

Mikrobielle Vielfalt

von **KARL-HEINZ SCHLEIFER** und **MATTHIAS HORN** Lehrstuhl f. Mikrobiologie Technische Universität München-Freising

Spricht man von Artenschutz, Artensterben oder allgemein von Biodiversität, denkt fast jeder nur an die höheren Tiere und Pflanzen. Von Spezialisten ausgenommen, erwähnt kaum jemand die Vielfalt der mit dem bloßen Auge nicht sichtbaren Mikroorganismen, ganz nach dem Motto: „Was ich nicht sehe, interessiert mich nicht“. Als Mikrobiologen möchten wir versuchen, Sie zu überzeugen, dass die Kleinstlebewesen (Prokaryoten), die im Gegensatz zu den höheren Lebewesen (Eukaryoten: Pflanzen, Tiere oder auch Menschen) keinen Zellkern besitzen, eine bedeutende Rolle hinsichtlich der Vielfalt der Lebewesen spielen.

Die zeltkernlosen Organismen dominieren auf unserem Planeten nicht nur bezüglich ihrer Zeltzahl - so ist z.B. der gesunde Mensch mit 10 – 100-mal mehr Bakterienzellen (10^{14} - 10^{15}) besiedelt als er eigene Zellen (10^{15}) enthält -, sondern nach neuesten Schätzungen machen sie auch mehr als die Hälfte der auf der Erde vorkommenden Biomasse aus (siehe Tabelle 1). Nach Schätzungen von WHITMAN et al. (1998) sind ca. 500 Milliarden Tonnen Kohlenstoff in Prokaryoten gebunden, das ist etwa die Hälfte des gesamten in der Biomasse vorkommenden Kohlenstoffs. Bezogen auf Stickstoff und Phosphor sind sogar fast 90% in Prokaryoten gebunden. Die Zahl der auf der Erde vorkommenden Prokaryoten wird auf $4 - 6 \times 10^{30}$ Zellen geschätzt, wobei der größte Teil dieser Organismen im Sediment (90 - 95%) vorkommen soll.

Tabelle 1: Geschätzte Menge an gebundenem Kohlenstoff, Stickstoff und Phosphor in den auf der Erde vorkommenden Prokaryonten (nach Whitman et al., 1998)

Substanz	Gebundene Menge in Tonnen	im Vergleich zu der in Pflanzen gebundenen Menge
Kohlenstoff	$3,5 - 5,5 \times 10^{11}$	60 – 100 %
Stickstoff	$0,9 - 1,4 \times 10^{11}$	10-mal mehr
Phosphor	$0,9 - 1,4 \times 10^{11}$	10-mal mehr

Im Folgenden sollen skizzenhaft einige charakteristische Eigenschaften der Prokaryoten genannt werden, die ihre besondere Bedeutung im Vergleich zu anderen Lebewesen aufzeigen.

Die Prokaryoten stellen die Grundlage der Biosphäre dar und besiedeln seit ca. 3.5 Milliarden Jahren unseren Planeten. Sie waren aber nicht nur die ersten, sondern auch für die längste Zeit der Erdgeschichte die einzigen Lebewesen. Überdies produzierten sie als erste Organismen freien Sauerstoff und schufen so die Voraussetzung für die Entstehung von Pflanzen und Tieren. Ohne Mikroorganismen wäre der vollständige Abbau von organischen Stoffen in anorganische nicht möglich. Insbesondere die Stickstoff- und Schwefelkreisläufe sind ebenso wie Metallreduktionen auf die Aktivität der Prokaryoten angewiesen. Viele stoffwechselfysiologische Leistungen wie z.B. chemolithotrophes Wachstum, d.h. die Verwendung anorganischer an Stelle von organischen Energiequellen, wie sie von den heterotrophen höheren Lebewesen genutzt werden, sind auf Prokaryoten beschränkt. Auch spezielle Gärungen, Stickstofffixierung, Methanbildung oder anoxygene Photosynthese ebenso wie viele ungewöhnliche Syntheseleistungen (sekundäre Metabolite wie z.B. viele Antibiotika oder Toxine) findet man nur bei diesen Mikroorganismen.

Auch die Grenzen der Lebensmöglichkeiten werden durch Prokaryoten festgelegt. Sie kommen auf der Erde überall dort vor, wo die physikalischen und chemischen Gegebenheiten prinzipiell die Existenz von Leben erlauben. So gibt es viele Prokaryoten, die in heißen Quellen vorkommen. Sie können noch bei Temperaturen bis 113 °C wachsen, bei 90 °C wird es ihnen bereits zu kalt. Andererseits konnte man inzwischen lebende Bakterien nachweisen, die unter einem vier Kilometer dicken Eispanzer in einem

Süßwasserssee der Antarktis vorkommen. Überdies gibt es keine natürlichen Stoffe, die nicht von Mikroorganismen abgebaut werden, aber auch viele synthetisch hergestellte Stoffe können von diesen Organismen verwertet werden. Es gibt sogar Bakterien, die auf Cyanid als einziger C- und N-Quelle wachsen können.

