillariophyceae): 2,6-Dichlorobenzonitrile inhibition of motility and stalk production in the marine diatom *Achnanthes longipes*. *Plant Physiology* **113**. 1071-1080.
- Wanzek, M. (1994): Der Einfluß unterschiedlicher Temperaturen auf Wachstum, Photosynthese, Respiration und ausgewählte Inhaltsstoffe der antarktischen Diatomeen *Entomoneis kufferathii* MANGUIN und *Nitzschia lecointei* VAN HEURCK. Dissertation, Universität Bremen.
- Watanabe, K., Satoh, H. und Hoshiai, T. (1990): Seasonal variation in ice algal assemblages in the fast ice near Syowa station in 1983/84. In *Antarctic Ecosystems*, Hrsg. Kerry, K.R. und Hempel, G., Seite 136-142. Springer Verlag, Berlin.
- Weeks W.F. und Ackley S.F. (1982): The growth, structure, and properties of sea ice. Cold Regions Research and Engineering Laboratory Hanover, New Hampshire. CRREL Monograph 82-1.
- Weidner S., Arnold W., Stackebrand E. und Pühler A. (2000): Phylogenetic analysis of bacterial communities associated with leaves of seagrass *Halophila stipulacea* by a culture-independent small-subunit rRNA gene approach. *Microbial Ecology* **39**. 22-31.
- Weinbauer M.G. und Suttle C.A. (1996): Potential significance of lysogeny to bacteriophage production and bacterial mortality in coastal waters of the Gulf of Mexico. *Applied Environmental Microbiology* **62**. 4374-4380.
- Weissenberger, J. (1992): Die Lebensbedingungen in den Solekanälchen des antarktischen Meereises, *Reports on Polar Research*, **111**.
- Weissenberger J. und Grossmann S. (1998): Experimental formation of sea ice: importance of water circulation and wave action for incorporation of phytoplankton and bacteria. *Polar Biology* **20**. 178-188.
- Weller R. und Schrems O. (1993): H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the marine troposphere and seawater of the Antarctic ocean (48°N-63°S). *Geophysical Research Letters* **20**. 125-128.
- Wichels A., Biel S.S., Gelderblom H.R., Brinkhoff T., Muyzer G. und Schütt C. (1999): Bacteriophage diversity in the North Sea. *Applied and Environmental Microbiology* **64**. 4128-4133.
- Wilkinson D.M. (2001): At cross purposes. *Nature* **412**. 485-485.
- Willekens H., Inzé D., Van Montagu M. und Van Kamp W. (1995): Catalases in plants. *Molecular Breeding* **1**. 207-228.
- Wilmotte A., Van der Auwera G. und de Wachter R. (1993): Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorohloeopsis HTF* (*Mastigocladus laminosus* HTF) strain PCC7518, and phylogenetic analysis. *FEBS Letters* **317**. 96-100.
- Woodbury W., Spencer A.K. und Stahmann M.A. (1971): An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isoenzymes. *Annals of Biochemistry* **44**. 301-305.

