



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Nachweis von mikrobiellen Symbionten karnivorer  
Kannenpflanzen anhand von 16S rRNA und  
Kulturmethoden“

Verfasserin

Barbara C. Müllner

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Wien, 2009

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 444

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Biologie / Ökologie

Betreuerin / Betreuer:

Ao. Prof. Dr. Irene K. Lichtscheidl



## DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mein Biologiestudium möglich gemacht haben. Ebenso meiner ganzen Familie und Freunden, die mir immer zugehört und zugeredet haben, wenn ich etwas auf dem Herzen hatte.

Bei Professor Dr. Irene Lichtscheidl bedanke ich mich für das interessante, breitgefächerte und lehrreiche Thema meiner Diplomarbeit und die freundschaftliche Betreuung.

Besonderer Dank gilt Mag. Dr. Wolfram Adlassnig und Dipl. Biol. Sebastian Lücker (Department of Microbial Ecology), die mir bei Fragen, technischen Problemen und anderen Anliegen immer zur Seite standen. Ihre Hilfe hat viel zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Allen Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Zellphysiologie und Wissenschaftlicher Film danke ich für die freundschaftliche Atmosphäre und sehr lustige, schöne Stunden, die das Arbeiten sehr viel angenehmer gemacht haben.

Dank gebührt auch Prof. Dr. Matthias Horn, der es ermöglicht hat den mikrobiologischen Teil meiner Arbeit im Department of Microbial Ecology durchzuführen, und ebenfalls für offene Fragen zur Verfügung stand. Ebenso danke ich Mag. Christian Baranji für die Sequenzierungen.

Bei DDr. Heidemarie Halbritter und Dr. Martina Weber bedanke ich mich für die Möglichkeit die Geräte des Departments für Palynologie und strukturelle Botanik zu nutzen. Weiters danke ich Manfred Edlinger und Robert Wessely von den Bundesgärten Schönbrunn für die Versorgung der Versuchspflanzen.

Barbara C. Müllner

Kottingbrunn am 22. 4. 2009





# INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS .....	1
1a. ZUSAMMENFASSUNG .....	5
1b. ABSTRACT .....	6
2. PROBLEMSTELLUNG.....	7
3. EINLEITUNG .....	9
3.1 Verbreitung & Ökologie karnivorer Pflanzen .....	10
3.2 Fallentypen .....	12
3.2a Klebfallen .....	12
3.2b Kannenfallen.....	15
3.2c Klappfallen .....	20
3.2d Saugfallen .....	22
3.2e Reusenfallen .....	23
3.3 Systematik .....	25
3.4 Phytotelmata .....	27
3.5 Symbiosen .....	29
3.6 <i>Sarracenia</i> (Trompetenblatt) .....	32
3.6a Verbreitung & Ökologie .....	32
3.6b Morphologie .....	33
3.6c Fangmechanismus.....	34
3.6d <i>Sarracenia purpurea</i> .....	35
3.7 <i>Nepenthes</i> .....	36
3.7a Verbreitung & Ökologie .....	36
3.7b Morphologie .....	37
3.7c Fangmechanismus.....	39
3.7d <i>Nepenthes x ventrata</i> .....	42
<u>TEIL 1 - BAKTERIEN</u>	
4. MATERIAL & METHODEN .....	45
4.1 Pflanzenmaterial .....	45
4.2 Mikroskopische Methoden .....	45
4.2a Lichtmikroskopische Methoden .....	45
4.2b Elektronenmikroskopische Methoden .....	46

4.3	Dokumentation .....	46
4.4	Molekulare Methoden .....	47
4.4a	Bestimmung der absoluten Keimzahlen - Quantifizierung mit DAPI.....	47
4.4b	Full Cycle 16S rRNA Approach .....	48
4.5	Kulturmethoden.....	64
4.5a	Herstellung der Nährmedien.....	64
4.5b	Herstellung von Reinkulturen .....	64
4.5c	Keimzahlbestimmung.....	64
4.5d	Verwendete Nährmedien.....	65
4.6	Statistik.....	68
5.	ERGEBNISSE.....	69
5.1	Keimzahlen.....	69
5.2	Selektivmedien .....	71
5.3	Reinkulturen .....	72
	Phylogenetische Analyse.....	72
	Myxobakterien .....	74
5.4	16SrRNA Ansatz.....	75
5.5	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung .....	78
5.6	Geschlossene <i>Nepenthes</i> -Falle .....	82
	Keimzahlbestimmungen.....	82
<b><u>TEIL 2 - PILZE UND FALLENCHEMISMUS</u></b>		
6.	MATERIAL & METHODEN.....	87
6.1	Pflanzenmaterial.....	87
6.2	Mikroskopische Methoden.....	87
6.2a	Lichtmikroskopische Methoden .....	87
6.2b	Elektronenmikroskopische Methoden.....	88
6.3	Dokumentation .....	89
6.4	Kulturmethoden.....	90
6.4a	Herstellung der Nährmedien.....	90
6.4b	Herstellung von Reinkulturen .....	90
6.4c	Verwendete Nährmedien .....	90
6.5	Fallenchemie und Statistik .....	91
7.	ERGEBNISSE.....	93
7.1	pH-Werte der Fallen.....	93

7.2 Bestimmung der Schimmelpilze.....	93
7.3 Myzel-Sporangien-Versuch.....	98
7.4 Algen .....	102
8. DISKUSSION .....	105
8.1 Keimzahlen.....	105
8.2 Diversität der Bakterien.....	107
Bakterien in geschlossenen Fallen.....	112
8.3 Pilze .....	114
8.4 Symbiose/Mutualismus .....	117
Bakterien.....	117
Pilze .....	120
Algen .....	121
8.5 Vergleich: <i>S. purpurea</i> / <i>N. x ventrata</i> .....	123
9. AUSBLICK .....	125
10. ANHANG.....	127
10.1 Protokoll - Quantifizierung mit Dapi .....	127
10.2 Sequenzierung mit der Kettenabbruchmethode.....	128
10.3 Fixierung von Umweltproben.....	128
10.4 Rezepte I.....	129
10.5 Rezepte II - Selektivmedien .....	129
10.6 Rezepte III .....	131
11. Literaturverzeichnis.....	133



## 1a. ZUSAMMENFASSUNG

Karnivore Pflanzen fangen und verdauen kleine Tiere um ihren Nährstoffbedarf zu decken. Der typische Mechanismus besteht aus vier Schritten: (1) Anlockung der Beutetiere, (2) die Rückhaltung durch spezielle anatomische Strukturen der Blätter bzw. Fallen, (3) die Zersetzung der Beute durch Enzyme, die von der Pflanze selbst oder von Symbionten gebildet werden. Und (4) die Absorption der Nährstoffe.

Diese Diplomarbeit beschäftigt sich mit dem Vorkommen von Bakterien und Pilzen in den Fallen zweier nicht verwandter Arten von Kannenpflanzen, *Sarracenia purpurea* (Sarraceniaceae) und *Nepenthes x ventrata* (Nepenthaceae). Die Untersuchungen der Pflanzen und deren Bewohner wurden mit verschiedenen mikroskopischen Techniken wie CLSM, REM und konventioneller Lichtmikroskopie durchgeführt. Neue molekulare Methoden, die die gesamte Bakteriendiversität erfassen, wurden im Vergleich mit konventionellen Kulturmethoden angewandt.

Die Bestimmung der absoluten Keimzahlen mittels Quantifizierung mit DAPI im Vergleich mit Kultivierung auf verschiedenen Nährmedien zeigte, dass nur etwa 2% der Bakterien der Kannenflüssigkeit kultivierbar sind.

Die Anzahl der Bakterien pro Milliliter unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den beiden Pflanzenarten.

Fallen von *S. purpurea* beinhalten eine weit höhere Diversität an Bakterien, vor allem Symbionten / Mutualisten, die der Pflanze von Nutzen sind. *N. x ventrata* bildet eine Reihe von Verdauungsenzymen und besitzt daher eine saure Kannenflüssigkeit, die der Grund für ihre Artenarmut sein könnte. Es ist wahrscheinlich dass Fallenbewohner, hauptsächlich Bakterien, für die Beuteverdauung in *S. purpurea* verantwortlich sind. *N. x ventrata* hingegen verwendet eher ihre selbst gebildeten Verdauungsenzyme.

## 1b. ABSTRACT

Carnivorous plants trap and utilise tiny animals to supplement their mineral nutrition. The process of prey capture consists of four steps: (1) Attraction of animals, (2) their retention by specialised trap leaves, (3) degradation of the prey either by enzymes produced by the plant or by symbiotic organisms and (4) absorption of nutrients by the plant.

This thesis deals with the occurrence of bacteria and fungi in the traps of two unrelated species of pitcher plants, *Sarracenia purpurea* (Sarraceniaceae) and *Nepenthes ×ventrata* (Nepenthaceae). For the characterisation of traps and inquilines, different microscopical techniques like CLSM, REM and conventional light microscopy were used. New molecular methods, like the full cycle 16S rRNA approach, which cover the whole bacterial diversity, in comparison with common cultivation methods were applied.

Quantification of bacteria by DAPI staining *in situ* (total number of bacteria) in comparison with cultivation on different media (cultivable units per ml) showed that only about 2% of the pitcher fluid's bacteria are cultivable. The numbers of bacteria do not significantly differ between the two species.

Traps of *S. purpurea* host a higher biodiversity of bacteria, especially more symbionts / mutualists, which are beneficial for the plant. *N. x ventrata* secretes a wide range of digestive enzymes and features an acid pitcher fluid, which may be the reason for the low species diversity. It's likely that a large part of the pitcher inquilines, mostly bacteria, are responsible for the degradation of the prey in *S. purpurea*, whereas *N. ventrata* relies on digestive enzymes produced by the plant itself.

## 2. PROBLEMSTELLUNG

Karnivore Kesselfallenpflanzen benutzen trichterförmige flüssigkeitsgefüllte Fangblätter um kleine Tiere zu erbeuten und zu verdauen. Allerdings gelingt es keiner Kesselfalle, alle Organismen in ihren Fallen zu töten. Widerstandsfähige Organismen wie Bakterien, Algen, Pilze, Protozoen und sogar Insektenlarven können überleben und tragen möglicherweise sogar zum Abbau der Beute bei.

Schon seit etwa 150 Jahren beschäftigen sich Forscher mit karnivoren Kannenpflanzen (Juniper et al., 1989). Die meisten Daten, die bis heute erhoben wurden, beziehen sich auf die Anatomie der Pflanzen und auf fallenbewohnende Insekten. Es existieren kaum Daten über Schimmelpilze und wenig mikrobiologische Daten über Bakterien, da die bisherigen Versuche mit konventionellen Kulturmethoden durchgeführt wurden. Die Bakterien aus derartigen Umweltproben sind jedoch zu einem hohen Prozentsatz unkultivierbar (Amann, 1995). So konnte bisher nur ein geringer Bruchteil der Vielfalt untersucht werden.

Aus diesen Gründen sollen in dieser Diplomarbeit die Phytotelmata zweier nicht verwandter Kannenpflanzen (*Sarracenia purpurea*, *Nepenthes x ventrata*) unter kontrollierten Bedingungen verglichen und dabei folgende Fragestellungen untersucht werden:

- Unterscheidet sich die Bakterienvielfalt?
- Kommen einzelne Bakteriengruppen besonders häufig vor?
- Beherbergt *Sarracenia purpurea* mehr Symbionten?
- Wie viel Prozent der Bakterien sind im Labor kultivierbar?
- Welche Schimmelpilze kommen in den Fallen vor?
- Unterscheidet sich deren Vielfalt?
- Welche Lebensweise haben Schimmelpilze in den Fallen?
- Wie verhalten sich die pH-Werte der Kannenflüssigkeiten?
- Unterscheidet sich die Algenvielfalt?





### 3. EINLEITUNG

Fleischfressende Pflanzen stellen den uns gewohnten Nahrungskreislauf auf den Kopf. Im Laufe der Evolution haben sich Strategien entwickelt, die es einigen Pflanzen möglich machen, Tiere zu fangen, sie zu verdauen und ihre Nährstoffe zu nutzen. Dieses Phänomen beeindruckt die Wissenschaft schon lange Zeit.

Marcus Plaearius, ein italienischer Arzt, beschrieb schon im 12. Jahrhundert die Gattung *Drosera* (Sonnentau) als Heilpflanze gegen Husten (Braem, 2002). Diderot und d'Alembert (1775) sprachen allerdings erst 500 Jahre später erstmals von „karnivoren Pflanzen“.

Die Existenz von Pflanzen, die Tiere als Nährstoffquelle nutzen, wurde sehr lange Zeit für unmöglich gehalten. Bekannte Biologen wie Carl von Linné (1707-1778) oder Auguste Trécul (1818- 1896) akzeptierten diese ersten Ansätze nicht (Trécul, 1855).

Erst Charles Darwin (1809-1882) beschäftigte sich mit fleischfressenden Pflanzen, führte wissenschaftliche Versuche durch und schrieb die Erkenntnisse in seinem Werk „*Insectivorous Plants*“ nieder (Darwin, 1875).

Heute bezeichnet man diese Pflanzen meist nicht als „insektivor“, sondern als „karnivor“ (Lat.: *caro* = Fleisch, *devorare* = verschlingen), da zu ihrem Beutespektrum nicht nur Insekten zählen. Auch kleine Säugetiere, Frösche, Spinnen, Mollusken, Krebse, Nematoden bis hin zu Mikroorganismen wie Protozoen werden zersetzt und ihre Nährstoffe verwertet. Das Spektrum hängt vom Fangmechanismus der Pflanze, ihrer Größe und ihrem Standort ab (Gibson, 1999).

Das **Karnivore Syndrom** beschreibt die Fähigkeiten und Eigenschaften, die Pflanzen aufweisen müssen, um als karnivor bezeichnet zu werden (Juniper et al., 1989):

- Anlocken des Beutetiers
- Festhalten (und Töten)
- Verdauen bzw. Zersetzen der Beute
- Aufnehmen der gelösten Nährstoffe

Fehlt eines dieser Kriterien, gelten Pflanzen als prä- oder protokarnivor. Denn erst die Kombination aller dieser Fähigkeiten gemeinsam macht eine Pflanze „karnivor“.

Das isolierte Auftreten eines der oben genannten Merkmale ist allerdings keine Seltenheit im Pflanzenreich. Die meisten Blütenpflanzen verfügen über Mechanismen zur Anlockung von Tieren, die einen wichtigen Teil zur Bestäubung beitragen. Verdauungsenzyme werden nicht nur von karnivoren Pflanzen, sondern auch von keimenden Samen produziert. Die Aufnahme von Molekülen ins Innere kann von nahezu jeder pflanzlichen Struktur ausgehen. (Juniper et al., 1989)

Durch die Entwicklung all dieser Anpassungen ist es den karnivoren Pflanzen möglich geworden, sehr nährstoffarme Standorte zu besiedeln und sich dort gegen Konkurrenten durchzusetzen. Da der Boden zu wenig Nährstoffe bietet, können Beutetiere als zusätzliche Nährstoffquelle nutzbar gemacht werden.

### 3.1 Verbreitung & Ökologie karnivorer Pflanzen

Karnivore Pflanzen sind weltweit, mit Ausnahme der Antarktis, verbreitet. Ihre Diversität und Häufigkeit sind jedoch nicht in allen Lebensräumen die selben. Der Schwerpunkt liegt in warmgemäßigten bis subtropischen Zonen, wo die Hälfte aller Gattungen heimisch ist (Grabherr, 1997). Obwohl *Drosera*, *Sarracenia* und *Pinguicula* bis an die Grenze der Arktis zu finden sind (D'Alessi, 2004; Kristinsson, 2006), ist die Artenvielfalt in kälteren Gebieten eher gering.

Die Fähigkeit Tiere als Nahrungsquelle zu nutzen hat sich im Laufe der Evolution mehrmals unabhängig voneinander entwickelt. Die Gruppe der Karnivoren Pflanzen umfaßt, nach heutigem Wissen, mehr als 600 Arten aus 8 Familien, was etwa 0,5% der Gefäßpflanzen entspricht (Benzing, 1987).

Die Frage, warum das karnivore Syndrom mehrmals entstehen konnte, wird durch die Lebensräume der Pflanzen beantwortet. Nährstoffarme Gebiete sind global verbreitet und werden von den unterschiedlichsten Pflanzengruppen besiedelt. Um erfolgreich zu überleben, waren die Pflanzen gezwungen, Fähigkeiten zur Erschließung zusätzlicher Nahrungsquellen zu entwickeln. Dabei mussten jedoch keine Eigenschaften komplett neu erfunden, sondern schon vorhandene nur zweckmäßig weiterentwickelt werden.

Folgende Zusammenstellung ökologischer Merkmale, nach Juniper 1989, charakterisiert karnivore Pflanzen im Allgemeinen:

- ausdauernde Pflanzen
- schwaches Wurzelsystem
- bilden oft klonale Kolonien
- kalzifug
- wenig konkurrenzfähig
- tolerant gegenüber nährstoffarmem Milieu
- intolerant gegenüber Lichtmangel
- tolerant gegenüber und teilweise sogar abhängig von Flächenbränden
- tolerant gegenüber Staunässe

Die Faktoren gelten jedoch nicht für alle Arten gleichermaßen (Ellison, 2005a, 2006; Ellison und Gotelli, 2001; Givnish, 1989):

*Drosophyllum lusitanicum*, *Ibicella lutea*, so wie einige australische *Drosera* Arten besitzen ausgeprägte Wurzelsysteme (Adlassnig et al., 2005b). Einige Arten von *Drosera*, *Nepenthes* und *Pinguicula* besiedeln auch kalziumreiche Standorte (Adlassnig et al., 2005b; Juniper et al., 1989).

Zusätzlich zu den genannten Faktoren werden oft auch Schwermetall belastete Böden und Radioaktivität toleriert (Adlassnig et al., 2005a; D'Alessi, 2004; Kelly, 1989).

Standorte, die eine Kombination aus Nässe, niedrigem pH, sowie Nährstoffmangel aufweisen, stellen für viele andere Pflanzen eine Streßsituation dar, die ein dauerhaftes Überleben in diesen Gebieten unmöglich machen würde. Die sonst konkurrenzschwachen Karnivoren nutzen ihren Selektionsvorteil um sich in diesen extremen Gebieten durchzusetzen.

## 3.2 Fallentypen

Karnivore Pflanzen haben verschiedenste Fangmechanismen und somit unterschiedliche Strukturen entwickelt, mit denen Tiere erbeutet werden. Die Pflanzen bringen mit Hilfe von Metamorphosen der Laubblätter Fangorgane hervor.

Die Fallentypen lassen sich in 5 Gruppen einteilen (Braem, 2002):

- Klebfallen sondern ein klebriges Sekret ab, das Beutetiere anlockt und festhält.
- Kannenfallen bilden trichterförmige Blätter, in denen Tiere festgehalten werden.
- Klappfallen besitzen bewegliche Blätter, die zuschnappen und die Beute umschließen.
- Saugfallen erzeugen einen Sog, um Beute ins Falleninnere zu transportieren.
- Reusenfallen bilden Haare, die Beutetiere in Richtung Falleninneres schleusen.

Man unterscheidet, je nach Fangmechanismus, aktive und passive Fallen, wobei aktive Fallen gezielte Bewegungen ausführen, um die Beute festzuhalten. Passive Fallen hingegen kommen ohne spezielle Bewegungsapparatur aus. (Slack, 1985)

*Dionaea* (Venusfliegenfalle) weist z.B. einen aktiven Fangmechanismus auf, *Darlingtonia* (Kobralilie) hingegen einen passiven (Braem, 2002).

In den folgenden Kapiteln werden die verschiedenen Fallentypen im Detail vorgestellt.

### 3.2a Klebfallen

Klebfallen sondern durch Drüsen schleimige, oft duftende Sekrete ab, um Beutetiere anzulocken und damit festzuhalten. Der sogenannte Fangschleim besteht aus einer wässrigen Lösung von Polysacchariden (Xylose, Glukonsäure, Galaktose, Arabinose und Rhamnose) (Schnepf, 1963). Man unterscheidet gestielte und sitzende Drüsen, die je nach Gattung verschiedene Funktionen haben können.