Die Anpassung vieler höherer Lebewesen an bestimmte Standorte wurde erst durch Symbiose mit Mikroorganismen möglich. Viele wesentliche Besonderheiten von Lebensgemeinschaften sind nicht unmittelbar aus den Eigenschaften der einzelnen Organismen ableitbar, sondern sind das Ergebnis der mannigfaltigen Interaktionen zwischen den einzelnen Mitgliedern der Biozönose. Dies trifft in besonderem Maße auf Lebensgemeinschaften zu, an denen Mikroorganismen beteiligt sind, da diese über ein breites Repertoire an Stoffwechselleistungen verfügen und oft erst in Wechselwirkung mit anderen Organismen als Ekto- oder Endosymbionten ihre für das Ökosystem typischen Funktionen ausbilden (zur Endosymbiose siehe nachfolgenden Beitrag von KLAUS KOWALLIK). Ein typisches Beispiel hierfür sind bestimmte Röhrenwürmer in der Tiefsee, die auf ihre bakteriellen Endosymbionten als Nahrungsquelle angewiesen sind. Diese Endosymbionten stellen Sulfide, Sauerstoff und Kohlendioxid zum Wachstum zu Verfügung.

Obwohl ein Großteil der bekannten genetischen, physiologischen und biochemischen Vielfalt bei den Mikroorganismen zu finden ist, spielen sie in Bezug auf die organismische Biodiversität nur eine untergeordnete Rolle (Tabelle 2). Im Vergleich zu fast einer Million Insektenarten sind zur Zeit nur ca. 5000 Prokaryotenarten bekannt. Bei diesen sehr unterschiedlichen Zahlen muss zusätzlich berücksichtigt werden, dass jedes Insekt in seinem Verdauungstrakt Millionen bzw. sogar Milliarden von Prokaryoten enthält.

Gruppe	Zahl der beschriebenen Arten	Zahl der geschätzten Arten	% bekannte Arten
Mikroorganismen			
Prokaryoten	5	> 1000	<0,5
Pilze	72	1500	4,8
Protozoen	40	200	20
Algen	40	400	10
Pflanzen	270	320	84
Tiere			
Nematoden	25	400	6
Crustaceen	40	150	26
Insekten	950	8000	12
Wirbeltiere	45	45	90

Warum ist so wenig über diese Prokaryoten bekannt?

Der Hauptgrund für die beschränkte Zahl an bekannten Arten liegt darin, dass die Beschreibung neuer Arten von Prokaryoten fast ausschließlich auf Reinkulturen beruht, die mit klassischen Kultivierungsverfahren isoliert wurden. Mit Hilfe dieser Isolierungsverfahren lässt sich aber nur ein Bruchteil der in der Natur vorhandenen Prokaryoten isolieren (Tabelle 3). Folglich gehen aktuelle Schätzungen davon aus, dass man heute weit weniger als 1 % der tatsächlich in der Natur vorkommenden Prokaryotenarten kennt, d.h., die Mikroorganismen stellen in puncto Diversität die mit großem Abstand am wenigsten erforschten Lebewesen dar.

Habitat	Kultivierbar (in %)
Boden	0,3
Sediment	0,25
Süßwasser	0,1 – 0,5
Meer	< 0,1
Belebtschlamm	3 – 15

Durch die vergleichende Sequenzanalyse informativer Makromoleküle, hier vor allem des Gens, das für die Ribonukleinsäure der kleinen Untereinheit des Ribosoms kodiert, die 16S- rRNS der Prokaryoten bzw. die 18S-rRNS der Eukaryoten, kann man heute einen Stammbaum der Lebewesen rekonstruieren (WOESE, 1987; LUDWIG & SCHLEIFER, 1999), der sich in die drei Reiche (Domänen) *Archaea*, *Bacteria* und *Eucarya* unterteilen lässt (WOESE et al., 1990, Abb. 1). Hierbei fällt auf, dass die Vertreter von zwei der drei Reiche zu den Prokaryoten gehören.

