

Universität Mainz  
Institut für Mikrobiologie und Weinforschung

**Phylogenetische Charakterisierung von Mikroorganismen  
aus dem Intestinaltrakt von Insekten**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

vorgelegt von  
Farahnaz Emtiazi  
aus Abadan/Iran

Mainz, Mai 2000

Amtierender Dekan:

Prof. Dr. J. MARKL

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

06.07.2000

# Inhaltverzeichnis

	Seite
<b>1 Einleitung</b> .....	1
<b>1.1 Insekten</b> .....	1
<b>1.2 Termiten</b> .....	1
<b>1.3 Anatomie des Intestinaltraktes der Termiten</b> .....	2
<b>1.4 Flagellaten des Termitendarmes</b> .....	3
<b>1.5 Bakterien des Termitendarmes</b> .....	4
<b>1.6 Methanbakterien als Symbionten in Insekten</b> .....	5
<b>1.7 Sulfatreduzierende Bakterien in Insekten</b> .....	6
<b>1.8 Zielsetzung</b> .....	7
<b>2 Material und Methoden</b> .....	8
<b>2.1. Insekten</b> .....	8
<b>2.2 Bakterien</b> .....	8
<b>2.3 Chemikalien</b> .....	8
<b>2.4 Biochemikalien und Kits</b> .....	10
<b>2.5 Medien</b> .....	13
<b>2.6 Puffer und Lösungen</b> .....	17
<b>2.7 Geräte</b> .....	19
<b>2.8 Präparation des Darmes aus Termiten</b> .....	20
<b>2.9 Präparation des Darminhaltes aus verschiedenen Insekten</b> .....	20
<b>2.10 Molekularbiologische Identifizierung der Darmbakterien</b> .....	21
2.10.1 Isolierung von Nukleinsäuren .....	21
2.10.2 Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	21
2.10.3 Horizontale Agarosegelelektrophorese .....	22
2.10.4 Reinigung der PCR-Produkte .....	22
2.10.5 Reinigung der Nukleinsäuren durch Phenol-Chloroform-Extraktion .....	23
2.10.6 Klonierung der PCR Produkte .....	23
2.10.7 Schneiden der DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	23
2.10.8 Reinigung der DNA-Bande des Restriktionsansatzes .....	23

	Seite
2.10.9 Vorbehandlung des Plasmidvektors .....	24
2.10.10 Ligation von linearer DNA.....	24
2.10.11 Herstellung kompetenter Bakterien .....	24
2.10.12 Transformation kompetenter Bakterien .....	25
2.10.13 Reinigung der rekombinanten Plasmide .....	25
2.10.14 DNA-Sequenzierung .....	26
<b>2.11 Identifizierung der kultivierbaren Darmwandbakterien .....</b>	<b>26</b>
<b>2.12 Denaturierende Gradientengelelektrophorese .....</b>	<b>28</b>
<b>2.13 Bestimmung der Methanbildungsrate .....</b>	<b>29</b>
<b>2.14 Bestimmung der Sulfatreduktionsrate .....</b>	<b>29</b>
<b>2.15 Sequenzierung und Konstruktion phylogenetischer Stammbäume .....</b>	<b>31</b>
2.15.1 Sequenzalignment .....	31
2.15.2 Phylogenetische Stammbäume .....	31
2.15.3 Statistische Absicherung der Stammbäume .....	31
<b>2.16 Fluoreszenz-<i>in situ</i>-Hybridisierung .....</b>	<b>32</b>
2.16.1 Vorbereitung des Darmgewebes .....	32
2.16.2 Durchführung der Hybridisierung und DAPI-Färbung .....	32
2.16.3 Epifluoreszenzmikroskopie .....	33
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1 Charakterisierung symbiontischer Mikroorganismen an der Darmwand der</b>	
<b>Termiten <i>Mastotermes darwiniensis</i> .....</b>	<b>34</b>
3.1.1 Kultivierte Bakterien .....	34
3.1.1.1 Physiologische Tests .....	35
3.1.1.2 Phylogenie der kultivierten Darmwand-Bakterien von <i>Mastotermes darwiniensis</i> ..	37
3.1.2. Nicht kultivierte Bakterien .....	39
3.1.2.1. Phylogenie der nicht kultivierten Darmwandbakterien von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	41
3.1.3 Methanbakterien an der Darmwand von <i>Mastotermes darwiniensis</i> .....	48
3.1.3.1 Phylogenie der Methanbakterien .....	50
3.1.3.2 Methanbildungsrate .....	54
3.1.3.3 Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung der Methanbakterien .....	55

	Seite
<b>3.2 Vorkommen von sulfatreduzierenden Bakterien (SRB) im Darm</b>	
<b>verschiedener Insekten</b> .....	59
3.2.1 Phylogenie der sulfatreduzierenden Bakterien .....	59
3.2.2 Sulfatreduktionsrate .....	65
<b>4 Diskussion</b> .....	66
<b>4.1 Methodik</b> .....	66
<b>4.2 Phylogenetische Charakterisierung symbiontischer Bakterien</b>	
<b>an der Darmwand von <i>Mastotermes darwiniensis</i></b> .....	67
4.2.1 Kultivierte symbiontische Darmwand-Bakterien .....	68
4.2.2 Nicht-kultivierte Darmwand-Bakterien .....	70
4.2.3 Symbiontische Methanbakterien .....	73
<b>4.3 Methanbildungsrate von <i>Mastotermes darwiniensis</i></b> .....	76
<b>4.4 Sulfatreduzierer in verschiedenen Insekten</b> .....	77
4.4.1 Phylogenetische Charakterisierung von Sulfatreduzierern in verschiedenen Insekten .....	77
4.4.2 Sulfatreduktionsrate .....	79
<b>4.5 Ausblick</b> .....	83
<b>5 Zusammenfassung</b> .....	84
<b>6 Literaturverzeichnis</b> .....	86
<b>7 Anhang</b> .....	100
<b>7.1 Aligment der SSU rDNS-Sequenzen</b> .....	100
<b>7.2 Abkürzungen der Organismen in den Aligments</b> .....	127

## Abkürzungen

ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
CMC	Carboxymethylcellulose
DABCO	Diazabicyclooctan
DGGE	Denaturierende-Gradienten-Gel-Elektrophorese
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMBL	European Molecular Biology Laboratory (Heidelberg)
g	Gramm
HK	Hexokinase
IPTG	Isopropylthiogalactosid
M	Molar
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PHYLIP	Phylogeny inference package
rDNA	Ribosomale DNA (Gen für rRNA)
RDP	Ribosomal Database Project
rRNA	Ribosomale RNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRB	Sulfatreduzierende Bakterien
TEMED	N,N,N',N' -Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TSB/TSA	Tryptic Soy Broth/ Tryptic Soy Agar
ÜN	über Nacht
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-Galactosid

## Einleitung

### 1.1 Insekten

Systematisch lassen sich die Insekten in drei großen Gruppen einteilen. Der sog. Altgruppen gehören Ephemeroptera (Eintagsfliegen), Odonata (Libellen) und Plecoptera (Steinfliegen) an, zu einer Mittelgruppen gehören Orthopteroidea, Blattopteroidea, Psocoptera, Thysanoptera und Rhynchota. Die Holometabola mit Neuropteroidea, Coleoptera, Hymenoptera und Mecopteroidea werden als Neugruppen zusammengefaßt (Remane et al. 1989). Die etwa 8000 bekannten Arten staatenbildender Insekten verteilen sich auf zwei Gruppen, Termiten (Isoptera) und Hymenopteren (Remane et al. 1989). Die Staaten der Termiten werden von beiden Geschlechtern gleichermaßen aufgebaut. Auch Jungtiere gehören dazu. In der Königskammer leben König und Königin. In den Staaten der Hymenopteren herrscht das weibliche Geschlecht vor. Im komplizierten Insektenstaat müssen eine Reihe von Aufgaben bewältigt werden, um diesen funktionsfähig zu halten. Dabei kann es zur Kastenbildung kommen. Innerhalb eines Staates sind körperlich stark verschieden ausgebildete Gruppen vorhanden (Soldaten, Arbeiter, Geschlechtstiere). König und Königin sorgen für Nachkommenschaft. Die Soldaten besitzen Verteidigungsmittel und werden von den Arbeitern mit Futter ernährt.

### 1.2 Termiten

Die hemimetabolen Termiten, auch weiße Ameisen genannt, sind Insekten mit hochentwickelten Staaten und zum Teil auffälligen Bauten aus Sediment, Kot und Speichel, die besonders in den Savannengebieten Afrikas und Australiens vorkommen. Manche der Arten leben auch an der französischen Atlantikküste bis zur Höhe von Paris. Die 2671 bekannten Termitenarten (Myles, 1999) sind über den gesamten Tropen- und Subtropengürtel verbreitet. Der termitenreichste Kontinent ist Afrika, wo annähernd 700 Arten vorkommen (Grzimek und Ernst, 1969).

Termiten bilden die Ordnung Isoptera. Die 2671 Termitenarten werden in 7 Familien unterteilt. Die sechs Familien Mastotermitidae, Kalotermitidae, Termopsidae, Hodotermitidae, Rhinotermitidae und Serritermitidae werden als niedere Termiten zusammengefaßt. Zu den höheren Termiten zählt dagegen nur die Familie Termitidae, die mit 1958 Arten allerdings 3/4 aller Termiten umfaßt (Myles, 1999). Die höheren Termiten grenzen sich von den niederen Termiten u.a. durch ihre großen, teilweise oberirdisch angelegten Nester und durch das Fehlen symbiontischer Flagellaten im Enddarm ab.

Aufgrund des Verbreitungsmusters fossiler und rezenter Arten läßt sich ihre stammesgeschichtliche Entwicklung 300 Millionen Jahre zurückverfolgen (Emerson, 1965; 1967). Die in Australien vorkommende Art *Mastotermes darwiniensis*, die einzige rezente Spezies der Mastotermitidae, gilt als die ursprünglichste Termitenart, da sie noch einige Merkmale mit den als Termitenvorfahren angesehenen Schaben gemeinsam hat. So stimmt die Flügeladerung mit der der Schaben überein, und die geflügelten Tiere besitzen auch noch ein deutliches Analfeld in den Hinterflügeln. Schließlich legt diese Art ihre Eier nicht einzeln wie alle übrigen Termiten, sondern in Form von Paketen ab, in denen 20 bis 24 Eier in einer Doppelreihe durch eine gelatinöse Substanz zusammengekittet sind. Diese Pakete entsprechen grundsätzlich den Ootheken der Schaben (Grzimek und Ernst, 1969). Daher nimmt man heute als sicher an, dass Termiten von ursprünglichen Schaben abstammen, die zum sozialen Leben übergegangen sind.

Nach der bevorzugten Nahrung lassen sich die Termiten in humus-, holz-, gras-, und allesfressende sowie pilzzüchtende Arten einteilen. Während die niederen Termiten im wesentlichen von Holz leben, haben die höheren Termiten z.T. unterschiedliche Nahrungsgewohnheiten. Vermutlich waren die Humusstoffe die ursprüngliche Nahrung (Grzimek und Ernst, 1969). Viele höhere Termiten (Termitidae, Macrotermitinae) warmer Gebiete legen unterirdisch oder in der Tiefe ihres Nestes Pilzgärten in Kammern an. Die Pilzmyzele werden von den Termiten verzehrt, und als Nahrung für die Pilze wird z. B. der Kot der Termiten verwendet, oft auch Blätter und Holz. Die Feuchtigkeit liebenden Termiten legen überdeckte Gänge an und zerstören vorwiegend Holz, das sie mit Hilfe von Flagellaten und Bakterien aufschließen. So können die Termiten wirtschaftlichen Schaden anrichten. Andererseits können die Termiten auch einen unschätzbaren Beitrag zum Recycling von biologischem Material und zur Bodenfruchtbarkeit leisten (Baumann, 1999).

### **1.3 Anatomie des Intestinaltraktes der Termiten**

Die Geschlechtstiere und die Arbeiter sind mit kräftigen, beißend-kauenden Mundwerkzeugen ausgestattet. Der Ösophagus kann sich hinten zu einem Kropf (Vormagen) erweitern. Die von den Mundwerkzeugen grob zerkaute Nahrung gelangt zunächst in den Kropf, wird dann in dem mit Chitinzähnen bewährten Kaumagen weiter zerkleinert und in den Mitteldarm geleitet. Der Hinterdarm mündet in die Exkretionsorgane (Malpighischen Gefäße) ein. Erst im sackförmig ausgeweiteten Abschnitt des Enddarmes, der Gärkammer, findet der wesentliche Celluloseabbau statt. Ein Ventil verhindert den Übertritt von Gärkammerinhalt in den Mitteldarmbereich.

Im Mittel- und Enddarm von niederen und höheren Termiten liegt der pH-Wert gewöhnlich zwischen 6-7,5. Als Ausnahme wurde zum Beispiel bei erdfressenden Termiten im Vorderen Teil des Hinterdarms ein alkalischer pH-Wert von 10,4 gemessen (Brune et al., 1995, Radek und Hausmann 1994). Auftreten strikt anaerober, fakultativ anaerober, aerober und sauerstoffempfindliche Flagellaten zeigen ( Radek und Hausmann 1994; Kuhnigk et al. 1994; Ohkuma und Kudo 1996, 1998), dass die Gärkammer ein Sauerstoffgradientensystem ist mit stark negativem Redoxpotential bis zu  $-270$  mV. Bei Sauerstoffpartialdruckmessungen der Gärkammer wurde festgestellt, dass nach den ersten 50-100  $\mu\text{m}$  des Radialprofils der Gärkammer kein Sauerstoff mehr vorhanden ist (Brune 1998; Kuhnigk et al. 1994).

#### **1.4 Flagellaten des Termitendarmes**

Bei den Arten, die vorwiegend Holznahrung zu sich nehmen, wird etwa drei Viertel der Cellulose von Enzymen (Cellulasen) aufgespalten und dann als Zucker aufgenommen. In ihrem Darm, speziell in dem stark erweiterten vorderen Teil des Enddarmes, der Gärkammer, leben jedoch Einzeller, vielgeißelige Flagellaten, die die feinen Nahrungsteilchen aufnehmen (Phagocytose) und Cellulose über Glucose zu Pyruvat abbauen. Pyruvat wird anschließend in speziellen Zellorganellen, den Hydrogenosomen, in Acetat, Wasserstoff und Kohlendioxid gespalten, wobei Acetat wiederum von den Termiten verwertet werden kann (Radek und Hausmann, 1994; Müller, 1993). Zwischen den Termiten und den Darmflagellaten besteht ein für beide Teile lebenswichtige Symbiose. Darmflagellaten sind zwischen 5  $\mu\text{m}$  und 500  $\mu\text{m}$  groß und werden aufgrund morphologischer und ultrastruktureller Merkmale den Ordnungen Trichomonadida, Oxymonadida und Hypermastigida zugeordnet (Honigberg, 1970; Yamin, 1979,1981).

Im Darm höherer Termiten leben wenige Flagellaten und vereinzelt auch andere Protozoen wie Ciliaten, Gregarinen und Amöben, die aber keine Symbionten sind (Honigberg, 1970). Es gibt Hinweise, dass bei höheren und niederen Termiten in der Speicheldrüse, im Vorder- und Mitteldarm Cellulasen (Endo- $\beta$ 1,4-Glucanasen,  $\beta$ 1,4-Glucosidasen) vorhanden sind, die anscheinend kristalline Cellulose abbauen können (Slaytor, 1992). Die Gemeinschaft der Darmbewohner hilft nicht nur, das Substrat rasch chemisch aufzuschließen, sondern dient auch als Stickstoff- und Vitaminquelle. Es ist allgemein bekannt, dass viele der hochentwickelten Termiten (Familie Termitidae) in ihren Nestern Pilzgärten anlegen, indem sie bestimmte Kammern mit ihrem Kot füllen und oft noch zerkaute Nahrung sowie Holz abzugeben und mit einem Pilz animpfen. Auf dieser Weise entwickeln sich bei der relative hohen Luftfeuchtigkeit Pilzgeflechte, die das Holz leichter verwertbar machen.

Bisher war man der Ansicht, dass niedere Termiten nach Abtöten der Flagellaten im Darm allein nicht fähig sind, Cellulose abzubauen. Versuche von Wenzel et al. (2000) zeigten, dass die beiden niederen Termiten *Kaloterme flavicollis* und *Zootermopsis angusticollis* ohne Flagellaten überleben können. Obwohl die Flagellaten für Cellulose- und Hemicelluloseabbau offenbar unabdingbar sind, übernehmen bei vielen Termiten besonderes bei den höheren Termiten, die ja keine symbiontischen Protozoen besitzen, neben termiteneigenen Cellulasen möglicherweise zahlreich vorhandene Bakterien den Celluloseabbau (Wenzel et al., 2000). Bei pilzkultivierenden Arten scheinen die Cellulasen, die im Mitteldarm nachgewiesen werden konnten, von den kultivierten Pilzen zu stammen (Martin und Martin 1978; 1979). In Termiten spielen allerdings auch die Darmbakterien eine wichtige Rolle. Fakultative anaerobe Formen, welche vorhandenen Sauerstoff für Oxidationsprozesse verwenden können, sind wesentlich an der Aufrechterhaltung des anaeroben Milieus beteiligt (Veivers et al., 1982). Andere Bakterien können molekularen Stickstoff fixieren oder aus dem Harnsäure Ammoniak, die wieder von den Termiten verwendet wird, freisetzen (Bently, 1984). Methanogene und acetogene Bakterien verwerten freigesetzten Wasserstoff und gebildetes Kohlendioxid zur Energiegewinnung, wobei Methan bzw. Acetat hergestellt werden.

## 1.5 Bakterien des Termitendarmes

Der Großteil der isolierten Bakterien sind fakultative anaerobe Formen wie verschiedene *Enterobacter*-Arten. Andere Bakterienarten wie *Streptococcus*, *Bacteroides*, , *Staphylococcus* und *Bacillus*, Coryneforme Bakterien und *Streptomyces* wurden auch aus dem Termitendarm isoliert. Daneben wurden auch obligat aerobe Arten zum Beispiel aus den Gattungen *Pseudomonas* und *Acinetobacter* gefunden. (Thayer, 1976; Schulz und Breznak, 1978; Eutick et al., 1978; Mannesmann und Piechowski, 1989; Kuhnigk et al., 1994). Die auffälligen, großen, sich frei im Darmmilieu bewegend Spirochaeten, die man in Termiten und Schaben findet, gehören phylogenetisch zu den Treponemen (Berchtold 1995). Von ihrer stoffwechselphysiologischen Funktion im Darm ist nicht viel bekannt. Vor kurzem konnten Spirochaeten aus *Zootermopsis angusticollis* kultiviert werden (Leadbetter et al., 1999). Dabei zeigte sich, dass die Spirochaeten an der Acetogenese beteiligt sind. Es ist schon länger bekannt, dass Spirochaeten zur Bewegung ihres Wirtes beitragen können, wie es bei dem großen Flagellaten *Mixotricha paradoxa* der Fall ist. Eutick et al. (1978) konnten zeigen, dass die Lebensdauer der Termiten nach selektiver Ausschaltung der Spirochaeten von 250 Tagen auf 13 Tage sank. Bakterien der Gärkammer können je nach Art frei im Darmlumen

vorkommen, an der Darmwand oder an Flagellaten angeheftet sein oder auch intrazellulär in den Flagellaten leben.

## **1.6 Methanbakterien als Symbionten in Insekten**

Mehr als die Hälfte des Methans in der Erdatmosphäre stammt aus biologischen Quellen, wird also von Methanbakterien produziert (Rogers und Whitman, 1991). Obwohl es nur in geringen Konzentrationen in der Atmosphäre vorkommt, ist es doch für den Treibhauseffekt und das Ozonloch mitverantwortlich (Rogers und Whitmann, 1991; Graedel und Crutzen, 1989). Methanbakterien kommen nicht nur in Sedimenten von Gewässern, im Schlamm von Kläranlagen und in Reisfeldern, Sümpfen und Mülldeponien vor, sondern auch im Pansen der Wiederkäuer und im Enddarm von Insekten. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Insekten ergab, dass sich die Methanbakterien immer im Enddarm der Wirtstiere befinden. (Buchner, 1953; Breznak, 1982; Hackstein und Stumm, 1993; Stumm und Hackstein 1994; Slaytor, 1992).

Methanbakterien kommen nicht nur freibeweglich im Enddarm vor. In vielen methanproduzierenden Insektenarten können die Bakterien auch intrazellulär in Flagellaten und Ciliaten nachgewiesen werden (Hackstein und Stumm, 1993; Fröhlich 1999). Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Methanbakterien innerhalb der Protozoenzellen in der Nähe von spezialisierten Organellen, den Hydrogenosomen, liegen. Die Lokalisierung der Methanbakterien dicht bei den Hydrogenosomen dürfte vorteilhaft sein, da dort Pyruvat zu Acetat,  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2$  decarboxyliert und der freigesetzte Wasserstoff teilweise sofort von Methanbakterien konsumiert wird. Die Verwertung von Wasserstoff durch die Methanbakterien ist also für die Protistenzelle und viele andere Darmbakterien vorteilhaft und vielleicht lebensnotwendig, da eine Anhäufung von molekularem Wasserstoff bestimmte Reaktionen des Zellstoffwechsels hemmen kann (Lee et al., 1987; Hackstein und Stumm, 1993).

Bei der Umsetzung von  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2$  zu Methan spielen spezifische Coenzyme eine zentrale Rolle. Einer dieser Cofaktoren, das Deazaflavin-Derivat  $\text{F}_{420}$ , hat die Eigenschaft, bei Bestrahlung mit kurzwelligem Blaulicht zu fluoreszieren. Methanbakterien leuchten daher im kurzwelligen Blaulicht blaugrün auf, während die andere Bakterien unsichtbar bleiben (Doddema und Vogels, 1978; Stumm et al., 1982; Stumm und Zwart, 1986).

## 1.7 Sulfatreduzierende Bakterien in Insekten

Sulfatreduzierende Bakterien (SRB) spielen eine große Rolle beim Kohlenstoff- und Schwefel-Kreislauf in Ökosystemen. Sulfatreduzierende Bakterien sind nicht nur in marinen Standorten (Widdel und Hansen, 1992) und Frischwasser-Sedimenten gefunden worden, sondern auch aus dem Intestinaltrakt des Menschen, dem Pansen von Schafen und Kühen und dem Schweinedarm isoliert worden (Sass et al., 1998; Gebhart et al., 1993; Gibson et al., 1988a,b; Howard und Hungate, 1976). Sulfatreduzierende Bakterien konnten auch als Ektosymbionten auf der Oberfläche von anaeroben Ciliaten nachgewiesen werden (Fenchel und Ramsing, 1992). Erst in jüngster Zeit wurden sulfatreduzierende Bakterien als  $H_2$ -verwertende Bakteriengruppe aus dem Darm von höheren und niederen Termiten und aus der holzfressende Schaben *Cryptocercus punctulatus* isoliert (Trinkerl et al., 1990; Kuhnigk et al., 1996; Fröhlich et al., 1999). Im Termitendarm stehen SRB in direkter Konkurrenz mit methanogenen und acetogenen Bakterien. Während Acetogene überwiegend bei holzfressenden Termiten vorkommen, findet man Methanogene vorwiegend bei Bodentermiten (Braumann et al., 1992) Überraschend ist, dass sulfatreduzierenden Bakterien z.T. nicht so strikt anaerob sind, wie postuliert wurde. Hardy und Hamilton (1981) fanden heraus, dass Sulfatreduzierer einen gewissen Sauerstoffstress bis 72 h überleben können.

Es ist schon berichtet worden, dass im Boden lebende Termiten mehr Sulfat mit der Nahrung aufnehmen können. Fütterungsexperimente zeigten, dass der Titer in starkem Maße von dem Sulfatangebot abhängig ist (Kuhnigk, 1996) . Wird Sulfat in Form von  $Na_2SO_4$  oder  $CaSO_4$  mit der Nahrung gegeben, nimmt die Zahl der Sulfatreduzierer zu. Wird andererseits sulfatfreies Substrat verfüttert, sinkt deren Zahl (Kuhnigk, 1996).

## 1.8 Zielsetzung

Bis heute haben viele Autoren über die Mikroorganismen in verschiedenen Termiten und ihre Bedeutung für die Symbiose in Termitendarm berichtet. Dabei wurden viele cellulolytische Bakterien charakterisiert. Ebenfalls wurden auch Sulfatreduzierer aus den verschiedenen Termiten isoliert. Hierbei stand die Frage im Vordergrund, welche Bakterien an der Termitendarmwand lokalisiert sind und wie das Verteilungsmuster von sulfatreduzierenden Bakterien bei verschiedenen Insekten ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die symbiontischen Bakterien, die an der Darmwand der Termiten *Mastotermes darwiniensis* lokalisiert sind, charakterisiert. Die kultivierten und nicht-kultivierten Darmsymbionten wurden über ihre 16S rRNA, die bei allen Bakterien vorkommt und für verschiedene Bakterienarten spezifisch ist, identifiziert. Ein Schwerpunkt lag auf der Untersuchung der an der Darmwand lokalisierten Methanbakterien. Einen weiteren Schwerpunkt stellten die sulfatreduzierenden Bakterien (SRB) in verschiedenen Insekten dar.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Insekten

Larven von *Zygoptera* spec. (Odonata), *Chironomus thummi* (Diptera), *Baetis vernus* (Ephemeroptera), *Perla marginata* und *Nemoura* spec. (Plecoptera) wurden aus Teichen und Flüssen in der Umgebung von Mainz gefangen. Adulte Tiere von *Pyrrhocoris apterus* (Hemiptera) wurde unter Linden auf dem Campus der Universität Mainz gesammelt. Adulte Tiere von *Pachnoda marginata* (Coleoptera) wurden von Frankfurter Zoo zur Verfügung gestellt. Adulte Tiere von *Gryllus bimaculatus* (Ensifera) wurden vom Zoologischen Institut der Universität Mainz erhalten.

Die australische Termite *Mastotermes darwiniensis* Froggatt wurde von der Bundesanstalt für Materialforschung und Materialprüfung, Berlin, zur Verfügung gestellt. Einige hundert Tiere wurden im Dunkeln bei 28°C in einem Metallgefäß gehalten, das feuchtes Vermiculit enthielt. Eine mit engmaschigem Drahtnetz versehene Bohrung im Gefäßdeckel ermöglichte den Gasaustausch. Als Futter dienen Fichten- und Eichenholzquader.

### 2.2 Bakterien

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  wurde von der Firma Gibco-BRL (Eggenstein) bezogen und auf LB-Medium bei 37 °C im Schüttelinkubator gezüchtet.

*Escherichia coli* TOP10F war in TA-Cloning-Kit (Invitrogen, Groningen, Niederland) enthalten.

### 2.3 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	Roth, Kalsruhe
Agar	Hartge-Marcor, Hackensack
Agarose NA	Roth, Karlsruhe
Agarose (low melting)	Applichem, Darmstadt
Ampicillin	Fluka, Neu-Ulm
ATP	Boehringer, Mannheim
Borsäure	Roth, Kalsruhe
Bromkresolgrün	Merck, Darmstadt
CaCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
Cellulose	Fluka, Neu-Ulm

---

Carboxymethylcellulose (CMC)	Sigma, München
Diazabicyclooctan (DABCO)	Sigma, München
dNTP	Fermentas, St. Leon-Rot
EDTA	Roth, Kalsruhe
Eisessig	Roth, Kalsruhe
Ethanol	Roth, Kalsruhe
FeSO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Formamid	Sigma, München
Glucose	Merck, Darmstadt
Glucose-6-Posphat-Dehydrogenese	Boehringer, Mannheim
Glycerin	Roth, Kalsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Fluka, Neu-Ulm
Hefeextrakt	Hartge-Marcor, Hackensack
Hydraziniumsulfat	Sigma, Steinheim
IPTG	Fermentas, St. Leon-Rot
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
KCl	Roth, Kalsruhe
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Roth, Kalsruhe
Lactat-Dehydrogenase (LDH)	Boehringer, Mannheim
Mercaptoäthanol	Merck, Darmstadt
MgSO <sub>4</sub>	Roth, Kalsruhe
MnSO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Nat-Acetat	Roth, Kalsruhe
NaCl	Roth, Kalsruhe
NAD	Boehringer, Mannheim
NADP+	Boehringer, Mannheim
NaNO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Fluka, Neu-Ulm
Pepton	Difco, Detroit
Peptonwasser	OXOID,
Phenol-Chloroform	Roth, Kalsruhe
Saccharose	Roth, Kalsruhe
SDS	Biorad, Hercules CA

Triäthanolamin-Hydrochlorid	Sigma, Steinheim
TRIS	Roth, Kalsruhe
Trypton	Difco, Detroit
Tween 80	Merck, Münschen
X-Gal	Fermentas, St. Leon-Rot

Alle nicht genannten Chemikalien waren von der Qualität p.A. und wurden von den Firma Fluka (Neu Ulm), Serva (Heidelberg), Sigma (München), Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

## 2.4 Biochemikalien, Enzyme und Kits

DNA-Längenstandard ( $\lambda$ HindIII/EcoRI)	Fermentas, St. Leon-Rot
InstaGene-DNA-Purification-Matrix	Biorad, Hercules,CA
Lysozym	Serva, Heidelberg
Oligonukleotide (Tab. 1)	ARK, Darmstadt
QIAquick-PCR-Purification-Kit	Qiagen, Hilden
Plasmidvektor pBluescript (SK+)	Stratagene, Heidelberg
Prepspin-Plasmid-Purification-Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick-Gel-Extraction-Kit	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzym <i>NotI</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsenzym <i>AluI</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
TA-Cloning-Kit	Invitrogen, <i>San Diego, CA</i>
Taq DNA-Polymerase	Applied Biosystems

**Tab. 1: Oligonukleotide****a) Oligonukleotide für die PCR**

Name	Sequenz	Länge <sup>a</sup>	T <sub>m</sub> <sup>b</sup>	Position <sup>c</sup>
Eubak5F	ATATGCGGCCGCAGAGTTGAT(C/T)(A/C)GGCTCAG	18	56	Eco 8-27
GCEubak5	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCGGCC GCCCCAGAGTTTGATCMTGGCTC	18	53	Eco 8-27
Eubak3	ATATGCGGCCGCAGAAAGGAGGTGATCC	16	48	Eco 1544-1529
Eub338F	ACTCCTACGGGAGGCAG	17	56	Eco 338-354
Eub781F	AACAGGATTAGATACCC	17	48	Eco 781-797
Eub1070F	ATGGCTGTCGTCAGCT	16	50	Eco 1055-1070
C1392R	ACGGGCGGTGTGTAC	15	50	Eco 1392-1406
GC1392R	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCGGCC GCCCCACGGGCGGTGTGTAC	15	50	Eco 1392-1406
Narch1100R <sup>g</sup>	GGGTCTCGCTCGTTRCC	17	57	Eco 1115-1098
GCNArch781F <sup>g</sup>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCGGCCGCC CCAACCGGATTAGATACCC	57	210	Eco 781-797
Narch5A <sup>g</sup>	TCCGGTTGATCCCGCCGG	18	62	Eco 8-25
Narch5B <sup>g</sup>	TCYGTTTGATCCTGGCRG	18	56	Eco 8-25
Narch5C <sup>g</sup>	TCTGGTTGATCCTGCCAG	18	56	Eco 8-25
SRB385R <sup>h</sup>	CGGCGTCGCTGCGTCAGG	18	64	Eco 385-403
SRB385F <sup>h</sup>	CCTGACGCAGCGACGCCG	18	64	Eco 385-403
DSB985 R <sup>h</sup>	GGATGTCAAACCCAG	15	58	Eco 986-1010

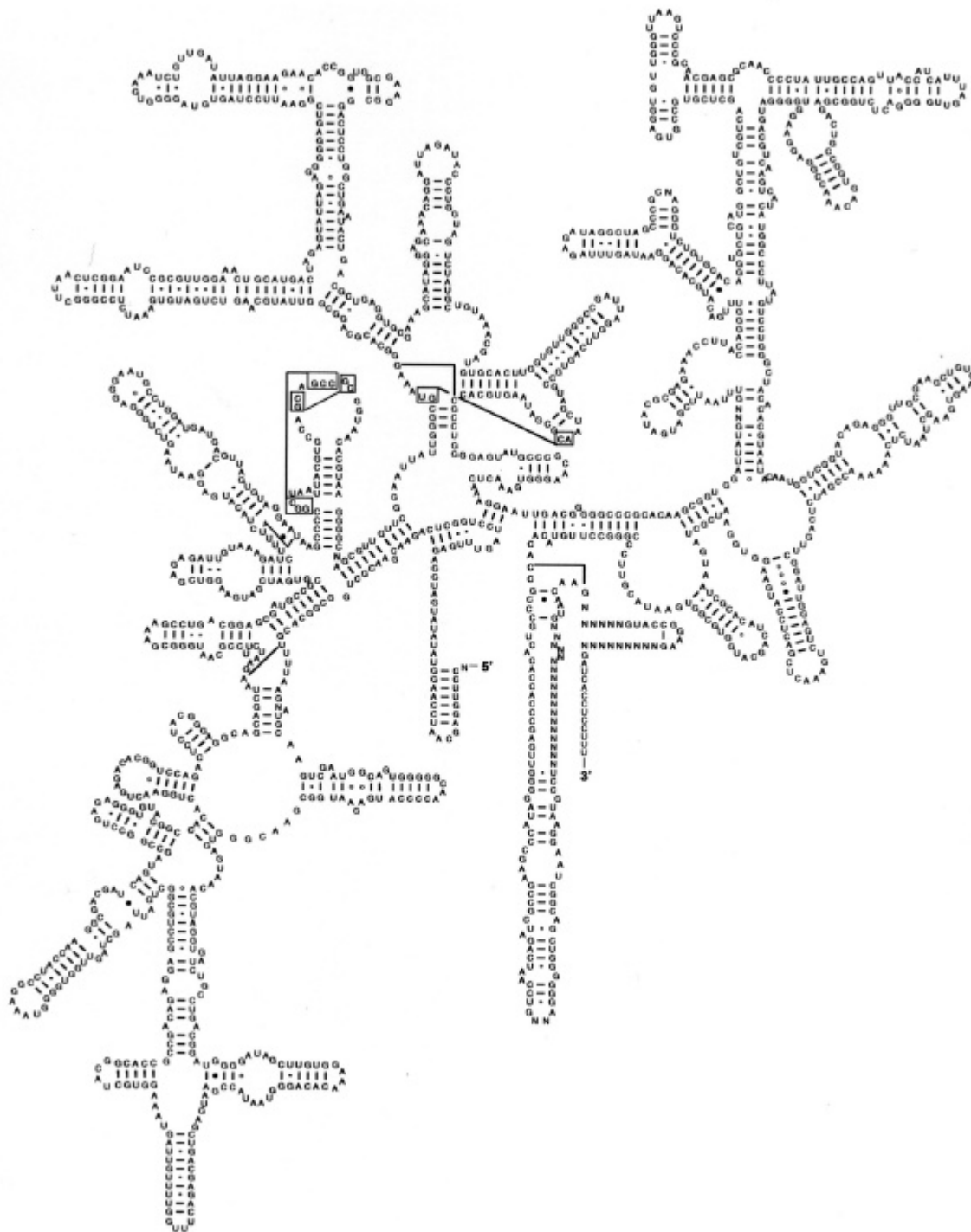
**b) Oligonukleotide zum Sequenzieren**

Eubak5F	ATATGCGGCCGCAGAGTTGAT(C/T)(A/C)GGCTCAG	19	56°C	Eco 8-27
Eub1070F	ATGGCTGTCGTCAGCT	16	50°C	Eco 1055-1070
Eub781F	AACAGGATTAGATACCC	17	48°C	Eco 781-797
Eub338F	ACTCCTACGGGAGGCAG	17	56°C	Eco 338-354

**c) Oligonukleotide für die *in-situ*-Hybridisierung**

Eubak338 <sup>e</sup>	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	5'-Cy3	18	60	Eco 338-355
Eubak338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	5'-F	18	60	Eco 338-355
Arch915 <sup>e</sup>	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	5'-Cy3	20	66	Eco 915-934
Arch915	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	5'-F	20	66	Eco 915-934
FM1045S	AAAACCATCAACCTGGCTAT	5'-F	20	50	Eco 1045
FM1045B	AAGACCATCAACCTGGCCAT	5'-F	20	40	Eco 1045
FMBK <sub>2-5</sub> 840R	GAGCAACTCAAGGTCATC	5'-Cy3	18	54	Eco 840-858
1178TYIR <sup>f</sup>	TTCCTCACCTGCTGCCAT	5'-Cy3	18	56	Eco 1178-1196

a) Anzahl der Nukleotide in dem Bereich der Oligonucleotide, der komplementär zur SSU-rDNA-Sequenz ist. b) Schmelztemperatur der Oligonucleotide in °C. c) Die Positionsangaben beziehen sich auf die SSU-rRNA-Sequenz von *Escherichia coli* (Brosius et al., 1981; Abb.1). d) Die Oligonucleotide sind am 5'-Ende mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 (Cyanine3, MWG-Biotech., Ebersberg) bzw. Fluorescein markiert. e) Sequenz nach Amann *et al.* (1990). f) Sequenz nach Shinzato *et al.* (1999, modifiziert). g) spezifisch für Methanbakterien. h) Spezifisch für sulfatreduzierende Bakterien



**Abb. 1: Sekundärstruktur der SSU rRND von *Escherichia coli*** (aus Maidak et al. 2000). I, II und III kennzeichnen die 5′-, Zentral- und 3′-Domäne der 16S rRNA. Striche zwischen Basen deuten die Wechselwirkungen hinsichtlich Sekundär- und Tertiärstruktur an.

## 2.5 Medien

LB-Medium<sup>a</sup>

5 g Hefeextrakt  
 5 g Trypton  
 5 g NaCl  
 ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>  
 pH 7,2-7,5

LB-Agar<sup>a</sup> LB-Medium mit 1,5% Agar

LBA-Medium<sup>a</sup> LB-Medium mit Ampicillin (100µg/ml)

LBA-Agar<sup>a</sup> LBA-Medium mit 1,5% Agar

LBAIX-Agar<sup>a</sup>

1 l LBA-Agar  
 2 ml X-Gal-Lösung (24 mg X-Gal/ml Dimethylformamid)  
 2 ml IPTG-Lösung (20 mg IPTG/ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>)

<sup>a)</sup> Sambrook *et al.* (1989), modifiziert

TSB-Medium TSB-Fertigmedium (Difco) wurde nach Herstellerangaben angesetzt

Widdel Lactat-Medium (nach Widdel und Bak, 1992, modifiziert)

### **Basismedium**

Destilliertes Wasser	1000 ml
Natrium-Lactat (50%)	2,2 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 g
NH <sub>4</sub> Cl	0,1 g
NaCl	0,25 g
KCl	0,1 g
MgCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,2 g
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,1 g
Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	250 mg
Resazurin-Lösung (0,5 mg/ml)	0,5 ml

**Natriumbicarbonat-Lösung**

1 M NaHCO<sub>3</sub>-Lösung 30 ml

**Spurenelementlösung SL9 (nach Tschsch und Pfennig, 1984)**

Destilliertes Wasser 1000 ml  
Nitrilotriessigsäure 12,8 ml  
FeCl<sub>2</sub> · 4 H<sub>2</sub>O 1500 mg  
CoCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O 190 mg  
MnCl<sub>2</sub> 100 mg  
ZnCl<sub>2</sub> 70 mg  
Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O 36 mg  
NiCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O 24 mg  
H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 6 mg  
CuCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O 2 mg

Die Spurenelementlösung wurde mit 1 M NaOH auf pH 6,0 titriert und autoklaviert.

**Selenit-Wolframat-Lösung (nach Widdel, 1980)**

Destilliertes Wasser 1000 ml  
NaOH 0,4 g  
Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> · H<sub>2</sub>O 6 mg  
Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O 8 mg

**Multivitaminlösung (nach Pfennig, 1978)**

Destilliertes Wasser 180 ml  
Biotinlösung (100 mg/l) 20 ml  
Pyridoxamindihydrochlorid 50 mg  
Nikotinsäure 20 mg  
Cyanocobalamin 10 mg  
p-Amonobenzoessäure 10 mg  
Thiaminiumdichlorid 10 mg  
Calziumpantothenat 5 mg

Die Multivitaminlösung wurde sterilfiltriert und lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

Das Medium für Sulfatreduzierer wurde anaerob unter 80% Stickstoff und 20% Wasserstoff entgast und autoklaviert. Die 1 M Natriumhydrogencarbonatlösung wurde in den jeweils benötigten Mengen angesetzt, in das Wasser gegeben, bis zur Sättigung mit CO<sub>2</sub> durchströmt und unter Kohlenstoffdioxidgasatmosphäre autoklaviert. Die Multivitaminlösung mußte auch anaerob steril filtriert werden. Nach dem Autoklavieren wurden NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (30 ml), Spurenelementlösung (1,0 ml), Multivitaminlösung (1,0 ml) und Selenit-Wolframat-Lösung (0,2 ml) zum Basismedium pipettiert. Schließlich wurde das Medium mit einigen Kristallen Natriumdithionit versetzt, bis sich der Redoxindikator Resazurin entfärbte und reduzierende Bedingungen anzeigte.

Postgate Medium B (Postgate's Medium B, 1984)

**Basismedium**

Destilliertes Wasser	1000 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	2,0 g
CaSO <sub>4</sub>	1,0 g
Hefeextrakt	1,0 g
Natrium-Lactat-Lösung (50%)	7,0 g

Das Basismedium wurde, ähnlich dem Widdelmedium (s.o.), anaerob unter 80% Stickstoff und 20% Wasserstoff durchströmt und in geschlossenen Gefäßen autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurden zum Basismedium 10 ml Reduktionslösung und 10 ml Eisensulfatlösung (nach Postgate 1984) gegeben.

**MacConkey-Agar**

MacConkey-Agar ist ein Selektivagar für viele gramnegative Bakterien. Er wurde von der Firma (Difco Laboratories GmbH, Augsburg) bezogen und nach Herstellerangabe eingesetzt.

**Cellulose-Ager**

Zum Nachweis von konstitutionelle Cellulasen

NaNO <sub>3</sub>	1,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g
KCl	0,5 g
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g

Hefeextrakt	0,5 g
CMC	0,5 %
Glucose	1,0 g
Agar	12 g
Ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	
PH 7,0	

## MRS-Medium

Zur Kultur von Milchsäurebakterien

Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
Nat-Acetat	5,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0 g
Tween 80	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	200 mg
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	34,0 mg
FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	10,0 mg
Glucose (2%)	20,0 g
ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	
pH 6,5	

## SA2-Agar

Nachweis von Dextran-Bildung

Saccharose	50,0 g
Pepton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	5,0 g
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0,5 g
MnSO <sub>4</sub> ·4 H <sub>2</sub> O	0,5 g
Tween 80	1,0 g
Bromkresolgrün	20,0 mg
CaCO <sub>3</sub>	3,0 g
Agar	13,0 g
ad 1000ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	
pH 6,5	

Alle Medien wurden 20 min bei 121 °C autoklaviert. Hitzelabile Substanzen wie Ampicillin, X-Gal oder IPTG wurden sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren steril zugegeben.

## 2.6 Puffer und Lösungen

TE-Puffer <sup>a</sup>	10 mM Tris 1 mM EDTA pH 8,0
TBE-Puffer (10x) <sup>a</sup>	108 g Tris 55 g Borsäure 8,3 g EDTA ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> pH 8,3
TAE-Puffer (50x) <sup>a</sup>	242 g Tris 57.1 ml Eisessig 18.61 g EDTA ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> pH 8,0
Probenpuffer <sup>a</sup>	3,2 ml Tris/HCl 3,5 ml Glycerin 1 Spatelspitze Bromphenolblau 2,5 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> pH 8,0
PBS-Puffer <sup>a</sup>	26 ml 1M NaCl 20 ml 100mM Phosphatpuffer ad 200 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> pH 7,2
Phosphat-Puffer (100 mM)	13,8 g Natrium-Phosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) ad 1000 H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> pH 7,2 (mit NaOH eingestellt)

Acrylamid-Lösung<sup>a</sup>0 % Denaturierungs-Lösung

20 ml 40 % Acrylamid/bisacrylamid. 37,5:1

2 ml 50 x TAE Puffer

ad 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>bide</sub>st100 % Denaturierungs-Lösung

20 ml 40 % Acrylamid/bisacrylamid 37,5:1

50 x TAE-Puffer

40 ml Formamid

42 g Harnstoff

ad 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>bide</sub>st*In-situ*-Hybridisierungspuffer<sup>b</sup>

20 mM Tris pH 7,2

900 mM NaCl

0,01 % SDS

2,5 ng Oligonukleotidsonde/μl

*In-situ*-Waschpuffer<sup>b</sup>

20 mM Tris pH 7,2

180 mM NaCl

5 mM EDTA

*In-situ*-Fixierungspuffer<sup>b</sup>4 % Paraformaldehyd in H<sub>2</sub>O<sub>bide</sub>stAntibleichlösung<sup>c</sup>

233 mg DABCO

1 ml PBS

9 ml Glycerin

Lagerung bei -20 °C

<sup>a</sup> Sambrook *et al.* (1989) <sup>b</sup> Manz *et al.* (1992) <sup>c</sup> Bächner (Abteilung Klinische Genetik, Universität Ulm)

## 2.7 Geräte

Agarose-Minigelektrophorese-Einheit	Biorad, Hercules,CA
Computer	PC Pentium II
Computersoftware	PHYLIP (Phylogeny inference package) Felsenstein (1993) ClustalW- Sequenzalignmentprogramm Thompson (1994)
Diafilm PROVIA Fujichrome 1600	
Fluoreszenz-Photomikroskop Axiophot 2 (mit Fluoreszenzfiltersätzen 01, 05, 10, 15 und Cy3-Filtersatz)	Zeiss, Oberkochen
Digitalkamera SPOT DIAGNOSTIC	VISITRON SYSTEM, Puchheim
Denaturant Gel Electrophoresis D GENE™ SYSTEM	Biorad, Hercules -CA
Hybridisierungsöfen	HYBAID, Heidelberg
Labormikroskop LABORLUX 11	Leitz, Wetzlar
Gaschromatograph C-R1B	Shimadzu (CHROMATOPAC)
Nukleotidsequenz-Datenbanken	
RDP-rRNA-Datenbank	RDP (Maidak <i>et al.</i> 2000)
EMBL-Nukleotidsequenz-Datenbank	EBI (Stoesser <i>et al.</i> 1999)
Objekträger (Epoxid-beschichtet)	Marienfeld, Bad Mergentheim
PCR-Reaktionsgefäße (0.5ml)	Roth, Kalsruhe
Stereomikroskop Stemi 2000-C	Zeiss, Oberkochen
PCR-Gerät PROGENE	Techne, Cambridge
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
UV-Transilluminator (312 nm)	Biometra, Göttingen
Ultraturax T8	IKA Labortechnik, Staufen
Zentrifuge 5403	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Biofuge A	Heraeus Sepatech, Osterode

## 2.8 Präparation des Darmes aus Termiten

Die dekapitierten Tiere wurden für ca. 30 s in 70%ige Ethanol getaucht und in sterilem Wasser gewaschen, um Keime auf der Körperoberfläche ab zu töten. Alle weiteren Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Das Abdomen der Tiere wurde mit einem Skalpell

aufgeschnitten und der Darmtrakt mit einer Pinzette in 100 µl PBS übertragen. Der Darminhalt wurde 2-3 mal mit PBS und wiederum 2-3 mal mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gewaschen. Das Gewebe wurde wiederum in ein neues Eppendorf-Gefäß mit ca. 500 µl PBS bzw. H<sub>2</sub>O überführt und für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Aus dem Gewebe wurde dann DNA isoliert. Um Methanbakterien zu identifizieren, die an der Darmwand lokalisiert sind, wurden die Arbeiter von *M. darwiniensis* 1-2 Tage mit Lysozym (um Eubakterienzellwand zu lysen) gefüttert. Nach der Darmpräparation (wie oben beschrieben) wurde der Darm mit einem Skalpell zerkleinert, in 50 µl H<sub>2</sub>O suspendiert und 3-4 mal bei -70 °C für 10 min eingefroren und bei 80 °C aufgetaut. Durch die Eiskristallbildung wurde Methanbakterien zerstört, sodass die DNA frei gesetzt wurde und isoliert werden konnte.

