

Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Institut für Mikrobiologie und Weinforschung

**Isolierung und Charakterisierung von Spirochaeten
aus dem Termitendarm**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
Stefan Dröge
geb. am 15.02.1971 in Lemgo

Mainz 2005

Jahr der mündlichen Prüfung: 2005

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden von April 2001 bis Juli 2005 am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind teilweise in folgenden Publikationen und Posterpräsentationen veröffentlicht:

Dröge, S., Limper, U., Emtiazi, F., Schönig, I., Pavlus, N., Drzyzga, O., Fischer, U., König, H. (2005): In vitro and in vivo sulfate reduction in the gut contents of the termite *Mastotermes darwiniensis* and the rose-chafer *Pachnoda marginata*. J. Gen. Appl. Microbiol. 51: 57-64.

Dröge, S., Fröhlich, J., Radek, R., König, H. (2005): *Spirochaeta coccoides* sp. nov., a novel coccoid spirochete from the hindgut of the termite *Neotermes castaneus*. Appl. Environ. Microbiol. Im Druck.

Dröge, S., Emtiazi, F., Schönig, I., König, H. (2002): Sulfate-reduction rates in the gut of the rose-chafer *Pachnoda marginata* and the termite *Mastotermes darwiniensis*. Posterpräsentation auf der Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM). März 2002 in Göttingen.

Dröge, S., Radek, R., König, H. (2004): Isolation of a novel spirochete from the termite hindgut. Posterpräsentation auf der Jahrestagung der VAAM. März 2004 in Braunschweig.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Termiten	1
1.2 Der Termitendarm	3
1.3 Die mikrobielle Flora des Termitendarms	5
1.4 Mikrobieller Abbau von Lignocellulose im Termitendarm	6
1.5 Spirochaeten	10
1.6 Sulfatreduzierende Bakterien im Intestinaltrakt von Insekten	14
2. Material und Methoden	16
2.1 Geräte	16
2.2 Chemikalien	17
2.3 Lösungen, Kits und Puffer	19
2.4 Organismen	22
2.5 Präparation von Därmen aus Termiten und Rosenkäfern	22
2.6 Methoden zur Isolierung und Charakterisierung von Spirochaeten	23
2.6.1 Medien und Wachstumssubstrate	23
2.6.2 Gewinnung von Reinkulturen	26
2.6.3 Bestimmung von Stoffwechselprodukten und fermentierbaren Substraten	26
2.6.4 Bestimmung von Zellzahlen und Verdopplungszeiten	27
2.6.5 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	28
2.6.6 Aktivitätsnachweis hydrolytischer Enzyme	28
2.6.7 Bestimmung des GC-Gehaltes	29
2.7 Sulfatreduktion im Darm von <i>Pachnoda marginata</i> und <i>Mastotermes darwiniensis</i>	31
2.7.1 Medium für sulfatreduzierende Bakterien	31
2.7.2 Titer sulfatreduzierender Bakterien	32
2.7.3 Bestimmung von Sulfatkonzentrationen und <i>in vitro</i> Sulfatreduktionsraten	32

2.8 Molekularbiologische Untersuchungen	33
2.8.1 DNA-Extraktion von Reinkulturen	33
2.8.2 Extraktion bakterieller DNA aus Termitendärmen	33
2.8.3 Amplifikation von Zielgenen mittels PCR	34
2.8.4 Agarose-Gelelektrophorese	37
2.8.5 Aufreinigung von PCR-Produkten	37
2.8.6 Klonierung	37
2.8.7 Plasmidisolierung	38
2.8.8 Sequenzierung	38
2.8.9 Sequenzanalyse	38
2.8.10 Erstellung phylogenetischer Stammbäume	39
2.8.11 Statistische Absicherung phylogenetischer Bäume	40
3. Ergebnisse	41
3.1 Charakterisierung von Spirochaeten aus Termitendärmen	41
3.1.1 Anreicherung und Isolierung von Spirochaeten aus Termitendärmen	41
3.1.2 Charakterisierung von Stamm SPN1	43
3.1.3 Charakterisierung von Kultur SPIT5	49
3.1.4 Charakterisierung von Stamm SPIM25	53
3.1.5 Qualitativer Nachweis relevanter Enzyme des Lignocelluloseabbaus	56
3.1.6 Phylogenetische Charakterisierung der Isolate	59
3.1.7 Isolierung und phylogenetische Einordnung von Nitrogenase-Genen (<i>nifH</i>)	62
3.2 Sulfatreduktion im Darm von <i>Pachnoda marginata</i> und <i>Mastotermes darwiniensis</i>	64
3.2.1 Anreicherung und Identifizierung eines sulfat- reduzierenden Bakteriums aus dem Darm des Rosenkäfers <i>Pachnoda marginata</i>	64
3.2.2 <i>In vitro</i> Sulfatreduktion im Darm von <i>Pachnoda</i> <i>marginata</i> und <i>Mastotermes darwiniensis</i>	66

4. Diskussion	67
4.1 Die Spirochaeten des Termitendarms	67
4.1.1 Charakterisierung der Isolate	67
4.1.2 Lignocelluloseabbau im Termitendarm	72
4.1.3 Phylogenie der Spirochaeten des Termitendarms	73
4.1.4 Stickstofffixierung im Termitendarm	76
4.2 Sulfatreduktion im Darm von Insekten	77
5. Zusammenfassung und Ausblick	81
6. Literaturverzeichnis	84
7. Anhang	96
7.1 Sequenzen	96
7.2 Alignments der Sequenzen für die Konstruktion phylogenetischer Stammbäume	98
7.2.1 Sequenzen des „Spirochaeten-Stammbaums“	98
7.2.2 Sequenzen des Stammbaums sulfatreduzierender Bakterien	113
7.2.3 Sequenzen des „ <i>nifH</i> -Stammbaums“	118
7.3 Abkürzungen und Zugriffsnummern	120
7.3.1 Abkürzungen und Zugriffsnummern des „Spirochaeten-Stammbaums“	120
7.3.2 Abkürzungen und Zugriffsnummern des Stammbaums sulfatreduzierender Bakterien	121
7.3.3 Abkürzungen und Zugriffsnummern des „ <i>nifH</i> -Stammbaums“	122

Abkürzungen

ATP	Adenosin-5-triphosphat
ATCC	American Type Culture Collection
BAM	Bundesanstalt für Materialforschung und Materialprüfung
bp	Basenpaare
CMC	Carboxymethylcellulose
DABCO	1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]oktan
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	DL-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
FAD	Flavinadenindinukleotid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LB	Luria Bertani
M	Molar
mM	Millimolar
MPN	Most Probable Number
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PHYLP	Phylogeny Interference Package
rDNA	ribosomal Deoxyribonucleic Acid
RDP	Ribosomal Database Project
rRNA	ribosomal Ribonucleic Acid
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	Saline-Sodiumcitrate
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute

1. Einleitung

1.1 Die Termiten

Termiten stellen die ältesten staatenbildenden Insekten auf unserem Planeten dar. Die frühesten fossilen Funde stammen aus der Kreidezeit (ca. 140 Mio. Jahre alt). Vermutlich reicht die Stammesgeschichte der Termiten aber bis ins Paläozoikum vor rund 300 Millionen Jahren zurück (EMERSON 1965). Systematisch werden die Termiten in der Ordnung Isoptera (Gleichflügler) zusammengefasst. Obwohl bisweilen als „weiße Ameisen“ bezeichnet, haben die Termiten mit den Ameisen, abgesehen von gewissen Ähnlichkeiten in der Lebensweise, nur wenig gemein. Im Gegensatz zu den hemimetabolen Termiten bilden die Ameisen, zusammen mit Bienen und Wespen, die Ordnung der Hymenoptera (Hautflügler) und gehören zur Gruppe der holometabolen Insekten.

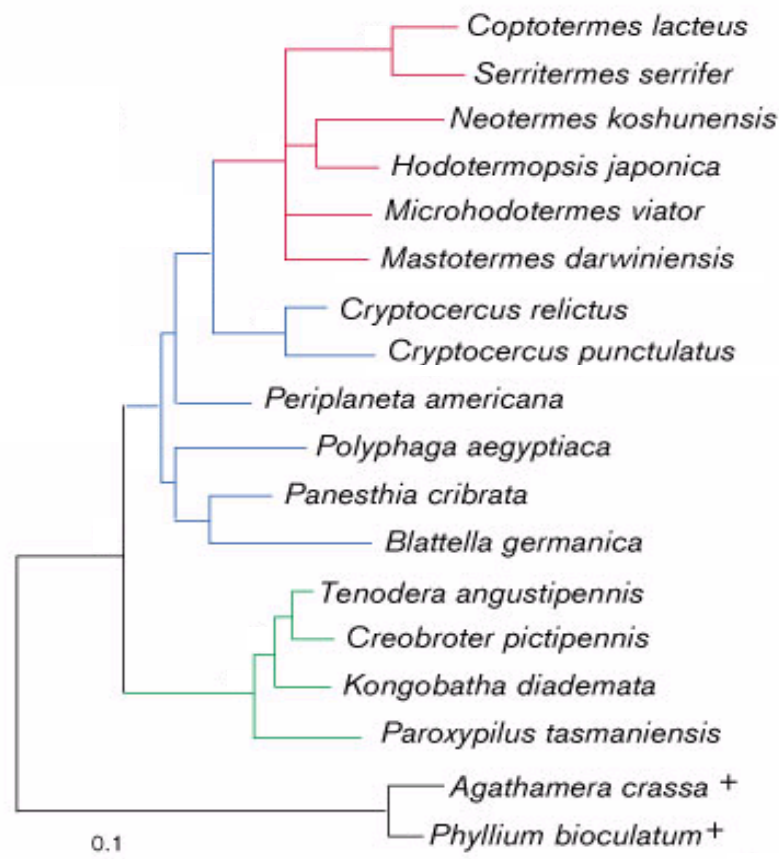


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum von Vertretern der Dictyoptera. Vertreter der Termiten sind durch rote, die Schaben durch blaue und die Gottesanbeterinnen durch grüne Äste gekennzeichnet (LO et al. 2000).

Die engsten Verwandten der Termiten sind vielmehr die Schaben (Blattodea) und die Fangschrecken (Mantodea), was auch durch neuere phylogenetische Untersuchungen bestätigt wurde (LO et al. 2000). Der in Abbildung 1 dargestellte Stammbaum beruht auf der kombinierten Analyse von Genen der 18S rRNA, der mitochondrialen Cytochromoxidase und der Endo- β -1,4-Glukanase. Danach haben sich die Termiten aus holzfressenden Schaben entwickelt. Bei der heute noch vorkommenden urtümlichen Schabenart *Cryptocercus punctulatus* lassen sich denn auch gewisse Ähnlichkeiten zu den Termiten feststellen. So leben diese Tiere in lockeren Verbänden unter der Rinde von Bäumen und ernähren sich von Holz. Weiterhin beherbergen sie in ihrem Darm, ebenso wie viele Termiten, symbiotische Flagellaten, welche für den Verdau der komplexen Nahrungsbestandteile der Schaben essentiell sind.

Die Gruppe der Termiten umfasst derzeit rund 2800 bekannte Arten welche in 282 Gattungen eingeteilt sind (KRISHNA 1970). Innerhalb der Gruppe wird zwischen den so genannten „höheren“ und den evolutionsgeschichtlich älteren „niederen“ Termiten unterschieden (Abb. 2). Die höheren Termiten umfassen nur die Familie der Termitidae mit zahlreichen Unterfamilien. Sie repräsentieren ca. $\frac{3}{4}$ aller heute beschriebenen Arten.

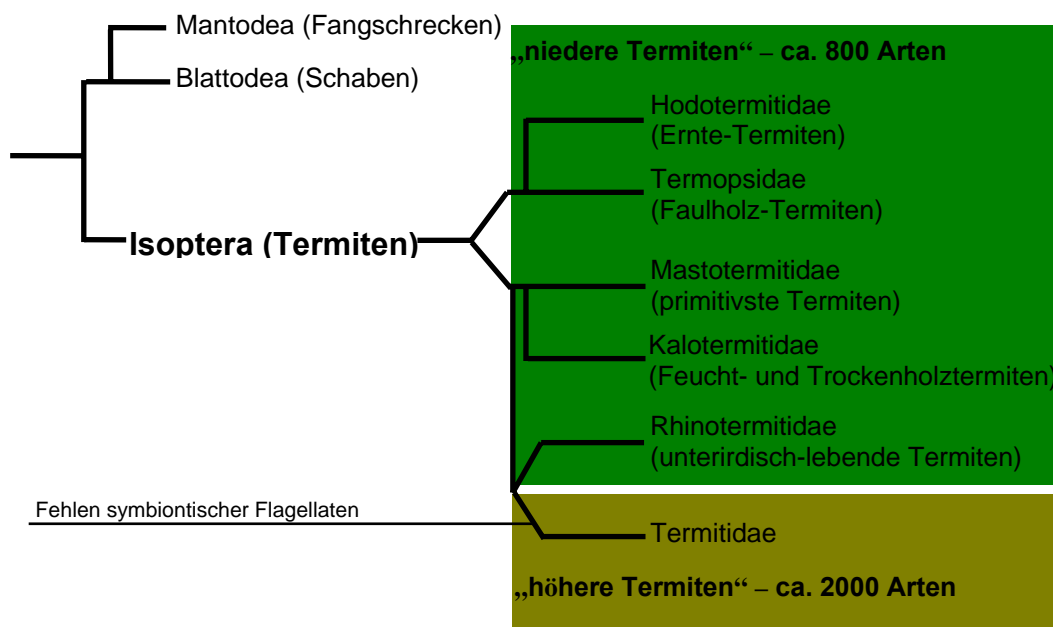


Abbildung 2: Schematischer Stammbaum der Termiten (nach MYLES 1999).

Die niederen Termiten werden in mehrere Familien unterteilt, die zusammen rund 800 Arten umfassen. Ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal zwischen höheren und niederen Termiten ist, neben einigen morphologischen Merkmalen, die unterschiedliche

Zusammensetzung der Darmflora. Zwar beherbergen beide Gruppen eine große Anzahl symbiontischer Mikroorganismen. Den höheren Termiten fehlen jedoch die für niedere Termiten charakteristischen Darmflagellaten. Diese sehr ursprünglichen Protozoen sind außer bei den niederen Termiten nur noch bei holzfressenden Schaben anzutreffen (KÖNIG et al. 2002).

Das Hauptverbreitungsgebiet der Termiten sind die tropischen und subtropischen Regionen der Erde. Einzelne Arten sind aber auch in gemäßigten Breiten anzutreffen. So die Gelbhalsholztermit *Kaloterme flavicollis* in Teilen Südeuropas und die Bodentermit *Reticulitermes lucifugus* in Frankreich. Insbesondere in den tropischen Gebieten spielen Termiten eine wichtige Rolle bei der Remineralisierung von organischem Material (KÖNIG & BREUNIG 1997). Dabei produzieren die Termiten jedes Jahr große Mengen verschiedener Gase, so u.a. rund 5×10^{10} Tonnen Kohlendioxid, 2×10^8 Tonnen Wasserstoff und 1×10^7 Tonnen Kohlenmonoxid (ZIMMERMANN et al. 1982). Im Bezug auf die jährlichen Emissionen des Treibhausgases Methan schwanken die Schätzungen zwischen 6×10^7 (HACKSTEIN et al. 1996) und $1,5 \times 10^8$ Tonnen (ZIMMERMANN et al. 1982). Somit dürften die Termiten für ca. 10 % der weltweiten jährlichen Methanemissionen verantwortlich sein. Viele Termiten haben ein recht breites Nahrungsspektrum. Einige sind regelrechte Allesfresser, denen nahezu jedes organische Material als Nahrung recht ist. Dennoch ist für die meisten Termiten, insbesondere für die niederen Termiten, Holz ein zentraler Nahrungsbestandteil. Um diese schwer abbaubare Nahrungsquelle nutzen zu können, beherbergen die Termiten in ihrem Darm eine komplexe mikrobielle Gemeinschaft aus Protozoen, Eubakterien, Archaeen und Hefen (KÖNIG et al. 2002).

1.2 Der Termitendarm

Der Intestinaltrakt der Termiten besteht prinzipiell aus dem Vorderdarm mit Kropf und Kaumagen, dem Mitteldarm mit den Malphigi-Gefäßen und dem Hinterdarm (Abb. 3). Der Hinterdarm selbst wird in fünf Segmente (P1-P5) unterteilt zu denen neben Colon und Rectum auch die so genannte Gärkammer zählt (NOIROT & NOIROT-TIMOTHEÉ 1969, NOIROT 1995). Die von den Termiten mit ihren Mundwerkzeugen grob zerkleinerte Nahrung wird im Vorderdarm zu μ m-großen Partikeln zerrieben. Dies geschieht mechanisch im, mit zahlreichen Chitinzähnen ausgekleideten, Kaumagen (auch als Termitenraspel bezeichnet). Bei der weiteren Passage durch den Mitteldarm werden der

Nahrung bereits Verdauungsenzyme zugesetzt. Der Hauptumsatz findet aber in der Gärkammer, einem stark vergrößerten tubulären Bereich des Hinterdarms, statt (P3; Abb. 3). Die Gärkammer beherbergt auch den überwiegenden Teil der symbiontischen Mikroorganismen des Termitendarms. Entsprechend der zum Teil erheblichen Größenunterschiede zwischen den zahlreichen Termitenarten schwankt auch das Gesamtvolumen des Hinterdarms recht stark zwischen 0,5 μl – 10 μl .

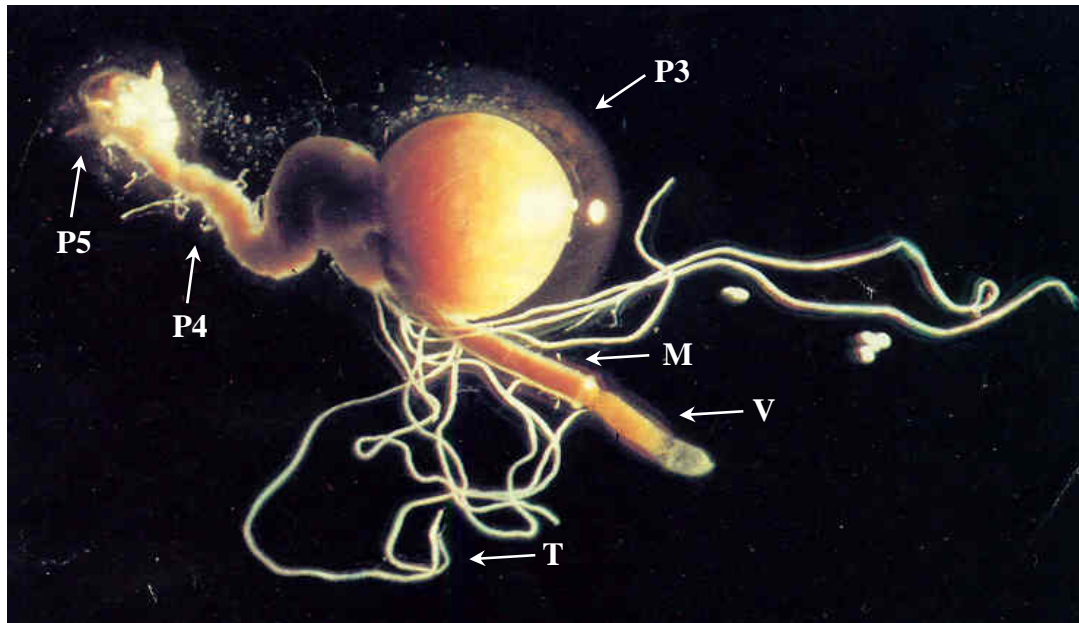


Abbildung 3: Präparat des Intestinaltraktes der Termitenart *Mastotermes darwiniensis*.

V: Vorderdarm; M: Mitteldarm; T: Malpighi-Gefäße; P3: Gärkammer; P4: Colon; P5: Rectum. (Foto: A. Breunig, KÖNIG & BREUNIG 1997)

Aufgrund der vorliegenden chemisch-physikalischen Bedingungen kann die Gärkammer des Termitendarms als anoxisches Gradientensystem bezeichnet werden. Hierbei wird der äußere Darmbereich über das Epithel ständig mit Sauerstoff versorgt. Infolge der mikrobiellen Aktivitäten kommt es in der Darmperipherie zu einer starken Sauerstoff-Zehrung, so dass der zentrale Bereich anoxische Bedingungen aufweist (BRUNE et al. 1995a, BERCHTOLD et al. 1999). Die Ausdehnung dieses anaeroben Zentralbereichs ist im Wesentlichen vom jeweiligen Oberflächen/Volumen-Verhältnis abhängig. Dementsprechend ist bei größeren Termiten (Darmvolumen ca. 10 μl) der überwiegende Teil der Gärkammer anoxisch, während bei kleineren Termiten ein erheblicher Anteil ($\geq 50\%$) oxische oder zumindest mikrooxische Bedingungen aufweist. Neben dem Sauerstoff-Gradienten findet sich im Termitendarm typischerweise ein in umgekehrter Richtung verlaufender Wasserstoff-Gradient. Der Wasserstoff entsteht durch die Aktivität

anaerober Mikroorganismen im Zentralbereich der Gärkammer, wo sich Konzentrationen von ca. 40 μM H_2 nachweisen lassen (EBERT & BRUNE 1997). Die pH-Werte im Mittel- und Hinterdarm liegen sowohl bei den höheren als auch niederen Termiten in der Regel um den neutralen Bereich. Allerdings finden sich bei einigen höheren Termiten auch deutlich alkalische Kompartimente ($\geq \text{pH } 10$) im Hinterdarm (BIGNELL & ANDERSON 1980).

1.3 Die mikrobielle Flora des Termitendarms

Der Intestinaltrakt der Termiten, und hier insbesondere die Gärkammer, stellt ein komplexes Ökosystem dar, das einer Vielzahl unterschiedlichster Mikroorganismen Lebensraum bietet. Bisher wurden nahezu 100 verschiedene Eubakterien und Archaea aus 14 Ordnungen aus Termitendärmen isoliert (KÖNIG et al. 2002). Hierbei muss berücksichtigt werden, dass mit den gängigen Isolierungstechniken üblicherweise nur ein geringer Teil der tatsächlichen mikrobiellen Diversität eines Standorts erfasst werden kann (AMANN et al. 1995). Die am häufigsten im Termitendarm vorkommenden Bakterien lassen sich der Gruppe der Spirochaeten zuordnen (siehe Kap. 1.5). Die bisher gewonnenen Isolate sowie verschiedene molekularbiologische Untersuchungen deuten darauf hin, dass daneben Vertreter der Proteobakterien, der grampositiven Bakterien und der *Bacteroides/Flavobacterium* Gruppe in größerer Anzahl im Darm vorkommen (KRASIL'NIKOV & SATDYKOV 1969, KUHNIGK & KÖNIG 1997, BERCHTOLD et al. 1999, WENZEL et al. 2002b, HONGOHO et al. 2003). Neben den zahlreichen Eubakterien konnten im Termitendarm auch Vertreter der Archaeen nachgewiesen werden. Die bisher identifizierten Organismen lassen sich alle der Gattung *Methanobrevibacter* zuordnen (LEADBETTER & BREZNAK 1996, FRÖHLICH & KÖNIG 1999, BRAUMANN et al. 2001). Die Gesamtzellzahl prokaryontischer Mikroorganismen in Termitendärmen liegt in der Regel zwischen 10^9 und 10^{10} Zellen/ml (BERCHTOLD et al. 1999).

Bei der Gruppe der so genannten niederen Termiten (siehe Kap. 1.1) findet sich neben den Prokaryonten eine besondere Gruppe von anaeroben Flagellaten, welche sonst nur noch bei Holzfressenden Schaben vorkommen. Alle bisher identifizierten Organismen lassen sich den Gruppen der Hypermastigiden, der Oxymonaden und der Trichomonaden zuordnen (HONIGBERG 1970, RADEK & HAUSMANN 1993). Phylogenetische Untersuchungen deuten darauf hin, dass es sich um sehr ursprüngliche Protozoen handelt,

die sich bereits früh in der Evolutionsgeschichte vom Stammbaum der Eukaryonten abgespalten haben (BERCHTOLD & KÖNIG 1995). Bei den niederen Termiten, wo sie mehr als 90 % des Gärkammervolumens einnehmen können (BERCHTOLD 1995), werden die Flagellaten als essentielle Symbionten angesehen.

Daneben bietet der Termitendarm Lebensraum für zahlreiche Hefen. Aus den Därmen niederer Termiten wie *Mastotermes darwiniensis*, *Zootermopsis angusticollis* u. a. konnten verschiedene Hefen der Gattungen *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Pichia* und *Sporothrix* isoliert werden (PRILLINGER et al. 1996). Darüber hinaus ließen sich auch einige filamentöse Pilze im Darminhalt von Termiten nachweisen (RAJAGOPAL et al. 1979).

1.4 Mikrobieller Abbau von Lignocellulose im Termitendarm

Auch wenn sich die Nahrungsansprüche der ca. 2800 Termitenarten zum Teil erheblich unterscheiden, verfügen dennoch alle bekannten Termiten über eine ausgeprägte symbiontische Darmflora. Die Mikroorganismen des Darms spielen beim Nahrungsverdau eine entscheidende Rolle. Der Darm der Termiten kann als eine Art Bioreaktor angesehen werden, in dem symbiontische Mikroorganismen das komplexe organische Material abbauen und die Termiten hierbei mit Kohlenstoff und Energie versorgen. (VARMA et al. 1994, BRUNE 1998).

Holz, die Hauptnahrung der niederen Termiten, besteht im Wesentlichen aus den Polymeren Cellulose, Hemicellulose und Lignin (Abb. 4). Diese drei Hauptbestandteile kommen je nach Holzart in unterschiedlichen Verhältnissen vor, wobei die Cellulose in der Regel mengenmäßig vorherrschend ist. Formal kann der Abbau dieses komplexen organischen Materials im Termitendarm in drei Stufen eingeteilt werden (Tab. 1). In der ersten Stufe werden die Polymere hydrolysiert und in ihre monomeren bzw. oligomeren Bestandteile zerlegt. In der zweiten Stufe werden diese Bruchstücke teilweise oxidativ wie auch fermentativ abgebaut und es entstehen verschiedene niedermolekulare Säuren und Alkohole sowie Kohlendioxid und Wasserstoff. In der dritten Stufe werden die entstandenen Stoffwechselprodukte im Wesentlichen zu Acetat, Methan und Kohlendioxid umgesetzt (KÖNIG et al. 2002).

Cellulose besteht aus unverzweigten Ketten von 1,4-glykosidisch verknüpften β -Glucose-Einheiten. Für den Abbau werden 1,4-Glucanasen sowie β -Glucosidasen benötigt. Beim Celluloseabbau im Darm der niederen Termiten spielen die Flagellaten eine bedeutende Rolle. Die Organismen nehmen feine Holzpartikel über Endocytose in die Zelle auf und bauen die Cellulose zu Acetat, Kohlendioxid und Wasserstoff ab.

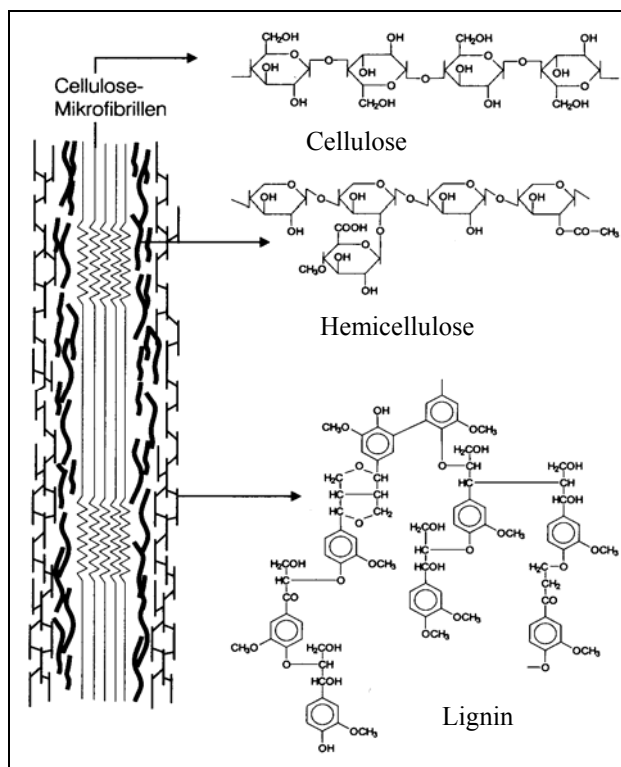


Abbildung 4: Hauptbestandteile und Struktur der wichtigsten polymeren Bestandteile von Holz (nach FRITSCH 1999).


Das Acetat wiederum kann von der Termiten als Energiequelle genutzt werden. Bei der Termiten *Mastotermes darwiniensis* deuten neuere Untersuchungen darauf hin, dass die Flagellaten zur Hydrolyse der Cellulose keine eigenen Enzyme nutzen, sondern stattdessen Cellulasen die von der Termiten selbst in den Speicheldrüsen produziert werden und welche dann von den Flagellaten mit der Nahrung aufgenommen werden (LI et al. 2003). Ob auch bei anderen Termiten und deren Symbionten ähnliche Verhältnisse vorherrschen ist allerdings bis jetzt unklar.

Die Rolle der Bakterien beim Celluloseabbau wird seit langem kontrovers diskutiert (SLAYTOR 1992). Die ursprünglich verbreitete Ansicht, dass Prokaryonten keinen signifikanten Beitrag zum Celluloseabbau leisten, kann so nicht mehr aufrechterhalten werden. So wurden mittlerweile zahlreiche cellulolytische Bakterien aus verschiedenen Termiten isoliert (HETHENER et al. 1992, BAKALIDOU et al. 2002, WENZEL et al. 2002b).

Aufgrund der gewonnenen Isolate scheint sich die cellulolytische bakterielle Darmflora vorwiegend aus fakultativ anaeroben oder mikroaerophilen Vertretern der Gattungen *Bacillus* und *Paenibacillus* sowie verschiedenen Actinobakterien zusammensetzen.

Unter dem Oberbegriff der Hemicellulosen werden verschiedene Heteropolysaccharide zusammengefasst, von denen das wichtigste das Xylan ist. Sowohl baustein- als auch strukturmäßig unterscheiden sich die mit zahlreichen Substituenten versehenen Xylanketten erheblich von den unsubstituierten und wesentlich stärker polymerisierten Celluloseketten. Für den vollständigen Abbau des Xylans werden eine Reihe verschiedener Enzyme benötigt. Bisher konnte aus Termitendärmen noch kein Bakterium isoliert werden, das über die vollständige Enzymausstattung verfügt. Xylan und andere Hemicellulosen werden demnach wahrscheinlich synergistisch durch verschiedene Mikroorganismen abgebaut. Hierzu gehören Vertreter der Actinomyceten und Clostridien aus der Gruppe der grampositiven Bakterien ebenso wie Enterobakterien und Vertreter der Gattungen *Pseudomonas* und *Acinetobacter* (SCHÄFER et al. 1996).

Tabelle 1: Stufenweiser Abbau von Polymeren im Termitendarm.

	I. Stufe Hydrolytische Mikroorganismen	II. Stufe Oxidative/Fermentative Mikroorganismen	III. Stufe Sulfatreduzierer Acetogene Methanogene
			
Cellulose (34 %-62 %)	Cellulase Flagellaten, Prokaryonten Hefen	β-Glucosidase Prokaryonten, Hefen	Lactat \rightarrow Acetat + CO₂ <i>Desulfovibrio</i>
Hemicellulose (14 %-32 %)	1,4-β-Xylanase 1,3-β-Galactanase Prokaryonten, Hefen	β-D-Galactosidase α-L-Arabinosidase β-D-Xylosidase Prokaryonten, Hefen	4H₂ + 2CO₂ \rightarrow Acetat + 2H₂O <i>Acetonema, Clostridium</i>
Lignin (18 %-39 %)			4H₂ + CO₂ \rightarrow CH₄ + 2H₂O <i>Methanobrevibacter</i>
Aromatische Verbindungen (5 %)		Aerober Abbau Prokaryonten	

Der Abbau von Lignin ist in dem weitgehend anaeroben Lebensraum des Termitendarms offensichtlich problematisch. Lignin ist ein komplexes Polymer, das sich aus verschiedenen Phenylpropanen aufbaut. An der Biosynthese wie auch am Abbau sind

radikalische Enzyme beteiligt. Zwar konnten aus verschiedenen Termiten Isolate gewonnen werden, die in der Lage sind, monomere Aromaten und oligomere Ligninverbindungen in Anwesenheit von Sauerstoff abzubauen. Es fanden sich jedoch bisher keine Mikroorganismen im Termitendarm, die komplexes Lignin abbauen konnten. Unter anaeroben Bedingungen kommt es auch bei monomeren Aromaten lediglich zu Modifikationen der Seitenketten, während der aromatische Ring selbst nicht angegriffen wird (KUHNIK et al. 1994, KUHNIK & KÖNIG 1997).

In der zweiten Stufe des Lignocelluloseabbaus werden die Bruchstücke, die durch den Abbau der Polymere entstehen, zu Monomeren umgesetzt und verstoffwechselt. Da es sich beim Termitendarm um ein sauerstofflimitiertes Gradientensystem handelt, werden die Mono- und Oligosaccharide sowohl oxidativ als auch fermentativ abgebaut. Die meisten Isolate, die sich bisher diesem Abbauschritt zuordnen ließen, gehören zu den grampositiven Bakterien und den Proteobakterien.

An der dritten Stufe des Lignocelluloseabbaus sind die methanogenen Bakterien, die homoacetogenen Bakterien und die sulfatreduzierenden Bakterien beteiligt. Die Methanogenese und die Acetogenese werden als die wichtigsten terminalen Stoffwechselprozesse angesehen (BRAUMANN et al. 1992). So sind Symbiosen zwischen Tieren und intestinalen methanogenen Bakterien weit verbreitet (HACKSTEIN et al. 1996). Alle bislang isolierten methanogenen Bakterien gehören zur Gattung *Methanobrevibacter*. Die Acetogenese ist insofern von besonderer Bedeutung, als dass die Termiten Acetat als Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen kann. Dementsprechend konnten in Termitendärmen Acetatkonzentrationen bis zu 5 nmol/mg nachgewiesen werden (ODELSON & BREZNAK 1983). Homoacetogene Bakterien der Gattungen *Acetonea*, *Clostridium* und *Sporomusa* konnten im Termitendarm identifiziert werden. Weiterhin konnten aus der Termitenart *Zootermopsis angusticollis* zwei homoacetogene Spirochaeten isoliert werden (*Treponema primitia* ZAS-1 und ZAS-2, LEADBETTER et al. 1999, GRABER & BREZNAK 2004). Sulfatreduzierer sind bei Termiten weit verbreitet und konnten im Intestinaltrakt verschiedener höherer und niederer Termiten nachgewiesen werden. Alle bisher gewonnenen Isolate gehören zur Gattung *Desulfovibrio* (u. a. TRINKERL et al. 1990, FRÖHLICH et al. 1999). Eine typische Eigenschaft dieser Organismen ist die unvollständige Oxidation der Elektronendonatoren zu Acetat.

1.5 Spirochaeten

Die Spirochaeten bilden eine der großen phylogenetischen Hauptlinien in der Domäne der Eubakterien (OLSEN et al. 2000). Aufgrund ihres einzigartigen Zellaufbaus und ihrer charakteristischen Bewegungsweise lassen sie sich aber auch morphologisch gut von anderen Bakterien abgrenzen. Spirochaeten sind bewegliche Bakterien von helikaler Gestalt (siehe Abb. 5A, B). Während einzelne Arten außergewöhnlich lang werden können ($> 250 \mu\text{m}$) ist im Vergleich dazu der Zelldurchmesser in der Regel sehr gering ($0,1 - 1 \mu\text{m}$). Die äußere Abgrenzung der Zelle bildet eine mehrschichtige Hüllmembran („outer sheath“, äußere Scheide) welche den so genannten Protoplasmazyylinder vollständig umschließt (Abb. 5C). Der Protoplasmazyylinder wiederum wird von einem Cytoplasmamembran-Zellwandkomplex abgeschlossen (CANALE-PAROLA 1984).

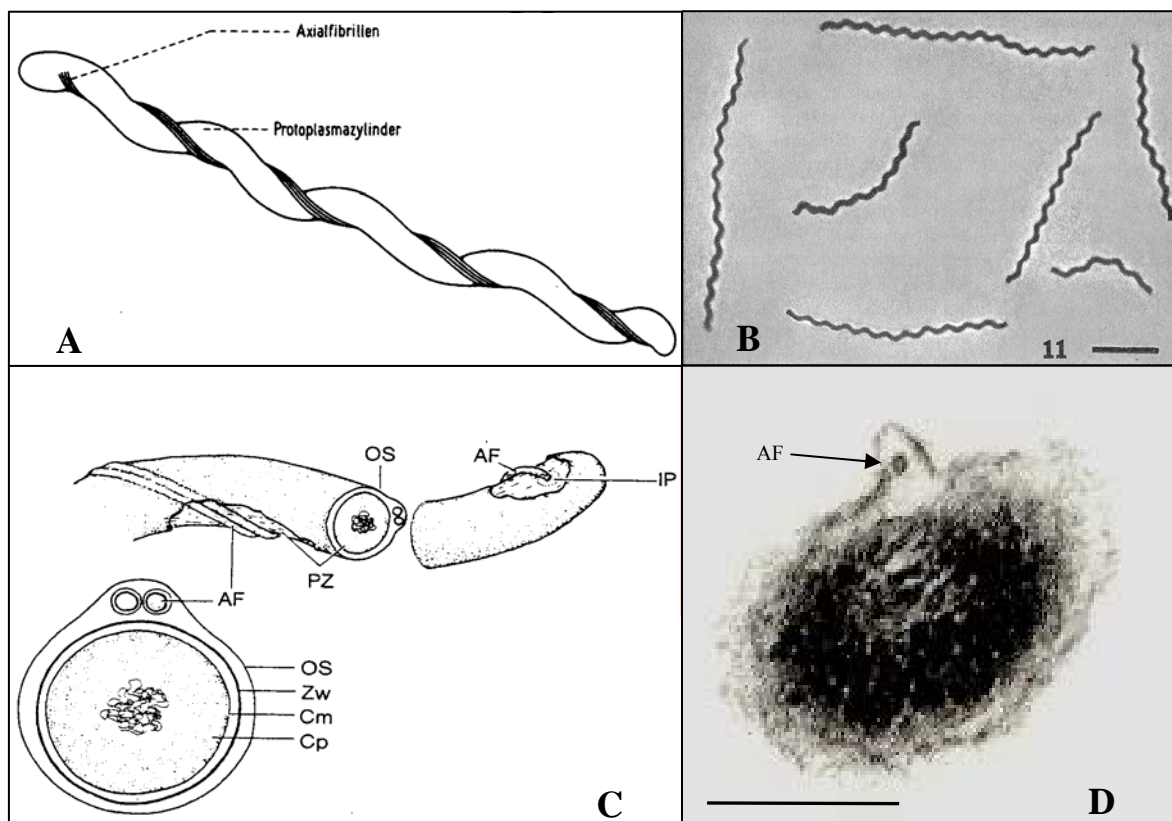


Abbildung 5: Morphologie der Spirochaeten.

