

**Isolierung und Charakterisierung von Mikroorganismen
von Mineralböden Nordost-Grönlands und Livingston
Island (Antarktis)**

Diplomarbeit

im Studienfach Diplombiologie an der Universität Potsdam

Vorgelegt von Felizitas Bajerski

Gutachter:

PD Dr. Dirk Wagner

(Stiftung Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung Potsdam,
Universität Potsdam)

Prof. Dr. Ingo Schneider

(Institut für Biologie und Biochemie, Universität Potsdam)

Mai 2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	II
Zusammenfassung.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	IX
Abbildungsverzeichnis.....	X
1. Einleitung und Zielstellung.....	1
2. Grundlagen.....	4
2.1 Verbreitung und Diversität von Mikroorganismen in der Hohen Arktis und Antarktis.....	4
2.2 Bedeutung von Mikroorganismen für die Nährstoffflüsse in wenig entwickelten Habitaten.....	5
2.3 Der Artbegriff in der Mikrobiologie.....	6
2.4 Methoden zur Charakterisierung von Mikroorganismen in Reinkultur.....	7
3. Untersuchungsgebiete.....	10
3.1 Livingston Island (Südliche Shetlandinseln, Antarktis).....	10
3.2 Store Koldewey (Nordost-Grönland).....	12
4. Material und Methoden.....	16
4.1 Probennahme am Untersuchungsstandort.....	16
4.1.1 Livingston Island	16
4.1.2 Store Koldewey (Nordost-Grönland).....	17
4.2 Anreicherung, Isolierung und Kultivierung.....	17
4.2.1 Nährmedien.....	17
4.2.2 Aufbereitung der Bodenproben.....	19
4.2.3 Anreicherung von Mikroorganismen.....	19
4.2.4 Isolation von Reinkulturen.....	20
4.2.5 Kultivierung der Isolate.....	20

4.3	Molekularbiologische Analysen.....	21
4.3.1	Extraktion von DNA aus den Reinkulturen.....	21
4.3.2	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	21
4.3.3	Agarosegelelektrophorese.....	22
4.3.4	Aufreinigung der PCR-Produkte und Sequenzierung.....	23
4.3.5	Phylogenetische Analyse.....	23
4.4	Mikroskopische Analysen.....	23
4.4.1	Phasen-Kontrast-Mikroskopie.....	23
4.4.2	Lichtmikroskopie.....	24
4.4.2.1	Gram-Färbung nach GRAM.....	24
4.4.2.2	Geißelfärbung nach LÖFFLER.....	25
4.4.2.3	Sporenfärbung nach WIRTZ.....	25
4.5	Physiologische und ökologische Analysen.....	26
4.5.1	Temperatur.....	26
4.5.2	pH-Wert.....	26
4.5.3	Salztoleranz.....	27
4.5.4	Berechnung der spezifischen Wachstumsrate μ	27
4.5.5	Verhalten gegenüber Sauerstoff.....	28
4.5.6	Antibiotika und Lysozym.....	28
4.6	Biochemische Leistungsfähigkeit.....	30
4.6.1	Zuckerverwertbarkeit.....	30
4.6.2	Methylrot-Probe.....	31
4.6.3	Stärkehydrolyse (Amylase-Test).....	32
4.6.4	Nachweis von Gelatinase.....	32
4.6.5	Protease-Test.....	33
4.6.6	Harnstoffspaltung (Urease).....	34
4.6.7	Indolbildung aus Tryptophan.....	34
4.6.8	Bildung von Schwefelwasserstoff.....	35
4.6.9	Katalase-Test.....	36
4.6.10	Oxidase-Test.....	36
4.7	Fremdmaterial.....	37

5.	Ergebnisse.....	38
5.1	Auswahl von Isolaten aus den Anreicherungskulturen zur näheren Charakterisierung.....	38
5.2	Phylogenetische Einordnung der ausgewählten Isolate.....	38
5.3	Morphologische, physiologisch-ökologische und biochemische Charakterisierung/ Beschreibung der Isolate.....	43
5.3.1	Morphologische Charakterisierung.....	43
5.3.2	Physiologisch-Ökologische Charakterisierung.....	45
5.3.3	Biochemische Leistungsfähigkeit.....	51
5.4	Detaillierte Charakterisierung der einzelnen Isolate.....	56
5.4.1	Beschreibung von LI-1.....	56
5.4.2	Beschreibung von LI-2.....	58
5.4.3	Beschreibung von LI-3.....	59
5.4.4	Beschreibung von LI-4.....	61
5.4.5	Beschreibung von SK-1.....	62
5.4.6	Beschreibung von SK-2.....	63
5.4.7	Beschreibung von SK-3.....	65
5.4.8	Beschreibung von SK-4.....	66
6.	Diskussion.....	68
6.1	Isolation von Reinkulturen.....	68
6.2	Verwandtschaftsvergleich der untersuchten Bakterienstämme.....	69
6.3	Bedeutung der untersuchten Organismen.....	79
6.4	Ausblick.....	81
7.	Literatur.....	84
8.	Danksagung.....	94
9.	Eigenständigkeitserklärung.....	95
10.	Anhang.....	96

Zusammenfassung

Die mikrobielle Gemeinschaft in extremen Habitaten wie der Arktis und der Antarktis ist immer noch wenig erforscht und erst ca. 1 % der Mikroorganismen überhaupt kultiviert. Aus diesem Grund war das Ziel der vorliegenden Arbeit, Anreicherungskulturen aus Bodenproben von Store Koldewey (Nordost-Grönland) und Livingston Island (South Shetland Islands, Antarktis) zu gewinnen, daraus Reinkulturen zu isolieren und einige Isolate exemplarisch zu charakterisieren. Von den Reinkulturen von Livingston Island wurden die Stämme LI-1, LI-2, LI-3 und LI-4 charakterisiert. Von den Isolaten von Store Koldewey wurden die Kulturen SK-1, SK-2, SK-3 und SK-4 ausgewählt. Die Charakterisierung erfolgte in einem möglichst polyphasischen Ansatz, indem einerseits eine molekulare Typisierung mittels 16S rRNA-Gen-Analytik vorgenommen und andererseits der Phänotyp morphologisch, physiologisch-ökologisch und biochemisch beschrieben wurde. Der phänotypische Ansatz wurde bearbeitet, indem zelluläre Eigenschaften, wie Form, Größe, Sporenbildung oder Zellwandaufbau ermittelt, und die Koloniemorphologien beschrieben wurden. Außerdem wurden die Isolate hinsichtlich ihrer physiologisch-ökologischen und biochemischen Eigenschaften, wie Temperatur, pH-Wert, Salztoleranz, Verhalten gegenüber Sauerstoff, Enzymausstattung und Stoffwechsel, charakterisiert. Zur genotypischen Charakterisierung diente der Vergleich der 16S rRNA-Gensequenzen von den charakterisierten Isolaten mit ihren nächsten Verwandten.

Alle Isolate weisen eine relativ hohe Sequenzähnlichkeit von über 97 % zu ihren nächsten Verwandten auf, und würden sich demnach innerhalb dieser, von STACKEBRANDT & GOEBEL (1994) vorgeschlagenen, Artgrenze befinden. Allerdings sprechen die ermittelten phänotypischen Unterschiede in vielen Fällen dafür, dass es sich bei den Isolaten um neue, bisher unbeschriebene, Taxa handelt. Isolat LI-1 von Livingston Island gehört zusammen mit SK-1 und SK-3 von Store Koldewey innerhalb des Phylums der *Actinobacteria* zur Familie der *Microbacteriaceae*. Trotz der hohen Sequenzübereinstimmung von über 98 % und einer morphologischen Ähnlichkeit, unterscheidet sich Isolat LI-1 in vielen physiologisch-biochemischen Eigenschaften, vor allem im Temperaturspektrum, eindeutig von *Microterricola viridarii* und *Leifsonia pindariensis*. Neben den hohen Sequenzunterschieden weist Isolat SK-1 zu seinen nächsten Verwandten *Cryobacterium psychrotolerans* (97,5 %), *Salinibacterium xinjiangense* (96,7 %) und *Frigoribacterium faeni* (96,6 %) Unterschiede im Temperaturspektrum, sowie in der Salztoleranz und biochemischen Eigenschaften auf. Obwohl die Sequenzübereinstimmung von SK-3 zu seinen nächsten Verwandten über 99 % beträgt, treten im Vergleich zu *Agreia bicolorata* Unterschiede in Koloniemorphologie und Temperaturspektrum und zu

Agreia pratensis Abweichungen im Temperaturspektrum und –optimum auf. Die Isolate LI-2 und LI-3 zählen innerhalb des Phylums der *Actinobacteria* zur Familie der *Micrococcaceae*. Vor allem die Unterschiede in der biochemischen Leistungsfähigkeit sprechen dafür, dass Isolat LI-2 weder *Arthrobacter psychrolactophilus*, noch *Arthrobacter stackebrandtii* zugeordnet werden kann. Vergleicht man die physiologischen Eigenschaften, wie Temperaturspektrum und Salztoleranz oder die biochemische Leistungsfähigkeit, werden viele Unterschiede zwischen LI-3 und *Arthrobacter psychrophenicus* und *Arthrobacter kerguelensis* deutlich. Isolat LI-4 ist der Familie der *Planococcaceae* im Phylum *Firmicutes* zugeordnet. Die deutlichen Unterschiede in der morphologischen und biochemischen Charakteristik zwischen LI-4 und *Filibacter limicola* lassen trotz eines ähnlichen Temperaturspektrums und der hohen Sequenzübereinstimmung darauf schließen, dass die Stämme nicht zu einer Art oder zu einer Gattung gehören. Zwischen LI-4 und *Sporosarcina globispora* existieren nur geringe morphologische (Koloniefarbe), physiologische (Temperaturspektrum) und biochemische Unterschiede. Isolat SK-2 gehört zur Familie der *Flavobacteriaceae*. Trotz der hohen Sequenzähnlichkeit von über 98 %, treten zwischen SK-2 und *Flavobacterium hydatidis* und *Flavobacterium glaciei* Unterschiede in der Zell- und Koloniemorphologie, der Zuckerverwertbarkeit und der biochemischen Leistungsfähigkeit auf. Isolat SK-4 ist dem Genus *Pseudomonas* in der Familie der *Pseudomonadaceae* zugeordnet. Die hohen Sequenzähnlichkeiten von über 99 % deuten darauf hin, dass SK-4 dem Genus *Pseudomonas* zugeordnet ist, mit einer hohen phänotypischen Ähnlichkeit ist eine Artzugehörigkeit von SK-4 zu *P. migulae* wahrscheinlich.

Die Untersuchung der prokaryotischen Diversität und ihre Beziehung zum Ökosystem besonders in extremen Habitaten wie Arktis und Antarktis ist und bleibt ein wichtiges und interessantes Forschungsgebiet. Es ist erforderlich, einen möglichst vollständigen Überblick über die mikrobielle Gemeinschaft zu erhalten und beispielhaft Reinkulturen zu kultivieren und charakterisieren.

Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Arthrobacter</i>
Abb.	Abbildung
ad	lat.: zu
BD	Becton/ Dickinson
bp	Basenpaare
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
d	Tage
d.h.	das heißt
deion.	Deionisiert
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxy ribonucleic acid)
DOC	Dissolved organic carbon
<i>et al.</i>	lat.: et alii (und andere)
G	Guanin
gTM	Gramm Trockenmasse
kb	Kilobasen
LB	Luria Bertani/ Lysogeny Broth
MIO	Mikroorganismen
MM	Minimalmedium
MM+Glc	Minimalmedium mit Glucose
n. K.	Negativkontrolle
n.g.	nicht getestet
OD	Optische Dichte

p	para
p. K.	Positivkontrolle
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RBR	Relativer Bindungsgrad (relative binding ratio)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure (ribosomal ribonucleic acid)
S	Svedberg
Tab.	Tabelle
TM	Trockenmasse
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
z.B.	zum Beispiel

In diesem Verzeichnis nicht aufgeführt sind:

- SI-Einheiten, deren Symbole sowie Zeichen und Kürzel aus chemischen oder mathematischen Formeln,
- Kurzbezeichnungen für die Zusammensetzung von Puffern und Medien, diese werden in den entsprechenden Kapiteln erläutert.

Tabellenverzeichnis

3-1:	Bodenparameter von Livingston Island und Store Koldewey (Ganzert, L., persönliche Mitteilung)	12
4-1:	Beschreibung der verwendeten Antibiotika	29
4-2:	Auflistung der verwendeten Zucker	30
5-1:	Ergebnis der Nucleotide Similarity Search von EBI und Blast von NCBI	40
5-2:	Ergebnisse der mikroskopischen Färbungen	45
5-3:	Wachstum auf unterschiedlichen Nährmedien	45
5-4:	Ergebnisse der Zuckerverwertbarkeit	51
10-1:	Zusammenfassung der Ergebnisse der Charakterisierung der Isolate	96

Abbildungsverzeichnis

3-1:	Der antarktische Kontinent mit der antarktischen Halbinsel und antarktischen Inseln	10
3-1a:	Übersichtskarte der Antarktis, Pfeil: Südliche Shetlandinseln	10
3-1b:	Südliche Shetlandinseln mit Livingston Island	10
3-2:	Karte des Untersuchungsgebietes Store Koldewey in Nordost-Grönland	11
3-3:	Karte des Untersuchungsgebietes Store Koldewey in Nordost-Grönland	13
3-4:	Klimadiagramm Danmarkshavn Lage: 76°46'N 18°46'W	14
3-5:	Blühende Vierkantige Schuppenheide (<i>Cassiope tetragona</i>)	14
3-6:	Bodenprofil von Transekt 1 (T1-1) mit initialer Bodenbildung	14
4-1:	Bodenprofil von Transekt 1 (T1-1) mit initialer Bodenbildung	15
5-1:	Ergebnis der DNA-Extraktion der Isolate; Überprüfung mittels Agarosegelelektrophorese mit Eco RI/Hind III als Größenstandard	39
5-2:	Ergebnis der PCR der Isolate, Überprüfung mittels Agarosegelelektrophorese mit einer 1 kb Leiter als Standard; nk: Negativkontrolle; pk: Positivkontrolle (<i>E.Coli</i> K12)	39
5-3:	Phylogenetischer Stammbaum mit integrierten Isolaten (Fettdruck)	42
5- 4:	Gram-Färbung von LI-4 (grampositiv)	43
5- 5:	Geißelfärbung (5-5a: LI-2; 5-5b: LI-4)	44
5-6:	Sporenfärbung LI-3	44
5-7:	Temperaturspektren der Isolate	46
5-8:	pH-Spektrum der Isolate	47
5-9:	Salztoleranzkurven der Isolate	48
5-10:	Hemmhofdurchmesser (mm) der Isolate, ausgelöst durch ihre Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika	50
5-11:	Hemmhofdurchmesser (mm) der Isolate, ausgelöst durch Lysozym	50
5-12:	Beispiel zur „Bunten Reihe“	51
5-13:	Ergebnis Methylrot-Probe	52
5-13a:	Isolate von Livingston Island	52
5-13b:	Isolate von StoreKoldewey	52
5-14:	Ergebnisse des Katalase-Tests	53
5-14a:	Isolate von Livingston Island	53

5-14b:	Isolate von Store Koldewey	53
5-15:	Ergebnisse des Urease-Tests, Isolate von Livingston Island	54
5-16:	Ergebnisse des Indol-Tests	55
5-16a:	Isolate von Livingston Island	55
5-16b:	Isolate von Store Koldewey	55
5-17:	Bildung von H ₂ S	56
5-17a:	Isolate LI-1, SK-4 und SK-3 als Beispiel	56
5-17b:	Bildung von H ₂ S: Detail	56
5-18:	Morphologie von Isolat LI-1	56
5-18a:	Kolonien und Impfstrich	56
5-18b:	Zellform in der Phasen-Kontrast-Mikroskopie	56
5-19:	Morphologie von Isolat LI-2	58
5-19a:	Kolonien und Impfstrich	58
5-19b:	Zellform in der Phasen-Kontrast-Mikroskopie	58
5-20:	Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika, Beispiel: Erythromycin LI-2	58
5-21:	Morphologie von Isolat LI-3	59
5-21a:	Kolonien und Impfstrich	59
5-21b:	Zellform in der Phasen-Kontrast-Mikroskopie	59
5-22:	Empfindlichkeit von Isolat LI-3 gegenüber Oxytetracyclin, Beispiel: Ausbildung doppelter Hemmhöfe	60
5-23:	Morphologie von Isolat LI-4	61
5-23a:	Kolonien und Impfstrich	61
5-23b:	Zellform in der Phasen-Kontrast-Mikroskopie	61
5-24:	Morphologie von Isolat SK-1	62
5-24a:	Kolonien und Impfstrich	62
5-24b:	Zellform in der Phasen-Kontrast-Mikroskopie	62
5-25:	Morphologie von Isolat SK-2	63
5-25a:	Kolonien und Impfstrich	63
5-25b:	Zellform in der Phasen-Kontrast-Mikroskopie	63
5-26:	Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika, keine Hemmung durch Kanamycin- Sulfat	64
5-27:	Morphologie von Isolat SK-3	65
5-27a:	Kolonien und Impfstrich	65
5-27b:	Zellform in der Phasen-Kontrast-Mikroskopie	65

5-28:	Morphologie von Isolat SK-4	66
5-28a:	Kolonien und Impfstrich	66
5-28b:	Zellform in der Phasen-Kontrast-Mikroskopie	66
5-29:	Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika: Neomycin bewirkt bei Isolat SK-4 sehr kleine Hemmhöfe	67
5-30:	Zuckerverwertbarkeit SK-4 im Test mit Phenolphthalein	67

1. Einleitung und Zielstellung

Arktis und Antarktis stellen mit ihren extremen Umweltbedingungen, den klimatischen Besonderheiten und der geographischen Isolation ein riesiges einzigartiges natürliches Labor dar (WAGNER *et al.*, 2006; WYNN-WILLIAMS, 1996). Rekonstruktionen der paleoklimatischen Umwelt (GILICHINSKY & WAGENER, 1995) können Aufschluss über den aktuellen und zukünftigen Klimawandel bringen, denn Arktis und Antarktis spielen eine Schlüsselrolle im Klimasystem Erde (WAGNER *et al.*, 2008). Die Antarktis beinhaltet 90 % der globalen Eismasse und beeinflusst damit die südliche Hemisphäre und die gesamte Erdatmosphäre (UGOLINI & BOCKHEIM, 2008), andersherum wirken sich Änderungen in der Erdatmosphäre auf die polaren Gebiete aus. In den Gebieten der maritimen Antarktis westlich der antarktischen Halbinsel wurde beispielsweise seit 1945 ein dramatischer Temperaturanstieg um 2,5°C registriert (VAUGHAN *et al.*, 2001). Es bleibt die Frage zu klären, welchen Einfluss die Klimaerwärmung auf dieses empfindliche Ökosystem hat (BOKHORST *et al.*, 2007). Das terrestrische antarktische Ökosystem ist charakterisiert durch geringe Temperaturen, Feuchtigkeit und Nährstoffgehalte (BOKHORST *et al.*, 2007), lokal auch durch eine hohe Salinität (AISLABIE *et al.*, 2008). Auch der Nordosten Grönlands zeichnet sich durch diese Eigenschaften, insbesondere auch durch geringe Nährstoffgehalte, aus, im Gegensatz zu vielen anderen arktischen Habitaten wie zum Beispiel der polygonalen Tundra, die einen hohen Kohlenstoffgehalt aufweist (WAGNER & LIEBNER, 2009). Mikroorganismen spielen eine wichtige Rolle als Grundlage für ein funktionierendes arktisches und antarktisches Ökosystem (WYNN-WILLIAMS, 1996). Die einfache mikrobielle Gemeinschaft dient als Indikator für Veränderungen von Umweltbedingungen und beinhaltet Schlüsselorganismen für die Funktion des Ökosystems (WYNN-WILLIAMS, 1996). Daher ist es essentiell, die Stoffkreisläufe und die biologischen und physikalischen Einflüsse im Zusammenhang mit der Lebensgemeinschaft im Permafrostboden in den polaren Regionen zu verstehen (BARRETT *et al.*, 2006). Die terrestrischen Ökosysteme der Arktis und Antarktis zeigen eine starke positive Relation zwischen Temperatur und mikrobieller Aktivität (BARRETT *et al.*, 2006). Die Sensibilität der Mikroorganismen gegenüber dem Klimawandel und der Einfluss der mikrobiellen Aktivität unter Niedrigtemperaturbedingungen im Kohlenstoffkreislauf sind bisher weitgehend unbekannt (BARRETT *et al.*, 2006; NIEDERBERGER *et al.*, 2008). Wie jede ökologische Nische besitzen auch die polaren Regionen eine charakteristische Umwelt mit einer spezialisierten mikrobiellen Gemeinschaft (WAGNER *et al.*, 2006). Die Charakterisierung dieser Gemeinschaft ist wichtig, um besondere Gruppen zu identifizieren und ihre Anpassung an die extremen Bedingungen und ihre funktionelle Bedeutung im Habitat zu verstehen (HANSEN *et al.*, 2007). Mikroben aus diesen Ha-

bitaten gelten auf Grund methodischer Probleme als schwer kultivierbar. Es existiert mittlerweile eine große Anzahl an DNA-Sequenzen für dort vorkommenden Mikroorganismen, aber nur die wenigsten davon wurden tatsächlich isoliert und beschrieben (WAGNER *et al.*, 2006). Die polaren Regionen weisen eine geringere Diversität als viele temperierte Gebiete auf (AISLABIE *et al.*, 2008), dafür findet man innerhalb der vorkommenden Phyla eine große Taxa-Variabilität mit diversen Genpool und eine hohe metabolische Flexibilität (WYNN-WILLIAMS, 1996). Die geringe Speziesdiversität ist begründet in der räumlichen Isolation der Gebiete und dem umweltbedingten Selektionsdruck, der aber gleichzeitig zu ungewöhnlichen Eigenschaften, biochemischen und physiologischen Variationen und besonderen Überlebensstrategien führt (WYNN-WILLIAMS, 1996). Die Rolle dieser Organismen im Ökosystem und ihre Funktionen und Fähigkeiten müssen noch untersucht werden, um diese einzigartigen Ökosysteme zu verstehen. Unter Anwendung der 16S rRNA-Analytik hat sich herausgestellt, dass oft solche Gruppen in den Habitaten dominant sind, die an diesen Standorten bisher nicht bekannt waren, bzw. nicht isoliert werden konnten (WAGNER *et al.*, 2006). In der Antarktis sind Phyla der *Actinobacteria* und *Bacteroidetes* dominierend, wobei auch *Acidobacteria*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes* und *Proteobacteria* vorkommen (UGOLINI & BOCKHEIM, 2008). In der Arktis sind grampositive Bakterien ohne Sporen vorherrschend (KOCHKINA *et al.*, 2001) und Phyla der *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Flavobacteria* und α -, β -, γ -*Proteobacteria* vertreten (HANSEN *et al.*, 2007). Die Entdeckung neuer Arten, die Untersuchung der Speziesdiversität und der metabolischen Flexibilität der Mikroorganismen aus Arktis und Antarktis birgt ein großes Potential für das Verständnis eines funktionierenden Ökosystems in den wenig entwickelten Habitaten sowie für biotechnologische Anwendungen vor allem im Niedrigtemperaturbereich (WYNN-WILLIAMS, 1996). Weitere Untersuchungen der prokaryotischen Diversität und ihre Beziehungen zum Ökosystem in extremen Habitaten sind erforderlich, um die Zusammenhänge dieser Interaktionen und die Möglichkeiten, die sich daraus ergeben, besser zu verstehen (WAGNER *et al.*, 2006).

Das Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung hat sich zum Ziel gesetzt, die Kohlenstoffdynamik und die Entwicklung von mikrobiellen Gemeinschaften in extremen Habitaten zu verstehen. Es ist wichtig alle Faktoren, die den Klimawandel bestimmen, so auch den Kohlenstoffkreislauf im Permafrost, zu betrachten. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Teil zum Verständnis der Ökologie der mikrobiellen Gemeinschaft und ihre Funktionen im Stoffwechsel unter extremen Bedingungen beizutragen. Unter diesem Aspekt sollten Mikroorganismen aus diesen extremen, wenig entwickelten Habitaten einerseits mit molekularen Methoden, wie der 16S rRNA-Analytik, phylogenetisch untersucht werden. Anderer-

seits sollten Mikroorganismen aus diesen Habitaten mit klassischen Methoden angereichert, isoliert und einige Schlüsselorganismen charakterisiert werden. Ein weiteres Ziel war es, eine Aussage über die Bedeutung der Mikroorganismen innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft und in Bezug auf ihr Ökosystem zu machen.

2. Grundlagen

2.1 Verbreitung und Diversität von Mikroorganismen in der Hohen Arktis und Antarktis

In der Vergangenheit ging man davon aus, dass in extremen Habitaten nur wenige Arten mit geringer Zellzahl existieren (SMITH *et al.*, 2006). Tatsächlich sind innerhalb der höheren Organismen nur wenige Pflanzen und Tiere in der Lage unter den extremen Umweltbedingungen der Arktis und Antarktis zu überleben, Bakterien dagegen sind in den Permafrostböden weit verbreitet (ADAMS *et al.*, 2006). Untersuchungen im Sibirischen Permafrost ergaben Bakterien-Zellzahlen von 10^7 bis 10^9 Zellen gTM^{-1} (Zellen pro Gramm Trockenmasse; KOBABE *et al.*, 2004; VOROBOYOVA *et al.*, 1997), und auch in der hohen Arktis enthält der Boden Mikroorganismen in Zellzahlen von über 10^9 gTM^{-1} (HANSEN *et al.*, 2007). In den, im Rahmen dieser Arbeit untersuchten, Bodenproben von Store Koldewey betrug die Zellzahl heterotropher kultivierter Mikroorganismen 10^6 Zellen gTM^{-1} (GANZERT, persönliche Mitteilung). Im Dry Valley der Antarktis wurden Werte von 10^6 bis 10^8 prokaryotische Zellen gTM^{-1} ermittelt (COWAN *et al.*, 2002). Zellzahlen von 10^4 bis 10^8 gTM^{-1} kultivierter heterotropher Mikroorganismen konnten auch im Untersuchungsgebiet Livingston Island (Antarktis) gemessen werden (GANZERT, persönliche Mitteilung). Im Vergleich zu temperierten Regionen weisen die Böden der Antarktis eine geringere Diversität auf (AISLABIE *et al.*, 2008) und werden von einigen Phyla, wie den *Actinobacteria* oder *Bacteroidetes*, dominiert. Es kommen coryneforme verwandte Bakterien, wie *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas* oder *Corynebacterium*, zusammen mit gramnegativen Eubakterien, wie *Pseudomonas* oder *Flavobacterium*, vor. Innerhalb der *Fimicutes* wurden *Bacillus*, *Micrococcus*, *Nocardia* und *Streptomyces* isoliert (CAMERON *et al.*, 1972; FRIEDMANN, 1993). Auch *Cyanobacteria*, die als Primärproduzenten eine wichtige Rolle spielen, konnten in den antarktischen Böden nachgewiesen werden (DE LA TORRE *et al.*, 2003; TATON *et al.*, 2007). In arktischen Permafrostböden existiert eine relativ hohe Diversität an Mikroorganismen. Es wurden Bakterien aus der Gruppe der α -, β -, γ -*Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Flavobacteria*, *Planctomycetacia*, *Sphingobacteria*, *Thermomicrobia* und *Verrucomicrobiae* dokumentiert, wobei innerhalb des dominanten Phylums der *Actinobacteria* die Gattungen *Arthrobacter* und *Cellulomonas* vorherrschend sind (HANSEN *et al.*, 2007). Insgesamt hat sich die Ansicht über die mikrobielle Diversität in Niedrigtemperaturhabitaten mit den fortschreitenden Untersuchungen im Laufe der Zeit geändert. Anfänglich wurde die Diversität als gering oder gar nicht

vorhanden betrachtet, später wurde von einer relativ limitierten Diversität gesprochen, inzwischen geht man von einer diversen mikrobiellen Gemeinschaft aus (DEMING, 2002), die die Grundlage für ein funktionierendes polares Ökosystem darstellt (WYNN-WILLIAMS, 1996). Zukünftige Untersuchungen sollten klären wie diese Diversität, auch im Vergleich zu temperierten Ökosystemen, gestaltet ist. Auf Grund der extremen Umweltbedingungen haben die Mikroorganismen ungewöhnliche Eigenschaften und spezielle biochemische und physiologisch-ökologische Überlebensstrategien entwickelt (WYNN-WILLIAMS, 1996). So können Membranen eine spezifische Lipidzusammensetzung besitzen, um die Fluidität und die Membrantransport zu gewährleisten (MANGELSDORF *et al.*, 2009). Oder die Bakterien exprimieren kälteadaptierte Enzyme und sogenannte Kälteschock-Proteine in Anpassung an die Niedrigtemperaturhabitate (DEMING, 2002).

2.2 Bedeutung von Mikroorganismen für die Nährstoffflüsse in wenig entwickelten Habitaten

Mikroorganismen spielen eine wichtige Rolle in allen Stoffkreisläufen der Erde. Auf Grund ihrer Fähigkeit auch unter extremen Umweltbedingungen überleben zu können und der Ausprägung diverser physiologischer Stoffwechselwege, sind Mikroorganismen die idealen Erstbesiedler in wenig entwickelten Habitaten. Sie sind in der Lage bei extrem hohen oder niedrigen Temperaturen zu wachsen oder können geringe Wasserverfügbarkeiten, hohe Salzgehalte und extreme pH-Werte tolerieren. Im Zusammenhang mit den wenig entwickelten Habitaten der Arktis und Antarktis ist außerdem essentiell, dass Mikroorganismen auch bei geringen Nährstoffgehalten wachsen können und durch ihren Stoffwechsel weitere Nährstoffe für andere Organismen zugänglich machen. Autotrophe Organismen, die in der Lage sind aus CO₂ und anorganischen Komponenten, Biomasse aufzubauen, sind die Grundlage jedes Ökosystems. Phototrophe Mikroorganismen nutzen in der oxygenen (Cyanobakterien) oder anoxygenen Photosynthese (Purpurbakterien, Grüne Schwefel- oder Nichtschwefelbakterien) das Sonnenlicht als Energiequelle, weshalb sie vor allem in den oberen Bodenschichten zu finden sind. Methanogene Archaeen bilden aus CO₂ das klimarelevante Gas Methan, daher sollten diese Prozesse im Zusammenhang mit dem Klimawandel betrachtet und genau verstanden werden. Auch chemolithoautotrophe und acetogene Bakterien leisten einen Beitrag zur Bereitstellung organischen Materials. Des Weiteren sind Mikroorganismen an den Stickstoff-, Schwefel- und Phosphorkreisläufen beteiligt und sind befähigt Eisen, andere Spurenelemente und Ionen freizusetzen oder zu binden. Neben physikalischen und chemischen (Verwitte-

rungs-) Prozessen sind auch biologische Prozesse Teil der Bodenbildung. Das von den Primärproduzenten bereitgestellte organische Material bildet die Wachstumsgrundlage für chemoorganotrophe Mikroorganismen und Pilze. Diese produzieren Kohlensäure und organische Säuren und tragen somit zur Gesteinsauflösung und weiteren Bodenentwicklung bei. In der weiteren Entwicklung des Bodenhabitats bilden Mikroorganismen Symbiosen mit Pflanzen aus. Mikroorganismen stellen vor allem in wenig entwickelten Habitaten die Grundlage für eine weitere Besiedlung mit höheren Organismen dar und spielen generell eine entscheidende Rolle für ein funktionierendes Ökosystem.

2.3 Der Artbegriff in der Mikrobiologie

Sowohl für die Eukaryoten als auch für die Prokaryoten existieren keine offizielle Artdefinitionen, sondern verschiedene Artkonzepte, die zu unterschiedlichen Einteilungen eines Taxons führen können. Nach dem morphologischen Artkonzept lassen sich Arten als Gemeinschaft, oder verwandte Gemeinschaften, die eindeutige morphologische Gemeinsamkeiten aufweisen, beschreiben (CLARIDGE *et al.*, 1997). Das biologische Artkonzept definiert Arten als Gruppen von miteinander kreuzenden natürlichen Populationen, die von anderen Gruppen von Populationen reproduktiv isoliert sind (MAYR, 1942). In der Mikrobiologie wird ein physiologisches Artkonzept herangezogen, wonach eine Art eine Sammlung von Stämmen darstellt, die alle Haupteigenschaften gemeinsam haben und sich in mindestens einer Eigenschaft eindeutig von einer anderen Stammsammlung unterscheiden (GORDON, 1978; COLWELL *et al.*, 1995). Die Anwendung dieser Artkonzepte in der Mikrobiologie gestaltet sich als schwierig, da die Prokaryoten oft keine eindeutigen morphologischen Unterscheidungsmerkmale aufweisen und die Ausprägung eines speziellen Stoffwechsels von den gegebenen Umweltbedingungen abhängig ist. Außerdem haben sich bestimmte Stoffwechselwege analog in verschiedenen Gruppen entwickelt. Zum Beispiel galt die Fähigkeit Nitrit zu oxidieren lange Zeit auf die Gruppe der Nitritoxidanten beschränkt. Neuere Untersuchungen zeigen aber, dass auch Archaeen zur Nitrifikation befähigt sind (KOENICKE *et al.*, 2005). Daher wurde von WOESE und Kollegen (1987) eine molekulare Typisierung auf Basis der RNA vorgeschlagen. Auch das biologische Artkonzept lässt sich, auf Grund der speziellen „Fortpflanzung“ der Mikroorganismen, nicht anwenden. Die bisherigen Artkonzepte erscheinen einigen Forschern zu konservativ, da diese zu einer Unterschätzung der mikrobiellen Diversität führen würden (ROSELLÓ-MORA & AMANN, 2001; WHITMAN *et al.*, 1998). Für eine möglichst vollständige Erfassung der mikrobiellen Gemeinschaft und eine eindeutige Einordnung der einzelnen Taxa

ist ein polyphasischer Ansatz unter Anwendung eines breiten Spektrums unterschiedlicher Methoden erforderlich (VANDAMME *et al.*, 1996). Einerseits sollte der Genotyp charakterisiert werden, beispielsweise direkt über DNA-Sequenzierung oder indirekt durch DNA-DNA-Hybridisierung und G+C mol%-Bestimmung. Andererseits ist es erforderlich, den im Habitat ausgeprägten Phänotyp morphologisch, physiologisch und biochemisch zu beschreiben (ROSELLÓ-MORA & AMANN, 2001). In der molekularen Systematik gilt eine 97%ige Sequenzübereinstimmung der 16S rRNA als Artgrenze (STACKEBRANDT & GOEBEL, 1994). Ist der relative Bindungsgrad (RBR) während der DNA-DNA-Hybridisierung gleich oder höher als 70 % gehören die Prokaryoten zu einer Art (WAYNE *et al.*, 1987). Unterscheiden sich Organismen in ihrem G+C- Gehalt um mehr als 5 mol%, sind sie nicht mehr einer Art zu zuordnen (ROSELLÓ-MORA & AMANN, 2001). Um die mikrobielle Diversität eines Ökosystems möglichst vollständig zu erfassen, stellt die molekulare Systematik einen guten Ansatz dar. Für die Erfassung der Funktion und Bedeutung der Mikroorganismen im Ökosystem sind allerdings konventionelle Tests notwendig.

2.4 Methoden zur Charakterisierung von Mikroorganismen in Reinkultur

Die Geschichte der Mikrobiologie lässt sich in verschiedene Phasen einteilen, die geprägt sind von den Entdeckungen ihrer Zeit. Als erster hat VAN LEEUWENHOEK bereits um 1677 mit seinem selbst gebauten Mikroskop Bakterien sichtbar gemacht und als Lebewesen beschrieben. LOUIS PASTEUR (1822-1895) machte zu seiner Zeit entscheidende Entdeckungen für die Mikrobiologie. Mit der „PASTEUR-Flasche“ konnte er 1864 nachweisen, dass Mikroorganismen nicht spontan aus dem Nichts entstehen, sondern sich in der Luft befinden und von dort aus übertragen werden (PASTEUR, 1864 (1864)). Die Grundlage für die Beschreibung von Reinkulturen legte ROBERT KOCH (1843-1910) 1884, indem er Kriterien bestimmte, die spezifische Mikroorganismen als Auslöser einer Krankheit identifizierten (KOCH, 1912 (1884)). Die Voraussetzung für diese „KOCH´schen Postulate“ ist, dass die Mikroorganismen als Kultur isoliert werden können und dass diese Kultur rein ist. Da KOCH als erster festes Medium zur Kultivierung von Mikroben benutzte, konnte er die unterschiedlichen Kolonien sehen und diese an Hand ihrer morphologischen Eigenschaften taxonomisch beschreiben und einteilen. Er ging dabei davon aus, dass jede Kolonie aus einer einzigen Bakterienzelle entsteht und somit eine Reinkultur darstellt. SERGEI WINOGRADSKY (1856-1953) gelang es 1889 über bestimmte Anreicherungsverfahren Stickstoff fixierende Bakterien zu isolieren und formulierte ein Konzept zur Chemolithotrophie (THORNTON, 1953). Der Begriff „Anreicherungskultur“ stammt von MARTINUS BEIJERINCK (1851-1931), der Mikroorganismen aus Boden- und Wasserhabi-

taten anreichern und als Reinkultur isolieren konnte (CHUNG & FERRIS, 1996). In einer Anreicherungskultur werden Mikroorganismen, aus ihrer natürlichen Umgebung über selektive Nährmedien angereichert. Die Auswahl an Kultivierungseigenschaften bestimmt die mikrobielle Gemeinschaft, die mit der Anreicherungskultur gewonnen wird. Da die mikroskopische Betrachtung damals eine der Grundlagen zur Charakterisierung von Mikroben darstellte, wurden zu dieser Zeit viele Färbemethoden entwickelt, so die GRAM-Färbung nach GRAM (1884), die Geißelfärbung nach LOEFFLER (1898) oder die Sporenfärbung nach WIRTZ (1908), die auch in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kamen. Mit der Entdeckung der DNA als genetisches Material durch AVERY, MACLEOD und MCCARTY (1944) eröffneten sich viele neue Möglichkeiten. Besonderes Interesse gilt der bakteriellen Genetik, nachdem festgestellt wurde, dass Mikroorganismen in der Lage sind Erbmaterial durch Konjugation (TATUM & LEDERBERG, 1946) und Transduktion (ZINDER & LEDERBERG, 1952) auszutauschen. Bereits 1977 gelang es SANGER und Kollegen Methoden zur Sequenzierung zur DNA zu entwickeln. Diese Phase im 20. Jahrhundert war geprägt durch die Weiterführung der klassischen Methoden in anwendungsbezogene Bereiche in der Agrarmikrobiologie oder Ökologischen Mikrobiologie einerseits und der Grundlagenforschung im Gebiet der systematischen, strukturellen, biochemischen und physiologischen Mikrobiologie andererseits. Spätestens mit der Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion, kurz PCR genannt, durch MULLIS (SAIKI *et al.*, 1985; MULLIS *et al.*, 1986) spielt die molekulare Mikrobiologie eine entscheidende Rolle bei der Untersuchung von Mikroorganismen. NORMAN PACE formulierte 1986 den Begriff der „Molekularen Umweltbiologie“, in welcher auch die vorgelegte Arbeit anzusiedeln ist. Die modernen Methoden der Molekularbiologie wurden dabei ständig weiterentwickelt. So konnte 1995 realisiert durch VENTER & SMITH das erste bakterielle Genom vollständig entschlüsselt werden (FLEISCHMANN & ADAMS *et al.*, 1995). Im neuen Forschungsbereich der „Genomics“ sind inzwischen mehr als 500 bakterielle Genome vollständig sequenziert worden.

