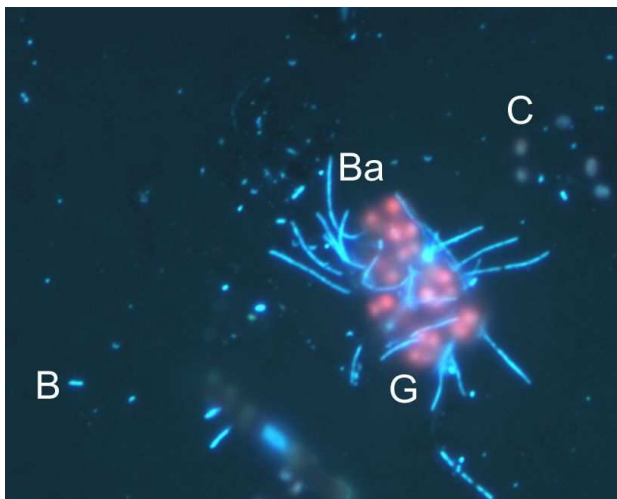


### Abundanz des Bakterioplanktons

Bakterien sind eine *wichtige Nahrung für Protozoen* im Plankton, die das mikrobielle Nahrungsnetz ganz wesentlich strukturieren. Außerdem remineralisieren sie neben Kohlenstoff auch die Nährelemente Phosphor und Stickstoff. Hinsichtlich der Kohlenstoffumsätze entscheiden vor allem die Bakterien mit ihrer Wachstumseffizienz, ob mehr Kohlenstoff remineralisiert wird und als CO<sub>2</sub> aus dem System freigesetzt (C-Sink) wird oder ob gelöster organischer Kohlenstoff über die Bakterienbiomasse in das Nahrungsnetz geschleust wird (C-Link). Diese Funktion wird mit dem Begriff des Microbial Loops beschrieben.

Die Biomasse im Plankton ist jedoch so gering, dass bakterienspezifische Biomoleküle nicht zur Biomassebestimmung genutzt werden können. Die Zellen sind so klein, dass sie lichtmikroskopisch nicht aufgelöst werden können. Deshalb ist die Färbung der Zellen mit *fluoreszierenden Verbindungen* die einzige Möglichkeit, planktische Bakterien direkt darzustellen und zu quantifizieren. Die Zellen sollten fixiert sein, nicht nur um sie haltbar zu machen, sondern auch, um die Membran zu permeabilisieren. Nur dann dringt genug Farbstoff ein. Alle Fluoreszenzmarker für Bakterien sind Interkalatoren in die DNA (und z.T. auch RNA). Bei Einlagerung in die DNA erhöht sich die Fluoreszenz sehr stark, so dass auch sehr kleine Zellen wahrgenommen werden können. Wenn ein mit UV-Licht angeregter blauer Farbstoff, wie z.B. DAPI, gewählt wird, können Cyanobakterien durch die Autofluoreszenz des Chlorophylls differenziert werden.

Eutrophe Gewässer haben meistens deutlich mehr planktische Bakterien als oligotrophe. Geringere Bakterienabundanzen treten auch bei hohem Protistenfraßdruck auf. Von allen Gruppen der Planktonorganismen haben **Bakterien oft die geringste Variabilität**. Solche Erscheinungen, wie "Blüten", werden für das Bakterioplankton nicht beschrieben.



Bakterioplankton aus dem Zingster Strom gefärbt mit DAPI.

- B Bakterien
- Ba mit Algenkolonien assoziierte besonders große Bakterien
- G Grünalgen
- C 5 Cyanobakterien

#### Auswahl an Farbstoffen:

Anregung (nm)	Emission (nm)	Filtersatz <sup>1</sup>	Fluorosensor	Bakterien
365	410-450	UV (BP <sup>2</sup> 410)	DAPI	weiß-blau
450-480	500-550	Blau (BP 490)	Acridinorange	grünlich bis orange
450-480	500-550	Blau (BP 490)	SYBR Gold	gelb-grün

<sup>1</sup> Bezeichnungen von Olympus

<sup>2</sup> Beam Splitter, Dichroic Mirror oder Teilerspiegel

### Probenvorbereitung und Aufbewahrung:

- Fixierung mit 37%igem Formaldehyd (giftig und allergen!) in 1-4%iger Endkonzentration, z. B. 1 ml Formaldehyd in 20 ml Probe.
- Ungeeignet für länger (>1 Woche) zu lagernde Freilandproben, weil Pigmenteigenfluoreszenz zerstört wird.
- Fixierung mit 25%igem Glutardialdehyd (giftig und allergen!) in 1-4%iger Endkonzentration, z. B. 1 ml Glutardialdehyd in 20 ml Probe.
- Glutardialdehyd hat eine gewisse Eigenfluoreszenz, deshalb nicht geeignet für schwache Markierungen. Nicht geeignet für SYBR Gold.
- Fixiertes Material nur an dafür ausgewiesenen Arbeitsplätzen bearbeiten (Labor 0.09 gekennzeichnete Fläche neben dem Waschbecken oder Abzug)! Kontaminationsgefahr!
- Empfindliche Proben kühlen (5-10°C). Lagerung dunkel. Dauer: Monate bis Jahre. Hauptverlust von Zellen durch Anheftung an Gefäßwände in den ersten 24 h.
- Entsorgung fixierter Proben im Sonderabfall. Nicht in Ausguss! Für Fixierungsmittel gesonderte Pipette benutzen. Für fixierte Proben nur die 2 schwarzen Costar-Pipetten nutzen (Labor 0.09).

### Material:

- 0,2 µm Kernspurmembranen aus Polyester oder Polycarbonat (ROTRAC, Nuclepore, Millipore o. ä.) Durchmesser 25 mm mit Irgalanswarz färben (mindestens 1 h, besser über Nacht).
- Filter unter fließendem Wasser abspülen (Farbspritzer im Becken entfernen!) und in sterilfiltriertem Wasser (0,2 µm Celluloseacetat-Spritzenfilter) bis zur Verwendung max. 6 h aufbewahren.
- Für die meisten Fluoreszenzmarker sind spezifische Sinterplatten im Filtriergestell vorgesehen. Nicht verwechseln! Bei zu starker Verschmutzung in 50%iger Salpetersäure (keine andere Säure!) unter dem Abzug auskochen. 24 h in Reinstwasser unter mehrmaligem Wasserwechsel spülen.

### Färbung:

#### **DAPI**

- Sinterplatte für DAPI wählen. Filter auf Filtrationsgestell legen. Probe von mindestens 0,5 ml mit -200 mbar abfiltrieren. Bei ungleichmäßiger Verteilung der Zellen höheres Vakuum einstellen.
- Nur fixierte Proben verwenden (mind. 12 h).
- Ggf. Probe verdünnen oder 0,5 ml Puffer, Medium oder Wasser (alle partikelfrei filtrieren) vor der Probe in das Filtriergestell geben.
- Vakuum entfernen. 1 ml DAPI (durch einen 0,2 oder 0,45 µm Spritzenfilter filtrieren. Filter regelmäßig, insbesondere nach mehrtägiger Arbeitspause wechseln!). auf Probe geben. 5 min färben.
- DAPI abfiltrieren und mit Hilfe von Immersionsöl (Olympus, nicht mit anderem mischen!) auf Objektträger "kleben".
- Mit einem Tropfen Immersionsöl, Deckglas und noch einmal Immersionsöl bedecken.
- pH der Probe > 7, sonst keine Fluoreszenz

#### **SYBR Gold**

- Probe unfixiert oder mit Formaldehyd fixiert verwenden.
- Je 1 ml Probe mit 1 µl SYBR-Arbeitslösung 5 min. in Eppi inkubieren.
- Probe (vgl. oben) auf SYBR-Sinterplatte abfiltrieren und mit Hilfe von Immersionsöl auf Objektträger "kleben". Mit einem Tropfen Immersionsöl, Deckglas und noch einmal Immersionsöl bedecken.

Zählung:

- Probe auf ungleiche Verteilung prüfen. Schätzen, in welcher Teilfeldgröße (ganzes Feld =10x10 Kästchen, halbes Feld =50 Kästchen, 1 Streifen =10 Kästchen usw.) ca. 20 Zellen enthalten sind.
- Sehfeld gleichmäßig ausleuchten. Fading beobachten. Ggf. Graufilter in Strahlengang. Bei einigen Objektiven Aperturblende schließbar.
- In mindestens 20 Gesichtsfeldern bzw. Teilflächen davon bei einer Vergrößerung von ca. 1000 x mindestens 400 Bakterien zählen.
- Zügig zählen.
- Felder sehr gleichmäßig über das Filter verteilen, z. B. von Rand zu Rand im Abstand von 1 mm (Kreuztischmarkierung nutzen).
- Ggf. mehr Felder zählen, niemals weniger.
- Bei Unterbrechung der Zählung Shutter benutzen.
- Bakterienzahl, filtriertes Volumen, Felderzahl, ggf. Teile des Feldes, Probenbezeichnung, Datum und Uhrzeit notieren.
- Unter Grünanregung werden ggf. die gewünschten pigmenthaltigen Zellen (mind. 200) gezählt.

Auswertung:

Mit Hilfe der folgenden Gleichung wird die Bakterienabundanz ( $10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ ) ermittelt:

$$\text{Bakterien}(10^6 \text{ ml}^{-1}) = \frac{\text{gezählteZellen} \cdot \text{Faktor} \cdot \text{Verdünnungskorrektur} \cdot \text{Teilflächenkorrektur}}{\text{filtriertesPr obenvolumen(ml)} \cdot \text{AnzahlGesichtsfelder}}$$

Faktor gilt jeweils für das 100x Objektiv

Mikroskop	Faktor
JENAMED 2	0,03464
OLYMPUS BX51	0,03464
OLYMPUS BH2-RFCA 1,25 Tubus (Ökologie und BSZ)	0,05852
OLYMPUS BH2-RFCA 2x1,25 Tubus (Meeresbiologie)	0,08451
OLYMPUS BH2-RFCA 1,25 Tubus (Meeresbiologie)	0,05748

Verdünnungskorrektur für Fixierung (1 ml auf 20 ml Probe) = 1,05

Teilflächenkorrektur für ganzes Gesichtsfeld = 1, für halbes Gesichtsfeld = 2, für 1 Streifen = 10 usw.

- Berechnung des Faktors für andere Mikroskope und Vergrößerungen: Im 25 mm Filtriergestell wird eine Kreisfläche von 21 mm Durchmesser benetzt. Fläche = 346,4 mm<sup>2</sup>. Bei einer Vergrößerung von 1000x ohne zusätzliche Tubusvergrößerungen hat eine Gitternetzplatte mit 100 Kleinquadraten gewöhnlich eine Kantenlänge von 100 µm. Fläche = 10000 µm<sup>2</sup>.

Literatur:

Azam F, Fenchel T, Field JG, Gray JS, Meyer Reil LA, Thingstad F (1983) The ecological role of water-column microbes in the sea. Mar Ecol Prog Ser 10:257-263  
 Freese HM, Karsten U, Schumann R (2006) Bacterial biomass, activity and viability in the eutrophic river Warnow, Northeast Germany. Microb Ecol 51:117-127  
 Hobbie JE, Daley RJ, Jasper S (1977) Use of Nucleopore filters for counting bacteria by epifluorescence

microscopy. Appl Environ Microbiol 33:1225-1228

Porter KG, Feig YS (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. Limnol Oceanogr 25:943-948

Zimmermann R, Meyer-Reil L-A (1974) A new method for fluorescence staining of bacterial populations on membrane filters. Kieler Meeresforschungen 30:24-27

#### Qualitätssicherung:

- Alle Lösungen vor Benutzung partikelfrei filtrieren.
- Jede zehnte Probe doppelt bearbeiten (incl. Filtration): Spannweiten-Zielkarte führen.
- Gelegentlich leeren Filter zählen: Background prüfen.

#### Chemikalien:

- DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole: 1-2 mg DAPI in 1 ml DMSO lösen. In 99 ml Phosphatpuffer geben. Dunkel bis zu 1 Monat bei Zimmertemperatur haltbar. Nicht einfrieren!
- 1/15 M Phosphatpuffer nach Sørensen pH=7,6: 0,907 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  auf 100 ml mit Reinstwasser auffüllen. Separat 1,187 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (oder 1,161 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) auf 100 ml mit Reinstwasser auffüllen.
- 12,8 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  Lösung mit 87,2 ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  mischen. Ggf. andere Phosphate (keine mit Ca oder Mg, sind nicht gut wasserlöslich) benutzen, Einwaagen auf 1/15 M umrechnen.
- SYBR Gold: Arbeitslösung aus Stammlösung mit DMSO (1  $\mu\text{l}$  Stammlösung + 9  $\mu\text{l}$  DMSO mit PCR Kapillaren pipettieren) verdünnen. Mindestmenge reicht für 10 Proben. Höchstens 1 Woche dunkel aufbewahren.
- 25% Glutardialdehyd: sofort nach Erwerb in 20 ml Portionen einfrieren. Aufgetaute Portionen schnell (1-2 Monate) verbrauchen, sonst polymerisiert die Chemikalie und fixiert mangelhaft.
- Irgalanschwarz: 200 mg Irgalanschwarz (Acid Black 107) in 100 ml 2%iger Essigsäure auflösen.