*Drosera* besitzt zusätzlich die Fähigkeit aktive Bewegungen der Fangorgane auszuführen, um das Opfer weiter zu immobilisieren und nach unten zu drücken (Braem, 2002).

Die Gruppe Klebfallen wird durch fünf Gattungen aus fünf Familien gebildet: *Byblis* (Byblidaceae), *Drosera* (Droseraceae), *Drosophyllum* (Drosophyllaceae), *Pinguicula* (Lentibulariaceae) und *Triphyophyllum* (Dioncophyllaceae).

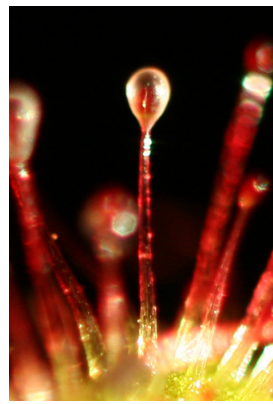
Es zählen auch einige protokarnivore Pflanzen zum Klebfallentyp, z.B. *Ibicella* (Martyniaceae) und *Roridula* (Sarraceniaceae). Sie besitzen zwar Sekret produzierende Drüsen, bilden jedoch keine Enzyme zum Zersetzen der Beute (Meyers-Rice, 1998; Peroutka et al., 2008b).

*Roridula* bildet eine interessante Symbiose mit Wanzen, in der sich die Tiere von der Beute ernähren und ihre Ausscheidungen wiederum der Pflanze als zusätzliche Nährstoffquelle dienen (Midgley und Stock, 1998).

### ***Drosera* (Sonnentau)**



**Abbildung 1: *Drosera rotundifolia*, Naturstandort Lunz (Niederösterreich)**



**Abbildung 2: Nahaufnahme eines Drüsenköpfchens**

Die Gattung *Drosera* (Droseraceae) ist weltweit in kalten, temperierten und tropischen Regionen verbreitet. Feuchte Sandflächen, Moore und Sümpfe stellen typische Standorte der Pflanzen dar (Barthlott et al., 2004; Juniper et al., 1989). Mit ihren etwa 140 Spezies ist *Drosera* eine der arten- und formenreichsten Karnivoren. Die Größenvariationen sind sehr deutlich, wobei die australische *Drosera gigantea* mit 1 Meter die größte bekannteste Art darstellt. (Braem, 2002)

Die Pflanzen meiden kalkhaltige Böden, wobei es hier eine Ausnahme gibt: *Drosera linearis* besiedelt alkaline Sümpfe Nordamerikas. Einige australische Arten besitzen Knollen, die es ihnen möglich machen Brände problemlos zu überleben (Adlassnig et al., 2005a).

Österreich beheimatet 4 *Drosera*-Arten: *D. anglica*, *D. intermedia*, *D. rotundifolia* (Abbildung 1) und *D. x obovata* (Aeschimann et al., 2004).

Die Habitusform der Pflanzen ist, wie ihre Größe, nicht einheitlich. Die meisten Arten bilden Blattrosetten, es kommen aber auch gestreckte Achsen oder kletternde Arten vor (Barthlott et al., 2004).

Die Blattoberflächen sind mit unzähligen, gestielten Drüsen besetzt, deren Köpfchen einen Fangschleimtropfen absondern (Abbildung 2). Die Besonderheit dieser Drüsen liegt darin, dass sie drei Funktionen in sich vereinen. Sie scheiden nicht nur das klebrige Fangsekret ab, sondern bilden auch Enzyme zur Zersetzung der Beute und resorbieren anschließend die gelösten Nährstoffe. Pranjic (2004) stellte bei Untersuchungen des Fangschleimes eine antibakterielle Wirkung, möglicherweise als Schutz gegen Infektionen, fest. Ungestielte Drüsen an der Blattepidermis sind für die Produktion weiterer Verdauungsenzyme verantwortlich.

Verfängt sich ein Tier im Fangschleim, führt jede Bewegung zu dichterem Verklebung der Fortbewegungsorgane und Atemwege. Mechanische oder chemische Reize lösen zusätzlich Krümmungen der Drüsenstiele in Richtung des Beutetieres aus.

Die so immobilisierte Beute wird anschließend durch aktives Einrollen des Blattes umschlossen und zur Epidermis hinabgedrückt.

### ***Pinguicula* (Fettkraut)**



**Abbildung 3: *Pinguicula vulgaris*,  
Naturstandort Salzburg**



**Abbildung 4: Blüte von *P. vulgaris*,  
Naturstandort Salzburg**

*Pinguicula* gehört zur Familie der Lentibulariaceen und umfaßt ca. 86 Arten, die hauptsächlich auf der nördlichen Erdhalbkugel beheimatet sind (Braem, 2002) (Slack, 1985). Sie besiedelt trockene bis extrem nasse Standorte in arktischen, gemäßigten und mediterran bis subtropischen Gebieten (Slack, 2000).

In Österreich sind 3 Arten zu finden, *P. alpina*, *P. leptoceras* sowie *P. vulgaris* (Abbildung 3-4) (Aeschmann et al., 2004), die vor allem Sumpfwiesen und Moore besiedeln.

Die ausdauernden Pflanzen bilden flache Blattrosetten (Abbildung 3) und haben im Gegensatz zu ihren nahen Verwandten *Genlisea* und *Utricularia* echte Wurzeln. An den Blattoberflächen sitzen unzählige gestielte und ungestielte Drüsen, die Fangschleim und Verdauungsenzyme absondern.

Kleine Tiere, die auf der sekretreichen Oberfläche kleben bleiben, werden zersetzt. Dabei wurden aktive Bewegungen der Blätter, die sich durch langsames Einrollen um die Beute äußern, nachgewiesen (Darwin, 1875; Juniper et al., 1989). Ist die Nährstoffaufnahme abgeschlossen, nehmen die Blätter ihre ursprüngliche Stellung ein.

### 3.2b Kannenfallen

Kannenpflanzen sind seit dem 17. Jahrhundert bekannt (Lloyd, 1942), ihre karnivoren Eigenschaften wurden jedoch erst 200 Jahre später von Bertram und Hooker erkannt.

Die Pflanzen sind mit rund 100 Arten in Amerika (*Brocchinia*, *Darlingtonia*, *Heliophora*, *Sarracenia*), Asien (*Nepenthes*), Australien (*Cephalotus*, *Nepenthes*) und Madagaskar (*Nepenthes*) vertreten (Barthlott et al., 2004).

Die Größe der Fangblätter variiert stark je nach Pflanzenart, Art und Alter der Falle. Die größte Kannenfalle wird von *Nepenthes rajah* gebildet. In der etwa zwei Liter fassenden Kanne (etwa 40 mal 18 Zentimeter) wurden des öfteren Ratten gefunden. (Barthlott et al., 2004)

Pflanzen, die sich diesen passiven Fangmechanismus zu Nutze machen werden als Kannen-, Kessel- oder Schlauchpflanzen bezeichnet. Zu kesselartigen Strukturen umgewandelte Blätter oder Blattrosetten funktionieren nach dem Fallgrubenprinzip: Nektar, Duftstoffe oder für Insekten auffällige UV-Farbmuster locken Beutetiere an den glatten Fallenrand. Das anschließende Hineinfallen der Tiere ist möglich, eine Flucht jedoch, durch spezielle Ausbildungen an den Fallenwänden, fast unmöglich.

Dieser Effekt kommt durch folgende Strukturen zustande (Peroutka et al., 2008a):

Glatte, fast senkrechte Fallenwände führen zum Abrutschen der Tiere und verhindern die Flucht aus der Falle.

Wachskristalle an der Fallenoberfläche verhindern, dass Beutetiere sich festhalten oder wieder hinaufklettern können.

Die Kannenflüssigkeit wirkt benetzend und führt früher oder später zum Ertrinken.

Haare, Zähne und Rillen im Inneren sind nach unten ausgerichtet, so dass der Weg in die Falle erleichtert, ein Entkommen jedoch erschwert wird.

In engen, langen Röhren wird Fluginsekten mit Hilfe stehender Luft der Auftrieb genommen.

Kannenpflanzen weisen jedoch nicht alle dieser Merkmale in gleicher Weise auf.

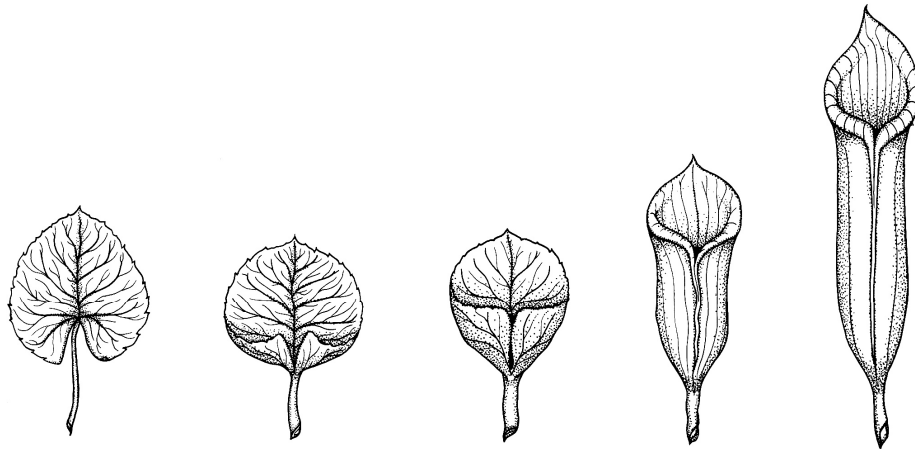
Zur Zerlegung und Freisetzung der Nährstoffe sind Enzyme notwendig, die von der Pflanze selbst, mit Hilfe von Drüsen, produziert werden können. Verfügt die Pflanze nicht über diese Fähigkeit, übernehmen symbiotisch aktive Organismen wie Bakterien und Pilze die Zersetzung. (Cochran-Stafira und von Ende, 1998; Mayer, 2005)

Untersuchungen und Vergleiche von Adlassnig (2007) und Mayer (2005) zeigten, dass die Mikroorganismen von Kesselfallen in Glashauskulturen weitgehend mit denen am Naturstandort übereinstimmen.

Bezogen auf die Funktion sind alle Kannenfallen ähnlich, es treten jedoch Unterschiede bei der Organogenese auf. Die Metamorphose bzw. die Bildung der Fangblätter kann von verschiedenen Blattbereichen ausgehen (Napp-Zinn, 1984):

- Am häufigsten tritt eine Wölbung der Blattspreite nach oben auf, wodurch die beiden Blattränder miteinander verwachsen und eine Kanne bilden. Die Blattoberseite stellt somit die Innenseite der Falle dar (Abbildung 5). Bsp.: *Sarracenia*, *Nepenthes*
- Weiters kann es zum schnelleren Wachstum der Blattfläche kommen, wogegen die Ränder ein verzögertes Wachstum aufweisen. Bsp.: *Cephalotus*
- Blattrosetten können ebenfalls die Funktion einer Kannenfalle aufweisen. Alle Blätter der Rosette bilden, einzeln aber eng auf Lücke stehend, trichterförmige Hohlräume. Bsp.: *Brocchinia*





**Abbildung 5: Mögliche Stadien der Entwicklung vom Laubblatt zur Kannenfalle durch Wölbung der Blattspreite (Grafik: Bream, 2002)**

Spezialisierungen auf verschiedene Beutetiere lassen sich bei manchen Pflanzen anhand des Standortes und Habitus der Falle erkennen. Lange, schmale Fallen, die raffinierte Lockmechanismen aufweisen, dienen dem Fang von Fluginsekten. Relativ kurze Fallen in Bodennähe sind hingegen auf kriechende, Boden bewohnende Tiere ausgerichtet. Oft bieten sie zusätzliche Strukturen an der Fallenaußenseite, um das Hinaufklettern zu erleichtern. (Braem, 2002)

Versuche von Hepburn (1927) und Lloyd (1942) zeigten, daß Kannenpflanzen vermutlich in der Lage sind, den pH-Wert ihrer Kannenflüssigkeit zu regulieren. Nach Zugabe von Säuren oder alkalischen Laugen erreichte der pH-Wert nach einigen Tagen seinen ursprünglichen Wert.

### ***Brocchinia***



**Abbildung 6: Habitus von *Brocchinia* sp., Kultur in Prag (Foto: Wolfram Adlassnig)**

Kannenstrukturen kommen unter den Monokotylen nur bei den Bromeliaceen (Ananasgewächse), deren Blattrosetten Zisternen formen, vor (Abbildung 6). Diese sind die ideale Voraussetzung für die Anpassung an eine karnivore Lebensweise.

Die Gattung *Brocchinia* besteht aus 18 Arten, von denen bis zu 5 als karnivor gelten. Die Neue Welt (Amerika) stellt den Verbreitungsraum der Familie dar, wobei die karnivoren Arten auf die Tafelberge Guyanas und Venezuelas beschränkt sind. (Braem, 2002)

Die krautigen Pflanzen erreichen eine Höhe von 30 bis 40 Zentimeter und besitzen ein nur spärlich ausgebildetes Wurzelsystem. Die eng auf Lücke stehenden Blätter bilden einen hohlen Zylinder, in dem ein Wasserreservoir von bis zu zwei Litern Fassungsvermögen entstehen kann (Braem, 2002). Diese Falle kann in 2 Zonen gegliedert werden: Die von einer Wachsschicht überzogene Gleitzone, an der Beutetiere den Halt verlieren, und eine mit Haaren besetzte Zone, in der die Verdauung stattfindet. Zusätzlich befinden sich unter dem Flüssigkeitsspiegel Drüsen, die der Nährstoffaufnahme dienen. (Barthlott et al., 2004)

Die Zisternen von *Brocchinia* bilden ökologische Nischen für eine Vielzahl von Organismen. Protozoen, verschiedene Algenarten, Süßwasserkrabben, Insektenlarven, Kaulquappen und sogar ausgewachsene Laubfrösche (*Hyla brunnea*) nutzen die Pflanzen als Lebensraum (Braem, 2002).

### ***Darlingtonia* (Kobralilie)**



**Abbildung 7: Habitus von *Darlingtonia* sp. in Kultur (Foto: Gregor Eder)**

*Darlingtonia californica*, die einzige Spezies dieser Gattung aus der Familie der Sarraceniaceae, wurde 1853 von John Torrey (1796-1873) beschrieben. Den Namen wählte

Torrey zu Ehren seines Freundes, des Botanikers William Darlington (1782-1863) (Lloyd, 1942).

Das Verbreitungsgebiet der Pflanze umfasst Nord-Kalifornien und die Küstenregionen von Oregon, wo sie in *Sphagnum*-Mooren und küstennahen Sümpfen bis in Höhen von 2800m zu finden ist (Carow und Fürst, 1990; Slack, 1985).

Der Fallenhabitus hebt sich von den meisten anderen Kannenpflanzen deutlich ab (Abbildung 7). Die Fangblätter entspringen einem Rhizom und erreichen eine Höhe von 10 bis 75 cm, um ein breites Beutespektrum abzudecken (Slack, 1985). Der Schlauch ist der Länge nach um 180° gedreht und krümmt sich an der höchsten Stelle. Die so gebildete Kuppel birgt an der Unterseite den Falleneingang. Am äußeren Winkel der Öffnung befindet sich ein gegabeltes, zungenähnliches Anhängsel, das mit Nektarien versehen ist und zur Anlockung dient. Dieser Fallenbau stellt sicher, dass die Öffnung jedes Schlauches nach außen gerichtet ist. Einzugsgebiete in alle Richtungen können abgedeckt werden und erhöhen so die Beutechancen (Braem, 2002).

Die von den Nektarien angelockten Beutetiere werden von Haaren des Anhängsels zum Falleneingang, und von dort ins Innere des Schlauches geführt, wo abwärts gerichtete Haare den Rückweg verhindern (Braem, 2002; Slack, 1985). Die Kuppel weist an ihrer Oberseite eine gefensterte, schachbrettartige Zone auf. Die Zellen dieser weißen, lichtdurchlässigen Flecken beinhalten weder Chlorophyll noch andere Pigmente. Die Funktion dieser Fenster ist es, gefangenen Beutetieren Ausgänge vorzutäuschen, sie so zu irritieren und zu schwächen (Braem, 2002; Canby, 1875; Mayer, 2005).

Da noch keine besonderen Drüsen und Verdauungsenzyme, die von der Pflanze produziert werden, nachgewiesen wurden (Lloyd, 1942; Slack, 2000), wird die Verdauung der Beute vermutlich von symbiotischen Organismen übernommen.

Die Merkmale und Ökologie der Versuchspflanzen, *Sarracenia purpurea* und *Nepenthes ventrata*, werden im Kapitel 3.6 und 3.7 genauer betrachtet.

### 3.2c Klappfallen

Der aktive Klappmechanismus ist wohl die bekannteste Methode des Beutefangs. Klappfallen kommen nur in der Familie der Droseraceen, bei zwei Gattungen vor. Während *Dionaea* terrestrisch lebt, kommt *Aldrovanda* nur aquatisch vor. Die beiden Gattungen sind, trotz der unterschiedlichen Lebensweise, nahe miteinander verwandt.

Der Mechanismus der Fangblätter ist mit dem Prinzip eines Fangeisens zu vergleichen. Die zwei Blatthälften sind wie durch ein Gelenk miteinander verbunden. Zusätzlich besitzen die Fangblätter Sinneshaare, die auf mechanische Reizungen, von z.B. Beutetieren, mit elektrischen Impulsen reagieren. Das Fangblatt wiederum setzt diese Impulse in ein blitzartiges Zuschnappen der beiden Blatthälften um. Zahnartige Fortsätze an den Blatträndern verhindern ein Entkommen der Beute. (Brown, 1916; Burdon-Sanderson, 1873)

#### ***Dionaea* (Venusfliegenfalle)**



**Abbildung 8: *Dionaea muscipula* in Kultur**

*Dionaea muscipula*, eine Droseraceae, ist die einzige Art dieser Gattung. North- und South Carolina, die westliche USA, ist das einzige Verbreitungsgebiet der Pflanze (Roberts und Oosting, 1958). Die sandigen, nährstoffarmen Böden der sonnigen Küstenregionen sind dauerfeucht, da Regenschauer im Winter eine konstante Luftfeuchtigkeit möglich machen. Es ist bekannt, dass sich *Dionaea* nach Flächenbränden besonders gut entwickelt (Braem, 2002).

Die Blattrosette entspringt einem unterirdischen Rhizom, das von den sukkulenten Blattbasen umgeben ist. An den Enden der überirdischen Blattstiele sitzen jeweils zwei Fanglappen mit Triggerhaaren, die zusammen die Klappfalle bilden (Abbildung 8). (Braem, 2002)

Das Anlocken der Beute wird durch ein UV absorbierendes Band und Nektarproduktion an den Fangblatträndern bewerkstelligt. (Juniper et al., 1989)

Um den Fangmechanismus auszulösen, muss ein Triggerhaar innerhalb von 20 bis 40 Sekunden zweimal, zwei unterschiedliche Haare je einmal, oder mehrere Haare in größeren Abständen gereizt werden. Aktionspotentiale führen zu Turgoränderungen in den Zellen, der Schließmechanismus wird ausgelöst. Ist die Beute im Blattinneren eingeschlossen, bildet die Klappfalle einen geschlossenen Hohlraum. Die an den Innenseiten der Falle liegenden Drüsen geben Enzyme und Säuren ab um die Beute zu zersetzen (Lloyd, 1942). Ist die Verdauung abgeschlossen, öffnet sich das Fangblatt und unverdauliche Reste wie Flügel oder Chitinstrukturen werden abgestoßen (Slack, 1985).

In manchen Fällen, z.B. bei zu großen Beutetieren, kann es auf Grund von mangelnden Verdauungsekreten zu Bakterienkontamination, Nekrose und schließlich zum Absterben der Falle kommen (Slack, 1985).

### ***Aldrovanda* (Wasserfalle)**



**Abbildung 9: Habitus von *Aldrovanda* sp.**  
(Foto: Marianne Peroutka)

*Aldrovanda vesiculosa* ist die einzige Art ihrer Gattung und zählt wie ihr naher Verwandter *Dionaea* zu den Droseraceen.