Die 16S rRNA bietet kultivierungsunabhängige Möglichkeiten zur Identifizierung neuer Mikroorganismen (WARD *et al.*, 1992), da sie einen hohen Informationsgehalt besitzt und stark konserviert ist (LANE *et al.*, 1985). Auf Grund dieses kulturunabhängigen Einblicks in die Zusammensetzung gemischter mikrobieller Gemeinschaften (WARD *et al.*, 1990), wurden die klassischen Kultivierungsmethoden lange Zeit als benachteiligt betrachtet. Zunächst ist die Isolation von Reinkulturen für die klassischen Methoden zwingend erforderlich, hinzu kommen viele biochemische und physiologische Tests (AMANN *et al.*, 1995), was insgesamt sehr zeitaufwendig ist (KENNETH *et al.*, 2000). Ein grundsätzliches Problem ist, dass sich viele Mikroorganismen schwer oder gar nicht kultivieren lassen. Für die Anreicherung müssen die

komplexen Eigenschaften und Bedingungen des Ökosystems der Mikroorganismen bekannt sein, um sie isolieren zu können und das ist oft methodisch nicht möglich (Amman et al., 1995). Daher blieben viele Mikroorganismen unbekannt. Schon STALEY & KONOPKA (1985) beschrieben eine „great plate count anomaly“, wonach unter dem Mikroskop viel mehr Organismen zu zählen sind, als während der Lebendkeimzahlbestimmung ermittelt wurden. Viele Mikroorganismen sind lebensfähig, bilden aber keine Kolonien auf einer Platte aus („viable but not culturable“; ROSZAK *et al.*, 1984; 1987). Die kultivierten Mikroorganismen machen bisher nur einen geringen Teil der tatsächlichen Diversität aus (AMMAN *et al.*, 1995). Mit Hilfe der 16S rRNA können morphologisch sehr ähnliche oder nicht kultivierbare Mikroorganismen identifiziert werden. Die Arbeiten von WOESE legten dabei den Grundstein für die Klassifizierung und molekulare Typisierung von Mikroorganismen (WOESE *et al.*, 1987; AMANN *et al.*; 1995). Unter diesem Standpunkt wäre die DNA-Sequenzierung die beste Methode Mikroorganismen in ihre Arten und Unterarten zu differenzieren (OLIVE & BEAN 1999). Der eigentliche Vorteil, dass man keine Reinkulturen gewinnen muss, ist auch gleichzeitig ein Nachteil, da man zwar die Sequenzen des Organismus erhält, aber keine weiteren Tests zur Physiologie, Biochemie oder Morphologie machen kann. Außerdem ist es auch mit der 16S rRNA-Analyse nicht möglich, alle Mikroorganismen zu erfassen. Es könnten sogar solche Organismen verloren gehen, die mit einer guten Isolierungsmethode hätten gewonnen werden können. Probleme treten auf, wenn sich zum Beispiel chimäre Sequenzen aus DNA verschiedener Spezies bilden (AMMAN *et al.*, 1995). Außerdem lysieren die Zellen nicht immer optimal oder die Primer hybridisieren nicht an die DNA-Sequenz (OLIVE & BEAN 1999). Weitere Nachteile sind die weiterhin hohen Kosten der Sequenzierung und der hohe technische Anspruch an Maschinen und menschlichen Fähigkeiten (OLIVE & BEAN 1999).

Offensichtlich ist eine Verknüpfung der klassischen Methoden mit den modernen molekularbiologischen Methoden die optimale Herangehensweise zur Identifizierung von Mikroorganismen und zur weiteren Charakterisierung ihres physiologischen Leistungspotentials. Die 16S rRNA-Analytik bietet hervorragende Möglichkeiten nicht-kultivierbare Organismen zu identifizieren. Doch sollte im Allgemeinen der Versuch unternommen werden, die zu untersuchenden Mikroorganismen auch anzureichern und in Reinkultur zu gewinnen. Um die Funktion einer mikrobiellen Gemeinschaft in ihrem Ökosystem zu beschreiben, sollten molekulare Techniken in physiologische und biochemische Ansätze der klassischen Kultivierung integriert werden (SIEBERT *et al.*, 1996).

3. Untersuchungsgebiete

3.1 Livingston Island

Die Antarktis wird gebildet aus dem Kontinent Antarktika und den, im Südlichen Ozean gelegenen, antarktischen Inseln. Das Gebiet wird begrenzt durch den südlichen Polarkreis in Erweiterung der Subarktischen Zone auch bis 50° südliche Breite. Livingston Island gehört zu der subantarktischen Inselgruppe der Südlichen Shetlandinseln (62°0'S, 58°0'W) im Nordwesten der antarktischen Halbinsel (Abb.: 3-1). Innerhalb dieser Inselgruppe von 11 größeren und mehreren kleineren Inseln stellt Livingston Island, mit einer Größe von 845 km², die zweitgrößte Insel dar. Das Landschaftsbild ist geprägt von Bergen und Gletschern im Osten, eisbedeckten Hügeln und Plateaus in der Mitte und einer weitgehend eisfreien Ebene im Westen der Insel (WAGNER *et al.*, 2006). Der Untersuchungsstandort in der Nähe der Bulgarischen Antarktis-Basisstation liegt im Norden von Hurd Peninsula (62°41'S, 60°23'W) einer eisfreien Halbinsel an der Südküste von Livingston Island.

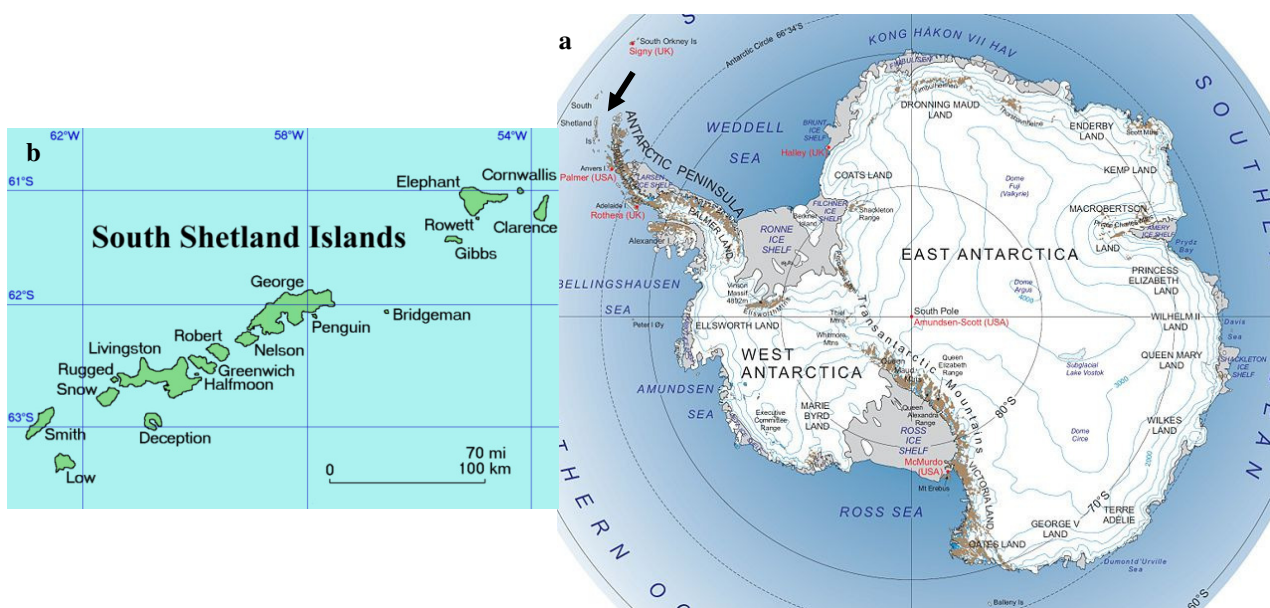


Abbildung 3-1: Der antarktische Kontinent mit der antarktischen Halbinsel und antarktischen Inseln
(3-1a: Übersichtskarte der Antarktis, Pfeil: Südliche Shetlandinseln
http://lima.usgs.gov/documents/LIMA_overview_map.pdf);
3-1b: Südliche Shetlandinseln mit Livingston Island
http://en.wikipedia.org/wiki/File:South_Shetland_Islands_Map.png)

Das kalt-maritime Klima, das auf Livingston Island vorherrscht, ist milder als das eigentliche antarktische Klima. Die antarktischen Winter von April bis Oktober sind charakterisiert durch wenige Sonnenstunden und durchschnittliche Temperaturen um -10°C mit Tiefstwerten von bis zu -35°C . Im Sommer (November bis März) werden Temperaturen um den Gefrierpunkt erreicht mit Tagesmaxima von selten bis zu 10°C (TORO *et al.*, 2007). Die Niederschläge, zumeist in Form von Schnee, im Sommer auch Schneeregen, fallen gleichmäßig über das Jahr verteilt und liegen um 500 mm pro Jahr (VIERIA & RAMOS, 2003). Auf Grund des rauen Klimas existieren nur wenige Pflanzen, die Vegetation ist geprägt durch Moose, Algen und Flechten. An den Orten, wo durch Pflanzenbewuchs organisches Material in den Boden eingetragen wird, findet man, auch begünstigt durch die regelmäßigen Niederschläge, aktive Bodenbildungsprozesse. Dabei kommt es zu einer Akkumulation organischen Materials, Lehm-bildung, Versäuerung und Redoxprozessen im Boden (BLUME *et al.*, 1997). In der Tierwelt sind unter anderen Pinguine und Robben vertreten.

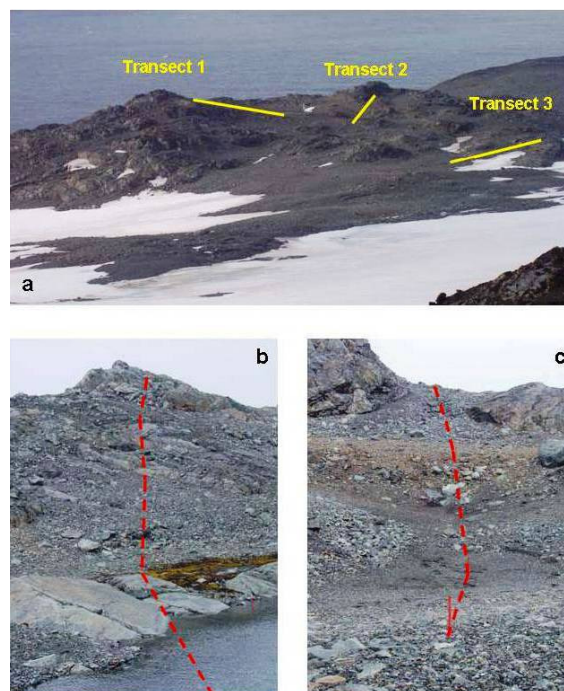


Abbildung 3-2: Untersuchungsgebiet nordöstlich der Bulgarischen Antarktisstation (3-2a: Übersicht des Gebietes und Lokalisierung der Transekten; 3-2b: Transect 1; 3-2c: Transect 2; WAGNER *et al.*, 2006)

Geologisch betrachtet ist Hurd Peninsula durch die Gesteinsausbildung der „MIERS Bluff Formation“ charakterisiert, welche durch mesozoische Turbidite geprägt ist. Dort existieren Sandsteine, Tonsteine, Konglomerate und Sediment-Brekzie, außerdem tertiäre Vulkangesteine, Plutonite (Granit) und Gangschwärme aus Basalt und Andesit. Das Gebiet entlang der periglazialen Grenze ist gestaltet durch Blockgletscherformationen, Moränen und Verwitte-

ungsschutt. Auf Grund der vulkanischen Aktivität auf Deception Island, gibt es außerdem Schichten vulkanischer Asche. Im eisfreien Gebiet nordöstlich der bulgarischen Antarktisstation, welches vor allem Basalt- und Andesitgestein aufweist, wurden Proben aus 15 Profilen entlang von 3 Transekte untersucht (Abb.: 3-2). Das ausgewählte Untersuchungsgebiet ist charakterisiert durch initiale Bodenbildung mit physikalischen und chemischen Verwitterungsprozessen und Bodenbildungsprozesse mit Humusakkumulation in lockeren Sedimenten, die auch vulkanische Asche enthalten (WAGNER *et al.*, 2006). Auf Grund der hier ausgebildeten Mooschicht wiesen vor allem die Bodenproben aus den oberen Schichten einen niedrigeren pH-Wert von 4,8 bis 6,1, eine höhere Feuchtigkeit und einen höheren Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt auf (Tab.: 3-1).

Tabelle 3-1: Bodenparameter von Livingston Island und Store Koldewey (Ganzert, L., persönliche Mitteilung)

Standort	Tiefe (cm)	Feuchtigkeit (%)	C _{total} (%)	N _{total} (%)	pH-Wert	Zellzahl kultivierter heterotropher Mikroorganismen (g/TM)
Livingston Island T1-1	0-4	7,1	26,50	0,84	4,81	1,4*10 ⁸
	4-7	4,7	2,22	0,20	6,04	7,0*10 ⁴
	7-14	5,5	0,46	<0,10	6,10	4,9*10 ⁵
Store Koldewey G03-78	0-2	70,3	7,63	0,51	5,69	1,1*10 ⁶

3.1 Store Koldewey (Nordost-Grönland)

Im Gegensatz zur Antarktis besteht die Arktis aus dem, meist von Eis bedeckten, Nordpolarmeer und die den Arktischen Ozean direkt umgebenden Landmassen. Dazu gehören die nördlichen Teile von Kanada, Russland, Alaska (USA), Spitzbergen (Norwegen), Lappland (Norwegen, Schweden, Finnland) und Grönland (Dänemark). Grönland, als größte Insel der Erde, bildet auch die größte zusammenhängende Landmasse der Arktis. Im Norden grenzt es an den Arktischen Ozean, im Osten an die Grönlandsee. Im Westen (Baffin Bay), Süden und Südosten ist Grönland von verschiedenen Randmeeren des Nordatlantiks umgeben. Store Koldewey, benannt nach CARL KOLDEWEY, ist mit 615 m² die größte der Koldewey Inseln im Nordosten Grönlands und befindet sich zwischen 75°55′-76°45′ nördlicher Breite und 018°27′-019°10′ westlicher Länge (Abb.: 3-3). Zwischen dem grönländischen Festland und der Insel Store Koldewey liegt die Dove Bugt.

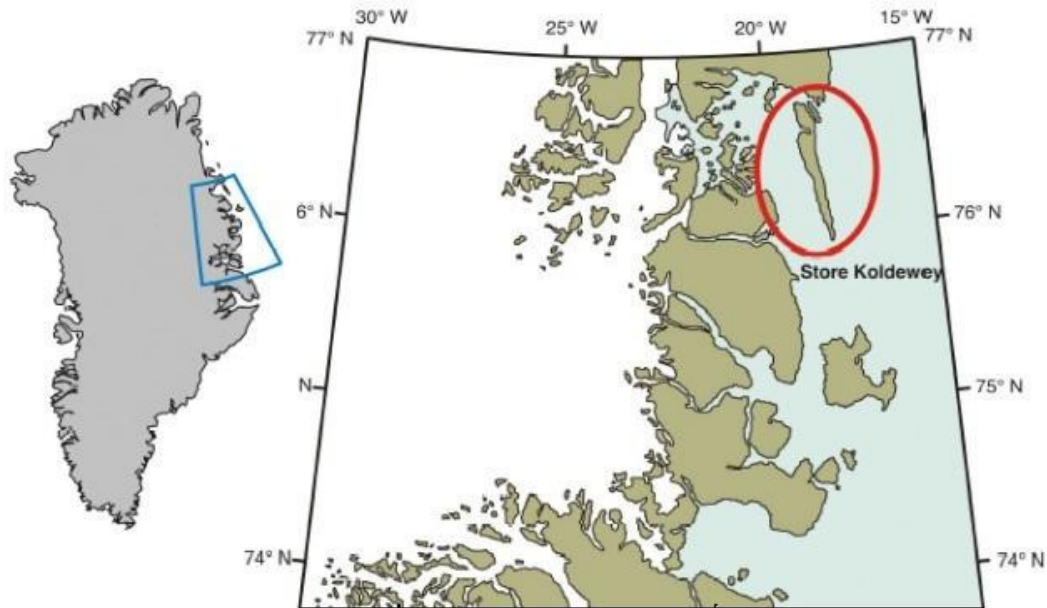


Abbildung 3-3: Karte des Untersuchungsgebietes Store Koldewey in Nordost-Grönland
(<http://www.uni-leipzig.de/~geologie/Forschung/ProjektSeiten/UmweltGroenl/Groenland1.jpg>, modifiziert)

Grönland liegt in der polaren bis subpolaren Klimazone, d.h. das Klima ist ganzjährig geprägt von niedrigen Temperaturen und wenig Niederschlägen. In Nordost-Grönland herrschen Temperaturen zwischen -24°C und 4°C und durchschnittliche Jahresniederschläge von ca. 150 mm vor (BORN & BÖCHER, 2001). Exemplarisch ist dafür ein Klimadiagramm von Danmarkshavn (Abb.: 3-4) aufgezeigt, welches in etwa der geographischen Lage des Untersuchungsgebietes entspricht. Zum Zeitpunkt der Expedition im August 2003 erreichten die Temperaturen mit etwa 4°C ihren Höchstwert, die Niederschlagsmenge ist mit rund 20 mm dem Jahresverlauf entsprechend gleichmäßig gering. Das raue Klima behindert auch die Bodenbildungsprozesse im Permafrostboden Nordost-Grönlands. Die Vegetation Nordost-Grönlands ist charakterisiert durch einen spärlichen und niedrigen Bewuchs, wobei hauptsächlich Moose, Flechten, Algen und einige Samenpflanzen vorzufinden sind. Typische Vertreter sind die Arktische Weide (*Salix arctica*) oder die Weiße Silberwurz (*Dryas octopetala*). Des Weiteren findet man immergrüne Zwergsträucher, wie *Cassiope tetragona* (Abb.: 3-5), und Vertreter der Wollgräser (*Eriophorum* sp.). Zur charakteristischen Fauna zählen viele Vogelarten, wie die Schneeeule und verschiedene Gänsearten, außerdem einige Säugetiere wie Polarfüchse, Eisbären und Lemminge.

Danmarkshavn -12.2 Grad C
12 m 132 mm

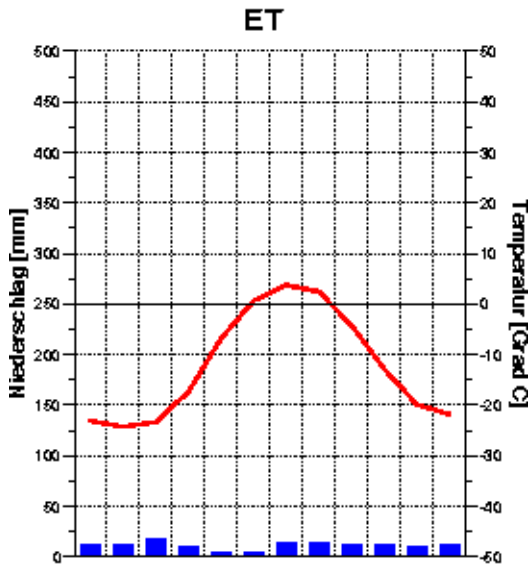


Abbildung 3-4: Klimadiagramm Danmarkshavn
Lage: 76°46'N 18°46'W
(<http://www.klimadiagramme.de/Europa/danmarkshavn.html>)



Abbildung 3-5: Blühende Vierkantige Schuppenheide (*Cassiope tetragona*)
(http://de.wikipedia.org/wiki/Cassiope_tetragona)

Geologisch besteht Store Koldewey aus metamorphen Gesteinsfeldern, die ihren Ursprung im frühen Proterozoikum (Präkambrium) haben. Bei den Gesteinen handelt es sich meist amphibolreiche Arten wie Amphibol-Gneisse (Abb.: 3-6). An der östlichen Küste befinden sich außerdem fossilhaltige marine Sedimente aus der Jura- und Kreidezeit. Des Weiteren sind quartäre glaziale Ablagerungen und Sedimente weit verbreitet. Das Untersuchungsgebiet befindet sich im Ketilidian Folt Belt, der aus dem kaledonischen Faltungsgürtel hervorgeht (BENNICKE *et al.*, 2004).



Abbildung 3-6: Gesteinsbeispiel (Bändergneis, <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/de/f/f3/Gneis2.jpg>)

4. Material und Methoden

Soweit nicht anders angegeben wurden zum Herstellen der Medien und Lösungen Chemikalien der Firmen Merck, Roth und AppliChem verwendet.

4.1 Probennahme am Untersuchungsstandort

4.1.1 Livingston Island (Antarktis)

Während der Expedition LIVINGSTON 2005 auf Livingston Island (Südliche Shetlandinseln) wurden im Zeitraum von Januar bis Februar 2005 73 Proben aus 19 verschiedenen Boden- und Sedimentprofilen genommen (WAGNER *et al.*, 2006). Dazu kamen weitere 19 Oberflächenproben, die die verschiedenen Habitateigenschaften, wie Vegetationsbeschaffenheit, Feuchtigkeits- oder Trockenheitsgrad, beispielhaft dokumentierten. Die Probenentnahme erfolgte entlang dreier Transekts in der Nähe der Bulgarischen Antarktis-Station St. Kliment Ohridski. Transekt 1 befand sich nordöstlich, Transekt 2 östlich und Transekt 3 im Süden der Station. Die zur näheren Charakterisierung ausgewählten Reinkulturen stammen vom Standort T1-1 aus 0 bis 14 cm Tiefe. Auf Grund der hier ausgebildeten Moosschicht wiesen vor allem die Bodenproben aus den oberen Schichten einen niedrigeren pH-Wert von 4,8 bis 6,1, eine höhere Feuchtigkeit und einen höheren Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt auf. Lagerung und Transport der Proben zur mikrobiologischen Analyse erfolgte bei -22°C in sterilen 500 ml NALGENE-Boxen.



Abbildung 4-1: Bodenprofil von Transekt 1 (T1-1) mit initialer Bodenbildung

4.1.2 Store Koldewey (Nordost-Grönland)

Im Rahmen der Expedition ARK XIX/4 08/09 2003 wurden in Nordost-Grönland (Store Koldewey) und in Ost-Grönland (Geographical Society ø) an unterschiedlichen Standorten Bodenproben zur Untersuchung der mikrobiellen Gemeinschaften entnommen (BENNICKE *et al.*, 2004). Die zur näheren Charakterisierung ausgewählten Isolate von Store Koldewey stammen aus der Bodenprobe G 03-78 vom Ende eines flachen Hanges am Ufer des Melles-Sees. Die Probenentnahme von 0,5 kg Bodenmaterial erfolgte im August von Standort 1 Horizont Go2/ B 2 aus 0 bis 2 cm Tiefe. Der Standort war zu maximal einem Drittel mit Vegetation bedeckt, welche vorrangig durch Moose und Flechten geprägt war. Der Standort zeichnete sich durch eine hohe Feuchtigkeit von etwa 70 %, einen mittleren Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt und einen leicht sauren pH-Wert von 5,69 aus (Tab.: 3-1). Die Proben für die geochemischen und geophysikalischen Analysen wurden bei 4°C transportiert und gelagert. Der Transport und die Lagerung der Proben zur mikrobiologischen und molekularbiologischen Untersuchung erfolgten bei -18°C.

4.2 Anreicherung, Isolierung und Kultivierung

4.2.1 Nährmedien

Zur Anreicherung heterotropher Mikroorganismen aus Bodenproben von Livingston Island wurde das BRII-Medium nach BUNT-ROVIRA (1955) verwendet.

Zusammensetzung BRII-Medium mit Glucose

BRII-Phosphat-Stammlösung	100 ml
BRII-Salzlösung	100 ml
Steinextrakt	250 ml
Trypticase Pepton (Becton/ Dickinson = BD)	0
Hefeextrakt (BD)	1 g
Glucose-Monohydrat	5 g
Na ₂ CO ₃	0,3 g
deion. H ₂ O	ad 1000 ml

BRII-Phosphat-Stammlösung (10 fach)

$K_2PO_4 \cdot 3 H_2O$	4 g
$(NH_4)HPO_4$	5 g
deion. H_2O	ad 1000 ml

BRII-Salzlösung (10 fach)

$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,05 g
$MgCl_2 \cdot 6 H_2O$	1 g
$FeCl_2 \cdot 4 H_2O$	0,01 g
$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	1g
deion. H_2O	ad 1000ml

Steinextraktlösung

NaCl	0,0415 g
$AlCl_3 \cdot 6 H_2O$	0,0126 g
KNO_3	0,00505 g
K_2SO_4	0,08004 g
$CaSO_4 \cdot 2 H_2O$	0,06708 g
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,05406 g
Oligoelementelösung BG11	1 ml
deion. H_2O	ad 1000 ml

Oligoelementelösung BG11

H_3BO_3	2,86 g
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,222
$Co(NO_3)_2 \cdot 6 H_2O$	0,049 g
$MnCl_2 \cdot 4 H_2O$	1,81 g
$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	0,079 g
$NaMoO_4 \cdot 2 H_2O$	0,391 g
deion. H_2O	ad 1000 ml

Für die weitere Kultivierung wurden verschiedene Nährmedien getestet. Dazu zählten das LB-Medium nach BERTANI (1951), Trypticase Soy Broth, Nutrient-Medium, welches außerdem als „Nutrient Special“ modifiziert wurde, und ein Minimalmedium mit und ohne Zugabe von Glucose.

Material und Methoden

LB-Medium

Trypticase Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
deion. H ₂ O	ad 1000 ml

Trypticase Soy Broth

Trypticase Soy Broth (BD)	30 g
deion. H ₂ O	ad 1000 ml

Nutrient-Medium

Trypticase Pepton	5 g
Fleischextrakt	3 g
deion. H ₂ O	ad 1000 ml

Nutrient Special

Trypticase Pepton	1 g
Hefeextrakt	1 g
Fleischextrakt	1 g
Glucose-Monohydrat	5 g
deion. H ₂ O	ad 1000 ml

Minimalmedium

NH ₄ Cl	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0,01 g
Spurenelementelösung	2 ml
deion. H ₂ O	ad 1000 ml

Spurenelementelösung

H ₃ BO ₃	50 mg
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	4 mg
FeCl ₃ * 6 H ₂ O	20 mg
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	40 mg

NH_4MoO_4	20 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	40 mg

Die Substanzen wurden einzeln in deionisiertem Wasser aufgelöst, zusammengeführt und auf 1000 ml aufgefüllt.

Mit dem pH-Meter (handylab 1, SCHOTT-Geräte) erfolgte die Einstellung eines pH-Wertes von 7,0 bis 7,2 bei allen Medien. Zur pH-Werteinstellung wurde 0,1...5 M NaOH-Lösung und 0,1...5 M HCl-Lösung genutzt.

Die Kulturmedien wurden 20 min bei 121°C im Autoklav (Systec GmbH) sterilisiert.

Zur Herstellung von festem Medium wurde 1,5 % Agar-Pulver (VWR) zum vorbereiteten Flüssigmedium gegeben. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium im Wasserbad auf 60°C abgekühlt und unter der Sterilbank in Petrischalen portioniert.

Alle weiteren Arbeitsschritte nach dem Autoklavieren wurden ebenfalls unter sterilen Bedingungen unter der Sterilbank durchgeführt.

4.2.2 Aufbereitung der Bodenproben (Livingston Island)

Nach dem Auftauen der Bodenproben wurden jeweils 5 g Boden eingewogen und in ein steriles 50 ml Plastikröhrchen überführt. Der Arbeitsschritt erfolgte unter halbsterilen Bedingungen mit Hilfe des Bunsenbrenners. Unter der Sterilbank wurden 10 ml einer 0,9%igen NaCl-Lösung zu dem Boden gegeben. Das Gemisch aus Boden und NaCl-Lösung schüttelte anschließend 20 min waagrecht auf einem Vortexer und konnte dann zur Anreicherung von Mikroorganismen verwendet werden.

4.2.3 Anreicherung von Mikroorganismen

Für einen Plattentest zur Lebendkeimzahlbestimmung wurden aus der Original-Boden-NaCl-Lösung Verdünnungsstufen von 10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3} angesetzt. Die Verdünnung erfolgte mit 0,9%iger NaCl-Lösung. 0,1 ml der jeweiligen Probenlösung wurden auf eine BR-Agarplatte pipettiert und mit dem DRIGALSKI-Spatel ausplattiert. Sowohl für die Originalprobenlösung, als auch für die Verdünnungsstufen wurde eine Dreifachbestimmung angesetzt. Die beimpften Platten wurden für 10 Tage bei 10°C im Brutschrank inkubiert. Die gewachsenen Bakterienkulturen dienten gleichzeitig als Anreicherungskulturen.

4.2.4 Isolation von Reinkulturen

Nach Abschluss der Lebendkeimzahlbestimmung wurden die bewachsenen Platten der Originalbodenlösung und der Verdünnungsstufen zur Gewinnung von Isolaten genutzt. Die Auswahl erfolgte an Hand visuell erkennbarer Unterschiede in der Koloniemorphologie. Alle unterschiedlichen Kolonien einer Probe wurden mit Hilfe einer abgeflamten Impfföse gepickt und auf einer neuen BR-Agarplatte ausgestrichen. Die beimpften Platten wurden bei 10°C im Brutschrank inkubiert. Nachdem die Kulturen gewachsen waren, wurden erneut einzelne Kolonien isoliert und auf frische BR-Agarplatten überimpft. Durch mehrmalige Wiederholung dieses Schrittes wurden Reinkulturen gewonnen.

4.2.5 Kultivierung der Isolate

Die Anreicherungskulturen wurden zunächst weiter auf BR-Agarplatten überimpft und für 14 Tage bei 10°C im Brutschrank angezogen. Die anschließende Lagerung erfolgte bei 4°C im Kühlraum. Um die Kulturerhaltung zu optimieren, wurde das Wachstum der Anreicherungskulturen auf ½ LB-Medium, welches sich einfach handhaben lässt, getestet. Die weitere Kultivierung erfolgte auf ½ LB-Agarplatten.

Außerdem wurde getestet, ob die Isolate, die zur näheren Charakterisierung ausgewählt worden sind, auf verschiedenen Nährmedien wachsen. Die Medien sind unter 4.2.1 beschrieben. Für die Kultivierung der Stämme LI-1, LI-2, LI-3, LI-4, SK-1 und SK-3 wurde das ½ LB-Medium und für die Stämme SK-2 und SK-4 das Nutrient Special-Medium ausgewählt. Der Kulturerhalt erfolgte auf den entsprechenden Agar-Platten, indem die Stämme einmal im Monat überimpft wurden. Für die verschiedenen Testansätze war es außerdem erforderlich einmal in der Woche zusätzlich frische Kulturen in Flüssigmedium und auf festen Agarplatten anzusetzen.

4.3 Molekularbiologische Analysen

4.3.1 Extraktion von DNA aus den Reinkulturen

Zur Extraktion von genomischer DNA aus den Reinkulturen wurde das UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.) verwendet. Als Ausgangsmaterial diente eine Impfföse der jeweiligen Bakterienkultur, die in der, vom Hersteller gelieferten, Micro-

Bead Solution resuspendiert wurde. Danach erfolgte die Durchführung der Extraktion nach Anleitung des Herstellers. Um die Ausbeute an DNA zu erhöhen, wurden die Zellen zunächst 10 min bei 65°C im Thermomixer lysiert („alternative lysis methods“ des Herstellers). Der weitere Zellaufschluss erfolgte mechanisch mit Hilfe eines horizontalen Flachbett-Vortexers (Murter, Heidolph). Alle Zentrifugationsschritte wurden bei Raumtemperatur und 10,000 x g (Biofuge pico, Heraeus) durchgeführt. Die Aufreinigung und Elution der DNA erfolgte über einen Spinfilter mit Silica-Membran. Der Erfolg der DNA-Extraktion wurde mittels Agarose-gelelektrophorese überprüft und die isolierte DNA anschließend bei -20°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

4.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion nach MULLIS (1983) dient der Vervielfältigung von spezifischen DNA-Abschnitten. Um das 16S rRNA-Genfragment der einzelnen Isolate für die spätere Sequenzierung zu amplifizieren, wurde das allgemeine bakterielle Primerpaar E8F (RAVENSCHLAG *et al.*, 1999) und E1492R (DOJKA *et al.*, 1998) eingesetzt. Für die PCR wurde der Mango-Taq-Polymerase-Mix (Bioline) eingesetzt und die Reaktion im iCycler (BioRad) durchgeführt.

Chemikalien

Mango-Mix (Bioline)	25,0 µl
Primer E8F 20 µM (TIB Molbiol)	0,5 µl (Sequenz: 5` AGA GTT TGA TCC TGG CTC 3`)
Primer E1492F 20 µM (TIB Molbiol)	0,5 µl (Sequenz: 5` GG TTA CCT TGT TAC GA CTT 3`)
DNA-Template	0,5 µl
reinst H ₂ O	23,5 µl

Um zu Überprüfen, ob die PCR funktionierte, wurde *Escherichia coli* als Positivkontrolle eingesetzt. Als Negativkontrolle, um mögliche Verunreinigungen im Reaktionsansatz nachzuweisen, diente Reinstwasser.

PCR-Programm (iCycler)

Zyklus (1 ×)	95°C	5:00 min (Denaturierung)
Zyklus 2 (35 ×)	94°C	1:00min (Denaturierung)
	48°C	0:45 min (Annealing)
	72°C	1:30 min (Elongation)
Zyklus 3 (1 ×)	72°C	20:00 min (finale Elongation)
	4°C	∞

4.3.3 Agarosegelelektrophorese

Chemikalien

- 50 × TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer (AppliChem)
- Agarose (neolab): DNA-Extraktion (1 %); PCR (1,5 %) in 1 × TAE-Puffer
- 10 × Ladepuffer für Agarosegele

Glycerol	50 %
Bromphenolblau	0,25 %
Xylencyanolblau FF	0,25 %

in 1 × TAE-Puffer
- SYBR®Gold-Färbelösung

SYBR ©Gold (Invitrogen)	5 µl
1 × TAE-Puffer	50 ml
- Größenstandard:
PCR: DNA-Marker 1 kb-Leiter (MoBi Tec)
DNA-Extraktion: Leiter Lambda Eco RI/Hind III (MoBi Tec)

Mit der Agarosegelelektrophorese wird sowohl das Ergebnis der DNA-Extraktion als auch das Resultat der PCR überprüft, indem die DNA-Fragmente in einem Agarosegel in einem elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Zur Kontrolle der DNA-Extraktion wurde ein Gemisch aus 0,5 µl 10 × Ladepuffer und 3 µl DNA auf die Gelmatrix (1 %) aufgetragen. Da der Mango-Mix bereits einen Farbstoff enthält, konnten je 3 µl des PCR-Produktes ohne weiteren Ladepuffer in die Geltaschen (1,5 % Agarose) gegeben werden. Zur Auswertung wurde das Gel zusätzlich mit einem Größenstandard, für die DNA-Extraktion Lambda Eco RI/Hind III und zur Überprüfung der PCR-Produkte eine 1 kb-Leiter, beladen. Die Elektrophorese erfolgte für 40 min bei 100 V in einer Elektrophoresekammer (BioRad). Anschlie-

ßend wurde das Gel mit SYBR®Gold für 35 min gefärbt und die Banden mit UV-Licht (Syngene, Gene Flash) sichtbar gemacht.

4.3.4 Aufreinigung der PCR-Produkte und Sequenzierung

Um die PCR-Produkte für die anschließende Sequenzierung vorzubereiten, wurden die DNA-Fragmente der PCR-Reaktion mit Hilfe des MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Dem Protokoll des Herstellers folgend, wurden die PCR-Produkte über eine Spinfilter Säule von Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen befreit.

Die Sequenzierung der Fragmente unter Einbezug der begrenzenden Primer E8F und E1492R wurde von der Firma GATC nach Methode von SANGER (1977) mit dem System ABI 3730XL (Applied Biosystems/ Sanger) durchgeführt.

4.3.5 Phylogenetische Analyse

Die von GATC erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm Sequencher (Version 4.7; Gene Codes, USA) bearbeitet. Dabei wurde eine Qualität von ca. 98 % angestrebt und die Einzelsequenzen des Primerpaares (vorwärts, rückwärts) bei einer Übereinstimmung von mindestens 90 % und bei einer Überlappung von mindestens 60 Basenpaaren zu Vollängensequenzen, sogenannten Contigs, zusammengeführt. Mit diesen Contigs wurde anschließend eine Datenbanksuche über die Internetseiten www.ncbi.nlm.nih.gov (Funktion: BLAST) und www.ebi.ac.uk/Tools/fasta33/index.html (FASTA - Nucleotide Similarity Search) durchgeführt, um die nächsten Verwandten der Isolate und deren phylogenetischen Einordnung zu ermitteln.