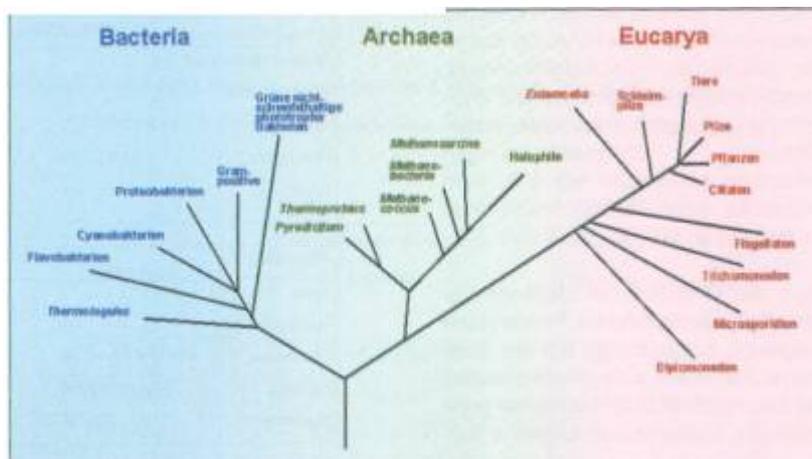


Abb.1: Stammbaum der drei Reiche (Domänen) des Lebens, basierend auf vergleichender Sequenzanalyse der ribosomalen Ribonukleinsäure (rRNS). Die Verwendung verschiedener mathematischer Verfahren erlaubt die Rekonstruktion der Entwicklungsgeschichte (Phylogenie) aller Lebewesen anhand von Unterschieden in der Basenabfolge der rRNS (Nukleotidsequenz). Heute ist die Sequenz der 16S- bzw. 18S-rRNS, bzw. deren Gene (rDNS), von mehr als 18.000 prokaryotischen und eukaryotischen Organismen bekannt. Diese Sequenzen dienen als Grundlage zur Identifizierung und Klassifizierung von Mikroorganismen.

Nachweismethoden

In den letzten fünfzehn Jahren wurden molekularphylogenetische Methoden entwickelt, die eine kultivierungsunabhängige Identifizierung der Mikroorganismen erlauben (AMANN et al., 1995). Hierbei spielt wiederum die rRNS eine herausragende Rolle. Auf Grund des unterschiedlichen Konservierungsgrades verschiedener Sequenzabschnitte innerhalb des rRNS-Moleküls können Nukleinsäuresonden unterschiedlich breiter Spezifität zielgerecht entworfen werden. Diese Nukleinsäuresonden, auch Gensonden genannt, bestehen aus einzelsträngigen Oligonukleotiden oder DNS-Fragmenten, die komplementäre einzelsträngige Nukleinsäureabschnitte erkennen und mit ihnen ein stabiles Paar (Hybrid) bilden. Durch entsprechende Markierung der Gensonden können nach spezifischer Paarung die stabilen Hybride eindeutig nachgewiesen werden. In Abbildung 2 ist die Gensondentechnik schematisch dargestellt.

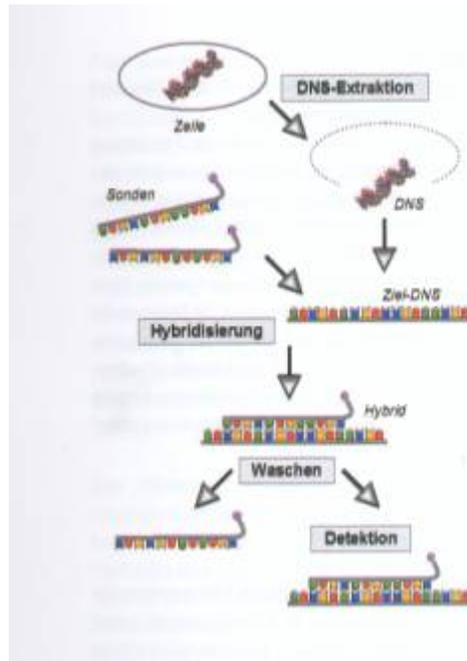


Abb.2 Prinzip der Gensondentechnik. Die Gensondentechnik ermöglicht den Nachweis einer bestimmten Nukleotidsequenz in einem DNS-Gemisch. Dafür wird die DNS aus den zu untersuchenden Zellen extrahiert, in Einzelstränge zerlegt und mit den markierten, einzelsträngigen Gensonden zusammengebracht. Selektive Reaktionsbedingungen führen zur Bildung eines Hybrids, bestehend aus der Gensonde und zellulärer DNS (Dieser Vorgang wird als Hybridisierung bezeichnet). Ein anschließender Waschschritt entfernt nicht-gebundene Gensonden. Das entstandene Hybrid kann über die Markierung der gebundenen Gensonden nachgewiesen werden.

Die gegen die rRNS-gerichteten Oligonukleotidsonden haben einen weiteren wichtigen Vorteil. In aktiven, wachsenden Bakterienzellen können bis zu einhunderttausend Ribosomen pro Zelle vorkommen und damit genau so viele 16S- und 23S-rRNS-Moleküle. Dadurch kann an eine Zelle eine genügend große Menge an Sonden binden, um sie bei geeigneter Markierung, z.B. mit Fluoreszenzfarbstoffen, im Mikroskop sichtbar zu machen. Mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Sonden ist es daher möglich, Mikroorganismen auch ohne vorherige Kultivierung in situ, d.h. unmittelbar in der Probe, nachzuweisen und zu identifizieren (Abb. 3). Diese sog. **FISH** (*fluoreszente In-situ-ybridisierung*)-Technik wird an unserem Lehrstuhl seit über 10 Jahren angewendet, um die mikrobielle Diversität in verschiedenen Umweltproben zu untersuchen (SCHLEIFER et al. 1992; AMANN et al. 1995; SCHLEIFER & WAGNER, 1998). Ein Beispiel für die In-situ-Identifizierung von Einzelzellen in einem Bakteriengemisch ist in Abb. 3 wiedergegeben. Durch den Einsatz von drei verschiedenen fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden können sogar bis zu sieben phylogenetisch verschiedene Bakterien in einem Gemisch unterschieden werden (Abb. 4).