## 2.9 Präparation des Darminhaltes aus verschiedenen Insekten

Die Tiere wurden entweder mit Chloroform oder in einer Mischung von 70 %igen Isopropanol und 1 %igen Perchloressigsäure abgetötet. Tiere, die mit Chloroform abgetötet wurden, wurden danach in der Isopropanol-Perchloressigsäure-Mischung keimfrei gemacht. Die Tiere wurden in eine Präparierschale überführt. Mit sterilen Pinzetten und Skalpellen wurden die Därme herauspräpariert. Je ein Darm wurde in eine 1 ml-Spritze überführt und 0,9 % sterile NaCl-Lösung mit in die Spritze aufgezogen. Darm und NaCl-Lösung wurden durch die Spritzenöffnung herausgedrückt, wobei der Darm zerkleinert und der Darminhalt freigesetzt wurde. Die Darminhalte von je 8 Tieren wurden vereinigt und zwischen den einzelnen Präparationen auf Eis gelegt. Nach einer 1-minütigen Zentrifugation der Darmsuspensionen wurde 0,1 ml Überstand in ein Hungate-Röhrchen mit 9,9 ml Postgate B Medium überimpft. Ausgehend von diesem Röhrchen wurde in zwei parallelen Ansätzen eine 1:10 Verdünnungsreihen bis 10<sup>-6</sup> angelegt. Die Verdünnungsreihe wurden jeweils bei 15 °C oder 28 °C bebrütet bis eine Schwarzfärbung des Mediums eintrat.

Danach wurden die Kulturen in verschiedenen Medium kultiviert :

Postgate Medium B

Widdel-Lactat Medium

Widdel-Medien war doch Zugabe von Fe(II)SO<sub>4</sub> ( 500 mg/L) modifiziert.

Beim Animpfen wurde Peptonwasser (15 g/L) zu dem Widdel-Medium gegeben

## 2.10 Molekularbiologische Identifizierung der Darmbakterien

### 2.10.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Das Darmgewebe wurde in 200 µl InstaGene-DNA-Purification-Matrix suspendiert, 20-30 min bei 56 °C unter Schütteln inkubiert und schließlich bei 95 °C für 15 min gekocht. Dabei brechen die Zellen auf und freigesetzte Kationen (z.B.  $\text{Ca}_2^+$ ,  $\text{Mg}_2^+$  und positiv geladene DNA-bindende Proteine) werden an die Ionenaustauscher-Kügelchen gebunden, die in der Purification-Matrix enthalten sind. Nach kräftigem Schütteln der Ansätze wurden die Zelltrümmer, Gewebereste und die Ionenaustauscher-Kügelchen 2 min bei 15,000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20 °C gelagert und konnte direkt für die PCR-Reaktion verwendet werden.

### 2.10.2 Durchführung der Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation der 16S rRNA-Gene (16S rDNA) erfolgte mittels Polymerase Chain Reaktion (PCR, Saiki *et al.*, 1988; Medlin *et al.*, 1988). Dabei wurde je nach intressierender Organismengruppe verschiedene Oligodeoxynukleotide als Primer verwendet. Hierzu wurde 10 µl bzw. 20 µl DNA-Matrize und 90 µl bzw. 80 µl Mastermix (eine Mischung von PCR-Puffer, dNTPs, Primer und Taq-Polymerase) vorgelegt und auf 100 µl aufgefüllt.

Die Herstellung des PCR-Ansatzes erfolgte auf Eis (0 °C).

*Standard Bedingungen:*

pH-Wert: 8,3

dNTPs-Konz.: 0,2 mM

Primer : 0,4 µM

Taq-Polymerase : 2,5 Units

$\text{MgCl}_2$  : 1,5 mM

*PCR-Programm*

Zyklusschritt	Temperatur	Zeit
1) Vordenaturierung	94 °C	5 min
2) 30-35 Zyklen: Denaturierung	94 °C	1 min
Hybridisierung	50-55 °C	1min
Polymerisierung	72 °C	2,5 min
3) Endpolymerisierung:	72 °C	10 min
4) Abkühlen auf 8 °C		

### 2.10.3 Horizontale Agarosegelelektrophorese

Lineare doppelsträngige DNA wandert in einem elektrischen Feld durch eine Agarosegelmatrix. Agarose ist ein komplex vernetztes, gelierfähiges Polysaccharid, das aus Meeresalgen gewonnen wird. DNA ist aufgrund ihres Phosphodiester-Aufbau negativ geladen, bewegt sich also im elektrischen Feld zum positiven Pol. Die DNA-Fragmente werden je nach Länge in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit durch die Gelmatrix verzögert. So wandern kleinere DNA-Fragmente schneller als größere.

Es handelt sich hierbei im Prinzip um eine Kombination von Elektrophorese und Molekularsiebchromatographie. Die Migrationgeschwindigkeit ist vorwiegend abhängig von:

- der Konzentration der Agarose
- der angelegte Spannung
- der Zusammensetzung des Puffers
- der Fragmentlänge der DNA

In der vorliegenden Arbeit wurde 1%ige Agarosegele eingesetzt. Als Lauf- und Gelpuffer wurde 1 x TBE verwendet. Dann wurden die im Probenpuffer gemischten DNA-Proben in die Geltaschen einpipettiert. Die Saccharose im Probenpuffer ließ die DNA in die Tachen sinken. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 100 Volt. Über die Farbstoffe im Probenpuffer konnte die erforderliche Trennstrecke optisch kontrolliert werden. Anschließend wurde die elektrophoretisch separierte DNA im Gel durch Ethidiumbromid angefärbt und mit Hilfe eines UV-Transilluminators detektiert und photographisch dokumentiert. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit Polaroid-Filmen. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich selektiv an DNA bindet und bei Anregung mit UV-Licht (260-360 nm) orange-rot fluoresziert.

### 2.10.4 Reinigung der PCR-Produkten

Für die Reinigung der PCR Ansätze von Primer, Nukleotiden, Salzen, Enzymen und anderen Verunreinigungen wird der „QIAquick PCR Purification Kit“ eingesetzt, der alle benötigten Puffer beinhaltet. Das PCR Produkt wurde mit der fünffachen Menge an Puffer PB (im Kit enthalten) versetzt und auf eine Säule pipettiert. Durch PB-Puffer wurde der pH-Wert unter 7,5 gebracht und die Konzentration an Salzen erhöht. Aufgrund der hohen Konzentration des Salzes können die DNA-Fragmente an die Säule binden. Im Anschluß an eine Zentrifugation von einer Minute bei 13000 rpm wurden die Säule mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Nach Entfernung des gesamten PE konnte die DNA durch Zugabe von 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> vom Säulenmaterial durch einminütiges Zentrifugieren eluiert werden.

### **2.10.5 Reinigung der Nukleinsäuren durch Phenol/Chloroform-Extraktion**

Um störende Proteine in der DNA-Präparation zu entfernen, wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Die Nukleinsäure-Lösung wurde dafür mit dem identischen Volumen einer Mischung von Phenol und Chloroform versetzt. Hierbei denaturiert und löst Phenol die Proteine, und Chloroform dient als Stabilisator zwischen wässriger und phenolischer Phase und entfernt dabei die restlichen Phenolspuren (Newton und Graham 1994). Nachdem der Ansatz für 10 min gut geschüttelt worden war, wurde er zur Phasentrennung 10 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Im Anschluß daran wurde die obere, wässrige DNA enthaltende Phase mit einer Pipette vorsichtig, ohne etwas von der organischen, proteinreichen Interphase mitzuführen, abgenommen. Dieser Reinigungsschritt der wässrigen Lösung wurde nochmal wiederholt, um die restliche Phenol-Chloroform-Mischung nach Zentrifugation ( 10 min, 14000 rpm, 4°C) zu entfernen.

### **2.10.6 Klonierung der PCR Produkte**

Die Amplifikationsprodukte der PCR-Ansätze, bei denen Darmwandbakterien der Termiten *M. darwiniensis* als Ausgangsmaterial verwendet wurde, bestanden aus einer Mischung verschiedener 16S rRNA-Sequenzen. Um diese Sequenzen analysieren zu können, mußten sie durch Klonieren aus dem Gemisch vereinzelt werden.

### **2.10.7 Schneiden der DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Restriktionsendonukleasen erkennen kurze DNA-Sequenzen und spalten doppelsträngige DNA innerhalb bzw. in der Nähe der für jedes Restriktionsenzym spezifischen Erkennungssequenzen. Durch den Verdau von Nukleinsäuren werden diese in Stücke definierter Länge zerkleinert, wodurch man z.B. Klone charakterisieren kann. Bei der Arbeit wurden die DNA-Sequenzen nach Herstellerprotokoll 4 bis 16 h bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym *NotI* inkubiert. Für einen 25 µl-Restriktionsansatz wurden 21,5 µl DNA mit 2,5 µl 10 x Restriktionspuffer und 1 µl Restriktionsenzym *NotI* eingesetzt. Das Restriktionsenzym wurde anschließend durch 20 minütige Inkubation bei 70 °C inaktiviert.

### **2.10.8 Reinigung der DNA nach Restriktionsverdau**

Die Isolation der restringierten und gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA wurde mit dem QIAquick-Gel-Extraction-Kit durchgeführt. Die eingesetzten Puffer waren Bestandteile des Kits. Nachdem der gesamte Restriktionsansatz auf einem Low-melting-Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt wurde, wurde die DNA-Bande unter UV

detektiert und mittels eines Skalpells ausgeschnitten. Da UV-Strahlung zu DNA-Mutationen führen kann, wurde auf eine möglichst kurze Expositionszeit geachtet. Nachdem das Gelstück gewogen wurde, wurde es in der erforderlichen Menge QXI-Puffer (300 µl/100 mg Gel) bei 50 °C für 10 min unter regelmäßiger Bewegung aufgelöst. Nach Zugabe von 1 Gelvolumen Isopropanol und mehrmaligem schütteln des Reaktionsgefäßes, wurde die Mischung auf die Säule gegeben. Ausschließend wurde die Säule mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Danach konnte die DNA durch Zugabe von 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> vom Säulenmaterial durch einminütiges Zentrifugieren eluiert werden.

### 2.10.9 Vorbehandlung des Plasmidvektors

Der zirkuläre Plasmidvektor pBluescript SK(+), der eine *NotI* Schnittstelle besitzt, wurde durch einen Restriktionsverdau mit *NotI* linealisiert (2 µg Plasmid, 20 U *NotI*, 2 h 37 °C). Nach Inaktivieren von *NotI* (20 min, 70 °C) wurden die 5'-Enden des linearen Plasmids durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert (5 U Phosphatase, 1 h, 37 °C), um im folgenden Ligationsschritt eine Religation des Vektors zu verhindern. Die Phosphatase wurde durch Inkubation bei 70 °C für 20 min inaktiviert.

### 2.10.10 Ligation von linearer DNA

Die Ligation eines linearen DNA-Fragmentes beruht auf der Bildung neuer Phosphodiesterbindungen. Hierfür wird die T4-DNA-Ligase und dazugehörige Puffer verwendet. Zu den 15 µl *NotI*-verdauten Amplifikationsprodukten wurden 2 µl dephosphorylierter Plasmidvektor pBluescript SK(+), 2 µl 10 x Ligase-Puffer und 1 µl Ligase pipettiert und das Volumen mit Aq. bidest. auf 20 µl ergänzt. Die Ligrationsreaktion fand bei 16 °C Ü.N. statt. Danach wurde das Enzym Ligase durch eine Inkubation bei 70 °C für 20 min inaktiviert.

### 2.10.11 Herstellung kompetenter Bakterien

Um Fremd-DNA effizient in ein Bakterium einschleußen zu können, muß dieses Bakterium vorher kompetent gemacht werden, d.h. die Permeabilität der bakteriellen Zellwand für DNA wird erhöht. Dabei werden *Escherichia coli* DH5α-Zellen in LB-Medium kultiviert (bei 37 °C, Ü.N. unter Schütteln). 400 µl einer Übernackkultur von *E. coli* DH5α wurde in 40 ml LB-Medium inkubiert und so lange (ca. 2-3 h) bei 37 °C geschüttelt, bis eine OD von ca. 0,4 erreicht war. Nach 5 minütiger Kühlung der Suspensionskultur auf Eis folgte ein Zentrifugationsschritt (4 °C, 3000 rpm, 5 min), um die Bakterien zu pelletieren. Nachdem das

Bakterien-Pellet in 4 ml kaltem 100 mM  $\text{CaCl}_2$  suspendiert wurde, wurde für 30 min wiederum auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach einem Zentrifugationsschritt (4 °C, 2000 rpm, 3 min) in 1 ml kaltem 100 mM  $\text{CaCl}_2$ , 15% Glycerin suspendiert. Die Suspension wurde aliquotiert (200  $\mu\text{l}$ ) und sofort benutzt oder zum weiteren Gebrauch bei -70 °C gelagert.

#### **2.10.12 Transformation kompetenter Bakterien**

Transformation bezeichnet das Einschleußen von DNA in kompetente Bakterienzellen. Nach der Anheftung der DNA-Moleküle an die Zellen wird die eigentliche Aufnahme in die Bakterien durch einen Hitzeschok bei 42 °C ermöglicht. Nach vorsichtigem Mischen von 200  $\mu\text{l}$  kompetenten Bakterien mit einem Ligationsansatz (ca. 20  $\mu\text{l}$ ) wurde der Ansatz für 30 min auf Eis gehalten. Im Anschluß an einen Hitzeschock bei 42 °C für 2 min wurde der Ansatz nochmal 2 min auf Eis gehalten. Die Bakterien wurden mit 800  $\mu\text{l}$  LB-Medium versetzt vorsichtig gemischt und für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Suspension wurde mittels eines Glas-Spatels auf LBAIX-Agar-Platten ausplattiert (20-200  $\mu\text{l}$ ) und Ü.N bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag konnten die transformierten Kolonien mit korrekt ligierten Plasmiden aufgrund von blau/weiß-Selektion detektiert werden.

Alternativ wurden gereinigte PCR-Produkte mit dem TA-Cloning Kit nach Herstellerangaben kloniert.

#### **2.10.13 Reinigung der rekombinanten Plasmide**

Ausgehend von positiven Klonen wurden Übernachtskulturen in LBA-Medium (5 ml) angesetzt (37 °C, unter Schütteln). Plasmid-DNA wurde dann mit dem QIAprep Spin Plasmid Kit, der die Puffer P1, P2, N3 und PE enthielt, entsprechend den Herstellerangaben gereinigt. Im ersten Schritt wurden ca. 1 bis 1,5 ml Bakterienkultur bei 10.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 250  $\mu\text{l}$  Puffer P1, der RNase A enthielt, resuspendiert. Nach Zugabe von 250  $\mu\text{l}$  alkalischem P2, bestehend aus NaOH/SDS, wurden die Bakterienzellen 5 min bei RT lysiert. Durch 5-minütige Inkubation mit 350  $\mu\text{l}$  eisgekühltem Puffer N3 auf Eis, neutralisierte man das Lysat, stellte eine hohe Salzkonzentration ein, die Voraussetzung für das Binden der DNA an die Membran der Säule war. Im Anschluß an eine 10minütige Zentrifugation bei 13000 rpm wurde der klare Überstand auf eine membranenthaltende Säule pipettiert. Nach zweimaligem Waschen mit 750  $\mu\text{l}$  Waschpuffer PE, der dem Entfernen störender Salze diente, und anschließender Zentrifugation wurde die DNA mit 30-50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  oder Tris-Puffer eluiert.

Menge, Größe und Qualität des gereinigten Plasmids wurden unter Verwendung eines DNA-Längenstandards ( $\lambda$ HindIII/EcoRI, 100 ng/ $\mu$ l) mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Die Insertgröße wurde nach einem Restriktionsverdau mit *NotI* ebenfalls über Agarose-Gelelektrophorese bestimmt. Für einen Restriktionsansatz wurden 4  $\mu$ l Plasmid-DNA mit 1  $\mu$ l Enzym *NotI* und 1  $\mu$ l Restriktionspuffer versetzt und das Reaktionsvolumen mit Aqua bidest. auf 10  $\mu$ l ergänzt. Inserts verschiedener Plasmide konnten nach einem Restriktionsverdau mit *AluI* anhand des resultierenden DNA-Bandenmusters verglichen bzw. unterschieden werden. Zu 4  $\mu$ l Plasmid-DNA wurden 1  $\mu$ l 10 x Restriktionspuffer, 1  $\mu$ l Restriktionsenzym *AluI* und 1  $\mu$ l BSA pipettiert und mit Aqua bidest. auf 10  $\mu$ l aufgefüllt. Schließlich wurden die unterschiedlichen Sequenzen sequenziert.

#### **2.10.14 DNA-Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung wurden von der Firma Genterprise (Mainz) durchgeführt. Als Sequenzier-Primer wurden Eub1070F, Eub781F, Eubak5F und Eub338F (Tab. 1) verwendet.

### **2.11 Identifizierung der kultivierbaren Darmwandbakterien**

Nach der Darmpräparation wurde der Gesamtdarm in 500  $\mu$ l H<sub>2</sub>O mit einem Ultra Turrax zerkleinert, auf TSB-Platten (50  $\mu$ l und 100 ml) ausplattiert und bei 28°C inkubiert. Um aus den mehreren Tagen gewachsenen Kolonien Reinkulturen zu bekommen, wurden verschiedene Kolonien in TSB-Medium angeimpft und bei 28°C Ü.N. inkubiert. Nachdem die Bakterien gewachsen waren, wurde DNA aus den Bakterien isoliert und in die PCR eingesetzt. PCR-Produkte verschiedener Arten wurden nach einem Restriktionsverdau mit *AluI* unterschieden. Schließlich wurden die PCR-Produkte sequenziert.

#### **Cellulase-Nachweis**

Die Bakterienkulturen wurden auf CMC-Platten ausplattiert und Ü.N. bei 28°C inkubiert. Nach Inkubation der Platten wurden sie mit 0,1%igen Kongorot für 20 min bei RT überschichtet. Schließlich wurde 2,7%ige NaCl auf die Platten gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Entstehung von weißen Höfen auf den Platten zeigten, dass Cellulase vorhanden war.

### Katalase-Nachweis

Die Bakterienkulturen wurden mit 1 ml Wasserstoffperoxid (3%) übergossen. Katalase-positive Bakterien zeigen sofort oder spätestens nach 5 min Gasproduktion.

### Amylase-Nachweis

Die Organismen wurden auf stärkehaltige Platten ausplattiert. Nach einer Inkubation für mehrere Tagen bei 28 °C wurde Lugolsche'-Lösung zugegeben. Wenn Amylase vorhanden war, entfärbte sich der Nährboden und weißen Höfen entstanden.

### Glucose-Bestimmung (Bergmeyer 1974)

- 1 ml Puffer pH 7,6  
(0,05 M Triäthanolamin-Hydrochlorid, 0,007 M  $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ , 0,0014 M Mercaptoäthanol)
- 0,05 ml ATP (10 mg/ml),
- 0,05 ml NADP (10 mg/ml),
- 0,2 ml Probe.

$E_1$  wurde bei 366 nm bestimmt.

- 0,01 ml HK (1 mg/ml)
- 0,01 ml G-6-P-DH (1 mg/ml)

$E_2$  wurde nach 10 min. abgelesen.

Die Glucosekonzentration wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$c = \frac{\Delta E * V_1}{\epsilon * d * V_2}$$

$c$  = Glucosekonzentration,  $\Delta E = E_2 - E_1$  = Extinktionsänderung,  $V_1$  = Testvolumen ml,  $V_2$  = Probevolumen ml,

$d$  = Schichtdicke cm,  $\epsilon_{365}$  = Extinktionskoeffizient bei 365 nm ( $3,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

### Lactat-Bestimmung:

Durch den folgenden enzymatischen Test wurde die Menge des gebildeten Lactat bestimmt (LDH = Lactat-Dehydrogenase):



Gemessen wird die NADH-Zunahme bei 365 nm. Lactat wird quantitativ umgesetzt, da das entstehende Pyruvat durch die Reaktion mit Hydrazin aus dem Gleichgewicht entfernt wird.

Die Lactatkonzentration wurde nach folgender Formel berechnet (Extinktionkoeffizient von NADH bei 365 nm:  $3,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

$$c = \frac{E}{e * d}$$

$c$  = Lactatkonzentration,  $E$  = Extinktion,  $\epsilon_{365}$  = Extinktionskoeffizient bei 365 nm ( $3,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),  $d$  = Schichtdicke  $\text{cm}^{-1}$

#### *Reagenzien:*

- 100 ml Glycin-Hydrazin-Puffer  
(0,2 g EDTA in 51 ml 2N NaOH lösen, ad 100 ml dest. Wasser, 7,5 g Glycin, 0,2 g Hydraziniumsulfat, pH 9,5)
- 25 mM  $\text{NAD}^+$  in Aqua dest. (1 ml)
- L-LDH bzw. D-LDH

#### *Durchführung:*

- In Eppendorfcaps pipettieren:
  - 845  $\mu\text{l}$  Glycin-Hydrazin-Puffer
  - 50  $\mu\text{l}$   $\text{NAD}^+$ -Lösung
  - 0-100  $\mu\text{l}$  Standard bzw. Probe
  - ad 995  $\mu\text{l}$  Wassermit 5  $\mu\text{l}$  D- bzw. L-LDH die Reaktion starten
- 30 min bei 37 °C inkubieren
- Extinktion bei 365 nm gegen Luft messen, Blindwert abziehen.
- Konzentration von Lactat in den Proben ausrechnen.

## **2.12 Denaturierende-Gradienten-Gel-Elektrophorese**

Die DGGE mit anschließender Ethidiumbromidfärbung ist ein Verfahren, um im Anschluß an eine PCR DNA-Polymorphismen nachzuweisen, die innerhalb genomischer DNA auftreten. Das Prinzip der Technik beruht auf der unterschiedlichen Schmelzeigenschaft von doppelsträngiger DNA, deren Sequenzen leicht voneinander abweichen (Muyzer et al. 1993). Der Übergang von der doppel- zur einzelsträngigen DNA ist mit einer Polyacrylamidgelelektrophorese aufgrund der schlechten elektrophoretischen Laufeigenschaften der einzelsträngigen DNA gut zu verfolgen. Dazu verwendet man ein Gel

mit einem denaturierenden Gradienten, in dem die DNA-Stränge chemisch (Formamid und Harnstoff) oder durch Hitze getrennt werden. Bei der DGGE werden zwei ähnliche Doppelstränge an verschiedenen Stellen denaturiert und verlangsamen ihre Wanderung durch das Polyacrylamidgel. In dieser Arbeit wurde für die DGGE ein Polyacrylamidgel mit einem Denaturierungsgradienten von 0% bis 100% hergestellt. Die Zusammensetzung des Gels wurde in Kapitel Material und Methoden angegeben. Nach 5-7 h Elektrophorese bei 160 V und 60 °C Puffertemperatur wurde der Lauf abgebrochen und das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt. Für die Identifizierung der Methanbakterien an der Darmwand wurden die zwei Primer GC-Arch781F und Narch1100R verwendet. Die beiden Primer schließen eine ca. 320 bp lange Sequenz, der 16S rDNA, zwischen den Nukleotiden 781 und 1100 ein.

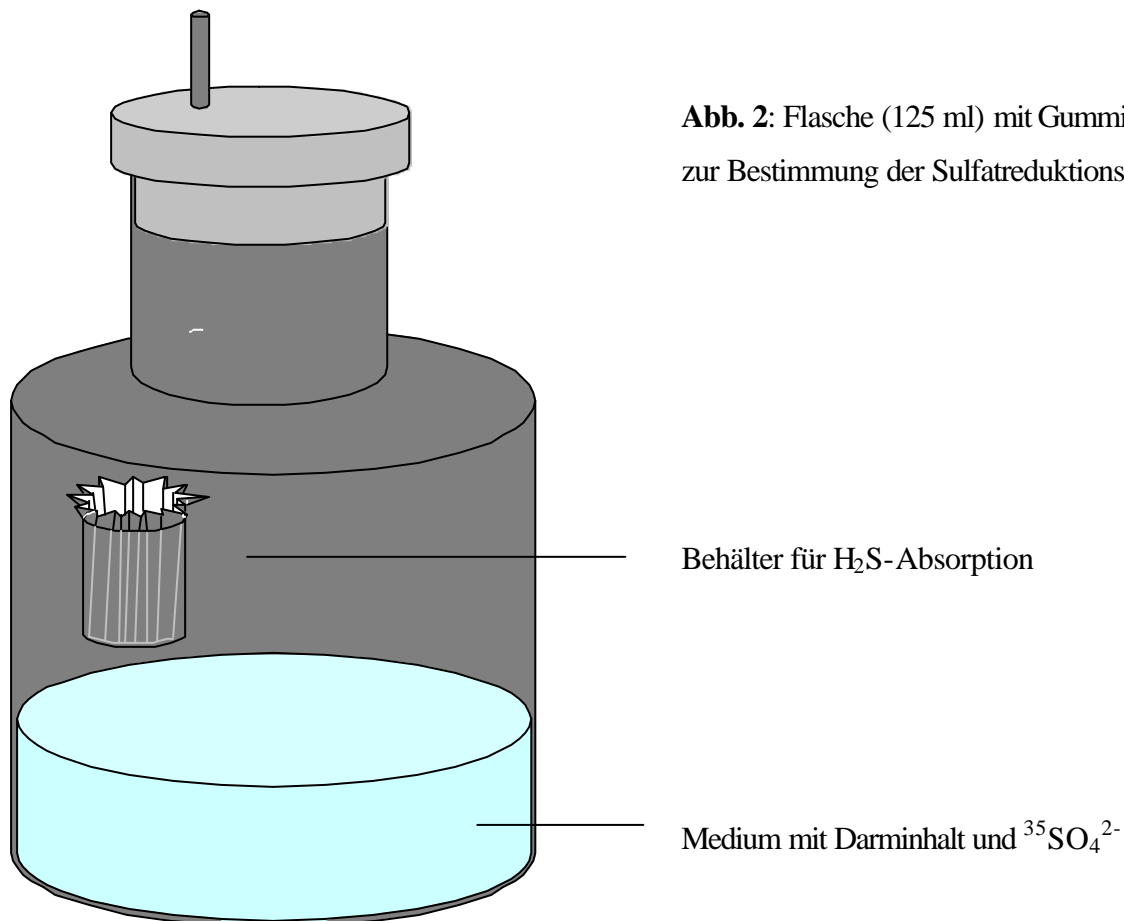
### 2.13 Bestimmung der Methanbildungsrate

Für die Bestimmung der Methanbildungsrate von *Mastotermes darwiniensis*-Darmflora wurden insgesamt 180 Tiere getestet. Die Methanbildungsrate wurde für jede Probe in Hungate-Röhrchen durchgeführt, wobei bei jedem Versuch die Methanbildung von 20 Tieren nach 3 bzw. 4 und 8 Stunden durch Gaschromatographie (Gaschromatograph Model 3700 mit FID, Varian, Integrator CR-1B, Shimadzu, Carbon layer Open Tubulator-Kapillare 30m, 0,32 mm iD., Suppelco. Testbedingungen: Säulenvordruck 0,4 bar He, Split 1:10, Einspritzvolumen 1 ml, Injektor 100 °C, Säulenofen 40 °C, Detektor 100 °C.) gemessen wurde. Die Termiten wurden mit Holzpulver gefüttert und bei 28 °C inkubiert.

### 2.14 Bestimmung der Sulfatreduktionsrate

In der vorliegenden Arbeit wurde die Sulfatreduktionsrate der Darmflora der Termiten *Mastotermes darwiniensis*, des Rosenkäfers *Pachnoda marginata* und einer *Desulfovibrio intestinalis*-Reinkultur (Stamm KMS2) nach Rosser und Hamilton 1983 gemessen. Die Bestimmung der Sulfatreduktionsrate bei *M. darwiniensis* wurde nicht nur mit Holzgefütterten Termiten durchgeführt, sondern auch mit Termiten, die 22 Tage lang mit Sulfatreicher Nahrung gefüttert wurden (2,5 g CaSO<sub>4</sub> pro 5 g Sägemehl). Für jede Versuch wurde 94 Termiten bzw. 4 Rosenkäfer verwendet. Die Bestimmung der Sulfatreduktionsrate wurde für jede Probe in fünf Parallelansätzen durchgeführt. Dabei wurden jeweils 94 Termiten-Därme bzw. 4 Rosenkäfer-Därme in 2 bzw. in 3 ml sulfatarms (0,3 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) Mineralmedium (Widdel und Bak, 1992) suspendiert. Zu jeder luftdicht verschlossenen Versuchsflasche, die jeweils einen Behälter mit Filterpapier (aschenfreie Rundfilter, 15 cm Ø, Macheray-Nagel, Düren) für H<sub>2</sub>S-Absorption und 10 ml sulfatarms Mineralmedium enthält,

wurden 500  $\mu\text{l}$  Darmsuspension injiziert (Abb. 2). Bei der Bestimmung der Sulfatreduktionsrate der *Desulfovibrio intestinalis*-Reinkultur wurden zu Beginn der Messung  $10^7$  Bakterien-Zellen in jedes Testgefäß gegeben. Die Versuchsflaschen mußten vorher anaerob, autoklaviert und mit Gummisepten verschlossen sein. Nach schneller Zugabe von 100  $\mu\text{l}$   $^{35}\text{S}$ -Sulfat-Stammlösung (0,07 MBq) in das Medium wurden die Ansätze für 5,5 Stunden bei 28 °C inkubiert. Danach wurden durch das Septum 500  $\mu\text{l}$  1 M Zinkacetat-Lösung in den Behälter mit dem Filterpapier für die  $\text{H}_2\text{S}$ -Absorption injiziert und anschließend 1 ml einer 6 M HCl durch das Septum vorsichtig in das Medium gespritzt (bei dem Versuch mit *Dsv. Intestinalis* wurden erst die Zellen nach 5,5 Stunden gezählt). Hierbei wurde der Versuch gestoppt und das entstandene Sulfid aus dem Darmsuspension-Medium ausgetrieben. Schließlich wurden die Flaschen ÜN. (ca. 20 h) unter Schütteln bei 28 °C zur vollständigen Absorption des Sulfids inkubiert. Danach wurden die Versuchsflaschen geöffnet und das Filterpapier mit absorbiertem Sulfid bzw. 200  $\mu\text{l}$  von Darmsuspensions-Medium separat in vorbereitete Szintillations-Flaschen (gefüllt mit 15 ml Szintillationscocktail, Rotizink eco plus, Roth) gegeben. Die Messung der Radioaktivität erfolgte im Szintillationsspektrometer (Beckmann LS 6000). Zur Bestimmung der Aktivität des zugegebenen Sulfats (cpm  $\text{SO}_4^{2-}$ ) wurden außerdem 10  $\mu\text{l}$  der eingesetzten  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ -Stammlösung gemessen.



**Abb. 2:** Flasche (125 ml) mit Gummiseptum zur Bestimmung der Sulfatreduktionsrate.

## 2.15 Sequenzierung und Konstruktion phylogenetischer Stammbäume

Die 16S rRNA-Sequenzen wurden für die Konstruktion phylogenetischer Bäume verwendet.

Die erhaltenen Daten wurden mit 16S rDNA-Sequenzen aus den zwei Datenbanken EMBL und RDP verglichen. Die beiden Datenbanken sind über folgende Internet-Adressen zu erreichen.

EMBL <http://www.ebi.ac.uk/ebi-home.html>, (Stoesser et al., 1999)

RDP <http://WWW.cme.msu.edu/RDP>, (Maidak et al., 2000)

### 2.15.1 Sequenzalignment

Die Sequenzen wurden mit Hilfe von ClustalW unter Berücksichtigung von Primär- und Sekundärstruktur in ein Sequenzalignment eingefügt, das von RDP bezogen wurde. Dieses Alignment enthielt ca. 6200 prokaryontische SSU-rRNA-Sequenzen. Die Positionen der Sequenzen, die zu hochvariablen Bereichen (größer 50% Variabilität) gehören und damit nicht eindeutig einander zuzuordnen waren, wurden weggelassen. Dadurch ging zwar ein Teil der Informationen verloren, es wurde aber verhindert, dass potentiell falsches Alignment in hochvariablen Regionen die Qualität der resultierenden Stammbäume beeinträchtigt.

### 2.15.2 Phylogenetischer Stammbäume

Dieser reduzierte Datensatz konnte nun mit Programmen aus dem Programmpaket PHYLIP (Felsenstein 1993) nach Distanz-Matrix-Methoden (verwendete Programme: DNADIST, FITCH, NEIGHBOR) in einen Stammbaum umgesetzt werden.

Das Programm DNADIST vergleicht die Sequenzen paarweise miteinander und errechnet z.B. nach der Methode von Jukes und Cantor (1969) aus ermittelten Sequenzähnlichkeiten „genetische Distanzen“. Ausgehend von solchen in Matrixform dargestellten Distanzen kann nach der Neighbor-Joining-Methode (Programm NEIGHBOR; Saito und Nei, 1987) bzw. nach der Kleinstquadrat-Distanzmethoden (Programm FITCH; Fitch und Margoliash, 1967) ein Baum konstruiert werden. Die in Klammernotationsform erhaltenen Bäume konnten mit dem Programm DRAWGRAM in Baumdiagramme umgesetzt und im Textverarbeitungsprogramm WinWord editiert und ausgedruckt werden.

### 2.15.3 Statistische Absicherung der Stammbäume

Die Zuverlässigkeit der Verzweigungen in einem Baum wird mit der Bootstrap-Methode überprüft (Felsenstein 1985). Bei dieser Methode wird aus einem Datensatz (Originaldatensatz) der Länge  $n$  ( $n$  = Anzahl der Alignmentpositionen) durch Zufallsauswahl

von  $n$  Alignmentpositionen ein neuer Datensatz (Zufalldatensatz) der Länge  $n$  geschaffen. Dieser Vorgang wird 100 bis 1000fach wiederholt. Von jedem der resultierenden 100 bis 1000 Zufalldatensätze wird dann jeweils ein Baum (Zufallsbaum) berechnet. Eine Verzweigung im Originalbaum ist nun mit umso höherer Wahrscheinlichkeit richtig, je höher der Bootstrap-Wert ist, d.h. je mehr Zufallsbäume diese Verzweigung aufweisen. Für Bootstrapwerte über 80 (bei 100 Wiederholungen) kann eine Verzweigung als verlässlich angesehen werden. Die ermittelten Bootstrapwerte wurden im Baumdiagramm an der jeweiligen Verzweigung angegeben.

## 2.16 Fluoreszenz *in-situ*-Hybridisierung

Fluoreszenz-markierte Oligonukleotidsonden, die komplementär zu Abschnitten der 16S rDNA sind, binden an die 16S rRNA der Ribosomen, sofern dort die entsprechend komplementäre Sequenz vorhanden ist. Durch die Bindung der Sonden an die komplementären Bereiche zeigen die Zellen bzw. Bakterien im Fluoreszenzmikroskop ein Fluoreszenzsignal.

Die Sonden, die in dieser Arbeit verwendet wurden, waren am 5'-Ende mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fluorescein bzw. Cy3 markiert (Tab. 1).

### 2.16.1 Vorbereitung des Darmgewebes

Der Darm der *M. darwiniensis* wurde nach mehrmaligem Waschen mit PBS bzw.  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  in 500  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  suspendiert und mit Hilfe eines Ultra Turrax zerkleinert. Nach einer Zentrifugation bei 1000 rpm für 1 min wurde der Überstand (enthält Bakterien, die durch die Zerkleinerung von der Darmwand frei geworden sind) abpipettiert und für 2 Stunden bei 4 °C in 3 %ige *in-situ*-Fixierungslösung inkubiert.

Zur Entfernung des Fixatives wurde die Suspension für 3-5 min bei 15000 rpm zentrifugiert und das Pellet zweimal mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gewaschen. Dann wurden 2  $\mu\text{l}$  geeigneter Verdünnung pro Fenster auf die Objektträger (Epoxid-beschichtete Objektträger mit runden Fenstern, 3 mm Durchmesser, die vorher mit 70 %igem Ethanol gesäubert wurden). Schließlich wurden die Objektträger bis zur Hybridisierung bei Raumtemperatur trocken und dunkel gelagert.

### 2.16.2 Durchführung der Hybridisierung und DAPI-Färbung

(nach Manz *et al.* 1992; modifiziert)

Zum Schutz der Farbstoffe muß starke Lichtexposition vermieden werden. Die Falcon-Gefäße werden mit einem Filterpapierstreifen und mit 500  $\mu\text{l}$  *in-situ*-Äquibrierpuffer beschickt.

Danach wurden je 2  $\mu\text{l}$  *in-situ*-Hybridisierungspuffer, der die entsprechende Oligonukleotidsonde enthielt, auf die Fenster der Objektträger aufgebracht. Nachdem die Präparate vorsichtig in die Falcon-Gefäße geschoben wurden, stellte man sie waagrecht in den Hybridisierungsöfen (die Flüssigkeit verschiedener Fenster darf nicht zusammengemischt werden). Nach 2-stündiger Inkubation bei 46 °C wurden die Objektträger 2 x 15 min bei 48 °C in 40 ml *in-situ*-Waschpuffer inkubiert, um die ungebundenen Sonden zu entfernen. Danach wurden die Objektträger vorsichtig mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  abgespült. Auf die luftgetrockneten Präparate wurden 3  $\mu\text{l}$  DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol)/Fenster aufgebracht und 15 min bei RT dunkel gelagert (DAPI-Stammlösung: 1 mg/ml, vor Gebrauch 1:1000 verdünnen). Nachdem die Objektträger noch mal mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  abgespült wurden, wurden die Präparate luftgetrocknet. Schließlich wurden die Objektträger mit 2  $\mu\text{l}$  Antibleichlösung (DABCO, Diazabicyclooctan)/Fenster beschickt und mit Deckglas abgedeckt. Die Präparate müssen möglichst sofort mikroskopiert werden.

### 2.16.3 Epifluoreszenzmikroskopie

Das Fluoreszenzfarbstoffmolekül kann durch Fluoreszenzanregung zum Lichtemission gebracht werden. Unter dem Mikroskop können die leuchtenden Zellen entsprechend der SONDENSPEZIFITÄT identifiziert werden. Je nach Farbstoff (DAPI, Cy3 oder Fluorescein) wurden UV-Licht-(360 nm), Rotlicht (540 nm)- bzw. Blaulicht-(450-490 nm) Fluoreszenzanregungsfilter verwendet (Fluoreszenzfilteransätze 01, Fcy3 und 10). Präparate wurden bei 400-1000 Vergrößerung mit Epifluoreszenzausrüstung (Axiophot 2, Zeiss) untersucht.

## 3 Ergebnisse

### 3.1. Charakterisierung symbiontischer Mikroorganismen an der Darmwand der Termiten *Mastotermes darwiniensis*

In der vorliegenden Arbeit wurden Eu- und Archaeobakterien von der Darmwand der Termiten *Mastotermes darwiniensis* isoliert. Die Mikroorganismen wurden über 16S rDNA-Sequenzanalyse und Kultivierung identifiziert (Tab. 2 und 5).

#### 3.1.1 Kultivierte Bakterien

Nachdem der Darm gründlich gewaschen und zerkleinert wurde, wurde er direkt auf TSB-Platten ausplattiert und bei 28 °C inkubiert. Danach wurden gewachsene Kolonien in TSB-Medium angeimpft. Ausgehend von der erhaltenen Reinkulturen konnten fünf Bakterienstämme (FZ1, FZ4, FZ5, Z2 und FZ) über ihre 16S rRNA identifiziert werden. Dazu wurde von den Reinkulturen zunächst DNA isoliert. Mit den Eubakterien-spezifischen Primern Eubak5 und Eubak3 (Tab. 1) wurde mittels PCR dann die 16S rRNA der Stämme amplifiziert. Das ca. 1,5 kb lange Amplifikationsprodukt wurde schließlich sequenziert (Siehe Anhang). Die resultierende Sequenz wurde dann mit Sequenzen aus der EMBL- bzw. RDP-Datenbank (Stoesser *et al.* 1999 bzw. Maidak *et al.* 2000) verglichen. Es ergaben sich fünf verschiedene kultivierbare Bakterienarten. Dabei zeigte die Sequenz FZ1 97% Ähnlichkeit zu *Cellulomonas cellulans*, die Sequenz FZ4 95% Ähnlichkeit zu *Streptococcus bovis*, die Sequenz FZ5 96% Ähnlichkeit zu *Leuconostoc citreum*, die Sequenz Z2 98% Ähnlichkeit zu *Streptomyces griseus* und die Sequenz FZ 100% Ähnlichkeit zu *Burkholderia cepacia* (Tab. 2). Stamm FZ5 wurde genauer untersucht.

**Tab. 2 Vergleich von partiellen Sequenzen von 3'-Ende der 16S rDNA aus kultivierten Darmwandbakterien von *Mastotermes darwiniensis* mit Sequenzen aus der EMBL- bzw. RDP-Datenbank.**

Nr.	Sequenz <sup>a,b</sup>	Ähnlichster Organismus	Ähnlichkeit <sup>c</sup>	Bakteriengruppe <sup>d</sup>
1	FZ1	<i>Cellulomonas cellulans</i>	97 % in 403 bp	HGC, Gram <sup>+</sup>
2	FZ4	<i>Streptococcus bovis</i>	95 % in 422 bp	LGC, Gram <sup>+</sup>
3	FZ5	<i>Leuconostoc citreum</i>	96 % in 380 bp	LGC, Gram <sup>+</sup>
4	Z2	<i>Streptomyces griseus</i>	98 % in 437 bp	HGC, Gram <sup>+</sup>
5	FZ	<i>Burkholderia cepacia</i>	100% in 446 bp	Proteobakterien-Gram <sup>-</sup>

<sup>a)</sup> Alle Sequenzen von kultivierbaren Bakterien der Darmwand von *M. darwiniensis*. <sup>b)</sup> Sequenzen wurden noch nicht bei EMBL hinterlegt. <sup>c)</sup> Sequenzvergleich mit der EMBL- bzw. RDP-Nukleotidsequenz-Datenbank (Stoesser et al. 1999, Maidak et al. 2000). <sup>d)</sup> Bakteriengruppe, zu der der ähnlichste Organismus gehört. LGC-Gram<sup>+</sup> = Gram-positive Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt, HGC-Gram<sup>+</sup> = Gram-positive Bakterien mit hohem G+C-Gehalt.

### 3.1.1.1. Physiologische Tests

Tabelle 3 zeigt die getesteten Eigenschaften der Stämme FZ5, FZ4, FZ1, Z2 und FZ. Alle fünf Bakterienstämme sind aerob und zeigen keine konstitutionelle Cellulase-Aktivität und keine Sporenbildung. Die Stämme FZ5 und FZ4 gehören nach der Gram-Reaktion zu den Gram-positiven Bakterien, da die Zellen blau gefärbt waren und nicht auf MacConkey-Agar wachsen (nur Gram-negative Bakterien wachsen auf MacConkey-Agar). Da bei dem Stamm FZ ein eindeutiges Wachstum auf MacConkey-Agar festgestellt wurde und nach Gram-Färbung die Zellen rot gefärbt waren, gehört FZ zu den Gram-negativen Bakterien. Die Zellen der Stämme FZ1 und Z2 gehören vermutlich zu der Gram-positiven Bakterien, da die Zellen nicht auf MacConkey-Agar wachsen. Nach Gram-Reaktion waren die Zellen der Stämme FZ1 und Z2 rosa-violett gefärbt. Die Stämme FZ4, FZ1, Z2 und FZ zeigten Amylase- und Katalase-Aktivität. Stamm FZ5 zeigte weder Amylase- noch Katalase-Aktivität. Die Bakterien aller Stämmen waren kaum beweglich.

**Tab. 3 Vergleich der physiologischen Eigenschaften der isolierten Stämme von *Mastotermes darwiniensis***

Stamm	Morphologie	Katalase-Aktivität	Amylase-Aktivität	Konstitutionelle Cellulase-Aktivität	Gram-Reaktion <sup>a</sup>	MacConkey-Agar
FZ5	Kokken, Kettenförmig	-	-	-	Gram+	-
FZ4	Kleine Stäbchen	+	+	-	Gram+	-
FZ1	Kokken	+	+	-	Gram±	-
Z2	Mycelartig	+	+	-	Gram±	-
FZ	Stäbchen	+	+	-	Gram-	+

+ = Aktivität, Wachstum auf MacConkey-Agar, - = Keine Aktivität, kein Wachstum auf MacConkey-Agar, Gram+ = Gram positiv, Gram- = Gram negativ, Gram± = Unklar, <sup>a</sup> = Simbert und Krieg, 1994

Stamm FZ5 (mit 96% Ähnlichkeit zur *Leuconostoc citreum*-Sequenz) wurde genauer untersucht. Wie Tabelle 4 zeigt, kann der Stamm FZ5 aus Glucose, Trehalose und Xylose eindeutig Säure bilden, während aus Saccharose, Fructose, Maltose und Lactose nach mehreren Tagen Inkubationszeit nur schwache Säurebildung festzustellen war. Diese Bakterien konnten bei einem pH von 6,5 und bei einer Temperatur von 28 °C gut wachsen. Da *Oenococcus oeni* bei einem pH von 4,8 und in Gegenwart von 10% Ethanol wächst (Garvie, 1967, Dicks et al. 1995) und *Leuconostoc gelidum* sowie *Leuconostoc carnosum* bei einer Temperatur von 1 °C wachsen (Shaw und Harding, 1989), wurden diese Tests auch bei der weiteren Identifizierung des Stammes FZ5 (mit einer Ähnlichkeit von 96% zu *Leuconostoc citreum*) durchgeführt. Ein Wachstum bei einem pH von 4,8 und 10% Ethanol sowie bei 1 °C konnte nicht festgestellt werden. Die Lactatbestimmung unter Verwendung von Lactat-Dehydrogenase und Hydrazin sowie die Glucose-Bestimmung zeigten, dass aus ca. 80 mM Glucose nur 50-54 mM Lactat gebildet wurde. Ausserdem konnte unter Verwendung von Durham-Röhrchen gezeigt werden, dass die FZ5-Zellen CO<sub>2</sub> produzierten. Dadurch konnte der Stamm FZ5 den heterofermentativen Milchsäurebakterien zugeordnet werden

(homofermentative Bakterien bilden reines oder beinahe (90%) reines Lactat). Eine Dextran-Bildung konnte nicht festgestellt werden.

**Tab. 4 Physiologische Eigenschaften des Stammes FZ5 von *Mastotermes darwiniensis* und *Leuconostoc citreum***

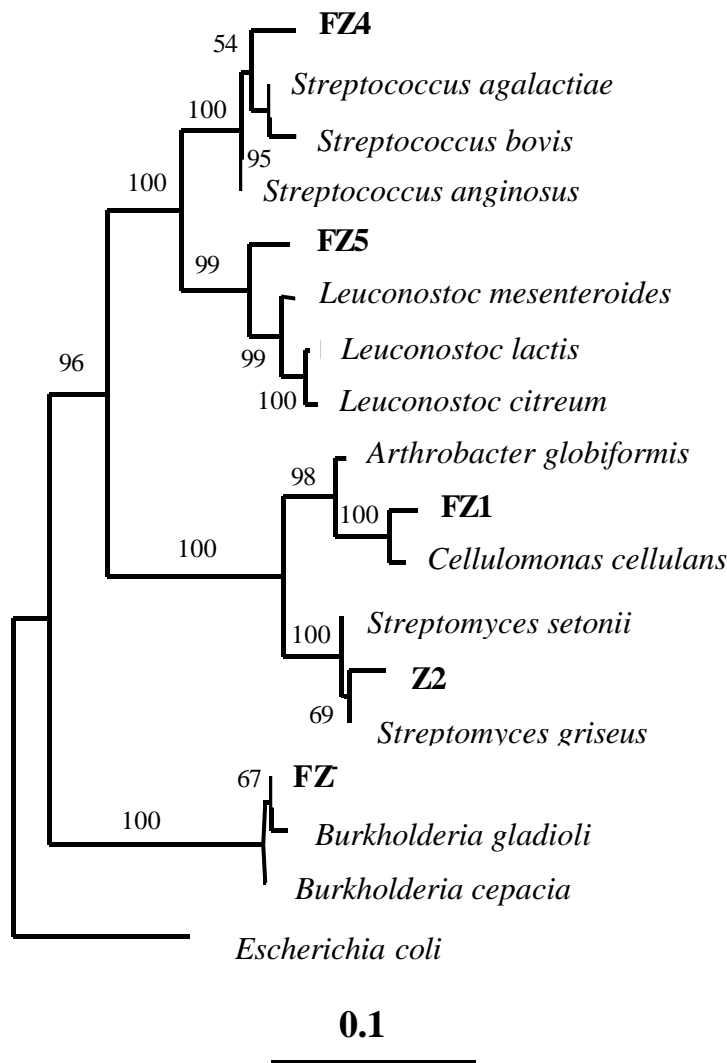
Säure-Bildung aus:	Reaktion	
	Stamm FZ5	<i>Lc. citreum</i> <sup>a)</sup>
Glucose	+	+
Fructose	x	+
Maltose	x	+
Trehalose	+	+
Xylose	+	x
Lactose	x	-
Saccharose	x	+
Wachstum bei pH: 6.5	+	+
Wachstum bei pH: 4.8	-	-
Wachstum bei 10% Ethnol	-	-
Wachstum bei 28 °C	+	+
Wachstum bei 1 °C	-	-
Dextran-Bildung	-	n.b.

+ = Säure-Bildung - = keine Säure-Bildung õ = schwache Säure-Bildung n.b. = nicht bestimmt a) Farrow et al. (1989)

### 3.1.1.2 Phylogenie der kultivierten Darmwand-Bakterien von *Mastotermes darwiniensis*

Für die phylogenetische Analyse wurde ein Datensatz verwendet, der 17 Bakteriensequenzen und *Escherichia coli* als Außengruppe enthielt. Der zugrundeliegende Datensatz enthielt 471 Alignmentpositionen. In Abb. 3 ist der Neighbour-Joining-Baum der untersuchten Darmwand-Bakterien SSU rDNA-Sequenzen gezeigt. Der Baum zeigt die Positionen der isolierten Bakterien. Die nächsten Verwandten der Stämme FZ1 und Z2 sind *Cellulomonas cellulans* (97%) bzw. *Streptomyces griseus* (98%). Aufgrund der Stammbaum-Berechnungsmethode können bei den anderen drei Stämmen, FZ4, FZ5 und FZ- mit einer Ähnlichkeit von 95% zu *Streptococcus bovis*, 96% zu *Leuconostoc citreum* bzw. 100% zu *Burkholderia cepacia* nicht die richtigen Ähnlichkeitsverhältnisse bestimmt werden (Vergleich mit Tab. 2). Da hier die Unterschiede im niedrigen Prozentbereich liegen, spiegelt

die Struktur des Baumes unter Umständen nicht mehr die richtigen Ähnlichkeitsverhältnisse wieder.



**Abb 3: Phylogenetische Position der kultivierten Darmwandbakterien von *Mastotermes darwiniensis*.** Dieser Baum wurde über die Neighbour-Joining-Methode aus einem Datensatz mit 471 Alignmentpositionen und *Escherichia coli* als Außengruppe errechnet. Die Bootstrapwerte sind an den entsprechenden Verzweigungen angegeben. Der Maßstrich entspricht 10 Austauschen pro 100 Nukleotidpositionen.

### 3.1.2 Nicht-kultivierte Bakterien

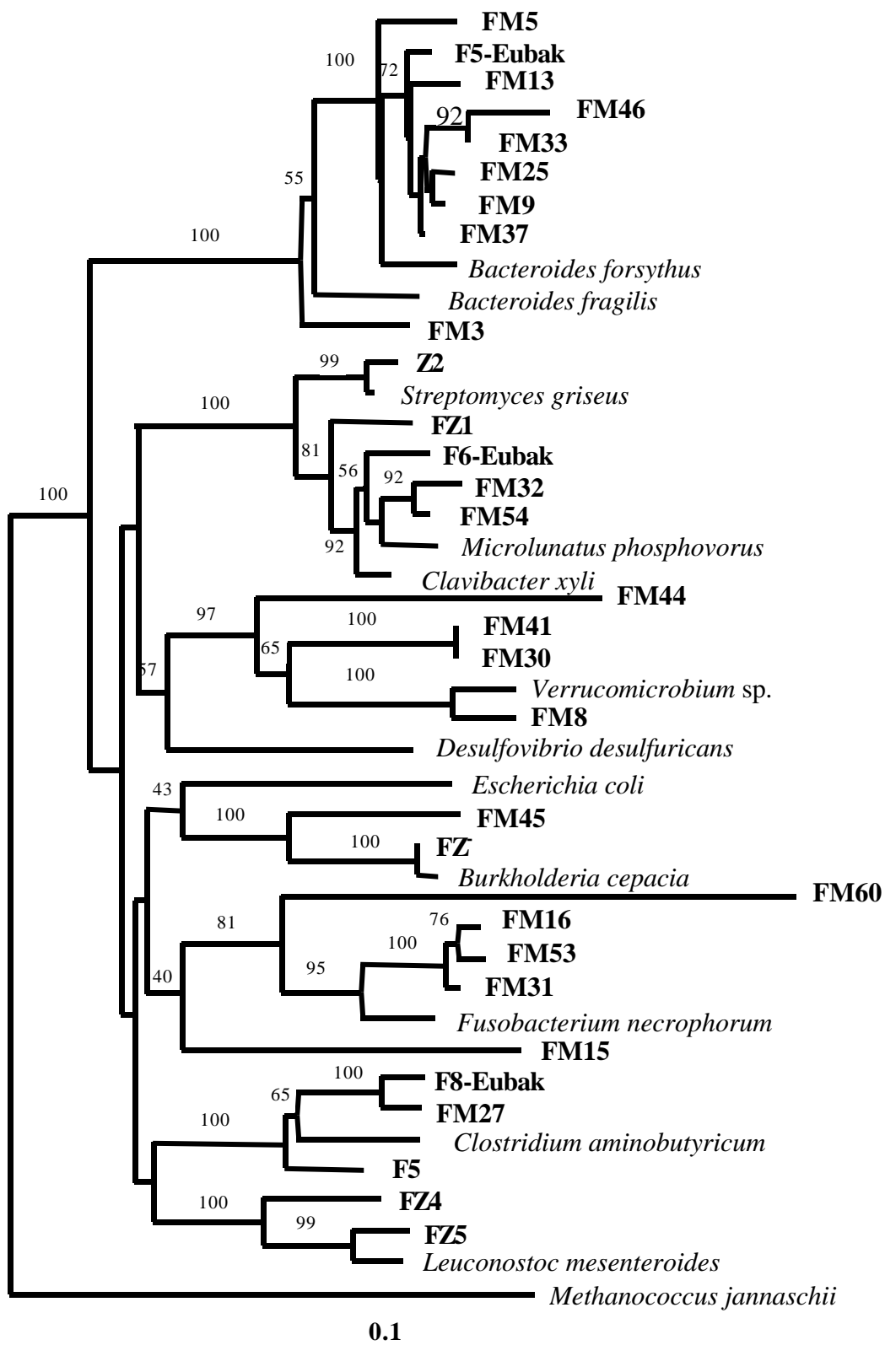
Die nicht-kultivierten Bakterien wurden über ihre 16S rDNA Sequenzanalyse identifiziert. Nach der Präparation des Darmes wurde der Darm gründlich gewaschen und das Darmwandgewebe zerkleinert. Nach 1-minütiger Zentrifugation wurde aus dem Darmgewebe die DNA der Bakterien isoliert, die an der Darmwand sitzen. Die DNA wurde dann in PCR-Ansätze mit den Eubakterien-spezifischen Oligonukleotidprimern Eubak3 und Eubak5 (Tab. 1) eingesetzt. Die resultierenden Amplifikationsprodukte bestanden aus einem Gemisch verschiedener 16S rRNA Gene und hatten eine Länge von ca. 1,5 kb. Um einzelne Sequenzen aus dem Gemisch zu separieren, wurden die Amplifikationsprodukte kloniert. Von 60 Klonen wurden jeweils rekombinante Plasmide gereinigt. Nach einem Restriktionsverdau mit dem Enzym *AluI* wurde ca. 25 verschiedene Sequenzen erhalten. Ein Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit der EMBL- bzw. RDP-Datenbank ergab, dass diese Sequenzen von verschiedenen Bakterien abgeleitet sind (Tab. 5). Drei dieser Sequenzen (FM54, FM32 und F6) gehören zur Gruppe der Gram-positiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt. Dabei zeigen die Sequenzen FM54, FM32 und F6-Eubak jeweils 95%, 91% und 94% Ähnlichkeit zu *Micrococcus phosphovorans*. Fünf dieser Sequenzen (F5, FM15, F8-Eubak, FM27 und FM60) konnten auch zur Gruppe der Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt zugeordnet werden. Dabei sind die Sequenzen F5, F8-Eubak und FM27 zu 89%, 91% und 86% mit *Clostridium aminobutyricum* verwandt. Die zwei Sequenzen FM15 und FM60 zeigen 81% bzw. 83% Ähnlichkeit zu *Clostridium cellulosi* und *Bacillus lautus*. Die drei Stämme FM16, FM31 und FM53 konnten der Fusobakterien-Gruppe zugeordnet werden und zwar sind sie zu *Fusobacterium necrophorum* Stamm FnS-1 verwandt (88% bzw. 92% und 92%). Die Sequenzen FM45, FM8, FM30, FM41, FM44 stammen von Proteobakterien ab. Hierbei zeigen die Sequenzen FM8, FM30, FM41 und FM44 mit 94%, 88%, 88% und 90% Ähnlichkeit zu *Verrucomicrobium* sp.. Die nächste Verwandte zur Sequenz FM45 ist *Thauera selenatis* mit 93% Ähnlichkeit. Die restlichen 9 Sequenzen (FM5, F5-Eubak, FM13, FM9, FM46, FM33, FM25, FM37 und FM3) gehören zu der *Bacteroides*-Gruppe. Dabei sind die Sequenzen mit 88% bis 95% ähnlich zu *Bacteroides forsythus*. Sequenz FM3 ist mit *Bacteroides acidofaciens* (85%) verwandt.

**Tab. 5 Vergleich von partiellen Sequenzen von 3'-Ende der 16S rDNA aus nicht kultivierten Darmwandbakterien von *Mastotermes darwiniensis* mit Sequenzen aus der EMBL-bzw. RDP-Datenbank**

Nr.	Sequenz	Nächster verwandter Organismus	Ähnlichkeit	Bacteriengruppe
1	FM54	<i>Micrococcus phosphovorus</i>	95% in 400 bp	HGC-Gram+
2	FM32	<i>Micrococcus phosphovorus</i>	91% in 398 bp	HGC-Gram+
3	F6-Eubak	<i>Micrococcus phosphovorus</i>	94% in 477 bp	HGC-Gram+
4	F5	<i>Clostridium aminobutyricum</i>	89% in 372 bp	LGC-Gram+
5	FM15	<i>Clostridium cellulosi</i>	81% in 159 bp	LGC-Gram+
6	F8-Eubak	<i>Clostridium aminobutyricum</i>	91% in 304 bp	LGC Gram+
7	FM27	<i>Clostridium aminobutyricum</i>	86% in 359 bp	LGC-Gram+
8	FM60	<i>Bacillus lautus</i>	83% in 160 bp	LGC-Gram+
9	FM16	<i>Fusobacterium necrophorum</i> . FnS-1	88% in 393 bp	Fusobakterien-Gruppe
10	FM31	<i>Fusobacterium necrophorum</i> . FnS-1	92% in 414 bp	Fusobakterien-Gruppe
11	FM53	<i>Fusobacterium necrophorum</i> . FnS-1	92% in 393 bp	Fusobakterien-Gruppe
12	FM45	<i>Thauera selenatis</i>	93% in 334 bp	Beta-Proteobakterien
13	FM8	<i>Verrucomicrobium</i> sp. VeCb1	94% in 410 bp	Verrucomicrobien
14	FM30	<i>Verrucomicrobium</i> sp	88% in 221 bp	Verrucomicrobien
15	FM41	<i>Verrucomicrobium</i> sp.	88% in 220 bp	Verrucomicrobien
16	FM44	<i>Verrucomicrobium</i> sp.	90% in 229 bp	Verrucomicrobien
17	FM5	<i>Bacteroides forsythus</i>	90% in 300 bp	<i>Bacteroides</i> -Gruppe
18	F5-Eubak	<i>Bacteroides forsythus</i>	95% in 390 bp	<i>Bacteroides</i> -Gruppe
19	FM13	<i>Bacteroides forsythus</i>	88% in 364 bp	<i>Bacteroides</i> -Gruppe
20	FM9	<i>Bacteroides forsythus</i>	91% in 355 bp	<i>Bacteroides</i> -Gruppe
21	FM46	<i>Bacteroides forsythus</i>	92% in 310 bp	<i>Bacteroides</i> -Gruppe
22	FM33	<i>Bacteroides forsythus</i>	92% in 324 bp	<i>Bacteroides</i> -Gruppe
23	FM25	<i>Bacteroides forsythus</i>	93% in 359 bp	<i>Bacteroides</i> -Gruppe
24	FM37	<i>Bacteroides forsythus</i>	94% in 380 bp	<i>Bacteroides</i> -Gruppe
25	FM3	<i>Bacteroides acidofaciens</i>	85% in 360 bp	<i>Bacteroides</i> -Gruppe

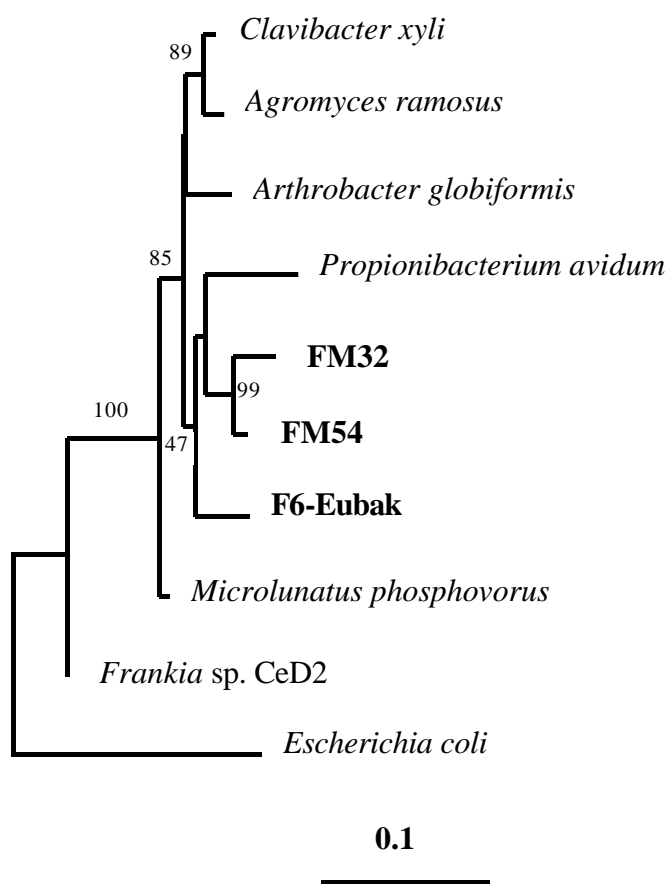
### 3.1.2.1. Phylogenie der nicht-kultivierten Darmwand-Bakterien von *Mastotermes darwiniensis*

Abb. 4 zeigt die phylogenetische Stellung aller erhaltenen bakteriellen Sequenzen. Die nicht-kultivierbaren Darmwand-Bakterien wurden in sechs verschiedene Gruppen eingeteilt: Gram-positive Bakterien mit hohem G+C-Gehalt, Gram-positive Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt, Fusobakterien, Proteobakterien, Verrucomicrobien und *Bacteroides*-Arten. Die Phylogenie dieser Bakterien wurde aus verschiedenen Datensätzen errechnet (Abb. 4; Tab. 5). Die identifizierten Bakterien wurden zu einem Alignment von 6205 bakteriellen SSU-rDNA Sequenzen hinzugefügt. Die phylogenetische Analyse wurde mittels Neighbour-Joining-Methode durchgeführt, wobei *Escherichia coli* als Außengruppe verwendet wurde.



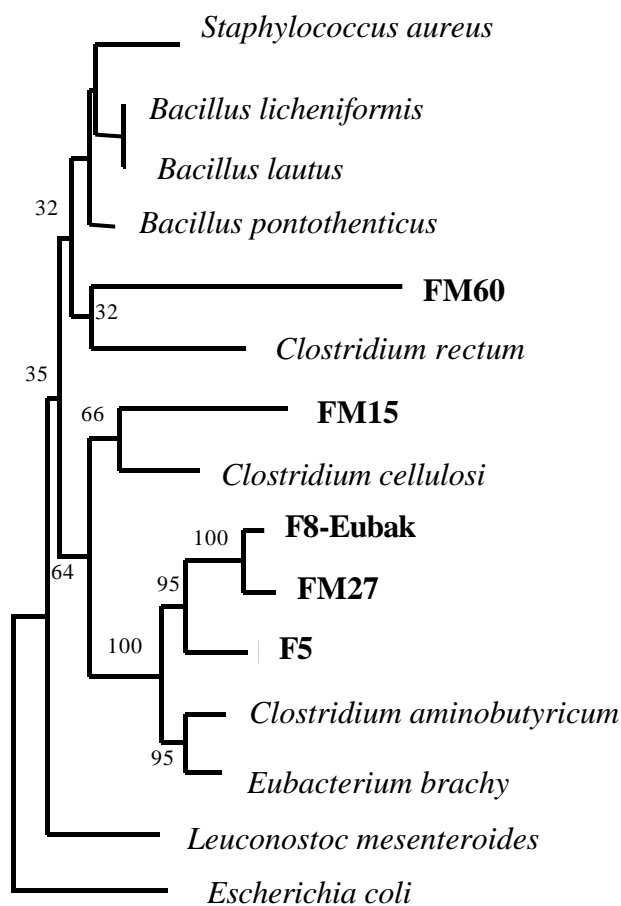
**Abb. 4: Phylogenetischer Stammbaum der identifizierten Bakterien von der Darmwand von *Mastotermes darwiniensis*.** Dieser Baum wurde über die Neighbour-Joining-Methode und *Methanococcus jannaschii* als Außengruppe errechnet. Die Bootstrapwerte sind an den entsprechenden Verzweigungen angegeben. Der Maßstrich entspricht 10 Austauschen pro 100 Nukleotidpositionen.

Abb. 5 zeigt die Positionen der Klone FM32, FM54 und F6-Eubak, die zur Gruppe der Gram-positiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt gehören. Der verwendete Datensatz enthielt 9 Bakteriensequenzen und nach Abzug der hochvariablen Bereiche 462 Alignmentpositionen. Um die Wurzel der Stammbäume zu finden, wurde *Escherichia coli* als Außengruppe mit in den Datensatz aufgenommen. Die nächsten Verwandten sind *Microlunatus phosphovorius* und *Propionibacterium avidum*, wobei die Sequenz FM32 91,0%, Sequenz FM54 95,0% und Sequenz F6-Eubak 94,0% Ähnlichkeit zur *Microlunatus phosphovorius* zeigen.



**Abb. 5: Phylogenetische Position der grampositiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt von der Darmwand von *Mastotermes darwiniensis*.** Dieser Baum wurde über die Neighbour-Joining-Methode aus einem Datensatz mit 462 Alignmentpositionen und *Escherichia coli* als Außengruppe errechnet. Die Bootstrapwerte sind an den entsprechenden Verzweigungen angegeben. Der Maßstrich entspricht 10 Austauschen pro 100 Nukleotidpositionen.

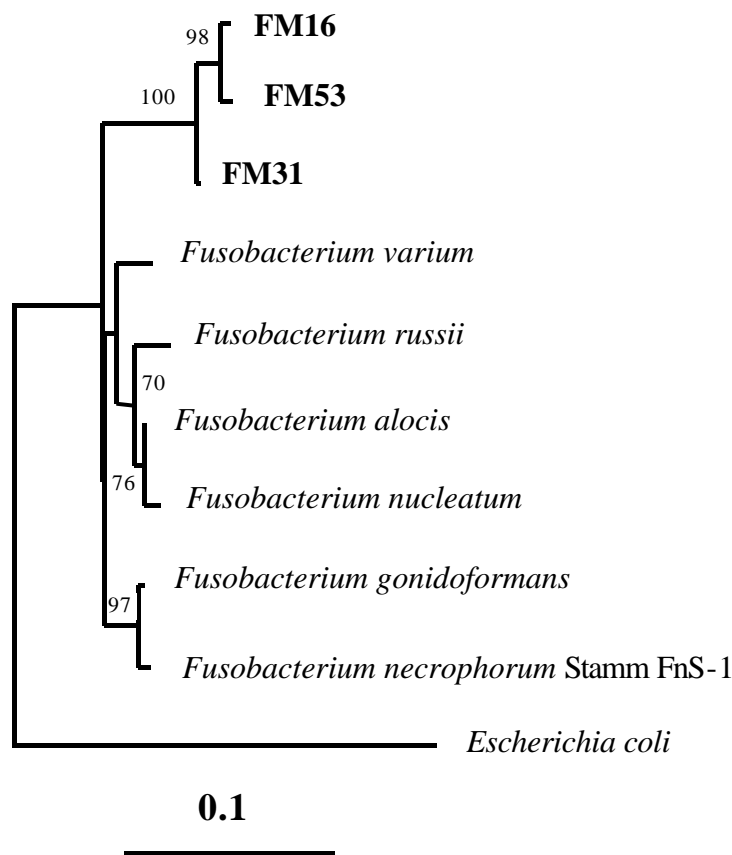
Abb. 6 zeigt die Positionen der fünf Klone F5, FM27, F8-Eubak, FM15 und FM60, die zu den Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt zugeordnet werden können. Für die phylogenetische Analyse wurde ein Datensatz von 14 Bakteriensequenzen und *Escherichia coli* als Außengruppe verwendet. Nach Entfernen von Positionen, die nicht eindeutig einander zuzuordnen waren, verblieben nur noch 440 Alignmentpositionen im Datensatz. Der nächste Verwandte zu den Sequenzen F5, FM27 und F8-Eubak ist *Clostridium aminobutyricum* mit einer Ähnlichkeit von 89,0%, 86,0% und 91,0%. Die nächsten Verwandten zur Sequenz FM15 sind *Clostridium cellulosi* mit 81,0% Ähnlichkeit und zu der Sequenz FM60 *Bacillus lautus* bzw. *Bacillus licheniformis* mit 83,0% Ähnlichkeit.



0.1

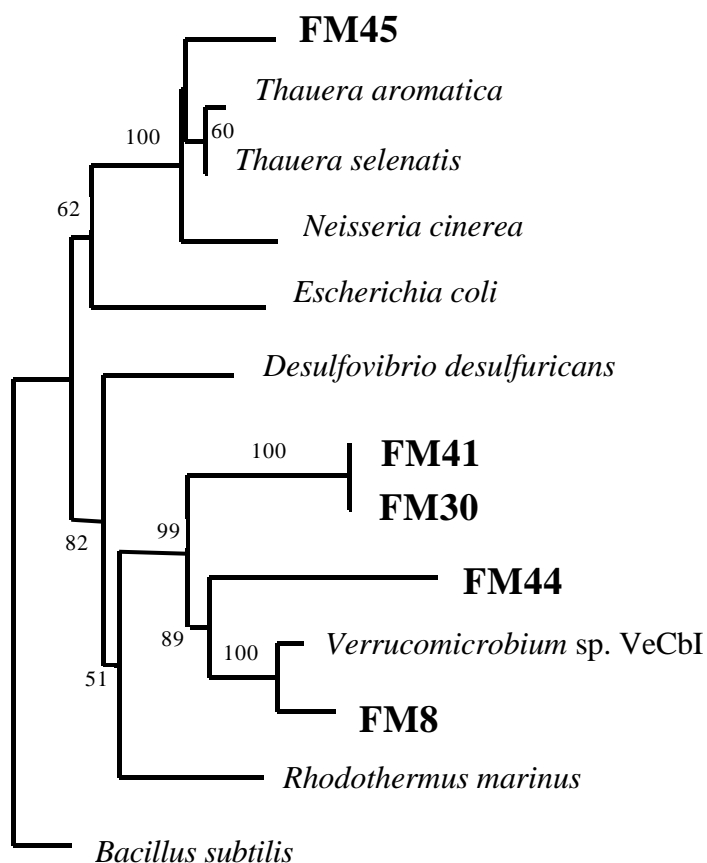
**Abb. 6: Phylogenetische Position der Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt von der Darmwand von *Mastotermes darwiniensis*.** Dieser Baum wurde über die Neighbour-Joining-Methode aus einem Datensatz mit 440 Alignmentpositionen und *Escherichia coli* als Außengruppe errechnet. Die Bootstrapwerte sind an den entsprechenden Verzweigungen angegeben. Der Maßstrich entspricht 10 Austauschen pro 100 Nukleotidpositionen.

Abb. 7 zeigt als dritte Bakteriengruppe die der Fusobakterien. Dafür wurde ein Datensatz von 9 Bakteriensequenzen und *Escherichia coli* als Außengruppe verwendet. Der Datensatz enthielt nach Abzug der hochvariablen Bereiche 421 Alignmentpositionen. Der Neighbour-joining-Baum zeigt die Positionen der Sequenzen FM16, FM53 und FM31. Die beiden Sequenzen FM16 und FM 53 zeigen nach dem Programm DNADIST eine Ähnlichkeit von 99,0%. Die Sequenz FM31 hat eine geringere Ähnlichkeit zu der Sequenz FM16 (97,9%) bzw. zu der Sequenz FM53 (98,4%). Die nächsten Verwandten aus der EMBL-Datenbank zu den drei Sequenzen sind *Fusobacterium necrophorum* und *Fusobacterium gonidiformans* mit einer Ähnlichkeit von 92,0%.



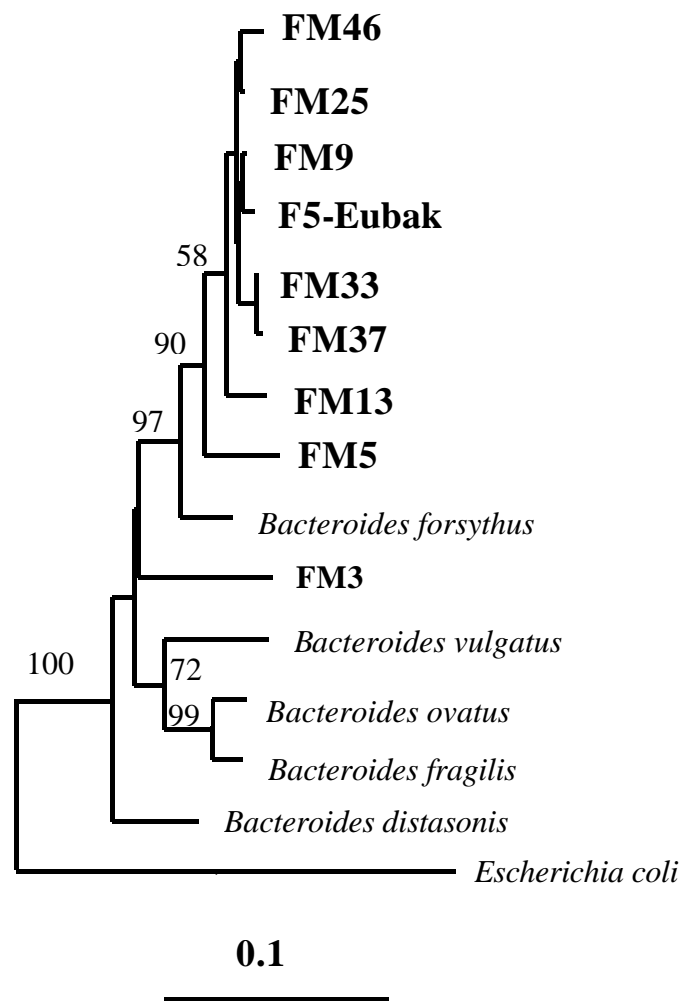
**Abb. 7: Phylogenetische Position der identifizierten Fusobakterien-ähnlichen Bakterien von der Darmwand von *Mastotermes darwiniensis*.** Dieser Baum wurde über die Neighbour-Joining-Methode aus einem Datensatz mit 421 Alignmentpositionen und *Escherichia coli* als Außengruppe errechnet. Die Bootstrapwerte sind an den entsprechenden Verzweigungen angegeben. Der Maßstrich entspricht 10 Austauschen pro 100 Nukleotidpositionen.

In Abb. 8 ist der phylogenetische Baum der Proteobakterien-Gruppe FM45 und Verrucomicrobien FM41, FM30, FM44 und FM8 dargestellt. Zur Feststellung der Wurzel des Baumes wurde *Bacillus subtilis* als Außengruppe mit in den Datensatz einbezogen, der 465 Alignmentpositionen enthielt. Nachdem die Sequenzen paarweise miteinander über das Programm DNADIST verglichen wurden, konnte gezeigt werden, dass die beide Sequenzen FM30 und FM41 100% ähnlich sind und die beiden Sequenzen FM44 und FM45 die niedrigste Ähnlichkeit (96,4%) untereinander haben. Der Baum zeigt, dass der nächste Verwandte der Sequenzen FM30, FM41, FM44 und FM8 *Verrucomicrobium* sp. VeCbI ist, während die Sequenz FM45 mit 93,0% Ähnlichkeit mit *Thauera selenatis* verwandt ist.



**Abb. 8: Phylogenetische Position der Bakterien aus der Proteobakterien- bzw. *Verrucomicrobium*-Gruppe von der Darmwand von *Mastotermes darwiniensis*.** Dieser Baum wurde über die Neighbour-Joining-Methode aus einem Datensatz mit 465 Alignmentpositionen und *Bacillus subtilis* als Außengruppe errechnet. Die Bootstrapwerte sind an den entsprechenden Verzweigungen angegeben. Der Maßstrich entspricht 10 Austauschen pro 100 Nukleotidpositionen.

Abb. 9 zeigt den phylogenetischen Baum der identifizierten Bakterien, die zur *Bacteroides*-Gruppe gehören. Die 9 Bakteriensequenzen wurden zu einem Alignment von 6205 bakteriellen SSU-rDNA Sequenzen hinzugefügt. Für die phylogenetische Analyse wurde dann ein Datensatz verwendet, der 14 *Bacteroides*-Sequenzen und 440 Alignmentpositionen enthielt. *Escherichia coli* wurde als Außengruppe mit in den Datensatz einbezogen. Der nächste Verwandte der Sequenzen FM25, FM46, FM9, F5-Eubak, FM33, FM37, FM13 und FM5 aus der EMBL-Datenbank war *Bacteroides forsythus* (88,0%-95,0% Ähnlichkeit).



**Abb. 9: Phylogenetische Position der *Bacteroides*-Gruppe der identifizierten Bakterien von der Darmwand von *Mastotermes darwiniensis*.** Dieser Baum wurde über die Neighbour-Joining-Methode aus einem Datensatz mit 440 Alignmentpositionen und *Escherichia coli* als Außengruppe errechnet. Die Bootstrapwerte sind an den entsprechenden Verzweigungen angegeben. Der Maßstrich entspricht 10 Austauschen pro 100 Nukleotidpositionen.

### 3.1.3 Methanbakterien von der Darmwand von *Mastotermes darwiniensis*

Da alle bisher bekannten Methanbakterienarten in ihren Zellen Coenzym F<sub>420</sub> besitzen, kann man sie mikroskopisch von anderen Bakterien unterscheiden. Durch die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung konnten an der Darmwand von *M. darwiniensis* mindestens zwei morphologisch verschiedene Methanbakterien nachgewiesen werden (Abb. 10a,b). Außerdem ergab die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung, dass die stäbchenförmigen bzw. filamentösen Methanbakterien nicht gleichmäßig an der Darmwand verteilt sind. Eine große Zahl von stäbchenförmigen Methanbakterien befinden sich in der P4-Region der Darmwand, und die meisten filamentförmigen Methanbakterien sind in P3b an der Darmwand lokalisiert (Abb. 11). In der P5-Region konnten keine Methanbakterien nachgewiesen werden, während in der P3a-Region nur stäbchenförmige Methanbakterien in geringerer Zahl als Endosymbionten von Flagellaten vorkommen.

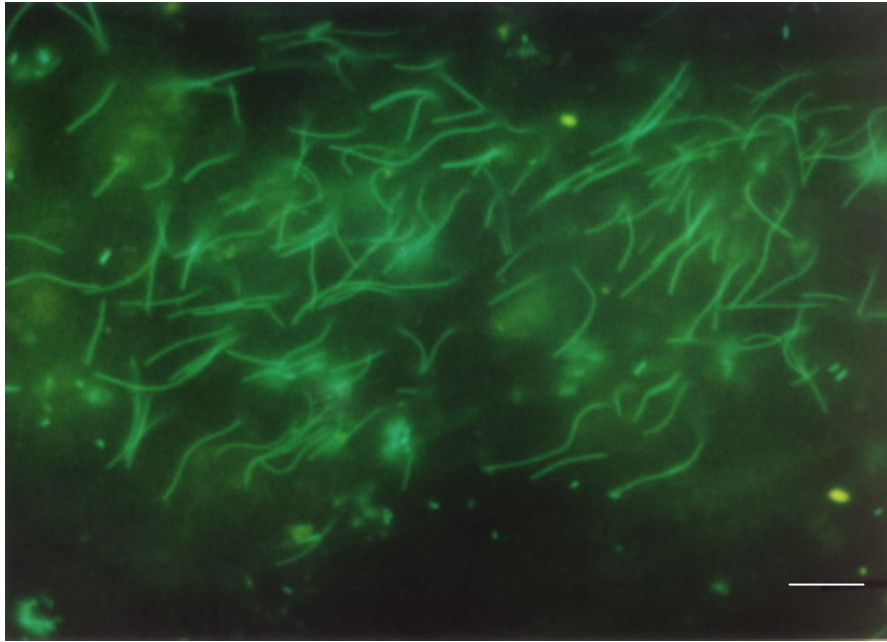


Abb. 10 a

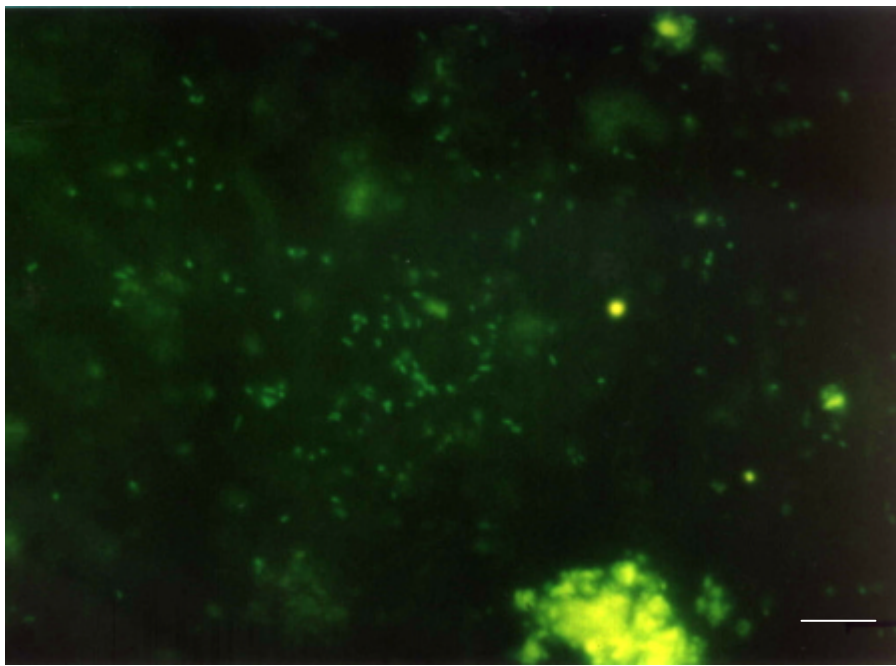
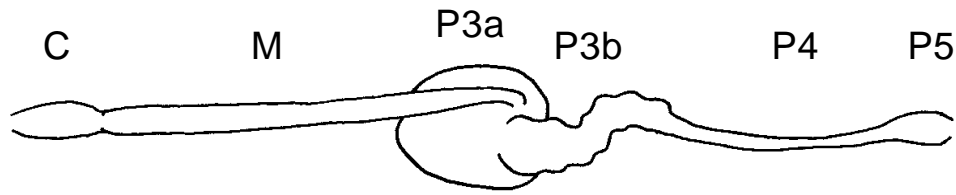


Abb. 10 b

**Abb. 10:** (a,b): Fluoreszenzaufnahme von faden- bzw. stäbchenförmigen Methanbakterien an der Darmwand (Region P3b bzw. P4, siehe Abb.11) der Termiten *Mastotermes darwiniensis*. Die Methanbakterien sind an ihrer intensiv grünen Autofluoreszenz deutlich zu erkennen. Maßstrich entspricht 10  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 11:** Darmschema der Termit *Mastotermes darwiniensis*. C = Vorderdarm, M = Mitteldarm, P3a und P3b = Gärkammer, P4 = Colon, P5 = Rectum. Darmschema nach Noirot (1995)

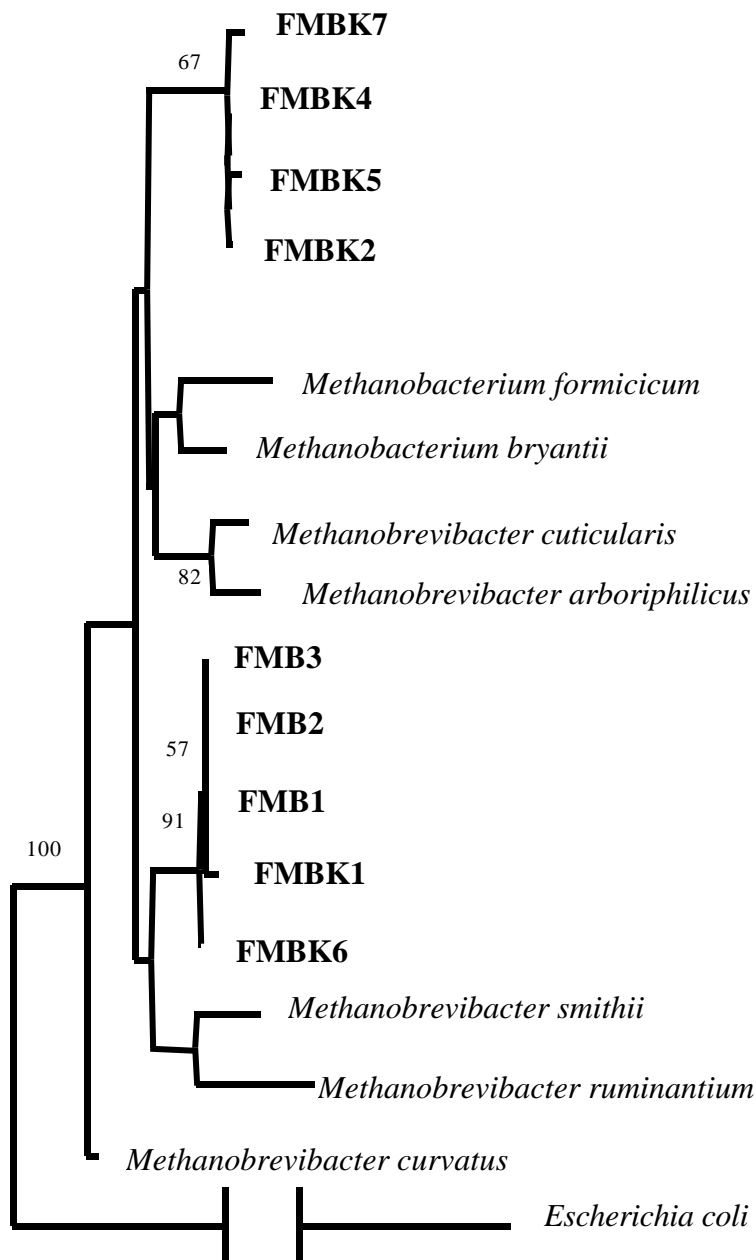
Es wurde versucht, über 16S rDNA-Sequenzen die Vielfalt und die phylogenetische Position dieser Organismen innerhalb des Methanobakterienasts zu ermitteln. In mehreren PCR-Ansätzen wurden der Prokaryonten-spezifische Primer Eubak3R und der Methanbakterien-spezifische Primer Narch5CF eingesetzt, um 16S rRNA-Sequenzen von Methanbakterien zu amplifizieren. Mit den erhaltenen PCR-Produkten wurde eine nested PCR durchgeführt, wobei die zwei Methanbakterien-spezifischen Primer Narch1100 R und GC Arch 781 F (Tab. 1) verwendet wurden. Schließlich wurden die PCR-Produkte entweder auf DGGE (Denaturierende Gradientengelelektrophorese) aufgetragen, um für die anschließende Sequenzierung reine PCR-Produkte zu bekommen (FMB1, FMB2 und FMB3) oder wurden direkt nach der PCR kloniert. Nach Klonierung der Amplifikationsprodukte wurden insgesamt 19 Klone mit einem 1,5 kb-Plasmidinsert analysiert. Die Sequenzierung von 6 zufällig herausgegriffenen Klonen zeigte, dass es sich bei allen Klonen um Methanbakterien-Sequenzen handelte (FMBK1, FMBK2, FMBK4, FMBK5 FMBK6 und FMBK7).

So ergaben sich insgesamt 9 sequenzen von Methanbakterien mit einer Länge zwischen 287 bis 305 bp. Die Sequenzähnlichkeiten zeigen, dass die identifizierten Methanbakterien zu der Familie Methanobacteriaceae und zwar zu den Gattungen *Methanobrevibacter* und *Methanobacterium* gehören (Tab. 7).

### 3.1.3.1 Phylogenie der Methanbakterien von der Darmwand der *Mastotermes darwiniensis*

Die 9 von sequenzen Methanbakterien FMB1, FMB2, FMB3, FMBK1, FMBK2, FMBK4, FMBK5, FMBK6 und FMBK7 wurden zu einem Alignment von 6205 prokaryotischen 16S rDNA-Sequenzen hinzugefügt. Für die anschließende phylogenetische Analyse wurden dann ein Datensatz verwendet, der 16 Methanogenensequenzen und *Escherichia coli* als Außengruppe enthielt. Aus den Distanzwerten, errechnet nach Jukes und Cantor (1969), wurden schließlich über Neighbour-Joining-Methoden phylogenetische Bäume abgeleitet. Der

erstellte Baum (Abb. 12) zeigt die Position der Termitendarmwand-Methanbakterien im Vergleich zu Vertretern anderer Methanbakteriengattungen aus der Datenbank.



0.1

**Abb. 12: Phylogenetischer Stammbaum der Methanbakterien von der Darmwand der Termiten *Mastotermes darwiniensis*.** Dieser Baum wurde über die Neighbour-Joining-Methode aus einem Datensatz mit 275 Alignmentpositionen und *Escherichia coli* als Außengruppe errechnet. Die Bootstrapwerte sind an den entsprechenden Verzweigungen angegeben. Der Maßstrich entspricht 10 Austauschen pro 100 Nukleotidpositionen. Der Ast zu *E. coli* wurde nicht maßstabsgerecht dargestellt.

Die 9 Sequenzen kann man in zwei Gruppen unterteilen (Tab. 6). Die erste Gruppe enthält die Sequenzen FMB1, FMB2, FMB3, FMBK1 und FMBK6. Diese Sequenzen ließen sich eindeutig der Gattung *Methanobrevibacter* zuordnen. Die Sequenzen FMB1, FMB2, FMB3 und FMBK6 stimmen in ihren 16S rRNA-Sequenz 100% überein, während die Sequenz FMBK1 eine Ähnlichkeit von 99,6% bzw. 99% zu den anderen vier Sequenzen hat. Aufgrund der hohen Übereinstimmung von 99% 100% in der 16S rDNA-Sequenzen gehören diese fünf Sequenzen zur gleichen Art. Die stärkste Übereinstimmung zu diesen Sequenzen in der 16S rDNA zeigt *Methanobrevibacter smithii* (97% Ähnlichkeit). Als nächste Verwandte wurde *Methanobrevibacter curvatus* mit 96% Ähnlichkeit identifiziert.

Zu der zweiten Gruppe gehören die Sequenzen FMBK2, FMBK4, FMBK5 und FMBK7. Die vier Sequenzen zeigen eine hohe Sequenzähnlichkeit (99,3%-99,7%) zueinander. Als nächstverwandte Art wurde *Methanobacterium bryantii* Stamm RiH2 (96% Ähnlichkeit) identifizieren.

**Tab. 6 Vergleich von 16S rDNA-Sequenzen der Methanbakterien von der Darmwand von *Mastotermes darwiniensis* mit Sequenzen aus der Datenbank**

Nr.	Sequenz <sup>a</sup> / Datenbank-Nr.	Nächster Verwandter	Ähnlichkeit <sup>b</sup>
1	FMB3 (AJ243840)	<i>Methanobrevibacter smithii</i>	97% in 288 bp
2	FMB2 (AJ243839)	<i>Methanobrevibacter smithii</i>	97% in 297 bp
3	FMB1 (AJ243838)	<i>Methanobrevibacter smithii</i>	97% in 292 bp
4	FMBK1 (AJ243841)	<i>Methanobrevibacter smithii</i>	97% in 297 bp
5	FMBK6 (AJ243846)	<i>Methanobrevibacter smithii</i>	97% in 287 bp
6	FMBK2 (AJ243842)	<i>Mb. bryantii</i> <sup>d</sup> Stamm RiH2	96% in 299 bp
7	FMBK4 (AJ243844)	<i>Mb. bryantii</i> Stamm RiH2	96% in 287 bp
8	FMBK5 (AJ243845)	<i>Mb. bryantii</i> Stamm RiH2	95% in 290 bp
9	FMBK7 (AJ243847)	<i>Mb. bryantii</i> Stamm RiH2	96% in 281 bp

<sup>a</sup> Alle Sequenzen von direkt von der Darmwand stammenden Bakterien

<sup>b</sup> Sequenzvergleich mit der Nukleotidsequenz-Datenbank EMBL

<sup>c</sup> Klon Cd30, (Ohkuma et al., 1999)

<sup>d</sup> *Mb. bryantii*, *Methanobacterium bryantii*

<sup>e</sup> *Mbb. curvatus*, *Methanobrevibacter curvatus*



### 3.1.3.2 Methanbildungsrate

Die Methanbildungsrate der methanogenen Darmflora von *M. darwiniensis* wurde in Tabelle 8 dargestellt. Es wurde die Methanbildung in 9 Ansätzen mit jeweils 20 Termiten (insgesamt 180 Tieren) nach 3-4 und 8 Stunden gemessen. Es ergab sich ein Mittelwert von 2,35 µg Methan pro Termiten und pro Tag mit einer Standardabweichung von 0,32. Ausgehend von dem Mittelwert und einem durchschnittlichen Termitengewicht von 0,04 Gramm kann man feststellen, dass pro Gramm Termiten ca. 2,6 µg CH<sub>4</sub> pro Stunde produziert wird.

**Tab. 8 Methanbildungsrate von *M. darwiniensis***

Ansatz	Nach 3-4 h		Nach 8 h	
	CH <sub>4</sub> -Produktion µg/Tag	± SA	CH <sub>4</sub> -Produktion µg/Tag	± SA
<i>M. darwiniensis</i>				
1	2,88	0,42	4,00	0,10
2	4,26	0,23	3,99	0,29
3	3,73	0,27	3,51	0,49
4	n.b.	n.b.	1,00	0,29
5	n.b.	n.b.	1,70	0,20
6	4,25	0,40	2,40	0,40
7	2,4	0,20	1,99	0,70
8	n.b.	n.b.	1,10	0,30
9	1,79 (n=1)	n.b.	1,49	–
<b>Mittelwert: 2,35 µg/Tag x Termiten (= 2,6 mg CH<sub>4</sub>/h x Gramm Termiten), ±SA: 0,32</b>				

SA = Standardabweichung, n.b. = nicht bestimmt, n = 3, falls nicht anders angegeben

### 3.1.3.3 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) der Methanbakterien

Für die Identifizierung der Methanbakterien an der Darmwand durch die FISH-Methode wurden fünf verschiedene Cy3 markierten Oligonukleotiden verwendet:

ARCH915 (Tab. 1) spezifisch für alle Archaea,

1178TYIR (Tab. 1, modifiziert nach Shinzato et al., 1999) spezifisch für die beiden Gattungen *Methanobrevibacter* und *Methanobacterium*,

FMBK<sub>2,5</sub>840R spezifisch für die beiden Sequenzen FMBK2 und FMBK5,

FM1045S sowie FM1045B spezifisch für die beiden identifizierten Sequenzgruppen (erste Gruppe: Sequenzen FMB1, FMB2, FMB3, FMBK1 und FMBK6; zweite Gruppe: Sequenzen FMBK2, FMBK4, FMBK5 und FMBK7).

Wie Abb. 13a und b zeigen, lieferten sowohl büschelartige als auch kleine und große, stäbchenförmige Methanbakterien mit Arch915 rote Fluoreszenzsignale. Zur weiteren Absicherung wurde eine Doppelfärbung mit DAPI durchgeführt. Während alle Bakterien mit DAPI blau gefärbt waren, war nur Archaeobakterien mit der Sonde ARCH915 rot gefärbt. Die Hybridisierung mit allen anderen Sonden führte ebenfalls zu Fluoreszenzsignalen, wobei nur kleine und große, stäbchenförmige Zellen rot fluoreszierten. Hierbei wurde auch eine DAPI-Färbung zur weiteren Absicherung durchgeführt (Abb. 13c,d,e und f).

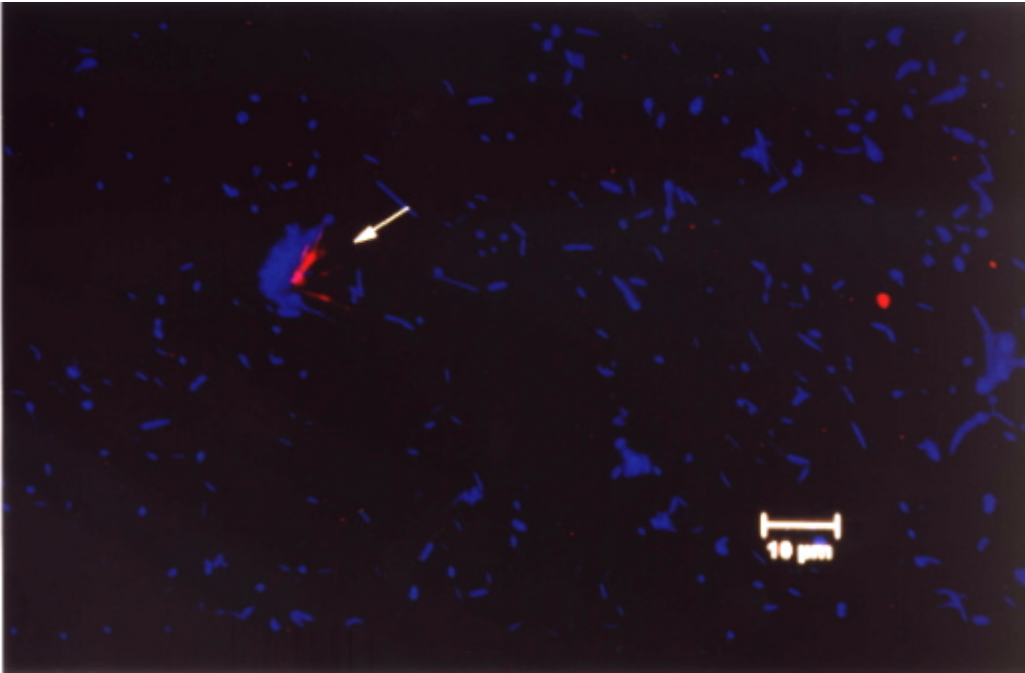


Abb. 13 a

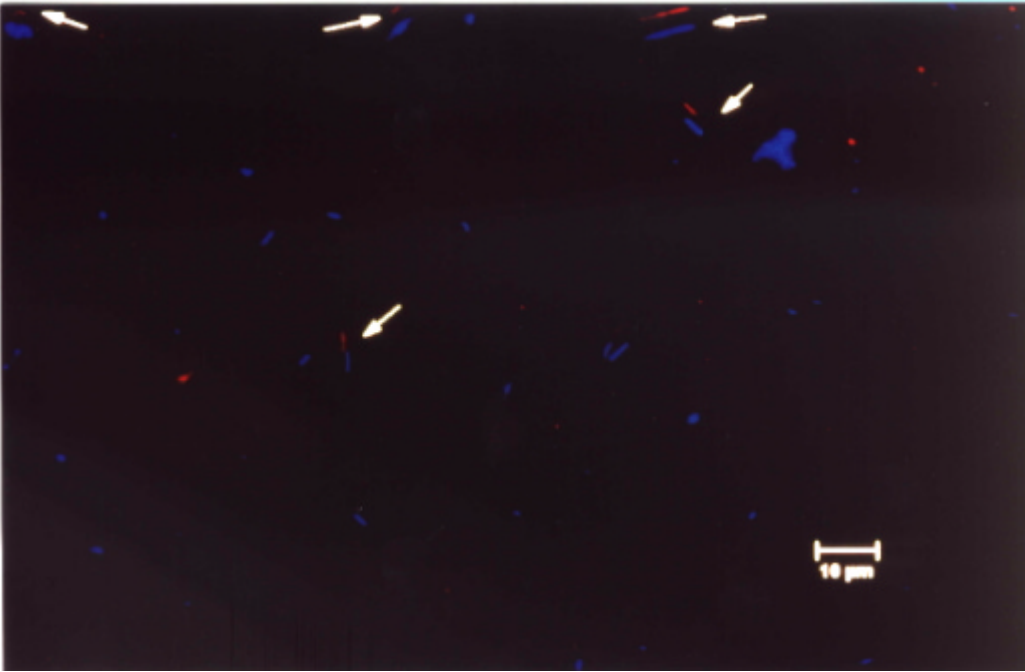


Abb. 13 b

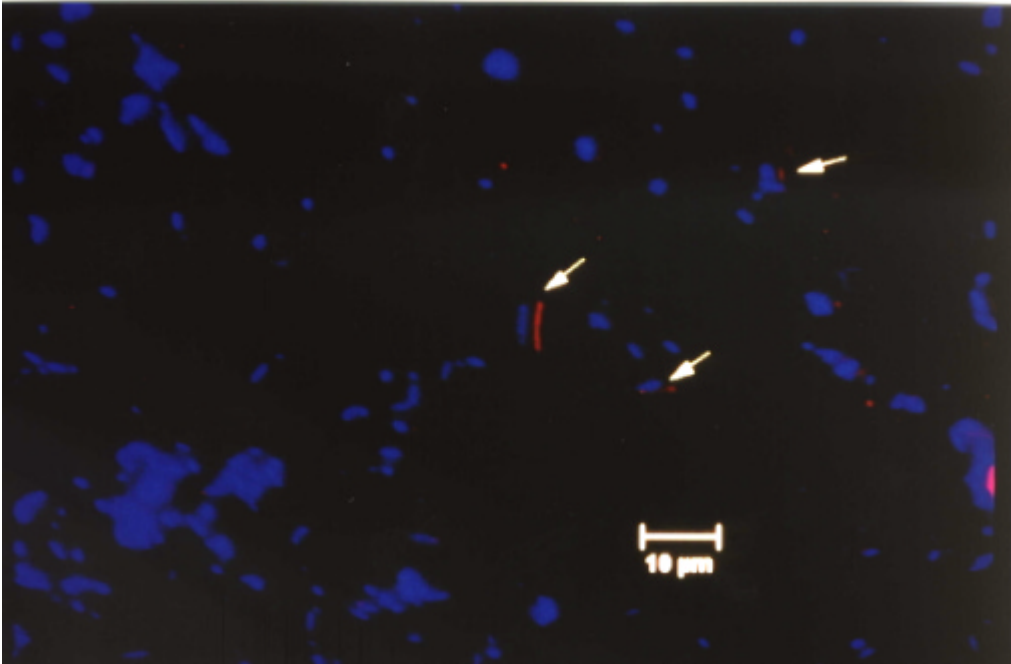


Abb.13 c

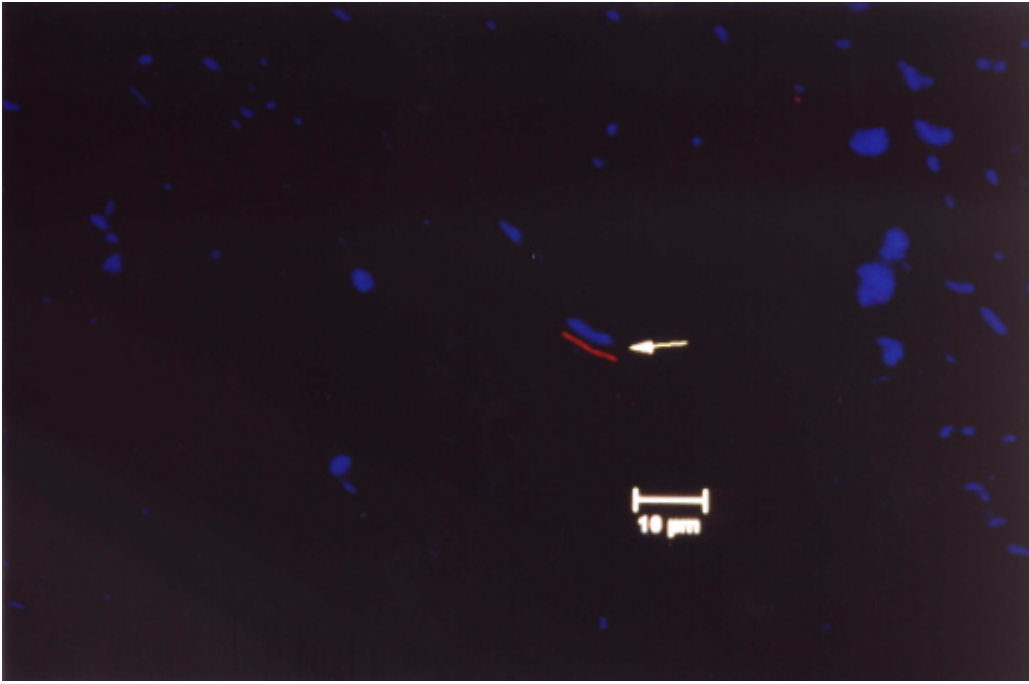


Abb. 13 d

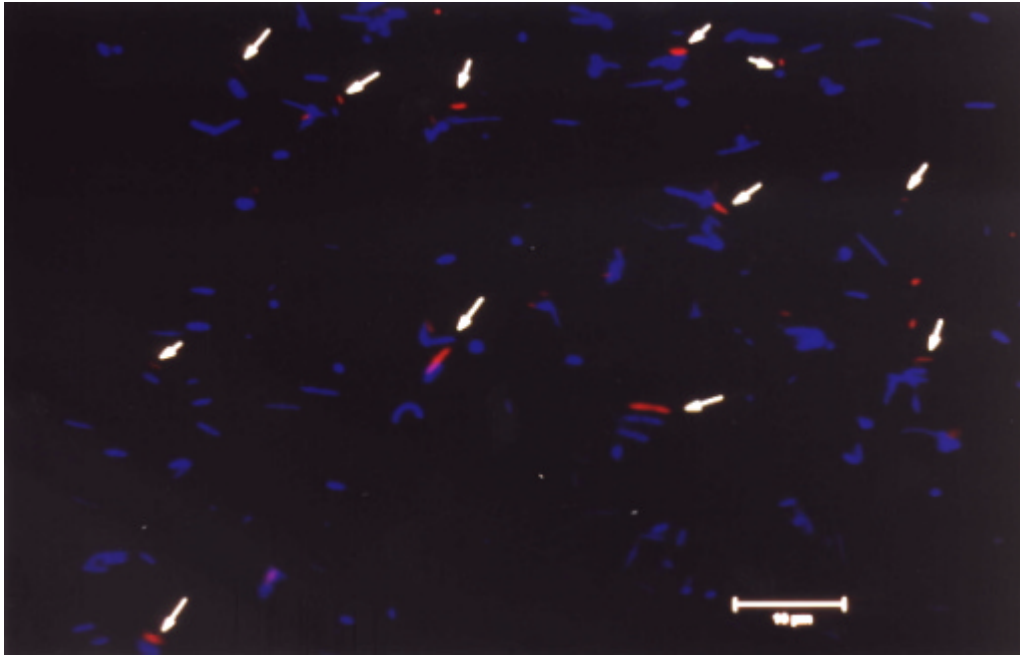


Abb. 13 e

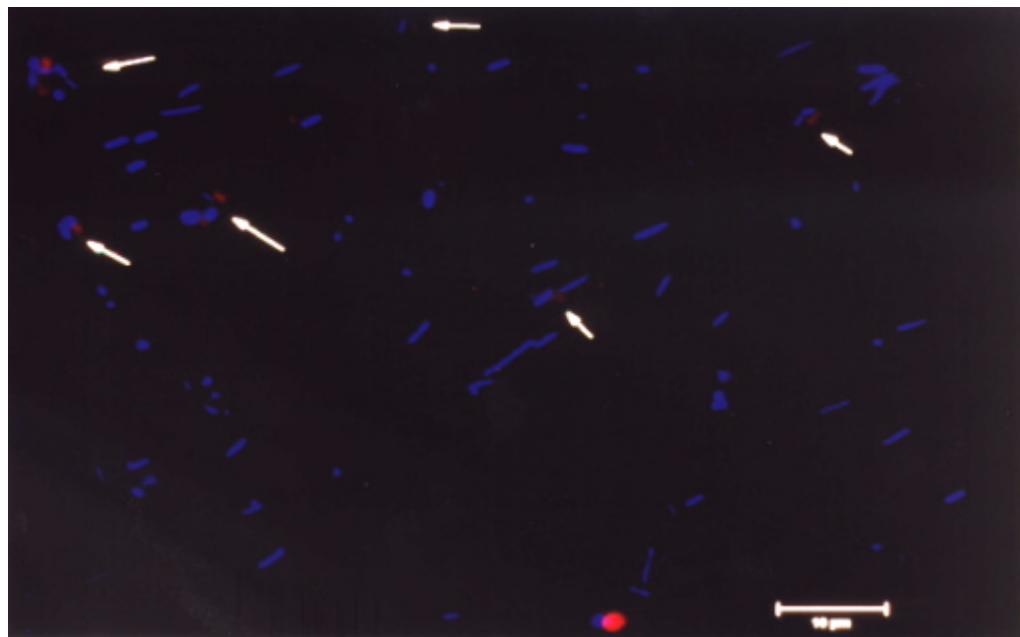


Abb. 13 f

**Abb. 13:** Lichtmikroskopische Aufnahme von Methanbakterien von der Darmwand von *Mastotermes darwiniensis*. (a,b) Epifluoreszenzaufnahme von Methanbakterien nach einer Hybridisierung mit der Sonde ARCH915, (c) 1178TYIR, (d) FMBK<sub>2,5</sub>840R und (e) FM1045S sowie (f) FM1045B. Zellen, die mit der jeweiligen Sonde hybridisieren, zeigen rote Signale. Alle anderen Bakterien sind mit DAPI blau gefärbt. Die blauen und roten Aufnahmen wurden separat gemacht und nachträglich mit leichter Verschiebung überlagert, um Signale deutlicher darzustellen.

## 3.2 Vorkommen von sulfatreduzierenden Bakterien im Darm verschiedener Insekten

### 3.2.1 Phylogenie der Sulfatreduzierer

Nachdem Sulfatreduzierer aus den Gärkammern der Termiten *Cubitermes speciosus* (Termitidae), *Odontotermes obesus* (Macrotermitidae) *Mastotermes darwiniensis* (Mastotermidae), *Heterotermes indicola* (Rhinotermitidae) und der holzfressenden Schabe *Cryptocercus punctulatus* isoliert werden konnten (Fröhlich et al., 1999, Brauman et al., 1990, Kuhnigk et al., 1996, Trinkerl et al., 1990), sollte untersucht werden, wie das Verteilungsmuster von sulfatreduzierenden Bakterien in anderen Insektenarten ist. Die untersuchten Insekten stammten aus unterschiedlichen Habitaten und hatten entsprechend unterschiedliche Ernährungsweisen. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, aus acht Insektenarten sulfatreduzierende Bakterien über ihre 16S rDNA-Sequenzen zu identifizieren. Bei den vier Arten *Baëtis vernus* (Eintagsfliegenlarven,  $3 \times 10^5$  Zellen pro ml), *Nemoura* spec. (Steinfliegenlarven,  $3 \times 10^7$  Zellen pro ml), *Chironomus thummi*-Gruppe (Zuckmückenlarven,  $4 \times 10^9$  Zellen pro ml) und *Pachnoda marginata* (adulte Rosenkäfer,  $7 \times 10^9$  Zellen pro ml) konnten SRB aus Darmpräparationen angereichert werden (Tab. 9). Unterschiedliche Zellzahl und Verteilung von SRB in den Därmen der jeweiligen Insektenarten sind wahrscheinlich auf die differierenden Umwelt- und Ernährungsbedingungen der untersuchten Tiere zurückzuführen.

Die Kultivierung der Stämme erfolgte in Postgate B-Medium und Widdel-Lactat-Medium.

Nach den Verdünnungsansätzen der Kulturen und Inkubation der Kulturen bei 28 °C bzw. 15 °C für mehrere Tage konnte leider keine Reinkultur erhalten werden. Dagegen lagen alle Kulturen als *Citrobacter*-, *Aeromonas*- und *Clostridium*-Kokultur vor. Trotzdem wurden in den erhaltenen Mischkulturen SRB nachgewiesen (Sequenzen FSRO2 und FSO4 aus Libellenlarven, Sequenzen FSCI, FSCII und FSC4 aus Zuckmückenlarven, Sequenz FSPa4-5 aus Rosenkäfern und Sequenz FSB6 aus Eintagsfliegenlarven, Tab. 9). Um die identifizierten Klone anhand ihrer 16S rDNA einer phylogenetischen Untersuchung zu unterziehen, wurden in mehreren PCR-Ansätzen die Eubakterien-spezifischen Primer Eubak5, GC-Eubak5 und der SRB-spezifische Primer SRB385 R eingesetzt (Tab. 1). Die amplifizierte 16S rDNA von SRB wurde dann kloniert und nach erfolgter Plasmidaufreinigung mit dem Primer Eubak5 F sequenziert (Klone: FSCI, FSCII, FSC4, FSPa4-5 und FSB6). Alternativ wurden die Amplifikationsprodukte über DGGE gereinigt und schließlich mit dem Primer Eubak5 F sequenziert (Klone: FSRO2, FSO4 und FSCII).

**Tab. 9 Vorkommen von SRB in verschiedenen Insektendärmen**

Nr.	Name	Habitat	Vorkommen von SRB	Titer [ $ml^{-1}$ ]
1	Libellenlarven, <i>Zygoptera spec.</i>	Teiche, Flüsse <sup>a</sup>	+ (FSRO2, FSO4)	n.b.
2	Eintagsfliegenlarven, <i>Baëtis vernus</i>	Teiche, Flüsse	+ (FSB6)	$3 \times 10^5$
3	Steinfliegenlarven, <i>Perla marginata</i>	Teiche, Flüsse	n.b.	n.b.
4	Feurwanzen, <i>Pyrrhocoris apterus</i>	Linden <sup>b</sup>	n.b.	n.b.
5	Rosenkäfer, <i>Pachnoda marginata</i>	Zoo, Terrarium <sup>c</sup>	+ (FSPa4-5)	$7 \times 10^9$
6	Zuckmückenlarven, <i>Chironomus thymmi</i>	Teiche, Flüsse	+ (FSCI, FSCII, FSC4)	$4 \times 10^9$
7	Feldgrillen, <i>Gryllus bimaculatus</i>	Zoologie, Terrarium <sup>d</sup>	n.b.	n.b.
8	Steinfliegenlarven, <i>Nemoura sp.</i>	Teiche, Flüsse	+	$3 \times 10^7$

+ = Sulfatreduzierer durch Kultivierung nachgewiesen, n.b. = Nicht bestimmt, <sup>a</sup> = Tiere aus verschiedenen Teichen und Flüssen aus verschiedenen Orten in Mainz, <sup>b</sup> = Linden aus Mainz, <sup>c</sup> = Frankfurter Zoo, <sup>d</sup> = Zoologische Institut Universität Mainz

Nach dem Sequenzvergleich von 16S rDNA-Sequenzen der SRB mit Sequenzen aus der Datenbank konnte festgestellt werden, dass die identifizierten Bakterien zu den Gattungen *Desulfovibrio* und *Desulfotomaculum* gehörten. Tabelle 10 zeigt die Sequenzähnlichkeiten der erhaltenen Klone FSRO2, FSO4, FSCI, FSCII, FSC4, FSPa4-5 und FSB6 mit den Sequenzen aus der Datenbank. Die Sequenzen FSRO2 und FSO4 aus Libellenlarven haben 97% bzw. 98% Ähnlichkeit zu *Desulfovibrio desulfuricans* bzw. *Desulfovibrio termitidis*. Die drei Klone FSCI, FSCII und FSC4 aus Zuckmückenlarven sind mit der Sequenz von *Desulfovibrio sp.* Stamm. STL1 (98%, 96% und 97% Ähnlichkeit) verwandt. Die nächste Verwandte der Sequenz FSPa4-5 ist der von Sass et al. (1998) isolierte *Desulfovibrio sp.* Stamm STL6 mit einer Ähnlichkeit von 94%. Schließlich konnte gezeigt werden, dass die Sequenz FSB6 zu der Gattung *Desulfotomaculum* gehört. Klon FSB6 ist mit *Desulfotomaculum halophilum* nah

verwandt (97% Ähnlichkeit). Die Ähnlichkeit der Sequenzen, die zur Gattung *Desulfovibrio* gehören, liegt bei 64,8% bis 98,6% (Tab. 11). Dabei zeigen die Klone FSCI und FSC4 mit 98,6% den höchsten Verwandtschaftsgrad und die beiden Sequenzen FSPa4-5 und FSRO2 weisen mit 64,8% die größten Unterschiede auf.

**Tab. 10 Vergleich von SRB 16S rDNA-Sequenzen aus Darminhalt verschiedener Insekten mit Sequenzen aus der Datenbank**

Nr.	Sequenz/ Datenbank-Nr.	Nächster Verwandter	Ähnlichkeit <sup>e</sup>
1	FSO4 <sup>a</sup> AJ329334	<i>Desulfovibrio termitidis</i>	98% in 322 bp
2	FSRO2 <sup>a</sup> AJ32935	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	97% in 299 bp
3	FSCI <sup>b</sup> AJ32937	<i>Desulfovibrio cuneatus</i> . Stamm STL1	98% in 365 bp
4	FSCII <sup>b</sup> AJ32936	<i>Desulfovibrio cuneatus</i> . Stamm STL1	96% in 308 bp
5	FSC4 <sup>b</sup> AJ32938	<i>Desulfovibrio cuneatus</i> . Stamm STL1	97% in 362 bp
6	FSPa4-5 <sup>c</sup> AJ252167	<i>Desulfovibrio</i> sp. Stamm STL6	94% in 167 bp
7	FSB6 <sup>d</sup> AJ271831	<i>Desulfotomaculum halophilum</i>	97% in 166 bp

<sup>a</sup>) Sequenzen aus Darminhalt von Libellenlarven (*Zygoptera* spec., Odonata)

<sup>b</sup>) Sequenzen aus Darminhalt von Zuckmückenlarven (*Chironomus thummi*, Diptera)

<sup>c</sup>) Sequenz aus Darminhalt von Rosenkäfer (*Pachnoda marginata*, Coleoptera)

<sup>d</sup>) Sequenz aus Darminhalt von Eintagsfliegenlarven (*Baëtis vernus*, Ephemeroptera)

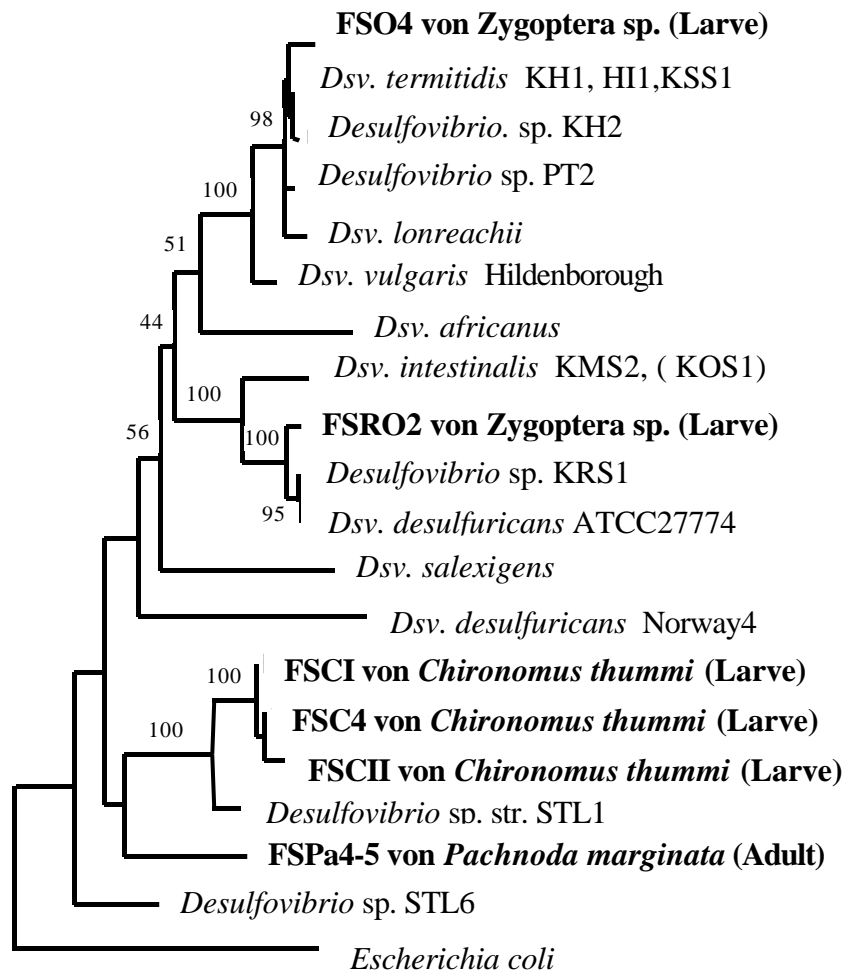
<sup>e</sup>) Sequenzvergleich mit der EMBL- bzw. RDP-Nukleotidsequenz-Datenbank.

**Tab. 11 Ähnlichkeitswerte der 16S rDNA-Sequenzen der isolierten SRB-Stämmen**

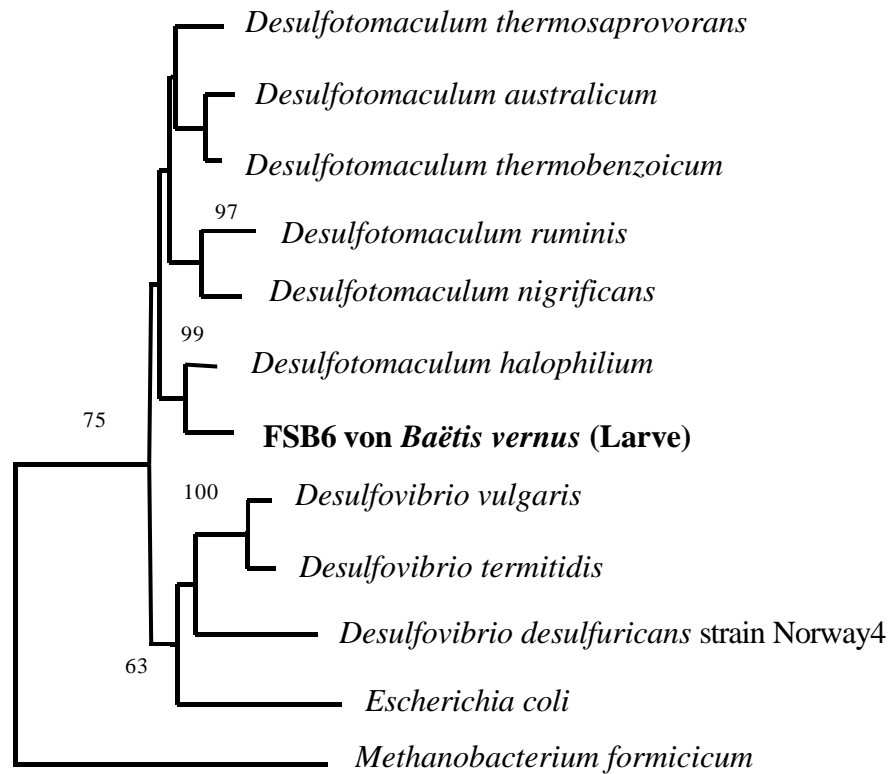
Nr.	Sequenz	Sequenz-länge (bp)	Sequenzähnlichkeit					
			FSO4	FSRO2	FSCII	FSCI	FSC4	FSPa4-5
1	FSO4	326	100,0	86,20	80,30	81,30	81,00	67,60
2	FSRO2	371		100,0	77,50	80,10	79,60	64,80
3	FSCII	319			100,0	97,50	96,60	66,60
4	FSCI	372				100,0	98,60	69,30
5	FSC4	372					100,0	68,90
6	FSPa4-5	178						100,0

Für die anschließende phylogenetische Analyse wurde ein Datensatz von 19 Bakteriensequenzen (*Desulfovibrio*-Arten) und *Escherichia coli* als Außengruppe (Abb. 14)

sowie 11 Prokaryonten (*Desulfotomaculum*-Arten) und *Methanobacterium formicicum* als Außengruppe (Abb. 15) verwendet. Die identifizierten Bakteriensequenzen wurden zu einem Alignment von 6205 bakteriellen 16S rDNA-Sequenzen hinzugefügt. Mit den Programmen DNADIST (Jukes und Cantor, 1969), FITCH (Fitch und Margoliash, 1967), NEIGHBOR (Saitou und Nei, 1987) aus dem PHYLIP-Package (Felsenstein, 1993) wurden phylogenetische Bäume abgeleitet. Der phylogenetische Baum zeigt die Positionen der Klone FSCI, FSCII, FSC4, FSRO2, FSO4 und FSPa4-5 innerhalb verwandter, sulfatreduzierender Bakterien der Gattung *Desulfovibrio* (Abb. 14). Der Baum zeigt, dass der nächste Verwandte zu den Klonen FSCI, FSCII und FSC4 *Desulfovibrio cuneatus* Stamm STL1 ist (98%, 96%, 97% Ähnlichkeit). Als nächstverwandte Arten zu den Sequenzen FSRO2 und FSO4 wurden *Desulfovibrio* sp. Stamm KRS1 (97%) und *Desulfovibrio termitidis* Stamm KH1, HI1, KSS1 mit je 97% und 98% Ähnlichkeit identifiziert. Sequenz FSPa4-5 ist mit 94% verwandt mit *Desulfovibrio* sp. Stamm STL6. Jedoch wurden hier nur 167 bp sequenziert. Abb. 15 zeigt die Position der Sequenz FSB6, die mit *Desulfotomaculum halophilum* zu 97% verwandt ist.



**Abb. 14: Phylogenetischer Stammbaum der Sulfat-reduzierenden Bakterien aus dem Darm von verschiedenen Insekten.** Dieser Baum wurde über die Neighbour-Joining-Methode aus einem Datensatz mit 362 Alignmentpositionen und *Escherichia coli* als Außengruppe errechnet. Die Bootstrapwerte sind an den entsprechenden Verzweigungen angegeben. Der Maßstrich entspricht 10 Austauschen pro 100 Nukleotidpositionen. Dsv. = *Desulfovibrio*.



**0.1**

---

**Abb. 15: Phylogenetischer Stammbaum der Sulfat-reduzierenden Bakterien aus dem Darm von Eintagsfliegenlarven (*Baëtis vernus*).** Dieser Baum wurde über die Neighbour-Joining-Methode aus einem Datensatz mit 376 Alignmentpositionen und *Methanobacterium formicicum* als Außengruppe errechnet. Die Bootstrapwerte sind an den entsprechenden Verzweigungen angegeben. Der Maßstrich entspricht 10 Austauschungen pro 100 Nukleotidpositionen.

### 3.2.2 Sulfatreduktionsraten

Tab. 12 zeigt die Sulfatreduktionsraten der Darmflora der Termiten *M. darwiniensis*, des Rosenkäfers (*Pachnoda marginata*) und die Sulfatreduktionsrate einer *Desulfovibrio intestinalis*-Reinkultur Stamm KMS2. Die Sulfatreduktionsrate ist im Rosenkäfer mit bis zu 18,05 nmol Sulfat/Darm x h am höchsten. Die Aktivität pro Darm bei Rosenkäfern ( $1,2 \times 10^9$  SRB-Zellen/Darm) ist damit 368,37 mal größer als die Aktivität bei der Termiten *M. darwiniensis* ( $10^5$  SRB-Zellen/Darm), die mit Holz gefüttert wurde (0,049 nmol/Darm x h), obwohl das Darmvolumen der Rosenkäfer (173 µl) nur 17,3 mal größer ist als das Darmvolumen von *M. darwiniensis* (10 µl). Die Termiten, die mit der Nahrung zusätzlich  $\text{CaSO}_4$  aufgenommen haben, zeigen eine Sulfatreduktionsrate von 0,134 nmol/Darm x h. Die Aktivität pro Darm bei diesen Termiten ist folglich 2,73 mal größer als die Aktivität von nur mit Holz gefütterten Termiten. Wenn man die Sulfatreduktionsrate pro  $10^7$  Bakterien errechnet, kann die Sulfatreduktionsraten von Holz gefütterten Termiten, Rosenkäfern und *Dsv. intestinalis* miteinander verglichen werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Aktivität pro  $10^7$  Bakterien in mit Holz gefütterten Termiten (4,9 nmol/ $10^7$  Bakterien x h) am höchsten ist.

**Tab. 12 Sulfatreduktionsrate von SRB aus dem Termiten-Darm, *Mastotermes darwiniensis*, dem Rosenkäfer-Darm und der Reinkultur von *Dsv.intestinalis* (KMS2)**

	Darm- Volumen	Zellen/ Darm	Aktivität/Darm nmol/Darm x h	Aktivität/ml nmol/ml x h	Aktivität/ $10^7$ Zellen nmol/ $10^7$ Bakterien x h
<b>Termite<sup>a)</sup></b>	10 µl	$10^5$	0,049	4,9	4,9
<b>Termite<sup>b)</sup></b>	10 µl	n.b. <sup>d)</sup>	0,134	13,4	n.b. <sup>d)</sup>
<b>Rosenkäfer</b>	173 µl	$1,2 \times 10^9$	18,05	104,3	0,15
<b><i>Dsv. Intestinalis</i><sup>c)</sup></b>	-	-	-	1,36	0,2-0,7

<sup>a)</sup> Termiten, die mit Holz gefüttert wurden, <sup>b)</sup> Termiten, die mit der Nahrung zusätzlich  $\text{CaSO}_4$  aufgenommen haben, 22 Tage

<sup>c)</sup> Reinkultur von *Desulfovibrio intestinalis* Stamm KMS2, <sup>d)</sup> n.b. nicht bestimmt

## 4 Diskussion

### 4.1 Methodik

Die enormen Fortschritte in der Molekularbiologie und der Gentechnologie haben ihren Niederschlag in der mikrobiellen Taxonomie gefunden. Mit der 16S rRNA-Analyse besaß man bereits vor 20 Jahren eine Methoden, um Mikroorganismen zu charakterisieren und zu systematisieren. Das Ziel dieser 16S rRNA-Analyse bestand darin, einen möglichst großen Teil der genetischen Information dieses Moleküls zu erhalten, ohne eine Totalsequenzierung der rRNA durchführen zu müssen. Mittlerweile ist es Standard, die 16S rDNA zu sequenzieren. In dieser Arbeit wurde neben der üblichen Identifizierungstechnik durch Isolierung einer Reinkultur mit anschließenden physiologischen und biochemischen Untersuchungen ein molekularbiologisch-phylogenetischer Ansatz über die Analyse von 16S rRNA-Gene gewählt. Die 16S rRNA-Gene haben den großen Vorteil, dass sie sehr konservative Sequenzbereiche besitzen, die bei allen Bakterien erhalten sind und daher geeignete Primerbindungsstellen darstellen, um entsprechende Sequenzabschnitte zu amplifizieren. Mit der PCR können auch kürzere, variable Abschnitte der entsprechenden 16S rRNA-Gene amplifiziert und als spezifische Hybridisierungssonden verwendet werden. Die Gensonden bieten eine schnelle und verlässliche Methode, um Mikroorganismen ohne vorherige Kultivierung auf unterschiedlichem taxonomischem Niveau zu identifizieren. Mit der PCR sollte es möglich sein, einen einzelnen Mikroorganismus nachzuweisen. Gensonden sind hilfreich bei Nachweis und Identifizierung langsam wachsender oder schwierig zu kultivierender Organismen. Da die meisten Bakterien bisher nicht kultiviert werden konnten, wurden sie dann nach Klonierung und Sequenzierung ihrer 16S rRNA-Gene sowie durch *in situ*-Hybridisierung mit spezifischen Gensonden phylogenetisch charakterisiert. Dies hat vor allem bei Mikroorganismen noch den Vorteil gegenüber einer phänotypischen Charakterisierung, dass genotypische Merkmale eines Organismus, d.h. die Nukleotidabfolge des rRNA-Gene unabhängig von den Umgebungsbedingungen konstant und eindeutig sind. Trotz dieser Vorteile gibt es auch kritische Punkte bei der genotypischen Charakterisierung von Mikroorganismen. Da sehr viele Faktoren eine erfolgreiche Amplifikation und Hybridisierung beeinflussen können, sind somit umfangreiche Optimierungsversuche notwendig. Doch es können sowohl in den Schritten der Sequenzpräparation (Extraktion, Amplifikation, Klonierung, Sequenzierung) als auch in der Sequenzdetektion (Hybridisierung) Probleme auftreten. So gilt seit Liesak et al. (1991) die Bildung von rRNA-Sequenzchimären als nicht vernachlässigbares Risiko für Untersuchungen aus

Mischpopulationen. Je mehr DNA-Fragmente mit ähnlicher Primärstruktur in dem Untersuchungsansatz vorliegen, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit der Chimärenbildung.

Die Untersuchungen von Clayton et al. (1995) zeigen, dass sich die 16S rRNA-Gene eines Organismus bzw. verschiedener Stämme einer Spezies bis zu 1% unterscheiden, da fast alle Organismen mehrere 16S rRNA-Gene mit geringfügig unterschiedlichen Sequenzen besitzen. Stackebrandt und Goebel (1994) haben einen vorläufigen Grenzwert für die Artabgrenzung von 2% Sequenzunterschied vorgeschlagen. Die Charakterisierung von Mikroorganismen über die Analyse ihrer 16S rRNA-Gene scheint somit die leistungsfähigste unter den derzeit zur Verfügung stehenden Methoden zu sein.

Ziel dieser Arbeit war es, symbiotische Mikroorganismen von der Darmwand der Termiten *Mastotermes darwiniensis* bzw. Sulfat-reduzierende Bakterien in verschiedenen Insekten anhand ihrer 16S rDNA-Sequenz zu identifizieren.

## **4.2 Phylogenetische Charakterisierung symbiotischer Bakterien an der Darmwand von *Mastotermes darwiniensis***

Die Bakterien sind im Ökosystem Termitendarm neben Flagellaten die weitaus wichtigste mikrobielle Komponente. Im Termitendarm befinden sich eine Vielzahl sowohl aerober als auch fakultativ anaerober und strikt anaerober Bakterien (Breznak und Brune, 1994; Varma et al. 1994). Es gibt Dutzende von Arten, von denen viele noch gar nicht charakterisiert und klassifiziert sind. Die Analyse der symbiotischen Mikroorganismen stößt oft auf große Schwierigkeiten, da es in der Regel nicht einfach ist, die verschiedenen Organismen zu isolieren, sie in Reinkultur zu züchten und schließlich zu identifizieren (Breznak, 1982; Cruiden und Markovetz, 1987). Der Bakterientiter im Termitendarm liegt zwischen  $10^7$  und  $10^9$  Bakterien pro ml Darminhalt (Kuhnigk, 1996). Sie wurden von Breznak, (1982) mit  $10^5$ - $10^7$  Zellen pro Darm sowohl freilebend als auch an der Darmwand haftend angegeben. Seit langem ist bekannt, dass Termiten ihre Nahrung, die oft aus Holz besteht, nur mit Hilfe von symbiotischen Bakterien und Protozoen verdauen können. Ohne ihre Symbionten würden sie verhungern (Breznak, 1982; Odelson und Breznak, 1983). Meist ist die Funktion der assoziierten Bakterien unbekannt. Sie scheinen generell jedoch weniger Parasiten zu sein, sondern sind vielmehr an der Ernährung ihrer Wirte beteiligte Symbionten.

Von Kuhnigk (1996) sind eine Reihe von Bakterien aus Darminhalt von *Mastotermes darwiniensis* isoliert worden. Die isolierten Stämme konnten in sieben verschiedene „Bakteriengruppen“ eingeteilt werden. Dazu zählen Enterobakterien, Gram-negative strikt aerobe Bakterien (Pseudomonaden), *Bacillus*-Arten, strikt anaerobe *Clostridien*-Arten,

coryneforme Bakterien (Cellulomonaden), Gram-positive Kokken (Streptokokken) und die letzte Gruppe bilden die Streptomycceten.

Von den Sulfat-reduzierenden Bakterien konnten bisher insgesamt 4 Arten aus dem Termitendarm kultiviert und identifiziert und der Gattung *Desulfovibrio* zugeordnet werden (Braumann et al., 1990; Trinkerl et al., 1990; Kuhnigk et al., 1996; Fröhlich et al., 1999).

Berchtold (1995) und Berchtold und König (1996) konnten ebenfalls aus dem Darminhalt von *Mastotermes darwiniensis* neben unkultivierbaren Spirochaeten zusätzlich zu den kultivierten Arten auch *Bacteroides*- und *Mycoplasma*-ähnliche Organismen nachweisen, die bis jetzt noch nicht aus Termiten isoliert werden konnten. Von Ohkuma und Kudo (1996) wurde die phylogenetische Diversität bakterieller Symbionten im Darm weiterer Termiten durch 16S rRNA Sequenzanalysen dargestellt. Bei der vorliegenden Arbeit wurde erstmals versucht, die Darmwand-Bakterien von *Mastotermes darwiniensis* über Kultivierung und parallel dazu nicht-kultivierte Bakterien über 16S rDNA-Analyse zu identifizieren.

#### **4.2.1 Phylogenetische Charakterisierung der kultivierbaren symbiontischen Darmwand-Bakterien von *Mastotermes darwiniensis***

Ausgehend von erhaltenen Reinkulturen konnten fünf Bakterienstämme FZ1, FZ4, FZ5, Z2 und FZ- über ihre 16S rRNA identifiziert werden. Die Stämme zeigen keine konstitutionelle Cellulase-Aktivität, während alle Stämme mit Ausnahme von Stamm FZ5 Katalase- und Amylase-Aktivität zeigen. Abb. 3 und Tab. 2 zeigen die nächsten Verwandten zu den identifizierten Bakterien. Stamm FZ1 ist mit 97% Ähnlichkeit zu *Cellulomonas cellulans* am ähnlichsten. Dadurch kann man diese Bakterien zu den Gram-positiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt zuordnen, da der GC-Gehalt bei Arten der Gattung *Cellulomonas* bei ca. 76,6% liegt. FZ1 sind Gram-positive Kokken, die keine konstitutionelle Cellulase-Aktivität zeigen, obwohl die Gattung *Cellulomonas* sicherlich am Cellulose- und Hemicelluloseabbau beteiligt ist. *Cellulomonas* spec. wurde schon von Kuhnigk et al. (1994) aus dem Darminhalt von *M. darwiniensis* und auch aus anderen Termiten isoliert.

Die Zellen von Stamm FZ4 sind Gram-positive Kokken und mit *Streptococcus bovis* (Ähnlichkeit von 95%) verwandt. Diese Bakterienzellen gehören zu den Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt. Bis jetzt wurde *Streptococcus* spec. nicht nur in dieser Arbeit aus dem *Mastotermes darwiniensis*-Darm von isoliert, sondern mehrere Autoren haben diese Bakterien im Termitendarm gefunden (Tholen und Brunne 1997; Kuhnigk et al., 1994; Potricus und Breznak, 1980a,b).

Die Zellen von Stamm FZ5 sind Kokken, die meist kettenförmig vorkommen. Der nächste Verwandte zu diesen Bakterien ist *Leuconostoc citreum* mit einer Ähnlichkeit von 96%. Die isolierten Bakterien sind heterofermentative Milchsäurebakterien, die zu den Gram-positiven Kokken mit niedrigem GC-Gehalt gehören. Die Zellen zeigten keine Katalase-, Amylase- und Cellulase-Aktivität. Physiologische Experimente von FZ5 zeigen, dass die isolierte Bakterien sich in verschiedenen Eigenschaften wie Säurebildung bzw. Wachstum auf verschiedenen Zuckern wie Fructose, Maltose und Lactose von *Leuconostoc citreum* unterscheiden (Tab. 4, Farrow et al., 1989). Von Schultz und Breznak (1978) und Kuhnigk et al. (1994) wurden auch mehrere stäbchen- und kokkenförmige Milchsäurebakterien wie *Lactobacillus spec.* bzw. *Lactococcus*-Arten aus verschiedenen Termitendärmen isoliert.

Die Zellen von Stamm Z2 wachsen mycelartig und sind zu *Streptomyces griseus* (Ähnlichkeit 98%) am ähnlichsten und werden deshalb den Gram-positiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt zugeordnet. *Streptomyceten* wurden auch von anderen Autoren im Termitendarm gefunden (Schäfer, 1993; Bignell et al., 1991; Mannesmann und Piechowski, 1989; Kuhnigk et al., 1994). Bei diesem Isolat konnte keine Cellulase-Aktivität festgestellt werden, während Kuhnigk et al. (1996) äußerten, dass einige isolierte *Streptomyceten* aus dem Termitendarm in der Lage waren, native Cellulose abzubauen und möglicherweise zu einem gewissen Grade zum Ligninabbau befähigt sind.

Stamm FZ- gehört zur Gattung *Burkholderia* (ehemals *Pseudomonas*) und ist zur *Burkholderia cepacia* (*Pseudomonas cepacia*) am ähnlichsten (Ähnlichkeit 100 %). Diese strikt aeroben Bakterienzellen gehören zu den Gram-negativen Proteobakterien. Verschiedene Autoren berichten auch von der Isolierung von *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonaden* und verwandten Gattungen aus dem Termitendarm (Kuhnigk et al., 1994; Mannesmann und Piechowski, 1989; Schäfer, 1993).

Die 16S rRNA-Sequenzen aller in der vorliegenden Arbeit isolierten Bakterien weisen mehr als 95% Sequenzähnlichkeit zu bekannten sequenzierten Organismen aus der Datenbank auf. Möglicherweise handelte es sich bei den beiden Stämme Z2 und FZ-, die zu *Streptomyces griseus* und *Burkholderia cepacia* 98% bzw. 100% ähnlich sind, um Stämme dieser Arten. Doch bei den anderen drei Stämmen FZ1, FZ4 und FZ5 ist trotz hoher Sequenzähnlichkeit zwischen 95%-97% zu bekannten Datenbank-Organismen eine weitere physiologische, biochemische als auch molekularbiologische Untersuchung notwendig. Das gilt besonders für Stamm FZ5, der mit *Leuconostoc citreum* (96%) verwandt ist, aber aufgrund physiologischer Unterschiede vermutlich eine eigene Art bildet.

Bei der Isolierung von cellulolytischen Bakterien kamen viele Autoren zu verschiedenen Ergebnissen. Bis heute wurden völlig unterschiedliche Thesen vertreten. Cleveland (1924) berichtete, dass in niederen Termiten Cellulose in der Gärkammer durch symbiontische Flagellaten abgebaut wird. Versuchen von Wenzel et al. (2000) zeigten, dass die niederen Termiten unabhängig von Flagellaten, Cellulose abbauen können. Breznak (1984), Martin und Martin (1978,1979) haben berichtet, dass in höheren Termiten diese Aufgabe durch symbiontische Bakterien oder bei pilzkultivierenden Arten durch die symbiontischen Pilze übernommen, da sie keine Flagellaten im Darm besitzen. Andere Autoren sind der Meinung, dass die Cellulasen in den Speicheldrüsen und dem Mitteldarm durch die Termiten selbst sezerniert werden und Bakterien für den Celluloseabbau im Termitendarm nur eine untergeordnete Rolle spielen (Breznak, 1984; Slaytor, 1992). Die kompetentesten bakteriellen Celluloseabbauer sind *Cellulomonas*- und *Streptomyces*-Arten, die von einigen Autoren aus dem Termitendarm isoliert wurden (Kuhnigk 1996, Mannesmann und Piechowski 1989). Eine Reihe von diesen isolierten Stämmen waren in der Lage, Cellulose abzubauen. Die in dieser Arbeit isolierten Stämme FZ1 (*Cellulomonas cellulans*-ähnliche Bakterien) und Z2 (*Streptomyces griseus*-ähnliche Bakterien) waren nicht in der Lage, Cellulose konstitutiv abzubauen. Kuhnigk et al. (1996) haben cellulolytische Bakterien aus dem *Mastotermes darwiniensis*- Darm isoliert und berichteten, dass etwa 1-10% der Gesamtbakterienzahl aus cellulolytischen Bakterien bestehen (=  $10^3$ – $10^4$  cellulolytische Bakterien pro Darm).

Als strikt aerobe Organismen dürften alle diese Isolate nur an der Darmwand lokalisiert sein oder aber in unmittelbarer Nähe der Darmwand im sonst anaeroben Termitendarm überleben.

Bei diesen isolierten Bakterien stellt sich die Frage, inwieweit es sich dabei um darmspezifische Arten handelt. Kuhnigk *et al.* (1996) äußerten, dass bei manchen Isolaten, insbesondere bei den sporenbildenden *Streptomyces*-Arten, die Möglichkeit besteht, dass sie nur deshalb im Darm nachgewiesen werden konnten, weil sie zusammen mit der Nahrung aufgenommen worden waren.

#### **4.2.2 Phylogenetische Charakterisierung der nicht kultivierbaren Darmwand-Bakterien von *Mastotermes darwiniensis***

Obwohl die allgemeine phylogenetische Diversität bakterieller Symbionten im Darminhalt von verschiedenen Termiten nach Untersuchungen von Berchtold (1996), Kuhnigk (1996) oder Ohkuma und Kudo (1996) in Ansätzen bekannt ist, war unklar, welche Bakterienarten an der Darmwand von *Mastotermes darwiniensis* vorkommen. Tab. 5 und der Stammbaum in Abb. 3 zeigen die in dieser Arbeit erhaltenen Sequenzen und ihr phylogenetische Stellung.

Über die 16S rDNA-Sequenzanalyse wurden 25 verschiedene Bakterien-Arten von der Darmwand von *Mastotermes darwiniensis* identifiziert. Die identifizierten Bakterien können in sechs verschiedene Bakteriengruppen eingeteilt werden.

Die erste Gruppe bilden Gram-positive Bakterien mit hohem GC-Gehalt (Abb. 5). Alle drei identifizierten Sequenzen sind zu *Microlunatus phosphovorus* (> 90%) am ähnlichsten (Tab. 5). *Microlunatus phosphovorus* ist ein aerobes Gram-positives Bakterium, das aus Schlamm isoliert worden ist (Nakamura et al., 1995) und mit den Gattungen *Nocardia* und *Arthrobacter* sehr eng verwandt ist. Kuhnigk et al., (1996) konnten auch *Nocardia*- bzw. *Arthrobacter*-Arten aus dem Darm von Termiten isolieren.

Die zweite Gruppe bilden Gram-positive Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt. Die meisten von den identifizierten Sequenzen gehören zu den *Clostridium*-ähnlichen Bakterien allerdings mit Sequenzähnlichkeiten von weniger als 90% zu bekannten Bakterienarten aus der Datenbank (Tab. 5). Von Kuhnigk et al. (1994, 1996) und Branke (1997) wurden auch *Clostridium spec.* aus *Mastotermes darwiniensis*- bzw. *Neotermes spec.*-Darminhalt isoliert. Abb. 6 zeigt die erhaltenen Sequenzen und ihre phylogenetischen Positionen.

Die dritte Gruppe bilden Gram-negative anaerobe Fusobakterien-ähnliche Bakterien. Alle drei in der vorliegenden Arbeit identifizierten Sequenzen sind zu *Fusobacterium necrophorum* (Ähnlichkeit 88%-92%) am ähnlichsten (Tab. 5 und Abb. 7). *Fusobacterium spec.* wurden auch von Schultz und Breznak (1978) aus dem *Reticulitermes flavipes*-Darm isoliert. Außerdem wurde *Fusobacterium varium* im Darm der Schabe *Blatta orientalis* und der Termiten *Reticulitermes lucifugus* nachgewiesen (Moore et al., 1984).

Die vierte Gruppe bilden die Bakterien, die zu den Proteobakterien gehören (Tab. 5, Abb. 8). Dazu gehört als einzige Sequenz FM45, die zu *Thauera selenatis* mit einer Ähnlichkeit von 93% am ähnlichsten ist und dadurch zur Beta-Gruppe der Proteobakterien zugeordnet werden kann. Auf Grund der phänotypischen Eigenschaften war *Thauera selenatis* früher als *Pseudomonas sp.* klassifiziert worden. Aus dem Darminhalt verschiedener Termiten z.B. *M. darwiniensis* wurden von einigen Autoren auch Bakterien aus der Gattung *Pseudomonas* isoliert (Kuhnigk et al., 1996; Mannesman und Piechowski, 1989).

Die fünfte Gruppe, bestehend aus 4 Sequenzen, gehört zu den Verrucomicrobien (Tab. 5). *Verrucomicrobium* wurde von den Proteobakterien abgespalten und als eigene Bakteriengruppe definiert (Janssen et al., 1997). Diese Zellen wurden aus Reisfeldern isoliert. Sie sind strikt fermentative, Gram-negative Bakterien, die Sauerstoff tolerieren können und werden als „dwarf cells“ bezeichnet, da die Zellen sehr klein sind. Sie verwerten keine Cellulose. Die phylogenetische Stellung der identifizierten Sequenzen der Proteobakterien- bzw. Verrucomicrobium-Gruppe ist in Abb. 8 dargestellt.

Die sechste Gruppe bilden die *Bacteroides*-Arten. Dazu gehören insgesamt neun Sequenzen. Die meisten dieser Sequenzen weisen mehr als 90% Sequenzähnlichkeit zu *Bacteroides forsythus* auf (Tab. 5 und Abb. 9). Verschiedene Autoren haben auch *Cytophaga/Bacteroides* ähnliche Bakterien aus verschiedenen Termiten nachgewiesen (Berchtold et al., 1996; Potricus und Breznak, 1980; Ohkuma und Kudo, 1996; Branke, 1997).

Ähnliche Ergebnisse finden sich bei Ohkuma und Kudo (1996) und Berchtold et al. (1996), wobei die von o.g. Autoren identifizierten Bakterien aus dem Darminhalt der Termiten *Reticulitermes speratus* und *Mastotermes darwiniensis* in vier Hauptbakteriengruppen eingeordnet wurden: Proteobakterien, Spirochaeten, *Cytophaga/Bacteroides*-Gruppe und Gram-positive Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt. In der vorliegenden Arbeit konnten keine Spirochaeten an der Darmwand gefunden werden. Diese auffälligen, großen, sich frei im Darmmilieu bewegend Spirochaeten scheinen auch nach mikroskopischem Befund nicht an der Darmwand angeheftet zu sein. Unter den Bakterien aus dem Darminhalt sind die Spirochaeten die auffälligsten Symbionten in Termiten. Spirochaeten sind durch ihre Schraubenform und die periplasmatisch lokalisierten Flagellaten klar von anderen Prokaryonten abgrenzbare Mikroorganismen (Canale-Parola, 1984; Cleveland und Grimstone, 1964; To et al., 1978). Ektobiontische Spirochaeten können zur Bewegung ihres Wirtsflagellaten beitragen, wie es bei dem großen Flagellaten *Mixotricha paradoxa* der Fall ist (Margulis et al., 1979).

Auf der anderen Seite konnten in der vorliegenden Arbeit Gram-positive Bakterien mit hohem GC-Gehalt an der Termitendarmwand nachgewiesen und identifiziert werden (*Micrococcus phosphovorus*-ähnliche Bakterien), wie es bei Kuhnigk et al. (1994, 1996) der Fall ist (*Arthrobacter*-, *Nocardia*- und *Cellulomonas*-Arten). Da die meisten Bakterienarten strikt aerob sind, dürften diese Arten vorwiegend an der Darmwand vorkommen. Bei den strikt anaeroben Bakterien wie *Fusobakterien*-ähnliche Bakterien bzw. *Bacteroides*-Arten, die in

dieser Arbeit an der Darmwand von *M. darwiniensis* identifiziert wurden, handelt es sich möglicherweise um Bakterien, die den geringen Sauerstoff-Partialdruck an der Darmwand tolerieren können, da z.B. in der Nähe der Darmwand ständig Sauerstoff von aeroben Bakterien verbraucht wird.

Wenn man alle bis jetzt identifizierten Bakterien aus dem Termitendarminhalt bzw. der Termitendarmwand vergleicht, sieht man, dass im Termitendarm zahlreiche neuartige Bakterienarten, -gattungen und -familien vorhanden sind, die durch heutige Kultivierungstechniken keiner physiologischen und biochemischen Analyse zugänglich gemacht werden konnten. Meist ist die Funktion der assoziierten Bakterien unbekannt. Dass sie eine bedeutende Rolle im Abbau der Holzpartikel wie Cellulose, Hemicellulose und Lignin besitzen, ist zu vermuten (Wenzel et al., 2000; Varma et al., 1994; Breznak und Brune, 1994; Slaytor, 1992). Buchner (1953) berichteten, dass der Nutzen einer solchen Symbiose für den Wirt darin liegt, dass schwerverdauliche oder giftige Nahrung durch die Symbionten aufgeschlossen wird. Das komplexe, noch immer Rätsel aufgebende Zusammenspiel von Wirt, Flagellaten und Bakterien weckt daher weiterhin das Interesse an weiteren Untersuchungen zur Zusammensetzung der Bakterienflora im Termitendarm.

#### **4.2.3 Phylogenetische Charakterisierung symbiontischer Methanbakterien an der Darmwand von *Mastotermes darwiniensis***

Möglicherweise existieren Methanbakterien schon seit 3-4 Milliarden Jahren. In strikt anaeroben Nischen konnten sie bis heute überleben. Man unterscheidet 3 Biotope:

- Süß- und Meerwassersedimente, Faulschlamm sowie sich zersetzendes Holz und Moorboden.
- Verdauungstrakte von Wirbeltieren und Insekten.
- Thermalquellen (König 1986).

Untersuchungen an über 100 verschiedenen Arthropoden-Arten aus unterschiedlichen Ordnungen zeigen, dass Symbiosen zwischen Arthropoden und Methanbakterien recht selten sind (Hackstein und Stumm, 1993, Stumm und Hackstein 1994). Nur Tausendfüßer (Diplopoden), Schaben, Termiten und Blattkäfer produzieren Methan, während andere Arthropodengruppen wie Asseln, Silberfischchen, Bockkäfer, aber auch Grillen, Heuschrecken oder Schmetterlingsraupen kein Methan abgeben. Da viele dieser Nichtproduzenten ebenso Pflanzen oder Detritus fressen wie die Methanproduzenten, kann die Art der Nahrung nicht von ausschlaggebender Bedeutung für eine Symbiose mit Methanbakterien sein. So produzieren alle bisher untersuchten Termitenarten Methan, auch solche Arten, die sich von

Pilzen ernähren, die sie in ihren Staaten züchten (Brauman et al. 1992). Außerdem ergab die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der methanproduzierenden Arthropoden, dass sich die Methanbakterien in verschiedenen Abschnitten des Darmkanals der Wirtstiere befanden. Diese Darmabschnitte sind komplexe mikrobielle Ökosysteme, die am Aufschluss des Nahrungsbreies beteiligt sind. Verschiedene Experimente zeigen, dass die Methanbakterien im Termitendarm sowohl als Endo- und Ektosymbionten von Flagellaten als auch als freie Organismen im Darm und am Darmepithelium vorkommen (Fröhlich et al., 1999; Leadbetter und Breznak, 1996). Insgesamt unterscheidet man sechs Morphotypen: die erste Gruppe enthält mittellange bis lange büschelförmige Bakterien, die sich zu Ketten zusammenlagern können (*Methanobacterium*). Eine zweite Gruppe umfasst Gram-positive Bakterien, die aber kurze Stäbchen bis kokkoide Formen ausbilden (*Methanobrevibacter*). Die dritte Variante bilden geschwungene filamentöse Formen (*Methanosprillum*). *Methanosarcina* ist ein Beispiel für einen weiteren Typ. Diese Zellen können sich zu riesigen Zellpaketen zusammenlagern. Eine fünfte morphologische Form stellen Gram-negative, mehr oder weniger regelmäßige kokkoide Bakterien dar (*Methanlobus tindarius*). Erythrocyten-förmige Bakterien bilden die sechste morphologische Variante (*Methanococcus*) (König 1986).

In der vorliegenden Arbeit wurden Methanbakterien an der Darmwand der holzfressenden, niederen Termiten *M. darwiniensis* (Mastotermitidae) identifiziert. Durch ihre Autofluoreszenz konnten stäbchen- bzw. fadenförmige Methanbakterien an der Darmwand von *M. darwiniensis* nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich auch, dass die Methanbakterien an der Darmwand nicht gleichmäßig verteilt sind. Alle identifizierten Methanbakterien von der *M. darwiniensis*-Darmwand gehören zur Familie Methanobacteriaceae und können den Gattungen *Methanobrevibacter* oder *Methanobacterium* zugeordnet werden. Die identifizierten Sequenzen sind zu *Methanobrevibacter smithii* und *Methanobacterium bryantii* ähnlich. Bis jetzt wurden Methanbakterien in verschiedenen niederen Termiten identifiziert, die meistens zur Gattung *Methanobrevibacter* gehören. *Methanobrevibacter curvatus* und *Methanobrevibacter cuticularis* wurden aus der niederen Termiten *Reticulitermes flavipes* isoliert (Leadbetter und Breznak, 1996). Klon Cd30 wurde von Ohkuma und Kudo (1998) aus der niederen Termiten *Cryptotermes domesticus* identifiziert. Schließlich konnten auch aus der niederen Termiten *Hodotermopsis sjostedti* und *Reticulitermes speratus* Methanbakterien identifiziert werden, die zur Familie Methanobacteriaceae (Ohkuma et al., 1999 und 1995) gehören. Weiterhin zeigten Fröhlich und König (1999), dass verwandte methanogene Arten als Endo- bzw. Ektosymbionten der Darmflagellaten *Pentatrachomonoides scroa* bzw. *Oxymonas* sp. in verschiedenen niederen Termiten auftreten. Methanbakterien sind auch in

höheren Termiten identifiziert worden. Ohkuma et al. (1999) haben Methanbakterien aus den höheren Termiten *Odontotermes formosanus*, *Nasutitermes takasagoensis* und *Pericapritermes nitobei* isoliert, die zu den Familien Methanosarcinaceae und Methanomicrobiaceae (Ordnung: Methanosarcinales und Methanomicrobiales) gehören. Diese Ergebnisse zeigen, dass die niederen und höheren Termiten unterschiedliche Methanbakterienarten in ihrem Intestinaltrakt besitzen. Im Gegensatz zu niederen Termiten kommen Methanbakterien bei höheren Termiten in größerer Specieszahl vor. Das Vorkommen von unterschiedlichen Methanbakterien im Termitendarm lässt sich aufgrund des Nahrungsangebots erklären. Ihr Substratspektrum ist sehr begrenzt. Methanbakterien können molekularen Wasserstoff verwerten, einige benutzen Methanol, Methylamine, Acetat oder Formiat als Wasserstoffdonator. Alle *Methanobrevibacter*-Arten sind zur Methanproduktion aus CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> fähig, verwerten aber kein Acetat, das die Hauptnahrungsquelle für die Termiten darstellt. Auf der anderen Seite sind die *Methanosarcina*-Arten zur Acetatspaltung fähig. Die Experimente zeigen auch, dass alle bisher untersuchten holzfressenden Termiten in ihrem Intestinaltrakt *Methanobrevibacter* sp. besitzen. Auf der anderen Seite konnte bis jetzt aus dem Darm der holzfressenden höheren Termiten *Nasutitermes takasagoensis* (Ohkuma et al., 1999) kein *Methanobrevibacter* sp. identifiziert werden.

Eine Möglichkeit, Organismen verschiedener Spezies zu unterscheiden, ist die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit artspezifischen Oligonukleotidsonden. Damit ist es im Idealfall möglich, die Organismen der verschiedenen Bakterienspezies zu quantifizieren. In dieser Arbeit gelang es, Methanbakterien an der Darmwand von *M. darwiniensis* durch die *in-situ*-Hybridisierungstechnik nachzuweisen. Dazu wurde fünf Cy3-markierte Oligonukleotidsonden (ARCH915, 1178TYIR, FMBK<sub>2,5</sub>840R, FMI045S und FM1045B) verwendet. Die einzelnen stäbchen- und fadenförmigen Methanbakterien, die meist in einer büschelförmigen Anordnung vorkommen, zeigen mit der Archaea-spezifischen Sonde (ARCH915) deutliche Signale. Bei der Hybridisierung mit den anderen vier Sonden 1178TYIR (spezifisch für die Gattungen *Methanobrevibacter* und *Methanobacterium*), FMBK<sub>2,5</sub>840R (spezifisch für die Sequenzen FMBK2 und FMBK5), FMI045S (spezifisch für die Sequenzen FMB1, FMB2, FMB3, FMBK1 und FMBK6) und FM1045B (spezifisch für die Sequenzen FMBK2, FMBK4, FMBK5 und FMBK7) zeigen stäbchenförmige Methanbakterien rote Signale. Leider ist eine genaue Zuordnung der Sequenzen zu den Zellmorphotypen mit den verwendeten Sonden nicht möglich. Da die identifizierten Sequenzen nur in einem Fragment von ca. 400 bp vorliegen, ist die Herstellung von anderen Oligonukleotidsonden, die nur für stäbchen- bzw. fadenförmigen Methanbakterien spezifisch

wären, nicht möglich. Schinzato et al. (1999) konnten auch Methanbakterien im Darminhalt der niederen Termiten *Reticulitermes speratus* durch *in-situ*-Hybridisierung analysieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass kleine stäbchenförmige Methanbakterien im Darminhalt als Doppelzellen vorkommen, während die stäbchenförmigen Methanbakterien von *M. darwiniensis* meist als Einzelzellen auftreten.

### 4.3 Methanbildungsrate von *Mastodermis darwiniensis*

Methan ist ein Endprodukt des mikrobiellen Abbaus organischen Materials in anaeroben Süßwasserhabitaten wie den Sedimenten von Seen und dem Verdauungstrakt von Tieren. Man weiß heute, dass die Mikroorganismen, die Methan als Endprodukt ihres Energiestoffwechsels bilden, alle zu den Archaeobakterien gehören. Man schätzt, dass etwa 1 Milliarde Tonnen Methan pro Jahr hauptsächlich durch methanogene Bakterien gebildet werden. Eine erwachsene Kuh zum Beispiel kann etwa 200 l Methan pro Tag produzieren (König, 1986).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methanbildungsrate von *M. darwiniensis* gemessen (Tab. 8). Die durchgeführten Experimente zeigen, dass pro Termiten 2,35  $\mu\text{g CH}_4/\text{Tag}$  [= 2,6  $\mu\text{g CH}_4/\text{g Termiten} \times \text{h}$ ] Methan produziert werden. Bis jetzt wurde die Methanbildungsrate von verschiedenen Termiten untersucht. Experimente zeigen, dass die Methanbildungsrate von den Nahrungsbedingungen der Termiten abhängig ist. Es ist auch bekannt, dass die Boden- und Pilz-fressenden höheren Termiten mehr Methan produzieren als die holzfressenden Termiten (Brauman et al., 1992).

Von der höheren Termiten *Gnathamitermes perplexus* und der niederen Termiten *Reticulitermes tibialis*, die mit Pilzen bzw. Kuhdünger gefüttert wurden, wurde auch die Methanbildungsrate gemessen (Zimmerman et al., 1982). Die Ergebnisse zeigten, dass pro Individuum von *M. darwiniensis* mehr Methan gebildet wird als von *Gnathamitermes perplexus* bzw. *Reticulitermes tibialis*. Dies ist nicht überraschend, da *M. darwiniensis* einen größeren Darm im Vergleich zu den anderen beiden Termiten besitzt und deshalb mehr Methan produzieren kann. Experimente mit einer Mischung von anderen Termiten (*Cryptotermes brevis*, *Heterotermes indiculata*, *Mastotermes darwiniensis* und *Reticulitermes santonensis*) zeigten, dass pro g Termiten 6,1  $\mu\text{g Methan/h}$  (= 380  $\text{nmol CH}_4/\text{g Termiten} \times \text{h}$ ) produziert werden (Hackstein und Stumm, 1993). Nach den hier vorliegenden Ergebnissen wird pro g *M. darwiniensis*-Biomasse nur circa die Hälfte davon, 2,6  $\mu\text{g Methan/h}$  (= 2,35  $\mu\text{g/Termiten} \times \text{Tag}$ ) produziert. Von den holzfressenden Termiten *Nasutitermes* spp. in Amazonien wurde die Methanbildungsrate von Martius et al. (1993) gemessen. Dabei wurde festgestellt, dass von

einem g Termitenbiomasse etwa 26 mg Methan/Jahr (= 1.9  $\mu\text{g CH}_4/\text{g Termite} \times \text{h}$ ) produziert wird. Legt man die in dieser Arbeit bestimmte Methanbildungsrate von 2,35  $\mu\text{g /Tag} \times$  Termite und die Schätzungen von Khalil et al. (1990), dass es weltweit  $2 \times 10^{17}$  Termiten gibt, zugrunde, so berechnet sich daraus für die globale Methanbildung eine Menge von ca. 150 Millionen Tonnen Methan pro Jahr. Dies entspricht den in der Literatur genannten Werten, die eine Methanmenge von 25-150 Millionen Tonnen schätzen (Madigan et al., 1997).

## 4.4 Sulfatreduzierer in verschiedenen Insekten

### 4.4.1 Phylogenetische Charakterisierung der Sulfatreduzierer in verschiedenen Insekten

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verteilung der Sulfat-reduzierenden Bakterien (SRB) in verschiedenen Insekten aus unterschiedlichen Habitaten untersucht. Bis jetzt wurden SRB aus dem Intestinaltrakt des Menschen (Gibson et al., 1988a und b) und aus verschiedenen niederen bzw. höheren Tieren isoliert ( Kuhnigk et al., 1996; Fröhlich et al., 1999; Trinkerl et al., 1990; Gebhart et al., 1993; Howard und Hungate, 1976). Kürzlich wurden mehrere SRB aus ungewöhnlichen Habitaten, wie zum Beispiel aus den aeroben Schichten von Süßwassersedimenten isoliert, die für SRB nicht typisch sind (Sass et al., 1997a). Es ist bekannt, dass SRB die Fähigkeit haben, den Sauerstoff als Elektronen-Akzeptor zu verwenden (Dilling und Cypionka, 1990). Dadurch wird Sauerstoff aus der Umgebung entfernt und wieder ein reduzierender Zustand für SRB hergestellt (Sass et al., 1998). Viele Berichte zeigen auch, dass SRB senkrecht in mikrobielle Matten wandern, um eine Sauerstoff-Konzentrationszunahme zu vermeiden (Krekeler et al., 1998). Nachdem man physiologische und biochemische Eigenschaften der isolierten SRB untersucht hat, konnte festgestellt werden, dass viele dieser Isolate zur Gattung *Desulfovibrio* gehören.

In dieser Arbeit wurde die phylogenetische Analyse und Identifikation der SRB aus dem Intestinaltrakt von verschiedenen Insekten mit einem ca. 400 bp-Fragment ihrer 16S rDNA-Gene durchgeführt. Die SRB bei den untersuchten Insekten wurden durch zwei verschiedene Methoden, DGGE und 16S rDNA-Sequenzierung analysiert. Alle in der Arbeit identifizierten SRB aus Libellenlarven (Klone FSO4 und FSRO2), aus Zuckmückenlarven (Klone FSCI, FSCII und FSC4) und aus Rosenkäfern (Klon FSPa4-5) gehören zur Gattung *Desulfovibrio*, wogegen die identifizierte Sequenz aus Eintagsfliegenlarven (FSB6) zu Gattung *Desulfotomaculum* gehört (Tab. 10, Abb. 14 und 15). Die beiden Klone FSO4 und FSRO2 sind zu *Desulfovibrio termitidis* (98% Ähnlichkeit) bzw. zu *Desulfovibrio desulfuricans* (97% Ähnlichkeit) verwandt. Tabelle 11 zeigt, dass die beiden Klone FSO4 und FSRO2 eine Ähnlichkeit von nur 86.2% untereinander haben. Dies zeigt, dass mindestens zwei

verschiedene SRB-Arten im Libellenlarvendarm vorkommen. Möglicherweise handelt es sich um neue Arten, die zur Gattung *Desulfovibrio* gehören.

Aus dem Intestinaltrakt von Zuckmückenlarven konnten ebenfalls SRB (Klone FSCI, FSCII und FSC4) identifiziert werden. Tabelle 10 bzw. Abb.14 stellen die nächstverwandten Organismen aus der Datenbank zu den identifizierten Sequenzen vor. Alle drei Sequenzen sind zu dem von Sass et al. (1998) aus Frischwasser-Sedimenten isolierten *Desulfovibrio cuneatus* Stamm STL1 mit einer Ähnlichkeit von 98%, 96% und 97% verwandt. Das Programm DNADIST zeigt, dass die Stämme FSCI und FSC4 mit einer Ähnlichkeit von 98.6% am ähnlichsten sind (Tab.11, Abb.14). Vermutlich gehören sie zu verschiedenen Arten. Schließlich konnten aus Rosenkäfer- und Eintagsfliegenlarven-Darminhalt die Klone FSPa4-5 und FSB6 identifiziert werden, wovon erstere zu dem von Sass et al. (1998) isolierten *Desulfovibrio* sp. Stamm STL6 (94%) und letztere zu dem von Tardy-Jacquenod et al. (1998) isolierten grampositiven *Desulfotomaculum halophilum* (97%) ähnlich sind.

Aus dem Darminhalt der getesteten Insekten konnte keine Reinkultur von SRB erhalten werden. Fermentative Bakterien wie *Citrobacter freundii*, *Erwinia persicinus*, *Fusobacterium varium* und *Brevibacterium casei*-ähnliche Bakterien kommen als Kokultur mit SRB im Darm der getesteten Insekten: [Eintagsfliegenlarven (*Baetis vernus*, *Nemoura* sp.), Steinfliegenlarven (*Perla marginata*) und Feldgrillen (*Gryllus bimaculatus*)] vor. Es ist bekannt, dass *Citrobacter*-Arten in der Lage sind, H<sub>2</sub>S aus S-enhaltenden Komponenten von Kulturmedien-Bestandteilen wie Cystein zu produzieren (Sakazaki 1984). Durch physiologische Tests mit *Citrobacter*-Isolaten konnte man feststellen, dass diese *Citrobacter*-ähnlichen Bakterien auch zur H<sub>2</sub>S-Produktion fähig sind. Unsere Experimente zeigten, dass alle die in dieser Arbeit isolierten fermentative Bakterien auch H<sub>2</sub>S aus S-enhaltenden Komponenten von Kultur-Medien produzieren. Es ist bekannt, dass SRB die katabolischen Endprodukte der Darmflora wie Lactat unvollständig zu Acetat oxidieren können, welches dann über die Darmwand vom Wirt aufgenommen werden kann (Kuhnigk et al., 1996). Kuhnigk et al. (1996) fanden, dass eine Mischkultur aus *Desulfovibrio* sp. und *Citrobacter* sp. aus der gleichen Menge Glucose etwa 2,8 mal mehr Acetat bildet als eine *Citrobacter*-Reinkultur. Das kann ein Grund für die Schwierigkeiten bei der Isolierung einer Reinkultur von SRB aus dem Darm der untersuchten Insekten sein, weil SRB häufig in Kokultur mit fermentativen Bakterien wachsen können.

Es stellt sich die Frage, ob SRB autochthon oder allochthon in Insektendärmen vorkommen. Zur Beantwortung dieser Frage ist zu beachten, dass das Vorhandensein von Sulfatreduzierern in Insekten dem Wirt vielfache Vorteile bringt, wie z.B. unvollständige Oxidation der

katabolischen Endprodukte der Darmflora zu Acetat, das vom Wirt weiter verwertet werden kann sowie die Entfernung von Wasserstoff durch die Oxidation mit Sauerstoff. Dadurch wird im Darm ein anoxisches Milieu aufrechterhalten. Weiterhin ist die Fixierung von molekularem Stickstoff zu nennen. Damit wird das Stickstoffangebot für den Wirt erhöht. Der ständige Verbrauch von Wasserstoff senkt die  $H_2$ -Konzentration lokal auf ein niedriges Niveau. Dadurch wird das Gleichgewicht von Glucose in Richtung Acetat verschoben.

Folglich kann man feststellen, dass die SRB eine wichtige Rolle im Darm von Insekten spielen. Da bei dem Rosenkäfer (*Pachnoda marginata*) ein relativ hoher Titer von ca.  $7 \times 10^9$  SRB/ml und eine hohe Sulfatreduktionsrate (18,05 nmol Sulfat/Darm x h) ermittelt werden konnte und da Kuhnigk et al. (1996) den Titer der Sulfatreduzierer von  $10^6$ - $10^8$  Zellen pro ml in den Därmen verschiedener Termiten bestimmte, kann gefolgert werden, dass SRB sehr aktiv im Darm sind. Das deutet darauf hin, dass SRB autochthon im Darm leben.

#### 4.4.2 Sulfatreduktionsraten

Die Sulfatkonzentration im Darm von Termiten wurden zu 0,3-0,7 mM bestimmt (Kuhnigk et al. 1996). Neuere Untersuchungen zeigen, dass *Mastotermes darwiniensis* 0,14 mM Sulfat im Darm enthält. Durch sulfatreiche Diät konnte dieser Wert sogar bis auf 18,3 mM gesteigert werden. Im Vergleich dazu enthält *Pachnoda marginata* 1,1 mM Sulfat im Darm (Paulus, persönliche Mitteilung). Wenn man das Darmvolumen der Termiten *Mastotermes darwiniensis* mit dem der Rosenkäfer *Pachnoda marginata* vergleicht, sieht man, dass der Darm von Rosenkäfern etwa 17,3 mal größer ist als der Darm von *M. darwiniensis* (Tab. 12). Folglich ist der SRB-Titer bei Rosenkäfern relativ höher. Kuhnigk et al. (1996) zeigten, dass bei *M. darwiniensis* die Zellzahl von SRB etwa  $10^7$ /ml beträgt, d.h. der SRB-Titer liegt etwa bei  $10^5$  Zellen/Darm. Wir haben festgestellt, dass der Gesamt-Bakterientiter im Rosenkäferdarm bei etwa  $1,2 \times 10^{11}$ /ml liegt und 5,8 % davon bestehen aus SRB, d.h.  $7 \times 10^9$  SRB-Zellen kommen pro ml vor (=  $1,2 \times 10^9$  Zellen/Darm). Die Bestimmungen der Sulfatreduktionsraten zeigte, dass die Aktivität pro Darm im Rosenkäfer 368,4 mal größer ist als die Aktivität pro Darm in der holzfressenden *M. darwiniensis*, obwohl die Darmvolumen-Unterschiede nur bei etwa 17,3 fach liegen. Das deutet darauf hin, dass im Rosenkäfer pro Volumen bzw. pro Darm eine 21,3 fach größere Aktivität vorhanden ist. Wenn die Aktivität auf die Zellzahl bezogen wird, kann eine ca. 25 fach kleinere Aktivität pro Zelle bei Rosenkäfern bestimmt werden. Pro  $10^7$  Bakterien bei Termiten *M. darwiniensis* wird ca. 4,9 nmol Sulfat in Sulfid pro Stunde reduziert, wobei die Sulfatreduktionsrate pro  $10^7$  Bakterien/h von Rosenkäfer bei 0,15 nmol liegt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass

die SRB im *M. darwiniensis*-Darm eine deutlich größere Aktivität haben als die SRB im Rosenkäferdarm, d.h. bei Rosenkäfern ist die Zellzahl von SRB höher, aber die Aktivität pro Zelle eindeutig niedriger. Es stellt sich die Frage, warum die Aktivität pro Zelle abnimmt, wenn die Zellzahl zunimmt. Möglicherweise hängt es vom Sulfatangebot ab. Andere Darmbedingungen wie z.B. Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck und die Rolle anderer Darmbakterien besonderes in Gegenwart von Sulfat können auch eine sehr wichtige Rolle bei den Sulfatreduktionsraten in verschiedenen Insekten und Termiten aus verschiedenen Habitaten spielen.

Die Versuche der mit Sulfat gefütterten *M. darwiniensis* zeigen eine Sulfatreduktionsrate von 0,134 nmol/Darm x h. Die Aktivität pro Darm bei diesen Termiten ist also 2,73 mal größer als die Aktivität bei den Holz gefütterten Termiten (Tab. 12). In Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich durch Zugabe von zusätzlichem Sulfat die Bilanz der anaeroben Mineralisation zugunsten der sulfatreduzierenden Bakterien verschieben lässt (Brandl et al., 1990). Es wurde an den beiden Termiten *Reticulitermes santonensis* und *Heterotermes indicola* gezeigt, dass die Zahl der Sulfatreduzierer um etwa ein Zehnerpotenz zunimmt, wenn Sulfat in Form von  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  oder  $\text{CaSO}_4$  mit der Nahrung angeboten wird (Kuhnigk et al., 1996). Wenn man annimmt, dass die Zellzahl bei *M. darwiniensis* nach Sulfat-Aufnahme auch wie bei den o.g. Termiten, *R. santonensis* und *H. indicola*, um etwa ein Zehnerpotenz zunimmt, kann man bei Sulfat-gefütterten Termiten auf eine Sulfatreduktionsrate von 1,34 nmol/ $10^7$  Bakterien x h schließen. Dieser Wert zeigt ebenfalls, dass die Aktivität der Zellen bei diesen Termiten mit steigender Zellzahl abnimmt.

Schließlich wurde die Sulfatreduktionsrate von getesteten Termiten und Rosenkäfern mit der der *Desulfovibrio intestinalis*-Reinkultur (Stramm KMS2) verglichen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass *Dsv. intestinalis*-Zellen ( $10^7$ ) pro Stunde eine Sulfatreduktionsrate zwischen 0,2-0,7 nmol zeigen (Tab.12). Man kann also davon ausgehen, dass die SRB bei den Termiten, nachdem sie mit Holz gefüttert wurden (Sulfatreduktionsrate: 4.9 nmol/ $10^7$  x h), am aktivsten sind. Die Sulfatreduktionsrate wurde auch aus verschiedenen Sedimenten von oligo-, meso-, eu-, und hypertrophen Seen und marinen Standorten bestimmt (Tab.13)

**Tab. 13: Sulfatreduktionsraten in verschiedenen limnischen und marinen Systemen.**

Gewässer	Sulfatreduktionsrate nmol x cm <sup>-3</sup> x d <sup>-1</sup>	Anzahl von SRB [Zellen x cm <sup>-3</sup> ]	Quelle
<b>Oligotrophe Seen:</b>			
Baikalsee	1,2	2,1 x 10 <sup>5</sup>	Namsaraev et al., 1995
Stechlinsee	1,66	1,2 x 10 <sup>5</sup>	Sass et al., 1997
<b>Mesotrophe Seen:</b>			
Bodensee	190	2,4 x 10 <sup>6</sup>	Rothfuss et al., 1997
Kale Kizaki	10,1	-	Li et al., 1996
<b>Eutrophe Seen:</b>			
Dagowsee	76,7	1,5 x 10 <sup>6</sup>	Sass und Babenzien, 1997
Untere Güll (Bodensee)	2000	5,5 x 10 <sup>6</sup>	Bak und Pfennig, 1991
<b>Hypertrophe Seen:</b>			
Lake Taganuma	1000	10 <sup>5</sup>	Fukui und Takii, 1990
<b>Andere Standorte:</b>			
Abwasserbiofilm	20000	2 x 10 <sup>9</sup>	Kühl und Jørgensen, 1992

Die höchste Sulfatreduktionsrate, die man bis jetzt gefunden hat, ist von einem Abwasserbiofilm und liegt bei 20000 nmol/cm<sup>3</sup> x d (= 833,3 nmol/ml x h). Hierbei haben Ramsing et al. (1993) die Anzahl von SRB im Abwasserbiofilm auf 2 x 10<sup>9</sup>/ml bestimmt. Die niedrigsten Werte der Sulfatreduktionsrate wurden im oligotrophen Baikalsee von Namsaraev et al. (1995) mit 1,2 nmol/cm<sup>3</sup> x d (= 0,05 nmol/ml x h) bestimmt. Dabei wurde eine Zellzahl von SRB von 2,1 x 10<sup>5</sup>/ml angegeben. Nach Sass et al. (1997) ist die Sulfatreduktionsrate im oligotrophen Stechlinsee von 1,66 nmol/cm<sup>3</sup> x d (= 0,069 nmol/ml x h) mit einer SRB-Anzahl von 1,2 x 10<sup>5</sup> Zellen pro cm<sup>3</sup> korreliert. Um diese Werte mit den hier vorgestellten Ergebnissen vergleichen zu können, wurden die Sulfatreduktionsraten von nmol/ml x h in nmol/10<sup>7</sup> Bakterien x h umgerechnet (Tab. 14).

**Tab. 14: Vergleich von Sulfatreduktionsraten in verschiedenen Habitaten**

Habitat	Aktivität [nmol/10 <sup>7</sup> Bakterien x h]
Intestinaltrakt von Termiten <sup>a)</sup>	4,9
Intestinaltrakt von Rosenkäfer	0,15
<i>Dsv. intestinalis</i> Stamm KMS2 <sup>b)</sup>	0,2-0,7
Abwasserbiofilm	4,17
Baikalsee	2,3
Stechlinsee	5,75

<sup>a)</sup> Termiten, die mit Holz gefüttert wurden <sup>b)</sup> Reinkultur von *Desulfovibrio intestinalis*

Dabei ergab sich, dass die Sulfatreduktionsraten im Abwasserbiofilm bei  $4,17 \text{ nmol}/10^7$  Bakterien  $\times \text{h}$ , im Baikalsee bei  $2,3 \text{ nmol}/10^7$  Bakterien  $\times \text{h}$  und im Stechlinsee bei  $5,75 \text{ nmol}/10^7$  Bakterien  $\times \text{h}$  liegen. Wenn man alle Resultate vergleicht, kann man feststellen, dass die Aktivität pro Zelle in mit Holz gefütterten Termiten fast genauso hoch ist, wie die Aktivität pro Zelle aus Abwasserbiofilmen bzw. aus dem Stechlinsee. Weiterhin zeigten die Experimente, dass die SRB im Rosenkäferdarm viel weniger aktiv sind.

## 4.5 Ausblick

Die Erforschung der Lebensgemeinschaft zwischen Termiten und ihren Darmsymbionten ist trotz einer Vielzahl spezieller Untersuchungen unvollständig. Das liegt zum einen am Artenreichtum der Termiten und der beteiligten Mikroorganismen. Zum anderen erschweren die vielfach unbekanntes Wechselwirkungen zwischen Bakterien, Flagellaten und Termiten sowie die speziellen Lebensbedingungen die Untersuchungen. Einige Autoren beschreiben Kulturlösungen, in denen die anaeroben Flagellaten bzw. anaerobe und aerobe Bakterien aus dem Termitendarm einige Zeit am Leben erhalten bleiben oder sich sogar vermehren können. Mittels molekularbiologischer Methoden ist es vielen Forschern in den letzten Jahren gelungen, Darmsymbionten systematisch zu erfassen und wichtige Erkenntnisse über Zusammensetzung, Funktion und Physiologie symbiontischer Mikroorganismen und ihrer Wirte zu erlangen. Die Anpassung der Mikromanipulationstechnik auf anaerobes Arbeiten sowie die Kombination der mikromanipulatorischen und fluoreszenz-mikroskopischen Techniken werden die Kultivierung und Identifizierung bzw. die Charakterisierung strikt anaerober Mikroorganismen wie z.B. der Methanbakterien im Termitendarm vereinfachen. Eine genaue Charakterisierung der Darmwandflora wäre für ein besseres Verständnis des Celluloseabbaus im Termitendarm sicherlich wünschenswert. Ein weiterer, Ansatzpunkt für zukünftige Forschung ist aber auch die Lokalisierung der Mikroorganismen im Darm bzw. an der Darmwand und die Abschätzung ihrer physiologischen Aktivität, was durch Anwendung von Fluoreszenz-*in-situ* Hybridisierung im Rahmen des Möglichen ist.

## 5 Zusammenfassung

Die komplexe Lebensgemeinschaft des Termitendarms fasziniert die Biologen schon seit langem. Es ist bekannt, dass Termiten ihre Nahrung mit Hilfe von symbiontischen Bakterien und Protozoen verdauen können. Ohne ihre Symbionten würden sie verhungern. Das Zusammenspiel von Termiten und darmbewohnenden Mikroorganismen, zu denen Flagellaten, Bakterien, Archaeobakterien und Hefen gehören, ist trotz moderner Untersuchungstechniken keineswegs vollständig aufgeklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurden:

1) Einige kultivierte und nicht-kultivierte Bakterien charakterisiert, die an der Darmwand von *Mastotermes darwiniensis* lokalisiert sind. Die Darmwandbakterien wurden entweder nach Kultivierung oder direkt von der Darmwand für die Analyse der 16S rDNA verwendet. Die Sequenzierung erfolgte entweder nach DGGE oder nach Klonierung der PCR-Produkte. Die identifizierten Bakterien kann man in 7 Gruppen teilen:

- 1: Gram-positive Bakterien mit hohem GC-Gehalt
- 2: Gram-positive Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt
- 3: Fusobakterien-ähnliche Bakterien
- 4:  $\beta$ -Proteobakterien
- 5: Verrucomicrobien
- 6: *Bacteroides*-ähnliche Bakterien
- 7: Methanogene Bakterien

2) Aufgrund des Vorhandenseins des Coenzym Deazaflavin-Derivats F<sub>420</sub>, kann man Methanbakterien mikroskopisch identifizieren und von anderen Bakterien unterscheiden, weil Methanbakterien im kurzwelligen Blaulicht blaugrün aufleuchten. Untersuchungen haben gezeigt, dass mindestens zwei Morphotypen von Methanbakterien an der Darmwand von *M. darwiniensis* vorkommen. Sie wurden auch über 16S rDNA Sequenzanalyse identifiziert. Ihre Lokalisierung an der Darmwand wurde durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit spezifischen Oligonukleotiden nachgewiesen. Schließlich konnte gezeigt werden, dass pro Gramm Termiten 2,6  $\mu$ g Methan pro Stunde produziert werden.

3) Bis jetzt wurden aus verschiedenen Termiten sulfatreduzierende Bakterien (SRB) isoliert. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Verbreitung der SRB in verschiedenen Insekten

untersucht. Insgesamt wurden zwei Sequenzen aus Libellenlarven (FSBO4 und FSBRO2), drei Sequenzen aus Zuckmückenlarven (FSCI, FSCII und FSC4), eine Sequenz aus Rosenkäfern (FSPa4-5) und ebenfalls eine Sequenz aus Eintagsfliegenlarven (FSB6) identifiziert. Alle identifizierten Bakterien ausser Klon FSB6, gehören zur Gattung *Desulfovibrio*. Klon FSB6 gehört zu der Gram-positiven Gattung *Desulfotomaculum*.

Außerdem wurde die Sulfatreduktionsrate der SRB im Darm von Rosenkäfern (*Pachnoda marginata*), Holz- bzw. Sulfat-gefütterten Termiten (*Mastotermes darwiniensis*) und einer Reinkultur von *Desulfovibrio intestinalis* gemessen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Aktivität pro Zelle in Holz-gefütterten Termiten am höchsten ist ( $4,9 \text{ nmol}/10^7 \text{ Bakterien} \times \text{h}$ ).

## 6 Literaturverzeichnis

- Amann, R. I., Binder, B. J., Christolm, S. W., Devereux, R. und Stahl, D. A. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1919-1925.
- Bak, F. und Pfenning, N. (1991) Microbial sulfate reduction in littoral sediment of Lake Constance. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85: 43-52
- Baumann, G. (1999) Don't be a victim of termites. In: Epton-Kowitz Pest Control: Pest-Gazette. National Pest Control Association Inc., Spring-Edition, VA,USA.
- Bently, B. L. (1984) Nitrogen fixation in termites: fate of newly fixed nitrogen. *J. Insect. Physiol.* 30: 653-655.
- Berchtold, M. (1996) Phylogenetische Charakterisierung symbiontischer Mikroorganismen im Darm von Termiten. Dissertation, Universität Ulm, Ulm.
- Berchtold, M. und König, H. (1995) phylogenetic analysis and in situ identification of uncultivated spirochetes from the hindgut of the termite *Mastotermes darwiniensis*. *Syst. Appl. Microbiol.* 19: 66-73.
- Bergmeyer, H. U. (1974) Glucose. In: Methoden der enzymatische Analyse (Bergmeyer, H. U. und Gawehn, K., Hrsg.) Chemie Weinheim. Vol. II. pp. 1241-1246.
- Bignell, D. E., Anderson, J. M. und Crosse, R. (1991) Isolation of facultative aerobic actinomycetes from the gut, parent soil and mound materials of the termites *Procupitermes aburiensis* and *Cubitermes severus*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85: 151-160.
- Brandl, H., Hanselmann, K. M. und Bachofen, R. (1990) In situ stimulation of bacterial sulfate reduction in sulfate-limited freshwater lake sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74: 21-32.

- Branke, J. T. (1997) Phylogenetische und morphologische Charakterisierung pro- und eukaryontischer Mikroorganismen aus dem Mäuse- und Termitendarm, Dissertation, Universität. Ulm, Ulm.
- Brauman, A., König, J. F., Dutrix, J. und Gracia, J. L. (1990) Characterization of two sulfate-reducing bacteria from the gut of the soil-feeding termite, *Cubitermes speciosus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 58: 271-275.
- Brauman, A., Kane, M. D., Labat, M. und Breznak, J. A. (1992) Genesis of acetate and methane by bacteria of nutritionally diverse termites. *Science* 257: 1384-1387.
- Breznak, J. A. (1982) Intestinal microbiota of termites and other xylophagous insects. *Annu. Rev. Microbiol.* 36: 323-343.
- Breznak J. A. (1984) Biochemical aspects of symbiosis between termites and their intestinal microbiota. In: Anderson J. M., Rayner A. D. M, Walton D. W. H., (Hrsg). *Invertebrate-microbial interactions*, Cambridge University. Press, Cambridge. PP 173-203.
- Breznak, J. A. und Brune, A. (1994) Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 453-487.
- Brosius, J., Dull, T., Sleeter, D. und Noller, H. F. (1981) Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4801-4805.
- Brune, A., Emerson, D. und Breznak A. (1995) The termite gut microflora as an oxygen sink: microelectrode determination of oxygen and pH gradient in guts of lower and higher termites. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2681-2687.
- Brune, A. (1998) Termite guts: the world's smallest bioreactors. *Tibtech.* 16: 16-21.
- Buchner, P. (1953) *Endosymbiose der Tiere mit pflanzlichen Mikroorganismen*. Birkhäuser, Basel, Stuttgart.