4.4 Mikroskopische Analysen

4.4.1 Phasen-Kontrast-Mikroskopie

Auf einen fett- und staubfreien Objektträger wurde mit einer PASTEURpipette ein Tropfen der entsprechenden Bakterienkultur aufgetragen und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Mikroskopie erfolgte mit dem Mikroskop „Zeiss Axioskop 2 plus“ mit einem Phasen-Kontrast-Objektiv „PH3 Plan NeoFluar 160 ×/1,30 Oil“. Zur Bildeaufnahme diente die Axio-Cam von Zeiss.

4.4.2 Lichtmikroskopie

4.4.2.1 Gram-Färbung nach GRAM (1884)

Chemikalien

- Karbol-Gentianaviolett (Merck)
 - Alkoholisch gesättigte Stammlösung 10 ml
 - 2,5%ige Phenol-Lösung 90 ml
- Lugol'sche Lösung
 - Kaliumiodid 2 g → in etwas deion. H₂O lösen
 - Iod 1 g → in der KI-Lösung lösen
 - deion. H₂O ad 300 ml
- Ethanol 96%ig
- Wässrige Safranin-Lösung (Merck) 1%ig

Von der zu untersuchenden Bakterienkultur wurde ein hitzefixierter Ausstrich hergestellt. Dazu wurde auf einen fett- und staubfreien Objektträger ein bis zwei Tropfen Wasser gegeben und darin eine Impföse mit einer 5...7 Tage alten Flüssigkultur verteilt. Die Ausstriche wurden unter der Sterilbank luftgetrocknet und über einen Bunsenbrenner hitzefixiert, indem der Objektträger im Abstand von 30 s dreimal durch die Flamme geführt wurde. Die hitzefixierten Ausstriche wurden mit Karbol-Gentianaviolett-Lösung überschichtet, 3 min gefärbt und die Lösung wieder abgegossen. Danach wurde der Objektträger mit Lugol'scher Lösung gespült, 2 min lang inkubiert, mit Leitungswasser abgespült und luftgetrocknet. Dann wurde der Objektträger mit 96%igen Alkohol entfärbt bis keine Farbwolken mehr zu sehen waren und abschließend getrocknet. Dabei zeigen grampositive Bakterien eine violette, gramnegative eine rote, Färbung.

4.4.2.2 Geißelfärbung nach LOEFFLER (1898)

Chemikalien

- Geißelbeize
 - A) FeSO₄ (kaltgesättigt) 5 ml
 - B) Tannin (Roth) 3 g
 - deion. H₂O 12 ml

- Davon 10 ml heiß zu Lösung A geben
- Alkoholisch gesättigte Fuchsin-Lösung (Fluka) 1 ml

Tannin wurde unter Erwärmen in 12 ml deion. Wasser gelöst, davon 10 ml heiß zu Lösung A gegeben. Die Lösungen A und B wurden vor jedem Gebrauch frisch hergestellt und zu dem Gemisch 1 ml der Fuchsin-Lösung gegeben.

- Karbol-Fuchsin nach ZIEHL-NEESEN (1882/1883)
 - Gesättigte alkoholische Lösung basischen Fuchsins 10 ml
 - 5%iges Phenol 90 ml

Beide Lösungen wurden miteinander vermischt.

Die Herstellung der hitzefixierten Ausstriche musste für die Geißelfärbung besonders vorsichtig erfolgen, da sonst die Geißeln bereits im Vorfeld abgetrennt werden. Der Ausstrich wurde für 8 min mit Geißelbeize bedeckt, mit Leitungswasser gespült und luftgetrocknet. Im zweiten Schritt wurde der Objektträger für 2 min mit Karbol-Fuchsin-Lösung inkubiert, mit Leitungswasser gespült und abschließend luftgetrocknet.

4.4.2.3 Sporenfärbung nach WIRTZ (1908)

Chemikalien

- Wässrige Malachitgrün-Lösung 5 %
 - Malachitgrün (Fluka) 5 g
 - deion. H₂O ad 100 ml
- Wässrige Safranin-Lösung (Merck) 1 %

Die hitzefixierten Ausstriche wurden mit Malachitgrün-Lösung bedeckt und über dem Bunsenbrenner eingedampft bis ein metallischer Glanz entsteht. Danach wurde der Objektträger mit Leitungswasser abgespült, zusätzlich 5 min in einem Becherglas mit Leitungswasser eingestellt und anschließend luftgetrocknet. Die Gegenfärbung erfolgte für 10 min mit Safranin, wonach ebenfalls mit Leitungswasser abgespült und abschließend luftgetrocknet wurde. Vorhandene Sporen werden grün, vegetative Zellen rot gefärbt.

4.5 Physiologische und ökologische Analysen

4.5.1 Temperatur

Für die ausgewählten Isolate wurde ein Temperaturspektrum von -6°C bis 32°C aufgenommen. Das $\frac{1}{2}$ LB-Medium für die Isolate LI-1, LI-2, LI-3, LI-4, SK-1 und SK-3, und das Nutrient Special-Medium für die Isolate SK-2 und SK-4, wurden á 19,5 ml in 50 ml SCHOTT - Flaschen portioniert und anschließend 20 min bei 121°C steril autoklaviert. Als Inokulum dienten 0,5 ml einer frischen, gut bewachsen Bakterienkultur. Der Reaktionsansatz erfolgte als Duplikat. Die beimpften SCHOTT-Flaschen wurden entweder in einem Brutschrank mit integriertem Schüttler (Certomat BS-1, B. BRAUN) oder auf einen externen Schüttler (B. BRAUN) im Inkubationsschrank (Binder) bei -6 , -3 , 0 , 5 , 10 , 15 , 20 , 24 , 28 und 32°C inkubiert. Als Maß für das Bakterienwachstum wurde die optische Dichte der Bakterienkultur bei 600 nm bestimmt. Die Messung erfolgte, angepasst an die Wachstumsgeschwindigkeit, ein- bis zweimal pro Tag, mit einem Photometer (Genesys 10 Series, Thermo Spectronic). Dazu wurden 100 μl der Kultur in eine Küvette (BRAND) überführt. Das entsprechende Medium diente sowohl als Referenz, als auch zur Verdünnung ab einer $\text{OD}_{600} > 0,8$.

4.5.2 pH-Wert

Das Wachstum der ausgewählten Bakterienstämme wurde in einem pH-Bereich von pH 2 bis pH 11 untersucht. Das $\frac{1}{2}$ LB-Medium für die Isolate LI-1, LI-2, LI-3, LI-4, SK-1 und SK-3, und das Nutrient Special-Medium für die Isolate SK-2 und SK-4, wurden folgendermaßen gepuffert (Hoaki et al., 1994):

pH 2,0/ 3,0/ 4,0/ 4,5/ 5,0	Glycin
pH 5,0/ 5,5/ 6,0/ 6,5	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)
pH 7,0; 7,5; 8,0	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)
pH 8,5/ 9,0/ 9,5	Bis-Tris-propan (BTP)
pH 10,0/ 11,0	Glycin

Die Endkonzentration der Puffersubstanzen (Sigma-Aldrich) im Medium betrug jeweils 25 mM.

Mit HCl (0,1...5 M) und NaOH (0,1...5 M) wurden die verschiedenen pH-Werte in den Medien eingestellt. Anschließend wurden je 19,5 ml des Mediums in 50 ml SCHOTT-Flaschen gefüllt, autoklaviert und nach dem Abkühlen mit 0,5 ml Bakterienkultur beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 15°C im Brutschrank mit integriertem Schüttler. Die Probenmessung der Parallelen entsprach der des Temperaturtests. Nach Abschluss der Messreihe wurde der pH-Wert der Bakterienkultur mit Hilfe von pH-Indikatorstreifen ermittelt.

4.5.3 Salztoleranz

Der Salzbedarf und die Salztoleranz der zu untersuchenden Isolate wurden in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 10 % NaCl getestet. Das ½ LB- und das Nutrient Special-Medium wurden für den Versuch modifiziert, indem mit NaCl (Merck) Salzkonzentrationen von 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,5; 9,0 und 10,0 % eingestellt wurden. Genau wie bei den anderen physiologischen Tests wurden 19,5 ml steriles Medium mit 0,5 ml Inokulum versetzt. Der Versuchsansatz erfolgte als Duplikat in 100 ml Erlenmeyerkolben, welche bei 15°C auf dem Schüttler inkubiert wurden. Die Probenentnahme und –messung entsprachen der von Temperatur- und pH-Test.

4.5.4 Berechnung der Spezifischen Wachstumsrate μ

Wie bereits unter 4.6.1 erwähnt, diente die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) als Maß für das Bakterienwachstum. Über die OD_{600} kann man die spezifische Wachstumsrate μ berechnen. Indem man die logarithmierten OD_{600} -Werte auf einer arithmetischen Skala aufträgt, werden die typischen Phasen des Bakterienwachstums deutlich. Aus dem exponentiellen Bereich der Kurve lässt sich durch anlegen einer linearen Regressionsgeraden $y = a + bx$ der Anstieg ermitteln.

$$(1) y = bx + a$$

Aus den Anstiegen der Parallelen wurde der Mittelwert gebildet. Der entlogarithmierte Anstieg b ergibt die spezifische Wachstumsrate μ .

$$(2) \mu = b * \ln 10$$

4.5.5 Verhalten gegenüber Sauerstoff

Die Isolierung und Kultivierung der Isolate erfolgte unter aeroben Bedingungen. In zwei Testansätzen wurde getestet, ob die Isolate in der Lage sind ohne Sauerstoff zu wachsen. Der erste Test wurde in Flüssigmedium durchgeführt. Von den Medien $\frac{1}{2}$ LB (LI-1, LI-2, LI-3, LI-4, SK-1, SK-3) und Nutrient Special (SK-2, SK-4) wurden je 19,5 ml in 100 ml Serumflaschen gegeben und Resazurin als Indikator für Sauerstoff zugesetzt. Ist Sauerstoff vorhanden, färbt sich der Indikator rosa. Nachdem die Flaschen mit Stopfen und Bördelkappen verschlossen worden waren, wurden diese anaerobisiert und dreimal mit N_2 begast, um eine sauerstofffreie Atmosphäre zu schaffen. Die präparierten Flaschen wurden 20 min bei $121^\circ C$ steril autoklaviert. Anschließend wurden die anaerobisierten Serumflaschen mit 0,5 ml einer frischen Bakterienkultur mit Hilfe einer sterilen Spritze an geimpft und 7 Tage bei $16^\circ C$ im Brutschrank inkubiert. Für den zweiten Test wurde festes $\frac{1}{2}$ LB und Nutrient Special-Medium in Petrischalen verwendet. Als Inokulum diente jeweils eine Bakterienkolonie, die mit Hilfe einer Impföse auf der Petrischale verteilt wurde. In der Vorkammer der Glove-Box wurden die beimpften Petrischalen einem Vakuum ausgesetzt und diese dann in der Glove-Box für 7 Tage unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Beide Versuche wurden als Triplikat durchgeführt. Nach Abschluss der Tests wurde das visuell sichtbare Wachstum dokumentiert.

4.5.6 Antibiotika und Lysozym

Des Weiteren wurde die Empfindlichkeit der isolierten Bakterien gegenüber Antibiotika überprüft. Antibiotika aus den verschiedenen Stoffklassen (Tab.: 4-1) sollten zeigen, wie die unterschiedlichen Mechanismen auf die Bakterien wirken und ob diese auch Resistenzen ausbilden. Es wurde ein Hemmhoftest mit, in Antibiotika getränkten, Filterpapierscheibchen durchgeführt. Mit einem handelsüblichen Locher wurden aus Filterpapier Scheibchen mit einem Durchmesser von 6 mm gestanzt, diese in der jeweiligen Antibiotikallösung (1 mg/ml) getränkt und wieder getrocknet. Für den Hemmhoftest wurden $\frac{1}{2}$ LB- und Nutrient Special-Agarplatten verwendet. Für jedes Antibiotikum wurde eine Agarplatte mit 0,1 ml des entsprechenden Testkeims mit einem DRIGALSKI-Spatel beimpft und darauf drei Filterpapierscheibchen pro Antibiotikum und Testkeim gleichmäßig verteilt. Die Agarplatten wurden über 14 Tage bei $15^\circ C$ bebrütet. Nach 14 Tage erfolgte die Messung des Hemmhofradius, woraus der Hemmhofdurchmesser bestimmt werden konnte.

Formel zur Berechnung des Hemmhofdurchmessers:

Der Filterscheibchendurchmesser betrug 0,6 mm und wurde in der Formel als feste Zahl berücksichtigt.

$$(3) d = 2 \times r + 0,6$$

d = Hemmhofdurchmesser

r = Radius

Tabelle 4-1: Beschreibung der verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	Wirkprinzip	Stoffklasse
Penicillin G Kaliumsalz (Merck)	Zellwandsynthesehemmer	β -Lactamantibiotika
Ampicillin (Sigma-Aldrich)	Zellwandsynthesehemmer	β -Lactamantibiotika (Aminopenicillin)
Streptomycin (Fluka)	Hemmung der Proteinbiosynthese am Ribosomen	Aminoglykoside
Neomycin (Sigma-Aldrich)	Hemmung der Proteinbiosynthese am Ribosomen	Aminoglykoside
Kanamycinsulfat (Roth)	Hemmung der Proteinbiosynthese am Ribosomen	Aminoglykoside
Erythromycin (Pierrel s.p.a.)	Hemmung der Proteinbiosynthese am Ribosomen	Makrolide
Oxytetracyclin (Jenapharm)	Hemmung der Proteinbiosynthese am Ribosomen	Tetracycline
Rifampicin (Merck)	Hemmer der bakteriellen RNA-Polymerase	Ansamycine
Novobiocin (LEPETIT s.p.a.)	Gyrasehemmer (Hemmung der DNA-Replikation)	Chinolone

Lysozym

Das Enzym Lysozym zählt zu den Bacteriocinen und wurde 1922 von ALEXANDER FLEMING entdeckt. Es wirkt als Muramidase, indem es in der Mureinschicht der Bakterienzellwand die β -1,4-glykosidischen Bindungen spaltet. Die Wirkung des Lysozyms auf Mikroben hat sich als eingeschränkt erwiesen. Im Versuch sollten nur grampositive Bakterien betroffen sein, da das Lysozym für die Anwendung gegen gramnegative Vertreter in EDTA gelöst sein muss, um auch die äußere Zellwand aufzulösen. Im Versuch wurde Lysozym aus Hühnereiweiß (Sigma-Aldrich) verwendet. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Antibiotika-Testreihe.

4.6 Biochemische Leistungsfähigkeit

4.6.1 Zuckerverwertbarkeit

Das Potential zum Abbau verschiedener Zucker und Zuckeralkohole war ein Kriterium zur Charakterisierung der ausgewählten Isolate. Bei dem Abbau von Zuckern entstehen Säuren, die einen Farbumschlag des Indikators Bromthymolblau von blau (pH 7,6) nach gelb (pH 6,0) zur Folge haben.

Chemikalien

- Peptonwasser
 - Pepton aus Laktalbumin (Ferak Berlin) 10,0 g
 - NaCl (Merck) 5,0 g
 - Bromthymolblau als Indikator (Roth)
 - deion. H₂O ad 1000 ml

Parallel zur Zugabe des Indikators erfolgte die Einstellung des pH-Wertes auf 7,6.
- Zuckerlösung 1 %
 - Phenolphthalein-Lösung (Feinchemie K.-H. Kallies KG) 1 % in 96%igem Ethanol

Tabelle 4-2: Auflistung der verwendeten Zucker

„Kleine Bunte Reihe“	„Große Bunte Reihe“
Glucose-Monohydrat (Merck)	Adonitol (Roth)
D(+)-Galaktose (Merck)	L-Arabinose (Germed)
Laktose-Monohydrat (Merck)	Dulcitol (Lachema/ Chemapol)
Maltose (VEB-Berlin Chemie)	Meso-Inositol (Merck)
D-Mannitol (Ferak Berlin)	L(+)-Rhamnose (Agrochemie Berlin)
Saccharose (Merck)	D(-)-Salicin (Roth)
	D(-)-Sorbitol (Germed)
	Trehalose (Roth)
	D(+)-Xylose (Merck)

Der Versuch wurde als Triplikat durchgeführt. Drei Reagenzglasröhrchen je Zucker (Tab.: 4-2) und Testkeim wurden mit 5 ml Peptonwasser gefüllt. Zur Überprüfung der Gasbildung wurde in jedes Reagenzglas ein DURHAM-Röhrchen eingelegt. Die Nährlösung wurde 20 min bei 121°C im Autoklav sterilisiert. Die Sterilisation der Zuckerlösungen erfolgte an drei aufeinander folgenden Tagen für je 20 min bei 97°C im Dampftopf. Zu den 5 ml Peptonwasser wurde anschließend je 1 ml der entsprechenden Zuckerlösung gegeben, das Gemisch mit 30 µl Testkeim beimpft und 14 Tage bei 15°C auf dem Schüttler inkubiert und die Färbung beobachtet.

Nachweis einer Alkalisierung des Medium durch den Stamm SK-4 mit Phenolphthalein

Auf Grund der unerwarteten Ergebnisse (5.3.8) im ersten Teil des Zuckertests wurde der Stamm SK4 zusätzlich auf die Bildung alkalischer Produkte getestet. Der Versuchsansatz entsprach dem des Zuckertests. An Stelle von Bromthymolblau wurde Phenolphthalein als Indikator eingesetzt, welcher allerdings erst nach dem Bebrüten zu der Bakterienkultur gegeben wurde. Eine Alkalisierung lag bei einem Farbumschlag von gelb (pH 0...8,2) nach rötlich/rosa (pH 8,2...12), wobei gelb die Farbe des Mediums widerspiegelte. Außerdem wurde der pH der Bakteriensuspension mit Indikatorstreifen überprüft.

4.6.2 Methylrot-Probe

Mit Hilfe der Methylrot-Probe sollte festgestellt werden, ob die Isolate Glucose unter so starker Säurebildung umsetzen, dass der Indikator Methylrot von gelb (pH 7,2) nach rot (pH < 4,4) umschlägt.

Chemikalien

- Glucose-Peptonwasser
 - Pepton aus Laktalbumin (Ferak Berlin) 1 %
 - NaCl (Merck) 0,5 %
 - Glucose-Monohydrat (Merck) 1 %

Die Chemikalien wurden in deion. H₂O gelöst und der pH auf 7,2 eingestellt.

- Methylrot-Lösung 0,04 %
 - 0,2 g Methylrot (Feinchemie K.-H. Kallies KG) wurden in 300 ml 96%igem Ethanol gelöst und mit deion. H₂O auf 500 ml aufgefüllt.

Das Glucose-Peptonwasser wurde in Reagenzglasröhrchen à 3 ml portioniert, 20 min bei 121°C autoklaviert und nach dem Abkühlen mit 30 µl Testkeim beimpft. Die Inkubation des Triplikat-Versuchsansatzes erfolgte über 12 Tage bei 15°C auf dem Schüttler. Nach dem Bebrüten wurde 1 ml der Methylrot-Lösung zu jedem Testansatz gegeben und der Farbumschlag dokumentiert.

4.6.3 Stärkehydrolyse (Amylase-Test)

Der Amylase-Test sollte zeigen, ob die zu untersuchenden Bakterienstämme in der Lage sind Stärke mit Hilfe des Exoenzyms Amylase zu hydrolisieren.

Chemikalien

- Stärkeagarplatten
 - Nähragar II (SIFIN: TN 1166) 5 g
 - Lösliche Stärke (Merck) 4 g
 - deion. H₂O ad 200 ml

Nähragar und Stärke wurde vermischt, unter Rühren in deion. H₂O gelöst, im Dampftopf erhitzt, in Reagenzgläser à 13 ml portioniert und abschließend 20 min bei 121°C autoklaviert.

- Lugol'sche Lösung
 - KI 2 g → in etwas deion. H₂O lösen
 - Iod 1 g → in der KI-Lösung lösen
 - deion. H₂O ad 300 ml

Der Stärkeagar in den Reagenzgläsern wurde durch Erhitzen verflüssigt und in Petrischalen gegossen. Der abgekühlte Agar wurde mit einer Impfüse der jeweiligen Bakterienkultur beimpft. Auf jede Platte wurden zwei verschiedene Testkeime aufgetragen und der Versuch insgesamt als Triplikat durchgeführt. Die beimpften Stärkeagarplatten wurden über 12 Tage bei 15°C bebrütet und anschließend mit Lugol'scher Lösung übergossen. Wurde Amylase gebildet und in das Medium abgegeben, blieb die Iod-Stärke-Reaktion an dieser Stelle aus und es bildete sich ein heller Hof um den Impfstrich der sonst blaugefärbten Platte.

4.6.4 Nachweis von Gelatinase

Mit dem Gelatinase-Test wurden die Bakterienstämme auf ihre Fähigkeit Gelatine zu hydrolisieren untersucht. Das Vorhandensein von Gelatinase lieferte gleichzeitig Aufschluss über die proteolytische Aktivität der Bakterien.

Chemikalien

- DEV-Gelatine-Agar (Merck) 50 g/l
- Gesättigte Ammonium-Sulfat-Lösung
 - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Germed) 15,08 g
 - deion. H_2O 20,0 ml

Der Gelatine-Agar wurde in deion. H_2O unter Erhitzen gelöst, 20 min bei 121°C autoklaviert, auf 60°C abgekühlt und dann in Petrischalen portioniert. Der Versuch wurde als Triplikat durchgeführt, d.h. jeder Testkeim wurde dreimal pro Platte mit einer Impföse ausgestrichen. Nach dem Bebrüten der Platten bei 15°C für 7 Tage, wurden die Gelatinase-Agarplatten mit gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung (Pfennig) überschichtet und die Bildung klarer Höfe um den Impfausstrich dokumentiert. Außerdem wurde im Schrägagarröhrchen getestet, ob die Bakterien den Gelatineagar verflüssigen. Die Isolate wurden als Triplikat im Schrägagarröhrchen als Stichkultur angeimpft und bei 15°C für 7 Tage bebrütet.

4.6.5 Protease-Test

Der Protease-Test diente, neben dem Gelatinase-Nachweis, als Test auf das Vorhandensein proteolytischer Enzyme. Speziell wurde überprüft, ob die isolierten Bakterien Casein mit Hilfe einer Protease abbauen können.

Chemikalien

- Calcium-Caseinat-Agar (Merck) 5,8 g
- deion. H_2O ad 200 ml

Der Calcium-Caseinat-Agar wurde im Dampftopf in deion. Wasser gelöst, anschließend je 13 ml in Reagenzgläser portioniert und diese 20 min bei 121°C autoklaviert. Der Calcium-Caseinat-Agar wurde durch Erhitzen verflüssigt und in Petrischalen gegossen. Der abgekühlte Agar wurde mit einer Impföse der jeweiligen Bakterienkultur beimpft. Auf jede Platte wurden zwei verschiedene Testkeime aufgetragen und der Versuch insgesamt als Triplikat durchgeführt. Die beimpften Calcium-Caseinat-Agarplatten wurden für 12 Tage bei 15°C bebrütet und anschließend visuell ausgewertet. Hatte sich ein durchscheinender Hof um den Impfstrich gebildet, waren die Kulturen positiv für den Protease-Test.

4.6.6 Harnstoffspaltung (Urease-Test)

Ein weiterer Test zur biochemischen Leistungsfähigkeit stellte der Nachweis des Enzyms Urease dar, welches die Umwandlung von Harnstoff zu Ammoniumkarbonat katalysiert. Der Nachweis erfolgte mit dem Indikator Phenolphthalein.

Chemikalien

- Glucose-Peptonwasser
 - Pepton aus Laktalbumin (Ferak Berlin) 1 %
 - NaCl (Merck) 0,5 %
 - Glucose-Monohydrat (Merck) 1 %
- Harnstoff (Merck) 1 %
- Phenolphthalein-Lösung (Feinchemie) 1 % in 96%igem Ethanol

Die Chemikalien des Glucose-Peptonwassers wurden in deion. H₂O gelöst und der pH auf 7,2 eingestellt. Der Harnstoff wurde in Glucose-Peptonwasser gelöst, das Medium anschließend steril filtriert und à 3 ml in sterile Reagenzgläser portioniert. Das Harnstoffmedium wurde als Triplikat mit je 30 µl Bakterienkultur angeimpft und über 7 Tage bei 15°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Auswertung erfolgte unter Zugabe von 1 ml der 1%igen Phenolphthalein-Lösung je Versuchsansatz. Es wurde sowohl der Farbumschlag, als auch der abschließende pH-Wert notiert.

4.6.7 Indolbildung aus Tryptophan

In diesem Versuch wurde überprüft, ob die zu charakterisierenden Bakterien in der Lage sind, mit Hilfe des Enzyms Tryptophanase, aus Tryptophan Indol zu bilden. Bei einer Indolproduktion käme es unter Zugabe von p-Dimethylaminobenzaldehyd zur Ausbildung eines kirschroten Ringes am oberen Rand der Nährlösung.

Chemikalien

- Tryptophan-haltige Nährbouillon
 - Nährbouillon II Standard (SINFIN) 1,5 g
 - DL-Tryptophan 0,1 g
 - deion. H₂O ad 100 ml

Von der Nährbouillon wurden je 3 ml in Reagenzgläser abgefüllt und diese 20 min bei 121°C steril autoklaviert.

- Indol-Reagenz nach KOVACS
 - p-Dimethylaminobenzaldehyd 5 g
 - Amylalkohol 75 ml
 - konzentrierte HCl 25 ml

Die tryptophanreiche Nährbouillon wurde als Triplikatanatz mit je 30 µl Bakterienkultur angeimpft und für 7 Tage bei 15°C auf dem Schüttler inkubiert.

4.6.8 Bildung von Schwefelwasserstoff

Ein weiteres Charakteristikum stellte die Bildung von Schwefelwasserstoff aus schwefelhaltigen Aminosäuren dar, wobei der Abbau von Cystin, Cystein oder Methionin über die Bildung schwarzgefärbter Sulfide nachgewiesen wurde, die in Anwesenheit von Schwermetallsalzen mit Schwefelwasserstoff entstehen.

Chemikalien

- Nährbouillon mit Schwefelquelle
 - Nährbouillon II Standard (SINFIN) 1,5 g
 - Natriumthiosulfat 0,1 g
 - deion. H₂O ad 100 ml
- Bleiacetat-Lösung 5 %

Von der Nährbouillon wurden je 3 ml in Reagenzgläser abgefüllt und diese 20 min bei 121°C steril autoklaviert. Filterpapierstreifen mit einer Größe von etwa 20 cm × 1 cm wurden in der Bleiacetat-Lösung getränkt und getrocknet. Die Na₂S₂O₃-haltige Nährbouillon wurde als Triplikat mit je 30 µl Testkeim beimpft, der Bleiacetat getränkte Filterpapierstreifen etwa 1...2 cm mit der Bördel-Verschlusskappe über der Nährlösung befestigt und die präparierte Kultur über 12 Tage bei 15°C auf dem Schüttler bebrütet. Die Schwarzfärbung des Filterpapiers im Falle einer Bleisulfid-Bildung wurde festgehalten.

4.6.9 Katalase-Test

Der Nachweis von Katalase diente als weiteres Differenzierungsmerkmal der ausgewählten Bakterienstämme. Indem Katalase Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff umwandelt, spielt das Enzym eine wichtige Rolle beim Abbau reaktiver Sauerstoffspezies. Der Katalase-Test erfolgte, indem 1 ml einer 10%igen H_2O_2 -Lösung auf eine gut bewachsene Kultur gegeben wurde. Die ausgewählten Stämme wurden dafür in ihren bevorzugten Medien für 7 Tage bei $15^\circ C$ auf dem Schüttler angezogen. Die Blasenbildung auf Grund des beim H_2O_2 -Abbau entstehenden Sauerstoffs wurde dokumentiert.

4.6.10 Oxidase-Test

Mit dem Oxidase-Test nach KOVACS (1956) wurde die Cytochrom-c-Oxidase, die in einer Variante in den Zellmembranen aerober Bakterien vorkommen kann, nachgewiesen. Bakterielle Cytochrom-c-Oxidase besitzen oft andere Kofaktoren oder es werden generell andere Elektronenüberträger wie zum Beispiel Chinol-Oxidase von den Bakterien genutzt. Diese werden im Oxidase-Test nicht erfasst. Die Cytochrom-c-Oxidase spielt eine wichtige Rolle als Elektronenüberträger bei Redoxprozessen in der inneren Tellmembran der Bakterien.

Kovacs-Reagenz

- N, N, N, N'-Tetramethyl-p-phenylendiamin-Lösung 1 % in Phosphat-Puffer nach SÖRENSEN
- Phosphatpuffer nach SÖRENSEN
 - Lösung A: KH_2PO_4 (Merck) 1,816 g
deion. H_2O ad 200 ml
 - Lösung B: $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$ (Merck) 2,376 g
deion. H_2O ad 200 ml

Puffer pH 7: 62,2 ml Lösung B und 38,8 ml Lösung A wurden mit deion. H_2O auf 100 ml aufgefüllt. Filterpapierecken wurden mit Kovacs-Reagenz getränkt, leicht getrocknet und in eine Petrischale gegeben. Der Oxidase-Nachweis wurde mit Bakterienkulturen durchgeführt, die zuvor 7 Tage bei $15^\circ C$ auf ihren bevorzugten Festmedien angezogen wurden. Mit einer Kunststoffpipettenspitze wurde eine Kolonie jeder Kultur entnommen, auf die getränkten Filterpapierscheiben ausgestrichen und die Zeit gemessen, die bis zur Blaufärbung der Kolonie

verging. Der Versuch wurde für jedes Isolat dreimal wiederholt. Die Verwendung einer Kunststoffpipettenspitze war notwendig, da eine Impföse aus Eisen das Ergebnis verfälschen würde.

4.7 Fremdmaterial (Store Koldewey)

Verschiedene Reinkulturen aus Bodenproben von Store Koldewey wurden von apl. Prof. Dr. André Lipski und Friederike Bruns isoliert.

Anreicherung und Isolierung

Zur Anreicherung wurden 2 g Bodenmaterial in 20 ml steriler Ringerlösung (9,0 g/l NaCl, 0,42 g/l KCl, 0,24 g/l NaHCO₃) gelöst und für 20 min gerührt. Um heterotrophe Mikroorganismen zu isolieren, wurden Nutrient-Agarplatten (5,0 g/l Pepton, 3,0 g/l Fleischextrakt, 1,0 g/l Hefeextrakt, 5,0 g/l Glucose, 15 g/l Agar pH 7,2) mit der Zellsuspension beimpft und bei 4°C, 10°C und 20°C inkubiert.

Die Isolate FB 3 = SK-1, FB 7 = SK-2, FB 10 = SK-3 und FB 14.2 = SK-4 wurden zur näheren Charakterisierung ausgewählt.

5. Ergebnisse

5.1 Auswahl von Isolaten aus den Anreicherungskulturen zur näheren Charakterisierung

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, aus Bodenproben von Livingston Island (Antarktis) und Store Koldewey (Grönland, Arktis) Mikroorganismen anzureichern, daraus Reinkulturen zu gewinnen und einige Isolate näher zu charakterisieren. Die Anreicherungskulturen ergaben eine Vielzahl kultivierbarer heterotropher Mikroorganismen. Nach morphologischen Gesichtspunkten wurden daraus viele verschiedene Kolonien gepickt und insgesamt 8 Reinkulturen etabliert. Von den Reinkulturen wurde die DNA extrahiert, ein Fragment des 16S rRNA-Gens mittels PCR spezifisch amplifiziert und zur phylogenetischen Einordnung sequenziert. Anhand einer ersten phylogenetischen Einordnung der isolierten Bakterienstämme, wurden 8 Isolate zur näheren Charakterisierung ausgewählt. Von Interesse waren dabei insbesondere Reinkulturen, die möglicherweise noch nicht beschrieben worden sind. Von den Reinkulturen von Livingston Island wurden die Stämme LI-1, LI-2, LI-3 und LI-4 charakterisiert. Von den zur Verfügung gestellten Isolaten von Store Koldewey wurden die Kulturen SK-1, SK-2, SK-3 und SK-4 ausgewählt.

5.2 Phylogenetische Einordnung der ausgewählten Isolate

Für die phylogenetische Analyse wurde von allen Reinkulturen genomische DNA isoliert. Das Ergebnis der DNA-Extraktion wurde mit der Agarosegelelektrophorese überprüft und dabei gleichzeitig mit dem DNA-Standard Lambda Eco RI/Hind III verglichen. Wie erwartet, wurde für jedes Isolat eine Bande im Bereich des obersten Abschnitts des Größenstandards sichtbar (Abb.: 5-1).

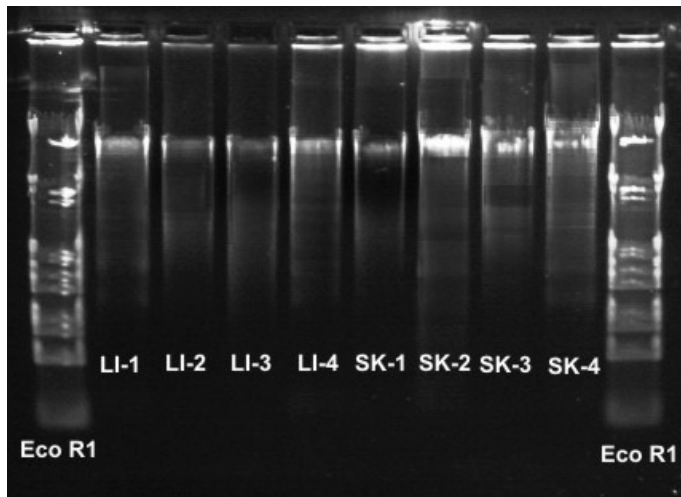


Abbildung 5-1: Ergebnis der DNA-Extraktion der Isolate; Überprüfung mittels Agarosegelelektrophorese mit Eco RI/Hind III als Größenstandard

Die anschließende PCR des 16S rRNA-Genfragments mit Hilfe der universellen Bakterienprimer E8F und 1492R war erfolgreich. In der Agarosegelelektrophorese zur Überprüfung der PCR wurden die gewünschten Banden mit je einer Länge von ca. 1500 bp sichtbar (Abb.: 5-2), was der Größe des 16S rRNA-Gens entspricht. Als Referenzstandard diente eine 1 kb Leiter.

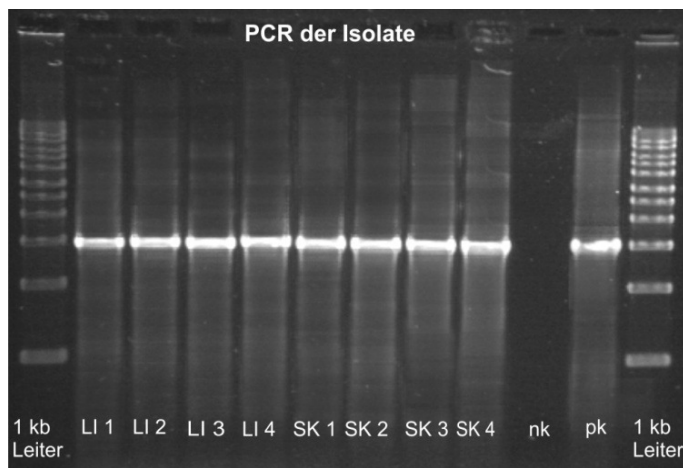


Abbildung 5-2: Ergebnis der PCR der Isolate, Überprüfung mittels Agarosegelelektrophorese mit einer 1 kb Leiter als Standard; nk: Negativkontrolle; pk: Positivkontrolle (*E. coli* K12)

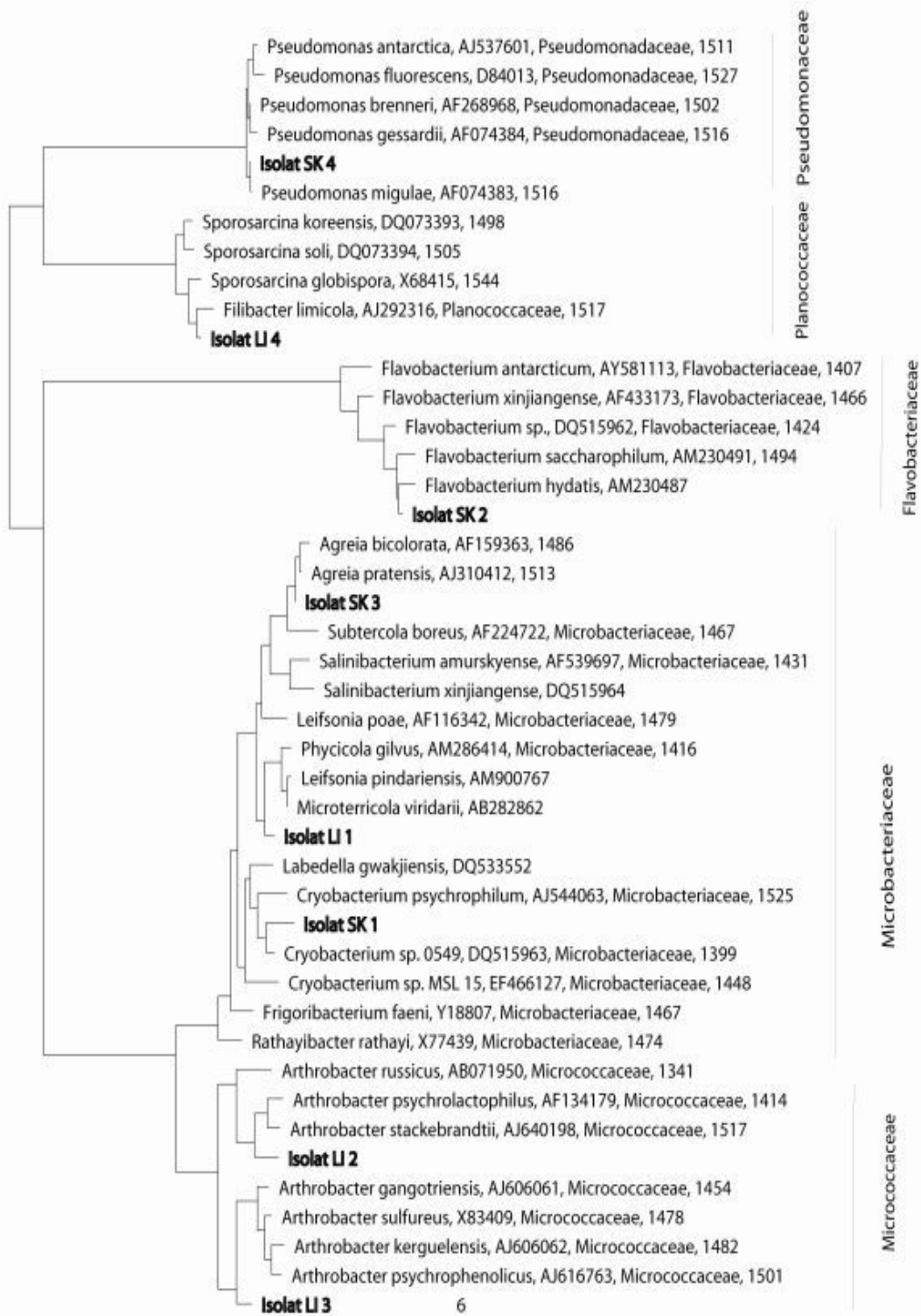
Die Sequenzierung der aufgereinigten PCR-Produkte wurde von der Firma GATC in unserem Auftrag durchgeführt. Die Datenbanksuche mittels BLAST (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) und FASTA (EBI, www.ebi.ac.uk/Tools/fasta33/index.html) brachte Aufschluss über die nächsten Verwandten der Isolate, welche auf Grund dieser Informationen phylogenetisch eingeordnet werden konnten (Tab.:5-1).