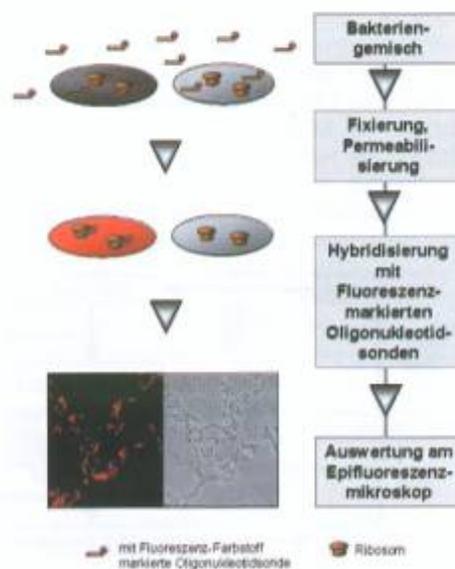


Abb.3: Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung arbeitet nach dem Prinzip der Gensondentechnik. Die Hybridbildung erfolgt hier jedoch innerhalb der Zielzellen (in situ). Dafür muss die Umweltprobe zunächst fixiert, d.h. die Bakterien abgetötet und die Zelhülle der Bakterien durch chemische Behandlung für die Sonden durchlässig gemacht werden. Die verwendeten Gensonden sind kurze, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte DNS-Einzelstränge (Oligonukleotide). Diese binden an die ribosomale rNS, die in mehreren tausend Kopien in jeder Zelle vorliegt. Wird der auf diese Weise in den Zielzellen gebundene Fluoreszenzfarbstoff unter einem Epifluoreszenzmikroskop angeregt, leuchten die Zielzellen auf.

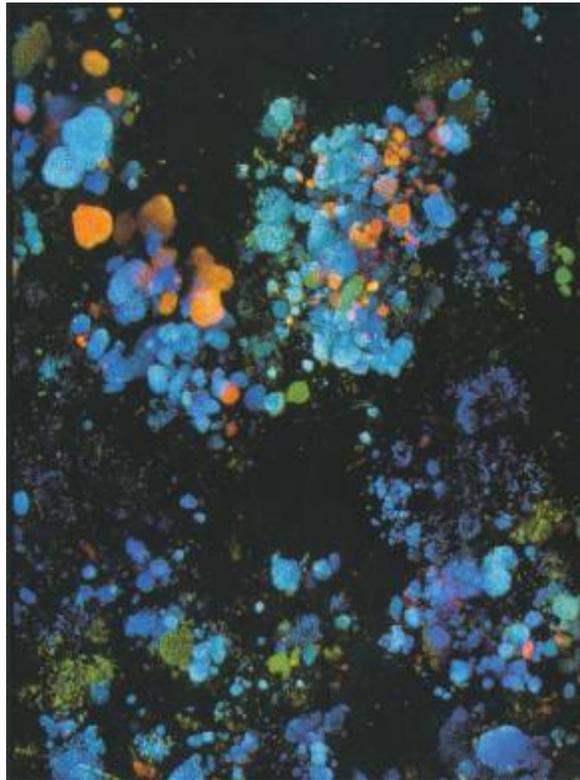


Abb.4 Mikrobielle Population in einer Belebtschlammflocke. Sichtbar durch Fluoreszente In-situ-Hybridisierung (FISH)

Photo: Holger Daims
 Untersuchung komplexer mikrobieller Populationen mittels FISH. Durch den simultanen Einsatz dreier verschiedenfarbig (rot, grün und blau) markierter Sonden mit unterschiedlicher Spezifität können in einer Probe gleichzeitig bis zu sieben verschiedene Bakteriengruppen identifiziert und visualisiert werden. Wenn alle drei Sonden binden, erscheint die Bakterienzelle weiß (Bildmitte). Wenn z.B. die rote und grüne Sonde gleichzeitig bindet, färbt sich die Zelle gelb. Die abgebildete Hybridisierung einer Belebtschlammflocke wurde mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) aufgenommen,

Wie kann man nun diese Sonden einsetzen, um die mikrobielle Vielfalt zu erforschen?

Es gibt grundsätzlich zwei unterschiedliche Ansätze: Erstens für wenig komplexe Umweltproben, die nur einige verschiedene Mikroorganismen enthalten (z.B. Symbionten) oder bei denen diese Mikroorganismen angereichert werden können (z.B. magnetotaktische Bakterien); zweitens für komplexe Umweltproben, in denen zahlreiche, verschiedene Mikroorganismen vorkommen.

