

Universität Mainz
Institut für Mikrobiologie und Weinforschung

**Symbiotische Mikroorganismen
aus dem
Termitendarm**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

vorgelegt von
Marika Veronika Wenzel
aus Edesheim/Pfalz

Mainz 2001

Jahr der mündlichen Prüfung: 2001

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Februar 1998 bis Oktober 2001 am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind teilweise veröffentlicht in:

Publikationen und Posterpräsentationen

1. Wenzel, M., Radek, R., König, H. (2002) *Identification of the ectosymbiotic bacteria of *Mixotricha paradoxa* involved in movement symbiosis*. Euro. J. Protist. Eingereicht
2. Wenzel, M., Schönig, I., Berchtold, M., Kämpfer, P., König, H. (2002) *Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis**. J. Appl. Microbiol. 92: 32-40.
3. König, H., Fröhlich, J., Berchtold, M., Wenzel, M. (2002) *Diversity and microhabitats of the hindgut flora of termites*. Re. Res. Dev. Microbiol. Im Druck.
4. Bakalidou, A., Kämpfer, P., Berchtold, M., Kuhnigk, T., Wenzel, M., König, H. (2001) *Cellulosimicrobium variabile* sp. nov., a cellulolytic bacterium from the hindgut of the termite *Mastotermes darwiniensis*. IJSEM. Online publiziert am 18.12.2001 (<http://www.sgm.ac.uk/IJSEM/PiP/ijsem01904.pdf>).
5. König, H., Berchtold, M., Fröhlich, J., Wenzel, M., Emtiazi, F. (2000) *Die lignocellulolytischen Bakterien des Termitendarmes*. Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Ent. 12: 219-222.
6. Wenzel, M., Radek, R., Fröhlich, J., König, H. (2001) *Mixotricha paradoxa: unravelling of the bacterial components of a paradoxical movement symbiosis*. Posterpräsentation auf der VAAM-Tagung (Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie), März 2001 in Oldenburg (Das Poster gewann einen VAAM-Posterpreis).
7. Wenzel, M., Berchtold, M., Fröhlich, J., Emtiazi, F., König, H. (2000) *The complexity of lignocellulolytic microorganisms in the termite gut: A survey of the present state of knowledge*. Posterpräsentation auf der VAAM-Tagung, März 2000 in München.
8. Wenzel, M., Mayer, M., Schönig, I., Kämpfer, P., König, H. (1999) *Characterization of cellulose-degrading bacteria and yeasts isolated from termites*. Posterpräsentation auf der VAAM-Tagung, März 1999 in Göttingen.
9. Fröhlich, J., Wenzel, M., König, H. (1998) *Flagellates and their bacterial symbionts in the hindgut of the lower termite *Mastotermes darwiniensis**. Posterpräsentation auf der VAAM-Tagung, März 1998 in Frankfurt.

Inhaltsverzeichnis

1. <u>Einleitung</u>	1
1.1. Die Termiten	1
1.2. Der Flagellat <i>Mixotricha paradoxa</i>	6
1.3. Spirochäten	9
1.4. Cellulolytische Bakterien im Termitendarm	11
2. <u>Material und Methoden</u>	15
2.1. Geräte und Hilfsmittel	15
2.2. Chemikalien	16
2.3. Biochemikalien und Kits	18
2.4. Puffer	23
2.5. Lösungen	24
2.6. Medien	25
2.7. Organismen	27
2.8. Die cellulolytischen Bakterien	28
2.8.1. Isolierung und Kultivierung der cellulolytischen Bakterien	28
2.8.2. Nachweis der glykolytischen Aktivität	29
2.8.3. Nachweis der glykolytischen Aktivität, bei anaerober Kultivierung	29
2.8.4. 16S rDNA-Präparation der cellulolytischen Bakterien	30
2.8.5. Sequenzanalysen der 16S rDNA	30
2.8.6. Morphologische und physiologische Charakterisierung	31
2.8.7. Zellzählung	31
2.9. Methoden zur Identifizierung der symbiotischen Oberflächenbakterien von <i>Mixotricha paradoxa</i>	31
2.9.1. Isolierung von <i>Mixotricha paradoxa</i>	31
2.9.2. Präparation der Hüllen von <i>Mixotricha paradoxa</i>	32
2.9.3. Präparation der DNA der Oberflächenbakterien	32
2.9.4. Sequenzanalyse der 16S rDNA mit semispezifischer PCR	33
2.9.5. Fluoreszenzoligonukleotidsonden	34
2.9.6. Helfersonden	34

2.9.7.	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung der Flagellatenhüllen	35
2.9.8.	Phylogenetische Analyse der Sequenzen	36
2.9.9.	Stammbaumprogramme	36
2.9.10.	Stammbaumkonstruktionen	37
3.	<u>Ergebnisse</u>	38
3.1.	Cellulolytische Bakterien im Termitendarm	38
3.1.1.	Isolierung der cellulolytischen Bakterien	38
3.1.2.	Glykolytische Aktivität	39
3.1.3.	Identifizierung der Darmisolate	39
3.1.4.	Celluloseabbau unter anaeroben Kulturbedingungen	41
3.2.	Die Oberflächenbakterien von <i>Mixotricha paradoxa</i>	48
3.2.1.	Die Identifizierung der Spirochäten auf der Oberfläche mit Hilfe semispezifischer PCR-Reaktionen	48
3.2.2.	Die Stäbchen auf der Oberfläche von <i>Mixotricha paradoxa</i>	50
3.2.3.	Zuordnung isolierter Sequenzen zu den entsprechenden Organismen auf der Oberfläche von <i>Mixotricha paradoxa</i>	50
3.2.4.	Phylogenetische Charakterisierung der Symbioten	57
3.2.5.	Mikroskopische Untersuchung	60
4.	<u>Diskussion</u>	61
4.1.	Bakterieller Celluloseabbau im Termitendarm	61
4.2.	Die Symbioten auf der Oberfläche von <i>Mixotricha paradoxa</i>	67
5.	<u>Zusammenfassung</u>	76
6.	<u>Literatur</u>	78

7. <u>Anhang</u>	89
7.1. Alignments der 16S rDNA der Klone für die Konstruktion der Stammbäume	89
7.1.1. Bakterien des „Spirochätenstammbaumes“	89
7.1.2. Bakterien des „B6-Stammbaumes“	96
7.2. Übersichtsalignment der Spirochätenklone mp1- mp5	99
7.3. Die cellulolytischen Bakterien und ihre nächsten Verwandten	103
7.4. Alle cellulolytischen Stämme und ihr Celluloseabbauverhalten	109

Abkürzungen

BAM	Bundesanstalt für Materialforschung und Materialprüfung
bp	Basenpaare
CMC	Carboxymethylcellulose
Cy	5-(6)-Carboxyfluorescein
DABCO	1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]Oktan
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
Eco	<i>E. coli</i> Nummerierung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EMI	Elektronenmikroskopie
Eubak	Eubakterien
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
Hebis	Hessischer Verbundkatalog
M	Molar (mol/l)
MPN	Most probable number
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PHYLIP	Phylogeny Inference Package
PubMed	Public Medline
rDNA	ribosomal Desoxyribonucleic Acid
RDP	Ribosomal Database Project
rpm	revolutions per minute
rRNA	ribosomal Ribonucleic Acid
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfate
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
T _m	Melting temperature
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TSB	Tryptic Soy Broth



Termitenhügel in Australien

[<http://aussie.trafalgargroup.net/termites.html>]

1. Einleitung

Termiten gehören beim Abbau und der Mineralisation von komplexen Biopolymeren wie Holz und anderen Cellulose- und Hemicellulosehaltigen Stoffen zu den wichtigsten Insekten. Um diese Aufgabe zu erfüllen hat sich im Termitendarm ein Bioreaktor-ähnliches System aus verschiedenen Mikroorganismen aufgebaut, die alle auf bestimmte Weise am Abbau der Naturstoffe beteiligt sind. Diese Lebensgemeinschaft setzt sich bei niederen Termiten im Allgemeinen aus Protozoen, Archaeen, Bakterien und Hefen zusammen. Wie alle Ökosysteme ist der Termitendarm ein offenes System das aus Zu- und Abgängen von Stoffen und Lebewesen besteht. Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war, einen Teil der Zusammenhänge zu klären. Das Hauptgewicht lag dabei im Wesentlichen auf den cellulolytischen Bakterien im Termitendarm und der Bewegungssymbiose des Flagellaten *Mixotricha paradoxa* mit assoziierten Spirochäten aus der australischen Termitenart *Mastotermes darwiniensis*. Aus den rezenten, niederen Termitenarten wurden sieben ausgewählt, um in ihrem Darm nach celluloseabbauenden Bakterien zu forschen. Die sieben Arten sind *Heterotermes indicola*, *Kalotermes flavicollis*, *Mastotermes darwiniensis*, *Neotermes castaneus*, *Reticulitermes santonensis*, *Schedorhinotermes intermedius* und *Zootermopsis angusticollis*.

1.1. Die Termiten

Wie so oft bei Insekten sieht der Mensch in der Termiten in erster Linie ein Schadinsekt, das für alle Holzbauten eine zerstörende Rolle spielen kann. Die wichtige Aufgabe der Termiten im Naturhaushalt bleibt dabei oft unbeachtet. In tropischen Gebieten zum Beispiel lockern sie die nährstoffarmen Böden auf, was ihnen eine ähnliche Bedeutung wie den hiesigen Regenwürmern zukommen lässt (König und Breunig, 1997). Der Name Termiten leitet sich aus dem griechischen „Τέρμα“ [Ende] ab. Die Römer verstanden unter „Termes“ ganz allgemein holzerstörende Tiere, die dem Holz durch ihre Nagetätigkeit „ein Ende bereiten“. Die wärme- und feuchtigkeitsliebenden Termiten (Ordnung Isoptera) schließen sich systematisch eng an die Schaben an, mit denen sie (zusammen mit den Gottesanbeterinnen oder Mantodea) die Ordnung der Dictyoptera bilden (Abbildung 1). Die Termiten

werden aber wegen ihres sozialen Verhaltens oft mit den Ameisen in Verbindung gebracht, weshalb die Termiten auch vielerorts seit dem Altertum als „weiße Ameisen“ bezeichnet werden. Dieser landläufig eingebürgerte Ausdruck lässt sich kaum noch ändern, obwohl sich Ameisen und Termiten, abgesehen vom Körperbau, in der Entwicklung, im Verhalten und in der Staatenbildung wesentlich voneinander unterscheiden. Termiten gehören im Gegensatz zu den Ameisen zu den hemimetabolen Insekten. Zum Termitenstaat gehört auch immer ein König, weshalb man ihn eine Elternfamilie nennt, während der Ameisenstaat immer eine Mutterfamilie darstellt (Sämtliche Termitenarten leben in geselligen Verbänden). Wie das Gesellschaftsleben der Termiten entstanden sein könnte, verrät uns eine nordamerikanische Schabenart, *Cryptocercus punctulatus*, die eine halbgesellige Lebensweise führt. Diese Schaben leben in losen Horden unter der Rinde von Bäumen und ernähren sich von Holz. Für den Celluloseabbau benötigen sie wie die niederen Termiten Flagellaten (Grizmek, 1968). *Cryptocercus* ist eine ursprünglich gebliebene Schabe, deren Darmflagellaten denen der urtümlichsten Termitenart *M. darwiniensis* gleichen (Cleveland *et al.*, 1934). Aufgrund weiterer phylogenetischer Verwandtschaften wurde *M. darwiniensis* sogar als das fehlende Glied zwischen Schaben und Termiten vermutet (Hennig, 1966). Doch spätere Studien der mitochondrialen rRNA widersprachen dieser Einteilung. Sie gehen davon aus, dass die Ähnlichkeiten zwischen *Cryptocercus punctulatus* und *Mastotermes darwiniensis* aufgrund der ähnlichen Lebensweise und des analogen Lebensraumes entstanden sind (Kambhampati, 1995). Ein anderes Ergebnis zeigt eine neuere Untersuchung, die sich mit den Genen der 18S rRNA, der zweiten Untereinheit der mitochondrialen Cytochromoxidase (COII) und der endogenen Endo- β -1,4-Glukanase befasst. Laut diesen Untersuchungen stammen die Termiten von holzfressenden Schaben ab (Abbildung 1) (Lo *et al.*, 2000). Abbildung 1 vermittelt nun aber nicht das Bild, dass *Mastotermes darwiniensis* die ursprünglichste Termitenart ist, da *Microhodotermes viator* fast die gleiche phylogenetische Distanz zu den anderen Arten zeigt. Die Erklärung liegt in den verschiedenen Parametern, die von den jeweiligen Forschern für die Erstellung von Stammbäumen gewählt wurden. In einigen Arbeiten wurden übereinstimmende morphologische Merkmale wie fünfgliedrige Tarsen, Analfeld der Flügel, die Eiablage in Paketen (Krishna, 1970; Thorne und Carpenter, 1992) und die Integration von *Flavobakterien*-ähnlichen Endosymbionten während der Larven-

entwicklung in spezielle Zellen der Fettkörper (Bandi *et al.*, 1995; Sacchi *et al.*, 1998) als Indizien für die enge Verwandtschaft von *Mastotermes darwiniensis* und Schaben angesehen. In Abbildung 2 sind Merkmale wie 2-fach segmentierte Cerci, das Vorkommen einer Soldatenkaste und aufwärts gedrehte Mandibeln für die Einordnung in den Stammbaum verantwortlich (Myles, 1999). Lo *et al.* (2000) wählten für ihre Untersuchung relativ konservierte Gene, deren Vergleich wiederum einen anderen phylogenetischen Baum hervorbrachte (Abbildung 1). Diese kleine Aufzählung spiegelt die Probleme der neueren Erforschung der Phylogenie wieder, bei der nur ein Vergleich von Stammbäumen derselben Parameter eine gewisse Sicherheit zu erreichen scheint.

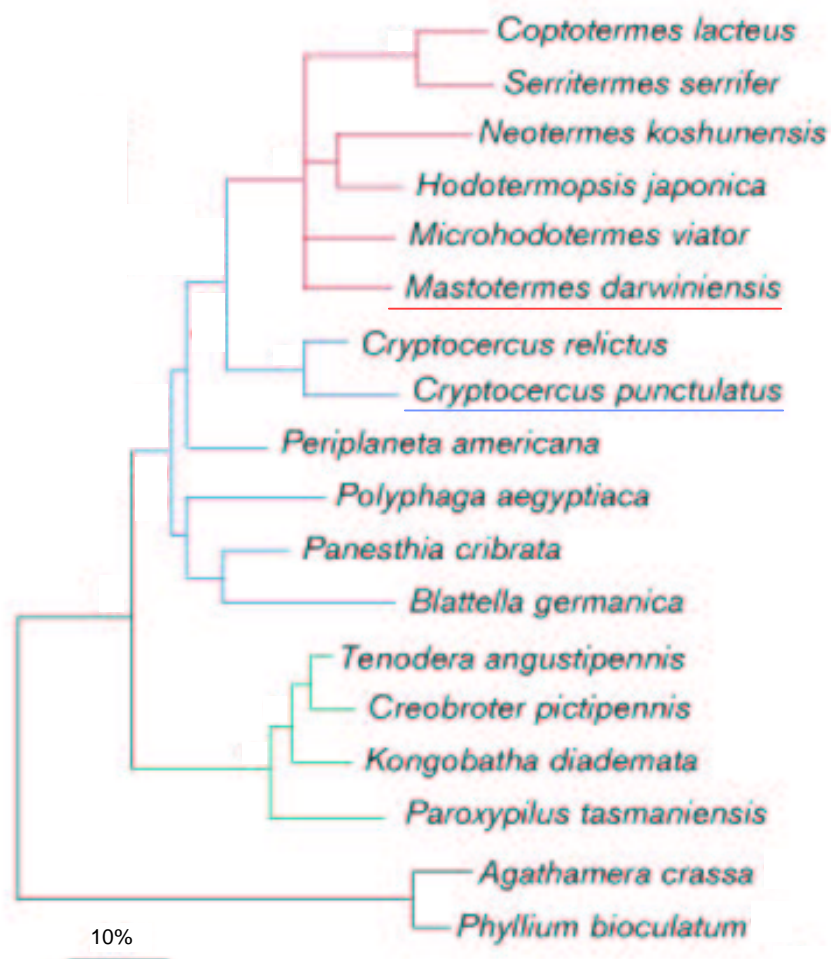


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum von Vertretern der Dictyoptera

Der Baum ist durch die kombinierte Analyse der 18S rDNA und der COII entstanden. Als Stammbaumprogramme wurden Maximum Likelihood und Maximum Parsimony verwendet. Die roten Äste zeigen Vertreter der Termiten, die blauen der Schaben und die grünen der Gottesanbeterinnen. Als Außengruppe wurden die zwei Gespenstschrecken *Agathamera crassa* und *Phyllium bioculatum* gewählt. Der Maßstrich repräsentiert 10% Sequenzunterschied (Lo *et al.*, 2000).

Die stammesgeschichtliche Entwicklung der Termiten hat schon relativ früh begonnen. Während *Homo sapiens* höchstens einige hunderttausend Jahre alt ist und die Bienen und Ameisen „erst“ vor fünfzig Millionen Jahren auftraten, lässt sich die Entwicklung der Termiten über 300 Millionen Jahre zurückverfolgen (Emerson, 1965). Als urtümlichste Familie werden die Mastotermitidae angesehen (Abbildung 2). Sie waren in den frühen Abschnitten des Tertiärs, vor vierzig bis sechzig Millionen Jahren, noch weltweit verbreitet. Heute gibt es nur noch eine Art, die im tropischen Norden von Australien beheimatete *Mastotermes darwiniensis*. Durch unterirdische Gänge befällt diese Termitenart Pflanzen, Bäume und Bauholz. Ihr Speisezettel ist außerordentlich vielseitig (Allesfresser) (Grizmek, 1968). Für die vorliegende Arbeit wurden allerdings nur Tiere von *M. darwiniensis* verwendet die auf Holz lebten.

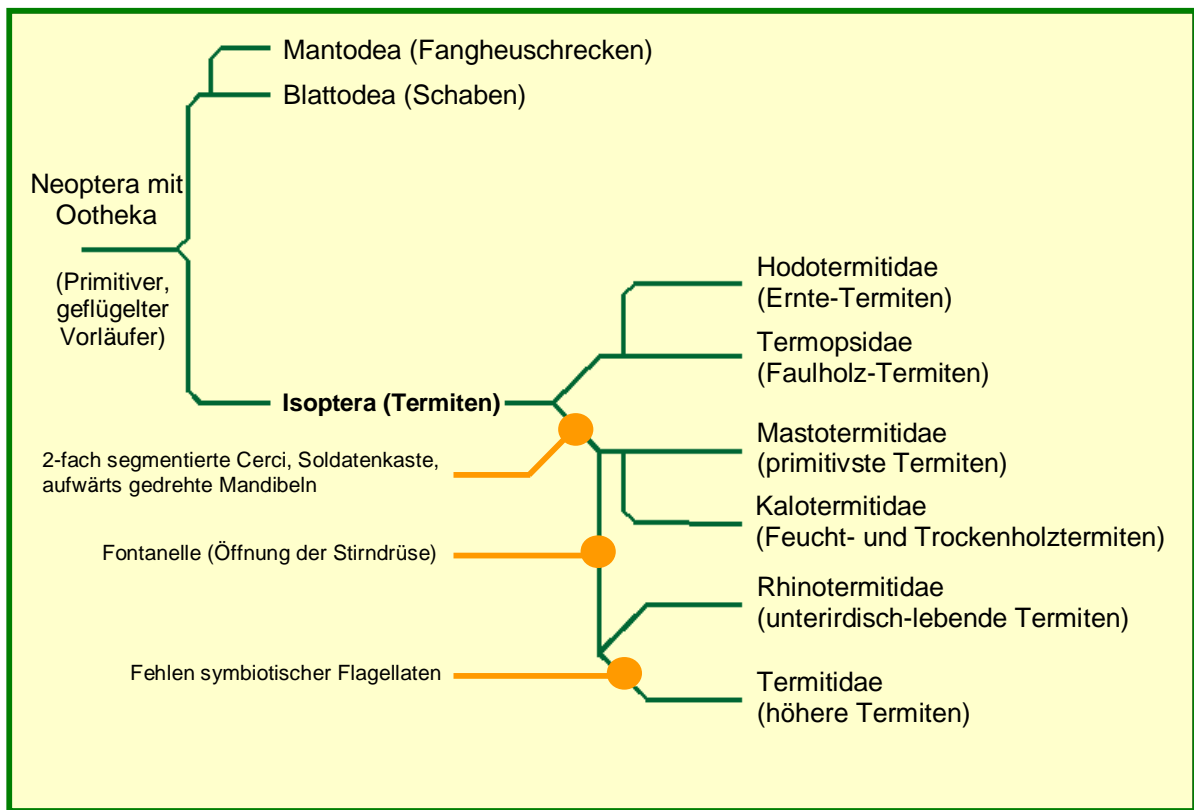


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Termitenstammbaumes (Myles, 1999) (Entnommen: <http://www.utoronto.ca/forest/termite/termite.htm>).

Eine andere in der vorliegenden Arbeit untersuchte Termitenart war *Kaloterme flavicollis*. Die Familie der Kalotermitidae hat eine recht einfache Gesellschaftsordnung. Diese Trockenholztermiten leben, vorwiegend in kleinen Kolonien (etwa 3000 Einwohner), unmittelbar im Holz das somit gleichzeitig als Nahrung und als Wohnung dient. Die meisten Mitglieder dieser Familie kommen in Küstengebieten und auf Inseln vor. *Kaloterme flavicollis* (Gelbhalstermite) lebt an den Mittelmeerküsten in Weinstöcken und alten Bäumen, dabei dringt sie nur selten in Häuser ein. Auch die ebenfalls in dieser Studie erforschte Art *Neoterme castaneus* gehört zu dieser Familie.

Zur Familie der Termopsidae gehört *Zootermopsis angusticollis* (Abbildung 3). Diese Termitenart kommt an der Westküste von Nordamerika vor.



Abbildung 3:
Zootermopsis angusticollis
(Arbeiter und Jungtiere)
(Entnommen:
www.utoronto.ca/forest).

Die beiden Termitenarten *Heterotermes indicola* und *Reticulitermes santonensis* gehören zu den Heterotermitinae. *Reticulitermes* lebt nur in nördlichen gemäßigten Zonen, während *Heterotermes* in den Tropen und den Subtropen beheimatet ist.

Die letzte untersuchte Termitenart ist *Schedorhinotermes intermedius*. Sie gehört zu den Rhinotermitidae und ist in den Tropen außerhalb Südamerikas beheimatet (Grizmek, 1968).

Alle in dieser Studie untersuchten und oben genannten Termiten gehören zu den niederen Arten, die etwa $\frac{1}{4}$ der gesamten Termitenpopulation ausmachen. Den weitaus größten Anteil haben die höheren Termiten (Familie Termitidae) mit

derzeit 1958 bekannten Arten (Myles, 1999). Sie unterscheiden sich von den niederen Termiten insbesondere durch das Fehlen symbiotischer Flagellaten.

1.2. Der Flagellat *Mixotricha paradoxa*

Im Darm der Termiten *Mastotermes darwiniensis* existiert eine artenreiche Mikroflora bestehend aus Flagellaten, Archaeen, Bakterien und Hefen. Defaunierungsexperimente deuteten darauf hin, dass die Protozoen für das Überleben der Termiten essentiell sind (Veivers *et. al.*, 1983). Aber einige neuere Versuche zeigten, dass einige Termitenarten unter Umständen auch nur mit ihrer Flora aus Bakterien und Hefen überleben können (Branke, 1997; Kuhnigk, 1996). Im Darm von *Mastotermes darwiniensis* gibt es sechs verschiedene Flagellatenarten, *Mixotricha paradoxa*, *Koruga bonita*, *Deltotrichonympha operculata* und *D. nana*, die zwischen 400 bis 500 µm groß werden können (Abbildung 4). Dagegen sind *Pentatrichomonoides scroa* und *Metadevescovina extranea* wesentlich kleiner (25-50 µm) (Berchtold, 1995). Geraume Zeit wurden die Flagellaten *M. paradoxa*, *P. scroa* und *M. extranea* zu den Trichomonaden zugeordnet, während *K. bonita*, *D. operculata* und *D. nana* als Hypermastigiden angesehen wurden. Untersuchungen von Fröhlich (1999) zeigten aber, dass die drei letztgenannten Flagellatenarten nahe mit den Trichomonaden verwandt sind.

Mixotricha paradoxa ist meistens der zahlenmäßig häufigste Einzeller in *Mastotermes darwiniensis*. Er ist von ovaler Gestalt, etwa 500 µm lang und 250 µm breit. Das hintere Ende des Flagellaten kann sehr stark in der Form variieren, je nach dem wie viel Nahrung eine Zelle aufgenommen hat. Die sogenannte Ingestionszone ist der Bereich am hinteren Ende, wo Holz, Bakterien und kleinere Protozoen als Nahrung aufgenommen werden. Er kann sich bei verschiedenen Flagellaten sehr stark in der Größe unterscheiden und reicht von einer sehr kleinen Region bis zur Hälfte der Zelle. Am vorderen Ende von *M. paradoxa* liegt die Papilla, eine mützenartige Struktur, die meistens heller als der restliche Flagellat erscheint. An der Zellspitze befindet sich ein tubuläres Axostyl, in dem sich der Zellkern befindet. Der Protozoe ist vollkommen mit Holz gefüllt, was ihn von den anderen großen Flagellaten im Termitendarm unterscheidet. *Deltotrichonympha spec.* und *Koruga bonita* enthalten nur im hinteren Teilbereich Holz (Abbildung 4).

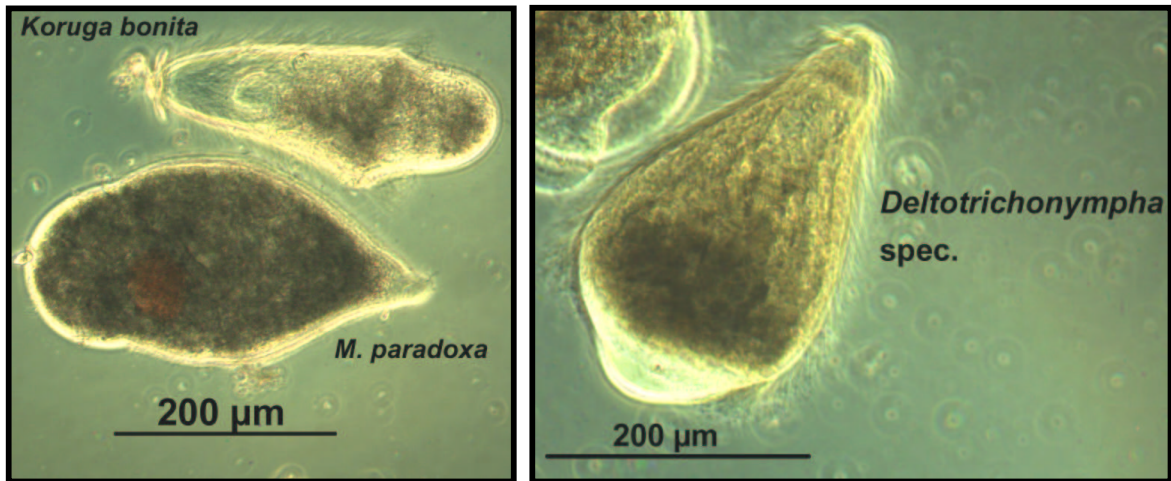


Abbildung 4: Die drei großen Darmflagellaten aus *M. darwiniensis*

Ähnlich wie das Schnabeltier bei den Mammalia ist *Mixotricha paradoxa* unter den Protozoen ein „Paradoxon“. Auf seiner Oberfläche befindet sich ein gleichmäßiger Bakterienrasen, der sich aus einem Bakterienstäbchen und morphologisch unterschiedlichen Spirochäten zusammensetzt, die den Organismus vorantreiben. Der Flagellat gilt als seltenes Beispiel einer Bewegungssymbiose und seine Spirochäten wurden in den dreißiger Jahren fälschlicherweise für Cillien gehalten (Sutherland, 1933).

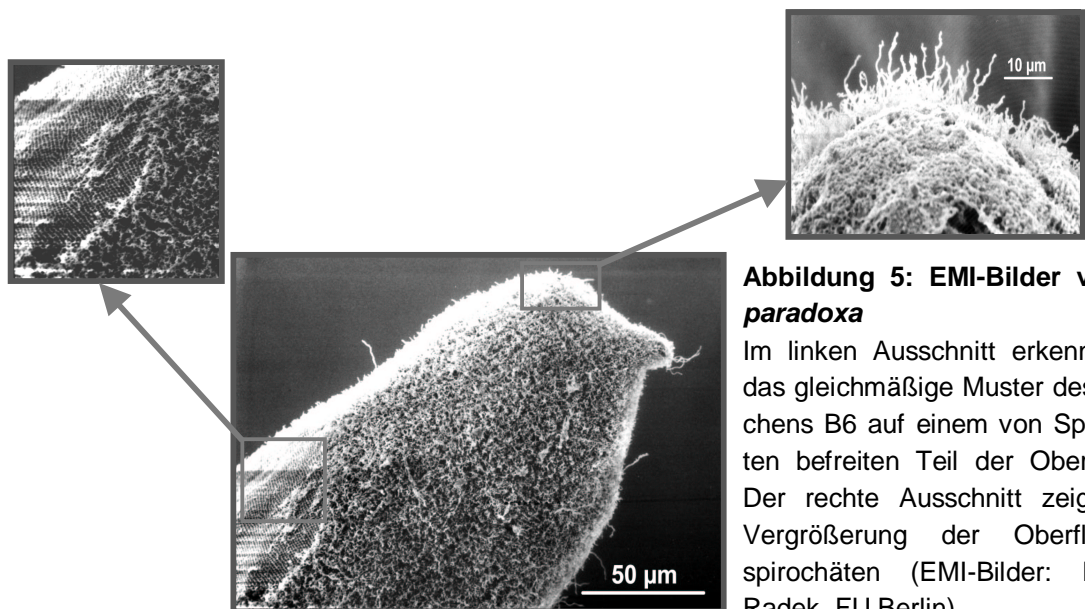


Abbildung 5: EMI-Bilder von *M. paradoxa*

Im linken Ausschnitt erkennt man das gleichmäßige Muster des Stäbchens B6 auf einem von Spirochäten befreiten Teil der Oberfläche. Der rechte Ausschnitt zeigt eine Vergrößerung der Oberflächen-spirochäten (EMI-Bilder: Renate Radek, FU Berlin).

Die Stäbchen und die Spirochäten sind in einem Muster von sogenannten „Brackets“ (Erhebungen) angeordnet, was als Grund für die koordinierte Bewegung der Spirochäten angesehen wird (Abbildung 6). Es sind immer 1-4 Spirochäten pro Erhebung angeordnet. In unregelmäßigem Abstand sind immer

wieder deutlich längere Spirochäten an die Oberfläche von *Mixotricha paradoxa* angeheftet, wobei diese nicht in den Brackets befestigt sind. Die Anzahl dieser Spirochäten kann von Zelle zu Zelle sehr stark variieren. Es scheint auch, dass sie kein Teil der Bewegungssymbiose sind. Obwohl *Mixotricha paradoxa* drei bis vier Flagellen besitzt, sind die Spirochäten für die Fortbewegung verantwortlich. Die Flagellen entspringen dem Bereich der Papilla und haben wahrscheinlich nur eine steuernde Funktion. Die Spirochäten sind nicht in der Lage den Flagellaten zu drehen, sie können mit ihrer Wellenbewegung *M. paradoxa* nur nach vorne und hinten bewegen (Cleveland und Grimstone, 1964).

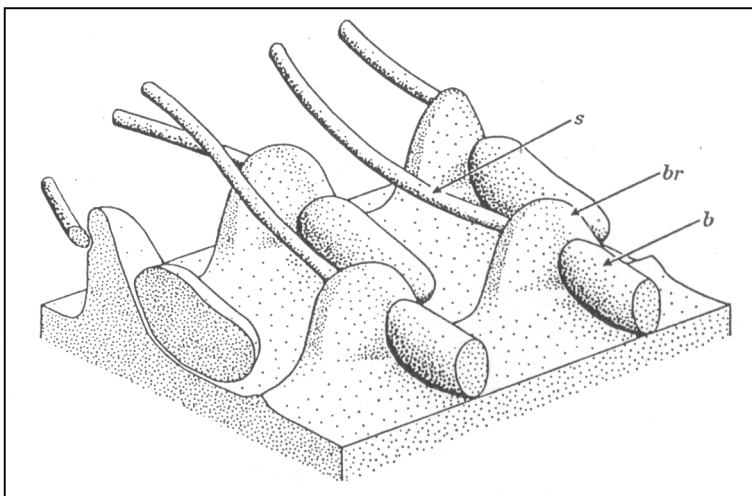


Abbildung 6:
Schema der Anordnung
von Spirochäten und des
Stäbchens in Erhebun-
gen (Brackets).

s Spirochät
 b Bakterium (Stäbchen)
 br Bracket (Erhebung)
 (Cleveland und Grimstone,
 1964)

Die Spirochäten bewegen sich in gleichmäßigen Wellenbewegungen, welche eine nach der anderen von vorne nach hinten gleiten und so die Zelle vorwärts bewegen. Es ist noch immer unklar, wie die Kommunikation zwischen dem Flagellaten und seinen assoziierten Bakterien über die Bewegungsrichtung stattfindet. In einer Studie von Machin (1963) wurde gezeigt, dass Strukturen wie Cilien, Flagellaten, Spermien und Spirochäten aus hydromechanischen Gründen automatisch ihre Bewegungen synchronisieren, wenn sie in enger Nachbarschaft angeordnet sind. Aber auch bei einer solchen Erklärung bleibt unklar, ob *Mixotricha paradoxa* die Bewegung in irgendeiner Weise initiiert oder ob der gesamte Ablauf zufällig geschieht. Bisher konnte keine dieser Spirochätenspezies außerhalb des Termitendarmes kultiviert werden, deshalb gibt es keine sicheren Beweise über ihre physiologische Rolle im Darm. Allgemein kommen Spirochäten immer in hoher Zahl in der Darmflora aller Termiten vor, selbst bei den höheren Arten, die in der Regel keine Flagellaten enthalten (Honigberg, 1970).

1.3. Spirochäten

Schon oberflächliche mikroskopische Untersuchungen der meisten Termitendärme zeigen 12-15 unterschiedliche Morphotypen von Spirochäten, die sich in Zelllänge, Durchmesser und Bewegungsbild unterscheiden (Abbildung 7) (Lilburn *et al.*, 1999). Spirochäten besitzen eine zelluläre Struktur, die unter Eubakterien unikal ist (Holt, 1978; Canale-Parola, 1991). Ihr helikaler, protoplasmatischer Zylinder ist von einer Außenhülle umgeben, die Ähnlichkeiten zu der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien aufweist. Die Spirochäten besitzen interne Bewegungsstrukturen (periplasmatische Flagellen), die zwischen dem protoplasmatischen Zylinder und der Außenschicht lokalisiert sind (Paster *et al.*, 1991). Seit ihrer Entdeckung von Leidy vor über 100 Jahren (Leidy, 1881) ist immer noch sehr wenig über ihre physiologische Rolle im Termitendarm bekannt. Eine der wenigen Ausnahmen erbrachten die Experimente von Leadbetter *et al.* (1999), dem es gelang zwei Spirochätenstämme zu kultivieren. Es konnte gezeigt werden, dass diese Spirochäten zu einer Homoacetogenese fähig sind (Leadbetter *et al.*, 1999). Eine solche Fähigkeit würde einen entscheidenden Beitrag zur Ernährung der Termiten bringen, deren Hauptenergiequelle Acetat darstellt (Breznak und Brune, 1994). Deshalb könnte dies eine Erklärung für ihr zahlreiches und regelmäßiges Vorkommen in Termitendärmen sein.