Tabelle 5-1: Ergebnis der Nucleotide Similarity Search von EBI und Blast von NCBI

Standort	Isolat	ID	Nächster Verwandter	Identität %	Klassifizierung (<i>Bacteria</i>)
Livingston Island T1-1	LI-1	AB282862	<i>Microterricola viridarii</i>	98,2	<i>Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Micrococcineae; Microbacteriaceae; Microterricola</i>
		AM900767	<i>Leifsonia pindariensis</i>	98,1	<i>Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Micrococcineae; Microbacteriaceae; Leifsonia</i>
Livingston Island T1-1	LI-2	AF134181	<i>Arthrobacter psychrolactophilus</i>	97,8	<i>Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Micrococcineae; Micrococcaceae; Arthrobacter.</i>
		AJ640198	<i>Arthrobacter stackebrandtii</i>	97,7	<i>Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Micrococcineae; Micrococcaceae; Arthrobacter</i>
Livingston Island T1-1	LI-3	AJ606062	<i>Arthrobacter kerguelensis</i>	97,6	<i>Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Micrococcineae; Micrococcaceae; Arthrobacter</i>
		AJ617763	<i>Arthrobacter psychrophenicus</i>	97,6	<i>Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Micrococcineae; Micrococcaceae; Arthrobacter</i>
Livingston Island T1-1	LI-4	X68415	<i>Sporosarcina Globispora</i>	98,8	<i>Firmicutes; Bacillales; Planococcaceae; Sporosarcina.</i>
		AJ292316	<i>Filibacter limicola</i>	98,7	<i>Firmicutes; Bacillales; Planococcaceae; Filibacter</i>
Store Koldewey G03-78	SK-1	DQ515963	<i>Cryobacterium psychrotolerans</i>	97,5	<i>Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Micrococcineae; Microbacteriaceae; Cryobacterium</i>
		DQ515964	<i>Salinibacterium xinjiangense</i>	96,7	<i>Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Micrococcineae; Microbacteriaceae; Salinibacterium.</i>
		NR026511	<i>Frigoribacterium faeni</i>	96,6	<i>Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Micrococcineae; Microbacteriaceae; Frigoribacterium.</i>
Store Koldewey G03-78	SK-2	AM230487	<i>Flavobacterium hydatis</i>	98,6	<i>Bacteroidetes; Flavobacteria; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae; Flavobacterium</i>
		DQ515962	<i>Flavobacterium glaciei</i>	98,3	<i>Bacteria; Bacteroidetes; Flavobacteria; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae; Flavobacterium</i>
Store Koldewey G03-78	SK-3	NR025460	<i>Agreia pratensis</i>	99,8	<i>Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Micrococcineae; Microbacteriaceae; Agreia</i>
		AF159363	<i>Agreia bicolorata</i>	99,6	<i>Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Micrococcineae; Microbacteriaceae; Agreia</i>
Store Koldewey G03-78	SK-4	AF074383	<i>Pseudomonas migulae</i>	99,9	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas</i>
		AM933513	<i>Pseudomonas brenneri</i>	99,5	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas</i>

Die Isolate LI-1, LI-2, LI-3, SK-1 und SK-3 gehören zum Phylum der *Actinobacteria*. Dabei werden die Reinkulturen LI-1, SK-1 und SK-3 der Familie der *Microbacteriaceae*, die Isolate LI-2 und LI-3 der Familien der *Micrococcaceae* zugeordnet. Mit 98,2 % weist LI-1 die größte Ähnlichkeit zu *Microterricola viridarii* auf. Die Ähnlichkeit zwischen SK-1 und *Cryobacterium psychrotolerans* ist mit nur 97,5 % wesentlich geringer. SK-3 dagegen ist mit einer Identität von über 99 % dem Genus *Agreia* zu zuordnen. Die Ähnlichkeit zu *Agreia pratensis* beträgt 99,8 %, zu *Agreia bicolorata* 99,6 %. Die Isolate LI-2 und LI-3 gehören laut phylogenetischer Einordnung zum Genus *Arthrobacter*, wobei die Ähnlichkeiten von LI-2 zu *Arthrobacter psychrolactophilus* (97,8 %) und von LI-3 zu *Arthrobacter kerguelensis* (97,6 %) nicht sehr hoch sind. *Sporosarcina globispora* mit 98,8 % und *Filibacter limicola* mit 98,7 % Ähnlichkeit zu Isolat LI4, werden in das Phylum der *Firmicutes* und in die Familie der *Planococcaceae* eingeordnet, wobei *Filibacter limicola* bisher als einzige Art im Genus *Filibacter* beschrieben ist. Isolat SK-2 ist Vertretern aus der Familie der *Flavobacteriaceae* im Phylum der *Bacteroidetes* zu zuordnen. Zu *Flavobacterium hydatidis* besitzt SK-2 eine Ähnlichkeit von 98,6 %, zu *Flavobacterium glaciei* 98,3 %. Die Sequenz von SK-4 ist nahezu identisch mit *Pseudomonas migulae* (99,9 %). Auch zu *Pseudomonas brenneri* besitzt SK-4 mit 99,5 % eine hohe Sequenzübereinstimmung. Die Pseudomonaden gehören zur Familie der *Pseudomonadaceae* in der Klasse der *Gammaproteobacteria*.

Zur besseren Übersicht wurden die Isolate und ihre nächsten kultivierten Verwandten in einen Stammbaum integriert (Abb.:5-3). Dazu erfolgte zunächst das Ausrichten (Alignement) der Sequenzen untereinander mit dem Programm ARB-SILVA (www.arb-silva.de) und das Importieren der Dateien in das ARB-Programm Version 5.3. Über einen Maximum-Likelihood-Algorithmus wurden die Sequenzen dann in bestehende Datenbanken integriert und ein Dendrogramm erstellt.



0.05

Abbildung 5-3: Phylogenetischer Stammbaum mit integrierten Isolaten (Fettdruck)

5.3 Morphologische, physiologisch-ökologische und biochemische Charakterisierung der Isolate

5.3.1 Morphologische Charakterisierung

In einer ersten qualitativen Untersuchung wurden die makroskopisch sichtbaren und wahrnehmbaren Eigenschaften der Kolonien festgehalten. Die Kolonien wurden hinsichtlich ihrer Farbe, Geruch, Form, Profil, Randbeschaffenheit, Oberfläche, Konsistenz und Größe beurteilt (5.4.1 bis 5.4.8).

Mit Hilfe verschiedener Färbemethoden konnten weitere Eigenschaften der Isolate ermittelt werden. Die Unterscheidung der Bakterien in gramnegativ und grampositiv ist ein wichtiges Kriterium, da mit der Beschaffenheit der Zellwand weitere wichtige Eigenschaften verbunden sind. Bei der GRAM-Färbung (GRAM, 1884) wurden in einem ersten Schritt alle Bakterien mit Gentianaviolett eingefärbt. Während die violette Färbung der grampositiven Bakterien bei der anschließenden Entfärbung mit Lugol'scher Lösung und Ethanol erhalten blieb, verloren die gramnegativen Bakterien die Färbung auf Grund ihrer Durchlässigkeit für den Iod-Farbstoffkomplex. Anschließend wurden die gramnegativen Bakterien mit Safranin als Kontrastfarbstoff rötlich gefärbt. Die Isolate LI-3, LI-4 (Abb.: 5-4) und SK-1 zeigten eine violette Färbung und sind demnach grampositiv, wohingegen LI-1, LI-2, SK-2, SK-3 und SK-4 rötlich eingefärbt waren und daher den gramnegativen Bakterien zuzuordnen sind.

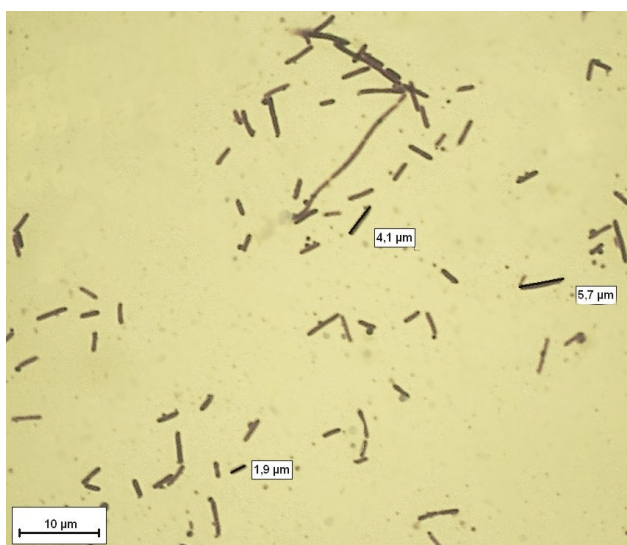


Abbildung: 5- 4: GRAM-Färbung von LI-4 (grampositiv)

Die Geißelfärbung nach LOEFFLER (1898) sollte einen Hinweis auf die Beweglichkeit der Bakterien liefern. Durch eine Geißelbeize mit Tannin und Eisen(II)Sulfat wurden Bakterien und Geißeln zunächst aufgequollen, um die feinen dünnen Geißeln überhaupt färb- und sichtbar zu machen. Die Bakterien wirken daher in der Geißelfärbung deutlich größer als zum Beispiel während der GRAM-Färbung. Das Anfärben der Geißeln erfolgte mit Karbolfuchsin (ZIEHL & NEELSEN, 1882; 1883) und resultierte in einer Rotfärbung der Bakterien und vorhandenen Geißeln. Die Geißelfärbung gestaltete sich als schwierig, da man nicht sicher sein kann, dass die Geißeln an den Organismen befestigt bleiben. Die Ergebnisse könnten daher nicht eindeutig sein. Mit großer Wahrscheinlichkeit sind die meisten der untersuchten Bakterien begeißelt (LI-1, LI-2 (Abb.: 5-5a), LI-3, LI-4 (Abb.: 5-5b), SK-2, SK-3). Nur bei den Isolaten SK-1 und SK-4 konnte durch die Geißelfärbung kein Hinweis auf ein Vorhandensein von Geißeln erbracht werden.

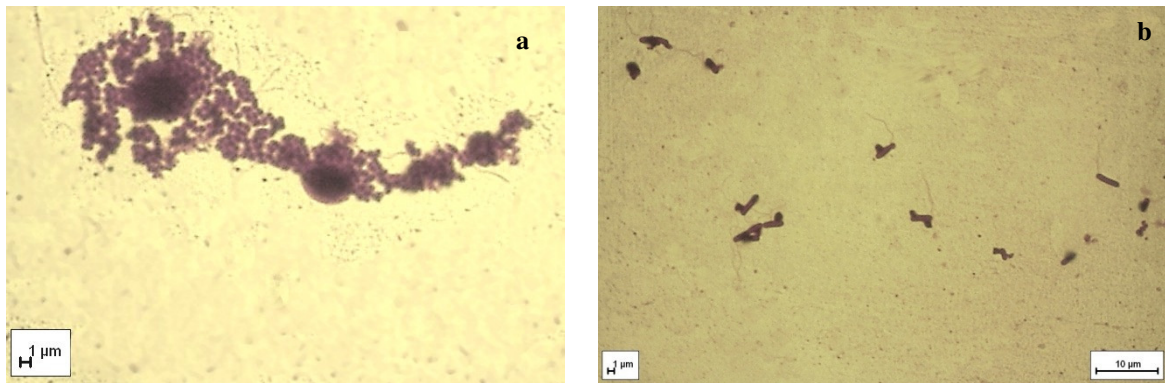


Abbildung: 5- 5: Geißelfärbung (5-5a: LI-2; 5-5b: LI-4)

Des Weiteren wurde getestet, ob unter den zu charakterisierenden Isolaten Sporenbildner vorhanden sind. In der Sporenfärbung nach WIRTZ (1908) wurden reife Sporen unter Hitzeeinwirkung mit Malachitgrün eingefärbt. Es konnten mit der Sporenfärbung keine Sporen in den zu charakterisierenden Isolaten nachgewiesen werden. Exemplarisch ist das Ergebnis der Sporenfärbung von LI-3 in Abbildung 5-6 dargestellt.

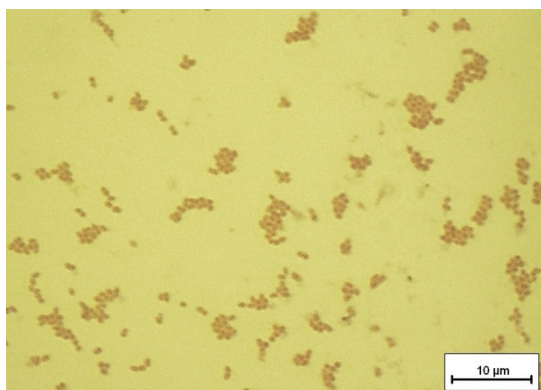


Abbildung: 5-6: Sporenfärbung LI-3

Die Ergebnisse der mikroskopischen Färbungen sind in Tabelle 5-2 zusammengefasst.

Tabelle 5-2: Ergebnisse der mikroskopischen Färbungen

	LI-1	LI-2	LI-3	LI-4	SK-1	SK-2	SK-3	SK-4
Gram-Färbung	-	-	+	+	+	-	-	-
Geißelfärbung	+	+	+	+	-	+	+	-
Sporenfärbung	-	-	-	-	-	-	-	-

5.3.2 Physiologisch-Ökologische Charakterisierung

Nach der Anreicherung verschiedener heterotropher Bakterien auf BR-Agarplatten wurden die zur näheren Charakterisierung ausgewählten Isolate hinsichtlich ihres Wachstums auf verschiedenen Nährmedien getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5-3 zusammengefasst. Insgesamt wachsen alle Isolate gut auf den getesteten Vollmedien LB, TSA und Nutrient, wobei sich die Anzucht in Flüssigmedien teilweise schwieriger gestaltete als auf Agarplatten. Lediglich SK-2 und SK-4 benötigen ein modifiziertes Nutrient Medium mit geringerer Nährstoffkonzentration für ein optimales Wachstum. Alle Isolate, bis auf LI-4, zeigen außerdem Wachstum auf Minimalmedium mit Glucose, die Stämme LI-2, LI-3, SK-1 und SK-3 wachsen sogar auf Minimalmedium ohne Glucose.

Tabelle 5-3: Wachstum auf unterschiedlichen Nährmedien

Medium	Isolat							
	LI-1	LI-2	LI-3	LI-4	SK-1	SK-2	SK-3	SK-4
Minimalmedium fest	-	+/-	+	-	+	-	+/-	-
MM flüssig	-	-	-	-	-	-	-	-
MM+Glc fest	+/-	+	+	-	+	+	+	+
MM+Glc flüssig	-	+	-	-	-	-	-	-
Nutrient fest	+	+	+	+	+	n.g.	+	n.g.
Nutrient flüssig	-	+	-	+	-	n.g.	+	n.g.
LB fest	+	+	+	+	+	n.g.	+	n.g.
LB flüssig	+	+	+	+	+	n.g.	+	n.g.
1/2 LB fest	+	+	+	+	+	-	+	+/-
1/2 LB flüssig	+	+	+	+	+	n.g.	+	n.g.
TSA fest	+	+	+	+	+	+	+	+
TSA flüssig	+	+	+	+	+	n.g.	+	n.g.
Nutrient special fest	+	+	+	+	+	+	+	+
Nutrient special flüssig	+/-	-	-	-	+	+	+/-	+

n.g. = nicht getestet; MM = Minimalmedium; LB = LURIA BERTANI; TSA = Tryptic Soy Agar

Zur weiteren Kultivierung wurde für die Isolate LI-1, LI-2, LI-3, LI-4, SK-1 und SK-3 das 1/2 LB-Medium genutzt. SK-2 und SK-4 wurden auf einem modifizierten DUNGER-Medium (DUNGER & FIEDLER, 1997), welches in dieser Arbeit „Nutrient Special“ genannt wird, kulti-

viert. Da das DUNGER-Medium von ANDRÉ LIPSKI zur Kultivierung von SK-2 und SK-4 vorgeschlagen worden war, erfolgten für diese Stämme keine Tests mit Nutrient-Medium, LB-Medium und TSA.

Um die Isolate bezüglich ihrer physiologisch-ökologischen Eigenschaften zu charakterisieren, wurde die Temperaturwachstumskurve aufgenommen, der pH-Bereich bestimmt, in welchem die Bakterien wachsen können, und der Salzbedarf bzw. die Salztoleranz der Bakterien ermittelt. Für die unterschiedlichen Parameter wurde mit Hilfe der Optischen Dichte bei 600 nm jeweils die spezifische Wachstumsrate μ berechnet.

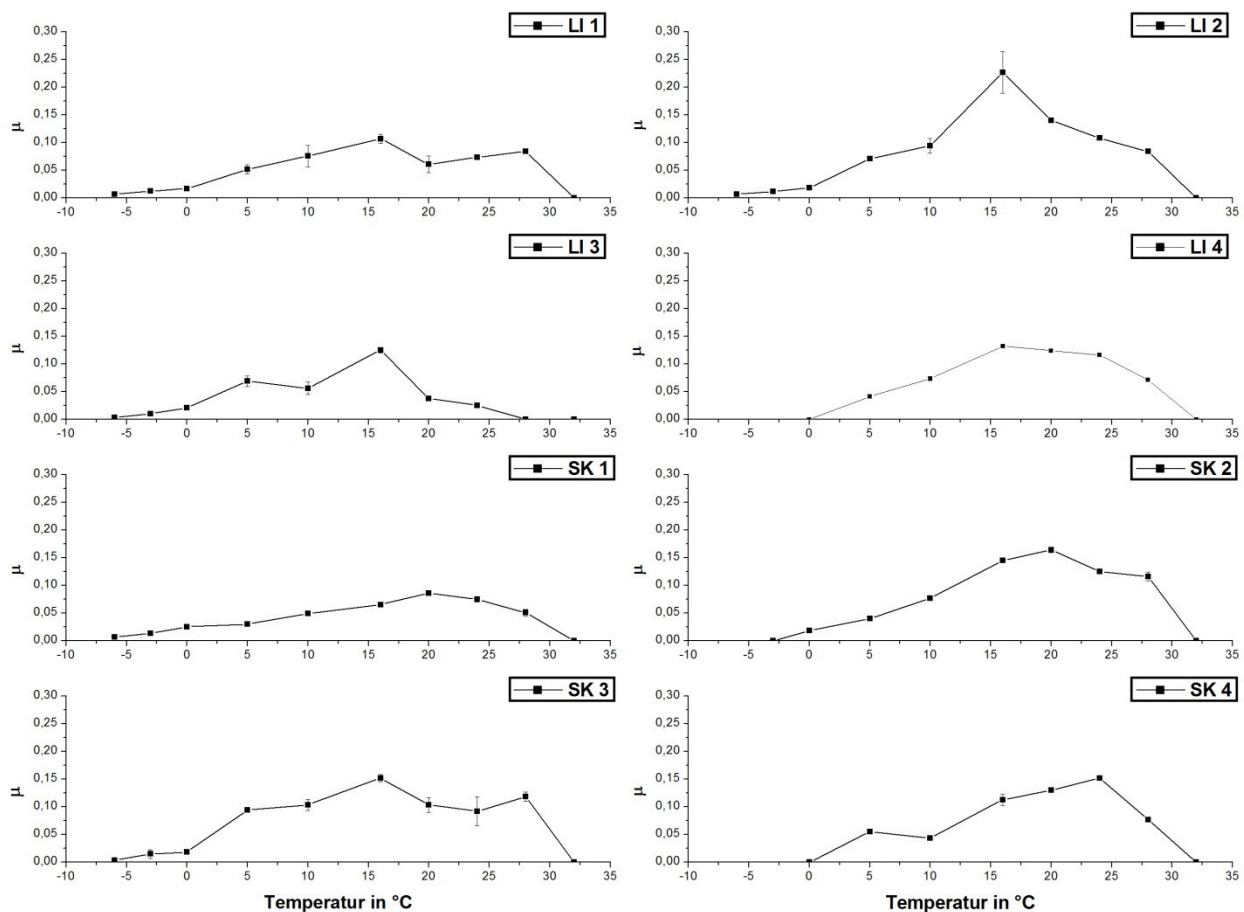


Abbildung 5-7: Temperaturspektren der Isolate

Das Wachstum der Bakterienkulturen wurde in einem **Temperaturbereich** von -6°C bis 32°C aufgenommen (Abb.: 5-7). Von den acht untersuchten Isolaten sind fünf (LI-1, LI-2, LI-3, SK-1, SK-3) in der Lage bei Temperaturen unter 0°C bis maximal -6°C zu wachsen. Dabei zeigen insbesondere LI-1 und SK-1 auch noch bei -6°C deutliche Wachstumsaktivität. SK-2 kann bei Temperaturen bis 0°C wachsen, während LI-4 und SK-4 können ab Temperaturen

von 5°C wachsen. In den höheren Temperaturbereichen über 30°C ist für die Mehrheit der Isolate kein Wachstum zu beobachten. Lediglich SK-4 zeigt bei 32°C ein geringes Wachstum über einer OD von 0,1. Die Isolate LI-1, LI-2, LI-4, SK-1, SK-2 und SK-3 können bis zu 28°C, Isolat LI-3 bis zu 24°C, gut wachsen. Das Temperaturoptimum liegt bei dem Großteil der Reinkulturen (LI-1, LI-2, LI-3, LI-4, SK-3) um 16°C. SK-1 und SK-2 haben ihr Temperaturoptimum bei 20°C und SK-4 wächst bei 24°C optimal.

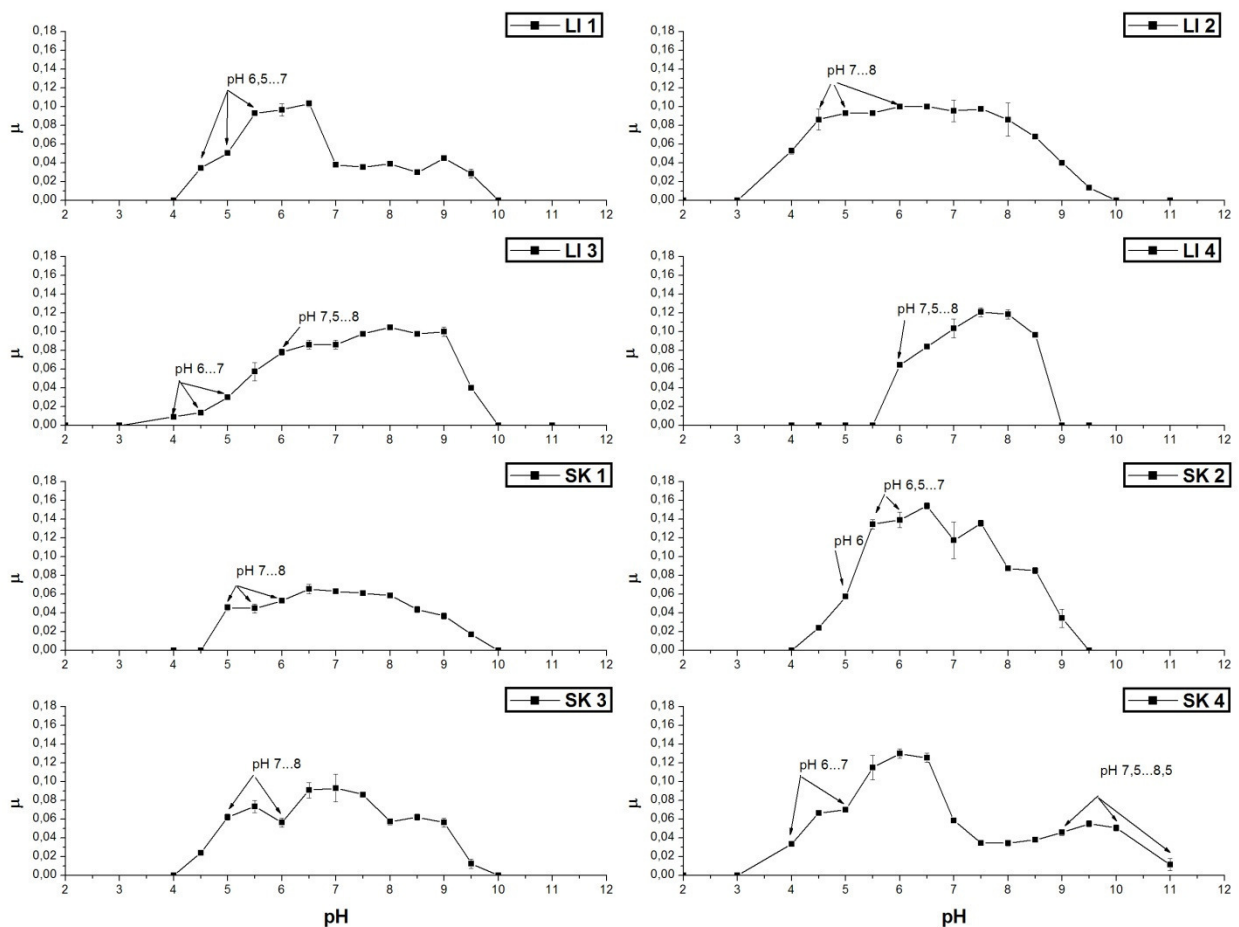


Abbildung 5-8: pH-Spektrum der Isolate; Pfeile im Graphen zeigen pH-Wert-Anpassung an, bedingt durch Veränderungen im Medium auf Grund der mikrobiellen Aktivität

Das **pH-Spektrum** wurde zwischen pH 2,0 und pH 11,0 getestet (Abb.: 5-8). Von den getesteten Isolaten besitzt lediglich LI-4 ein enges pH-Spektrum von pH 6,0 bis pH 8,5. Im sauren Bereich um pH 4 können LI-2, LI-3 und SK-4 wachsen. Ab pH 4,5 bis 5,0 sind auch LI-1, SK-1, SK-2 und SK-3 fähig zu wachsen. Bis auf LI-4 und SK-2 zeigen alle Stämme Wachstum im basischen Bereich bis pH 9,5. SK-2 wächst bis zu einem pH-Wert von 9,0 und bei

SK-4 war auch bei pH 11,0 Wachstum noch deutlich erkennbar. Die pH-Optima liegen um einen neutralen pH-Wert von 7,0. Bei LI-1, SK-1, SK-2 und SK-3 liegt das pH-Optimum um pH 6,5. Der optimale pH-Bereich der Isolate LI-3 (pH 8,0...9,0) und LI-4 (pH 7,5...8,0) ist leicht ins Basische verschoben, während SK-4 sein Optimum im leicht Sauren bei pH 5,5...6,5 hat. LI-2 besitzt ein sehr breites pH-Optimum von pH 5,0 bis 7,5.

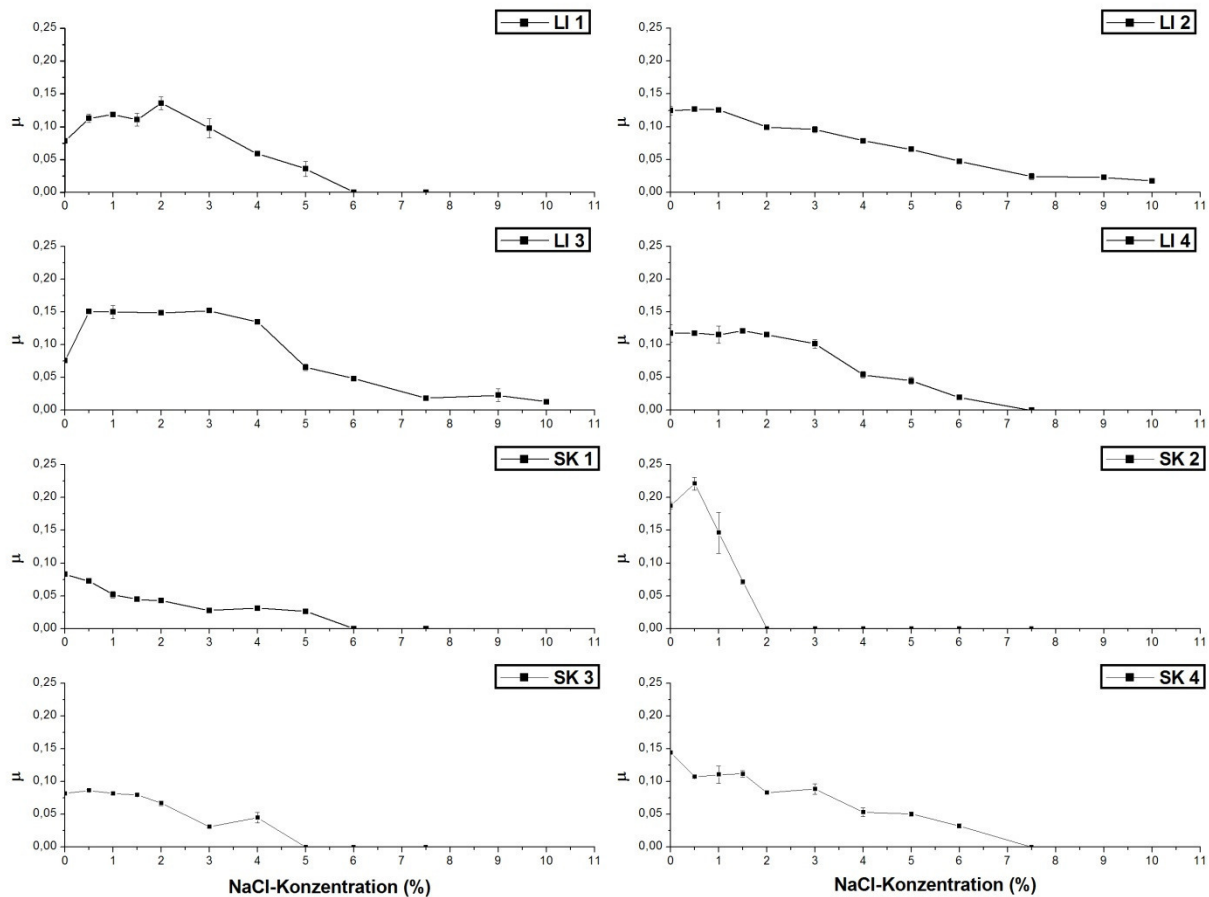


Abbildung 5-9: Salztoleranzkurven der Isolate

Die **Salztoleranz** der untersuchten Isolate wurde in einem Bereich zwischen 0 % und 10,0 % NaCl ermittelt (Abb.: 5-9). Alle Isolate können sowohl mit als auch ohne Salz wachsen. Von den acht getesteten Stämmen wachsen SK-1 und SK-4 am besten ohne Salz, tolerieren aber Salzkonzentrationen von 5,0 % (SK-1) bis 6,0 % (SK-4) NaCl. Für LI-1 (0,5...2,0 %), LI-3 (0,5...3,0 %), SK-2 (0,5 %) und SK-3 (0,5...1,5 %) ist eine geringe bis mittlere Salzkonzentration für das optimale Wachstum erforderlich. LI-2 wächst optimal von 0 % bis 1,0 %, LI-4 von 0 % bis 2,0 % NaCl. Bis auf SK-2, welcher nur zwischen 0 % und 1,5% NaCl wächst, weisen alle Isolate einen breiten Salztoleranzbereich auf. LI-2 und LI-3 zeigen auch noch bei

9,0 % bis 10,0 % NaCl ein sichtbares Wachstum. LI-4 und SK-4 wachsen bis zu einer Konzentration von 7,0 % NaCl, LI-1 und SK-1 bis hin zu 5,0 %. SK-3 toleriert Salzkonzentrationen bis 4,5 % NaCl.

Das **Verhalten gegenüber Sauerstoff** wurde in Flüssig- und auf Festmedium überprüft. Das Flüssigmedium in den Serumflaschen war nach dem Autoklavieren leicht rosa, was darauf schließen lässt, dass sich noch ein geringer Teil Restsauerstoff in der Flasche befand. Bei Testabschluss waren bis auf SK-3 alle Flaschen entfärbt. Eine deutliche Trübung, die als Wachstumsparameter diente, war nicht erkennbar. Bei LI-2, LI-3 und SK-1 hatte sich ein milchiger Film am Flaschenboden abgesetzt, was auf ein geringes Wachstum hindeutet. Die anderen Isolate zeigen im Flüssigmedium kein Wachstum in Abwesenheit von Sauerstoff. Beim Test auf Agarplatten wurde die Koloniebildung beurteilt. LI-4 und SK-2 bildeten eindeutige Kolonien aus, bei LI-1, LI-2, LI-3 und SK-4 waren sehr kleine, feine Kolonien sichtbar, ein geringes Wachstum ist vorhanden. SK-1 und SK-3 wachsen ohne Sauerstoff gar nicht auf dem Festmedium. In beiden Tests erwies sich nur SK-3 als eindeutig strikt aerob. LI-2, LI-3, LI-4 und SK-2 sind demnach fakultativ anaerob. Zu LI-1, SK-1 und SK-4 kann keine eindeutige Aussage gemacht werden, da die Ergebnisse sehr unterschiedlich sind. Die Isolate wachsen insgesamt optimal mit Sauerstoff und zeigen, wenn überhaupt, nur sehr geringes Wachstum ohne Sauerstoff.

In einem Test zur **Wachstumshemmung** wurde die Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber 9 verschiedenen Antibiotika (Abb.: 5-10) und Lysozym (Abb.: 5-11) im Filterscheibchentest geprüft. Je größer der gebildete Hemmhofdurchmesser, desto größer ist auch die Hemmung durch das Antibiotikum. Eine maximale Hemmung, d. h. Wachstum war lediglich am äußersten Rand der Agarplatte oder gar nicht erkennbar, wurde in der graphischen Auswertung mit einem Hemmhofdurchmesser von 60 mm bewertet. Bei einigen Antibiotika und Stämmen bildete sich ein doppelter Hemmhof aus. Das war der Fall bei Erythromycin (SK-3), Streptomycin (LI-4), Rifampicin (SK-4) und Oxytetracyclin (LI-3, SK-4). Gemessen wurde der äußere Ring, weil sich im inneren Ring offensichtlich resistente Zellen befanden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-10 zusammengefasst und werden in den folgenden Kapiteln (5.4.1 bis 5.4.8) erklärt. Insgesamt wird deutlich, dass die Isolate von Store Koldewey eine höhere Resistenz gegenüber Antibiotika aufweisen, als die von Livingston Island. Besonders SK-2 und SK-4 sind gegenüber einem Großteil der getesteten Antibiotika resistent, bzw. weisen nur eine geringe Hemmung auf. Die Isolate von Livingston Island sind gegenüber einer wesentlich größeren Bandbreite der getesteten Antibiotika empfindlich.