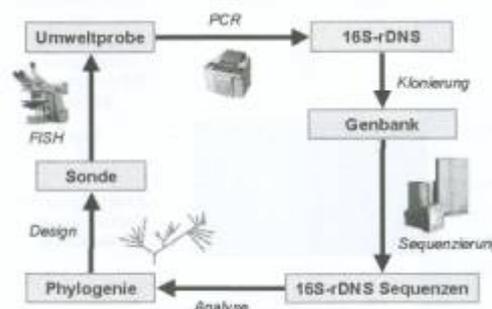


Abb.5 Der „Full cycle rRNA approach“. Das vollständige rRNS-Verfahren ermöglicht die Identifizierung und phylogenetische Charakterisierung unbekannter, nicht kultivierbarer Mikroorganismen. Dazu wird aus der zu untersuchenden Umweltprobe DNS isoliert. Anschließend werden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) die für die rRNS codierenden Gene vervielfältigt. Durch Klonierung der PCR-Produkte in *E.coli* gelingt die Vereinzelung der verschiedenen rRNS-Sequenzen: Man erhält eine sogenannte rRNS-Genbank. Die einzelnen rRNS-Gene werden sequenziert. Der computergestützte Vergleich der ermittelten rRNS-Gensequenzen mit in öffentlichen Datenbanken abgelegten Referenzsequenzen ermöglicht die Identifizierung der in der Umweltprobe vorhandenen Bakterien. Basierend auf diesen Sequenzen können spezifische Oligonukleotidsonden für den Nachweis einzelner in der Genbank identifizierten Bakterien oder Bakteriengruppen entworfen werden. Mit der Anwendung dieser Sonden in der FISH-Analyse der Umweltprobe ist der „full cycle“-rRNS-Ansatz vollständig: Die Bakterien können direkt in der Probe visualisiert werden.

Für wenig komplexe Umweltproben kommt das sog. vollständige rRNS-Verfahren zum Einsatz, das in

Abb. 5 schematisch wiedergegeben ist. Mit Hilfe dieses Verfahrens ist es z.B. möglich, obligate bakterielle Endosymbionten, die bisher nicht kultivierbar sind, nach In-vitro-Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung ihrer 16S- rRNS-Gene sowie In-situ-Hybridisierung mit spezifischen Sonden auf phylogenetischer Ebene zu identifizieren. (siehe beispielhaft Abb. 7 nächste Seite).

Bei diesen und ähnlichen Untersuchungen an komplexeren Umweltproben konnte festgestellt werden, dass fast alle aus diesen Proben erhaltenen 16S-rRNS-Sequenzen nicht identisch mit denen von kultivierbaren Organismen sind und dass ein Drittel der bisher beschriebenen bakteriellen Entwicklungslinien ausschließlich auf „Umweltsequenzen“ von bisher nichtkultivierbaren Bakterien basiert (HUGENHOLTZ et al., 1998).

Für die Untersuchung komplexer Biotope haben wir das sog. Top-to-bottom Verfahren entwickelt (AMANN et al. 1995), das schematisch in Abb. 6 dargestellt ist. Hierbei werden auf der Basis eines umfangreichen rRNS-Sequenzdatensatzes (zur Zeit ca. 22.000 Sequenzen) in einem hierarchischen Ansatz Sonden mit zunehmender Spezifität entwickelt; ausgehend von umfassenden Sonden, die gesamte Domänen bzw. Entwicklungslinien erfassen, über gruppen- und gattungs- bis zu artspezifischen Sonden.



Abb. 6 Das „Top-to-bottom“-Verfahren. Der „Top-to-bottom“-Ansatz ermöglicht die phylogenetische Charakterisierung komplexer mikrobieller Lebensgemeinschaften mittels FISH unter Verwendung eines hierarchischen SONDENSATZES. Der Einsatz eines DNS-Farbstoffes erlaubt dabei das Anfärben aller Zellen in der untersuchten Umweltprobe und gibt so über die Gesamtzellzahl Auskunft. Durch den Vergleich der Gesamtzellzahl mit der Anzahl der mit so genannten Universal-Sonden (die bis zu 95 % aller Bakterien erfassen) detektierbaren Zellen wird der Anteil der mit FISH nachweisbaren Bakterienzellen ermittelt. Die Anwendung von gruppen-, gattungs- und artspezifischen Sonden erlaubt schließlich detaillierte Aussagen über die Zusammensetzung der untersuchten Umweltprobe.