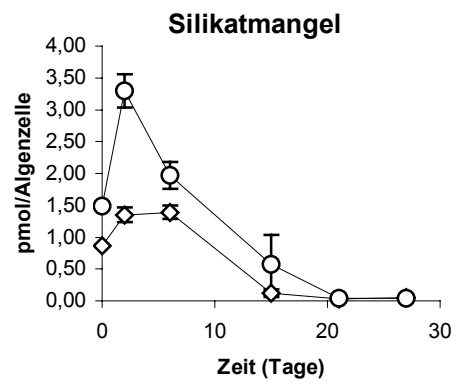
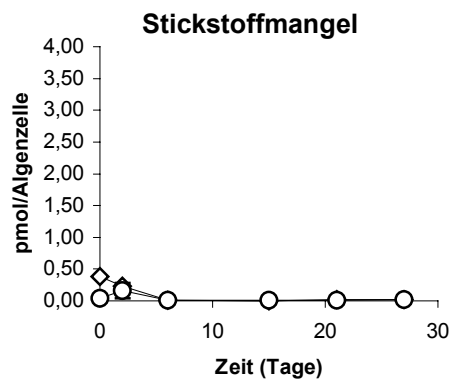
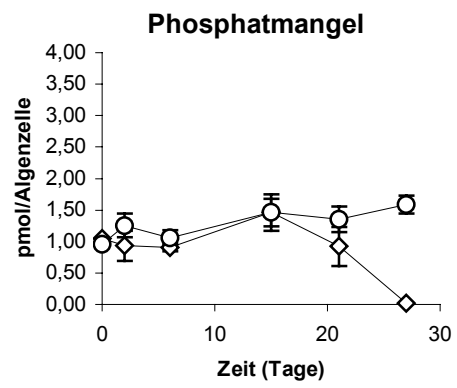
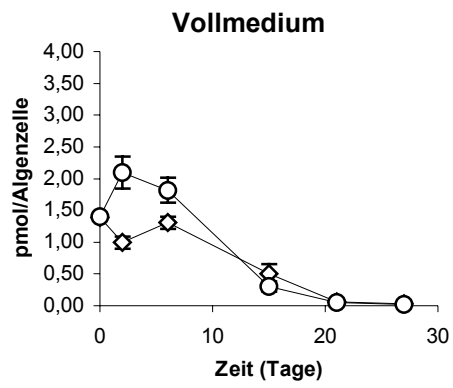
- Wuerz S., Spaeth R., Hinderberger A., Griebe T., Flemming H.C. und Wilderer P.A. (2001): A new method for extraction of extracellular polymeric substances from biofilms and activated sludge suitable for direct quantification of sorbed metals. *Water Science and Technology* **43** . 25-31.
- Yocis B.H., Kieber D. und Mopper K. (2000): Photochemical production of hydrogen peroxide in Antarctic waters. *Deep Sea Research* **47**. 1077-1099.
- Yokota,A. (1992): Glycolate dehydrogenase and glycolate metabolism in *Euglena*. In *Phylogenetic changes in peroxisomes of algae phylogeny of plant peroxisomes*, Hrsg. Stabenau,H., Seite **92-105**. Universität Oldenburg, Oldenburg.
- Yoshimura K., Yabuta Y., Ishikawa T. und Shigeoka S. (2000): Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stress. *Plant Physiology* **123**. 223-233.
- Zafiriou,O.C. (1983): Natural water chemistry. In *Chemical Oceanography*, Hrsg. Riley,J.P. und Chester,R., Academic Press, New York.
- Zwally H.J., Parkinson C.L. und Comiso J.C. (1983): Variability of Antarctic sea ice and changes in carbon dioxide. *Science* **220**. 1005-1012.