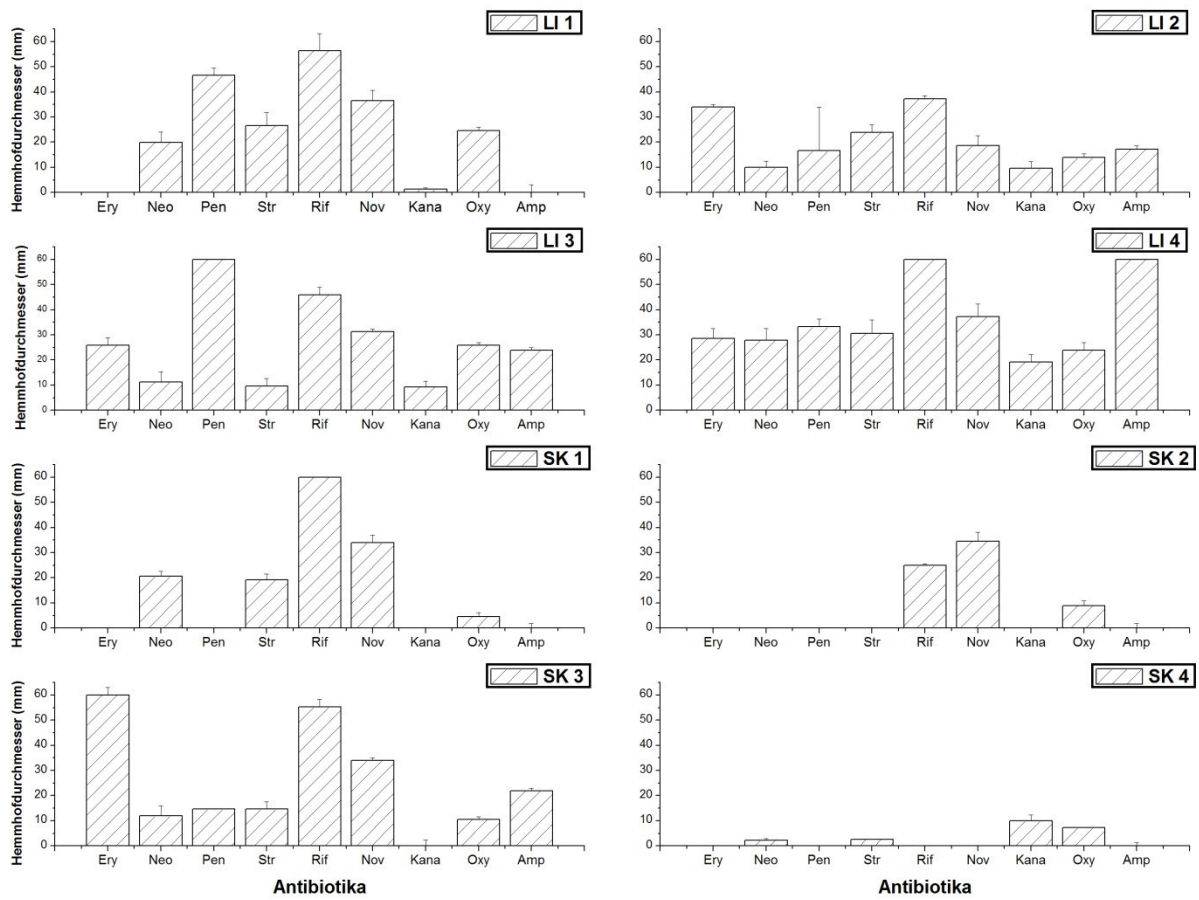


Abbildung 5-10: Hemmhofdurchmesser (mm) der Isolate, ausgelöst durch ihre Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika

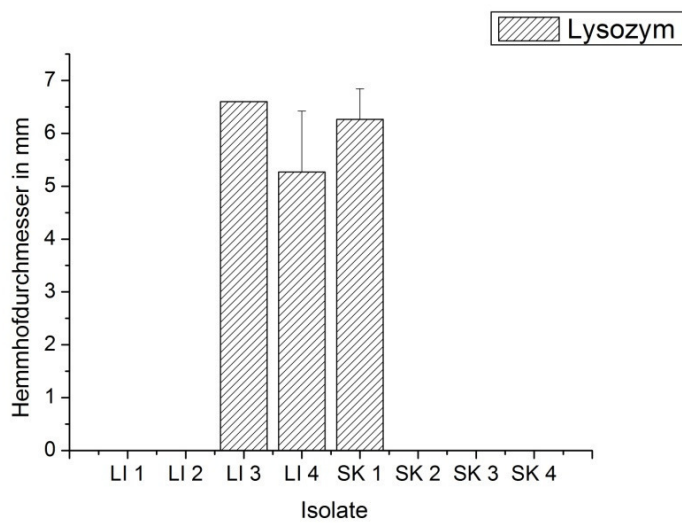


Abbildung 5-11: Hemmhofdurchmesser (mm) der Isolate, ausgelöst durch Lysozym

Eine Hemmung durch **Lysozym** ist in diesem Versuch nur bei grampositiven Bakterien möglich, da zur Zellwandlyse der gramnegativen Bakterien EDTA dazu gegeben werden muss. Die äußere Membran der gramnegativen Bakterien wird allein durch Lysozym nicht abgebaut (ELLISON & GIEHL, 1991). LI-3, LI-4 und SK-3 (Abb.: 5-11) zeigen eine Hemmhofbildung und sind gegenüber Lysozym empfindlich. Der Lysozym-Test unterstützt demnach die Ergebnisse der GRAM-Färbung, wonach LI-1, LI-2, SK-2, SK-3 und SK-4 gramnegativ und Lysozym unempfindlich sind, während LI-3, LI-4 und SK-1 grampositiv und Lysozym empfindlich sind.

5.3.3 Biochemische Leistungsfähigkeit

Das Potential der zu charakterisierenden Bakterien zur **Verwertung von Zuckern** wurde über die sogenannte „Bunte Reihe“ und mit Hilfe der Methylrot-Probe getestet. Beim Abbau von Zuckern und Zuckeralkoholen entstehen unter anderem Säuren, die mit einem Indikator nachgewiesen werden können. Bromthymolblau schlägt bei einer pH-Absenkung auf pH 6 von blau (neutral bis alkalisch) nach gelb/orange um. Als Referenzorganismen dienten *Escherichia coli* und *Proteus mirabilis*. In Abbildung 5-12 ist der Farbumschlag des Indikators von der Negativkontrolle (blau) zu *Escherichia coli* (orange/ gelb) und *Proteus mirabilis* (gelb/ grün) erkennbar.

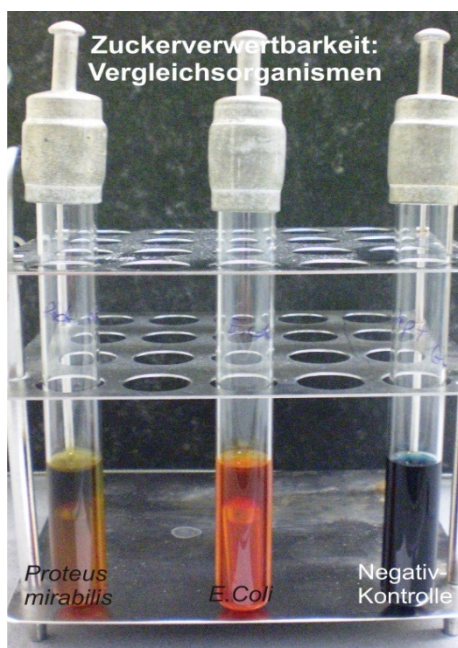


Abbildung 5-12: Beispiel zur „Bunten Reihe“

Tabelle 5-4: Ergebnisse der Zuckerverwertbarkeit

	LI-1	LI-2	LI-3	LI-4	SK-1	SK-2	SK-3	SK-4
1) Glucose	+	+	-	+	++	+	+	+/-
2) Galactose	+	-/+	-	-	+	+/-	+/-	-
3) Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-
4) Maltose	-	-	-	-	+	+/-	+/-	-
5) Mannitol	-	+	-	-	++	-	+/-	-
6) Saccharose	+/-	+/-	-	-	+	+/-	+/-	-
7) Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-
8) Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-
9) Dulcitol	-	-	-	+/-	-	-	-	-
10) Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-
11) Rhamnose	+	-	+/-	-	-	-	-	-
12) Salicin	+/-	-	-	-	++	+/-	+/-	-
13) Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-
14) Trehalose	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-
15) Xylose	-	-	-	-	+/-	-	+	-

++ hellgelb = stark positiv; + gelb-hellgrün = positiv;
 +/- grün-dunkelgrün = schwach positiv; - blau = negativ

Die untersuchten Stämme zeigten insgesamt eine eher schwache Reaktion von blau nach grün bis gelb-grün und gelb (Tab.: 5-4), ähnlich wie *Proteus mirabilis*, und bauen demnach nur wenige Zucker und Zuckeralkohole unter Säurebildung ab. Lediglich Glucose wird von allen Isolaten außer LI-3 genutzt. Lactose, Arabinose, Adonitol, Inositol und Sorbitol spielen offenbar gar keine Rolle. Insgesamt zeigen die Isolate von Store Koldewey ein etwas größeres Abbaupotential der getesteten Zucker als die Isolate von Livingston Island. Für Stamm SK-4 wurde festgestellt, dass der Abbau des Zucker-Peptonwassers zu einer Alkalisierung (stärkere Blaufärbung) des Mediums führt. Daher wurde SK4 in einem weiteren Zuckertest mit dem basischen Indikator Phenolphthalein untersucht (5.4.8). Als weiteres Abbauprodukt entstehen bei der Zuckerverwertung Gase wie CO₂ oder H₂. Eine Gasbildung konnte bei den untersuchten Isolaten nicht beobachtet werden.

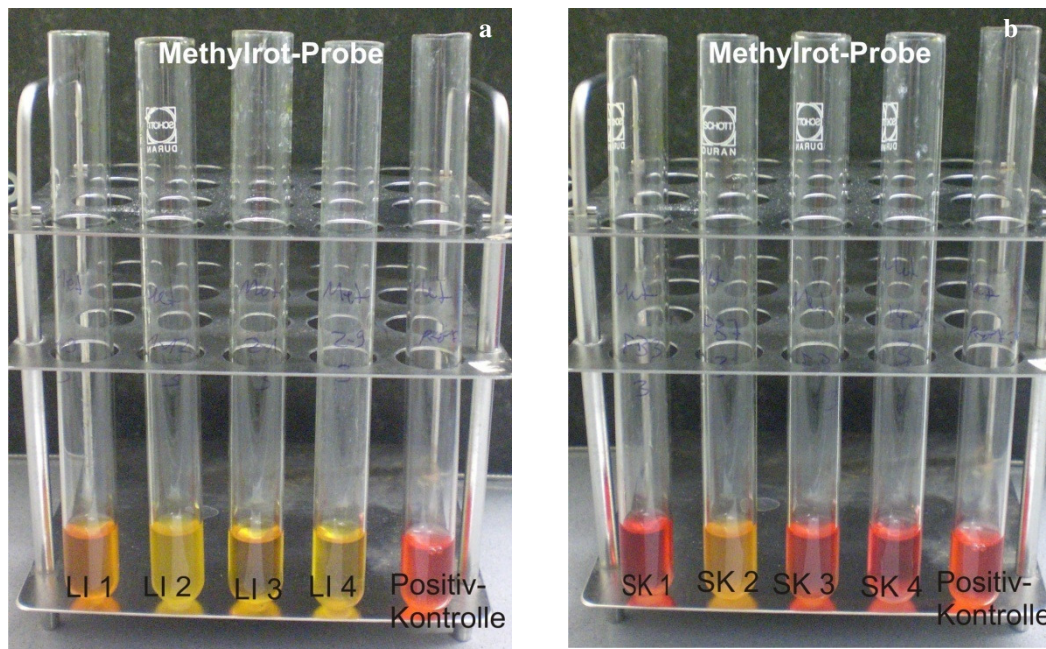


Abbildung 5-13: Ergebnis Methylrot-Probe (5-13a: Isolate von Livingston Island; 5-13b: Isolate von StoreKoldewey)

Die **Methylrot-Probe** ergab Aufschluss darüber, ob die Isolate Glucose unter so starker Säurebildung abbauen können, dass der pH-Wert im Medium unter pH 4,4 absinkt. Dann erst schlägt der Indikator Methylrot von gelb (neutral) nach rot (pH < 4,4) um. Als Positivkontrolle diente *Proteus mirabilis* (Abb.: 5-13a/b). Wie in Abbildung 5-13b erkennbar reagieren SK-1, SK-3 und SK-4 positiv auf die Methylrot-Probe, während bei LI-1 (Abb.: 5-13a) und SK-2 (Abb.: 5-13b) durch ihre Orangefärbung auf eine schwache Säurebildung zu schließen ist. Bei den Isolaten LI-2, LI-3 und LI-4 ist die Methylrot-Probe negativ. Laut Zuckertest bauen LI-2 und LI-4 Glucose durchaus ab, aber offensichtlich nur unter geringer Säurebildung.

Auch komplexere Kohlenhydrate wie Stärke können von Mikroorganismen abgebaut werden. Im **Stärkehydrolyse-Test** wurde festgestellt, ob die zu untersuchenden Isolate Amylase produzieren und als Exoenzym ins Medium abgeben, um die darin enthaltene Stärke zu spalten und zu verwerten. Der Nachweis erfolgte mit Lugol'scher Lösung. Wurde die Stärke zu Oligosacchariden abgebaut, blieb die Iod-Stärke-Reaktion an dieser Stelle aus und es bildete sich ein heller Hof um den Impfstich der sonst blauen Agarplatte. Von den untersuchten Isolaten sind nur SK-3 (stark positiv) und LI-1 (schwach positiv) in der Lage Stärke mit Hilfe von Amylase zu spalten. Die anderen Stämme wachsen zwar auf dem Stärkeagar, können das Kohlenhydrat aber nicht verwerten.

Ein weiteres Exoenzym ist die **Gelatinase**. Im Test wurde überprüft, ob die Bakterien in der Lage sind den Gelatine-Agar zu verflüssigen (Stichkultur im Schrägagarröhrchen), oder ob sich unter Einfluss des Entwicklers Ammoniumsulfat klare Höfe um den Impfstich ausbilden (Test auf Gelatine-Agarplatten). Alle Kulturen erwiesen sich in beiden Tests als Gelatinase-negativ. Die Stichkultur im Schrägagarröhrchen liefert gleichzeitig eine Aussage zum Verhalten der Kulturen gegenüber Sauerstoff. Generell wachsen alle Kulturen aerob. SK-4, LI-3 und LI-4 wachsen nur oberhalb des Stichkanals auf dem Agar und sind daher wahrscheinlich strikt aerob. Dagegen findet man bei LI-2 und SK-1 Wachstum entlang des gesamten Stichkanals, was auf ein fakultativ aerobes Verhalten hindeutet. Die weiteren Isolate LI-1, SK-2 und SK-3 bewegen sich dazwischen, indem sie vorwiegend auf der Agarschicht bis leicht in diese hinein wachsen.

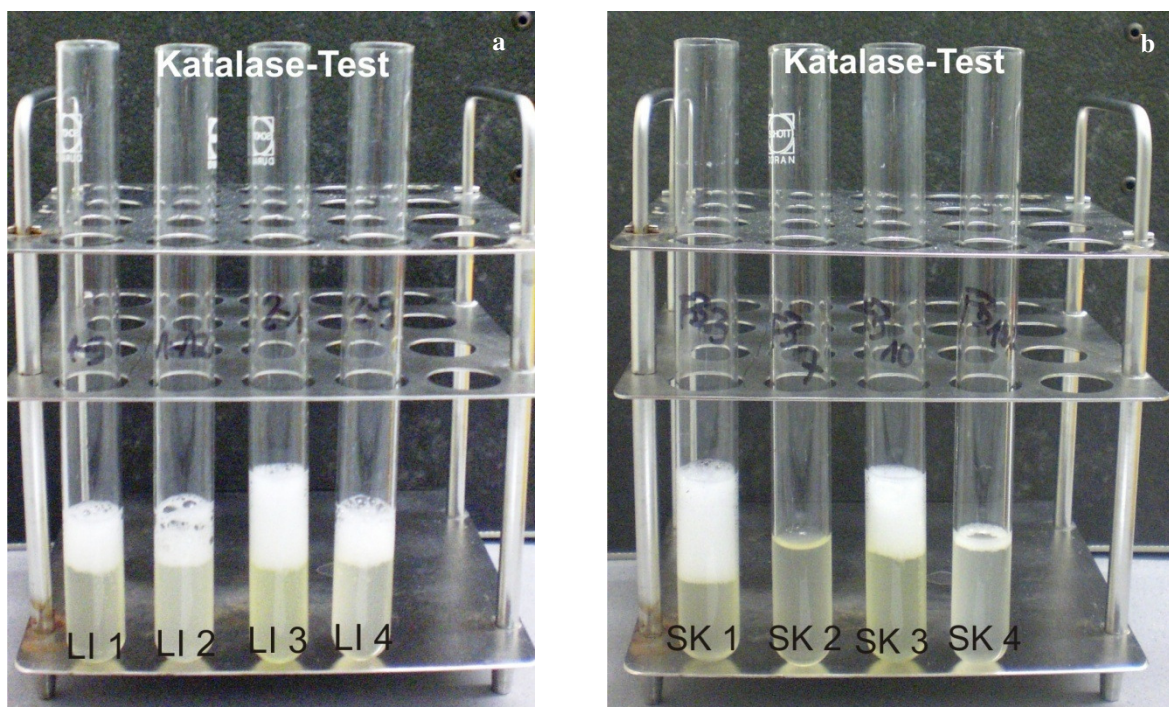


Abbildung 5-14: Ergebnisse des Katalase-Tests (5-14a: Isolate von Livingston Island; 5-14b: Isolate von Store Koldewey)

Auch die Enzyme **Katalase** und Oxidase können einen Hinweis dazu geben, wie sich die zu charakterisierenden Bakterien im Wachstum gegenüber Sauerstoff verhalten. Katalase spielt eine wichtige Rolle bei der Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies, indem es Wasserstoffperoxid in Sauerstoff und Wasser umwandelt. Eine positive Reaktion wurde an der Blasenbildung auf Grund des Sauerstoffes sichtbar (Abb.: 5-14a/b). Die Isolate LI-1, LI-2, LI-3, LI-4, SK-1 und SK-3 sind stark Katalase positiv, während die Reaktion bei SK4 sehr schwach ausfällt. SK-2 ist Katalase-negativ.

Entsprechend dem **Oxidase-Test** nach KOVACS (1956) wurde eine Bakterienkolonie des jeweiligen Testkeims auf ein, mit N,N,N,N'-Tetramethyl-p-phenylendiamin getränktes, Filterpapier ausgestrichen. Färben sich die Kolonien innerhalb von 10 s (+) bis 30 s (+/-) blauschwarz, besitzen die Bakterien dieses Enzym. SK-2 (+) und SK-4 (+/-) zeigten sich Oxidase-positiv.

Das alle untersuchten Kulturen Gelatinase-negativ sind, ist ein Hinweis auf die geringe proteolytische Aktivität der Bakterien. Das bestätigte sich auch im **Protease-Test**, bei dem der Abbau von Casein getestet wurde. Wurde das Casein abgebaut, bildete sich ein durchscheinender, klarer Hof um den Impfstrich der sonst trüben Platte. Die Isolate SK-2 und SK-4 bildeten einen solchen klaren Hof und besitzen demnach proteolytische Enzyme. LI-2 und LI-4 reagierten leicht Protease-positiv. LI-1, LI 3, SK-1 und SK-3 bauen das Casein im Medium nicht ab und weisen daher in den angewendeten Test keine proteolytische Aktivität auf.

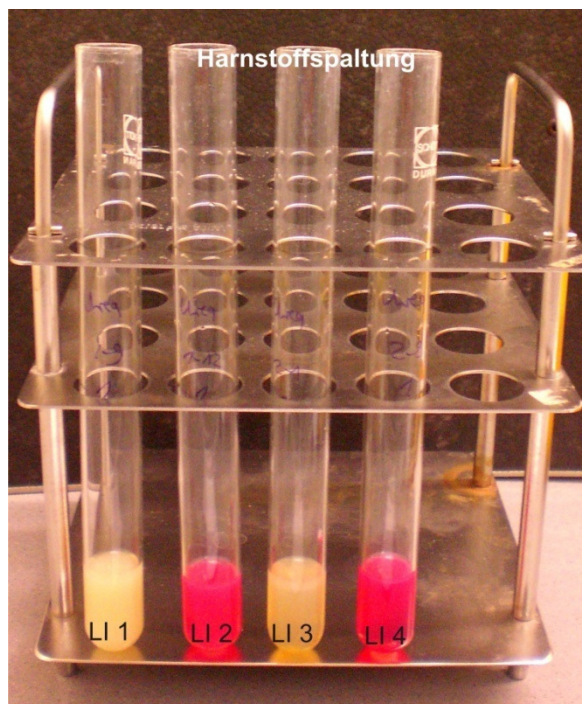


Abbildung 5-15: Ergebnisse des Urease-Tests, Isolate von Livingston Island

Die **Fähigkeit Harnstoff zu spalten**, ist mit der Fähigkeit verbunden, das Enzym Urease zu bilden. Das mit den Testkeimen angeimpfte Harnstoffmedium wurde zur Auswertung mit dem basischen Indikator Phenolphthalein versetzt, da Urease aus Harnstoff unter Wassereinklagerung das stark alkalische Ammoniumcarbonat bildet. In Abbildung 5-15 wird der Farbumschlag des Indikators von farblos/Medium (neutral) nach rot (basisch) deutlich. LI-2 und LI-4 sind demnach in der Lage Harnstoff zu spalten, wohingegen die anderen Isolate LI-1, LI-2 sowie SK-1, SK-2, SK-3 und SK-4 nicht dazu fähig sind.

In einem weiteren Versuch zur biochemischen Leistungsfähigkeit wurde überprüft, ob die zu charakterisierenden Bakterien in der Lage sind, mit Hilfe des Enzyms **Tryptophanase**, aus Tryptophan Indol zu bilden. Bei einer **Indolproduktion** kommt es unter Zugabe von p-Dimethylaminobenzaldehyd zur Ausbildung eines kirschroten Ringes am oberen Rand der Nährlösung wie bei der Positivkontrolle *E. coli* (Abb.: 5-16a/b) erkennbar. Sowohl die Isolate von Livingston Island als auch die Kulturen von Store Koldewey reagierten im Indol-Test negativ und können demnach kein Indol aus Tryptophan bilden.

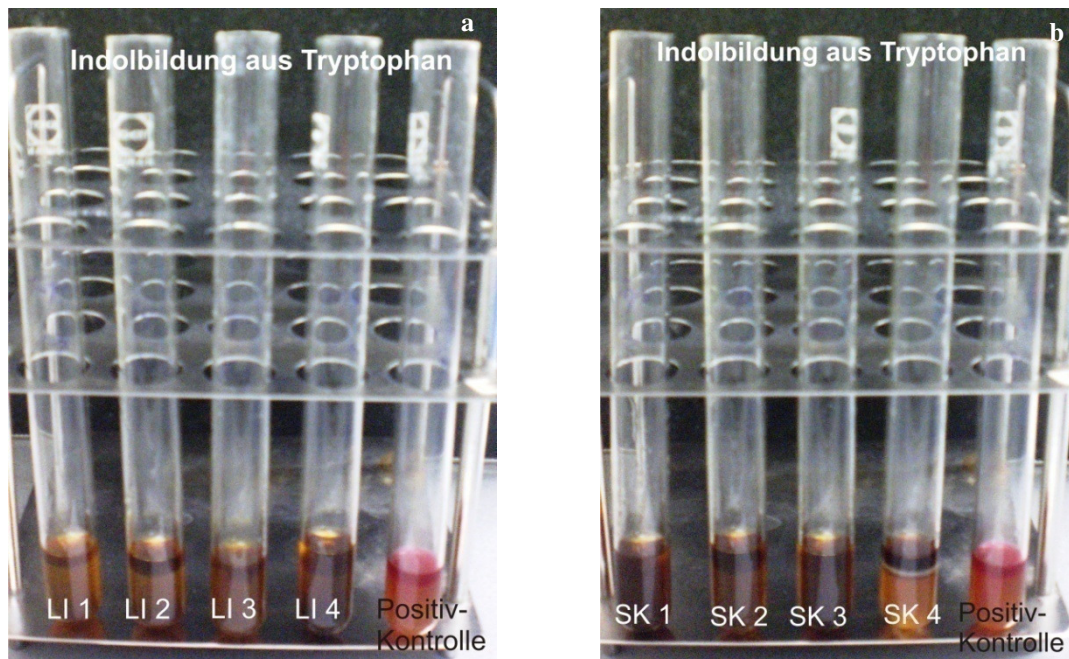


Abbildung 5-16: Ergebnisse des Indol-Tests (5-16a: Isolate von Livingston Island; 5-16b: Isolate von Store Koldewey)

Ein weiteres Charakteristikum stellte die **Bildung von Schwefelwasserstoff** aus schwefelhaltigen Aminosäuren dar, wobei der Abbau von Cystin, Cystein oder Methionin über die Bildung schwarz gefärbter Sulfide nachgewiesen wurde, die in Anwesenheit von Schwermetallsalzen und Schwefelwasserstoff entstehen. Die Isolate LI-1, LI-2, LI-3, LI-4, SK-1 und SK-2 sind in der Lage aus schwefelhaltigen Eiweißverbindungen Schwefelwasserstoff zu bilden,

wie am Beispiel LI-1 (Abb.: 5-17a/b) an der braunschwarzen Färbung des Bleiacetatstreifens zu sehen ist. Das Isolat SK-2 zeigte nur eine geringe Färbung. Im Test mit SK-3 und SK-4 entstanden keine Sulfide, der Filterstreifen blieb weiß, wonach von diesen Isolaten kein H_2S gebildet werden kann.

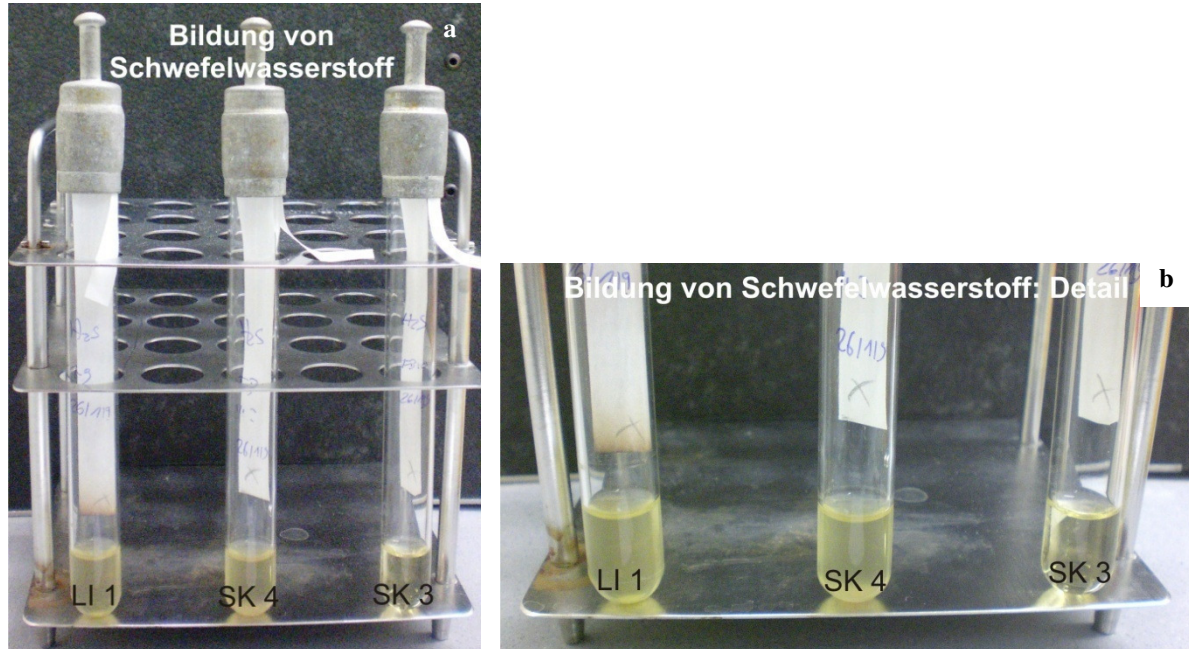


Abbildung 5-17: Bildung von H_2S (5-17a: Isolate LI-1, SK-4 und SK-3 als Beispiel; 5-17b: Bildung von H_2S : Detail)

5.4 Detaillierte Charakterisierung der Isolate

5.4.1 Beschreibung von LI-1

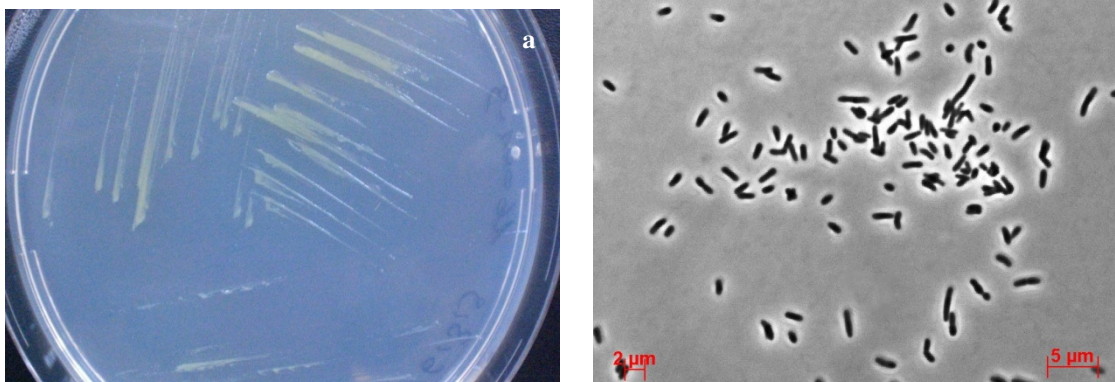


Abbildung 5-18: Morphologie von Isolat LI-1 (5-18a: Kolonien und Impfstrich; 5-18b: Zellform in der Phasen-Kontrast-Mikroskopie)

Das Isolat LI-1 (Abb.: 5-18a) bildete nach 7 bis 14 Tagen sehr kleine Kolonien mit einem Koloniedurchmesser von kleiner als 0,5 mm. Die runden Kolonien schließen mit einem glat-

ten Rand ab, sind leicht erhaben und in der Farbe durchsichtig hell zitronengelb, dabei aber eher matt als glänzend. Die Bakterien weisen einen käsigen Geruch auf und die Konsistenz ist butterartig schleimig. Bei Isolat LI-1 handelt es sich um gramnegative, 0,5 bis 2,5 µm lange und 0,3 bis 0,5 µm breite Stäbchenbakterien, die laut Färbung durch Geißeln beweglich sind, aber keine Sporen bilden (Abb.: 5-18b).

Isolat LI-1 zeigte Wachstum im Bereich von -6°C bis 28°C und hat ein Temperaturoptimum von 16°C. Der Stamm wächst in einem relativ breiten pH-Bereich von pH 4,5...9,5 und hat sein pH-Optimum im leicht sauren bis neutralen bei pH 5,5...6,5. Eine abschließende pH-Messung des Mediums ergab eine pH-Wertanpassung. Die pH-Werte 4,5, 5 und 5,5 wurden auf pH 6,5 bis pH 7,0 angehoben. Der Test auf Salztoleranz ergab bei Isolat LI-1 einen Salzbedarf von 1 % bis 2 % NaCl (Optimum), wobei Wachstum auch ohne Salz und bis zu einer Konzentration von 5 % NaCl auftrat. Das Wachstum bei 5 % NaCl war nur gering.

Im Test auf Wachstumshemmung in Anwesenheit verschiedener Antibiotika zeigte sich Isolat LI-1 gegenüber Penicillin, Neomycin, Streptomycin, Oxytetracyclin, Novobiocin und Rifampicin empfindlich. Kanamycin löste mit einem Hemmhofdurchmesser unter 10 mm nur eine geringe Hemmung aus. Gegenüber Erythromycin und Ampicillin erwies sich LI-1 als resistent. Der Lysozym-Test war negativ.

Isolat LI-1 ist in der Lage Glucose, Galactose, Saccharose, Rhamnose und Salicin unter schwacher Säurebildung abzubauen und diese als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Bei Saccharose und Salicin erfolgte der Indikatorumschlag lediglich von blau nach grün, d.h. diese Zucker konnten nur unter schwacher Säurebildung genutzt werden. Lactose, Maltose, Mannitol, Adonitol, Arabinose, Dulcitol, Inositol, Sorbitol, Trehalose und Xylose wurden nicht umgesetzt. Die Methylrot-Probe war schwach positiv. Stärke konnte hydrolysiert werden (Amylase-positiv). Der Gelatinase- und der Proteasetest waren negativ. Isolat LI-1 besitzt keine Tryptophanase-, Urease und Oxidase-Aktivität, kann aber Schwefelwasserstoff aus schwefelhaltigen Eiweißverbindungen herstellen und ist Katalase-positiv.

5.4.2 Beschreibung von LI-2

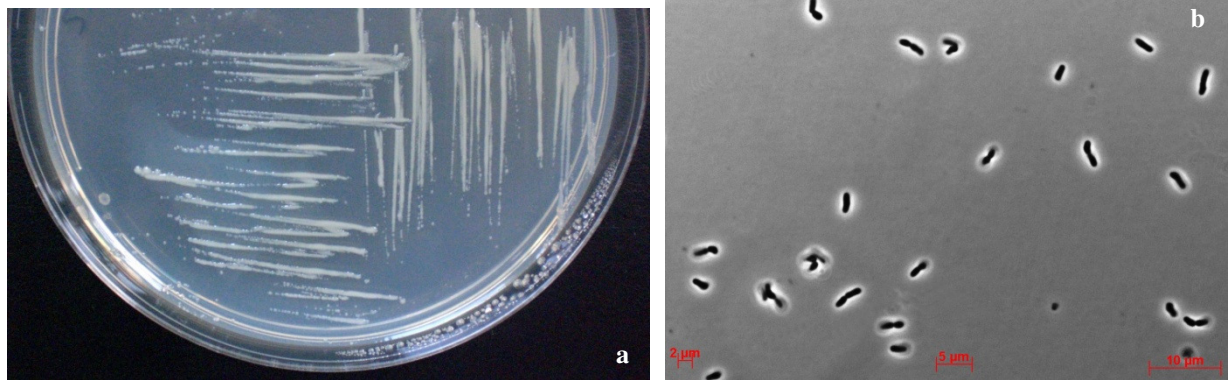


Abbildung 5-19: Morphologie von Isolat LI-2 (5-19a: Kolonien und Impfstrich; 5-19b: Zellform in der Phasen-Kontrast-Mikroskopie)

Die runden Kolonien des Isolates LI-2 (Abb.: 5-19a) haben nach 7 bis 14 Tagen einen Durchmesser von ca. 0,5 mm, besitzen einen glatten Rand und sind leicht erhaben. Die leicht glänzenden Kolonien sind crème- bis eierschalenfarbig, in ihrer Konsistenz feucht schleimig und riechen leicht käsig bis muffig. Die Zellen von LI-2 sind gramnegative Bakterien, die je nach Entwicklungsstadium Kokken oder Stäbchen ($0,3-0,5 \mu\text{m} \times 0,5-2,0 \mu\text{m}$) ausbilden, begeißelt sind und keine Sporen besitzen (Abb.: 5-19b). In seiner Entwicklung weist LI-2 einen Rod-Coccus-Zyklus auf.

Isolat LI-2 zeigt Wachstum von -6°C bis 28°C , kann aber nicht mehr bei 32°C wachsen. Das Temperaturoptimum liegt bei 16°C . Isolat LI-2 wächst innerhalb eines pH-Spektrums von pH 4,0 bis pH 9,5. Optimales Wachstum ist in einem breiten Bereich von pH 5,0 bis 8,0 möglich. Dabei wurde der Medium-pH-Wert durch die Aktivität der Mikroorganismen bei pH 4,5...6,0 auf pH 7,0...8,0 angehoben. Bei Salzkonzentrationen um 7,5 % NaCl zeigte LI-2 noch ein deutliches Wachstum mit einer $\text{OD} > 0,5$. Isolat LI-2 besitzt einen großen Salztoleranzbereich von 0 bis hin zu geringem Wachstum bei 10,0 % NaCl und wächst optimal ohne Salz bis hin zu einer Konzentration von 1,0 % Natriumchlorid.

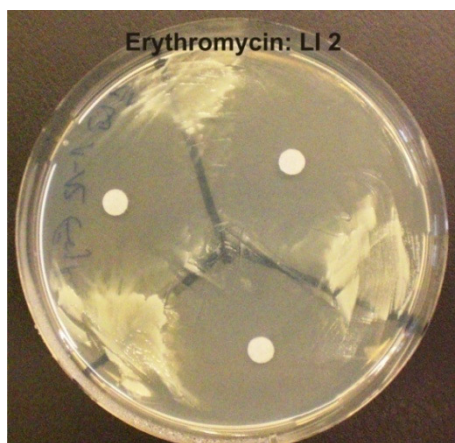


Abbildung 5-20: Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika, Beispiel: Erythromycin LI-2

Isolat LI-2 erwies sich gegenüber allen getesteten Antibiotika als empfindlich. Erythromycin (Abb.: 5-20) und Rifampicin lösten mit einem Hemmhofdurchmesser über 30 mm die größte Hemmung aus. Bei Neomycin und Kanamycin-Sulfat bildete sich nur ein kleiner (< 10 mm) Hemmhof aus, was darauf schließen lässt, dass die Bakterien dagegen nahezu resistent sind. Das gramnegative Bakterium LI-2 reagiert im Lysozym-Test negativ.

Von den 15 getesteten Zuckern und Zuckeralkoholen konnte Isolat LI-2 nur Glucose und Mannitol gut, Galactose und Saccharose geringfügig, unter Säurebildung verwerten. Lactose, Maltose, Adonitol, Arabinose, Dulcitol, Inositol, Rhamnose, Salicin, Sorbitol, Trehalose und Xylose wurden nicht unter Säurebildung abgebaut. Die Methylrot-Probe war negativ. Stärke wurde durch LI-2 nicht hydrolysiert (Amylase-negativ). Der Gelatinase-Tests war negativ, Casein konnte proteolytisch abgebaut werden (Protease schwach positiv). LI-2 ist nicht in der Lage Indol aus Tryptophan zu bilden, kann aber Schwefelwasserstoff aus schwefelhaltigen Aminosäuren herstellen und besitzt Urease-Aktivität. Im Katalase-Test zeigte LI-2 eine deutliche Schaumbildung. Der Oxidase-Test war negativ.

5.4.3 Beschreibung von LI-3

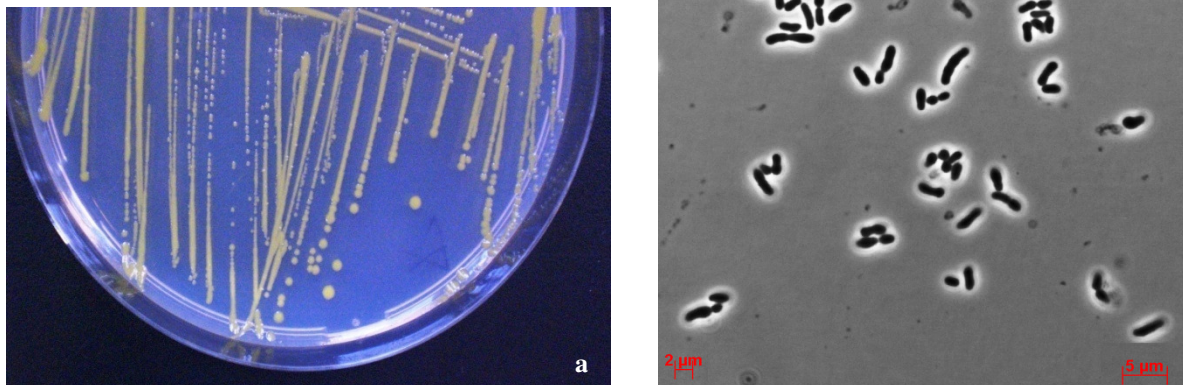


Abbildung 5-21: Morphologie von Isolat LI-3 (5-21a: Kolonien und Impfstrich; 5-21b: Zellform in der Phasen-Kontrast-Mikroskopie)

LI-3 (Abb.: 5-21a) zeichnet sich durch eine leuchtend gelbe Farbe aus, wobei die Kolonien nicht durchscheinend aber glänzend sind. Die Kolonien sind nach 7 bis 14 Tagen 0,5 mm bis 2,0 mm groß und riechen stark käsig. Der Rand der runden Kolonien ist glatt, das Profil erhaben und die Konsistenz feucht, flüssig bis schleimig. Bei Isolat LI-3 handelt es sich um gram-positive $0,4 \mu\text{m}$ bis $2,5 \mu\text{m}$ lange und $0,3 \mu\text{m}$ bis $0,5 \mu\text{m}$ breite, kurze stäbchenförmige Zellen, die begeißelt sind, aber keine Sporen bilden (Abb.: 5-21b).