(A) Schematische Darstellung der Zelle (FRITSCH 1999); (B) Mikrographie von *Spirochaeta halophila* (Balken entspricht $5 \mu\text{m}$, CANALE-PAROLA 1981); (C) Schematische Darstellung eines Querschnitts (OS: äußere Scheide, PZ: Protoplasmazyylinder, AF: Axial-Filamente, IP: Insertionspunkt, Zw: Zellwand, Cm: Cytoplasmembran, Cp: Cytoplasma; SCHLEGEL 1992); (D) Elektronenmikroskopische Aufnahme des Querschnitts eines Spirochaeten (AF: Axial-Filament; Balken entspricht $0,1 \mu\text{m}$, Aufnahme R. Radek).

Die Beweglichkeit der Spirochaeten beruht auf den periplasmatischen Axial-Flagellen (auch als Axial-Filamente oder Axial-Fibrillen bezeichnet), welche strukturell den Geißeln anderer Bakterien durchaus vergleichbar sind (Abb. 5C und 5D). Bei den Spirochaeten allerdings winden sich die Flagellen von den Insertionspunkten an den Zellpolen um den Protoplasmazyylinder und werden wie dieser von der Hüllmembran umschlossen (CANALE-PAROLA 1978).

Die für Spirochaeten typischen Bewegungen entstehen durch das Zusammenspiel der Flagellen, des starren Protoplasmazyinders und der flexiblen äußeren Scheide. Die Rotation der Flagellen erzeugt hierbei ein Drehmoment an den Zellpolen was eine Spannung auf die Zelle ausübt, und so die schlängelnden bisweilen ruckartigen Bewegungen auslöst. Diese Art der Bewegungsweise ermöglicht ihnen nicht nur das Schwimmen in flüssigen und viskosen Medien, sondern auch das Gleiten auf festen Oberflächen bzw. durch gelartige Strukturen.

Die Gruppe der Spirochaeten wird derzeit in die fünf Hauptgattungen *Spirochaeta*, *Treponema*, *Borrelia*, *Leptospira*, und *Brachyspira* unterteilt. Auf Basis des 16S rRNA-Gens zeigt sich das innerhalb der Gattungen *Spirochaeta* und *Treponema* eine hohe phylogenetische Diversität herrscht. Die Sequenzunterschiede zwischen einzelnen Arten einer Gattung liegen hierbei zum Teil oberhalb von 10 %. Im Gegensatz dazu bilden die Gattungen *Borrelia*, *Leptospira*, und *Brachyspira* phylogenetisch distinkte Gruppen (Abb. 6). Die Gattung *Spirochaeta* umfasst anaerobe und fakultativ aerobe Spirochaeten, welche vorwiegend in verschiedenen limnischen und marinen Gewässern und Sedimenten vorkommen. Im Gegensatz zu vielen anderen Spirochaeten sind die Mitglieder dieser Gattung frei lebend und nicht mit Wirten assoziiert. Die meisten Vertreter sind auf die Fermentation von verschiedenen Kohlenhydraten spezialisiert wobei im Wesentlichen Acetat, Ethanol, CO₂ und H₂, sowie in geringen Konzentrationen auch Lactat und Succinat produziert wird (CANALE-PAROLA 1977). Die Gattung *Treponema* umfasst strikt anaerobe oder mikroaerophile Arten, die als Symbionten, Kommensalen und Parasiten bei Menschen und Tieren vorkommen. Typische Lebensräume sind die Mundhöhle, der Darmtrakt oder der Genitalbereich ihrer jeweiligen Wirte. Bei den meisten charakterisierten Arten handelt es sich um Gärer, die Kohlenhydrate oder Aminosäuren fermentieren (SMIBERT 1984). Bei Vertretern der Gattung *Borrelia* handelt es sich überwiegend um pathogene Organismen, die sowohl bei Menschen als auch bei vielen Tieren zum Teil schwerwiegende Krankheiten auslösen können. Meist dienen hierbei blutsaugende Insekten, insbesondere Zecken und Läuse, als Krankheitsüberträger. Bekannte Vertreter sind der Erreger des

Rückfallfiebers *Borrelia recurrentis*, sowie der Auslöser der Lyme- oder Zecken-Borreliose *Borrelia burgdorferi*. Die Gattung *Leptospira* enthält streng aerobe Spirochaeten, wobei neben einigen freilebenden viele Arten parasitär leben. Eine Besonderheit dieser Gattung ist, dass die meisten Arten langkettige Fettsäuren als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen. Die Mitglieder der Gattung *Brachyspira* wurden ursprünglich der Gattung *Treponema* zugeordnet, anschließend aber mehrfach reklassifiziert (*Treponema* → *Serpula* → *Serpulina* → *Brachyspira*). Alle bekannten Vertreter sind mit Wirten assoziiert und einige sind bei Menschen und Tieren pathogen.

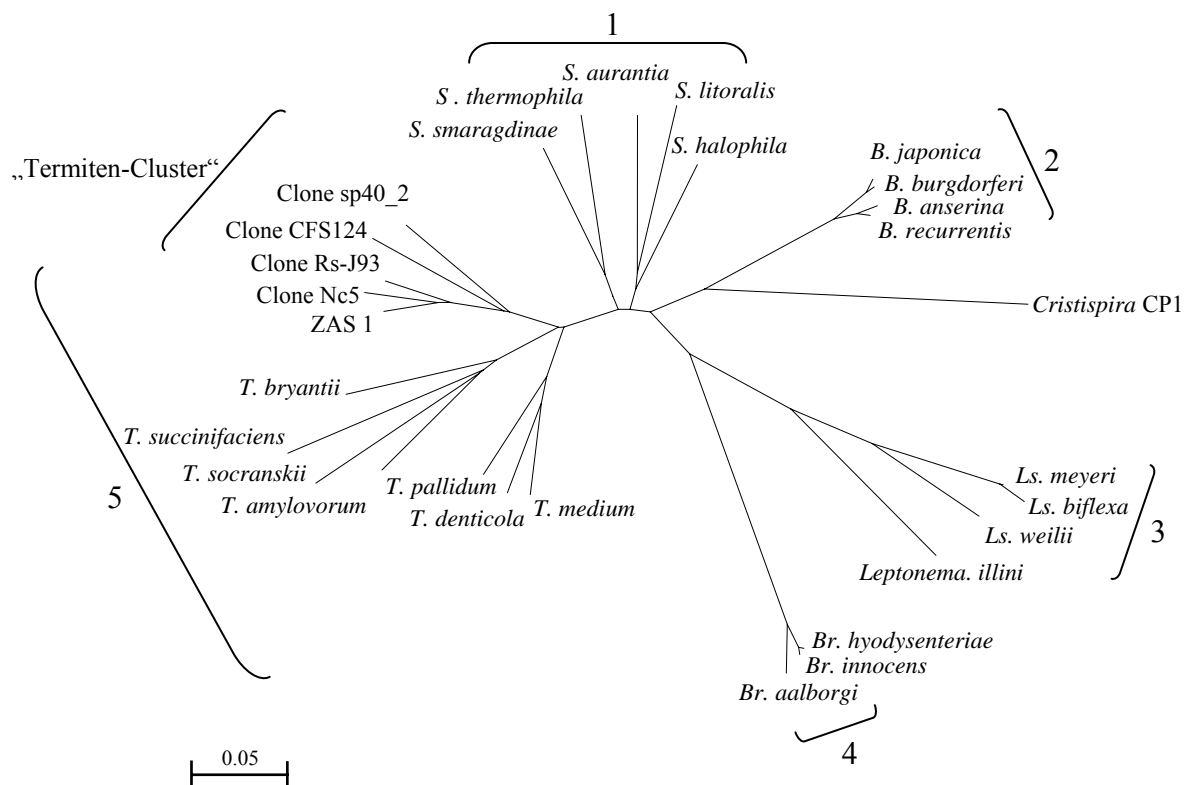


Abbildung 6: Stammbaum ausgesuchter Vertreter der Ordnung Spirochaetales. Phylogenetischer Stammbaum auf Basis von 16S rRNA Gensequenzen (Neighbor-joining method, SAITOU & NEI 1987). (1) Gattung *Spirochaeta*; (2) Gattung *Borrelia*; (3) Gattung *Leptospira*; (4) Gattung *Brachyspira*; (5) Gattung *Treponema*.

Obwohl Spirochaeten in vielen verschiedenen Habitaten anzutreffen sind, gibt es jedoch kaum einen Lebensraum in dem sie in vergleichbarer Zelldichte und morphologischer Vielfalt vorkommen wie im Termitendarm. Sowohl bei den höheren als auch bei den niederen Termiten stellen die Spirochaeten die dominierende Bakteriengruppe

dar. Neben den auffälligen großen Spirochaeten existiert eine Vielzahl mittlerer und kleinerer Formen (Abb. 7). Das Größenspektrum reicht von 0,2 µm Durchmesser und 3 µm Länge bis zu 1 µm Durchmesser und 100 µm Länge. Im Darm der Termiten *Mastotermes darwiniensis* konnten aufgrund von morphologischen Merkmalen mindestens 12 verschiedene Spirochaeten unterschieden werden (BERCHTOLD et al. 1994). Neben den frei im Darm vorkommenden Spirochaeten gibt es bei den niederen Termiten zudem Arten, die in einer Symbiose mit Flagellaten leben. Bei dem Flagellaten *Mixotricha paradoxa* aus der Termitenart *Mastotermes darwiniensis* ist ein Großteil der Oberfläche mit einem Bakterienstäbchen sowie verschiedenen fest verankerten Spirochaeten besetzt (WENZEL et al. 2002a). Interessanterweise sind es diese Spirochaeten, die den Flagellaten voranbewegen und nicht dessen eigene Flagellen (CLEVELAND & GRIMSTONE 1964). Über die genaue Funktion und die Hintergründe dieser erstaunlichen Symbiose herrscht allerdings nach wie vor Unklarheit.

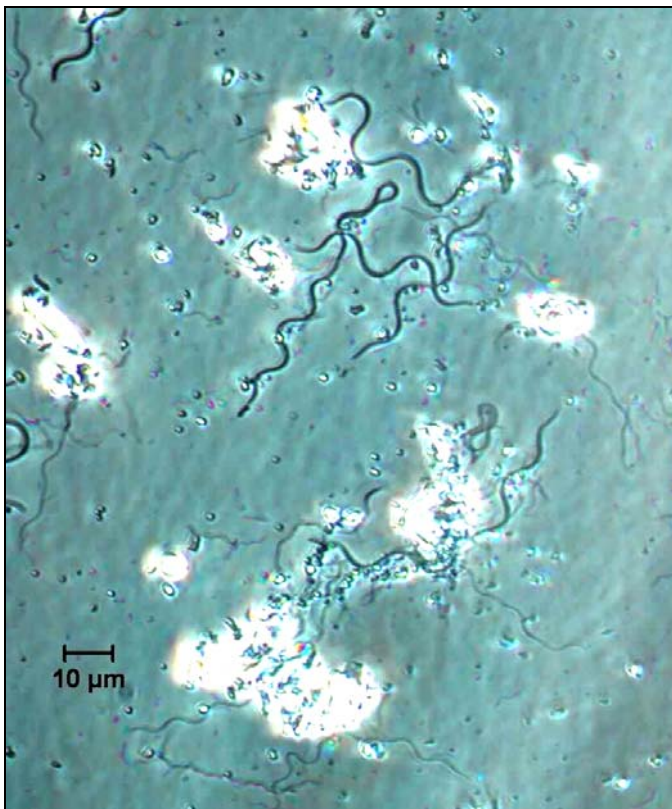


Abbildung 7: Spirochaeten aus dem Darm der Termiten *Incisitermes marginipennis*.

Die taxonomische Einteilung der frei im Darm lebenden Spirochaeten erfolgte ursprünglich auf der Basis ultrastruktureller Merkmale, da sowohl Isolate als auch molekularbiologische Daten fehlten. Hiernach wurden die Spirochaeten des Termitendarms in die Gattungen *Hollandina*, *Pillotina*, *Clevelandina* und *Diplocalyx*

eingeteilt (MARGULIS & HINKLE 1992). Über die phylogenetische Position dieser Gattungen innerhalb des Stammbaums der Spirochaeten war jedoch nichts bekannt. Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Isolierung und Kultivierung dieser Organismen wurden eine Reihe von kultivierungsunabhängigen Untersuchungen durchgeführt um die phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen mit Spirochaeten anderer Ökosysteme aufzuklären (BERCHTOLD et al. 1994, BERCHTOLD & KÖNIG 1996, PASTER et al. 1996). Alle ermittelten Spirochaeten-Sequenzen dieser ersten molekularbiologischen Untersuchungen ließen sich der *Treponema*-Gruppe des Spirochaeten-Stammbaums zuordnen, worauf der so genannte „Termiten-Cluster“ etabliert wurde (Abb. 5). Allerdings sind die phylogenetischen Unterschiede zu bekannten *Treponema*-Arten recht groß (ca. 10 - 20 % in der 16S rRNA Gensequenz). Neuere Untersuchungen zeigen eine noch breitere phylogenetische Diversität der Darm-Spirochaeten, wobei neben einem zweiten Termiten-Cluster innerhalb der Treponemen auch Sequenzen entdeckt wurden, die eher der Gattung *Spirochaeta* zuzuordnen sind (LILBURN et al. 1999, IDA et al. 2000, HONGOHO et al. 2003, NODA et al. 2003). Bisher liegen nur drei Isolate von Darm-Spirochaeten vor, die alle aus der Termiten *Zootermopsis angusticollis* stammen (LEADBETTER et al. 1999, LILBURN et al. 2001, GRABER & BREZNAK 2004, GRABER et al. 2004). Überraschenderweise handelt es sich bei zwei der Isolate um homoacetogene Organismen (Bildung von Acetat aus CO₂ und H₂), und damit um einen Stoffwechsellyp, der in der Gruppe der Spirochaeten erstmalig nachgewiesen werden konnte. Die bisher gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass der Termitendarm ein enormes Reservoir für bis heute noch völlig unbekannte Spirochaeten-Arten darstellt. Aufgrund der geringen Anzahl von Isolaten ist jedoch noch wenig über ihre Physiologie und Bedeutung innerhalb des komplexen Ökosystems Termitendarm bekannt.

1.6 Sulfatreduzierende Bakterien im Intestinaltrakt von Insekten

Die Sulfatreduktion ist ein wesentlicher terminaler Oxidationsprozess in anoxischen Ökosystemen. Gut untersucht ist die Sulfatreduktion insbesondere in marinen Sedimenten, die sich durch hohe Sulfatkonzentrationen im Porenwasser auszeichnen. Hier beträgt der Anteil der Sulfatreduktion an der Gesamtrespiration bis zu 50 % (JØRGENSEN 1982). Sulfatreduzierende Bakterien konnten bisher in zahlreichen Ökosystemen nachgewiesen werden. Außer in marinen und limnischen Sedimenten auch im Intestinaltrakt von

Menschen und verschiedenen höheren Tieren (HOWARD & HUNGATE 1976, WIDDEL & PFENNIG 1984, GIBSON et al. 1988, SASS et al. 1998). Darüber hinaus scheinen Sulfatreduzierer auch im Intestinaltrakt von Insekten eine wichtige Rolle zu spielen. Sulfatreduzierer wurden im Darm höherer und niederer Termiten sowie holzfressender Schaben gefunden, wo sie neben den methanogen und homoacetogenen Bakterien an der Endoxidation des organischen Materials beteiligt sind (BRAUMANN et al. 1990, TRINKERL et al. 1990, KUHNIGK et al. 1996, OHKUMA & KUDO 1996, FROEHLICH et al. 1999).

Die sulfatreduzierenden Bakterien sind eine phylogenetisch heterogene Gruppe, die über die gemeinsame Fähigkeit zur dissimilatorischen Reduktion von Sulfat definiert wird (POSTGATE 1987). Während sich die meisten charakterisierten Vertreter der δ -Gruppe der Proteobakterien zuordnen lassen, finden sich Sulfatreduzierer auch bei den grampositiven Bakterien (*Desulfotomaculum*) und den Archaeen (*Archaeoglobus*). Alle sulfatreduzierenden Bakterien, die bislang aus dem Darmtrakt von Tieren isoliert werden konnten, ließen sich der Gattung *Desulfovibrio* zuordnen. Vertreter dieser Gattung gehören physiologisch zur Gruppe der so genannten unvollständigen Oxidierer, d. h. die Elektronendonatoren werden zu Acetat und CO_2 und nicht vollständig zu CO_2 oxidiert. Die meisten *Desulfovibrio*-Arten sind zudem in der Lage, Wasserstoff als Elektronendonator zu nutzen (WIDDEL & HANSEN 1992). In den relativ sulfatarmen Darmsystemen stehen die Sulfatreduzierer in direkter Konkurrenz zu den methanogen und acetogenen Bakterien um den verfügbaren Wasserstoff (CORD-RUWISCH et al. 1988). Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass Sulfatreduzierer in Co-Kultur mit methanogenen Bakterien Laktat in Abwesenheit von Sulfat nutzen können (ESNAULT et al. 1988).

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

- Anaerobenzelt Coy Laboratory Products, Grass Lake, USA
- Autoklaven Omega 121/131, Prestige Medical, Blackburn, England
FVS/1, Tecnomara, Fernwald
- Elektrophorese Wide Mini-Sub Cell GT mit Power Pac 200, Bio-Rad
Laboratories, München
- Geldokumentation Helioplan S49 Videosystem, Polaroid, Offenbach
Software, Intas, Göttingen
- Mikroskope Fluoreszenzmikroskop Axioplan/Axiophot 2, Carl Zeiss, Jena
Laborlux 11, Leitz, Wetzlar
- Mikroskop-Kamera SPOT CCD mit SPOT Advanced Software, Visitron Systems,
Puchheim
- pH-Meter CG 840, Schott, Hofheim
- Photometer 1101 M, Eppendorf, Hamburg
UV-120-01, Shimadzu, Kyoto, Japan
- Schüttler G 10, New Brunswick Scientific, Edison, USA
G 25 Incubator, New Brunswick Scientific, Edison, USA
- Thermocycler Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg
- Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg
- Transilluminator FLX-20M, Biometra, Göttingen
- Vortexer Vibriofix VF1, IKA-Werk, Staufen
- Wasseranlagen Milli-RO Plus 30, Millipore, Molsheim, Frankreich
Milli-Q Plus 185, Millipore, Molsheim, Frankreich
- Zentrifugen 5403, Eppendorf, Hamburg
J2-MC, Beckmann Coulter, Palo Alto, USA

2.2 Chemikalien

- (3-[N-Morpholino]propansulfonsäure) (Sigma, München)
- 4-Aminobenzoessäure (Fluka, Neu-Ulm)
- Agarose (Peqlab, Erlangen)
- Alanin (Roth, Karlsruhe)
- Ameisensäure (98 %) (Roth)
- Ammoniumchlorid (Merck, Darmstadt)
- Ampicillin (Sigma)
- Arabinogalactan (Sigma)
- Arabinose (Sigma)
- Ascorbinsäure (Roth)
- Bactoagar (Difco, Detroit)
- Biotin (Fluka)
- Borsäure (Roth)
- Calcium-D(+)-Pantothenat (Sigma)
- Calciumchlorid × 2 H₂O (Fluka)
- Calcium-Folinat (Sigma)
- Cellobiose (Roth)
- Cellulose (Sigma)
- Cobaltchlorid × 6 H₂O (Sigma)
- Coenzym A (Sigma)
- Cystein (Merck)
- DABCO (Sigma)
- DAPI (Fluka)
- Di-Kaliumhydrogenphosphat (Roth)
- Dithiothreitol (DTT) (Sigma)
- EDTA (Roth)
- Eisenchlorid × 4 H₂O (Merck)
- Eisensulfat × 7 H₂O (Merck)
- Essigsäure (100 %) (Roth)
- Ethanol (99,8 %) (Roth)
- Ethidiumbromid (10 mg/ml) (Sigma)
- FAD (Sigma)
- Fleischextrakt (Merck)
- Folsäure (Sigma)
- Galactose (Roth)
- Glucose × 1 H₂O (Merck)
- Glutamat (Sigma)
- Glycerin (100 %) (Roth)
- Glycin (Roth)
- Hefeextrakt (Gibco-BRL, Eggenstein)
- Hemin (Fluka)
- Kaliumchlorid (Merck)
- Kaliumdihydrogenphosphat (Roth)
- Kohlendioxid (Linde, Wiesbaden)
- Kupferchlorid × 2 H₂O (Merck)
- Leucin (Roth)
- Lösliche Stärke (Merck)
- Magnesiumchlorid × 6 H₂O (Roth)
- Magnesiumsulfat × 7 H₂O (Merck)
- Malotriose (Sigma)
- Maltose (Fluka)
- Maltotetraose (Sigma)
- Manganchlorid × 2 H₂O (Merck)
- Mannose (Sigma)
- NAD (Roche, Mannheim)
- Natriumacetat (Roth)
- Natriumformiat (Fluka)
- Natriumhydrogencarbonat (Merck)
- Natriumhydroxid (Roth)

- Natriumlactat (Fluka)
- Natriummolybdat $\times 2 \text{ H}_2\text{O}$ (Merck)
- Natriumselenit $\times 5 \text{ H}_2\text{O}$ (Merck)
- Natriumselenit (Fluka)
- Natriumsulfat (Roth)
- Natrium-Thioglycolat (Merck)
- Natriumwolframat $\times 2 \text{ H}_2\text{O}$ (Merck)
- Nickelchlorid $\times 6 \text{ H}_2\text{O}$ (Merck)
- Nicotinamid (Merck)
- Nicotinsäure (Fluka)
- Pepton aus Casein (Roth)
- p-Nitrophenyl- β -D-Fucopyranosid (Sigma)
- p-Nitrophenyl- α -D-Galactopyranosid (Sigma)
- p-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (Sigma)
- p-Nitrophenyl- α -D-Glucopyranosid (Sigma)
- p-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid (Sigma)
- p-Nitrophenyl- β -D-Glucuronid (Sigma)
- p-Nitrophenyl- α -D-Mannopyranosid (Sigma)
- p-Nitrophenyl- β -D-Xylopyranosid (Sigma)
- p-Nitrophenyl- β -L-Arabinopyranosid (Sigma)
- Prolin (Merck)
- Pyridoxal-HCl (Sigma)
- Pyridoxal-Phosphat (Sigma)
- Pyridoxinhydrochlorid (Sigma,)
- Resazurin (Fluka)
- Riboflavin (Sigma)
- Rifamycin SV (Sigma)
- Salzsäure (25 %) (Fluka)
- Schwefelsäure (95 %) (Roth)
- Serin (Roth)
- Stickstoff (Linde)
- Thiamin Pyrophosphat (Serva, Heidelberg)
- Thiamin-HCl $\times 2 \text{ H}_2\text{O}$ (Fluka)
- Tris (Roth)
- Vitamin B₁₂ (Fluka)
- Wasserstoff (Linde)
- Xylan (Fluka)
- Xylose (Roth)
- Zinkchlorid (RdH, Seelze)

2.3 Lösungen, Kits und Puffer

Lösungen:

- Antibleichlösung
 - DABCO (Diazabicyclooctan) 233 mg
 - Glycerin (100 %) 9 ml
 - ad 10 ml PBS-Puffer
- DAPI-Stammlösung
 - DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) 1 mg
 - dH₂O 1 ml
- DNA-Färbelösung
 - Ethidiumbromid (10 mg/ml, Sigma) 25 µl
 - 1 × TBE-Puffer 500 ml
- λ-DNA Längenstandard (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
 - λ-DNA (0,5 mg/ml, mit *EcoRI/HindIII* verdaut) 10 µl
 - 6 × Ladepuffer 10 µl
 - dH₂O 40 µl
- dNTP-Lösung
 - dATP, dCTP, dGTP, dTTP (100 mM, Peqlab) je 25 µl
 - dH₂O 900 µl

Kits:

- Dnyabeads[®] DNA Direct[™] Universal Kit (DynaL Biotech, Hamburg)
- InstaGene[™]-Matrix (Bio-Rad Laboratories, München)
- QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden)
- QIAquick[®] Gel Extraction Kit (Qiagen)
- QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen)
- TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA)

Puffer:

➤ 6 × Ladepuffer (MBI Fermentas)

- Bromphenolblau 0,2 %
- Xylen Cyanol FF 0,2 %
- Glycerin 60 %
- EDTA 60 mM

➤ Lyse-Puffer

- Tris/HCl 100 mM
 - EDTA 20 mM
 - NaCl 300 mM
 - SDS 2 % (w/v)
 - 2-Mercaptoethanol 2 % (v/v)
 - Proteinase K 100 µg/ml
 - 5 M Natriumperchlorat ad 0,5 vol.
- pH 8,0

➤ MOPS-Puffer (10 mM)

- (3-[N-Morpholino]propansulfonsäure) 2,1 g
 - dH₂O 1000 ml
- pH 7,2

➤ PBS-Puffer

- NaCl 8 g
 - KCl 0,22 g
 - Na₂HPO₄ 1,14 g
 - KH₂PO₄ 0,2 g
 - ad 1000 ml dH₂O
- pH 7,4

➤ 10 × PCR-Puffer

- Tris/HCl 100 mM
 - KCl 500 mM
- pH 8,3

➤ 1 x SSC

- NaCl 150 mM
 - Trinatriumcitrat 15 mM
- pH 7

➤ TBE-Puffer

- Tris/HCl 10,8 g
 - H₃BO₃ 5,5 g
 - EDTA 0,74 g
 - ad 1000 ml dH₂O
- pH 8,3

➤ Zellsuspensions-Puffer

- Tris/HCl 10 mM
 - EDTA 1 mM
 - Saccharose 350 mM
- pH 8,0

2.4 Organismen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Termiten *Coptotermes formosanus* (Shiraki), *Coptotermes niger* (Snyder), *Incisitermes marginipennis* (Latreille), *Incisitermes tabogae* (Snyder), *Kalotermes flavicollis* (Fabricius), *Mastotermes darwiniensis* (Froggatt), *Neotermes castaneus* (Burmeister), *Reticulitermes speratus* (Kolbe) und *Zootermopsis angusticollis* (Hagen) wurden von der Bundesanstalt für Materialforschung und Materialprüfung (BAM, Berlin) zur Verfügung gestellt. Die Termiten wurden bei 30 °C (*Zootermopsis angusticollis* bei 20 °C) in, mit angefeuchtetem Vermiculit gefüllten, Metall- oder Kunststoffbehältern gehalten. Je nach Termiten-Art wurde Birken-, Buchen- oder Pappelholz verfüttert.

Exemplare des Rosenkäfers *Pachnoda marginata* (Drury) (Coleoptera) wurden vom Zoologischen Garten in Frankfurt/Main zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden bei 30 °C gehalten und mit Karotten gefüttert.

2.5 Präparation von Därmen aus Termiten und Rosenkäfern

Für die Anreicherungsexperimente wurden jeweils mindestens 10 Termitendärme verwendet, da ein ggf. schlechter physiologischer Zustand einzelner Termiten erheblichen Einfluss auf die Darmflora haben kann. Die verwendeten Termiten wurden mit Ethanol (70 %) abgetötet sowie oberflächendesinfiziert und anschließend mit sterilem Wasser abgespült. Die folgenden Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Därme wurden aus dem Abdomen entfernt und in Kunststoffgefäße überführt. Anschließend wurde der Inhalt der Därme mit einer Spritze in Reagenzröhrchen mit Wachstumsmedium überführt (siehe Kap. 2.6.1). Die Röhrchen enthielten 5 ml Medium und waren mittels Butyl-Stopfen gasdicht verschlossen.

Für die Anreicherung von sulfatreduzierenden Bakterien aus Rosenkäfern wurden die Tiere dekapitiert und mit Ethanol (70 %) oberflächendesinfiziert. Anschließend wurde unter sterilen Bedingungen das Abdomen geöffnet und der Darm entfernt. Der Darminhalt wurde in gasdicht verschlossene Reagenzröhrchen mit Wachstumsmedium überführt (siehe Kap. 2.7.1).

2.6 Methoden zur Isolierung und Charakterisierung von Spirochaeten

2.6.1 Medien und Wachstumssubstrate

Als Basalmedium für die Anreicherung und Isolierung von Spirochaeten aus dem Termitendarm wurde ein modifiziertes Medium nach LEADBETTER & BREZNAK (1996) verwendet. Die eingewogenen Salze (Tab. 2) wurden unter Rühren zugegeben und gelöst. Anschließend wurde das Medium in einem Anaerobenzelt in Reagenzröhrchen überführt (jeweils 5 ml) welche mit Butylstopfen gasdicht verschlossen wurden.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Basalmediums.

Vor dem Autoklavieren	
Destilliertes Wasser	1000 ml
NaCl	1,00 g
KCl	0,50 g
MgCl ₂ × 6 H ₂ O	0,40 g
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	0,10 g
NH ₄ Cl	0,30 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
Na ₂ SO ₄	0,15 g
Nach dem Autoklavieren	
	Je 5 ml Medium
MOPS-Puffer (10 mM)	0,05 ml
Selenit-Wolframat-Lösung ¹⁾ (Tab. 3)	0,01 ml
SL 10 ¹⁾ (Tab. 4)	0,01 ml
NaHCO ₃ (10 % w/v)	0,20 ml
Vitaminlösung ¹⁾ (Tab. 5)	0,01 ml
Cofaktor-Lösung ¹⁾ (Tab. 6)	0,10 ml
Dithiothreitol (DTT; 0,5 M)	0,05 ml

1) Optional wurde das Medium statt der angegebenen Zusätze mit Hefeextrakt (0,1 - 0,4 %) supplementiert.

Die Gasphase (ca. $\frac{3}{4}$ des Kulturröhrchens) wurde mit reinem Stickstoff oder alternativ mit einem Gemisch aus Wasserstoff und Kohlendioxid (80 / 20) ausgetauscht und die Röhrchen anschließend autoklaviert. Die Zugabe von Supplementlösungen und Wachstumssubstraten erfolgte nach dem Autoklavieren aus sterilen Stammlösungen. Der pH-Wert des fertigen Mediums lag zwischen 7,3 und 7,4. Bei Anreicherungsansätzen wurde neben den in Tabelle 2 angegebenen Substanzen zusätzlich Rifamycin SV (Sigma-Aldrich, Steinheim) in einer Endkonzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben. Das Antibiotikum sollte das Wachstum der Begleitflora hemmen. Spirochaeten selbst sind weitgehend unempfindlich gegen Rifamycin.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Selenit-Wolframat-Lösung (nach WIDDEL 1980).

Destilliertes Wasser	1000 ml
NaOH	0,4 g
$\text{Na}_2\text{SeO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	6 mg
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	8 mg

Tabelle 4: Zusammensetzung der Spurenelementlösung SL 10 (nach TSCHECH & PFENNIG 1984).

HCl (25 %; 7,7 M) ¹⁾	10 ml
$\text{FeCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ ¹⁾	1,5 g
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	1,1 g
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	190 mg
$\text{MnCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	100 mg
ZnCl_2	70 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	36 mg
$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	24 mg
H_3BO_3	6 mg
$\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	2 mg
Destilliertes Wasser	990 ml

1) Vor dem Zusetzen der anderen Bestandteile wurde das Eisenchlorid vollständig in der Salzsäure gelöst.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Vitaminlösung.

Vitamin B ₁₂	100 mg
p-Aminobenzoessäure	80 mg
D (+)-Biotin	20 mg
Nikotinsäure	200 mg
Ca-D (+)-Pantothenat	100 mg
Pyridoxinhydrochlorid	300 mg
Thiamin-HCl × 2H ₂ O	200 mg
Destilliertes Wasser	1000 ml

Der pH-Wert wurde auf 7 eingestellt, die Lösung sterilfiltriert und bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Tabelle 6: Zusammensetzung der Cofaktor-Lösung (nach LEADBETTER 1999).

Pyridoxal-HCl	250 mg
Pyridoxal Phosphat	250 mg
Calcium Folinat	50 mg
β-NAD	50 mg
Coenzym A	50 mg
FAD	50 mg
Nicotinamid	25 mg
Folsäure	2,5 mg
Riboflavin	0,5 mg
Haemin ¹⁾	65 mg
Thiamin Pyrophosphat	2,5 g
Destilliertes Wasser	1000 ml

1) Das Haemin wurde vor der Zugabe in 10 mM NaOH vollständig gelöst.

Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH auf 7 eingestellt und die Lösung anschließend steril filtriert.

Für die Anreicherung von Spirochaeten aus dem Termitendarm wurde dem, in Tabelle 2 angegebenen Basalmedium verschiedene Wachstumssubstrate bzw. Substratgemische zugegeben (Tab. 7). Das in Tabelle 7 aufgeführte Hefeautolysat wurde im Labor

hergestellt. Hierbei wurden 5,6 g getrocknete Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*, Sigma, München) in 20 ml destilliertem Wasser suspendiert und zur Autolyse der Zellen für 24 h bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurden Zelltrümmer und andere unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation entfernt (20.000 × g, 15 min) und der Überstand mit 5 M NaOH neutralisiert. Die Lösung wurde steril filtriert und unter einer Stickstoff-Atmosphäre bei 4 °C gelagert.

Tabelle 7: Substratgemische für die Anreicherung von Spirochaeten.

Substratgemische	Einzelsubstrate	Endkonzentration
S I	Pepton / Hefeextrakt / Fleischextrakt / Glucose	0,2 % / 0,2 % / 0,1 % / 0,1 %
S II	Pepton / Hefeextrakt / Glucose	0,5 % / 0,2 % / 0,2 %
S III	Pepton / Hefeextrakt / Glucose	0,2 % / 0,2 % / 0,5 %
Hexosen	Glucose, Galactose, Mannose	jeweils 2 mM
Pentosen	Arabinose, Xylose	jeweils 2 mM
Polysaccharide I	Cellulose, Xylan	jeweils 0,05 %
Polysaccharide II	Arabinogalactan, lösl. Stärke	jeweils 0,05 %
Aminosäuren I	Alanin, Cystein, Glutamat, Serin	jeweils 1,5 mM
Aminosäuren II	Alanin/Glycin, Leucin/Prolin	jeweils 1 mM/2 mM

2.6.2 Gewinnung von Reinkulturen

Anreicherungskulturen bei denen Spirochaeten angewachsen und gegenüber der Begleitflora in der Mehrzahl waren, wurden zur Gewinnung von Isolaten genutzt. Die Isolation erfolgte über Tiefagar-Verdünnungsreihen (WIDDEL & PFENNIG 1984) im jeweiligen Anreicherungsmedium. Die Ansätze hatten einen Agargehalt von 0,9 - 1,2 % und wurden zwischen 2 - 8 Wochen inkubiert. Zur Gewinnung von Reinkulturen wurden 3 - 4 Verdünnungsreihen in Folge durchgeführt.

2.6.3 Bestimmung von Stoffwechselprodukten und fermentierbaren Substraten

Die Bestimmung von Stoffwechselprodukten sowie des Verbrauches von angebotenen Substraten wurde mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) analysiert. Hierbei wurde eine Methode

gewählt (stark saurer Kationenaustauscher, verdünnte Säure als Eluent) mit der sich Alkohole, organische Säuren und Zucker in einem Lauf analysieren lassen (PFEIFFER & RADLER 1985). Die Messungen wurden mit einer HPLC-Anlage (Shimadzu LC 10AD VP, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) mit Brechungsindex-Detektor (RI Detector ERC-7515B, Erma CR. Inc., Kawaguchi-City, Japan) durchgeführt. Als Trennsäule diente eine Aminex HPX 87H mit den Abmessungen 300 × 7,8 mm (Bio Rad Lab., Calif., USA) und eine vorgeschaltete Micro Guard Vorsäule (Bio Rad).

Die Bedingungen für die HPLC-Analysen waren wie folgt:

- Probenvolumen 5 µl
- Mobile Phase 0,0065 M H₂SO₄
- Säulentemperatur 65 °C
- Fließgeschwindigkeit 0,6 ml/min

Zu analysierende Proben wurden vor dem Einspritzen in die Anlage abzentrifugiert (13.000 Upm) und filtriert (0,2 µm Porengröße). Die quantitative Bestimmung der Substanzen erfolgte über vergleichende Analyse mit definierten Referenz-Lösungen.

2.6.4 Bestimmung von Zellzahlen und Verdopplungszeiten

Die Bestimmung von Zellzahlen erfolgte unter einem Fluoreszenzmikroskop nach Anfärbung der Zellen mit dem DNA-Fluoreszenzfarbstoff DAPI. Hierzu wurden 1 ml Kultur (in ausreichender Verdünnung) mit 1 µl DAPI-Lösung (1 mg/ml) versetzt und 5 min im Dunkeln inkubiert. Die angefärbten Bakterien wurden auf einen Polycarbonat-Membranrundfilter (0,2 µm Porenweite; Millipore, Molsheim, Frankreich) filtriert und mit sterilem Wasser gespült um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Anschließend wurden die Filter auf einen Objektträger gelegt und mit ca. 50 µl DABCO behandelt, um ein Ausbleichen der Präparate zu verhindern. Die Auswertung erfolgte mit dem Fluoreszenz-Mikroskop unter UV-Anregung mit Hilfe eines Zählquadrats.

Die Bestimmung der Verdopplungszeit erfolgte über die Zunahme der optischen Dichte während der exponentiellen Wachstumsphase der Kulturen. Die Messungen wurden mit einem Reagenzglas-Photometer bei 543 nm durchgeführt.

2.6.5 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Zellen der elektronenmikroskopisch zu untersuchenden Stämme wurden in geeigneter Verdünnung in einer Fixierlösung (Paraformaldehyd 4 %; Glutaraldehyd 2,5 %; in 0,05 M Cacodylat-Puffer pH 7,2) für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit Puffer gewaschen und für 1½ Stunden in einer Osmiumtetroxid-Lösung (2 %) nachfixiert. Die fixierten Zellen wurden in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (30, 50, 70, 90 und 3 x 100 %) vollständig entwässert und in Epoxid-Harz (Spurrs Resin) eingebettet. Ultradünnschnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat behandelt und mit einem Philips CEM 120 Bio-Twin Transmissionen-Elektronenmikroskop analysiert.

Die elektronenmikroskopischen Bilder der Isolate aus dem Termitendarm wurden von Frau Renate Radek am Institut für Biologie/Zoologie der Freien Universität Berlin aufgenommen.

