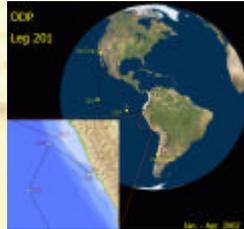


# Neue Ansätze zur Kultivierung mariner Sedimentbakterien

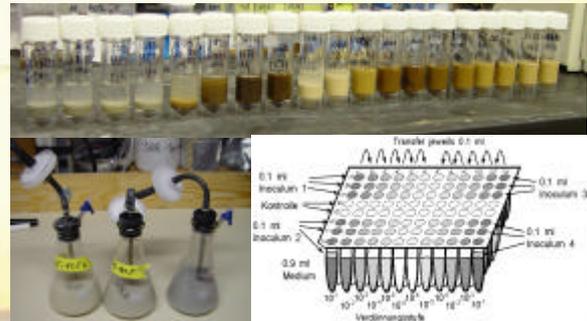
Heribert Cypionka, Bert Engelen und Henrik Sass

Institut für Chemie und Biologie des Meeres (ICBM), Universität Oldenburg, D-26111 Oldenburg

[www.icbm.de/pmbio](http://www.icbm.de/pmbio)



Die ODP-Fahrt 201 hatte zum ersten Mal mikrobiologische Fragestellungen zur 'deep biosphere' in den Sedimenten als Schwerpunkt. Links die JOIDES Resolution in Valparaiso (Chile).



**Kultivierung in Mikrotiter-Platten.** Zunächst werden Sedimentproben in sterilem Meerwasser als 'Slurries' aufgeschlämmt (oben Site 1231, links Site 1225). Rechts eine Mikrotiter-Platte für Kultivierungsversuche in Verdünnungsreihen. Aus dem Muster bewachsener Vertiefungen lässt sich nach dem statistischen MPN-Verfahren die Anzahl der wachstumstfähigen Keime ermitteln. Es können Subkulturen zur Gewinnung von Reinkulturen angelegt werden. Außerdem lassen sich die vorhandenen Nucleinsäuren (DNA und RNA) mit molekularbiologischen Methoden analysieren.

## Zusammenfassung

Marine Sedimente enthalten eine erheblichen Teil der lebenden Biomasse der Erde. Allerdings kann man in traditionellen Kulturmedien nur ein verschwindend geringen Teil davon zum Wachstum bringen. Die meisten Sedimentbakterien gelten als 'unkultivierbar', ungeschützt der Tatsache, dass sie in den Sedimenten zu hohen Populationsdichten herangewachsen sind. Wir wissen sehr wenig über ihre Anpassungen und Leistungen.

In unserer Arbeitsgruppe versuchen wir neuartige Ansätze zu Kultivierung, die auf die Bedingungen in natürlichen Sedimenten zugeschnitten sind. Hierbei nutzen wir

- (1) nicht-selektive Medien, die Wachstum von verschiedenen Prokaryoten ermöglichen. Diese Medien enthalten verschiedene Mischungen von Monomeren, Polymeren, schwer abbaubaren Verbindungen oder auch Sedimentextrakt als Substrat.
- (2) Die eingesetzten Substratkonzentrationen sind sehr niedrig (0 bis 100  $\mu\text{M}$ ).
- (3) Es werden den flüssigen Medien Partikel zugesetzt, etwa FeS-Präzipitate, die gleichzeitig als mildes Reduktionsmittel wirken.
- (4) Syntrophe Wechselwirkungen zwischen den Bakterien werden gefordert, sowohl durch den Einsatz der komplexen Substrate als auch durch den Einsatz von Hintergrundbakterien zu Sediment-Verdünnungsreihen.

In unseren Medien können keine hohen Zelldichten entstehen. Außerdem müssen wegen der Partikel und der bereits zugesetzten Bakterien besonders empfindliche Analyseverfahren eingesetzt werden. Hierzu zählen der Einsatz von Radioisotopen, etwa zum Nachweis der Sulfidbildung aus  $^{35}\text{S}$ -Sulfat. Bakterien in den Kulturen müssen mit Fluoreszenzfarbstoffen sichtbar gemacht werden. Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) und andere molekularbiologische Methoden werden zur Identifizierung und Differenzierung der Mikroorganismen eingesetzt.

## Medien

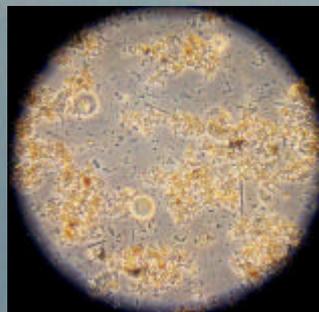
- Künstliches Meerwasser
- FeS: Partikel und Reduktionsmittel
- Substralmische in niedriger Konzentration
- Fünf verschiedene Standard-Medien:
  - [Mono]: 36 verschiedene Monomere (je 100  $\mu\text{M}$ )
  - [Poly]: Polymere: Chitin, Xylan, Cellulose, Pepton
  - [Aro]: Zehn aromatische Verbindungen und sieben langkettige Fettsäuren
  - [Sed]: Extrakt aus Wattenmeer-Sediment
  - [Lac]: Lactat als klassisches Substrat für Sulfatreduzierer

## Variationen

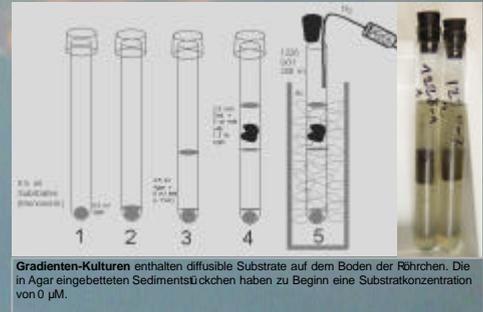
- Radiotracer-MPN ( $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ )
- Sulfatfreies Medium (für sulfatfreie Standorte)
- Pasteurisation um sporiulierte Zellen zu zählen
- Sauerstoff für (fakultativ) aerobe Bakterien
- Background-Bakterien (Sulfatreduzierer, die Sauerstoff verbrauchen und syntroph die Oxidation komplexer Substrate erleichtern)



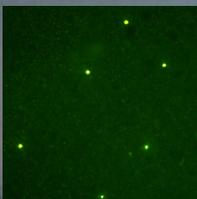
Ankunft eines Kern auf dem 'Catwalk'. Sulfidreiche Sedimentkerne werden unter Schutzmasken bearbeitet.



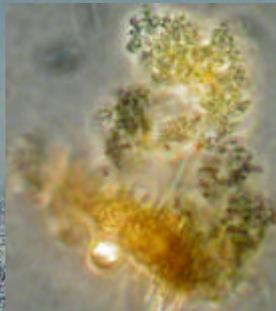
Blick auf eine Sedimentaufschlammung. Diatomeenschalen prägen das Bild, Bakterien sind kaum zu erkennen.



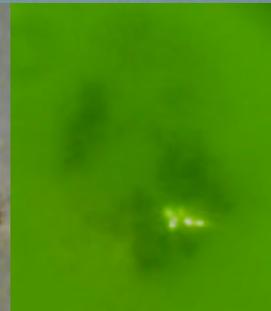
**Gradienten-Kulturen** enthalten diffusible Substrate auf dem Boden der Röhrchen. Die in Agar eingebetteten Sedimentsdickchen haben zu Beginn eine Substratkonzentration von 0  $\mu\text{M}$ .



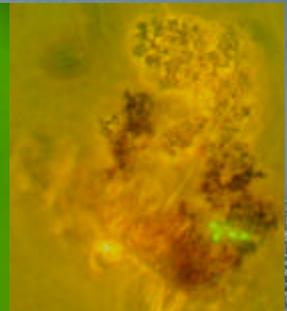
**Kontaminationskontrolle.** Fluoreszierende Kügelchen (beads) mit 0,5  $\mu\text{m}$   $\varnothing$  zeigen eine evtl. Kontamination der Sedimentproben mit Bohr- oder Meerwasser an. Außerdem wird der Bohrfüssigkeit ein chemischer Indikator zugegeben, der im Gaschromatographen hochempfindlich nachweisbar ist [1].



Eisensulfid-Flocke aus einer Mikrotiter-Platte. Auch hier sind im (Phasenkontrast-)Mikroskop Bakterien kaum zu entdecken. (Kultur mit mit Sediment von ODP Site 1225 von 300 m unter dem Meeresboden)



Mit Hilfe von Fluoreszenz-Farbstoffen (hier Acridinorange) lassen sich jedoch Bakterienkolonien in der Flocke sichtbar machen.



In einer Mischbeleuchtung (Phasenkontrast + Fluoreszenz von Acridinorange) erkennt man sowohl die Flocke als auch die Bakterienkolonie.



Das Hintergrund-Bild zeigt einen Sonnenaufgang über den Anden vor der Küste von Peru, aufgenommen während ODP Leg 201 an Site 1225.

Die Untersuchungen werden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

## References

- [1] Smith, D. C., Spivack, A. J., Fisk, M. R., Haveman, S. A., and Staudigel, H., 2000. Tracer-based estimates of drilling-induced microbial contamination of deep sea crust. *Geomicrobiol. J.*, 17: 207-219

Viele weitere Informationen im Internet: [www.icbm.de/pmbio](http://www.icbm.de/pmbio) und [www.bgr.de/odp](http://www.bgr.de/odp)