Die vollkommen wurzellose, krautige Süßwasserpflanze lebt freischwimmend zwischen Schilf, Binsen und anderen Pflanzen. Ihr Verbreitungsgebiet reicht von Indien, Japan und Australien bis nach Afrika und Europa. In Österreich gilt *Aldrovanda* seit einiger Zeit als ausgestorben (Adamec, 1997).

Die Pflanze besteht aus einer Hauptachse, an der Wirtel mit je 8 Fangblättern angeordnet sind (Abbildung 9). Das Wachstum erfolgt an der Sprossspitze. Eine Länge von 30 cm wird selten überschritten, da die Pflanze von hinten langsam abstirbt (Barthlott et al., 2004).

Die Fallen funktionieren sehr ähnlich der von *Dionaea*, sind aber deutlich kleiner. Das Zuschnappen der Fallen erfolgt durch Reizung der etwa 40 Sinneshaare an den Klappen (Lloyd, 1942).

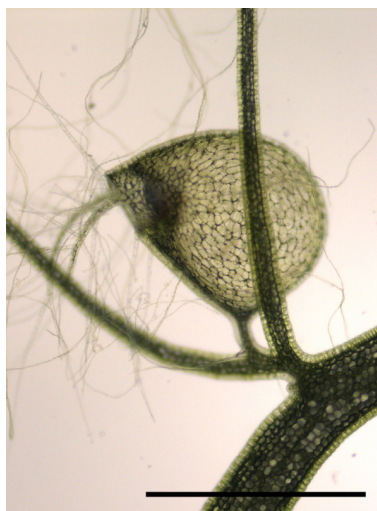
### 3.2d Saugfallen

Der Saugfallenmechanismus beschränkt sich auf die Gattung *Utricularia*, die zur Familie der Lentibulariaceen gehört.

#### ***Utricularia* (Wasserschlauch)**



**Abbildung 10: Habitus von *Utricularia gibba***



**Abbildung 11: Saugfalle von *Utricularia gibba*  
Markierung ~ 1 mm**

Die Gattung *Utricularia* (Lat: kleiner Schlauch) umfaßt ca. 275 Arten, ist weltweit verbreitet und somit die am weitesten verbreitete karnivore Pflanze (Taylor, 1994). Ihr

Hauptverbreitungsgebiet liegt jedoch in den Tropen und Subtropen (Barthlott et al., 2004). Man findet die Pflanze als aquatische, terrestrische oder epiphytische Lebensform (Mabberley, 2000).

In Österreich ist *Utricularia* mit 6 Arten vertreten (*U. australis*, *U. bremii*, *U. intermedia*, *U. minor*, *U. ochroleuca* und *U. vulgaris*), die nur aquatisch oder amphibisch vorkommen (Taylor, 1994).

Die Pflanzen sind wurzellos. Stattdessen bilden sie ein verzweigtes Sproßsystem, an dem zu Fallen umgewandelte Blätter sitzen (Abbildung 10). Diese Saugfallen sind aus zwei Zellschichten aufgebaut und haben eine Öffnung, die durch ein Ventil verschließbar ist (Abbildung 11). Am Deckel sitzen sensitive Fühlhaare, die bei Berührung die Falle auslösen (Lloyd, 1942).

Der aktive Fangmechanismus arbeitet nach dem Saugstromprinzip:

Die Falle besteht aus einer hohlen Kammer, in der ein negativer hydrostatischer Druck vorherrscht. Das ruckartige Aufspringen der Fallenöffnung erzeugt einen Unterdruck, wodurch das umliegende Wasser samt kleinen Wassertieren in die Kammer strömt. Löst ein Beutetier den Fangmechanismus aus, wird es eingesaugt, in der Falle festgehalten und verdaut. (Braem, 2002)

Die Beute besteht aus winzigen Krebsen, Insekten, Protozoen und Rädertierchen (Mette et al., 2000). Unter bestimmten Bedingungen machen auch Algen einen großen Teil der Beute aus (Peroutka et al., 2008b).

### 3.2e Reusenfallen

Der Fangmechanismus dieser Art von Fallen ist passiv, erfolgt durch sogenannte Reusenhaare. Diese sind in der Falle so ausgerichtet, dass Tiere leicht ins Innere gelangen können, die Haare aber ein Entkommen in die andere Richtung verhindern.

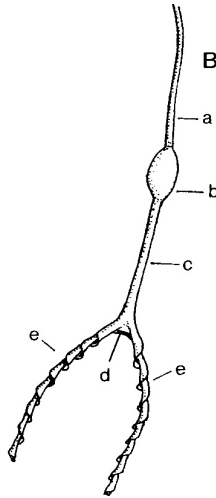
Die Reusenfallen werden nur durch die Gattung *Genlisea*, mit 21 Arten, vertreten (Müller et al., 2004).



## ***Genlisea* (Korkenzieherpflanze)**



**Abbildung 12: Habitus von *Genlisea* sp.**



**Abbildung 13: Unterirdisches Fangblatt von *Genlisea* (Grafik: Slack, 1985)**

*Genlisea* zählt wie *Utricularia* und *Pinguicula* zur Familie der rein karnivoren Lenibulariaceen. Ihre 21 Arten sind in Südamerika, Westindien, Afrika und Madagaskar zu finden. Auf Grund der ähnlichen Blüten steht die Pflanze *Utricularia* sehr nahe, der Fangmechanismus jedoch ist ein vollkommen anderer.

Während die Laubblätter an der Bodenoberfläche kleine Rosetten bilden, befinden sich die Fangorgane unterirdisch (Abbildung 12, Abbildung 13). Die Fangblase geht in ein röhrenförmiges Halsstück über, an dessen Ende eine Öffnung liegt. An dieser Stelle teilt sich das Fangblatt in zwei spiralförmig gewundene Arme, an denen sich weitere Öffnungen befinden. Die Innenwände sind mit spitzen Haarreihen besetzt, die in Richtung der Fangblase ausgerichtet sind. Ein eindringendes Beutetier wird immer weiter nach Innen, zur Blase geschleust. Eine Rückkehr wird durch das perfekte Reusenprinzip ausgeschlossen. Drüsen an den Wänden der Fangblase sondern Sekrete ab, die die Beute schließlich zersetzen und die gelösten Nährstoffe resorbieren. (Slack, 1985)

Zu den Beutetieren zählen wurmartige Organismen und Algen (Lendl et al., 2006).

### ***Sarracenia psittacina***

Die Fallen dieser Art liegen, im Gegensatz zu den anderen Spezies von *Sarracenia*, beinahe waagrecht am Boden. Der Deckel bildet über dem Falleneingang eine nach oben gerichtete Kuppel mit transparenten Bereichen. Diese täuschen Ausgänge an falschen



Stellen vor. Ähnlich wie bei *Genlisea* geraten Beutetiere in eine behaarte Zone, in der sie immer weiter ins Innere der Falle gelangen, aber der Rückweg durch die Richtung der Haare ausgeschlossen ist. Im hinteren Teil der Falle findet die Verdauung statt. (Slack, 1985)

Die Spezies ist in Teilen der USA beheimet (Florida, Georgia, Mississippi) und bevorzugt Überschwemmungsgebiete, sodass kleine Wasserorganismen meistens einen größeren Beuteanteil ausmachen als Landtiere. (Slack, 1985)

### 3.3 Systematik

Karnivore Pflanzen haben sich im Laufe der Evolution mehrmals unabhängig voneinander entwickelt und bilden im Stammbaum daher keine einzelne verwandtschaftliche Gruppe. Klebfallen haben sich sechsmal entwickelt, Kannenfallen viermal, Reusenfallen zweimal, Klappfallen einmal und Saugfallen ebenfalls einmal.

*Sarracenia psittacina* nimmt in gewisser Weise eine Sonderstellung ein, da sie Kannenfalle und Reusenfalle zu einer Fangmethode kombiniert, ebenso *Nepenthes inermis*, die Kannenfalle und Klebfalle vereint. (Rice, 2007)

Klebfallen	Kannenfallen	Klappfallen	Saugfallen	Reusenfallen
<i>Drosera</i>	<i>Sarracenia</i>	<i>Dionaea</i>	<i>Utricularia</i>	<i>Genlisea</i>
<i>Pinguicula</i>	<i>Darlingtonia</i>	<i>Aldrovanda</i>		<i>S. psittacina</i>
<i>Byblis</i>	<i>Heliampora</i>			
<i>Ibicella</i>	<i>Archaeamphora</i>			
<i>Roridula</i>	<i>Brocchinia</i>			
<i>Drosophyllum</i>	<i>Catopsis</i>			
<i>Triphylophyllum</i>	<i>Nepenthes</i>			
	<i>Cephalotus</i>			

Tabelle 1: Fallentypen und dazugehörige Gattungen im Überblick

Folgende Stammbäume zeigen die Zusammenhänge zwischen den einzelnen Gruppen:

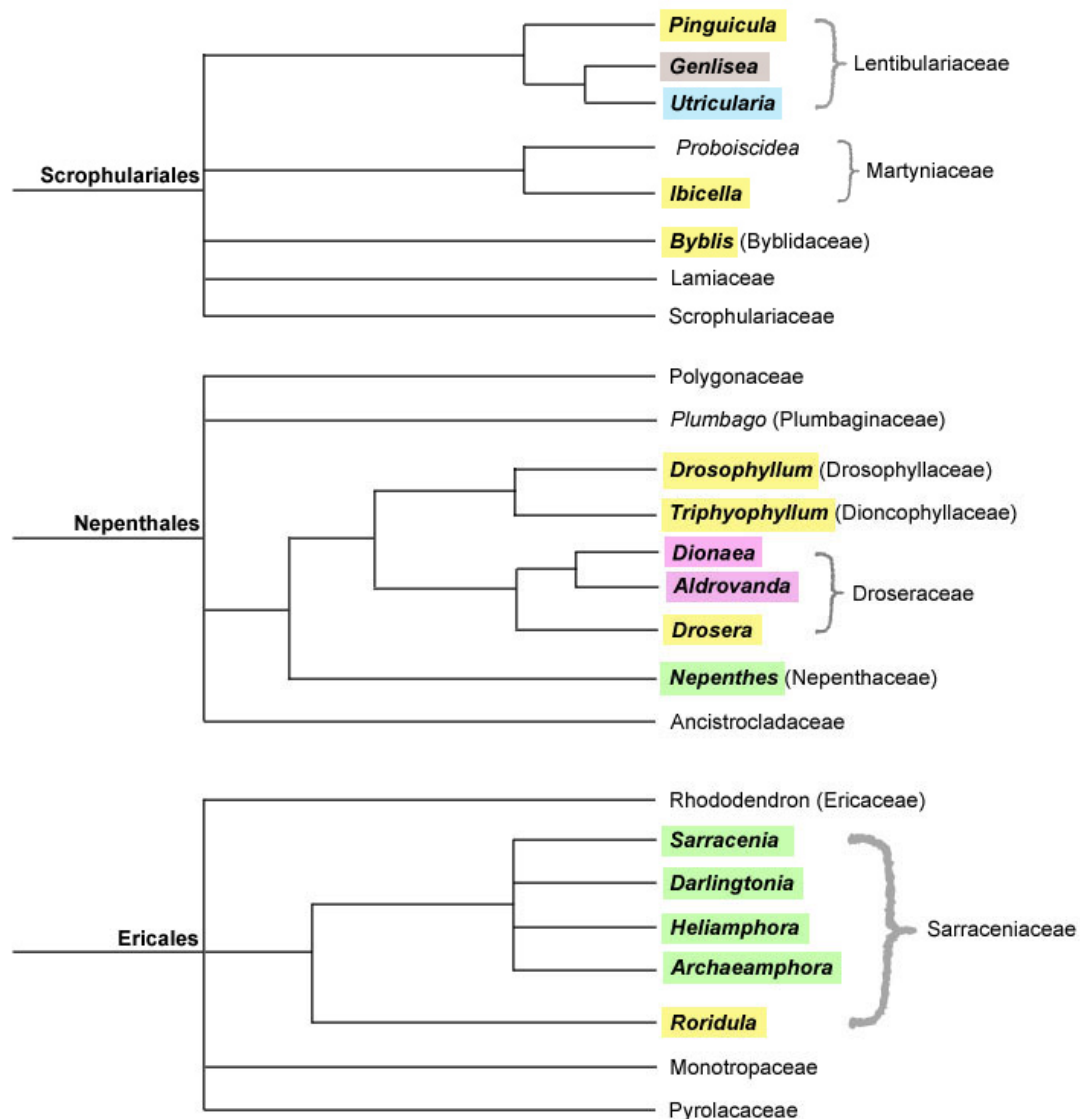


Abbildung 14: Stammbäume der Karnivoren mit Farbschema von Tabelle 1 (Astlängen sagen nichts über den Verwandtschaftsgrad aus)

Die älteste bekannte karnivore Pflanze, *Archaeamphora longicervia*, ein ausgestorbener Verwandter in den Sarraceniaceae, lebte vor ca. 125 Millionen Jahren (Kreidezeit) in China (Li, 2005). In Folge dieses Fossilfundes konnte die Evolution der Sarraceniaceae relativ genau rekonstruiert werden.

*Brocchinia*, *Catopsis* und *Cephalotus*, Kannenfallen bildende Pflanzen, sind in den Stammbäumen nicht eingezeichnet, da sie nicht mit den gezeigten Gruppen zusammenhängen. *Brocchinia* und *Catopsis* stellen unter den 62 Gattungen der Bromeliaceae die einzigen 2 vorläufig bekannten Karnivoren dar und *Cephalotus* ist die einzige Art in der Familie der Cephalotaceae.

Es existieren, neben den erwähnten Familien und Gruppen, auch karnivore Pilze (Lloyd, 1942), Algen (Raven, 1997) und Moose (Migula, 1912).

### 3.4 Phytotelmata

Der Begriff Phytotelma (Griech.: *phytos* = Pflanze, *telm* = Teich) bezeichnet flüssigkeitsgefüllte Hohlräume, die von Landpflanzen gebildet werden. Modifizierte Blätter, Blattachsen, Blütenstrukturen, Baumhöhlen, offene Früchte oder herabgefallene Blätter verschiedenster Pflanzen weltweit bilden die Grundlange für die Entstehung von Phytotelmata (Frank und Lounibos, 1983) (Abbildung 15). Die Größe kann daher von einem 300µl kleinen Tropfen einer Blattachsel bis hin zu einer Menge von 2 Litern einer *Nepenthes rajah* Falle oder gar einigen 100 Litern in großen Baumhöhlen (Kitching, 2000) variieren. Die Lebensdauer solcher Lebensräume ist oft sehr begrenzt, da kleine Wassermengen schnell austrocknen. Hineinfallende organische Substanzen bestimmen die Zusammensetzung von Flüssigkeit und bewohnenden Lebewesen.



**Abbildung 15: Phytotelma zwischen Stamm und Wurzeln zweier Bäume in Niederösterreich**

1754 stellte Mark Catesby während seiner Arbeit an „Natural History of Carolina“ die Existenz von Insekten fest, die karnivore Pflanzen als Lebensraum nutzen. (Juniper et al., 1989)

Der Begriff Phytotelma wurde erst 1928 von Ludwig Varga, einem deutschen Biologen geprägt (Varga, 1928). Sein Werk löste reges Interesse an diesem Thema aus, das bis heute angehalten hat (Kitching, 2000). Varga war jedoch nicht der erste, der sich mit wassergefüllten Pflanzenstrukturen und deren Bewohnern beschäftigte. Arbeiten von

Müller (1879), Picado (1912,1913) und van Oye (1921, 1923), die damals noch von Kontainerhabitaten sprachen, inspirierten seine Versuche. (Kitching, 2000)

Heute zählen Phytotelmata zu den Modellsystemen in der Ökologie (Srivastava et al., 2004). Manipulierbarkeit, Allgemeingültigkeit und Realismus zeichnen ökologische Modellsysteme sowie Phytotelmata aus. Die überschaubare Größe und kurzen Generationszeiten der Bewohner machen diese Lebensräume attraktiv für wissenschaftliche Untersuchungen.

Kitching (2000) und Frank (1983) beschreiben verschiedene Typen von Phytotelmata (Abbildung 16):



Abbildung 16: Typen von Phytotelmata nach Kitching, 2000

- **Bromeliantanks:** Die in Rosetten angeordneten Blätter der Bromeliaceen (z.B. *Ananas comosus*) geben der Pflanze die Möglichkeit im Inneren größere Regenwassermengen zu halten. Wasser und Mineralstoffe werden dem Tank entzogen und genutzt (Benzing und Renfrow, 1974). Ähnliche Wasserreservoirs wurden bei Riesenlobelien nachgewiesen (Corbet, 1983), die ihren Tank als Frostschutz für die Apikalknospe einsetzen (Adlassnig, 2007).
- **Kannenfallen:** Modifizierte Blätter bilden kesselartige Strukturen, die als Fangorgan dienen. Einige Organismen, hauptsächlich Insekten und ihre Larven, haben sich auf Strukturen wie diese spezialisiert und nutzen sie als Lebensraum. Die Kessel sind einerseits auf Regenwasser angewiesen, andererseits geben einige Arten aktiv, durch Guttation, Flüssigkeit ins Falleninnere ab (Adlassnig, 2007; Peroutka et al., 2008a).
- **Baumhöhlen:** Verletzte Rindenstücke, Senken oder Höhlen in, auf oder zwischen Bäumen sind allgegenwärtig. Phytotelmata können weltweit bei Laubbälzern und

Koniferen entstehen (Frank und Lounibos, 1983), nachdem Regenwasser die Hohlräume aufgefüllt hat (Abbildung 15).

- **Bambus Markhöhlen:** Abholzungen durch den Menschen, Abknicken bei Stürmen oder tierische Fraßspuren hinterlassen oft Internodien mit nach oben offener Markhöhle. Diese hohlen Stümpfe füllen sich mit Regenwasser und bieten hauptsächlich Insekten (z.B. Moskitos) Lebensraum (Kitching, 2000). Die Größe ist abhängig von Spezies und Alter der Pflanze und kann zwischen wenigen Kubikzentimetern und einem Liter variieren.
- **Blattachseln:** Bei manchen Pflanzenarten sind Blattachseln oder Blütenblätter speziell geformt, so daß sich Regenwasser darin sammeln kann (z.B. *Heliconia*, *Angelica*, *Liliidae* oder Bananenstauden). Mit Ausnahme von einigen Palmen, die bis zu 25 Litern fassen können (Frank und Lounibos, 1983), sind die Wassermengen in Blattachseln meistens sehr klein.

### 3.5 Symbiosen

Der Begriff **Symbiose** (Griech.: *symbioun* = zusammenleben) wurde vom deutschen Naturwissenschaftler Heinrich Anton de Bary geprägt. Er beschrieb das Phänomen als „Zusammenleben artverschiedener Organismen“ (de Bary, 1879; Ruby und Goldner, 2007).

Das Zusammenleben zwischen Organismen verschiedener Arten kann auf unterschiedliche Weise erfolgen und ist in der Natur allgegenwärtig. Es bestehen weiters Unterschiede in der Abhängigkeit voneinander und in der Dauer der Assoziation. Einige Lebensgemeinschaften kommen von Zeit zu Zeit zustande und lösen sich wieder, andere sind dauerhaft.

Der allgemeine Begriff Symbiose gliedert sich in 3 Untergruppen:

- **Mutualismus** (Lat.: *mutuus* = Wechselseitigkeit) wird im deutschen Sprachgebrauch als „Symbiose“ bezeichnet. Das Zusammenleben ist für beide Beteiligten von Nutzen, also eine ++ Beziehung.

Ein bekanntes Beispiel aus dem Tierreich stellen Anemonenfische und Seeanemonen dar (Abbildung 17). Die Anemone bietet dem Fisch durch ihre Nesseltentakel Schutz und somit sicheren Lebensraum. Die Fische wiederum schützen ihre Anemone vor Fressfeinden und stellen Nahrungsreste zur Verfügung. (Miyagawa, 1989)



**Abbildung 17: Clownfisch in einer Anemone**

Sehr bekannt ist auch die umstrittene Symbiose zwischen Honigdachs und Honiganzeiger (Spechtvogel), die zusammen Bienenstöcke plündern. Der Vogel lotst den Honigdachs zum Nest, dieser bricht es auf und letztendlich werden von beiden Honig bzw. die Larven verspeist.