LI-3 wächst in einem Temperaturspektrum von -6°C bis 24°C , das Temperaturoptimum liegt bei 16°C . Isolat LI-3 wächst in einem pH-Bereich von pH 4,0 bis pH 9,5 und besitzt ein Op-

timum bei pH 7,5 bis pH 9,0. Bei pH-Werten um pH 4,0...5,0 erfolgte eine Anpassung des Mediums durch die Mikroorganismen auf pH 6,0...7,0. Die abschließende Messung von Test pH 6,0 ergab eine pH-Wertanhebung auf pH 7,5...8,0. Für optimales Wachstum benötigt Isolat LI-3 eine Salzkonzentration von mindestens 0,5 % NaCl bis hin zu 3,0 %. Wachstum erfolgt in einem breiten Salzkonzentrationsbereich von 0 % bis maximal 10,0 % NaCl.

Gegenüber den getesteten Antibiotika bildet Isolat LI-3 keine Resistenzen aus. Bei Penicillin war eine starke Hemmung zu beobachten. Ampicillin, Neomycin, Erythromycin, Oxytetracyclin (Abb.: 5-22), Novobiocin und Rifampicin lösen ebenfalls eine deutliche Hemmung aus. Bei Streptomycin und Kanamycin-Sulfat bildete Isolat LI-3 nur einen kleinen Hemmhof (< 10 mm) aus. In Abbildung 5-22 ist zu erkennen, dass die Bakterien in einigen Fällen zwei Hemmhöfe ausbilden. Der äußere Durchmesser zeigt die generelle Hemmung, jedoch haben sich teilweise resistente Zellen gebildet die in einem näheren Umkreis zum Filterpapier wachsen können.

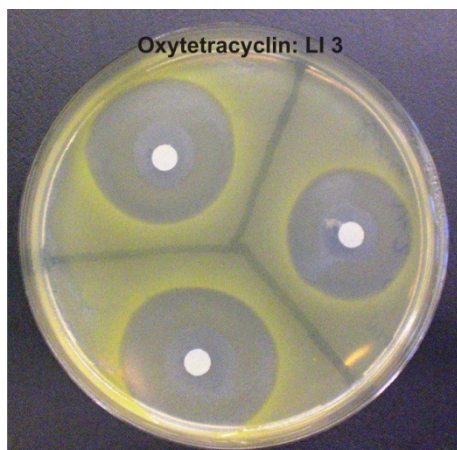


Abbildung 5-22: Empfindlichkeit von Isolat LI-3 gegenüber Oxytetracyclin, Beispiel: Ausbildung doppelter Hemmhöfe

Im Test mit Lysozym zeigte sich eine Hemmung mit einem Hemmhofdurchmesser unter 10 mm.

Von den getesteten Zuckern kann Isolat LI-3 nur Rhamnose unter schwacher Säurebildung umsetzen. Glucose, Galactose, Lactose, Maltose, Mannitol, Saccharose, Adonitol, Dulcitol, Inositol, Salicin, Sorbitol, Trehalose und Xylose werden nicht als Kohlenstoffquelle genutzt. Dem entsprechend war auch die Methylrot-Probe negativ. LI-3 ist Amylase-, Gelatinase- und Protease-negativ, kann aber auf den jeweiligen Medien wachsen. Indol- und Urease-Test waren ebenfalls negativ. H₂S-Bildung konnte beobachtet werden. LI-3 besitzt Katalase-, jedoch keine Oxidase-Aktivität.

5.4.4 Beschreibung von LI-4

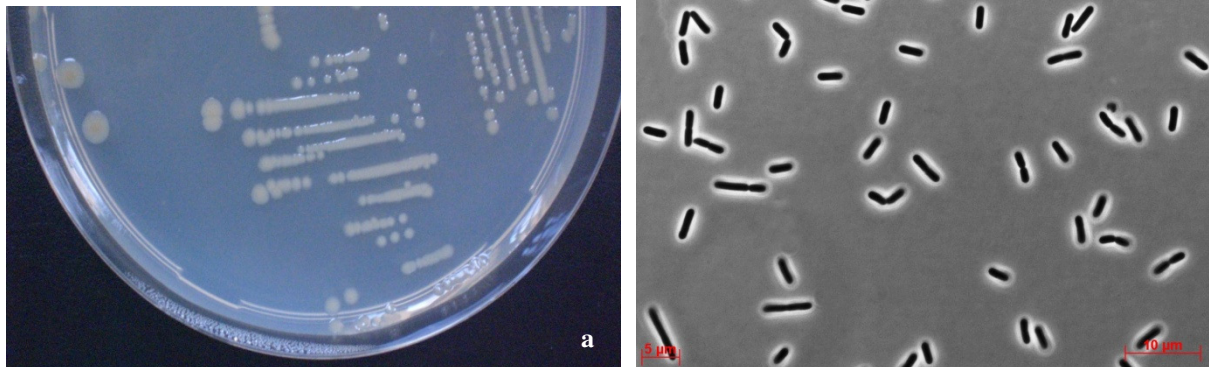


Abbildung 5-23: Morphologie von Isolat LI-4 (5-23a: Kolonien und Impfstrich; 5-23b: Zellform in der Phasen-Kontrast-Mikroskopie)

Die beige- bis ockerfarbenen Kolonien von LI-4 (Abb.: 5-23a) sind knopfförmig konvex mit einem glatten Rand. Die Kolonien, mit einem Durchmesser von 1,0...4,5 mm nach 7 bis 14 Tagen, riechen gestockt muffig bis säuerlich käsiger und sind leicht glänzend, butterartig schleimig. Bei LI-4 handelt es sich um grampositive 2,0 bis 10,0 µm lange und 0,5 bis 0,8 µm breite Stäbchen, die eindeutig begeißelt sind aber, zumindest unter normalen Wachstumsbedingungen, keine Sporen besitzen (Abb.: 5-23b).

Isolat LI-4 zeigt Wachstum in einem Bereich von 5°C bis 28°C, wobei das Temperaturoptimum für diesen Stamm bei 16°C liegt. Der Stamm wächst in einem relativ engen pH-Spektrum von pH 6,0 bis pH 8,5. Der optimale pH-Wert liegt bei 7,5. Dem entsprechend erfolgte auch die Anpassung des Mediums durch die mikrobielle Aktivität bei pH 6,0 auf pH 7,5 bis pH 8,0. Wachstum konnte bei Salzkonzentrationen zwischen 0 % und 6,0 % beobachtet werden, mit einem Optimum von 0 % bis 2,0 % NaCl.

Isolat LI-4 zeigt gegenüber den getesteten Antibiotika eine hohe Empfindlichkeit. Sowohl bei Ampicillin, als auch bei Rifampicin konnte eine maximale Hemmung festgestellt werden (Hemmung bis an den Petrischalenrand). Auch die anderen Antibiotika wie Penicillin, Kanamycin-Sulfat, Neomycin, Streptomycin, Erythromycin, Oxytetracyclin und Novobiocin führten zu einer Hemmhofausbildung (> 10 mm). Gegenüber Lysozym zeigt sich das Isolat empfindlich.

Im Test zur Zuckerverwertbarkeit wurden lediglich Glucose mit starker und Dulcitol mit schwacher Säurebildung umgesetzt. Die Methylrot-Probe mit Glucose war negativ. Die Kohlenhydrate Galactose, Lactose, Maltose, Mannitol, Saccharose, Adonitol, Arabinose, Inositol, Rhamnose, Salicin, Sorbitol, Trehalose und Xylose konnten nicht unter Säurebildung verwertet werden. Isolat LI-4 zeigt eine leichte proteolytische Aktivität im Abbau von Casein (leicht

Protease positiv), ist aber nicht in der Lage Gelatine oder Stärke zu hydrolisieren. Das Isolat besitzt die Fähigkeit H_2S aus schwefelhaltigen Eiweißverbindungen zu bilden und Harnstoff mit Urease-Aktivität zu spalten, kann aber kein Indol aus Tryptophan herstellen. LI-4 hat Katalase-Aktivität. Ein Typ der Cytochrom-c-Oxidase ist in der Zellwand nicht vorhanden.

5.4.5 Charakterisierung von SK-1

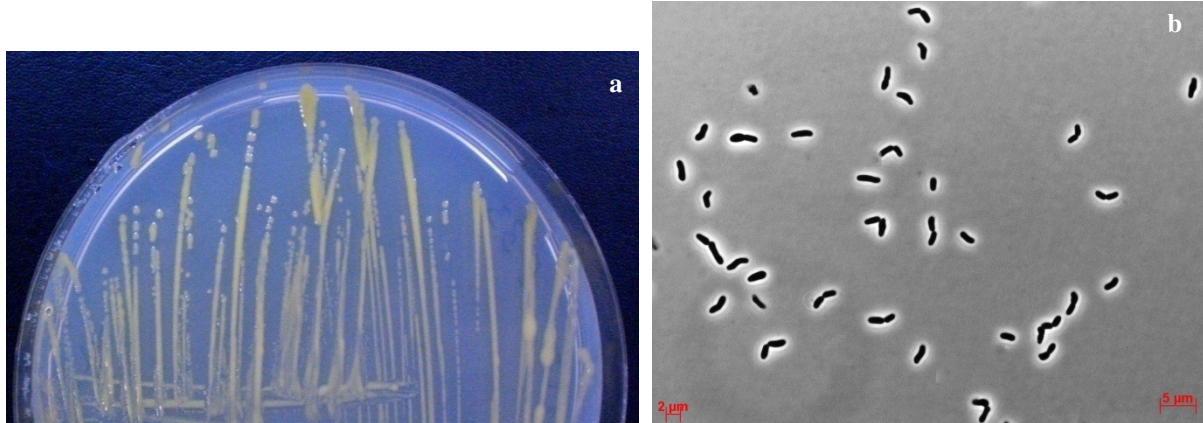


Abbildung 5-24: Morphologie von Isolat SK-1 (5-24a: Kolonien und Impfstrich; 5-24b: Zellform in der Phasen-Kontrast-Mikroskopie)

Das Isolat SK-1 (Abb.: 5-24a) bildet nach 7 bis 14 Tagen 0,5...1,5 mm kleine, runde Kolonien mit glattem Rand. Die leicht erhabenen Kolonien sind hellgelb, aber nicht durchscheinend, die Oberfläche ist eher matt als glänzend. Ein charakteristischer Geruch ist nicht wahrnehmbar und die Konsistenz erwies sich als zähschleimig bis klebrig. Bei SK-1 handelt es sich um grampositive 0,4 µm bis 2,0 µm lange, 0,2 µm bis 0,4 µm breite, kurze Stäbchen, die nach Färbung weder Geißeln noch Sporen aufweisen (Abb.: 5-24b).

Isolat SK-1 wächst in einem Temperaturbereich von $-6^{\circ}C$ bis $28^{\circ}C$ und hat sein Temperaturoptimum bei $20^{\circ}C$. In einem pH-Bereich von pH 5,0 bis pH 9,5 konnte Wachstum beobachtet werden. Das pH-Optimum für Isolat SK-1 befindet sich zwischen pH 6,5 und pH 7,5. Ist das Bakterium niedrigeren pH-Werten von pH 5,0 bis pH 6,0 ausgesetzt, kann es sich anpassen, indem der Umgebungs-pH-Wert auf pH 7,0...8,0 angehoben wird. Isolat SK-1 besitzt eine geringe Salztoleranz im Bereich von 0 % bis 3,0 % NaCl mit gutem Wachstum, bis 5,0 % NaCl mit geringem Wachstum und kann am Besten ohne Salz wachsen.

Gegenüber den Antibiotika Neomycin, Streptomycin, Oxytetracyclin, Novobiocin und Rifampicin ist Isolat SK-1 empfindlich, wobei Rifampicin eine starke Hemmung auslöst und Oxytetracyclin eine schwache Hemmung bewirkt. Resistent gegenüber Penicillin, Ampicillin, Kanamycin-Sulfat und Erythromycin bildet das Isolat keine Hemmhöfe aus.

Im Test mit Lysozym war eine Hemmung zu beobachten.

Isolat SK-1 ist in der Lage mehrere Zucker und Zuckeralkohole zu nutzen. Es werden Glucose, Galactose, Maltose, Mannitol, Saccharose, Salicin und Xylose unter Säurebildung umgesetzt. Die Methylrot-Probe war positiv. Lactose, Adonitol, Arabinose, Dulcitol, Inositol, Rhamnose, Sorbitol und Trehalose werden nicht verwertet. Amylase-, Gelatinase- und Protease-Aktivität konnten nicht festgestellt werden. Sowohl der Indol-, als auch der Urease-Test waren negativ. SK-1 bildet Schwefelwasserstoff aus schwefelhaltigen Eiweißverbindungen. Das Isolat besitzt Katalase-, jedoch keine Oxidase-Aktivität.

5.4.6 Charakterisierung von SK-2

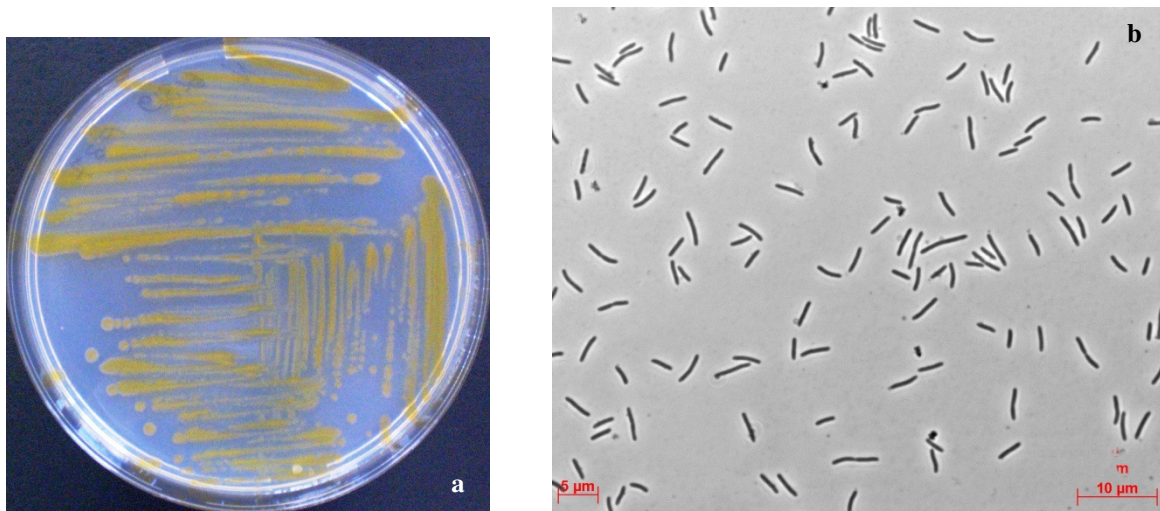


Abbildung 5-25: Morphologie von Isolat SK-2 (5-25a: Kolonien und Impfstrich; 5-25b: Zellform in der Phasen-Kontrast-Mikroskopie)

Die flachen, runden Kolonien des Isolates SK-2 (Abb.: 5-25a) sind nach 7 bis 14 d ca. 3,5 mm groß und durch eine durchscheinend gelb-orange Färbung, einer eher stumpfen Oberfläche, einen wimpernförmigen Rand, einen leicht süßlich käsigen Geruch und einer butterartig weichen, leicht klebrigen Konsistenz charakterisiert. Bei SK-2 handelt es sich um 0,2 µm bis 0,5 µm breite, 2,5 µm bis 8,0 µm lange, gramnegative Stäbchen, die laut Färbung durch Geißeln beweglich sind aber keine Endosporen besitzen (Abb.: 5-25b).

Isolat SK-2 wächst in einem Temperaturspektrum von 0°C bis 28°C mit einem Temperaturoptimum von 20°C. Bei pH-Werten im Bereich zwischen pH 4,5 und pH 9,0 kann Isolat SK-2 gut wachsen, wobei ein pH von 6,5 optimal ist. Ist SK-2 niedrigen pH-Werten (pH 5,0) ausgesetzt, passt es seine Umgebung an, indem es das Medium auf pH 6,0 anhebt. Bei pH 6,0 erfolgt eine Anpassung auf pH 7,0. SK-2 toleriert nur sehr geringe Salzkonzentrationen zwischen 0 % und 1,5 % NaCl, benötigt aber eine geringe Menge Salz (0,5 %) für das optimale Wachstum.

Im Test auf Wachstumshemmung erwies sich SK-2 gegenüber Lysozym als resistent. Eine Empfindlichkeit ist gegenüber Rifampicin und Novobiocin, in geringem Maße gegenüber Oxytetracyclin, vorhanden. Penicillin, Ampicillin, Kanamycin-Sulfat (Abb.: 5-26), Neomycin, Streptomycin und Erythromycin lösen keine Hemmung aus.

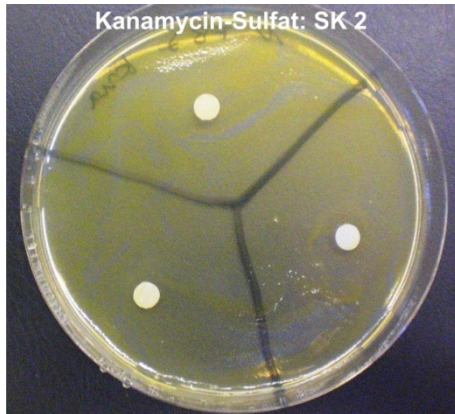


Abbildung 5-26: Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika, keine Hemmung durch Kanamycin-Sulfat

Glucose kann von SK-2 als einziger Zucker unter starker Säurebildung verwertet werden, wobei die pH-Absenkung aber nicht unter pH 4,4 erfolgt, d.h. die Methylrot-Probe war negativ. Galactose, Maltose, Saccharose, Salicin und Trehalose werden unter schwacher Säurebildung umgesetzt. Im Test mit Lactose, Mannitol, Adonitol, Arabinose, Inositol, Rhamnose, Dulcitol, Sorbitol und Xylose war keine Säurebildung durch SK-2 erkennbar. Stärke kann von Isolat SK-2 hydrolysiert und Casein abgebaut werden. Isolat SK-2 ist Gelatinase-, Urease, und Indol-negativ. Eine Bildung von H₂S erfolgt in geringem Maße. Im Gegensatz zu fast allen anderen getesteten Stämme weist SK-2 eine deutliche Oxidase-, jedoch keine Katalase-Aktivität auf.

5.4.7 Charakterisierung von SK-3

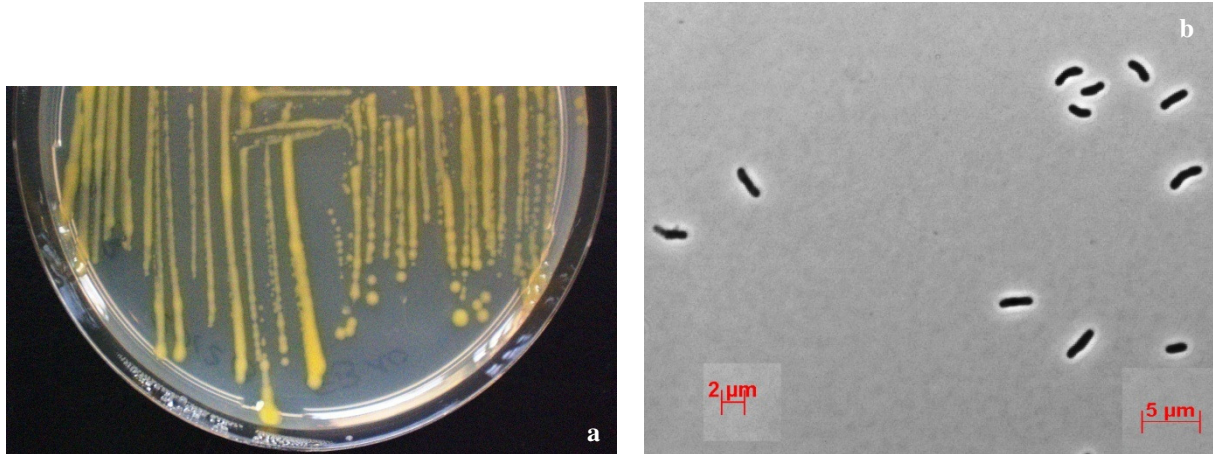


Abbildung 5-27: Morphologie von Isolat SK-3 (5-27a: Kolonien und Impfstrich; 5-27b: Zellform in der Phasen-Kontrast-Mikroskopie)

Die runden Kolonien von SK-3 (Abb.: 5-27a) sind nach 7 bis 14 Tagen zwischen 2,0 mm und 4,0 mm groß und weisen einen stark käsigen Geruch auf. Die Kolonien haben einen glatten Rand, sind leicht erhaben und fest bis zähklebrig in ihrer Konsistenz. Die Bakterien besitzen eine helle, sonnenblumengelbe Pigmentierung, wobei die Kolonien durchscheinend glänzend sind. Bei SK-3 handelt es sich um gramnegative, 2,0 µm bis 3,5 µm lange und 0,4 µm bis 0,6 µm breite Stäbchen, die laut Färbung Geißeln zur Fortbewegung, aber keine Sporen als Überdauerungsstadium ausbilden (Abb.: 5-27b).

Isolat SK-3 ist in der Lage in einem breiten Temperaturspektrum von -6°C bis 28°C zu wachsen. Das Temperaturoptimum liegt bei 16°C. Wachstum erfolgt in einem pH-Spektrum von pH 5,0 bis pH 9,0 mit einem Optimum bei pH 6,5 bis pH 7,5. Bei eingestellten pH-Werten von pH 5,0...6,0 im Medium war eine pH-Wert-Anpassung von pH 7,0...8,0 nachweisbar.

Der Salztoleranzbereich für Isolat SK-3 liegt zwischen 0 % und 4,0 % NaCl, optimales Wachstum wird bei Konzentrationen von 0 % bis 1,5 % NaCl erreicht.

Innerhalb der untersuchten Bakterienstämme von Store Koldewey weist SK-3 die höchste Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika auf. Eine deutliche Hemmung wird durch Penicillin, Ampicillin, Neomycin, Streptomycin, Erythromycin, Oxytetracyclin, Novobiocin und Rifampicin hervorgerufen. Gegenüber Kanamycin-Sulfat zeigt sich Isolat SK-3 resistent.

Durch Lysozym wird keine Hemmung ausgelöst.

Folgende Zucker und Zuckeralkohole werden von SK-3 unter Säurebildung verwertet: Glucose, Galactose, Maltose, Mannitol, Saccharose, Salicin, Trehalose und Xylose. Bei Lactose, Adonitol, Arabinose, Dulcitol, Inositol, Rhamnose und Sorbitol konnte keine Säurebildung nachgewiesen werden. SK-3 ist Methylrot-positiv. In den weiteren Tests zeigte SK-3 eine geringe biochemische Leistungsfähigkeit. Weder Gelatine, noch Stärke oder Casein werden

durch SK-3 abgebaut. Auch die Tests zur Indolbildung, Schwefelwasserstoffbildung und Harnstoffspaltung waren negativ. Isolat SK-3 ist Katalase-positiv und Oxidase-negativ.

5.4.8 Charakterisierung von SK-4

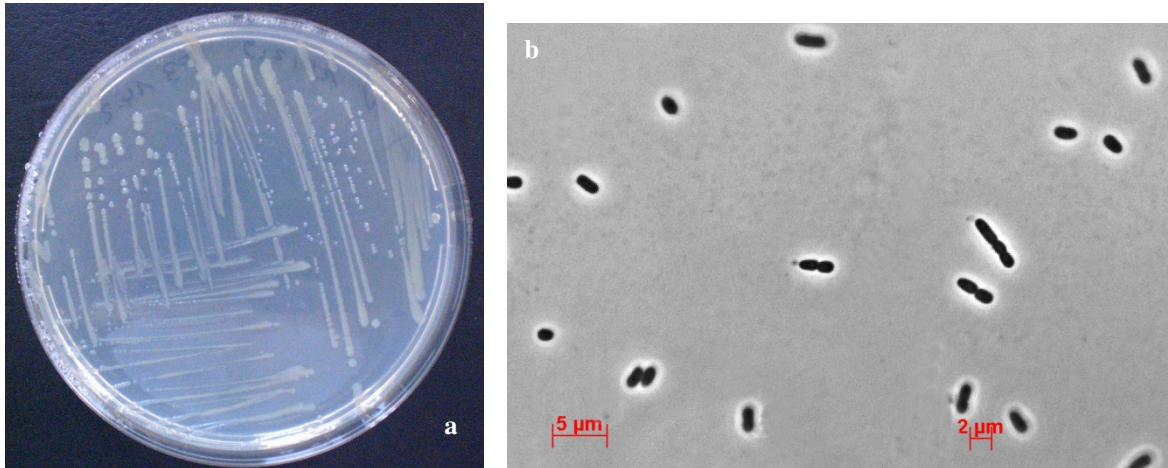


Abbildung 5-28: Morphologie von Isolat SK-4 (5-28a: Kolonien und Impfstrich; 5-28b: Zellform in der Phasen-Kontrast-Mikroskopie)

Die weiß-, beige- oder cremefarbig pigmentierten Bakterien SK-4 (Abb.: 5-28a) bilden runde Kolonien, die nach 7 bis 14 Tagen eine Größe von ca. 3,0 mm erreichen und einen wimpernförmigen Rand aufweisen. Des Weiteren sind sie charakterisiert durch einen säuerlich-käsigen Geruch, einem leicht erhabenen Profil und einer fest butterartigen, krisseligen Konsistenz. Bei SK-4 handelt es sich um gramnegative 0,8 bis 2,7 µm lange, 0,5 µm bis 0,8 µm breite Stäbchen, die laut Färbung weder Geißeln noch Sporen besitzen (Abb.: 5-28b).

Isolat SK-4 besitzt ein Temperaturspektrum von 5°C bis 28°C. Auch bei 32°C konnte ein sehr schwaches Wachstum registriert werden. Das Temperaturoptimum beträgt 24°C.

Eine Anpassung an ein sehr breites pH-Spektrum von pH 4,0 bis pH 11,0 wurde beobachtet. Das pH-Optimum von SK-4 liegt im leicht Sauren um pH 5,5 und pH 6,5. Bei allen pH-Werten wurde insgesamt ein sehr gutes Wachstum gemessen, realisiert über eine pH-Wert-Anpassung durch Isolat SK-4. Im Bereich pH 4,0...5,5 erfolgte eine pH-Wert-Erhöhung auf pH 6,0...7,0 und bei eingestellten pH-Werten von pH 9,0...11,0 wurde der pH-Wert auf pH 7,5...8,5 abgesenkt. SK-4 wächst optimal ohne Salz, kann aber Konzentrationen von bis zu 6,0 % NaCl tolerieren.

Isolat SK-4 zeigt nur eine geringe Empfindlichkeit gegenüber den getesteten Antibiotika. Kanamycin-Sulfat, Neomycin (Abb.: 5-29), Streptomycin und Oxytetracyclin lösen eine geringe Hemmung aus. Gegenüber Penicillin, Ampicillin, Erythromycin, Novobiocin und Rifampicin ist SK-4 resistent. Der Lysozym-Test erwies sich als negativ.

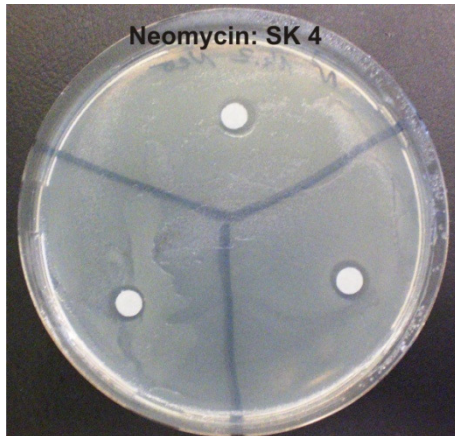


Abbildung 5-29: Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika: Neomycin bewirkt bei Isolat SK-4 sehr kleine Hemmhöfe.

Im Test zur Zuckerverwertbarkeit setzte SK-4 Glucose als einzigen Zucker unter starker Säurebildung um, wobei auch die Methylrot-Probe positiv war. Die anderen verwendeten Zucker und Zuckeralkohole führten zu einer verstärkten Blaufärbung des Indikators Bromthymolblau, was ein Hinweis auf Alkalisierung des Mediums darstellt. Daher wurde ein zweiter Zuckertest, diesmal mit dem basischen Indikator Phenolphthalein, durchgeführt, der bei allen Zuckern, außer Glucose, zu einem leicht positiven Testergebnis führte (Abb.: 5-30). Ein starker Indikatorumschlag, wie etwa beim Urease-Nachweis war hier nicht zu erwarten. Eine pH-Wertmessung mit Teststreifen ergab im Medium mit Glucose, bei weißlich-gelber Mediumfärbung (Indikator um pH 7,0 farblos), einen pH-Wert von pH 7,5. Bei den unterschiedlich rosa-gefärbten Proben 2 bis 15 lag ein pH um 8,5 vor. Ein Abbau des zuckerhaltigen Peptonwassers unter pH-Wert-Erhözung wurde für SK-4 nachgewiesen.



Abbildung 5-30: Zuckerverwertbarkeit SK 4 im Test mit Phenolphthalein

Zucker: 1) Glucose, 2) Galactose, 3) Lactose, 4) Maltose, 5) Mannitol, 6) Saccharose, 7) Adonitol, 8) Arabinose, 9) Dulcitol, 10) Inositol, 11) Rhamnose, 12) Salicin, 13) Sorbitol, 14) Trehalose, 15) Xylose

6. Diskussion

6.1 Isolation von Reinkulturen

Die Isolierung von Reinkulturen aus extremen Habitaten, wie der Arktis oder der Antarktis, gilt als schwierig (WAGNER *et al.*, 2006). Die mikrobielle Gemeinschaft ist insgesamt wenig erforscht und erst ca. 1 % der Mikroorganismen kultiviert (TORSVIK *et al.*, 2002). Aus diesem Grund war ein Ziel dieser Arbeit, Anreicherungskulturen aus Bodenproben von Store Kolde- wey (Nordost-Grönland) und Livingston Island (Antarktische Inseln) zu gewinnen und daraus Reinkulturen zu isolieren. Ein wichtiger Faktor ist die extreme Kälte, die an den Standorten vorherrscht. In Nordost-Grönland liegen die Temperaturen auch im Sommer im Durchschnitt nur um 4°C (BORN & BÖCHER, 2001). Im antarktischen Sommer (November bis März) auf Livingston Island werden ebenfalls nur Temperaturen um 0°C, selten bis zu 10°C erreicht (TORO *et al.*, 2007). Die Anreicherung erfolgte daher angepasst an die Bedingungen der Ha- bitate bei niedrigen Temperaturen von 10°C mit einem Nährstoff reduzierten Medium, da es sich um Standorte mit relativ geringem Kohlenstoffgehalt handelt (Tab.: 4-1). Da die Anrei- cherung in einer sauerstoffhaltigen Atmosphäre erfolgte, konnten nur aerobe oder fakultativ anaerobe Mikroorganismen isoliert werden.

Für die genauere taxonomische Einordnung von Prokaryoten ist heutzutage ein polyphasi- scher Ansatz notwendig (VANDAMME *et al.*, 1996). Die Klassifikation von Mikroorganismen erfordert zwei verschiedene Herangehensweisen (ROSELLÓ-MORA & AMANN, 2001). Einer- seits sollte der Genotyp charakterisiert werden, beispielsweise direkt über DNA-Sequenzie- rung oder indirekt durch DNA-DNA-Hybridisierung und G+C mol%-Bestimmung. Anderer- seits ist es erforderlich, den im Habitat ausgeprägten Phänotyp morphologisch, physiologisch- ökologisch und biochemisch zu beschreiben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der phänotypische Ansatz bearbeitet, indem zelluläre Eigenschaften, wie Form, Größe, Sporen- bildung oder Zellwandaufbau ermittelt, und die Koloniemorphologien beschrieben wurden. Außerdem wurden die Isolate hinsichtlich ihrer physiologisch-ökologischen und bioche- mischen Eigenschaften, wie Temperatur, pH-Wert, Salztoleranz, Verhalten gegenüber Sauers- toff, Enzymausstattung und Stoffwechsel, charakterisiert. Problematisch gestaltet sich die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der vielen verschiedenen Methoden (VANDAMME *et al.*, 1996). Die Auswahl der Tests und die Interpretation der Daten bestimmt die Charakteri- sierung der Mikroorganismen und ihre taxonomische Einordnung. Außerdem können Phäno- typen unterschiedlich ausgeprägt sein, da die Genexpression direkt mit den jeweils vorherr-

schenden Umweltbedingungen assoziiert ist. Als genomische Information diente der Vergleich der 16S rRNA-Gensequenzen. Nach STACKEBRANDT & GOEBEL (1994) bildet eine 97%ige Ähnlichkeit der 16S rRNA-Sequenzen die Spezies-Grenze. Ein Problem dabei ist, dass es auf dem Spezies-Level nur eine geringe Auflösung innerhalb der 16S rRNA gibt, das heißt, es existieren verschiedene Arten mit (nahezu) identischer 16S rRNA-Sequenz (FOX *et al.*, 1992; MARTINEZ-MURCIA *et al.*, 1992). An Hand der vorliegenden Ergebnisse sollte, basierend auf diesen Grundlagen, der Versuch unternommen werden, die ausgewählten Isolate phylogenetisch einzuordnen und eine Klassifizierung vorzuschlagen.

6.2 Verwandtschaftsvergleich der untersuchten Bakterienstämme

Isolat LI-1 von Livingston Island gehört zusammen mit SK-1 und SK-3 von Store Koldewey innerhalb des Phylums der *Actinobacteria* zur Familie der *Microbacteriaceae*. Obwohl LI-1 eine relativ hohe Sequenzähnlichkeit zu *Microterricola viridarii* (98,2 %) und *Leifsonia pindariensis* (98,1 %) aufweist, existieren neben verschiedenen Gemeinsamkeiten auch einige Unterschiede zu diesen nächsten Verwandten des Isolates. Morphologisch sind sich die drei Stämme durchaus ähnlich. Es handelt sich bei allen drei Stämmen um kurze, unregelmäßige Stäbchen, die beweglich sind, was bei LI-1 und *Microterricola viridarii* (MATSUMOTO *et al.*, 2008) durch Geißeln realisiert ist. Sowohl LI-1 als auch *Leifsonia pindariensis* besitzen keine Sporen (REDDY *et al.*, 2008). Die Koloniefarben der Stämme variieren leicht zwischen verschiedenen Gelbtönen. Der Hauptunterschied der Morphologie liegt in der GRAM-Färbung. Im Gegensatz zu Isolat LI-1, welches sich sowohl in der GRAM-Färbung als auch im Lysozym-Test als gramnegativ erwies, sind *Microterricola viridarii* und *Leifsonia pindariensis* grampositiv. Bei der Betrachtung der physiologisch-ökologischen Eigenschaften fällt auf, dass sich vor allem das Temperaturspektrum der drei Stämme unterscheidet. LI-1 hat ein Temperaturspektrum von -6°C bis 28°C, während *Leifsonia pindariensis* (4°C-35°C) und *Microterricola viridarii* (10°C-38°C) nur im positiven Temperaturbereich Wachstum zeigen. Während das Temperaturoptimum bei *Microterricola viridarii* zwischen 15°C und 30°C liegt, kann LI-1 bei Temperaturen über 28°C nicht mehr wachsen und besitzt ein Optimum bei 16°C. Auch die Fähigkeit bei verschiedenen pH-Werten zu wachsen unterscheidet sich leicht zwischen LI-1 (pH 4,5-9,5) und *Microterricola viridarii* (pH 6,0-11,0). Alle drei Stämme sind aerob. Die biochemische Leistungsfähigkeit der drei Stämme lässt sich nur eingeschränkt vergleichen, da unterschiedliche Methoden zur Charakterisierung benutzt wurden, ein Problem der phänotypischen Charakterisierung (ROSELLÓ-MORA & AMANN, 2001). REDDY *et al.* (2008) haben

bei der Zuckerverwertbarkeit den Schwerpunkt auf die Nutzung der Zucker und Zuckeralkohole als alleinige Kohlenstoffquelle gelegt, an der Stelle ist kein Vergleich möglich. *Leifsonia pindariensis* baut nach MATSUMOTO *et al.* (2008) vorrangig andere Zucker unter Säurebildung ab als LI-1. LI-1 verwertet Glucose und Galactose gut, Saccharose und Salicin schwach, während *Leifsonia pindariensis* diese Zucker nicht, dafür aber Maltose, nutzen kann. Die Methylrot-Probe war bei LI-1 schwach positiv, bei *Leifsonia pindariensis* negativ. Amylase wird von LI-1 produziert. Die beiden nächsten Verwandten können Stärke nicht hydrolisieren. Alle drei Stämme produzieren Katalase. Innerhalb der getesteten Antibiotika erwiesen sich die drei Stämme gegenüber (Oxy-)Tetracyclin und Kanamycin(-Sulfat) resistent. Penicillin G, Streptomycin, Novobiocin und Rifampicin induzierten bei LI-1 und *Leifsonia pindariensis* eine Hemmung, wurden bei *Microterricola viridarii* nicht getestet. Unterschiedlich ist die Empfindlichkeit gegenüber Ampicillin und Erythromycin, die bei den nächsten Verwandten von LI-1 eine Hemmung auslösen, bei dem Isolat selbst nicht.