Quantitative Analysen der mikrobiellen Populationsstruktur und -dynamik können so kultivierungsunabhängig durch manuelles Auszählen der fluoreszenzmarkierten Zellen unter dem Epifluoreszenzmikroskop oder durch Berechnung des Biovolumens der spezifisch markierten Bakterienpopulation mittels Kombination von konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie und digitaler Bildverarbeitung (WAGNER et al., 1998) erfolgen. Durch diese Untersuchungen konnte eindeutig gezeigt werden, dass mit Hilfe der FISH-Technik ein wesentlich höherer Anteil der im Mikroskop erkennbaren Gesamtpopulation identifiziert werden kann als mit den klassischen Kultivierungsmethoden. In manchen Fällen liegt er sogar bei 95%, während nur 10% oder weniger kultiviert werden können. Aber es gibt nicht nur quantitative Unterschiede, sondern was für ökologische Aussagen noch wichtiger ist, auch sehr deutliche qualitative Unterschiede, die dadurch bedingt sind, dass alle Kultivierungsbedingungen selektiv bestimmte Gruppen bevorzugen oder diskriminieren. Die neuen molekularbiologischen Methoden spiegeln daher sowohl quantitativ als auch qualitativ die tatsächliche mikrobielle Vielfalt eindeutig besser wider als die bisher verwendeten klassischen Methoden.

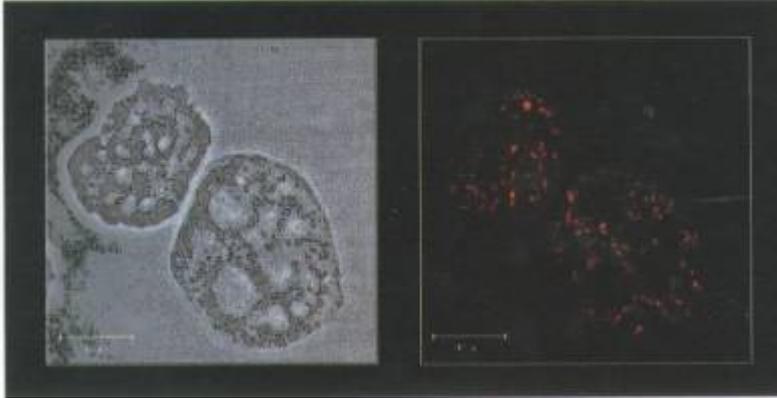


Abb.7 Identifizierung obligat bakterieller Endosymbionten freilebender Amöben. Durch Anwendung des vollständigen rRNS-Verfahrens können beispielsweise symbiontische Bakterien identifiziert werden, die außerhalb ihrer Wirtszellen nicht kultivierbar sind. Hier ist der In-situ-Nachweis von *Paracaedibacter symbiosus*, einem obligaten Endosymbionten bestimmter Acanthamöben, mittels spezifischer 16S-rRNS-gerichteter Oligonukleotidsonden abgebildet. Linkes Bild: Phasenkontrast; rechtes Bild: Spezifischer Nachweis von *Paracaedibacter symbiosus*, Endosymbionten einer bestimmten Bodenamöbe (*Acanthamoeba* sp. UWE39).

Der Einsatz rRNS-gerichteter Oligonukleotidsonden ist, wie oben dargestellt, eine sehr gute Methode, um die mikrobielle Populationsstruktur in Umweltproben aufzuklären, aber sie ermöglicht im Allgemeinen keine Aussagen über die Funktion der nachgewiesenen Organismen in ihrem Ökosystem, da die phylogenetische Verwandtschaft nur in wenigen Fällen einen Hinweis auf gemeinsame physiologische Eigenschaften zulässt.

Wie können wir mehr über die Eigenschaften dieser Bakterien erfahren? Die Isolierung der entsprechenden Bakterien in Reinkultur und eine anschließende genaue genetische und biochemische Charakterisierung wären sicherlich die beste Lösung. Leider reichen hierfür die klassischen Methoden nicht aus, daher versucht man neue Ansätze wie die Kultivierung nach Ausschlussverdünnung, um die quantitativ dominierenden Bakterien zu erfassen. Eine weitere Möglichkeit ist die Anreicherung durch Kokultivierung oder durch Zeltsortierung mit Durchflusszytometrie oder optischer Pinzette. Eine andere vielversprechende Methode ist die rRNS-gestützte Isolierung. Hierbei werden die Isolate durch Sondenhybridisierung überprüft, um Verwechslungen wegen morphologischer Veränderungen, die nach der Kultivierung auftreten können, zu vermeiden und überdies bereits bekannte Bakterien rasch zu erkennen und damit von weiteren Untersuchungen auszuschließen.