Bewiesen ist jedoch, dass afrikanische Buschmänner die Laute und Flugmuster des Vogels zu deuten wissen und so zum Bienenstock gelotst werden. Nachdem die Honigsucher das Nest geöffnet haben, frisst der Vogel an den zurückgelassenen Honigwaben. (Isack und Reyer, 1989)

Die Zoophilie (Bestäubung durch Tiere) ist eine häufig beobachtbare Symbiose zwischen Pflanzen und Tieren. Die Pflanze bietet süßen Nektar an und heftet ihre Pollen an die Bestäuber (Insekten, Vögel, Fledermäuse, Säugetiere, ...).

Im Fall von Pflanzen und Mikroorganismen ist die Symbiose von Wurzeln mit Stickstoff fixierenden Bakterien, z.B. Rhizobien, wohl am bekanntesten. Für Pflanzen ist N essentiell, aber als  $N_2$  nicht direkt verwertbar. Die Pflanzen, z.B. Robinien, stellen den in ihren Wurzeln lebenden Bakterien Kohlenstoffverbindungen zur Deckung ihres Energiebedarfs zur Verfügung. Im Gegenzug fixieren die Bakterien Stickstoff, der so für die Pflanze nutzbar wird. Auf stickstoffarmen Böden erlangen diese Pflanzen einen Selektionsvorteil.

- Beim **Kommensalismus** (Lat.: *commensalis* = Tischgenosse) ist einem Partner die Assoziation nützlich, dem anderen fügt sie weder Schaden zu, noch hilft sie ihm. Es besteht somit ein einseitiger Nutzen, eine +0 Beziehung.

Aasfresser beispielsweise folgen größeren Raubtieren und warten auf Beuteüberreste. Mäuse suchen bei Häusern oder Hütten Unterschlupf und ernähren sich von Speiseresten.

- Zieht nur ein Beteiligter Nutzen aus dem Zusammenleben und schädigt den anderen damit, spricht man von **Parasitismus** (Griech.: *para* = neben, *sitos* = Nahrung), einer +- Beziehung.

Gängige Beispiele für Parasiten sind zum Beispiel Kuckuck, Schlupfwespe oder der Malariaerreger, *Plasmodium ssp.*, beim Menschen. Der eine wird von der falschen Mutter aufgezogen, die andere legt ihre Eier in Insekten, die letztendlich von den Larven aufgefressen werden. Ein einzelliger Erreger hat einen komplizierten Lebenszyklus entwickelt, um sich in Leberzellen des Menschen zu vermehren, in den Blutkreislauf gelangen und von Mosquitos verbreitet zu werden. Manche Parasiten gehen aber noch weiter.

Der Kleine Leberegel, *Dicrocoelium dendriticum*, setzt sich im Kopf von Ameisen fest - am Nervenknötchen, das die Kiefer steuert. Die Ameisen verbeißen sich daraufhin solange in Grashalmspitzen, bis sie von Wiederkäuern, den Endwirten des Parasiten, gefressen werden. (Holmes, 1993)

Der Saugwurm *Ribeiroia ondatrae* nutzt Kaulquappen als zweiten Zwischenwirt. Er enzystiert sich in den Beinanlagen, woraufhin der Frosch mehrere, unter anderem missgebildete Hinterbeine entwickelt (Abbildung 18). Der Frosch ist in seiner Bewegungsfreiheit eingeschränkt, ist langsamer und somit leichte Beute für Reiher und andere Vögel. Im Darm dieser Endwirte entwickelt sich der Parasit letztendlich zum adulten Tier. (Johnson et al., 1999; Sessions et al., 1990)



**Abbildung 18: Ein von *Ribeiroia* befallener Frosch**  
(Foto nach [http://www.newscientist.com/data/images/ns/cms/dn12687/dn12687-1\\_700.jpg](http://www.newscientist.com/data/images/ns/cms/dn12687/dn12687-1_700.jpg))

Die Pflanzen dieser Arbeit, *Sarracenia purpurea* und *Nepenthes x ventrata*, werden in den folgenden zwei Kapiteln detailliert vorgestellt.

### 3.6 *Sarracenia* (Trompetenblatt)

Um 1700 wurde die Kannenpflanze *Sarracenia* erstmals vom Botaniker Joseph Pitton de Tournefort beschrieben. Die Gattung wurde nach dem Arzt Michel Sarrazin (1659-1736) benannt, der Tournefort ein Exemplar aus Quebec zusandte. (Barthlott et al., 2004; Lloyd, 1942; Slack, 1985)

William Bertram erkannte 1791, dass *Sarracenia* Insekten nicht nur fängt, sondern auch tötet und in irgendeiner Form verdaut (Quelle 2.3.2009: [www.plantarara.com](http://www.plantarara.com)).

#### 3.6a Verbreitung & Ökologie

Ellison (2004) beschreibt 9 Arten, die an der Ostküste Nord-Amerikas beheimatet sind (Abbildung 19). *Sarracenia purpurea* ist in diesen Gebieten am weitesten verbreitet.

Den Nachweis, dass in den Fallen tatsächlich Insekten und andere Beute verdaut werden, lieferte Hepburn (1927).



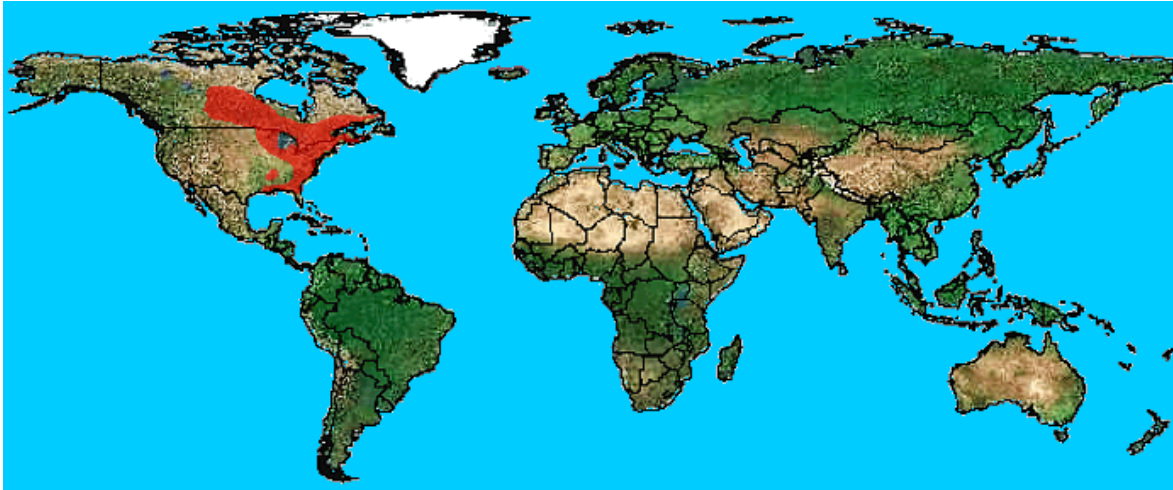


Abbildung 19: Verbreitungskarte der Gattung *Sarracenia* (Quelle: [www.plantarara.com](http://www.plantarara.com))

### 3.6b Morphologie

Die Pflanzen sind ausdauernde Stauden, die ein unterirdisches Rhizom bilden, von dem rosettig angeordnete Blätter ausgehen. Die schlauchförmigen Blätter werden etwa 10 Zentimeter bis 1,2 Meter hoch (Barthlott et al., 2004). Entlang ihrer Längsachse verläuft ein flügelartiger Saum. Das Ende der Röhre geht in ein kapuzenartiges Anhängsel, den Deckel, über. Mit seinen zahlreichen Nektardrüsen dient dieser zur Anlockung von Beute und bildet bei einigen Arten gleichzeitig Schutz vor zu viel Regenwasser. (Abbildung 20)

Die eindrucksvollen Blüten von *Sarracenia* (Abbildung 21) erreichen eine Höhe von etwa 70 Zentimetern (Barthlott et al., 2004). Fünf herabhängende Kronblätter umhüllen den schirmförmigen Griffel der Blüte. Durch Nektar angelockte Bienen bestäuben die Blüten.



Abbildung 20: Habitus von *Sarracenia purpurea* in Kultur



Abbildung 21: Blüte von *S. purpurea*, Naturstandort Kanada

Die Pflanzen profitieren oft von Bränden, da diese Konkurrenten auslöschen und den Boden mit Nährstoffen anreichern (Brewer, 1999).

### 3.6c Fangmechanismus

Die Falle gliedert sich im Wesentlichen in fünf Zonen (Abbildung 22) mit jeweils unterschiedlichen Funktionen (Braem, 2002; Lloyd, 1942):

**Zone 1**, der Deckel, ist mit zahlreichen Nektardrüsen, abwärts gerichteten Haaren und auffälligen Farbmustern besetzt. Auch die Fallenöffnung trägt zahlreiche Nektardrüsen und wird als **Zone 2** bezeichnet. Im Anschluß daran befindet sich **Zone 3**, eine glatte, fast senkrechte Oberfläche macht es unmöglich Fuß zu fassen. Bei vielen Arten reicht **Zone 4** bis zum Grund der Falle. Sie trägt lange, spitze Borstenhaare, die ein Entkommen der Beute verhindern. **Zone 5**, deren Bedeutung bisher noch unklar ist, trägt weder Haare noch Drüsen und ist nicht bei allen *Sarracenia* Arten vorhanden.

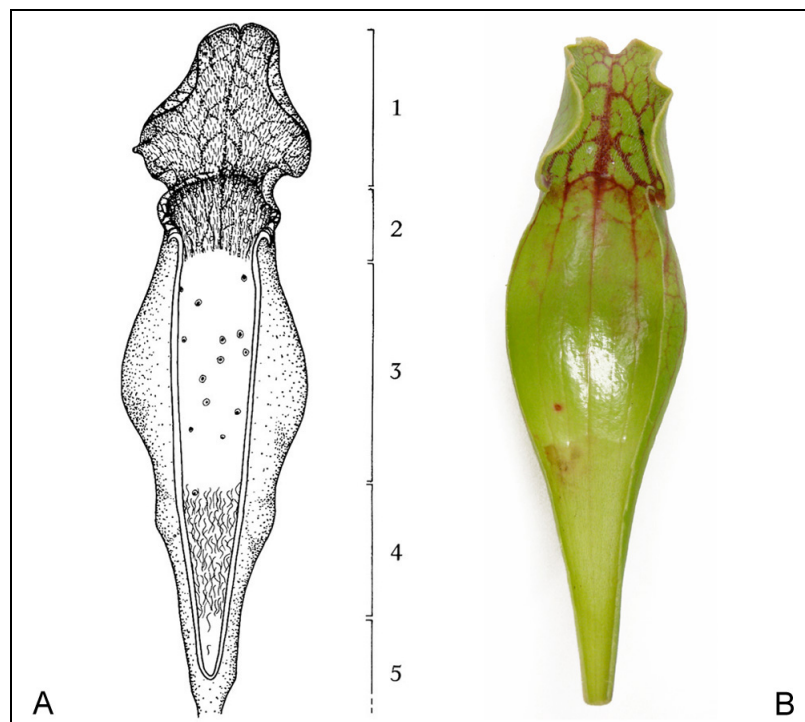
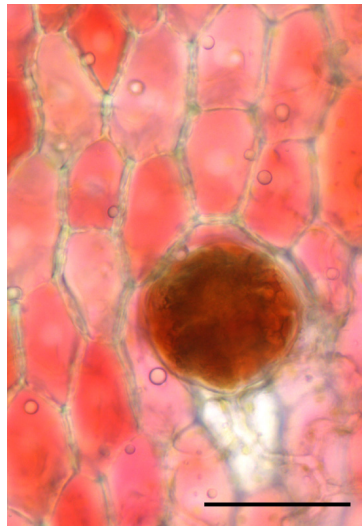


Abbildung 22: Fallenschema (A) und aufgeschnittene Falle von *S. purpurea* (B) im Längsschnitt (Grafik A: Braem, 2002)

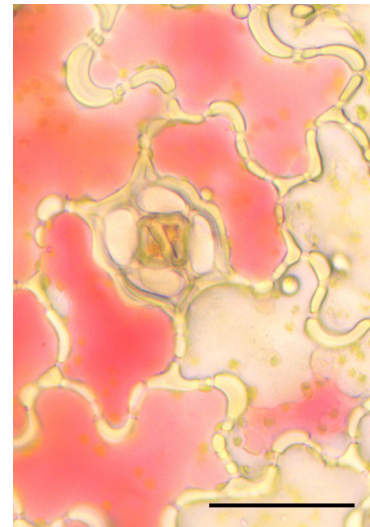
Folgende Aufnahmen machen, anhand von *S. purpurea*, die Unterschiede der Zonen sichtbar:



**Abbildung 23: Fallenrand (Zone 1) mit unzähligen nach unten gerichteten Haaren  
Markierung ~ 1 cm**



**Abbildung 24: Nektardrüse der Zone 2 im Hellfeld  
Markierung ~ 50 µm**



**Abbildung 25: Epidermis der Zone 3 mit Stoma im Hellfeld  
Markierung ~ 40 µm**

Farbmuster und Duft des gebildeten Nektars reichen aus, um Insekten aus einiger Entfernung anzulocken (Ellison, 2005b). Der Nektarkragen lockt sie immer weiter in Richtung Fallenöffnung, bis sie letztendlich an der glatten Oberfläche den Halt verlieren und in die Flüssigkeit stürzen. Nach unten gerichtete Haare machen das Hinaufkrabbeln unmöglich.

In Zone 5 beginnt die Verdauung des gefangenen Tieres. Bis heute ist die Produktion von Verdauungsenzymen durch die Pflanze nicht nachgewiesen worden (Gallie und Chang, 1997; Kingsolver, 1981). Es gilt als wahrscheinlich, daß *Sarracenia* von Mikroorganismen wie Bakterien profitiert, die selbst Verdauungsenzyme bilden (Cochran-Stafira und von Ende, 1998; Mayer, 2005). Die Aufnahme der Nährstoffe erfolgt in der Zone 4. Hier weisen die Zellen keine Kutikula auf, was eine Diffusion in die Epidermiszellen der Pflanze ermöglicht (Slack, 1985).

### 3.6d *Sarracenia purpurea*

Das Verbreitungsgebiet dieser Art liegt im nordöstlichen Kanada und reicht bis in den Südosten der USA. Das Areal strahlt in nördlicher Richtung bis Labrador und Neufundland aus (Barthlott et al., 2004; Slack, 1985). Bevorzugt werden sehr nasse Standorte wie



Sphagnum-Moore, es sind aber auch Populationen auf Sandböden zu finden (Barthlott et al., 2004).

In Teilen von Europa wurde *S. purpurea* mit Hilfe des Menschen eingebürgert. Einige Stellen in Irland, England (Lake District), der Schweiz, Deutschland (Bayrischer Wald) (Fürsch, 2001) und Österreich (Lunz am See, eigene Beobachtung) bilden neue Standorte der Pflanze.



**Abbildung 26: *S. purpurea* in Blüte, Naturstandort Kanada**



**Abbildung 27: Habitus von *S. purpurea*, Naturstandort Kanada**



**Abbildung 28: *S. purpurea*, Naturstandort Lunz am See**

Die Fallen von *S. purpurea* liegen fast waagrecht am Boden und sind in ihrer Form eher gedrunken und gebogen. Der Deckel weist eine sehr starke Behaarung auf. Die Farbe der Fallen kann, je nach Unterart, von hellgrün bis dunkelpurpur variieren. (Abbildungen 26-28)

## 3.7 *Nepenthes*

### 3.7a Verbreitung & Ökologie

Mitte des 17. Jahrhunderts wurde *Nepenthes* erstmals von Etienne de Flacourt auf Madagaskar entdeckt (Lloyd, 1942). Carl von Linné war es jedoch, der 1753 den Namen *Nepenthes* (Griech.: kummerstillend) prägte - in Anlehnung an Homers Odyssee, in der eine Droge namens „*Nepenthes*“ verwendet wurde (Juniper et al., 1989). Noch heute findet *Nepenthes* in der lokalen Medizin etliche Anwendungsgebiete. Verschiedene Teile der

Pflanze werden zur Heilung von Husten, Blasenleiden, Magenschmerzen, Malaria, Augenerkrankungen und Entzündungen verwendet (Barthlott et al., 2004).

Das Verbreitungsgebiet der Gattung erstreckt sich von Madagaskar über die Seychellen, Indien, Südostasien bis Nordost-Australien und Neukaledonien (Abbildung 29). Es werden mehr als 80 Arten (Clarke et al., 2001) beschrieben, deren Blätter auffällige, flüssigkeitsgefüllte Kannen bilden. Mehrere Arten wurden seit ihrer Entdeckung nicht mehr gefunden oder kommen nur auf einzelnen Bergen vor. Nur 10 Arten besiedeln ein größeres Areal. Ab der Meereshöhe bis ins Hochgebirge besiedeln die Pflanzen hauptsächlich Regenwälder, Nebelwälder und immerfeuchte Gebiete (Barthlott et al., 2004). Von Zeit zu Zeit sind sie auch an trockenen, offenen Stellen zu finden (Slack, 1985).

Sämtliche der bisher untersuchten Arten weisen einen homogenen Chromosomensatz von  $n=40$  auf. Dies ist der Grund für die fast unbegrenzte Kreuzbarkeit der Arten und erklärt die Existenz etlicher Naturhybriden, wie z.B. *Nepenthes x ventrata* (Barthlott et al., 2004).

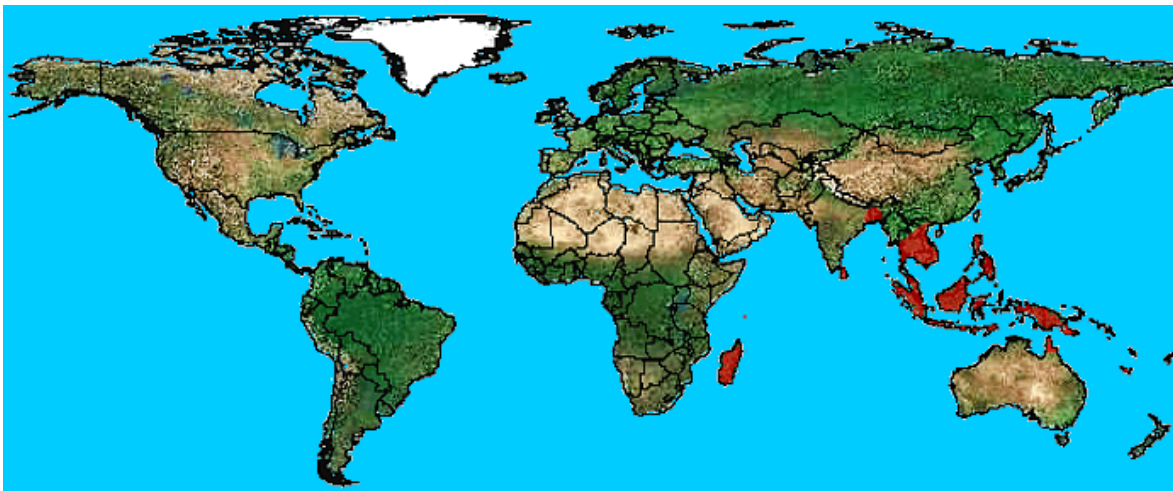


Abbildung 29: Verbreitungskarte der Gattung *Nepenthes* (Quelle: [www.plantarara.com](http://www.plantarara.com))

### 3.7b Morphologie

*Nepenthes* sind ausdauernde, verholzte Pflanzen, vor allem Kletterpflanzen oder Lianen, die eine Höhe von mehr als 15 Metern erreichen können (Slack, 1985). Die kräftigen Blattstiele klammern sich als Ranken an anderen Pflanzen fest (Abbildung 30, Abbildung 32). Im Gegensatz zu den meisten Karnivoren ist das Wurzelsystem von *Nepenthes* gut entwickelt (Barthlott et al., 2004).