Trotz der hohen Sequenzübereinstimmung von über 98 % und einer morphologischen Ähnlichkeit, unterscheidet sich Isolat LI-1 in vielen physiologisch-biochemischen Eigenschaften eindeutig von *Microterricola viridarii* und *Leifsonia pindariensis*. Vor allem das stark unterschiedliche Temperaturspektrum von *Microterricola viridarii* spricht dagegen, dass der Stamm zusammen mit LI-1 zu einer Art gehört. Die Ähnlichkeit zu *Leifsonia pindariensis* ist unter diesem Aspekt etwas höher, da der Stamm auch aus einem Niedrigtemperatur-Habitat, einem Himalaya-Gletscher, isoliert wurde. Höchstwahrscheinlich handelt es sich bei LI-1 um eine neue Art in der Familie der *Mircrobacteriaceae*, zur genaueren taxonomischen Einordnung sind aber weitere Test notwendig (siehe Ausblick).

Auch aus den arktischen Bodenproben konnten mit SK-1 und SK-3 Vertreter der *Mircrobacteriaceae* isoliert werden. SK-1 und *Cryobacterium psychrotolerans* befinden sich mit 97,5 % Sequenzähnlichkeit laut STACHEBRANDT & GOEBEL (1994) knapp innerhalb einer Artgrenze. Sowohl zu *Salinibacterium xinjiangense* (96,7 %) als auch zu *Frigoribacterium faeni* (96,6 %) weist Isolat SK-1 eine geringere Sequenzübereinstimmung als die der vorgeschlagene 97 % auf, und würde daher an Hand der 16S rRNA-Analytik nicht mehr zu diesen Spezies gehören. Die phänotypische Analyse ergab viele Gemeinsamkeiten, aber auch einige Unterschiede zwischen den verwandten Stämmen. Morphologisch betrachtet weisen die vier Stämme einige Gemeinsamkeiten auf. Es handelt sich bei allen um grampositive kurze (SK-1) bis unregelmäßig geformte Stäbchen von ähnlicher Größe, wobei SK-1, *Salinibacterium*

xinjiangense (ZHANG *et al.*, 2008) und *Frigoribacterium faeni* (KÄMPFER *et al.*, 2000) keine Sporen bilden. SK-1 zeigt im Vergleich zu *Cryobacterium psychrotolerans* (ZHANG *et al.*, 2007), *Salinibacterium xinjiangense* und *Frigoribacterium faeni* eine große Ähnlichkeit in der Koloniemorphologie. Die vier verwandten Stämme bilden gelbe, runde, konvexe Kolonien mit einem geschlossenen Rand aus. Das Temperaturspektrum liegt bei SK-1 (-6°C-28°C), *Cryobacterium psychrotolerans* (4°C-27°C), *Salinibacterium xinjiangense* (4°C-23°C) und *Frigoribacterium faeni* (-2°C-25°C) im psychrotoleranten bis psychrophilen Bereich. Auffällig ist, dass die vier Stämme schon ab Temperaturen über 28°C nicht mehr wachsen können und Isolat SK-1 und *Frigoribacterium faeni* auch im negativen Temperaturbereich moderates Wachstum aufweisen. *Frigoribacterium faeni* besitzt ein niedriges Temperaturoptimum zwischen 4°C und 10°C, dagegen liegen das Optimum von SK-1 und das der anderen nah verwandten Stämme um 20°C. Sowie das pH-Spektrum als auch das pH-Optimum von SK-1 (pH 5,0-9,5/ pH 6,5-7,5) ist im Vergleich zu *Cryobacterium psychrotolerans* (pH 5,0-10,0/ pH 6,0-7,0) und *Salinibacterium xinjiangense* (pH 5,0-9,0/ pH 6,0-8,0) sehr ähnlich. Physiologische Unterschiede gibt es in der Salztoleranz. Während SK-1 und *Cryobacterium psychrotolerans* 0 % bis maximal 5 % bzw. 4 % NaCl tolerieren, wächst *Salinibacterium xinjiangense* bei Salzkonzentrationen bis zu 14 %. SK-1 und die drei nächsten Verwandten wachsen aerob. Deutliche Unterschiede zwischen SK-1 und *Frigoribacterium faeni* treten hinsichtlich der Zuckerverwertbarkeit unter Säurebildung auf. SK-1 kann mit Glucose, Galactose, Maltose, Mannitol, Saccharose, Salicin und Xylose wesentlich mehr Zucker oder Zuckeralkohole verwerten, als *Frigoribacterium faeni*, welches nur Glucose und Adonitol schwach umsetzt. Glucose und Galactose werden auch von *Salinibacterium xinjiangense* genutzt. SK-1 und *Cryobacterium psychrotolerans* sind in der Lage Glucose, Maltose und Xylose zu verwerten, Galactose und Saccharose können nur von SK-1, Arabinose dagegen nur von *Cryobacterium psychrotolerans* unter Säurebildung abgebaut werden. Gemeinsamkeiten in der biochemischen Leistungsfähigkeit aller vier Stämme existieren in der Bildung von Katalase und dem Nichtvorhandensein einer Cytochrom-c-Oxidase. Gelatinase-, Indol- und Urease-Test waren sowohl bei SK-1 als auch bei *Cryobacterium psychrotolerans* und *Salinibacterium xinjiangense* negativ. Im Gegensatz zu den beiden letztgenannten Stämmen ist Isolat SK-1 nicht dazu in der Lage Stärke zu hydrolisieren. *Cryobacterium psychrotolerans* kann außerdem Casein proteolytisch abbauen, SK-1 und *Salinibacterium xinjiangense* dagegen nicht.

Die vorhandenen Unterschiede in der phänotypischen Charakterisierung bestätigen das Ergebnis der 16S rRNA-Analyse. Im Vergleich von SK-1 zu *Frigoribacterium faeni* sprechen, sowohl die geringen Sequenzübereinstimmung (96,6 %), als auch das abweichende Temperaturoptimum und die Unterschiede in der Zuckerverwertung dagegen, dass die beiden Stämme zu einer Art gehören. Der sehr deutliche Unterschied in der Salztoleranz und eine Sequenzähnlichkeit unter 97 % deuten auch bei SK-1 und *Salinibacterium xinjiangense* auf zwei verschiedene Arten hin. Obwohl die 16S rRNA-Sequenz zwischen SK-1 und *Cryobacterium psychrotolerans* über 97 % liegt, weisen beide Stämme Unterschiede in der Zuckerverwertbarkeit und in der biochemischen Leistungsfähigkeit auf. Daher handelt es sich bei Isolat SK-1, unter Vorbehalt weiterer Tests, wahrscheinlich um eine neue Spezies und vielleicht auch um eine neue Gattung in der Familie der *Microbacteriaceae*.

Bei Isolat SK-3 von Store Koldewey handelt es sich um einen weiteren Vertreter aus der Familie der *Microbacteriaceae*. Die Reinkultur weist eine sehr hohe Sequenzübereinstimmung zu *Agreia pratensis* (99,8 %) und *Agreia bicolorata* (99,6 %) auf, aber gerade diese beiden Stämme sind ein gutes Beispiel dafür, dass auch Reinkulturen mit einer hohen Sequenzähnlichkeit von über 97 % zu unterschiedlichen Arten gehören können. Obwohl die Sequenzübereinstimmung von *Agreia pratensis* und *Agreia bicolorata* 99,6 % beträgt, bilden die Stämme auf Grund ihrer unterschiedlichen anderen Eigenschaften jeweils eine eigene Spezies. *Agreia pratensis* ist identisch mit *Subtercola pratensis*, welcher 2003 von SCHUMANN *et al.* zum *Agreia*-Genus reklassifiziert wurde. Als Zellform bilden alle drei Vertreter unregelmäßige, sporenlose Stäbchen aus. Hinsichtlich der Zellgröße findet man eine Ähnlichkeit zwischen SK-3 (0,4-0,6 µm × 2,0-3,5 µm) und *Agreia bicolorata* (0,4-0,5 µm × 1,2-2,5 µm; EVTUSHENKO *et al.*, 2001). Die Koloniemorphologie von SK-3 und *Agreia pratensis* ist nahezu identisch. Beide Stämme bilden ganzrandige, runde, glänzend gelbe Kolonien, die in ihrem Profil leicht erhaben sind. Die Kolonien von *Agreia bicolorata* dagegen sind, wie der Name schon sagt, zweifarbig von gelb-orange bis braun-orange ausgeprägt und in ihrer Konsistenz eher halbflüssig bis flüssig, anstatt klebrig bis zähschleimig, wie SK-3. Laut GRAM-Färbung und Lysozym-Test gehört SK-3 zu den gramnegativen Bakterien. Die beiden *Agreia*-Vertreter werden den grampositiven Bakterien zugeordnet. Neben der Koloniemorphologie unterscheidet sich SK-3 auch physiologisch von *Agreia bicolorata*. *Agreia bicolorata* ist mit einem Temperaturoptimum um 25°C und Wachstum bis 37°C mesophil, während die psychrophilen Vertreter SK-3 (bis -6°C) und *Agreia pratensis* (bis -2°C) auch bei Temperaturen unter dem Gefrierpunkt wachsen. Das Temperaturoptimum von SK-3 liegt mit 16°C deutlich unter dem

von *Agreia pratensis* (21-25°C). Alle drei Stämme sind obligat aerob. In der biochemischen Charakterisierung weisen SK-3 und *Agreia pratensis* viele Gemeinsamkeiten auf, während zu *Agreia bicolorata* mehrere Unterschiede deutlich werden. Sowohl SK-3 als auch *Agreia pratensis* können Glucose, Galactose, Mannitol, Trehalose und Xylose unter Säurebildung verwerten, die Zuckeralkohole Adonitol und Sorbitol werden nicht abgebaut. Einen Unterschied stellt die Nutzung von Rhamnose und Arabinose durch *Agreia pratensis* dar. Beide Stämme sind Amylase-, Gelatinase-, Protease- und Oxidase-negativ und Katalase positiv. Katalase kann auch von *Agreia bicolorata* produziert werden, Unterschiede treten im Test auf Bildung von Schwefelwasserstoff, beim Oxidase-Test und in der Methylrot-Probe auf. SK-3 ist H₂S- und Oxidase-negativ und Methylrot-positiv, *Agreia bicolorata* dagegen H₂S- und Oxidase-positiv und Methylrot-negativ. SK-3 und *Agreia bicolorata* sind gegenüber Penicillin, Ampicillin, (Oxy-)Tetracyclin und Rifampicin empfindlich. Gegenüber Neomycin und Streptomycin ist *Agreia bicolorata* resistent, SK-3 empfindlich.

Trotz der hohen Sequenzübereinstimmung von SK-3 zu *Agreia bicolorata* (99,6 %) unterscheiden sich die Stämme eindeutig hinsichtlich ihrer Koloniemorphologie, im Temperaturspektrum und in der biochemischen Leistungsfähigkeit und können daher nicht einer Art zugeordnet werden. Die morphologische, physiologische und biochemische Charakteristik von SK-3 und *Agreia pratensis* weisen überwiegend Gemeinsamkeiten auf. Unterschiede werden in der physiologischen Charakteristik hinsichtlich des Temperaturspektrums und des Temperaturoptimums deutlich. Die hohe Ähnlichkeit in der genotypischen (Sequenzübereinstimmung von 99,8 %) und phänotypischen Charakterisierung deuten darauf hin, dass die Stämme *Agreia pratensis* und SK-3 zu einer Gattung gehören. Auf Grund des unterschiedlichen Temperaturoptimums könnte es sich bei Isolat SK-3 um eine neue Art im Genus *Agreia* oder zumindest um einen neuen Stamm dieser Art handeln. Für eine endgültige Klassifizierung von SK-3 sind auch hier weitere Tests notwendig.

Zu den *Actinobacteria* zählen auch die Isolate LI-2 und LI-3, die innerhalb der Familie der *Micrococcaceae* dem Genus *Arthrobacter* zugeordnet sind. Isolat LI-2 weist eine Sequenzübereinstimmung von 97,8 % zu *Arthrobacter psychrolactophilus* und von 97,7 % zu *Arthrobacter stackebrandtii* auf. Obwohl eine Artzugehörigkeit bei über 97 % Sequenzähnlichkeit (STACKEBRANDT & GOEBEL, 1994) wahrscheinlich ist, wurden deutliche Unterschiede im Phänotyp festgestellt, was in den Umweltbedingungen der unterschiedlichen Standorte begründet sein kann. Während LI-2 aus antarktischem Permafrostboden isoliert wurde, stammt *Arthrobacter psychrolactophilus* (LOVELAND-CURTZE *et al.*, 1999) aus Farmland-

Boden und *Arthrobacter stackebrandtii* (TVRZOVÁ *et al.*, 2005) aus Geflügelabfall. In der Zellmorphologie unterscheidet sich LI-2 von seinen nächsten Verwandten. LI-2 erwies sich in der GRAM-Färbung und im Lysozym-Test als gramnegativ und besitzt Geißeln zur Fortbewegung, die *Arthrobacter*-Vertreter sind grampositiv und nicht beweglich. Die Zellen von LI-2 (0,3-0,5 µm × 0,5-2,0 µm), *Arthrobacter psychrolactophilus* (0,5-1,4 µm) und *Arthrobacter stackebrandtii* (0,6-1,0 µm × 1,0-3,0 µm) bilden einen Rod-Coccus-Zyklus aus und variieren daher, abhängig vom Entwicklungsstadium, hinsichtlich Zellgröße und -form. Sporen werden von keinen der Stämme gebildet. Die Temperaturspektren von LI-2 (-6°C-28°C), *Arthrobacter psychrolactophilus* (0°C-30°C) und *A. stackebrandtii* (4°C-30°C) unterscheiden sich. Weitere physiologische Unterschiede werden zwischen LI-2 und *A. stackebrandtii* in Bezug auf pH-Wert und Salztoleranz deutlich. LI-2 ist in der Lage in einem pH-Bereich von pH 4,0 bis pH 9,5 und bei Salzkonzentrationen von 0 % bis 10 % NaCl zu wachsen. *A. stackebrandtii* wächst in einem etwas engeren pH-Spektrum von pH 5,7-9,1 und kann nur Salzkonzentrationen bis 5 % NaCl tolerieren. Während *A. psychrolactophilus* und *A. stackebrandtii* obligat aerob sind, wächst LI-2 zwar bevorzugt mit Sauerstoff, kann aber auch fakultativ anaerob ohne Sauerstoff überleben. *A. psychrolactophilus* kann im Gegensatz zu LI-2 keine Säure aus Glucose bilden, nutzt aber Lactose als alleinige Kohlenstoffquelle. Lactose wird von LI-2, hinsichtlich der Säurebildung, nicht verwertet. LI-2 baut Glucose, Galactose, Mannitol und Saccharose unter Säurebildung ab, *A. stackebrandtii* ist dazu nicht in der Lage. Bis auf die Fähigkeit zur Bildung von Katalase, die alle drei Stämme auszeichnet, treten in der biochemischen Charakteristik deutliche Unterschiede auf. LI-2 kann weder Stärke hydrolisieren noch Gelatine abbauen, *A. psychrolactophilus* und *A. stackebrandtii* sind in diesen Tests positiv. LI-2 und *A. stackebrandtii* sind Urease-positiv und Oxidase-negativ. *A. psychrolactophilus* kann Harnstoff nicht spalten.

Vor allem die Unterschiede in der biochemischen Leistungsfähigkeit sprechen dafür, dass Isolat LI-2 weder *Arthrobacter psychrolactophilus*, noch *Arthrobacter stackebrandtii* zugeordnet werden kann, sondern eine eigene Spezies bildet. Für *A. psychrolactophilus* ist die Verwertbarkeit von Lactose eine bestimmende Charaktereigenschaft, die bei LI-2 nicht gegeben ist. Zwischen LI-2 und *A. stackebrandtii* existieren außerdem physiologische Diskrepanzen hinsichtlich der Salztoleranz und der pH-Verträglichkeit, die den Vorschlag von LI-2 als neue Art bekräftigen.

Die Sequenzübereinstimmung von LI-3 zu *Arthrobacter kerguelensis* und zu *Arthrobacter psychrophenicus* beträgt 97,6 %, wonach auch diese Reinkultur von Livingston Island zur

Familie der *Micrococcaceae* gehört und dem Genus *Arthrobacter* zugeordnet sein könnte. Sowie *Arthrobacter kerguelensis* (GUPTA *et al.*, 2004), isoliert aus Seewasser von den Kerguelen Islands (Sub-Antarktis), als auch *Arthrobacter psychrophenicus* (MARGESIN *et al.*, 2004), aus einer alpinen Eishöhle (Österreich), stammen aus extremen Niedrigtemperaturhabitaten. Zellmorphologisch betrachtet handelt es sich bei allen drei Stämmen um sporenlose, grampositive, unregelmäßige kurze Stäbchen, wobei *A. kerguelensis* und *Arthrobacter psychrophenicus* einen Rod-Coccus-Zyklus aufweisen. Isolat LI-3 und *Arthrobacter psychrophenicus* bilden runde, ganzrandige, konvexe, glänzend gelbe Kolonien aus. Auch die Kolonien von *A. kerguelensis* sind gelb. Isolat LI-3 (-6°C-24°C), *A. psychrophenicus* (1°C-25°C) und *Arthrobacter kerguelensis* (4°C-30°C) unterscheiden sich in ihrem Temperaturspektrum, wobei LI-3 auch deutliches Wachstum bei Temperaturen unter 0°C aufweist. Auch die Temperaturoptima von *Arthrobacter kerguelensis* (22°C) und LI-3 (16°C) sind verschieden. Im Salztoleranzverhalten werden Unterschiede zwischen den drei Stämmen deutlich. Während LI-3 bis zu 10 % NaCl toleriert, wachsen *A. kerguelensis* (6 % NaCl) und *A. psychrophenicus* (1-3 % NaCl) bei deutlich geringeren Salzkonzentrationen. Alle drei Stämme wachsen bevorzugt aerob, wobei LI-3 auch fakultativ anaerobes Wachstum zeigt. In Hinblick auf die Zuckerverwertbarkeit lassen sich nur LI-3 und *A. kerguelensis* vergleichen. Glucose, Galactose, Lactose, Mannitol und Saccharose werden von beiden Stämmen nicht abgebaut. LI-3 verwertet Rhamnose in geringem Maße, *A. kerguelensis* nicht. Mit der Nutzung von Xylose verhält es sich entgegengesetzt. Die drei Stämme sind Indol-negativ und Katalase-positiv. Im weiteren biochemischen Vergleich sind sowohl LI-3 als auch *A. kerguelensis* Amylase- und Methylrot-negativ. Unterschiede existieren in der Gelatinase-, Protease-, Urease- und Oxidase-Aktivität. LI-3 zeigte sich in diesen Tests negativ, *A. kerguelensis* dagegen produziert diese Enzyme. *A. psychrophenicus* ist, genau wie LI-3, Gelatinase- und Oxidase-negativ, kann aber im Gegensatz zu LI-3 kein Schwefelwasserstoff aus schwefelhaltigen Eiweißverbindungen herstellen. Gegenüber den Antibiotika Ampicillin und (Oxy-)Tetracyclin sind alle drei Stämme empfindlich. LI-3 und *A. kerguelensis* werden außerdem durch Penicillin, Kanamycin(-Sulfat), Streptomycin und Erythromycin gehemmt. Hinsichtlich der Antibiotika-Empfindlichkeit und der Zellmorphologie sind sich LI-3 und *Arthrobacter kerguelensis* durchaus ähnlich, vergleicht man dagegen physiologische Eigenschaften, wie Temperaturspektrum und Salztoleranz oder die biochemische Leistungsfähigkeit, werden viele Unterschiede deutlich. Trotz der Sequenzübereinstimmung von über 97 % sprechen diese Unterschiede dafür, dass LI-3 und *Arthrobacter kerguelensis* nicht zu einer Art gehören. LI-3 und *Arthrobacter psychrophenicus* ähneln sich in ihrer Zell- und Kolonie-

morphologie und mehreren biochemischen Eigenschaften. Der Hauptunterschied liegt in der Salztoleranz und im Wachstum im Minus-Temperaturbereich. Es ist durchaus möglich, dass es sich bei LI-3 um eine neue Art in der Familie der *Micrococcaceae* handelt. Um Isolat LI-3 einer eigenen neuen Spezies zu zuordnen, sind weitere Tests erforderlich.

Isolat LI-4 besitzt eine hohe Sequenzübereinstimmung zu *Sporosarcina globispora* (98,8 %) und *Filibacter limicola* (98,7 %) und wird demnach der Familie der *Planococcaceae* in dem Phylum *Firmicutes* zugeordnet. *Sporosarcina globispora* wurde ursprünglich als *Bacillus globisporus* beschrieben (LARKIN & STOKES, 1967) und von YOON *et al.* (2001) in dem neuen Genus *Sporosarcina* reklassifiziert. Während sich LI-4 und *Sporosarcina globispora* (LARKIN & STOKES, 1967) morphologisch ähneln, weist LI-4 zu *Filibacter limicola* (MAIDEN & JONES, 1984) in dieser Hinsicht Unterschiede auf. Die Zellen von *Filibacter limicola* sind (1,1 µm × 3-30 µm) filamentös. Isolat LI-4 (0,5-0,8 µm × 2,0-10,0 µm) und *Sporosarcina globispora* (0,8-1,1 µm × 1,3-6,4 µm) bilden kleinere stäbchenförmige Zellen aus. Sowohl LI-4 als auch *Sporosarcina globispora* sind grampositiv (letzterer auch gramvariabel) und besitzen Geißeln zur Fortbewegung, *Filibacter limicola* ist unbegeißelt und gramnegativ. Von den drei Stämmen bildet nur *Sporosarcina globispora* bei Temperaturen um 0°C Sporen aus. Bei LI-4 konnte unter normalen Wachstumsbedingungen keine Sporenbildung beobachtet werden. Die Kolonien sind hell beige oder ocker (LI-4) bis weiß (*Sporosarcina globispora*) gefärbt oder ohne Pigmentierung bei *Filibacter limicola*. *Filibacter limicola* (4°C bis 26°C) und LI-4 (5°C bis 28°C) zeigen psychrotolerantes Wachstum mit ähnlichem Temperaturspektrum, *Sporosarcina globispora* wächst auch bei Temperaturen um 0°C und nur bis 25°C. Allerdings liegt das Temperaturoptimum von LI-4 (16°C) niedriger als das von *Sporosarcina globispora* (20°C-25°C) und *Filibacter limicola* (20°C). Der Salztoleranzbereich von *Sporosarcina globispora* variiert zwischen 2 % und 4 % NaCl und liegt wie bei LI-4 (0-6 %) unter 7 % NaCl. Im Gegensatz zu *Filibacter limicola*, der strikt aerob wächst, können LI-4 und *Sporosarcina globispora* auch fakultativ anaerob überleben. Während *Filibacter limicola* keine Zucker unter Säurebildung abbaut, sind LI-4 und *Sporosarcina globispora* in der Lage Glucose zu verwerten, unterscheiden sich aber in der Nutzung von Dulcitol (LI-4 – positiv) und Saccharose (LI-4 – negativ). Alle drei Stämme sind fähig Harnstoff zu spalten und Katalase zu bilden. Gelatine wird von den nächsten Verwandten von LI-4 abgebaut, von dem Stamm selbst nicht. LI-4 und *Filibacter limicola* unterscheiden sich außerdem in der Protease- (LI-4 – positiv) und Oxidase-Aktivität (LI-4 – negativ). Beide Stämme sind nicht in der Lage Stärke zu spalten.

Die deutlichen Unterschiede in der morphologischen und biochemischen Charakteristik lassen trotz eines ähnlichen Temperaturspektrums und der hohen Sequenzübereinstimmung darauf schließen, dass LI-4 und *Filibacter limicola* nicht zu einer Art oder zu einer Gattung gehören. Zwischen LI-4 und *Sporosarcina globispora* existieren nur geringe morphologische (Koloniefarbe), physiologische (Temperaturspektrum) und biochemische Unterschiede. Allerdings zeichnet sich der Genus *Sporosarcina* eindeutig durch Sporenbildung aus (YOON *et al.*, 2001), was unter normalen Wachstumsbedingungen bei LI-4 nicht der Fall war. Auf Grund dieser Unterschiede könnte Isolat LI-4 eine neue Art darstellen. Die genaue phylogenetische Einordnung kann erst nach weiteren Tests abgeschlossen werden.

Isolat SK-2 gehört, mit einer Sequenzübereinstimmung von 98,6 % zu *Flavobacterium hydatis* und 98,3 % zu *Flavobacterium glaciei*, zur Familie der *Flavobacteriaceae*. *Flavobacterium hydatis*, ursprünglich *Cytophaga aquatilis*, aus den Kiemen eines Süßwasserfisches isoliert (STROHL & TAIT, 1978), wurde 1996 von BERNADET *et al.* reklassifiziert. *Flavobacterium glaciei* stammt von Chinas Gletscher Nr. 1 (ZHANG *et al.*, 2006). Die drei Stämme unterscheiden sich morphologisch hinsichtlich Zellgröße und Geißel-Ausbildung. SK-2 (0,2-0,5 µm × 2,5-8,0 µm), *Flavobacterium hydatis* (0,5-0,75 µm × 5,0-15,0 µm) und *Flavobacterium glaciei* (0,45-0,55 µm × 2,7-6,3 µm) bilden gramnegative Stäbchen, wobei nur SK-2 begeißelt ist. Die Koloniefarbe variiert leicht von durchscheinend gelb-orange (SK-2), über gelb-orange oder hellbraun (*Flavobacterium hydatis*) bis gelb (*Flavobacterium glaciei*). Die Kolonien von SK-2 sind flach im Profil mit einem wimpernförmigen Rand, *Flavobacterium glaciei* dagegen bildet ganzrandige konvexe Kolonien aus. Physiologisch sind sich die drei Stämme ähnlich. Das Temperaturoptimum der Stämme liegt um 20°C. SK-2 wächst bereits bei 0°C bis hin zu 28°C, *Flavobacterium hydatis* kann bei Temperaturen über 0°C und unter 37°C wachsen, *Flavobacterium glaciei* zeigt, wie SK-2, psychrotolerantes Wachstum (4°C-25°C). Der tolerierte pH-Wertbereich von SK-2 (pH 5,0-9,0) und *Flavobacterium glaciei* (pH 6,0-9,0) ist sehr ähnlich, inklusive der Optima von pH 6,5 bzw. pH 6,5-7,5. Sowohl SK-2 als auch *Flavobacterium glaciei* tolerieren niedrige Salzkonzentrationen von 0-1,5 % bzw. 0-1 % NaCl. Während *Flavobacterium glaciei* obligat aerob ist, können SK-2 und *Flavobacterium hydatis* auch fakultativ anaerob wachsen. Die Zuckerverwertbarkeit zeigt weitere Unterschiede auf. Bei *Flavobacterium glaciei* konnte keine Säurebildung aus Kohlenhydraten nachgewiesen werden. SK-2 und *Flavobacterium hydatis* bauen Glucose, Maltose und Trehalose unter Säurebildung ab. Lactose, Mannitol und Inositol kann von keinen der Stämme verwertet werden. Im Gegensatz zu *Flavobacterium hydatis* nutzt SK-

2 zusätzlich Galactose, Saccharose und Salicin. Andere Kohlenhydrate, wie Arabinose, Dulcitol (variabel) und Xylose werden von *Flavobacterium hydatis* umgesetzt und von SK-2 nicht. SK-2 und seine nächsten Verwandten sind Amylase-, Protease- und Oxidase-positiv, aber Indol-, Urease- und Methylrot-negativ. *Flavobacterium hydatis* und *Flavobacterium glaciei* bilden Gelatinase und Katalase, SK-2 besitzt diese Enzymaktivitäten nicht. Allerdings ist SK-2 in der Lage in geringem Maße Schwefelwasserstoff aus schwefelhaltigen Eiweißverbindungen herzustellen. Gegenüber (Oxy-)Tetracyclin und Novobiocin sind SK-2 und *Flavobacterium hydatis* empfindlich. Penicillin und Ampicillin lösen keine Hemmung aus. SK-2 ist gegenüber Kanamycin-Sulfat, Neomycin, Streptomycin und Erythromycin resistent, *Flavobacterium hydatis* ist gegenüber diesen Antibiotika empfindlich.

Trotz der Sequenzübereinstimmung von 98,3 % und der physiologischen Ähnlichkeit zwischen SK-2 und *Flavobacterium glaciei*, sprechen die Unterschiede in der Zell- und Koloniemorphologie, der Zuckerverwertbarkeit und der biochemischen Leistungsfähigkeit dafür, dass diese beiden Stämme nicht zu einer Spezies gehören. Auch zu *Flavobacterium hydatis* weist Isolat SK-2 in jedem Bereich der phänotypischen Charakteristik Unterschiede auf, wonach auch diese Stämme nicht einer Art zugeordnet werden können. Höchstwahrscheinlich handelt es sich bei Isolat SK-2 um eine neue Art in der Familie der *Flavobacteriaceae*.

Mit einer Sequenzübereinstimmung von 99,9 % zu *Pseudomonas migulae* und 99,5 % zu *Pseudomonas brenneri* ist Isolat SK-4 dem Genus *Pseudomonas* in der Familie der *Pseudomonadaceae* zugeordnet. Sowohl *Pseudomonas migulae* (VERHILLE *et al.*, 1999) als auch *Pseudomonas brenneri* (BADĪA *et al.*, 2001) wurden aus natürlichem Mineralwasser isoliert. Es handelt sich bei den drei Stämmen um gramnegative Stäbchen, wobei SK-4 (0,5-0,8 µm × 0,8-2,7 µm) und *P. migulae* (0,5-0,7 µm × 1,5-2,5 µm) nahezu gleich groß sind. SK-4 und *P. brenneri* besitzen keine Sporen. Im Gegensatz zu den beiden nächsten Verwandten bildet SK-4 laut Färbung auch keine Geißeln aus. Die Kolonien der Stämme sind rund, bei SK-4 mit wimpernförmigem, bei *P. migulae* und *P. brenneri* mit glattem Rand. SK-4 wächst in einem Temperaturbereich von 5°C bis 28°C, mit geringem Wachstum auch bei 32°C. Der tolerierte Temperaturbereich für *P. migulae* (4°C-35°C) und *P. brenneri* (4°C bis < 41°C) ist etwas höher, aber ähnlich. Das Temperaturoptimum von SK-4 liegt mit 24°C unter dem von *P. migulae* (30°C). Die Salztoleranz verhält sich bei SK-4 (0-6% NaCl) und *P. brenneri* (0-3%, < 5 % NaCl) sehr ähnlich, während *P. migulae* nur Salzkonzentrationen ≤ 0,8 % NaCl toleriert. Sowohl SK-4 als auch *P. migulae* sind Amylase-, Gelatinase- und Indol-negativ. Alle drei Stämme sind nicht in der Lage Harnstoff zu spalten, besitzen aber Oxidase- und Ka-

talase-Aktivität. Hinsichtlich der Zuckerverwertbarkeit unter Säurebildung oder der Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika können auf Grund fehlender vergleichbarer Daten, d.h. Anwendung unterschiedlicher Tests, keine Aussagen gemacht werden, was die phänotypische Einordnung des Isolates SK-4 insgesamt erschwert.

In der biochemischen Leistungsfähigkeit gleichen sich Isolat SK-4, *Pseudomonas migulae* und *Pseudomonas brenneri*. Im Bereich der morphologischen und physiologischen Charakteristik existieren sowohl zu *P. migulae* (Salztoleranz) als auch zu *P. brenneri* (Temperaturspektrum) leichte Unterschiede. Die hohen Sequenzähnlichkeiten von über 99 % deuten darauf hin, dass SK-4 dem Genus *Pseudomonas* zugeordnet ist. Mit 99,9 % Sequenzübereinstimmung und einer hohen phänotypischen Ähnlichkeit ist eine Artzugehörigkeit von SK-4 zu *P. migulae* wahrscheinlich. Um diese Vermutung zu bestätigen müssten weitere phänotypische Merkmale verglichen werden oder die Charakterisierung durch weitere genotypische Untersuchungen ergänzt werden.

Die Isolate LI-1, LI-2 und SK-3 erwiesen sich sowohl in der GRAM-Färbung, als auch im Lysozym-Test als gramnegativ. In der phylogenetischen Analyse wurden diese Isolate zusammen mit LI-3 und SK-1 dem Phylum und der Klasse der *Actinobacteria* zugeordnet. Die *Actinobacteria* und ihre Vertreter zählen zu den grampositiven Bakterien, wonach auch für die Isolate LI-1, LI-2 und SK-3 ein positives GRAM-Verhalten zu erwarten gewesen wäre. Eine Erklärung wäre, dass es sich hierbei um gramvariable Bakterien handelt. Außerdem könnte das Ergebnis der GRAM-Färbung fehlerhaft sein, da oft auch grampositive Bakterien beim Waschen mit Ethanol entfärbt werden (BEHRENDT *et al.* 2002). Im Fall von LI-2, LI-3 und SK-3 würde der negative Lysozym-Test die GRAM-Färbung bestätigen. Um ein sicheres Ergebnis hinsichtlich des GRAM-Verhaltens zu erzielen, wären weitere Tests erforderlich.

6.3 Bedeutung der untersuchten Organismen

Der Wachstumstest auf unterschiedlichen Medien ergab, dass die Mehrzahl der Stämme auch mit einem verdünnten Vollmedium wie ½ LB wächst. SK-2 und SK-4 benötigen, wahrscheinlich in optimaler Anpassung an ihren Kohlenstoff-limitierten Standort, ein Nährstoff-reduziertes Nutrient-Medium für ein gutes Wachstum. Die Anpassung an geringe Nährstoffkonzentrationen wird auch darin deutlich, dass alle Isolate, außer LI-4, auf einem Minimalmedium mit Glucose, die Reinkulturen LI-2, LI-3, SK-1 und SK-3 auch auf einem Minimalmedium ohne Glucose, wachsen.

Innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft der Antarktis dominieren Vertreter aus den Phyla der *Actinobacteria* und der *Bakteroidetes*, wobei auch *Acidobacteria*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes* und *Proteobacteria* vorkommen (UGOLINI & BOCKHEIM, 2007). In der vorliegenden Arbeit konnten drei Isolate (LI-1, LI-2, LI-3) dem dominierenden Phylum der *Actinobacteria* und LI-4 den *Firmicutes* zugeordnet werden. In arktischen Habitaten findet man *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Flavobacteria* und α -, β -, γ -*Proteobacteria* (HANSEN *et al.*, 2007). Aus den Bodenproben von Store Koldewey konnten, diese Aussage bestätigend, exemplarisch Vertreter der *Actinobacteria* (SK-1, SK-3), der *Flavobacteria* (SK-2) und der γ -*Proteobacteria* (SK-4) identifiziert werden. Die *Actinobacteria* und insbesondere der Genus *Arthrobacter* weisen einen sehr heterogenen Stoffwechsel auf und sind oft in der Lage ungewöhnliche Substanzen wie Herbizide, Phenole oder Nicotine abzubauen. Mit diesen Fähigkeiten könnten die isolierten Reinkulturen eine wichtige Rolle in ihrem Ökosystem spielen. Die Analyse unterschiedlicher Nährmedien hat gezeigt, dass die Isolate LI-2 und LI-3 von Livingston Island, sowie SK-1 und SK-3 von Store Koldewey fähig sind auf einem Minimalmedium ohne Glucose als Kohlenstoffquelle zu wachsen. Da das Minimalmedium keinen Kohlenstoff enthält, stand den Organismen nur das CO₂ in der Luft als Kohlenstoffquelle zur Verfügung. Es ist naheliegend, dass diese Organismen zu autotrophen Wachstum befähigt sein können und auf diese Weise als Primärproduzenten eine wichtige Grundlage im Ökosystem bilden. Auf Grund ihrer Fähigkeit aus anorganischen, organische Stoffe herzustellen und CO₂ zu fixieren, sind autotrophe Organismen von entscheidender Bedeutung im Ökosystem. Die Kohlenstofffixierung der Mikroorganismen könnte im Calvin-Zyklus, im rückläufigen Citrat-Zyklus oder im Hydroxypropionat-Zyklus erfolgen. Photoautotrophes Wachstum, mit dem Sonnenlicht als Energiequelle, wäre bezüglich der Bodenproben nur in den oberen lichtdurchlässigen Bodenschichten möglich. Photoautotrophe Organismen wie *Cyanobacteria* konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht isoliert werden, da alle Reinkulturen ohne Licht angezogen wurden. Autotrophie ist außerdem im Rahmen von Chemolithotrophie (aerob), Methanogenese (anaerob) oder Acetogenese (anaerob) möglich. Die Bakterien liefern, ob als Primärproduzenten oder mit heterotrophen Wachstum, wichtige Substanzen und Nährstoffe, die als Grundlage zum Wachstum anderer Lebewesen im Habitat dienen. In den, im Rahmen der Arbeit untersuchten, polaren Gebieten existiert, wenn überhaupt, eine initiale Bodenbildung. Bei der initialen Bodenbildung werden zunächst Gesteine physikalisch und chemisch verwittert. Die dabei entstehenden anorganischen Substanzen könnten von chemolithoautotrophen Mikroorganismen als Elektronendonatoren zur Oxidation genutzt werden. Das von den autot-

rophen bereit gestellte organische Material dient als Grundlage für chemoorganotrophe Mikroorganismen, die Teil der biologischen Bodenbildungsprozesse sind, indem sie organische Säure oder Kohlensäure produzieren. Des Weiteren ist die Mineralisierung des organischen Materials durch Mikroorganismen von besonderer Bedeutung, um Kohlenstoffdioxid, Wasser, Mineralstoffe und Spurenelemente für höhere Organismen bereit zu stellen. Die Aktivität von Mikroorganismen ermöglicht die weitere Besiedlung des Bodens durch andere Mikroorganismen und Pflanzen und bildet damit eine Grundlage für die Entwicklung des Habitats. Da Bakterien an einer Vielzahl geochemischer Stoffumsätze wie dem Kohlenstoff- oder Stickstoffkreislauf der Erde beteiligt sind, beeinflussen sie außerdem das gesamte globale Klimasystem.