Eine zusätzliche Möglichkeit, mehr über Aktivität und physiologische Eigenschaften von Bakterien ohne vorherige Kultivierung zu erfahren, ist die Kombination aus FISH und Mikroautoradiographie (Lee et al. 1998; Abb. 8). Hierbei wird die Umweltprobe zuerst mit radioaktiv-markiertem Substrat inkubiert, dann fixiert und anschließend mit fluoreszenzmarkierten Sonden hybridisiert, mit einer Filmemulsion bedeckt und wieder inkubiert. Radioaktiv-markierte Zellen setzen in der Filmemulsion schwarze Silberpartikel frei. Der Vorteil dieser Methode ist, dass einerseits die Lebensfähigkeit der identifizierten Zellen bewiesen wird und andererseits die Substrataufnahmespektren unter verschiedenen Bedingungen, z.B. mit oder ohne Sauerstoff, untersucht werden kann. Durch diese Methode erhält man wichtige Hinweise, unter welchen Bedingungen (Substrat, Inkubation mit oder ohne Sauerstoff usw.) eine mögliche Kultivierung der Bakterien möglich sein könnte.



Abb.8 Funktionelle In-situ-Analyse nicht-kultivierter Mikroorganismen. Die Kombination von FISH und Mikroautoradiographie (MAR) ist eine Methode zur Untersuchung von Substrataufnahmespezifitäten unkultivierter Bakterien. Dabei wird die Umweltprobe zunächst mit radioaktiv markiertem Substrat inkubiert und anschließend fixiert. Die zu untersuchenden Bakterien werden dann mittels FISH markiert, die Probe auf einen Objektträger gebracht und mit einer fotografischen Emulsion überzogen. Bakterien, die das zugegebene Substrat aufgenommen haben, führen durch Bildung von elementarem Silber zur Schwärzung der fotografischen Emulsion. Die Auswertung der Objektträger geschieht mit Hilfe eines inversen konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (CLSM) und erlaubt Aussagen über die Substrataufnahme-Kapazitäten der mittels FISH visualisierten Bakterien. Im hier gezeigten Beispiel wird demonstriert, dass die grün leuchtenden Bakterien die Fettsäure Propionat aufnehmen können. Durch weitere Untersuchungen mit anderen Substraten kann so ein Substrataufnahme-Profil für bisher nicht kultivierbare Mikroorganismen erstellt werden, das beim Entwurf einer Kultivierungs-Strategie für diese Bakteriengruppe helfen kann.

In einer weiteren Studie konnten wir zeigen, dass eine Anreicherung fixierter (toter) Bakterienzellen mit Hilfe rRNS-gerichteter Polynukleotidsonden möglich ist (STOFFELS et al. 1999; Abb. 9). Hierbei wird eine spezifische Region eines rRNS-Gens, die komplementär zum rRNS-Molekül ist, in vitro amplifiziert und gleichzeitig während der Synthese mit Biotin markiert. Die Zellen werden durch die Fixierung für die Sonde durchlässig gemacht, so dass sie spezifisch an die Ribosomen in der Zelle binden kann. Die mit der Sonde reagierenden Bakterien können mit paramagnetischen Partikeln, die mit Streptavidin beschichtet sind und dadurch spezifisch an Biotin binden, angereichert werden. Die Bakterien sind zwar nicht mehr lebensfähig, aber ihre genetische Information bleibt erhalten und die DNS kann isoliert und näher untersucht werden.



Abb. 9 Anreicherung von Bakterien aus einer komplexen Umweltprobe mittels rRNS-gerichteter Polynukleotidsonden. Die große Mehrheit der Bakterien kann nicht im Labor kultiviert werden. Mittels rRNS-gerichteter Sonden ist es jedoch möglich, gezielt bestimmte Mikroorganismen aus einer komplexen Umweltprobe zu isolieren. Dabei werden im Gegensatz zur FISH wesentlich längere Sonden (so genannte Polynukleotidsonden mit einer Länge von mehreren hundert Nukleotiden) eingesetzt, die nach der Hybridisierung aus den Zellen herausragen. Diese Sonden werden mehrfach mit Biotin markiert, ein Molekül, das eine stabile Bindung mit Streptavidin eingehen kann. Nach erfolgter Fixierung und Hybridisierung werden Streptavidin-beschichtete, paramagnetische Kügelchen zur Probe zugegeben. Diese binden über das Streptavidin an die Biotin-markierten Sonden und somit an die gewünschten Bakterienzellen. Die gesamte Umweltprobe wird nun in eine Säulenmatrix gebracht, die sich in einem Magnetfeld befindet. Aufgrund des Magnetfeldes verbleiben die paramagnetisch markierten Zielzellen in der Säule, während nichtmarkierte Bakterien die Säulenmatrix ungehindert passieren und ausgespült werden. Entfernt man anschließend die Säule aus dem Magnetfeld, so können die markierten Zellen ausgewaschen und in einem separaten Gefäß aufgefangen werden. Die auf diese Weise angereicherten, allerdings toten Zielorganismen stehen nun für weitergehende molekulare Untersuchungen zur Verfügung. Am Beispiel einer Belebtschlammflocke aus einer Abwasserreinigungsanlage ist klar ersichtlich, dass nur die mit der fluorescein-markierten Oligonukleotidsonde reagierenden Bakterien (grün) in der Lage sind, radioaktiv-markiertes Propionat aufzunehmen (Abb. 8).