Bei den Blättern unterscheidet man drei Bereiche (Barthlott et al., 2004): Der flache, Laubblatt-ähnliche Teil, der am Spross ansetzt, geht aus dem Blattgrund hervor und dient

der Photosynthese. Der Kannenstiel ist als Ranke ausgebildet und entspricht dem Blattstiel. Die eigentliche Kanne, eine Metamorphose der Blattspreite, dient dem Beutefang. Bisweilen fehlt die Falle bzw. die umgewandelte Blattspreite (Adlassnig, 2007).

Das Jugendstadium der Pflanzen zeichnet sich durch rosettig angelegte Blätter aus, an deren Enden sich später Kannenfallen bilden. Erste Anzeichen dafür sind verdickte Enden einer Ranke. Um die Falle aufrecht zu halten, dreht sich der Kannenstiel in die richtige Position. Ist die Entwicklung der neuen Falle abgeschlossen, füllt sie sich mit Luft und erhält ihre typische Form (Slack, 1985). Nach einiger Zeit öffnet sich schließlich der Deckel.

Viele *Nepenthes*-Arten weisen einen Blattdimorphismus auf, indem sie zwei Kannentypen, Boden- und Luftkannen, ausbilden (Braem, 2002; Moran, 1996; Veitch, 1897). Bodennahe, gedrungene Fallen sind vor allem auf kriechende Beute spezialisiert. Die Bildung von Kannenflügeln an der Außenseite der Falle erleichtert den Tieren das Hinaufklettern zur Fallenöffnung. Luftkannen hingegen sitzen am kletternden Spross der Pflanze. Sie sind langgestreckt bzw. röhrenförmig und dienen dem Fang von Fluginsekten.



**Abbildung 30: Habitus von *N. pervillei*, Naturstandort Seychellen (Foto: Verena Koller)**



**Abbildung 31: Falle von *N. pervillei*, Naturstandort Seychellen (Foto: Verena Koller)**



**Abbildung 32: Falle von *N. coccinia* in Kultur**

Die 10 Zentimeter bis 1 Meter langen Blütenstände der Pflanzen ( Abbildung 46) sind aus unzähligen kleinen Einzelblüten zusammengesetzt. Die Blüten sind zweihäusig, d.h. männliche und weibliche Blüten sitzen auf unterschiedlichen Pflanzen. (Danser, 1928)



### 3.7c Fangmechanismus

Die Fallen von *Nepenthes* können in vier Bereiche mit jeweils verschiedenen Funktionen gegliedert werden (Abbildung 33) (Braem, 2002; Juniper et al., 1989):

Folgende Aufnahmen machen, anhand von *N. ventrata*, den Fangmechanismus und die zellulären Unterschiede der Zonen sichtbar.

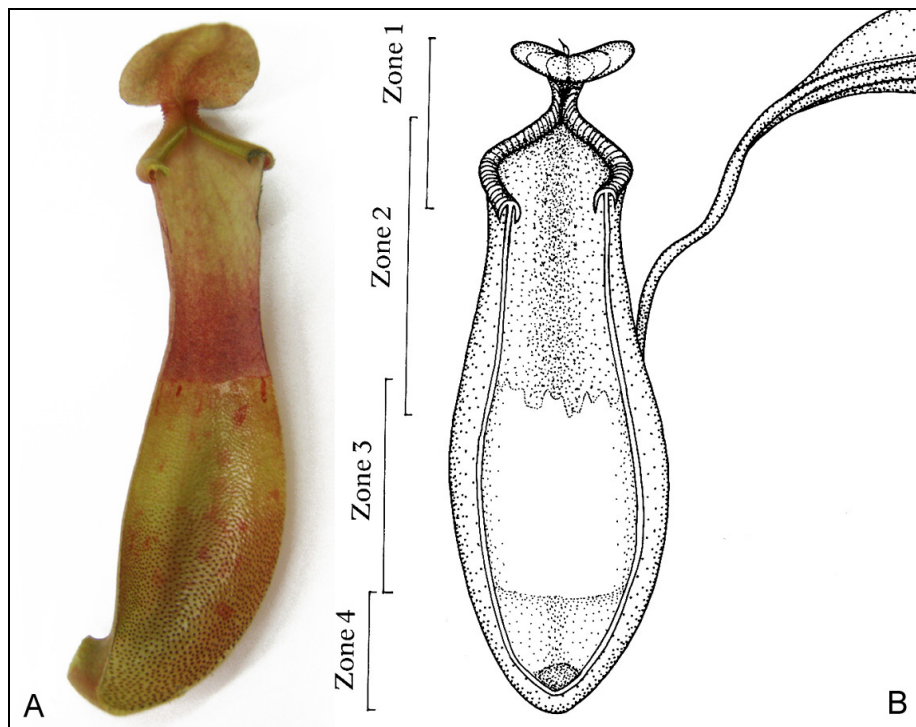
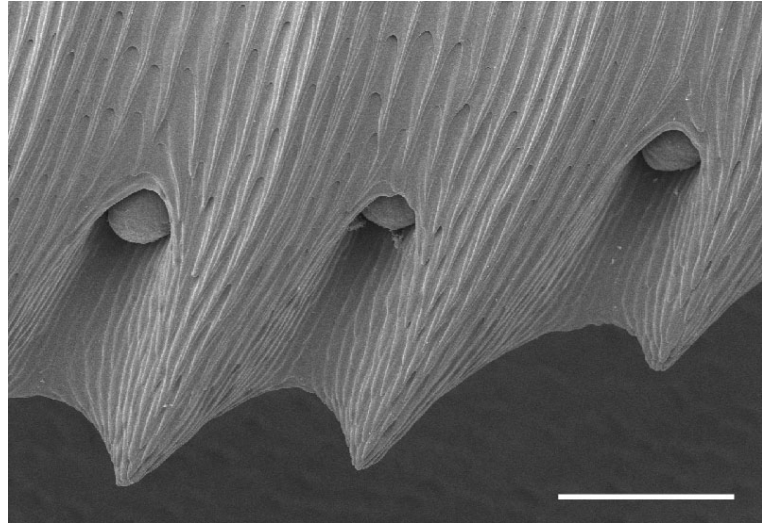


Abbildung 33: Aufgeschnittene Falle von *N. ventrata* (A) und Fallenschema (B) (Grafik B: Bream, 2002)

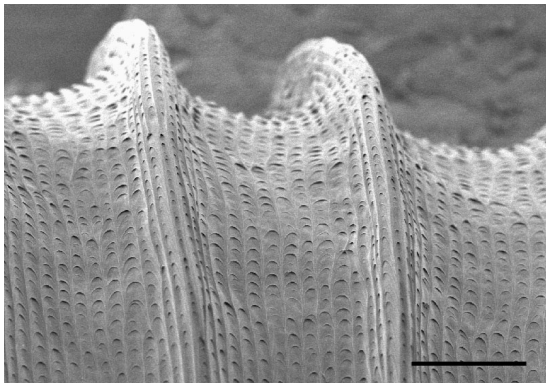
**Zone 1**, die sogenannte Anlockzone, umfasst Deckel und Peristom (Kannenrand). Die von zahlreichen Nektardrüsen gebildeten zuckerhaltigen Sekrete locken Beutetiere an die Fallenöffnung. (Abbildung 34-37)



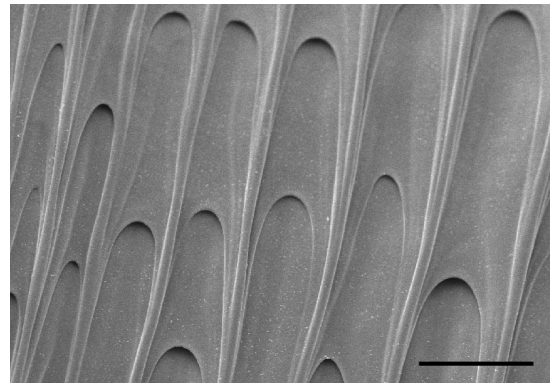
**Abbildung 34:** Der Kannenrand ist im Stereomikroskop als gerippte Struktur zu erkennen  
Markierung ~ 3mm



**Abbildung 35:** Nektardrüsen am Rand des Kannenrandes  
REM; Markierung ~ 200 µm



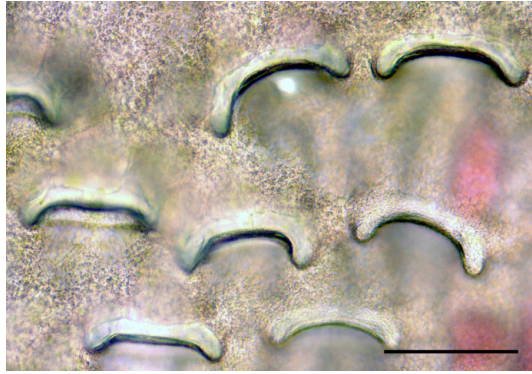
**Abbildung 36:** Am Kannenrand sind rillenartige Strukturen zu erkennen  
REM; Markierung ~ 200 µm



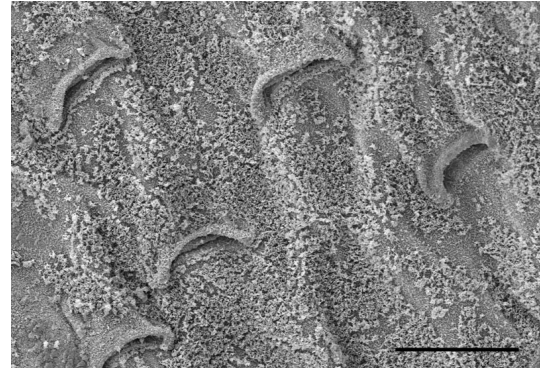
**Abbildung 37:** Bei stärkerer Vergrößerung wird eine ziegelartige Feinstruktur sichtbar  
REM; Markierung ~ 50 µm

Die Oberfläche der Gleitzzone, **Zone 2**, ist von bläulich schimmernden, plattenförmigen Wachskristallen überzogen (Devecka, 2007). Festen Halt auf dieser Fläche zu finden ist so gut wie unmöglich. Die sichelförmigen Strukturen, umgewandelte Spaltöffnungen (Reuter, 1938), bilden Überhänge, die Klettern an der Fallenwand zusätzlich erschweren. Beutetiere stürzen in den mit Flüssigkeit gefüllten Teil der Falle und ertrinken. Welche Rolle die umgewandelten Spaltöffnungen spielen, ist bisher nicht bekannt. (Abbildung 38-41)

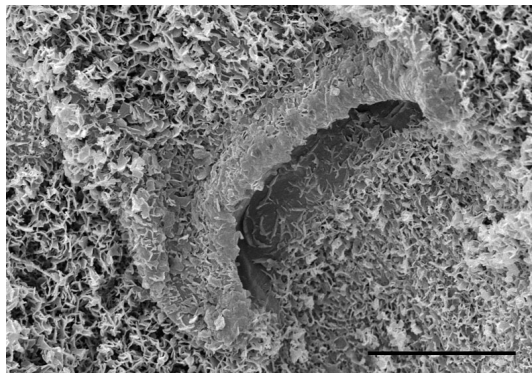




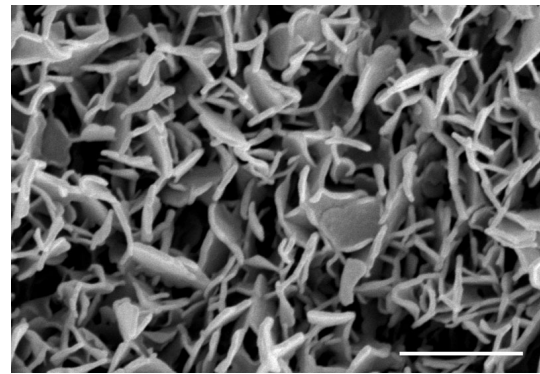
**Abbildung 38:** Wachskristalle der Gleitzone im Hellfeld; Markierung ~ 60  $\mu\text{m}$



**Abbildung 39:** Wachskristalle der Gleitzone REM; Markierung ~ 50  $\mu\text{m}$



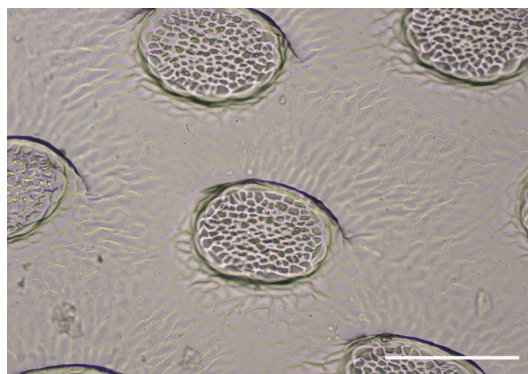
**Abbildung 40:** Bei stärkerer Vergrößerung werden Kristalle sichtbar  
REM; Markierung ~ 10  $\mu\text{m}$



**Abbildung 41:** Einzelne Wachskristalle der Gleitzone  
REM; Markierung ~ 2  $\mu\text{m}$

**Zone 3** stellt eine Übergangszone dar (Abbildung 43).

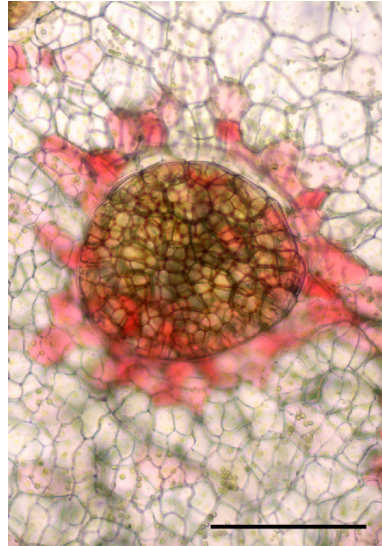
Die Fallwand von **Zone 4** ist mit unzähligen Verdauungsdrüsen besetzt (Abbildung 44, Abbildung 42). Die produzierten Verdauungsenzyme zersetzen die Beute und lösen die enthaltenen Nährstoffe. Die Verdauungsdrüsen setzen nicht nur die Enzyme frei, sondern nehmen die gelösten Nährstoffe auch auf (Barthlott et al., 2004).



**Abbildung 42:** Nagellack-Abdruck von Zone 4 (Verdauungszone); Markierung ~ 100  $\mu\text{m}$



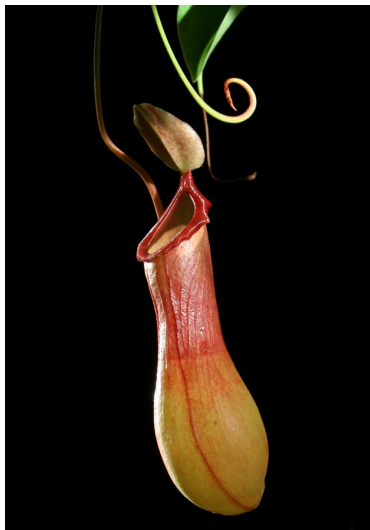
**Abbildung 43: Übergangszone mit Kristalleinlagerungen in den Zellen Hellfeld; Markierung ~ 80 µm**



**Abbildung 44: Verdauungsdrüse im Hellfeld; Markierung ~ 80 µm**

### 3.7d *Nepenthes x ventrata*

*Nepenthes x ventrata* (Abbildung 45) ist ein natürlicher Hybrid aus *N. ventricosa* und *N. alata*. Wie ihre beiden Herkunftsarten ist die Pflanze auf den Philippinen endemisch (Clarke et al., 2001; Fleming, 1979). Da die Spezies häufig gezüchtet wird, ist sie in vielen Gartencentern erhältlich.



**Abbildung 45: Falle von *N. ventrata* in Kultur**



**Abbildung 46: Weiblicher Blütstand von *N. ventrata* in Kultur**

Teil 1

Bakterien



## 4. MATERIAL & METHODEN

### 4.1 Pflanzenmaterial

Die Versuche wurden mit den Arten *Sarracenia purpurea* (Sarraceniaceae) und *Nepenthes x ventrata* (Nepenthaceae) durchgeführt.

Die Versuchspflanzen wurden in den Glashäusern der Universität Wien (Biozentrum) und der Bundesgärten Schönbrunn unter denselben Bedingungen kultiviert.

Die Probennahmen der Kannenflüssigkeit wurden mit sterilen Pipettenspitzen und sterilen Eppendorfcups oder Greiner-Tubes durchgeführt. Die Proben wurden beim Transport gekühlt gelagert.

Geschlossene Fallen von *Nepenthes x ventrata* wurden vom Stiel abgetrennt und außen mit 96% Ethanol sterilisiert. Die Probenentnahme erfolgte in der Sterilkammer.

### 4.2 Mikroskopische Methoden

#### 4.2a Lichtmikroskopische Methoden

Zur Untersuchung der Bakterien bzw. Kulturen wurden verschiedene Techniken angewandt.

Mikroskopische Untersuchungen der Bakterienkulturen wurden mit dem Forschungsmikroskop Olympus BX-41 (Abbildung 47) durchgeführt. Techniken wie Hellfeld, Dunkelfeld und Phasenkontrast wurden eingesetzt.

Weiters kam ein Nikon SMZU Stereomikroskop mit Tritubus zum Einsatz.

Die Detektion von Fluoreszenzfarbstoffen wurde mit einem Konfokalen Laser Scan Mikroskop (CLSM), einem Zeiss LSM 510meta, durchgeführt (Abbildung 48).

Das Prinzip eines CLSM besteht darin, dass ein Laser das Präparat Punkt für Punkt und Zeile für Zeile abtastet. Die in den Strahlengang des Mikroskops integrierte Blende



(„Pinhole“) leitet nur emittiertes Licht aus der eingestellten Schärfenebene zum Detektor weiter, blendet daher störende Lichtstrahlen („*Out of Focus* Licht“) aus. Ein Photomultiplier wandelt die Photonen in Stromflüsse um, aus denen der PC ein digitales Bild des Präparates erstellt.



Abbildung 47: Olympus BX-41



Abbildung 48: Zeiss LSM 510meta

#### 4.2b Elektronenmikroskopische Methoden

Einige ausgewählte Kulturen wurden fixiert, präpariert und mit dem Rasterelektronenmikroskop dokumentiert (siehe Kapitel 6.2b).

### 4.3 Dokumentation

Zur Dokumentation von Bakterienkulturen und Testnährmedien wurden die digitalen Spiegelreflexkameras Olympus E-330 und Canon EOS 400D, mit Stativ und eine Olympus  $\mu$ 770 Digitalkamera freihändig verwendet.

Die Beobachtungen am Olympus Forschungsmikroskop wurden mit einer Mikroskop-Digitalkamera, ColorView von Soft Imaging Systems, festgehalten.

Am Stereomikroskop kam die Kamera Nikon Coolpix 4500 zum Einsatz.

## 4.4 Molekulare Methoden

Bei allen Schritten dieser Techniken ist möglichst steriles Arbeiten erforderlich. Spezielle Werkbänke, Sterilbänke, ständiges Reinigen aller Utensilien mit 70%igem Ethanol und Überprüfung der Resultate sollen Kontaminationen und damit falsche Ergebnisse verhindern.

### 4.4a Bestimmung der absoluten Keimzahlen - Quantifizierung mit DAPI

Die Bestimmung der absoluten Keimzahl in 1ml Probe erfolgte mit einem Filterturm (Abbildung 49). Definierte Probemengen wurden auf den 0,2µm feinen Filter pipettiert. Eine Vakuumpumpe bewirkte, daß die Kannenflüssigkeit nach unten gesaugt wurde, während Bakterien an der Filteroberfläche gehalten wurden. Mittels DAPI (DNA Fluoreszenzfarbstoff) wurden die Bakterienzellen markiert. Der Filter wurde auf einen Objektträger transferiert und in Citifluor (Pufferlösung) eingebettet. Die Auszählung erfolgte mittels Zählkular am Zeiss AXIO Imager M1 Epifluoreszenz-mikroskop.