Die extremen Umweltbedingungen der polaren Habitate können ungewöhnlichen Eigenschaften und Fähigkeiten der Mikroorganismen resultieren, die ein großes Potential für biotechnologischen Anwendungen, in Bereich der Müllentsorgung, Lösungs- und Nahrungsmittelindustrie, Enzymologie oder Medizin, beinhalten können (MARGESIN & SCHINNER, 1994). Kälteoptimierte Enzyme könnten die Arbeitstemperaturen in entsprechenden industriellen Produktionsprozessen herabsetzen und somit zur Energieeinsparung beitragen oder hitzeempfindliche Materialien werden durch Einsatz kälteadaptierter Enzyme geschont. Bei Wasch- und Reinigungsmitteln können Proteasen, Cellulasen oder Lipasen mit Leitungswasser eingesetzt werden. In der Nahrungsmittelindustrie sorgen verschiedenste Enzyme für den Erhalt von Frische, Geschmack und Produktqualität. Der Einsatz von Katalase führt in der Abwasserbehandlung zur Energieersparnis (MARGESIN & SCHINNER, 1999; OHGIYA *et al.*, 1999) Das Abbaupotential von *Arthrobacter*-Vertretern bietet eventuell Einsatzmöglichkeiten in der Bioremediation oder Dekontamination, denn viele Bodenbakterien nutzen organische Giftstoffe als Kohlenstoff- oder Energiequelle oder unter anaeroben Bedingungen als Elektronenakzeptor (SCOW, 2000). *Arthrobacter psychrophenicus* kann beispielsweise phenolische Verbindungen abbauen. Auch *Arthrobacter chlorophenicus* verwertet 4-Chlorophenol optimal bei niedrigen Temperaturen (5°C; BACKMAN *et al.*, 2004). Viele Bodenbakterien eröffnen außerdem Möglichkeiten hinsichtlich ihrer Antibiotika-Produktion. Es könnten neue Antibiotika entdeckt werden, was in Anbetracht auftretender Resistenzen von großer medizinischer Bedeutung ist.

6.4 Ausblick

Die Untersuchung der prokaryotischen Diversität und ihre Beziehung zum Ökosystem besonders in extremen Habitaten wie Arktis und Antarktis ist und bleibt ein wichtiges und interes-

santes Forschungsgebiet. Um die mikrobielle Gemeinschaft und ihre Relevanz und Funktion im Ökosystem besser verstehen zu können, ist es notwendig, Reinkulturen zu gewinnen und die isolierten Mikroorganismen phylogenetisch zu bestimmen und physiologisch zu charakterisieren. Für diese Charakterisierung ist ein polyphasischer Ansatz erforderlich (VANDAMME *et al.*, 1996), indem molekulare Techniken in klassische, physiologische und biochemische Kultivierungsmethoden integriert werden (SIEBERT *et al.*, 1996). In der vorliegenden Arbeit wurden die ausgewählten Isolate LI-1, LI-2, LI-3, LI-4, SK-1, SK-2, SK-3 und SK-4 genotypisch hinsichtlich ihrer 16S rRNA analysiert. Außerdem wurde in der morphologischen, physiologisch-ökologischen und biochemischen Charakterisierung der Phänotyp beschrieben. Die anerkanntesten Parameter in der prokaryotischen Taxonomie hinsichtlich der Speziesgrenze stellen die Gesamt-DNA-Ähnlichkeit (DNA-DNA-Hybridisierung) und der G+C-Gehalt dar (ROSELLÓ-MORA & AMANN, 2001). Um eine sichere Einordnung der Reinkulturen zu gewährleisten, sollten daher eine DNA-DNA-Hybridisierung durchgeführt und der G+C mol% bestimmt werden, was in dieser Arbeit wegen der fehlenden Analysegeräte nicht möglich war. Ist der relative Bindungsgrad (RBR) während der DNA-DNA-Hybridisierung gleich oder höher als 70 % gehören die untersuchten Prokaryoten zu einer Spezies (WAYNE *et al.*, 1987). Unterscheiden sich Organismen in ihrem G+C-Gehalt um mehr als 10 mol% sind sie nicht mehr einer Gattung zu zuordnen, die Artgrenze liegt bei einem Unterschied von 5 mol% (ROSELLÓ-MORA & AMANN, 2001). Eine andere Möglichkeit wäre, ein weiteres stark konserviertes Gen zu sequenzieren. So könnten beispielsweise House-Keeping-Gene als molekulare Marker eingesetzt werden. Die allgemeine Charakterisierung sollte außerdem um chemotaxonomische Aspekte ergänzt werden. Dazu gehört die Zellwandzusammensetzung unter Angabe der vorherrschenden Zucker und Peptidoglycan-Struktur, die Analyse der Lipide (Fettsäureanalytik, polare Lipide, Lipopolysaccharide, Isoprenoid-Chinone) und die Bestimmung der Polyamine. Mit Hilfe der Ergebnisse der indirekten genotypischen Analyse und der chemotaxonomischen Charakterisierung des Phänotyps könnte die abschließende phylogenetische Einordnung der Isolate erfolgen.

Des Weiteren wäre es sinnvoll den Rückschluss zum Habitat zu erbringen und die Frage zu klären, in welcher Anzahl die charakterisierten Reinkulturen im Boden vorkommen und welche Rolle sie demnach tatsächlich für das Ökosystem spielen. Im Rahmen dieser Fragestellung könnte man für die Isolate spezifische Sonden konstruieren, um eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) durchführen. Ein anderer Ansatzpunkt wäre die Analyse der Anpassungsmechanismen der Bakterien. Die extremen Umweltbedingungen in den polaren Regionen generieren besondere strukturelle und metabolische Eigenschaften der Bakterien. Die

Einzigartigkeit der (ant-)arktischen Stämme wird in einer Divergenz zwischen diesen Stämmen und ihren nicht-(ant-)arktischen Verwandten deutlich (WYNN-WILLIAMS, 1996). Bezüglich der vorliegenden Arbeit könnten zum Beispiel die Substanzen analysiert werden, die zur pH-Wertanpassung ins Medium abgeben werden. Außerdem würde sich die Frage stellen, in welcher Form die Isolate an die niedrigen Temperaturen oder an hohe Salzkonzentrationen angepasst sind. Die Anpassung an Psychrophilie könnte über kälte-aktive Enzyme, die einen erhöhten Anteil an α -Helix-Strukturen und polaren Aminosäuren haben, oder eine veränderte Membran-Zusammensetzung mit einem höheren Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, erfolgen. Um hohe Salzkonzentrationen bzw. geringe Wasseraktivitäten zu tolerieren, können die Organismen entweder Mechanismen aufweisen um die anorganischen Ionen aus der Zelle zu pumpen, oder sie produzieren oder reichern „Compatible Solute“, wie Glycin, Betain Zucker oder Prolin, an.

7. Literaturverzeichnis

- Adams, B., Bardgett, R., Ayres, D., Wall, D., Aislabie, J., Bamforth, S., et al. (2006). Diversity and distribution of Victoria Land biota. *Soil Biol. Biochem.* , 38, 3003-3018.
- Aislabie, J., Jordan, S., & Barker, G. (2008). Relation between soil classification and bacterial diversity in soils of the Ross Sea region, Antarctica. *Science Direct Geoderma* , 144, 9-20.
- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K.-H. (1995). Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiological Reviews* , 59 (1), 143-169.
- Avery, O., MacLeod, C., & McCarty, M. (1944). Studies of the chemical nature of the substance including transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus typ III. *Journal of experimental Medicine* , 79 (2), 137-158.
- Backman, A., Ninwe, M., & Jansson, J. (2004). Impact of Temperature on the Physiological Status of a Potential Bioremediation Inoculant, *Arthrobacter chlorophenicus* A6. *Appl Environ Microbiol* , 70 (5), 2952–2958.
- Baidar, N., Yazourh, A., Singer, S., & Izard, D. (2001). *Pseudomonas brenneri* sp. nov., a new species isolated from natural mineral waters. *Res. Microbiol.* , 493-502.
- Barrett, J., Virginia, R., Parsons, A., & Wall, D. (2006). Soil carbon turnover in the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Soil Biology & Biochemistry* , 38, 3065-3082.
- Bast, E. (2001). *Mikrobiologische Methoden* (2. ed.). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Behrendt, U., Ulrich, A., Schumann, P., Naumann, D., & Suzuki, K. (2002). Diversity of grass-associated Microbacteriaceae isolated from the phyllosphere and litter layer after mulching the sward; polyphasic characterization of *Subtercola pratensis*, sp. nov., *Curtobacterium herbarum*, sp. nov. and *Plantibacter flavus*, gen. nov., sp. *IJSEM* , 1441-1454.
- Bennike, O., Cremer, H., Hakansson, L., Hultsch, N., Kobabe, S., & Wagner, B. (2004). *Quaternary geological and biological studies on Store Koldewey and on Geographical Society: The Expedition ARKTIS XIX/4 of the Research Vessel Polarstern 2003*. Reports on Polar and Marine Research 475, 51-74.
- Bernardet, J.-F., & Grimont, P. (1989). Deoxyribonucleic Acid Relatedness and Phenotypic Characterization of *Flexibacter columnaris*, sp. nov., nom. rev., *Flexibacter psychrophilus*, sp. nov., nom. rev., and *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida and Masumura 1986. *IJSB* , 346-354.

- Bernardet, J.-F., Segers, P., Vancanneyt, M., Berthe, F., Kersters, K., & Vandamme, P. (1996). Cutting a Gordian Knot: Emended Classification and Description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family Flavobacteriaceae, and proposal of *Flavobacterium hydatis*, nom. nov. (Basonym, *Cytophaga Aquatilis*, Strohl and Tait 1978). *IJSB*, 128-148.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenesis *Escherichia coli*. *J. Bacteriology*, 62 (3), 293-300.
- Blume, H., Beyer, L., Bölter, M., Erlenkeuser, H., Kalk, E., Kneesch, S., et al. (1997). Pedogenic zonation in soils of southern circumpolar region. *Advances in GeoEcology*, 30, 69-90.
- Bokhorst, S., Huiskes, A., Convey, P., & Aerts, R. (2007). Climate change effects on organic matter decomposition rates in ecosystems from the Maritime Antarctic and Falkland Islands. *Global Change Biology*, 13, 2642-2653.
- Born, E., & Böcher, J. (2001). *The Ecology of Greenland*. Ilinnusiorfik, Nuuk, Greenland: Ministry of Environment and Natural Resources.
- Brockman, F. (1995). Nucleic-acid-based methods for monitoring the performance of in situ bioremediation. *Molecular Ecology*, 5, 567-578.
- C. Gram. (1884). Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschritte der Medizin* (2), 185-189.
- Cameron, R., Morelli, F., & Johnson, R. (1972). Bacterial species in soil and air of the Antarctic continent. *Antarct J*, 187-189.
- Carter, K. C. (1985). Koch's Postulates in Relation to the Work of Jacob Henle and Edwin Klebs. *Medical History*, 353-375.
- Chung, K.-T., & Ferris, D. H. (1996). Martinus Beijerinck (1851-1931): pioneer of general microbiology. *AMS News* (62), pp. 539-543.
- Claridge, M., Dawah, H., & Wilson, M. (1997). Practical approaches to species concepts of living organisms. In M. Claridge, H. Dawah, & M. Wilson, *Species: the Units of Biodiversity* (pp. 1-15). London: Chapman and Hall.
- Colwell, R., Clayton, R., Ortiz-Conde, B., Jacobs, D., & Russek-Cohen, E. (1995). The microbial species concept and biodiversity. In D. Allsopp, R. Colwell, & D. Hawksworth, *Microbial Diversity and Ecosystem Function* (pp. 3-15). Oxon: CAB International.
- Cowan, D., Russel, N., Mamais, A., & Sheppard, D. (2002). Antarctic Dry Valley mineral soils contain unexpected high levels of microbial biomass. *Extremophiles*, 6, 431-436.
- de la Torre, J., Goebel, B., Friedmann, E., & Pace, N. (2003). Microbial diversity cryptoendolithic communities from the Mc Murdo Dry Valleys, Antarctica. *Appl Environ Microbiol*, 69, 3858-3867.

- Deming, J. (2002). Psychrophiles and polar regions. *Current Opinion in Microbiology* , 5, 301-309.
- Dojka, M. A.; Hugenholtz, P.; Haack, S.K.; Pace, N.R.; (1998). Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl Environ Microbiol* (64), 3869-3877.
- Drews, G. (1983). *Mikrobiologisches Praktikum* (4. ed.). Berlin Heidelberg New York Tokyo: Springer Verlag.
- Ellison III, R., & Giehl, T. (1991). Killing of Gram-negative Bacteria by Lactoferrin and Lysozyme. *J. Clin. Invest.* , 88, 1080-1091.
- Evtushenko, L. I., Dorofeeva, L., Dobrovolskaya, T., Streshinskaya, G., Subbotin, S., & Tiedje, J. (2001). *Agreia bicolorata* gen. nov., sp. nov., to accommodate actinobacteria isolated from narrow grass infected by the nematode *Heteroanguina graminophila*. *IJSEM* , 51, 2073-2079.
- Fiedler, H. (1973). *Methoden der Bodenanalyse- Mikrobiologische Methoden* (Vol. 2). Dresden: Theodor Steinkopff.
- Fleischmann, R., & Adams, M. e. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae*. *Science* , 269 (5223), 496-512.
- Fox, G., Wisotzky, J., & Jurtshuk Jr., P. (1992). How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* (42), 166-170.
- Friedmann, E. (1993). *Antarctic Micobiology*. New York: Wiley-Liss.
- Garnjobst, L. (1944). CYTOPHAGA COLUMNARIS (DAVIS) IN PURE CULTURE: A MYXOBACTERIUM PATHOGENIC TO FISH Pathogenic To Fish. *jb.asm.org* , 112-128.
- Gilichinsky, D., & Wagener, S. (1995). Microbial life in permafrost - a historical review. *Permafrost Periglac Process* , 6, 243-250.
- Gordon, R. (1978). A species definition. *Int. J. Syst. Bacteriol.* , 28, 605-607.
- Gupta, P., Reddy, G., Delille, D., & Shivaji, S. (2004). *Arthrobacter gangotriensis* sp. nov. and *Arthrobacter kerguelensis*, sp. nov. from Antarctica. *IJSEM* (54), 2375-2378.
- Hansen, A., Herbert, R., Mikkelsen, K., Liengard Jensen, L., Kristoffersen, T., Tiedje, J., et al. (2007). Viability, diversity and composition of the bacterial community in a high Arctic permafrost soil from Spitsbergen, Northern Norway. *Environmental Microbiology* , 9 (11), 2870-2884.
- Hoaki, T., Nishijima, M., Kato, M., Adachi, K., Mizobuchi, S., Hanzawa, H., et al. (1994). Growth Requirements of Hyperthermophilic Sulfur-Dependent Heterotrophic Archaea isolated from a. *Appl Environ Microbiol* , 60 (8), 2898-2904.

- J., S., Hirsch, P., Hoffmann, B., Gliesche, C., Jendrach, M., & Peissl, K. (1996). Cryptoendolithic microorganisms from Antarctic sandstone of Linnaeus Terrace (Asgard Range): diversity, properties and interactions. *Biodiversity and Conservation* , 5 (11), 1337-1363.
- K., S., Bauser, C., & Regenbogen, J. (2007). Praxisbericht: Next Generation DNA-Sequenzierung. *Laborwelt* , 3 (8).
- Kämpfer, P., Rainey, F., Andersson, M., E.-L., N. L., Ulrych, U., Busse, H., et al. (2000). *Frigoribacterium faeni* gen. nov., sp. nov., a novel psychrophilic genus of the family Microbacteriaceae. *IJSEM* , 355-363.
- Kobabe, S., Wagner, D., & Pfeiffer, E.-M. (2004). Characterisation of microbial community composition of a Siberian tundra soil by fluorescence in situ hybridisation. *FEMS Microbiology Ecology* , 50, 13-23.
- Koch, R. (1912 (1884)). "Die Ätiologie der Tuberkulose". In J. Schwalbe, *Gesamelte Werke von Robert Koch* (Vol. 1, pp. 467-565). Leipzig: Georg von Thieme.
- Kochkina, G., Ivanushkina, N., Karasev, S., Gavrish, E., Gurina, L., & Evtushenko, L. (2001). Survival of micromycetes and actinobacteria under condition of long-term natural cryopreservation. *Microbiology* , 70, 356-364.
- Koenicke, A., Bernhardt, A., de la Torre, J., Walker, C., Waterbury, J., & Stahl, D. (2005). Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* , 437, 543-546.
- Kovacs, N. (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyaneae* by the Oxidase-Reaction. *Nature* , 703.
- L.I., E., Dorofeeva, L., Dobrovolskaya, T., Streshinskaya, G., Subbotin, S., & Tiedje, J. (2001). *Agreia bicolorata* gen. nov., sp. nov., to accommodate Actinobacteria isolated from narrow reed grass infected by the nematode *Heteroanguina graminophila*. *IJSEM* , 2073-2079.
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., & Pace, N. R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 82, 6955-6959.
- Larkin, J., & Stokes, J. (1967). Taxonomy of Psychrophilic Strains of *Bacillus*. *J of Bacteriology* , 889-895.
- Leeuwenhoek, A. v. (November 1677). Letter from Leeuwenhoek to William Brouckner. *II*, 290-291.
- Loeffler, F. (1884). Untersuchung über die Bedeutung der Mikroorganismen für die Entstehung der Diphtherie beim Menschen, bei der Taube und beim Kalbe. *Mitteilungen aus dem kaiserlichen Gesundheitsamte* 2 , pp. 421-499.
- Loeffler, F., & Frosch, P. (1898). *Berichte der Kommission zur Erforschung der Maul- und Klauenseuche bei dem Institut für Infektionskrankheiten in Berlin Zbl. Bakt. I/Orig.*

- Loeffler, F., & Frosch, P. (1897). *Berichte der Kommission zur Erforschung der Maul- und Klauenseuche bei dem Institut für Infektionskrankheiten. Zbl. Bakt. I/ Orig.*
- Loveland-Curtze, J., Sheridan, P. P., Gutshall, K., & Brenchley, J. (1999). Biochemical and phylogenetic analyses of psychrophilic isolates belonging to the *Arthrobacter* subgroup and description of *Arthrobacter psychrolactophilus*, sp. nov. *Arch Microbiol* (171), 355-363.
- Madigan, M., & Martinko, J. (2006). *Brock Biology of Microorganisms* (11. ed.). Pearson Education, Inc.
- Maiden, M. F., & Jones, J. (1984). A New Filamentous, Gliding Bacterium, *Filibacter limicola* gen. nov. sp. nov.; from Lake Sediment. *Journal of General Microbiology*, 130, 2943-2959.
- Mangelsdorf, K., Finsel, E., Liebner, S., & Wagner, D. (2009). Temperature adaptation of microbial communities in different horizons of Siberian permafrost-affected soils from the Lena Delta. *Science Direct Chemie der Erde*, 169-182.
- Margesin, R., & Schinner, F. (1994). Properties of cold-adapted microorganisms and their potential role in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 33, 1-14.
- Margesin, R., Schumann, P., Spröer, C., & Gounot, A.-M. (2004). *Arthrobacter psychrophenicus* sp. nov., isolated from an alpine ice cave. *IJSEM*, 54, 2067-2072.
- Martinez-Murcia, A., Benlloch, S., & Collins, M. (1992). Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42, 412-421.
- Matsumoto, A., Yamada, M., Omura, S., & Takahashi, Y. (2008). *Microterricola viridarii* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Microbacteriaceae*. *IJSEM* (58), 1019-1023.
- Mayr, E. (1942). *Columbia University Press, New York*.
- Meynell, G., & Meynell, E. (1965). *Theory and Practice in Experimental Bacteriology*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*.
- Neelsen, F. (1883). *Centbl. Med. Wis.* (21), 497-501.
- Niederberger, T., McDonald, I., Hacker, A., Soo, R., Barrett, J., Wall, D., et al. (2008). Microbial community composition in soils of Northern Victoria Land, Antarctica. *Environmental Microbiology*, 10 (7), 1713-1724.
- Ohgiya, S., Toshino, T., Okuyama, H., Tanaka, S., & Ishizaki, K. (1999). Biotechnology of enzymes from cold-adapted microorganism. In R. Margesin, & F. Schinner, *Biotechnological applications of cold-adapted organisms* (pp. 17-34). Springer.

- Olive, M., & Bean, P. (1999). Minireview: Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *Journal of Clinical Microbiology* , 37 (6), 1661-1669.
- Oliveira, K., Wilson, D., Coull, J., & Stender, H. (2002). Rapid Identification of *Staphylococcus aureus* Directly from Blood Cultures by Fluorescence In Situ Hybridization with Nucleic Acid Probes. *Journal of Clinical Microbiology* , 40 (1), 247-251.
- Palys, T., Berger, E., Mitrica, I., Nakamura, L., & Cohan, F. (2000). Protein-coding genes as molecular markers for ecologically distinct populations: The case of two *Bacillus* species. *IJSEM* , 1021-1028.
- Pasteur, L. (1964 (1864)). Pasteur und die Generatio spontanea / Pasteur. Aus d. Werken von Pasteur ausgew., übers. u. eingel. von Josef Tomcsik. In J. Tomcsik, *Hubers Klassiker der Medizin und der Naturwissenschaften* (Vol. 3). Bern, Stuttgart: Huber.
- Pepper, I., Gerba, C., & Brendecke, J. (1995). *Environmental Microbiology, A Laboratory Manual*. San Diego New York Boston London Sydney Tokyo Toronto: Academic Press, Inc.
- R., M., & Schinner, F. (1999). *Biotechnological applications of cold-adapted organisms*. Springer.
- Ravenschlag, K., Sahm, K., Pernthaler, J., & Amann, R. (1999). High bacterial diversity in permanently cold marine sediments. *Appl Environ Microbiol* (65), 3982-3989.
- Reddy, G. S., Prabakaran, S., & Shivaji, S. (2008). *Leifsonia pindariensis* sp. nov., isolated from the Pindari glaciers of the Indian Himalayas, and emended description of the genus *Leifsonia*. *IJSEM* (58), 2229-2234.
- Reddy, G., Matsumoto, G., & Shivaji, S. (2003). *Sporosarcina macmurdoensis* sp. nov., from a cyanobacterial mat sample from a pond in the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *IJSEM* , 1363-1367.
- Rosello-Mora, & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* , 25, 39-67.
- Roszak, D., & Colwell, R. (1987). Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* , 51, 365-379.
- Roszak, D., Grimes, D., & Colwell, R. (1984). Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Can. J. Microbiol.* , 30, 334-338.
- Rovira, J. S. (1955). Microbiological of some subantarctic soils. *Journal of soil sciences* 6 , 119-128.
- Ruestow, E. (1983). Leeuwenhoek's Perception of the Spermatozoa. *J. History of Biology* , 16, 185-224.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H., et al. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* , 230 (4732), 1350-1354.

- Sanger, F. e. (1997). DNA-Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* , 74, 5463-5467.
- Sanger, F. e. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* , 265, 687-695.
- Schröder, H. (1991). *Mikrobiologisches Praktikum* (5. ed.). Berlin: Volk und Wissen Verlag GmbH.
- Schumann, P., Behrendt, U., Ulrich, A., & Suzuki, K. (2003). Reclassification of *Subtercola pratensis* Behrendt et al. 2002 as *Agreia Pratensis*, comb. nov. *IJSEM* , 2041-2044.
- Scow, K. (2000). Soil Microbiology. In J. Lederberg, *Encyclopedia of Microbiology* (2 ed., Vols. 4 Q-Z, pp. 321-335). San Diego, San Fransisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Academic Press.
- Serrano, E., & Lopez-Martinez, L. (2003). *The periglacial morphodynamic system in the South Shetland Islands, wetsern Antarctica, 9th Intern. Symposium on ANtartic Earth Sciences, ISAES-IX.*
- Smith, J., Tow, L., Stafford, W., Cary, C., & Cowan, D. (2006). Bacterial diversity in three different antarctic cold desert mineral soils. *Microbial Ecology* , 51, 413-421.
- Stackebrandt, E., & Goebel, B. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species defenition in Bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* , 44, 846-849.
- Staley, J., & Konopka, A. (1985). Measurement of in situ activities og nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* , 39, 321-346.
- Strohl, W., & Tait, L. (1978). *Cytophaga aquatilis* sp. nov., a Facultative Anaerobe Isolated from the Gills of Freshwater Fish. *IJSB* , 293-303.
- Süßmuth, R., Eberspächer, J., Haag, R., & Springer, W. (1999). *Mikrobiologisch-Biochemisches Praktikum* (2. ed.). Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag.
- Taton, A., Grubisic, S., Brambilla, E., De Witt, R., & Wilmotte, A. (2003). Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. *Appl Environ Microbiol* , 69, 5157-5169.
- Tatum, E., & Lederberg, J. (1946). Gene recombination in the bacterium *Echerichia coli*. *J. of Bacteriology* , 63 (6).
- Ten, L., IM, W.-T., Baek, S.-H., Lee, J.-S., Oh, H. -M., & Lee, S.-T. (2006). *Bacillus ginsengihumi* sp. nov., a Novel Species Isolated from Soil of a Ginseng Field in Pocheon Province, South Korea. *J. Microbiol Biotechnol* , 1554-1560.

- Thang, D.-C., Wang, H.-X., Liu, H.-C., Dong, X.-Z., & Zhou, P.-J. (2006). *Flavobacterium glaciei* sp. nov., a novel psychrophilic bacterium isolated from the China No. 1 glacier. *IJSEM*, 2921-2925.
- Thornton, H. (1953). Sergei Nicholaevitch Winogradsky. 1856-1953. *Obituary Notices of Fellows of the Royal Society*, 8 (22), pp. 635-644.
- Toro, M., Camacho, A., Rochera, C., Rico, E., Banon, M., & Fernandez-Valiente, E. e. (2007). Limnological characteristic of the freshwater ecosystems of Beyers Peninsula, Livingston Island, in maritime Antarctica. *Polar Biol*, 30, 635-649.
- Torsvik, V., & Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5, 240-245.
- Tvrzowa, L., Schumann, P., Spröer, C., Sedlacek, I., Verbarg, S., Kroppenstedt, R., et al. (2005). Polyphasic taxonomic study of strain CCM 2783 resulting in the description of *Arthrobacter Stackebrandtii*, sp. nov. *IJSEM* (55), 805-808.
- Ugolini, F., & Bockheim, J. (2008). Antarctic soils and soil formation in a changing environment: A review. *Science Direct Geoderma*, 144, 1-8.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.*, 60, 407-438.
- Vaughan, D., Marshall, G., Connoley, W., King, J., & Mulvaney, R. (2001). Perspectives: climate change: devil in the detail. *Science*, 293, 1777-1779.
- Verhille, S., Baida, N., Dabboussi, F., Hamze, M., Izard, D., & Leclerc, H. (1999). *Pseudomonas gessardii* sp. nov. and *Pseudomonas migulae*, sp. nov., two new species isolated from natural mineral waters. *IJSB*, 1559-1572.
- Vieria, G., & Ramos, M. (2003). Geographic factors and geocryological activity in Livingston Island, Antarctic. In M. Philips, S. Springman, & S. Arenson, *Proceedings of the 8th International Conference on Permafrost* (pp. 1183-1188). Zurich, Switzerland: Balkema Publishers, Lisse.
- Vorobyova, E., Soina, V., Gerlenko, M., Minkovskaya, N., Zalinova, N., & Mamukelashvili, A. e. (1997). The deep cold biosphere: facts and hypothesis. *FEMS Microbiol Rev*, 20, 277-290.
- Vorobyova, E., Soina, V., Gerlenko, M., Minkovskaya, N., Zalinova, N., & Mamukelashvili, A. (1997). The deep cold biosphere: facts and hypothesis. *FEMS Microbiol Rev*, 20, 277-290.
- Wagner, D., & Liebner, S. (2009). Global Warming and Carbon Dynamics in Permafrost Soils: Methane Production and Oxidation. In R. Margesin, *Permafrost Soils, Soil Biology 16* (pp. 219-236). Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.

- Wagner, D., Koch, K., Gattinger, A., & Lipski, A. (2008). Methane Cycle in Terrestrial and Submarine Permafrost Deposits of Laptev Sea Region. *Ninth International Conference of Permafrost*, (pp. 1875-1880).
- Wagner, D., Schwammborn, G., Hubberten, H.-W., & Pimpirev, C. (2006). *Bulgarian-German Expedition: Livingston 2005*. Reports on Polar and Marine Research 539, 91-123.
- Ward, D. M., Bateson, M., Weller, R., & Ruff-Roberts, A. (1992). Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. *Adv. Microb. Ecol.* , 12, 219-286.
- Ward, D. M., Weller, R., & Bateson, M. (1990). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* , 345, 63-65.
- Wayne, L. e. (1987). Report of the Ad Hoc Committee on reconciliation of approaches to Bacterial Systematics. *Int J. Syst. Bacteriol.* , 37, 463-464.
- Whitman, W., Coleman, D., & Wiebe, W. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 95, 6578-6583.
- Wirtz, R. (1908). *Cenbl. Bakt., I. Abt., Orig.*, (48), 727-728.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial Evolution. *Microbiol. Rev.* , 51, 221-271.
- Woese, C., Stackebrandt, E., Macke, T., & Fox, G. (1985). A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Syst. Appl. Microbiol.* , 6, 143-151.
- Wynn-Williams, D. (1996). Antarctic microbial diversity: the basis of polar ecosystem processes. *Biodiversity and Conservation* , 5 (11), 1271-1293.
- Yoon, J.-H., Lee, K.-C., Weiss, N., Kho, Y. H., Kang, K. H., & Park, Y.-H. (2001). *Sporosarcina aquimarina* sp. nov., a bacterium isolated from seawater in Korea, and transfer of *Bacillus globisporus* (Larkin and Stokes, 1967), *Bacillus Psychrophilus* (Nakamura, 1984) and *Bacillus Pasteurii* (Chester 1898) to the genus *Sporosarcina* as *Sporo*. *IJSEM* , 1079-1086.
- Zhang, D. C., Wang, H.-X., Liu, H.-C., Dong, X.-Z., & Zhou, P.-J. (2006). *Flavobacterium glaciei* sp. nov., a novel psychrophilic bacterium isolated from the China No. 1 glacier. *IJSEM* , 56, 2921-2925.
- Zhang, D.-C., Liu, H.-C., Xin, Y.-H., Yu, Y., Zhou, P.-J., & Zhou, Y.-G. (2008). *Salinibacterium xinjiangense* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from the China No. 1 glacier. *IJSEM* , 58, 2739-2742.
- Zhang, D.-C., Wang, H.-X., Cui, H.-L., Yang, Y., Liu, H.-C., Dong, X.-Z., et al. (2007). *Cryobacterium psychrotolerans* sp. nov., a novel psychrotolerant bacterium isolated from the China No. 1 glacier. *IJSEM* , 57, 866-869.
- Zhang, T., Barry, R., Knowles, K., Heginbottom, J., & Brown, J. (1999). Statistics and characteristics of permafrost and ground-ice distribution in the northern hemisphere. *Polar Geogr.* , 23, 132-154.

Ziehl, F. (1882). Zur Färbung des Tuberkelbacillus. *Deutsch. Med. Woch.* (8), 451.

Zinder, N., & Lederberg, J. (1952). Genetic exchange in Salmonella. *J. Bacteriology* (64), 679-699.

8. Danksagung

Ich danke allen, die zu dem Gelingen meiner Diplomarbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt...

- ... meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Sylvia & Norbert, für die liebevolle Unterstützung während des gesamten Studiums
- ... meinem Freund Randy, der mich durch alle Höhen und Tiefen begleitet
- ... PD Dr. Dirk Wagner für das Überlassen des Themas und die Betreuung im Rahmen dieser Arbeit
- ... Prof. Dr. Ingo Schneider für die Betreuung im Rahmen dieser Arbeit und für das Erstellen des Zweitgutachtens
- ... Lars Ganzert für die Betreuung im Rahmen dieser Arbeit, die gute Zusammenarbeit und Unterstützung
- ... allen weiteren Mitglieder meiner Arbeitsgruppe, d.h. Juliane Griess, Katharina Feige, Esther Rickert, Hendrik Frenzel und Janosch Malaszkiewicz für das angenehme Arbeitsklima, Ratschläge im Laboralltag und gratis Motivationscoaching und Krisenmanagement
- ... Frau Ursula Hohl für ihre Hilfsbereitschaft, Geduld und Unterstützung bei meinen umfangreichen Versuchsansätzen
- ... apl. Prof. Dr. André Lipski und Friederike Bruns für die zur Verfügung gestellten Proben von Store Koldewey
- ... Ute Bastian, Ulrike Hoff und allen anderen Arbeitskollegen, die im Probenaufbereitungs-, Konferenz- und Pausenraum 0.10 für willkommende Abwechslung gesorgt haben, für die Bewältigung des Laboralltages und weitere unentbehrliche Ratschläge

9. Eigenständigkeitserklärung

Die vorliegende Arbeit habe ich am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in der Forschungsstelle Potsdam angefertigt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Potsdam, 13.05.09

.....

(Felizitas Bajerski)

10. Anhang

Tabelle 10-1: Zusammenfassung der Ergebnisse der Charakterisierung der Isolate

Eigenschaft	LI-1	LI-2	LI-3	LI-4	SK-1	SK-2	SK-3	SK-4
Länge	0,5-2,5 µm	0,5-2,0 µm	0,4-2,5 µm	2,0-10,0 µm	0,4-2,0 µm	2,5-8,0 µm	2,0-3,5 µm	0,8...2,7 µm
Breite	0,3-0,5 µm	~0,5 µm	0,3-0,5 µm	0,5-0,8 µm	0,2-0,4 µm	~0,2 µm	0,4-0,6 µm	0,5-0,8 µm
Gram	-	-	+	+	+	-	-	-
Geißel	+	+	+	+	-	+	+	+
Sporen	-	-	-	-	-	-	-	-
Form	Stäbchen	Stäbchen	kurze Stäbchen	Stäbchen	kurze unregelmäßige Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen (v-förmige Anordnung)	Stäbchen
Koloniefarbe	hellzitronengelb/durchsichtig	crème/eierschale	leuchtend gelb/ nicht durchscheinend	hell beige/ocker	hell-gelb/ nicht durchscheinend	gelb-orange/durchscheinend	hell sonnenblumengelb	weiß/beige/crème
Kolonieform	rund	rund	rund	knopfförmig	rund	rund	rund	rund
Rand	glatt	glatt	glatt	glatt	glatt	wimpernförmig	glatt	wimpernförmig
Profil	leicht erhaben	leicht erhaben	erhaben	konvex	leicht erhaben	flach	leicht erhaben	flach bis leicht erhaben
Oberfläche	stumpf bis leicht glänzend	leicht glänzend	glänzend	eher stumpf bis leicht glänzend	nicht leuchtend/glänzend, eher stumpf	eher stumpf	durchscheinend glänzend	leicht glänzend
Konsistenz	leicht butterartig schleimig	leicht feucht schleimig	feuchtflüssig schleimig	butterartig schleimig	zäh-schleimig/ klebrig	butterartig weich/ leicht klebrig	klebrig zäh-schleimig	fest butterartig bis krisselig
Temperaturspektrum	-6 bis 28°C	-6 bis 28°C	-6 bis 24°C	5 bis 28°C	-6 bis 28°C	0 bis 28°C	-6 bis 28°C	5 bis 28 (32)°C
Temperaturoptimum	16°C	16°C	16°C	16°C	20°C	20°C	16°C	24°C
pH-Spektrum	4,5 bis 9,5	4,0 bis 9,5	4,0 bis 9,5	6,0 bis 8,5	5,0 bis 9,5	5,0 bis 9,0	5,0 bis 9,0	4,0 bis 11,0
pH-Optimum	5,5 bis 6,5	7,5 bis 8,0	6,5	7,5	6,5 bis 7,5	6,5	8,0?	6,0 bis 6,5
NaCl-Toleranz	0-4(5)%	0-9(10)%	0-9(10)%	0-6%	0-3(5)%	0-1,5%	0-4%	0-6%
NaCl-Optimum	1-2%	0-1%	0,5-3%	0-2%	0%	0,5%	0-1,5%	0%
Verhalten gegenüber O₂	aerob	aerob, (fak. anaerob)	aerob (fak. anaerob)	aerob (fak. anaerob)	aerob	aerob, fak. Anaerob	obligat aerob	aerob

Zuckerverwertbarkeit (Säurebildung)								
1) Glucose	+	+	-	+	++	+	+	+
2) Galactose	+	-/+	-	-	+	+/-	+/-	-
3) Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-
4) Maltose	-	-	-	-	+	+/-	+/-	-
5) Mannitol	-	+	-	-	++	-	+/-	-
6) Saccharose	+/-	+/-	-	-	+	+/-	+/-	-
7) Adonit	-	-	-	-	-	-	-	-
8) L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-
9) Dulcitol	-	-	-	+/-	-	-	-	-
10) Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-
11) L-Rhamnose	+	-	+/-	-	-	-	-	-
12) Salicin	+/-	-	-	-	++	+/-	+/-	-
13) Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-
14) Trehalose	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-
15) Xylose	-	-	-	-	+/-	-	+	-
Amylase	+/-	-	-	-	-	+	-	-
Gelatinase	-	-	-	-	-	-	-	-
Protease	-	+/-	-	+/-	-	++	-	++
Indolbildung	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S-Bildung	+	+	+	+	+	+/-	-	-
Harnstoffspaltung	-	+	-	+	-	-	-	-
Katalase	+	+	+	+	+	-	+	+/-
Oxidase	-	-	-	-	-	+	-	+/-
Methylrot-Probe	+/-	-	-	-	+	-	+	+
Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika								
Penicillin	+	+	++	+	-	-	+	-
Ampicillin	-	+	+	++	-	-	+	-
Kanamycin-Sulfat	+/-	+/-	+/-	+	-	-	-	+/-
Neomycin	+	+/-	+	+	+	-	+	+/-
Streptomycin	+	+	+/-	+	+	-	+	+/-
Erythromycin	-	+	+	+	-	-	++	-
Oxytetracyclin	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+/-
Novobiocin	+	+	+	+	+	+	+	-
Rifampicin	+	+	+	++	++	+	+	-
Lysozym	-	-	+/-	+/-	+/-	-	-	-