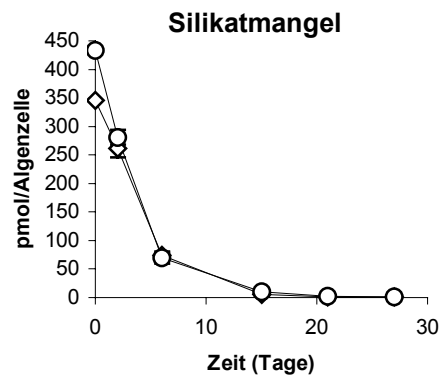
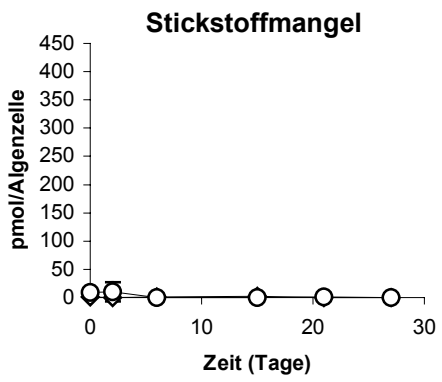
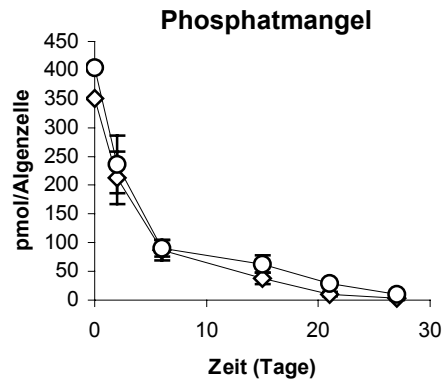
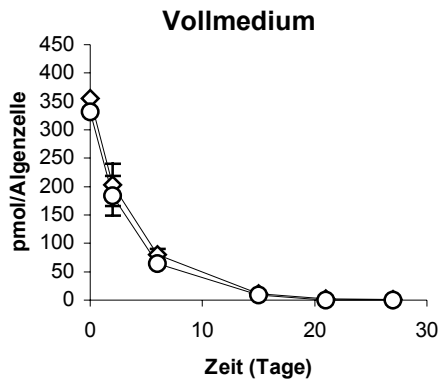
Nährstoffdaten bezogen auf die Zelldichte von *Amphiprora kufferathii*.

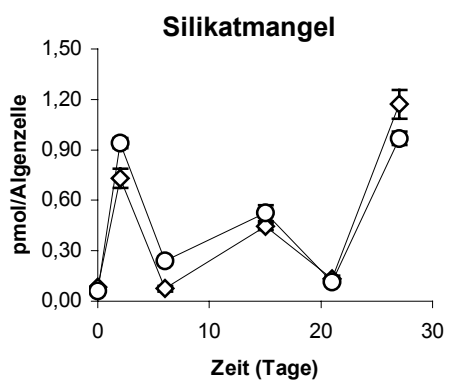
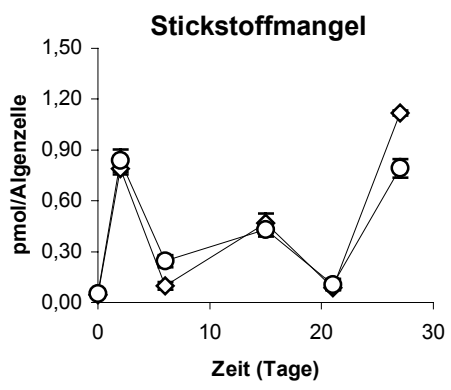
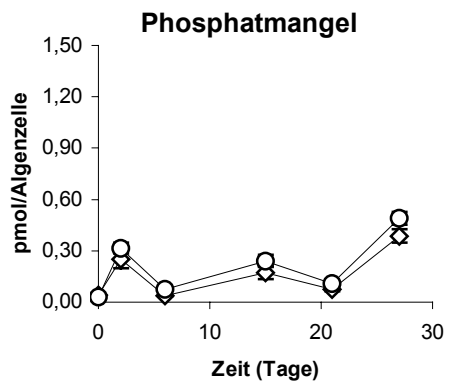
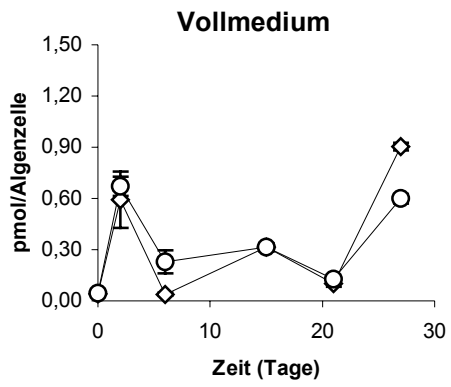
KONTROLLANSÄTZE