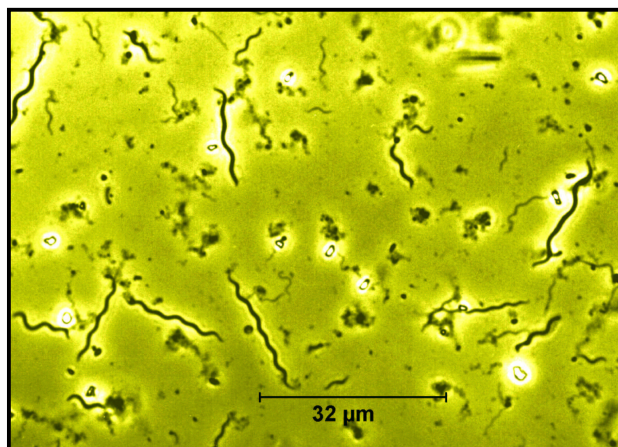


Abbildung 7: Freilebende Spirochäten aus dem Darm von *M. darwiniensis*

Es wurden bereits in früheren Arbeiten verschiedene 16S rDNA-Sequenzen von Spirochätenklonen aus dem Darm von *Mastotermes darwiniensis* veröffentlicht, die dem *Treponema*-Ast des Spirochätenclusters zugeordnet wurden (Berchtold *et al.*, 1994; Berchtold und König, 1996), dabei wurden die Spirochäten aber nicht lokalisiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden symbiotischen Spirochäten und das Stäbchen auf der Oberfläche von *Mixotricha paradoxa* untersucht. Dazu wurden verschiedene Methoden wie die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und semi-spezifische Polymerase-Kettenreaktion (PCR) angewandt. Eine besonders effektive Methode, um isolierten Sequenzen Organismen aus Mischkulturen zuordnen zu können, ist die FISH. Seit diese Methode von DeLong und seinen Mitarbeitern 1989 eingeführt wurde, hat sie sich vor allem auch durch den leichten Zugang zu 16S rRNA Sequenzen zu einer gängigen Standardmethode in vielen Labors entwickelt (Van de Peer *et al.*, 1998; Maidak *et al.*, 2000). Allerdings sind während der Arbeit mit Fluoreszenz markierten Sonden immer wieder Probleme mit ihrer Bindung an die 16S rRNA entstanden. Obwohl die Sonden spezifisch waren, gab es immer wieder Unterschiede in der Signalstärke. Man wusste dass die Zellwanddurchlässigkeit (Bidnenko *et al.*, 1998), die Anzahl der Ribosomen (Bindner und Liu, 1998; Fegatella *et al.*, 1998), die Bindung der rRNA mit den Proteinen der Untereinheiten und die Sekundärstruktur der rRNA Probleme bei der Anheftung der Sonden verursachen konnten. Um die genaue Wirkung der Sekundärstruktur auf das Bindungsverhalten von markierten Sonden zu untersuchen, wurde eine Studie mit ca. 170 Sonden mit verschiedenen Bindungspositionen auf der 16S rRNA durchgeführt. Getestet werden sollte ihre Bindung auf der 16S rRNA von *Escherichia coli* DSM 30083 (Abbildung 8). Das Ergebnis war, dass die Bindungsstärke der Sonde sehr stark von ihrer Position auf der 16S rRNA abhängig ist und dass dies bei der Sondenkonstruktion berücksichtigt werden sollte. Es zeigt sich auch, dass hochvariable Bereiche, die optimal für die Bindung einer spezifischen Sonde wären, oft Stellen sehr geringer Bindungsfähigkeit sind. Hierbei ist zu beachten, dass dieses Ergebnis sich nur auf *E. coli* bezieht und bei anderen Spezies ganz anders aussehen kann (Fuchs *et al.*, 1998).

Als weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Bindung von Sonden an die 16S rRNA erwies sich die Konstruktion von sogenannten Helfersonden. Dies sind unmarkierte Oligonukleotidsonden, die um die Position der markierten Sonde auf der 16S rRNA anbinden und so die Sekundärstruktur des Sondenbereiches auflösen (Abbildung 10) (Fuchs *et al.*, 2000).

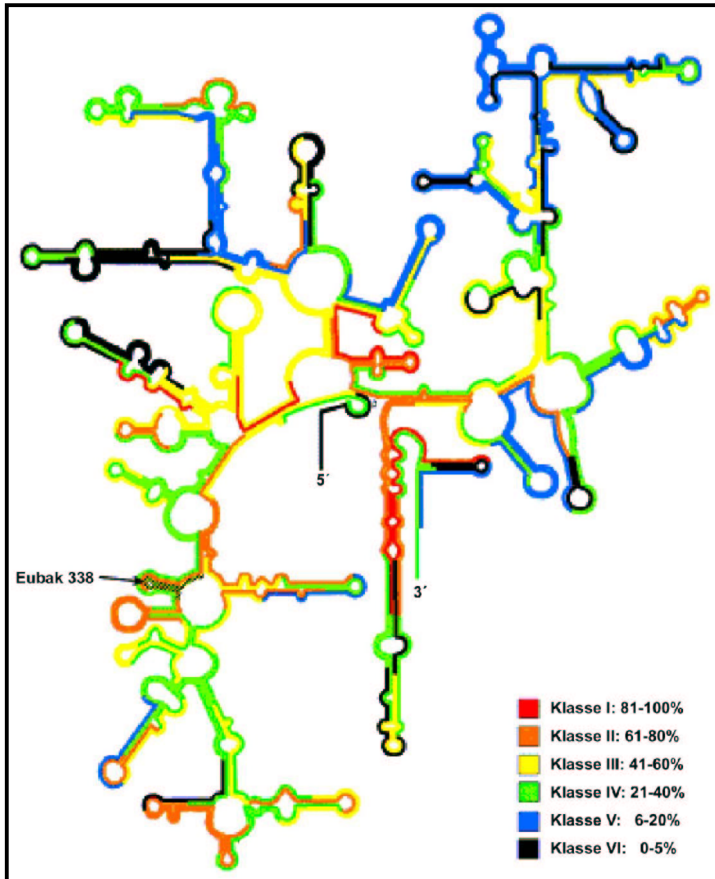


Abbildung 8: Fluoreszenzintensitäten von markierten Oligonukleotidsonden

Dargestellt ist die 16S rRNA von *E. coli* (Guttel, 1994). Die Stärken der Signale sind durch Farben in Klassen eingeteilt. Rote Sonden bilden die Klasse I und zeigen die Signalstärke von 81-100%. Schwarz zeigt hingegen nur 0-5% (Fuchs *et al.*, 1998).

1.4. Cellulolytische Bakterien im Termitendarm

Wie schafft es die Termiten so effizient Holz abzubauen? Neben der Bekämpfung der Termiten ist diese Frage das zweite große Thema der Termitenforschung. Anhand dieses Sachverhaltes wird erneut deutlich, wie nahe Schaden und Nutzen für den Menschen in der Natur zusammen liegen können.

Holz besteht hauptsächlich aus Cellulose, Hemicellulose und Lignin. Natürlich vorkommende Cellulose besteht zu einem großen Teil aus kristallinen Regionen, die nur schwer abbaubar sind, da die Wasserstoffbrückenbindungen in den Cellulosemolekülen partiell eng gepackte Kristalle bilden können. Diese Kristalle sind manchmal so stabil, dass sie weder durch Wasser noch durch die meisten Enzyme beeinflussbar sind, woraus auch die Wasserunlöslichkeit der kristallinen Cellulose resultiert. Exoglukanasen, die glukosidische terminale Bindungen angreifen, können kristalline Cellulose abbauen. Amorphe Cellulose, ebenfalls ein Teil von Holz, wird von Endoglukanasen leicht abgebaut. Aber selbst die einfachste Form des Celluloseabbaus, wie sie zum Beispiel in dem Pilz

Trichoderma viride abläuft, benötigt mindestens zwei verschiedene Enzyme. Der erste Schritt ist der Abbau von Cellulose zu Cellobiose, der von β -1,4-Glukanasen katalysiert wird, dann wird die Cellobiose mit Hilfe β -Glukosidasen zur Glukose degradiert (Bertran und Dale, 1985). Die Darmflora der Termiten bauen, w-möglich mit Unterstützung termiteneigener Cellulasen, die Cellulose mit einer Mischung aus Endo-, Exo-Glukanasen und Cellobiasen (Varma *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1998) zu Glukose ab. Der größte Teil der Glukose wird glykolytisch zu Pyruvat umgesetzt und anschließend in den sogenannten Hydrogenosomen zu Acetat, CO_2 und H_2 vergoren. Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid können von methanogenen bzw. homoacetogenen Bakterien zu Methan bzw. Acetat verarbeitet werden (Müller, 1993; Leadbetter *et al.*, 1999). Das freigesetzte Acetat, sowohl der Hydrogenosomen als auch der acetogenen Bakterien, kann nun in den Stoffwechsel der Termiten absorbiert werden (Breznak und Brune, 1994). Wie oben erwähnt sind die Flagellaten hauptsächlich für den Celluloseabbau bei niederen Termiten verantwortlich, während es bei höheren Termiten keine symbiotische Flagellaten gibt. Manche Familien (Macrotermitidae) legen sich oft eigene Pilzgärten an und züchten sich somit eine Nahrungsquelle selbst. Auf diese Weise nehmen sie dann die Cellulasen zusammen mit den Pilzen auf (Rouland *et al.*, 1988). Sowohl bei höheren als auch bei niederen Termiten wurden in den Speicheldrüsen und im Darm termiteneigene, endogene Cellulasen wie Endo- β -1,4-Glukanasen bzw. β -1,4-Glukosidasen gefunden (Slaytor, 1992; Veivers *et al.*, 1982). In *Nasutitermes takasagoensis* enthielt hauptsächlich der Mitteldarm der Termiten die Endo- β -1,4-Glukanase (Tokuda *et al.*, 1997). Vor einiger Zeit wurde das erste Cellulasegen aus einer Termitenart sequenziert (Watanabe *et al.*, 1998). Zusätzlich konnten einige cellulolytische Bakterien aus verschiedenen Termitenspezies isoliert werden (Tabelle 1), viele Versuche blieben jedoch erfolglos (Cleveland, 1924; Dickman, 1931; Hungate, 1936; Schultz und Breznak, 1978). Deswegen wurde vermutet, dass Bakterien im Holzabbau von Termiten keine große Rolle spielen (Slaytor, 1992).

Tabelle 1: Bisher bekannte cellulolytische Bakterien aus dem Termitendarm
Dargestellt sind cellulolytische Bakterien aus früheren Arbeiten und die Termiten, aus denen sie isoliert wurden. Die Einteilung der Organismen in die einzelnen Zweige wurde von Tabelle 4 übernommen.

Bakterien	Termiten	Referenzen
I. Actinomycetenweig <i>Arthrobacter</i> spec. <i>Micrococcus luteus</i> <i>Micrococcus roseus</i> <i>Micromonospora acetiformici</i> <i>Micromonospora propionici</i> <i>Micromonospora</i> spec. <i>Streptomyces</i> spec.	<i>Reticulitermes hesperus</i> <i>Reticulitermes hesperus</i> <i>Reticulitermes hesperus</i> <i>Reticulitermes lucifugus</i> var. <i>santonensis</i> <i>Amitermes minimus</i> <i>Odontotermes icrotermes</i> <i>Macrotermes amitermes</i>	Thayer, 1976 Saxena <i>et al.</i> , 1993 Saxena <i>et al.</i> , 1993 Sebald und Prévot, 1962 Hungate, 1946 Pasti und Belli, 1985 Pasti und Belli, 1985
II. Clostridienweig <i>Bacillus cereus</i> <i>Clostridium</i> spec. <i>Clostridium termitidis</i> <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Reticulitermes hesperus</i> <i>Amitermes minimus</i> <i>Nasutitermes lujae</i> <i>Odontotermes obesus</i>	Thayer, 1976 Hungate, 1946 Hethener <i>et al.</i> , 1992 Paul <i>et al.</i> , 1986
III. Proteobacteria <i>Serratia marcescens</i>	<i>Reticulitermes hesperus</i>	Thayer, 1976

Zusätzlich zu den Cellulosekristallen erschwert Lignin den Holzabbau. Bei der gewerblichen Holzverarbeitung werden Holzstücke bei annähernd 160°C mit Säure oder Sulfitlaugen behandelt, um Hemicellulose und Lignin von der Cellulose abzulösen, bevor sie mit einer Mischung von cellulolytischen Enzymen behandelt werden (Grethlein, 1978). Lignin besteht aus Phenylpropanresten, die aus Carbon- und Etherbindungen aufgebaut sind. Das komplexe Polymer ist sehr resistent gegen mikrobiellen Abbau. Ein anaerober Abbau von Lignin konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden (Zeikus *et al.*, 1982). Um den Ligninabbau in Termiten zu untersuchen, wurde in verschiedenen Studien der Abbau von Ligninmonomeren, anderen aromatischen Verbindung und dimeren Lignin-Modellschubstanzen untersucht (Kuhnigk *et al.*, 1994; Brune *et al.*, 1995a). Es konnten mehrere Bakterienstämme aus den niederen Termiten *Mastotermes darwiniensis* und *Reticulitermes santonensis* und der höheren Termiten *Nasutitermes nigriceps* isoliert werden, die in Selektivmedien mit aromatischen

Verbindungen bei Anwesenheit von Sauerstoff gewachsen waren. Dies deutet darauf hin, dass ein großer Teil der bakteriellen Flora im Termitendarm unter aeroben Bedingungen aromatische Verbindungen aus Holz abbauen kann. Im Gegensatz zu bisher geltenden Ansichten herrscht im Termitendarm ein Sauerstoffgradient, der durch eine ständige Diffusion durch das Darmepithelium aufrechterhalten wird (Brune *et al.*, 1995b; Berchtold *et al.*, 1999). Dies erklärt auch die Anwesenheit strikt aerober Organismen wie *Pseudomonas aeruginosa* im Darm von *Mastotermes darwiniensis* (Kuhnigk *et al.*, 1996). Trotzdem ist es fraglich, ob im Termitendarm polymeres Lignin in einem größeren Umfang verwertet wird, da die Darmpassage des Holzes nur etwa 24 Stunden dauert (Breznak, 1984). Dieser Zeitraum erscheint für den Abbau eines solch komplexen Polymers sehr gering. Es ist wahrscheinlicher, dass holzassoziierte Mikroorganismen während des Verdauungsvorgangs schon einen Vorabbau des Lignins betreiben, der dann außerhalb des Darms zusammen mit anderen Organismen fortgesetzt wird. Durch die Koprophagie der Termiten könnten auf diese Weise die Zwischenprodukte des Ligninabbaus im Termitendarm weiterverwertet werden (Kuhnigk und König, 1997).

Hemicellulose, der dritte Hauptbestandteil von Holz, ist ebenfalls chemisch komplex. Es besteht aus verschiedenen Heteropolysacchariden wie Arabinan, Galaktan, Glukan, Mannan und Xylan. In verschiedenen Termiten konnten Hemicelluloseabbauende Bakterien und Hefen nachgewiesen werden (Breznak und Brune, 1994; Varma *et al.*, 1994; Schäfer *et al.*, 1996). Hierbei konnten Vertreter von *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Ochrobactrum* u.a. auf Xylan oder Arabinogalactan isoliert werden (Schäfer *et al.*, 1996).

2. Material und Methoden

2.1. Geräte und Hilfsmittel

- Agarose-Minigelelektrophorese-Einheit (Bio-Rad Laboratories, Krefeld)
- Anaerobenzelt (Töpffer, Lab Systems, Göppingen)
- Bildbearbeitung: Visitron Digital Microscopy Imaging System (Visitron Systems GmbH, Puchheim), iPhotoplus, (Version 1.2, Ulead Sys., Inc., Hamburg), Adobe Photoshop 5.0 (Adobe Systems GmbH, Unterschleißheim)
- Branson Sonifier 250, (Branson Ultrasonics Corp., Genf, Schweiz)
- Dias: Agfachrome 1600RS Farbfilm (Belichtungszeiten: 0.2 s für Phasenkontrast und 4-16 s für Fluoreszenz)
- EDV: PC mit Betriebssystem Windows NT 4.0 und Microsoft Office 97, Scanner Mustek paragon 1200 SP (Mustek GmbH, Neuss), Clustal X-Sequenzalignmentprogramm (Thompson *et al.*, 1994), Phylip-Package (Felsenstein, 1993)
- Datenbanken:
 - Nukleotide: EMBL (http://www.ebi.ac.uk/ebi_home.html)
 - GenBank (<http://golgi.harvard.edu/genbank.html>)
 - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
 - RDP (<http://www.cme.msu.edu/RDP/html/index.html>)
 - Literatur: Current Contents (<http://www.library.ucsf.edu/db/cc.html>)
 - HeBis (<http://webcbs.rz.uni-frankfurt.de/webopc-bin/nph-wwredir/kiwi.rz.uni-frankfurt.de:40813/>)
 - PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>)
 - Organismen: DSMZ (<http://www.dsmz.de>).
- Filterpapierstreifen (MN616, Macherey & Nagel, Düren)
- Fluoreszenzmikroskop Axiophot 2 (Zeiss, Göttingen) mit Filter: Anregung: 550 nm, Emission: 610-675 nm, Objektive: Zeiss 10, 20, 40, 100
- Geldokumentationseinheit (Polaroid, Offenbach), Bedienungssoftware (Intas, Göttingen)
- Hybridisierungsofen (Hybaid, Heidelberg)
- Objektträger (Epoxid-beschichtet, Ø 5 mm Vertiefungen) (Menzel-Gläser, Braunschweig)
- Thermocycler (Progene, Thermo-Dux, Wertheim)

- Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)
- UV-Detektor BT 3030 (Biotronik, Berlin)
- Vortexer (IKA-Minishaker MS2, Ika-Werke GmbH & CO. KG, Stauffen)
- Zentrifuge 5403 (Eppendorf, Hamburg)

2.2. Chemikalien

- Acetat 96%ig (Roth, Karlsruhe)
- Agarose (PeqLab, Erlangen)
- 4-Aminobenzoessäure (Fluka, Neu-Ulm)
- Ampicillin (Fluka, Neu-Ulm)
- Bactoagar (Difco, Detroit)
- Biotin (Fluka, Neu-Ulm)
- Borsäure (Roth, Karlsruhe)
- Bromphenolblau (Merck, Darmstadt)
- Calciumcarbonat (Merck, Darmstadt)
- Calciumchlorid x 2 H₂O (Fluka, Neu-Ulm)
- Carboxymethylcellulose (Sigma, München)
- Cobaltsulfat x 2 H₂O (Merck, Darmstadt)
- Cyanocobalamin (Sigma, München)
- DABCO (Sigma, München)
- Dichlordimethylsilan (Fluka, Neu-Ulm)
- Dikaliumhydrogenphosphat (Fluka, Neu-Ulm)
- DL-Liponsäure (Sigma, München)
- Dinatriumhydrogenphosphat (Fluka, Neu-Ulm)
- EDTA (Fluka, Neu-Ulm)
- Ethanol (Roth, Karlsruhe)
- Ethidiumbromid: 1%ige Stammlösung 10 mg/ml (Roth, Karlsruhe)
- Fleischextrakt (Merck, Darmstadt)
- Folsäure (Sigma, München)
- Formamid, deionisiert (Roth, Karlsruhe)
- Glukose (Roth, Karlsruhe)
- Glycerin (Fluka, Neu-Ulm)
- Hefeextrakt (Gibco-BRL, Eggenstein)
- Isopropanol (Roth, Karlsruhe)

- Kaliumdihydrogenphosphat (Fluka, Neu-Ulm)
- Kaliumchlorid (Fluka, Neu-Ulm)
- Kalium-Aluminium-Sulfat (Merck, Darmstadt)
- Kupfersulfat x 5 H₂O (Sigma, München)
- Magnesiumchlorid (Fluka, Neu-Ulm)
- Magnesiumsulfat x 7 H₂O (Sigma, München)
- Mangansulfat x H₂O (Sigma, München)
- Malzextrakt (Merck, Darmstadt)
- Natriumacetat (Fluka, Neu-Ulm)
- Natriumascorbat (Fluka, Neu-Ulm)
- Natriumchlorid (Fluka, Neu-Ulm)
- Natriumdihydrogenphosphat (Fluka, Neu-Ulm)
- Natriumdodecylsulfat (SDS) (Fluka, Neu-Ulm)
- Natriumhydroxid (Fluka, Neu-Ulm)
- Natriummolybdat 2 H₂O (Merck, Darmstadt)
- Natriumnitrat (Roth, Karlsruhe)
- Nikotinsäure (Fluka, Neu-Ulm)
- Pantothersäure (Sigma, München)
- Pepton (Fluka, Neu-Ulm)
- Phosphorsäure (Merck, Darmstadt)
- Pyridoxamin x HCL x H₂O (Sigma, München)
- Riboflavin (Sigma, München)
- Salzsäure 25%ig (Fluka, Neu-Ulm)
- Stickstoff (Linde, Kostheim)
- Thiamindichlorid (Sigma, München)
- Thiamin/HCl (Fluka, Neu-Ulm)
- Titriplex I (Merck, Darmstadt)
- Tris/HCL (Roth, Karlsruhe)
- Trypton (Difco, Detroit)
- Vitamin B12 (Fluka, Neu-Ulm)
- Wasser: Milli RO & Q Plus (Millipore, Eschborn) *
- Wasserstoff (Linde, Kostheim)
- Zinksulfat x 7 H₂O (Fluka, Neu-Ulm)

* Das benutzte Reinwasser wurde durch eine Millipore RO 30 plus-Anlage im Umkehrosmoseverfahren hergestellt. Das für die PCR benutzte Reinstwasser wird erhalten, indem man Reinwasser in einer zweiten Reinigungsstufe durch einen weiteren Umkehrosmoseschritt mit einer Millipore Milli Q plus-Reinstwasseranlage entionisiert.

2.3. Biochemikalien und Kits

- λ -DNA-Längenstandard (*Hind*III, *Eco*RI) (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- dNTP (PeqLab, Erlangen)
- Dynabeads DNA Direct™ Universal-Kit (DynaL Biotech GmbH, Hamburg)
- InstaGen™-Präparation (Bio-Rad Laboratories, Krefeld)
- Oligonukleotide (MWG, Ebersberg)
- Cy3 markierte Oligonukleotide (MWG, Ebersberg)
- QIA Gelextraction Kit (Qiagen, Hilden)
- QIA PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)
- Restriktionsenzyme *Bsu*RI und *Hind*III (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- TA Cloning Kit (Invitrogen, Groningen, Niederlande)
- *Taq*-Polymerase (Applied Biosystems, Weiterstadt)

Tabelle 2: Die bei der Identifizierung der Oberflächenbakterien von *M. paradoxa* eingesetzten Sonden, Helfersonden und Primer.

Sonden markiert mit dem Farbstoff Cy3	Sequenz (5'-3') der Sonde	Zielregion (16S rRNA Position) in Basenpaaren ^a	Zielorganismus ^b
B 27. 440	CTT ATT CTC CGG GTG GA	Eco 440-456	Spirochätenklon msp15
B 27.2	CCG GAC TCA AGC CGC G	Eco 647-661	Spirochätenklon msp15
B 27.481	GGC TTA TTC CCA CCC TAC	Eco 481-499	Spirochätenklon msp15
B 6.1	CCA GCG CGT GGA GCA T	Eco 455-470	<i>B. forsythus</i> ähnliches Bakterium B6
B 6.2	TCA TAC TCA AGG CAA CCA G	Eco 643-661	<i>B. forsythus</i> ähnliches Bakterium B6
Mp 1.999	TCT GCA CCT TTC CCC TG	Eco 999-1015	Spirochätenklon mp1
Mp 3.648	TTC CCA GAC TCC AGT CC	Eco 648-664	Spirochätenklon mp3
Mp 4.193	TTT CTT TAT CAG GCC ACA G	Eco 193-201	Spirochätenklon mp4
Mp 4.646	CTC CTA GAC TCA AGC TAC A	Eco 646-664	Spirochätenklon mp4
Mp 5.1020	CGT TTC CAG GCA GAC GC	Eco 1020-1032	Spirochätenklon mp5
Mpsp 15.1258	GCC CTT GCG GGT TCG C	Eco 1258-1273	Spirochätenklon msp 15
Mpsp 2. 647	TCC CAG ACT CTA GTC TCC	Eco 647-663	Spirochätenklon msp2
Sp 40-11.647	TCC ATG ACT CCA GTT ACA	Eco 647-663	Spirochätenklon sp 40-11
Sp 40-12.647	CGC CAT GCT TGC CGT AC	Eco 663-647	Spirochätenklon sp 40-12
Sp 40-7.441	GCC TTA TTC TTC GAA TGG	Eco 441-458	Spirochätenklon sp40-7
Sp 40-7.648	CCC AGA CTC AAG TCA CT	Eco 648-664	Spirochätenklone mp2 und sp40-7
Sp 40-8.1022	CTT GCG GGC CGG ATA TA	Eco 1022-1038	Spirochätenklone mp3 und sp40-8
Sp 5-17.1025	GGG ACG CAT TGC TGC G	Eco 1025-1040	Spirochätenklone sp 5-17
Sp 5-18.1	GCA GAG CAT TTC CTC CCT	Eco 457-476	Spirochätenklone mp5 und sp5-18
Sp 5-18. 647	TCC CGG GAC TCT AGT ATC G	Eco 647-663	Spirochätenklone mp5 und sp5-18

Unmarkierte Helfersonden			
A4.631	CAG TTT CTA ACG CAG TC	Eco: 631-647	Unspezifisch
A4.666	GAA TTC CAA CTC CCC C	Eco 666-681	Unspezifisch
A4.724	GTT CGC CTT CGC CAC	Eco 724-738	Unspezifisch
A4.750	GCC TCA GCG TCA GTC	Eco 750-764	Unspezifisch
B27.418	AGG ATT TTA CAA CCT TGC GG	Eco 418-438	Unspezifisch
B27.440 II	CTT ATT CTC CGG GTG GAA	Eco 440-457	Unspezifisch
B27.458	GCA TTC CCT CCC CGC	Eco 458-472	Unspezifisch
B27.473	TAC CGT CAT CGT CGG G	Eco 473-489	Unspezifisch
B27.490	GGG CTT ATT CCC ACC C	Eco 490-505	Unspezifisch
B27.506	CTG GCA CGT AAT TAG CCG	Eco 506-523	Unspezifisch
B6.623	TCA ATG GCA TTC TTA TCG	Eco 623-640	<i>B. forsythus</i> ähnliches Bakterium B6
B6.665	CGC ATT CCG CCT ACT T	Eco 665-678	<i>B. forsythus</i> ähnliches Bakterium B6
B6.721	AGC TGC CTT CGC AAT C	Eco 721-736	<i>B. forsythus</i> ähnliches Bakterium B6
B6.750	GTG CTT CAG TGT CAG T	Eco 750-766	<i>B. forsythus</i> ähnliches Bakterium B6
Mp1.1016	ATT ACT GCA ACA GCG CAT C	Eco 1016-1033	Unspezifisch
Mp1.978	ATG TCA AAC CCA GGT AAG GT	Eco 978-997	Unspezifisch
Mp2.586	GAC TTG CGT AAC CGC CT	Eco 586-602	Unspezifisch
Mp2.632	CAG TTT CCC GCG CAG T	Eco 632-647	Unspezifisch
Mp3.631	GCA GTT TCC AGC GCA G	Eco 631-646	Unspezifisch
Mp3.666	CCT GGA ATT CCA ACT GCC	Eco 666-683	Unspezifisch
Mp4.175	CCG ATA ACC ACA TCC GG	Eco 175-192	Unspezifisch
Mp4.203	CGG GGC CAA AGC CCC	Eco 203-217	Unspezifisch
Mp4.626	TTT TCA ACG CAG TCC GG	Eco 626-642	Unspezifisch
Mp4.666	ACC AGG AAT TCC AAC TAC	Eco 666-684	Unspezifisch

Mp5.1002	CTC TGC GCC CTC CGC	Eco 1002-1017	Unspezifisch
Mp5.1032	AGC ACC TGT GAT AGC GC	Eco 1032-1049	Unspezifisch
Sp40-7.420	AAA AGA ACT TTA CAA CCT TTC	Eco 420-440	Unspezifisch
Sp40-7.459	AGG GCA TTC CCT CCC C	Eco 459-472	Unspezifisch
Sp40-7.577	ACC GCC TAC GCG CCC	Eco 577-591	Unspezifisch
Sp40-8.1000	TCT CTA TAC CCT TCA CTG	Eco 1000-1021	Unspezifisch
Sp40-8.1038	ACC TGT GAC AGC GTC C	Eco 1038-1054	Unspezifisch
Sp40-8.982	CCA TGT CAA ACC CAG GTA	Eco 982-999	Unspezifisch
Primer			
B21.1271 (3´)	CCG CGT TCC GCT ATA CC	Eco 1288-1271	Spirochätenklone B21 und mp4
B27.450 (5´)	TCC ACC CGG AGA ATA AG	Eco: 440-456	Spirochätenklon mpsp15
MDS1.1258 (3´)	ATA CCC TCG CAG GCT CG	Eco 1258-1275	Spirochätenklon MDS1
mp1.195 (5´)	CCT TGC AAA GAA AGG GGC TTA	Eco 195-210	Spirochätenklon mp1
mp2.128 (5´)	GTA ATC TAC CCT CCG GGT	Eco 128-144	Spirochätenklon mp2
mp3.187 (5´)	ACA GGG CAA TGG TCT TG	Eco 187-195	Spirochätenklon mp3
mp4.193 (5´)	CTG TGG CCT GAT AAA GAA A	Eco 193-201	Spirochätenklon mp4
mp5.69F (5´)	GCA AGT GCC AGC AAT GGT	Eco 69-85	Spirochätenklon mp5
Mpsp15.129 (5´)	TGA CCT GCC CTA GAG G	Eco 129-144	Spirochätenklon mpsp15
Sp 40-2.648 (3´)	TCC CAG ACT CCA GTT ATA	Eco 648-665	Spirochätenklon sp 40-2
Sp 5-9.1022 (3´)	TCG CGG GAC GGA TAC C	Eco 1022-1037	Spirochätenklon sp 40-11

^a *Escherichia coli* Nummerierung (Brosius *et al.*, 1981).

^b Die Helfersonden können an verschiedene Organismen binden.

Tabelle 3: Spezifische Cy3- gefärbte Oligonukleotidsonden und ihre korrespondierenden Helfersonden (Tabelle 2).

Sonden markiert mit dem Farbstoff Cy3	Korrespondierende Helfersonden	Zielorganismus
B27.440	B27.418; B27.458; B27.473; B27.490; B27.506	Spirochätenklon mpsp15
B27.481	B27.418; B27.440II; B27.458; B27.506	Spirochätenklon mpsp15
B6.2	B6.623; B6.665; B6.721; B6.750	Stäbchen B6
mp1.999	mp1.978; mp1.1016	Spirochätenklon mp1
mp3.648	mp3.666; mp3.631	Spirochätenklon mp3
mp4.193	mp4.175; mp4.203	Spirochätenklon mp4
mp4.646	mp4.626; mp4.666	Spirochätenklon mp4
mp5.1020	mp5.1002; mp5.1032	Spirochätenklon mp5
mpsp2.647	sp40.7.577; B27.506; A4.666; A4.750	Spirochätenklon mp1
sp40-7.481	sp40-7.420; sp40-7.459; B27.473; B27.506 ;B27.490	Spirochätenklon sp40-7
sp40-7.648	sp40-7.577; A4.666; A4.724; A4.750; mp2.632; mp2.586	Spirochätenklon mp2
sp40-8.1022	Sp40-8.982; sp40-8.1000; sp40-8.1036	Spirochätenklon mp3
sp5-17.1025	sp5-17.1005; sp5-17.989; sp5-17.1041	Spirochätenklon sp5-17
sp5-17.441	B27.506; sp5-17.418; sp5-17.462; sp5-17.479	Spirochätenklon sp5-17
sp5-18.1	A4.443; A4.422; A4.477; A4.493	Spirochätenklon mp5
sp5-18.647	A4.631; A4.666; A4.727; A4.750	Spirochätenklon mp5

2.4. Puffer

Äquilibrierpuffer (FISH)

- Tris/HCl 20 mM
 - NaCl 900 mM
 - SDS 0,01 %
- pH 7.2

Hybridisierungs-Puffer (FISH)

- Tris/HCl 20 mM
 - NaCl 900 mM
 - SDS 0.01 %
 - Oligonukleotidsonde 2.5 ng/μl
- pH 7.2

Ladepuffer (Sambrook *et al.*, 1989, modifiziert) (bei -20 °C lagern)

- Tris/HCl (1 M) 3.2 ml
 - Glycerin (100 %) 3.5 ml
 - Reinstwasser 2.5 ml
 - eine Spatelspitze Bromphenolblau
- pH 8

1x PBS-Puffer

- NaH₂PO₄ 5 mM
 - Na₂HPO₄ 5 mM
 - NaCl 130 mM
- pH 7.4

10x PCR-Puffer (bei -20 °C lagern)

- Tris/HCl 100 mM
 - KCl 500 mM
- pH 8.3

Tris-Borat-EDTA-Puffer (10x TBE- Puffer)

- Tris/HCl 890 mM
 - Borsäure 890 mM
 - EDTA 20 mM
- pH 8

Waschpuffer (FISH)

- Tris/HCl 20 mM
 - NaCl 180 mM
 - EDTA 5 mM
 - SDS 0.01%
- pH 7.2

2.5. Lösungen

Antibleichlösung (bei -20 °C lagern)

- DABCO 233 mg
- Glycerin (100 %) 9 ml
- ad 10 ml 1x PBS

λ-DNA/ *EcoR*I-*Hind*III-Marker (bei -20 °C lagern)

- λ-DNA (*Eco*RI-*Hind*III restringiert)
(Konz. 0.5 mg/ml) 100 µl
- Ladepuffer 200 µl
- ad 500 µl Reinstwasser

Restriktionsansatz (10 µl)

- DNA-Lösung 3.0 - 7.0 µl
- 10x Restriktionspuffer 1.0 µl
- Rinderserumalbumin (BSA, 1mg/ml) 1.0 µl
- Restriktionsenzym (10 U/µl) 1.0 µl
- Reinstwasser 0 - 4.0 µl

Wolfs Mineralienelixier (Balch *et al.*, 1979) (bei +4 °C lagern)

• MgSO ₄ x 7 H ₂ O	3 g/l
• Titriplex I	1.5 g/l
• NaCl	1 g/l
• MnSO ₄ x 2 H ₂ O	0.5 g/l
• CoSO ₄ x 2 H ₂ O	0.1 g/l
• CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.1 g/l
• ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0.1 g/l
• CuSO ₄ x 5 H ₂ O	10mg/l
• KAl(SO ₄) ₂	10 mg/l
• H ₃ BO ₃	10 mg/l
• NaMoO ₄ x 2 H ₂ O	10 mg/l

Wolfs Vitamine (Balch *et al.*, 1979) (bei +4 °C lagern)

• Pyridoxamin x HCl x H ₂ O	10 mg/l
• Thiamindichlorid	5 mg/l
• Riboflavin	5 mg/l
• 4-Aminobenzoessäure	5 mg/l
• DL-Liponsäure	5 mg/l
• Pantothensäure	5 mg/l
• Biotin	2 mg/l
• Folsäure	2 mg/l
• Cyanocobalamin	0.1 mg/l
• Nicotinsäure	5 mg/l

2.6. Medien

Medium 1 (modifiziertes DSMZ-Medium 65)

• Hefeextrakt	40 mg/l
• Malzextrakt	100 mg/l
• CaCO ₃	2g/l
→ pH 7.2	

Medium 1a

Medium 1 + Filterpapierstreifen

Medium 1b

Medium 1 + 5 g CMC/l

Medium 2 (Stewart und Leatherwood, 1976)

- NaNO_3 1 g/l
 - K_2HPO_4 1 g/l
 - KCl 0.5 g/l
 - $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/l
 - Hefeextrakt 0.5 g/l
 - CMC 5 g/l
- pH 7.0

Medium 3

- Hefeextrakt 4 g/l
 - Malzextrakt 10 g/l
- pH 7.2

Medium 4 (Kuhnigk *et al.*, 1994)

- KH_2PO_4 6.9 mM
 - K_2HPO_4 10.8 mM
 - KCl 21.5 mM
 - NaCl 24.1 mM
 - $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 5.3 mM
 - $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 0.53 mM
 - Hefeextrakt 0.05 %
 - CMC 0.05 %
 - Wolfs Mineralienelixier 0.01 %
 - Wolfs Vitamine 0.01 %
- pH 7.2

Medium 5 (Kuhnigk *et al.*, 1994)

Siehe Medium 4 aber:

- Hefeextrakt 0.1 %
- CMC 0.1 %

Nutrient-Medium (Medium 1, DSMZ, 2001)

- Pepton 5.0 g/l
- Fleischextrakt 3.0 g/l

→ pH 7.0

→ Test auf Celluloseabbau: 2 g CMC/l (Carboxymethylcellulose), Zugabe nach der pH- Einstellung, Zutaten unter Rühren bis zur vollständigen Lösung kochen

Gym *Streptomyces*-Medium (Medium 65, DSMZ, 2001)

- Glukose 4.0 g/l
- Hefeextrakt 4.0 g/l
- CaCO₃ 10.0 g/l

→ pH 7.2

TSB- Medium

Das Tryptic Soy-Broth Medium und der Tryptic Soy-Broth Agar sind Vollmedien von Difco (Augsburg) und wurden nach Herstellerangaben angesetzt.