- Canale-Parola, E. (1984) The spirochetes, pp. 38-70. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Krieg, N. R. J. und Holt, G., Hrsg.) Vol. I, Williams and Wilkins, Baltimore.
- Clayton, R. A., Sutton, G., Hinkle, P. S.jr., Bult, C. und Fields, C. (1995) Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in Genbank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 595-599.
- 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.* 46: 178-227.
- Cleveland, L. R. und Grimstone A. V. (1964) The fine structure of the flagellate *Mixotricha paradoxa* and its associated micro-organisms. *Proc. Royal Soc. Lond. Ser. B* 159: 668-686.
- Cord-Ruwisch, R., Seitz, H.-J. und Conrad, R. (1988) The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor. *Arch. Microbiol.* 149: 350-357.
- Cruiden, D. L. und Markovetz A. J. (1987) Microbial ecology of the cockroach gut. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 617-643.
- Dicks, L. M. T., Dellaglio, F. und Collins, M. D. (1995) Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 395-397.
- Dilling, W. und Cypionka, H. (1990) Aerobic respiration in sulfate reducing bacteria. *Arch. Microbiol.* 71: 123-128.
- Dodemma, H. J. und Vogels, G. D., (1978) Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Env. Microbiol.* 36: 752-754.

- Emerson A. E. (1965) A review of the Mastotermitidae (Isoptera), including a new fossil genus from Brazil. Amer. Mus. Novitates 2236: 1-46.
- Emerson A. E. (1967) Cretaceous insects from Labrador. 3. A new genus and species of termite (Isoptera: Hoodotermitidae). Psyche 74: 276-289.
- Eutick, M .L., Veivers, P., O'Brien, R. W. und Slaytor, M. (1978) Dependence of the higher termite, *Nasutitermes exitiosus* (Hill) and the lower termite, *Coptotermes lacteus* on their gut flora. J. Insect Physiol. 24: 363-368.
- Farrow, J. A. E., Facklam, R. R. und Collins, M. D. (1989) Nucleic acid homologies of some vancomycin-resistant leuconostocs and description of *Leuconostoc citreum* sp. nov. and *Leuconostoc pseudomesenteroides* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 279-283.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.
- Felsenstein, J. (1993) PHYLIP 3.5. Department of Genetic SK-50, University of Washington, Seattle.
- Fenchel, T. und Ramsing, N. B. (1992) Identification of sulfate-reducing ectosymbiotic bacteria from anaerobic ciliates using 16S rDNA binding oligonucleotide probes. Arch. Microbiol. 158: 394-397.
- Fitch, W. M. und Margoliash, E. (1967) Construction of phylogenetic trees. Science 155: 279-284.
- Fröhlich, J. und König, H. (1999) Rapid isolation of single microbial cells from mixed natural and laboratory populations with the aid of a micromanipulator. Syst. Appl. Microbiol. 22: 249-257.
- Fröhlich, J., Sass, H., Babenzien, H. D., Kuhnigk, T., Varma, A., Saxena, S., Nalepa, C., Pfeiffer, P. und König, H. (1999) Isolation of *Desulfovibrio intestinalis* sp. nov., from

- the hindgut of the lower termite *Mastotermes darwiniensis*. Can J. Microbiol. 45: 145-152.
- Fukui, M. und Takii, S. (1990) Seasonal variations of population density and activity of sulfate-reducing bacteria in offshore and reed sediments of a hypertrophic freshwater lake. Jpn. J. Limnol. 51: 63-71.
- Garvie, E. I. (1967) *Leuconostoc oenos* sp. nov. J. Gen. Microbiol. 48: 431-438.
- Gebhart, C. J. , Barn, S. M., McOrist, S., Lin, G.-F. und Lawons, H. K. (1993) Ileal symbiont intracellularis, an obligate intracellular bacterium of porcine intestines showing a relationship to *Desulfovibrio* species. Int. J. System. Bacteriol. 43: 533-538.
- Grzimek, B. und Ernst, E. (1969) Tierleben, Insekten II, Kindler Verlag.
- Gibson, G. R., Cummings , J. H. und MacFarlane, G. T. (1988a) Competition for hydrogen between sulfat-reducing bacteria and methanogenic bacteria from the human large intestine. J. Appl. Bacteriol. 65: 241-247.
- Gibson, G. R., Cummings, J. H. und MacFarlane, G. T. (1988b) Use of a three-stage continuous culture system to study the effect of mucin on dissimilatory sulfate reduction and methanogenesis by mixed populations of human gut bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2750-2755.
- Graedel, T. E. und Crutzen, P. J. (1989) Veränderungen der Atmosphäre. Spektrum der Wissenschaft 11: 58-68.
- Hackstein, J. H. P. und Stumm, C. K. (1993) Methane production in terrestrial arthropods. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 5441-5445.
- Hardy, J. A. und Hamilton, W. A., (1981) The oxygen tolerance of sulphate-reducing bacteria isolated from North Sea waters. Curr. Microbiol. 6: 259-262.

- Honigberg, B. M. (1970) Protozoa associated with termites and their role in digestion, pp. 1-36. In: Biology of termites (Krisma, K. und Weesner, F. M., Hrsg.) Vol. I, Academic Press, New York.
- Howard, B. H. und Hungate, R. E. (1976) *Desulfovibrio* of the sheep rumen. Appl. Environ. Microbiol. 32: 598-602.
- Janssen, P. H., Schumann, A., Mörschel, E. und Rainey, F. A. (1997) Novel anaerobic ultramicrobacteria belonging to the *Verrucomicrobiales* lineage of bacterial descent isolated by dilution culture from anoxic rice paddy soil. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1382-1388.
- Jukes, T. H. und Cantor, C. R. (1969) Evolution of protein molecules. In : Manual of protein metabolism (Munro, H.N., ed.). pp. 21-132. Academic Press, New York.
- Khalil, M. A. K., Rasmussen, R. A., French, J. R. J. und Holi, J. A. (1990) The influence of termites on atmospheric trace gases: CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>O, CO, H<sub>2</sub> and light hydrocarbons. J. Geophys. Res. 95: 3619-34
- König, H. (1986) Biologie der Archaeobakterien. In: Biologie in unsere Zeit, VCH Weinheim. 16: 71-82.
- Krekeler, D., Teske, A. und Cypionka, H. (1998) Strategies of sulfate reducing bacteria to escape the oxygen stress in a cyanobacterial mat (Sinai, Egypt). FEMS Microbiol. Ecol. 25: 89-96.
- Kühl, M. und Jørgensen, B. B. (1992): Microsensor measurements of sulfate reduction and sulfide oxidation in compact microbial communities of aerobic biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 58, 1164-1174.
- Kuhnigk, T. (1996) Charakterisierung Lignocellulose abbauender und Sulfat reduzierender Bakterien aus dem Termitendarm. Dissertation, Universität Ulm, Ulm.

- Kuhnigk, T., Borst, E.M., Ritter, A., Kämpfer, P., Graf, A., Hertel, H. und König, H. (1994) Degradation of lignin monomers by the hindgut flora of xylophagous termites. *Syst. Appl. Microbiol.* 17: 76-85.
- Kuhnigk, T., Branke, J., Krekeler, D., Cypionka, H. und König, H. (1996) A feasible role of sulfate-reducing bacteria in the termite gut. *System. Appl. Microbiol.* 19: 139-149.
- Leadbetter, J. R. und Breznak, J. A. (1996) Physiological ecology of *Methanobrevibacter cuticularis* sp. nov. and *Methanobrevibacter curvatus* sp. nov., isolated from the hindgut of the termite *Reticulitermes flavipes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3620-3631.
- Leadbetter, J. R., Schmidt, T. M., Graber, J. R. und Breznak, J. A. (1999) Acetogenesis from H<sub>2</sub> plus CO<sub>2</sub> by spirochetes from termite guts. *Science* 283: 686-689.
- Lee, M. J., Schreurs, P. J., Messer, A. C. und Zinder, S. H. (1987) Association of methanogenic bacteria with flagellated Protozoa from a termite hindgut. *Microbiol.* 15: 337-341.
- Li, J., Takii, S., Kotakemori, R. und Hayashi, H. (1996) Sulfate reduction in profundal sediments in Lake Kizaki, Japan. *Hydrobiologia* 333: 201-208.
- Liesack, W., Weyland, H. und Stackebrandt, E. (1991) Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria. *Micob. Ecol.* 21: 191-198.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. und Parker, J. (1997) In: Brock, *Biology of Microorganisms*, New Jersey.
- Maidak, B. K., Cole, J. R., Lilburn, T. G., Parker, C. T., Saxman, P. R., Stredwick, J. M., Garrity, G. M., Li, B., Olsen, G. J., Pramanik, S., Schmidt, T. M. und Tiedje, J. M. (2000) The RDP (Ribosomal Database Project). *Nucl. Acids Res.* 28: 173-174.
- Mannesmann, R. und Piechowski, B. (1989) Verteilung von Gärkammerbakterien einiger Termitenarten. *Mat. Org.* 24: 161-177.

- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. und Schleifer, K.-H. (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 593-600.
- Margulis, L., Chase, D. und To, L. P. (1979) Possible evolutionary significance of spirochaetes. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 204: 189-198.
- Martin, M. M. und Martin, J. S. (1978) Cellulose digestion in the midgut of the fungus growing termite *Macrotermes natalensis*: the role of acquired digestive enzymes. *Science* 199: 1453-1455.
- Martin, M. M. und Martin, J. S. (1979) The distribution and origins of the cellulolytic enzymes of the higher termite, *Macrotermes natalensis*. *Physiol. Zool.* 52:11-21.
- Martius, C., Wassbann, R., Thein, U., Bandeira, A. und Rennenberg, H. (1993) Methane emission from wood-feeding termites in Amazonia. *Chemosphere* 26: 623-632.
- Medlin, L., Elwood, H. J., Stickel, S. und Sogin, M. L. (1988) The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene* 71: 491-499.
- Moore, W. E. C., Holdeman, L. V. und Kelley, R. W. (1984) Genus II *Fusobacterium* Knorr 1922, In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Krieg, N. R. and Holt, J. G., Hrsg.), vol. 1, pp. 631-634. Williams and Wilkins, Baltimore/London.
- Müller, M. (1993) The hydrogenosom. *J. Gen. Microbiol.* 139: 2879-2889.
- Muyzer, G., De Waal, E. C. und Uitterlinden A. G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction- amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700.
- Myles, T. G. (1999) Phylogeny and taxonomy of the Isoptera. XIII Intl. Congress Intl. Union for the Study of Social Insects. Adelaide, Australia.

- Nakamura, K., Hiraishi, A., Yoshimi, Y., Kawaharasaki, M., Masuda, K. und Kamagata, Y. (1995) *Microlunatus phosphovorius* gen. nov., sp. nov., a new gram positive Polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge. Int. J. Syst. Bacteriol. 45:17-22.
- Namsaraev, B. B., Dulov, L. E., Zemskaya, T. I. und Karabanov, E. B. (1995) Geochemical activity of sulfate-reducing bacteria in the bottom sediments of Lake Baikal. Microbiology (Engl. Tr) 64: 405-410.
- Newton, C. R. und Graham, A. (1994) PCR. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Noirot, C (1995) The gut of termites (Isoptera). Comparative Anatomy, Systematics, Phylogeny. I. Lower termites. Ann. Soc. Entomol. Fr. (N.S.). 31: 197-226.
- Odelson, D. A. und Breznak J. A. (1983) Volatile fatty acid production by the hindgut microbiota of xylophagous termites. App. Environ. Microbiol. 45: 1602-1613.
- Ohkuma, M. und Kudo, T. (1996) Phylogenetic diversity of the intestinal bacterial community in the termite *Reticulitermes speratus*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 461-468.
- Ohkuma, M. und Kudo, T. (1998) Phylogenetic analysis of the symbiotic intestinal microflora of the termite *Cryptotermes domesticus*. FEMS Microbiol. Lett. 164: 389-395.
- Ohkuma, M., Noda, S., Horikoshi, K. und Kudo, T. (1995) Phylogeny of symbiotic methanogens in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* FEMS Microbiol. Lett. 134: 45-50.
- Ohkuma, M., Noda, S. und Kudo, T. (1999) Phylogenetic relationships of symbiotic methanogens in diverse termites. FEMS Microbiol. Lett. 171: 147-153.
- Pfennig, N. (1978) *Rhodocyclus purpureus* gen. nov. and sp. nov., ring-shaped vitamin B12-requiring member of the family Rhodospirillaceae. Int. J. Syst. Bacteriol. 28: 283-288.

- Postgate, J. R. (1984) Genus *Desulfovibrio*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, (Krieg, N. R. und Holt, J. G., Hrsg.), Vol. 1, pp. 666-672. Williams und Wilkins, Baltimore/London.
- Potrikus, C. J. und Breznak J. A. (1977) Nitrogen-fixing *Enterobacter agglomerans* isolated from guts of wood-eating termites. *Appl. Env. Microbiol.* 33: 392-399.
- Potrikus, C. J. und Breznak, J. A. (1980a) Uric acid in wood-eating termites. *Insect Biochem.* 10: 19-27.
- Potrikus, C. J. und Breznak, J. A. (1980b) Uric acid-degrading bacteria in guts of termites *Reticulitermes flavipes*. *Appl. Env. Microbiol.* 40: 117-124.
- Radek, R. und Hausmann, K. (1994) Symbiontische Flagellaten im Termitendarm, In: Extremophile mikroorganismen in ausgefallenen Lebensräumen (Hausmann, K. und Kremer B. P., Hrsg.), VCH, Weinheim, 325-339.
- Ramsing, N. B., Kühl, M. und Jørgensen, B. B. (1993) Distribution of sulfate-reducing bacteria, O<sub>2</sub>, and H<sub>2</sub>S in photosynthetic biofilms determined by oligonucleotide probes and microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3840-3849.
- Remane, A., Storch, V., und Welsch, U. (1989) Kurzes Lehrbuch der Zoologie. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart
- Rogers, J. E. und Whitman, W. B. (1991) Microbial production and consumption of greenhouse gases: methane, nitrogen oxides, and halomethanes. American Society for Microbiology, Washington.
- Rosser, H. R. und Hamilton, W. A. (1983) Simple assay for accurate determination of [<sup>35</sup>S] sulfate reduction activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1956-1959.
- Rothfuss, F., Bender, M. und Conrad, R. (1997) Survival and activity of bacteria in a deep, aged lake sediment (Lake Constance). *Microb. Ecol.* 33: 69-77.

- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Ehrlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491
- Saitou, N. und Nei, M. (1987) The neighbor joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sakazaki, S. (1984) Genus IV. *Citrobacter*. In: *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. (Krieg, N. R. and Holt, J. G., Hrsg.) Vol. 1, pp. 458-461. Williams & Wilkins, Baltimore/London.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sass, H. und Babenzien, H.-D. (1997) Sulfatreduktion in einem eutrophen Gewässer (Dagowsee): ein Standortvergleich. *Deutsche Gesellschaft für Limnologie (DGL)-Tagungsbericht 1996 (Schwedt)*, 191-195.
- Sass, H., Cypionka, H. und Babenzien, H.-D. (1997) Vertical distribution of sulfate-reducing bacteria at the oxic-anoxic interface in sediments of the oligotrophic Lake Stechlin. *FEMS Microbiol. Ecol.* 22: 245-255.
- Sass, H., Berchtold, M., Branke, J., König, H., Cypionka, H. und Babenzien, H. D. (1998) Psychrotolerant sulfate reducing bacteria from an oxic freshwater sediment, description of *Desulfovibrio cuneatus* sp. nov. and *Desulfovibrio litoralis* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 21: 212-219.
- Schäfer, A. (1993) Isolierung und Charakterisierung von Hemicellulose-abbauenden Bakterien aus dem Termitendarm. Diplomarbeit, Universität Ulm.
- Schultz, J. E. und Breznak, J. A. (1978) Heterotrophic bacteria present in hindgut of wood-eating termites *Reticulitermes flavipes* *Appl. Env. Microbiol.* 35: 930-936.

- Shinzato, N., Matsumoto, T., Yamaoka, I., Oshima, T. und Yamagishi, A. (1999) Phylogenetic diversity of symbiotic methanogens living in the hindgut of the lower termite *Reticulitermes speratus* analyzed by PCR and in situ hybridization. Appl. Environ. Microbiol. 65: 837-840.
- Show, B. G. und Harding, C. D. (1989) *Leuconostoc gelidum* sp. nov. and *Leuconostoc carnosum* sp. nov. from chill-stored meats. Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 217-223.
- Slaytor, M. (1992) Cellulose digestion in termites and cockroaches: What role do symbionts play Comp. Biochem. Physiol. 103: 775-784.
- Smibert, R. M. und Krieg, N. R. (1981) General characterization. In: Manual of Methods for General Bacteriology (Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R. und Phillips, G. B., Hrsg.) American society for Microbiology, Washington, pp 409-443.
- Stackebrandt, E. und 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.
- Stoesser, G., Moseley, M.-A., Lopez, R. und Sterk, P. (1999) The EMBL Nucleotide Sequence Database. Nucl. Acids Res. 27: 18-24.
- Stumm, C. K., und Zwart, K. B. (1986) Symbioses of protozoa with hydrogen-utilizing methanogens. Microbiol. Sci. 3: 100-105.
- Stumm, C. K. und Hackstein (1994) Methanbakterien und Protisten in den Gärkammern von Wiederkäuern und Insekten. In: Extremophile Mikroorganismen in ausgefallenen Lebensräumen (Hausmann, K., Kremer, B. P., Hrsg.) VCH Weinheim. 299-324.
- Stumm, C. K. Gijzen, H. J. und Vogel, G. D. (1982) Association of methanogenic bacteria with ovine rumen ciliates. Br. J. Nutr. 47: 95-99

- Tardy-Jacquenod, C., Magot, M., Patel, B. K. C., Matheron, R. und Caumette, P. (1998): *Desulfotomaculum halophilum* sp. nov., a halophilic sulfate-reducing bacterium isolated from oil production facilities. *Int. J. System. Bacteriol.* 48: 333-338.
- Thayer, D. W. (1976) Facultative wood-digesting bacteria from the hindgut of the termite *Reticulitermes hesperus*. *J. Gen. Microbiol.* 95: 794-801.
- Tholen, A., Schink, B. und Brune, A. (1997) The gut microflora of *Reticulitermes flavipes*, its relation to oxygen, and evidence for oxygen-dependent acetogenesis by the most abundant *Enterococcus* sp. *FEMS Microbiol Ecol* 24: 137-149.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. und 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. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
- To, L., Margulis, L. und Cheung, A. T. W. (1978) Pillotinas and hollandinas: distribution and behaviour of large spirochaetes symbiotic in termites. *Microbios* 22: 103-133.
- Trinkerl, M., Breunig, A., Schauder, R. und König, H. (1990) *Desulfovibrio termitidis*, sp. nov., a carbohydrate-degrading sulfate-reducing bacterium from the hindgut of a termite. *System. Appl. Microbiol.* 13: 372-377.
- Tschech, A. und Pfennig, N. (1984) Growth yield increase linked to caffeate reduction in *Acetobacterium woodii*. *Arch. Microbiol.* 137: 163-167.
- Varma, A., Kolli, B. K., Paul, J., Saxena, S. und 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., O'Brien, R. W. und Slaytor, M. (1982) Role of bacteria in maintaining the redox potential in the hindgut of termites and preventing entry of foreign bacteria. *J. Insect Physiol.* 28:947-951.

- Wenzel, M., Schönig, I., Meyer, M., Kämfer, P., Berchtold, M., Fang, F., und König H. (2000) Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria and cellulolytic yeasts from the termite gut. Eingereicht.
- Widdel, F. (1980) Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoesäure durch neue isolierte Arten sulfatreduzierender Bakterien. Dissertation Universität Göttingen.
- Widdel, F. und Hansen, T. A. (1992) The dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing bacteria. In: The Prokaryotes (Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K. H., Hrsg.), Vol. 1, pp. 583-627. Springer, Heidelberg.
- Widdel, F. und Bak, F. (1992) Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In: The Prokaryotes (Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. H., Hrsg.), Vol 4, pp. 3352-3372. Springer, New York..
- Yamin, M. A. (1979) Flagellates of the orders Trichomonadida Kirby, Oxymonadida Grassé, and Hypermastigida Grassi & Foà reported from lower termites (Isoptera families Mastotermitidae, Kalotermitidae, Hodotermitidae, Termopsidae, Rhinotermitidae, and Serritermitidae) and from the wood-feeding cockroach *Cryptocercus* (Dictyoptera: Cryptocercidae). Sociobiology 4:5-119.
- Yamin, M. A. (1981) Cellulose metabolism by the flagellate *Trypanonympha* from a termite is independent of endosymbiotic bacteria. Science 211: 58-59.

## 7 Anhang

### 7.1 Aligment der SSU rDNA-Sequenzen

#### Anhang 1: Alignment der SSU-rDNA-Sequenzen der kultivierten Bakterien

Die mit 1 bezeichneten Positionen wurden für die Kontruktion des Stammbaumes der kultivierten Bakterien von der Darmwand der Termiten *Mastotermes darwiniensis* verwendet.

```

          1070                               1100
          •                                 •
E-coli      -UCGUGUUGU GAAAUGUUGG GUUAAGUCCC GCAACGAGCG CAACCCUUAU
Stm-griseu -UCGUGUCGU GAGAUGUUGG GUUAAGUCCC GCAACGAGCG CAACCCUUGU
Stm-setoni -UCGUGUCGU GAGAUGUUGG GUUAAGUCCC GCAACGAGCG CAACCCUUGU
Lc-citreu  -UCGUGUCGU GAGAUGUUGG GUUNAGUCCC GCAACGAGCG CNACCCUNAU
Lc-mesente -UCGUGUCGU GAGAUGUUGG GUUAAGUCCC GCAACGAGCG CAACCCUUAU
Lc-lacUis  -UCGUGUCGU GAGAUGUUGG GUUAAGUCCC GCAACGAGCG CAACCCUUAU
Stc-angino -UCGUGUCGU GAGAUGUUGG GUUAAGUCCC GCAACGAGCG CAACCCUNAU
Stc-bovis  -UCGUGUCGU GAGAUGUUGG GUUAAGUCCC GCAACGAGCG CAACCCCUAU
Stc-agalac -UCGUGUCGU GAGAUGUUGG GUUAAGUCCC GCAACGAGCG CAACCCCUAU
Cllm-cllul -UCGUGUCGU GAGAUGUUGG GUUAAGUCCC GCAACGAGCG CAACCCUCGU
Arb-globif -UCGUGUCGU GAGAUGUUGG GUUAAGUCCC GCAACGAGCG CAACCCUCGU
Bur-cepaci -UCGUGUCGU GAGAUGUUGG GUUAAGUCCC GCAACGAGCG CAACCCUUGU
Bur-gladio -----
FZ-          ----- ---AAGTCCC GCAACGAGCG CAACCCTTGT
FZ4         ----- ----- GCAACGAGCG CAACCCTTAT
FZ5         ----- ----- ----- CCTTAT
FZ1         ----- ----- -----
Z2          ----- ----- ----- TTGT
1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111

                                     1150
                                     •
CCUUUGUUGC CAGCGG---- -UCCGG---- -CCGGGAACU CAAAGGAGAC
UCUGUGUUGC CAGCAUGCC- -UUCGG-GGU GAUGGGGACU CACAGGAGAC
UCUGUGUUGC CAGCAUGCCC -UUCG-GGGU GAUGGGGACU CACAGGAGAC
UGUUAGUUGC CAGCA----- UUCAGU---- --UGGGCACU CUAGCGAGAC
UGUUAGUUGC CAGCA----- UUCAGA---- --UGGGCACU CUAGCGAGAC
UGUUAGUUGC CAGCA----- UUCAGU---- --UGGGCACU CUAGCGAGAC
UGUUAGUUGC CAUCA----- UUAAGU---- --UGGGCACU CUAGCGAGAC
UGUUAGUUGC CAUCA----- UUAAGU---- --UGGGCACU CUAGCGAGAC
UGUUAGUUGC CAUCA----- UUAAGU---- --UGGGCACU CUAGCGAGAC
CCCAUGUUGC CAGCGG---- GUUAUG---- -CCGGGGACU CAUGGGGAGAC
UCCAUGUUGC CAGCGC---- GUAAUG---- -GCGGGGACU CAUGGGGAGAC
CCUUAGUUGC UA-C----- -GCNA----- ---GAGCACU CUAAGGAGAC
-----
CCTTAGTTGC TA-CG----- --CAA----- ---GAGCACT CTAAGGAGAC
TGTTAGTTGC CATCA----- TTAAGT---- --TGGGCACT CTAGCGAGAC
CATTAGTTGC -AGCA----- TTAAGT---- --TGGGCACT CTAGCGAGAC
----- --CGGGTTAT GAAGGGGACT CATGGGAGAC
CCTGTGTTGC CNGCATGCCT TTCGGG--GT GATGGGGACT CACAGGAGAC
1111111111 1111100000 1111110000 001111111111 1111111111

                                     1200
                                     •
UGCCAGUGAU AAACUGGAGG AAGGUGGGGA UGACGUCAAG UCAUCAUGGC
UGCCGGGGUC AACUCGGAGG AAGGUGGGGA CGACGUCAAG UCAUCAUGCC
UGCCGGGGUC AACUCGGAGG AAGGUGGGGA CGACGUCAAG UCAUCAUGCC
UGCCGGUGAC NAACCGGAGG AAGGCGGGGA CGACGUCAGA UCAUCAUGCC
UGCCGGUGAC AAACCGGAGG AAGGCGGGGA CGACGUCAGA UCAUCAUGCC
UGCCGGUGAC AAACCGGAGG AAGGCGGGGA CGACGUCAGA UCAUCAUGCC
UGCCGGUAAU NAACCGGAGG AAGGUGGGGA UGACGUCAAA UCAUCAUGCC
UGCCGGUAAU AAACCGGAGG AAGGUGGGGA UGACGUCAAA UCAUCAUGCC
UGCCGGUAAU NAACCGGAGG AAGGUGGGGA UGACGUCAAA UCAUCAUGCC

```

UGCCGGGGUC	AACUCGGAGG	AAGGUGGGGA	UGACGUCAAA	UCAUCAUGCC
UGCCGGGGUC	AACUCGGAGG	AAGGUGGGGA	CGACGUCAAA	UCAUCAUGCC
UGCCGGGUGAC	AAACCGGAGG	AAGGUNGCGA	UGACGUCAAG	UCCUCAUGGC
UGCCGGGUGAC	AAACCGGAGG	AAGGUGGGGA	UGACGUCAAG	UCCUCAUGGC
TGCCGGTGAC	AAACCGGAGG	AAGGTGGGGA	TGACGTCAA	TCCTCATGGC
TGCCGGTAAT	AAACCGGAGG	AAGGTGGGGA	TGACGTCAA	TCATCATGCC
TGCCGGTGAC	AAACCGGAGG	AAGGTGGGGA	TGACGTCAA	TCATCATGCC
TGCCGGGGTC	AACTCGGAGG	AAGGTGGGGA	TGACGTCAA	TCATCATGCC
TGCCGGGGTC	AACTCGGAGG	AAGGTGGGGA	CGACGTCAAG	TCATCATGCC
1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111

1250

CCUUAACGACC	AGGGCUACAC	ACGUGCUACA	AUGGCGCAUA	CAAAGAGAAG
CCUUAUGUCU	UGGGCUGCAC	ACGUGCUACA	AUGGCCGGUA	CAAUGAGCUG
CCUUAUGUCU	UGGGCUGCAC	ACGUGCUACA	AUGGCCGGUA	CAAUGAGCUG
CCUUAUGACC	UGGGCUACAC	ACGUGCUACN	AUGGCCGUAU	CNACGAGUUG
CCUUAUGACC	UGGGCUACAC	ACGUGCUACA	AUGGCCGUAU	CAACGAGUUG
CCUUAUGACC	UGGGCUACAC	ACGUGCUACA	AUGGCCGUAU	CAACGAGUUG
CCUUAUGACC	UNGGCUACAC	ACGUGCUACA	AUGGCUUGUA	CAACGAGUCG
CCUUAUGACC	UGGGCUACAC	ACGUGCUACA	AUGGUUGGUA	CAACGAGUCG
CCUUAUGACC	UNGGCUACAC	ACGUGCUACA	AUGGUUGGUA	CAACGAGUCG
CCUUAUGUCU	UGGGCUUCAC	GCAUGCUACA	AUGGCCGGUA	CAAAGGGCUG
CCUUAUGUCU	UGGGCUUCAC	GCAUGCUACA	AUGGCCGGUA	CAAAGGGUUG
CCUUAUGGGU	AGGGCUUCAC	ACGUCAUACA	AUGGUCGGAA	CAGAGGGUUG
CCUUAUGGGU	AGGGCUUCAC	ACGUCAUACA	AUGGUCGGAA	CAGAGGGUCG
CCTTATGGGT	AGGGCTTCAC	ACGTGCTACA	ATGGTCGGAA	CAGAGGGTTG
CCTTATGACC	TGGGCTACAC	ACGTGCTACA	ATGGTTGGTA	CAACGAGTCG
CCTTATGACC	TGGGCTACAC	ACGTGCTACA	ATGGCGTATA	CAACGAGTTG
CCTTATGTCT	TGGGCTTCAC	GCATGCTACA	ATGGCCGGTA	CAGAGGGCTG
CCTTATGTCT	TGGGCTGCAC	ACGTGCTACA	ATGGCCGGTA	CAATGAGCTG
1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111

1300

CGACCUCGCG	AGAGCAAGCG	GACCUCAUAA	AGUGCGUCGU	AGUCCGGAUU
CGAUGC-GCG	AGGCGGAGCG	AAUCUCAAAA	AGCCGGUCUC	AGUUCGGAUU
CGAUGC-CGCG	AGGCGGAGCG	AAUCUCAAAA	AGCCGGUCUC	AGUUCGGAUU
CCAACCCGCG	AAGGUGAGCU	AAUCUCUAAA	AGUACGUCUC	AGUUCGGACU
CCAACCCGCG	AGGGUGAGCU	AAUCUCUAAA	AGUACGUCUC	AGUUCGGAUU
CCAACCCGCG	AGGGUGAGCU	AAUCUCUAAA	AGUACGUCUC	AGUUCGGACU
CAAGCCGGUG	ACGGCAAGCU	AAUCUCUGAA	AGCCAGUCUC	AGUUCGGAUU
CGAGUCGGUG	ACGGCAAGCA	AAUCUCUAAA	AGCCAAUCUC	AGUUCGGAUU
CAAGCCGGUG	ACGGCAAGCU	AAUCUCUAAA	AGCCAAUCUC	AGUUCGGAUU
CGAUACCGUA	AGGUGGAGCG	AAUCCCAAAA	AGCCGGUCUC	AGUUCGGAUU
CGAUACUGUG	AGGUGGAGCU	AAUCCCAAAA	AGCCGGUCUC	AGUUCGGAUU
CCAACCCGCG	AGGGGGAGCU	AAUCCAGAAA	AACCGAUCGU	AGUUCGGAUU
CCAACCCGCG	AGGGGGAGCU	AAUCCCAAAA	AACCGAUCGU	AGUUCGGAUU
CCAACCCGCG	AGGGGGAGCT	AATCCAGAAA	AACCGATCGT	AGTCCGGATT
CAAGCTAGTG	ATAGCAAGCT	AATCTCTTAA	AGCCAATCTC	AGTTCGGATT
CGAACC GGCG	ACGGCAAGCT	AATCTCTTAA	AGTACGTCTC	AGTTCGGATT
CGATACCGTA	AGGTGGAGCG	AATCCCAAAA	AGCCGGTCTC	AGTTCGGATT
CGATGTCTGT	AGGCGGAGCG	AATCTCAAAA	AGCCGGTCTC	AGTTCGGATT
1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111

1350

GGAGUCUGCA	ACUCGACUCC	AUGAAGUCGG	AAUCGCUAGU	AAUCGUGGAU
GGGGUCUGCA	ACUCGACCCC	AUGAAGUCGG	AGUUGCUAGU	AAUCGCAGAU
GGGGUCUGCA	ACUCGACCCC	AUGAAGUCGG	AGUUGCUAGU	AAUCGCAGAU
GCAGUCUGCA	ACUNGACUGC	ACGAAGUCGG	AAUCGCUAGU	AAUCGCGGAU
GUAGUCUGCA	ACUCGACUAC	AUGAAGUCGG	AAUCGCUAGU	AAUCGCGGAU
GCAGUCUGCA	ACUCGACUGC	ACGAAGUCGG	AAUCGCUAGU	AAUCGCGGAU
GUAGGCUGCA	ACUCGCCUNC	AUGAAGUCGG	AAUCGCUAGU	AAUCGCGGAU

GUAGGCUGCA	ACUCGCCUAC	AUGAAGUCGG	AAUCGCUAGU	AAUCGCGGAU
GUAGGCUGCA	ACUCGCCUNC	AUGAAGUCGG	AAUCGCUAGU	AAUCGCGGAU
GGGGUCUGCA	ACUCGACCCC	AUGAAGUCGG	AGUCGCUAGU	AAUCGCAGAU
GGGGUCUGCA	ACUCGACCCC	AUGAAGUCGG	AGUCGCUAGU	AAUCGCAGAU
GCACUCUGCA	ACUCGAGUGC	AUGAAGCUGG	AAUCGCUAGU	AAUCGCGGAU
GCACUCUGCA	ACUCGAGUGC	AUGAAGCUGG	AAUCGCUAGU	AAUCGCGGAU
GCACTCTGCA	ACTCGAGTGC	ATGAAGCTGG	AATCGCTAGT	AATCGCGGAT
GTAGGCTGCA	ACTCGCCTAC	ATGAAGTCGG	AATCGCTAGT	AATCGCGGAT
GCAGGCTGCA	ACTCGCCTGC	ATGAAGTCGG	AATCGCTAGT	AATCGCGGAT
GGGGTCTGCA	ACTCGACCCC	ATGAAGTCGG	AGTCGCTAGT	AATCGCAGAT
GGGGTCTGCA	ACTCGACCCC	ATGAAGTCGG	AGTTGCTAGT	AATCGCAGAT
1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111

1400

CAGA-AUGCC	ACGGUGAAUA	CGUCCCCGGG	CCUUGUACAC	ACCGCCCUGC
CAGCAUUGCU	GCGGUGAAUA	CGUCCCCGGG	CCUUGUACAC	ACCGCCCUGC
CAGCAUUGCU	GCGGUGAAUA	CGUCCCCGGG	CCUUGUACAC	ACCGCCCUGC
CAGC-ACGCC	GCGGUGAAUA	CGUCCCCGGG	UCUUGUACAC	ACCGCCCUGC
CAGC-ACGCC	GCGGUGAAUA	CGUCCCCGGG	UCUUGUACAC	ACCGCCCUGC
CAGC-ACGCC	GCGGUGAAUA	CGUCCCCNGG	NCUUGUACAC	ACCGNNNNNUC
CAGC-ACGCC	GCGGUGAAUA	CGUCCCCGGG	CCUUGUACAC	ACCGCNCGUC
CAGC-ACGCC	GCGGUGAAUA	CGUCCCCGGG	CCUUGUACAC	ACCGCCCUGC
CAGC-ACGCC	GCGGUGAAUA	CGUCCCCGGG	CCUUGUACAC	ACCGCCCUGC
CAGCAACGCU	GCGGUGAAUA	CGUCCCCGGG	CCUUGUACAC	ACCGCCCUGC
CAGCAACGCU	GCGGUGAAUA	CGUCCCCGGG	CCUUGUACAC	ACCGCCCUGC
CAGC-AUGCC	GCGGUGAAUA	CGUCCCCGGG	UCUUGUACAC	ACNGCCCUGC
CAGC-AUGCC	GCGGUGAAUA	CGUCCCCGGG	UCUUGUACAC	ACCGCCCUGC
CAGC-ATGCC	GCGGTGAATA	CGTTCCCCGGG	TCTTGTACAC	ACCGCCCCTC
CAGC-ACGCC	GCGGTGAATA	CGTTCCCCGGG	CCTTGTACAC	ACCGCCCCTC
CAGC-ACGCC	GCGGTGAATA	CGTTCCCCGGG	TCTTGTACAC	ACCGCCCCTC
CAGCAACGCT	GCGGTGAATA	CGTTCCCCGGG	CCTTGTACAC	ACCGCCCCTC
CAGCATTGCT	GCGGTGAATA	CGTTCCCCGGG	CCTTGTACAC	ACCGCCCCTC
1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111

1450

ACACCAUGGG	AGUGGGUUGC	AAAAGAAGUA	GGUAGCUUAA	CC--UUCG--
ACGUCACGAA	AGUCGGU AAC	ACCCGAAGCC	GGUGGCCCAA	CCC-CUUGUG
ACGUCACGAA	AGUCGGU AAC	ACCCGAAGCC	GGUGGCCCAA	CCC-CUUGUG
ACACCAUGGG	AGUUUGUAAU	GCCCAAAGCC	GGUGGCCUAA	CC--NNNU--
ACACCAUGGG	AGUUUGUAAU	GCCCAAAGCC	GGUGGCCUAA	CC--UUUUA--
ACNCCAUGGG	AGUUUGUAAU	GCCCNAAAGCC	GGUGGCCUAA	CC--UUUA--
ACACCACGAG	AGUUUGU AAC	ACCCGA----	-----	-----
ACACCACGAG	AGUUUGU AAC	ACCCGAAGUC	GGUGAGGUAA	CC--UUUU--
ACACCACGAG	AGUUUGU AAC	ACCCGA----	-----	-----
AAGUCACGAA	AGUCGGU AAC	ACCCGAAGCC	CAUGGCCCAA	CCG-UUCG-C
AAGUCACGAA	AGUUGGU AAC	ACCCGAAGCC	GGUGGCCUAA	CCC-CUUGUG
ACACCAUGGG	AGUGGGUUUU	ACCAGAAGUG	GCUAGUCUAA	CC--ACAA--
ACACCAUGGG	AGUGGGUUUU	ACCAGAAGUG	GCUAGUCUAA	CC--GCAA--
ACACCATGGG	AGTGGGT TTT	ACCAGAAGTG	GCTAGTCTAA	CC--GCAA--
ACACCACGAG	AGTTTGTAAT	ACCCAAAGCC	GGTGGGCTAA	CCA-ATTAT-
ACACCATGGG	AGTTTGTAAT	GCCCAAAGCC	GGTGGCCTAA	CT-----TC
AAGTCACGAA	AGTTGGTAAC	ACCCGAAGCT	CATGGCCCAA	CCGGTTTCGCC
ACGTCACGAA	AGTCGGTAAC	ACCCGAAGCC	GGTGGCCCAA	CCC-CTTGTG
1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1100111100

1500

GGAGGGCGCU	UACCACUUUG	UGAUUCAUGA	CUGGGGUGAA	GUCGUAACAA
GGAGGGAGCU	GUCGAAGGUG	GGACUGGCCA	UUGGGACGAA	GUCGUAACAA
GGAGGGAGCU	GUCGAAGGUG	GGACUGGCCA	UUGGGACGAA	GUCGUAACAA
GGAGGGAGCC	GUCUAAGGCA	G-----	-----	-----
GGAAGGAGCC	GUCUAAGGCA	GGACAGAUGA	CCGGGG----	---GUAACAA

```

GGAGGGAGCC GUCUAAGGCA GGACAGAUGA CUAGGG-----
-----
GGAGCUAGCC GCCUAAGGUG GGAUAGAUGA -----
-----
GGGGGGAGUG GUCGAAGGUG GGACUGGCGA UUGGGACUAA GUCGUAACAA
GGAGGGAGCC GUCGAAGGUG GGACUGGCGA UUGGGACUAA GUCGUAACAA
GGAGGANNGU CACNANGGUA GGAUUNANG-
GGAGGACGGU CACCACGGUA GGAUUCAUGA CUGGGGUGAA GUCGUAACAA
GGAGGACGGT CACCACGGTA GGATTCATGA CTGGGGTGAA GTCGTAACAA
GGAGGCAGCC GTCKAAGGTA GGATAGATGA TTKGGGTGAA GTCGTAACAA
GGAAGGAGCC GTCTAAGGCA GGACAGATGA CTGGGGTGAA GTCGTAACAA
GGGGGGAGTG GTCAAAGGTG GGACTGGCGA TTGGGACTAA GTCGTAACAA
GGAGGGAGCT GTCGAAGGTG GGACTGGCGA TTGGGACGAA GTCGTAACAA
1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111

```

1540

```

GGUAACCGUA GGGGAACCGU CGGUUGGAUC ACCUCCU---
GGUAGCCGUA CCGGAAGGUG CGGCUGGAUC ACCUCCU---
GGUAGCCGUA CCGGAAGGUG CGGCUGGAUC ACCUCCU---
-----
G----- --GAACCGU -----GAUC ACCUCCU---
-----
----- --GAUC ACCUCCU---
-----
GGUAGCCGU-
GGUAGCCGUA CCGGAAGGUG CGGCUGGAUC ACCUCCU---
-----
GGUAGCCGUA UCGGAAGGUG CGG-----
GGTAGCCGTA TCGGAAGGTG CGGCTGGATC ACCTCCTTTC T-----
GGTAGCCGTA TCSGAAGGTG CGGCTGGATC ACCTCCTTTC TGCGGCCGCT
GGTAGCCGTA GGAGAACCTG CGGCTGGATC ACCTCCTTTC TGCGGC----
GGTAGCCGTA CCGGAAGGTG CGGCTGGATC ACCTCC----
GGTAGCCGTA CCGGAAGGTG CGGCTGGATC ACCTCCTTTC TGCGGCCGCT
1111111111 1111111111 1111111111 1111111000 0000000000

```

## Anhang 2: Alignment der SSU rDNA-Sequenzen von grampositiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt

Die mit 1 bezeichneten Positionen wurden für die Kostruktion des Stammbaumes der grampositiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt von der Darmwand der Termiten *Mastotermes darwiniensis* verwendet.

```

1070
•
E.coli -----U ---CGUGUUG UGAAAUGUUG
Agmy-ramos -----U ---CGUGUCG UGAGAUGUUG
Clv-xyli -----U ---CGUGUCG UGAGAUGUUG
Arb-globif -----U ---CGUGUCG UGAGAUGUUG
Prp-avidum -----
Mcl-phphov -----U CCUCGUGUCG UGAGAUGUUG
Fra-spCeD2 -----U ---CGUGUCG UGAGAUGUUG
F6-Eubak CGGUUAUACAG GUGGUGCAUG GCUGUCGUCA GCUCGUGUCG UGAGAUGUUG
FM32 -----
FM54 -----
1000000000 0000000000 0000000000 0000111111 1111111111

```

1100

```

GGUUAAGUCC CGCAACGAGC GCAACCCUUA UCCUUUGUUG CCAGCGG-UC
GGUUAAGUCC CGCAACGAGC GCAACCCUCG UCGUAUGUUG CCAGCACGUC

```

```

GGUUAAGUCC CGCAACGAGC GCAACCCUCG UUCUAUGUUG CCAGCGCGUA
GGUUAAGUCC CGCAACGAGC GCAACCCUCG UUCAUGUUG CCAGCGCGUA
----- -UCACUGUUG CCAGCACGUU
GGUUAAGUCC CGCAACGAGC GCAACCCUCG UCCUAUGUUG CCAGCGGGUA
GGUUAAGUCC CGCAACGAGC GCAACCCUCG UCCUAUGUUG CCAGCGAGUC
GGUUAAGUCC CGCAACGAGC GCAACCCUCG UUUCUUGUUG CCAGCGGUUC
-----C CGCAACGAGC GCMMSCCUCG UCCWAUGUUD CCAGCGGAUA
-----UCG UCCUUUGUUG CCAGCGGAUA
1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111

```

1150

```

CGGCCGGGAA CUCAAAGGAG -ACUGCCAGU GAUAAACUG- GAGGAAGGUG
AUGGUGGGAA CUCAUAGGAG -ACUGCCGGG GUCAACUCG- GAGGAAGGUG
AUGGCGGGAA CUCAUAGGAG -ACUGCCGGG GUCAACUCG- GAGGAAGGUG
AUGGCGGGGA CUCAUGGGAG -ACUGCCGGG GUCAACUCG- GAGGAAGGUG
AUGGUGGGGA CUCAGUGGAG -ACCGCCGGG GUCAACUCG- GAGGAAGGUG
AUGCCGGGGA CUCAUAGGAG -ACUGCCGGG GUCAACUCG- GAGGAAGGUG
GUGUCGGGGA CUCAUAGGAG -ACUGCCGGG GUCAACUCG- GAGGAAGGUG
--GCCGGGAA CUCAAGAAAG -ACUGCCGGG GUCAACUCG- AAGGAAGGUG
AUGCSGGGGA CUCAUAGGAG -GCUGCCGGG GUCAACUCGA GAAGARUGUG
AUGCCGGGGA CUCAUAGGAG CACUGCCGGG GUCAACUCG- GAGGAAGGUG
1111111111 1111111111 0111111111 1111111110 1111111111

```

1200

```

GGGAUGACGU CAAGUCAUCA UGGCCCUUAC GACCAGGGCU ACACACGUGC
GGGAUGACGU CAAAUCAUCA UGCCCCUUAU GUCUUGGGCU UCACGCAUGC
GGGAUGACGU CAAAUCAUCA UGCCCCUUAU GUCUUGGGCU UCACGCAUGC
GGGACGACGU CAAAUCAUCA UGCCCCUUAU GUCUUGGGCU UCACGCAUGC
GGGAUGACGU CAAGUCAUCA UGCCCCUUAU GUCCAGGGCU UCACGCAUGC
GGGAUGACGU CAAGUCAUCA UGCCCCUUAU GUCCAGGGCU UCACGCAUGC
GGGAU-----
GGGACGACGU CAAGUCAUCA UGCCCCUUAU GUCCAGGGCU UCACGCAUGC
GGGAWGACGU CAWGUCCUCA UGCCCCUUAU GUCCAGGGCU UCACGCAUGC
GGGAUGACGU CAAGUCAUCA UGCCCCUUAU GUCCAGGGCU UCACGCAUGC
1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111

```

1250

```

UACAAUGGCG CAUACAAAGA GAAGCGACCU CGCGAGAGCA AGCGGACCUC
UACAAUGGCC GGUACAAAGG GCUGCGAUGU CGUAAGGCGG AGCGAAUCCC
UACAAUGGCC GGUACAAAGG GCUGCAAUAC CGUAAGGUGG AGCGAAUCCC
UACAAUGGCC GGUACAAAGG GUUGCGAUAC UGUGAGGUGG AGCUAAUCCC
UACAAUGGCC GGUACAAAGA GUUGCGAGCC UGUGAGGGUG AGCGAAUCUC
UACAAUGGCU GGUACAAAGG GCUGCAAUAC CGCAAGGUUG AGCGAAUCCC
-----
CACAAUGGCC GGUACAAAGG GCUGCAAUAC CGUAAGGUGG AGCGAAUCCC
UACAAUGGCC GGUACAAAGG GCUGCAAUCC UGCARAGGUG AGCGAAUCCC
UACAAUGGCC GGUACAAAGG GCUGCAAUCC UGCAAAGGUG AGCGAAUCCC
1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111

```

1300

```

AUAAGUGCG UCGUAGUCCG GAUUGGAGUC UGCAACUCGA CUCCAUGAAG
AAAAAGCCGG UCUCAGUUCG GAUUGAGGUC UGCAACUCGA CCUCAUGAAG
AAAAAGCCGG UCUCAGUUCG GAUUGAGGUC UGCAACUCGA CCUCAUGAAG
AAAAAGCCGG UCUCAGUUCG GAUUGGGGUC UGCAACUCGA CCCCAUGAAG
GGAAAGCCGG UCUCAGUUCG GAUUGGGGUC UGCAACUCGA CCCCAUGAAG
AAAAAGCCAG UCUCAGUUCG GAUUGGGGUC UGCAACUCGA CCCCAUGAAG
-----
AGAAAGCCGG UCUCAGUUCG GAUUGGGGUC UGCAACUCGA CCCCAUGAAG
AAAAAGCCKG UCUCAGUUCA GAUUGGGGUC UGCAACUCGA CCCCAUGAWG
AAAAAGCCGG UCUCAGUUCG GAUUGGGGUC UGCAACUCGA CCCCAUGAAG
1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111

```

1350

```

•
UCGGAAUCGC UAGUAAUCGU GGAUCAGA-A UGCCACGGUG AAUACGUUCC
UCGGAGUCGC UAGUAAUCGC AGAUCAGCAA CGCUGCGGUG AAUACGUUCC
UCGGAGUCGC UAGUAAUCGC AGAUCAGCAA CGCUGCGGUG AAUACGUUCC
UCGGAGUCGC UAGUAAUCGC AGAUCAGCAA CGCUGCGGUG AAUACGUUCC
UCGGAGUCGC UAGUAAUCGC AGAUCAGCAA CGCUGCGGUG AAUACGUUCC
UCGGAGUCGC UAGUAAUCGC AGAUCAGCAA CGCUGCGGUG AAUACGUUCC
-----
UCGGAGUCGC UAGUAAUCGC AGAUCAGCAA CGCUGCGGUG AAUACGUUCC
UCAGAGUCGC UAGUAAUCGC AGAUCARCAA CGCUGCGGUG AAUACGUUCC
UCGGAGUCGC UAGUAAUCGC AGAUCAGCAA CGCUGCGGUG AAUACGUUCC
1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111

```

1400

```

•
CGGGCCUUGU ACACACCGCC CGUCACACCA UGGGAGUGGG UUGCAAAAAGA
CGGGCCUUGU ACACACCGCC CGUCAAGUCA UGAAAGUCGG UAACACCCGA
CGGGCCUUGU ACACACCGCC CGUCAAGUCA UGAAAGUCGG UAACACCCGA
CGGGCCUUGU ACACACCGCC CGUCAAGUCA CGAAAGUUGG UAACACCCGA
CGGGCCUUGU ACACACCGCC CGUCAAGUCA UGAAAGUCGG UAACACCCGA
CGGGCCUUGU ACACACCGCC CGUCAAGUCA UGAAAGUCGG UAACACCCGA
-----
CGGGCCUUGU ACACACCGCC CGUCAAGUCA UGAAAGUCGG UAACACCCGA
CGGGCCUUGU ACACACCGCC CGUCAAGUCA URAAAGUCGG UAACACCCGA
CGGGCCUUGU ACACACCGCC CGUCAAGUCA UGAAAGUCGG UAACACCCGA
1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111

```

1450

```

•
AGUAGGUAGC UUAACC-UUC G--GGAGGGC GCUUACCACU UUGUG-AUUC
AGCCGGUGGC CUAACC-CUU GU-GGAGGGA GCCGUCGAAG GUGGG-AUCG
AGCCGGUGGC CCAACC-CUU GU-GGAGGGA GCCGUCGAAG GUGGG-AUCG
AGCCGGUGGC CUAACCCUUU GUGGGAGGGA GCCGUCGAAG GUGGG-ACUG
AGCCGGUGGC CUAACC-UGU GU--GGGGGA GCCGUCGAAG GUGGG-ACUG
AGCCGGUGGC CCAACC-UUU U--GGAGGGA GCCGUCGAAG GUGGG-ACUG
-----
AGCCGGUGGC CUAACC-CUU GU-GGAGGGA GCCGUCGAAG GUGGG-ACCG
AGCCGGUGGC CUAACC-CUU UUGGGAGGGA CCCAUCGAAG GUGGG-ACCG
AGCCGGUGGC CUAACCUUUU U--GGAGGGA GCCGUCCAAG GUGGGGACCG
1111111111 1111111111 1101111111 1111111111 1111101111

```

1490

```

•
AUGACUGGGG -UGAAG---- -----
GUGAUUAGGA -CUAAG---- -----
GUGAUUAGGA -CUAAG---- -----
GCGAUUGGGA -CUAAG---- -----
GUAUUUAGGA -CUAAG---- -----
GCGAUUAGGA -CUA----- -----
-----
GUAUUUAGGA -CUAAGUCGU AACAAGGUAG CCGUACCGGA AGGUGC GGCU
GUAUUUAGGA -CUAAGUCGU AACAAGGUAG CCGUACCGGA AGGUGC GGCU
GUAUUUAGGA ACUAAGUCCU AACAAGGUAG CCGUACCGGA AGGUGC GGCU
1111111111 0111110000 0000000000 0000000000 0000000000

```

### Anhang 3: Alignment der SSU-rDNA-Sequenzen der grampositiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt

Die mit der 1 bezeichneten Positionen wurden für die Konstruktion des Stammbaumes der grampositiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt von der Darmwand der Termiten *Mastotermes darwiniensis* verwendet.

			1080		1100
			•		•
<i>E-coli</i>	-----	-----U	CGUGUUGUGA	AAUGUUGGGU	UAAGUCCCGC
<i>C-rectum</i>	-----	-----U	CGUGUCGUGA	GAUGUUGGGU	UAAGUCCCGC
<i>C-aminobut</i>	-----	-----U	CGUGUCGUGA	GAUGUUGGGU	UAAGUCCCGC
<i>C-cellulos</i>	-----	-----U	CGUGUCGUGA	GAUGUUGGGU	UAAGUCCCGC
<i>B-lichenif</i>	-----	-----U	CGUGUCGUGA	GAUGUUGGGU	UAAGUCCCGC
<i>B-pantothe</i>	-----	-----U	CGUGUCGUGA	GAUGUUGGGU	UAAGUCCCGC
<i>Lc-mesente</i>	-----	-----U	CGUGUCGUGA	GAUGUUGGGU	UAAGUCCCGC
<i>Stp-aureus</i>	-----	-----U	CGUGUCGUGA	GAUGUUGGGU	UAAGUCCCGC
<i>Eub-brachy</i>	-----	-----U	CGUGUCGUGA	GAUGUUGGGU	UAAGUCCCGC
<i>B-lautu</i>	GUGCAUGGUU	GUCGUCAGCU	CGUGUCGUGA	GAUGUUGGGU	UAAGUCCCGC
F5	-----	-----	-----	-----	-----CCGC
F8-Eubak	-----	-----	-----	-----	-----
FM27	-----	-----	-----	-----	-----CGC
FM15	-----	---UUCCCN	AUUNUCNUGN	UA-GUCNGUU	UAAGUCCCGC
FM60	-----	-----	-----CUGU	UN-GUCCGNU	UAANUCNUUC
	1000000000	0000000001	1111111111	1111111111	1111111111
			1130		
			•		
	AACGAGCGCA	ACCCUUAUCC	UUUGUUGCCA	GCGG-UCCGG	CCGGGAACUC
	AACGAGCGCA	ACCCUUUCG	UAUGUUGCCA	UCA-UUAAGU	-UGGGCACUC
	AACGAGCGCA	ACCCUUGUCA	UUAGUUGCCA	GCA-GUAAGA	-UGGGCACUC
	AACGAGCGCA	ACCCUUGUUA	AUAGUUGCUA	-C---GCAA-	--GAGCACUC
	AACGAGCGCA	ACCCUUGAUC	UUAGUUGCCA	GCA-UUCAGU	-UGGGCACUC
	AACGAGCGCN	ACCCUUGAUC	UUAGUUGCCA	GCA-UUUAGU	-UGGGCACUC
	AACGAGCGCA	ACCCUUAUUG	UUAGUUGCCA	GCA-UUCAGA	-UGGGCACUC
	AACGAGCGCA	ACCCUUAAGC	UUAGUUGCCA	UCA-UUAAGU	-UGGGCACUC
	AACGAGCGCA	ACCCUUGUCA	UUAGUUGCCA	UCA-UUAAGU	-UGGGCACUC
	AACGAGCGCA	ACCCUNGAUC	UUAGUUGCCA	GCA-UUCAGU	-UGGGCACUC
	AACGAGCGCA	ACCCUUGUCG	GUAGUUGCCA	GCAGCUAGGC	-UGGGCACUC
	-----	-----	-----CCA	UCGCUUCGGG	-CGGGCACUC
	AACRAGCGCA	ASCCUUGCCG	UUAGUUGCCA	UCA-GCCAGG	CUGGGCACUC
	AACGAGCCCA	ACCCUUUUCN	UUUUUUGCUA	CC----CNA-	--GAGCACUC
	AACGAGCGCA	ACCCUUCUCN	UCUUUUACCA	UUUNUUCAGU	-UGGGCACUC
	1111111111	1111111111	1111111111	1110111111	0111111111
	1150		•		
	AAAGGAGACU	GCCAGUGAUA	AACUGG-AGG	--AAGGUGGG	GAUGACGUCA
	AUGCGAUACU	GCCUGCGAUC	AGCAGG-AGG	--AAGGUGGG	GAUGACGUCA
	UAGUGAGACU	GCCGUGGAUA	ACACGG-AGG	--AAGGUGGG	GAUGACGUCA
	UAUUAAGACU	GCCGUUGAUA	AAACGG-AGG	--AAGGUGGG	GAUGACGUCA
	UAAGGUGACU	GCCGGUGACA	AACCGG-AGG	--AAGGUGGG	GAUGACGUCA
	UAAGGUNACU	GCCGGUGACN	AACCGG-AGG	--AAGGUGGG	GAUGACGUCN
	UAGCGAGACU	GCCGGUGACA	AACCGG-AGG	--AAGGUGGG	GACGACGUCA
	UAAGUUGACU	GCCGGUGACA	AACCGG-AGG	--AAGGUGGG	GAUGACGUCA
	UAGUGAGACU	GCCGGGGACA	ACUCGG-AGG	--AAGGUGGG	GAUGACGUCA
	UAAGGUGACU	GCCGGUGACA	AACCGG-AGG	--AAGGUGGG	GAUGACGUCA
	UACCGAGACU	GCCGGGGAUA	ACUCGG-AGG	--AAGGUGGG	GAUGACGUCA
	UAACGGGACU	GCCGGGGACA	ACUCGGGAGG	GAAAGGUGGG	GAUGACGUCA
	UAACGGGACU	GCCGGGGACA	ACUCGG-AGG	--AAGGUGGG	GAUGACGUCA
	NAAUGAGACC	GCUACCG-UA	AGGUGG-AGG	--AAGGUGGG	GANUACGUCN
	UGGNGANACU	GCCAGNNCAU	NACCNGGAGG	--AANGUGGG	GAUGAGGUCA
	1111111111	1111111111	1111110111	0011111111	1111111111

1200

•

AGUCAUCAUG	GCCCUUACGA	CCAGGGCUAC	ACACGUGCUA	CAAUGGCGCA
AGUCAUCAUG	CCCCUUAUAC	GCUGGGCUAC	ACACGUGCUA	CAAUGGGUAG
AAUCAUCAUG	CCCCUUAUGU	UCUGGGCUAC	ACACGUGCUA	CAAUGGCUGG
AAUCAUCAUG	CCCCUUAUGA	CCUGGGCUAC	ACACGUACUA	CAAUGGCCGC
AAUCAUCAUG	CCCCUUAUGA	CCUNGGCUAC	ACACGUGCUA	CAAUGGGCAG
AAUCAUCAUG	CCCCUUAUGA	CCNNGGCUAC	ACACGUGCUA	CNAUGGAUGG
GAUCAUCAUG	CCCCUUAUGA	CCUGGGCUAC	ACACGUGCUA	CAAUGGCGUA
AAUCAUCAUG	CCCCUUAUGA	UUUGGGCUAC	ACACGUGCUA	CAAUGGACAA
AAUCAUCAUG	CCCCUUAUGU	UCUGGGCUAC	ACACGUGCUA	CAAUGGCUGG
AAUCAUCAUG	CCCCUUAUGA	CCUGGGCUAC	ACACGUGCUA	CAAUGGGCAG
AAUCAUCAUG	CCCCUUAUGC	CCUGGGCUAC	ACACKUGCUA	CAAUGGCCGG
AAUCAUCAUG	CCCCUUAUGU	UCUGGGCUAC	ACACGUGCUA	CAAUGGCCGG
AAUCAUCAUG	CCCCUUAUKU	CUUGGGCUAC	ACACKUGCUA	CAAUGGCCGG
AAUCUNCAUN	CCCCUUAANGA	CCUGGGNUAC	ACNUNUNCUA	CANUGGCCGU
AAUCNUCAUN	CCCCUUAUAAA	CCUGGGCUAC	GCACGUNCUA	CAAUGGGUCA
1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111

1250

•

UA-CAAAGAG	AAGCGACCUC	GCGAGAGCAA	GCGGACCUCA	UAAAGUGCGU
UA-CAGAGAG	UCGCAAACCU	GCGAGGGGGA	GCUAUUCUCA	GAAAACUAU
UA-CAAAGAG	ACGCAAGACG	GUGACGUGGA	GCAAUUCUCA	-AAAACAGU
CAACAAAGGG	AAGCAAUACC	GCGAGGUGGA	GCGAAUCCCC	-AAAAGCGU
AA-CAAAGGG	CAGCGAAGCC	GCGAGGCUNA	GCCAAUCCCA	CAAUCUNUU
AA-CNAAGGG	CNGCGAAGCC	GCGAGGCCAA	GCNAAUCCCA	UNAAACNNU
UA-CAACGAG	UUGCCAACCC	GCGAGGGUGA	GCUAUUCUCU	UAAAGUACGU
UA-CAAAGGG	CAGCGAAACC	GCGAGGUCAA	GCAAUUCCCA	UAAAGUUGUU
UA-CAAAGAG	AAGCAAGACC	GCAAGGUGGA	GCAAAGCUCU	-AAAACAGC
AA-CAAAGGG	CAGCGAAGCC	GCGAGGCUAA	GCCAAUCCCA	CAAUCUGUU
UA-CARARAG	AAGCAAGGUC	GCGAGGCGGA	GCAAUUCUCA	-AAAACCGU
UA-CAAUGGG	AAGCGAUACG	GCGACGUGGA	GCAAUUCACC	-AAAACCGU
UA-CAAUGGG	AAGCAAUAUG	GCRACAUGGA	GCAAUUCACC	-AAAACCGU
CNACANANGG	AAGCNAACCC	GCNAGGUGNA	GCCAAACCCC	-AAAACCGU
AA-CAAAGGG	AANCGAAGCC	GCGAGGCNAA	GCNAAACCCA	CAAAAUUAU
1101111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111

1300

•

CGUAGUCCGG	AUUGGAGUCU	GCAACUCGAC	UCCAUGAAGU	CGG-AAUCGC
CUCAGUUCGG	AUUGUACUCU	GCAACUCGAG	UACAUGAAGU	UGG-AAUCGC
CCCAGUUCGG	AUUGUAGGCU	GCAACUCGCC	UACAUGAAGU	UGG-AGUUGC
CCCAGUUCAG	AUUGCAGGCU	GCAACCCGCC	UGCAUGAAGA	CGG-AAUUGC
CUCAGUUCGG	AUCGCAGUCU	GCAACUCGAC	UNCGUGAAGC	UNG-AAUCGC
CUCNGUUCGG	AUUGCAGGCU	GCNACUCGCC	UGCAUGAAGC	CGG-AAUCGC
CUCAGUUCGG	AUUGUAGUCU	GCAACUCGAC	UACAUGAAGU	CGG-AAUCGC
CUCAGUUCGG	AUUGUAGUCU	GCAACUCGAC	UACAUGAAGC	UGG-AAUCGC
CCCAGUUCGG	AUUGUAGGCU	GAAACUCGCC	UACAUGAAGU	CGG-AGUUGC
CUCAGUUCGG	AUCGCAGUCU	GCAACUCGAC	UGCGUGAAGC	UGG-AAUCGC
CCCAGUUCGG	AUCGCAGGCU	GAAACCCGCC	UGCGUGAAGU	UGG-AGUUGC
CCCAGUUCGG	AUUGCAGGCU	GAAACCCGCC	UGCAUGAAGU	CGG-AGUUGC
CCCAGUUCGG	AUUGCAGGCU	GAAACCCGCC	UGCAUGAAGC	CGG-AGUUGC
CUCAGUUCGG	AUCGCAGGCU	GCAACCCGCC	UGCUNAAANU	CGG-AAUUNC
CUCAGUUCGG	AUUGNACUCU	GCAACCCGNG	UGCAUGAANU	UGGGAAUCNC
1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1110111111

1350

•

UAGUAAUCGU	GGAUCAGA-A	UGCCACGGUG	AAUA-CGUUC	CCGGGCCUUG
UAGUAAUCGC	AAAUCAGCUA	UGUUGCGGUG	AAUA-CGUUC	UCGGGUCUUG
UAGUAAUCGC	AGAUCAGA-A	UGCUGCGGUG	AAUG-CGUUC	CCGGGUCUUG
UAGUAAUCGC	GGAUCAGC-A	UGCCGCGGUG	AAUA-CGUUC	CCGGGCCUUG
UAGUAAUCGC	GGAUCAGC-A	UGCCGCGGUN	AAUA-CGUUC	CCGGGCCUNG

```

UNGUAAUCGC GGAUCAGC-A UGCCGCGGUN AAUA-CGUUC CCGGGUNUUG
UAGUAAUCGC GGAUCAGC-A CGCCGCGGUG AAUA-CGUUC CCGGGUCUUG
UAGUAAUCGU AGAUCAGC-A UGCUACGGUG AAUA-CGUUC CCGGGUAUUG
UAGUAAUCGC AGAUCAGA-A UGCUGCGGUG AAUG-CGUUC CCGGGUCUUG
UAGUAAUCGC GGAUCAGC-A UGCCGCGGUG AAUA-CGUUC CCGGGCCNNG
UAGUAAUCGC GAAUCAAA-A UGUCGCGGUG AAUG-CGUUC CCGGGUCUUG
UAGUAAUCGU GAAUCAGA-A UGUCACGGUG AAUA-CGUUC CCGGGUCUUG
UAGUAAUCGU GAAUCARA-A UGUCACGGUR AAUA-CUUUC CCGGGUCUUG
NANUAAUCGC NGAUCAGC-A AGCCGNGGNN AAUAACUUUC CCNGGNNNUG
UAGUAAUCNC NGAUCAGCAN GCUUCCGGUA AAUC-CUUC CCGGGUCUGN
1111111111 1111111101 1111111111 1111011111 1111111111

```

1400

```

•
UACACACCGC CCGUCACACC AUGGGA--GU GGUUGCAAA AGAAGUAGG-
UACACACCGC CCGUCACACC ACGAGA--GU UGGUUGCACC UGAAGUAGC-
UACACACCGC CCGUCACACC AUGGAA--GU UGGGGGCGCC CGAAGUUGG-
UACACACCGC CCGUCACACC AUGAGA--GN NGGCAACACC CGAAGUCG-U
UACACACCGC CCGUCACACC ACGAGA--GU UUGUAACACC C-----
UACACACCGC NCGUCACACC ACGAGA--GU UGGUAACACC C-----
UACACACCGC CCGUCACACC AUGGGA--GU UUGUAAUGCC CAAAGCCGG-
UACACACCGC CCGUCACACC ACGAGA--GU UUGUAACACC CGAAGCCGG-
UACACACCGC CCGUCACACC AUGGAA--GU UGGGGGCGCC CAAAGUUGG-
UACACACCGC CCGUNACACC ACGAGA--GU UNGUAACACC C-----
UACACACCGC CCGUCACACC AUGGAA--GU UGGGGGCGCC CGAAGUCGGU
UACACACCGC CCGUCACACC AUGGAA--GU UGGGGGCGCC CGAAGUGGGC
UACACACCGC CCGUCACACC AUGGAAA-GU UGGGGGCGCC CRAAGUGGGC
UUCNNACCGC CCGUCNCNCC AUGAAAA-AC NGGUANCCCC CAAAAUNAUU
UCACCNCCCC CCUNCANCCC NNAAAAUUGG UAUUGACCCU AGAACUAGUC
1111111111 1111111111 1111110011 1111111111 1111111110

```

1450

```

•
UAGCUUAACC -UUCG----- -GGAGGGCGC UUACCACUUU GUGAUUCA-U
AGGCCUAACC -GCAA----- -GGAGGGAUG CUCCGAGGGU GUGAUUAG-C
C-CA----- AUAAAUA--- -----GGU UACCUAAGGC GAAAUCAAA-U
UUGCUGAACC -GAAA----- -GGAGCGCGG CGCCGAAGGU GGGAUCCG-U
-----
-----
UGGCCUAACC -UUUUA---- -GGAAGGAGC CGUCUAAGGC AGGACAGA-U
UGGAGUAACC -UUUUA---- -GGAGCUAGC CGUCGAAGGU GGGACAAA-U
C-AGA----- -UAAA----- -----UAUGC UACCUAAGGU GAAACCAA-U
-----
CGGC----- ----- -AAAUAGGC UGCCUAAGGC AAAAUCAA-U
CAGC----- -----A---- -AAUCGGU UCCCUAAGGC GAAAUCAAA-U
CAAUC----- ----- -AAUCGGU UCCCUAAGGC RAAAUCAA-U
NGUCUNACCC CNA----- -GCAAGANNC UGCCAAGGU UGNAUUGGGN
UGGCCUACCC CCAUAGGGAG AGGAGAUUGC UCCAGAGGU GUUGUAUCUU
1111000000 0000000000 0111111111 1111111111 1111111101

```

1500

```

•
GACUGGGGUG AAGUCGUAA- -----
GAUUGGGGUG AAGUCGUAA- -----
GACUGGGGUG AAGUCGUAA- -----
GAUUGGGGUG AAGUCGUAA- -----
-----
-----
GACCGGGG-- -----GUAA-
GAUUGGGGUG AAGUCGUAA- -----
GACUGGGGUG AAGUCGUAA- -----
-----
GACUGGGGUG AAGUCGUAA- AAGGUAGCCG UAUCGGAAGG UCGGGCUGGA
GACUGGGGUG AAGUCGUAA- AAGGUAGCCG UAUCGGAAGG UCGGGCU---

```

```

GACUGGGGUG AAGUCGUAAC AAGGUAGCCG UAUCGRAAGG UCGGGCUGGA
GANUGGGGUU AAGUNUUUAC CCGGUUNCCC AUUUCUGNAA NGUNCAGCUA
GGGCAUAUNG NGGUGUUNAA UCUCUAUACA CAGGUGUUAC UCCCGUCAUG
1111111111 1111111110 0000000000 0000000000 0000000000

```

#### Anhang 4: Alignment der SSU-rDNA-Sequenzen der *Fusobacterium*-Gruppe

Die mit der 1 bezeichneten Positionen wurden für die Konstruktion des Stammbaumes der *Fusobacterium*-ähnlichen Bakterien von der Darmwand der Termiten *Mastotermes darwiniensis* verwendet.

```

                1070                                1100
                •                                •
E-coli         -UCGUGUUGU GAAAUGUUGG GUUAAGUCCC GCAACGAGCG CAACCCUUAU
Fus-necph2    -UCGUGUCGU GAGAUGUUGG GUUAAGUCCC GCAACGAGCG CAACCCUUAU
Fus-nuclea    -UCGUGUCGU GAGAUGUUGG GUUAAGUCCC GCAACGAGCG CAACCCUUAU
Fus-varium    -UCGUGUCGU GAGAUGUUGG GUUAAGUCCC GCAACGAGCG CAACCCUUAU
Fus-russi     -UCGUGUCGU GAGAUGUUGG GUUAAGUCCC GCAACGAGCG CAACCCUUAU
Fus-gonidi    -UCGUGUCGU GAGAUGUUGG GUUAAGUCCC GCAACGAGCG CAACCCUUAU
Fus-alocis    -UCGUGUCGU GAGAUGUUGG GUUAAGUCCC GCAACGAGCG CAACCCUUAU
FM31            -----
FM53            -----
FM16            -----
1111111111    1111111111 1111111111 1111111111 1111111111

                                1150
                                •
CCUUUGUUGC    CAGCGG-UCC GGCCGGGAAC UCAAAGGAGA CUGCCAGUGA
CGUAUGUUAC    CAGCC-UUCA GU-UGGGGAC UCAUGCGAUA CUGCCUGCGA
CGUAUGUUAC    CAUCA-UUAA GU-UGGGGAC UCAUGCGAUA CUGCCUACGA
CGUAUGUUAC    CAUCA-UUAA GU-UGGGGAC UCAUGCGAGA CUGCCUGCGA
CGUAUGUUAC    CAUCA-UUAA GU-UGGGGAC UCAUGCGAUA CUGCCUGCGA
CGUAUGUUAC    CAGCC-UUUA GU-UGGGGAC UCAUGCGAUA CUGCCUGCGA
CGUAUGUUAC    CAUCA-UUAA GU-UGGGGAC UCAUGCGAUA CUGCCUGCGA
CGUAUGUUAC    CAUCA-UUCA GU-UGGGGAC UCAUGCGAGA CUGCCUUGGA
CGUAUGUUAC    CAUCA-UUCA GU-UGGGGAC UCAUGCGAGA CUGCCUUGGA
CGUAUKUUAC    CAUCA-UUCA GU-UGGGGAC UCAUGCGAAA CUGCCUUGGA
1111111111    1111101111 1101111111 1111111111 1111111111

                                1200
                                •
UAAACUGG-A    GGAAGGUGGG GAUGACGUCA AGUCAUCAUG GCCCUUACGA
CGAGCAG--A    GGAAGGUGGG GAUGACGUCA AGUCAUCAUG CCCCUUAUAC
UGAGUAGG-A    GGAAGGUGGG GAUGACGUCA AGUCAUCAUG CCCCUUAUAC
UGAGCAGG-A    GGAAGGUGGG GAUGACGUNN AGUCAUCAUG CCCCUUAUAC
UGAGCAGG-A    GGAAGGUGGG GAUGACGUNN AGUCAUCAUG CCCCUUAUAC
CGAGCAGG-A    GGAAGGUGGG GAUGACGUCA AGUCAUCAUG CCCCUUAUAC
UGAGCAGG-A    GGAAGGUGGG GAUGACGUNA AGUCAUCAUG CCCCUUAUAC
UGACAAGGGA    GGAAGGUGGG GAUGACGUCA AGUCAUCAUG CCCCUUAUAU
UGACAAGGUA    GGAAGGUGGG GAUGACGUCA AGUCAUCAUG CCCCUUAUAU
UGACAAGG-A    RGAAGGUGGG GAUGACGUCA AGUYAUCAUG CCCCUUAUAU
0111111101    1111111111 1111111111 1111111111 1111111111

                                1250
                                •
CCAGGGCUAC    ACACGUGCUA CAAUGGCGCA UACAAAGAGA AGCGACCUCG
GCUGGGCUAC    ACACGUGCUA CAAUGGGUAG UACAGAGAGC GGCAAACCCG
GCUGGGCUAC    ACACGUGCUA CAAUGGGUAG AACAGAGAGU UGCAAAGCCG
GCUGGGCUAC    ACACGUGCUA CAAUGGGUAG UACAGAGAGC UGCAAACCCG
GCUGGGCUAC    ACACGUGCUA CAAUGGGUAG AACAGAGAGU GGCGAAGCUG
GCUGGGCUAC    ACACGUGCUA CAAUGGGUAG UACAGAGAGC GGCGAACCCG
GCUGGGCUAC    ACACGUGCUA CAAUGGGUAG AACAGAGAGU UGCAAAGCCG

```



1500  
•

```

ACCACUUUGU GAUUCA-UGA CUGGGGUGAA GUCGUAACAA GGUAACCGUA
CCGAGGGUGU GGUUAG-CGA UUGGGGUGAA GUCGUAACAA GGUAUCCGUA
CCGAGGGUGU GAUUAG-CGA NNGGGG---- ---GUAACAA GGUAUCCG--
CCGAGGGUGU GAUUAG-CGA NUGGGG---- -----
CCGAGGGUGU GAUUAG-CGA NNGGG-----
CCGAGGGUGU GGUUAG-CGA NUGGGG---- -----
-----
CCGAGGGUGU GGUUAG-CGA UUGGGGUGAA GUCGUAACAA GGUAUCCGUA
CCGAGGGUGU GGUUGG-CGA UUAGGGUGAA GUCGUAACAA GGUAUCCGUA
CCGAGGGUGU GGUUGGGCGA UUAGGGUGAG GUCGUAACAA GGUAUCCGUA
1111111111 1111110111 0111111100 0001111111 1111111100

```

### Anhang 5: Alignment der SSU-rDNA-Sequenzen der Proteobakterien bzw. *Verrumicrobium*-Gruppe

Die mit 1 bezeichneten Positionen wurden für die Konstruktion des Stammbaumes der Proteobakterien- bzw. *Verrumicrobium*-Gruppe von der Darmwand der Termiten *Mastotermes darwiniensis* verwendet.

1070  
•

```

B-subtilis ----- -UCGU CAGCUCGUGU CGUGAGAUGU
E-coli ----- -UCGU CAGCUCGUGU UGUGAAAUGU
Tha-aromat ----- -UCGU CAGCUCGUGU CGUGAGAUGU
Tha-selnat ----- -UCGU CAGCUCGUGU CGUGAGAUGU
Nis-cinere -----
Dsv-desulf ----- -UCGU CAGCUCGUGU CGUGAGAUGU
Rht-marinu ----- -UCGU CAGCUCGUGC CGUGAGGUGU
FM45 ----- -UUNUU
Verru-Seq ACCGGUGCAC AGGUGCUGCA UGGCUGUCGU CAGCUCGUGU CGUGAGAUGU
FM8 -----
FM30 -----
FM41 -----
FM44 ----- --UCCCGNUU UUCCNGUUUAU
1000000000 0000000000 0000000111 1111111111 0111101111

```

1100  
•

```

UGG-GUUAAG UCCCGCAACG AGCGCAACCC UUGAUCUUAG UUG-CCAGCA
UGG-GUUAAG UCCCGCAACG AGCGCAACCC UUAUCCUUUG UUG-CCAGCG
UGG-GUUAAG UCCCGCAACG AGCGCAACCC UUGUCACUAG UUG-CCAUCA
UGG-GUUAAG UCCCGCAACG AGCGCAACCC UUGUCACUAG UUG-CCAUCA
----- --GUCAUUAG UUG-CCAUCA
UGG-GUUAAG UCCCGCAACG AGCGCAACCC CUAUGGAUAG UUG-CCAGCA
UGG-GUUAAG UCCCGCAACG AGCGCAACCC CUACCGCCAG UUA-CCAGCG
UNG-GUUAAG UCCCGCCNCG AGCGCAACCC UUUUNNCCAG UUG-CCACCA
UGC-GUUAAG UCGCGCAACG AGCGCAACCC CUGUCCUUAG UUG-CCAUCA
-----AAG UCGCGCAACG AGCSCAACCC CUKUCCUUAG UUG-CCAUCA
----- --CCGCAACG AGCGCAASCC CUAUGGUUAG UUA-C----A
----- UCCCGCAACG AGCGCAACCC CUAUGGUUAG UUA-C----A
UGCCGUUUNG UCCGGCCACG AGCGCCCCC UCUUUCUNAG UUUUCCAGCG
1110111111 1111111111 1111111111 1111111111 1110111111

```

1150  
•

```

-UUCAGU-UG GGCACUCUAA GGUGACUGCC GGUGACAAAC CGGAGGAAGG
G-UCCGGCCG GGAACUCAAA GGAGACUGCC AGUGAUAAAC UGGAGGAAGG
-UUUGGU-UG GGCACUCUAG UGAGACUGCC GGUGACAAAC CGGAGGAAGG
-UUUGAGU-UG GGCACUCUAG UGAGACUGCC GGUGACAAAC CGGAGGAAGG
-UUUAGU-UG GGCACUCUAA UGAGACUGCC GGUGACAAGC CGGAGGAAGG
AGUAAUGUUG GGCACUCUAU UCAGACUGCC CGGGUUAACC GGGAGGAAGG

```

GGUAAUGCCG	GGGACUCUGG	CGGGACUGCC	UGCG-CAAGC	AGGAGGAAGG
-UUUAGU-UG	GGCACUCUNG	UGAGACUGCC	GGUGACAAAC	CGGAGGAAGG
-UUUAGU-UG	GGCACUCUAG	GGAGACAAAC	CCUCUUUGAG	GGUGGGAAGG
-UUUAGU-UG	GGCACUUUAA	GGAGACAAAC	UCUCUCUGAG	AGUGGGAAGG
CGUCCGCAAG	GACUCUCUAG	CCAGACCGCU	CUGUUUAACG	GAGAGGAAGG
CGUCCGCAAG	GACUCUCUAG	CCAGACCGCU	CUGUUUAACG	GAGAGGAAGG
GUUAAAGCCG	GGGACUCUAA	GAGGACAAAC	UCGU--UAAG	GGUGGGAAGG
0111111011	1111111111	0111111111	0110011111	0111111111

1200

UGGGGAUGAC	GUCAAAUCAU	CAUGCCCUU	AUGACCUGGG	CUACACACGU
UGGGGAUGAC	GUCAAGUCAU	CAUGCCCUU	ACGACCAGGG	CUACACACGU
UGGGGAUGAC	GUCAAGUCCU	-AUGCCCUU	AUGGGUAGGG	CUUCACACGU
UGGGGAUGAC	GUCAAGUCCU	CAUGCCCUU	AUGGGUAGGG	CUUCACACGU
UGGGGAUGAC	GUCAAGUCCU	CAUGCCCUU	AUGACCAGGG	CUUCACACGU
UGGGGACGAC	GUCAAGUCAU	CAUGCCCUU	ACGCCUAGGG	CUACACACGU
UGGGGAUGAC	GUCAAGUCAU	CAUGCCCUU	ACGCCAGGG	CUGCACACGU
UGGGGAUGAC	GUCAAGUCCU	CAUGCCCUU	AUGGGUAGGG	CUUCACACGU
UGGGGAUGAC	GUCAAGUCAG	GAUGCCCUU	ACGGCUAGGG	CUGCACACGU
UGGGGAUGAC	GUCAAGUCAG	GAUGCCCUU	ACGGUUUGGG	CUGCACACGU
UGGGGAUGAC	GUCAAGUCAG	GAUGCCCUU	AUGACCAGGG	CUGCACACGU
UGGGGAUGAC	GUCAAGUCAG	GAUGCCCUU	AUGACCAGGG	CUGCACACGU
UGGGGAUGAC	GUCAAGUCAG	GAUGCCCUU	ACAUCCAGGG	CUGCACACGU
1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111

1250

GCUACAAUGG	ACAGAACAAA	GGGCAGCGAA	ACCGCGAGGU	UAAGCCAAUC
GCUACAAUGG	CGCAUACAAA	GAGAAGCGAC	CUCGCGAGAG	CAAGCGGACC
CAUACAAUGG	UCGGUACAGA	GGGUUGCCAA	GCCGCGAGGU	GGAGCCAAUC
CAUACAAUGG	UCGGUACAGA	GGGUUGCCAA	GCCGCGAGGU	GGAGCCAAUC
CAUACAAUGG	UCGGUACAGA	GGGUAGCCAA	GCCGCGAGGU	GGAGCCAAUC
ACUACAAUGG	CGCGCACAAA	GGGGAGCGAG	ACCGCGAGGU	GGAGCCAAUC
GCUACAAUGG	CCGGUACAAU	GGGCAGCCAC	CCCPCGAGGG	GGAGCGAAUC
CAUACAAUGG	UCGGUACANA	GGGACGCGAA	GCCGCGAGGU	GGAGCCAAUC
ACUACAAUGC	CCGGUACAGA	GGGACGCAAU	ACCGCGAGGU	GGAGCAAUC
ACUACAAUGC	CCGAUACAAA	GAGUCGCAAU	ACCGCGAGGU	GGAGCUAAUC
ACUACAAUGC	AUACUACAGA	GGGACGCAAG	ACCGCAAGGU	GGAGCUAAUC
ACUACAAUGC	AUACUACAGA	GGGACGCAAG	ACCGCAAGGU	GGAGCUAAUC
GCUACAAUGC	CCGGUACAAA	UGGAGGCGAA	UCCGCGAGGA	GGAGCAAAAC
0111111111	0111111111	1110011010	0111111111	1111111111

1300

CCAC--AAAU	CUGUUCUCAG	UUCGGAUCGC	AGUCUGCAAC	UCGACUGCGU
UCAU--AAAG	UGCGUCGUAG	UCCGGAUUGG	AGUCUGCAAC	UCGACUCCA
CCAA--AAAG	CCGAUCGUAG	UCCGGAUCGU	AGUCUGCAAC	UCGACUACGU
CCUU--AAAG	CCGAUCGUAG	UCCGGAUCGU	AGUCUGCAAC	UCGACUACGU
UCAC--AAAA	CCGAUCGUAG	UCCGGAUUGC	ACUCUGCAAC	UCGAGUGCAU
CCAA--AAAA	CGCGUCCCAG	UCCGGAUUGC	AGUCUGCAAC	UCGACUGCAU
CCU---AAAG	CCGGUCUCAG	UUCGGAUUGG	AGUCUGCAAC	UCGACUCCA
CCCAUAAAAG	CCGAUCGUAG	UCCGGAUCGC	ANUCUGCAAC	UCGACUGCGU
CUC---AAAA	CCGGGCCCAG	UUCAGAUUGU	AGUCUGCAAC	UCGACUACAU
UUC---AAAA	UCGGGCCCAG	UUCAGAUUGU	UGUCUGCAAC	UCGACAACAU
UCAG--AAAA	GUAUGCCCAG	UUCGGAUUGG	AGGUCUGCAAC	UCGCCUCCA
UCAG--AAAA	GUAUGCCCAG	UUCGGAUUGG	AGGUCUGCAAC	UCGCCUCCA
CAU---AAAG	CCGGGCUCAG	UUCAGAUUGC	AGUCUGCAAC	UCGACUGCAU
1110001111	1111111111	1111111110	1111111111	1111111011

1350

```

GAAGCUGGAA UCGCUAGUAA UCGCGGAUCA GC-AUGCCGC GGUGAAUACG
GAAGUCGGAA UCGCUAGUAA UCGUGGAUCA GA-AUGCCAC GGUGAAUACG
GAAGUCGGAA UCGCUAGUAA UCGCAGAUCA GC-AUGCUGC GGUGAAUACG
GAAGUCGGAA UCGCUAGUAA UCGCAGAUCA GC-AUGCUGC GGUGAAU---
GAAGUCGGAA UCGCUAGUAA UCGCAGGUCA GC-AUACUGC GGUGAAUACG
GAAGUUGGAA UCGCUAGUAA UUCGAGAUCA GC-AUGCUCG GGUGAAUUCG
GAAGCCGGAA UCGCUAGUAA UCGCGCAUCA GCUACGGCGC GGUGAAUACG
GAAGUCGGAA UCGCUAGUAA UCCCGGAUCA GC-AUGCCGC GGUGAAUACG
GAAGUUGGAA UCGCUAGUAA UGGCGUAUCA GCUACGACGC CGUGAAUACG
GAAGUUGGAA UCGCUAGUAA UGGCGCAUCA GCUACGGCGC CGUGAAUACG
GAAGCCGGAA UCGCUAGUAA UGGCGCAUCA GCUACGGCGC CGUGAAUACG
GAAGCCGGAA UCGCUAGUAA UGGCGCAUCA GCUACGGCGC CGUGAAUACG
GAAGUUGGAA UCGCUAGUAA UGGUGCAUCA GCAACGGCAC CGUGAAUACG
1111111111 1111111111 0111111111 1101111111 1111111111

```

1400

```

UUCCCCGGGCC UUGUACACAC CGCCCCGUCAC ACCACGAG-A GUUUGUAACA
UUCCCCGGGCC UUGUACACAC CGCCCCGUCAC ACCAUGGG-A GUGGGUUGCA
UUCCCCGGGUC UUGUACACAC CGCCCCGUCAC ACCAUGGG-A GUGGGUUUCA
-----
UUCCCCGGGUC UUGUACACAC CGCCCCGUCAC ACCAUGGG-A GUGGGGGGAUA
UUCCCCGGGCC UUGUACACAC CGCCCCGUCAC ACCACGAA-A GUCGGUUUUA
UUCCCCGGGCC UUGUACACAC CGCCCCGUCAA CCCAUGGG-A GCCGGGGGCG
UUCCCCGGGUC UUGUACACAC CGCCCCGUCAC ACCAUGGGGA GUGGGUUUCA
U-CCCCGGGCC UUGUACACAC CGCCCCGUCAC GUCAUGAA-A GCCGGUUUCG
UUCCCCGGGCC UUGUACACAC CGCCCCGUCAC AUCAUGAA-A GCCGGUUUUG
UUCCCCGGGUC UUGUACACAC UGCCCCGUCAC AUCAUGAA-A GCCGGUUGUA
UUCCCCGGGUC UUGUACACAC UGCCCCGUCAC AUCAUGAA-A GCCGGUUGUA
UUCCCCGGGCC UUGUACACAC CGCCCCGUCAC GUCAUGAA-A GCCGAUUCAA
1111111111 1111111111 1111111111 1111111101 1111111111

```

1450

```

CCCGAA-GUC GGU--GAG-- -----
AAAGAA-GUA GGU--AGC-- -----
CCAGAA-GUA GGU--AGC-- -----
-----
CCAGAA-GUA GGU--AGG-- -----
CCCGAA-GCC GGU--GAG-- -----
CCCGAA-GUC CGU--GAC-- -----
CCANAAAGUA GGU--AGCCU UAACCGCAAG GAGGGGCGCC UUUACCCACG
CCCGAAGUGC GUU--UGCCA ACCAGCAAUG GAGGCGGCGC CCUAAGGUGA
CCCAAAGUGC GUU--AGCCA ACCAGCAAUG GAGGCGGCGC CCUAAGGUGA
CCCGAAGUCA UUU--CGG-- -----U G----- CCUAAGGUUAU
CCCGAAGUCA UUU--CGG-- -----U G----- CCUAAGGUUAU
CCCCNAAGUA UCCCGAGCCA ACUCGCAAGA NGGGCAGGGU CCUAAGGUUCG
1111110111 1110001100 0000000000 0000000000 0000000000

```

## Anhang 6: Alignment der SSU-rDNA-Sequenzen der *Bacteroides*-Gruppe

Die mit 1 bezeichneten Positionen wurden für die Konstruktion des Stammbaumes der *Bacteroides*-ähnlichen Bakterien von der Darmwand der Termiten *Mastotermes darwiniensis* verwendet.

1070

1100

```

E-coli      -UCGUGUUGU GAAAUGUUGG GUUAAGUCCC GCAACGAGCG CAACCCUUAU
Bac-fsyths -UCGUGCNGU GAGGUGUCGG CUUAAGUGCC AUAACGAGCG CAACCCUGAC
Bac-fragil -UCGUGCCGU GAGGUGUCGG CUUAAGUGCC AUAACGAGCG CAACCCUUAU
Bac-distas -UCGUGCCGU GAGGUGUCGG CUUAAGUGCC AUAACGAGCG CAACCCUUGC
Bac-vulgat -UCGUGCCGU GAGGUGUCGG CUUAAGUGCC AUAACGAGCG CAACCCUUGU

```

<i>Bac-ovatus</i>	-UCGUGCCGU	GAGGUGUCGG	CUUNAGUGCC	AUAACGAGCG	CAACCCUUAU
FM37	-----	-----	-----C	ATAACRAGCG	CAACCCCTGGA
F5-Eubak	-----	-----	---AAGTGCC	ATAACGAGCG	CAACCCCTGAC
FM33	-----	-----	-----C	ATAACRAGCG	CAASC--TRA
FM25	-----	-----	-----	-----	----CCTGAC
FM9	-----	-----	-----	-----	-AACCCTRAC
FM46	-----TTT	TTGAGNTTGC	CCTTTTACC	ATNACNAGCG	CCCCCCTGAC
FM13	-----	-----	---AAGTGCC	ATAACRAGCG	CAACCCCTGAC
FM5	-----	-----	-----	-TAACRAGCS	CAACCCCTGAC
FM3	-----	-----	-----	ATAACRAGCG	CAACCCCTTAC
	1000000000	0000000000	0000000001	1111111111	1111111111

1150

CC-UUUGUUG	CCAGCGG-UC	CGGCCGGGAA	CUCAAAGGAG	ACUGCCAGUG
UG-UCAGUUG	CUAACAGGUA	AAGCUGAGGA	CUCUNGCXXX	ACUGCCGGCG
CU-UUAGUUA	CUAACAGGUU	AUGCUGAGGA	CUCUAGAGAG	ACUGCCGUCG
CA-CUAGUUA	CUAACAGGUU	AGGCUGAGGA	CUCUGGUGGN	ACUGCCAGCG
UG-UCAGUUA	CUAACAGGUU	AUGCUGAGGA	CUCUGACAAG	ACUGCCAUCG
CU-UUAGUUA	CUAACAGGUU	AUGCUGAGGA	CUCUAGAGAG	ACUGCCGUCG
CTGTCAAGTTG	CTAACAGGTA	GTGCTGAGGA	CTCTGGCGGG	ACTGCCGGCG
TG-TCAGTTG	CTAACAGGTA	GTGCTGAGGA	CTCTGGCGGG	ACTGCCGGCG
CTGTCAAGTTG	CTAACAGGTA	GTGCTGAGGA	CTCTGGCGGG	ACTGCCGGCG
TG-TCAGTTG	CTAACAGGTA	GTGCTGAGGA	CTCTGGCGGG	ACTGCCGGCG
TG-TCARTTG	CTAACAGGTA	GTGCTGAGGA	CTCTGGCGGG	ACTGCCGGCG
NG-TCAGTTT	NTAACAGGTA	GTGCTGAGGA	CTCTGGCGGG	ACTGCCGGCG
TG-TCAGTTG	CTAACAGGTA	GTGCTGAGGA	CTCTGGCAGR	ACTGSCGGCA
TG-TCAGTTA	CTAACAGGTA	ATGCTGARGA	CTCTGGCAGG	ACTGCCGGCR
CG-ATAGTTA	CCAGYAAGTG	AAGTTGGGGA	CTCTGTCGGG	ACTGCCACCG
1101111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111

1200

AUAAACUG-G	AGGAAGGU-G	GGGAUGACGU	CAAGUCA-UC	AUGGCC-UU
-UAAGCUGUG	AGGAAGGU-U	GGGAUGACGU	CAAAUCA-GC	ACGGCCC-UU
-UAAGAUGUG	AGGAAGGU-G	GGGAUGACGU	CAAAUCA-GC	ACGGCCC-UU
-UAAGCUGCG	AGGAAGGC-G	GGGAUGACGU	CAAAUCA-GC	ACGGCCC-UU
-UAAGAUGUG	AGGAAGGU-G	GGGAUGACGU	CAAAUCA-GC	ACNGCCC-UU
-UAAGAUGUG	AGGAAGGU-G	GGGAUGACGU	CAAAUCA-GC	ACGGCCC-UU
-TAAGCTGTG	AGGAAGGT-T	GGGATGACGT	CAAATCA-GC	ACGGCCC-TT
-TAAGCTGTG	AGGAAGGT-T	GGGATGACGT	CAAATCA-GC	ACGGCCC-TT
-TAAGCTGTG	AGGAAGGT-T	GGGATRACTT	CAAATCA-GC	ACGGCCC-TT
-TAAGCTGTG	AGGAAGGT-T	GGGATRACTT	CAAATCA-GC	ACGGCCC-TT
-TAAGCTGTG	AGGAAGGT-T	GGGATRACTT	CAAATCA-GC	ACGGCCC-TT
-TAAGCTGTG	AGGAAGGT-T	GGGATNACNT	CAAATCA-GC	ACGGCCC-TT
-TAAGCTGTR	AGRAAGGT-K	GGRATAACTT	CAAWTCACGC	ACGGCCC-TT
-TAAGCTGTA	AGRAAGGT-T	GGRATRACCT	CAAWTCA-SC	ACGGCCC-TT
-TAAGGTGTR	AGGAAGGT-G	GGGATRACGT	CAAATCA-GC	ACGGCCC-TT
0111111111	1111111101	1111111111	1111111011	1111111011

1250

ACGACCAGGG	CUACACACGU	GUUACAAUGG	CGCAUACAAA	GAGAAGCGAC
ACNNCCGGGG	CGACACACGU	GUUACAAUGG	CAGGGACAAA	GGGCAGCUAC
ACGUCCGGGG	CUACACACGU	GUUACAAUGG	GGGGUACAGA	AGGCAGCUAG
ACAUCCGGGG	CGACACACGU	GUUACAAUGG	CGUGGACAAA	GGGAGGCCAC
ACGUCCGGGG	CUACACACGU	GUUACAAUGG	GGGGUACAGA	GGGCNGCUAC
ACGUCCGGGG	CUACACACGU	GUUACAAUGG	GGGGUACAGA	AGGCRGCUAC
ACATCCGGGG	CRACACACKT	GTTACAATGG	CAGGGACAAA	GGGCAGCTAC
ACATCCGGGG	CGACACACGT	GTTACAATGG	CAGGGACAAA	GGGCAGCTAC
ACATCCGGGG	CAACACACKT	GTTACAATGG	CRGGGACAAA	GGGCASCTAC
ACATCCGGGG	CAACACACTT	GTTACAATGG	CAGGGACAAA	GGGCAGCTAC
ACATCCGGGG	CAACACACKT	GTTACAATGG	CAGGGACAAA	GGGCAGCTAC
ACATCCGGGG	CAACACACNT	GTTACAATGG	CAGGGACAAA	GGGCAGCTAC

ACATCCGGGG	CAACACACTT	GTTACAATGG	CAGGGACAAA	RGGCACCWAC
ACATCCGGGG	CRACACACTT	GTTACAATGG	TGGGGACAAA	RGGCTGCWAC
ACKTCCGGGG	CRACACACKT	GTTACAATGG	GGGGRACAAA	GGGCAGCTAC
1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111

1300

CUCGCGAGAG	CAAGCGGACC	UCAUAAAGUG	CGUCGUAGUC	CGGAUUGGAG
CGGGCGACCG	GAUGCCAAUC	UCC-AAACCC	UGUCUCAGUU	CGGAUCGGAG
CGGGUGACCG	UAUGCUAAUC	CCA-AAAACC	UCUCUCAGUU	CGGAUCGAAG
CUGGCGACAG	GGAGCGAAUC	CCC-AAACCA	CGUCUCAGUU	CGGAUCGGAG
CACGCGAGUG	GAUGCCAAUC	CCC-AAAACC	UCUCUCAGUU	CGGACUGGAG
CUGGYGACAG	GAUGCUAAUC	CCA-AAAACC	UCUCUCAGUU	CGGAUCGAAG
CTGGTGACAG	GATGCTAATC	TCT-AAACCC	TGTCTCAGTT	CGGATCGGAG
CTGGTGACAG	GATGCTAATC	TCT-AAACCC	TGTCTCAGTT	CGGATCGGAG
CTGGTGACAG	GATGCTAATC	TCT-AAACCC	TGTCTCAGTT	CGGATCGGAG
CTGGTGACAG	GATGCTAATC	TCC-AAACCC	TGTCTCAGTT	CGGATCGGAG
CTGGTGACAG	GATGCTAATC	TCK-AAACCC	TGTCTCARTT	CGGATCGRAG
CTGGTGACAG	GATGCTAATC	TCT-AAACCC	TGTCTCANTT	CGGATCGGAN
CTGGTRACAG	GATGCTAATC	TCT-AAACCC	TGTCTCAGTT	CGGATCGGAG
CGGGCRACCG	GATGCCAATC	TCC-AAACCC	CATCTCAGTT	CGGATCGGAG
ACAGCRATGT	GATGCGAATC	TCC-AAACCC	TCTCCCAKTT	CGGATCRAAK
1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111

1350

UCUGCAACUC	GACUCCAUGA	AG-UCGGAAU	CGCUAGUAAU	CGUGGAUCAG
UCUGCAACUC	GACUCCGUGA	AG-CUGGAUU	CGCUAGUAAU	CGCGCAUCAG
UCUGCAACCC	GACUUCGUGA	AG-CUGGAUU	CGCUAGUAAU	CGCGCAUCAG
UCUGCAACCC	GACUCCGUGA	AG-CUGGAUU	CGCUAGUAAU	CGCGCAUCAG
UCUGCAACCC	GACUCCACGA	AG-CUGGAUU	CGCUAGUAAU	CGCGCAUCAG
UCUGCAACCC	GACUUCGUGA	AG-CUGGAUU	CGCUAGUAAU	CGCGCAUCAG
TCTGCAACCC	GACTCTGTGA	AG-CTGGATT	CGCTAGTAAT	CGCGCATCAG
TCTGCAACCC	GACTCTGTGA	AG-CTGGATT	CGCTAGTAAT	CGCGCATCAG
TCTGCAACCC	RACTCTGTGA	AG-CTGGATT	CGCTAGTAAT	CGCGCATCAS
TCTGCAACCC	RACTCTGTGA	AG-CTGGATT	CGCTAGTAAT	CGCGCATCAG
TCTGCAACCC	RACTCTGTRA	AS-CTGGATT	CGCTAGTAAT	CGCGCATCAG
TCTGCAACCC	NACTCTGTGA	AN-CTGGATT	CGCTAGTAAT	CGCGCATCAG
TCTGCAACCC	GACTCTGTGA	AGTCTGGATT	CGCTAGTAAT	CGCGCATCAG
TCTGCAACCC	RACTCTGTGA	AG-CTGGATT	CGCTAGTAAT	CGCGCATCAG
TCTGCAACCC	RACTTCGTRA	AG-CTGGATT	CGCTAGTAAT	CGCGCATCAG
1111111111	1111111111	1101111111	1111111111	1111111111

1400

A--AUGCCAC	GGU-GAAUAC	GUUCCCGGGC	CUUGUACACA	CCGCCCGUCA
CC-AUGGCGC	GGU-GAAUAC	GUUCCCGGGC	CUUGUACACA	CCGCCCGUCA
CC-ACGGCGC	GGU-GAAUAC	GUUCCCGGGC	CUUGUACACA	CCGCCCGUCA
CC-AUGGCGC	GGU-GAAUAC	GUUCCCGGGC	CUUGUACACA	CCGCCCGUCA
CC-ACGGCGC	GGU-GAAUAC	GUUCCCGGGC	CUUGUACACA	CCGCCCGUCA
CC-AUGGCGC	GGU-GAAUAC	GUUCCCGGGC	CUUGUACACA	CCGCCCGUCA
CC-ATGGCGC	GGT-GAATAC	TTTCCCGGGC	CTTGTACACA	CCGCCCGTCA
CC-ATGGCGC	GGT-GAATAC	KTYCCCGGGC	CTTGTACACA	CCGCCCGTCA
CC-ATGGCGC	GGT-RAATAC	TTTCCCGGGC	CTTGTACACA	CCGCCCGTCA
CC-ATGGCGC	GGT-RAATAC	GTTCCCGGGC	CTTGTACACA	CCGCCCGTCA
CC-ATGGCGC	GGT-RAATAC	TTTCCCGGGT	CTTGTACACA	CCGCCCGTCA
ACCATGGCGC	GGTAGAATAY	GT-CCCGGGC	CTTGTACACA	CCGCCCGTCA
MM-ATGGCGC	GGT-RAATAC	TTTCCCGGGC	CTTGTACACA	CCGCCCGKCA
CC-ATGGCGC	GGT-RAATAC	KTTCCCGGGC	CTTGTACACA	CCGCCCGTCA
1101111111	1110111111	1111111111	1111111111	1111111111

1450

CACCAUGGGA GUGGGUUGCA AAAGAA-GUA GGUAGCUUAA CCUUCGGGAG  
 AGCCAUGGGA GCCGGGGGUA CCUGAA-GUC CGU-----AA CCGCGAGGA-  
 AGCCAUGGGA GCCGGGGGUA CCUGAA-GUA CGU-----AA CCGCAAGGA-  
 AGCCAUGGGA GCCGGGGGUA CCUGAA-GUC CGU-----AA CCGAAAAGGA-  
 AGUCAUGGGA GCCGGGGGUA CCUGAA-GUG CGU-----AA CCGCGAGGA-  
 AGCCAUGAAA GCCGGGGGUA CCUGAA-GUA CGU-----AA CCGCAAGGA-  
 AGCCATGGGA GCCGGGGGTA CCTGAA-GTA TGT-----AA CCGCAAGGA-  
 AGCCATGGGA GCCGGGGGTA CCTGAA-GTA TGT-----AA CCGCAAGGA-  
 AGCCATGGGA GCCGGGGGTA CCTGAA-GTA TGT-----AA CCGCAAGGA-  
 AGCCATGGGA GCCGGGGGTA CCTRAA-KTA TGT-----AA CCGCAAGGAA  
 AGCCATGGGA GCCGGGGGTA CCTGAA-GTA TGT-----AA CCGCAAGGA-  
 AGCCATGGGA GCCGGGGGTA CCTNAAANTA TGT-----AA CCGCAAGGAA  
 ASCCATGGRA GCCGGGGGTA CCTAGAWGTR TKT-----AA CCGCAAGGA-  
 AGCCATGGRA GCCGGGGGTA CCTAAAAGTA GTG-----AA CCGCAAGGG-  
 AGCCATGGRA GCCGGGGGTA CCTRAA-RTC CGT-----AA CCGCRAGGG-  
 1111111111 1111111111 1111110111 1110000011 1111111110

1500

GCGCUUACC -ACUUUGUGA UUCA-UGACU GGGGUGAAGU -CGUAACAAG  
 ---UCGGCCU -AGGGUAAAA CUGG-UG--- -----  
 ---UCGUCCU -AGGGUAAAA CUGG-UGACU GGGGCUAAGU -CGUAACAAG  
 ---UCGGCCU -AGGGUAAAA CUGG-UGACU GGGGCUAAGN -NGUAACAAG  
 ---GCGCCCU -AGGGUAAAA CUGG-UGACU GGGGCUAAGU -CGUAACAAG  
 ---GCGUCCU -AGGGUAAAA CUGG-UAAU- -----  
 ---GCGTCCT -AGGGTAAAA CCGG-TGACT GGGGCTAAGT -CGTAACAAG  
 ---GCGTCCT -AGGGTAAAA CCGG-TGACT GGGGCTAAGT -CGTAACAAG  
 ---GCGTCC- -----  
 ---GCGTCCT -AGGGTAAAA CCGG-TRACT GGGGCTAAKT -CGTAACAAG  
 ---GCGTCCT -AGGGTAAAA CCGG-TRACT GGGGCTAAGT -CGGAACAAG  
 ---GCGTCCT TAGGGTAAAA CCGGGTGACT GGGGCTAANT TCGTAACAAG  
 ---GCGTCCT -AGGGTAAAA CCGG-TGACT GGGGCTAAGT -CTTAACAAG  
 ---GCGTCCT -AGGGTAAAA CCGG-TGACT GGGGCTAAGT CGTTAACAAG  
 ---ACGGCCT -AGGGTAAAA CCGGGTAACT GGGGCTAAGT -CGTAACAAG  
 0001111111 0111111111 1111011111 1111111111 0111111111

1540

GUAACC-GUA GGGGAACC-U GCGGUUG-GA UCACCU--CC U-----  
 -----  
 GUAGCC-GUA CCGGAAGG-U GCGGCUG-GA ACACCU--CC U-----  
 -----GUA CCGGAAG--- -----GA ACACCU--CC U-----  
 GUAGCN-GUA CCGGAAG--- -----GA ACACCU--CC U-----  
 -----  
 GTACCC-GTA CCGGAAGG-T GTGGCTG-GA TCACCT--CC TTTCTGCGGC  
 GTAGCC-GTA CCGGAAGG-T GTG-----  
 -----  
 GTAGCC-GTA CCGGAAGG-T GTGGCTG-GA TCACCT--CC TTTCTGCGGC  
 GTAGCCCATA CCGGAAGG-T GTGGCTG-GA TCACCT--CC TTTCTGCGGC  
 GTANCCCATA CCGGAAAGGT GTGGCTGGGA TCACCCTCCC TTTCTGCGGC  
 GTACCC-GTW CCGGAAGG-T GTGGCTG-GA TCACCT--CC TTTCTGCGGC  
 GTAGCC-GTA CCGRAAGG-T GTGRCTG-GA TCACCT--CC TTTCTGCGGC  
 GTAGCC-GTA CCGRAAGG-T GCGGCTG-GA TCACCT--CC TTTCTGCGGC  
 1111111111 1111111111 1111111111 1111110011 1000000000

## Anhang 7: Alignment der SSUr DNA-Sequenzen der Methanbakterien

Die mit 1 bezeichneten Positionen wurden für die Konstruktion des Stammbaumes der Methanbakterien von der Darmwand der Termiten *Mastotermes darwiniensis* verwendet.

				781	
				•	
<i>E-coli</i>	-----	-----	-----	-----	A ACAGGAUUAG
<i>Mbb-arbori</i>	-----	-----	-----	-----	A ACCGGAUUAG
<i>Mbb-rumina</i>	-----	-----	-----	-----	A ACCGGAUUAG
<i>Mb-bryanti</i>	-----	-----	-----	-----	A ACCGGAUUAG
<i>Mb-formic</i>	-----	-----	-----	-----	A ACCGGAUUAG
fmb1	-----	-----	-----	-----	CCCCA ACCGGAUUAG
fmb2	-----	-----	-----	-----	CCCCA ACCGGAUUAG
fmb3	-----	CCCCGCGCCC	GGCCCGCCGC	GGCCGCCCCA	ACCGGAUUAG
<i>Mbb-CutiCu</i>	GAACGAACCU	GACGGUGAGG	GACGAAAGCU	AGGGGCGCGA	ACCGGGUUAG
FMBK2	-----	-----	-----	-----	-----
FMBK4	-----	-----	-----	-----	-----
FMBK7	-----	-----	-----	-----	-----
FMBK5	-----	-----	-----	-----	-----
FMBK6	-----	-----	-----	-----	-----
FMBK1	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Mbb-smithii</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Mbb-Curvatu</i>	-----	-----	-----	-----	-----
	1000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000
		800			
		•			
	AUACCCUGGU	AGUCCACGCC	GUAAACGAUG	UCGACUUGGA	GGUUGUGCC-
	AUACCCGGGU	AGUCCUAGCC	GUAAACGAUG	CGGACUUGGU	GUUAGAAUGG
	AUACCCGGGU	AGUCCUGGCC	GUAAACGAUG	CGGACUUGGU	GUUGGGAUGG
	AUACCCGGGU	AGUCCUGGCC	GUAAACGAUG	CGGACUUGGU	GUUGGAAUGG
	AUACCCGGGU	AGUCCUGGCC	GUAAACGAUG	UGGACUUGGU	GUUGGGAUGG
	AUACCCGGGU	AGUCCUAGCC	GUAAACGAUG	CGGACUUGGU	GUUGGGGUGG
	AUACCCGGGU	AGUCCUAGCC	GUAAACGAUG	CGGACUUGGU	GUUGGGGUGG
	AUACCCGGGU	AGUCCUAGCC	GUAAACGAUG	CGGACUUGGU	GUUGGGGUGG
	AUACCCGGGU	AGUCCUAGCC	GUAAGCGAUG	CGGACUUGGU	GUUGGAAUGG
	-----	-----	CC GUAAACGAUG	CGGACUUGGU	GUUGGGAUGA
	-----	-----	-----	----CUUGGU	GUUGGGAUGA
	-----	-----	-----	CGGACUUGGU	GUUGGGAUGA
	-----	-----	-----	-GGACUUGGU	GUUGGGAUGA
	-----	-----	-----	----CUUGGU	GUUGGGGUGG
	-----	-----	CC GUAAACGAUG	CGGACUUGGU	GUUGGGGUGG
	-----	-----	GCU GUAAACGAUG	CGGACUUGGU	GUUGGGGUGG
	-----	-----	-----	-----	-----
	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111
		850			
		•			
	-CUUGA--GG	CGUGGCUUCC	GGAGCUAACG	CGUUAAGUCG	ACCGCCUGGG
	CUUUGAGCCG	CUCUAGUGCC	GAAGGGAAGC	UGUUAAGUCC	GUCGCCUGGG
	CUUUGAGCNN	UUCGUGUGCC	GAAGGGAAGC	UGUUAAGUCC	GCCGCCUGGN
	CUUCGAGCUG	CUCCAGUGCC	GAAGGGAAGC	UGUUAAGUCC	GCCGCCUGGG
	CUCCGAGCUG	CCCCAGUGCC	GAAGGGAAGC	UGUUAAGUCC	ACCGCCUGGG
	CUUUGAGCUG	UUCGAGUGCC	GAAGGGAAGC	UGUUAAGUCC	GCCGCCUGGG
	CUUUGAGCUG	UUCGAGUGCC	GAAGGGAAGC	UGUUAAGUCC	GCCGCCUGGG
	CUUUGAGCUG	UUCGAGUGCC	GAAGGGAAGC	UGUUAAGUCC	GCCGCCUGGG
	CUUUGAGCCG	CUCCAGUGCC	GAAGGGAAGC	UGUUAAGUCC	GCCGCCUGGG
	CCUUGAGUUG	CUCCAGUGCC	GAAGGGAAGC	UGUUAAGUCC	GUCGCCUGGG
	CCUUGAGUUG	CUCCAGUGCC	GAAGGGAAGC	UGUUAAGUCC	GUCGCCUGGG
	CCUUGAGUUG	CUCCAGUGCC	GAAGGGAAGC	UGUUAAGUCC	GUCGCCUGGG
	CUUUGAGCUG	UUCGAGUGCC	GAAGGGAAGC	UGUUAAGUCC	GCCGCCUGGG
	CUUUGAGCUG	UUCGAGUGCC	GAAGGGAAGU	UGUUAAGUCC	GCCGCCUGGG





### Anhang 8: Alignment der SSU-rDNA-Sequenzen der sulfatreduzierenden Bakterien

Die mit 1 bezeichneten Positionen wurden für die Konstruktion des Stammbaumes der sulfatreduzierenden Bakterien aus verschiedenen Insekten verwendet.

```

                20                               50
                •                               •
E-coli          -UGGCUCAGA UUGAACGCUG GCGGCAGGCC UAACACAUGC AAGUCGAACG
Dsv-salex     -UGGCUCAGA UUGAACGCUG GUGGCGUGCU UAACACAUGC AAGUCGUGCG
Dsv-africa   -UGGCUCAGA UUGAACGCUG GCGGCGUGCC UANNACAUNC AAGUCGUNGNG
Dsv-lonrch   ----- --GAACGCUG GCGGCGUGCC UAACACAUGC AAGUCGUNCG
Dsv-desulf  -UGGCUCAGA UUGAACGCUG GCGGCGUGCU UAACACAUGC AAGUCGAACG
Dsv-spKRS    --GGCUCAGA UUGAACGCUG GCGGCGUGCU UAACACAUGC AAGUCGAACG
Dsv-vulgar  -UGGCUCAGA UUGAACGCUG GCGGCGUGCU UAACACAUGC AAGUCGNGCG
Dsv-spPT    -UGGCUCAGA UUGAACGCUG GCGGCGUGCC UAACACAUGC AAGUCGUGCG
Dsv-spKH    -----A UUGAACGCUG GCGGCGUGCC UAACACAUGC AAGUCGUGCG
Dsv-termit  -----A UUGAACGCUG GCGGCGUGCC UAACACAUGC AAGUCGUGCG
Dsv-desuN   -UGGCUCAGA AUGAACGCUG GCGGCGUGCC UAACACAUGC AAGUCGUACG
FSO4         ----- --GAACGCUG GCGGCGUGCC UAACACAUGC AAGUCGUGCG
FSRO2       ----- --GAACGCUG GCGGYUUGCU UAACACAUGC AAGUCKAACG
Dsv-KMS2   -----A UUGAACGCUG GCGGCGUGCU UAACACAUGC AAGUCGAACG
FSCI        -----CAGA UUGAACGCUG GCGGCGUGCC UAACACAUGC AAGUCGAGCG
fsc4       -----CAGA UUGAACGCUG GCGGCGUGCC UAACACAUGC AAGUCGAGCG
Dsv-SUL1  -----A UUGAACGCUG GCGGCGUGCC UAACACAUGC AAGUCGAGCG
FSCII      -----AGA UUGAMCGCUG GCGGCGUGCC UAACACAUGC AAGUCGAGCG
Dsv-STL6  -----AGA TTGAACGCTG GCGGCGTGCT TAACACATGC AAGTCGAACG
FSPa4-5    -----GA TTGAACGCTG GCGGCGTGCC TAACACATGC AAGTCGAACG
100000011 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111

                                                    100
                                                    •
GUAACAG--- --GAAGAAGC UUGCUUCUUU -----GCU GACGAGUGGC
-----AGA AC-AGUCCU UCGGGAACC- -UAGUAG--- ----AGCGGC
-----AGA NA-GUYGGYU UCGGCCCGC- GAGUACA--- ----AGCGGC
-----UGA AA---GGGCU UCGGCC---- UGAGUAA--- ----AGCGGC
-----CGA AA---GGGACU UCGGUCCU-- -GAGUAA--- ----AGUGGC
-----CGA AA---GGGACU UCGGUCCU-- -GAGUAA--- ----AGUGGC
-----UGA AA---GGACU UCGGYCC--- -GAGUAA--- ----AGCGGC
-----UGA AA---GGCU UCGGCC---- UGAGUAA--- ----AGCGGC
-----UGA AA---GGGCU UCGGCC---- UGAGUAA--- ----AGCGGC
-----UGA AA---GGGCU UCGGCC---- UGAGUAA--- ----AGCGGC
-----AGA AA---GGGGCU UCGGCCCU-- -GAGUAG--- ----AGUGGC
-----UGA AA---GGGCU UCGGCC--U- -GAGUAA--- ----AGCGGC
-----CGA AA---GGGACU UCGGUCCU-- -GAGUAA--- ----AGUGGC
-----UGA AA---GGGGCU UCGGCCCU-- -AAGUAA--- ----AGUGGC
A-----UGA A---GGGAGC UUGCUCUCCG- -GAUU----- ----AGCGGC
A-----UGA A---GGGAGC UUGCUCUCCG- -GAUU----- ----AGCGGC
A-----UGA A---GGGAGC UUGCUCUCCG- -GAUU----- ----AGCGGC
A-----UGA A---GGGAGC UUGCUCUCCG- -GAUU----- ----AGCGGC
-----GA ATTAAGGAGC TTGCTCTTT- -AATTT----- ----AGTGGC
G-----GTGA A---GGGAGC TTGCTCCCT- -GATCT----- ----AGTGGC
0000000111 1100111111 1111111100 0111111000 0000111111

                                                    150
                                                    •
GGACGGGUGA GUA AUGUCUG GGA-AACUGC CUGAUGGAGG GGGUAACUA
GCACGGGUGA GUAACGCGUG GAUAAUCUAC CCAGAAGACU GGGUAACAG
GCACGGGUGA GUAACACGUG GGUGAUCUCC CUAACAGAUU GGGUAACAG
GCACGGGUGA GUAACGCGUG GAUGAUCUGC CCAUGAGUUG GGAAUAACGG
GCACGGGUGA GUAACGCGUG GAUAAUCUGC CCUUAUGAUC GGGUAACAG
GCACGAGUGA GUAACGCGUG GAUAAUCUGC CCUUAUGAUC GGGUAACAG
GCRCGGGUGA GUAACGCGUG GAUGAUCUAC CCAUGAGUUG GGAAUAACGG

```





```

CUCCUACGGG AGGCAGCAGU GGGGAAUAUU GCGCAAUGGA CGAAAGCCUG
CUCCUACGGG AGGCAGCAGU GGGGAAUAUU GCGCAAUGGA CGAAAGCCUG
CUCCUACGGG AGGCAGCAGU GGGGAAUAUU GCGCAAUGGA CGAAAGUCUG
CUCCUACGGG A-----
CTCCTACGGG AGGCAGCAGT GGGGAATATT GCGCAATGGG CGAAAGCCTG
CTCCTACGGG AGGCAGCAGT GGGGAATATT GCGCAATGGG CGAAAGCCTG
1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111
    
```

400

```

      •
AUGCAGCCAU GC-----
ACGCAGCGAC GC-----
ACGCAGCGAC GC-----
ACGCAGCGAC GC-----
ACGCAGCGAC GC-----
ACGCAGCGAC GC-----
ACGCAGCGAC GC-----
ACGCAGCGAC GC-----
ACGCAGCGAC GC-----
ACGCAGCGAC GC-----
ACGCAGCGAC GC-----
ACGCAGCNAC GC-----
-----
ACGCAGC---
ACGCAGCGAC GCCGCGUGAG GGAUGAAGGU UUUCGGAUCG UAAACCUCUG
ACGCAG----
ACGCAGC---
ACGCAGCGAC GCCGCGUGAG GGAUGAAGGC CUUCGGGUUG UAAACCUCUG
-----
ACGCAGCGAC GCCGCGTGAG GGATGAAGGT TCTCGGATCG TAAACCTCTG
ACGCAGC---
1111111111 1100000000 0000000000 0000000000 0000000000
    
```

**Anhang 9: Alignment SSU rDNA-Sequenzen der sulfatreduzierenden Bakterien**

Die mit 1 bezeichneten Positionen wurden für die Konstruktion des Stammbaumes der sulfatreduzierenden Bakterien aus dem Darm von Eintagfliegenlarven (*Baëtis vernus*) verwendet.

```

              20                               50
      •                                         •
Mb-formici  -----GAU CCUGGCGGAG GCC-ACUGCU AUUGGGUUUC GAUUAAGCCA
E-coli      -----GAU CAUGGCUCAG AUUGAACGCU GCGGCA-GG C-CUAACACA
Dfm-nigrif  -----GAU CCUGGCUCAG GACGAACGCU GCGGCG-UG C-CNMNACA
Dfm-rumin   -----RGU CCUGGCUCAG GACGAACGCU GCGGCG-UG C-UUAACACA
Dfm-thbenz  -----GAU CCUGGCUCAG GACGAACGCU GCGGCG-UG C-CUAACACA
Dfm-thsapv  -----GAU CCUGGCUCAG GACGAACGCU GCGGCG-UG C-UUAACACA
Dfm-austra  -----
Dsv-desuN4  -----GAU UCUGGCUCAG AAUGAACGCU GCGGCG-UG C-CUAACACA
Dsv-termit  -----
Dsv-vulgar  -----GAU UCUGGCUCAG AUUGAACGCU GCGGCG-UG C-UUAACACA
FSB6        -----
Dfm.haloph  AGAGUUUGAU CCUGGCUCAG GACGAACGCU GCGGCG-UG C-CUAACACA
1000000111 1111111111 0111111111 1111111011 1011111111

      60
      •
UGCAAGUCGA ACG-----
UGCAAGUCGA ACG--GUAAC AG-----
UGCAAGUCGA ACG--GG--G NUGAAUGAA-
UGCAAGUCGA ACG--GA--G UUUAAAAUGA A-----
UGCAAGUCGA ACGGAUU--G AGAGGUGAGA -GGUGAGAGG -UUAGAA---
UGCAAGUCGA ACG--GG---
    
```

```

----AGUCGA GCG--GG--U AACGGAGGUC GGUCA-UCGG AGGUC-AGAA
UGCAAGUCGU ACG----- --AGAAA--- -----
UGCAAGUCGU GCG----- --UGAAA--- -----
UGCAAGUCGN GCG----- --UGAAA--- -----
UGCAAGUCGA ACGGAGUU-U AGUUAAAA-- -----
UGCAAGUCGA ACGGGGAAUU AUCGGAGA-- -----
1111111111 1110010000 0000011000 0000000000 0000000000

```

70

```

----- AUCCU U-----
----- GAAGAAGC U-----
----- GC- U-----
----- ACC U-----
----- GUGAGAUU- ---AAGAAGG CUUUGGCAAA
----- GUUU AACGAGAAGC U-----
GUCAGAU AAGCAA---- ---GUGGCC UGA-----
----- GGGCU U-----
----- GGGCU U-----
----- GGACU U-----
----- AGCU U-----
----- AAUU UUCGA-----
0000000000 0000000000 0000000000 1000000000 0000000000

```

80

```

----- CGGGGU -----
----- UGCUUC UUU-----
----- UGGC-----
----- N-GU-----
GCACAGACAA UA---GAUC UCAC----- --AUC
----- UACUUU UUGUAAAAC-----
----- GGCAGUUG C-----G ACGAAAGAUC UGGCAUCC-G
----- CGGCC U-----
----- CGGCC-----
----- CGGYCC-----
----- GCUU UU-----
--A----- UGGAUC U-----
0000000000 0000011000 0000000000 0000000000 0000000000

```

100

```

----- C GUGGCGUACG GCUCAGUAAC
----- GCUGACGA GUGGCGGACG GGUGAGUAAU
----- GAUUUC UA-AACCU-A GUGGCGGACG GGUGAGUAAC
----- GAUUUU UR-AACUU-A GUGGCGGACG GGUGAGUAAC
UCA-CCUCUC ACA-UCUCAC CU-CUCAAUA GCGGCGGACG GGUGAGUAAC
AUUUCGGA-C GGCCGACUUC CG-UUGCC-A GC-GCGGACG GGUGAGUAAC
----- GAGU AG-----A GUGGCGCACG GGUGAGUAAC
----- UGAGU AA-----A GCGGCGCACG GGUGAGUAAC
----- GAGU AA-----A GCGGCGCRCG GGUGAGUAAC
----- UC ACUAAACUUA GUGGCGGACG GGUGAGUAAC
----- GA UAAUAUCCUA GUGGCGGACG GGUGAGUAAC
0000000000 0000000000 0000000001 1111111111 1111111111

```

150

```

ACGUGGAUAA CCUAACCUUA GGACUGGGAU AACCCUGGGA AACUGGGGAU
GUCUGGGA-A ACUGCCUGAU GGAGGGGGAU AACUACUGGA AACGGUAGCU
GCGUGGAUAA CCUGCCUGGU AGACCGGGAU AACAGCUGGA AACGGCUGCU
GCGUGGAUAA CCUGGCGGAU AGACCGGGAU AACAGUUGGA AACGACUGCU
GCGUGGAUAA CCUGCCCAUU AGACCGGGAN AACGCCGGGA AACUGGUGCU
GCGUGGAUAA CCUGCCCAUU AGCCUGGGAU AACGCCGGGA AACCGGUGCU
GCGUGGAUAA CCUGCCCAUU AGACCGGGAU AACGCUGGCA AACUGGCGCU

```

GCGUGGGUAA	UCUACCCUUG	GAUUUGGGAU	AACUCUGCGA	AAGUGGAGCU
GCGUGGAUGA	UCUGCCCAUG	AGUUGGGAAU	AACGGCUGGA	AACGGUCGCU
GCGUGGAUGA	UCUACCCCAUG	AGUUGGGAAU	AACGGCUGGA	AACGGUCGCU
GCGUGGAUAA	CCUGCCUGUU	AGACUGGGAU	AACUCCGGGA	AACCGGUGCU
GCGUGGAUAA	CCUGCCUAUC	AGACUGGGAU	AACACCGGGA	AACCGGUGCU
1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111

180

AAUACCGGAU	A--UGUAGGG	CUGCCUGGAA	UGGU-U-CCC	UAUUGAAAUG
AAUACCGCAU	AAC-----	--GUC-GCAA	-GAC-----	----CAAA-G
AAUACCGGAU	ACGCUCUUGG	N-GCC-GCAU	-GGU--GCCG	AGAGGAAA-G
AAUACCGGAU	ACGCUCUAG	G-AAC-GCAU	-GUU--CUAA	GGAGGAAA-G
AAUACCGGAU	ACGUCCCACU	G-GCC-GCAU	-GGU--CGGG	GGAGGAAA-G
AAUACCGGAU	ACGUUCACCG	G-AUU-GCAU	-GGU--CCGG	UGAAGAAA-G
AAUACCGGAU	ACGCUCCCUG	G-UUC-GCAU	-GGA--CUGG	GGAGGAAA-G
AAUACCGGAU	AGUCUNGCU-	--UUA-AAUA	-AGA----AG	UCGGUAAA-G
AAUACCGAAU	ACGCUCCG--	--AUU-UCAU	-AGUU----C	GGGGGAAA-G
AAUACCGAAU	ACGCUCCG--	--AUU-UCRA	-CNU-----C	GGGGGAAA-G
AAUACCAGAU	AA--UAAUUA	UUUGGCGCAU	GCUA---AGU	AAUUGAAAAGG
AAUACCGGAU	ACA--AACUU	ACUAACGCAU	GUUA---GGA	AGUUGAAAAG
1111111111	1111111111	0000001111	0100000000	0111111101

200

U-----	UCCG-----	-ACGCCUAAG	GAUGGAUCUG	CGGCAGAUUA
AGGGGGA-CC	UUCGGG-CCU	CUUGCCAUCG	GAUGUGCCCA	GAUGGGAUUA
G-----	GGAG-----	-CCGCUAUCA	GAUGGAUCCG	CGUCCCAUUA
A-----	UUUA-----	-UCGCUAACC	GAUGGAUCCG	CGUCCCAUUA
GG-----	GGAA-----	CCCGCUAAUG	GAUGGGUNCG	CGUCCCAUUA
GU-----	CCAA-----	ACCGCUACUG	GAUGGGUCCG	CGUCCCAUUA
GG-----	GAAA-----	CCCGCUAAUG	GAUGGGUCCG	CGUCCCAUUA
GAUGCCUCU-	GCGU-AUGCA	UUCGUCCGAG	GAUGAGCCCG	CGUCUCAUUA
GUGGCCUCUG	CUUGCAAGCU	ACCGCUCAUG	GAUGAGUCCG	CGUCCCAUUA
GUGGCCUCUG	CUUGCAAGCU	ACUGCUCAUG	GAUGAGUCCG	CGUCCCAUUA
AU-----	-----	UCUGCUAACA	GAUGGAUCCG	CGUCCCAUUA
UU-----	-----A	UUCGCUGAUA	GAUGGAUCCG	CGUCCCAUUA
0000000000	0000000000	0111111111	1111111111	1111111111

250

GGUAGUUGGC	GGGGUAAAUG	CCCACCAAGC	CAGUAAUCUG	UACGGGUUGU
GCUAGUAGGU	GGGGUAAACGG	CUCACCUAGG	CGACGAUCCC	UAGCUGGUUCU
GCUGGUUGGU	GGUGUAGCGG	ACCACCAAGG	CGACGAUGGG	UAGCCGGCCU
GCUAGUUGGA	GGUGUAAACGG	ACCCCUAAGG	CGACGAUGGG	UAGCCGGCCU
GCUAGAUGGU	GGGGUAAACGG	CCCACCAUGG	CGACGAUGGG	UAGCCGGCCU
GCUAGUUGGU	AGGGUAAACGG	CCUACCAAGG	CGACGAUGGG	UAGCCGGCCU
GCUAGAUGGU	GGGGUAAACGG	CCUACCAUGG	CGACGAUGGG	UAGCCGGCCU
GCUAGUUGGU	AGGGUAAUGG	CCUACCAAGG	CAACGAUGAG	UAGCUGGUUCU
GCUUGUUGGC	GGGGUAAUGG	CCCACCAAGG	CGACGAUGGG	UAGCCGACCU
GCUAGUUGGU	GGGGUAAACGG	CCCACNAAGG	CGACRAUGGG	NAGCCGGUCU
GCUAGUUGGU	GGGGUAAAGG	CCUACCAAGG	CGACGAUGGG	UAGCCGGCCU
GCUAGUUGGU	GGGGUAAAGG	CCUACCAAGG	CAACGAUGGG	UAGCCGGCCU
1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111

300

GAGAGCAAGA	GCCCCGAGAU	GGAACUGAG	ACAAGGUUCC	AGGCCCUACG
GAGAGGAUGA	CCAGCCACAC	UGGAACUGAG	ACACGGUCCA	GACUCCUACG
GAGAGGGCGA	CCGGCCACAC	UGGGACUGAG	ACACGGCCCA	GACUCCUACG
GAGAGGGCGA	ACGGCCACAC	UGGAACUGAG	ACACGGCCUN	GACUCCUACG
GAGAGGGUGA	CCGGCCACAC	UGGGACUGAG	ACACGGCCCA	GACUCCUACG
GAGAGGGCGA	CCGGCCACAC	UGGAACUGAG	ACACGGUCCA	GACUCCUACG
GAGAGGGUGA	CCGGCCACAC	UGGGACUGAG	ACACGGCCCA	GACUCCUACG
GAGAGGAUGA	UCAGCCACAC	UGGAACUGAA	ACACGGUCCA	GACUCCUACG

```

GAGAGGGUGA UCGGCCACAC UGGGACUGGA ACACGGCCCA GACUCCUACG
GAGAGGAUGA CCGGCCACAC UGGGACUGGA ACACGGCCNA GACUCCUACG
GAGAGGGUGA CCGGCCACAC UGGGACUGAG ACACGGCCCA GACUCCUACG
GAGAGGGUGA ACGGCCACAC UGGGACUGAG ACACGGCCCA GACUCCUACG
1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111

```

350

```

•
GGGCGCAGCA GGC GCGAAAC CUCCGCAAUG CACGAAAGUG CGACGGGGGA
GGAGGCAGCA GUGGGGAAUA UUGCACAAUG GGC GCAAGCC UGAUGCAGCC
GGAGGCAGCA GUGGGGAAUC UUCCGCAAUG GGC GAAAAGC- UGACGGAGCA
GGAGGCAGCA GUGGGGAAUA UUCCGCAAUG GGC GAAAAGCC UGAGGGAGCA
GGAGGCAGCA GUGGGGAAUC UUCCGCAAUG GGC GAAAAGC- UGACGGAGCG
GGAGGCAGCA GUGGGGAAUC UUCCGCAAUG GGC GCAAGCC UGACGGAGCA
GGAGGCAGCA GUGGGGAAUC UUCCGCAAUG GGC GAAAAGCC UGACGGAGCG
GGAGGCAGCA GUGGGGAAUA UUGC GCAAUG GGC GAAAAGCC UGACGCAGCN
GGAGGCAGCA GUGGGGAAUA UUGC GCAAUG GGC GAAAAGCC UNACGCAGCG
GGAGGCAGCA GUGGGGAAUA UUGC GCAAUG GGC GAAAAGCC UNACGCAGCG
GGAGGCAGCA GUGGGGAAUA UUCCGCAAUG GGGGAAAACCC UGACGCAC--
GGAGGCAGCA GUGGGGAAUA UUCCGCAAUG GGGGAAAACCC UGACGGAGCG
1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111

```

400

```

•
AACCCAAGUG CC----- -----ACUC UUAACGG---
AUGCCGCGUG UAUGAAGAAG GCCUUCGGGU UGUAAA-----
ACGCCGCGUG AGGGAAGAAG GCNUCNGUU -GUAAA-----
ACGCNGCGUG AGGGAAGAAG GCUUUCGGGU UGUAAA-----
ACGCCGCGUG AGCGAAGAAG GC-UUCGGGU CGUAAA-----
ACGCCGCGUG AGUGACGAAG GUCUUCGGAU UGUAAA-----
ACGCCGCGUG AGCGAAGAAG GCCUUCGGGU CGUAAA-----
ACGCCGUGUG AGGGAUGAAG GCUUUCGGGU CGUAAA-----
ACGCCGCGUG AGGGAUGAAG GCCUUCGGGU CGUAAA-----
ACGCCGCGUR AGGGAUGAAG GUCCUCGGAU CGUNAA-----
-----
ACGCCGCGUG AGGGAAGAAG GUUUUCG-AU UGUAAAACUC UGUUCUAUGG
1111111111 1111111111 1111111111 1111110000 0000000000

```

## 7.2. Abkürzungen der Organismen in den Aligments

Kapitel	Organismus	Abkürzungen	Kapitel	Organismus	Abkürzungen
Anhang 1	<i>Escherichia coli</i>	<i>E.coli</i>	Anhang 6	<i>Bacteroides forsythus</i>	<i>Bac. fsyths</i>
	<i>Streptomyces griseus</i>	<i>Stm. griseu</i>		<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Bac. fragil</i>
	<i>Streptomyces setonii</i>	<i>Stm. setoni</i>		<i>Bacteroides distasonis</i>	<i>Bac. distas</i>
	<i>Leuconostoc citreum</i>	<i>Lc. citreu</i>		<i>Bacteroides vulgatus</i>	<i>Bac. vulgat</i>
	<i>Leuconostoc mesenterodes</i>	<i>Lc. mesente</i>		<i>Bacteroides ovatus</i>	<i>Bac. ovatus</i>
	<i>Leuconostoc lactis</i>	<i>Lc. lactis</i>	Anhang 7	<i>Methanobrevibacter arboriphilicus</i>	<i>Mbb. arbori</i>
	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Stc. angino</i>		<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	<i>Mbb. rumina</i>
	<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Stc. bovis</i>		<i>Methanobacterium bryantii</i>	<i>Mb. bryanti</i>
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Stc. agalac</i>		<i>Methanobacterium formicicum</i>	<i>Mb. formic</i>
	<i>Cellulomonas cellulans</i>	<i>Cllm. cllul</i>		<i>Methanobrevibacter cuticularis</i>	<i>Mbb. cuticu</i>
	<i>Arthrobacter globiformis</i>	<i>Arb. globif</i>		<i>Methanobrevibacter smithii</i>	<i>Mbb. smithii</i>
	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Bur. cepaci</i>		<i>Methanobrevibacter curvatus</i>	<i>Mbb. curvatu</i>
	<i>Burkholderia gladioli</i>	<i>Bur. gladio</i>	Anhang 8	<i>Desulfovibrio salexigens</i>	<i>Dsv. salexi</i>
Anhang 2	<i>Agromyces ramosus</i>	<i>Agmy. ramos</i>		<i>Desulfovibrio africanus</i>	<i>Dsv. africa</i>
	<i>Clavibacter xyli</i>	<i>Clv. xyli</i>		<i>Desulfovibrio lonreachii</i>	<i>Dsv. lonrch</i>
	<i>Arthrobacter globiformis</i>	<i>Arb. globif</i>		<i>Desulfovibrio desulfuricans ATCC27774</i>	<i>Dsv. desulf</i>
	<i>Propionibacterium avidum</i>	<i>Prp. avidum</i>		<i>Desulfovibrio sp. KRS1</i>	<i>Dsv. spKRS</i>
	<i>Microlunatus phosphovororus</i>	<i>Mcl. phphov</i>		<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	<i>Dsv. vulgar</i>
	<i>Frankia sp. CeD2</i>	<i>Frau.spCeD2</i>		<i>Desulfovibrio sp. PT2</i>	<i>Dsv. spPT</i>
Anhang 3	<i>Clostridium rectum</i>	<i>C. rectum</i>		<i>Desulfovibrio sp. KH2</i>	<i>Dsv. spKH</i>
	<i>Clustridium aminobutyricum</i>	<i>C. aminobut</i>		<i>Desulfovibrio termitidis KH1, H11, KSS1</i>	<i>Dsv. termit</i>
	<i>Clostridium cellulosi</i>	<i>C. celluloso</i>		<i>Desulfovibrio desulfuricans Norway4</i>	<i>Dsv. desuN</i>
	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>B. lichenif</i>		<i>Desulfovibrio intestinalis KMS2, (KOS1)</i>	<i>Dsv. KMS2</i>
	<i>Bacillus pantothenicus</i>	<i>B. pantothe</i>		<i>Desulfovibrio sp. Stamm STL1</i>	<i>Dsv. STL1</i>
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Lc. mesente</i>		<i>Desulfovibrio sp. STL6</i>	<i>Dsv. STL6</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Stp. aureus</i>	Anhang 9	<i>Methanobacterium formicicum</i>	<i>Mb. formici</i>
	<i>Eubacterium brachy</i>	<i>Eub. brachy</i>		<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i>
	<i>Bacillus lautus</i>	<i>B. lautu</i>		<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	<i>Dfm. nigrif</i>
Anhang 4	<i>Fusobacterium necrophorum</i> Stamm FnS-1	<i>Fus. Necph2</i>		<i>Desulfotomaculum ruminis</i>	<i>Dfm. rumin</i>
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Fus. nuclea</i>		<i>Desulfotomaculum thermobenzoicum</i>	<i>Dfm. thbenz</i>
	<i>Fusobacterium varium</i>	<i>Fus. varium</i>		<i>Desulfotomaculum thermosaprovorans</i>	<i>Dfm. thsapv</i>
	<i>Fusobacterium russii</i>	<i>Fus. russi</i>		<i>Desulfotomaculum australicum</i>	<i>Dfm. austr</i>
	<i>Fusobacterium gonidiformans</i>	<i>Fus. gonidi</i>		<i>Desulfovibrio desulfuricans Norway4</i>	<i>Dsv. DesuN4</i>
	<i>Fusobacterium alocis</i>	<i>Fus. alocis</i>		<i>Desulfovibrio termitidis</i>	<i>Dsv. termit</i>
Anhang 5	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>		<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	<i>Dsv. vulgar</i>
	<i>Escherichia coli</i>	<i>E.coli</i>		<i>Desulfotomaculum halophilium</i>	<i>Dfm. haloph</i>
	<i>Thauera aromatic</i>	<i>Tha. aromat</i>			
	<i>Thauera selenatis</i>	<i>Tha. selnat</i>			
	<i>Neisseria cinerea</i>	<i>Nis. cinere</i>			
	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	<i>Dsv. desulf</i>			
	<i>Rhodothermus marinus</i>	<i>Rht. marinu</i>			
	<i>Verrucomicrobium sp. VeCbl</i>	<i>Verru. VeCbl</i>			

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Helmut König möchte ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für das damit von Anfang an bestehende entgegengebrachte Vertrauen, für die Überlassung des interessanten Themas, für die ständige Diskussionsbereitschaft und für die allzeit gewährte Unterstützung recht herzlich danken.

Herrn Dr. Manfred Berchtold gilt mein besonderer Dank für die unermüdliche praktische Hilfe und für die konstruktive Kritik, sowie für die Unterstützung bei der sprachlichen Präsentation der vorliegenden Fassung und für seine immerwährende gute Laune, die uns manche lustige Stunde beschert hat.

Besonderes hilfreich war stets Frau Dr. Anne Tarrach. Bei ihr möchte ich für die freundliche und hilfsbereite Unterstützung bei der Identifizierung der SRB in verschiedenen Insekten sowie für die Überbearbeitung dieser Arbeit herzlich bedanken.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Peter Pfeiffer, der mir erste Einblicke in die Gaschromatographie gab und hilfreiche Vorarbeiten zur Methanbestimmungsrate leistete.

Herrn Dr. Jürgen Fröhlich möchte ich für seine geduldigen Erklärungen danken.

Frau Schöning danke ich für die Unterstützung bei der SRB-Identifizierung.

Weiterhin danke ich Herr Prof. Dr. Rainer Rupprecht vom Zoologischen Institut der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, für die Bereitstellung der verschiedenen Insekten.

Für die Überlassung der Termiten bedanke ich mich bei Herrn Dr. Horst Hertel von der Bundesanstalt für Materialforschung und Materialprüfung, Berlin.

Allen Mitgliedern des Instituts für Mikrobiologie und Weinforschung danke ich für die freundliche und hilfsbereite Atmosphäre.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern für die finanzielle Unterstützung danken, die mir das Studium der Biologie erst ermöglicht hat

# Lebenslauf

Farahnaz Emtiazi

geboren am 05.05 1965 in Abadan/Iran

- 1972-1976**                    Grundschule in Abadan/Iran
- 1977-1983**                    Besuch des Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Gymnasiums in Isfahan/Iran
- 1986-1987**                    Besuch des Deutschsprachkurses an der Volkshochschule Giessen
- 1987-1988**                    Besuch des Studienkollegs in Frankfurt/Main
- 1988-1996**                    Studium der Biologie an der Justus Liebig-Universität, Giessen  
Anfertigung der Diplomarbeit am Zentrum der Rechtsmedizin Frankfurt  
Thema: RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA*) zur Verwandtschaftsanalyse bei Crustaceen
- seit Dezember 1996**        Wissenschaftliche Angestellte und Doktorandin am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz  
  
Thema der Dissertation: Phylogenetische Charakterisierung von Mikroorganismen aus dem Intestinaltrakt von Insekten
- 06. 07. 2000**                Tag der Promotion
- Seit 15 Mai 2000**            Wissenschaftliche Angestellte bei WFM Wasser Forschung Mainz