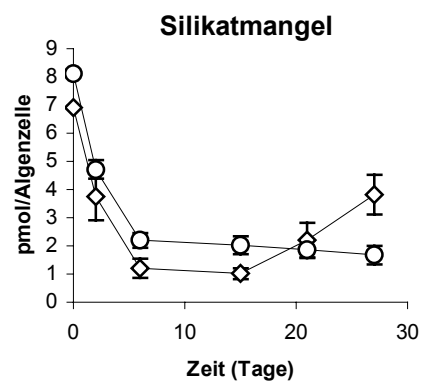
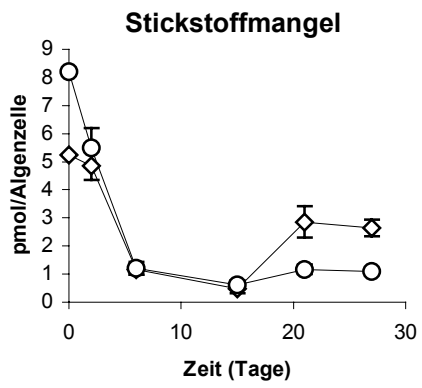
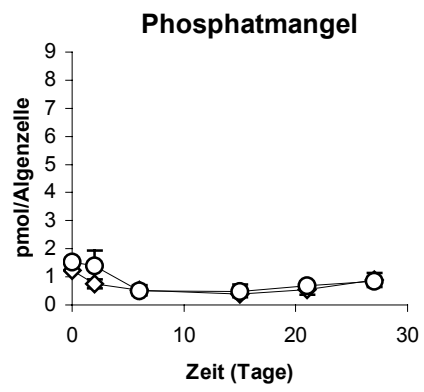
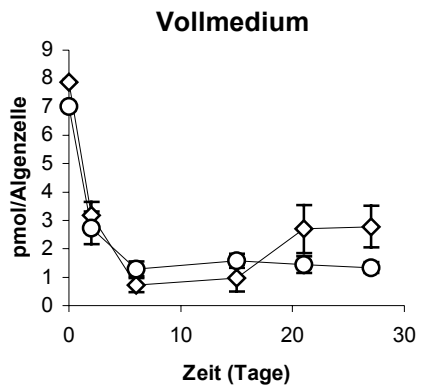
NITRIT

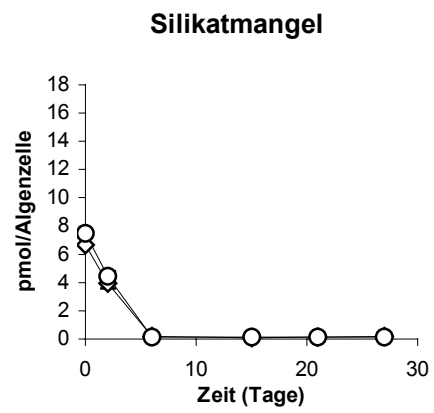
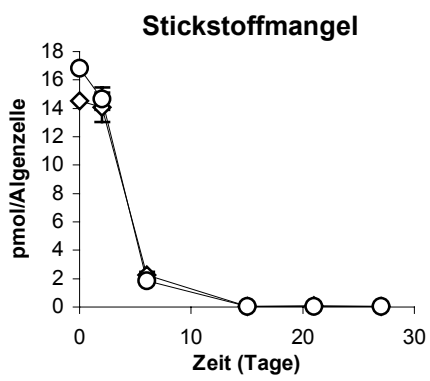
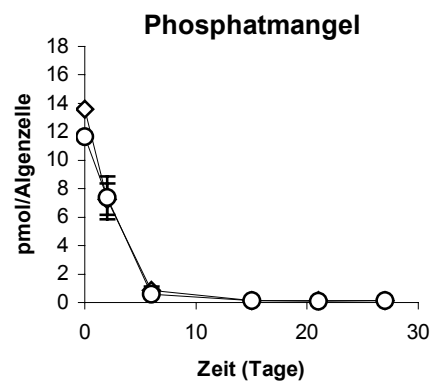
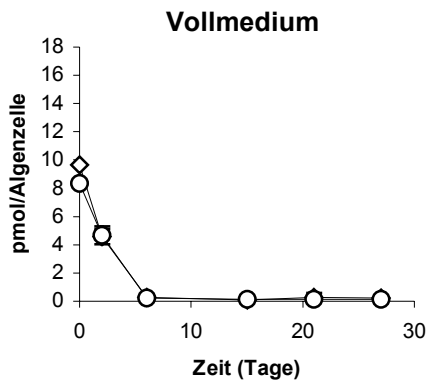
NITRAT