(Alle Medien wurden 20 min bei 121 °C autoklaviert. Die Vitaminlösung wurde sterilfiltriert und dann den Medien (bei RT) steril zugegeben)

2.7. Organismen

Die Termiten *Heterotermes indicola* (Wasman), *Kalotermes flavicollis* (Fabricius), *Mastotermes darwiniensis* (Froggatt), *Neotermes castaneus* (Burmeister), *Schedorhinotermes intermedius* (Isolieser) und *Zootermopsis angusticollis* (Hagen) wurden von der Bundesanstalt für Materialforschung und Materialprüfung BAM (Berlin) bezogen. *Reticulitermes santonensis* (Feytaud) wurde auf der Ile d'Oléron (Frankreich) gesammelt. Die Tiere lebten bei 28 °C auf Fichte-, Buchen- oder Pappelholz in mit feuchtem Vermiculit gefüllten Metallkannen.

Der Flagellat *Mixotricha paradoxa* wurde immer frisch aus dem Darm von *Mastotermes darwiniensis* präpariert.

2.8. Die cellulolytischen Bakterien

2.8.1. Isolierung und Kultivierung der cellulolytischen Bakterien

Die cellulolytischen Bakterien der vorliegenden Arbeit wurden nach drei verschiedenen Methoden isoliert. Die benutzten Medien sind unter Punkt 2.6. aufgeführt.

Methode 1: (durchgeführt von Inge Schöning, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Universität Mainz)

a) *Zootermopsis angusticollis* wurde für 22 Tage und *Kaloterme flavicollis* für nahezu 11 Monate auf Filterpapier kultiviert. Die Termiten wurden mit Ethanol (70%) oberflächensterilisiert und anschließend mit sterilem Reinwasser gewaschen. Die nun folgenden Schritte wurden unter axenischen Bedingungen durchgeführt. Von *Z. angusticollis* und *K. flavicollis* wurden jeweils 4 bzw. 10 Därme aus dem Abdomen entnommen. Die Darminhalte wurden in 1 ml Medium 1 suspendiert. Die Medien wurden entweder mit Filterpapierstreifen (Medium 1a) oder mit CMC (Medium 1b) angereichert. Nach mehreren Verdünnungsreihen wurden die einzelnen Medien solange bei 28 °C inkubiert, bis entweder die Papierstreifen deutliche Anzeichen von Zersetzung zeigten oder die gelatinisierte CMC sich verflüssigt hatte. Die gewachsenen Kulturen wurden nach wiederholten Verdünnungsreihen auf Agarplatten (Medien 2 und 3) erneut kultiviert. Vereinzelt Kolonien wurden wiederholt ausgestrichen und auf Agarplatten für fünf Tage bei 28 °C kultiviert.

b) *Zootermopsis angusticollis* wurde auf Holz kultiviert. Alle weiteren Schritte waren die gleichen wie bei Methode 1a.

Methode 2: *Mastotermes darwiniensis* wurde auf Holz kultiviert. Für die Isolierung der Darmbakterien wurden die Termiten mit Ethanol (70%) oberflächensterilisiert und mit sterilem 1x PBS-Puffer nachgespült. Das weitere Vorgehen geschah unter axenischen Bedingungen. Es wurden 10 Därme aus den Termiten präpariert, danach wurde der Inhalt in 10 ml 1x PBS-Puffer suspendiert. Nach der Sedimentation der großen Flagellaten und der Holzpartikel wurde der Überstand auf Agarplatten (Medium 2) verteilt und bei 28°C für 3-4 Tage inkubiert. Anschließend wurden einzelne Kolonien erneut ausgestrichen und wie oben beschrieben inkubiert.

Method 3: (Kuhnigk, 1996)

Um am Epithelium des Darmes lebende cellulolytische Bakterien ebenfalls isolieren zu können, wurden von jeder der unter 2.7 aufgeführten Termiten 10 Därme bei 4 °C in 10 ml sterilem 1x PBS-Puffer unter leichtem Ultraschall homogenisiert (Beschallungsdauer 1-2 min). Für die Bestimmung des Bakterientiters wurden die Medien 4 und 5 eingesetzt. Jedes Reagenzröhrchen enthielt einen 4 cm langen und 5 mm breiten Filterpapierstreifen. Das Inokulum wurde bei 28 °C für 2-4 Wochen inkubiert. Der Celluloseabbau konnte anhand des zersetzten Papierstreifens oder an der Verflüssigung der CMC erkannt werden.

Alle durch die Methoden 1-3 isolierten Bakterien wurden für die weiteren Untersuchungen entweder auf Gym *Streptomyces*-Medium (DSMZ, 2001), Nutrient-Medium (DSMZ, 2001) oder TSB-Medium kultiviert (Tabelle 4, 7).

2.8.2. Nachweis der glykolytischen Aktivität

Der Abbau von Cellulose durch die isolierten cellulolytischen Bakterien wurde auf CMC-haltigen Agarplatten (Medium 2, Stewart und Leatherwood, 1976 oder Gym *Streptomyces*-Medium, DSMZ, 2001) mit der Kongorot-Färbemethode getestet. Die Platten wurden mit einer Kongorotlösung übergossen, inkubiert und mit 1 M NaCl-Lösung nachgewaschen (Teather und Wood, 1983). Der Abbau von CMC konnte durch einen farblosen Hof um die Kolonie nachgewiesen werden. Zeigten die Kolonien einen Abbauhof, der größer als 4 mm war, wurden sie mit +++ bewertet, bei 1 – 4 mm mit ++. Waren die Höfe kleiner als 1 mm, aber immer noch deutlich zu sehen, wurden sie mit + bewertet (Tabelle 4). Die Bakterienisolate, die auf Medium 2 keinen Abbau zeigten, wurden zur Sicherheit auf CMC- Nutrient-Agarplatten (DSMZ, 2001) getestet, da theoretisch vermutet wurde, dass manche Spezies auf Medium 2 nicht wachsen konnten.

2.8.3. Nachweis der glykolytischen Aktivität, bei anaerober Kultivierung

Bakterien, die aeroben Celluloseabbau zeigten, wurden auf Medium1-Agarplatten mit CMC-Zusatz kultiviert und in einem Anaerobenzelt unter Stickstoffatmosphäre maximal 14 Tage bei 28°C kultiviert. Bei Wachstum wurden die Kolonien wie unter 2.8.2 beschrieben auf Celluloseabbau getestet (Tabelle 5).

2.8.4. 16S rDNA-Präparation der cellulolytischen Bakterien

Die DNA wurde nach einem modifizierten InstaGene™-Protokoll isoliert. Eine vereinzelte Kolonie wurde in 50 µl sterilem Reinstwasser suspendiert und mit 50 µl InstaGen™-Matrix bei 56 °C für 20 min inkubiert. Die Lösung wurde anschließend bei 95 °C für 10 min bei 15 000 rpm im Thermomixer geschüttelt. Durch die kollidierenden Glaskügelchen wurden die Bakterienzellen aufgebrochen und die DNA gelang in Lösung. Unlösliche Teile wurden bei 15 000 rpm abzentrifugiert, der Überstand mit der DNA wurde bei –20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.8.5. Sequenzanalysen der 16S rDNA

PCR:

Mit Hilfe der Eubakterien Primer Eubak 3 (5´- ATATATAAGCGGCCGCAGAAAG-GAGGTGATCC -3´, Eco: 1544-1529 bp) und Eubak 5 (5´-ATATATAAGCGGCCG-CAGAGTTTGATCATGCCTC-3´, Eco: 8-27 bp) (Hicks *et al.*, 1992) wurde die 16S rDNA in einer Touchdown-PCR amplifiziert. Jeder PCR-Ansatz (100 µl) enthielt 10 µl 10 x PCR-Puffer, 10 µl MgCl₂ (25 mM), 6 µl dNTP-Mix (2.5 mM), 4 µl von jedem Primer (10 pmol/µl), 0.3 µl *Taq* Polymerase (5 U/µl) und 2 µl DNA-Lösung. Das Temperaturprofil des Thermocyclers begann mit 10 Zyklen, zuerst der Denaturierungsschritt bei 94 °C für 1 min, dann die Primeranheftung bei 60°C für 1 min. Bei diesem Schritt wurde bei jedem Zyklus die Temperatur um 0.5 °C auf 55 °C erniedrigt (Newton und Graham, 1994). Zuletzt erfolgte die Elongation bei 72°C für 2.5 min. Die nächsten 20 Zyklen haben einen Denaturierungsschritt bei 94°C für 1 min, Primerannealing bei 60°C für 1 min und die Elongation bei 72°C für 2.5 min. Im letzten Zyklus wurde der Verlängerungsschritt auf 5 min bei 72°C verlängert, um der *Taq* Polymerase Zeit zu geben, die Elongation der letzten Stränge zu beenden. Die erhaltenen PCR Produkte wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

Restriktionsfragmentanalyse:

Der Restriktionsverdau der 16S rDNA wurde mit den Restriktionsenzymen *Bsu*RI (Schnittstelle GG↓CC) und *Hpa*II (Schnittstelle C↓CGG) durchgeführt. Jeder Reaktionsansatz enthielt 5 µl gereinigtes PCR-Produkt, 1 µl 10 x Reaktionspuffer, 1 µl BSA (Rinderserumalbumin, 1mg/ml), 0.3 µl Restriktionsenzyme (10 U/µl) und 2.7 µl steriles Reinstwasser. Die Lösung wurde für mindestens 4 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 5 µl der Lösung auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen und die

Fragmente in der Agarose aufgetrennt. Anhand der Restriktionsmuster konnten gleiche Stämme in Gruppen gefasst bzw. ungleiche Stämme unterschieden werden (Tabelle 4).

Sequenzierung:

Von jeder Gruppe wurde mindestens ein Vertreter teilweise mit dem Primer Eubak 1070F (5' ATGGCTGTCGTCAGCT`3, Eco: 1055-1070 bp) sequenziert. Die Direktsequenzierung wurde von der Firma Genterprise (Mainz) nach der Didesoxymethode von Sanger durchgeführt (Sanger *et al.*, 1977). In jedem Fall konnten etwa 400-450 bp sequenziert werden. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der 16S rDNA-Sequenz von Organismen aus der EMBL (Stoesser *et al.*, 2001) und der RDP Datenbank (Maidak *et al.*, 2000) verglichen.

2.8.6. Morphologische und physiologische Charakterisierung

Die cellulolytischen Bakterien wurden anhand von 87 physiologischen Merkmalen bestimmt. Zusätzlich wurde die Morphologie der Zellen und Kolonien festgestellt. Die Testprofile wurden mit der Methode einer numerischen Identifizierung in einer Datenbank verglichen (Kämpfer *et al.*, 1991, 1992) (Tabelle 4).

2.8.7. Zellzählung

Die Zellzählung wurde von Inge Schönig und Thomas Kuhnigk nach der MPN Methode durchgeführt (5 Replikationen; Näveke und Tepper, 1979).

2.9. Methoden zur Identifizierung der symbiotischen Oberflächenbakterien von *Mixotricha paradoxa*

2.9.1. Isolierung von *Mixotricha paradoxa*

Für die Isolierung der Flagellaten wurde *Mastotermes darwiniensis* mit Ethanol (70 %) oberflächensterilisiert und mit sterilem 1x PBS-Puffer nachgespült. Das weitere Vorgehen geschah unter axenischen Bedingungen. Der Darm wurde herauspräpariert und der Inhalt in 1 ml 1x PBS suspendiert. Die Lösung wurde nun für 1-2 Minuten bei RT in einem Reaktionsgefäß inkubiert, um durch Sedimentierung die großen Flagellaten von den Bakterien, den Hefen, den kleineren Flagellaten und den freien Holzpartikeln zu trennen. Der Überstand wurde verworfen und die

Flagellaten wurde in 1 ml 1x PBS-Puffer resuspendiert. Mit Hilfe von Kristallspitzen (Eppendorf, Hamburg) konnten nun einzelne Flagellaten unter dem Phasenkontrastmikroskop (100x Vergrößerung) abgesondert werden.

2.9.2. Präparation der Hüllen von *Mixotricha paradoxa*

Während der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung der Spirochäten und des Stäbchens auf der Oberfläche von *M. paradoxa* trat das Problem einer sehr starken Hintergrundfluoreszenz des Flagellaten auf. Es zeigte sich, dass das Holz im Inneren der Protozoen so stark fluoreszierte, dass die Fluoreszenz der spezifischen Sonden der Oberflächenbakterien nicht zu erkennen war. Um dies zu verhindern, wurde der Flagellat vom Holz befreit. Um den Organismus aufzuquellen, wurden die Flagellaten für etwa 10 min in 1x PBS Puffer inkubiert. Danach wurde mit einer 1000 µl Pipette die Lösung stark durchgemischt, wobei das Zellinnere im optimalen Fall nach außen gedrückt wurde, ohne die Hülle komplett zu zerstören. Die Suspension wurde erneut 2-3 min bei RT inkubiert, um die Hüllen sedimentieren zu lassen. Das Vereinzeln der Hüllen erfolgte wie oben beschrieben.

2.9.3. Präparation der DNA der Oberflächenbakterien

Die DNA-Präparation von *M. paradoxa*-Hüllen und den assoziierten Bakterien erfolgte nach zwei Methoden.

Methode 1: InstaGene™-Protokoll

Etwa 50 vereinzelt Flagellatenhüllen wurden zusammen mit 100 µl InstaGene™ Matrix bei 56°C für 20 min inkubiert. Anschließend wurde die Lösung für 5 min bei 99°C inkubiert und danach für 1 min bei 5000 rpm in einem Vortexer gemischt. Die unlöslichen Teile wurden dann bei 15 000 rpm in 1 min abzentrifugiert. Der Überstand mit der gelösten DNA wurde bei –20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Methode 2: Dynabeads DNA Direct-Kit (Präparation geschah gemäß dem Protokoll)

Die Bakterienzellen werden bei dieser Methode lysiert und die frei gewordene DNA wurde an die Oberfläche der Dynabeads adsorbiert. Der DNA-Dynabeads-Komplex wurde magnetisch getrennt und eventuell vorhandene PCR-Inhibitoren werden ausgewaschen (Abbildung 9). Die auf diese Weise gewonnene DNA wurde bei –20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

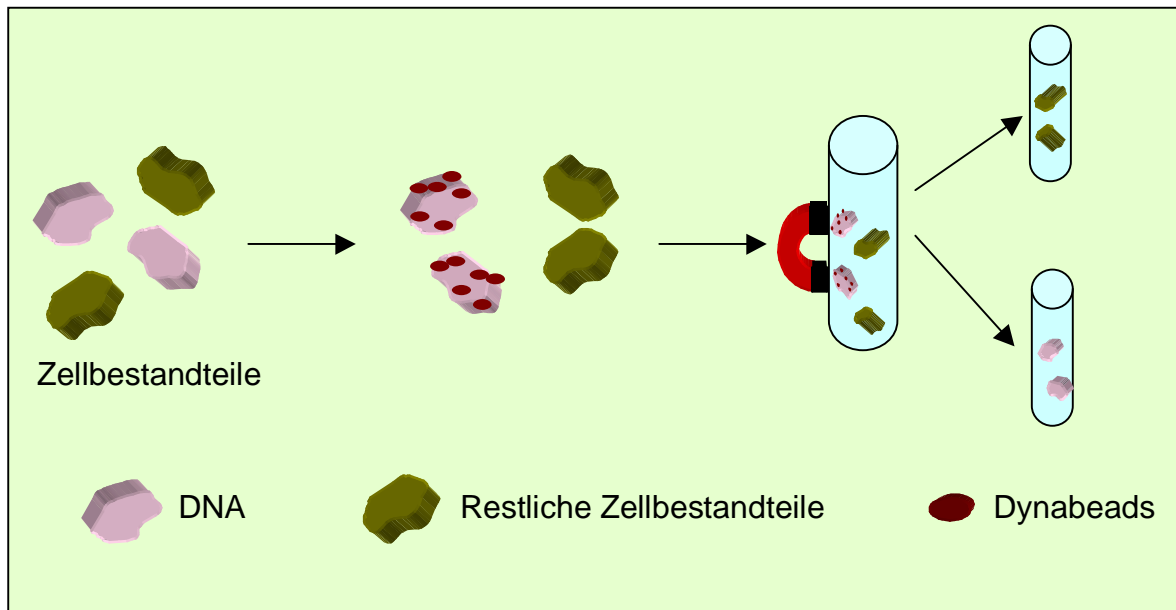


Abbildung 9: DNA-Aufreinigungsschema nach der Dynabeads-Methode

2.9.4. Sequenzanalyse der 16S rDNA mit semispezifischer PCR

Die 16S rDNA der Spirochäten und des Stäbchens von der Oberfläche von *M. paradoxa* wurden in einer semispezifischen PCR amplifiziert. Berchtold und König (1996) konnten eine Anzahl von mindestens 12 verschiedenen Spirochätenklonen aus dem Darm von *Mastotermes darwiniensis* isolieren. Anhand dieser Sequenzen wurden spezifische 3'-Primer für jeden dieser Organismen konzipiert (Tabelle 2). Jeweils einer dieser Primer wurde mit Eubak 5 als 5'-Primer und 2-10 µl der isolierten Flagellatenhüllen-DNA in eine PCR-Reaktion eingesetzt. Die PCR wurde wie im Punkt 2.8.5. beschrieben durchgeführt. Bei einem positiven PCR-Produkt wurde die Sequenzierung von der Firma Genterprise durchgeführt. Die Länge der sequenzierten Fragmente variierte nach der Annealingposition des Primers. Es wurden als Sequenzierprimer in 5'-Richtung jeweils Eubak 5 (5'-ATATATAAG-CG-GCCGCAGAGTTTGATCATGCCTC-3', Eco: 8-27 bp), Eubak 338F (5'-ACTCCT-ACGGGAGGCAG-3', Eco: 338-354 bp), Eubak 519F (5'-CAGCAGCCGCGGTAA-TA-3', Eco: 519-533 bp), Eubak 781F (5'-AACAGGATTAGATACCC-3', Eco: 781-797 bp) oder Eubak 1070F (5'-ATGGCTGTCGTCAGCT-3', Eco: 1055-1070 bp) benutzt (Amann *et al.*, 1990). Von den Organismen mp1, mp2, mp3, mp4, mp5 und mpsp15 konnten eindeutige Sequenzfragmente identifiziert werden. Von ihnen wurden spezifische 5'-Primer hergestellt (Tabelle 2), um zusammen mit dem 3'-Primer Eubak 3 in einer weiteren semispezifischen PCR (Reaktion siehe oben) das gesamte 16S rDNA-Gen des Bakteriums zu amplifizieren und zu sequenzieren (Anhang 7.3). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit 16S rDNA-Sequenzen von

anderen Organismen in der EMBL (Stoesser *et al.*, 2001) oder RDP Datenbank (Maidak *et al.*, 2000) verglichen.

2.9.5. Fluoreszenzoligonukleotidsonden (Amann *et al.*, 1990)

Zur Lokalisierung der Spirochäten wurden von verschiedenen Organismen spezifische Oligonukleotidsonden mit dem Farbstoff Cy3 (5-(6)-Carboxyfluorescein) am 5'-Ende synthetisiert. Alle Sonden sind in Tabelle 2 aufgeführt.

2.9.6. Helfersonden

Zur besseren Anheftung der Fluoreszenzsonden wurden für jede spezifische Cy3-Sonde mehrere unmarkierte, und deshalb nicht notwendigerweise spezifische Helfersonden synthetisiert (Tabelle 2,3).

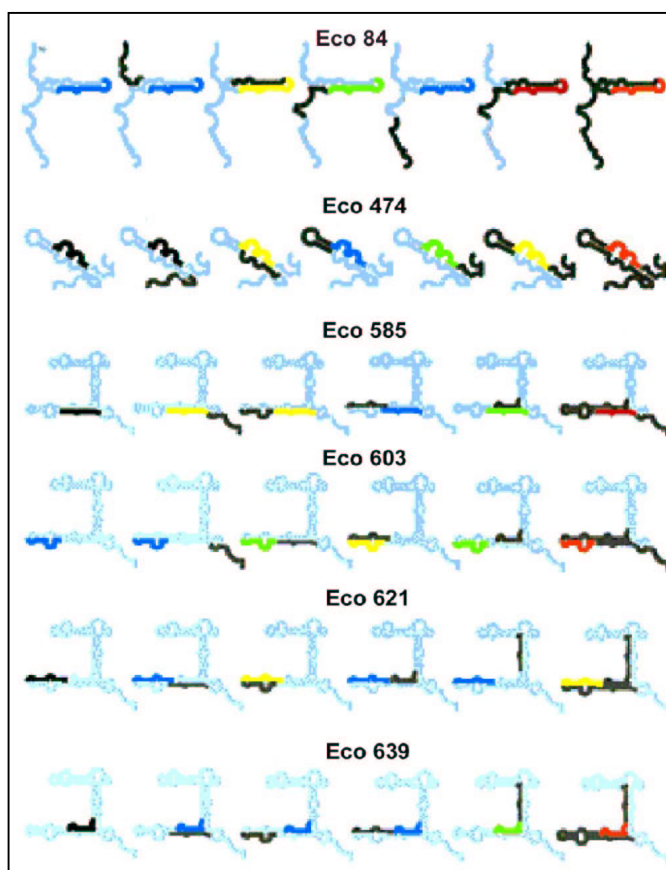


Abbildung 10: Helfersonden

Eine Auswahl von Sonden (in Farbe) mit möglichen Kombinationen von Helfersonden (in Schwarz). Die 16S rRNA Struktur stammt von dem *E. coli* Stamm DSM 30083. Die Sekundärstruktur der 16S rRNA wurde gemäß Gutell (1994) gestaltet. Die Fluoreszenzstärken wurden in verschiedene Klassen aufgeteilt wobei die Klasse I die stärkste und die Klasse VI die schwächste Fluoreszenz zeigen. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn die Helfersonden die spezifische Sonde umgaben. Aber schon eine Helfersonde in direkter Nachbarschaft vor allem gegenüberliegend zur Sonde kann die Fluoreszenzstärke schon deutlich steigern. Bei Eco 621 wird vermutet, dass sich an der Bindestelle der Sonde eine RNA-Protein Interaktion befindet und deshalb die Bindung blockiert. Um optimale Bedingungen während der Hybridisierung zu gewährleisten, sollten die Helfersonden die gleiche Schmelztemperatur wie die Sonde haben (Fuchs *et al.*, 2000).

■ KI I: 81-100%	■ KI II: 61-80%	■ KI III: 41-60%	■ KI IV: 21-40%	■ KI V: 6-20%	■ KI VI: 0-5%
--------------------------------------------------	------------------------------------------------------	------------------------------------------------------	----------------------------------------------------	-------------------------------------------------	--------------------------------------------------

Entscheidend ist lediglich, dass die Sequenz identisch mit der des Zielorganismus ist. Sollte die Helfersonde noch an einem anderen Organismus binden, ist dies eher unbedeutend, da sie keinen Farbstoff trägt. Die Sequenzen der Helfersonden

wurden so gewählt, dass sie die Position der spezifischen Cy3-Sonde umgeben, dadurch die Sekundärstruktur auflösen und somit eine bessere Bindung der Sonde gewährleisten (Fuchs *et al.*, 2000) (Abbildung 10).

2.9.7. Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung der Flagellatenhüllen

Die vereinzelt Flagellatenhüllen wurden ohne Fixierung auf einen epoxidbeschichteten Objektträger aufgetragen. Der Objektträger wurde luftgetrocknet und anschließend wurde jedes Fenster mit 10 µl Reinstwasser bedeckt. Die Objektträger wurden dann für 10 min bei 80°C inkubiert, um die Sekundärstruktur der 16S rRNA der Bakterien auf den Hüllen aufzulösen. Die Hüllen wurden dann wieder luftgetrocknet und in einer aufsteigende Ethanolreihe (50%, 80% und 96% v/v) jeweils für 3 min entwässert. Für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) wurden die in Tabelle 2 und 3 aufgeführten Cy3-Sonden und ihre assoziierten Helfersonden eingesetzt.

Bei den Sonden des Klons mp2 (Tabelle 2, 3) wurden die Hybridisierungspuffer bei zwei FISH-Reaktionen mit deionisierten Formamid-Konzentrationen von jeweils 0, 20 und 30% angesetzt. Bei den Sonden der Klone mp4 und mp5 wurden zwei FISH-Reaktionen mit Formamid-Konzentrationen von jeweils 0, 20, 30, 50 und 70% durchgeführt.

Die FISH wurde nach Manz *et al.* (1992) durchgeführt, allerdings mit einigen Modifikationen. Es wurden Cy3-Sonden und Helfersonden in Hybridisierungspuffer zu einer Konzentration von 2,5 ng/µl pro Sonde und Helfersonde gemischt. 5 µl der Sondenlösung wurden auf ein Fensterchen des Objektträgers aufgetragen und 2 h bei 46 °C im Dunkeln inkubiert. Um unspezifisch gebundene Sonden zu entfernen, wurden die Proben zweimal für 20 min bei 48 °C in Waschpuffer inkubiert. Die Objektträger wurden danach mit Reinwasser nachgespült und luftgetrocknet. Anschließend wurden die Proben mit 10 µl Antibleichmittel (DABCO) überschichtet und mikroskopiert. Cy3 absorbiert Licht der Wellenlänge 535-550 nm (grün) und emittiert bei 610-675 nm (orange-rot). Die Bilder wurden sowohl mit einer Axiophot Mikroskopkamera (Belichtungszeit: Phasenkontrast 0,2 sec, Fluoreszenzaufnahmen 4-16 sec) als auch mit einem mikroskopischen Bildbearbeitungssystem (Visitron) aufgenommen.

2.9.8. Phylogenetische Analyse der Sequenzen

Die neu identifizierten 16S rDNA-Sequenzen wurden zu 10700 anderen homologen, bakteriellen Primärstrukturen aus der RDP Datenbank aligned (Maidak *et al.*, 2000). Mit Hilfe der Distanzmatrixmethode (Jukes und Cantor, 1969; Fitch und Margoliash, 1967; Saitou und Nei, 1987) und den Programmen des Phylip Packetes (Felsenstein 1982, 1993) konnte eine phylogenetische Analyse durchgeführt werden. Je nach Auswahl der Referenzsequenzen kann die Anzahl der Positionen im Alignment variieren. Hierbei wurden nur solche Positionen analysiert, deren Primärstruktur zweifelsfrei zugeordnet werden konnten.

2.9.9. Stammbaumprogramme

Das Phylip-Paket (Version 3.5, Felsenstein, 1993) ist u.a. aus folgenden Programmen aufgebaut:

- DNADIST: Berechnet die phylogenetischen Distanzen von Organismen auf der Grundlage der Basensequenz (Distanz-Matrix).
- Fitch: Berechnet die inneren Knotenpunkte des Baumes, so dass die Anzahl der Sequenzunterschiede minimal wird.
- Neighbor: Eine Distanz-Matrix Methode, die einen Baum ohne Wurzel produziert. Die Astlängen sind nicht durch die Methode des kleinsten Quadrates optimiert, aber durch die Schnelligkeit des Programms können große Datensätze bearbeitet werden.
- Seqboot: Hier werden Bootstrap-Datensätzen erstellt.
- Drawgram: Dieses Programm erstellt eine graphische Darstellung der Bäume.
- Retree: Mit diesem Programm kann man die Stammbaumdarstellungen modifizieren.
- Consense: Das Programm wertet Bootstrap-Ergebnisse aus.

Bootstrap-Verfahren: Um die Aussagekraft der Stammbaumkonstruktion zu testen, wird das sogenannte Bootstrapverfahren (Efron, 1979) verwendet. Diese Methode wurde von Neyman (1971) zum Testen phylogenetischer Stammbäume vorgeschlagen und von Felsenstein (1985) angewandt. Aus den vorhandenen Daten werden – beispielsweise- 100 mögliche Bäume errechnet. Hedges (1992) schlug die minimale Anzahl von 100 vor, um einen aussagekräftigen Wert zu erhalten. Das Phylip-Programm Consense (Felsenstein, 1993), generiert aus den errechneten

Bäumen einen Konsensusbaum und zu jedem Teilbaum die Bootstrap-Werte der Verzweigungen. Der Bootstrapwert gibt an, mit welcher prozentualen Häufigkeit die jeweilige Verzweigung in allen Teilbäumen gefunden wurde.

2.9.10. Stammbaumkonstruktionen

„Spirochäten-Stammbaum“: Die Sequenzen der nachfolgenden Organismen wurden zur Konstruktion des „Spirochätenstammbaums“ eingesetzt (EMBL-Zugriffsnummern in eckigen Klammern):

Spirochätenklon mpsp2 [X89050], Spirochätenklon mpsp15 [X89051], Spirochätenklon sp40-7 [X89046], Spirochätenklon sp40-8 [X89047], Spirochätenklon sp5-18 [X89044], Spirochätenklon MDS1 [X79548], *Spirochaeta zulzeriae* [M88725], *Spirochaeta stenostrepta* [M88724], *Treponema pallidum* [M88726], *Treponema maltophilum* [X87140] und als Außengruppe *Leptospira illini* [M88719].

„Klon B6-Stammbaum“: Für den Stammbaum für den Klon B6 wurden mehrere Gram-negative Organismensequenzen eingesetzt (EMBL-Zugriffsnummern soweit bekannt, in eckigen Klammern):

Bacteroides forsythus Orale Klon BU063 [AY008308], *Bacteroides merdae* [X83954], *Burkholderia pseudomallei* [U91839], *Cytophaga fermentans* [M58766], *Flectobacillus* sp. [AJ011917], Klon B6, *Porphyromonas cangingivalis* [X76259], *Porphyromonas levii* ATCC 29147 [L16493], *Prevotella heparinolytica* [L16487], *Proteus vulgaris* [J01874] und als Außengruppe *Klebsiella pneumoniae* [X87276].

Die Sequenzen der entsprechenden Bäume wurden mit dem Programm ClustalX aligned (Thompson *et al.*, 1994) (Anhang 7.1). Zur Vorbereitung der Alignments für die Phylip-Programme wurde ein spezielles Excel-Programm von Fröhlich (2001) eingesetzt. Die Alignments wurden dann mit den Programmen des Phylip-Paketes (DNAdist, Fitch, Neighbor, Seqboot, Retree, Drawgram, Consense von Felsenstein, 1982, 1993) zu Bäumen umgewandelt.

3. Ergebnisse

3.1. Cellulolytische Bakterien im Termitendarm

3.1.1. Isolierung der cellulolytischen Bakterien

Da über die Rolle der Bakterien im Celluloseabbau im Termitendarm wenig bekannt war, wurden 7 verschiedene niedere Termitenarten auf cellulolytische Bakterien hin untersucht. Es handelte sich hierbei um die Termiten *Zootermopsis angusticollis*, *Neotermes castaneus*, *Schedorhinotermes intermedius*, *Reticulitermes santonensis*, *Mastotermes darwiniensis*, *Kalotermes flavicollis* und *Heterotermes indicola*. *Zootermopsis angusticollis* wurde dabei am genauesten untersucht. Mehrere Tiere von *Zootermopsis angusticollis* wurden für 22 Tage auf Filterpapier inkubiert. Bei dieser Diät waren die Flagellaten nach 3-4 Wochen nicht mehr zu sehen. Einige Tiere von *Kalotermes flavicollis* überlebten fast 11 Monate auf Filterpapier. Auch in ihrem Darm ließen sich keine Flagellaten nachweisen. Von jeder Termitenspezies wurden auch Vertreter untersucht, die auf Holz kultiviert wurden, so dass alle Därme entweder von Filterpapier oder Holz gefütterten Termiten stammten.

Von besonderem Interesse waren die Bakterien, die kristalline Cellulose abbauen können, deshalb wurden die kompletten Därme in stark verdünnten Medien mit Filterpapier als C-Quellen angesetzt. Filterpapier besteht zum Teil aus kristalliner Cellulose (van der Reyden, 1992) und kann wahrscheinlich nur von Bakterien abgebaut werden, die über ein Cellulasesystem verfügen, das möglicherweise die Cellulose im Holz abbauen kann. Von Anfang an wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass der bakterielle Celluloseabbau im Termitendarm womöglich nur von einer Gemeinschaft von Bakterien geleistet werden kann, da ein synergistisches Cellulasesystem benötigt wird. Da CMC leichter angreifbar ist als kristalline Cellulose, wurden die Därme auch auf CMC (Carboxymethylcellulose) inkubiert. Möglicherweise gibt es im Darm Bakterienarten, die in Reinkultur nur CMC abbauen können. Celluloseabbau konnte man anhand der Zersetzung des Filterpapiers oder der Verflüssigung des gelartigen CMC-Mediums erkennen.

Mit Hilfe drei verschiedener Methoden konnten über 200 verschiedene cellulolytische Bakterienstämme isoliert werden (siehe auch 2.8.1). Die Bakterienstämme, die eindeutiges Wachstum zeigten, wurden in verschiedenen Kultur-

medien angereichert (Tabelle 4, 7), um danach ihre glykolytische Aktivität zu bestimmen.

Die Termitenart *Zootermopsis angusticollis* wurde von allen Arten am besten untersucht. Die cellulolytischen Bakterien im Darm der anderen Termitenarten wurden teilweise nur oberflächlich bearbeitet. Dies ist höchstwahrscheinlich der Grund, dass aus *Zootermopsis angusticollis* die meisten cellulolytischen Bakterienisolate gewonnen werden konnten. Deshalb ist der numerische Vergleich der cellulolytischen Bakterienarten aus den einzelnen Termitenarten nicht zulässig.

3.1.2. Glykolytische Aktivität

Um den Celluloseabbau der einzelnen Stämme zu untersuchen, wurden die angereicherten Bakterienisolate auf CMC-Agarplatten von Medium 2 ausgestrichen. Der Celluloseabbau wurde mit einer Kongorotfärbung bestimmt (Teather und Wood, 1983). Von den 200 Stämmen zeigten 164 einen deutlichen Celluloseabbau und wurden weiter untersucht.

3.1.3. Identifizierung der Darmisolate

Für die Identifizierung der cellulolytischen Bakterien wurden zwei Methoden angewandt. Zum einen die Identifizierung mit numerischen, biochemischen und physiologischen Tests, diese wurden von der Arbeitsgruppe Kämpfer in Gießen durchgeführt (Kämpfer *et al.*, 1991, 1992) (Tabelle 4). Zum anderen die Untersuchung der 16S rDNA mit Restriktionsfragment- und mit Sequenzanalysen. Die DNA der einzelnen Bakterienisolate wurde präpariert und die 16S rDNA in einer PCR amplifiziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit den Restriktionsenzymen *BsuRI* (GG↓CC) und *HpaII* (C↓CGG) geschnitten. Die 16S rDNA der einzelnen Bakterienspezies ist in ihrer Basenpaarzusammensetzung unterschiedlich, so dass die Enzyme an verschiedenen Stellen schneiden und man verschieden lange DNA-Fragmente erhält. Man bekommt auf diese Weise für jeden Stamm ein spezifisches Muster. Zur Absicherung wiederholt man den Vorgang mit einem zweiten Enzym. Die Organismen mit übereinstimmendem Fragmentmuster kann man nun in Gruppen zusammenfassen. Mit dieser Methode wurde ermittelt, dass die cellulolytischen Bakterien in 36 Gruppen eingeteilt werden können. Von jeder der 36 Gruppen wurde ein Teil der 16S rDNA mindestens eines Mitgliedes sequenziert. Die erhaltene Teilsequenz wurde mit anderen Bakterien aus der

EMBL-Datenbank verglichen, um die nächsten verwandten Organismen ermittelt (Tabelle 4).

Wenn man die cellulolytischen Bakterien anhand ihres GC-Gehaltes einteilt, ergibt sich folgendes Bild: Die Gram-positiven Isolate gehören sowohl zur niedrigen (Clostridien-Ast) als auch zur hohen GC-Gehaltgruppe (Actinomyceten-Ast). Die Gram-negativen gehören entweder zu den Proteobakterien oder in die Flexibacter-Gruppe.

Die Actinomyceten waren außer in *Reticulitermes santonensis* in allen untersuchten Termitendärmen zu finden. Wobei die Cellulomonaden am zahlreichsten waren und im Vergleich mit allen anderen Isolaten sehr starken Celluloseabbau zeigten.

Allgemein gesehen gehören die meisten cellulolytischen Bakterienisolate zu *Bacillus*. Die Mehrzahl von diesen Organismen gehören zu *Bacillus anthracis* oder *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* und *Bacillus vortex* (Tabelle 4). Außer aus *Reticulitermes santonensis* und *Heterotermes indicola* konnten Mitglieder der Gattung *Bacillus* aus allen anderen untersuchten Termitenarten isoliert werden. Das Celluloseabbauverhalten der *Bacillus*-Arten war gut bis sehr gut, wobei manche Stämme sogar ähnliche große Abbauhöfe wie die Cellulomonaden zeigten (Tabelle 4).

Mitglieder der Proteobakterien konnten nicht in *H. indicola*, aber in den sechs anderen Termitenarten gefunden werden, wobei die Sphingomonaden den zahlenmäßig größten Anteil beitrugen. Interessanterweise waren es auch nur Proteobakterien, deren nächste Verwandte bisher unkultivierte Organismen waren, so dass man auf fernere Verwandte zurückgreifen musste, um die Spezies zu definieren. Mit nur zwei Arten (beide *Klebsiella pneumoniae*-ähnlich) sind die Enterobacteriaceae relativ schwach vertreten. Das Celluloseabbau-Verhalten der Proteobakterien war bis auf zwei Ausnahmen (*Bordetella bronchiseptica*- und *Sphingomonas spec.*-ähnlich aus dem Darm von *Mastotermes darwiniensis*) nur mäßig bis gut (Tabelle 4).

Aus *Zootermopsis angusticollis* konnte eine große Anzahl Prokaryoten isoliert werden, die zu der Flexibacter-Gruppe gehören. Der am nächsten verwandte Organismus ist ein *Spirosoma*-ähnliches Bakterium. Die Übereinstimmung beträgt nur 90%, hier ist davon auszugehen, dass eine bisher unbekannte Bakterienart

isoliert wurde. Wobei das Celluloseabbauverhalten dieser Spezies aber deutlich geringer war, als das der Cellulomonaden (Tabelle 4).

Cellulolytische Stämme, die zu den Spezies *Bacillus cereus* oder *Bacillus anthracis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus vortex* und *Spirosoma*-ähnliche Bakterien gehören, konnten aus Verdünnungen bis 10^7 aus dem Darm von *Zootermopsis angusticollis* isoliert werden. Dies deutet auf eine mögliche Anzahl von mindestens 10^7 Bakterienzellen pro ml Darminhalt hin.

3.1.4. Celluloseabbau unter anaeroben Kulturbedingungen

Um festzustellen, ob die isolierten cellulolytischen Bakterien auch unter anaeroben Bedingungen CMC abbauen, wurde aus den meisten der in Tabelle 4 aufgelisteten Gruppen ein oder zwei Stämme ausgewählt und auf Agarplatten von Medium 1 + CMC ausgestrichen (Tabelle 5). Die aerob hergestellten Platten wurden maximal 14 Tage bei 28°C in einem Anaerobenzelt unter Stickstoffatmosphäre bebrütet. Etwaiges Wachstum wurde mit Kongorot auf Celluloseabbau getestet. Acht der getesteten Stämme zeigten Wachstum und Celluloseabbau, welcher aber eine Hofgröße von 1 mm nicht überschritt (Tabelle 5). Es waren die Stämme CZ35 und CZ131 (*Bacillus cereus* oder *B. anthracis*-ähnlich), CZ89 (*Bacillus vortex*-ähnlich), KneC2.1 (*Bacillus cereus* oder *B. thuringiensis*-ähnlich), KMaC1 (*Cellulomonas spec*-ähnlich), KMC6 (*Klebsiella pneumoniae*-ähnlich), KMC15 (*Bordetella bronchiseptica*-ähnlich) und KRC2.1 (*Brucella melitensis*-ähnlich).

Tabelle 4: Übersicht über die cellulolytischen Bakterienisolate

Die cellulolytischen Bakterien sind zusammen mit ihren nächsten Verwandten und die Termitenarten, aus denen sie isoliert wurden dargestellt. Die Bakterienstämme deren 16S rDNA teilweise sequenziert wurde sind unterstrichen. Die Bakterienarten sind anhand ihres Restriktionsmusters eingeteilt. Angegeben sind auch die verschiedenen Isolierungsmethoden und die Kulturmedien. Die Zugriffsnummern der Organismen aus der EMBL-Datenbank sind (soweit bekannt) in eckigen Klammern aufgeführt.

Ähnlichste Spezies (16S rDNA Verwandtschaft: in % und bp)	Isolierte Stämme mit gleichem Restriktionsmuster ¹	Termiten	Kultivierungs- methoden	Kulturmedium	CMC- Abbau ²	RFL ⁶ (in bp) x) Bsu RI ⁴ y) Hpa II ⁴
I. Actinomyceten						
<i>Agromyces</i> spec., Stamm IFO16238, [AB023359], (99%, 457 bp)	<u>KMC14.1</u> (10 ⁵)	<i>Mastotermes darwiniensis</i>	Methode 3	Medium 4	+	x) 450-350-230-100 y) 520-410-190-150
<i>Cellulosimicrobium variabile</i> sp. nov.	1) KScC3 (10 ⁴) 2) <u>MX5</u> [AJ298873]	1) <i>Schedorhinotermes intermedius</i> 2) <i>Mastotermes darwiniensis</i>	Methode 3	Medium 4	+++	x) 310-240-150 y) 480-200
<i>Cellulomonas</i> spec., [AB0047321], (98%, 463 bp)	1a) X6 1b) KMaC1 (10 ⁵), KMaC2 (10 ⁵), KMaC3 (10 ⁵), KMaC4 (10 ⁵), <u>KMaC5</u> (10 ⁵) [AJ296274] 2) <u>KNeC1</u> (10 ⁴) 3) <u>KHC4</u> (10 ³) 4) KScC2 (10 ⁴), KScC6 (10 ⁴)	1) <i>Mastotermes darwiniensis</i> 2) <i>Neotermes castaneus</i> 3) <i>Heterotermes indicola</i> 4) <i>Schedorhinotermes intermedius</i>	1a) Methode 2 1b) Methode 3 2) Methode 3 3) Methode 3 4) Methode 3	1a) Medium 3 1b) Medium 5 2) Medium 5 3) Medium 5 4) Medium 5	+++	x) 290-220-150 y) 600-180
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> , Stamm LMG3645, [AJ312209], (95%, 448 bp)	<u>FL1</u>	<i>Mastotermes darwiniensis</i>	Methode 2	Medium 3	+	x) 320-250-200-150-100 y) 610-200-120
<i>Kocuria varians</i> ³	CZ66 (10 ⁴)	<i>Zootermopsis angusticollis</i>	Methode 1a	Medium 1b	+	x) 400-230-150 y) 450-190-100
<i>Microbacterium</i> spec. A8-2, [AY017058], (99%, 460 bp)	<u>CZ245b</u> (10 ⁴) [AJ299566]	<i>Zootermopsis angusticollis</i>	Methode 1b	Medium 1b	+	x) 220-200-150-100 y) 620-290-190
<i>Micromonospora aurantiaca</i> (99.7%)	CK2 (10 ⁴), CK7 (10 ⁴), <u>CK20</u> (10 ⁴), CK50 (10 ⁷) (PC: Actinomyceten) ⁵	<i>Kalotermes flavicollis</i>	Methode 1a	Medium 1a	+++	x) 250-170 y) 350-200-150
<i>Streptomyces sampsonii</i> , [D63871] oder <i>Streptomyces nodosus</i> , [AF114036], (99%, 450 bp)	<u>Y2</u> , Y3	<i>Mastotermes darwiniensis</i>	Methode 2	Medium 3	++	x) 300-240-210-150-100 y) 300-200-110

Ähnlichste Spezies (16S rDNA Verwandtschaft: in % und bp)	Isolierte Stämme mit gleichem Restriktionsmuster ¹	Termiten	Kultivierungs- methoden	Kulturmedium	CMC- Abbau ²	RFL ⁶ (in bp) x) Bsu RI ⁴ y) Hpa II ⁴
<i>Azospirillum irakense</i> , [Z29583], (99%, 432 bp)	CK80 (10 ⁴)	<i>Kaloterme flavicollis</i>	Methode 1a	Medium 1a	+	x) 300-180 y) 500-390-320
<i>Bordetella bronchiseptica</i> , [X57026], (100% in 453 bp)	KMC3.1 (10 ⁴), KMC15.1 (10 ³)	<i>Mastotermes darwiniensis</i>	Methode 3	Medium 4	+++	x) 320-210 y) 520-300-190
<i>Brucella melitensis</i> , [AF220149], (99%, 460 bp)	KRC2.1 (10 ⁴), KRC3.1 (10 ³), KRC4.1 (10 ³), KRC6.1 (10 ⁴)	<i>Reticulitermes santonensis</i>	Methode 3	Medium 4	+	x) 310-290-220-190 y) 520-470-300-200-150
<i>Brucella melitensis</i> , [AF220149], (99%, 460 bp)	1a) CZ237 (10 ³) [AJ299579] 1b) CZ330 (10 ²) 1c) KZC6 (10 ⁵)	<i>Zootermopsis angusticollis</i>	1a) Methode 1b 1b) Methode 1b 1c) Methode 3	1a) Medium 1b 1b) Medium 1a 1c) Medium 4	+	x) 480-280-200-150-90 y) 450-400-230-190-130
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , [X87276], (99%, 462 bp)	1) KMC6 (10 ³) 2) KRC7 (10 ⁴), KRX2 (10 ⁴)	1) <i>Mastotermes darwiniensis</i> 2) <i>Reticulitermes santonensis</i>	1) Methode 3 2) Methode 3	1) Medium 4 2) Medium 4	++	x) 310-200-150 y) 500-290-190
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , [X87276], (98%, 462 bp)	KMC7.1 (10 ³)	<i>Mastotermes darwiniensis</i>	Methode 3	Medium 4	+	x) 500-240 y) 640-180
Unkultiviertes α -Proteobakterium spec. GR-371.III.81, [AJ301574], (96% 454 bp)	CZ361 (10 ²) [AJ299578]	<i>Zootermopsis angusticollis</i>	Methode 1b	Medium 1a	++	x) 480-300-190 y) 350-290-180-120
<i>Rhizobium etli</i> CFN42, [U28916] oder <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. phaseoli, [U29388], (99%, 460 bp)	1a) CZ58 (10 ³), CZ63 (10 ⁴), CZ67 (10 ⁵) 1b) CZ68b (10 ⁴) [AJ299577], CZ69 (10 ⁴), CZ71 (10 ⁴) (PC: <i>Agrobakt.-Rhizobium</i> -ähnlich) ⁵	<i>Zootermopsis angusticollis</i>	Methode 1a	1a) Medium 1b 1b) Medium 1a	+	x) 500-290-250-180 y) 550-420-220-180
<i>Sphingomonas</i> spec. Stamm BF2, [X89905], (97%, 391 bp)	Y4	<i>Mastotermes darwiniensis</i>	Methode 2	Medium 3	+++	x) 510-300-180 y) 400-350-280-220
<i>Sphingomonas</i> spec., Stamm DhA-95, [AF177917], (96%, 458 bp)	CZ195 (10 ⁴) [AJ299576]	<i>Zootermopsis angusticollis</i>	Methode 1a	Medium 1a	+	x) 520-300-250-180 y) 430-380-250
1. Unidentif. Eubakterium GKS69, [AJ224989], (96%, 453 bp) 2. <i>Sphingomonas</i> spec., RW1 [AB021492], (96%, 451 bp)	CZ325 (10 ²), CZ332 (10 ²) [AJ299575], CZ342 (10 ²)	<i>Zootermopsis angusticollis</i>	Methode 1b	Medium 1a	++	x) 500-280-190-100 y) 390-260-180-100
<i>Sphingomonas</i> Stamm ML1, [AY026948], (96%, 454 bp)	CZ363 (10 ³) [AJ299580]	<i>Zootermopsis angusticollis</i>	Methode 1b	Medium 1a	++	x) 500-290-240-180-90 y) 550-390-260-180-100
1. <i>Zymomonas mobilis</i> , Cosmid-klon 65G3, [AF088897] (94%, 461 bp) 2. <i>Sphingomonas echinoides</i> , [AB021370], (96%, 452 bp)	CZ7 (10 ²) [AJ299581], CZ322 (10 ²) (PC: <i>Sphingomonas</i> spec.) ⁵	<i>Zootermopsis angusticollis</i>	Methode 1a	Medium 1a	+	x) 500-300-150 y) 450-400-350-230-130

Tabelle 5: Celluloseabbau unter anaeroben Kulturbedingungen

Es wurde aus jeder cellulolytischen Bakteriengruppe (Tabelle 4) ein Vertreter getestet.

	Ähnlichste Spezies (16S rDNA Verwandtschaft: % in wie viel bp)	Stamm	CMC- Abbau
1.	<i>Micromonospora aurantiaca</i> 99.7%	CK20	-
2.	<i>Azospirillum irakense</i> , [Z29583], (99%, 432 bp)	CK80	-
3.	1. <i>Zymomonas mobilis</i> , Cosmid-klon 65G3, [AF088897] (94%, 461 bp) 2. <i>Sphingomonas echinoides</i> , [AB021370], (96%, 452 bp)	CZ7	-
4.	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] / <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)	CZ35	+
5.	1. Unkultiviertes Bakterium, Stamm SJA-105, [AJ009482], (99%, 451 bp) 2. <i>Afipia</i> spec. A8-3, [AY017061], (98%, 451 bp)	CZ64	-
6.	<i>Rhizobium etli</i> CFN42, [U28916] / <i>Rh. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> , [U29388], (99%, 460 bp)	CZ68b	-
7.	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 465 bp)	CZ89	+
8.	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 460 bp)	CZ107b	-
9.	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] / <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)	CZ131	+
10.	<i>Paenibacillus</i> spec., Stamm TRO4, [AJ251193], (95%, 326 bp)	CZ181a	-
11.	<i>Sphingomonas</i> spec., Stamm DhA-95, [AF177917], (96%, 458 bp)	CZ195	-
12.	<i>Brevibacillus brevis</i> , [M10111], (98%, 460 bp)	CZ207.1	-
13.	1. Unkultiviertes Abwasserbakterium, Stamm tmbr 11-7, (AF309812), (96%, 462 bp) 2. <i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 462 bp)	CZ225	-
14.	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> , Stamm LMG3645, [AJ312209], (95%, 448 bp)	FI1	-
15.	<i>Cellulomonas</i> spec., [AB0047321], (98%, 463 bp)	KMaC1	+
16.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , [X87276], (99%, 462 bp)	KMC6	+
17.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , [X87276], (98%, 462 bp)	KMC7.1	-
18.	<i>Agromyces</i> spec., Stamm IFO16238, [AB023359], (99%, 457 bp)	KMC14.1	-
19.	<i>Bordetella bronchiseptica</i> , [X57026], (100% in 453 bp)	KMC15	+
20.	<i>Bacillus subtilis</i> , [Z99107], (100%, 461 bp)	KNC1	-
21.	<i>Bacillus cereus</i> , Stamm WSBC10206, [Z84590], (98%, 353 bp) <i>Bacillus thuringiensis</i> , Stamm WS 2614, [Z84593], (98%, 353 bp)	KNeC2.1	+
22.	<i>Brucella melitensis</i> , [AF220149], (99%, 460 bp)	KRC2.1	+
23.	<i>Cellulosimicrobium variabile</i> sp. nov.	MX5	-
24.	<i>Streptomyces sampsonii</i> , [D63871] oder <i>Streptomyces nodosus</i> , [AF114036], (99%, 450 bp)	Y2	-
25.	<i>Sphingomonas</i> spec. Stamm BF2, [X89905], (97%, 391 bp)	Y4	-

3.2. Die Oberflächenbakterien von *Mixotricha paradoxa*

3.2.1. Die Identifizierung der Spirochäten auf der Oberfläche mit Hilfe semispezifischer PCR-Reaktionen

Im Jahre 1996 fanden Berchtold und König die 16S rDNA-Sequenzen von mindestens 12 verschiedenen Spirochätenspezies aus dem Darm von *Mastotermes darwiniensis*. In einer früheren Arbeit (Wenzel, 1998) konnte die 16S rDNA-Sequenz eines weiteren Spirochäten durch Klonierung gefunden werden (Klon B21). Anhand dieser Sequenzen wurden 11 spezifische 3'-Primer für die Identifizierung der Spirochäten auf der Oberfläche von *Mixotricha paradoxa* synthetisiert (Tabelle 2). Die Sequenzen der Primer wurden in der RDP-Datenbank (Maidak *et al.*, 2000) mit dem Programm Probe Match auf ihre Spezifität mit allen bekannten Organismen in der Datenbank verglichen, darunter auch alle bisher bekannten Spirochäten aus *Mastotermes darwiniensis*. Danach wurden die Primer (der Klon B21, MDS1, mpsp2, mpsp15, sp40-2, sp40-7, sp40-8, sp40-11, sp40-12, sp5-09, sp5-17, sp5-18) in eine PCR mit den *M. paradoxa*-Hüllen eingesetzt.

Es konnten mit den spezifischen Primern der Spirochätenklone B21, mpsp2, mpsp15, MDS1, sp40-7, sp40-8, sp40-11, sp5-09, sp5-17 und sp5-18 positive PCR-Ergebnisse erzielt werden. Mit den anderen Primern konnte auch nach mehrmaliger Wiederholung kein PCR-Produkt amplifiziert werden und deshalb liegt der Schluss nahe, dass die Spirochätenklone sp40-2 und sp40-12 als mögliche Oberflächenspirochäten nicht in Frage kommen (Tabelle 2).

Die positiven PCR-Produkte wurden mit dem universellen Eubakterien-Primer Eubak 338F sequenziert (Amann *et al.*, 1990). Die PCR-Produkte der Primer der Klone MDS1, sp40-11, sp5-09 und sp5-17 enthielten keine homogenen 16S rDNA-Sequenzen, die Produkte waren nicht auszuwerten. Womöglich banden die Primer dieser vier Spirochätenklone unspezifisch, was allerdings bei Schmelztemperaturen der Primer von höchstens 56 °C und einer Annealingtemperatur der PCR-Reaktion von 60 °C sehr ungewöhnlich ist. Wahrscheinlicher ist, dass die Primer-Sequenz identisch mit der 16S rDNA mehrerer Organismen ist und die Primer mehr als eine 16S rDNA amplifiziert haben.

Das PCR-Produkt mit dem Primer mpsp15 zeigte eine 99% Übereinstimmung mit dem Spirochätenklon mpsp15. Hier hatte der Primer spezifisch an die 16S rDNA des Originalorganismus gebunden. Dies deutete darauf hin, dass mpsp15 ein Oberflächenspirochät von *M. paradoxa* sein könnte.

Die PCR-Produkte der restlichen Primer waren zwar homogen und gut auswertbar, doch zeigten die Sequenzen keine genaue Übereinstimmung zu denen der Originalspirochätenklone B21, mpsp2, sp40-7, sp40-8 und sp5-18 (Berchtold und König, 1996; Wenzel, 1998). Es wurde deshalb vermutet, dass die fünf 16S rDNA-Sequenzen zu bisher nicht identifizierten Spirochätenklonen gehörten. Auch in diesem Fall hätten die vermuteten spezifischen Primer an andere Organismen gebunden. Der Klon, dessen Sequenz mit dem Primer für mpsp2 amplifiziert wurde, bekam den Namen mp1, von Primer sp40-7 → mp2, sp40-8 → mp3, B21 → mp4 und sp5-18 → mp5. Mit den identifizierten Sequenzen wurden weitere Primer nun spezifisch für die Klone mp1-mp5 hergestellt (Tabelle 2), so dass etwa 1400 bp von ca. 1600 bp der 16S rDNA der fünf Spirochätenklone sequenziert werden konnten.

Nachdem ein Großteil der 16S rDNA von mp1-mp5 bekannt war, zeigte sich dass die zuerst konstruierten Primer tatsächlich nicht so spezifisch waren, wie dies zuerst den Anschein hatte. Die Primer für die Klone B21, sp40-7, sp40-8 und sp5-18 hatten übereinstimmende Sequenzen mit den Ursprungs- sowie den neu gefundenen Sequenzen von mp4, mp2, mp3 und mp5. Der Primer von Klon mpsp2 zeigte gar einen Mismatch mit der 16S rDNA-Sequenz von mp1, hatte aber trotzdem an die 16S rDNA von Klon mp1 gebunden.

Bei dem Vergleich von ca. 1400 bp zeigte mp2 nun aber doch eine 98%ige Ähnlichkeit zu sp40-7, dem Spirochätenklon, von dessen Sequenz der erste Primer stammte. Dieses deutet darauf hin, dass sp40-7 womöglich doch ein Oberflächenspirochät und identisch mit mp2 ist.

Das Ergebnis ließ darauf schließen, dass die Spirochätenklone B21, mpsp2, sp40-8 und sp5-18 nicht mit der Hülle von *Mixotricha paradoxa* assoziiert sind. Möglicherweise aber die Spirochätenklone mp1-mp5 bzw. sp40-7.

Es zeigte sich, dass mp1 91% Ähnlichkeit in 1312 bp mit dem unkultivierten *Treponema* Klon HsDiSp319 zeigt (EMBL- Zugriffsnummer AB032009) und 95% in 946 bp zu dem Spirochäten sp5-09. Aufgrund der Daten kann man vermuten, dass es sich hierbei um eine bisher unbekannte Spirochätenspezies handelt.

Der Spirochätenklon mp3 hat eine 88%ige Ähnlichkeit in 1449 bp zu *Treponema* spec. ZAS-9 (EMBL-Zugriffsnummer AF320287) und eine 96%ige in 1328 bp zu dem Klon sp40-8. Zwar war sp40-8 der Organismus, dessen Sequenz als Primer

für die erste Identifizierung von Klon mp3 benutzt wurde, doch sind 96% Ähnlichkeit womöglich nicht ausreichend, um von einer Art zu sprechen.

Mp4 zeigt die größten Ähnlichkeiten ebenfalls zu *Treponema spec.* ZAS-9 (91% in 1460 bp) (EMBL-Zugriffsnummer AF320287) und dem Spirochätenklon sp40-11 (91% in 1437 bp). Auch hier scheint es sich um eine bisher unbekannte Spirochätenart zu handeln,

Die Sequenz von mp 5 zeigt die größte Ähnlichkeit zu den Spirochätenklonen mpsp2 (89% in 1477 bp) und sp5-18 (94% in 1304 bp). Das führt zu dem Schluss, dass mp5 möglicherweise ebenfalls ein bisher noch nicht identifizierter Darmspirochät von *M. darwiniensis* ist.

3.2.2. Die Stäbchen auf der Oberfläche von *Mixotricha paradoxa*

In früheren Experimenten konnte ein Teil der 16S rDNA-Sequenz eines *Bacteroides forsythus*-ähnlichen Organismus aus *Mixotricha paradoxa* identifiziert werden (Wenzel, 1998). Mit Hilfe der schon isolierten Sequenz konnten weitere spezifische Primer hergestellt werden, mit deren Hilfe es gelang, in semi-spezifischer PCR mit den isolierten *M. paradoxa*-Hüllen 1338 bp des Bakteriums zu sequenzieren. Die 16S rDNA-Sequenz zeigte die größte Ähnlichkeit (92% in 855 bp) zu dem unkultivierten Bakterium Gf16 (EMBL-Zugriffsnummer AB055716) und zu dem *Bacteroides cf forsythus* Oralklon BUO63 (92% in 441 bp) (EMBL-Zugriffsnummer AY008308). Der Organismus bekam die Bezeichnung B6 und wurde als wahrscheinliches Stäbchen auf der Hülle von *Mixotricha paradoxa* eingestuft. Die geringe Ähnlichkeit zu Organismen aus der Datenbank lässt vermuten, dass es sich bei B6 um ein bisher noch nicht isoliertes und identifiziertes Bakterium handelt.

3.2.3. Zuordnung isolierter Sequenzen zu den entsprechenden Organismen auf der Oberfläche von *Mixotricha paradoxa*

Als mit Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen mit dem Flagellat *Mixotricha paradoxa* begonnen wurden, stellte sich sehr schnell das Problem der Autofluoreszenz des Holzes im Zelleninneren und der Hülle dar. Es zeigte sich, dass das Holz in *M. paradoxa* bei 530-550 nm im Bereich des Cy3-Farbstoffes, ohne Färbung so stark leuchtete, dass ein spezifisches Detektieren von assoziierten Organismen nicht möglich war (Abbildung 11).

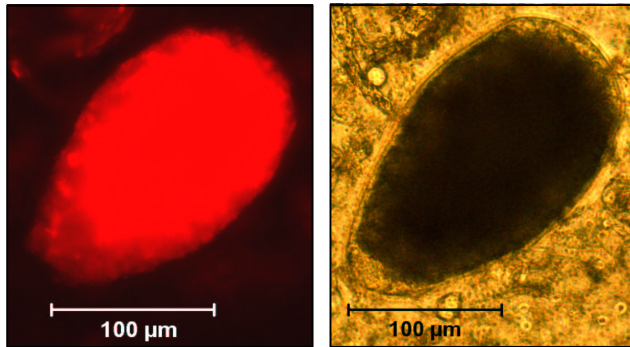


Abbildung 11: Autofluoreszenz

Im linken Bild erkennt man die Autofluoreszenz des Holzes im Zellinneren von *Mixotricha paradoxa* bei 530-550 nm. Rechts ist die gleiche Aufnahme im Phasenkontrast zu sehen.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde eine Methode entwickelt, die Flagellatenhülle von internem Holz zu trennen, ohne die äußere Struktur von *Mixotricha paradoxa* komplett zu zerstören. Die Protozoen wurden in 1x PBS-Puffer aufgequollen und dann durch mechanische Scherkräfte, hervorgerufen durch schnelle Bewegungen mit einer Pipette, von ihrem Zellinneren befreit (Abbildung 12). Ohne Holz war die Autofluoreszenz des Flagellaten zu vernachlässigen.

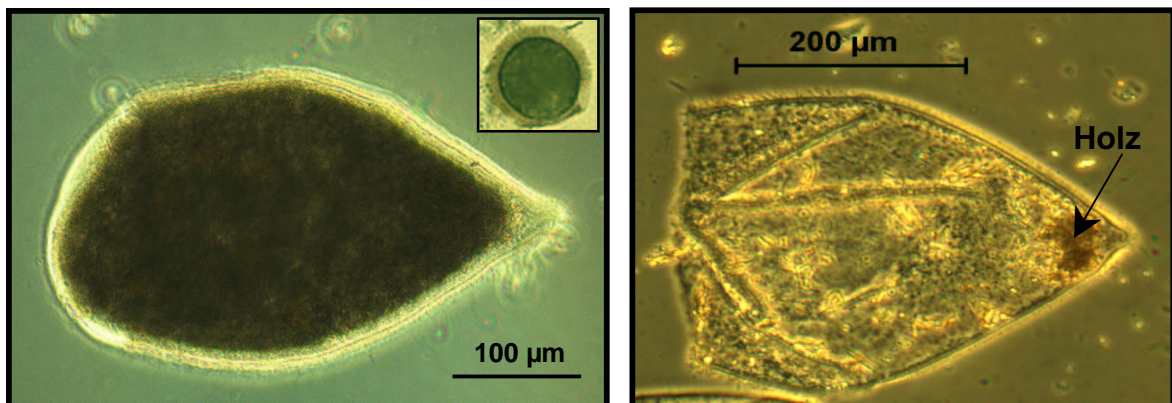


Abbildung 12: *Mixotricha paradoxa* komplett und ohne Zellinneres

In der linken Aufnahme sieht man eine *Mixotricha paradoxa*-Zelle in ihrem ursprünglichen Zustand. In dem eingesetzten Bild kann man den gleichen Organismus in einer Aufsichtsdarstellung beobachten. Der Spirochätensaum, der die Zelle umrankt ist deutlich zu erkennen. Im rechten Bild ist *M. paradoxa* nach Entfernung des internen Holzes dargestellt.

Allerdings zeigte sich dann ein weiteres Problem des Hybridisierungsverfahrens, die Sekundärstruktur der 16S rRNA. Wie viele RNAs in vivo faltet sich auch die 16S rRNA in der Zelle zu partiellen Doppelhelixstrukturen und ist sie in einigen Bereichen mit Proteinen assoziiert. Diese beiden Eigenschaften können eine optimale Bindung der Fluoreszenz-markierten Sonden an die 16S rRNA in den

Ribosomen behindern. Um das Problem der Sekundärstruktur zu überwinden, schlugen Fuchs *et al.* (2000) die Konstruktion von Helfersonden vor.

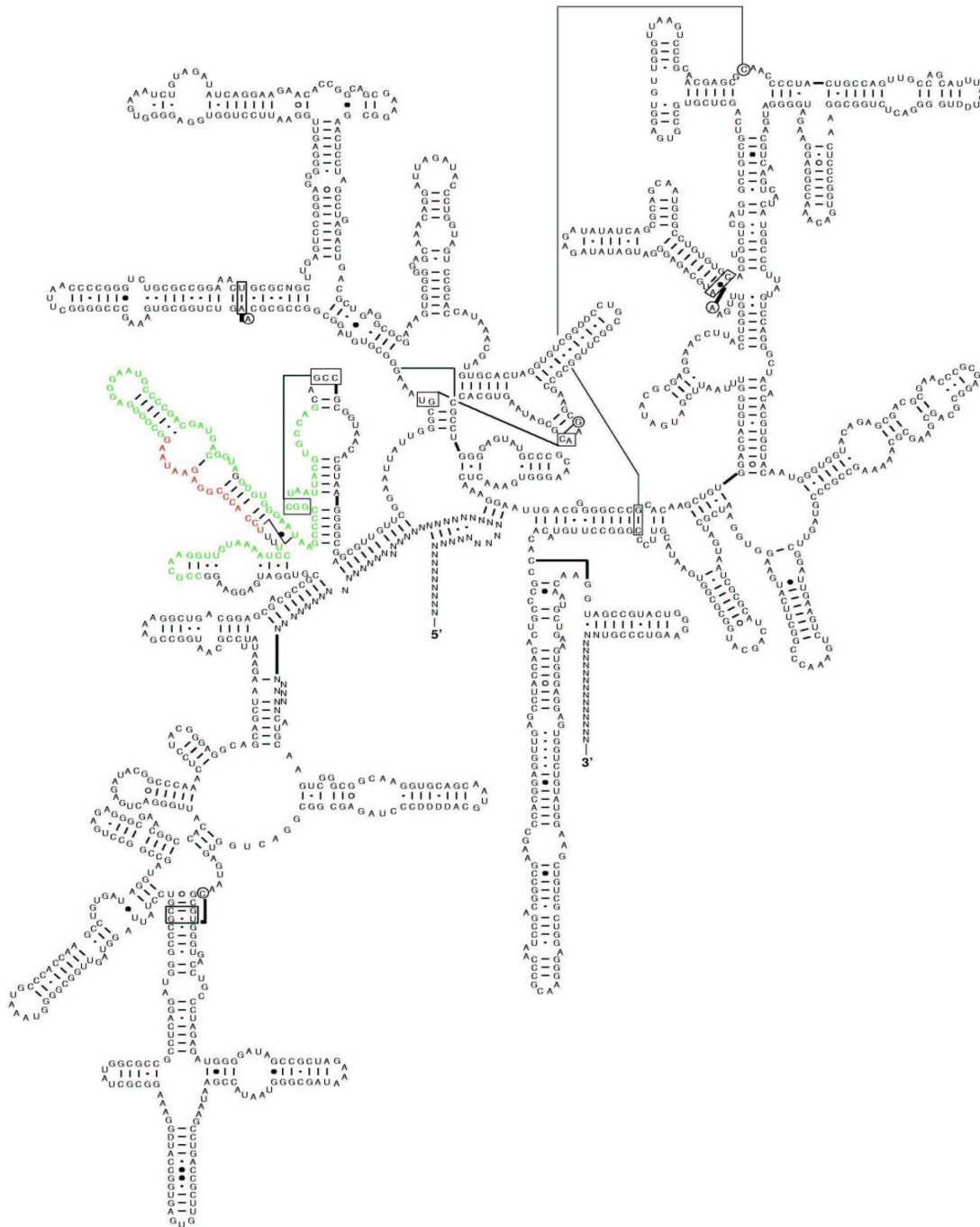


Abbildung 13: Fluoreszenz-Sonde mit Helfersonden

Hypothetische Sekundärstruktur der 16S rRNA des Oberflächenspirochätenklons mpsp15. Als Vorlage galt die Sekundärstruktur von *Treponema pallidum* (<http://www.rna.icmb.utexas.edu>). Die spezifische Sonde B27.440 ist in rot eingezeichnet, die sie umgebenden Helfersonden in grün (Tabelle 3).

Die Sequenzen dieser unmarkierten Oligonukleotide wurde so gewählt, dass sie in umliegenden Positionen der spezifischen Cy3-Sonden auf der 16S rRNA binden und auf diese Weise die Sekundärstruktur in diesem Bereich auflösen, so dass die markierten Sonden besser binden können (Abbildung 13). Aufgrund dieser Überlegung wurden mehrere Helfersonden für jede spezifische Sonde konstruiert (Tabelle 2, 3). Da die Helfersonden unmarkiert blieben, war es nicht nötig, die Sequenzen spezifisch für die Zielorganismen auszuwählen, da eine Bindung an andere Organismen nicht zu sehen war. Entscheidend war ihre Bindung an die 16S rRNA des jeweiligen Organismus, um die Cy3-Sonde zu unterstützen. Eine weitere Möglichkeit, die Sekundärstruktur der 16S rRNA und die assoziierten Proteine auf- bzw. abzulösen, lag in einem Denaturierungsschritt. Die Objektträger mit den Flagellatenhüllen wurden bei 80°C für 10 min inkubiert, um auf diese Weise die assoziierten Proteine zu denaturieren und von der 16S rRNA abzulösen. Mit Hilfe der beiden Verfahren konnte eine deutliche Besserung der Leuchtkraft und damit der Bindung der spezifischen Cy3-Sonden an die 16S rRNA festgestellt werden.

Spirochäten:

Aufgrund der oben geschilderten PCR-Reaktionen war es möglich die Spirochätenklone mpsp15, mp1, mp2 (sp40-7), mp3, mp4 und mp5 sowie den *Bacteroides forsythus*-ähnlichen Klon B6 als vermutliche Bakterien auf der Oberfläche von *Mixotricha paradoxa* zu identifizieren. Um dies zu verifizieren, wurden von den genannten Organismen spezifische Cy3 gefärbte Sonden hergestellt (Tabelle 2). Mit diesen Sonden und den dazugehörigen Helfersonden wurden Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungs-Experimente durchgeführt. Es gelang mit den Cy3-Sonden für die Spirochätenklonen mpsp15, mp1 und mp3 sowie für den Klon B6 eindeutige Fluoreszenzsignale zu erhalten. Überraschenderweise zeigte sich im Laufe der Hybridisierung, dass die einzelnen Spirochätenarten auf der Hülle nicht homogen von einem Ende bis zum anderen angeordnet sind, sondern dass man zwischen einem hinteren und einem vorderen Spirochätenbereich unterscheiden kann. Der Spirochätenklon mpsp konnte nur im vorderen Bereich detektiert werden (Abbildung 14), während die Klone mp 1 und mp3 nur im hinteren Bereich zu finden waren (Abbildung 15, 16).

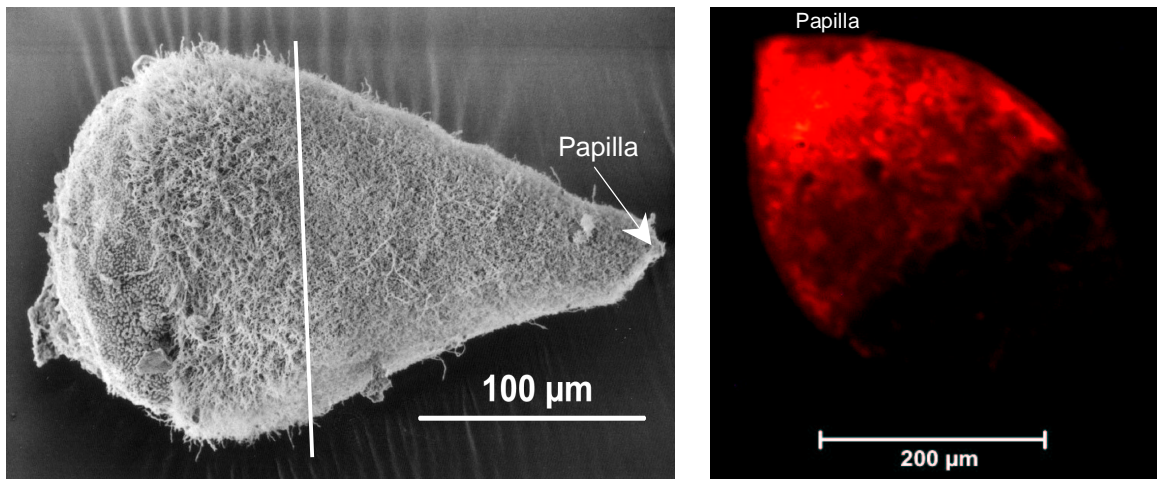


Abbildung 14: Elektronenmikroskopische- und Fluoreszenz-Aufnahme von *Mixotricha paradoxa*

Das linke Bild zeigt eine EMI-Aufnahme von *Mixotricha paradoxa*. Der weiße Querstrich unterscheidet den vorderen Bereich mit der Papilla vom hinteren mit der Ingestionszone. Man kann deutlich erkennen, dass vorne überwiegend kurze Spirochäten angeheftet sind und hinten eher längere. Auf dem rechten Bild ist eine *M. paradoxa*-Hülle zu sehen, die mit Cy3-Sonden und den dazugehörigen Helfersonden spezifisch für mpsp15 gefärbt wurden. Man kann sehen, dass nur der vordere Bereich mit mpsp15 gefärbt ist (EMI-Aufnahme von Renate Radek).

Es zeigte sich auch, dass der Spirochätenklon mp3 in größerer Anzahl vorkam als mp1, der bei manchen Flagellaten ein regelmäßiges Muster zeigte, bei anderen aber nur vereinzelt zu sehen war (Abbildung 15, 16). Es konnte nicht nachgewiesen werden, ob dies auf das Präparationsverfahren zurückzuführen ist oder ob mp1 tatsächlich von Flagellat zu Flagellat in unterschiedlicher Anzahl vorhanden ist.

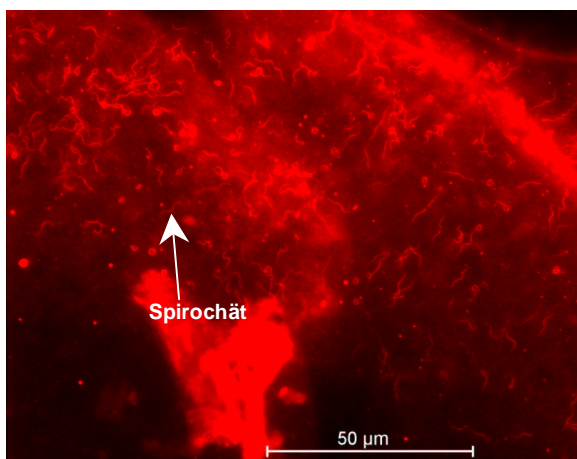


Abbildung 15: Spirochätenklon mp1

Fluoreszenzaufnahme eines Ausschnittes vom hinteren Bereich einer *Mixotricha paradoxa*-Hülle. Gefärbt wurde mit spezifischen Cy3-Sonden für den Spirochätenklon mp1.

Sowohl Klon mpsp 15 als auch mp3 waren bei allen untersuchten Flagellaten gleichmäßig im vorderen bzw. hinteren Bereich auf der Hülle nachzuweisen und entsprachen dem Bild, das Cleveland und Grimstone (1964) von den in Brackets regelmäßig angeordneten Spirochäten entwarf.

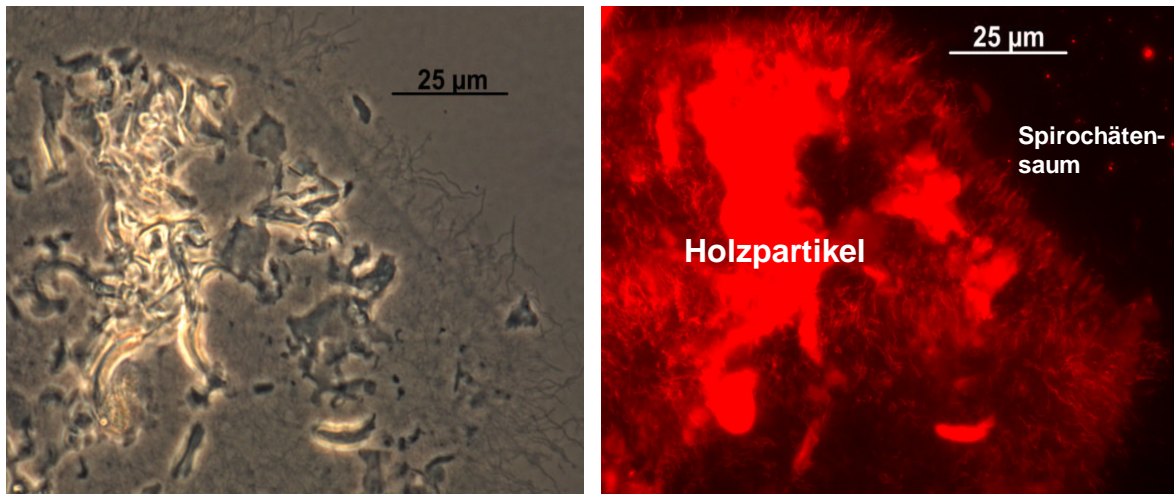


Abbildung 16: Der Spirochätenklon mp3

Die beiden Aufnahmen zeigen den gleichen Ausschnitt einer *Mixotricha paradoxa* Hülle. Das linke Bild ist eine Phasenkontrastaufnahme, das rechte zeigt die Hülle gefärbt mit den spezifischen Sonden für den Spirochäten mp3.

Die Sonden für die Spirochätenklone mp4 und mp5 zeigten kein eindeutiges Signal, so dass ihre Anwesenheit auf der Oberfläche von *Mixotricha paradoxa* trotz der eindeutigen PCR-Ergebnisse nicht bestätigt werden konnte. Die Sonden von mp2 (sp40-7) zeigten bei einigen Flagellaten vereinzelte, aber dennoch eindeutige Signale. Es ist aber fraglich, ob mp2 (sp40-7) ein festes Mitglied der Bewegungssymbiose ist. Anhand der Hybridisierungsergebnisse gewinnt man den Eindruck, dass er nur hin und wieder an den Flagellaten angeheftet ist. Zur Steigerung der Stringenz wurden zusätzlich auch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungsreaktionen mit Formamid durchgeführt. Die Hybridisierungspuffer mit den Sonden für den Klon mp2 (sp40-7) wurden dazu mit Formamid-Konzentrationen von 0, 20 und 30 % angesetzt. Aber nur der Hybridisierungsansatz ohne Formamid zeigte einzelne, aber deutliche Signale. Bei den Sondenmischungen für die Klone mp4 und mp5 wurden Formamid-Konzentrationen von 0, 20, 30, 50 und 70% eingesetzt, doch kein Ansatz zeigte positive Signale.

Als Negativkontrolle wurden die Spirochätenklone sp5-17 und sp40-11 ausgewählt, deren spezifischer Primer heterogene PCR Ergebnisse erbrachten.

Die Primer wurden durch die Anheftung eines Cy3-Farbstoffes am 3'-Ende der Sequenz zur Sonde umfunktioniert und es wurden zusätzlich Helfersonden konstruiert (Tabelle 2, 3). Aber alle Hybridisierungen mit den *Mixotricha paradoxa* Hüllen waren negativ.

Positive Signale ergaben reproduzierbar bei allen Flagellatenhüllen nur die Sequenzen der Klone mpsp15, mp1 und mp3. Folglich kann vermutet werden, dass diese Spirochätenklone drei Teilnehmer der Bewegungssymbiose auf der Oberfläche von *Mixotricha paradoxa* sind.

Stäbchen:

Von dem *Bacteroides forsythus*-ähnlichen Klon B6 wurden ebenfalls spezifische Cy3 markierte Sonden und weniger spezifische Helfersonden hergestellt (Tabelle 2, 3). Bei der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung konnte man die Signale des Bakteriums gleichmäßig über die gesamte Oberfläche von *Mixotricha paradoxa* verfolgen. Untersuchte man den Organismus im Phasenkontrast, waren keine ungefärbten Stäbchen festzustellen.

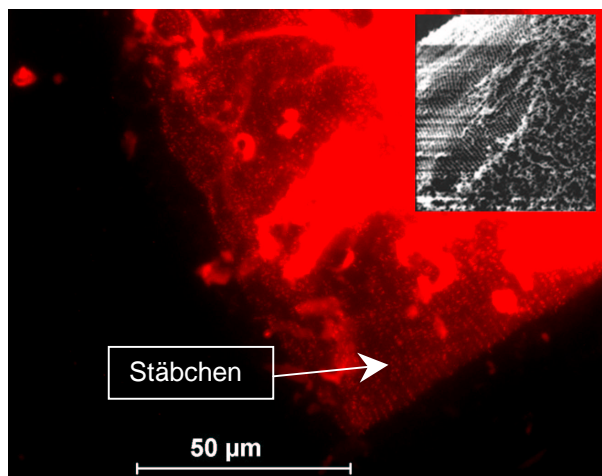


Abbildung 17: *Bacteroides forsythus*-ähnlicher Klon B6

Dargestellt ist ein Teil einer *Mixotricha paradoxa* Hülle. Die Hülle wurde mit den spezifischen Cy3-Sonden und den zugehörigen Helfersonden für den Klon B6 (Tabelle 2, 3) hybridisiert. Man kann auf den Teilen der Hülle die vollkommen frei von Holz sind, das Muster der Stäbchen erkennen. In dem kleinen Ausschnitt ist das elektronenmikroskopische Bild eines Teils der Hülle von *M. paradoxa* ohne assoziierte Spirochäten zu erkennen. Das Muster der Stäbchen ist freigelegt (EMI-Aufnahme: Renate Radek).

Bei vergleichenden Hybridisierungen mit einer universellen Eubakteriensonden Cy3-Eubak 338 konnte an spirochätenfreien Stellen exakt das gleiche Stäbchenmuster (wie mit der spezifischen Sonde) festgestellt werden. Als Negativkontrolle wurde von der Sonde B6.2 eine Mismatchsonde hergestellt. In die Sequenz von B6.2 wurden 3 Basenmismatches eingebaut und dann wurde die Sonde mit allen Helfersonden unter gleichen Bedingungen hybridisiert. Das Ergebnis war negativ, was darauf hin deutet, dass die Sonde B6.2 hochspezifisch ist.

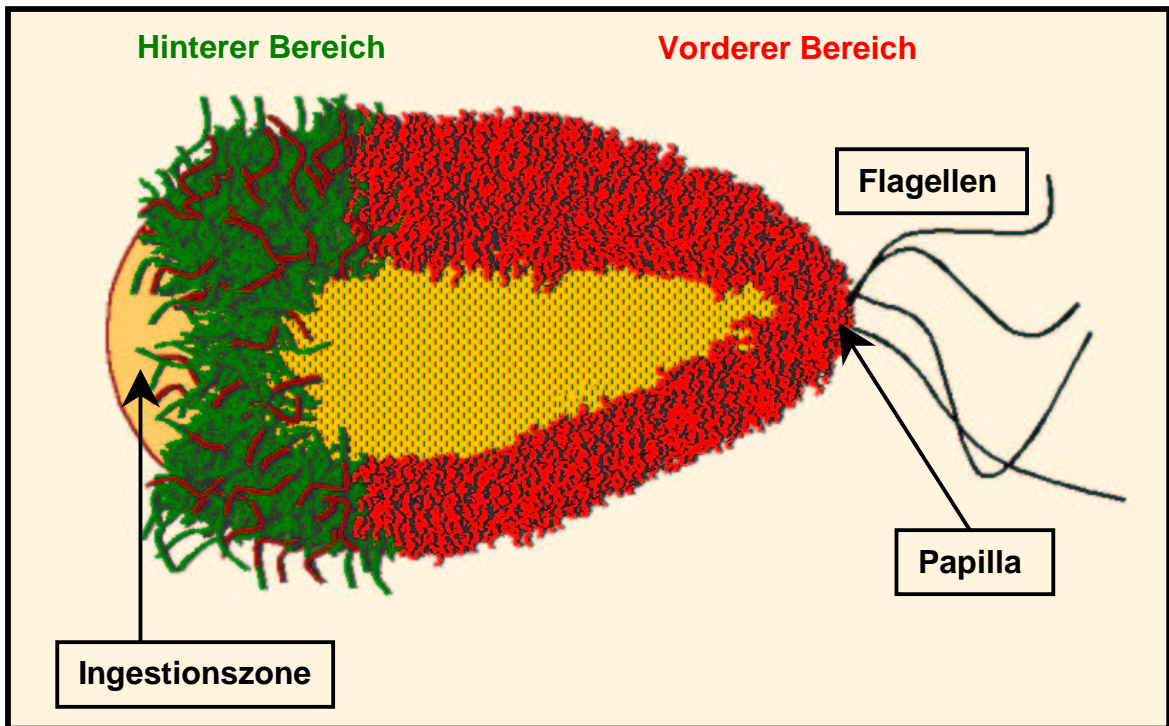


Abbildung 18: Skizze von *M. paradoxa* mit den entdeckten Hüllenbakterien.

Spirochätenklon mpsp 15		Spirochätenklon mp1	
Spirochätenklon mp3		Stäbchenklon B6	

Auf dem Flagellaten *Deltotrichonympha spec.* konnte mit der Eubakteriensonde Cy3-Eubak 338 im hinteren Bereich der Zelle ein Stäbchen in diffuser Anordnung nachgewiesen werden. Es lag nun nahe, die Sonden für B6 auch mit diesem Stäbchen zu hybridisieren, aber das Ergebnis war negativ. Das Stäbchen auf der Oberfläche von *Deltotrichonympha spec.* ist sehr wahrscheinlich nicht B6 (Daten werden hier nicht gezeigt).

3.2.4. Phylogenetische Charakterisierung der Symbioten

Bei der Konstruktion des Stammbaumes der symbiotischen Spirochäten zeigt sich die nahe phylogenetische Stellung der *Mastotermes darwiniensis* Spirochätenklone untereinander (Abbildung 19). Auch hier wurden die nächsten Verwandten aus der Datenbank mit in den Baum integriert. Wie bei den identifizierten Spirochätenklonen von Berchtold und König (1996) gehören auch mp1, mp2 (sp40-7), mp3, mp4 und mp5 zum *Treponema*-Zweig der Spirochäten.

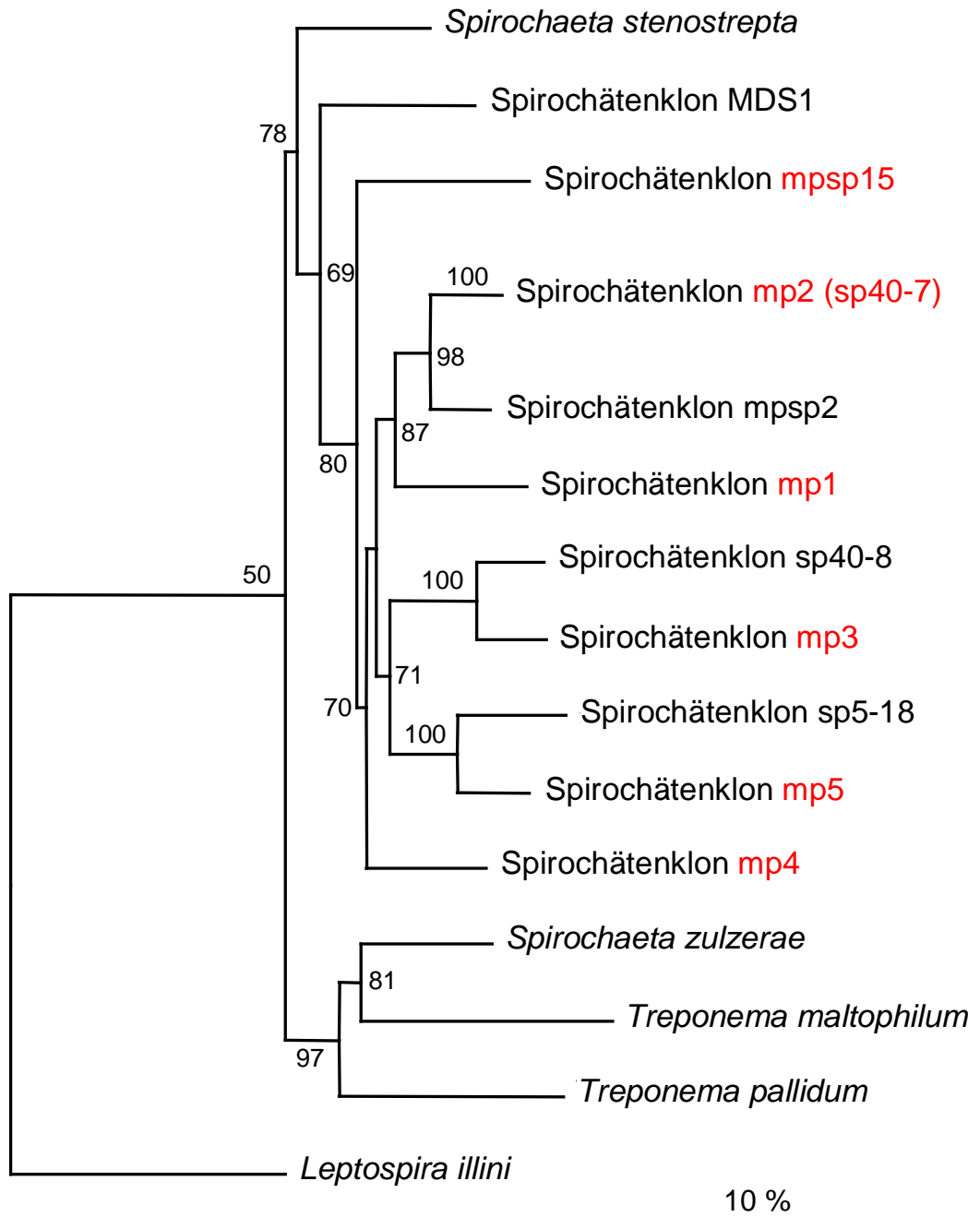


Abbildung 19: „Spirochätenstammbaum“

Phylogenetischer Stammbaum der 16S rDNA aller Spirochäten, die mit semispezifischer PCR von der Hülle von *Mixotricha paradoxa* amplifiziert wurden (in rot). Die Außengruppe ist *Leptospira illini*. Die Bootstrapwerte sind an den entsprechenden Verzweigungen angegeben. Bootstrapwerte unter 50% wurden nicht berücksichtigt. Der Maßstrich entspricht 10 Austauschen pro 100 Nukleotidpositionen.

Die Sequenzen des Klons B6 und seinen nächsten Verwandten wurden zur Konstruktion eines Stammbaumes herangezogen. Abbildung 20 zeigt die phylogenetische Position von Klon B6 zu den ähnlichsten Gram-negativen Bakterien. Man kann erkennen, dass Klon B6 die größte Verwandtschaft zu Organismen der *Bacteroides*-Gruppe hat. Wobei man bei allen phylogenetischen Interpretationen die geringe Ähnlichkeit von Klon B6 zu einem bisher bekannten Bakterium beachten sollte.

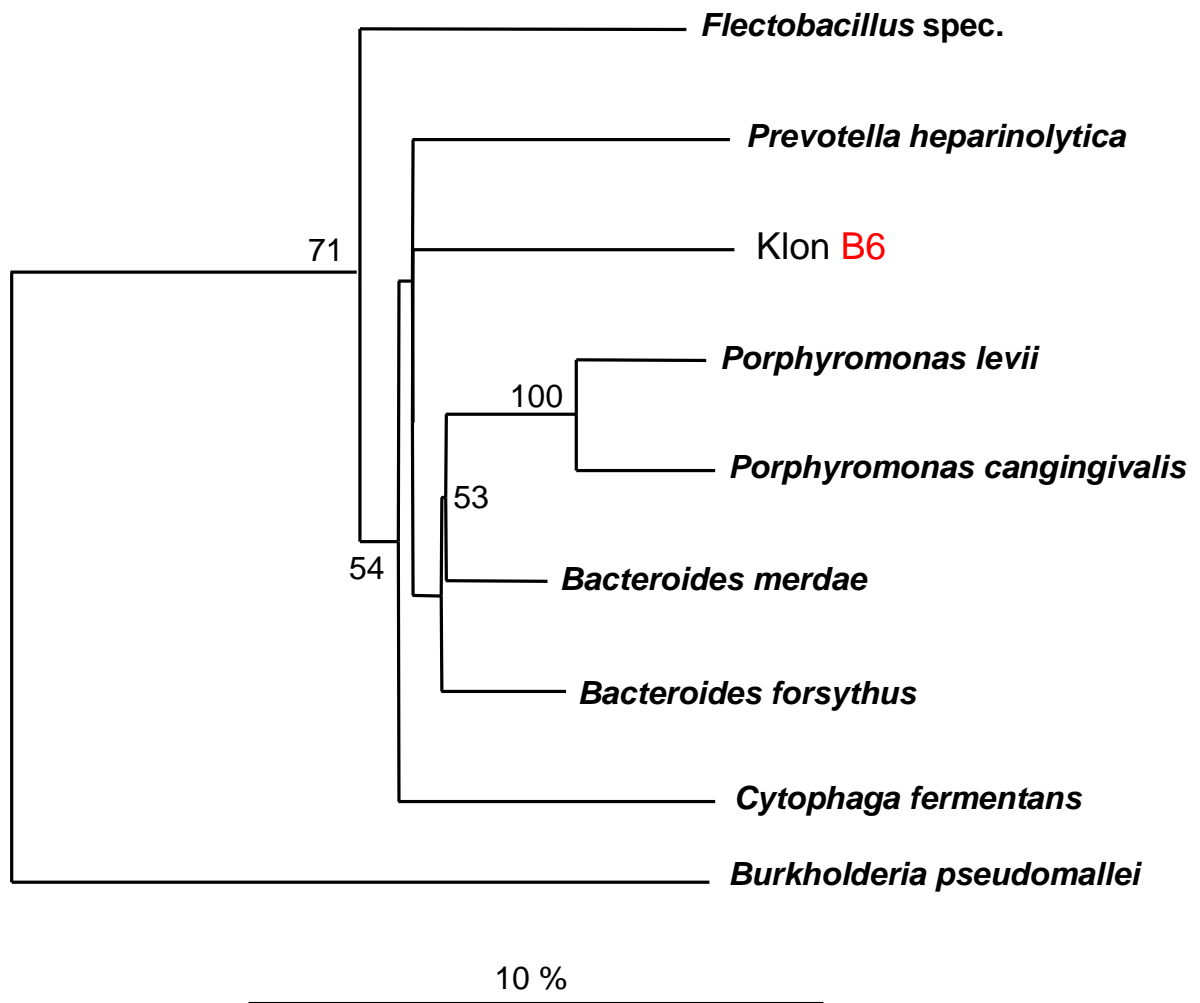


Abbildung 20: „Klon B6-Stammbaum“

Phylogenetischer Stammbaum der 16S rDNA des Klons B6 von der Oberfläche von *Mixotricha paradoxa* (in rot), zusammen mit den ähnlichsten Organismen aus der Datenbank (EMBL). Die Außengruppe ist *Burkholderia pseudomallei*. Die Bootstrapwerte sind an den entsprechenden Verzweigungen angegeben. Bootstrapwerte unter 50% wurden nicht berücksichtigt. Der Maßstrich entspricht 10 Austauschen pro 100 Nukleotidpositionen.

3.2.5. Mikroskopische Untersuchung

Bei der mikroskopischen Untersuchung von *Mixotricha paradoxa* konnte man feststellen, dass beim Absterben des Flagellaten die assoziierten Spirochäten ebenfalls zugrunde gingen. Es war zu erkennen, dass die Spirochäten etwa 2-3-mal länger lebten, aber am Ende doch starben, während im umliegenden Medium noch eine Vielzahl freier Spirochäten schwammen. Man konnte während der Absterbephase auch den Eindruck gewinnen, dass sich die Spirochäten von dem Flagellaten befreien wollten, dies aber nicht gelang. Das Mikroskopieren von *Mixotricha paradoxa* zeigt auch, dass die langen, unregelmäßig erscheinenden Spirochäten nicht Teil der Bewegungssymbiose sind, sondern dass die kürzeren, regelmäßig angeordneten Spirochäten die Bewegung verursachen.

4. Diskussion

4.1. Bakterieller Celluloseabbau im Termitendarm

Die normale Ernährung von Termiten ist reich an Cellulose, Hemicellulose und Lignin (Breznak und Brune, 1994; Varma *et al.*, 1994). Es scheint, dass aromatische Stoffe während der Passage des Holzes im Termitendarm modifiziert werden, wobei dies auf Lignin nicht zuzutreffen scheint (Kuhnigk *et al.*, 1994; Brune *et al.*, 1995a; Kuhnigk und König, 1997). Cellulose und Hemicellulose werden zu 80-90% im Darm abgebaut, wobei mehrere Hemicellulose abbauende Bakterien und Hefen schon beschrieben wurden (Schäfer *et al.*, 1996; Varma *et al.*, 1994).

Es ist eine weit verbreitete Ansicht, dass in erster Linie die Protozoen die Cellulose verwerten (Honigberg, 1970; Yamin, 1981; Odelson und Breznak, 1984). Da viele Versuche cellulolytische Bakterien zu isolieren scheiterten, sah man in ihnen kein großes cellulolytisches Potential (Cleveland, 1924; Dickman, 1931; Hungate, 1936; Eutick *et al.*, 1978; Schultz und Breznak, 1978; Slaytor, 1992). Vielleicht war deswegen bis zu der hier beschriebenen Arbeit über die Systematik und Anzahl von cellulolytischen Bakterien im Termitendarm nur wenig bekannt (Tabelle 1). Die Ergebnisse der gegenwärtigen Untersuchung zeigen eine hohe Zahl von unterschiedlichen cellulolytischen Bakterienspezies im Darm von sieben niederen Termitenarten (Tabelle 4). Den Hauptanteil der cellulolytischen Prokaryoten stellen fakultativ aerobe und mikroaerophile Mitglieder der Gattungen *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Streptomyces*, *Flexibacter* und Proteobakterien (Tabelle 4). Der Termitendarm wird oft mit dem Pansen von Kühen verglichen, wobei aber einige signifikante Unterschiede bestehen. Im Pansen wird der Celluloseabbau von Ciliaten, anaeroben Pilzen und anaeroben Bakterien betrieben. Die Bakterien sind Mitglieder von *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Fibrobacter* und *Ruminococcus* (Hobson, 1988). Ein weiterer Unterschied besteht im Sauerstoffgradienten. Der Pansen hat ein Volumen von etwa 100 l, während die Größe des Termitendarms je nach Art von 0.5 bis 10 µl variiert. *Mastotermes darwiniensis* und *Zootermopsis angusticollis* besitzen z. B. ein Volumen von 9-10 µl. Um überwiegend anaerob zu bleiben, muss der 10⁸-mal kleinere Termitendarm einen 500-mal höheren O₂-Verbrauch aufweisen. Deshalb ist im Gegensatz zum Pansen von Kühen, bei dem der Sauerstoffgradientenbereich nur ein Bruchteil des Pansenvolumens aus-

machen kann, der aerobe Bereich im Termitendarm prozentual ungleich größer. Im Falle von *Reticulitermes flavipes* macht diese Zone ungefähr 25% aus. Was bedeutet, dass in einem Viertel der Gärkammer von *R. flavipes* ein mehr oder weniger aerobes Milieu herrschen muss. Untersuchungen mit einer Sauerstoffempfindlichen Mikroelektrode zeigten das Termitendarmepithel als gut luftdurchlässig, so dass sich im Darm ein Sauerstoffgradientensystem aufbauen kann (Brune *et al.*, 1995b). Im Falle von *Mastotermes darwiniensis* reicht die sauerstoffhaltige Atmosphäre bis etwa 100 µm in den Darm hinein (Berchtold *et al.*, 1999). Von daher ist es nicht verwunderlich, dass in der vorliegenden Studie eine Vielzahl von fakultativ aeroben und strikt aeroben Organismen isoliert werden konnten. Sie können im Termitendarm vermutlich besser mit den dortigen Bedingungen leben als die strikt anaeroben Bakterien, die im Darm auch vorkommen und womöglich den sauerstoffhaltigen Bereich meiden müssen (Kuhnigk *et al.*, 1994). Wobei allerdings auch bekannt ist, dass methanogene Bakterien das Colon besiedeln können (Leadbetter und Breznak, 1996; Emtiazi, 2000). Mit mehreren cellulolytischen Isolat, die alle fakultativ anaerob sind, konnte auf Agarplatten ein Celluloseabbau unter anaeroben Kultivierungsbedingungen nachgewiesen werden. Es handelte sich dabei um *Bacillus*-Arten, des weiteren um Verwandte von *Cellulomonas spec.*, *Bordetella bronchiseptica*, *Brucella melitensis* und *Klebsiella pneumoniae* (Tabelle 5). In einer früheren Arbeit konnte ein strikt anaerobes und cellulolytisches *Clostridium* aus *Nasutitermes lujae* isoliert werden (Hethener *et al.*, 1992). Die Kultivierung der in dieser Arbeit beschriebenen Arten fand unter Stickstoffatmosphäre statt, möglicherweise waren dies nicht die geeigneten Bedingungen für die anderen cellulolytischen Isolate. In erster Linie wurde die Termit *Zootermopsis angusticollis* genau untersucht. Die cellulolytischen Bakterienarten aus ihrem Darm gehören hauptsächlich zur *Bacillus*- und *Flexibacter*-Gruppe. Es soll nicht unerwähnt bleiben, dass *Bacillus*-ähnliche Organismen aus fünf Termiten isoliert werden konnten, während alle *Flexibacter*-ähnliche Bakterien ausschließlich in *Zootermopsis angusticollis* gefunden wurden. Wobei noch mal betont werden muss, dass die übrigen sechs Termitenarten nicht genauso intensiv wie *Zootermopsis angusticollis* untersucht wurden. Dass *Bacillus*-Arten in Termiten weit verbreitet sind, ist angesichts ihrer anspruchslosen Physiologie und ihrer Fähigkeit zur Sporenbildung nicht verwunderlich. Auch im Laufe dieser Untersuchung waren die *Bacillus*-Isolate besonders

einfach zu kultivieren. Darin liegt aber auch die Gefahr der Missinterpretation, da im Termitendarm andere Verhältnisse als im Reagenzglas herrschen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass *Bacillus*-Arten unter den Kulturbedingungen dieser Studie einen Selektionsvorteil besaßen, der im Darm nicht vorhanden ist, und sich deshalb das Zahlenverhältnis der cellulolytischen Bakterien *in vivo* anderes präsentiert.

Die nächsten Verwandten der *Flexibacter*-ähnlichen Bakterien sind *Spirosoma*-ähnliche Organismen (90%, 561 bp), und ein unkultiviertes Bakterium namens GKS2-19 [AJ290060] (90%, 561 bp). *Flectobacillus* spec. [AJ011917] ist der nächste Organismus, der genauer definiert ist. Allerdings liegt eine 90% Übereinstimmung hier nur in 552 bp vor, was die phylogenetische Distanz erhöht. Man kann an diesen großen Sequenzunterschieden erkennen, dass diese Spezies möglicherweise eine neue Art ist, über deren Stoffwechselphysiologie deshalb wenig ausgesagt werden kann. Interessant ist die Tatsache, dass die *Flexibacter*-ähnlichen Bakterien nur aus dem Darm isoliert werden konnten, wenn *Z. angusticollis* auf Holz kultiviert wurde. Es stellt sich jetzt die Frage, ob die Bakterien bei der Filterpapierdiät nur nicht gefunden wurden oder ob sie unter diesen Voraussetzungen wenig oder überhaupt nicht im Darm vorkommen. Da sie so zahlreich in holzfressenden *Zootermopsis angusticollis* vorkommen und auch noch aus einer 10⁷fachen Verdünnung isoliert werden konnten, handelt es sich womöglich um eine zahlenmäßig dominierende Bakterienart im Darm, deren Funktion in der Darmflora genauer untersucht werden sollte.

Mitunter die besten Celluloseabbauer unter den gefundenen Organismen waren, wie es der Name schon andeutet, die Cellulomonaden. Bakterienarten ähnlich zu *Cellulomonas* spec. wurden aus *Mastotermes darwiniensis*, *Neotermes castaneus*, *Schedorhinotermes intermedius* und *Heterotermes indicola* isoliert (Tabelle 4). Zwei weitere Isolate mit dem gleichen Restriktionsmuster wurden aus *Zootermopsis angusticollis* (ZC1) und *Nasutitermes nigriceps* (NA2) isoliert (Daten nicht aufgeführt). Das zeigt, dass diese Bakterienspezies in sechs der sieben untersuchten Termiten nachzuweisen war. Berücksichtigt man die sehr gute Celluloseabbaufähigkeit dieser Isolate und ihre weite Verbreitung in den untersuchten Termitenspezies, dann wäre es möglich, dass diese Spezies einen erheblichen Anteil am Celluloseabbau im Darm von Termiten haben. Zwei bakterielle Isolate (MX5 und KScC3) stellten sich als eine neue Spezies heraus,

sie wurden als *Cellulosimicrobium variabile* sp. nov. bezeichnet. Es handelt sich bei den Bakterien um Gram-positive Stäbchen, die während des Wachstums eine irreguläre kokkoide und coryneforme Form zeigen. *C. variabile* wurde als einziges der cellulolytischen Isolate auch auf xylanolytische Aktivität hin untersucht und zeigte ein positives Ergebnis (Bakalidou *et al.*, 2001). Bei der vorliegenden Arbeit wurden die gesamten Därme in verschiedenen Medien inkubiert, so dass über die Lokalisierung der einzelnen Bakterienarten im Termitendarm wenig ausgesagt werden kann. In *Mastotermes darwiniensis* wurden Mitglieder des *Cytophaga-Flavobacterium*-Clusters in Wandbereichen der Gärkammer und des Colons gefunden (Berchtold *et al.*, 1999). Es besteht die Möglichkeit, dass es sich hierbei um die oben genannten Cellulomonaden handelt.