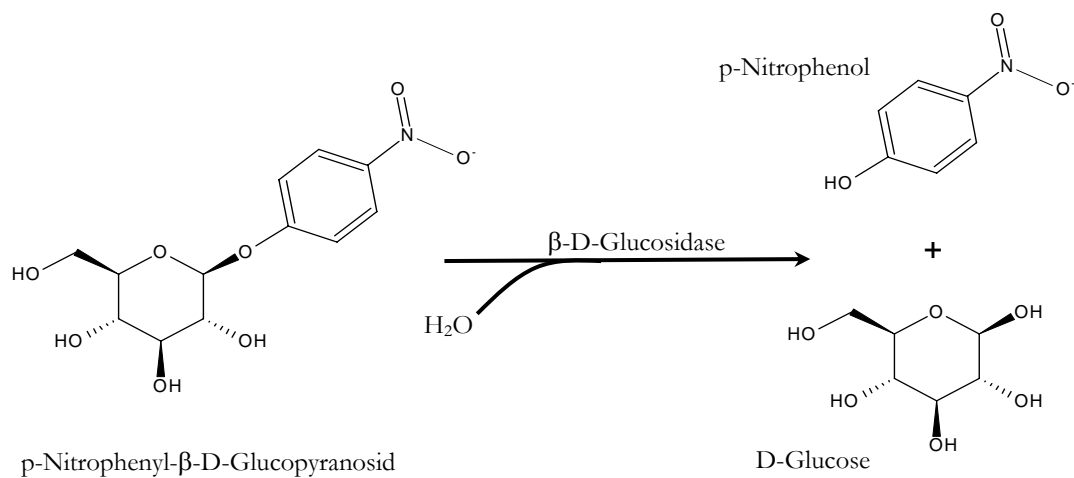
2.6.6 Aktivitätsnachweis hydrolytischer Enzyme

Der Aktivitätsnachweis verschiedener hydrolytischer Enzyme, welche beim Abbau von Lignocellulose sowie pflanzlicher Speicherstoffe beteiligt sind, wurde mit Hilfe von Nitrophenol-gekoppelten Modellsubstraten ermittelt. Die verwendeten Substrate sowie die zugehörigen Enzyme sind in Tabelle 8 angegeben. Das Prinzip der Methode beruht auf der hydrolytischen Spaltung der verwendeten Substrate infolge enzymatischer Aktivität (siehe Abb. 8). Das hierbei freigesetzte Nitrophenol führt zu einer deutlich sichtbaren Gelbfärbung des Testansatzes. Zur Durchführung der Untersuchung wurden die verwendeten Reinkulturen in den jeweiligen Medien bis zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Anschließend wurden die Modellsubstrate aus steril filtrierten Stammlösungen zugegeben (finale Konzentration: 0,3 mg / ml) und der Testansatz im Dunkeln bei 30 °C inkubiert. Die Kontrolle auf sichtbare Gelbfärbung der Ansätze infolge der Freisetzung von Nitrophenol erfolgte nach 24 Stunden. Gegebenenfalls wurde eine Überprüfung mittels Spektralphotometer bei 400 nm gegen den Kontrollansatz durchgeführt.

Tabelle 8: Modellsubstrate und zugehörige Enzyme.

Nitrophenol-gekoppelte Substrate	Enzyme ¹⁾
p-Nitrophenyl- α -L-Arabinopyranosid	α -L-Arabinosidase
p-Nitrophenyl- β -D-Fucopyranosid	β -D-Fucosidase
p-Nitrophenyl- β -D-Cellobiosid	β -D-Cellobiosidase
p-Nitrophenyl- α -D-Galactopyranosid	α -D-Galactosidase
p-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid	β -D-Galactosidase
p-Nitrophenyl- α -D-Glucopyranosid	α -D-Glucosidase
p-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid	β -D-Glucosidase
p-Nitrophenyl- β -D-Glucuronid	β -D-Glucuronidase
p-Nitrophenyl- α -D-Mannopyranosid	α -D-Mannosidase
p-Nitrophenyl- β -D-Xylopyranosid	β -D-Xylosidase

1) Nachweisbare Enzymaktivität.

**Abbildung 8:** Freisetzung von Nitrophenol infolge enzymatischer Aktivität.

2.6.7 Bestimmung des GC-Gehaltes

Für die Bestimmung des GC-Gehaltes von Stamm SPN1 wurde eine 1000 ml Kultur im Kultivierungsmedium angesetzt. Die gewachsenen Zellen wurden abzentrifugiert ($10.000 \times g$; $4 \text{ }^\circ\text{C}$) und anschließend in 20 ml Zell-Suspensionspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 50 mg Lysozym inkubierte der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur. Danach wurde die Suspension mit 30 ml vorgewärmten Lyse-Puffer

versetzt und für eine Stunde bei 50 °C inkubiert. Anschließend erfolgten wiederholte Phenol-Chloroform-Extraktionen, bis keine Proteinschicht mehr an der Grenzfläche erkennbar war. Die Nukleinsäuren in der abgetrennten wässrigen Phase wurden durch Zugabe von Isopropanol (0,6-faches Volumen) gefällt, zweimal mit kaltem Ethanol (80 %) gewaschen und schließlich luftgetrocknet. Um die RNA aus dem Gemisch zu entfernen wurden die getrockneten Nukleinsäuren in 1 x SSC-Puffer resuspendiert und mit 0,25 ml RNase A-Lösung und 2,5 ml RNase T₁-Lösung versetzt. Nach 30 min Inkubation wurden die zugesetzten Enzyme durch wiederholte Extraktion mit einer Mischung aus Chloroform und 3 % Isopentanol (v/v) entfernt. Zur erneuten Fällung der DNA wurde die abgetrennte wässrige Phase mit dem 0,1-fachen Volumen einer Natriumacetat-Lösung (3 M; pH 5) sowie dem doppelten Volumen Ethanol (95 %) versetzt. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert, zweimal mit kaltem Ethanol (80 %) gewaschen und nach erneutem Lufttrocknen in 2 ml 0,1 x SSC-Puffer suspendiert.

Die Bestimmung des GC-Gehaltes erfolgte durch enzymatischen Verdau der gereinigten DNA und anschließender Analyse der Mononukleoside mittels HPLC (modifiziert nach MESBAH et al. 1989). Hierzu wurde die DNA (ca. 25 µg/ml) für 5 min bei 95 °C inkubiert und dann sofort auf Eis gestellt. Zu 25 µl der denaturierten DNA-Lösung wurden 50 µl Natriumacetat-Puffer (30 mM; pH 5,3), 5 µl Zinksulfat-Lösung (20 mM) und 1 µl Nuclease S1-Lösung (100 U/µl) gegeben und anschließend für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 5 µl Glycin-Puffer (100 mM; pH 10,4) und 5 µl alkalische Phosphatase (200 U/ml) und eine weitere Inkubation für 6 Stunden. Als Standard diente DNA mit bekanntem GC-Gehalt (DNA aus Lachssperma, Fluka, Neu-Ulm), welche in gleicher Weise verdaut wurde. Das HPLC-System bestand aus einem SCL-10ADVP Autosampler, einem SCL-6B Systemcontroller, einem SPD-M6A UV-Detektor und 2 LC-6A Pumpen (alle Geräte von Shimadzu, Kyoto, Japan). Die Auftrennung der Nukleoside erfolgte mittels binärer Gradientenelution mit Phosphorsäure (Puffer A; 0,17 %) und Methanol (Puffer B; 100 %) über eine LiChrospher 100 RP C18-5µ Säule (Ziemer, Langerwehe) bei 30 °C und einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min. Hierbei wurde der Gradient innerhalb von 20 min von 0 auf 32 % Methanol gefahren.

Da die dargestellte Methode keine absoluten, sondern relative Werte liefert, erfolgte die Berechnung des GC-Gehaltes über das Verhältnis der einzelnen Nukleoside unter der Annahme, dass G = C und A = T ist.

2.7 Sulfatreduktion im Darm von *Pachnoda marginata* und *Mastotermes darwiniensis*

2.7.1 Medium für sulfatreduzierende Bakterien

Für die Anreicherung von sulfatreduzierenden Bakterien aus dem Darm von *Pachnoda marginata* wurde ein Medium nach Postgate (POSTGATE 1984) benutzt (siehe Tab. 9)

Tabelle 9: Zusammensetzung des Mediums für sulfatreduzierende Bakterien.

Lösung A	
Destilliertes Wasser	980 ml
K ₂ HPO ₄	0,5 g
NH ₄ Cl	1,0 g
Na ₂ SO ₄	1,0 g
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	0,1 g
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	2,0 g
DL-Natriumlactat	2,0 g
Hefeextrakt	1,0 g
Resazurin	1 mg
Lösung B	
Destilliertes Wasser	10 ml
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	0,5 g
Lösung C	
Destilliertes Wasser	10 ml
Natrium-Thioglycolat	0,1 g
Ascorbinsäure	0,1 g

Die Lösung A wurde für mehrere Minuten gekocht, um gelösten Sauerstoff zu entfernen, und anschließend unter einer Stickstoff-Atmosphäre auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Zugabe der Lösungen B und C wurde der pH-Wert mit NaOH auf 7,8

eingestellt und das Medium in gasdicht verschließbare Reagenzröhrchen („Hungate-Röhrchen“) überführt. Die Gasphase wurde mit Stickstoff ausgetauscht und die Röhrchen autoklaviert. Das im Medium enthaltene Eisensulfat diente als Indikator für das Wachstum sulfatreduzierender Bakterien. Das von den Organismen gebildete Sulfid reagiert mit Eisen zu unlöslichem Eisensulfid, was zu einem deutlich sichtbaren schwarzen Niederschlag führt.

2.7.2 Titer sulfatreduzierender Bakterien

Die Zellzahlen sulfatreduzierender Bakterien im Darm von *Pachnoda marginata* wurden mit dem *Most-Probable-Number* Verfahren (MPN, NÄVEKE & TEPPER 1979) mit fünf Parallelen im Postgate-Medium (siehe Tab. 9) bestimmt. Die MPN-Reihen wurden für 3 Wochen bei 28 °C inkubiert.

2.7.3 Bestimmung von Sulfatkonzentrationen und *in vitro* Sulfatreduktionsraten

Die Sulfatkonzentrationen im Darm von *Pachnoda marginata* und *Mastotermes darwiniensis* wurden mittels HPLC bestimmt. Für die Untersuchungen wurden 3 (*Pachnoda marginata*) bzw. 10 (*Mastotermes darwiniensis*) Därme in 1 ml dH₂O gelöst und anschließend unlösliche Bestandteile abzentrifugiert. Die Messungen erfolgten mit einer HPLC-Anlage (System S1021, Sykam, Gilching) mit einem elektrochemischen Detektor (ED 40, Dionex, Idstein). Die Trennung erfolgte mit einer CarboPacAs11 Säule (Dionex) bei einer Flussrate von 0,8 ml/min, mit 10 mM NaOH als Eluent.

Die Bestimmung von Sulfatreduktionsraten erfolgte mit Hilfe von radioaktiven ³⁵SO₄²⁻ (0,07 MBq, spez. Radioaktivität: 0,9-1,5 TB/mg S) nach ROSSER & HAMILTON (1983) und SASS (1997). Hierzu wurden die Darminhalte in 3 ml Medium (nach WIDDEL & BAK 1992) mit 10 mM Laktat und 0,3 mM Sulfat, aber ohne Eisensulfat, überführt. Hiervon wurden 500 µl in ein Inkubationsgefäß (mit 10 ml Medium) injiziert und für 5½ Stunden bei 28 °C inkubiert. Durch Zugabe von 6 M HCl wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurden die Gefäße für 20 Stunden geschüttelt. Die Bestimmung des gebildeten H₂³⁵S erfolgte als Zn³⁵S in 15 ml Szintillations Lösung (Rotiszint eco plus, Roth, Karlsruhe) mit einem Szintillationszähler (LS 6000, Beckman Instruments, München). Als Referenzstamm wurde eine Kultur von *Desulfovibrio intestinalis* KMS2 mitgeführt (10⁶ Zellen/ml zu Beginn der Inkubation). Die Bestimmung von Sulfatkonzentrationen und

Sulfat-reduktionsraten wurden von Farah Emtiazi und Inge Schöning durchgeführt (DRÖGE et al. 2005a).

2.8 Molekularbiologische Untersuchungen

2.8.1 DNA-Extraktion von Reinkulturen

Zur Gewinnung von DNA aus Reinkulturen wurden zwischen 1 und 3 ml einer frisch gewachsenen Kultur abzentrifugiert (5 min, 13000 Upm). Das Zellpellet wurde zweimal in sterilem DNA-freiem PBS-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert und in 50-100 µl DNA-freiem Wasser resuspendiert. Die Extraktion der genomischen DNA erfolgte nach einem modifizierten Protokoll mit dem InstaGene Matrix Kit. Hierzu wurde zu der gewaschenen Zellsuspension 200-400 µl (je nach Zelldichte) der InstaGene Matrix-Lösung zugegeben und für 20 min bei 56 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation bei 98 °C (5 min) im Thermomixer bei 1000 Upm. Zelltrümmer und andere unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation entfernt (13.000 Upm, 5 min). Der Überstand wurde direkt für die PCR (siehe Kapitel 2.8.3) verwendet oder bis zur späteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

Alternativ erfolgte die DNA-Extraktion mit dem Dynabeads DNA Direct-Kit. Hierzu wurden 1 ml Kultur abzentrifugiert, in PBS-Puffer gewaschen und in 50 µl DNA-freiem Wasser gelöst. Die Suspension wurde mit 200 µl Dynabeads-Lösung für 5 min inkubiert. Hierbei werden die Zellen mit Lyse-Puffer aufgelöst und die freigesetzte DNA bindet an die, in der Lösung enthaltenen, magnetischen Partikel (Dynabeads). Der DNA-haltige Komplex wurde magnetisch von den anderen Lösungsbestandteilen getrennt, mit Puffer gewaschen und schließlich in 30 µl DNA-freiem Wasser resuspendiert.

2.8.2 Extraktion bakterieller DNA aus Termitendärmen

Für die Extraktion bakterieller DNA aus Termitendärmen wurden je Ansatz mindestens 10 Termiten verwendet. Die Tiere wurden mit Ethanol (70 %) abgetötet, oberflächendesinfiziert und anschließend mit sterilem DNA-freiem Wasser abgespült. Alle weiteren Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die Därme wurden vom Abdomen entfernt und jeweils in 50 µl PBS-Puffer überführt. Hier wurde die Gärkammer des Darms geöffnet und der Ansatz für 5 min stehengelassen, damit die Flagellaten sowie größere Darmpartikel absedimentieren konnten. Die Überstände der Ansätze wurden anschließend

vereinigt und bei 13.000 Upm zentrifugiert. Die abzentrifugierten Zellen wurden in 100 µl PBS-Puffer mit 10 mg/ml Poly A resuspendiert. Das Poly A diente der Absorption von potentieller Fremd-DNA. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert, gewaschen und schließlich in 100 µl PBS-Puffer suspendiert. Die Extraktion der DNA erfolgte mit dem InstaGene Matrix-Kit (siehe Kapitel 2.8.1).

2.8.3 Amplifikation von Zielgenen mittels PCR

Die Zielgene von DNA-Extrakten aus Reinkulturen und Termitendärmen wurden mittels PCR amplifiziert (MEDLIN et al. 1988). Als Zielsequenz diente das 16S rRNA-Gen sowie bei den Reinkulturen zusätzlich das Dinitrogenase-Reduktase kodierende Gen *nifH*. Die prinzipielle Zusammensetzung der PCR-Ansätze ist in Tabelle 10 angegeben. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 14 angegeben.

Tabelle 10: Zusammensetzung der PCR-Ansätze zur Amplifizierung der 16S rDNA.

Lösung	Vol. [µl]
DNA-Probe	0,5-5
10 x PCR-Puffer	5
MgCl ₂ (25 mM)	3-4
dNTP-Lösung	3
5'-Primer (10 pmol/µl)	2
3'-Primer (10 pmol/µl)	2
Wasser (steriles DNA-freies ddH ₂ O)	30-33,5
DNA-Polymerase (5 U/µl) 1:5 verdünnt	1
Gesamtvolumen pro Ansatz:	50

Die Amplifizierung von 16S rRNA Gensequenzen erfolgte mit einer *Touchdown*-PCR (DON et al. 1991) unter den in Tabelle 11 angegebenen Bedingungen in einem Thermocycler. Bei der *Touchdown*-PCR wird während einer bestimmten Zyklenzahl (Phase I in Tabelle 11) die Anlagerungstemperatur schrittweise von einem Wert oberhalb der zu erwartenden T_m (Berechnete Schmelztemperatur der Primer) auf einen Wert unterhalb der T_m abgesenkt. Die Amplifikation von *nifH*-Genen erfolgte nach OHKUMA et al. 1996 (siehe Tab. 12).

Tabelle 11: Bedingungen für PCR-Amplifikation von 16S rDNA.

Start	Denaturierung der DNA	96 °C, 5 min
Phase I (10 Zyklen)	Denaturierung	94 °C, 1 min
	Primeranlagerung	59-54,5 °C ¹⁾ , 1 min 52-47,5 °C ²⁾ , 1 min
	Elongation	72 °C, 2 min
Phase II (20 Zyklen)	Denaturierung	94 °C, 1 min
	Primeranlagerung	56 °C ¹⁾ , 1 min 50 °C ²⁾ , 1 min
	Elongation	72 °C, 2 min
Ende	Abschließende Elongation	72 °C, 10 min

1) Mit Primern Spiro50f und 1392r bzw. SPN1269r

2) Mit Primern Eub5 und Eub3.

Für das Isolat SPN1 aus der Termite *Neotermes castaneus* wurde ein spezifischer Primer konstruiert (SPN1269r, siehe Tab. 14), um den Organismus im Darminhalt der Termite molekularbiologisch nachweisen zu können. Die Konstruktion erfolgte mit Hilfe des Programms GenDoc (Nicholas et al. 1997) auf Basis eines Alignments der 16S rRNA Gensequenz von Stamm SPN1 mit 23 spirochaetalen Referenzsequenzen. Der Primer wurde in Kombination mit dem Primer Spiro50f (siehe Tab. 14) unter den in Tabelle 11 angegebenen Bedingungen verwendet.

Tabelle 12: Bedingungen für PCR-Amplifikation von *nifH*-Genen.

Start	Denaturierung der DNA	96 °C, 5 min
30 Zyklen	Denaturierung	94 °C, 30 sec
	Primeranlagerung	48 °C, 45 sec
	Elongation	72 °C, 2 min
Ende	Abschließende Elongation	72 °C, 10 min

Zur Identifizierung von sulfatreduzierenden Bakterien in den Anreicherungskulturen aus dem Darminhalt des Rosenkäfers *Pachnoda marginata* wurde eine Teilsequenz des 16S rRNA-Gens mittels semispezifischer PCR bestimmt. Hierzu

wurde ein allgemeiner Eubakterien-Primer in Kombination mit einem für die Gattung *Desulfovibrio* spezifischen Primer verwendet (NEub 5 / NSRB 687r, siehe Tab. 14). Die Bedingungen sind in Tabelle 13 angegeben.

Tabelle 13: Bedingungen für semispezifische Amplifikation der 16S rDNA.

Start	Denaturierung der DNA	96 °C, 5 min
30 Zyklen	Denaturierung	94 °C, 1 min
	Primeranlagerung	55 °C, 1 min
	Elongation	72 °C, 1,5 min
Ende	Abschließende Elongation	72 °C, 10 min

Tabelle 14: Verwendete Primer.

Name ¹⁾	Nukleotidsequenz	Spezifität
Eub5f (8)	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CT- 3'	16S rDNA Eubakteria
Eub3r (1544)	5'-AGA AAG GAG GTG ATC C- 3'	16S rDNA Eubakteria
Spiro50f	5'-TGG CGG CGC GTC TTA AG- 3'	16S rDNA Spirochaeta
Eub1392r	5'-CCA CGG GCG GTG TGT AC- 3'	16S rDNA Eubakteria
SPN1269r	5'-GGG TCC GTC TCG CTC T- 3'	16S rDNA Stamm SPN1
IGK 11f ²⁾	5'-AAR GGN GGN ATH GGN AA- 3'	<i>nifH</i> -Gen
KAD 39f ²⁾	5'-TGY GAY CCN AAR GCN GA- 3'	<i>nifH</i> -Gen
GEM 154r ²⁾	5'-ADN GCC ATC ATY TCN CC- 3'	<i>nifH</i> -Gen
YAA 160r ²⁾	5'-ATR TTR TTN GCN GCR TA- 3'	<i>nifH</i> -Gen
NEub5f (8)	5'-ATA TAT AAG CGG CCG CAG AGT TTG ATC MTG GCT C- 3'	16S rDNA Eubakteria
NSRB687r	5'-ATA TAT AAG CGG CCG CTA CGG ATT TCA CTC CT- 3'	16S rDNA <i>Desulfovibrio</i>

1) Zahl in Klammern bzw. Primer-Bezeichnung: Nummer = Position des 5'-Endes relativ zur *E. coli*-Nummerierung; f = forward; r = reverse.

2) Nummerierung basiert auf der entsprechenden Aminosäureposition des *nifH* Gens von *Klebsiella pneumoniae*.

2.8.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgte zur Analyse von Amplifikationsprodukten. Hierzu wurden 0,33 g Agarose in 30 ml 1 x TBE-Puffer aufgekocht bis sich die Agarose schlierenfrei gelöst hatte. Das Gel wurde in eine Kammer eingegossen und an einem Ende ein Kamm eingesetzt. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurde der Kamm herausgezogen und das Gel in eine mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer eingesetzt. In die Geltaschen wurden jeweils 5 µl Amplifikatonsprodukt, gemischt mit 1 µl Ladepuffer, eingefüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 90 V (25-30 min). Um die DNA sichtbar zu machen, wurde das Gel mit Ethidiumbromid angefärbt. Das Ergebnis wurde unter UV-Licht auf einem Transilluminator fotografisch dokumentiert.

2.8.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte, welche für eine Sequenzierungsreaktion vorgesehen waren, wurden einer Aufreinigung unterzogen, da Rückstände wie freie Primer, Nukleotide und Taq-Polymerase die Sequenzierung beeinflussen können. Die Aufreinigung erfolgte mit dem QIAquick PCR Purifikation Kit, nach Anweisung des Herstellers. Alternativ erfolgte eine Gelreinigung mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit. Die gereinigte DNA wurde in 30 µl dH₂O aufgenommen.

2.8.6 Klonierung

Eine Klonierung von DNA-Produkten erfolgte mit den 16S rDNA Amplifikaten aus der bakteriellen DNA von Termitendärmen sowie den *nifH*-Amplifikaten aus Reinkulturen. Die Ligation und Transformation der gereinigten Amplifikate wurde mit dem TOPO TA Cloning Kit durchgeführt. Das Kit beinhaltet den linearisierten Plasmidvektor pCR 2.1-TOPO mit kovalent gebundener Topoisomerase I. Der Vektor hat an den flankierenden Enden einen Basenüberhang aus einem Desoxythymidin. Damit sind die Enden komplementär zum jeweiligen PCR-Produkt, da die Taq-Polymerase unabhängig vom Template ein Desoxyadenosin an das 3'-Ende des synthetisierten DNA-Strangs anhängt. Die Topoisomerase I bindet an die DNA-Fragmente und ligiert die Basenpaare in den Vektor. Der Vektor wird anschließend in chemisch kompetente *Escherichia coli* Zellen transformiert. Zur Durchführung wurden 1 – 3 µl frisches PCR-

Produkt, 1 µl Salzlösung (1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl₂) 1 - 3 µl steriles Wasser und 1 µl TOPO Vektor (6 µl finales Volumen) gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2 µl des Reaktionsgemisches entnommen und mit unmittelbar vorher aufgetauten One Shot TOP 10 Zellen (Invitrogen) gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation des Vektors erfolgte durch einen Hitzeschock der Zellen für 30 Sekunden bei 42 °C. Der Ansatz wurde mit 250 µl S.O.C Medium gemischt und eine Stunde unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Je Transformationsansatz wurden 20 - 50 µl auf LB Agar Platten (10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; 15 g/l Agar; pH 7), welche mit Ampicillin (50 µg/ml) und X-Gal (40 µg/ml) versehen waren, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Positive Klone konnten anhand der weißen Koloniefarbe identifiziert werden (Klone mit Plasmid ohne Insert verfügen über das intakte Lac-Z-Gen und spalten das X-Gal, was zu blau gefärbten Kolonien führt).

2.8.7 Plasmidisolierung

Einzelne weiße Kolonien wurden von den Agarplatten entnommen und in flüssigem ampicillinhaltigen LB-Medium über Nacht kultiviert. Die Isolierung des Plasmids erfolgte durch alkalische Lyse der Zellen und anschließende Fällung und Reinigung der Plasmid-DNA. Die Durchführung erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit nach Anweisungen des Herstellers.

2.8.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmid-DNA erfolgte nach der Didesoxy-Methode (SANGER et al. 1977) und wurde in Auftragsarbeit von der Firma Genterprise (Mainz) durchgeführt.

2.8.9 Sequenzanalyse

Neu identifizierte DNA-Sequenzen wurden mit den verfügbaren homologen Sequenzen verschiedener Datenbanken verglichen. Folgende Datenbanken wurden für den Vergleich herangezogen:

- **EMBL** <http://www.ebi.ac.uk/embl/> (STOESSER et al. 2003)
- **RDP** <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp> (COLE et al. 2005)
- **NCBI/GenBank** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (BENSON et al. 2004)

Mit Hilfe der Datenbanken wurden die am nächsten verwandten Organismen ermittelt und zusammen mit Referenz-Organismen in ein Alignment mit den neu identifizierten DNA-Sequenzen eingefügt. Das Alignment wurde mit dem Programm *ClustalX* erstellt (THOMPSON et al. 1997).

2.8.10 Erstellung phylogenetischer Stammbäume

Die Berechnung und Konstruktion phylogenetischer Stammbäume erfolgte mit dem Programm-Paket PHYLIP 3.5 (FELSENSTEIN 1993). Folgende Programme bzw. Methoden wurden für die Stammbaumkonstruktion verwendet:

- Distanz-Matrix-Methoden mit den Programmen *DNADIST*, *FITCH* und *NEIGHBOR*:

Das Programm *DNADIST* berechnet die phylogenetischen Distanzen zwischen allen Organismen eines Alignments in Form einer Distanz-Matrix. Da sich Sequenzen im Laufe der Evolution nicht linear verändern, ist eine direkte Distanzberechnung nicht sinnvoll. Dementsprechend stehen verschiedene Korrekturmethode zur Verfügung. Das Jukes-Cantor-one-parameter-Modell (JUKES & CANTOR 1969) stellt einen Korrekturfaktor für multiple Substitutionen zur Verfügung, wobei Transitionen (Purin-Purin- bzw. Pyrimidin-Pyrimidin-Substitutionen) und Transversionen (Änderung der Nukleotid-Klasse) gleich bewertet werden. Im erweiterten Kimura-two-parameter-Modell (KIMURA 1980) wird zusätzlich berücksichtigt das Transitionen häufiger vorkommen als Transversionen. Die ermittelten Distanzmatrizen dienen als Grundlage für die phänetische Clusteranalyse. Hierfür wurden die Programme *FITCH* (Algorithmen nach FITCH & MARGOLIASH, 1967) oder *NEIGHBOR* (Neighbor-Joining-Methode, SAITOU & NEI 1987) verwendet.

- Maximum Likelihood-Methode mit dem Programm *DNAML*:

Der Maximum Likelihood-Methode liegen statistische Modelle der Wahrscheinlichkeitsrechnung zugrunde. Für die Konstruktion phylogenetischer Stammbäume wurde die Methode erstmals von FELSENSTEIN (1981) angewandt. Die Methode basiert auf der Annahme, dass alle Basen einer Sequenz unabhängig voneinander

mutieren. Hieraus ergeben sich für jede Basenposition verschiedene Möglichkeiten. Entweder kann die Base im Laufe der Evolution unverändert geblieben sein oder es hat eine Transition oder aber eine Transversion stattgefunden. Bei der Maximum Likelihood-Methode wird die Wahrscheinlichkeit jedes Ereignisses für jede Base berechnet und anschließend durch Aufsummieren der Einzelergebnisse die Wahrscheinlichkeit des gesamten Stammbaums errechnet. Als Ergebnis erhält man das Evolutionsmodell welches mit der größten Wahrscheinlichkeit zu den vorhandenen Daten (Sequenzen) geführt hat.

2.8.11 Statistische Absicherung phylogenetischer Bäume

Zur statistischen Absicherung von phylogenetischen Stammbäumen wurden Bootstrap-Analysen durchgeführt (FELSENSTEIN 1985). Bei diesem Verfahren werden ausgehend von der Original-Matrix eine vorgegebene Zahl (meist 100 bis 1000) so genannter Pseudomatrizen simuliert, welche sich in zufällig ausgewählten Merkmalen von der Ausgangs-Matrix unterscheiden. Mit diesen Datensätzen wird jeweils die gleiche Analyse wie mit der Original-Matrix durchgeführt und hieraus ein Consensus-Baum errechnet. Der Consensus-Baum gibt für jede Verzweigung an, wie oft sie in allen simulierten Bäumen vorkommt. Der prozentuelle Bootstrap-Wert ab dem eine Verzweigung als stabil angesehen werden kann, liegt nach HILLIS & BULL (1993) bei 70 %.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von Spirochaeten aus Termitendärmen

3.1.1 Anreicherung und Isolierung von Spirochaeten aus Termitendärmen

Für Anreicherungsversuche mit verschiedenen Wachstumssubstraten wurden neun Termitenarten aus verschiedenen Familien der niederen Termiten verwendet. Hierbei handelte es sich um die Termiten *Coptotermes formosanus*, *Coptotermes niger*, *Reticulitermes speratus* (Rhinotermitidae), *Incisitermes marginipennis*, *Incisitermes tabogae*, *Kalotermes flavicollis*, *Neotermes castaneus* (Kalotermitidae), *Mastotermes darwiniensis* (Mastotermitidae) und *Zootermopsis angusticollis* (Termopsidae).

Generell war zu beobachten, dass bei Ansätzen, denen keine komplexen Substrate (Hefeextrakt bzw. Hefelysat) zugegeben wurden, kein Wachstum von Spirochaeten erfolgte. Stabile Anreicherungskulturen konnten aus den Termiten *Incisitermes marginipennis*, *Incisitermes tabogae* und *Neotermes castaneus* gewonnen werden (Tab. 15). In den Ansätzen aus *Incisitermes marginipennis* lagen vorwiegend enggewundene (Wellenlänge 1 - 1,5 μM) Morphotypen mit einem Zelldurchmesser von 0,1 - 0,3 μm und einer Länge zwischen 5 - 15 μm vor. Demgegenüber waren in den Ansätzen aus *Incisitermes tabogae* größere Spirochaeten (10 - 30 μm) mit Zelldurchmessern zwischen 0,4 - 0,6 μm und Wellenlängen zwischen 5 - 7 μm vorherrschend.

Tabelle 15: Anreicherungskulturen von Spirochaeten.

Termite	Substrate ¹⁾	Atmosphäre	Morphotypen
<i>Incisitermes marginipennis</i>	S I	H ₂ /CO ₂	0,1 - 0,3 × 5 - 15 μm
	S II	H ₂ /CO ₂	1 - 1,5 μm Wellen-
	Hefelysat	H ₂ /CO ₂	länge
<i>Incisitermes tabogae</i>	S II	H ₂ /CO ₂	0,4 - 0,6 × 10 - 30 μm
	S III	H ₂ /CO ₂	5 - 7 μm Wellenlänge
<i>Neotermes castaneus</i>	S II	H ₂ /CO ₂	Cocooide Zellen,
	S II	N ₂	zwischen 0,5 - 2 μm \varnothing

1) Siehe Tab. 7, Kap. 2.6.1.

Ein Sonderfall waren die Ansätze aus *Neotermes castaneus*. Hier waren nur wenige auf den ersten Blick als Spirochaeten zu erkennende Zellen sichtbar. Vorherrschend waren vielmehr unbewegliche coccoide Zellformen mit einem Durchmesser von 0,5 - 2 μm . Allerdings ähnelten diese Zellen bekannten coccoiden Zellstadien, welche bei Spirochaeten unter bestimmten Umweltbedingungen vorkommen können (CANALE-PAROLA 1984) und wurden daher weiter bearbeitet. Alle Anreicherungen, in denen Spirochaeten anwuchsen, waren mit komplexen Substraten bzw. Substratgemischen supplementiert, entweder mit Hefelysat oder mit Kombinationen aus Hefeextrakt, Pepton, Glucose und Fleischextrakt.

Aus den Därmen der Termiten *Coptotermes formosanus*, *Coptotermes niger*, *Kalotermes flavicollis*, *Mastotermes darwiniensis*, *Reticulitermes speratus* und *Zootermopsis angusticollis* konnten keine stabilen Anreicherungskulturen gewonnen werden. Entweder war kein bzw. nur sehr schwaches Wachstum zu beobachten oder die Spirochaeten wurden von der Begleitflora überwachsen.

Aus den Anreicherungen von *Neotermes castaneus*, *Incisitermes marginipennis* und *Incisitermes tabogae* wurden insgesamt sechs Reinkulturen (siehe Tab. 16) gewonnen. Die Isolation erfolgte über wiederholte Tiefagarverdünnungsreihen im jeweiligen Anreicherungsmedium.

Termite	Isolat
<i>Neotermes castaneus</i>	SPN1
	SPN2
<i>Incisitermes marginipennis</i>	SPIM20
	SPIM24
	SPIM25
<i>Incisitermes tabogae</i>	SPIT5

Tabelle 16: Reinkulturen aus Termitendärmen.

3.1.2 Charakterisierung von Stamm SPN1

Der Stamm SPN1 wurde aus dem Darm der Termite *Neotermes castaneus* isoliert. Die Anreicherung erfolgte im Mineralmedium (Kap. 2.6.1) mit dem Substratgemisch S II als Energie- und Kohlenstoffquelle unter einer H₂/CO₂-Atmosphäre (80/20). Der ebenfalls aus *Neotermes castaneus* isolierte Stamm SPN2 zeigte bei der phylogenetischen Untersuchung eine mehr als 99 %ige Übereinstimmung in der 16S rRNA Gensequenz mit Stamm SPN1 und wurde daher nicht näher charakterisiert.

Die Isolation von Stamm SPN1 erfolgte über wiederholte Tiefagarverdünnungsreihen im Anreicherungsmedium. Stamm SPN1 bildete spindelförmige gelblich-weiße Kolonien, die nach einer Inkubationszeit von zwei bis drei Wochen im Agar sichtbar waren. Die Zellen von Stamm SPN1 zeigten eine coccoide Zellform und waren unbeweglich (Abb. 9). Die für Spirochaeten sonst typische helikale Zellform wurde in keiner Wachstumsphase beobachtet. Insbesondere in der frühen Wachstumsphase war die Bildung von Aggregaten mit meist fünf bis zehn Zellen zu beobachten.

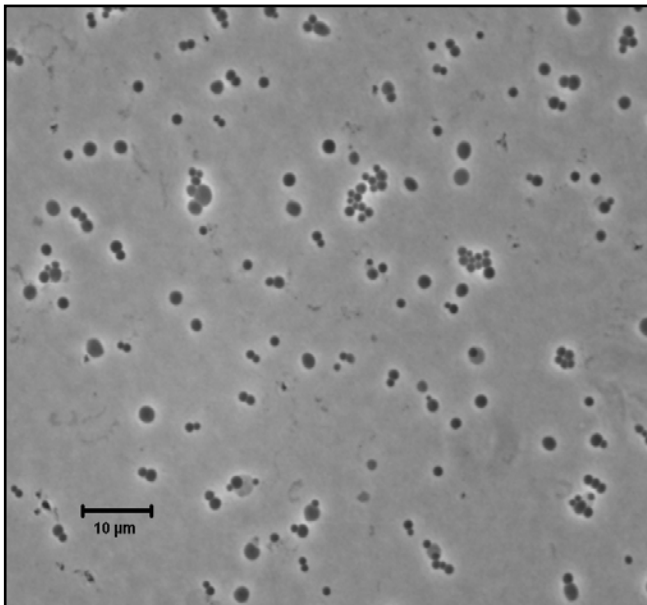


Abbildung 9: Phasenkontrastaufnahme von Stamm SPN1.

Die Zellen hatten einen Durchmesser von 0,5 - 2 µm und waren von einer äußeren Hüllmembran umgeben (siehe Abb. 10A und B). Geißeln bzw. die, für den Bewegungsapparat der Spirochaeten ansonsten charakteristischen Axialfibrillen, waren auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen nicht zu erkennen. Bei den dunkleren kondensierten Bereichen im ansonsten lockeren Cytoplasma (Abb. 10B) könnte es sich um

Reservestoffe handeln. In älteren Kulturen traten vermehrt größere Strukturen auf, wo zwei oder mehr Zellen von der äußeren Membran umhüllt waren (siehe Abb. 11)

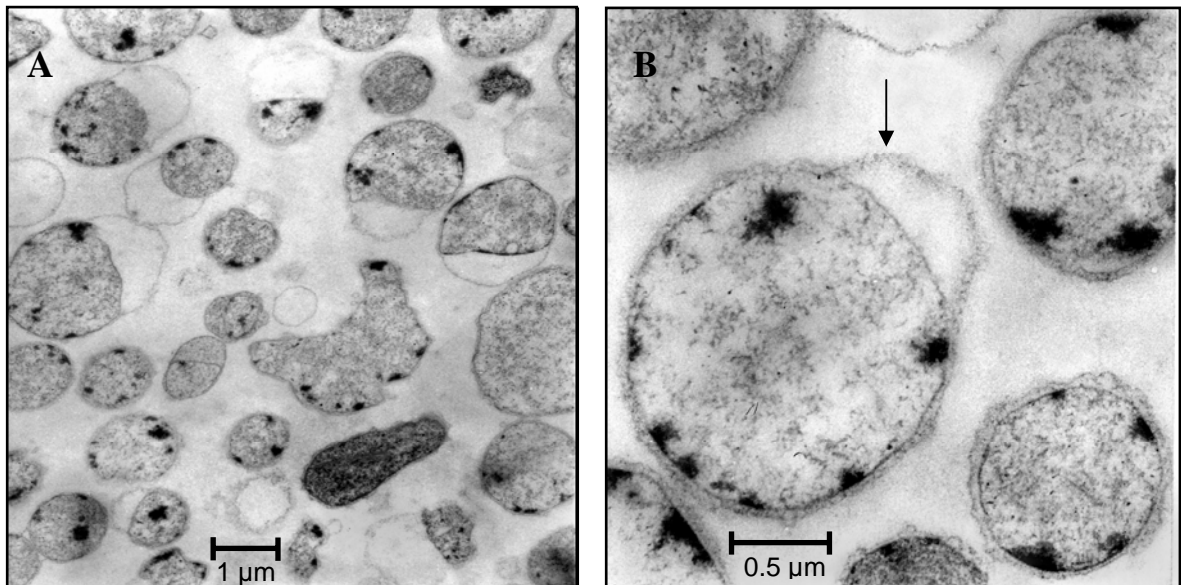


Abbildung 10: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Stamm SPN1. Die äußere Hüllmembran ist in Abbildung B mit einem Pfeil markiert.

Der Stamm SPN1 konnte als strikt anaerober Organismus charakterisiert werden. Der Stamm war Katalase-negativ und wuchs nur in Abwesenheit von Sauerstoff. Die H_2/CO_2 -Atmosphäre ließ sich, ohne signifikanten Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit und den Zellertrag, durch eine reine Stickstoff-Atmosphäre ersetzen.