(Detailliertes Protokoll siehe Anhang, Kapitel 10.1)



**Abbildung 49: Filterturm**

Die absolute Keimzahl wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl / ml} = \frac{\text{gezählte Zellen in Probe}}{\text{Zahl der ausgezählten Felder (10)}} \times M \times V$$

M = Mikroskopfaktor; V= Verdünnungsfaktor

#### 4.4b Full Cycle 16S rRNA Approach

Konventionelle Kulturmethode ermöglichen es nicht, die Anzahl und Vielfalt an Bakterien einer Probe vollständig zu erfassen. Mikroorganismen aus Umweltproben sind zu einem hohen Prozentsatz unkultivierbar (Amann, 1995) und formen keine Kulturen auf Medien. Es ist daher notwendig, molekulare Methoden einzusetzen um die gesamte Diversität einer Probe zu bestimmen.

Der 16S rRNA Ansatz (Amann, 1995) ermöglicht es, mit Amplifizierung und Klonierung der bakteriellen 16S rRNA deren Sequenzierung und mit Hilfe von Datenbanken die Artenvielfalt in Proben zu ermitteln.

Das Arbeitsmaterial bei dieser Methode ist die 16S-rRNA:

Ribosomale Ribonukleinsäure (rRNA) trägt keine genetische Information, sondern baut zusammen mit Proteinen die Ribosomen auf. Prokaryotische und eukaryotische Ribosomen besitzen verschieden viele und unterschiedlich große rRNA-Moleküle:

Eukaryonten: 4 Moleküle (28S, 5,8S, 5S und 18S)

Prokaryonten: 3 Moleküle (23S, 5S und 16S)

Die Einheit S (Svedberg) bezeichnet die Absinkgeschwindigkeit eines Teilchens in einer Zentrifuge, geteilt durch die Stärke des Zentrifugalfeldes.

Die rRNA dient heute als molekularer Marker, da sie in allen Organismen funktionell konstant und genetisch stabil ist. Die 16S rRNA weist eine ideale Größe von etwa 1.500 Basen auf. Dadurch liefert sie viel Information und ist nicht zu groß um damit phylogenetische Analysen durchzuführen. Viele internationale Sequenzdatenbanken basieren auf Daten der rRNA, meistens 16S rRNA, verschiedenster Organismen.

#### **Agarose-Gel-Elektrophorese**

Die Agarose-Gel-Elektrophorese ist eine Methode, um verschiedene DNA- oder RNA-Moleküle mittels Anlegen eines Spannungsfeldes ihrer Größe nach aufzutrennen. Diese Methode wird im Full Cycle 16S rRNA Ansatz mehrmals angewendet und dient hier hauptsächlich zur Überprüfung sämtlicher Produkte (PCR, Klonierung, ect.). Das Prinzip beruht auf der Tatsache, dass die negativ geladene DNA/RNA im elektrischen Feld vom - zum + Pol wandert.



<b>Lösungen:</b>	1 x TBE Puffer	89 mM Tris 89 mM Borsäure 2 mM EDTA
	1 % Agarose Gel	1,2 g Agarose 120 ml TBE Puffer
	Auftragspuffer	25 % Ficoll 0,5 % Bromphenolblau 0,5 % Xylencyanol 50 mM EDTA

**Tabelle 2: Für die Agarose Gelelektrophorese verwendete Lösungen**

Agarose und 1x TBE Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer) werden im richtigen Verhältnis gemischt (normalerweise zu einem 1 %igem Gel) und in der Mikrowelle aufgeschmolzen. Mit Hilfe eines Gelschlittens und eingesetzten Kämmen wird ein Rahmen zusammengesetzt (Abbildung 50), in den das flüssige Agarose-Gel gegossen wird. Die eingesetzten Kämmen verursachen Vertiefungen („Slots“) im Gel die später zum Beladen benötigt werden.

Das feste Gel wird mit dem Schlitten waagrecht in die Elektrophoresekammer gelegt, die mit 1x TBE Puffer gefüllt ist (Abbildung 51). Die Proben werden mit Auftragspuffer gemischt (normalerweise 5 µl Auftragspuffer + 5-10 µl Probe), um die DNA-Moleküle schwerer zu machen. Anschließend werden die Gel-Slots durch vorsichtiges Pipettieren mit dem Proben-Auftragspuffer-Gemisch befüllt.

Im ersten und letzten Slot jedes Gels wird eine DNA-Leiter (kbl) aufgetragen. Diese besteht aus gröbendefinierten Molekülen, die am fertig gelaufenen Gel einen Größenindex darstellen. Anhand dieser Skala kann die Größe der DNA-Moleküle abgelesen werden.

Wird elektrische Spannung angelegt, laufen große Fragmente wesentlich langsamer als kleine durch das Gel. Nach der Auftrennung wird das Gel aus der Kammer genommen und in einer abgedunkelten Färbewanne mit Ethidiumbromid (1:10.000 mit Wasser verdünnt) gefärbt. Die entstandenen Banden fluoreszieren unter UV-Licht violett und können ausgewertet werden.

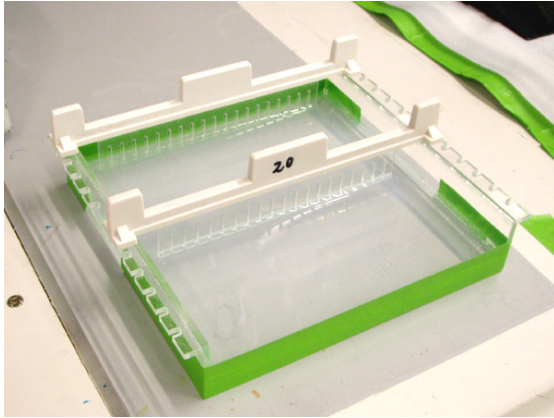


Abbildung 50: Gelschlitten mit Kämmen und gegossenem Gel

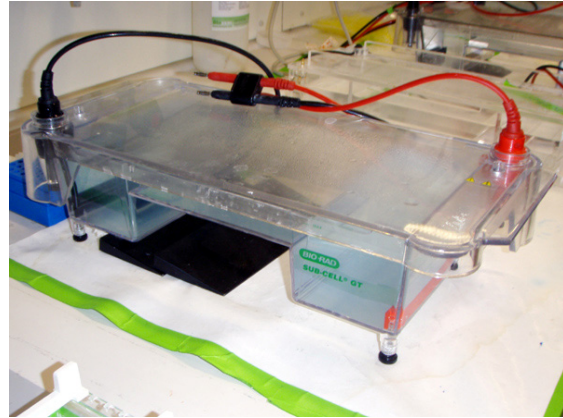
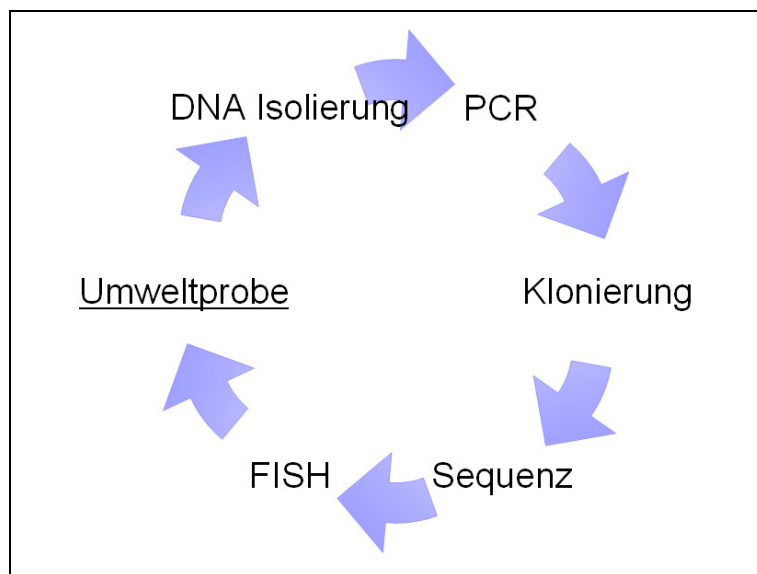


Abbildung 51: Biorad Elektrophoresekammer

Der *Full Cycle 16S rRNA Approach* beinhaltet folgende Einzelschritte:



Grafik 1: Schematische Darstellung der wichtigsten Schritte

## 1. DNA-Isolierung

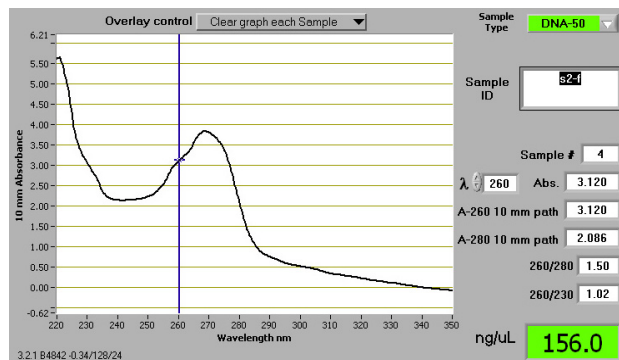
Aus den Proben, die den Kannenfallen entnommen wurden, soll mittels chemischer/enzymatischer und mechanischer Methode möglichst viel der enthaltenen DNA isoliert werden. Die Proben wurden zentrifugiert (1,5 ml Probe 1 min, bei 4°C und 10.000 rpm), der Überstand abgenommen, erneut mit Probe aufgefüllt und abermals zentrifugiert. Die so aufkonzentrierten Proben wurden nach dem „PowerSoil DNA Isolation Kit“ Protokoll des Herstellers MoBio Laboratories Inc., weiter bearbeitet. Der

Aufschluss der Zellen erfolgte durch „*bead beating*“ (mechanische Zerstörung) und chemische Lyse. In mehreren Zentrifugations- und Pippettierschritten wurde die DNA isoliert.

Die Reinheit und Konzentration der isolierten DNA wurde mit dem NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 der Firma NanoDrop Technologies Inc. bestimmt (Abbildung 53). Um mit der isolierten DNA weiterarbeiten zu können, muß sie eine bestimmte Konzentration und Reinheit aufweisen.



**Abbildung 52: Bead-Beater zum mechanischen Aufschluß der Zellen**



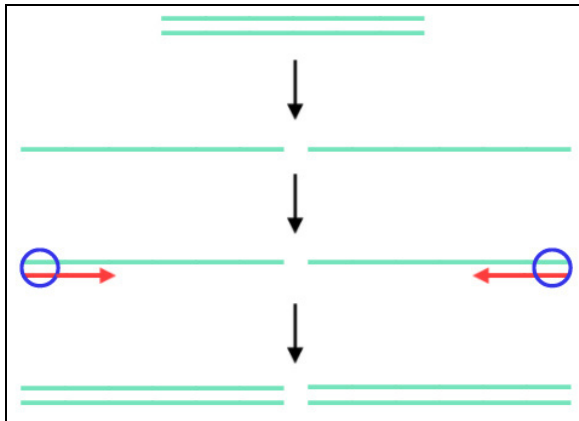
**Abbildung 53: Konzentrations- und Reinheitsmessung. Der Peak bei 260 nm zeigt die DNA, die anderen Peaks sind verschiedene Verunreinigungen.**

## 2. PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaktion) ist eine Methode um einzelne, definierte Fragmente der isolierten DNA *in vitro* zu vervielfältigen.

Ausgangsmaterial ist ein Master-Mix bestehend aus isolierter DNA, Primern, Nukleotiden, Taq-Polymerase und Puffer. Als Primer bezeichnet man ein Nukleotid das als Startpunkt für die Taq-Polymerase dient. Diese wiederum ist ein Enzym, welches die Verknüpfung der Nukleotide katalysiert. PCR-Cycler stellen durch Temperaturzyklen die richtigen Bedingungen für folgende Vorgänge her:

Die DNA wird erhitzt um die Doppelstränge zu trennen („*Denaturation*“). Das kurze Halten einer bestimmten Temperatur, abhängig von den Primern, ermöglicht deren Anlagerung an die Einzelstränge („*Annealing*“). Die Taq-Polymerase vervollständigt den Einzelstrang mit den richtigen Nukleotiden zu einem Doppelstrang („*Elongation*“). Dieser Zyklus wird etliche Male wiederholt und ermöglicht so eine exponentielle Zunahme der DNA-Zielgene. (Grafik 2)



**Grafik 2: Schematische Darstellung der PCR**



**Abbildung 54: PCR-Thermocycler**

Für die Polymerasekettenreaktion wurde ein iCycler der Firma BioRad eingesetzt (Abbildung 54). Universelle, bakterielle 16S-RNA-spezifische Primer (vorwärts und rückwärts) wurden verwendet, um sicherzustellen, dass nur bakterielle DNA-Fragmente von 1.500 Basenpaaren amplifiziert werden (Tabelle 3).

Primer	Annealing Temp. (°C)	Sequenz (5'-3')	Spezifität	Referenz
616 F	52	AGA GTT TGA TYM TGG CTC	Die meisten Bacteria	Juretschko <i>et al.</i> 1998
1492 R	52	GGY TAC CTT GTT ACG ACT T	Die meisten Bacteria und Archaea	Modifiziert aus Kane <i>et al.</i> 1993

**Tabelle 3: Für die PCR verwendete Vorwärts- und Rückwärts Primer**

Standardansatz pro Reaktion	(50 µl)
10x Taq-Polymerase Puffer	5 µl
dNTP-Mix (2,5 mM von jedem dNTP)	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4 µl
100x BSA (10 mg/ml)	0,5 µl
F-Primer	0,5 µl
R-Primer	0,5 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
H <sub>2</sub> O bidest.	33,25 µl
	49 µl

**Tabelle 4: Standardansatz für den PCR-Master-Mix**

Die Komponenten des Standardansatzes wurden in einem ERG (Eppendorf-Reaktionsgefäß) zum Master-Mix zusammengemischt (Tabelle 4).

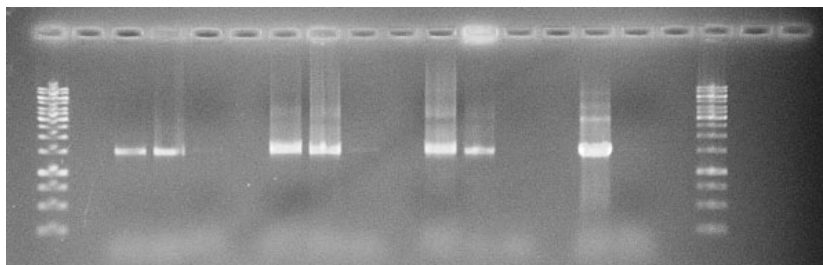
Davon wurden je 49 µl auf die PCR-Reaktionsgefäße aufgeteilt und je 1 µl der DNA-Lösungen zugesetzt. Der Ansatz wurde kurz geschüttelt, bevor die Reaktion im programmierten PCR-Cycler gestartet wurde (Tabelle 5).

Bei jedem PCR-Durchgang wurde eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt. Die Negativkontrolle besteht nur aus dem Master-Mix, die Positivkontrolle aus dem Master-Mix und einem Plasmid (p7k32). Bei der Negativkontrolle sollen bei der Auswertung am Gel keine Banden zu sehen sein, die Positivkontrolle sollte eine Bande auf einer bestimmten Höhe zeigen.

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Denaturation	95 °C	4 min	1x
Denaturation	95 °C	40 sec	30x
Annealing	52 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	90 sec	
Final Elongation	72 °C	15 min	1x
End	4 °C	∞	1x

**Tabelle 5: Einstellungen des PCR-Thermocyclers**

Die Überprüfung der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarose-Gel-Elektrophorese. Ein 1 prozentiges Agarose-Gel aus 1,2 g LE-Agarose und 120 ml TBE-Puffer wurde gegossen. Die Laufzeit betrug 45 Minuten, die Spannung 120 Volt und die Färbezeit in Ethidiumbromid 30 Minuten. Nach der Auftrennung konnten die Banden anschließend unter einer UV-Lampe ausgewertet werden.

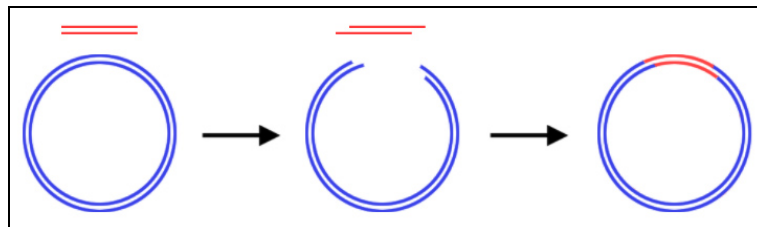


**Abbildung 55: Gel-Bild einer PCR**

### 3. Klonierung

Die Klonierung der 16S rRNA Gen-Amplifikate wurde nach dem Protokoll des „TOPO TA Cloning Kit“ der Firma Invitrogen vollzogen.

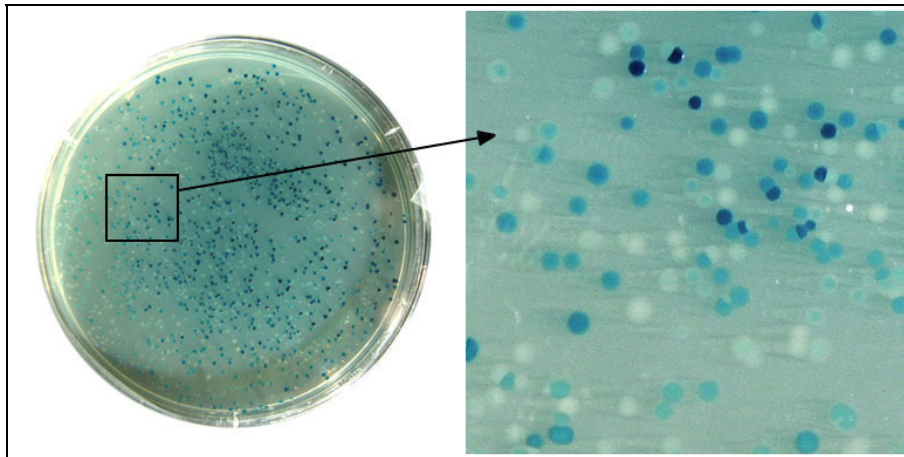
Die durch PCR vervielfältigten DNA-Fragmente der richtigen Größe (1.500 Basenpaare) werden nun in bakterielle Plasmide (pCR 2.1TOPO) eingebaut, die als Übertragungsvektoren verwendet werden (Grafik 3). Die im Kit vorhandenen Vektoren sind schon geschnitten. Die dafür verantwortliche Topoisomerase schneidet die Plasmide so, dass Poly-T-Überhänge an den Enden, sogenannte „*sticky ends*“, entstehen. Die PCR Produkte (Ziel-DNA) erhalten bei der PCR A-Überhänge, die nun an die T-Überhänge binden können. Die Topoisomerase katalysiert die Verbindung der Enden.



**Grafik 3: Schematische Darstellung der Klonierung**

Transformation: Zur Transformation wurden *One Shot* chemisch-kompetente (mit Kalziumchlorid vorbehandelt) *E. coli* TOP10-Zellen verwendet. Ein Hitzeschock veranlasst *Escherichia coli*-Zellen diese fremde DNA in ihre Plasmide aufzunehmen. Auf LB-Agarplatten wurden je 100µl des Antibiotikums Ampicillin ausgestrichen und im Klimaraum bei 37°C getrocknet. Die *E. coli* Zellen wurden anschließend auf diesen Kulturmedien vermehrt. Ein auf dem Plasmid vorhandenes Antibiotikum-Resistenzgen machte es nur transgenen Zellen möglich, auf dem mit Antibiotikum versehenen Medium Kolonien zu bilden.

Ein Blau-Weiß-Screening der Klone (Abbildung 56) ermöglicht die Selektion der Insert-positiven Zellen. Um dieses durchführen zu können, wurden zusätzlich 40µl X-Gal-Stammlösung (Rezept nach Anleitung des Kits) auf den Agarplatten verteilt. Nach Beendigung der Transformation wurden pro Klonierungsansatz je 100 µl und 150 µl der Soc-Vorkultur ausplattiert und über Nacht inkubiert.



**Abbildung 56: Blau-Weiß-Screening**

Klone ohne Insert sind in der Lage  $\beta$ -Galactosidase zu synthetisieren und auf Grund dessen X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) unter Bildung eines blauen Farbstoffes zu spalten. Bei Klonen die das Insert aufgenommen haben, unterbricht dieses das *lacZ*-Gen zur Bildung von  $\beta$ -Galactosidase. Die Zellen sind nicht in der Lage X-Gal zu spalten und bleiben daher weiß.

Rekombinante Klone wurden mit Zahnstochern gepickt, auf eine sogenannte Master-Platte übertragen und mit Nummern versehen, um Ergebnisse später wieder einer Kolonie zuordnen zu können. Zusätzlich wurden Proben dieser Klone je einem Röhrchen mit Antibiotika-haltigem LB-Flüssignährmedium zugesetzt. Alle Kulturansätze wurden im Klimaraum bei 37°C über Nacht inkubiert.

Parallel zum Anlegen der Master-Platte wurde eine M13-PCR angesetzt, um die Insertgröße der Klone zu überprüfen. Das richtige Insert sollte 1.500 Basenpaare lang sein, tendenziell nehmen Vektoren jedoch bevorzugt Fragmente auf, die kleiner als 1.500 Nukleotide sind. Es werden Primer eingesetzt die nur das aufgenommene Insert amplifizieren (Tabelle 6). Mit dieser Methode konnte vermieden werden mit kontaminierten Klonen weiter zu arbeiten.

<b>Primer</b>	<b>Annealing Temp. (°C)</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>
M13 F	60	GTA AAA CGA CGG CCA G
M13 R	60	CAG GGA ACA GCT ATG AC

**Tabelle 6: verwendete M13-Primer**

<b>Standardansatz pro Reaktion</b>	<b>(25 µl)</b>
10x Taq-Polymerase Puffer	2,5 µl
dNTP-Mix (2,5 mM von jedem dNTP)	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 µl
Primer M13 F (100 pmol/µl)	0,125 µl
Primer M13 R (100 pmol/µl)	0,125 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,125 µl
H <sub>2</sub> O bidest.	17,625 µl
	25 µl

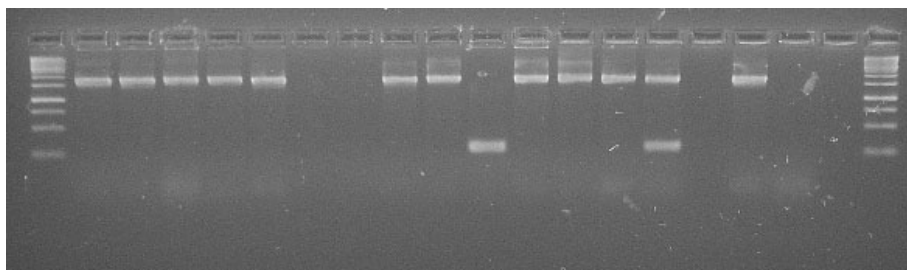
**Tabelle 7: Standardansatz für den M13-PCR-Master-Mix**

Der Master-Mix wurde wie bei einer normalen PCR gemischt (Tabelle 7) und in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (96 Wells) pipettiert. Mit sterilen Zahnstochern wurden Zellen jeder Klonkolonie der Masterplatte entnommen und durch kurzes Drehen in den Wells suspendiert. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer Folie überzogen und direkt in den programmierten Thermocycler gestellt (Tabelle 8).

<b>PCR-Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zyklenzahl</b>
Denaturation	95 °C	4 min	1x
Denaturation	95 °C	40 sec	35x
Annealing	60 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	90 sec	
Final Elongation	72 °C	15 min	1x
End	4 °C	∞	1x

**Tabelle 8: Einstellungen des PCR-Thermocyclers**

Mit den M13-PCR-Produkten wurde eine Agarose-Gel-Elektrophorese durchgeführt. Die Banden am Gel zeigen die Größe der Inserts (Abbildung 57).



**Abbildung 57: Gel-Bild einer M13-PCR**



## Plasmidpräparation („preppen“)

Die Plasmide ausgewählter Kulturen werden aus den Zellen isoliert. Für die Isolierung wurde folgendes Protokoll verwendet.

Die Plasmid-Aufreinigung erfolgte nach dem „Miniprep“ Protokoll (Lücker, 2004).

Die *E. coli* Zellen werden durch alkalische Lyse aufgebrochen. Durch anschließende organische Präzipitierung der Proteine und Fällung der Plasmid-DNA erhielt ich aufgereinigte Plasmide, die zur Sequenzierung weiterverwendet wurden.

Die Plasmid-Aufreinigung wurde wie folgt durchgeführt:

- Die benötigten Lösungen wurden angesetzt (Tabelle 9).

<b>Lösungen:</b>	P1-Puffer	1 M Tris-HCl (pH 8)	1 ml
		0,5 M EDTA (pH 8)	400 µl
		RNase A	100 µl/ml
		H <sub>2</sub> O bidest.	Ad 20 ml
	NaOH-SDS-Lösung	2N NaOH	2 ml
		10% SDS	2 ml
		H <sub>2</sub> O bidest.	16 ml
	Kaliumacetat/Acetat-Lösung	5 M Kaliumacetat	12 ml
		Eisessig	2,3 ml
		H <sub>2</sub> O bidest.	5,7 ml

**Tabelle 9: Verwendete Lösungen**

- Zwei mal 2 ml der im LB-Medium gewachsenen Kultur wurden abzentrifugiert (14.000 rpm, 1 min), der Überstand verworfen.
- Das Zellpellet wurde in 100 µl P1-Puffer resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- 200 µl NaOH-SDS-Lösung wurden zugegeben (Zellyse), der Ansatz geschwenkt und 5 min auf Eis gestellt.
- 150 µl Kaliumacetat/Acetat-Lösung wurden zugegeben, der Ansatz geschwenkt und 5 min auf Eis inkubiert.
- Die gefällten Proteine wurden durch Zentrifugation abgetrennt (14.000 rpm, 5 min), der Überstand in ein neues ERG überführt.

- Das gleiche Volumen Isopropanol wurde zugesetzt und die DNA für 10 min bei Raumtemperatur gefällt.
- Die DNA wurde abzentrifugiert (14.000 rpm, 1 min), der Überstand verworfen, das Pellet in 500 µl kaltem 70% Ethanol gewaschen und neu pelletiert (14.000 rpm, 1 min).
- Der Überstand wurde verworfen, das Pellet getrocknet.
- Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gelöst und bei -20°C gelagert.

#### 4. Sequenzierung & Sequenzanalyse

Diese Technik ermöglicht die Bestimmung der Nukleotidabfolge der DNA (Abbildung 58). Die ermittelte Sequenz kann schließlich in Datenbanken eingegeben und analysiert werden. Die einzelnen 16S Gene können so Organismengruppen, Gattungen oder Arten zugeordnet werden.

```
CSTATMAAAGTGGTAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGT
GTGTACAAGGCCCGGAACGTATTACCGTAGCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTT
GCAGACTCCAATCCGGACTACGACAGACTTTATGTGGTCCGCTTGTCTCGCGAGTTCGCTTCACTTTGTATCTGCCATT
GTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTATCACCGGCAG
TCTCCTTTGAGTTCCCAACCATGACGTGCTGGCAACAAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAAACATTTT
ACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTCGCGAAGGCACCGAAGCATCTCTGCTAAGTTCTGTG
GATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCGCTCAAT
TCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCGAGGCGGTGCACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCCTCAAGGG
CACAACTCCAAGTCGACATCGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTGCGACCT
GAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTTTCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGG
AATTTCTACCCCTCTACAAGACTCTAGCTTGCCAGTTTCAAATGCAGTTCACCGTTAAGCGCGGGGATTTACATCTG
ACTTAACAAACCGCTGCGTGCCTTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCTTGCAACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTG
GCACGGAGTTAGCCCGTCTTCTTCTGCGAGTAACGTTCATCMCAAAGGTTATTAACTTATGCTTCTCCTCCTCSTGAA
GTGCTTACACYCGAAGCTTCTTCCACACACGCGCCATGGCCTGCATCAGCTGCSCCATK
```

Abbildung 58: Basenabfolge einer Sequenz

Das Sequenzieren der Proben erfolgte mit dem Kapillarsequencer 3130x / Genetic Analyzer von Applied Biosystems (Hitachi). Der Vorgang beruht auf dem Prinzip der Kettenabbruchmethode oder Didesoxymethode nach Sanger, 1977 (Sanger et al., 1977). (Prinzip des Verfahrens, siehe Anhang, Kapitel 10.2)

Die Klone wurden jeweils vorwärts und rückwärts sequenziert um Vollsequenzen zu erhalten, da nur etwa 800 Basenpaare pro Sequenzierung ermittelt werden können. Ein Computer las die Sequenzen aus und ordnete die jeweiligen Basen zu.

Phylogenetische Schnellzuordnungen der Sequenzen wurden mit folgenden online Datenbanken durchgeführt:

NCBI: Blast

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Ribosomal Database Project II: Classifier

(<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>)

Greengenes: Blast

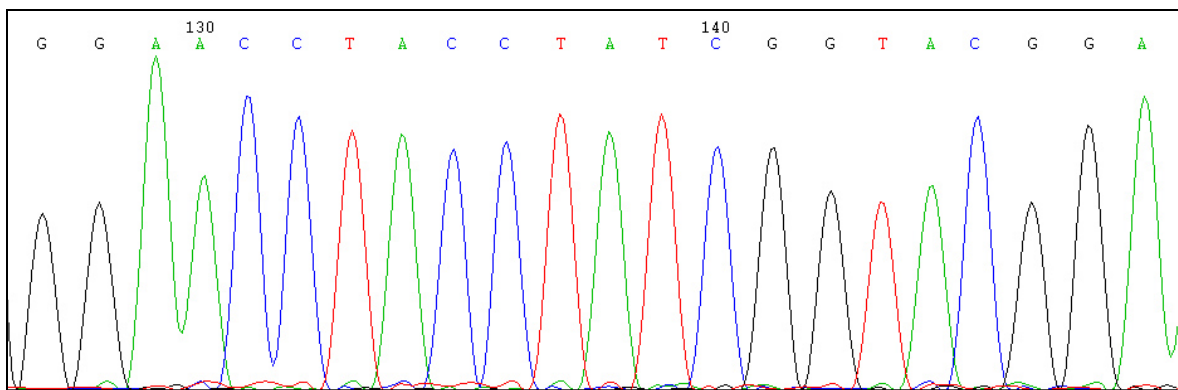
([http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-blast\\_interface.cgi](http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-blast_interface.cgi))

Die Programme durchsuchen allgemeine Datenbanken nach ähnlichen Sequenzen bzw. Organismen und Klonen und reihen die Ergebnisse nach ihrer Relevanz.

Erhält man bei Vorwärts- und Rückwärts-Sequenz sehr unterschiedliche Zuordnungen, kann das auf eine Chimäre hindeuten. In diesem Fall wurden die Sequenzen genauer untersucht und im Zweifelsfall aus weiteren Arbeitsschritten ausgeschlossen.

Genaue Einordnungen der Sequenzen und Einrechnungen in Stammbäume erfolgten mit dem Software Programm „Arb“.

Um die Sequenzdaten mit der Arb Datenbank vergleichen zu können, mussten zuerst die Chromatogramme (Grafik 4) Korrektur gelesen werden: Unsichere Stellen in der Basenabfolge werden, wenn möglich, ausgebessert. Zusätzlich werden Anfang und Ende jeder Sequenz abgeschnitten, da der Sequencer diese Bereiche meistens schlecht auslesen kann. Dies erfolgte mit dem Software Programm „Chromas“.



**Grafik 4: Teil eines sicheren Chromatogrammes**

Mit Hilfe eines online Aligners (<http://www.arb-silva.de/aligner/>) wurden grobe Alignments erstellt. Diese Daten wurden in Arb importiert, in einen allgemeinen Bakterien-Stammbaum eingerechnet und grob zugeordnet. Anschließend wurden in Arb genaue Alignments erstellt. Dabei werden die Sequenzen an nahen Verwandten so ausgerichtet, dass homologe Bereiche an denselben Stellen liegen. Zudem wurden Vorwärts- und Rückwärts-Sequenzen zu Vollsequenzen zusammengesetzt. Die so

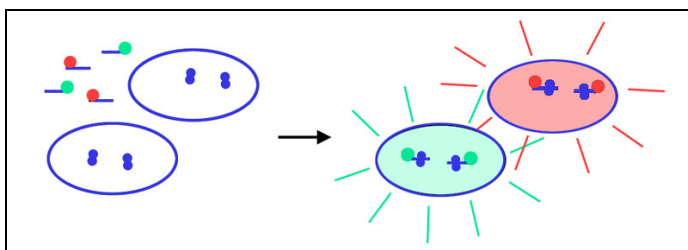
korrigierten und komplettierten Sequenzen konnten letztendlich genau in einen Stammbaum eingerechnet und bestimmten Gattungen und Arten zugeordnet werden.

Für die Baumberechnung wurde ein 50 % Konservierungsfiter verwendet, bei dem nur Sequenzbereiche berücksichtigt werden, die bei mindestens 50 % aller Bakterien konserviert sind. Die Baumberechnung erfolgte mit dem *AxML* (*Maximum Likelihood*) Verfahren. Alle theoretisch möglichen Bäume wurden nach Wahrscheinlichkeiten sortiert, bis der wahrscheinlichste übrig blieb. Parameter wie Konservierungen an bestimmten Stellen und Wahrscheinlichkeiten zur Mutation wurden in die Berechnung mit einbezogen. Als *Outgroup* für das Setzen der Stammbaumwurzel wurden die *Archaea* gewählt. Alle Sequenzen und Referenzsequenzen waren über 1350 Basen lang.

## 5. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung („FISH“)

Da die Diversität der Probe nun weitgehend bekannt war, stellte der letzte Schritt des Ansatzes den Nachweis der Organismen in den Umweltproben dar.

FISH ist eine kultivierungsunabhängige Technik zum Detektieren von charakteristischen RNA-Sequenzen in Zellen (Amann et al., 1990; Wagner et al., 2003). Mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte, 15-25 Nukleotide lange Sonden werden eingesetzt, um an ihre spezifischen Sequenzen in Zellen der Probe zu binden. In den Wells des FISH-Objekträgers (*Slide*) (Abbildung 59) werden kleine Mengen der fixierten Probe immobilisiert und unter bestimmten Bedingungen in Hybridisierungskammern hybridisiert. Nach einem Waschschrift können die Signale der gefärbten Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden. (Grafik 5)



Grafik 5: Schematische Darstellung des *FISH* Prinzips

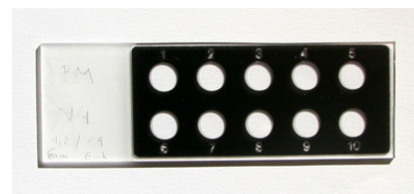
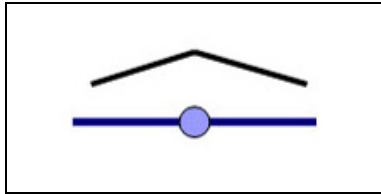


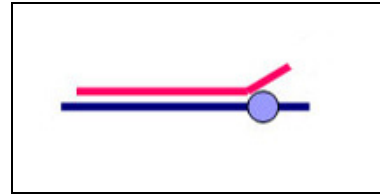
Abbildung 59: *FISH-Slide*

Die Sonden sollten komplementär zum Zielorganismus gewählt werden. Kommen Mismatches, Stellen an denen die Sonden- und Zielsequenz nicht übereinstimmen, vor, kann es zu unspezifischen Bindungen der Sonde kommen. Dies hat zur Folge, dass auch

Nicht-Ziel-Organismen ein Signal geben. Sind Mismatches nicht vermeidbar, sollten sie mittig in der Sequenz liegen, da die Sonde unter diesen Umständen nicht binden kann (Grafik 6-7).



**Grafik 6: Das Mismatch sitzt in der Mitte, die Sonde kann nicht binden.**



**Grafik 7: Das Mismatch sitzt am Rand, die Sonde biegt sich und bindet an Nicht-Ziel-Organismus**

Nicht jede Sonde ist 100% spezifisch für ihre Zielorganismen. Um unspezifische Bindungen weitgehend auszuschließen wird das „*Multiple Probe Concept*“ angewandt. Für jeden Zielorganismus werden mehrere Sonden mit unterschiedlichen Farbstoffen eingesetzt. Kommen bei der Detektion Mischfarben zustande, haben alle Sonden gebunden und das Ergebnis kann als sicher angenommen werden.

Die Stringenz beeinflusst die Strenge der Bedingungen und wird über die Formamid-Konzentration im Hybridisierungspuffer und die Natriumchlorid-Konzentration im Waschpuffer eingestellt. Die Stringenz der einzelnen Sonden wurde so eingestellt, daß die Sonde möglichst gut an Zielorganismen binden kann, Nicht-Ziel-Organismen jedoch möglichst wenig erfaßt werden.

Für die Versuche wurden folgende Sonden verwendet (Tabelle 10):

Sonde	Spezifität	Fluoreszenzfarbstoff	Stringenz (% FA)
EUB mix	Alle Bakterien	Fluos (grün)	0 – 60
NONEUB	Kein Organismus (Kontrolle)	Fluos (grün)	0 – 60
Alf 968	Alphaproteobakterien	Cy3 (rot)	20
Bet 42a	Betaproteobakterien	Cy3 (rot)	35
Gam 42a	Gammaproteobakterien	Cy3 (rot)	35
HGC 69a	Aktinobakterien	Cy3 (rot)	25
LGC 354	Firmicutes	Cy3 (rot)	20
Pla 46	Planctomyceten	Cy3 (rot)	30

**Tabelle 10: Für die Versuche verwendete Sondenkombinationen; FA (Formamid); für Informationen zu den Sequenzen siehe [www.microbial-ecology.net/probebase](http://www.microbial-ecology.net/probebase)**

## FISH-Protokoll

- Die Proben wurden durch Ethanol- oder Paraformamid(PFA)-Fixierung, abhängig von den Zielorganismen (gram- PFA, gram+ EtOH), präpariert (Protokolle siehe Anhang Kapitel 10.3).
- Die benötigten Lösungen wurden hergestellt (Tabelle 11).

Lösungen:	NaCl (5 M)	EtOH 50%
	Tris/HCl (1 M, pH 8)	EtOH 80%
	Formamid (FA)	EtOH 96%
	EDTA (0,5 M; pH 8)	
	H <sub>2</sub> O bidest. (MQ)	

**Tabelle 11: FISH-Lösungen**

- Die Sonden und Proben wurden bis zur Verwendung auf Eis gestellt und danach wieder bei -20°C eingefroren.
- 10 µl der fixierten Probe wurden auf Wells pipettiert, die Biomasse im Wärmeschrank bei 46°C immobilisiert.
- Zur Dehydrierung wurde eine Ethanolreihe mit 50%, 80% und 96% Ethanol durchgeführt. Der Objektträger wurde jeweils 3 min in die Lösungen getaucht und danach luftgetrocknet.
- Für jedes *Slide* wurde, je nach Sonden bzw. Stringenz, ein Waschpuffer wie folgt hergestellt (Tabelle 12) und im Wasserbad konstant auf 48°C gehalten.

FA %	20 %	25 %	30 %	35 %
<b>NaCl</b>	2150	1490	1020	700
<b>Tris/HCl</b>	1 ml	1 ml	2 ml	3 ml
<b>EDTA</b>	500	500	500	500
<b>MQ</b>	ad 50 ml	ad 50 ml	ad 50 ml	ad 50 ml

**Tabelle 12: Waschpuffer (Angaben, wo nicht anders vermerkt, in µl)**

Zusätzlich wurde ein Hybridisierungspuffer (Tabelle 13) hergestellt, wobei das FA zuletzt unterm Abzug hinzugefügt wurde.

FA %	20 %	25 %	30 %	35 %
NaCl	180	180	180	180
Tris/HCl	20	20	20	20
MQ	600	550	500	450
FA	200	250	300	350

**Tabelle 13: Hybridisierungspuffer (Angaben in  $\mu$ l)**

- Auf die Wells des Objektträgers mit den getrockneten Proben wurde unterm Abzug je 10  $\mu$ l Hybridisierungspuffer und 1  $\mu$ l Sonde aufpipettiert und vorsichtig gemischt.
- Ein leeres Greiner-Röhrchen diente als Hybridisierungskammer. Ein Streifen Küchenrolle wurde mit dem Rest des Hybridisierungspuffers befeuchtet und mit dem Slide in die Kammer gelegt ( Abbildung 60). Der Ansatz wurde bei 46°C im Wärmeschrank mindestens 1,5 h inkubiert.