Es wurden mehrere Isolate gefunden, welche die höchste Ähnlichkeit zu *Streptomyces sampsonii* oder *S. nodosus* und *Micromonospora aurantiaca* aufweisen. In früheren Studien wurden bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen mycelbildende Actinomyceten entdeckt (Bignel *et al.*, 1979; Kuhnigk *et al.*, 1994). Es ist möglich, dass es sich dabei um die oben genannten Organismen handelt.

Über die Gruppe der cellulolytischen Proteobakterien kann gesagt werden, dass sie die größte Artenvielfalt, aber auch das schlechteste Celluloseabbauverhalten der vier Gruppen zeigen (Tabelle 4). Das Beispiel von *Rhizobium*-ähnlichen Isolaten könnte ein Indiz dafür sein, dass die Mitglieder der Proteobakterien im Darm eine andere Funktion ausüben als den Celluloseabbau. Die Rhizobien sind Stickstofffixierende Bakterien und in dieser Funktion für die Termiten von Bedeutung, da Holz eine sehr stickstoffarme Kost ist und deshalb Stickstofffixierer im Darm eine wichtige Funktion besitzen (Benemann, 1973, Breznak *et al.*, 1973, O'Brian und Slaytor, 1982). Allerdings vermögen viele Termiten auch Harnsäure wieder zu verwerten und auf diese Art Stickstoff zu konservieren (Potrikus und Breznak, 1980).

In einer früheren Arbeit wurde entdeckt, dass eine *Enterobacter cloacae*-Art aus Termiten Acetat produzieren kann (Veivers *et al.*, 1983). Da von diesem *E. cloacae* keine 16S rDNA-Sequenz zum Vergleich vorliegt, kann nicht geklärt werden, inwieweit er mit den in dieser Arbeit entdeckten cellulolytischen Enterobacteriaceen verwandt oder womöglich identisch ist. Dies hätte bedeuten können, dass die untersuchten Enterobacteriaceen ebenfalls die Fähigkeit zur

Acetatbildung haben, womit sie für die Termiten sehr wertvoll wären. Es ist auch bekannt, dass die meisten *Klebsiella*-Arten Stickstoff fixieren können (Madigan *et al.*, 2000), was womöglich auch auf die gefundenen *Klebsiella*-Arten zutrifft

Wie die Termiten ernähren sich auch andere Insekten von cellulosehaltigen Nahrungsquellen (Martin, 1983). Systematisch eng verwandt mit den Termiten sind, wie schon erwähnt, die Schaben. Deren Cellulasen im Mitteldarm sind, anders als in ihren Speicheldrüsen, mikrobiellen Ursprungs (Wharton *et al.*, 1965). In der Schabe *Eublaberus posticus* wurden zwischen $2 \cdot 10^5$ und $1 \cdot 10^7$ aerobe und zwischen $6 \cdot 10^6$ und $2 \cdot 10^8$ anaerobe cellulolytische Bakterien gefunden. Die Zahlen der CMC-abbauenden Bakterien im Colon waren sogar noch 10 Mal höher. Die cellulolytischen Bakterien wurden als *Clostridium*, *Eubacterium*, *Serratia*, *Citrobacter* und *Klebsiella* identifiziert (Cruden und Markovetz, 1979). Die Werte in der vorliegenden Untersuchung deuten auf eine Anzahl von bis zu 10^7 cellulolytische Prokaryoten pro ml Darmvolumen in Termiten. Es sind also durchaus Übereinstimmungen zu erkennen.

Im Laufe dieser Arbeit wurde jeweils eine Kolonie von *Zootermopsis angusticollis* und *Kaloterme flavicollis* auf Filterpapier kultiviert. Bei beiden Termitenarten waren nach 30 Tagen keine der vier größeren Flagellatenarten mehr zu erkennen. Diese Kultivierung wurde wiederholt, diesmal blieben die Flagellaten aber auch nach längerer Zeit noch nachweisbar. Es kann also nicht eindeutig ausgesagt werden, dass bei einer Filterpapierkost die Flagellaten generell nach einer Weile nicht mehr zu sehen sind. Andere Termiten von *Z. angusticollis* und *K. flavicollis* lebten 11 Monate auf Filterpapier, ohne dass sich größere Flagellaten nachweisen ließen, was darauf hindeutet, dass andere Organismen die Cellulose abgebaut haben. Als Alternativen bleiben nur cellulolytische Bakterien und Hefen oder termiteneigene Cellulasen. In einer anderen Studie, die ebenfalls in unserem Labor durchgeführt wurde, konnten aus *Mastotermes darwiniensis*, *Zootermopsis nevadensis*, *Odontotermes asmuti* und *Neotermes* sp. cellulolytische Hefen isoliert werden (Meyer, 1999). Es wurden schon früher endogene Cellulasen in Termiten nachgewiesen (Veivers *et al.*, 1982) und vor einiger Zeit konnte das erste Cellulasegen aus einer Termitenart identifiziert werden (Watanabe *et al.*, 1998). Es bleibt unklar, wie die obengenannten Cellulasesysteme zusammen arbeiten und welchen Beitrag sie zum Gesamtabbau der Cellulose im Darm beitragen. Aber sie deuten darauf hin, dass die Termiten möglicherweise doch nicht obligat auf die

cellulolytische Aktivität der großen Flagellaten angewiesen sind. Entgegen der bisherigen Ansicht (Veivers *et al.*, 1983), können Termiten vielleicht auch mit einer Darmflora aus kleinen Flagellaten, Bakterien und Hefen überleben. Von *Zootermopsis angusticollis* wurden einige Individuen nach der elfmonatigen Filterpapierdiät wieder auf frisches Holz transferiert und es zeigte sich, dass die größeren Flagellaten nach einiger Zeit wieder sichtbar waren. Es ist daher anzunehmen, dass die Flagellaten in der Lage waren, eine Art Ruhestadium zu bilden, solange die Bedingungen wenig optimal waren, um dann – bei einer Besserung der Umstände – zur vegetativen Form über zu gehen. Wie und wo dieses Ruhestadium im Darm vorkommt, konnte noch nicht geklärt werden. Unklar ist auch, ob und in welchem Maß die Flagellaten in diesem Ruhestadium Cellulasen produzieren. Es muss auch noch näher geklärt werden, ob die Flagellaten nur bei einer Filterpapierdiät der Termiten eine Art Ruhestadium bilden. In früheren Experimenten wurden Termiten auf einer Stärkediät kultiviert, wobei die größeren Protozoen ebenfalls nach einiger Zeit verschwunden waren. Wurden diese Termiten wieder auf Holz angesiedelt, sind die Protozoen nicht wieder erschienen, was darauf hindeutet, dass sie möglicherweise abgestorben sind (Veivers *et al.*, 1983).

Fazit und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war, die Anzahl und die cellulolytische Aktivität von Bakterien im Darm von Termiten zu zeigen. Es konnten 164 cellulolytische Bakterienarten isoliert werden, die 36 Gruppen zugeteilt wurden (Tabelle 4). Das Ergebnis der Studie zeigt, dass cellulolytische Bakterien häufiger und in größerer Anzahl im Termitendarm vorkommen als bisher angenommen. Und dass sie möglicherweise unter bestimmten Umständen sogar die Rolle der größeren Flagellaten beim Celluloseabbau übernehmen können. Allerdings muss dieser Punkt noch eingehender studiert werden, da früher beschrieben wurde, dass bei *Mastotermes darwiniensis* die Cellulase-Aktivität im Darm nach dem Tod der großen Flagellaten nachließ. Auch waren die Termiten nach der endgültigen Defaunierung der großen Protozoen nicht mehr in der Lage, auf Holz zu leben (Veivers *et al.*, 1983). In diesem Fall gelang es der cellulolytischen Bakterien- und Hefengemeinschaft offensichtlich nicht den Holzabbau zu bestreiten. Auch sollte die Stoffwechselphysiologie cellulolytischer Bakterienarten aus dem Termitendarm noch

genauer untersucht werden. Vielleicht findet man dann völlig neue Zusammenhänge im Holzabbau, die möglicherweise über den Termitendarm hinaus von Bedeutung sein können. Es könnte auch von Interesse sein, in anderen holzabbauenden Systemen nach cellulolytischen Bakterienarten und ihrer Wirkungsweise zu suchen.

4.2. Die Symbioten auf der Oberfläche von *Mixotricha paradoxa*

Kirby (1936) war einer der ersten Beobachter einer Bewegungssymbiose zwischen Protozoen und Bakterien in Termiten. Es handelte sich dabei um die Bewegungssymbiose zwischen dem Flagellaten *Pseudodevescovina uniflagellata* und Spirochäten im Darm der australischen Trockenholztermiten *Kaloterme (= Neoterme) insularis*. Drei Jahre früher publizierte Sutherland (1933) noch einen Artikel über *Mixotricha paradoxa*, in dem die angehefteten Spirochäten als Cillien missinterpretiert wurden. Cleveland und Grimstone (1964) beschrieben detailliert die Verbindung zwischen dem Flagellat *M. paradoxa* und seinen assoziierten Bakterien. Sie unterschieden auf der Oberfläche des Flagellaten kürzere Spirochäten, die den Protozoen in einem dichten Saum umgeben, längere, die nur sporadisch zu sehen waren und ein stäbchenförmiges Bakterium, das in einem präzisen Muster angeordnet ist (Abbildung 5, 6, 17). Sie beschrieben ebenfalls die genaue Anordnung der Spirochäten und des Stäbchens in speziellen Strukturen, den Brackets. Diese Erhebungen sind signifikant für die Fortbewegungsfunktionen der Spirochäten. Wenn die Spirochäten ihren Wirt vorwärts bewegen wollen, genügt es nicht, auf der Zelloberfläche in irgendeiner Form befestigt zu sein, es ist notwendig, dass sie nach hinten ausgerichtet sind. Um die gewünschte Richtung zu erreichen, sind die Spirochäten an den hinteren Teil der Oberfläche der seitlich vorstehenden Erhebungen angeheftet (Abbildung 6). Das Stäbchenbakterium hat wahrscheinlich keinen Anteil an der Bewegung von *Mixotricha paradoxa* (Cleveland und Grimstone, 1964).

Mixotricha paradoxa war auch Anschauungsobjekt für die Theorie, dass eukaryotische Bewegungsorganellen wie Flagellen und Cilien, von Spirochäten mittels Bewegungssymbiose abstammen. Gemäß dieser Theorie evolvierten Eukaryoten dadurch, dass Archae- und Eubakterienzellen in anaerober Symbiose zusammentrafen. Die Archaeozelle lieferte das Cytoplasma während die Eubakterienzelle (z. B. ein Spirochät) die Möglichkeiten zur Bewegung und even-

tuell zur Mitose einbrachte. Einige dieser anaeroben Zellen bezogen dann aerobe Eubakteria ein und entwickelten sich zu Mitochondrien-haltigen Aerobiern. Von denen die meisten Protisten, Tiere und Pilze abstammen. Zum Schluß verbanden sich einige dieser aeroben Zellen mit photosynthetischen Cyanobakterien und wurden dadurch die Vorläufer der Chloroplasten-haltigen Algen und Pflanzen. (Bermudes *et al.*, 1987; Margulis, 1993).

Berchtold und König (1996) gelang es 12 Spirochätenklone aus dem Darm von *Mastotermes darwiniensis* zu identifizieren. Allerdings blieb ihre Position im Darm oder ihre Morphologie weiterhin unklar. Trotzdem war der Gedanke naheliegend, dass einer oder mehrere der entdeckten Spirochäten zu den Oberflächensymbioten von *M. paradoxa* gehören. Um die Oberflächensymbioten von *M. paradoxa* zu identifizieren, wurde versucht, die 16S rDNA aller assoziierten Bakterien zu analysieren, indem von einer ganzen *Mixotricha paradoxa*-Zelle mit universellen Eubak-Primern (Eubak 3 und 5) PCR-Reaktionen durchgeführt und das enthaltene PCR-Produkt dann kloniert wurde. Auch wurden Bakterien von einzelnen *M. paradoxa*-Zellen auf verschiedenen Standardmedien kultiviert und die 16S rDNA der dadurch erhaltenen Bakterienkolonien ebenfalls analysiert. Auf diese Weise konnten 300- 400 bp der 16S rDNA von Spirochäten isoliert werden, die Ähnlichkeiten mit den Spirochätenklonen mpsp15 (Klon B27, 99%), MDS1 (Klon B21, 94%) und sp5-18 (Klon A4, 95%) aufwiesen (Berchtold und König, 1996; Wenzel, 1998). Zusätzlich erhielt man ähnlich lange Sequenzen einer Vielzahl verschiedener Bakterien, die Übereinstimmungen zu *Bacteroides forsythus* (90%), *Mycoplasma gallisepticum* (89%), einem unkultivierbaren Rumenbakterium (86%), einem *Flexistipes*-ähnlichen Bakterium (93%), *Escherichia coli* (95%), *Enterobacter aerogenes* (98%), *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Actinomycetales) (95 %), *Clavibacter michiganensis* (Actinomycetales) (95%), *Burkholderia phenazinium* (Proteobacteria) (98%), *Leuconostoc mesenteroides* (95%) und *Streptococcus pyogenes* (92%) zeigen (Wenzel, 1998). Die große Anzahl dieser Bakterienarten führte zu dem Schluss, dass viele Organismen nicht mit der Oberfläche des Flagellaten, sondern womöglich zufällig mit dem internen Holz assoziiert sind. Schließlich war bekannt, dass eine Vielzahl von unterschiedlichen Bakterien das Holz im Darm von *Mastotermes darwiniensis* besiedelt (Kuhnigk *et al.*, 1994; Schäfer *et al.*, 1996; Kuhnigk und König, 1997). Um sich auf die Spirochäten auf der Oberfläche

von *M. paradoxa* zu konzentrieren, wurden 11 der schon identifizierten Spirochätenarten aus dem Darm von *Mastotermes darwiniensis* ausgewählt und anhand ihrer Sequenz spezifische Primer konstruiert (Berchtold und König, 1996) (Tabelle 2). Zusätzlich wurde ein spezifischer Primer für die Sequenz eines, der in einer früheren Arbeit gefunden Spirochäten (Klon B21) aus *Mastotermes darwiniensis* konzipiert (Wenzel, 1998). Sechs der zwölf Primer lieferten ein homogenes PCR-Produkt, vier ein heterogenes (und deshalb nicht auswertbares Produkt) und zwei lieferten kein PCR-Produkt mit den Hüllen von *Mixotricha paradoxa*. Überraschenderweise ergab die Analyse der homogenen Sequenzen in fünf Fällen nicht zu hundert Prozent die Originalspirochätenklone. Nur das PCR-Produkt des Primers mp sp 15. 1258 R (Tabelle 2) zeigte eine hohe Ähnlichkeit (99%) zu dem Spirochätenklon mp sp 15. Die PCR-Produkte der anderen Primer ergaben keine eindeutigen Sequenzübereinstimmungen zu den früher isolierten Spirochätenklonen (Berchtold und König, 1996; Wenzel, 1998) und wurden deshalb als mp1, mp2, mp3, mp4 und mp5 bezeichnet. Die in diesen ersten Schritten erhaltenen Sequenzen waren alle zwischen 300-400 bp lang; zu kurz, um schon genaue Angaben über die Phylogenie der Organismen zu machen. Nach der Identifikation von 1400 –1500 bp der 16S rDNA-Sequenz von mp1-mp5, wurde festgestellt, dass die zuvor konstruierten Primer weniger spezifisch waren als angenommen. Vier der oben erwähnten sechs Primer, die ein homogenes PCR-Produkt ergaben, hatten mit der 16S rDNA-Sequenz von mindestens zwei Spirochäten eine Sequenzübereinstimmung (Tabelle 2). Da in Spirochäten nur 1-2 Gene für die 16S rDNA vorliegen, kann man nicht damit rechnen, dass verschiedenen Cistronen sequenziert wurden (Baranton und Old, 1995). Wie war es trotzdem möglich mit spezifischen Primern verschiedene Sequenzen zu erhalten? Die bisher gefundenen Spirochätenklone (Berchtold und König, 1996; Wenzel 1998) sind nicht alle im Darm von *Mastotermes darwiniensis* vorkommenden Spirochäten. Es wurden aber diese Klone als Grundlage für die Konstruktion spezifischer Primer benutzt. Dass die Primer nicht hochspezifisch waren, liegt an der Verwandtschaft von einigen der schon bekannten Spirochätenklone aus *Mastotermes darwiniensis* zu den zu diesem Zeitpunkt noch unentdeckten Klonen mp1-mp5. Deren fünf 16S rDNA-Sequenzen konnte bei der Überprüfung der Spezifität der Primer nicht mit berücksichtigt werden. Die ältesten Fossilien von Termiten sind etwa 130 Mio. Jahre alt. Jedoch wird aufgrund der Verbreitung

rezenter Arten und der gefundenen Fossilien angenommen, dass die Entstehung der Termiten bis ins späte Paläozoikum zurückdatiert (Emerson, 1965). Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, dass sich im Termitendarm ein seit Millionen von Jahren isoliertes Ökosystem aufgebaut hat. Dieses zeigt teilweise hohe Verwandtschaften untereinander, so dass sich einige Spirochätenarten stark ähneln. Alle bisher gefundenen Spirochätenarten in *Mastotermes darwiniensis* gehören zudem zu den Treponemen, die generell häufig in Termitendärmen vorzufinden sind (Paster *et al.*, 1996; Lilburn *et al.*, 1999; Ohkuma *et al.*, 1999; Iida *et al.* 2000).

Der Spirochätenklon mp1 zeigt die höchste Ähnlichkeit (91%) mit einem unkultivierten Treponema-Klon HsDiSp319. Diese weite phylogenetische Distanz deutet darauf hin, dass mp1 eine bisher unbekannte Spirochätenspezies repräsentiert. Nach den ersten Ergebnissen schien das PCR-Produkt mit dem Primer des Spirochätenklones sp40-7 keine genaue Übereinstimmung mit der Sequenz des Spirochätenklons mp2 zu haben (Berchtold und König, 1996). Deshalb wurde von einer neuen Spezies ausgegangen. Doch nach dem Vergleich von 1400 bp ergab sich eine 98 % Übereinstimmung der 16S rDNA zwischen mp2 und sp40-7, so dass die Vermutung nahe liegt, dass die beiden Klone identisch sind. Der nächste Verwandte von Klon mp3 ist Klon sp40-8 (96 %), der zu mp 4 ist sp40-11 (91%) und der zu mp 5 ist sp5-18 (94 %). Die phylogenetische Distanz ist ein Hinweis darauf, dass hier möglicherweise drei Klone bisher unbekannter Spirochätenspezies aus dem Darm von *Mastotermes darwiniensis* identifiziert wurden (Abbildung 19). Man geht bei Prokaryonten davon aus, dass bei 2% Sequenzunterschied die Artbegrenzung liegt (Stackebrandt und Goebel, 1994).

In den oben erwähnten früheren Experimenten (Wenzel, 1998) gelang es, die Sequenz eines Klones zu identifizieren, der die höchste Ähnlichkeit zu *Bacteroides forsythus* aufwies und der die Bezeichnung B6 erhielt. *B. forsythus* ist ein stäbchenförmiges und anaerobes Bakterium, wie es für die Stäbchen auf der Oberfläche von *M. paradoxa* vermutet wurde. Spezifische Primer wurden konstruiert und mit ihnen ein großer Teil der Sequenz des 16S rDNA-Gens des Klons B6 von der Hülle des Flagellaten amplifiziert. Vergleiche der Hybridisierungen mit den spezifischen B6-Sonden und der Hülle im Phasenkontrastmodus deuten darauf hin, dass nur Klon B6 auf der Zelloberfläche vorzufinden ist, denn es konnten keine ungefärbten Stäbchen detektiert werden. Die Hybridisie-

zungsmuster zwischen spezifischen B6-Sonden und einer universellen Eubak-sonde waren ebenfalls identisch, wenn man davon absieht, dass die Eubaksonde ein etwas stärkeres Signal lieferte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit Hilfe mehr oder weniger spezifischer Primer, die 16S rDNA der Spirochätenklone mpsp15 und mp1-mp5 und des Klons B6 von *Mixotricha paradoxa*-Hüllen isoliert werden konnte. Dies war aber noch kein endgültiger Beweis, dass die oben genannten Organismen tatsächlich die symbiotischen Bakterien auf der Zelloberfläche sind. Um die erhaltenen Sequenzen mit den Oberflächensymbioten in Übereinstimmung zu bringen, wurden mehrere der spezifischen Primer zu Cy3-markierten Sonden umgestaltet (Tabelle 2) und in eine Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung eingesetzt. Es zeigte sich, dass *Mixotricha paradoxa* eine überaus starke Autofluoreszenz durch das interne Holz ausstrahlte (Abbildung 11), so dass man nahezu keine spezifischen Signale detektieren konnte. Für erfolgreiche Hybridisierungen musste die Flagellatenhülle von dem Holz getrennt werden. Dazu wurde eine Methode entwickelt, das Holz zu entfernen, ohne die Oberfläche zu zerstören. Mit den fast transparenten *M. paradoxa*-Hüllen konnten die ektosymbiotischen Bakterien genau untersucht werden (Abbildung 12). Bei den nun folgenden Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen traten jedoch neue Probleme auf. Die spezifischen Sonden gaben mit den vermuteten Bakterien nur äußerst schwache Signale, obwohl die Sequenzen nach dem Vorschlag von Fuchs *et al.*, (1998) aus gut zugänglichen Bereichen der 16S rRNA gewählt wurden (Abbildung 8). Allerdings bezogen sich seine Untersuchungen nur auf *E. coli*. Ebenfalls von Fuchs *et al.*, (2000) stammt die Idee von unmarkierten Helfersonden, welche um die spezifische Sonden gruppiert werden und so die Sekundärstruktur von *E. coli* aufbrechen (Abbildung 10, 13). Dieses soll den spezifischen Sonden die Bindung erleichtern und damit die Stärke des Fluoreszenzsignals erhöhen. Diese Überlegungen wurden auf die Oberflächenbakterien von *Mixotricha paradoxa* übertragen. Es wurden zu jeder spezifischen Cy3-Sonde benachbarte Helfersonden entwickelt. Ein weiterer Versuch, die Sekundärstruktur aufzulösen, war ein Denaturierungsschritt bei 80°C. Dahinter stand die Idee, dass bei 80°C eventuell blockierende Proteine von der RNA abgelöst werden und sich die Sekundärstruktur der 16S rRNA entwindet, die Ribosomen der Zellen sich aber bei dieser Temperatur nicht auflösen. Die Kombination aus Denaturierungsschritt und Helfersonden erhöhte die Signalstärke

ganz außerordentlich, so dass markierte und unmarkierte Bakterien deutlich voneinander unterschieden werden konnten. Auf diesem Weg gelang es, vier spezifische Sequenzen den entsprechenden Organismen zuzuordnen. Es waren dies die Spirochätenklone mpsp15, mp1 und mp3 und das *Bacteroides forsythus*-ähnliche Klon B6. Bei der Hybridisierung der spezifischen Fluoreszenzsonden von Klon mpsp 15 wurde die überraschende Entdeckung gemacht, dass nur Spirochäten des vorderen Bereichs von *Mixotricha paradoxa* ein Signal zeigten (Abbildung 14). Die Spirochäten am hinteren Ende des Flagellaten blieben bei der FISH mit mpsp15-spezifischen Sonden vollkommen unmarkiert. Mpsp15 wirkt im Vergleich zu vielen freilebenden Arten, eher klein. Dies stimmt nicht unbedingt mit dem Ergebnis von Berchtold (1995) überein, der die gleiche 16S rDNA-Sequenz einer großen freilebenden Spirochätenart zuordnete. Allerdings konnte nicht festgestellt werden, ob die assoziierten Bakterien nicht auch frei im Darm von *Mastotermes darwiniensis* vorkommen. Die genaue Größe von mpsp 15 konnte mit den dargestellten Verfahren nicht bestimmt werden, doch beschrieben Cleveland und Grimstone (1964) die kleinen Spirochäten auf *M. paradoxa* als etwa 10 µM lang. Die Sonden von mp1 färbten deutlich Spirochäten auf dem hinteren Bereich des Flagellaten an, aber keinen einzigen im vorderen Teil, wo Klon mpsp15 nachgewiesen wurde. Ebenfalls nur hinten auf der Oberfläche waren Signale von spezifischen Sonden für den Klon mp3 zu erkennen. Die Signale von Spirochätenklon mp3 deuten auch darauf hin, dass dieser Spirochät in höherer Zahl auf *Mixotricha paradoxa* vorkommt als Klon mp1 (Abbildung 15, 16). Morphologisch scheinen die Klone mp1 und mp3 größer zu sein als Klon mpsp 15, aber alle drei zeigen die typische helikale Spirochätenform. Es ist nicht bekannt, warum am hinteren Ende zwei Spirochätenspezies leben, während im vorderen Bereich nur eine befestigt ist. Es wäre möglich, dass durch die hinten angeordnete Verdauungsöffnung dieser Bereich eine höhere Nährstoffkonzentration aufweist und deshalb als Lebensraum attraktiver erscheint.

Obwohl die Sequenzen der Spirochätenklone mp2 (sp40-7), mp4 und mp5 positive PCR-Resultate mit den Hüllen von *M. paradoxa* ergaben, gelang es nicht, sie mit Hilfe einer Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung einem der Spirochäten auf der Oberfläche zuzuordnen. Klon mp2 (sp40-7) zeigte bei einigen Hüllen ein vereinzelt Auftreten, das Fluoreszenzsignal war dabei sehr deutlich. Deshalb kann man davon ausgehen, dass die Cy3-Sonden gut banden, Spirochäten vom

Typ Klon mp2 (sp40-7) aber nur sporadisch hin und wieder an einem Flagellaten angeheftet sind.

Schon bei einfachen lichtmikroskopischen Beobachtungen von *Mixotricha paradoxa* erkennt man auf der Hülle unregelmäßig vorkommende Spirochäten, die um vieles länger sind als die anderen Symbioten. Es war nicht möglich, nach der Präparation der Hüllen, diese Organismen noch auf der Oberfläche nachzuweisen. Auch bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen scheinen diese Spirochäten fast vollständig verloren gegangen zu sein (Abbildung 5, 14). Selbst bei genauen Untersuchungen von lebenden *Mixotricha paradoxa* Zellen konnte nicht zweifelsfrei ausgesagt werden, ob sich diese sehr langen Organismen mit den anderen Spirochäten in Übereinstimmung bewegen und somit den Protozoen ebenfalls vorantreiben. Cleveland machte die Entdeckung, dass diese Spirochäten nicht, wie die kürzeren, in Brackets angeordnet sind (Abbildung 6) (Cleveland und Grimstone, 1964). Dies würde bestätigen, dass sie nicht Teil der Bewegungssymbiose sind, womöglich reversibel mit *Mixotricha paradoxa* assoziiert und sogar nur temporär angeheftet sind.

Mit Hilfe spezifischer Sonden konnte das stäbchenförmige Bakterium, das zusammen mit den Spirochäten in einem exakten Muster auf der Hülle von *Mixotricha paradoxa* angeordnet ist, als *Bacteroides forsythus*-ähnlicher Klon B6 identifiziert werden (Abbildung 5, 17). Hybridisiert man die Flagellatenhüllen mit einer universellen Eubaksonde (Eubak 338R, Amann *et al.*, 1990), kann man auf der Oberfläche Stäbchen im gleichen Muster und der gleichen Dichte erkennen wie mit den Sonden für B6, nur ist die Signalstärke mit der Eubaksonde noch etwas besser.

Betrachtungen des lebenden Flagellaten unter dem Lichtmikroskop deuten an, dass Spirochäten und Protozoen eine Art „Schicksalsgemeinschaft“ eingegangen sind. Stirbt der Flagellat, sterben nach einiger Zeit auch die Spirochäten. Obwohl im umliegenden Medium viele freilebende Spirochäten noch längere Zeit überleben. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Spirochäten fest mit *Mixotricha paradoxa* verankert sind und nicht etwa den Flagellaten regelmäßig frequentieren, um dann aber wieder frei im Darm zu leben. Es scheint so zu sein, dass der Flagellat und seine Oberflächenspirochäten eine Einheit darstellen. Inwieweit das Überleben von *Mixotricha paradoxa* von den Bakterien auf seiner Oberfläche abhängig ist, konnte in diesem Experiment nicht festgestellt werden.

Auch ist nicht bekannt, ob das Stäbchen auf der Oberfläche ebenfalls dauerhaft angeheftet ist oder nicht. Es ist ebenfalls noch nicht geklärt ob zwischen Flagellat und Spirochäten nur eine Bewegungssymbiose herrscht. Dies ist nicht sehr wahrscheinlich, da in vielen Termiten Beispiele von Protozoen mit ektosymbiotischen Spirochäten gefunden wurden, die vermutlich keine Bewegungssymbiose miteinander teilen (Bloodgood und Fitzharris, 1976; Breznak, 1984; Iida *et al.*, 2000). In *Mastotermes darwiniensis* selbst liegt mit *Deltotrichonympha spec.* eine Protozoen-Spirochäten-Gemeinschaft vor, die aller Wahrscheinlichkeit nach keine Bewegungssymbiose darstellt (Cleveland und Cleveland, 1966). Es müsste also noch eine andere Erklärung für die Symbiose geben. Leadbetter *et al.* (1999) diskutieren die Möglichkeiten, dass die Spirochäten das von den Protisten ausgeschiedene CO₂ und H₂ konsumieren, um es in Acetat umzuwandeln, oder aber den Transport von reduzierten Äquivalenten durch die Bewegungsenergie der Symbiose. Ähnliches wurde im Fall der Symbiose zwischen anaeroben Ciliaten und endosymbiotischen, methanogenen Archaeen gezeigt (Emblay und Finlay, 1994).

Möglicherweise besteht zwischen *Mixotricha paradoxa* und dem assoziierten Stäbchen ebenfalls ein symbiotischer Austausch von Stoffwechselprodukten. Die meisten *Bacteroides*-Arten sind als fermentativ und acetogen bekannt. Es wurden schon früher Mitglieder von *Bacteroides* in Termiten gefunden (Schultz und Breznak, 1978; Kudo *et al.*, 1998). In einem Fall wurde ein Harnsäure abbauendes Bakterium als *Bacteroides termitidis* identifiziert (Potrikus und Breznak, 1980). Es wurde weiter oben erläutert, dass die Termiten den Harnsäure-Abbau als Stickstoffkonservierung benutzen. Möglicherweise besteht zwischen *Mixotricha paradoxa* und Klon B6 eine Symbiose, die den Flagellaten mit Stickstoff versorgt. Der Kommunikationsmechanismus zwischen den Spirochäten und *M. paradoxa* ist ebenfalls noch unklar. Die Bindung zwischen den Organismen erfolgt vermutlich über Lectine (Radek *et al.*, 1996). Es ist aber nicht bekannt ob *M. paradoxa* die Wellenbewegung der Spirochäten beeinflusst, ob die Bewegung ungerichtet ist oder ob die Spirochäten auf chemotaktische Einflüsse reagieren. Ein solches Verhalten wurde für den Termitenflagellaten *Streblomastix strix* und seine assoziierten, stäbchenförmigen Bakterien beschrieben (Dyer und Khalsa, 1993).

Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen das Spirochätenklon mpsp15 den dichten Saum auf dem vorderen Teil der *Mixotricha paradoxa*-Zelle bildet, während im hinteren Bereich die Spirochätenklone mp1 und mp3 befestigt sind (Abbildung 14, 15, 16, 18). Diese drei Organismen sind wahrscheinlich auch an der Bewegungssymbiose von Flagellat und Spirochäten beteiligt. Alle drei Spirochäten gehören zum *Treponema*-Ast (Abbildung 19) der Spirochäten, genau wie alle anderen aus *Mastotermes darwiniensis* isolierten Spirochätenklone (Berchtold und König, 1996). Das stäbchenförmige Bakterium B6, welches in einem regelmäßigen Muster auf der Oberfläche von *Mixotricha paradoxa* angeordnet ist (Abbildung 5, 17, 18), zeigt die höchste Ähnlichkeit zur *Bacteroides*-Gruppe (Abbildung 20), scheint aber aufgrund der geringen phylogenetischen Verwandtschaft eine bisher unbekannte Spezies zu sein. Es ist noch nicht geklärt, ob die obengenannten Organismen alle Mitglieder der Symbiose zwischen Flagellat und Bakterien darstellen. Es sind noch weitere Experimente nötig, um die gesamten Zusammenhänge festzustellen.

Es wurden schon viele Beispiele von Symbiosen zwischen Protisten und Prokaryoten im Termitendarm entdeckt (Bloodgood und Fitzharris, 1976; To *et al.* 1980; Breznak, 1984; Dyer und Khalsa, 1993; Iida *et al.*, 2000). Die in der Arbeit beschriebenen Untersuchungsmethoden könnten helfen, diese und andere Lebensgemeinschaften zwischen Protozoen und Bakterien zu entschlüsseln. Wobei die Anwendung der dargelegten Methoden nicht auf den Termitendarm beschränkt bleiben muss.

5. Zusammenfassung

Es ist eine bekannte Tatsache, dass niedere Termiten im Wesentlichen von Holz leben. Die Hauptaufgabe der Darmflora der Termiten liegt im Abbau dieses Holzes, um dessen Abbauprodukte wie Acetat, der Termiten zugänglich zu machen, da Acetat für die Termiten die Hauptenergiequelle darstellt. Im Laufe der Millionen Jahre alten Entwicklung der Termiten hat sich in ihrem Darm ein Ökosystem aufgebaut, das aus Protozoen, Archaeen, Bakterien und Hefen besteht. In welcher Form alle diese Organismen am Holzabbau beteiligt sind, ist noch nicht endgültig geklärt. Es ist aber bekannt, dass die Termiten ohne die Darmflora nicht überleben können. Ziel der vorliegenden Arbeit war die teilweise Erforschung der symbiotischen Zusammenhänge in diesem ökologischen System. Es wurden dabei zwei Gebiete genauer untersucht:

1) Cellulolytische Bakterien im Darm von niederen Termiten

Die bisher vorherrschende Meinung sah in den Protozoen die Hauptkomponenten des Celluloseabbaus in Termiten. Alle anderen Organismen wurden erst auf der Stufe von Abbauprodukten als Teilnehmer vermutet. In dieser Arbeit gelang es 164 cellulolytische Bakterienstämme aus sieben niederen Termitenarten zu isolieren und zu identifizieren. Die Stämme konnten den Gattungen *Agromyces*, *Cellulomonas*, *Curtobacterium*, *Cellulosimicrobium*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Micromonospora*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Afipia*, *Azospirillum*, *Bordetella*, *Brucella*, *Rhizobium*, *Klebsiella*, *Sphingomonas* und *Flexibacter* zugeordnet werden. Diese Vielzahl cellulolytischer Bakterienarten könnte ein Indiz dafür sein, dass Bakterien im Holzabbau der Termiten eine effizientere Rolle spielen als bisher angenommen.