AMMONIUM

PHOSPHAT



SILIKAT

### **Danksagung**

Mein Dank gilt Prof. Dr. G. O. Kirst für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für das interessante Thema. Er gab mir die Möglichkeit das Gebiet frei zu bearbeiten und eigenen Ideen nachzugehen. Seine Bürotür war immer für mich offen und er stand mir mit Rat und Tat zur Seite. Ich danke ihm für die Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten und den Vorsitz in der Prüfungskommission zu übernehmen.

Herrn Priv. -Doz. Dr. J. Harder danke ich für die Betreuung des mikrobiologischen- und molekularbiologischen Teils meiner Arbeit und für seine Geduld mich in den erforderlichen Techniken zu unterweisen. Ich danke ihm für die Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten und Mitglied meiner Prüfungskommission zu sein.

Den weiteren Mitgliedern des Prüfungskommission danke ich für ihr mitwirken.

Ich bedanke mich ganz besonders bei meinen „Projektstudenten“ Annina Hube und Mara Schmiing die mit Begeisterung, Fleiß und Zuverlässigkeit ihre Projekte bearbeiteten und eine echte Hilfe waren.

Frau Roswitha Ulmke danke ich für die Unterstützung im Labor, insbesondere bei den Chlorophyllbestimmungen.

Frau Christina Probian danke ich für die Hilfe in den Laboratorien des Max Planck Institutes für marine Mikrobiologie.

Herrn Matthias Birkicht (Zentrum für Marine Tropenökologie, Bremen) danke ich für die „Wiederaufnahme“ in sein Labor und seine tatkräftige Unterstützung bei den Nährstoffanalysen.

Frau Anke Tolz (AG Prof. Dr. W. Heyser, Zentrum für Umweltforschung und Umwelttechnologie, Bremen) danke ich für die Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe Meeresbotanik an der Universität Bremen (auch den Alumnis) für das tolle Arbeitsklima und die tatkräftige Unterstützung sowie für manches aufmunternde Wort in „Krisenzeiten“. Insbesondere bedanke ich mich bei Dr. Ina Plettner für anfängliche Hilfestellungen und die Einführung in die wundersame Welt der Eisdiatomeen. Ein Dank auch an Dr. Stefanie Kühn für die Verstärkung der „Molli-Fraktion“ in der AG Kirst sowie für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Auch Frau Julia Foerster danke ich für die Anmerkungen zu meinem Manuskript.

Dr. Raimund Schriek danke ich, dass er so oft den weiten Weg aus Hohenheim gefunden hat, um mich in den geheimen Riten der PAGE zu unterweisen und für seine Anregungen.

Bei der Abteilung Mikrobiologie des Max Planck Institutes für marine Mikrobiologie bedanke ich mich für die freundliche Unterstützung bei meinen Arbeiten.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meiner Frau Linda für ihren Beistand in dieser schweren Zeit des Zusammenschreibens und ihrer Geduld.

Dr.! Gudrun Kräbs (...nun hast Du doch gewonnen...) danke ich dafür, dass ich bei ihr so manchen „fachlichen Müll“ abladen durfte und ihre aufmunternden Worte.

Ich danke meinen Eltern, Brüdern und Freunden, die mich immer unterstützten.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung.