Methoden zur Bestimmung der *in situ*-Funktion von Mikroorganismen

Rudolf Amann
Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie, Bremen

Die irrtümlicherweise häufig allein menschlichen Aktivitäten zugeschriebene globale Erwärmung ist ein Thema, mit dem sich der Gesellschaft trefflich die Relevanz mikrobiologischer Forschung erläutern lässt. In BIOspektrum 2/2000 hatte Ralf Conrad Methoden zur *in situ*-Messung von Spurengas-Flüssen vorgestellt und dabei die Wichtigkeit der Mikroorganismen für die biogeochemischen Kreisläufe im Allgemeinen und die Zusammensetzung der Atmosphäre im Besonderen betont [1]. Es wird auch in der Zukunft eine der zentralen Aufgaben der Mikrobiologie bleiben, die an den biogeochemischen Kreisläufen beteiligten Organismen zu identifizieren und den Beitrag einzelner Arten zu messen. Dieser Beitrag stellt Methoden vor, die es erlauben, Mikroorganismen spezifische Umsetzungen zuzuordnen. Methoden zur Bestimmung genereller Aktivität, wie beispielsweise *de novo*-Synthese von DNA und RNA, bleiben dabei unberücksichtigt.

Was wir heute zur Physiologie der verschiedenen Prokaryonten wissen, beruht zum ganz überwiegenden Teil auf Laborstudien mit Reinkulturen. Beschreibungen ihrer vielfältigen Talente als anorganische und organische Chemiker füllen mehrbändige Werke wie „The Prokaryotes" [2]. Bei genauer Betrachtung fällt jedoch auf, dass wir in der Regel auf die Frage, welche Bakterien und Archaeen in bestimmten Habitaten in welchem Maße zu den gemessenen Stoffflüssen beitragen, keine oder nur unvollständige Antworten haben. Beispielhaft sei hier nur auf die anaerobe Oxidation von Methan in marinen Sedimenten verwiesen [3]. Für unser Unwissen gibt es zwei Hauptursachen. Zum einen konnte bisher erst ein Teil der in der Umwelt vorkommenden Prokaryonten kultiviert werden [4], zum anderen liefern Laboruntersuchungen an Reinkulturen nur Einblicke in das häufig breite Potential der jeweils untersuchten Organismen. Physiologisches Potential ist natürlich nicht gleich der realisierten *in situ*-Funktion. Ein Vergleich mag dieses Dilemma verdeutlichen: Dass Eisbären im Zoo mit Rindfleisch überleben können, bedeutet nicht automatisch, dass sie für das Verschwinden von ganzen Herden in Afrika verantwortlich sind.

Der Vergleich zeigt auch, daß für die Suche nach den lebenden Katalysatoren global wichtiger biogeochemischer Kreisläufe Felduntersuchungen unabdingbar sind. Über die exakte Quantifizierung der Stoffflüsse hinaus sollten hierbei zuerst Funktionszonen möglichst eindeutig und, mit Blick auf die Größe der Mikroorganismen, räumlich hochaufgelöst bestimmt werden. Die so erzielte Information erleichtert die Suche erheblich. Welche Möglichkeiten gibt es nun, definierten Prokaryontengruppen bestimmte *in situ*-Funktionen zuzuordnen? Im einfachsten Fall können wir hier auf Wissen über die Physiologie spezialisierter, kultivierter und damit detailliert untersuchter Bakterien zurückgreifen. So findet man aktuell die Fähigkeit zur Methanproduktion nur in einer definierten, phylogenetisch trotz beträchtlicher Tiefe kohärenten Gruppe von Archaeen. Der Nachweis eines Euryarchaeoten der Art *Methano-Xy* in einer Zone aktiver Methanogenese macht diesen sofort zu einem Kandidaten für den hier dominierenden Prozess. Trotzdem ist Vorsicht geboten: Weder die Isolierung von *Methano-Xy* in Reinkultur noch ein PCR-basierender Nachweis belegen wirklich, dass exakt diese Art in quantitativ signifikanter Weise zur Methanproduktion in der untersuchten Zone beiträgt. Beide Methoden sind hochgradig selektiv. Wir suchen ja nicht das auf dem eingesetzten Anreicherungs-/Isolierungsmedium (am schnellsten) wachsende methanogene Archaeon oder die Art mit dem durch die eingesetzten Zellaufschlussmethoden und PCR-Primer am besten amplifizierbaren 16S rDNA-Genfragment, sondern die für eine bestimmte Umsetzung verantwortliche(n) Population(en). Daher muß zusätzlich eine *in situ*-Populationsdichte nachgewiesen werden, die ausreicht, den Prozess zu erklären. Hierfür sind direkte Methoden unerlässlich. Die direkteste ist sicher die Mikroskopie.

Nun ist es leider über die Zellmorphologie allein selten möglich, Bakterienpopulationen voneinander zu differenzieren oder die aktuell inaktiven von den aktiven Mikroorganismen zu unterscheiden. Aber es lassen sich Gesamtzellzahlen bestimmen; und manchmal sieht man auch relativ einheitliche, in Verbänden auftretende, dominante Morphotypen. Kommt dann noch eine Besonderheit wie die F420-Autofluoreszenz der Methanogenen hinzu [4], lässt sich beispielsweise angesichts zahlreicher Pakete autofluoreszierender Sarcinen und geringer Zahlen autofluoreszierender Stäbchen schon nach wenigen Minuten an einem Fluoreszenzmikroskop die Annahme verwerfen, dass der isolierte *Methanobrevibacter* sp. im Habitat zum Zeitpunkt der Untersuchung relevant war.

In der Regel benötigt man aber weitere Methoden zur *in situ*-Identifizierung. Hier hat in den letzten Jahren die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) mit rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden [4] zunehmend die Immunfluoreszenz verdrängt. Dafür gibt es mehrere Gründe: Zum einen kann es neben morphologischen Unterschie-

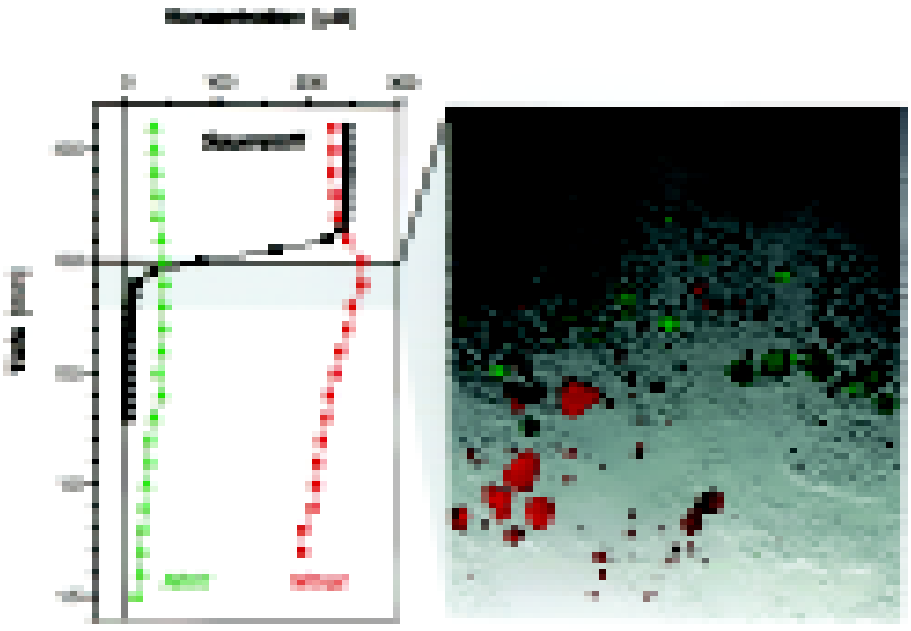

Abb. 1: Kombination von Mikrosensormessungen ([O_2], [NO_2^-], [NO_3^-]) und in situ-Identifizierung von nitrifizierenden Bakterien mittels FISH (grün, Nitrosomonas sp.; rot, Nitrospira sp.) in einem Abwasserbiofilm.

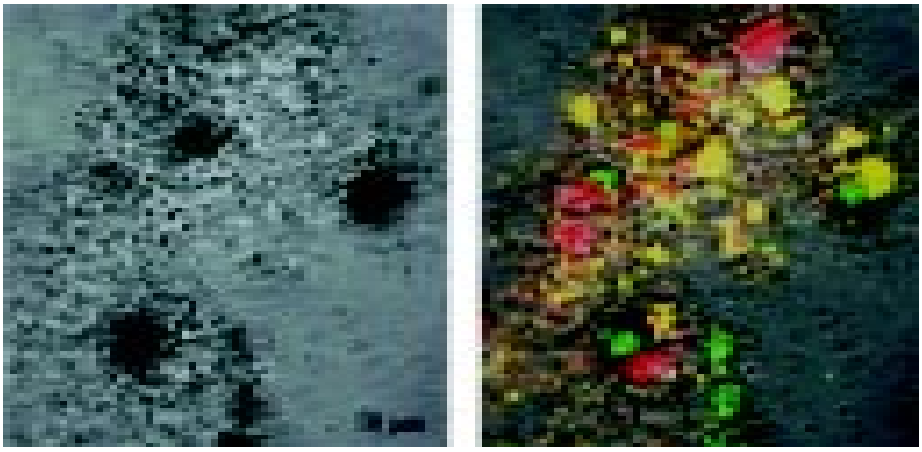

Abb. 2: Kombination von Mikroautoradiographie und FISH in einer Belebtschlammflocke. Radioaktives Propionat wird vor allem von den grün gefärbten Zellaggregaten der Azoarcus/Thauera-Gruppe, nicht jedoch von den rot gefärbten Nitrosomonas-Aggregaten aufgenommt. Identischer Bildausschnitt: links, Mikroautoradiographie; rechts, Überblendung FISH und Mikroautoradiographie.

den zwischen Labor- und Umweltform eines Stamms auch Unterschiede in der Antigen-Struktur geben, was zu falsch-negativen Ergebnissen führt, zum anderen benötigt man zur Herstellung eines spezifischen Antikörpers in der Regel eine Reinkultur. Dagegen können rRNA-gerichtete Oligonukleotidsonden ohne Rückgriff auf Isolate auf der Grundlage von direkt aus der Umwelt gewonnenen rDNA-Sequenzen hergestellt werden, und die normalerweise in jeder Zelle in hoher Zahl vorhandenen rRNA-Moleküle sind in ihrer Sequenz sehr stabil. Durch vergleichende Analyse der Umweltsequenz bzw. der 16S rDNA-Sequenz eines neuen Isolats lassen sich maßgeschneiderte Sonden entwerfen, die nach einer schnellen und kostengünstigen chemischen Synthese in immer gleicher Qualität für FISH verwendet werden können. Alternativ können die gleichen Oligonukleotide in der quantitativen dot blot-Hybridisierung von isolierter rRNA verwendet werden. Dabei wird die Menge einer für eine bestimmte Gruppe von Mikroorganismen spezifischen rRNA im Verhältnis zur Gesamt-rRNA quantifiziert. Mit diesen beiden Hybridisierungsmethoden ist es möglich, definierte Bakterienpopulationen in einer Funktionszone zu quantifizieren, wobei die Auflösung der FISH auf das Einzelzellniveau reicht. In Sonderfällen wird es damit zusammen mit Mikroelektrodenmessungen möglich, *in situ*-Funktionen mit hoher Wahrscheinlichkeit zuzuordnen. Diese Methodenkombination wurde erstmals von Ramsing und Mitarbeitern [6] auf die Verteilung von sulfatreduzierenden Bakterien in Biofilmen angewandt. Hohe Zahlen potentiell sulfatreduzierender Bakterien aus der δ-Gruppe der Proteobakterien wurden in der anoxischen Zone identifiziert. Aus den so bestimmten absoluten Zahlen und den Sulfatreduktionsraten folgern die Autoren, dass diese Gruppe der Gram-negativen, bakteriellen Sulfatreduzierer wesentlich zu den beobachteten Umsetzungen beiträgt.

Noch eindeutiger gelingt die Zuweisung von *in situ*-Funktionen in nitrifizierenden Biofilmen und Aggregaten. Hier lassen sich mit Mikrosensoren für O_2, NH_4^+, NO_2^- und NO_3^- [z.B. 7] exakte Funktionszonen definieren, die gerade in Systemen mit geringem Kohlenstoffeintrag fast ausschließlich mit NH_4^+- und NO_2^--oxidierenden Bakterien besiedelt sind (Abb. 1). Mit FISH wurden in der nur 50 µm tief reichenden Nitrifikationszone eines Biofilms einer Hochlastabwasseranlage lehrbuchgemäß dichte Kolonien der kultivierten obligat chemolithoautotrophen Bakteriengattungen *Nitrosomonas* (NH_4^+-Oxidation) und *Nitrobacter* (NO_2^--Oxidation) detektiert [8]. In Aggregaten aus einem Flüssigbett-Reaktor mit niedrigeren NH_4^+-Konzentrationen wurden dagegen keine Vertreter der Gattung *Nitrobacter*, sondern in hoher Zahl bisher nicht kultivierte Vertreter der Gattung *Nitrospira* in der Nitritoxidationszone gefunden [9]. Diese Gattung ist phylogenetisch weit von *Nitrobacter* entfernt. Für die wenigen bisher in Reinkultur erhaltenen Stämme dieses extrem langsam wachsenden Bakteriums war chemolithoautotrophe NO_2^--Oxidation gezeigt worden [10]. Aus den bei unterschiedlichen NH_4^+-Konzentrationen gemessenen Stoffflüssen und der Anzahl der NH_4^+- und NO_2^--oxidierenden Bakterien konnten durchschnittliche *in situ*-Reaktionsraten pro Zelle berechnet und auch die Substrataffinitäten für NH_4^+ und NO_2^- abgeschätzt werden [11]. Durch Vergleich mit Literaturwerten ergab sich die Hypothese, dass in Habitaten mit hohen NO_2^--Konzentrationen Vertreter der Gattung *Nitrobacter* aufgrund ihrer höheren maximalen Reaktionsraten dominieren (r-Strategen), während sich an Standorten mit niedrigen Konzentrationen *Nitrospira* spp. als K-Strategen aufgrund ihrer höheren Substrataffinität durchsetzen. Bei den unterschiedlichen Strategien könnte es sich jedoch auch um stammspezifische Eigenschaften handeln.

Bei allen bisher diskutierten Beispielen wurde auf Wissen über Reinkulturen zurückgegriffen. Wie könnte man nun definierten Populationen bisher nicht kultivierter Bakterien, für die es auch keine adäquaten, nahe verwandten Modelle gibt, *in situ*-Funktionen zuordnen? Eine Möglichkeit ist die Kombination von FISH und Mikroautoradiographie [12,13]. Hierbei wird die *in situ*-Identifizierung mit dem *in situ*-Nachweis der Aufnahme radioaktiver Substrate verbunden (Abb. 2). Lee und Kollegen [12] verfolgten so in Belebtschlamm die Aufnahme von ^{14}C-markiertem Acetat, Butyrat und Carbonat und $^{33}PO_4^{3-}$ unter aeroben und anaeroben Bedingungen. *Nitrosomonas*-Aggregate nahmen Carbonat auf, aber keine Fettsäuren, was gegen eine mixotrophe und für eine obligat autotrophe Lebensweise spricht. In einer zweiten FISH/Mikroautoradiographie-Studie mit marinem Bakterioplankton zeigte sich, dass Vertreter der α-Gruppe der Proteobakterien und der *Cytophaga-Flavobacterium*-Gruppe nicht nur zahlenmäßig dominieren, sondern auch signifikant zur Aufnahme gelöster Aminosäuren durch das Bakterioplankton beitragen [13].

Neben radioaktiv markierten Substraten können auch stabile Isotope bei der Zuordnung von definierten mikrobiellen Populationen zu spezifischen biogeochemischen Prozessen helfen. Eine Methode nutzt dabei ^{13}C-markierte Substrate und verfolgt deren Einbau in Lipide [14]. Aufgrund von Untersuchungen an Reinkulturen glaubt man, dass bestimmte Klassen von Lipiden zuverlässige Biomarker für definierte Bakteriengruppen sind. Teilweise kann auch eine natürliche Isotopensignatur genutzt werden. So weist Methan häufig einen sehr niedrigen ^{13}C -Wert auf. Dies machte man sich in einer Studie zur anaeroben Oxidation von Methan zunutze [3]. Ein für methanogene Archaeen charakteristisches Lipid war sehr leicht, was von den Autoren als Beleg für die Verwendung von Methan als Substrat interpretiert wurde. Parallel dazu konnte mittels PCR die Anwesenheit von Archaeen mit Verwandtschaft zu den Methanomicrobiales und den Methanosarcinales gezeigt werden. Noch direkter ist die Kopplung von Substratverwertung und Identifizierung einer definierten Bakteriengruppe bei einer vor kurzem vorgestellten Methode [15]. Nach Inkubation mit ^{13}C -markiertem Substrat wird einfach die schwerere ^{13}C-markierte DNA mittels Dichtegradienten-

zentrifugation abgetrennt. Nach Inkubation einer Bodenprobe mit schwerem Methanol wurden in der so gewonnenen DNA-Fraktion mittels PCR 16S rDNAs von α-Proteobakterien und Vertretern des *Acidobacterium*/*Holophaga*-Phylums und Gene der alpha-Untereinheit der Methanoldehydrogenase nachgewiesen. Durch die Identifizierung über Nukleinsäuren wird die Zuordnung sicherer. Während die Einordnung über Biomarker auf Reinkulturen nahe verwandter Bakterien beruht, lassen sich schwere DNA-Sequenzen davon unabhängig in phylogenetische Bäume stellen.

Auch die Molekularbiologie allein bietet Möglichkeiten, die *in situ*-Funktion bisher nicht kultivierter Bakterien abzuschätzen. Nach FISH lassen sich z.B. am Durchflusszytometer definierte Zellen aus Umweltproben sortieren. Die Zahl und Reinheit der so gewonnenen fixierten Zellen ist

Anzeige

Ausschreibung

Der Mukoviszidose e.V. vergibt für eine herausragende Arbeit auf dem Gebiet der Forschung und Therapie der Mukoviszidose den

Adolf-Windorfer-Preis

Der Preis ist mit DM 10.000 dotiert und kann an eine Einzelperson oder Gruppe vergeben werden.

Bewerber richten (bis zum 31. Dezember 2000) eine maximal zweiseitige Zusammenfassung ihrer Arbeit zusammem mit einem tabellarischen Lebenslauf, Publikationsliste und Kopien der 3 wichtigsten wissenschaftlichen Publikationen in 9facher Ausfertigung an den Mukoviszidose e.V. PD Dr. Cordula Harter, Bendenweg 101, 53121 Bonn
Tel.: 0228-9878040, Fax 0228-9878077,
e-mail: mukoviszidose@t-online.de,
http://www.mukoviszidose-ev.de

ausreichend, um Gene zu amplifizieren und nach Sequenzierung zuzuordnen [16]. Alternativ können größere Genomabschnitte aus Umwelt-DNA kloniert werden [17]. So lassen sich ebenfalls, wie durch Zellsortierung, die „Identifizierungsgene" für die 16S oder 23S rRNA mit Stoffwechselgenen koppeln. Nach *in vitro*-Translation kann man die entsprechenden Enzyme näher untersuchen [18]. Natürlich ist es mit hochsensitiven Methoden, mit oder ohne *in situ*-PCR [19], heute auch schon möglich, Gene oder zumindest Genomabschnitte in einzelnen Bakterienzellen nachzuweisen [20] bzw. Genexpression auf der mRNA- [21] oder Enzym-Ebene [22] zu zeigen.

Diese Aufzählung von Methoden zur Bestimmung der *in situ*-Funktion von Mikroorganismen ist sicher unvollständig. Viele der neuen Methoden sind von einer Routineanwendung noch weit entfernt. Trotzdem können wir mit ihnen heute, besser als jemals zuvor, diejenigen Mikroorganismen identifizieren, deren Umsetzungen wesentlich zu den verschiedenen biogeochemischen Kreisläufen beitragen. Dazu bedarf es, wie überall in der Wissenschaft, einer kritischen Einstellung zu den eingesetzten Methoden, der Bereitschaft, Altes mit Neuem zu verbinden und vor allem auch der Würdigung beschreibender Forschung. Die Erhebung von quantitativen Daten zur Struktur mikrobieller Lebensgemeinschaften und zur *in situ*-Funktion definierter Bakterienpopulationen, die Formulierung von Hypothesen und deren Überprüfung im Labor und im Feld müssen Hand in Hand gehen.

Danksagung

Die Abbildungen 1 und 2 wurden freundlicherweise von Herrn Gieseke (MPI Bremen) bzw. Frau Lee und Herrn Wagner (TU München) zur Verfügung gestellt. Herrn Schramm und Herrn Gieseke möchte ich für die kritische Durchsicht des Manuskripts danken.

Literatur

[1] ***Conrad, R.*** *2000. Methoden der in situ-Messung von Spurengas-Flüssen. Biospektrum 6:122-124.*

[2] ***Balows, A., H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer****. The Prokaryotes. 2. Edition. Springer-Verlag, New York (1992).*

[3] ***Hinrichs, K.-U., J. M. Hayes, S. P. Sylva, P. G. Brewer, and E. F. DeLong.*** *1999. Methane-consuming archaebacteria in marine sediments. Nature (London) 398:802-805.*

[4] ***Amann, R. I., W. Ludwig, and K. H. Schleifer.*** *1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. 59:143-169.*

[5] ***Doddema, H. J., and G. D. Vogels.*** *1978. Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. Appl. Environ. Microbiol. 36:752-754.*

[6] ***Ramsing, N. B., M. Kühl, and B. B. Jörgensen.*** *1993. Distribution of sulfate-reducing bacteria, O_2 and H_2S in photosynthetic biofilms determined by oligonucleotide probes and microelectrodes. Appl. Environ. Microbiol. 59:3820-3849.*

[7] ***De Beer, D., A. Schramm, C. M. Santegoeds, and M. Kühl.*** *1997. A nitrite microsensor for profiling environmental biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 63:973-977.*

[8] ***Schramm, A., L. H. Larsen, N. P. Revsbech, N. B. Ramsing, R. Amann, and K.-H. Schleifer.*** *1996. Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and microelectrodes. Appl. Environ. Microbiol. 62:4641-4647.*

[9] ***Schramm, A., D. De Beer, M. Wagner, and R. Amann.*** *1998. Identification and activities in situ of Nitrosospira and Nitrospira spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. Appl. Environ. Microbiol. 64:3480-3485.*

[10] ***Ehrich, S., D. Behrens, E. Lebedeva, W. Ludwig, and E. Bock.*** *1995. A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, Nitrospira moscoviensis sp. nov., and its phylogenetic relationship. Arch. Microbiol. 164:16-23.*

[11] ***Schramm, A., D. De Beer, J.C van den Heuvel, S. Ottengraf, and R. Amann.*** *1999. Microscale distribution of populations and activities of Nitrosospira and Nitrospira spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: quantification by in situ hybridization and the use of microsensors. Appl. Environ. Microbiol. 65:3690-3696.*

[12] ***Lee, N., P. H. Nielsen, K. H. Andreasen, S. Juretschko, J. L. Nielsen, K.-H. Schleifer, and M. Wagner.*** *1999. Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography-a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. Appl. Environ. Microbiol. 65:1289-1297.*

[13] ***Ouverney, C. C., and J. A. Fuhrman.*** *1999. Combined microautoradiography-16S rRNA probe technique for determination of radioisotope uptake by specific microbial cell types in situ. Appl. Environ. Microbiol. 65:1746-1752.*

[14] ***Boschker, H. T. S., S. C. Nold, P. Wellsbury, D. Bos, W. Graaf, R. Rel, R. J. Parkes, and T. E. Cappenberg.*** *1998. Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by 13C-labelling of biomarkers. Nature (London) 392:801-805.*

[15] ***Radajewski, S., P. Ineson, N. R. Parekh, and J. C. Murrell.*** *2000. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. Nature (London) 403:646-649.*

[16] ***Wallner, G., B. Fuchs, W. Beisker, S. Spring, and R. Amann.*** *1997. Flow cytometric sorting of microorganisms for molecular analysis. Appl. Environ. Microbiol. 63: 4223-4331.*

[17] ***Stein, J. L., T. L. Marsh, K. Y. Wu, H. Shizuya, and E. F. DeLong.*** *1996. Characterization of uncultivated prokaryotes: isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment fram a planktonic marine archaeon. J. Bacteriol. 178:591-599.*

[18] ***Schleper, C., R. V. Swanson, E. J. Mathur, and E.F. DeLong.*** *1997. Characterization of a DNA polymerase from the uncultivated psychrophilic archaeon Cenarchaeum symbiosum. J. Bacteriol. 179:7803-7811.*

[19] ***Hodson R.E., W. A. Dustman, R. P. Garg, and M. A. Moran.*** *1995. In situ PCR for visualization of microscale distribution of specific genes and gene products in prokaryotic communities. Appl. Environ. Microbiol. 61:4074-4082.*

[20] ***Jensen, R. B., and L. Shapiro.*** *1999. The Caulobacter crescentus smc gene is required for cell cycle progression and chromosome segregation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:10661-10666.*

[21] ***Hahn, D., R. I. Amann, and J. Zeyer.*** *1993. Detection of mRNA in Streptomyces cells by in situ hybridization with digoxigenin-labeled probes. Appl. Environ. Microbiol. 59:2753-2757.*

[22] ***Maddock, J. R., and L. Shapiro.*** *1993. Polar localization of the chemoreceptor complex in the Escherichia coli cell. Science 259:1717-1723.*

Korrespondenzadresse

PD Dr. Rudolf Amann
Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie
Celsiusstraße 1
D-28359 Bremen
Tel.: 0421-2028 930
Fax: 0421-2028 580
eMail: ramann@mpi-bremen.de