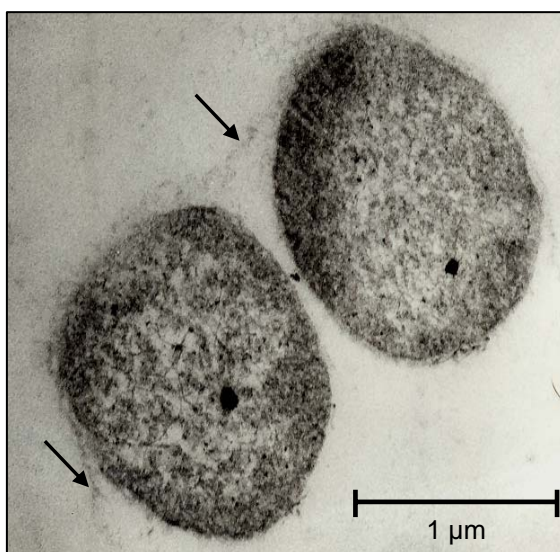


Abbildung 11: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Stamm SPN1. Zwei Zellen mit einer gemeinsamen Membran (Pfeile).

Bei den physiologischen Untersuchungen zeigte sich, dass Stamm SPN1 mit Hefeextrakt als alleiniger Energie- und Kohlenstoffquelle wachsen konnte, wobei die Zugabe von Pepton (0,1 - 0,2 %) wachstumsfördernd wirkte. Eine zusätzliche Supplementierung des Mediums mit Vitaminen, Spurenelementen und Co-Faktoren (siehe Kap. 2.6.1) zeigte keine positiven Wachstumseffekte. Als wesentliche Stoffwechselprodukte konnten Formiat, Acetat und Ethanol identifiziert werden. Die weitere Kultivierung von Stamm SPN1 erfolgte im Mineralmedium mit 0,4 % Hefeextrakt und 0,2 % Pepton (S-YP-Medium). Da Hefeextrakt einen hohen Proteinanteil hat, wurde auch die Fermentation von Aminosäuren als möglicher Stoffwechselweg in Betracht gezogen. Entsprechende Untersuchungen konnten diese Annahme allerdings nicht bestätigen. Auch waren keine erhöhten Ammoniak-Konzentrationen nachweisbar. Im Folgenden wurde das Wachstum von Stamm SPN1 bei Zugabe verschiedener Zucker zum S-YP-Medium untersucht (Abb. 12).

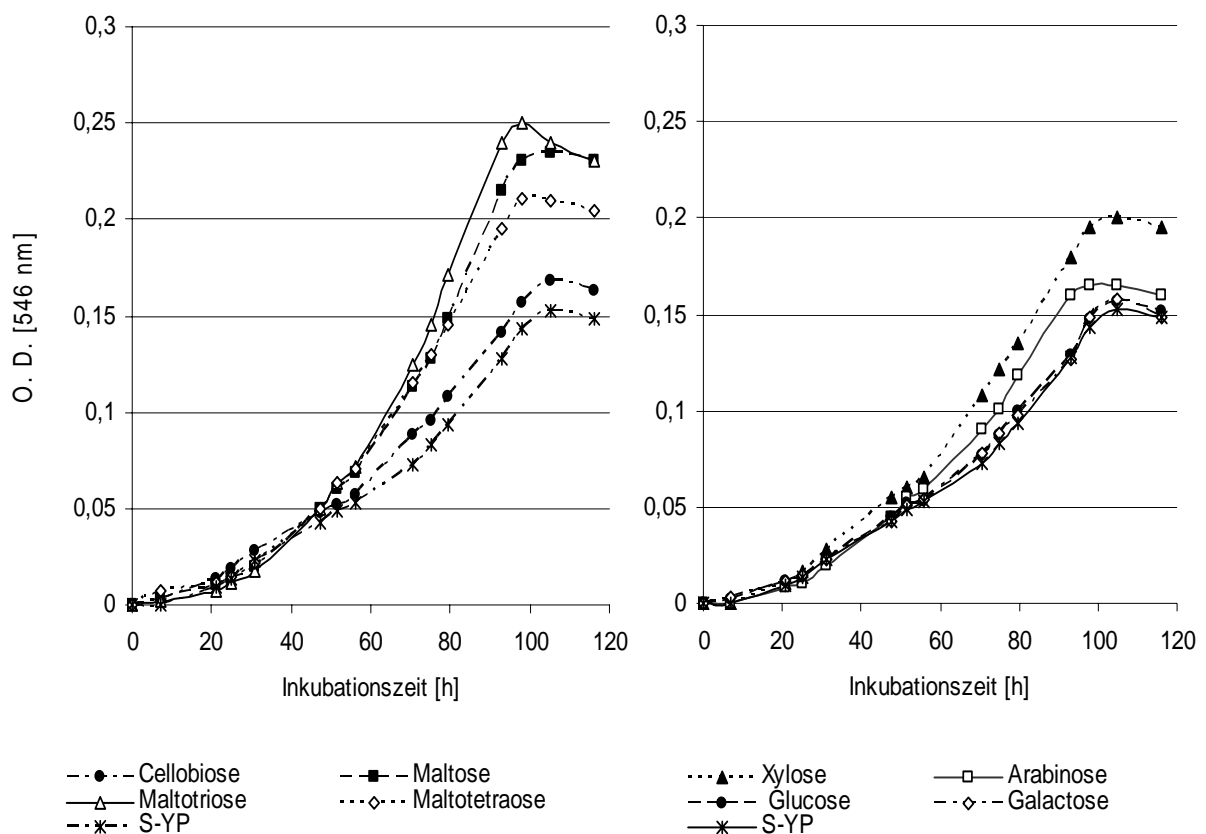


Abbildung 12: Wachstum von Stamm SPN1 mit Pentosen, Hexosen und Oligosacchariden.

Mit dem Grundmedium (S-YP-Medium ohne Zusatz) erreichte Stamm SPN1 nach gut vier Tagen Inkubationszeit eine maximale O.D. von ca. 0,15. Eine Steigerung der Wachstumsgeschwindigkeit sowie signifikant höhere O.D.-Werte zeigten sich insbesondere bei Zugabe von Maltose, Maltotriose, Maltotetraose und Xylose. In Tabelle 17 sind Zellertrag, Verdopplungszeit sowie die Menge der gebildeten Stoffwechselprodukte zusammengefasst. Im Vergleich zum Grundmedium zeigte sich bei den Ansätzen mit Maltose, Maltotriose und Maltotetraose eine deutliche Zunahme der Fermentationsprodukte Formiat, Acetat und Ethanol. Dies korrespondierte mit einem höheren Zellertrag und kürzeren Verdopplungszeiten. Bei den Pentosen Arabinose und Xylose sowie bei Cellobiose zeigten sich ebenfalls positive Wachstumseffekte, allerdings weniger stark ausgeprägt. Bei den Hexosen Glucose und Galactose zeigte sich hingegen kein signifikanter Unterschied zum Grundmedium.

Tabelle 17: Zellertrag, Verdopplungszeit und Fermentationsprodukte von Stamm SPN1.

Substrate ^{a), b)}	Zellertrag [10 ⁷ Zellen/ml]	t _d [h] ^{d)}	Fermentationsprodukte [mmol] (Formiat/Acetat/Ethanol)
Kontrolle ^{c)}	38.6 (± 2.6)	29.1	2.7 / 2.0 / 2.6
Arabinose	50.8 (± 4.8)	25.7	3.8 / 2.6 / 3.1
Xylose	53.7 (± 3.8)	25.2	3.1 / 2.2 / 3.0
Glucose	41.8 (± 2.8)	28.8	2.7 / 1.9 / 2.7
Galactose	40.6 (± 2.2)	30.0	2.7 / 1.9 / 3.0
Maltose	64.2 (± 3.9)	22.6	4.8 / 3.2 / 5.6
Cellobiose	46.4 (± 3.0)	28.3	2.9 / 2.0 / 3.2
Maltotriose	66.2 (± 5.6)	21.4	4.0 / 2.6 / 4.6
Maltotetraose	57.3 (± 5.4)	24.9	3.4 / 2.6 / 4.5

a) Die Substrate wurden dem S-YP Medium zugegeben. Inkubation bei 30 °C.

b) Endkonzentration 6 mM außer Disaccharide (3 mM), Maltotriose (2 mM) und Maltotetraose (1.5 mM).

c) S-YP Medium ohne zusätzliches Substrat.

d) Verdopplungszeit.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Verbrauch der angebotenen Kohlenhydrate mittels HPLC analysiert (Abb.13). Bei Maltotetraose war aufgrund einer Überlagerung mit einem anderen Peak eine genaue Quantifizierung nicht möglich. Im Fall von Arabinose und Xylose wurden 1,2 – 1,3 mM des angebotenen Substrates (6 mM) abgebaut. Deutlich stärker war der Abbau bei Maltose, Cellobiose und Maltotriose. Hier wurde der größte Teil des Substrats verbraucht. Allerdings konnte in diesen Ansätzen am Ende der Inkubationszeit freie Glucose nachgewiesen werden. Das galt insbesondere beim

Ansatz mit Cellulose, der eine Glucosekonzentration von 1,5 mM aufwies (Maltose 1 mM, Maltotriose 0,5 mM). Bei Glucose und Galactose war keine signifikante Abnahme zu beobachten.

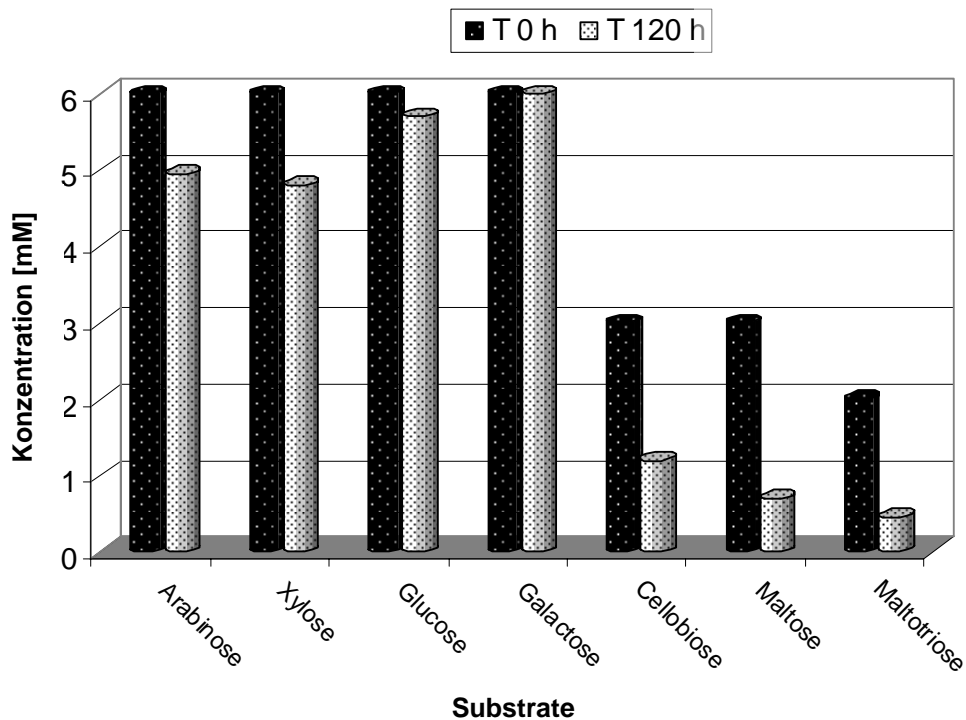


Abbildung 13: Substratverbrauch von Stamm SPN1 (T = Inkubationszeit).

Polymere Substanzen wie Cellulose, CMC, Xylan und Arabinogalactan wurden von Stamm SPN1 nicht verwertet.

Im Hinblick auf die Bestimmung der Stöchiometrie bei der Fermentation von Kohlenhydraten ergab sich die Problematik, dass Stamm SPN1 auch mit Hefeextrakt als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle Wachstum zeigte und signifikante Mengen an Formiat, Ethanol und Acetat bildete (siehe Tab. 17). Andererseits zeigte sich in einem definierten Medium (inkl. Vitamin- und Spurenelementlösung) ohne Zusatz von Hefeextrakt generell kein Wachstum. Zur Erstellung einer Fermentationsbilanz ohne den Hintergrund des Hefeextraktes wurden daher Untersuchungen mit aufkonzentrierten gewaschenen Zellsuspensionen durchgeführt. Hierzu wurde der Stamm im S-YP-Medium bis zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase angezogen und durch Zentrifugation auf einen Titer von ca. 5×10^9 Zellen/ml aufkonzentriert. Anschließend wurden die Zellen mehrfach gewaschen und im hefeextraktfreien Grundmedium mit 2,5 mM Maltose für

20 Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit war die angebotene Maltose vollständig verbraucht. Hierbei bildete der Stamm je mM verbrauchter Maltose 2,9 mM Formiat, 2,2 mM Ethanol und 1,4 mM Acetat. Anhand der HPLC-Profile ließen sich keine weiteren Produkte in signifikanter Menge nachweisen. Somit wurden ca. 84 % des eingesetzten Substratkohlenstoffs in den gebildeten Produkten wiedergefunden.

Die optimale Wachstumstemperatur von Stamm SPN1 lag bei 30 °C und somit in dem Temperaturbereich, bei dem die Wirtstermiten gehalten wurden. Unterhalb von 15 °C und oberhalb von 40 °C zeigte sich kein Wachstum. Der pH-Bereich, in dem Wachstum beobachtet wurde, lag zwischen 5.5 und 9.5, das pH-Optimum bei 7.4. Der GC-Gehalt der DNA von Stamm SPN1 lag bei 56,6 - 57,4 mol% und damit in einem für die Gattung *Spirochaeta* typischen Bereich (51 – 65 mol%; CANALE-PAROLA 1984).

Aufgrund der morphologischen Besonderheiten sowie der physiologischen und phylogenetischen Unterschiede zu bisher charakterisierten Vertretern der Gattung *Spirochaeta* wurde der Stamm SPN1 als neue Art, *Spirochaeta coccooides* sp. nov., bezeichnet (DRÖGE et al. 2005b). Referenzkulturen wurden bei der DSMZ, Braunschweig (DSM 17374) und der ATCC, Manassas, USA (ATTC BAA-1237) hinterlegt.

3.1.3 Charakterisierung von Kultur SPIT5

Die Kultur SPIT5 wurde aus dem Darm der Termitenart *Incisitermes tabogae* isoliert. Die Anreicherung erfolgte im Mineralmedium mit dem Substratgemisch S III als Energie- und Kohlenstoffquelle unter einer H₂/CO₂-Atmosphäre (80/20). Die Isolierung erfolgte über Tiefagarverdünnungsreihen im Anreicherungsmedium. Bis Kolonien im Agar sichtbar waren, bedurfte es einer erheblichen Inkubationszeit von 6 bis 8 Wochen. Weiterhin war zu beobachten, dass das Wachstum im Tiefagar stark konzentrationsabhängig war. Kolonien bildeten sich nur in Ansätzen mit Agarkonzentrationen von maximal 1 %. Konzentrationen oberhalb von 1 % wirkten dagegen generell wachstumshemmend. Der Stamm SPIT5 bildete rundliche, weiße Kolonien mit undefinierten äußeren Abgrenzungen („cottonball-like“). Die Zellen von Stamm SPIT5 waren zwischen 15 und 25 µm lang (siehe Abb. 15). Mit einer Wellenlänge von ca. 6 - 7 µm war die Spiralisierung der Zellen weniger stark ausgeprägt.

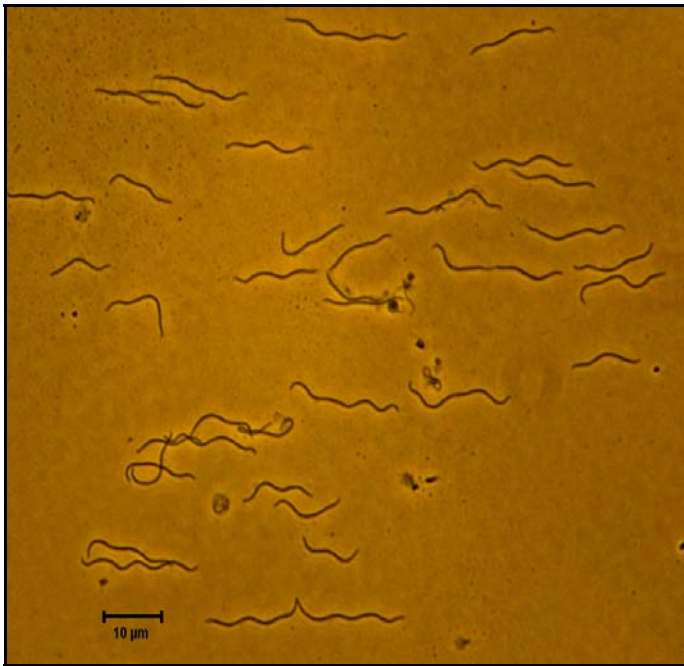


Abbildung 15: Phasenkontrastaufnahme von Stamm SPIT5.

Auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind der Protoplasmazyylinder und die äußere Hüllmembran von Stamm SPIT5 gut zu erkennen (Abb.16A). Die Zellen hatten einen Durchmesser von ca. 0,4 – 0,5 µm (Abb. 16B). Eine genaue Bestimmung der Anzahl der Axialfibrillen war anhand der Aufnahmen nicht möglich.

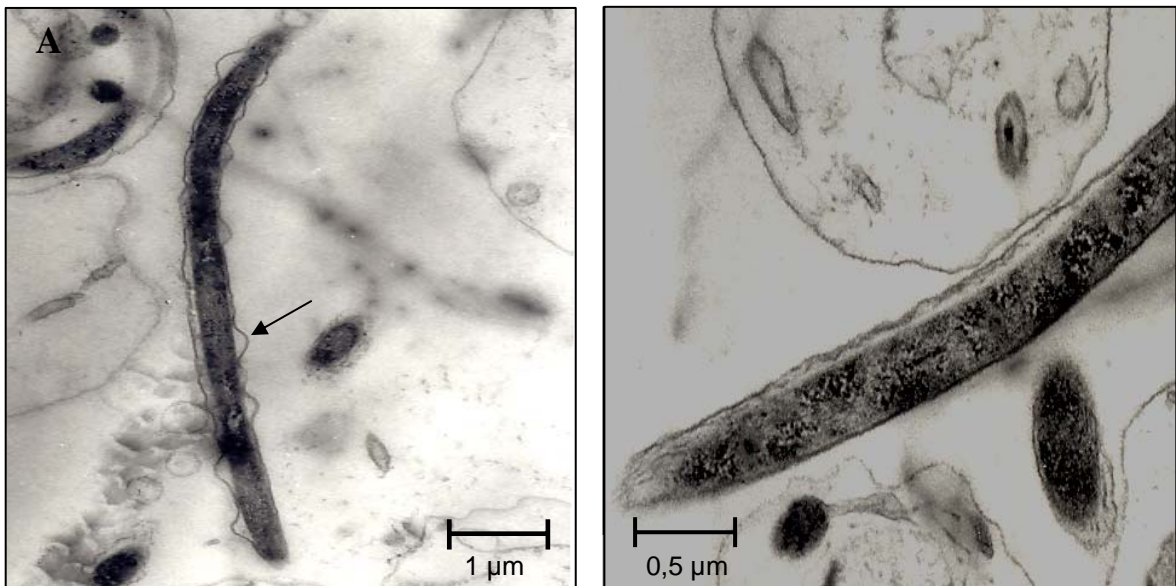


Abbildung 16: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Kultur SPIT5. Die äußere Hüllmembran ist in Abbildung A mit einem Pfeil markiert.

Der Stamm SPIT5 wuchs nur unter strikt anaeroben Bedingungen und war Katalase-negativ. Ebenso wie Stamm SPN1 war auch Stamm SPIT5 auf Hefeextrakt im Medium angewiesen. Die H_2CO_2 -Atmosphäre ließ sich ohne signifikanten Einfluss auf das Wachstumsverhalten durch eine N_2/CO_2 -Atmosphäre ersetzen. Im Gegensatz zu Stamm SPN1 zeigte sich jedoch kein Wachstum unter einer reinen N_2 Atmosphäre, auch dann nicht, wenn das Medium mit Phosphat statt Carbonat gepuffert wurde. Für die physiologischen Untersuchungen wurde das Wachstumsverhalten von SPIT5 im modifizierten Anreicherungsmedium (ohne Glucose; S-YPII) mit und ohne Zusatz verschiedener Zucker untersucht (Abb. 17). Generell war eine ausgeprägte lag-Phase von 5 bis 6 Tagen und ein langsames Wachstum (Verdopplungszeit > 50 h) zu beobachten. Im Basalmedium (ohne Kohlenhydrate) erreichte SPIT5 lediglich eine O.D. von 0,07. Ein ähnlicher Wachstumsverlauf zeigte sich bei Zugabe von Arabinose, Glucose und Galactose. Eine Steigerung der Wachstumsgeschwindigkeit sowie signifikant höhere Zelldichten zeigten sich bei Zugabe von Xylose, Cellobiose, Maltose und Maltotriose. Als Fermentationsprodukte ließen sich Ethanol und Acetat bestimmen (Tab. 18), Formiat wurde hingegen nicht gefunden. Hauptprodukt war Ethanol, während Acetat generell in deutlich niedrigeren Konzentrationen gefunden wurde bzw. in einigen Ansätzen nicht nachweisbar war. Die höchste Zellzahl erreichte Stamm SPIT5 mit Xylose als Substrat (ca. $2,6 \times 10^8$ Zellen/ml).

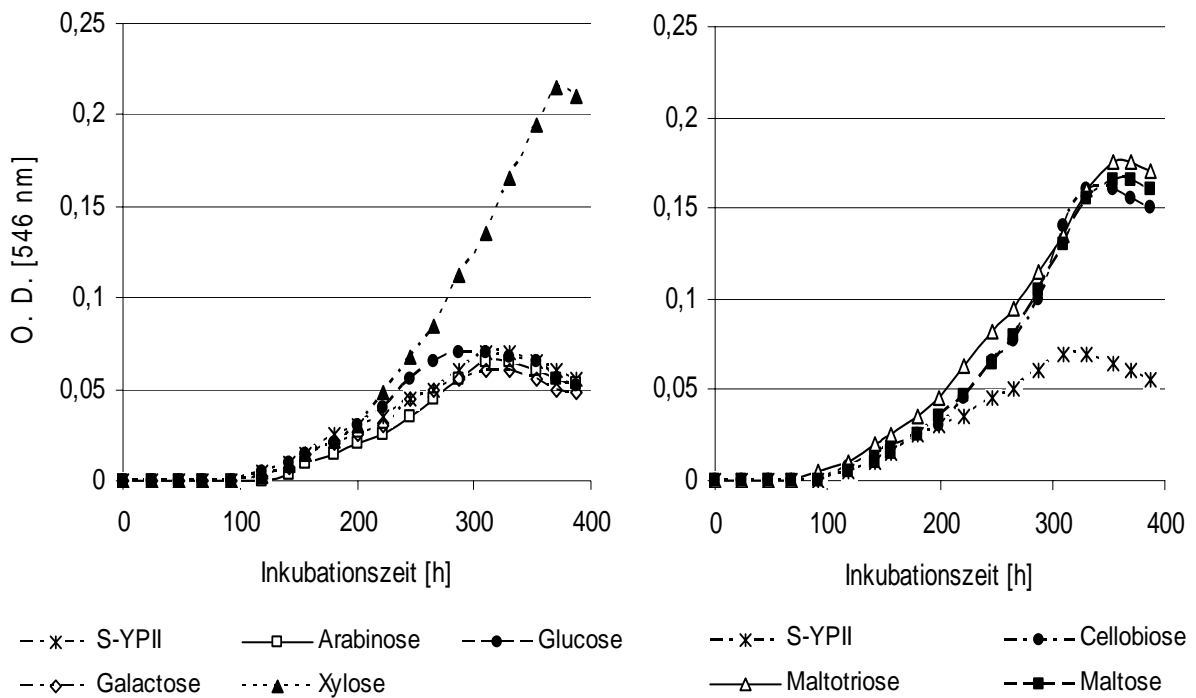


Abbildung 17: Wachstum von SPIT5 mit Pentosen, Hexosen und Oligosacchariden.

Bei der Analyse der angebotenen Substrate zeigte sich, dass Xylose, Cellobiose und Maltotriose am Ende der Inkubationszeit vollständig und Maltose zum größten Teil verbraucht waren (siehe Abb. 18).

Tabelle 18: Zellertrag, Verdopplungszeit und Fermentationsprodukte von SPIT5.

Substrate ^{a), b)}	Zellertrag [10 ⁷ Zellen/ml]	t _d [h] ^{d)}	Fermentationsprodukte [mmol] (Acetat / Ethanol) ^{e)}
Kontrolle ^{c)}	8.8 (± 1.8)	n.b.	n.d. / 1.2
Arabinose	10.7 (± 1.0)	n.b.	n.d. / 1.4
Xylose	25.8 (± 1.8)	52.9	0.8 / 6.8
Glucose	10.0 (± 1.7)	n.b.	n.d. / 1.4
Galactose	9.1 (± 1.4)	n.b.	0.5 / 1.8
Maltose	19.2 (± 2.0)	60.5	n.d. / 3.7
Cellobiose	17.1 (± 1.3)	53.9	0.5 / 4.4
Maltotriose	19.6 (± 2.9)	71.5	2.3 / 3.0

a) Die Substrate wurden dem S-YPII Medium zugegeben. Inkubation bei 30 °C.

b) Endkonzentration: Pentosen 5 mM; Hexosen 4 mM; Disaccharide 2 mM, Maltotriose 1,5 mM.

c) S-YPII Medium ohne zusätzliches Substrat.

d) Verdopplungszeit; n.b.: nicht bestimmt.

e) n.d.: nicht detektiert.

Bei den Ansätzen mit Cellobiose und Maltose konnte am Ende der Inkubationszeit jeweils freie Glucose nachgewiesen werden (1,2 mM bei Cellobiose, 0,7 mM Maltose). Bei Arabinose zeigte sich eine Abnahme um ca. 1 mM, während die Konzentrationen von Glucose und Galactose nahezu unverändert waren.

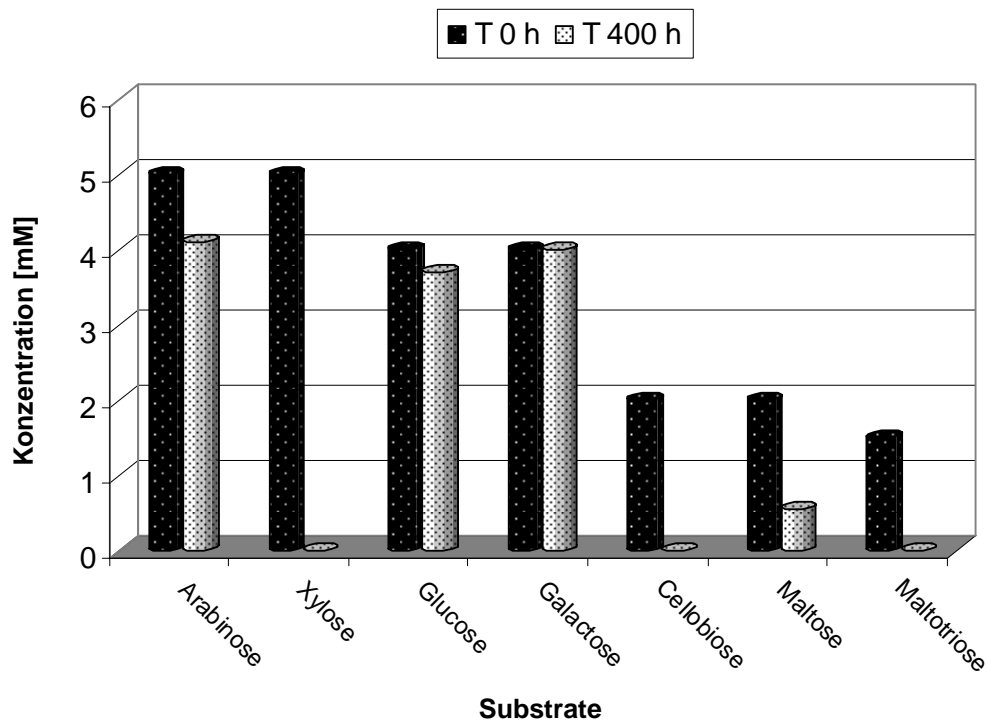


Abbildung 18: Substratverbrauch von SPIT5 (T = Inkubationszeit).

Im Bezug auf die Wiederfindungsraten des Substratkohlenstoffs in den gebildeten Produkten ergeben sich für den Stamm SPIT5 vergleichsweise niedrige Werte. Bei Xylose würde dieser Wert unter der Annahme, dass die CO₂-Bildung der Summe aus Ethanol und Acetat entspricht, bei rund 77 % liegen (korrigiert um die Ethanolbildung bei der Kontrolle, siehe Tab. 18). Pflanzliche Polymere wurden von Stamm SPIT5, ähnlich wie bei Stamm SPN1, nicht abgebaut. Der Temperaturbereich von Stamm SPIT5 lag zwischen 15 und 36 °C, bei einem Optimum von 30 °C. Der pH-Bereich lag zwischen 6,5 und 8, bei einem Optimum von 7,2 – 7,4.

3.1.4 Charakterisierung von Stamm SPIM25

Der Stamm SPIM25 wurde aus dem Darm der Termiten *Incisitermes marginipennis* isoliert. Die Anreicherung erfolgte im Mineralmedium (Kap. 2.6.1) mit dem Substratgemisch S II als Energie- und Kohlenstoffquelle unter einer H_2/CO_2 -Atmosphäre (80/20). Die Isolierung erfolgte über wiederholte Tiefagarverdünnungsreihen im Anreicherungsmedium. Der Stamm bildete leicht transparent-durchscheinende, weiße Kolonien. Ähnlich wie bei Stamm SPIT5 bedurfte es einer erheblichen Inkubationszeit von ca. 6 – 8 Wochen bis die Kolonien im Agar deutlich sichtbar waren.

Die Zellen von Stamm SPIM25 waren zwischen 12 – 20 μm lang und hatten einen Durchmesser von ca. 0,2 – 0,25 μm (siehe Abb. 19). Im Vergleich zu Stamm SPIT5 zeigten der Stamm SPIM25 eine deutlich stärkere Spiralisierung des Protoplasmazyinders. Hierbei betrug die Wellenlänge ca. 1,4 μm bei einer Amplitude von etwa 0,5 - 0,6 μm (siehe Abb. 20). Die elektronenmikroskopischen Querschnitte der Zellen zeigten, dass Stamm SPIM25 über eine Axialfibrille verfügte (siehe Abb. 20B und C).

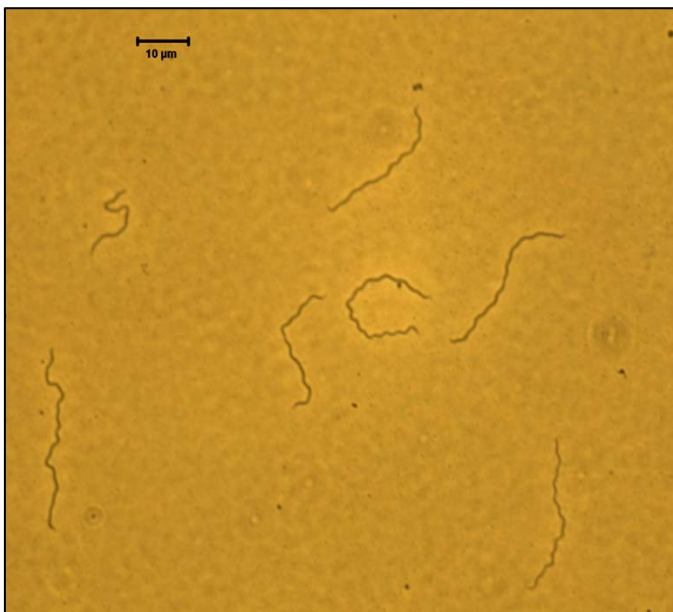


Abbildung 19: Phasenkontrast-aufnahme von Stamm SPIM25.

Der Stamm SPIM25 wuchs nur unter strikt anaeroben Bedingungen und war Katalase-negativ. Ähnlich wie Stamm SPIT5 ließ sich SPIM25 unter einer H_2/CO_2 und einer N_2/CO_2 Atmosphäre (jeweils 80/20) kultivieren, nicht jedoch unter reinem Stickstoff. Auch Stamm SPIM25 benötigte Hefeextrakt im Medium, welches sich nicht durch Supplementlösungen ersetzen ließ.

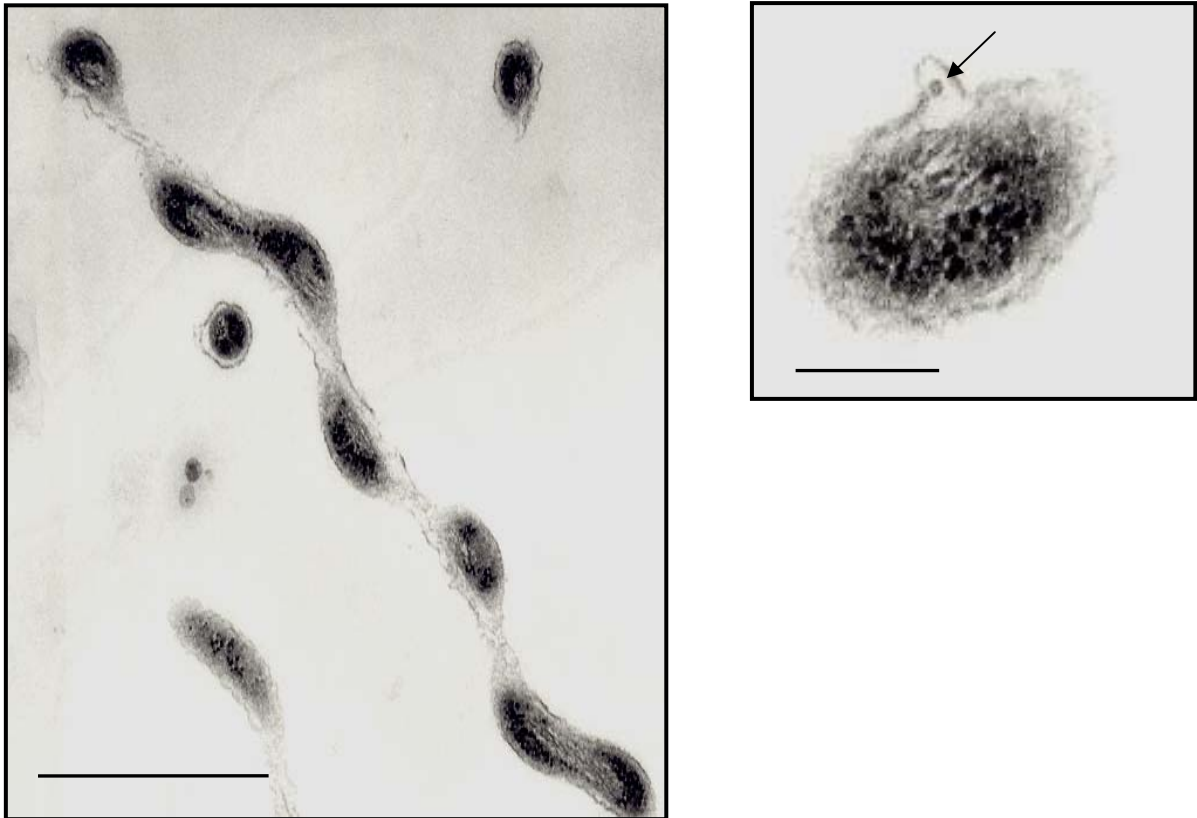


Abbildung 20: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Stamm SPIM25. Abbildung A zeigt einen Längsschnitt von Stamm SPIM25 (Der Balken entspricht 1 μm). Abbildung B zeigt einen Querschnitt mit einer Axialfibrille (Markiert mit Pfeil; Der Balken entspricht 0,1 μm).

Für die physiologischen Untersuchungen wurde das Wachstumsverhalten von SPIM25 im modifizierten Anreicherungsmedium (ohne Glucose; S-YPII) mit und ohne Zusatz verschiedener Zucker untersucht. Die Analysen erwiesen sich allerdings bei Stamm SPIM25 aufgrund des äußerst langsamen Wachstums und des geringen Zellertrags als schwierig. So erreichten die Kulturen die stationäre Phase erst nach ca. 3 Wochen Inkubationszeit, wobei die Zellerträge generell deutlich unterhalb von 10^8 Zellen/ml lagen. Ein geringer Verbrauch des angebotenen Substrats zeigte sich bei Maltose und Cellobiose (jeweils ca. 0,5 mM) sowie bei Xylose (ca. 0,7 mM), während bei Arabinose, Glucose, Galactose und Maltotriose keine Abnahme feststellbar war. Eine eindeutige Korrelation mit Zellzahlen bzw. Produktbildung war nicht festzustellen. In allen Ansätzen waren am Ende der Inkubationszeit geringe Mengen an Acetat (0,4 – 0,8 mM) nachweisbar. Formiat, Ethanol oder andere Stoffwechselprodukte wurden dagegen nicht gefunden. Aufgrund der schwer zu interpretierenden Ergebnisse wurden weitere Untersuchungen an

aufkonzentrierten gewaschenen Zellsuspensionen (Vergl. Kap. 3.1.2) durchgeführt. Hierbei konnte mit Cellobiose als Substrat neben Acetat (1,1 Mol je Mol verbrauchter Cellobiose) auch Ethanol (1 Mol/Mol Cellobiose) nachgewiesen werden. Die Wiederfindungsrate des Substratkohlenstoffs lag damit allerdings nur bei rund 52 % (Unter der Annahme, dass die CO₂-Bildung gleich der Summe aus Acetat und Ethanol ist). Weitere Stoffwechselprodukte waren anhand der HPLC-Profile nicht nachweisbar.

Die ebenfalls aus *Incisitermes marginipennis* isolierten Stämme SPIM20 und SPIM24 waren mit Stamm SPIM25 phylogenetisch eng verwandt (siehe Kap. 3.1.6) und wiesen morphologisch und physiologisch keine signifikanten Unterschiede auf.

3.1.5 Qualitativer Nachweis relevanter Enzyme des Lignocelluloseabbaus

Holz, die Hauptnahrung der Termiten, besteht im Wesentlichen aus den Polymeren Cellulose, Hemicellulose und Lignin. Während das Lignin, wenn überhaupt, nur in geringem Umfang von der mikrobiellen Darmflora angegriffen wird, ist der Abbau von Cellulose und Hemicellulose im Termitendarm sehr effektiv. Der vollständige Abbau dieser Polymere erfordert eine umfangreiche enzymatische Ausstattung. Zur Bestimmung der enzymatischen Fähigkeiten der gewonnenen Isolate wurden Nitrophenol gekoppelte Substratanaloga eingesetzt (siehe Abb. 21). Da zum Nahrungsspektrum der meisten Termiten neben Holz auch anderes pflanzliches Material gehört, wurden neben Enzymen, die am Lignocelluloseabbau beteiligt sind, auch solche getestet, die am Abbau pflanzlicher Speicherstoffe (Amylose) mitwirken.

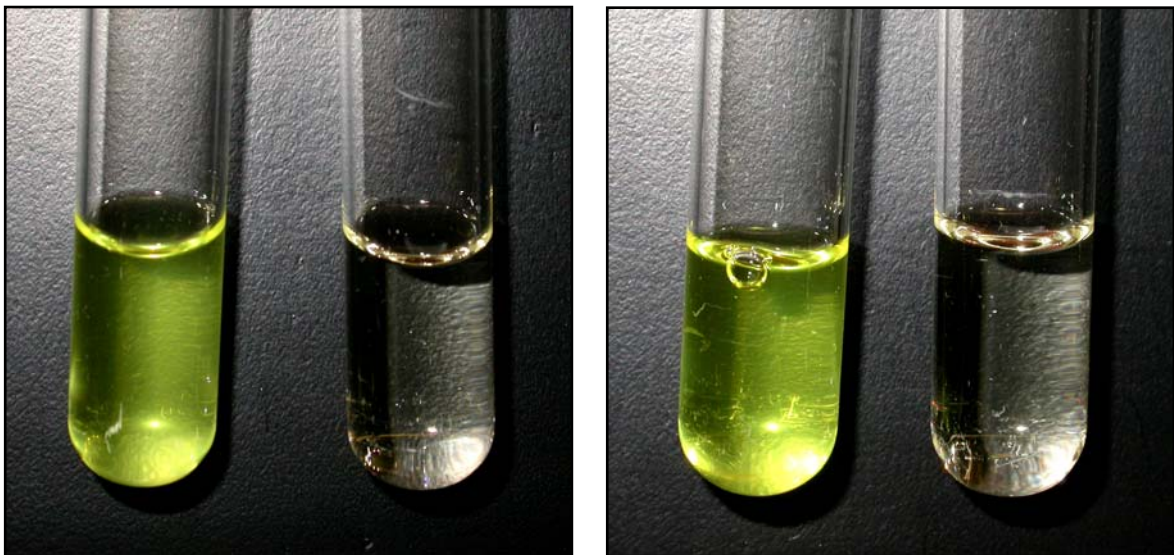


Abbildung 21: Nachweis enzymatischer Aktivität bei den Stämmen SPN1 (linkes Bild) und SPIT5 (rechtes Bild) am Beispiel von β -D-Xylosidase (das jeweils rechte Röhrchen zeigt die Negativkontrolle).

Die Ergebnisse der enzymatischen Untersuchungen sind in Tabelle 19 zusammengefasst. Bei allen Stämmen war Aktivität von α - und β -D-Glucosidase, β -D-Xylosidase und β -D-Fucosidase nachweisbar. Bei β -D-Galactosidase war bei keinem Stamm Aktivität feststellbar, gleiches galt für β -D-Glucuronidase und α -D-Mannosidase. Aktivität von β -D-Cellobiosidase war bei den Stämmen SPIT5 und SPIM20 nachweisbar, α -L-Arabinosidase- und α -D-Galactosidase-Aktivität zeigte sich jeweils bei Stamm SPN1 und SPIT5.

Tabelle 19: Qualitativer Nachweis enzymatischer Aktivitäten der gewonnenen Isolate.

Substratanalogon	Enzym	Reaktion			
		Stamm SPN1	Stamm SPIT5	Stamm SPIM20	Stamm SPIM25
p-Nitrophenyl- β -L-Arabinopyranosid	α -L-Arabinosidase	+	+	-	-
p-Nitrophenyl- β -D-Cellobiosid	β -D-Cellobiosidase	-	+	+	-
p-Nitrophenyl- β -D-Fucopyranosid	β -D-Fucosidase	+	+	+	+
p-Nitrophenyl- α -D-Galactopyranosid	α -D-Galactosidase	+	+	-	-
p-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid	β -D-Galactosidase	-	-	-	-
p-Nitrophenyl- α -D-Glucopyranosid	α -D-Glucosidase	+	+	+	+
p-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranoside	β -D-Glucosidase	+	+	+	+
p-Nitrophenyl- β -D-Glucuronide	β -D-Glucuronidase	-	-	-	-
p-Nitrophenyl- α -D-Mannopyranoside	α -D-Mannosidase	-	-	-	-
p-Nitrophenyl- β -D-Xylopyranoside	β -D-Xylosidase	+	+	+	+

Bei den Stämmen SPN1 und SPIT5 hatten vorhergehende Untersuchungen gezeigt, dass die Organismen zwar das Disaccharid Maltose verwerten konnten, andererseits war aber keine signifikante Verwertung von Glucose nachweisbar (siehe Kap. 3.1.2 /3.1.3). Da bei beiden Organismen α -Glucosidase-Aktivität nachgewiesen wurde, ergab sich die Frage, ob die Organismen Exoenzyme ins Medium abgeben oder ob die enzymatische Aktivität zellgebunden ist. Um diese Frage zu klären wurden beide Organismen im S-YP-Medium (mit 2 mM Maltose) bis zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase inkubiert. Anschließend wurden die Organismen durch Zentrifugation entfernt und das zellfreie Medium mit Nitrophenyl- α -D-Glucopyranosid inkubiert. Parallel erfolgte die Inkubation einer gewachsenen Kultur unter gleichen Bedingungen. Während die Ansätze mit Zellen einen deutlichen Farbumschlag infolge der enzymatischen Aktivität zeigten, war bei den zellfreien Ansätzen keine Reaktion feststellbar (siehe Abb. 22).

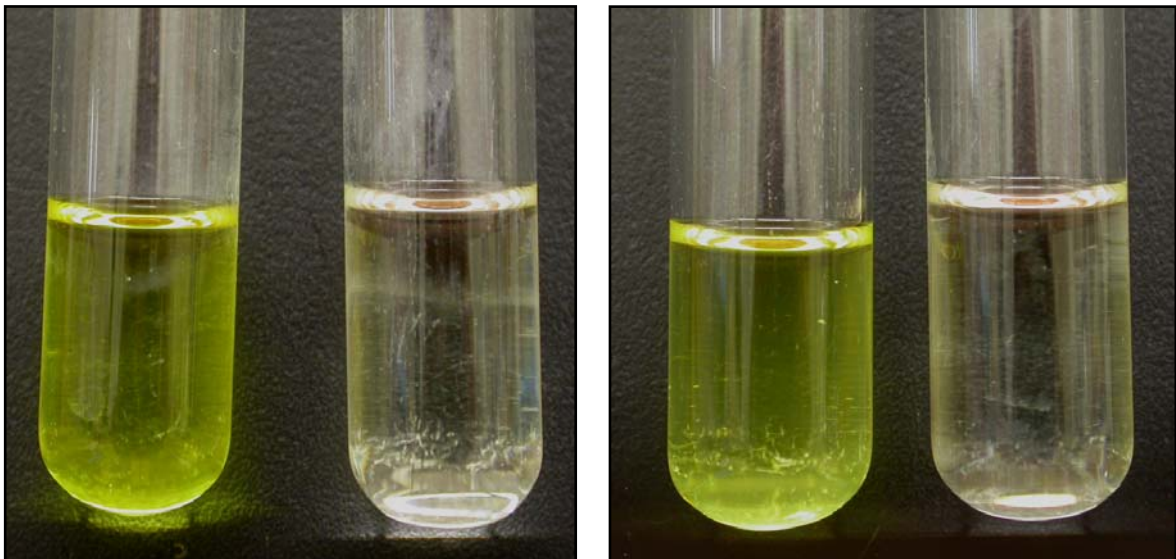


Abbildung 22: Gewachsene Kultur (jeweils linkes Röhrchen) im Vergleich mit zellfreiem Kulturüberstand (jeweils rechtes Röhrchen) von Stamm SPN1 (linkes Bild) und Stamm SPIT5 (rechtes Bild) nach 24 h Inkubation mit Nitrophenyl- α -D-Glucopyranosid.

3.1.6 Phylogenetische Charakterisierung der Isolate

Zur Ermittlung der phylogenetischen Position der Isolate innerhalb des Stammbaums der Spirochaeten, wurde die genomische DNA extrahiert und die 16S rRNA-Gene amplifiziert und anschließend sequenziert. Bei den Stämmen SPIM24 und SPN2 wurde jeweils nur ein Teilbereich des 16S rRNA-Gens bestimmt, da ihre Sequenzen mit denen von Stamm SPIM25 bzw. SPN1 identisch waren. Auf eine weitergehende phylogenetische Analyse dieser beiden Stämme wurde verzichtet.

Die Stämme SPIM20 und SPIM25 aus der Termiten *Incisitermes marginipennis* zeigten mit 99 % Sequenzähnlichkeit eine hohe Übereinstimmung in der 16S rRNA Gensequenz. Nach STACKEBRANDT & GOEBEL (1994) liegt die Artgrenze auf Basis des 16S rRNA-Gens bei 98 % Sequenzübereinstimmung. Demnach sind die beiden Stämme derselben Art zuzuordnen. Die höchste Übereinstimmung mit anderen, aus Termitendärmen gewonnenen, Sequenzen ergab sich mit den Klonen NkS-Oxy26 (98,9 %) und NkS56 (98,4 %), welche beide aus der Termiten *Neotermes koshunensis* stammen. Interessanterweise wurden beide Organismen als Ektosymbionten auf der Oberfläche von Darmflagellaten identifiziert (NODA et al. 2003). Die phylogenetischen Abstände zu bereits charakterisierten Isolaten aus Termitendärmen (ZAS1, ZAS2 und ZAS9, alle aus *Zootermopsis angusticollis*) lagen generell oberhalb von 5 %.

Der Stamm SPIT5 aus der Termiten *Incisitermes tabogae* zeigte die höchste Übereinstimmung mit den Klonen NkS53 und NkS-Oxy3. Auch diese Klone wurden als Ektosymbionten von Flagellaten der Termiten *Neotermes koshunensis* identifiziert (NODA et al. 2003). Allerdings lag die Sequenzübereinstimmung (95,5 % bzw. 94,2 %) deutlich unterhalb der Artgrenze. Die Ähnlichkeit von Stamm SPIT5 zu den Stämmen SPIM20 und SPIM25 lag bei rund 93 %.

Der Stamm SPN1 wies eine erhebliche phylogenetische Distanz sowohl zu charakterisierten Isolaten als auch zu den bislang aus Termitendärmen gewonnenen Klonen auf. Im Gegensatz zu den Stämmen SPIM20, SPIM25 und SPIT5 ließ sich der Stamm SPN1 nicht der Gattung *Treponema* zuordnen, sondern wies die höchsten Übereinstimmungen mit Vertretern der Gattung *Spirochaeta* auf. Bei den nächsten Verwandten handelte es sich um nicht wirtsassoziierte frei lebende Spirochaeten (*Spirochaeta* sp. Buddy, *Spirochaeta* sp. Grapes) mit denen Stamm SPN1 eine rund 91 %ige Übereinstimmung in der 16S rRNA Gensequenz aufwies. Mittels spezifischer PCR mit dem stammspezifischen Primer SPN1269r (Kap. 2.8.3) konnte die 16S rRNA

Gensequenz von Stamm SPN1 auch direkt in DNA-Extrakten aus dem Darm der Termiten *Neotermes castaneus* nachgewiesen werden.

Für die phylogenetische Analyse wurden 47 spirochaetale 16S rRNA Gensequenzen, einschließlich der Stämme SPIM20, SPIM25, SPIT5 und SPN1, sowie *Escherichia coli* als Außengruppe verwendet. Nach der Reduktion hochvariabler Bereiche verblieben 1227 Alignment-Positionen für die phylogenetische Analyse. Die Ermittlung phylogenetischer Stammbäume erfolgte mit den Programmen DNADIST (Kimura-two-parameter-Modell, KIMURA 1980) und NEIGHBOR (Neighbor-Joining-Methode, SAITOU & NEI 1987), sowie DNAML (Maximum Likelihood-Methode, FELSENSTEIN 1981). Zur statistischen Absicherung der phylogenetischen Bäume wurden Bootstrap-Analysen durchgeführt (FELSENSTEIN 1985).

Der in Abbildung 23 dargestellte Neighbor-Joining-Baum zeigt die phylogenetische Position der Isolate innerhalb der Gattungen *Spirochaeta* und *Treponema*. Die Stämme SPIM20, SPIM25 und SPIT5 liegen alle im so genannten Termiten-Cluster I, der ausschließlich Organismen bzw. Klone enthält, die im Intestinaltrakt von Termiten gefunden wurden. Dieser Cluster wird phylogenetisch der Gattung *Treponema* zugeordnet, obwohl es sich bei den nächsten, nicht aus Termiten stammenden Verwandten, um *Spirochaeta stenostrepta* und *Spirochaeta caldaria* handelt. Beide weisen auf genetischer Ebene eine größere Übereinstimmung mit den Treponemen als mit anderen Vertretern der Gattung *Spirochaeta* auf. Die Stämme SPIM20 und SPIM25 bilden innerhalb des Clusters I eine stabile monophyletische Gruppe mit den Klonen NkS-Ste9, NkS56 und NkS-Oxy26 wobei NkS-Ste9 den ältesten Organismus innerhalb dieser Verzweigung darstellt. Der Stamm SPIT5 gehört zusammen mit dem nächsten Verwandten NkS97 zu einer weiteren Untergruppe innerhalb des Clusters I. Diese beinhaltet auch die beiden Isolate *Treponema primitia* ZAS-1 und *Treponema primitia* ZAS-2 aus *Zootermopsis angusticollis*. Allerdings weist diese Untergruppe an der Basis keine ausreichende Stabilität auf (Bootstrap <50), so dass sie in dieser Form nicht als statistisch abgesichert betrachtet werden kann. Der Stamm SPN1 liegt phylogenetisch eindeutig außerhalb der Gattung *Treponema*. SPN1 bildet innerhalb der Gattung *Spirochaeta* eine monophyletische Gruppe mit *Spirochaeta* sp. Grapes und *Spirochaeta* sp. Buddy. Neben SPN1 wurden bisher 5 weitere Organismen identifiziert, die sich nicht einem der beiden Termiten-Cluster zuordnen ließen. Die Klone NkS34, Rs-H09, Rs-B68 und Za29 bilden hierbei eine stabile monophyletische Untergruppe, während die Position von Rs-D16 nicht eindeutig ist.

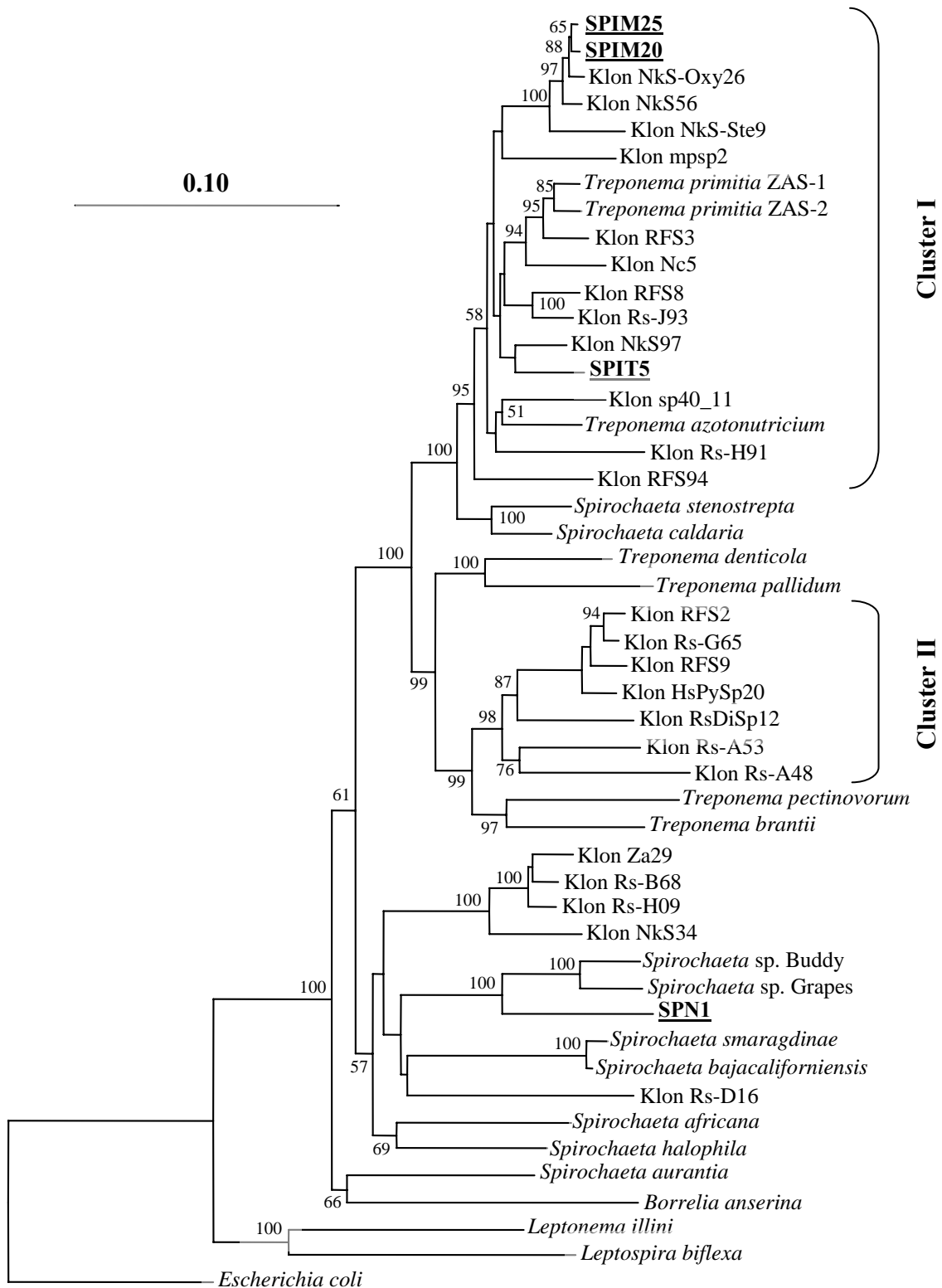


Abbildung 23: Phylogenetischer Stammbaum mit 47 Spirochaeten, einschließlich der Isolate SPN1, SPIM20, SPIM25 und SPIT5 sowie *Escherichia coli* als Außengruppe. Der Konsensus-Baum wurde aus 100 Neighbor-Joining-Bäumen, basierend auf 1227 Alignment-Positionen, berechnet. Der Maßstrich entspricht einer phylogenetischen Distanz von 10 %.

3.1.7 Isolierung und phylogenetische Einordnung von Nitrogenase-Genen (*nifH*)

Da Holz eine äußerst stickstoffarme Nahrungsquelle darstellt, ist die Fixierung von molekularem Stickstoff durch Bakterien im Intestinaltrakt von Termiten von erheblicher Bedeutung. Das Gen *nifH* kodiert für die Nitrogenase-Reductase-Untereinheit des Nitrogenase-Systems von stickstofffixierenden Bakterien. In der vorliegenden Arbeit wurden die Isolate SPN1, SPIT5 und SPIM25 auf das Vorhandensein des entsprechenden Gens überprüft.

Für die Amplifikation von *nifH*-Genen wurden vier verschiedene Primer-Kombinationen verwendet (IGK/GEM, IGK/YAA, KAD/GEM, KAD/YAA; Tab. 14; nach OHKUMA et al. 1996). PCR-Produkte, die mit der erwarteten Größe des *nifH* Gens übereinstimmten (360 - 470 bp), ergaben sich bei den Stämmen SPIT5 und SPIM25 mit der Kombination KAD/GEM. Die anschließende Klonierung und Sequenzierung lieferte bei den beiden Stämmen unterschiedliche Ergebnisse. Während sich das Produkt von SPIM25 keiner bekannten Sequenz zuordnen ließ, konnte das Amplifikat von Stamm SPIT5 eindeutig als *nifH*-Gen identifiziert werden. Die höchsten Übereinstimmungen ergaben sich mit verschiedenen Sequenzen, die im Darm von Termiten identifiziert wurden.

Für die anschließende phylogenetische Analyse wurde die DNA-Sequenz in die entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt und mit 28 *nifH*-Sequenzen verglichen. Der in Abbildung 24 dargestellte Stammbaum wurde mit den Programmen PROTDIST und NEIGHBOR des PHYLIP Programmpakets (FELSENSTEIN 1993) erstellt. Das Chlorophyll-Eisen-Protein von *Rhodobacter capsulatus* diente als Außengruppe. Der Stammbaum zeigt drei stabile Cluster (Bootstrap > 90) in denen sich ausschließlich Sequenzen aus Termitendärmen finden (Termitencluster I-III). Der Stamm SPIT5 liegt hierbei innerhalb des Clusters II, während sich in den Clustern I und III die Isolate *Treponema primitia* ZAS-2 und *Treponema azotonutricium* aus *Zootermopsis angusticollis* finden. Bekannte Stickstoff-fixierende Bakterien aus der Gruppe der α - und γ -Proteobakterien zeigen eine erhebliche phylogenetische Distanz zu den Termitenclustern, ebenso wie entsprechende Sequenzen aus der Gruppe der Archaeen.

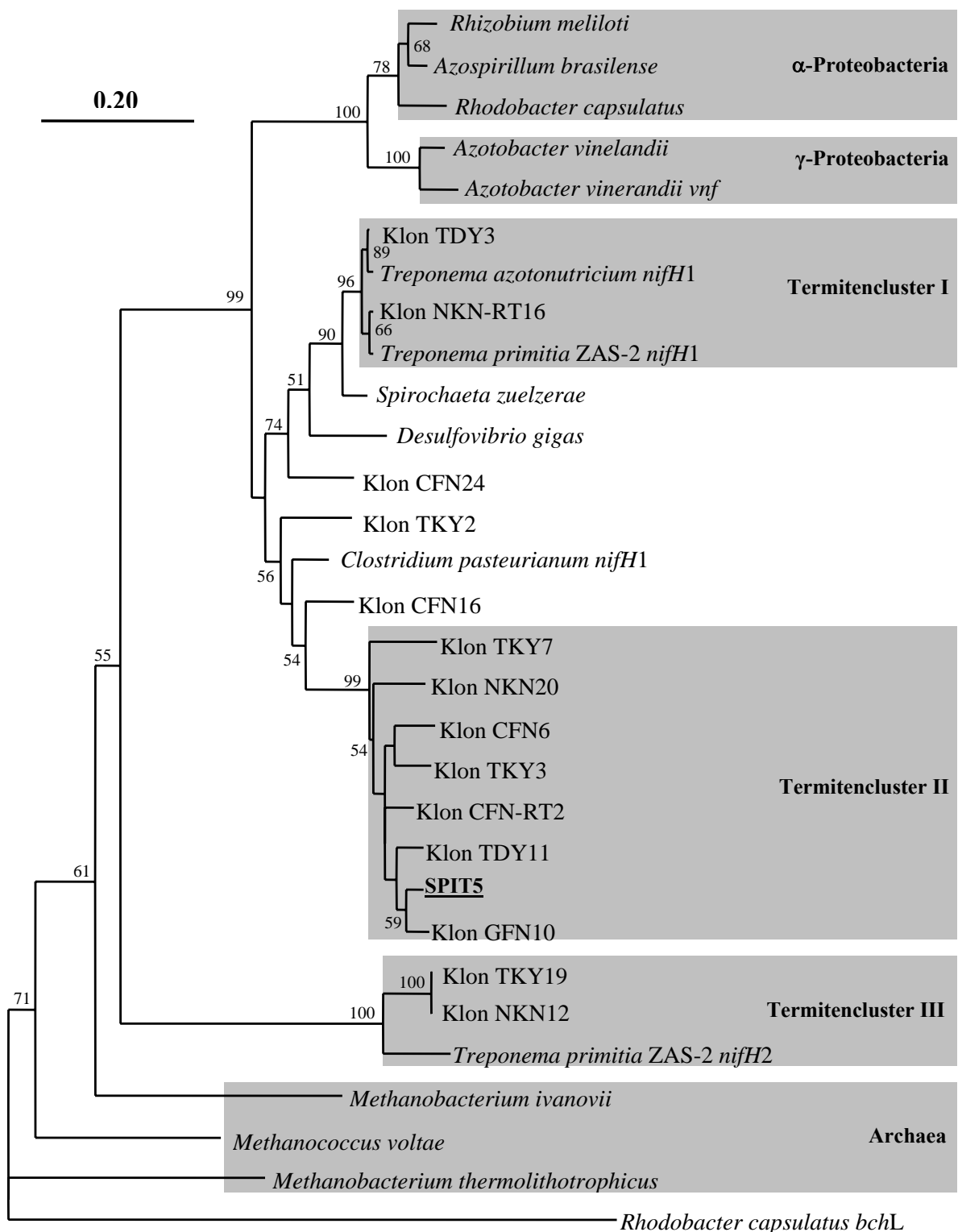


Abbildung 24: Phylogenetischer Stammbaum mit 29 *nifH* Sequenzen, einschließlich des Isolats SPIT5 und *Rhodobacter capsulatus* (*bchL*) als Außengruppe. Der Konsensus-Baum wurde aus 100 Neighbor-Joining-Bäumen berechnet (105 gewichtete Aminosäuren). Der Maßstrich entspricht einer phylogenetischen Distanz von 20 %.

3.2 Sulfatreduktion im Darm von *Pachnoda marginata* und *Mastotermes darwiniensis*

3.2.1 Anreicherung und Identifizierung eines sulfatreduzierenden Bakteriums aus dem Darm des Rosenkäfers *Pachnoda marginata*

Um die Abundanz sulfatreduzierender Bakterien im Darm von *Pachnoda marginata* zu überprüfen, wurde eine MPN-Zählung im Postgate Medium B durchgeführt. Die Gesamtzahl der unter diesen Bedingungen kultivierbaren Bakterien lag bei $9,2 \times 10^9$ Zellen/ml Darminhalt. Davon entfielen auf sulfatreduzierende Bakterien rund 2×10^8 Zellen/ml Darminhalt, entsprechend ca. 2 % der Gesamtpopulation. Der Titer sulfatreduzierender Bakterien im Darm der Termiten *Mastotermes darwiniensis* lag mit 1×10^7 Zellen/ml rund eine Größenordnung unterhalb der von *Pachnoda marginata*.

Zur Identifizierung der Organismen wurde aus der höchsten noch mit sulfatreduzierenden Bakterien bewachsenen Verdünnungsstufe eine Anreicherungskultur gewonnen. Hieraus ließ sich mittels semispezifischer PCR ein Sulfatreduzierer identifizieren. Das molekulare Isolat PM6 konnte auf Basis der ermittelten Teilsequenz des 16S rRNA-Gens (673 bp) der Gattung *Desulfovibrio* zugeordnet werden. Allerdings ist der phylogenetische Abstand zu charakterisierten Vertretern der Gattung recht groß. Die höchste Übereinstimmung in der 16S rRNA-Sequenz (ca. 93 %) zeigte sich mit dem Klon Rs-K75 der aus dem Darm der Termiten *Reticulitermes speratus* gewonnen wurde (HONGO et al. 2003).

Für die phylogenetische Analyse wurden 19 Sequenzen sulfatreduzierender Bakterien (einschließlich PM6) und *Escherichia coli* als Außengruppe verwendet. Nach der Reduktion hochvariabler Bereiche verblieben 584 Alignment-Positionen. Die Ermittlung eines phylogenetischen Stammbaums erfolgte mit den Programmen DNADIST (Kimura-two-parameter-Modell, KIMURA 1980) und NEIGHBOR (Neighbor-Joining-Methode, SAITOU & NEI 1987). Zur statistischen Absicherung des phylogenetischen Stammbaums wurde eine Bootstrap-Analyse durchgeführt (FELSENSTEIN 1985).

Der phylogenetische Stammbaum (Abb. 25) zeigt mehrere monophyletische Untergruppen. Die aus *Pachnoda marginata* ermittelte Sequenz PM6 bildet zusammen mit dem Klon Rs-K75 und mit *Desulfovibrio cuneatus*, der aus limnischen Sedimenten isoliert wurde (SASS et al. 1998), eine solche stabile phylogenetische Untergruppe (Bootstrapwerte = 100). Weitere, bisher aus dem Intestinaltrakt von Insekten isolierte Vertreter wie

D. termitidis, *D. intestinalis*, *D. giganteus* und *D. desulfuricans* lassen sich allerdings anderen phylogenetischen Clustern zuordnen. *D. intestinalis* bildet mit *D. desulfuricans* eine monophyletische Gruppe, während *D. vulgaris* und *D. termitidis* wiederum eine Untergruppe mit *D. oryzae* und *D. longreachii* bildet.

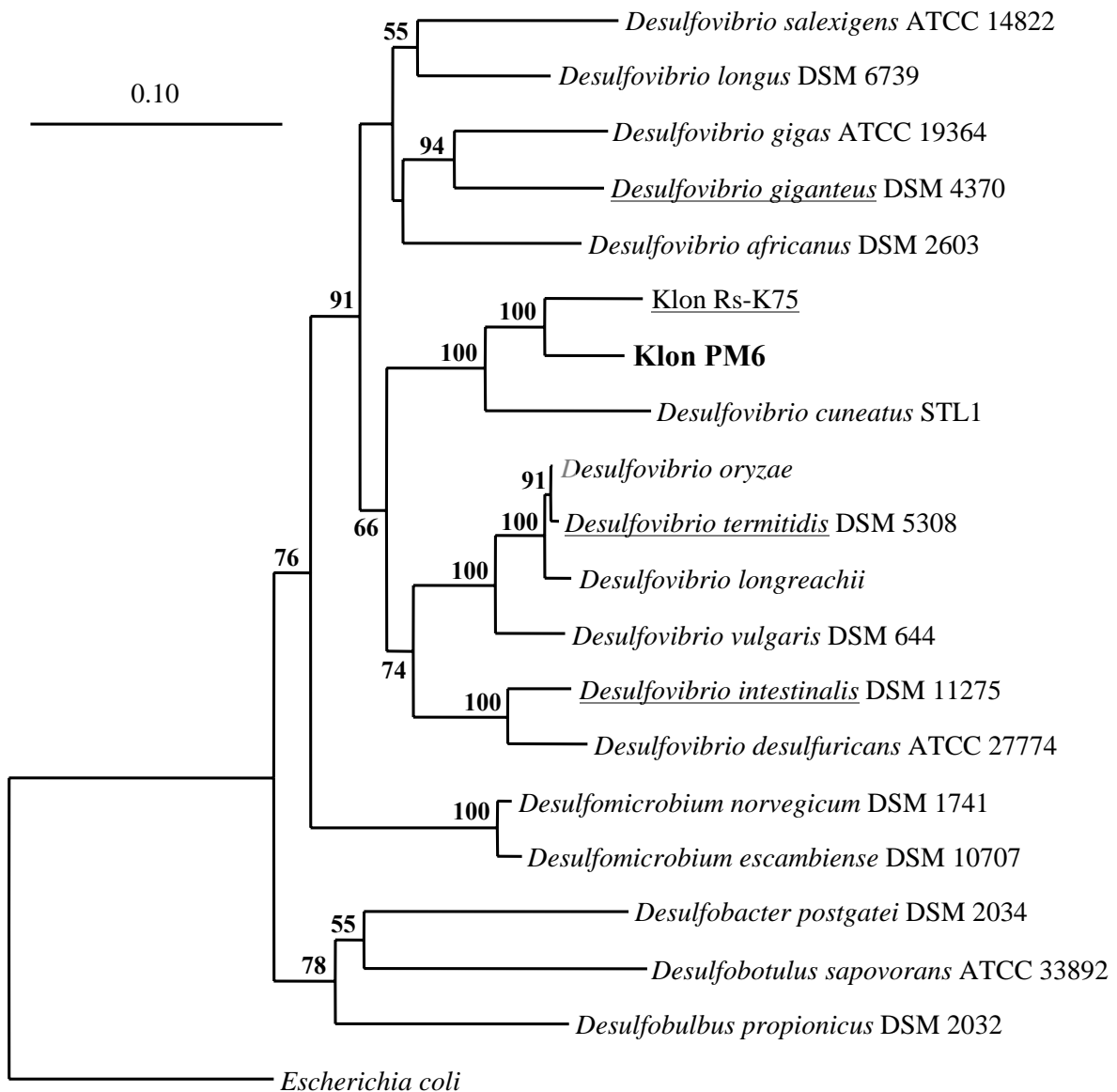


Abbildung 25: Phylogenetischer Stammbaum von Klon PM6 mit Vertretern der Gattung *Desulfovibrio* und verwandten Gattungen mit *Escherichia coli* als Außengruppe. Aus Termiten gewonnene Organismen/Klone sind unterstrichen. Der Konsensus-Baum wurde aus 100 Neighbor-Joining-Bäumen, basierend auf 584 Alignment Positionen, berechnet. Die Bootstrap-Werte sind an den entsprechenden Knotenpunkten angegeben. Der Maßstrich entspricht einer phylogenetischen Distanz von 10 %.

3.2.2 *In vitro* Sulfatreduktion im Darm von *Pachnoda marginata* und *Mastotermes darwiniensis*

Die hohen Zellzahlen sulfatreduzierender Bakterien im Darm von *Pachnoda marginata* deuteten darauf hin, dass die Sulfatreduktion als ein wesentlicher terminaler Oxidationsprozess in diesem Ökosystem anzusehen ist. Im Folgenden wurden die Sulfatkonzentrationen und die Sulfatreduktionsraten im Darm von *Pachnoda marginata* sowie zum Vergleich im Darm der Termiten *Mastotermes darwiniensis* bestimmt (siehe Tab. 20). Die Bestimmung von Sulfatkonzentrationen mittels HPLC sowie der Reduktionsraten mit radioaktiven Sulfat wurden von Frau Farah Emtiazi und Frau Inge Schöning durchgeführt (DRÖGE et al. 2005).

Tabelle 20: *In vitro* Sulfatreduktionsraten

Organismen	Darm- volumen [μ l] ²⁾	Sulfat- reduzierer [Zellen/ml]	Sulfat- konzentration [mM]	Sulfat- reduktionsrate [nmol \times h ⁻¹ \times ml ⁻¹]	Spezifische Sulfat- reduktion ³⁾
<i>Pachnoda marginata</i>	173	2×10^8	1,10	104,30	5,20
<i>Mastotermes darwiniensis</i>	10	1×10^7	0,14	4,90	4,90
<i>Desulfovibrio intestinalis</i> ¹⁾	n.d.	1×10^6	0,30	1,40	0,20 - 0,70

1) Titer vom Referenzstamm *Desulfovibrio intestinalis* KMS2 wurde auf die angegebene Zellzahl eingestellt und die Sulfatkonzentration am Beginn der Inkubation bestimmt.

2) Das Darmvolumen wurde jeweils durch Wiegen bestimmt (1 g \cong 1 ml).

3) Sulfatreduktionsrate je 10^7 Zellen (nmol \times h⁻¹).

Die Sulfatkonzentration im Darm von *Pachnoda marginata* lag mit 1,1 mM etwa siebenfach höher als bei *Mastotermes darwiniensis* (0,14 mM). Entsprechend den wesentlich höheren Zellzahlen sulfatreduzierender Bakterien lag die Sulfatreduktionsrate bei *Pachnoda marginata* rund 20-fach höher als bei *Mastotermes darwiniensis*. Bezogen auf eine definierte Zellzahl (spezifische Sulfatreduktionsrate) ergeben sich für beide Organismen ähnliche Werte (5,2 bzw. 4,9 nmol/10⁷ Zellen \times h⁻¹). Bei der Referenzkultur (*Desulfovibrio intestinalis*) zeigten sich allerdings spezifische Reduktionsraten die deutlich niedriger lagen (0,2 - 0,7 nmol/10⁷ Zellen \times h⁻¹).

4. Diskussion

4.1 Die Spirochaeten des Termitendarms

4.1.1 Charakterisierung der Isolate

Dass der Termitendarm ein großes Reservoir an bisher noch nicht charakterisierten Spirochaeten darstellt, ist seit langem bekannt (BREZNAK 1973). Allein aufgrund mikroskopischer Beobachtungen ließen sich in vielen Termiten mehr als ein Dutzend verschiedene spirochaetale Morphotypen nachweisen (TO et al. 1980, BERCHTOLD et al. 1994). Spätere molekularbiologische Untersuchungen zeigten dann, dass die phylogenetische Diversität der Spirochaeten des Termitendarms sogar noch deutlich größer ist (Kap. 4.1.3). Aufgrund des Fehlens von Isolaten herrschte allerdings über die Physiologie dieser Organismen und ihre Rolle innerhalb der komplexen mikrobiellen Gemeinschaft lange Zeit weitgehende Unklarheit. Erst vor wenigen Jahren gelang es, die ersten Spirochaetenstämme aus Termitendärmen zu isolieren (LEADBETTER et al. 1999). Interessanterweise zeigten die beiden aus der Termitenart *Zootermopsis angusticollis* gewonnenen Isolate (zwischenzeitlich beschrieben als *Treponema primitia* ZAS-1 und ZAS-2; GRABER & BREZNAK 2004, GRABER et al. 2004) die Fähigkeit zur Bildung von Acetat aus H_2 und CO_2 (Homoacetogenese). Zwei Jahre später konnten LILBURN et al. (2001) einen weiteren Spirochaeten aus *Zootermopsis angusticollis* isolieren (beschrieben als *Treponema azotonutricium*; GRABER et al. 2004), der in der Lage war, Stickstoff zu fixieren. Beide Stoffwechselwege unterstreichen den symbiontischen Charakter der gewonnenen Isolate, da zum einen Acetat die Hauptenergiequelle der Termiten ist (BREZNAK & BRUNE 1994) und zum anderen Holz eine äußerst stickstoffarme Nahrung darstellt (LILBURN et al. 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnten spirochaetale Isolate aus den drei niederen Termitenarten *Neotermes castaneus* (SPN1), *Incisitermes marginipennis* (SPIM20, SPIM25) und *Incisitermes tabogae* (SPIT5) gewonnen werden. Ein Novum stellt hierbei, insbesondere unter morphologischen Aspekten, der Stamm SPN1 aus *Neotermes castaneus* dar. Im Gegensatz zu allen anderen bisher beschriebenen Arten der Ordnung Spirochaetales zeigt dieser Stamm eine coccoide Zellform und ist unbeweglich. Berücksichtigt man, dass die typische helikale Zellform der Spirochaeten ein zentrales

(und namensgebendes) Merkmal dieser Gruppe darstellt, ergibt sich die Frage, inwieweit dieser Organismus überhaupt als Spirochaet einzuordnen ist. Ein wesentlicher Aspekt ist hierbei sicherlich die phylogenetische Einordnung auf Basis der 16S rRNA Gensequenz, welche den Stamm als Mitglied der Gattung *Spirochaeta* kennzeichnet (Kap. 4.1.3). Darüber hinaus zeigte der Stamm eine ausgesprochene Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Rifampin (Rifamycin), ein typisches Merkmal der Spirochaeten (LESCHINE & CANALE-PAROLA 1986). Eine mögliche Erklärung für die ungewöhnliche Zellform von Stamm SPN1 könnte das häufig beobachtet Phänomen der so genannten „spherical bodies“ sein (CANALE-PAROLA 1984). Diese 0,5 – 2 μm großen coccoiden Zellformen treten normalerweise bei sich verschlechternden Umweltbedingungen (*in vitro* in der Regel in der stationären Phase) vermehrt auf. Die Entstehung dieser runden Zellformen beginnt mit der Ablösung der äußeren Scheide vom Protoplasmazyylinder an einem der Zellpole (siehe Abb. 26). Anschließend rollt sich der Protoplasmazyylinder innerhalb der äußeren Scheide kugelförmig zusammen.

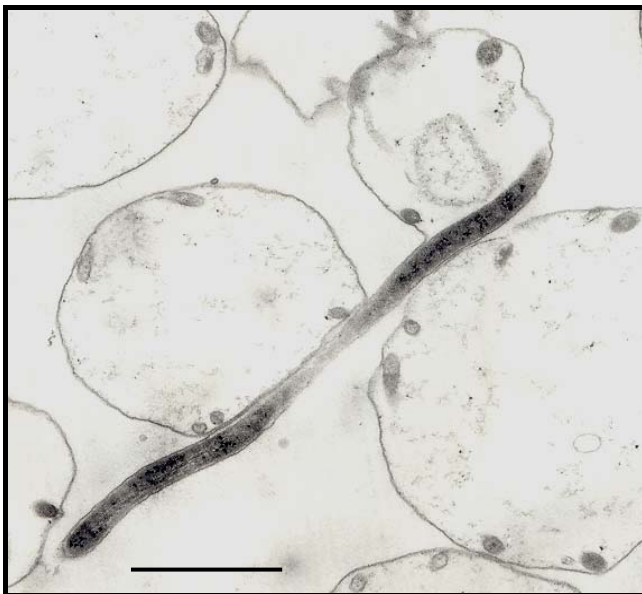


Abbildung 26: Bildung von „spherical bodies“ bei Spirochaeten. Elektronenmikroskopische Aufnahme von Stamm SPIM24 (Balken entspricht 1 μm , Aufnahme von R. Radek).

Mittlerweile gibt es Hinweise, dass coccoide Spirochaeten auch in anderen Ökosystemen vorkommen. So konnten mehrere nicht wirtsassoziierte coccoide Spirochaeten aus Sedimenten isoliert werden (RITALAHTI & LÖFFLER 2003 und 2004), welche zudem auf phylogenetischer Ebene die engsten Verwandten von Stamm SPN1 darstellen (siehe Kap. 4.3.1.). Eine genaue Charakterisierung dieser Organismen steht allerdings noch aus.

Im Gegensatz zu Stamm SPN1 zeigten die Stämme SPIT5, SPIM20 und SPIM25 die für Spirochaeten typische helikale Zellform und waren beweglich. Runde Zellformen

(„spherical bodies“) traten bei allen drei Isolaten erst in der stationären Wachstumsphase auf. Bei mikroskopischen Beobachtungen von Termitendarmpräparaten fallen innerhalb der Gruppe der Spirochaeten zwei verschiedene morphologische Grundformen auf. Zum einen sind dies Spirochaeten mit einem geringen Zelldurchmesser (0,1 – 0,3 μm) und meist stark spiralisierten Zellkörpern (Wellenlänge $< 2 \mu\text{m}$). Diesem Morphotyp entsprachen die Stämme SPIM20 und SPIM25. Gleiches gilt im Wesentlichen auch für *Treponema azotonutricium* und *Treponema primitia* (mit 2,3 μm Wellenlänge etwas weniger stark gewunden) aus der Termitenart *Zootermopsis angusticollis* (GRABER et al. 2004). Der Stamm SPIT5 entsprach dagegen dem zweiten Morphotyp der durch einen größeren Zelldurchmesser ($> 0,4 \mu\text{m}$) und eine weniger stark ausgeprägte Spiralisierung gekennzeichnet ist. Bei dem Stamm SPIM25 (ebenso auch bei dem eng verwandten Stamm SPIM20) ließ sich eine Axialfibrille (je Zellpol) nachweisen, während bei Stamm SPIT5 eine exakte Bestimmung nicht möglich war. Die Anzahl der Axialfibrillen ist ein wichtiges taxonomisches Merkmal innerhalb der Gruppe der Spirochaeten (HOLT 1978, CANALE-PAROLA 1984). Bei der Gattung *Treponema* finden sich in der Regel eine bis maximal neun Axialfibrillen je Zellpol (SMIBERT 1984). Eine Ausnahme bildet hier lediglich *Treponema saccharophilum* bei dem 16 Axialfibrillen nachgewiesen wurden (PASTER & CANALE-PAROLA 1985). Die beiden weiteren bislang aus Termitendärmen isolierten Spirochaeten *Treponema azotonutricium* und *Treponema primitia* verfügen wie die Stämme SPIM20 und SPIM25 über jeweils eine Axialfibrille (GRABER et al. 2004).

Alle gewonnenen Isolate wuchsen nur unter strikt anaeroben Bedingungen, was ein typisches Merkmal der Gattung *Treponema* darstellt (SMIBERT 1984). Eine Ausnahme bildet hier lediglich *Treponema pallidum* der als mikroaerophil eingestuft wird. Die Gattung *Spirochaeta*, welcher der Stamm SPN1 zuzuordnen ist, enthält dagegen sowohl strikt anaerobe als auch fakultativ anaerobe Organismen. Inwieweit die Organismen in ihrem natürlichen Lebensraum zumindest temporär erhöhten Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt sind, ist schwer zu beantworten. Strikt anoxische Verhältnisse herrschen im Zentralbereich der Gärkammer des Termitendarms, während die Peripherie aufgrund der Sauerstoffversorgung durch das Darmepithel oxische bzw. mikrooxische Verhältnisse aufweist (BRUNE 1995a). Bei größeren Termiten mit Darmvolumina von ca. 10 μl , wozu auch die Wirtstermiten der gewonnenen Isolate zählen, ist dieser Bereich allerdings sehr schmal, so dass der überwiegende Teil des Darms sauerstofffrei ist.

Die physiologische Charakterisierung kennzeichnete die untersuchten Spirochaeten als heterotrophe Bakterien, die verschiedene Kohlenhydrate zu Ethanol, Acetat CO_2 und

Formiat (bei Stamm SPN1) fermentieren. Damit ergeben sich deutliche Übereinstimmungen mit verschiedenen charakterisierten Vertretern der Gattungen *Spirochaeta* und *Treponema*. Die meisten Arten der Gattung *Spirochaeta* bilden als wesentliche Fermentationsprodukte Ethanol, Acetat, CO₂ und H₂. (u. a. CANALE-PAROLA 1977, ZHILINA et al. 1996). Als weitere Fermentationsprodukte können Lactat, Formiat, Succinat und Glycerin auftreten. Diese allerdings in der Regel nur in sehr geringen Mengen. Fermentierbare Kohlenhydrate werden hierbei über den Embden-Meyerhof-Weg zu Pyruvat abgebaut, welches anschließend nach dem Prinzip der Clostridien-Gärung zu Acetyl-CoA, CO₂ und H₂ umgesetzt wird. Acetyl-CoA wird schließlich über Acetaldehyd bzw. Acetyl-PO₄ zu Ethanol und Acetat umgesetzt (CANALE-PAROLA 1984; siehe Abb. 27).

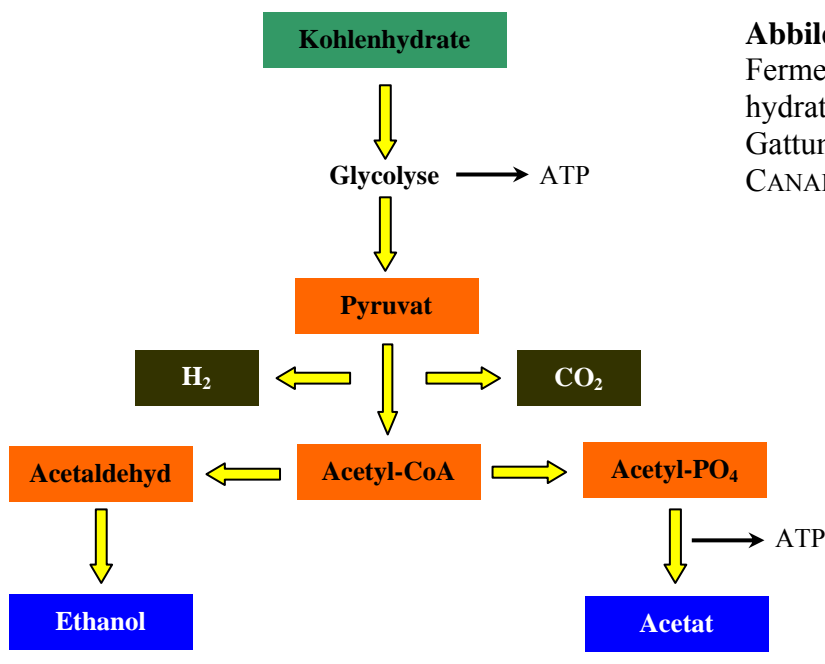


Abbildung 27: Anaerobe Fermentation von Kohlenhydraten durch Vertreter der Gattung *Spirochaeta* (nach CANALE-PAROLA 1984).

Das Verhältnis der nicht gasförmigen Produkte Acetat und Ethanol schwankt hierbei von Art zu Art, wobei meist die Ethanolbildung überwiegt. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Stämme SPIT5 und SPIM25 Kohlenhydrate nach dem gleichen Prinzip fermentierten. Dies wird auch für *Treponema azotonutricium* aus der Termiten *Zootermopsis angusticollis* postuliert, wobei dieser Stamm deutlich mehr Acetat als Ethanol bildet (GRABER et al. 2004). Bei Stamm SPN1 ist hingegen von einem Gärungstyp auszugehen, bei dem Pyruvat durch Pyruvat:Formiat-Lyase zu Acetyl-CoA und Formiat gespalten wird, was somit der Ameisensäuregärung der Enterobacteriaceae entsprechen würde. Gleiches wird auch für verschiedene Vertreter der Gattung *Treponema*

postuliert, welche ebenfalls Formiat als ein charakteristisches Fermentationsprodukt bilden. *Treponema saccharophilum* bildet hierbei neben Formiat, ebenso wie Stamm SPN1, Ethanol und Acetat als wesentliche Fermentationsprodukte (PASTER & CANALE-PAROLA 1985). *Treponema bryantii* sowie *Treponema succinifaciens* bilden dagegen neben Formiat und Acetat hauptsächlich Succinat aber kein Ethanol (CZYK & CANALE-PAROLA 1979, STANTON & CANALE-PAROLA 1980). Von einem homoacetogenen Wachstum (Acetat-bildung aus H_2 und CO_2), wie es LEADBETTER et al. (1999) bei *Treponema primitia* (isoliert aus *Zootermopsis angusticollis*) nachweisen konnten, ist bei den vorliegenden Isolaten nicht auszugehen. So war bei der Kultivierung unter H_2/CO_2 keine Abnahme der Gasphase festzustellen. Zudem ließ sich die H_2/CO_2 -Atmosphäre durch eine N_2 - bzw. N_2/CO_2 -Atmosphäre ersetzen.

Ein gemeinsames Merkmal der aus verschiedenen Termiten gewonnenen Spirochaeten, insbesondere der Isolate aus *Incisitermes marginipennis*, war ein sehr langsames Wachstum, wobei teilweise auch nur geringe Zelldichten erreicht wurden. Dieses Phänomen wurde auch bei den beiden anderen bislang aus Termitendärmen gewonnenen Isolaten *T. primitia* und *T. azotonutricium* beobachtet, welche je nach Stamm und Substratangebot Verdopplungszeiten zwischen 22 und 70 Stunden aufwiesen (GRABER & BREZNAK 2004, GRABER et al. 2004). Es stellt sich allerdings die Frage, ob die Spirochaeten auch in ihrem natürlichen Habitat ein solches Wachstumsverhalten zeigen. Hierbei muss man berücksichtigen, dass der Termitendarm kein statisches, sondern ein höchst dynamisches Ökosystem darstellt. Die Darmpassage des Holzes und anderer Nahrungsbestandteile dauert nur ca. 24 Stunden (BREZNAK 1984). Deshalb ist eher davon auszugehen, dass mit den derzeitigen Kultivierungsmethoden die Nährstoffansprüche bzw. die in vivo vorherrschenden chemisch-physikalischen Bedingungen nur unzureichend simuliert werden können. Dieses Problem ist allerdings nicht auf die Gruppe der Spirochaeten oder den Termitendarm beschränkt, sondern vielmehr generell zu sehen. Bei den meisten untersuchten Ökosystemen zeigte sich bisher, dass nur ein sehr geringer Teil der natürlich vorkommenden mikrobiellen Gemeinschaft im Labor kultivierbar war (in der Regel < 1 %, u. a. AMANN et al. 1995).

Das Substratspektrum der untersuchten Isolate umfasste verschiedene Mono-, Di- und Oligosaccharide, welche bei der Hydrolyse pflanzlicher Polymere auftreten. Interessanterweise wurde jedoch von keinem Stamm freie Glucose als Substrat genutzt. Zumindest innerhalb der Gattungen *Spirochaeta* und *Treponema* ist dies ungewöhnlich, da alle bisher untersuchten Arten, abgesehen von einigen Treponemen, die generell keine

Kohlenhydrate fermentieren, neben anderen Zuckern auch Glucose als Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen können. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass bei der Hydrolyse von Cellulose keine Glucose, sondern vielmehr das Disaccharid Cellobiose entsteht, welches von den untersuchten Isolaten verwertet wird. Ähnlich liegen die Verhältnisse bei einer Reihe von Pansenbakterien, so u. a. bei *Ruminococcus flavefaciens*, welcher ebenfalls Cellobiose aber keine Glucose verwertet (BRYANT 1984). Untersuchungen von THOLEN & BRUNE (2000) deuten zudem darauf hin, dass Glucose kein wesentliches Intermediärprodukt des Lignocelluloseabbaus darstellt. Unter in vitro Bedingungen wird dieses Substrat im Termitendarm nur in äußerst geringen Umfang umgesetzt ($< 0,5 \text{ nmol/Termite} \times \text{h}$).

4.1.2 Lignocelluloseabbau im Termitendarm

Holz ist ein wesentlicher Nahrungsbestandteil der meisten bekannten Termitenarten. Da die von den Termiten aufgenommene Nahrung den Darmtrakt innerhalb von ca. 24 h passiert (BREZNAK 1984), müssen die Organismen in der Lage sein, die hochpolymeren und komplexen Bestandteile des Holzes effektiv zu verwerten. Die mengenmäßig vorherrschenden Holzbestandteile Cellulose und Hemicellulose werden hierbei zu ca. 80 - 90 % im Darm abgebaut. Im Gegensatz dazu wird Lignin im Termitendarm vermutlich nicht im größeren Umfang abgebaut. Zwar konnte nachgewiesen werden, dass verschiedene aromatische Monomere und Dimere durch die mikrobielle Darmflora abgebaut oder zumindest modifiziert werden, gleiches konnte allerdings für Lignin bislang nicht gezeigt werden (KUHNIK et al. 1994, BRUNE et al. 1995b, KUHNIK & KÖNIG 1997).

Bei den niederen Termiten wurde häufig die Ansicht vertreten, dass der Celluloseabbau im Wesentlichen auf die Aktivität der im Darm vorkommenden Flagellaten zurückzuführen ist (YAMIN 1981, ODELSON & BREZNAK 1985). Ob auch cellulolytische Bakterien einen signifikanten Anteil an der Celluloseverwertung haben, war dagegen lange umstritten (SLAYTOR 1992). Mittlerweile konnten allerdings eine Vielzahl cellulolytischer Bakterien aus niederen Termiten isoliert werden (HETHENER et al. 1992, WENZEL et al. 2002b). Auf Basis der bisher gewonnenen Isolate scheint sich die cellulolytische bakterielle Darmflora vorwiegend aus fakultativ anaeroben oder mikroaerophilen Vertretern der Gattungen *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Flexibacter* und *Cellulomonas* (bzw. *Cellulosimicrobium* / *Isoptericola*, BAKALIDOU et al. 2002, STACKEBRANDT et al. 2004) sowie verschiedener Proteobakterien zusammensetzen. Bei den bislang nachgewiesenen

hemicellulolytischen Bakterien handelt es sich hauptsächlich um Vertreter der Actinomyceten und Clostridien aus der Gruppe der grampositiven Bakterien sowie Enterobakterien und Vertreter der Gattungen *Pseudomonas* und *Acinetobacter* (SAXENA et al. 1993, SCHÄFER et al. 1996). Obwohl sich somit dem Abbau der verschiedenen Polymere im Termitendarm zahlreiche mikrobielle Vertreter zuordnen ließen, herrschte jedoch über die Rolle der Spirochaeten, und damit der abundantesten prokaryontischen Gruppe im Termitendarm, bislang weitgehende Unklarheit. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass die Spirochaeten eine wesentliche Rolle beim Lignocelluloseabbau spielen. So konnten bei allen gewonnenen Isolaten verschiedene enzymatische Aktivitäten nachgewiesen werden, die für die Verwertung von Abbauprodukten von Cellulose und Hemicellulose von Bedeutung sind. Die Aktivitäten von β -Glucosidase, Arabinosidase und Xylosidase weisen darauf hin, dass die Spirochaeten insbesondere bei der zweiten Stufe des Lignocelluloseabbaus eine Rolle spielen. In dieser Stufe werden die Mono-, Di- und Oligosaccharide, die bei der Hydrolyse von Cellulose und Hemicellulosen entstehen, abgebaut (KÖNIG et al. 2002). Bislang konnten dieser Stufe verschiedene Vertreter der Grampositiven Bakterien und der Proteobakterien zugeordnet werden (SCHÄFER et al. 1996). Darüber hinaus dürften die Spirochaeten auch am Abbau verschiedener pflanzlicher Speicherstoffe, wie beispielsweise Amylose, beteiligt sein. Darauf deuten die Aktivitäten der α -Glucosidase hin. Ob im Termitendarm auch cellulolytische oder hemicellulolytische Spirochaeten vorkommen, ist nach wie vor unklar. Die vorliegenden Isolate waren nicht in der Lage Cellulose oder Xylan abzubauen. Allerdings konnten bisher auch aus keinem anderen Ökosystem celluloseabbauende Spirochaeten isoliert werden. Der Abbau von Xylan und Arabinogalactan durch Spirochaeten konnte dagegen bereits demonstriert werden (PASTER & CANALE-PAROLA 1982).

4.1.3 Phylogenie der Spirochaeten des Termitendarms

Die phylogenetische Einordnung der im Intestinaltrakt von Termiten vorkommenden Spirochaeten war lange Zeit unklar, obwohl ihre Entdeckung bereits mehr als 100 Jahre zurückliegt (LEIDY 1881). Eine erste taxonomische Einteilung erfolgte durch MARGULIS & HINKLE (1992), welche die Gattungen *Clevelandina*, *Diplocalyx*, *Hollandina* und *Pillotina* einführten. Diese Einteilung beruhte allerdings auf rein morphologischen Daten, da zu diesem Zeitpunkt weder Isolate vorlagen, noch molekularbiologische Daten verfügbar waren. Im Jahr 1994 gelang es BERCHTOLD et al. erstmals die 16S rRNA

Gensequenz eines Darmspirochaeten zu bestimmen. Der Klon MDS1 aus der Termiten *Mastotermes darwiniensis* ließ sich der *Treponema*-Gruppe der Spirochaeten zuordnen, wenn auch der phylogenetische Abstand zu bekannten Arten der Gattung recht groß war (> 10 %). In der Folgezeit wurden eine Reihe von molekularbiologischen Untersuchungen durchgeführt, die auf eine breite Artenvielfalt der Spirochaeten in Termitendärmen hindeuteten (BERCHTOLD & KÖNIG 1996, PASTER et al. 1996, OHKUMA & KUDO 1998). So konnten HONGOHO et al. (2003) allein im Darm der Termiten *Reticulitermes speratus* 61 verschiedene spirochaetale Phylotypen nachweisen, verglichen mit derzeit weniger als 40 charakterisierten Arten in allen Gattungen der Ordnung Spirochaetales. Insgesamt liegt die Anzahl der in verschiedenen Termiten identifizierten Spirochaeten bei deutlich über 100. Die überwiegende Zahl, inklusive der aus *Zootermopsis angusticollis* gewonnenen ersten Isolate, ließen sich, wie schon der erste Klon MDS1, phylogenetisch der Gruppe der Treponemen zuordnen. Innerhalb dieser Gruppe lassen sich zwei größere Cluster unterscheiden, die so genannten Termiten-Cluster I und II (OHKUMA et al. 1999a, IIDA et al. 2000). Bei den nächsten charakterisierten Verwandten der Spirochaeten des Cluster I handelt es sich interessanterweise um zwei nicht wirtsassoziierte Vertreter der Gattung *Spirochaeta* (*Spirochaeta caldaria* und *Spirochaeta stenostrepta*). Phylogenetisch werden diese beiden Organismen allerdings eher der Gattung *Treponema* zugeordnet (PASTER et al. 1991). Die Organismen des Clusters II werden ausschließlich durch Klone repräsentiert. Ein Isolat aus dieser Gruppe existiert bislang nicht. Mehrere Spirochaeten des Clusters II konnten als Ektosymbionten von Darmflagellaten identifiziert werden (IIDA et al. 2000). Gleiches trifft allerdings auch auf verschiedene Organismen des Clusters I zu (WENZEL et al. 2002a, NODA et al. 2003).

Der aus *Neotermes castaneus* isolierte Stamm SPN1 weist insofern eine interessante phylogenetische Stellung auf. Er lässt sich keinem der beiden Termiten-Cluster zuordnen, sondern ist phylogenetisch vielmehr in der Gattung *Spirochaeta* einzuordnen. Die vorliegenden Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass sich die phylogenetische Diversität der Darmspirochaeten nicht auf die Gattung *Treponema* beschränkt. Unterstützt wird diese These durch jüngere molekularbiologische Untersuchungen bei denen mehrere Klone entdeckt wurden, die gleichfalls der Gattung *Spirochaeta* zuzuordnen sind (HONGOHO et al. 2003, NODA et al. 2003, BERCHTOLD unveröffentlicht, Klon Za29). Allerdings ist die phylogenetische Distanz von Stamm SPN1 zu diesen Klonen, die eine stabile monophyletische Untergruppe bilden (abgesehen von Klon Rs-D16), recht groß. Stamm SPN1 bildet dagegen eine monophyletische Gruppe mit

zwei freilebenden Spirochaeten (*Spirochaeta* sp. Buddy und *Spirochaeta* sp. Grapes), welche ebenfalls eine coccoide Morphologie zeigen (RITALATHI & LÖFFLER 2003 und 2004). Dies könnte darauf hindeuten, dass diese neue Gruppe nichtspiraler Spirochaeten auch phylogenetisch eine distinkte Gruppe innerhalb der Gattung *Spirochaeta* bilden.

Die Stämme SPIM20 und SPIM25 aus *Incisitermes marginipennis* sowie SPIT5 aus *Incisitermes tabogae* ließen sich anhand der phylogenetischen Analyse eindeutig dem Termiten-Cluster I zuordnen. Die bisherigen molekularbiologischen Untersuchungen von Termitendärmen deuten darauf hin, dass die Mehrheit der Darmspirochaeten zu dieser phylogenetischen Untergruppe zählt. HONGOH et al. (2003) konnten im Darm der Termiten *Reticulitermes speratus* insgesamt 61 verschiedene spirochaetale Phylotypen identifizieren, wovon 50 auf den Cluster I entfielen und lediglich 7 auf den Cluster II (4 Phylotypen gehörten nicht zur Gattung *Treponema*). Weiterhin konnten Spirochaeten des Clusters I in allen bisher untersuchten Termiten nachgewiesen werden, während sich die bislang identifizierten Organismen des Cluster II auf die Termiten *Reticulitermes flavipes*, *Reticulitermes speratus* und *Hodotermopsis sjoestedti* beschränken (NODA et al. 2003). Es muss hierbei allerdings berücksichtigt werden, dass eine intensive phylogenetische Analyse der Darmflora bislang nur bei relativ wenigen Termitenspezies durchgeführt wurde. Die Stämme SPIM20 und SPIM25 bilden innerhalb des phylogenetischen Stammbaums eine stabile monophyletische Gruppe mit den Klonen NkS-Oxy26, NkS56 und NkS-Ste9 (alle aus *Neotermes koshunensis*, NODA et al. 2003). Hier lag der phylogenetische Abstand zu Klon NkS-Oxy26 bei weniger als 2 % und damit nach STACKEBRANDT & GOEBEL (1994) unterhalb der Artgrenze. NODA et al. (2003) konnten den Klon NkS-Oxy26 mittels FISH als Ektosymbionten auf der Oberfläche eines Oxymonaden identifizieren. Der Klon NkS56 ist dem gleichen Phylotyp zuzuordnen und wurde als einer der abundantesten Klone im Darm von *N. koshunensis* identifiziert. Dementsprechend lag die Vermutung nahe, dass die mit Flagellaten assoziierten Spirochaeten einen wesentlichen Teil der spirochaetalen Gesamtpopulation im Termitendarm ausmachen. Die Voraussetzung für diese These wäre aber, dass sich die mit Flagellaten assoziierten Spirochaeten von den frei im Darm vorkommenden auch phylogenetisch eindeutig abgrenzen lassen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen allerdings, dass dem nicht so ist. Offenbar kommen phylogenetisch sehr eng miteinander verwandte Spirochaeten sowohl frei lebend im Darm, als auch in Symbiose mit den Flagellaten vor. Denkbar wäre allerdings auch, dass sich die mit den Flagellaten assoziierten Spirochaeten auch ohne ihren Wirtsorganismus kultivieren ließen.

Betrachtet man die Phylogenie der Spirochaeten des Termitendarms, stellt sich die Frage, ob diese Organismen mehrfach unabhängig voneinander in dieses Ökosystem eingewandert sind oder ob sich die heutige Diversität in Coevolution mit den Termiten erst im Darm entwickelt hat. Solange sich alle identifizierten Organismen einem phylogenetischen Cluster zuordnen ließen (Termiten-Cluster I) erschien die letztere Variante wahrscheinlicher. Mittlerweile hat sich aber gezeigt, dass die phylogenetische Diversität der Spirochaeten nicht auf eine distinkte Gruppe beschränkt ist und neben den Treponemen auch Vertreter der Gattung *Spirochaeta* umfasst. Das Vorhandensein verschiedener Cluster sowie die zum Teil erheblichen phylogenetischen Distanzen zwischen den verschiedenen Darmspirochaeten (> 10 %) lassen es unwahrscheinlich erscheinen, dass sich alle Organismen auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückführen lassen, der bereits im Termitendarm gelebt hat. Nach OCHMAN & WILSON (1987) korreliert ein Sequenzunterschied von 1 % in der 16S rDNA-Sequenz mit einem Zeitraum von ca. 50 Millionen Jahren. Somit hätte die Entwicklung der Spirochaeten zur heute beobachteten Diversität lange vor der Entstehung der Termiten (vor ca. 300 Millionen Jahren) begonnen. Zudem zeigen verschiedene Untersuchungen, dass die Diversität der Spirochaeten nur wenig oder gar nicht von der Taxonomie, der geographischen Verteilung oder dem Nahrungsverhalten der Termiten beeinflusst ist (BERCHTOLD & KÖNIG 1996, LILBURN et al. 1999, OHKUMA et al. 1999a)

4.1.4 Stickstofffixierung im Termitendarm

Die Nahrung der Termiten ist in der Regel zwar reich an Kohlenstoff, gleichzeitig aber äußerst stickstoffarm. So enthält Holz, ein wesentlicher Nahrungsbestandteil der meisten Termiten, nur etwa 0,05 % Stickstoff (auf Basis des Trockengewichts, LILBURN et al. 2001). Von daher ist davon auszugehen, dass die Fixierung von molekularem Stickstoff durch Darmbakterien für die Termiten von erheblicher Bedeutung ist. Entsprechende Nachweise konnten bei einer Reihe von Termiten geführt werden (BENEMANN 1973, TAYASU et al. 1994). Weiterhin konnten aus Termitendärmen eine Reihe von stickstofffixierenden Bakterien der Gattungen *Enterobacter*, *Desulfovibrio*, *Citrobacter* und *Rhizobium* isoliert werden (POTRIKUS & BREZNAK 1977, KUHNIGK et al. 1996, WENZEL et al. 2002b). Bei molekularbiologischen Untersuchungen auf der Basis des *nifH*-Gens (das Gen kodiert eine Untereinheit des Nitrogenase-Systems) konnten eine Vielzahl unterschiedlicher *nifH*-Sequenzen identifiziert werden (OHKUMA et al. 1996, NODA et al. 1999, OHKUMA et al. 1999b). Bei der phylogenetischen Analyse zeigte sich aber, dass sich

die meisten dieser Sequenzen keinen bekannten stickstofffixierenden Bakterien zuordnen ließen. Untersuchungen von LILBURN et al. (2001) deuteten darauf hin, dass zumindest ein Teil dieser unbekannt Sequenzen durch Spirochaeten repräsentiert werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen diese These. So ließ sich die *nifH*-Sequenz von Stamm SPIT5 einem großen monophyletischen Cluster zuordnen, der ausschließlich durch Klone aus Termitendärmen repräsentiert wird (siehe Abb. 24). Die bei den Isolaten *Treponema primitia* und *Treponema azotonutricium* identifizierten *nifH*-Gene ließen sich ebenfalls phylogenetischen Clustern aus Termitendärmen zuordnen (LILBURN et al. 2001). Berücksichtigt man die hohe Abundanz der Spirochaeten in Termitendärmen, könnte man also spekulieren, dass diese Organismen einen erheblichen Teil der Stickstofffixierung im Termitendarm leisten. Einschränkend muss man allerdings berücksichtigen, dass bei den vorliegenden Untersuchungen nur bei einem der drei untersuchten Isolate das *nifH*-Gen nachgewiesen werden konnte. Zudem lässt sich aus dem Vorhandensein eines Gens nicht automatisch auf eine entsprechende Aktivität im natürlichen Ökosystem schließen. Eine signifikante Nitrogenase-Aktivität unter Kulturbedingungen konnte bei *Treponema azotonutricium* nachgewiesen werden (LILBURN et al. 2001).

4.2 Sulfatreduktion im Darm von Insekten

Die dissimilatorische Sulfatreduktion ist ein wesentlicher Prozess des anaeroben Abbaus von organischem Material. Insbesondere in marinen Sedimenten spielen sulfatreduzierende Bakterien eine zentrale Rolle im Kreislauf des Schwefels (JØRGENSEN 1977). Sulfatreduzierer finden sich aber auch in zahlreichen anderen Ökosystemen, so unter anderem im Intestinaltrakt von Menschen und Tieren (HOWARD & HUNGATE 1976, GIBSON et al. 1988). Weiterhin konnten sulfatreduzierende Bakterien im Darm verschiedener höherer und niederer Termiten sowie bei der holzfressenden Schabe *Cryptocercus punctulatus* nachgewiesen werden (BRAUMAN et al. 1990, TRINKERL et al. 1990, KUHNIGK et al. 1996, OHKUMA & KUDO 1996, FRÖHLICH et al. 1999). Wenig bekannt ist aber, inwieweit Sulfatreduzierer auch bei anderen Insektengruppen verbreitet sind und welche Rolle die Sulfatreduktion im Intestinaltrakt dieser Organismen spielt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit sulfatreduzierenden Bakterien im Intestinaltrakt des Rosenkäfers *Pachnoda marginata* und der Termiten *Mastotermes darwiniensis*. Der im Darm von *Pachnoda marginata* bestimmte Titer sulfatreduzierender Bakterien (2×10^8 Zellen/ml) deutet auf eine wichtige Rolle der Organismen in diesem Ökosystem hin. Entsprechende Vergleichszahlen für Insekten liegen allerdings nur eingeschränkt vor. KUHNIGK et al. (1996) bestimmte den Titer von Sulfatreduzierern im Darm von verschiedenen Termiten und ermittelte hierbei Zelltitern von $10^6 - 10^8$ Zellen/ml. Damit liegen die Zahlen in einer ähnlichen Größenordnung, wie man sie auch in marinen Sedimenten findet (WIERINGA et al. 2000), also einem Ökosystem, in dem die Sulfatreduktion als wesentlicher anaerober Stoffwechselprozess angesehen wird.

Aus Termiten wurden bislang verschiedene Stämme sulfatreduzierender Bakterien isoliert, die alle der Gattung *Desulfovibrio* zugeordnet werden konnten (*D. desulfuricans*, *D. giganteus*, *D. intestinalis* und *D. termitidis*; BRAUMANN et al. 1990, TRINKERL et al. 1990, FRÖHLICH et al. 1999). Interessanterweise gehören auch die Isolate bzw. Klone, die im Darm höherer Tiere und Menschen identifiziert werden konnten, zu dieser Gattung. Gleiches gilt für das molekulare Isolat PM6 aus dem Darm von *Pachnoda marginata*. Vertreter der Gattung *Desulfovibrio* gehören zur Gruppe der unvollständigen Oxidierer, die organische Verbindungen (insbesondere Lactat) zu Acetat und CO_2 abbauen. Die Bildung von Acetat durch Mikroorganismen ist im Termitendarm ein wesentlicher Teil der Darmsymbiose, da das Acetat von der Termiten aufgenommen und in den Stoffwechsel eingeschleust wird. Weiterhin deuten Untersuchungen darauf hin, dass Lactat ein wichtiges Zwischenprodukt innerhalb des Kohlenstoffflusses im Termitendarm darstellt (THOLEN & BRUNE 2000). Eine weitere Eigenschaft der Gattung *Desulfovibrio* ist eine zum Teil ausgeprägte Toleranz gegenüber Sauerstoff sowie die Fähigkeit, Sauerstoff mit Wasserstoff zu reduzieren (CYPIONKA 2000). Dies könnte insofern von Bedeutung sein, da das Intestinalsystem von Insekten ein anaerobes Gradientensystem darstellt, welches über das Epithel ständig mit Sauerstoff versorgt wird. Bei Termiten konnten Sulfatreduzierer insbesondere an der Innenseite der Darmwand, und damit im Bereich der oxisch/anoxischen Grenzschicht, nachgewiesen werden (BERCHTOLD et al. 1999). Jüngere Untersuchungen von EGERT et al. (2005) deuten darauf, dass die Verhältnisse bei dem Käfer *Melolontha melolontha* ähnlich liegen. Dies steht in Übereinstimmung mit Beobachtungen in verschiedenen Sedimenten, wo Sulfatreduzierer ebenfalls vermehrt an Grenzschichten bzw. in mikroaerophilen Bereichen vorkommen (u. a. SASS et al. 1997, SAHM et al. 1999, WIERINGA et al. 2000). Die Aktivität der Sulfatreduzierer im

Intestinaltrakt von Insekten dürfte somit einen wesentlichen Beitrag dazu leisten, dass ein aerobes Milieu sowie reduzierte Bedingungen im Darm aufrechterhalten bleiben.

Bei der phylogenetischen Analyse zeigte sich, dass die verschiedenen Vertreter der Gattung *Desulfovibrio*, die bislang als Darmsymbionten bei Insekten identifiziert werden konnten, sich unterschiedlichen monophyletischen Untergruppen zuordnen ließen. Weiterhin waren zum Teil erhebliche phylogenetische Distanzen zwischen den verschiedenen Vertretern feststellbar. Dies spricht dafür, dass die Besiedlung dieser Ökosysteme durch Sulfatreduzierer vermutlich mehrfach und unabhängig voneinander stattgefunden hat. Unterstützt wird diese These einerseits dadurch, dass die zwei phylogenetisch recht weit voneinander entfernten Arten *Desulfovibrio desulfuricans* und *Desulfovibrio giganteus* (> 10 % Sequenzunterschied) in derselben Termitenart gefunden wurden (*Cubitermes speciosus*; BRAUMAN et al. 1990), und andererseits, durch die Identifizierung von *Desulfovibrio termitidis* sowohl in der Termitenart *Heterotermes indicola* als auch in der Schabe *Cryptotermes punctulatus* (FRÖHLICH et al. 1999). Ähnlich liegen auch die Verhältnisse bei dem Klon PM6 aus *Pachnoda marginata*, der die höchste phylogenetische Übereinstimmung mit einem molekularen Isolat (Klon Rs-K75) aus der Termitenart *Reticulitermes speratus* aufwies.

Sulfatreduktionsraten wurden bisher hauptsächlich in verschiedenen marinen und limnischen Sedimenten untersucht (FUKUI & TAKAI 1990, BAK & PFENNIG 1991, JØRGENSEN & BAK 1991, KÜHL & JØRGENSEN 1992). Die bisher höchste Rate (20 $\mu\text{mol/ml} \times \text{d}$) wurde von KÜHL & JØRGENSEN (1992) in Biofilmen gefunden. Unter Berücksichtigung der gefundenen Zellzahlen sulfatreduzierender Bakterien ergab sich eine spezifische Sulfatreduktionsrate von 4,2 $\text{nmol}/10^7$ Bakterien $\times \text{h}$. Ähnlich hohe spezifische Raten fand SASS et al. (1997) im Sediment des oligotrophen Stechlinsees (5,8 $\text{nmol}/10^7$ Bakterien $\times \text{h}$). Die im Darm von *Pachnoda marginata* und *Mastotermes darwiniensis* gefundenen spezifischen Raten lagen in einer vergleichbaren Größenordnung von 5,2 bzw. 4,9 $\text{nmol}/10^7$ Bakterien $\times \text{h}$. Der Unterschied in den absoluten Raten von 104,3 zu 4,9 $\text{nmol/ml} \times \text{h}$ resultierte somit im Wesentlichen aus den verschiedenen hohen Zellzahlen sulfatreduzierender Bakterien im Darm von *Pachnoda marginata* und *Mastotermes darwiniensis*. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Populationsdichten sulfatreduzierender Bakterien könnten hierbei die ermittelten Sulfatkonzentrationen sein, welche im Darm von *Pachnoda marginata* wesentlich höher waren (1,1 mM) als bei *Mastotermes darwiniensis* (0,14 mM). In anaeroben Ökosystemen stehen Sulfatreduzierer

in direkter Konkurrenz um den verfügbaren Wasserstoff mit methanogenen und auch acetogenen Bakterien. Hierbei setzen sich die Sulfatreduzierer in der Regel durch, wenn ausreichend Sulfat als Elektronenakzeptor zur Verfügung steht, während in sulfatarmen Ökosystemen (z.B. Süßwassersedimente) die Methanogenese überwiegt (CAPPENBERG 1974a und 1974b, OREMLAND & TAYLOR 1978). Die Sulfatkonzentrationen bei *Pachnoda marginata*, aber auch bei verschiedenen Termiten (0,3 – 0,7 mM; KUHNIGK et al. 1996), liegen oberhalb der Konzentrationen, die üblicherweise in Süßwassersedimenten gefunden werden.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassung

Termiten spielen eine wichtige Rolle bei der Mineralisation von organischem Material. Beim Abbau von Biopolymeren kommt der Darmflora der Termiten eine essentielle Bedeutung zu. Erst die vielfältigen Aktivitäten der symbiontischen Darmbewohner versetzen die Termiten in die Lage, ihre komplexen und zum großen Teil schwer abbaubaren Nahrungsbestandteile effektiv zu verwerten. Betrachtet man die Zusammensetzung der Darmflora der Termiten, fallen insbesondere die in großer Anzahl vorkommenden Spirochaeten auf. Zwar belegen verschiedene molekularbiologische Untersuchungen eine enorme Artenvielfalt der Spirochaeten, diese wurde aber bislang nur durch sehr wenige Isolate repräsentiert. Der zentrale Aspekt der durchgeführten Untersuchungen war daher die Isolierung und Charakterisierung neuer Spirochaetenarten aus dem Darm von Termiten, um die Rolle dieser Organismen innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft näher zu erforschen.

In der vorliegenden Arbeit gelang es, 6 Spirochaetenstämme aus drei niederen Termitenarten zu isolieren und zu identifizieren. Die Stämme SPN1 aus *Neotermes castaneus*, SPIT5 aus *Incisitermes tabogae* und SPIM25 aus *Incisitermes marginipennis* stellten hierbei neue Arten der Gattungen *Spirochaeta* und *Treponema* dar. Der Stamm SPN1 ist der erste charakterisierte Vertreter der Gattung *Spirochaeta*, der aus Termitendärmen isoliert werden konnte und zugleich der erste wirtsassoziierte Organismus innerhalb dieser Gattung. Aufgrund seiner coccoiden Zellform, stellt dieser Stamm zudem auch morphologisch eine Besonderheit innerhalb der Ordnung Spirochaetales dar. Die physiologischen Untersuchungen charakterisierten den Stamm SPN1 als einen strikt anaeroben heterotrophen Organismus, der verschiedene Mono-, Di- und Oligosaccharide zu Ethanol, Formiat und Acetat fermentiert. Die Stämme SPIT5 und SPIM25 konnten phylogenetisch der Gattung *Treponema* zugeordnet werden. Hierbei ließen sie sich verschiedenen Untergruppen des so genannten „Termiten-Clusters“ der Treponemen zuordnen. Dieser Cluster wird ausschließlich durch Organismen bzw. Klone repräsentiert, die im Darm von Termiten gefunden wurden. Ähnlich wie Stamm SPN1 konnten auch die Stämme SPIT5 und SPIM25 als strikt anaerobe heterotrophe Bakterien eingestuft werden. Als wesentliche Endprodukte aus der Fermentation von Kohlenhydraten ließen sich

Ethanol und Acetat identifizieren. Da Holz, die Hauptnahrung der niederen Termiten, eine äußerst stickstoffarme Nahrungsquelle darstellt, wurden die Isolate auf das Vorhandensein des *nifH*-Gens überprüft. Dieses kodiert für eine Untereinheit des Nitrogenase-Systems stickstofffixierender Bakterien. Bei Stamm SPIT5 konnte das Gen *nifH* nachgewiesen werden. Weiterhin konnten bei den untersuchten Stämmen eine Reihe von enzymatischen Aktivitäten nachgewiesen werden, die für den Abbau von Lignocellulose im Termitendarm von Bedeutung sind. Die von den gewonnenen Isolaten verwerteten Substrate sowie die verschiedenen Enzymaktivitäten unterstreichen somit den symbiontischen Charakter der Spirochaeten im Termitendarm.

In vielen anoxischen Ökosystemen ist die dissimilatorische Sulfatreduktion ein wesentlicher terminaler Oxidationsprozess. Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass Sulfatreduzierer auch im Intestinaltrakt von Termiten eine wichtige Rolle spielen. Wenig bekannt ist aber, ob und in wieweit die dissimilatorische Sulfatreduktion auch bei anderen Insektengruppen von Bedeutung ist. Deswegen wurden in dieser Arbeit vergleichende Untersuchungen zur Sulfatreduktion im Intestinaltrakt der Termiten *Mastotermes darwiniensis* und des Rosenkäfers *Pachnoda marginata* durchgeführt.

Im Darm von *Pachnoda marginata* konnten mittels MPN-Zählungen 2×10^8 Sulfatreduzierer/ml Darminhalt nachgewiesen werden. Damit lag der Titer sulfatreduzierender Bakterien etwa 20-fach höher als bei der Termiten *Mastotermes darwiniensis* (ca. 1×10^7 Zellen/ml). Aus der höchsten Verdünnungsstufe der MPN-Reihen konnte ein sulfatreduzierendes Bakterium angereichert und identifiziert werden. Der Klon PM6 ließ sich anhand der 16S rRNA Gensequenz der Gattung *Desulfovibrio* zuordnen. Die höchste phylogenetische Übereinstimmung mit bisher identifizierten Vertretern der Gattung lag bei ca. 7 % (Klon Rs-K75 aus der Termiten *Reticulitermes speratus*). Die im Darm von *Pachnoda marginata* bestimmte Sulfatreduktionsrate lag bei $104,3 \text{ nmol} \times \text{h}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$ und damit deutlich höher als bei *Mastotermes darwiniensis* ($4,9 \text{ nmol} \times \text{h}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$). Unter Berücksichtigung des unterschiedlichen Titers ergaben sich für die beiden Organismen spezifische Sulfatreduktionsraten in vergleichbarer Größenordnung ($5,2 \text{ nmol}/10^7 \text{ Zellen} \times \text{h}$ bei *Pachnoda marginata* und $4,9 \text{ nmol}/10^7 \text{ Zellen} \times \text{h}$ bei *Mastotermes darwiniensis*). Die hohen Sulfatreduktionsraten sowie die ermittelten Zellzahlen sind ein Indiz dafür, dass Sulfatreduzierer eine wichtige Funktion bei der Endoxidation von organischem Material im Intestinaltrakt verschiedener Insekten spielen.

Ausblick

In den zurückliegenden Jahren haben sich eine Vielzahl von Studien mit der mikrobiellen Darmflora der Termiten und ihrer Rolle beim Lignocelluloseabbau beschäftigt. Die Erstellung von umfangreichen Datenbanken auf Basis des 16S rRNA-Gens gewährte wichtige Einblicke in die phylogenetische Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft des Termitendarms. Techniken wie die Fluoreszenz in situ Hybridisierung ermöglichten es zudem bestimmte bakterielle Gruppen im Darm zu lokalisieren und zu quantifizieren. Dennoch können solche kultivierungsunabhängigen Ansätze immer nur einen Teil der komplexen Zusammenhänge innerhalb mikrobieller Gemeinschaften aufklären, da über die Physiologie und damit auch über die Bedeutung vieler molekularbiologisch identifizierter Organismen nur spekuliert werden kann. Untersuchungen die auf die Isolierung und Kultivierung von Organismen aus dem Termitendarm abzielten brachten daher wesentliche Erkenntnisse über die Rolle einzelner Organismen bzw. Organismengruppen in diesem Ökosystem. Allerdings bestehen weiterhin große Schwierigkeiten bei der Isolation von relevanten Mikroorganismen aus komplexen Ökosystemen. Nach wie vor lassen sich die meisten Mikroorganismen mit den derzeitigen Methoden nicht im Labor kultivieren. Dies gilt, neben vielen anderen bakteriellen Gruppen, auch für zahlreiche Spirochaeten aus Termitendärmen. So blieben die Kultivierungsansätze der vorliegenden Untersuchungen bei einer Reihe von Termitenarten erfolglos. Um das Spektrum charakterisierter Isolate zu erweitern, sollte daher ein wichtiger Aspekt zukünftiger Untersuchungen in der weiteren Verbesserung der Kultivierungsmethoden liegen. Dies gilt auch im Hinblick auf das sehr langsame Wachstum aller bislang aus Termitendärmen gewonnenen Isolate. Neben der besseren Anpassung von Kultivierungsmedien an die in vivo Bedingungen im Ökosystem sollten auch alternative Isolationstechniken, wie z. B. die Mikromanipulation, verfeinert und im Hinblick auf strikt anaerobes Arbeiten weiterentwickelt werden. Weitere Untersuchungen sollten auch zur Rolle der Spirochaeten bei der Stickstofffixierung im Termitendarm angestellt werden. Hierbei gilt es insbesondere zu klären inwieweit die gefundenen genetischen Voraussetzungen auch mit einer tatsächlichen Aktivität im Termitendarm korrespondieren.

6. Literaturverzeichnis

- Amann, R. I., Ludwig, W., and Schleifer, K.-H. (1995): Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169.
- Bak, F., & Pfennig, N. (1991): Microbial sulfate reduction in a littoral sediment of Lake Constance. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85: 31-42.
- Bakalidou, A., Kämpfer, P., Berchtold, M., Kuhnigk, T., Wenzel, M., and König, H. (2002): *Cellulosimicrobium variabile* sp. nov., a cellulolytic bacterium from the hindgut of the termite *Mastotermes darwiniensis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1185-1192.
- Benemann, J. R. (1973): Nitrogen fixation in termites. *Science* 181: 164-165.
- Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., and Wheeler, D. L. (2004): Genbank: update. *Nucleic Acids Res.* 32 (Online): D23-6.
- Berchtold, M. (1995): Phylogenetische Charakterisierung symbiontischer Mikroorganismen im Darm von Termiten. Thesis. Universität Ulm.
- Berchtold, M., & König, H. (1995): Phylogenetic position of two uncultivated trichomonads *Pentatrichomonoides scroa* Kirby and *Metadevescovina extranea* Kirby from the hindgut of the termite *Mastotermes darwiniensis* Froggatt. *System. Appl. Microbiol.* 18: 567-573.
- Berchtold, M., & König, H. (1996): Phylogenetic analysis and *in situ* identification of uncultivated spirochetes from the hindgut of the termite *Mastotermes darwiniensis*. *System. Appl. Microbiol.* 19: 66-73.
- Berchtold, M., Ludwig, W., and König, H. (1994): 16s rDNA sequence and phylogenetic position of an uncultivated spirochete from the hindgut of the termite *Mastotermes darwiniensis* Froggatt. *FEMS Microbiol. Lett.* 123: 269-273.
- Berchtold, M., Chatzinotas, A., Schönhuber, W., Brune, A., Amann, A., Hahn, D., and König, H. (1999): Differential enumeration and *in situ* localization of microorganisms in the hindgut of the lower termite *Mastotermes darwiniensis*. *Arch. Microbiol.* 172: 407-416.
- Bignell, D. E., & Anderson, J. M. (1980): Determination of pH and oxygen status in the guts of lower and higher termites. *J. Insect. Physiol.* 26: 183-188.

- Braumann, A., König, H., and Dutreix, J. L. (1990): Characterization of two sulfate-reducing bacteria from the gut of the soil-feeding termite, *Cubitermes speciosus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 58: 271-275.
- Braumann, A., Kane, M. D., Labat, M., and Breznak, J. A. (1992): Genesis of acetate and methane by gut bacteria of nutritionally diverse termites. *Science* 257: 1384-1386.
- Braumann, A., Dore, J., Eggleton, P., Bignell, D., Breznak, J. A., and Kane, M. D. (2001): Molecular phylogenetic profiling of prokaryote communities in guts of termites with different feeding habits. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35: 27-36.
- Breznak, J. A. (1973): Biology of nonpathogenic, host-associated spirochetes. *Crit. Rev. Microbiol.* 2: 457-489.
- Breznak, J. A. (1984): Biochemical aspects of symbiosis between termites and their intestinal microbiota. In J. M. Anderson, A. D. M. Rayner and D. W. H. Walton (Ed.), *Invertebrate – Microbial Interactions*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 173-203.
- Breznak, J. A., & Brune, A. (1994): Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 453-487.
- Brune, A. (1998): Termite guts: the world's smallest bioreactors. *TIBTECH.* 16: 16-21.
- Brune, A., Emerson, D., Köhl, M., and Breznak, J.A. (1995a): The termite gut microflora as an oxygen sink: microelectrode determination of oxygen and pH gradients in guts of lower and higher termites. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2681-2687.
- Brune, A., Miambi, E., and Breznak, J.A. (1995b): Role of oxygen and the intestinal microflora in the metabolisms of lignin-derived phenylpropanoids and other monoaromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2688-2695.
- Bryant, M. P. (1984): Genus *Ruminococcus* Sijpesteijn 1948 152^{AL}. In R. Krieg & J. G. Holt (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume I*. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1093-1097.
- Canale-Parola, E. (1977): Physiology and evolution of spirochetes. *Bacteriological Reviews* 41: 181-204.
- Canale-Parola, E. (1978): Motility and chemotaxis of spirochetes. *Annu. Rev. Microbiol.* 32: 69-99.
- Canale-Parola, E. (1981): Free-living anaerobic and facultatively anaerobic spirochetes: the genus *Spirochaeta*. In Starr, M. P., Stolp, H., Trüper, H. G., Balows, A., Schlegel, H. G. (Ed.). *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 538-547.

- Canale-Parola, E. (1984): Order I. Spirochaetales Buchanan 1917, 163^{AL}. In R. Krieg & J. G. Holt (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume I. Williams & Wilkins, Baltimore, p. 38.
- Cappenberg, T. E. (1974a): Interrelations between sulfate-reducing and methane-producing bacteria in bottom deposits of a fresh water lake. I. Field observation. *Antonie van Leeuwenhoek* 40: 285-295.
- Cappenberg, T. E. (1974b): Interrelations between sulfate-reducing and methane-producing bacteria in bottom deposits of a fresh water lake. II. Inhibition experiments. *Antonie van Leeuwenhoek* 40: 297-306.
- Cleveland, L. R., & Grimstone, A. V. (1964): The fine structure of the flagellate *M. paradoxa* and its associated microorganisms. *Proc. Royal. Soc. Lond. Ser. B.* 159: 668-686.
- Cole, J. R., Chai, B., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam, S. A., McGarrell, D. M., Garrity, G. M., and Tiedje, J. M. (2005): The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucl. Acids Res.* 33 (Online): D294-D296.
- Cord-Ruwisch, R., Seitz, H.-J., and Conrad, R. (1988): The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor. *Arch. Microbiol.* 149: 350-357.
- Cwyk, W. M., & Canale-Parola, E. (1979): *Treponema succifaciens* sp. nov., spirochete from the swine intestine. *Arch. Microbiol.* 122: 231-239.
- Cypionka, H. (2000): Oxygen respiration by *Desulfovibrio* species. *Ann. Rev. Microb.* 54: 827-848.
- Don, R. H., Cox, P. T., Wainwright, B. J., Baker, K., and Mattick, J. S. (1991): 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucl. Acids Res.* 19: 4008.
- Dröge, S., Limper, U., Emtiazi, F., Schönig, I., Pavlus, N., Drzyzga, O., Fischer, U., and König, H. (2005a): In vitro and in vivo sulfate reduction in the gut contents of the termite *Mastotermes darwiniensis* and the rose-chafer *Pachnoda marginata*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 51: 57-64.
- Dröge, S., Fröhlich, J., Radek, R., and König, H. (2005b): *Spirochaeta coccoides* sp. nov., a novel coccoid spirochete from the hindgut of the termite *Neotermes castaneus*. *Appl. Environ. Microbiol.* Im Druck.

- Ebert, A., & Brune, A. (1997): Hydrogen concentration profiles at the oxic-anoxic interface: a microsensor study of the hindgut of the wood-feeding lower termite *Reticulitermes flavipes* (Kollar). *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4039-4046.
- Egert, M., Stingl, U., Bruun, L. D., Pommerenke, B., Brune, A., and Friedrich, M. W. (2005): Structure and topology of microbial communities in the major gut compartments of *Melolontha melolontha* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4556-4566.
- Emerson, A. E. (1965): A review of the Mastotermitidae (Isoptera) including a new fossil genus from Brazil. *Amer. Mus. Novitates* 2236. 1-46.
- Esnault, G., Caumette, P., and Garcia, J. L. (1988): Characterization of *Desulfovibrio giganteus* sp.nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from brackish coastal lagoon. *System. Appl. Microbiol.* 10: 147-151.
- Felsenstein, J. (1981): Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum-likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17: 368-376.
- Felsenstein, J. (1985): Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 368-376.
- Felsenstein, J. (1993): Phylip (Phylogeny Inference Package) version 3.5. Department of genetics, University of Washington, Seattle, USA.
- Fitch, W.M., & Margoliash, E. (1967): Construction of phylogenetic trees. *Science* 155: 279-284.
- Fritsche, W. (1999): Mikrobiologie, 2. Auflage. Spektrum Verlag, Heidelberg/Berlin.
- Fröhlich, J., & König, H. (1999): Rapid isolation of single microbial cells from mixed natural and laboratory populations with the aid of a micromanipulator. *System. Appl. Microbiol.* 22: 249-257.
- Fröhlich, J., Sass, H., Babenzien, H.-D., Kuhnigk, T., Varma, A., Saxena, S., Nalepa, C., Pfeiffer, P., and König, H. (1999): Isolation of *Desulfovibrio intestinalis* sp. nov., from the hindgut of the lower termite *Mastotermes darwiniensis*. *Can. J. Microbiol.* 45: 145-152.
- Fukui, M., & Takii, S. (1990): Seasonal variations of population density and activity of sulfate-reducing bacteria in offshore and reed sediments of a hypertrophic freshwater lake. *Jap. J. Limnol.* 51: 63-71.
- Gibson, G. R., Cummings, J. H., and MacFarlane, G. T. (1988): Competition for hydrogen between sulfate-reducing bacteria and methanogenic bacteria from the human large intestine. *J. Appl. Bacteriol.* 65: 241-247.

- Graber, J. R., & Breznak, J. A. (2004): Physiology and nutrition of *Treponema primitia*, an H₂/CO₂-acetogenic spirochete from termite Hindguts. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1307-1314.
- Graber, J. R., Leadbetter, J. R., and Breznak, J. A. (2004): Description of *Treponema azotonutricium* sp. nov. and *Treponema primitia* sp. nov., the first spirochetes isolated from termite guts. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1315-1320.
- Hackstein, J. H. P., Langer, P., and Rosenberg, J. (1996): Genetic and evolutionary constraints for symbiosis between animals and methanogenic bacteria. *Environ. Monitoring and Assessment.* 42: 39-56.
- Hethener, P., Braumann, A., and Garcia, J. L. (1992): *Clostridium termitidis* sp. nov., a cellulolytic bacterium from the gut of the wood-feeding termite *Nasutitermes lujae*. *System. Appl. Microbiol.* 22: 249-257.
- Hillis, D. M., & Bull, J. J. (1993): An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 42:182-192.
- Holt, S. C. (1978): Anatomy and chemistry of spirochetes. *Microbiol. Rev.* 42: 114-160.
- Hongoh, Y., Ohkuma, M., and Kudo, T. (2003): Molecular analysis of bacterial microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera; Rhinotermitidae). *FEMS Microbiol. Ecol.* 44: 231-242.
- Honigberg, B. M. (1970): Protozoa associated with termites and their role in digestion. *In* K. Krishna and F. M. Weesner (Ed.) *Biology of Termites. Vol. II.* Academic Press. New York, pp. 1-36.
- Howard, B. H., & Hungate, R. E. (1976): *Desulfovibrio* of the sheep rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 598-602.
- Iida, T., Ohkuma, M., Ohtoko, K., and Kudo, T. (2000): Symbiotic spirochetes in the termite hindgut: phylogenetic identification of ectosymbiotic spirochetes of oxymonad protists. *FEMS Microbiol. Ecol.* 34: 17-26.
- Jørgensen, B. B. (1977): The sulfur cycle of a coastal marine sediment (Limfjorden, Denmark). *Limnology & Oceanography* 22: 814-831.
- Jørgensen, B. B. (1982): Mineralization of organic matter in the sea bed: the role of sulphate reduction. *Nature* 296: 643-645.
- Jørgensen, B. B., & Bak, F. (1991): Pathways and microbiology of thiosulfate transformations and sulfate reduction in a marine sediment (Kattegat, Denmark). *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 847-856.

- Jukes, T. H., & Cantor, C. R. (1969): Evolution of protein molecules. In H. N. Munro (Ed.) Mammalian Protein Metabolism. Academic Press, New York, pp. 21-132.
- Kimura, M. (1980): A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16: 111-20.
- König, H., & Breunig, A. (1997): Ökosystem Termitendarm. Spektrum der Wissenschaft 4: 68-76.
- König, H., Fröhlich, J., Berchtold, M., and Wenzel, M. (2002): Diversity and microhabitats of the hindgut flora of termites. Recent Res. Devel. Microbiol. 6: 125-156.
- Krasil'nikov, N.A. & Satdykov, S.I. (1969): Estimation of the total bacteria in the intestines of termites. Microbiology 38: 289-292.
- Krishna, K. (1970): Taxonomy, physiology and distribution of termites. In: K. Krishna and F. M. Weeser (Ed.). Vol. II. Academic Press, New York, pp. 127-152.
- Kühl, M., & Jørgensen, B. B. (1992): Microsensor measurements of sulfate reduction and sulfide oxidation in compact microbial communities of aerobic biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1164-1174.
- Kuhnigk, T., & König, H. (1997): Degradation of dimeric lignin model compounds by aerobic bacteria isolated from the hindgut of xylophagous termites. J. Basic Microbiol. 37: 205-211.
- Kuhnigk, T., Borst, E. M., Ritter, A., Kämpfer, P., Graf, A., Hertel, H., and König, H. (1994): Degradation of lignin monomers by the hindgut flora of termites. System. Appl. Microbiol. 17: 76-85.
- Kuhnigk, T., Branke, J., Krekeler, D., Cypionka, H., and König, H. (1996): A feasible role of sulfate-reducing bacteria in the termite gut. System. Appl. Microbiol. 19: 139-149.
- Leadbetter, J. R., & Breznak, J. A. (1996): Physiological ecology of *Methanobrevibacter cuticularis* sp. nov. and *Methanobrevibacter curvatus* sp. nov., isolated from the hindgut of the termite *Reticulitermes flavipes*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 3620-3631.
- Leadbetter, J. R., Schmidt, T. M., Graber, J. R., and Breznak, J. A. (1999): Acetogenesis from H₂ plus CO₂ by spirochetes from termite guts. Science. 283: 686-689.
- Leidy, J. (1881): The parasites of the termites. J. Acad. Nat. Sci. 8: 425-448.
- Leschine, S. B., & Canale-Parola, E. (1986): Rifampin-resistant RNA polymerase in spirochetes. FEMS Microbiol. Lett. 35: 199-204.

- Li, L., Fröhlich, J., Pfeiffer, P., and König, H. (2003): Termite gut symbiotic Archaezoa are becoming living metabolic fossils. *Eucaryotic Cell* 2:1091-1098.
- Lilburn, T. G., Schmidt, T. M., and Breznak, J. A. (1999): Phylogenetic diversity of termite gut spirochaetes. *Environ. Microbiol.* 1: 331-345.
- Lilburn, T. G., Kim, K. S., Ostrom, N. E., Byzek, K. R., Leadbetter, J. R., and Breznak, J. A. (2001): Nitrogen fixation by symbiotic and free-living spirochetes. *Science* 292: 2495-2498.
- Lo, N., Tokuda, G., Wantanabe, H., Rose, H., Slaytor, M., Maekawa, K., Bandi, C., and Noda, H. (2000): Evidence from multiple gene sequences indicates that termites evolved from wood-feeding cockroaches. *Curr. Biol.* 10: 801-804.
- Margulis, L. & Hinkle, G. (1992): Large symbiotic spirochetes: *Clevelandia*, *Cristispira*, *Diplocalyx*, *Hollandina*, and *Pillotina*. In Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K-H. (Ed.), *The Prokaryotes*, 2nd ed. Springer-Verlag, New York, pp. 3965-3978.
- Medlin, L., Elwood, H. J., Stickel, S., and Sogin, M. L.(1988): The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene* 71: 491-499.
- Mesbah, M., Premachandran, U., and Withman, W. B. (1989): Precise measurement of the G + C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 159-167.
- Myles, T. G. (1999): Phylogeny and taxonomy of the Isoptera. XIII Intl. Congress Intl. Union for the Study of Social Insects. Adelaide, Australia.
- Näveke, R., & Tepper, K.-P. (1979): Einführung in die mikrobiologischen Arbeitsmethoden, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B., and Deerfield, D.W. (1997): GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *EMBNEW.NEWS* 4: 14.
- Noda, S., Ohkuma, M., Usami, R., Horikoshi, K., and Kudo, T. (1999): Culture-independent characterisation of a gene responsible for nitrogen fixation in the symbiotic microbial community in the gut of the termite *Neotermes koshunensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4935-4942.
- Noda, S., Ohkuma, M., Yamada, A., Hongoh, Y., and Kudo, T. (2003): Phylogenetic position and in situ identification of ectosymbiotic spirochetes on protists in the termite gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 625-633.

- Noirot, C. (1995): The gut of termites (Isoptera). Comparative anatomy, systematics, phylogeny. I. Lower termites. Ann. Soc. Entomol. Fr. 31: 197-226.
- Noirot, C., & Noirot-Timotheé, C. (1969): The digestive system. In Krishna, K. and Weeser, F.M.(Ed.), Biology of Termites, Vol. I. Academic Press, New York, pp. 49-88.
- Ochman, H., & Wilson, A. C. (1987): Evolution in bacteria: Evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. J. Mol. Evol. 26: 74-86.
- Odelson, D. A., & Breznak, J. A. (1983): Volatile fatty acid production by the hindgut microbiota of xylophagous termites. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1602-1613.
- Odelson, D. A. & Breznak, J. A. (1985): Nutrition and growth characteristics of *Trichomitopsis termopsidis*, a cellulolytic protozoan from termites. Appl. Environ. Microbiol. 49: 614-621.
- Ohkuma, M., & Kudo, T. (1996): Phylogenetic diversity of the intestinal bacterial community in the termite *Reticulitermes speratus*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 461-468.
- Ohkuma, M., & Kudo, T. (1998): Phylogenetic analysis of the symbiotic intestinal microflora of the termite *Cryptotermes domesticus*. FEMS Microbiol. Lett. 164: 389-395.
- Ohkuma, M., Iida, T., and Kudo, T. (1999a): Phylogenetic relationships of symbiotic spirochetes in the gut of diverse termites. FEMS Microbiol Lett. 181: 123-129.
- Ohkuma, M., Noda, S., and Kudo, T. (1999b): Phylogenetic diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic microbial community. Appl. Environ Microbiol. 65: 4926-4934.
- Ohkuma, M., Noda, S., Usami, R., Horikoshi, K., and Kudo, T. (1996): Diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic intestinal microflora of the termite *Reticulitermes speratus*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2747-2752.
- Olsen, I., Paster, B. J., and Dewhirst, F. E. (2000): Taxonomy of spirochetes. Anaerobe 6: 39-57.
- Oremland, R. S., & Taylor, B. F. (1978): Sulfate reduction and methanogenesis in marine sediments. Geochim. Cosmochim. Acta 42: 209-214.
- Paster, B. J., & Canale-Parola, E. (1982): Physiological diversity of rumen spirochetes. Appl. Environ. Microbiol. 43: 686-693.

- Paster, B. J., & Canale-Parola, E. (1985): *Treponema saccharophilum* sp. nov., a large peptonolytic spirochete from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 212-219.
- Paster, B. J., Dewhirst, F. E., Weisburg, W. G., Fraser, G. J., Tordoff, L. A., Hespell, R. B., Stanton, T. B., Zablen, L., and Woese, C. R. (1991): Phylogenetic analysis of the spirochetes. *J. Bacteriol.* 173: 6101-6109.
- Paster, B. J., Dewhirst, F. E., Cooke, S. M., Fussing, V., Poulsen, L. K., and Breznak, J. A. (1996): Phylogeny of not-yet-cultured spirochetes from termite guts. *Appl. Environ. Microbiol.* 2: 347-352.
- Pfeiffer, P., & Radler, R. (1985): Hochleistungsflüssigchromatographische Bestimmung von organischen Säuren, Zuckern, Glycerin und Alkohol im Wein an einer Kationenaustauschersäule. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 181: 24-27.
- Postgate, J. R. (1984): Genus *Desulfovibrio*. In N. R. Krieg and J. G. Holt (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume I. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 666-672.
- Postgate, J. R. (1987): *The sulphate-reducing bacteria*. 2nd ed., Cambridge University Press, Cambridge.
- Potrikus, C. J., & Breznak, J. A. (1977): Nitrogen-fixing *Enterobacter agglomerans* isolated from guts of wood-eating termites. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 392-399.
- Prillinger, H., Messner, R., König, H., Bauer, R., Lopandic, K., Molnar, O., Dangel, P., Weigang, F., Kirisitis, T., Nakase, T., and Sigler, L. (1996): Yeast associated with termites: a phenotypic and genotypic characterization and use of coevolution for dating evolutionary radiations in asco- and basidiomycetes. *System. Appl. Microbiol.* 19: 265-283.
- Radek, R., & Hausmann, K. (1993): Symbiontische Flagellaten im Termitendarm. In K. Hausmann und B. P. Kremer (Ed.), *Extremophile. Mikroorganismen in ausgefallenen Lebensräumen*. VCH, Weinheim, p. 325-339.
- Rajagopal, S., Rao, D. R., and Varma, A. K. (1979): Association of fungi in the termite gut. *Curr. Sci.* 48: 998-999.
- Ritalahti, K., & Löffler, F. E. (2003): Non-spiral spirochetes (NSS), sticky denizens in anoxic environments. Abstracts, General Meeting of the American Society for Microbiology.

- Ritalahti, K., & Löffler, F. E. (2004): Non-spiral spirochetes (NSS), sticky denizens in anoxic environments. Abstracts of the 10th International Symposium on Microbiology, Cancun, Mexico.
- Rosser, H. R., & Hamilton, W. A. (1983): Simple assay for accurate determination of [³⁵S]sulfate reduction activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1956-1959.
- Sahm, K., MacGregor, B. J., Jørgensen, B. B., and Stahl, D. A. (1999): Sulphate reduction and vertical distribution of sulphate-reducing bacteria quantified by rRNA slot-blot hybridization in a coastal marine sediment. *Environ. Microbiol.* 1: 65-74.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987): The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sanger, F., Niclen, S., and Coulen, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 74: 5463-5467.
- Sass, H., Cypionka, H., and Babenzien, H.-D. (1997): Vertical distribution of sulfate-reducing bacteria at the oxic-anoxic interface in sediments of the oligotrophic Lake Stechlin. *FEMS Microbiol. Ecol.* 22: 245-255.
- Sass, H., Berchtold, M., Branke, J., König, H., Cypionka, H., and Babenzien, H.-D. (1998): Psychrotolerant sulfatereducing bacteria from an oxic freshwater sediment, description of *Desulfovibrio cuneatus* sp. nov. and *Desulfovibrio litoralis* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 21: 212-219.
- Saxena, S., Bahadur, J., and Varma, A. (1993): Cellulose and hemicellulose degrading bacteria from the termite gut and mound soils of India. *Ind. J. Microbiol.* 33: 55-60.
- Schäfer, A., Konrad, R., Kuhnigk, T., Kämpfer, P., Hertel, H., and König, H. (1996): Hemicellulose-degrading bacteria and yeasts from the termite gut. *J. Appl. Bacteriol.* 80: 471-478.
- Schlegel, H. G. (1992): *Allgemeine Mikrobiologie*, 7.Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York.
- Slaytor, M. (1992): Cellulose digestion in termites and cockroaches: what role do symbionts play? *Comp. Biochem. Physiol.* 103B: 775-784.
- Smibert, R. M. (1984): Genus III *Treponema* Schaudinn 1905, 1728^{AL}. In N. R. Krieg & J. G. Holt (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume I. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 49-57.
- Stackebrandt, E., & Goebel, B. M. (1994): Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rDNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 846-849.

- Stackebrandt, E., Schumann, P., Cui, X.-L. (2004): Reclassification of *Cellulosimicrobium variabile* Bakalidou et al. 2002 as *Isoptericola variabilis* gen. nov., comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 685-688.
- Stanton, T. B., & Canale-Parola, E. (1980): *Treponema bryantii* sp. nov., a rumen spirochete that interacts with cellulolytic bacteria. Arch. Microbiol. 127: 145-156.
- Stoesser, G., Baker, W., van den Broek, A., Garcia-Pastor, M., Kanz, C., Kulikova, T., Leinonen, R., Lin, Q., Lombard, V., Lopez, R., Mancuso, R., Nardone, F., Stoehr, P., Tuli, M. A., Tzouvara, K., and Vaughan, R. (2003): The EMBL Nucleotide Sequence Database: major new developments. Nucl. Acids Res. 31: 17-22.
- Tayasu, I., Sugimoto, A., Wada, E., and Abe, T. (1994): Xylophagous termites depending on atmospheric nitrogen. Naturwissenschaften 81: 229-231.
- Tholen, A., & Brune, A. (2000): Impact of oxygen on metabolic fluxes and *in situ* rates of reductive acetogenesis in the hindgut of the wood-feeding termite *Reticulitermes flavipes*. Environ. Microbiol. 2: 436-449.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G. (1997): The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucl. Acids Res. 24: 4876-4882.
- To, L. P., Margulis, L., Chase, D., and Nutting, W. L. (1980): The symbiotic microbial community of the sonoran desert termite : *Pterotermes occidentis*. Biosystems 13: 109-137.
- Trinkerl, M., Breunig, A., Schauder, R., and König, H. (1990): *Desulfovibrio termitidis* sp. nov., a carbohydrate-degrading sulfate-reducing bacterium from the hindgut of a termite. System. Appl. Microbiol. 13: 373-377.
- Tschech, A., & Pfennig, N. (1984): Growth yield increase linked to caffeate reduction in *Acetobacterium woodii*. Arch. Microbiol. 137: 163-167.
- Varma, A., Kolli, B. K., Paul, J., Saxena, S., and König, H. (1994): Lignocellulose degradation by microorganisms from termite hills and termite guts: a survey on the present state of art. FEMS Microbiol. Rev. 15: 9-28.
- Wenzel, M., Radek, R., Brügerolle, G., and König, H. (2002a): Identification of the ectosymbiotic bacteria of *Mixotricha paradoxa* involved in movement symbiosis. Europ. J. Protistol. 39: 11-23.
- Wenzel, M., Schönig, I., Berchtold, M., Kämpfer, P., and König, H. (2002b): Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*. J. Appl. Microbiol. 92: 32-40.

- Widdel, F. (1980): Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoesäure durch neu isolierte Arten sulfatreduzierender Bakterien. Dissertation. Georg-August-Universität zu Göttingen. Lindhorst/Schaumburg-Lippe, Göttingen.
- Widdel, F., & Pfennig, N. (1984): Dissimilatory sulfate- or sulfur-reducing bacteria. In R. Krieg & J. G. Holt (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume I. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 663-679.
- Widdel, F., & Bak, F. (1992): Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K-H. (Ed.), *The Prokaryotes*, 2nd ed. Springer-Verlag, New York, pp. 3352-3372.
- Widdel, F., & Hansen, T. A. (1992): The dissimilatory sulfate- and sulphur-reducing bacteria. In Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K-H. (Ed.), *The Prokaryotes*, 2nd ed. Springer-Verlag, New York, pp. 583-627.
- Wieringa, E. B. A., Overmann, J., and Cypionka, H. (2000): Detection of abundant sulphate-reducing bacteria in marine oxic sediment layers by a combined cultivation and molecular approach. *Environ. Microbiol.* 2: 417-427.
- Yamin, M. A. (1981): Cellulose metabolism by the flagellate *Trichonympha* from the termite is independent of endosymbiotic bacteria. *Science* 211: 58-59.
- Zhilina, T. N., Zavarzin, G. A., Rainey, F., Kevbrin, V. V., Kostrikina, N. A., and Lysenko, A. M. (1996): *Spirochaeta alkalica* sp. nov., *Spirochaeta africana* sp. nov., and *Spirochaeta asiatica* sp. nov. alkaliphilic anaerobes from the continental Soda Lakes in Central Asia and the East African Rift. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 305-312.
- Zimmermann, P. R., Greenberg, J. P., Wandiga, S. O., and Crutzen, P. J. (1982): Termites: a potentially large source of atmospheric methane, carbon dioxide, and molecular hydrogen. *Science* 218: 563-565.

7. Anhang

7.1 Sequenzen

16S rRNA Gensequenz von Stamm SPN1 (1500 bp)

CTGGCGGCGCGTTTTAAGCATGCAAGTCGAGCGGGAAGGGGCTTCGGCCCTGGAGAGCGGCGGACGGGTGAGT
AACACGTGGATGATCTGCCTCCAGTTGGGGACAGCACCTGGAAACAGGTGATAATACCGGATACGACCGCAG
GGGTAGAGCCCTGCGGGGAAAGGGGCCACGGCCCCGCTGGGAGATGAGTCCGCGGCCATTAGCTGGATGGGG
GGGTAACGGCCCACCATGGCGACGATGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGGACGGCCACATTGGAAC TGAGACAC
GGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGCTAAGAATCTTCCGCAATGGGGGAACCC TGACGGAGCGACGCCGC
GTGAACGAAGAAGGCCGTGAGGTTGTAAAGTTCTTTTCGGGAGGGGGAATAAGCCTGCCAGGGAATGGGCGGG
TGATGACGTGAATCCCGGAATAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAACACGTAGGGGGCGAGC
GTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCGCGCAGGCGGT CATGCAAGTCCGATGTGAAAGACCCCGGCTCAA
CCGGGGTATGCGTGGGAAACTGCATGGCTTGAGTACAGCAGGGGGCAGTGGAAATTCAGGTGTAGGGGTGAA
ATCTGTAGATATCTGGAAGAACACCGGAGGCGAAGGCGACTGCC TGGGCATGTACTGACGCTGAGGCGCGAAG
GTGCGGGGAGCGAACAGGTTTAGATACCCTGGTAGTCCGCACAGTAAACGATGCACACCAGGTGTCCGGGGGT
AGCCCCGGTACCGGAGCTAACGCACTGAGTGTGCCGCTGGGGAGTATGCCCGCAAGGGTGAACCTCAAAGG
AATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGTTTTAATTTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCAGGGC
TTGACATCCGGGGGAACCATGGGGAGACCCATGGGCCGCTTGC GGCCCGCCGGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTG
TCAGCTCGTGCTGTGAAGTGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGCCGCTCTGTTACCAGCATGTG
AAGATGGGGACTCGGACGGAAC TGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCC
CTTATGCCCTGGGCCACACACGTGCTACAATGGCCGGTACAGAGCGAAGCGGACCCCGGAGGGAGAGCGAACC
GCGAAAGCCGGTCTCAGTACGGATTGGACTCTGCAACCCGAGTCCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGC
ATCAGCATGGCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG TACACACCGCCCGTACACCATCCGAGTCGGGGGTAC
CCGAAGTCGCTGTCCCAACCGCGAGGGGGGAGGTGCCGAAGGTATGCC TGGTGGAGGGGTGAAGTCGTAACA
AGGTAGCCGTACCGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTT

16S rRNA Gensequenz von Stamm SPN2 (697 bp)

ACGGGTGAGTAACACGTGGATGATCTGCCTCCAGTTGGGGACAGCACCTGGAAACAGGTGATAATACCGGAT
ACGACCGCAGGGGTAGAGCCCTGCGGGGAAAGGGGCCACGGCCCCGCTGGGAGATGAGTCCGCGGCCATTAG
CTGGATGGGGGGTAAACGGCCCACCATGGCGACGATGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGGACGGCCACATTGGA
ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGCTAAGAATCTTCCGCAATGGGGGAACCC TGACGGA
GCGACGCCGCGTGAACGAAGAAGGCCGTGAGGTTGTAAAGTTCTTTTCGGGAGGGGGAATAAGCCTGCCAGGG
AATGGGCGGGTATGACGTGAATCCCGGAATAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAACACGTA
GGGGGCGAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCGCGCAGGCGGT CATGCAAGTCCGATGTGAAAGAC
CCCGGCTCAACCGGGGTATGCGTGGGAAACTGCATGGCTTGAGTACAGCAGGGGGCAGTGGAAATTCAGGTG
TAGGGGTGAAATCTGTAGATATCTGGAAGAACACCGGAGGCGAAGGCGACTGCC TGGGCATGTACTGACGCTG
AGGCGCGAAGGTGCGGGGAGCGAACAGGTTTAGATACCCT

16S rRNA Gensequenz von Stamm SPIT5 (1310 bp)

GCAGCGATGCCCTGAGCGGCGGACTGGTGAGTAACGCGTGGGTGACCTACCCTTAGGATGGGGATAGCCATT
AGAAATAGTGGGTAATACCGAATATGATTGCGGGACTGTGTTTTCGCAAAGAAAGGAGCTAAGGCTCCGCCTG
AGGATGGGCCCGCTCCATTAGGTAGTTGGTGCAGTAAAGGCGTACCAAGCCGGAGATGGGTAGCCGGCCTG
AGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGCTAAGAATATTCC
GCAATGGGCGAAAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCGTGTACGAAGAAGGCCGAAAGGTTGTAAAGTACTTTTTTT
GCGGAAGAATAAGCGGTGGAGGGAAATGCCATCGTGATGACGAGAAGCGAAGAATAAGCCCCGGCTAATTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAACACGTAAGGGGCGAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCCGT
TATGGAAGTCTGATGTGAAAAGGCAGGAGCTTAACCTTCTGGATTGCATTGGAAACTGGATGACTAGAGTCATGG
AGGGGGAGTTGGAATTCCTAGTGTAGGGGTGAAATCTGTAGATATTAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCCGAA
CTTCTAGCCAATGACTGACGCTGAGGCGCGAAAGTGCGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCGC
ACTATAACAGTATGCACTAGGTGTTGGGCCGAGGTTTCAGTCCGGAGCGAACGCTGATAAGTGCACCCGCT
GGGAGATATCCCGCAAGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTT
AATTGATGATACGCGAGGAACCTTACCCTGGTTTTGACATGGAGGCGAAGGGTGCAGAGATGTACCCGCCTGG
CAACAGGCGCTTTCACAGGTGCTGCATGGCTGTCTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTTGGGTTAAGTCCCGCAA

CGAGCGCAACCCCTTACTGCCAGTTGCTAACAGGTAAAGCTGAGGACTCTGGCGGAAC TGCCGGTGACAAACCG
GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTATGTCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTGGT
ACAACGTGACGCGAAACCGCGAGGTAAGAGCGAAGCACGAAAAGCCAGCCGTAGTTCCGATTGAAGTCTGAAA
CCCGACTTCATGAAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCACATCAGCATGGTGCGGTGAATACGTTCCCGGGC

16S rRNA Gensequenz von Stamm SPIM20 (1328 bp)

AAGTCGACGGCAAGGGGTAGCAATACCCCTAGAGCGGCGGACTGGTGAGTAACGCGTGGGTGACCTACCCCT
AGGTTGGGGATAGCCATTAGAAAATAGTGGGTAATACCGAATATGGTTGTTTTGCTATGGCGAGACAAAGAAAG
GAGCCTTGGCTCCGCTGGGGATGGGCCCGGCTCCCATTAGGTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGCCCG
AGATGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGCTAAGAATATTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCGACGCCCGGTGTATGAAGAAGGCCGAAAGG
TTGTAATAATACTTTTCTTGCTGAAGAATAAGCGGGGGAGGGAATGCCCTCGTGATGACGGTAAGCAAGGAATA
AGCCCCGGCTAATTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAACACGTAAGGGGCAAGCGTTGTTCCGGAATTTATGGGCGT
AAAGGGCGCGTAGGCGGTTACGCAAGTCTGGCGTGAAAGGCAAGGGGCTTAACCTCCGACTGCGCTGGAAACT
ATGTAACCTTGAGTCATGGAGGGGGAGTTGGAATTCCTGGTGTAGGGGTGAAATCTGTAGATATCAGGAAGAAC
ACCGGTGGCGAAGGCGAACTTCTAGCCAATGACTGACGCTGAGGCGCGAAAGTGCGGGGAGCAAACAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCGCACTATAAACGATGTACACTAGGTGTTGGGCCGAGCGGTTCCAGTGCCGAAGCAAAC
GTGATAAGTGTACCGCTGGGGAGTATGCCCGCAAGGGTGAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAG
CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCCTGGGTTTGACATGGTAGTGAATGATGC
AGAGATGTATCAGCGTAGCAATACGCGCTATCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTG
TTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCCTACTGCCAGTTACCAGCAGGTAAAGCTGGGGACTCTGGCGGA
ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTATGTCCAGGGCTACACA
CGTGCTACAATGGCCGGAACAAAGCGACGCGACACCGCGAGGTATGAGCGAAGCGCAAAAACCCGGCCGTAGT
TCGGATTGAAGTCTGAAAACCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTACATCAGCATGGTACGGTGA
ATACGTTCCCGGGC

16S rRNA Gensequenz von Stamm SPIM24 (700 bp)

TACCCCTAGAGCGGCGGACTGGTGAGTAACGCGTGGGTGACCTACCCCTTAGGTTGGGGATAGCCATTAGAAA
TAGTGGGTAATACCGAATATGGTTGTTTTGCTATGGCGAGACAAAGAAAGGAGCCCTTGGCTCCGCCTGAGGAT
GGGCCCGCGTCCCATTAGGTAGTTGGTGAGGTAAGGGCCACCAAGCCCGAGATGGGTAGCCGGCCTGAGAGG
GTGAACGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGCTAAGAATATTCGCAAT
GGACGAAAGTCTGACGGAGCGACGCCCGGTGTATGAAGAAGGCCGAAAGGTTGTAAAGTACTTTTCTTGCTGA
AGAATAAGCGGGGAGGGAATGCCCGCGGATGACGGTAAGCAAGGAATAAGCCCCGGCTAATTACGTGCCAG
CAGCCCGGTAACACGTAAGGGGCAAGCGTTGTTCCGGAATTTATGGGCGTAAAGGGCGCTAGGCGGTTACGT
AAGTCTGGCGTGAAAGGCAAGGAGCTTAACCTCCGACTGCGCTGGAAACTGTGTAACCTTGAGTCATGGAGGGG
GAGTTGGAATTCCTGGTGTAGGGGTGAAATCTGTAGATATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGAACTTCT
AGCCAATGACTGACGCTGAGGCGCGAAAGTGCGGGGAGCAAAC

16S rRNA Gensequenz von Stamm SPIM25 (1296 bp)

GAGCGGCGGACTGGTGAGTAACGCGTGGGTGACCTACCCCTTAGGTTGGGGATAGCCATTAGAAAATAGTGGGTA
ATACCGAATATGGTTGTTTTGTTATGGCGAGACAAAGAAAGGAGCCCTTGGCTCCGCCTGAGGATGGGCCCGCG
TCCCATTAGGTAGTTGGTGAGGTAAGGGCCACCAAGCCCGAGATGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGAACGGC
CACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGCTAAGAATATTCGCAATGGACGAAAG
TCTGACGGAGCGACGCCCGGTGTATGAAGAAGGCCGAAAGGTTGTAAAGTACTTTTCTTGCTGAAGAATAAGC
GGGGGAGGGAATGCCCGCGCGATGACGGTAAGCAAGGAATAAGCCCCGGCTAATTACGTGCCAGCAGCCCGG
TAAACACGTAAGGGGCAAGCGTTGTTCCGGAATTTATGGGCGTAAAGGGCGCTAGGCGGTTACGTAAGTCTGGC
GTGAAAGGCAGGAGCTTAACCTCCGACTGCGCTGGAAACTGTGTAACCTTGAGTCATGGAGGGGAGTTGGAA
TTCCTGGTGTAGGGGTGAAATCTGTAGATATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGAACTTCTAGCCAATGA
CTGACGCTGAGGCGGAAAGTGCGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCGCACTATAAACGATGT
ACACTAGGTGTTGGGCCGAGCGGTTCCAGTGCCGAAGCAAACGTGATAAGTGTACCCTGGGGAGTATGCCCG
CAAGGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGATACG
CGAGGAACCTTACCTGGGTTTACATGGTAGTGAATGATGCAGAGATGTATCAGCGTAGCAATACGCGCTATC
ACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCCT
ACTGCCAGTTACCAGCAGGTAAGCTGGGGACTCTGGCGGAACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGA
TGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTATGTCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCCGGAACAAAGCGACGCGA
CACCGCGAGGTATGAGCGAAGCGCAAAAACCGGCCGTAGTTCCGATTGAAGTCTGAAAACCGACTTCATGAA
GTTGGAATCGCTAGTAATCGTACATCAGCATGGTACGGTGAATACGTTCCCGGGC

16S rRNA Gensequenz von Klon PM6 (1296 bp)

AGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCTTTGGGGC
 TTGCCCCAGAGACTTAGCGGCGCACGGGTGAGTAACACGTGGATGATCTACCCATCAGTTTGGGATAACAGTT
 GGAAACGACTGCTAATACCGGATACGATCTTTTATCASATTAAGGTGAAAGGCGGCCCTCTGCTTGCAAGCTGT
 CGCTGATGGATGAGTCCGCGGCTCATTAGGTAGTTGGTAGGGTAACGGCCTACCAAGCCGACGATGAGTAGCC
 GGCTGAGAGGGTAATCGGCCACACTGGGACTGGAACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA
 TATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCGAGCGACGCCGCTGAGGGATGAAGGCCCTTCGGGTGCGTAAACCTCT
 GTCAGAAGGGGAAGAACGGGCATGGTGCTAATCAGCCATGTTTTGACGGTACCTTCAAAGGAAGCACCGGCTAA
 CTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGCGCGTA
 GGCGGCTTTGTAAGTCAGAGGTGAAAATCCACGGCTCACCCGTGGAACAGCTTGTGATACTGCATTGCTTGAG
 TGAGTGAGAGGATAGT

***nifH* Gensequenz von Stamm SPIT5 (462 bp)**

CGCGAATTCGCCCTTTGCGATCCTAAGGCTGACTCAACACGGCTTCTTTTAGGCGGTCTGCATCAGAAAACGG
 TACTCGACACAATTCGGGACAACCGGCTGGAAGTAACGCTGGATCAGCTGGTAAAAGAAGGCTGGCTCGGTAT
 ACGCTGCGTAGAATCGGGGGACCTGAACCTGGCGTTGGCTGTGCGGGACGGGGATCATCACTTCAATAGAT
 ATGCTTGAAAATTTGGGAGCTTACACAGACGATGATTATGTGTTTTATGATGTGCTGGGAGATGTAGTAT
 GCGGAGGCTTTGCAATGCCCATACGCGAAGGTAAAGCCAAAGAAATATACATTGTAGCCTCCGGCGAGATGAT
 GGCCCTAAGGGCGAATTCGTTTAAACCTGCAGGACTAGTCCCTTTAGTGAGGGTTAATCTGAGCTTGGCGTA
 ATCATGGTCATAGCTGTTTCTCTGA

***nifH* Aminosäuresequenz von Stamm SPIT5 (119 AS)**

CDPKADSTRLLLGLLHQKTVLDTIRDNRLEVTLDQLVKEGWLGIKRCVSEGGPEPGVGCAGRGIITSIDMLENL
 GAYTDDLDYVFYDVLGDVVCGGFAMP IREGKAKEIYIVASGEMMAL

7.2 Alignments der Sequenzen für die Konstruktion phylogenetischer Stammbäume

7.2.1 Sequenzen des „Spirochaeten-Stammbaums“ (Abb. 23)

Alle Sequenzpositionen die mit einer „1“ versehen sind, wurden für die phylogenetische Stammbaumanalyse verwendet (Abkürzungen und Zugriffsnummern, siehe Kap. 7.3.1).

Leptonema	GAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTAGGTAATTTGCCACGGATGGGGGATAACCTTTC
Lsbiflexa	CAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATGGATAACCTACCTAGAAGTTGGGGATAACACAGA
Za29	GAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTAGGTGATCTGTCTTGTATCGGGGATAGTCCGTG
Rs-B68	GAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTAGGTGATCTGTCTTGTGTTTTGGGGATAGCCCGTG
Rs-H09	GAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTAGGTGATCTGTCTTGTGTTTTGGGGATAGTCCGTG
Nks34	GAGTGGCGAACGGGTGAGTAAGACGTGGGTGATCTGTCTCCGGTACGGGGATAGCCTGTG
Spirosp. Buddy	GAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGACAATCTGCCCCCGGTCCGGGATAGCCAGG
Spirosp. Grapes	GAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGACAATCTGCCCCCGGTCCGGGATAGCCTTGG
SPN1	GAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGATGATCTGCCTCCAGTTGGGGACAGCACCTG
S. smaragdinae	GACCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTAGATAAATCTGTCTTGGGATGGGGATAGCCCATG
Spbajacalifor	GACCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTAGATAAATCTGTCTTGGGATGGGGATAGCCCATG
RsD16	GAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTAAGTGATCTACCTTAGGGTAAGGGATAGCTTATG
Sphalophila	GACCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTAGGTGATCTACCTTAGAGTTGGGGATAGCCCATG
S. africana	GAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGACCTGCCAGAGGATGGGGATAGCCTGTG
T. denticola	GAGTGGCGGACTGGTGAGTAACGCGTGGGTGACCTGCCCTGAAGATGGGGATAGCTAGTA
T. pallidum	GAGTGGCGGACTGGTGAGTAACGCGTGGGTAAATCTGCCTTTGAGATGGGGATAGCCTCTA
T. pectinovorum	GAGTGGCGGACTGGTGAGTAACACGTGGGTGACGTACCCNTTGGACGGGGATAGTCGGTA
T. bryantii	GAGCGGCGGACTGGTGAGTAACACGTGGGTGACGTACCTTTGTGACGGGGATAGCCTCTA
RFS2	GAATGGCGGACTGGTGAGTAACACGTGGGTGACATACCCCTTAGGACGGGGATAGCTTCTA
Rs-G65	GAATGGCGGACTGGTGAGTAACACGTGGGTGACATACCCCTTAGGACGGGGATAGCTTCTA
RFS9	GAGTGGCGGACTGGTGAGTAACACGTGGGTGACATGCCTTGAGGACGGGGATAGCCGTTA
HsPySp20	GAATGGCGGACTGGTGAGTAACACGTGGGTGACATACCCCTTAGGACGGGGATAGCCTCTA
RsDiSp12	GAGTGGCGGACTGGTGAGTAACACGTGGGTGACATGCCTTGAGGACGGGGATAGCCGATA
Rs-A53	GAGTGGCGGACTGGTGAGTAACACGTGGGTGACATACCCCTTAGGTTGGGGATAGCTATTA
Rs-A48	GAGTGGCGGACTGGTGAGTAACACGTGGGTGACATACCCCTTAGGTTGGGGATAGCTGATA
S. stenostrep	GAGCGGCGGACTGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTACCTTTAGGTTGGGGATAGCCATTA


```

Desv. termidkh2      GTAAAGTGCACGTAGGCTGTTTGGTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGCGGCT
Dsv. longreachii    GTAAAGCGCACGTAGGCTGTCTGGTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGCGGCT
Dsv. vulgaris       GTAAAGCGCACGTAGGCTGCTTGGTAAGTCAGGGGTGAAAGCCCGCGGCT
Dsv. intestin       GTAAAGCGCACGTAGGCTGTCTTGGTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGCGGCT
Dsv. desulfur       GTAAAGCGCACGTAGGCTGTAGTGTAAAGTCAGGGGTGAAATCCCGCGGCT
Dsv. gigas          GTAAAGCGCACGTAGGCTGTCTTGCAAGTCAGGTGTGAAAGCCCTCGGCT
Dsv. giganteus      GTAAAGCGCGCGTAGGTGGCGCGATAAGTCAGGCGTGAAAGCCCTCGGCT
Dsv. salexigens     GTAAAGCGCACGTAGGCTGTCTTGTAAAGTCGGATGTGAAAGCCCTCGGCC
Dsv. africanus      GTAAAGCGCACGTAGGCGGCGCGGTGAGTCAGATGTGAAAGCCCTCGGCT
Dsv. longus         GTAAAGCGCGCGTAGGCGGCGCGGTGAGTCAGATGTGAAAGCCCTCGGCT
Desulfom. norv      GTAAAGCGCGCGTAGGCGGCGCTTGTAAAGTCAGGGGTGAAATCCCGCGGCT
Desulfom. escam     GTAAAGCGCACGTAGGCGGCTTGTAAAGTCAGGGGTGAAATCCCGCGGCT
Desulfob. postg     GTAAAGGGCGCGCAGGCGGCTTGTCCGTGAGGTGTGAAAGCTCGGGCT
Desulfobulbpr      GTAAAGGGCGCGTAGGCGGCTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGCGGCT
Desulfobotulus     GTAAAGCGCACGTAGGCGGCTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCGCGGCT
e. coli             ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
1111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111

```

```

clone_Rs-K75        CAGCCGTGGAAGTGCCTTTGATACTGTAGGGCT-TGAGTATGTGAGAGGA
DsvSTL1             CAACCGTGGAAGTGCCTTTGATACTGCAAGGCTACGAGTTTGTGAGAGGA
clonePM6            CACCCGTGGAAGTGCCTTTGATACTGCATTGCT-TGAGTGTGAGAGGA
Dsv. oryzae         CAACCGCGGAATTGCCTTTGATACTGCTGGACT-TGAGTTCGGGAGAGGG
Dsv. termidkh2     CAACCGCGGAATTGCCTTTGATACTGCTGGACT-TGAGTTCGGGAGAGGG
Dsv. longreachii  CAACCGCGGAATTGCCTTTGATACTGCTGGACT-TGAGTTCGGGAGAGGG
Dsv. vulgaris     CAACCGCGGAATTGCCTTTGATACTGCCGAGCT-AGAGTCCGGGAGAGGG
Dsv. intestin     CAACCGTGGAAGTGCCTTTGATACTGCTTAGCT-TGAATCCGGGAGAGGG
Dsv. desulfur     CAACCGTGGAAGTGCCTTTGATACTGCACAAT-TGAATCCGGGAGAGGG
Dsv. gigas        CAACCGGGGAAGTGCCTTTGATACTGCATGACT-TGAGTACAGGAGAGGA
Dsv. giganteus    CAACCGAGGAATTGCCTTTGAAACTGCATGGCT-CGAGTTCGGGAGAGGG
Dsv. salexigens   CAACCGGGGAATTGCCTTTGAAACTGCTGCTGT-TGAGTTCGGGAGAGGG
Dsv. africanus    CAACCGGGGAAGTGCATTGCAAACTGCAAGGCT-GGAGTCTGGGAGAGGG
Dsv. longus       CAACCGAGGAATTGCATTGATACTGCCGTGCT-CGAGTACGGGAGAGGC
Desulfom. norv    CAACCGTGGAAGTGCCTTTGAAACTGCAGGGCT-TGAATCCTGGGAGAGGG
Desulfom. escam  CAACCGTGGAAGTGCCTTTGAAACTGCGAAGCT-TGAATCCTGGGAGAGGG
Desulfob. postg  CAACCCCGGAAGTGCCTTTGAAACGCAAGACT-TGAATACGGGAGAGGA
Desulfobulbpr    TAACTGTGGAAGTGCATTGAAACTGTCAGGCT-TGAGTACAGAGGGGA
Desulfobotulus   NAACCCCGAGCTGCATGTGATACTGGCAGGNT-TGAGTATGGCAGAGGA
e. coli           CAACCTGGGAAGTGCATCTGATACTGGCAAGCT-TGAGTCTCGTAGAGGG
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
1111111111111111111111111111111111111111110111111111111111111111

```

```

clone_Rs-K75        TAGCGGAATTCCAGGTGTAGGAGTGAATCCGTAGAGATCAGGAGGAACA
DsvSTL1             TAGTGGAATTCCAGGTGTAGGAGTGAATCCGTAGAGATCAGGAGGAACA
clonePM6            TAGT-----
Dsv. oryzae         TGGCGGAATTCCAGGTGTAGGAGTGAATCCGTAGATATCTGGAGGAACA
Dsv. termidkh2     TGGCGGAATTCCAGGTGTAGGAGTGAATCCGTAGATATCTGGAGGAACA
Dsv. longreachii  TGGCGGAATTCCAGGTGTAGGAGTGAATCCGTAGATATCTGGAGGAACA
Dsv. vulgaris     TAGTGGAATTCCAGGTGTAGGAGTGAATCCGTAGAGATCTGGAGGAACA
Dsv. intestin     TGGCGGAATTCCAGGTGTAGGAGTGAATCCGTAGATATCTGGAGGAACA
Dsv. desulfur     TGGCGGAATTCCAGGTGTAGGAGTGAATCCGTAGATATCTGGAGGAACA
Dsv. gigas        TGGCAGAATTCCGGGTGTAGGGGTNAAATCCGTAGATATCTGGAGGAATA
Dsv. giganteus    TAGCGGAATTCCGGGTGTAGGAGTGAATCCGTAGATATCCGGAGGAACA
Dsv. salexigens   TGGCGGAATTCCAGGTGTAGGAGTGAATCCGTAGATATCTGGAGGAACA
Dsv. africanus    TGGCGGAATTCCGGGTGTAGGAGTGAATCCGTAGATATCCGGAGGAACA
Dsv. longus       AGGCGGAATTCCAGGTGTAGGAGTGAATCCGTAGATATCCGGAGGAACA
Desulfom. norv    TGGCGGAATTCCGGGTGTAGGAGTGAATCCGTAGATATCAGGAGGAACA
Desulfom. escam  TGGCGGAATTCCGGGTGTAGGAGTGAATCCGTAGATATCAGGAGGAACA
Desulfob. postg  AAGCGGAATTCCGGGTGTAGGAGTGAATCCGTAGATATCAGGAGGAACA
Desulfobulbpr    AAGCGGAATTCCGGGTGTAGGAGTGAATCCGTAGATATCAGGAGGAACA
Desulfobotulus   AAGCGGAATTCCGGGTGTAGGAGTGAATCCGTAGATATCAGGAGGAACA
e. coli           GGGTAGAATTCCAGGTGTAGGAGTGAATGCGTAG-----
*
1111000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000

```

```

clone_Rs-K75        TCAGTGGCGAAGGCGGCTATCTGGCGCAAAACTGACGCTGAGGC-----
DsvSTL1             TCAGTGGCCAAGGCGACTATCTGGCACAACACTGACGCTGAGGTGCGGAA-
clonePM6            -----
Dsv. oryzae         TCAGTGGCGAAGGCGGCCACCTGGACCGATACT-----
Dsv. termidkh2     TCAG-----
Dsv. longreachii  TCAGTGGCGAAGGCGGCCACCTGGACCGATACTGACGCTGAGGTGCGGAAA
Dsv. vulgaris     TCAGTGGCGAAGGCGGCCACCTGGACCGGTAATTGACGCTGAGG-----
Dsv. intestin     TCAGTGGCGAAGGCGGCCACCTGGACCGGTAATTGACGCTGAGGTG-----
Dsv. desulfur     TCAGTGGCGAAGGCGGCCACCTGGACCGGTAATTGACGCTGAGGTG-----
Dsv. gigas        CCAGTGGCGAAGGCGGCCACCTGGACTGTCACTGACGCTGAGGTG-----
Dsv. giganteus    CCAGTGGCGAAGGCGGCCACCTGGACCGATACTGACGCTGAGGTGCGGAAA
Dsv. salexigens   CCAGTGGCGAAGGCGGCCACCTGGACCGATACTGACGCTGAGGTGCGGAAA

```

```

Dsv.africanus          CCAGTGGCGAAGGCGGCCACCTGGACAGGTA
Dsv.longus             CCAGTGGCGAAGGCGGCCTGCTGGACAGATA
Desulfom.norv         CCGGTGGCGAAGGCGGCCACCTGGACAGGTA
Desulfom.escam       CCGGTGGCGAAGGCGGCCACCTGGACAGGTA
Desulfob.postg       CCGATGGCGAAGGCAGCTTTCTGGACCGATA
Desulfobulbpr       CCGGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGCTGGATA
Desulfobotulus      CCRGTGGCGAAGGCGGCTNTCTNGACCNATA
e.coli                -----
00000000000000000000000000000000

clone_Rs-K75         -----
DesvSTL1             -----
clonePM6             -----
Desv.oryzae          -----
Desv.termidkh2       -----
Dsv.longreachii     GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG
Desv.vulgaris        GCGTG-----
Desv.intestin        -----
Dsv.desulfur         -----
Dsv.gigas            -----
Dsv.giganteus        GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG
Dsv.salexigens       GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA-----
Dsv.africanus        GTGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC-----
Dsv.longus           GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG
Desulfom.norv        GTGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG
Desulfom.escam       GTGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG
Desulfob.postg       GCGTGGGTAGCAAACGGGAT-----
Desulfobulbpr       GCGTGGGGAGCAAACAGGAT-----
Desulfobotulus      -----
e.coli                -----
00000000000000000000000000000000
    
```

7.2.3. Sequenzen des „nifH-Stammbaums“ (Abb. 25)

Alle Sequenzpositionen die mit einer „1“ versehen sind, wurden für die phylogenetische Stammbaumanalyse verwendet (Abkürzungen und Zugriffsnummer, siehe Kap. 7.3.3).

```

Methanobiv          TTRTLIGKRLP-TILDIVKKK---KNA-----S----IEEVLFEGYG
Methanocvo          STRTLMHGKIN-TVLDTFRDKGP--EYM-----K---IEDIVYEGFN
tky19               STRLLHGERITTVLDYLKVTG---PDR-----C---VLSDLVHEGAF
nkn12               STRLLHGERITTVLDYLKVTG---PDR-----C---VLSDLVHEGAF
Zas2Nif2            STRFLLHGERITTVLDYLKGT---PDQ-----C---CLSDVVHLGAF
spit5               STRLLGGLHQKTVLDTIRDNR---LEV-----T---LDQLVKEGWL
gfn10               STRLLGGLHQRKTVLDTIRDNR---LEV-----T---LDHLVKTWGW
TDY11               STRLLGGLHQKTVLDTIRDNT---QEV-----T---LDHLVKSQGWK
cfnrt2              STRLLGGLHQKTVLDTIRDNV---QEV-----K---LEQLVKTYGH
tky3                STRLLGGLHQKTVLDTIRDNA---HEV-----K---LENLMKTKGWK
cfn6                STRLLGGLHQKTVLDTIRDNA---LEA-----AQQAGLSALLKTYK
nkn20               STRLLGGLHQKTVLDTIRDN---QRP-----G---LESLIRRGFL
TKY7                STRLLGGMHQETVLDTVRDNR---KGV-----T---LENLVKVGFG
cfn16               STRLLGGLAQKTVLDTLREEG---DGV-----E---LSSIMKEGYK
clpasteur           STRLLGGLAQKTVLDTLREEG---EDV-----E---LEDVLMKKGFK
TKY2                STRLILGGLAQQTVLDTLREEG---EDI-----E---LDYVLKPGFVS
TDY3                STRLLLNGLAQKTVLDTLRTEG---EDL-----D---LEDVVKVGFK
ZAS9Nifh1          STRLLLNGLAQKTVLDTLRTEG---EDL-----D---LEDVVKVGFK
nknrt16             STRLLLNGLAQKTVLDTLRTEG---EDL-----D---LEDVVKVGFK
Zas2Nif1            STRLLLNGLAQKTVLDTLRTEG---EDL-----D---LDDVVKVGFK
Spzuelz            STRLLLGGLSQTVLDTLREEG---EDL-----D---LEDVVKAGFK
Desulfogig         STRLLGGLSQRVLDTLREEG---EDV-----D---LDDIVSPGFA
cfn24               STRLLHGLAQKTVLDTLRDEG---EDV-----E---LEDVMMKGFK
Rhizobiumm         STRLILNAKAQDTVVHHLAATEGSV-EDL-----E---LEDVLKVGYSR
Azospirbra         STRLILHAKAQDTVLHLAAEAGSV-EDL-----E---LEDVLKIGYSK
Rhodobcapsu        STRLILNTKLQDTVLHLAAEAGSV-EDL-----E---LEDVVKIGYSR
Azotobvinel        STRLILHSKAQGTVMEMAAEAGTV-EDL-----E---LEDVLKAGYK
Azotobviner        STRLILHSKAQGTVMEMAAEAGTV-EDL-----E---LEDVLQIGFG
Methanobther       CTSNLRGQEIPTVLDILREKG-L-DKLGLETIEKEMIEINDIIEGYFN
Rhodobcapbchl      DSTFTLTRLQETVIDILKQVNFHPEELR-----PEDYVTEGFN
:                   : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : *
1111111111101111111110000111000000000001111111111
    
```

```

Methanobiv          NVKCVESGGPEPGVGCAGRGVIVAMGLLDKLGTFSD--DIDI IYDVLGD
Methanocvo          GYCVESGGPEPGVGCAGRGVITAVDMLDRLGVYDQL-KPDVV IYDILGD
tky19               GVHCVEAGGPEPGVGCAGRGILTTFELLERLGIKQNN--YDTI IYDVLGD
    
```


7.3 Abkürzungen und Zugriffsnummern

7.3.1 Abkürzungen und Zugriffsnummern des „Spirochaeten-Stammbaums“

Organismus /Klon [Wirt]	Abkürzung	Zugriffsnr. (NCBI)
<i>Leptonema illini</i>	Leptonema	M88719
<i>Leptospira biflexa</i>	Lsbiflexa	Z12821
Klon Za29 [<i>Zootermopsis angusticolis</i>]	Za29	AJ419823
Klon Rs-B68 [<i>Reticulitermes speratus</i>]	Rs-B68	AB088897
Klon Rs-H09 [<i>Reticulitermes speratus</i>]	Rs-H09	AB088910
Klon NkS34 [<i>Neotermes koshunensis</i>]	NkS34	AB084961
<i>Spirochaeta</i> sp. „Buddy“	Spirosp.Buddy	AF357916
<i>Spirochaeta</i> sp. „Grapes“	Spirosp.Grapes	AF357917
Stamm SPN1 [<i>Neotermes castaneus</i>]	SPN1	AJ698092
<i>Spirochaeta smaragdinae</i>	S.smaragdinae	U80597
<i>Spirochaeta bajacaliforniensis</i>	Spbajacalifor	AJ698859
Klon Rs-D16 [<i>Reticulitermes speratus</i>]	RsD16	AB088873
<i>Spirochaeta halophila</i>	Sphalophila	M88722
<i>Spirochaeta africana</i>	S.africana	X93928
<i>Treponema denticola</i>	T.denticola	M71236
<i>Treponema pallidum</i>	T.pallidum	M88726
<i>Treponema pectinovorum</i>	T.pectinovorum	M71237
<i>Treponema bryantii</i>	T.bryantii	M57737
Klon RFS2 [<i>Reticulitermes flavipes</i>]	RFS2	AF068429
Klon Rs-G65 [<i>Reticulitermes speratus</i>]	Rs-G65	AB088858
Klon RFS9 [<i>Reticulitermes flavipes</i>]	RFS9	AF068432
Klon HsPySp20 [<i>Hodotermopsis sjoestedti</i>]	HsPySp20	AB032004
Klon RsDiSp12 [<i>Reticulitermes speratus</i>]	RsDiSp12	AB031998
Klon Rs-A53 [<i>Reticulitermes speratus</i>]	Rs-A53	AB088895
Klon Rs-A48 [<i>Reticulitermes speratus</i>]	Rs-A48	AB088859
<i>Spirochaeta stenostrepta</i>	S.stenostrep	M88724
<i>Spirochaeta caldaria</i>	Sp.caldaria	M71240
Klon sp40_11 [<i>Mastotermes darwiniensis</i>]	sp4011	X89048
<i>Treponema</i> sp. ZAS9 [<i>Zootermopsis angusticolis</i>]	ZAS9	AF320287
<i>Treponema</i> sp. ZAS1 [<i>Zootermopsis angusticolis</i>]	ZAS1	AF093251
<i>Treponema</i> sp. ZAS2 [<i>Zootermopsis angusticolis</i>]	Zas2	AF093252
Klon RFS3 [<i>Reticulitermes flavipes</i>]	RFS3	AF068340
Klon Nc5 [<i>Neotermes castaneus</i>]	clonenc5	AJ419819
Klon RFS8 [<i>Reticulitermes flavipes</i>]	RFS8	AF068343

Klon Rs-J93 [<i>Reticulitermes speratus</i>]	RsJ93	AB088913
Stamm SPIM25 [<i>Incisitermes marginipennis</i>]	Spim25	---
Stamm SPIM20 [<i>Incisitermes marginipennis</i>]	spim20	---
Klon NkS-Oxy26 [<i>Neotermes koshunensis</i>]	NkSOxy26	AB085167
Klon NkS56 [<i>Neotermes koshunensis</i>]	NkS56	AB084967
Klon NkS-Ste9 [<i>Neotermes koshunensis</i>]	NkSSte9	AB085162
Klon NkS97 [<i>Neotermes koshunensis</i>]	NKS97	AB084973
Stamm SPIT5 [<i>Incisitermes tabogae</i>]	Spit5	---
Klon mpsp2 [<i>Mastotermes darwiniensis</i>]	mpsp2	X89050
Klon Rs-H91 [<i>Reticulitermes speratus</i>]	Rs-H91	AB088863
RFS94 [<i>Reticulitermes flavipes</i>]	RFS94	AF068423
<i>Spirochaeta aurantia</i>	Spaurantia	M57740
<i>Borrelia anseria</i>	Borranseria	M72397
<i>Escherichia coli</i>	ecoli	J01695

7.3.2 Abkürzungen und Zugriffsnummern des Stammbaums sulfatreduzierender Bakterien

Organismus /Klon	Abkürzung	Zugriffsnr. (NCBI)
Klon Rs-K75 [<i>Reticulitermes speratus</i>]	clone_Rs-K75	AB089105
<i>Desulfovibrio cuneatus</i> STL1	DesvSTL1	X99501
Klon PM6 [<i>Pachnoda marginata</i>]	clonePM6	AJ630406
<i>Desulfovibrio oryzae</i>	Desv.oryzae	AF273083
<i>Desulfovibrio termitidis</i> KH2 [<i>Heterotermes indicola</i>]	Desv.termidkh2	X87409
<i>Desulfovibrio longreachii</i>	Dsv.longreachii	Z24450
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	Desv.vulgaris	AF418179
<i>Desulfovibrio intestinalis</i> [<i>Mastotermes darwiniensis</i>]	Desv.intestin	Y12254
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Dsv.desulfur	A30645
<i>Desulfovibrio gigas</i>	Dsv.gigas	M34400
<i>Desulfovibrio giganteus</i>	Dsv.giganteus	AF418170
<i>Desulfovibrio salexigens</i>	Dsv.salexigens	M34401
<i>Desulfovibrio africanus</i>	Dsv.africanus	X99236
<i>Desulfovibrio longus</i>	Dsv.longus	AY359867
<i>Desulfomicrobium norvegicum</i>	Desulfom.norv	AJ277897
<i>Desulfomicrobium escambiense</i>	Desulfom.escam	AJ277886
<i>Desulfobacter postgatei</i>	Desulfob.postg	AF418180
<i>Desulfobulbus propionicus</i>	Desulfobulbpr	AY548789
<i>Desulfobotulus sapovorans</i>	Desulfobotulus	M34402
<i>Escherichia coli</i>	ecoli	J01695

7.3.3 Abkürzungen und Zugriffsnummern des „*nifH*-Stammbaums“

Organismus /Klon [Wirt]	Abkürzung	Zugriffsnr. (NCBI)
<i>Methanobacterium ivanovii</i>	Methanobiv	X07501
<i>Methanococcus voltae</i>	Methanocvo	X03777
Klon TKY19 [<i>Reticulitermes speratus</i>]	tky19	D83111
Klon NKN12 [<i>Neotermes koshunensis</i>]	nkn12	AB011858
<i>Treponema</i> sp. ZAS2 [<i>Zootermopsis angusticolis</i>]	zas2Nif2	AF325802
Stamm SPIT5 [<i>Incisitermes tabogae</i>]	spit5	---
Klon GFN10 [<i>Glyptotermes fuscus</i>]	gfn10	AB011897
Klon TDY11 [<i>Reticulitermes speratus</i>]	TDY11	D83087
Klon CFNRT2 [<i>Coptotermes formosanus</i>]	cfnrt2	AB083570
Klon TKY3 [<i>Reticulitermes speratus</i>]	tky3	D83118
Klon CFN6 [<i>Coptotermes formosanus</i>]	cfn6	AB011853
Klon NKN20 [<i>Neotermes koshunensis</i>]	nkn20	AB011864
Klon TKY7 [<i>Reticulitermes speratus</i>]	TKY7	D83122
Klon CFN16 [<i>Coptotermes formosanus</i>]	cfn16	AB011844
<i>Clostridium pasteurianum</i>	clpasteur	X07472
Klon TKY2 [<i>Reticulitermes speratus</i>]	TKY2	D83112
Klon TDY3 [<i>Reticulitermes speratus</i>]	TDY3	D83089
<i>Treponema</i> sp. ZAS9 [<i>Zootermopsis angusticolis</i>]	ZAS9NifH1	AF325803
Klon NKNRT16 [<i>Neotermes koshunensis</i>]	nknrt16	AB027743
<i>Treponema</i> sp. ZAS2 [<i>Zootermopsis angusticolis</i>]	zas2Nif1	AF325801
<i>Spirochaeta zuelzerae</i>	Spzuelz	AF325795
<i>Desulfovibrio gigas</i>	Desulfogig	U68183
Klon CFN24 [<i>Coptotermes formosanus</i>]	cfn24	AB011848
<i>Rhizobium meliloti</i>	Rhizobiumm	V01215
<i>Azospirillum brasilense</i>	Azospirbra	X51500
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	Rhodobcapsu	M15270
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Azotobvinel	M20568
<i>Azotobacter vinerandii</i>	Azotobviner	M32371
<i>Methanobacterium thermolithotrophicus</i>	Methanobther	X07500
<i>Rhodobacter capsulatus</i> bchL	Rhodobcapbchl	Z07500