Was bringt die Zukunft hinsichtlich der mikrobiellen Vielfalt?

Methodische Verbesserungen sind dringend erforderlich, um eine schnellere Erfassung der Populationsstruktur zu ermöglichen. Hier spielen in Zukunft sicherlich die sog. DNS-Chips eine wichtige Rolle. Ein Arsenal verschiedenster Oligonukleotidsonden wird hierbei auf kleinster Fläche an entsprechendes Trägermaterial gebunden. Sie können sowohl für die Erfassung der Populationsstruktur dienen, wenn sie mit entsprechenden dienen, wenn sie z.B. gegen die rRNS gerichtet sind, oder aber auch wichtige Aussagen zur Funktion ermöglichen, wenn sie mit entsprechenden mRNS-Molekülen reagieren. Die Isolierung, Klonierung (bzw. In-vitro-Amplifikation) und anschließende Sequenzierung sowie Expression größerer, unmittelbar aus der Umwelt gewonnener DNS-Abschnitte oder sogar ganzer Genome von nicht-kultivierbaren Prokaryoten werden unsere Kenntnisse über deren Funktion und physiologischen Fähigkeiten erheblich erweitern. Außerdem wird es dadurch möglich sein, das riesige genetische und biotechnologische Potenzial dieser Organismen gezielt zu nutzen. Die Datenverarbeitung muss optimiert und ausgebaut werden. Neben den Organismen-spezifischen rRNS-Sequenzdatenbanken benötigen wir in Zukunft auch gen- und funktionspezifische Sequenzidentifikatoren für Diversitätsanalysen. Programme sollen erstellt werden, um bisher unbekannte Entwicklungslinien vorherzusagen und aufzufinden.

Verbesserte bzw. neue Kultivierungsverfahren sind notwendig, um die in der Umwelt dominierenden Keime in Rein- oder zumindest in Anreicherungskulturen anzuziehen und ihre Eigenschaften näher zu untersuchen. Damit könnten wir auch Erkenntnisse über ihre Bedeutung für das Ökosystem und ihre Interaktion mit anderen Organismen gewinnen. Gerade die Zell-Zellkommunikation zwischen diesen Einzelzellern durch spezifische Signalmoleküle ergaben in jüngster Zeit neue Einblicke in die Regulation von Virulenzfaktoren, Enzym- und Antibiotika-Produktion (EBERL 1999)

Dass die ungeheure Diversität der Mikroorganismen nicht nur für den Spezialisten von großer Bedeutung ist, sondern dass dies auch von anderen Wissenschaftlern erkannt wird, möchten wir durch zwei abschließende Zitate belegen:

EDWARD O. WILSON schreibt in seinem Buch „*The Diversity of Life*“: „The bacteria await biologists as the black hole of taxonomy. Few scientists have tried to dream of how all that diversity can be assayed and used“.

Der ebenfalls an der Harvard University lehrende Paläontologe und Evolutionsbiologe STEPHEN JAY GOULD schreibt: „...we live in the Age of Bacteria. As it was in the beginning, is now and ever shall be, until the world ends“ (In: *Full House. The Spread of Excellence from Plato to Darwin*).

Literaturhinweise

- AMANN, R.L., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K.H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143 –169
- HUGENHOLTZ, P., GOEBEL, B.M., PACE, N.R. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180: 4765 – 4774
- LEE, N., NIELSEN, P.H., ANDREASEN, K.H., JURETSCHKO, S., NIELSEN, J.L., SCHLEIFER, K.H., WAGNER, M. 1999. Combination of fluorescent in situ hybridization and microauto-radiography - a new tool for structure function analyses in microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1289 – 1297
- LUDWIG, W., SCHLEIFER, K.H. 1999. Phyogeny of bacteria beyond the 16S rRNA standard. *ASM News* 65: 752 – 757
- SCHLEIFER, K.H., LUDWIG, W., AMANN, R. 1992. Gensonden und ihre Anwendung in der Mikrobiologie. *Naturwissenschaften* 79: 213 – 219
- SCHLEIFER, K.H., WAGNER, M. 1998. In situ detection and identification of bacteria Prior to their cultivation. *Bioscience Microflora* 17:15 - 22.
- STOFFELS, M., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K.H. 1999. rRNA probe-based cell fishing of bacteria. *Environ. Microbiol.* 1:259-271
- WAGNER, M., HUTZIER, P., AMANN, R. 1998. 3-D analysis of complex microbial communities by combining confocal laser scanning microscopy and fluorescence in situ hybridization (FISH). In: *Digital Image Analysis of Microbes* (WILKINSON, M.H.F., SCHUT, F. eds.); pp.467-486. John Wiley & Sons, Chichester, UK
- WHITMAN, W.B., COLEMAN, D.C., WIEBE, W.J. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6578 - 6583
- WOESE, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221 –271
- WOESE, C.R., KANDIER, O., WHEELIS, M.L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal of the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4576 – 4579