2) Oberflächenbakterien von *Mixotricha paradoxa*, einem Flagellaten aus dem Darm der australischen Termiten *Mastotermes darwiniensis*

Mixotricha paradoxa ist ein Beispiel der seltenen Form einer Bewegungssymbiose zwischen Protozoen und Bakterien. Der Flagellat wird von Spirochäten, die auf seiner Oberfläche befestigt sind, vorangetrieben. Zusätzlich sind noch stäbchenförmige Bakterien auf der Hülle befestigt, die aber nach gegenwärtigem Kenntnisstand keinen Anteil an der Bewegung von *M. paradoxa* haben. Es gelang drei Spirochätenarten zu identifizieren, die allerdings nur in bestimmten Bereichen der Zelloberfläche zu finden sind. Der Spirochätenklon

mmsp 15 konnte nur im vorderen, die Spirochätenklone mp1 und mp3 nur im hinteren Bereich von *Mixotricha paradoxa* nachgewiesen werden. Alle drei Organismen gehören zum *Treponema*-Zweig der Spirochäten. Es wird angenommen, dass alle drei Arten Mitglieder der Bewegungssymbiose sind. Das auf der Oberfläche von *M. paradoxa* gefundene stäbchenförmige Bakterium wurde als Klon B6 bezeichnet. Es zeigt die größte Ähnlichkeit zur Gattung *Bacteroides*, wobei die phylogenetische Distanz auf eine bisher unbekannte Spezies hinweist. Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen deuten darauf hin, dass B6 als einziges Stäbchen auf der Zellhülle befestigt ist.

6. Literatur

- Amann, R. I., Krumholz, L., Stahl, D. A. (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172: 762-770.
- Bakalidou, A., Kämpfer, P., Berchtold, M., Kuhnigk, T., Wenzel, M., König, H. (2001) *Cellulosimicrobium variabile* sp. nov., a cellulolytic bacterium from the hindgut of the termite *Mastotermes darwiniensis*. *IJSEM*. Online publiziert am 18.12.2001.
- Balch, W. E., Fox, G. E., Magrum, L. J., Woese, C. R., Wolfe, R. S. (1979) Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.* 43: 260-296.
- Bandi, C., Sironi, M.; Damiani, G., Magrassi, L., Nalepa, C. A., Laudani, U., Sacchi, L. (1995) The establishment of intracellular symbiosis in an ancestor of cockroaches and termites. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 259: 293-299.
- Baranton, G., Old, I. G. (1995) The spirochaetes: a different way of life. *Bull. Inst. Pasteur* 93: 63-95.
- Benemann, J. R. (1973) Nitrogen fixation in termites. *Science* 181: 164–165.
- Berchtold, M., Ludwig, W., 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. (1995) Phylogenetische Charakterisierung symbiontischer Mikroorganismen im Darm von Termiten. Dissertation. Universität Ulm.
- 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., Chatzinotas, A., Schönhuber, W., Brune, A., Amann, R., Hahn, D., König, H. (1999). Differential enumeration and in situ localization of microorganisms in the hindgut of the lower termite *Mastotermes darwiniensis* by hybridization with rRNA-targeted probes. *Arch. Microbiol.* 172: 407-416.
- Bermudes, D., Margulis, I., Tzertzinis, G. (1987) Prokaryotic Origin of Undulipodia. In: Endocytobiology III (Hrsg. John J. Lee und Jerome F. Fredrick). The New York Academy of Sciences, New York, pp. 187-197.

- Bertran, M. S., Dale, B. E. (1985) Enzymatic hydrolysis and recrystallization behavior of initially amorphous cellulose. *Biotech. Bioeng.* 27: 177.
- Bidnenko, E., Mercier, C., Tremblay, J., Tailliez, P., Kulakauskas S. (1998) Estimation of the state of the bacterial cell wall by fluorescent *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3059–3062.
- Bignell, D. E., Oskarsson, H., Anderson, J. M. (1979) Association of actinomycete-like bacteria with soil-feeding termites (Termitidae, Termitinae). *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 339-342.
- Binder, B. J., Liu, Y. C. (1998) Growth rate regulation of rRNA content of a marine *Synechococcus* (Cyanobacterium) strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3346–3351.
- Bloodgood, R. A., Fitzharris, T. P. (1976) Specific associations of prokaryotes with symbiotic flagellate protozoa from the hindgut of the termite *Reticulitermes* and the wood-eating roach *Cryptocercus*. *Cytobios.* 17 (66): 103-22.
- Branke, J. (1997) Phylogenetische und morphologische Charakterisierung pro- und eukaryontischer Mikroorganismen aus dem Mäuse- und Termitendarm. Dissertation. Universität Ulm.
- Breznak, J. A., Brill, W. J., Mertins, J. W., Coppel, H. C. (1973) Nitrogen fixation in termites. *Nature* 244: 577–580.
- Breznak, J. A. (1982) Intestinal microbiota of termites and other xylophagous insects. *Ann. Rev. Microbiol.* 36: 323-343.
- Breznak, J. A. (1984) Biochemical aspects of symbiosis between termites and their intestinal microbiota. In: *Invertebrate-Microbial Interactions* (Hrsg.: Anderson, J. M., Rainer, A. D. M., Walton, D. W. H.), Cambridge University Press, pp 173-203.
- Breznak, J. A., Brune, A. (1994) Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. *Ann. Rev. Entomol.* 39: 453-487.
- Brosius, J., Dull, T. J., Sleeter, D. D., Noller, H. F. (1981) Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 148: 107–127.
- Brune, A., Miambi, E., Breznak, J. A. (1995a) Role of oxygen and the intestinal microflora in the metabolisms of lignin-derived phenylpropanoids and other monoaromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2688-2695.

- Brune, A., Emerson, D., Breznak, J. A. (1995b) The termite gut microflora as an oxygen sink: microelectrode determination of oxygen and pH gradients in the guts of lower and higher termites. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2681-2687.
- Canale-Parola, E. (1991) Free-living saccharolytic spirochetes: the genus *Spirochaeta*. In: Prokaryotes (Hrsg.: Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.) Springer Verlag, Heidelberg, Volume IV, 3593-3607.
- Cleveland, L. R. (1924) The physiological and symbiotic relationships between the intestinal protozoa of termites and their host with special reference to *Reticulitermes flavipes* Kollar. *Biol. Bull. Mar. Biol. Labo. Woods Hole* 46: 177-227.
- Cleveland, L. R., Hall, S. K., Sanders, E. P., Collier, J. (1934) The wood-feeding roach *Cryptocercus*, its protozoa, and the symbiosis between protozoa and roach. *Mem. Am. Acad. Arts. Sci.* 17: 185-342.
- 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.
- Cleveland, L. R., Cleveland, B. T. (1966) The locomotory waves of *Koruga*, *Deltotrichonympha* and *Mixotricha*. *Arch. Protistenk.* 109: 39-63.
- Cruden, D. L., Markovetz, A. J. (1979) Carboxymethyl cellulose decomposition by intestinal bacteria of cockroaches. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 369-372.
- DeLong, E. F., Wickham, G. S., Pace, N. R. (1989) Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* 243: 1360–1363.
- Dickman, A. (1931) Studies on the intestinal flora of termites with special reference to their ability to digest cellulose. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole* 61: 85-92.
- DSMZ (2001) Catalogue of Strains. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig.
- Dyer, B. D., Khalsa, O. (1993) Surface bacteria of *Streblomastix strix* are sensory symbionts. *Biosystems* 31: 169-80.
- Efron, B. (1979) Bootstrap methods: Another look at the jackknife. *Annals Stat.* 7: 1-26.

- Embley, T. M., Finlay, B. J. (1994) The use of small subunit rRNA sequences to unravel the relationships between anaerobic ciliates and their methanogen endosymbionts. *Microbiology* 140: 225-235.
- Emerson, A. E. (1965) A review of the Mastotermitidae (Isoptera), including a new fossil genus from Brazil. *Amer. Mus. Novitates* 2236: 1-46.
- Emtiazi, Farahnaz (2000) Phylogenetische Charakterisierung von Mikroorganismen aus dem Intestinaltrakt von Insekten. Dissertation. Universität Mainz.
- Eutick, M. L., O'Brian, R. W., Slaytor, M. (1978) Bacteria from the gut of australian termites. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 823-828.
- Eutick, M. L., Veivers, P., O'Brian, R., W., Slaytor, M. (1978) Dependence of the higher termite *Nasutitermes exitiosus* and the lower termite *Copotermes lacteus* on their hindgut flora. *J. Insect. Physiol.* 24: 363-368.
- Fegatella, F., Lim, J., Kjelleberg, S., Cavicchioli R. (1998) Implications of rRNA operon copy number and ribosome content in the marine oligotrophic ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. strain Rb2256. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4433–4438.
- Felsenstein, J. (1982) Numerical methods for inferring phylogenetic trees. *Quart. Rev. Biol.* 57: 379-404.
- Felsenstein J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Felsenstein, J. (1993) PHYLIP 3.5. Department of Genetics SK-50, University of Washington, Seattle, Washington 98195.
- Fitch, W. M., Margoliash, E. (1967) Construction of phylogenetic trees. *Science* 155: 279-284.
- Fröhlich, J. (1999) Entwicklung und Einsatz von Isoliertechniken zur phylogenetischen Charakterisierung symbiontischer Mikroorganismen im Darm von Termiten. Dissertation. Universität Ulm.
- Fröhlich, J. (2001) Persönliche Mitteilung, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Universität Mainz.
- Fuchs, B. M., Wallner, G., Beisker, W., Schwippl, I., Ludwig, W., Amann R. (1998) Flow cytometric analysis of the *in situ* accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol* 64: 4973–4982.

- Fuchs, B. M., Glöckner, F. O., Wulf, J., Amann R. (2000) Unlabeled helper oligonucleotides increase the *in situ* accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3603–3607.
- Gutell, R. R. (1994) Collection of small subunit (16S- and 16S-like) ribosomal RNA structures. *Nucl. Acids Res.* 22: 3502–3507.
- Grethlein, H. E. (1978) Comparison of the economics of acid and enzymatic hydrolysis of newsprint. *Biotech. Bioeng.* 20: 503.
- Grizmek, B. (Hrsg.) (1968) Tierleben - Enzyklopädie des Tierreichs, Kindler, Zürich.
- Hedges, S. B. (1992). The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap P value in phylogenetic studies. *Mol. Biol. Evol.* 9: 366-369.
- Hennig, W. (1966) Phylogentic systematics. Univ. of Illinois Press, Urbana, IL.
- Hethener, P., Braumann, A., Garcia, J.-L. (1992) *Clostridium termitidis* sp. nov., a cellulolytic bacterium from the gut of the wood-feeding termite, *Nasutitermes lujae*. *System. Appl. Microbiol.* 15: 52-58.
- Hicks, R., Amann, R. I., Stahl, D. A. (1992) Dual staining of natural bakterioplankton with 4',6-diamidino-2-phenylindole and fluorescence oligonucleotide probes targeting kingdom-level 16S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2158-2163.
- Hobson, P. N. (Hrsg.) (1988) The Rumen Microbial Ecosystem. Barking: Elsevier Science Publishers.
- Holt, S. C. (1978) Anatomy and chemistry of spirochetes. *Microbiol. Rev.* 42: 114-160.
- Honigberg, B. M. (1970) Protozoa associated with termites and their role in digestion. In: Biology of Termites (Hrsg.: Krishna, K., Weesner, F. M.) Vol. I, Academic Press, New York, pp. 1-36.
- Hungate, R. E. (1936) Studies on the nutrition of *Zootermopsis* I. The role of bacteria and molds in cellulose decomposition. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene Abt. 2* 94: 240-249.
- Hungate, R. E. (1946) Studies on cellulose fermentation. II. An anaerobic cellulose decomposing actinomycete, *Micromonospora propionici* sp. nov. *J. Bacteriol.* 51: 51-56.

- Iida, T., Ohkuma, M., Ohtoko, K., Kudo, T. (2000) Symbiotic spirochetes in the termite hindgut: phylogenetic identification of ectosymbiotic spirochetes of oxymonad protists. *FEMS Microbiol. Ecol.* 34: 17-26.
- Jukes T. H., Cantor C. R. (1969) Evolution of protein molecules. In: Mammalian Protein Metabolism (Hrsg.: Munro, H.N.) Academic Press, New York pp. 21- 132.
- Kambhampati, S. (1995) A phylogeny of cockroaches and related insects based on DNA sequence of mitochondrial ribosomal RNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 2017-2020.
- Kämpfer, P., Steiof, M., Dott, W. (1991) Microbiological characterization of a fuel-oil contaminated site including numerical identification of heterotrophic water and soil bacteria. *Microb. Ecol.* 21: 227-251.
- Kämpfer, P., Bark, K., Busse, H.-J., Auling, G., Dott, W. (1992) Numerical and chemotaxonomy of polyphosphate accumulating *Acinetobacter* strains with high polyphosphate: AMP phosphotransferase (PPAT) activity. *System. Appl. Microbiol.* 15: 409-419.
- Kirby, H. Jr. (1936) Two polymastigote flagellates of the genera *Pseudo-devescovina* and *Caduceia*. *Quart. J. Microsc. Sci.* 79:309-35.
- König H., Breunig A. (1997) Ökosystem Termitendarm. *Spektrum der Wissenschaft* 4: 68-76.
- Krishna, K. (1970) Taxonomy, phylogeny and distribution of termites. In: Biology of Termites (Hrsg: Krishna, K., Weesner, F. M.) Vol. 2, Academic Press, New York. pp. 127-152.
- Kudo, T., Ohkuma, M., Moriya, S., Noda, S., Ohtoko, K. (1998) Molecular phylogenetic identification of the intestinal anaerobic microbial community in the hindgut of the termite, *Reticulitermes speratus*, without cultivation. *Extremophiles* 2: 155-161.
- Kuhnigk, T., Borst, E.-M., Ritter, A., Kämpfer, P., Graf, A., Hertel, H., König, H. (1994) Degradation of lignin monomers by the hindgut flora of xylophagous termites. *System. Appl. Microbiol.* 17: 76-85.
- Kuhnigk, T. (1996) Charakterisierung Lignocellulose abbauender und Sulfat reduzierender Bakterien aus dem Termitendarm. Dissertation. Universität Ulm.

- Kuhnigk, T., Branke, J., Krekeler, D., Cypionka, H., König, H. (1996) A feasible role of sulfate reducing bacteria in the termite gut. *System. Appl. Microbiol.* 19: 139-149.
- 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.
- 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: 3620-31.
- Leadbetter, J. R., Schmidt, T. M., Graber, J. R., 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.
- Lilburn, T. G., Schmidt, T. M., Breznak, J. A. (1999) Phylogenetic diversity of termite gut spirochaetes. *Environ. Microbiol.* 1: 331-345.
- Lo, N., Tokuda, G., Watanabe, H., Rose, H., Slaytor, M., Maekawa, K., Bandi, C., Noda, H. (2000) Evidence from multiple gene sequences indicates that termites evolved from wood-feeding cockroaches. *Curr. Biol.* 10: 801-804.
- Machin, K. E. (1963) The control and synchronization of flagellar movements. *Proc. Roy. Soc. Lond. Biol. Sci.* 158: 88-104.
- Madigan M., Martinko J., Parker J. (2000) Brock: Biology of Microorganisms, 9th Edition Prentice Hall International, Inc., New Jersey, pp. 477-482.
- Maidak, B. L., Cole, J. R., Lilburn, T. G., Parker Jr, C. T., Saxman, P. R., Stredwick, J. M., Garrity, G. M., Li, B., Olsen, G. J., Pramanik, S., Schmidt, T. M., Tiedje, J. M. (2000) The RDP (Ribosomal Database Project) continues, *Nucl. Acids Res.* 28: 173-174.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: Problems and solutions. *System. Appl. Microbiol.* 15: 593-600.
- Margulis, L. (1993) Symbiosis in Cell Evolution, 2nd Edition. Freeman, New York
- Martin, M. M. (1983) Cellulose digestion in insects. *Comp. Biochem. Physiol.* 75A: 313-324.

- Meyer, M. (1999) Nachweis von cellulolytischen Aktivitäten bei neuisolierten Hefestämmen. Diplomarbeit. Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Universität Mainz.
- Müller, M. (1993) The hydrogenosome. *Rev. J. Gen. Microbiol.* 139: 2879-2889.
- 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. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Neyman, J. (1971) Molecular studies of evolution: a source of novel statistical problems. In: Statistical Decision Theory and Related Topics. (Hrsg.: Gupta, S. und Yackel, J.) Academic Press, New York.
- Newton, C. R., Graham, A. (1994) PCR. (Hrsg.: Carr, N. G.) 2. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- O´Brian, R., W., Slaytor, M. (1982) Role of microorganisms in the metabolism of termites. *Aust. J. Biol. Sci.* 35: 239-262.
- Ohkuma, M., Iida, T., Kudo, T. (1999) Phylogenetic relationships of symbiotic spirochetes in the gut of diverse termites. *FEMS Microbiol. Lett.* 181: 123-129.
- Odelson, D. A., Breznak, J. A. (1984) Nutrition and growth characteristics of *Trichomitopsis termopsidis*, a cellulolytic protozoan from termites. *Appl. Environ. Microbiol.* 3: 614-621.
- Paster, B. J., Dewhirst, F. E., Weisburg, W. G., Tordoff, L. A., Fraser, G. J., Hespell, R. B., Stanton, T. B., Zablen, L., Mandelco, L., Woese, C. R. (1991) Phylogenetic analysis of the spirochetes. *J. Bacteriol.* 173: 6101-6109.
- Paster, B. J., Dewhirst, F. E., Cooke, S. M., Fusing, V., Poulsen, L. K., Breznak, J. A. (1996) Phylogeny of not-yet-cultured spirochetes from termite guts. *Appl. Environ. Microbiol.* 2: 347-352.
- Pasti, M. B., Belli, M. L. (1985) Cellulolytic activity of actinomycetes isolated from termites (Termitidae) gut. *FEMS Microbiol. Lett.* 26: 107-112.
- Paul, J., Sarkar, A., Varma, A. K. (1986) In vitro studies of cellulose digesting properties of *Staphylococcus saprophyticus* isolated from termite gut. *Current. Science* 55: 710-714.
- Potrikus, C. J., Breznak, J. A. (1980) Uric acid degrading bacteria in guts of termites [*Reticulitermes flavipes* (Kollar)] *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 117-124.

- Radek, R., Rösel, J., Hausmann, K. (1996) Light and electron microscopic study of the bacterial adhesion to termite flagellates applying lectin cytochemistry. *Protoplasma* 193: 105-122.
- Rouland, C., Civas, A., Renoux, J., Petek, F. (1988) Purification and properties of cellulases from the termite *Macrotermes mülleri* (Termitidae, Macrotermitinae) and its symbiotic fungus *Termitomyces* sp. *Comp. Biochem. Physiol.* 91B: 449-458.
- Sacchi, L., Nalepa, C. A., Bigliardi, E., Lenz, M., Bandi, C., Corona, S., Grigolo, A., Lambiase, S., Laudani, U. (1998) Some aspects of intracellular symbiosis during embryo development of *Mastotermes darwiniensis*. *Parassitologia* 40: 309-316.
- Saitou, N., Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd. Edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Saxena, S., Bahadur, J., Varma, A. (1993) Cellulose and hemicellulose degrading bacteria from termite gut and mound soils of India. *Indian J. Microbiol.* 33: 55-60.
- Schäfer, A., Konrad, R., Kuhnigk, T., Kämpfer, P., Hertel, H., König, H. (1996) Hemicellulose-degrading bacteria and yeasts from the termite gut. *J. Appl. Bacteriol.* 80: 471-478.
- Schultz, J. E., Breznak, J. A. (1978) Heterotrophic bacteria present in the hindguts of wood-eating termites [*Reticulitermes flavipes* (Kollar)]. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 1206-1210.
- Sebald, M., Prévot, A. R. (1962) Étude d'une nouvelle espèce anaérobic stricte *Micromonospora acetofornici* n.sp. isolé de l'intestin postérieur de *Reticulitermes lucifugus* var. *santonensis*. *Annales de l' Institute Pasteur* 102: 199-214.
- Slaytor, M. (1992) Cellulose digestion in termites and cockroaches: What role do symbionts play? *Comp. Biochem. Physiol.*, Part B, 103: 775-784.

- Stackebrandt, E., Goebel, B. M. (1994) Taxonomic notes: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 846-849.
- Stewart, B. J., Leatherwood, J. M. (1976) Derepressed synthesis of cellulase by *Cellulomonas*. *J. Bacteriol.* 128: 609-615.
- Stoesser, G., Baker, W., van den Broek, A., Camon, E., Garcia-Pastor, M., Kanz, C., Kulikova, T., Lombard, V., Lopez, R., Parkinson, H., Redaschi, N., Sterk, P., Stoehr, P., Tuli, M. A. (2001) The EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucl. Acids Res.* 29 (1): 17-21.
- Sutherland, J. L. (1933) *Quart. J. Micr. Sci.* 76: 145.
- Thayer, D. W. (1976) Facultative wood-digesting bacteria from the hindgut of the termite *Reticulitermes hesperus*. *J. Gen. Microbiol.* 95: 287-296.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Thorne, B. I., Carpenter, J. M. (1992) Phylogeny of the Dictyoptera. *Syst. Entomol.* 17: 253-268.
- Teather, R. M., Wood, P. J. (1983) Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 777-780.
- To, L. P., Margulis, L., Chase, D., Nutting, W. L. (1980) The symbiotic microbial community of the sonoran desert termite: *Pterotermes occidentis*. *Bio. Systems* 13: 109-137.
- Tokuda, G., Watanabe, H., Matsumoto, T., Noda, H. (1997) Cellulose digestion in the wood-eating higher termite, *Nasutitermes takasagoensis* (Shiraki): distribution of cellulases and properties of endo-beta-1,4-glucanase. *Zool. Sci.* 14: 83-93.
- Van de Peer, Y., Caers, A., De Rijk, P., De Wachter, R. (1998) Database on the structure of small ribosomal subunit RNA. *Nucl. Acids Res.* 26: 179-182.
- Van der Reyden, D. (1992) Recent scientific research in paper conservation. *J. amer. Inst. Con.* 31: 117-138.

- Varma, A., Kolli, B. K., Paul, J., Saxena, S., 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.
- Veivers, P. C., Musca, A. M., O'Brien, R. W., Slaytor, M. (1982) Digestive enzymes of the salivary glands and gut of *Mastotermes darwiniensis*. *Insect. Biochem.* 12: 35-40.
- Veivers, P. C., O'Brien, R. W., Slaytor, M. (1983) Selective defaunation of *Mastotermes darwiniensis* and its effect on cellulose and starch metabolism. *Insect. Biochem.* 13: 95-101.
- Watanabe, H., Noda, H., Tokuda, G., Lo, N. (1998) A cellulase gene of termite origin. *Nature* 394: 330-331.
- Wharton, D. R. A., Wharton, M. L., Lola, J. E. (1965) Cellulases in the cockroach, with special reference to *Periplaneta americana*. *J. Insect. Physiol.* 11: 947-959.
- Wenzel, M. (1998) Untersuchungen der symbiotischen Bakterien von *Mixotricha paradoxa*, eines Flagellaten aus der Termiten *Mastotermes darwiniensis*. Diplomarbeit. Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Universität Mainz.
- Wenzel, M., Schönig, I., Berchtold, M., Kämpfer, P., König, H. (2001) Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*. *J. Appl. Microbiol.* 92: 32-40.
- Yamin, M. A. (1978) Axenic cultivation of the cellulolytic flagellate *Trichomitopsis termopsidis* (Cleveland) from the termite *Zootermopsis angusticollis*. *J. Protozool.* 25: 535-538.
- Yamin, M. A. (1981) Cellulose metabolism by the flagellate *Trichonympha* from a termite is independent of endosymbiotic bacteria. *Science* 211: 58-59.
- Zeikus, J. G., Wellstein, A. L., Kirk, T. K. (1982) Molecular basis for the biodegradative recalcitrance of lignin in anaerobic environments. *FEMS Microbiol. Lett.* 15: 193-197.


```

Sp.stenostrepta      AGCTTAACCCGCAAG-----GGGGAGCGACGTCGAAGGTATGGCTAGTT
Sp.zulzerae          AGTCTAACCCGTAAG-----GGAGGGCGGTGCCGAAGGTACGCTTAGTT
Tr.pallidum          AGCCTAACCCGCAAG-----GGAGGGCGGTGCCGAAGGTATGTTGGTA
L.illini             CGGCTAACCC-GCAAG-----GAGGCAGATTATC-AAGGCAAGATCGGTG
Tr.maltophilum      AGTCTAACCC-GCAAG-----G-AGGACGCTGCCGAAGNTATGCTTTGTA
Sp40-7              AGCCTAACCCGCAAG-----GGGGGGCGCTGTCTGAAGGTACGTTTAGTG
mpsp2               AGCCTAACCCGCAAG-----GGNGGGCGCTGTCTGAAGGTACGTTTAGTG
sp40-8              AGCCTAACCCGCAAG-----GGGGGGCGCTGTCTGAAGGTACGTTTAGTG
mpsp15              AGCCTAACCCGCAAG-----GGAGGTCGCTGTCTGAAGGTATGCTGTTAGTG
Mds1                AGTCTAACCC-GCAAG-----G-AGGACGCTGTCTGAAGGTATGTTTAGTG
sp5-18              AGTCTAACCC-GCAAG-----G-AAGACGCGCTCTAAGGCAAGCTTAGTG
mp3                 AGTCTAACCCGCAAG-----GGAGGACGCTGTCTGAAGGTACGTTTAGTG
mp5                 AGTCTAACCC-GCAAG-----GAAS-ACGCCGTCTAAGGCAAGCTTAGTG
mp4                 AGTCTAACCC-GYAAG-----GAGG-ACGCCGTCTGAAGGTACGTTTAGTG
mp1                 AGCGTAACCCGGCGGACGCAAGTCCGTGGAGCGCGCCGTCTAAGGCAAGCTTAGTG
mp2                 AGCCTAACCC-----
111111111111111111000000000001111111111111111111011111111

```

Eine 1 symbolisiert mindestens 50% Basenidentität in der betreffenden Reihe, eine 0 symbolisiert weniger als 50%. Gemäß dem Homologieprinzip wurden nur Bereiche mit einer 1 zur Erstellung des Stammbaumes eingesetzt.

Abkürzungen: (EMBL-Zugriffsnummern in eckigen Klammern)

<i>Sp. stenostrepta</i>	<i>Spirochaeta stenostrepta</i> [M88724]
<i>Sp. zulzerae</i>	<i>Spirochaeta zulzerae</i> [M88725]
<i>Tr. pallidum</i>	<i>Treponema pallidum</i> [M88726]
<i>L. illini</i>	<i>Leptospira illini</i> [M88719]
<i>Tr. maltophilum</i>	<i>Treponema maltophilum</i> [X87140]
Mp2 / Sp40-7	Spirochätenklon sp40-7 [X89046]
mpsp2	Spirochätenklon mpsp2 [X89050]
sp40-8	Spirochätenklon sp40-8 [X89047]
mpsp15	Spirochätenklon mpsp15 [X89051]
Mds1	Spirochätenklon spMast [X79548]
sp5-18	Spirochätenklon sp5-18 [X89044]
mp3	Spirochätenklon mp3 [AJ458945]
mp5	Spirochätenklon mp5 [AJ458947]
mp4	Spirochätenklon mp4 [AJ458946]
mp1	Spirochätenklon mp1 [AJ458944]

7.1.2. Bakterien des „B6-Stammbaums“ (Abbildung 20)

<i>Por. levii</i>	ATGCAAGTCGAGGGGTAACATGGGA-GTAGCTTGCTGCTT-CTGATGACGACCGGGCGGAT
<i>Por. cangingivalis</i>	ATGCAAGTCGAGGGGCAGCACGGGA-TTAGCTTGCTAATC-TTGGTGGCGACCGGCGTAA
<i>B. merdae</i>	ATGCAAGTCGAGGGGCAGCATGATTTGTAGC--AATACAGATTGATGGCGACCGGGCGCAC
B6	-----AGGGGCAGCACGGA--GCAGC--AATGCT--TGGGTGGCGACCGGGCGCAC
<i>B. forsythus</i>	ATGCAAGTCGAGGGGCAGCAATTT--GTAGC--AATACA--AAGTTGGCGACCGGGCGCAC
<i>Prevotella</i>	ATGCAAGTCGAGGGGCAGCATGGGC-TTAGCTTGCTAAGC-CCGATGGCGACCGGGCGCAC
<i>Cyto. fermentans</i>	ATGCAAGTCGAGGGGTAACATTGT---AGCTTGCTACA---GATGACGACCGGGCGCAC
<i>Flectob. sp</i>	ATGCAAGTCGAAACGGT-----G-----TAGC--AATACAC-----AG--TGCGGCAC
<i>Proteus</i>	ATGCAAGTCGAGCGGTAACAGGAGA--AAGCTTGCTTTCTT--GCTGACGAGCGGGCGGAC
<i>Klebsiella</i>	ATGCAAGTCGAGCGGTAGCAC-AGA--GAGCTTGCTCTCG---GGTGACGAGCGGGCGGAC
<i>Burkholderia</i>	ATGCAAGTCGAAACGGCACAC-----GGGCTT-CGGCCT---GGTGGCGAGTGGCGAAC
	1111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111
<i>Por. levii</i>	GGGTGAGTAACGCGTATGCAACTTGCCTCTTAGTGGGGAATAACCCGGAGAAATCCGGAC
<i>Por. cangingivalis</i>	GGGTGCGTAACGCGTATGCAACTTGCCTGTGCTAGTGGGGAATAACCCGGAGAAATCCGGAC
<i>B. merdae</i>	GGGTGAGTAACGCGTATGCAACTTACCTATCAGAGGGGGATAGCCCGGCGAAAGTCCGGAT
B6	GGGTGCGTAACGCGTATGTAACCTTGCCCTCCGCTTGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGAT
<i>B. forsythus</i>	GGGTGAGTAACGCGTATGCAACTACCTACAACAGAAGAATAATCCGGCGAAAGTCCGGTC
<i>Prevotella</i>	GGGTGAGTAACAGTATCCAACCTTCCGGTAACCTCCGTTATAGCTTTTCGAAAGAAAGAT
<i>Cyto. fermentans</i>	GGGTGCGTAACGCGTATGAAACCTACCTTTTACAGGGGAATAGCCCGGAGAAATTTGGAT
<i>Flectob. sp</i>	GGGTGCGTAACAGTATGCAACCTACCTATTATTGGGGATAGCTTTGGAAAGCCGAGAT
<i>Proteus</i>	GGGTGAGTAATGTATG-GGGATCTGCC-GATAGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGC
<i>Klebsiella</i>	GGGTGAGTAATGTCTG-GGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGC
<i>Burkholderia</i>	GGGTGAGTAATACATC-GGAACATGCTCTGTAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGAT
	1111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111
<i>Por. levii</i>	TAATACCGCATAACACTTAGTTATCCGCATGG-ATGATTAAGGAAAGATTTATTGCTAAGA
<i>Por. cangingivalis</i>	TAATACCGCATAACACTTTGGTTTCCGCATGG-GGACTTAGGAAAGATTTATTGCTGACA
<i>B. merdae</i>	TAATACCGCATAAAAACAGGGGTCCCGCATGGGAATATTGTTAAAGATTTCATCGCTGATA
B6	TAATACCGGATAACACAGGGGTCCCGCATGAAACAATTTGTTAAAGAGGAATTGCCGGAG
<i>B. forsythus</i>	TAATACTTCATAAAAACAGGGGTCGGCATGGTGTATTGTTAAAGATTTCATCGGTTGTA
<i>Prevotella</i>	TAATCCCGGATAGTATGGTATCCGCATGG-TTCTCCATTAAGGATT-CCGNATACC
<i>Cyto. fermentans</i>	TAATGCCCATGGTTATAYTTTTACCGCATGG-TAAATTATATAAAGCTTCGGCGGTAAAA
<i>Flectob. sp</i>	TAATACCGCATAAGACAGTGACATGGCATCA-TGTAGCTGTTAAAGCTTCGGCGATAATA
<i>Proteus</i>	TAATACCGCATGACGTCTACGGACAAAGCAGGGGTTCT--TCGGACCTT-GCCTATCG
<i>Klebsiella</i>	TAATACCGCATAACGTCGAAAGACAAAGTGGGGGACCT--TCGGGCCTC-ATGCCATCA
<i>Burkholderia</i>	TAATACCGCATAACGATCTGAGGATGAAAGCGGGGGACCT--TCGGGCCTC-GCCTATAG
	1111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111
<i>Por. levii</i>	GATAGGCATGCGTTCCATTAGTTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCATCGATGGA
<i>Por. cangingivalis</i>	GATAGGCATGCGTTCCATTAGATAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGTCACGATGGA
<i>B. merdae</i>	GATAGGCATGCGTTCCATTAGGCAGTTGGCGGGTAACGGCCACCAAAACCGACGATGGA
B6	GATAGGCATGCGTTCCATTAGGCAGTTGGCAGGGTAACGGCTCACCAAAACCGATGGA
<i>B. forsythus</i>	GATGGGCATGCGTACCATTAGGTAGTTGGTGAGGTAACGGCCACCAAAACCGATGTTG
<i>Prevotella</i>	GATGGGGATGCGTTCCATTAGGCAGTTGGCGGGTAACGGCCACCAAAACCTAGGATGGA
<i>Cyto. fermentans</i>	GATGGTCATGCGTGACATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGTC
<i>Flectob. sp</i>	GATGGGCATGCGTCCAATTAGTTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGACGATGATTGG
<i>Proteus</i>	GATGAACCCATAGGGATTAGCTAGTAGGTAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATGCTC
<i>Klebsiella</i>	GATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCC
<i>Burkholderia</i>	GGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCAG
	1111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111
<i>Por. levii</i>	TAGGGGAGCTGAGAGGCTTATCCCCACATTGGGACTGAGACACGGCCNAACTCCTACG
<i>Por. cangingivalis</i>	TAGGGGAGCTGAGAGGCTTATCCCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACG
<i>B. merdae</i>	TAGGGGTCTTGAGAGGAAGGTCCCCACATTGGTACTGAGACACGGACCAAACTCCTACG
B6	TAGGGGTCTTGAGAGGAAGGTCCCCACACTGGTACTGAGATACGGACCAACTCCTACG
<i>B. forsythus</i>	TAGGGGTCTTGAGAGGAAGTCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAACTCCTACG
<i>Prevotella</i>	TAGGGGTCTTGAGAGGAAGGTCCCCACATTGGAACTGAGACACGGTCCNAACTCCTACG
<i>Cyto. fermentans</i>	TAGGGGTCTTGAGAGGAAGGTCCCCNACACTGGTACTGAGACACGGACCAACTCCTACG
<i>Flectob. sp</i>	TAGGGGATCTGAGAGGAATCCCCACACTGGCACTGAGATACGGGCCAGACTCCTACG
<i>Proteus</i>	TAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACG
<i>Klebsiella</i>	TAGCTGGTCTGAGAGGATGACAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACG
<i>Burkholderia</i>	TAGCTGGTCTGAGAGGATGACAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACG
	1111110111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111
<i>Por. levii</i>	GGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGAGGAACTCTGAACCAGCCAAGTCCGCTG
<i>Por. cangingivalis</i>	GGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGCGGAGAGCCTGAACCAGCCAAGTCCGCTG
<i>B. merdae</i>	GGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGCCGAGAGNCTGAACCAGCCAAGTCCGCTG
B6	GGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGTGGGAAAGACTGAACCAGCCAAGTCCGCTG
<i>B. forsythus</i>	GGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGGCGAGAGCCTGAACCAGCCAAGTCCGCTG
<i>Prevotella</i>	GGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGGCGGAAAGCCTGAACCAGCCAAGTCCGCTG
<i>Cyto. fermentans</i>	GGAGGCAGCAGTGNGGAATATTGGTCAATGGCCGCAAGGCTNAACCAGCCATGTCCGCTG
<i>Flectob. sp</i>	GGAGGCAGCAGTAGGGAATATTGGGCAATGGACGGAAGTCTGACCCAGCCATGCCGCTG
<i>Proteus</i>	GGAGGCAGCAGTGGGCAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCTG
<i>Klebsiella</i>	GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCTG
<i>Burkholderia</i>	GGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCTG
	1111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111

mp1 AGAAGGCCGGAAGGTTGTAAAGTACTTTTGTGGCTGAAGAATAAGGTGGG-GAGGGAATG
mp2 AGAAGGCCGGAAGGTTGTAAAGTCTTTT-CCATCCGAGAATAAGGCCGGGTGAGGGAATG
mp3 AGGAGGCCGGAAGGTTGTAAAGTCTTTTTCGGGGGAGAATAAATCTGG-CAGGGAATG
mp4 CGAAGGCCGGAAGGTTGTAAAATCCTTTTATGCTGAAGAATAAGCGCGG-GAGGGAATG
mp5 AGGAGGCCGGAAGGTTGTAAAATCCTTTTTCGGGGAGAATAAGGCAGG-GAGGGAATG
E. coli AGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAA-GTTAATACC
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

mp1 CCCCATTGATGACGTGAAGCCATGAATAAGCCCCGGCTAATTAC-GTGCCAGCAGCCGCG
mp2 CCCTGGYGATGACGGTAGGATGGGAATAAGCCCCGGCTAATTAC-GTGCCAGCAGCCGCG
mp3 GCCAGGAGATGACGCGAACCAGGATAATAAGCCCCGGCTAATTAC-GTGCCAGCAGCCGCG
mp4 CCCGTGTGATGACGTTAACGATGAATAAGCCCCGGCTAATTACCGTGCCAGCAGCCGCG
mp5 CTCTGCTGATGACGGTACCCGAGAAATAAGCCCCGGCTAATTAC-GTGCCAGCAGCCGCG
E. coli TTTGCTCATTGACGTTACCCGAGAAAGCACCCGGCTAACTCC-GTGCCAGCAGCCGCG
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

mp1 GTAACACGTAAGGGGCGAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGT
mp2 GTAACACGTAAGGGGCGAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGT
mp3 GTAACACGTAAGGGGCGAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGCGGA
mp4 GTAACACGTAAGGGGCGAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGT
mp5 GTAACACGTAAGGGGCGAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGT
E. coli GTAATAACGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGAGGCGGT
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

mp1 TTTT-CAAGTCCGGCGTAAAGGGGGGCTTAACCTCTGGATTGCGCTGGAACTGGGA
mp2 TACG-CAAGTCTGTGTGAAAGGCGTGGGCTCAACCCACGGACTGCGCGGGAACTGAGT
mp3 TCTG-TAAGTCTGGCGTAAAGGGGGGGCTTAACCCCGGACTGCGCTGGAACTGCGG
mp4 TACG-TAAGTCTGGCGTAAAGGGGGGAGCTTAACCCCGGACTGCGTTGGAACTGTGT
mp5 GTTG-CAAGTCTGGCGTAAAGGGGGAGCTTAACCCCGGACTGCGTTAGAACTGCGA
E. coli TTGT-TAAGTCAGATGTGAAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAACCTGCATCTGATACTGGCA
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

mp1 GACTTGAGTCTGGGAGGGGGAGTTGGAATTCCTAGTGTAGGGGTGAAATCTGTAGATATT
mp2 GACTTGAGTCTGGGAGGGGGAGTTGGAATTCCTGTTGTAGGGGTGAAATCTGTAGATATC
mp3 GACTGGAGTCTGGGAAGGGCAGTTGGAATTCAGGTTGTAGGGGTGAAATCTGTAGATATC
mp4 AGCTTGAGTCTAGGAGGGGTAGTTGGAATTCCTGTTGTAGGGGTGAAATCTGTAGATATC
mp5 TACTAGAGTCCCGAGGGGGAGTTGGAATTCCTGTTGTAGGGGTGAAATCTGTAGATATC
E. coli AGCTTGAGTCTGTAGAGGGGGAGTTGGAATTCAGGTTGTAGCGGTGAAATGCTAGATATC
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

mp1 AGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCCAACTTCCAGCCTGGGACTGACGCTGAGGCGCGAAA
mp2 AGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCCAACTTCCAGCCTAAGACTGACGCTGAGGCGCGAAA
mp3 TGGGAAGAACACCGGAAGCGAAGGCCAACTGCCGGCCTGAGACTGACGCTGAGGAGCGAAA
mp4 AGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCCAACTACTAGCCTAAGACTGACGCTGAGGCGCGAAA
mp5 AGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCCAACTTCCAGCCGAGACTGACGCTGAGGCGCGAAA
E. coli TGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCCGCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGTGGCGAAA
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

mp1 GTGCGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCGCACATATAAACGATGTGACTA
mp2 GTGCGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCGCACATATAAACGATGTGACTA
mp3 GTGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACACTATAAACGATGCGACTA
mp4 GTGCGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCGCACATATAAACGATGTGACTA
mp5 GTGCGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCGCACATATAAACGATGACACTA
E. coli GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCAGCCGTAACGATGTGACTT
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

mp1 GGTG-TTGGGCC-TTGGGCTCAG-TGCCGAGCGAACCTGATAAGTGCACCCGCTGGGG
mp2 GGTG-TTGGGCC-TGACGGTTCAG-TGCCGAGCGAACCTGATAAGTGCACCCGCTGGGG
mp3 GGTG-TTGGGCC-GAGTGGTTCAG-TGCCGAGCGAACCGGATAAGTGCACCCGCTGGGG
mp4 GGTG-TTGGGCC-TGACGGTTCAG-TGCCGAGCGAACCTGATAAGTGCACCCGCTGGGG
mp5 GGTG-TTGGGCC-TAGAGTTCAG-TGCCGAGCGAACCTGATAAGTGCACCCGCTGGGG
E. coli GGAGGTTGTGCCCTTAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGTTAAGTGCACCCGCTGGGG
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

mp1 AGTATGCCCGCAAGGGTGAAGCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC
mp2 AGTATGCCCGCAAGGGTGAAGCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC
mp3 AGTATGCCCGCAAGGGTGAAGCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC
mp4 AGTATGCCCGCAAGGGTGAAGCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC
mp5 AGTATGCCCGCAAGGGTGAAGCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC
E. coli AGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC

mp1 ATGTGGTTTAAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCTGGGTTTGCATGCAGGGGAAAG
mp2 ATGTGGTTTAAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCTGGGTTTGCATGGCAGCGAATG
mp3 ATGTGGTTTAAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCTGGGTTTGCATGGCAGTGAAGG
mp4 ATGTGGTTTAAATTCGATGGTACGCGAGGAACCTTACCTGGGTTTGAATGCAGGTGGATG
mp5 ATGTGGTTTAAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCTGGGTTTGCATGGTACCGGAGG
E. coli ATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACAT-CCACGGAAGT

mp1 GTGCAGAGATGCGCTGTTGCAGTAATGCGCCCTGTGCAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCA
mp2 GCATAGAGATATGCCRGCTGGAAACAGGCGCTGTGCAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCA
mp3 GTATAGAGATATATCCGGCCGCAAGGGACGCTGTGCAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCA
mp4 GGGCAGAGATGTCTGAGTCCCGCAAGGGACACTGTGCAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCA
mp5 GCTCAGAGATGCGTCTGGTGGAAACGGCCGCTATCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCA
E. coli TTTTCAGAGATGAGAATGTGCCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCA

mp1 GCT-CGTGCC-GTGAGGTGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTACTGCCAGT
mp2 GCT-CGTGCC-GTGAGGTGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTACTGCCAGT
mp3 GCT-CGTGCC-GTGAGGTGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTACTGCCAGT
mp4 GCT-CGTGCC-GTGAGGTGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTACTGCCAGT
mp5 GCT-CGTGCCGCTGAGGTGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGGGCGCAACCCCTACTGCCAGT
E. coli GCT-CGTGTT-GTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTTTGT
*** **

mp1 TGCCAGCAGGCGATGCTGGGGACTCTGGCGGAACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTG
mp2 TGCCAACA--TTGAGTTGGGGACTCTGGCGGAACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTG
mp3 TACCAACAGGTAAAGCTGGGGACTCTGGTGGAAACAGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTG
mp4 TACTAACAGGTAACGCTGAGGACTCTGGCGGAACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTG
mp5 TACCAGCGAGCAAAGTTGGGGACTCTGGCGGAACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTG
E. coli TGCCAGCG-GTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTG
* * * *

mp1 GGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTATGTCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGGC
mp2 GGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTATGTCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGGC
mp3 GGGATGAGGTCAAGTCATCATGGCCCTTATGTCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGGG
mp4 GGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTATGTCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGGC
mp5 GGGATGAGGTCAAGTCATCATGGCCCTTATGTCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGGA
E. coli GGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCG

mp1 GGTACAAAGCGATGCGAACC CGGAGGGGAGAGCGAAGCGCCAAAAGCCGCCCGTAGTTC
mp2 GGTACAACGTGACGCGAGGCCGAGGCTTAAGCGAAGCACC AAAAGCCGCCCGTAGTTC
mp3 GGTACAAAGCGACGCGAACC CGGAGGTAAGAGCGAAGCGCAAAAAGCCGCCCGTAGTTC
mp4 GGTACAAAGCGAAGCGAGCCTGCGAGGGTATAGCGGAACGCGGAAAAGCCGCCCGTAGTTC
mp5 GGTACAAAGCGACGCGAGCCTGAGAGGGTATAGCGAAAACGCGA AAAAGCCGCCCGTAGTTC
E. coli CATACAAAGAGAAGCGACCTCGGAGAGCA-AGCGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTTC

mp1 GGATTGAAGTCTGAAACCCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGCATCAGCA
mp2 GGATTGAAGTCTGAAACCCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGCATCAGCA
mp3 GGATTGAAGTCTGAAACCCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTACATCAGCA
mp4 GGATTGAAGTCTGAAACCCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGCATCAGCA
mp5 GGATTGAAGTCTGAAACCCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTACATCAGCA
E. coli GGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAA

```

mp1      TGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATCCGAGTTGG
mp2      TGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATCCGAGTTGG
mp3      TGGTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATCCGAGTTGG
mp4      TGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATCCGAGTTGG
mp5      TGGTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATCCGAGTTGG
E.coli   TGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGG
**      *****

```

```

mp1      GAGTGCCCGAAGCCGGTAGCGTAACCGGCGGACGCAAGTCCGTGGAGCGCGCCGTCTAAG
mp2      AGGTACCCGAAGCCGGCAGCCTAACC-----
mp3      AGGTACCCGAAGCCGGTAGTCTAACC-----GCAAG-----GGAGGACGCTGTCGAAG
mp4      AGGTACCCGAAGCCGGTAGTCTAACC-----GYAAG-----GAGG-ACGCCGTCTGAAG
mp5      GAGTGCCCGAAGCCGGTAGTCTAACC-----GCAAG-----GAAG-ACGCCGTCTAAG
E.coli   TTGCAAAGAAGTAGGTAGCTTAACC-----TTCG-----GGAGGGCGCTTACCACT
*      **** ** ** *****

```

```

mp1      GCAAGCTTAGTGAGGAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAAGTGGAAAGTGC GGCTGG
mp2      -----
mp3      GTACGTTTAGTGAGGAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAAGTGGAAAGTGC GGCTGG
mp4      GTACGTTTAGTGAGGAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAAGTGGAAAGTGC GGCTGG
mp5      GCAAGCTTAGTGAGGAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAAGTGGAAAGTGC GGCTGG
E.coli   TTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAAACCGTAGGGGAACCTGCGGTTGG

```

7.3. Die cellulolytischen Bakterien und ihre nächsten Verwandten

Tabelle 6: Aufgezeichnet sind alle in dieser Studie isolierten und identifizierten, cellulolytische Bakterienstämme zusammen mit den ähnlichsten Organismen aus der Datenbank. Die EMBL-Zugriffsnummernnummern der nächsten Verwandten der Stämme sind in eckigen Klammern beigefügt.

	Stamm-name	Ähnlichste Spezies (16S rDNA Verwandtschaft: %/bp)
1.	CK2	<i>Micromonospora aurantiaca</i> 99.7%
2.	CK7	<i>Micromonospora aurantiaca</i> 99.7%
3.	CK20	<i>Micromonospora aurantiaca</i> 99.7%
4.	CK21	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
5.	CK26	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
6.	CK27	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
7.	CK50	<i>Micromonospora aurantiaca</i> 99.7%
8.	CK57	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
9.	CK74	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
10.	CK79	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , [X87276], (99%, 462 bp)
11.	CK80	<i>Azospirillum irakense</i> , [Z29583], (99%, 432 bp)
12.	CZ2	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
13.	CZ3	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
14.	CZ5	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
15.	CZ7	1. <i>Zymomonas mobilis</i> , Cosmid-klon 65G3, [AF088897], (94%, 461 bp) 2. <i>Sphingomonas echinoides</i> , [AB021370], (96%, 452 bp)
16.	CZ18	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
17.	CZ35	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
18.	CZ36	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
19.	CZ44	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
20.	CZ52	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
21.	CZ53	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 460 bp)
22.	CZ58	<i>Rhizobium etli</i> CFN42, [U28916] oder <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> , [U29388], (99%, 460 bp)
23.	CZ59b	<i>Bacillus megaterium</i> , [AF142677], (98%, 455 bp)

	Stamm- name	Ähnlichste Spezies (16S rDNA Verwandtschaft: %/bp)
24.	CZ63	<i>Rhizobium etli</i> CFN42, [U28916] oder <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> , [U29388], (99%, 460 bp)
25.	CZ64	1. Unkultiviertes Bakterium, Stamm SJA-105, [AJ009482], (99%, 451 bp) 2. <i>Afipia</i> spec. A8-3, [AY017061], (98%, 451 bp)
26.	CZ66	<i>Kocuria varians</i> ähnlich
27.	CZ67	<i>Rhizobium etli</i> CFN42, [U28916] oder <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> , [U29388], (99%, 460 bp)
28.	CZ68b	<i>Rhizobium etli</i> CFN42, [U28916] oder <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> , [U29388], (99%, 460 bp)
29.	CZ69	<i>Rhizobium etli</i> CFN42, [U28916] oder <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> , [U29388], (99%, 460 bp)
30.	CZ71	<i>Rhizobium etli</i> CFN42, [U28916] oder <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> , [U29388], (99%, 460 bp)
31.	CZ73	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
32.	CZ84	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
33.	CZ89	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 465 bp)
34.	CZ91a	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 465 bp)
35.	CZ92	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
36.	CZ95	<i>Bacillus circulans</i> ähnlich
37.	CZ96c	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 465 bp)
38.	CZ97	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
39.	CZ104a	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 465 bp)
40.	CZ104g	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 465 bp)
41.	CZ107b	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 460 bp)
42.	CZ109a	<i>Bacillus cereus</i> ähnlich
43.	CZ116	<i>Bacillus cereus</i> ähnlich
44.	CZ129	<i>Bacillus cereus</i> ähnlich
45.	CZ131	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
46.	CZ140d	<i>Bacillus megaterium</i> , [AF142677], (98%, 455 bp)
47.	CZ143	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 465 bp)
48.	CZ177b	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 465 bp)
49.	CZ181a	<i>Paenibacillus</i> spec., Stamm TRO4, [AJ251193], (95%, 326 bp)
50.	CZ195	<i>Sphingomonas</i> spec., Stamm DhA-95, [AF177917], (96%, 458 bp)
51.	CZ197a	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 460 bp)
52.	CZ198a	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 465 bp)
53.	CZ207.1	<i>Brevibacillus brevis</i> , [M10111], (98%, 460 bp)
54.	CZ220	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
55.	CZ225	1. Unkultiviertes Abwasserbakterium, Stamm tmbr 11-7, [AF309812], (96%, 462 bp) 2. <i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 462 bp)
56.	CZ229e	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 465 bp)
57.	CZ229f	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 465 bp)

	Stamm-name	Ähnlichste Spezies (16S rDNA Verwandtschaft: %/bp)
58.	CZ230a	<i>Bacillus circulans</i> ähnlich
59.	CZ231b	<i>Bacillus megaterium</i> , [AF142677], (98%, 455 bp)
60.	CZ231d	<i>Bacillus cereus</i> , Stamm WSBC10206, [Z84590], (98%, 353 bp) oder <i>Bacillus thuringiensis</i> , Stamm WS 2614, [Z84593], (98%, 353 bp)
61.	CZ233	<i>Bacillus megaterium</i> , [AF142677], (98%, 455 bp)
62.	CZ234	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 465 bp)
63.	CZ235b	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 465 bp)
64.	CZ236a	<i>Spirosoma</i> -like spec., Stamm PC 5.1a, [X89911.1], (90%, 561 bp)
65.	CZ237	<i>Brucella melitensis</i> , [AF220149], (99%, 460 bp)
66.	CZ239	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
67.	CZ241	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
68.	CZ242	<i>Spirosoma</i> -like spec., Stamm PC 5.1a, [X89911.1], (90%, 561 bp)
69.	CZ245b	<i>Microbacterium</i> spec. A8-2, [AY017058], (99%, 460 bp)
70.	CZ249	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
71.	CZ250	<i>Spirosoma</i> -like spec., Stamm PC 5.1a, [X89911.1], (90%, 561 bp)
72.	CZ251	<i>Bacillus cereus</i> , Stamm WSBC10206, [Z84590], (98%, 353 bp) oder <i>Bacillus thuringiensis</i> , Stamm WS 2614, [Z84593], (98%, 353 bp)
73.	CZ254	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
74.	CZ256	<i>Spirosoma</i> -like spec., Stamm PC 5.1a, [X89911.1], (90%, 561 bp)
75.	CZ257a	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
76.	CZ259	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
77.	CZ262a	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
78.	CZ263a	<i>Spirosoma</i> -like spec., Stamm PC 5.1a, [X89911.1], (90%, 561 bp)
79.	CZ263b	<i>Bacillus megaterium</i> , [AF142677], (98%, 455 bp)
80.	CZ264a	<i>Spirosoma</i> -like spec., Stamm PC 5.1a, [X89911.1], (90%, 561 bp)
81.	CZ264b	<i>Spirosoma</i> -like spec., Stamm PC 5.1a, [X89911.1], (90%, 561 bp)
82.	CZ266a	<i>Bacillus megaterium</i> , [AF142677], (98%, 455 bp)
83.	CZ266b	<i>Bacillus megaterium</i> , [AF142677], (98%, 455 bp)
84.	CZ267	<i>Spirosoma</i> -like spec., Stamm PC 5.1a, [X89911.1], (90%, 561 bp)
85.	CZ268a	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
86.	CZ268b	<i>Spirosoma</i> -like spec., Stamm PC 5.1a, [X89911.1], (90%, 561 bp)
87.	CZ268c	<i>Bacillus megaterium</i> , [AF142677], (98%, 455 bp)
88.	CZ269b	<i>Bacillus megaterium</i> , [AF142677], (99%, 402 bp)
89.	CZ271	<i>Spirosoma</i> -like spec., Stamm PC 5.1a, [X89911.1], (90%, 561 bp)
90.	CZ272	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
91.	CZ273	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
92.	CZ276a	<i>Spirosoma</i> -like spec., Stamm PC 5.1a, [X89911.1], (90%, 561 bp)

	Stamm-name	Ähnlichste Spezies (16S rDNA Verwandtschaft: %/bp)
93.	CZ276b	<i>Spirosoma</i> -like spec., Stamm PC 5.1a, [X89911.1], (90%, 561 bp)
94.	CZ277	<i>Spirosoma</i> -like spec., Stamm PC 5.1a, [X89911.1], (90%, 561 bp)
95.	CZ282d	<i>Bacillus megaterium</i> , [AF142677], (98%, 455 bp)
96.	CZ282e	<i>Bacillus megaterium</i> , [AF142677], (98%, 455 bp)
97.	CZ285	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
98.	CZ301a	<i>Spirosoma</i> -like spec., Stamm PC 5.1a, [X89911.1], (90%, 561 bp)
99.	CZ301c	<i>Spirosoma</i> -like spec., Stamm PC 5.1a, [X89911.1], (90%, 561 bp)
100.	CZ302	<i>Spirosoma</i> -like spec., Stamm PC 5.1a, [X89911.1], (90%, 561 bp)
101.	CZ311	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
102.	CZ318	<i>Bacillus megaterium</i> , [AF142677], (98%, 455 bp)
103.	CZ322	1. <i>Zymomonas mobilis</i> , Cosmid-klon 65G3, [AF088897], (94%, 461 bp) 2. <i>Sphingomonas echinoides</i> , [AB021370], (96%, 452 bp)
104.	CZ323	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
105.	CZ325	1. Unidentifiziertes Eubakterien Klon GKS69, [AJ224989], (96%, 453 bp) 2. <i>Sphingomonas</i> spec., Stamm RW1, [AB021492], (96%, 451 bp)
106.	CZ326b	<i>Spirosoma</i> -like spec., Stamm PC 5.1a, [X89911.1], (90%, 561 bp)
107.	CZ326d	<i>Spirosoma</i> -like spec., Stamm PC 5.1a, [X89911.1], (90%, 561 bp)
108.	CZ326g	<i>Spirosoma</i> -like spec., Stamm PC 5.1a, [X89911.1], (90%, 561 bp)
109.	CZ330	<i>Brucella melitensis</i> , [AF220149], (99%, 460 bp)
110.	CZ332	1. Unidentifiziertes Eubakterien Klon GKS69, [AJ224989], (96%, 453 bp) 2. <i>Sphingomonas</i> spec., Stamm RW1, [AB021492], (96%, 451 bp)
111.	CZ335b	<i>Spirosoma</i> -like spec., Stamm PC 5.1a, [X89911.1], (90%, 561 bp)
112.	CZ339c	<i>Spirosoma</i> -like spec., Stamm PC 5.1a, [X89911.1], (90%, 561 bp)
113.	CZ342	1. Unidentifiziertes Eubakterien Klon GKS69, [AJ224989], (96%, 453 bp) 2. <i>Sphingomonas</i> spec., Stamm RW1, [AB021492], (96%, 451 bp)
114.	CZ345	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
115.	CZ347	<i>Spirosoma</i> -like spec., Stamm PC 5.1a, [X89911.1], (90%, 561 bp)
116.	CZ351b	<i>Spirosoma</i> -like spec., Stamm PC 5.1a, [X89911.1], (90%, 561 bp)
117.	CZ352	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
118.	CZ356	<i>Bacillus megaterium</i> , [AF142677], (98%, 455 bp)
119.	CZ357a	<i>Bacillus megaterium</i> , [AF142677], (98%, 455 bp)
120.	CZ357c	<i>Bacillus megaterium</i> , [AF142677], (98%, 455 bp)
121.	CZ359	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
122.	CZ361	Unkultiviertes α -Proteobakterium spec. GR-371.III.81,[AJ301574], (96% 454 bp)
123.	CZ363	<i>Sphingomonas</i> Stamm ML1, [AY026948], (96%, 454 bp)
124.	CZ388a	<i>Bacillus megaterium</i> , [AF142677], (98%, 455 bp)
125.	CZ389a	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 465 bp)
126.	CZ389b	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 465 bp)
127.	CZ390	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 465 bp)
128.	CZ391	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 465 bp)
129.	CZ401a	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 465 bp)

	Stamm- name	Ähnlichste Spezies (16S rDNA Verwandtschaft: %/bp)
130.	CZ401b	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 465 bp)
131.	CZ415a	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 465 bp)
132.	CZ415b	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 465 bp)
133.	CZ416	<i>Bacillus pseudocaliphilus</i> o. <i>B. methanolicus</i> 97%
134.	CZ417	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
135.	CZ418	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 465 bp)
136.	CZ426	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 465 bp)
137.	CZ427a	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 465 bp)
138.	CZ427b	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 465 bp)
139.	CZ440	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 465 bp)
140.	CZ442a	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 465 bp)
141.	CZ443	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 465 bp)
142.	CZ445b	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
143.	CZ448a	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
144.	CZ449	<i>Spirosoma</i> -like spec., Stamm PC 5.1a, [X89911.1], (90%, 561 bp)
145.	F11	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> , Stamm LMG3645, [AJ312209], (95%, 448 bp)
146.	KD12	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
147.	KHC4	<i>Cellulomonas</i> spec., [AB0047321], (98%, 463 bp)
148.	KMC3.1	<i>Bordetella bronchiseptica</i> , [X57026], (100% in 453 bp)
149.	KMC6	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , [X87276], (99%, 462 bp)
150.	KMC7.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , [X87276], (98%, 462 bp)
151.	KMC12	<i>Bacillus vortex</i> , [AF039409], (96%, 465 bp)
152.	KMC14.1	<i>Agromyces</i> spec., Stamm IFO16238, [AB023359], (99%, 457 bp)
153.	KMC15.1	<i>Bordetella bronchiseptica</i> , [X57026], (100% in 453 bp)
154.	KMaC1	<i>Cellulomonas</i> spec., [AB0047321], (98%, 463 bp)
155.	KMaC2	<i>Cellulomonas</i> spec., [AB0047321], (98%, 463 bp)
156.	KMaC3	<i>Cellulomonas</i> spec., [AB0047321], (98%, 463 bp)
157.	KMaC4	<i>Cellulomonas</i> spec., [AB0047321], (98%, 463 bp)
158.	KMaC5	<i>Cellulomonas</i> spec., [AB0047321], (98%, 463 bp)
159.	KNC1	<i>Bacillus subtilis</i> , [Z99107], (100%, 461 bp)
160.	KNC5	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
161.	KNC6	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
162.	KNeC1	<i>Cellulomonas</i> spec., [AB0047321], (98%, 463 bp)
163.	KNeC2.1	<i>Bacillus cereus</i> , Stamm WSBC10206, [Z84590], (98%, 353 bp) oder <i>Bacillus thuringiensis</i> , Stamm WS 2614, [Z84593] (98%, 353 bp)
164.	KNx1	<i>Bacillus cereus</i> , [AF176322] oder <i>Bacillus anthracis</i> , [AF176321], (99%, 461 bp)
165.	KRC2.1	<i>Brucella melitensis</i> , [AF220149], (99%, 460 bp)
166.	KRC3.1	<i>Brucella melitensis</i> , [AF220149], (99%, 460 bp)
167.	KRC4.1	<i>Brucella melitensis</i> , [AF220149], (99%, 460 bp)
168.	KRC6.1	<i>Brucella melitensis</i> , [AF220149], (99%, 460 bp)

	Stamm- name	Ähnlichste Spezies (16S rDNA Verwandtschaft: %/bp)
169.	KRC7	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , [X87276], (99%, 462 bp)
170.	KRX2	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , [X87276], (99%, 462 bp)
171.	KScC1.1	<i>Bacillus cereus</i> , Stamm WSBC10206, [Z84590], (98%, 353 bp) oder <i>Bacillus thuringiensis</i> , Stamm WS 2614, [Z84593] (98%, 353 bp)
172.	KScC2	<i>Cellulomonas spec.</i> , [AB0047321], (98%, 463 bp)
173.	KScC3	<i>Cellulosimicrobium variabile spec. nov.</i>
174.	KScC4	<i>Bacillus subtilis</i> , [Z99107], (100%, 461 bp)
175.	KScC6	<i>Cellulomonas spec.</i> , [AB0047321], (98%, 463 bp)
176.	KZC6	<i>Brucella melitensis</i> , [AF220149], (99%, 460 bp)
177.	Mx5	<i>Cellulosimicrobium variabile spec. nov.</i>
178.	NA2	<i>Cellulomonas spec.</i> , [AB0047321], (98%, 463 bp)
179.	Y2	<i>Streptomyces sampsonii</i> , [D63871] oder <i>Streptomyces nodosus</i> , [AF114036], (99% , 450 bp)
180.	Y3	<i>Streptomyces sampsonii</i> , [D63871] oder <i>Streptomyces nodosus</i> , [AF114036], (99%, 450 bp)
181.	Y4	<i>Sphingomonas spec.</i> Stamm BF2, [X89905], (97%, 391 bp)
182.	X6	<i>Cellulomonas spec.</i> , [AB0047321], (98%, 463 bp)
183.	ZC1	<i>Cellulomonas spec.</i> , [AB0047321], (98%, 463 bp)

7.4. Alle cellulolytischen Stämme und ihr Celluloseabbauverhalten

Tabelle 7: Das Abbauverhalten wurde zuerst auf ¹Medium 2-Agar getestet. Bei negativem Ergebnis wurde das Celluloseabbauverhalten auf ²DSMZ-Medium 1- Agar + Cellulose untersucht. Die Größe des durchschnittlichen Grades des Celluloseabbaus innerhalb der jeweiligen Gruppe wurde folgendermaßen eingeteilt:

³ | > 4mm = +++, | < 4mm > 1mm = ++, | < 1mm = +.

Gemessen wurde der Abstand der Kolonie zur Grenze der Abbauzone.

Stamm	Anreicherungsmedien	Abbau von Cellulose ^{1,3}	Abbau von Cellulose ^{2,3}
9b	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet
CK2	DSMZ-Medium 65	+++	nicht getestet
CK20	DSMZ-Medium 65	+++	nicht getestet
CK21	DSMZ-MEDIUM 1	++	nicht getestet
CK26	DSMZ-MEDIUM 1	++	nicht getestet
CK27	DSMZ-MEDIUM 1	+	nicht getestet
CK50	DSMZ-Medium 65	+++	nicht getestet
CK57	DSMZ-MEDIUM 1	++	nicht getestet
CK7	DSMZ-Medium 65	+++	nicht getestet
CK74	DSMZ-MEDIUM 1	++	nicht getestet
CK79	DSMZ-Medium 65	--	+
CK80	DSMZ-MEDIUM 1	--	+
CZ104a	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet
CZ104g	TSB-MEDIUM	+++	nicht getestet
CZ107b	DSMZ-MEDIUM 1	++	nicht getestet
CZ109a	DSMZ-MEDIUM 1	+	nicht getestet
CZ116	DSMZ-MEDIUM 1	++	nicht getestet
CZ129	DSMZ-MEDIUM 1	--	++
CZ131	DSMZ-MEDIUM 1	+	nicht getestet
CZ140d	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet
CZ143	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet
CZ177b	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet
CZ18	DSMZ-MEDIUM 1	+	nicht getestet
CZ181a	TSB-MEDIUM	+++	nicht getestet
CZ195	DSMZ-MEDIUM 1	+	nicht getestet
CZ197a	DSMZ-MEDIUM 1	++	nicht getestet
CZ198a	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet
CZ2	DSMZ-MEDIUM 1	+	nicht getestet
CZ207	TSB-MEDIUM	++	nicht getestet
CZ220	DSMZ-MEDIUM 1	++	nicht getestet
CZ225	DSMZ-MEDIUM 1	++	nicht getestet

Stamm	Anreicherungsmedien	Abbau von Cellulose^{1,3}	Abbau von Cellulose^{2,3}
CZ229e	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet
CZ229f	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet
CZ230a	DSMZ-MEDIUM 1	--	+
CZ3	DSMZ-MEDIUM 1	++	nicht getestet
CZ35	DSMZ-MEDIUM 1	++	nicht getestet
CZ36	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet
CZ44	DSMZ-MEDIUM 1	++	nicht getestet
CZ5	DSMZ-MEDIUM 1	+	nicht getestet
CZ52	DSMZ-MEDIUM 1	+	nicht getestet
CZ53	DSMZ-MEDIUM 1	++	nicht getestet
CZ58	DSMZ-MEDIUM 1	--	++
CZ63	DSMZ-MEDIUM 1	--	+
CZ64	DSMZ-MEDIUM 1	--	+
CZ66	TSB-MEDIUM	--	+
CZ67	DSMZ-MEDIUM 1	--	+
CZ68a	DSMZ-MEDIUM 1	--	+
CZ68b	DSMZ-MEDIUM 1	--	++
CZ69	DSMZ-MEDIUM 1	--	++
CZ7	DSMZ-MEDIUM 1	--	+
CZ71	DSMZ-MEDIUM 1	--	++
CZ73	DSMZ-MEDIUM 1	++	nicht getestet
CZ84	DSMZ-MEDIUM 1	+	nicht getestet
CZ89	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet
CZ91a	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet
CZ92	DSMZ-MEDIUM 1	++	nicht getestet
CZ93a	TSB-MEDIUM	+++	nicht getestet
CZ95	TSB-MEDIUM	++	nicht getestet
CZ96c	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet
CZ97	DSMZ-MEDIUM 1	++	nicht getestet
FL1	DSMZ-MEDIUM 1	+	nicht getestet
KB1	DSMZ-MEDIUM 1	++	nicht getestet
KD12	DSMZ-MEDIUM 1	++	nicht getestet
KD8	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet
KHC4	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet
KMaC1	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet
KMaC2	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet
KMaC3	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet
KMaC4	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet
KMaC5	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet
KMC12	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet

Stamm	Anreicherungsmedien	Abbau von Cellulose^{1,3}	Abbau von Cellulose^{2,3}
KMC14.1	DSMZ-MEDIUM 1	--	+
KMC15.1	DSMZ-MEDIUM 1	--	+++
KMC3.1	DSMZ-MEDIUM 1	--	+++
KMC6	DSMZ-MEDIUM 1	--	+++
KMC7.1	DSMZ-MEDIUM 1	--	+
KNC1	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet
KNC5	DSMZ-MEDIUM 1	++	nicht getestet
KNC6	DSMZ-MEDIUM 1	++	nicht getestet
KNeC1	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet
KNeC2.1	DSMZ-MEDIUM 1	++	nicht getestet
KNx1	DSMZ-MEDIUM 1	++	nicht getestet
KRC2.1	DSMZ-MEDIUM 1	--	+
KRC3.1	DSMZ-MEDIUM 1	--	+
KRC4.1	DSMZ-MEDIUM 1	--	+
KRC6.1	DSMZ-MEDIUM 1	--	+
KRC7	DSMZ-MEDIUM 1	--	+
KRX2	DSMZ-MEDIUM 1	--	+
KScC1.1	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet
KScC2	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet
KScC3	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet
KScC4	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet
KScC6	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet
KZC6	DSMZ-MEDIUM 1	--	+
Mx5	TSB-MEDIUM	+++	nicht getestet
NA2 ^s	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet
X1	DSMZ-MEDIUM 1	--	+
X2	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet
X6	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet
Y2	DSMZ-MEDIUM 1	++	nicht getestet
Y3	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet
Y4	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet
ZC1	DSMZ-MEDIUM 1	+++	nicht getestet

Lebenslauf

Name: Marika Veronika Wenzel
geboren: 21.01.1966 in Edesheim (Pfalz)

Schul- und Hochschulausbildung

1972 - 1976	Volksschule Edesheim
1976 - 1982	Realschule Edenkoben: Mittlere Reife
1982 - 1983	Berufsschule Edenkoben, Berufsgrundschuljahr: Hauswirtschaft
1983 - 1986	Berufsschule Neustadt / Weinstraße: Ausbildungsbegleitender Unterricht
1988 - 1991	AKAD, Hochschule für Berufstätige: externes Abitur
1992 - 1997	Universität Mainz, Studienfach Biologie
1997 - 1998	Diplom: Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Thema: Mikroorganismen aus <i>Mixotricha paradoxa</i> , Note: sehr gut
1998 - 2001	Promotion, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Thema: Symbiotische Mikroorganismen aus dem Termitendarm, Note: 1,0 (Magna cum laude)

Beruf

1983 - 1986	Ausbildung zur Einzelhandelskauffrau bei Kaiser´s Kaffee Geschäft AG, Neustadt / Weinstraße
1986 - 1987	Auslandsaufenthalt: Jugendherberge in Paris / Frankreich (femme de chambre)
1987 - 1992	C & C – Großeinkauf, Landau (Pfalz) Fleischereifachverkäuferin