**Abbildung 60: Befüllte Hybridisierungskammer**

- Nach der Hybridisierung folgte ein 10minütiger Waschschrift im vorbereiteten Waschpuffer bei 48°C.
- Anschließend wurde der Objektträger etwa 1 Sekunde in eiskaltes MQ getaucht und sofort unterm Luftstrom getrocknet.
- Die *Slides* wurden bis zur Detektion am LSM bei -20°C eingefroren gelagert.
- Vor dem Mikroskopieren wurden die *Slides* in Citifluor eingebettet.

Zum Nachweis von mehreren Sonden mit unterschiedlichen Stringenzen wurden Doppelhybridisierungen durchgeführt. Dabei wurde zuerst die Sonde mit der höheren FA-Konzentration, zusammen mit der allgemeinen Sonde, hybridisiert, gewaschen und getrocknet. Danach der Vorgang mit der zweiten Sonde wiederholt.

## 4.5 Kulturmethoden

### 4.5a Herstellung der Nährmedien

Die benötigten Mengen der Inhaltsstoffe wurden eingewogen, gemischt und, wenn im Rezept nicht anders angegeben, auf dem Magnetrührer aufgekocht. Im kalten bis lauwarmen Zustand wurde der pH-Wert mittels pH-Meter gemessen und gegebenenfalls mit 1 molarer NaOH oder HCl richtig eingestellt. Die Sterilisation der Medien erfolgte im Autoklaven bei 121°C über 30 Minuten. Nach anschließendem Wiederverflüssigen auf der Magnetkochplatte wurden die Medien in der Sterilbank in Petrischalen gegossen und beimpft.

Hitzeempfindliche Stoffe, wie Antibiotika oder Harnstoff, wurden in der Sterilbank zum autoklavierten und wieder aufgekochten Medium dazufiltriert (Spritze mit Filteraufsatz, Porengröße 0,2 µm).

### 4.5b Herstellung von Reinkulturen

Die ausgestrichenen Proben entwickelten sich nach wenigen Tagen zu einer Vielzahl von verschiedenen Bakterienkulturen. Um Reinkulturen zu isolieren, wurden die einzelnen Stämme in der Sterilbank auf neue Petrischalen überimpft. Der Vorgang wurde solange wiederholt, bis die Kulturen „rein“ waren.

### 4.5c Keimzahlbestimmung

Die Anzahl der kultivierbaren Einheiten pro Milliliter (Cultivable Units = CUs) wurden bestimmt, indem die Proben in 3 Verdünnungsstufen (1:20, 1:400 und 1:8000, mit sterilem Wasser) ausplattiert wurden. Nach zweitägiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die sichtbaren Kolonien ausgezählt. Da aus jeder ausgestrichenen Bakterienzelle eine Kolonie entstand, konnten die CUs pro Milliliter durch Multiplikation der ausplattierten Menge (50 - 100 µl) und der Verdünnung berechnet werden.



#### 4.5d Verwendete Nährmedien

Plate Count Agar und Thioglycolat Agar wurden verwendet, um kultivierbare Bakterien aus den Proben zu quantifizieren und Reinkulturen anzulegen. Beide Medien sind für viele aerobe Bakterien geeignet (Rezepte der Medien befinden sich im Anhang Kapitel 10.4).

Spezielle **Selektivmedien** wurden verwendet, um verschiedene Gruppen von Bakterien und deren Fähigkeiten in Proben nachzuweisen. Die Medien werden so angelegt, dass die nachzuweisende Gruppe ideale Wachstumsbedingungen hat (Nährstoffe, Luftverhältnisse, Temperatur, ect.). Typische Stoffwechselprozesse und chemische Reaktionen äußern sich in Änderungen des Mediums, z.B. Verfärbungen.

(Rezepte der Medien befinden sich im Anhang, Kapitel 10.5)

#### **Purpurbakterien**

Da Purpurbakterien anaerob leben und photosynthetisch aktiv sind, wurde das Flüssigmedium mit Paraffinöl überschichtet (Abbildung 61), um die Sauerstoffzufuhr auszuschalten, und die Kultur im Licht inkubiert. Als C-Quelle diente Bernsteinsäure, die von den meisten anderen Bakterien nicht verwertet wird. Waren in der Probe Purpurbakterien enthalten, die im Medium wachsen können, färbte es sich nach einigen Tagen rot (Abbildung 62).



**Abbildung 61:** Im oberen Teil des Mediums ist die Paraffinöl-Schicht deutlich zu erkennen



**Abbildung 62:** Charakteristische Rofärbung des Mediums

### Schwefelabspaltende Bakterien

Schwefelabspaltende Bakterien reduzieren die im Medium enthaltene Schwefelquelle (Cystin oder Methionin) und spalten vom Produkt Schwefelwasserstoff ( $\text{H}_2\text{S}$ ) ab. Dieses reagiert wiederum mit dreiwertigem Eisen zum schwarzen, unlöslichen  $\text{Fe}_2\text{S}_3$ . Die Bildung eines schwarzen Niederschlages konnte beobachtet werden (Abbildung 63-64).

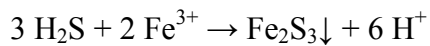
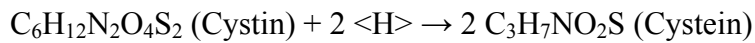


Abbildung 63: Leichte  $\text{Fe}_2\text{S}_3$  Bildung

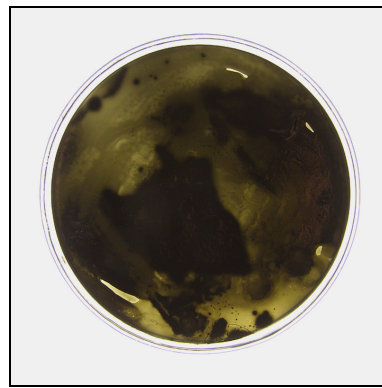


Abbildung 64: Charakteristischer schwarzer Niederschlag

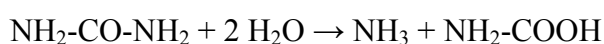
Obwohl der Test als sehr zuverlässig gilt, kommt es durch die hohe  $\text{Fe}^{3+}$  Konzentration im Medium zu einem Nachteil: nicht alle Bakterienstämme können unter diesen Bedingungen wachsen. (Hines et al., 2002)

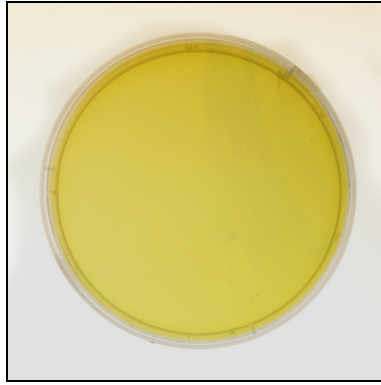
### Harnstoffspaltende Bakterien

In den Fallen karnivorer Pflanzen findet man häufig vielzellige Tiere. Sie nehmen mit ihrer Nahrung Stickstoff auf und scheiden diesen als Harnstoff oder Harnsäure wieder aus. Pflanzenzellen ist es nicht möglich, diese Abbauprodukte aufzunehmen.

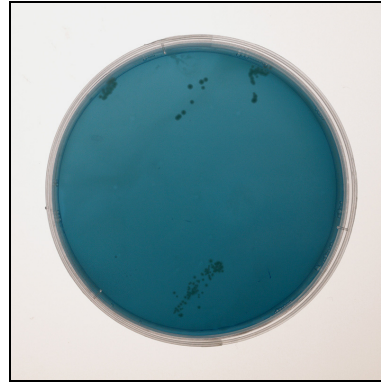
Mit diesem Test wird untersucht, ob in den Proben enthaltene Bakterien in der Lage sind Harnstoff in anorganische Stickstoffverbindungen umzusetzen.

Wird der dem Medium zugefügte Harnstoff ( $\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2$ ) gespalten, entsteht Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ). Der pH-Wert im Medium steigt daraufhin an, es wird basisch. Der ursprünglich grüne Indikator schlägt zu blau um (Abbildung 65-66).





**Abbildung 65: Medium mit Harnstoff und pH-Indikator**

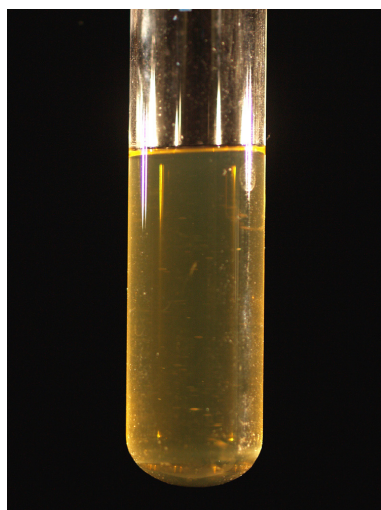


**Abbildung 66: Charakteristische Färbung unter Ammoniakbildung**

### **Proteinspaltende Bakterien**

Die Beute karnivorer Pflanzen dient laut Juniper et al. (1998) hauptsächlich zur Kompensation des fehlenden Stickstoffs. Proteine sind aus Aminosäuren aufgebaut und der enthaltene Stickstoff daher wesentlich. Um diesen aufnehmen zu können bilden karnivore Pflanzen entweder selbst Proteinasen (Hartmeyer, 1997, 1998; Meyers-Rice, 1998) oder nutzen jene, die von fallenbewohnenden Symbionten gebildet werden (Okahara, 1933).

Mit diesem Proteinase-Test kann nachgewiesen werden ob in Kannenflüssigkeiten Proteinase bildende Mikroorganismen leben. Die Konsistenz des proteinreichen Gelatine-Mediums ist nach der Herstellung fest (Abbildung 67). Zersetzen in der Probe enthaltene Bakterien Proteine, verflüssigt sich das Medium (Abbildung 68).



**Abbildung 67: Festes Medium**



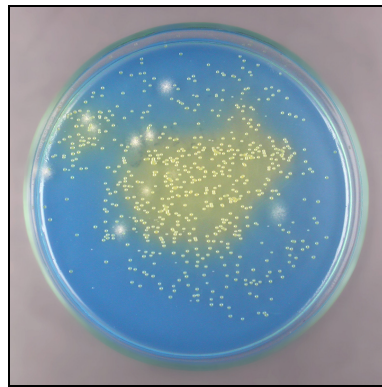
**Abbildung 68: Im oberen Teil des Mediums ist der von Bakterien verflüssigte Teil zu erkennen**

### **Schwefeloxidierende Bakterien**

Für Pflanzen ist Sulfid keine nutzbare Schwefelquelle (Schulze et al., 2002). Unter aeroben Bedingungen reagiert Sulfid jedoch langsam zu Sulfat. Diese Umwandlung kann von Bakterien auch wesentlich schneller durchgeführt werden (Caldwell et al., 1975).

Das Medium ist teilspezifisch, d.h. es können mehrere Bakteriengruppen darauf leben. Bei Kulturen, die Sulfid oder Thiosulfat zu Sulfat oxidieren können, kommt es im näheren Umkreis zum Absinken des pH-Wertes. Der Indikator färbt sich von blau zu gelb, wodurch ein gelber Hof um die nachzuweisenden Kulturen entsteht (Abbildung 69).

Die Tests wurden jeweils unter auto- und heterotrophen (Zusatz von Natriumacetat) Bedingungen durchgeführt.



**Abbildung 69: Positiver Test auf schwefeloxidierende Bakterien (Foto: Wolfram Adlassnig)**

Für den Nachweis von Actinobakterien und Myxobakterien wurden spezielle Selektivmedien verwendet (Rezepte befinden sich im Anhang, Kapitel 10.6).

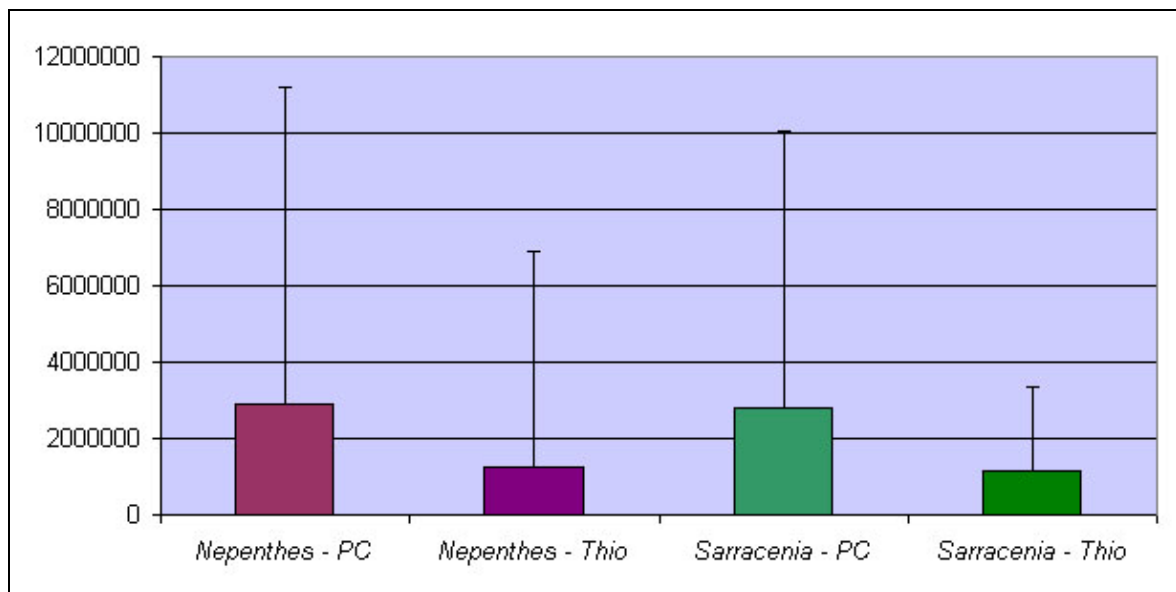
## **4.6 Statistik**

Die Statistiken wurden mit der Software SPSS 16.01 durchgeführt. Da alle Stichproben nicht normalverteilt waren, wurde der Mann-Whitney-Test zur Berechnung angewandt.

## 5. ERGEBNISSE

### 5.1 Keimzahlen

Um die Zahl der kultivierbaren Bakterien in der Kannenflüssigkeit zu bestimmen, wurden Proben ausplattiert und die nach 2 Tagen Inkubation entstandenen Kolonien gezählt (siehe Kapitel 4.5c). Dazu wurden jeweils zwei verschiedene Medien verwendet (PC- und Thioglycolat-Agar) um zu testen, ob eines der Medien bessere Ergebnisse erzielt (Grafik 8). Von jeder Pflanzenart wurden etwa 25 bis 30 Fallen auf beiden Medien untersucht.



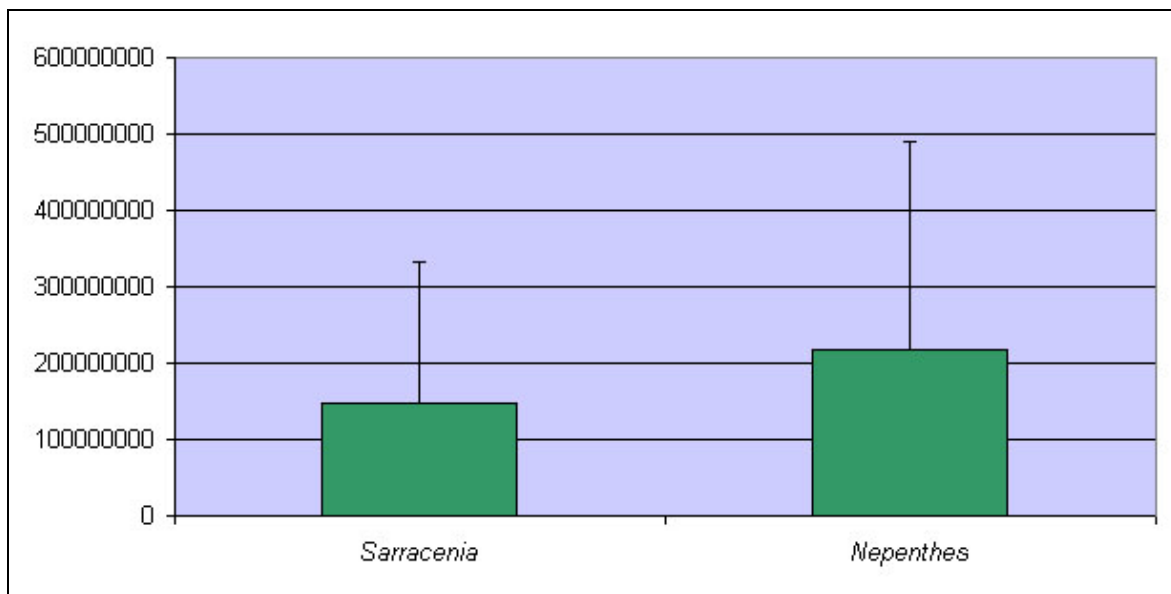
**Grafik 8: Ergebnisse der Keimzahlen-Bestimmung auf PC- und Thioglycolat-Agar, [Zellen pro Milliliter]**

Bei *Sarracenia* ist in der Wachstumsquote zwischen den beiden Nährmedien kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Die Bakterien wachsen auf beiden Medien gleich gut. Bei *Nepenthes* hingegen sprechen die Bakterien der Kannenflüssigkeit besser auf das PC Medium an. Ein signifikanter Unterschied ( $p < 5\%$ ) zwischen PC und Thio ist erkennbar. Die Ergebnisse verändern sich nicht, wenn man die Null-Werte (Platten auf denen nichts gewachsen ist) bei der Berechnung der Statistik vernachlässigt.

Die Standardabweichungen sind sehr hoch, da die einzelnen Fallen, je nach Alter und Beutefang, in ihrer Bakteriendichte extrem unterschiedlich sein können. Die Anzahl der

Bakterien schwankte bei *Sarracenia* zwischen 0 und 28.000.000, bei *Nepenthes* zwischen 0 und 34.880.000.

Da kultivierbare Bakterien meist nur einen kleinen Bruchteil der gesamten Vielfalt darstellen (Amann, 1995), wurden die absoluten Keimzahlen mittels **Quantifizierung mit DAPI** (siehe Kapitel 4.4a) ermittelt (Grafik 9). Es wurden jeweils 5 bis 7 Fallen jeder Pflanzenart ausgezählt.



**Grafik 9: Ergebnisse der absoluten Keimzahlen-Bestimmung, [Zellen pro Milliliter]**

Die Bakterienzahl schwankte bei *Sarracenia* zwischen 1 und 500 Millionen, bei *Nepenthes* zwischen 9 und 700 Millionen pro Milliliter. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Da nur wenige Werte ermittelt wurden kann es trotzdem sein, dass in den Fallen von *Nepenthes* im Durchschnitt mehr Bakterien pro Milliliter vorkommen.

Auch hier ist die Standardabweichung auf Grund der Individualität der einzelnen Fallen relativ hoch.

Durch die Bestimmung der absoluten Keimzahlen wurde deutlich, dass im Durchschnitt nur 1 - 2% der Bakterien auf nicht selektiven, mikrobiologischen Nährmedien kultivierbar sind. Es liegen hochsignifikante Unterschiede ( $p < 1\%$ ) bei der Bakterienzahl pro Milliliter zwischen der Kultivierung auf Medien und der absoluten Keimzahlbestimmung (Quantifizierung) vor.

## 5.2 Selektivmedien

Das Vorhandensein von verschiedenen Bakteriengruppen und deren Stoffwechselfähigkeiten wurde mit unterschiedlichen Selektivmedien getestet. Die durch typische chemische Reaktionen sichtbar gewordenen Stoffwechselprozesse konnten als positive oder negative Ergebnisse ausgewertet werden.

Es kann angenommen werden, dass die nachgewiesenen Bakteriengruppen Eigenschaften besitzen, die bei der Beuteverdauung der Pflanze eine Rolle spielen. Diese Bakterien können daher als Symbionten bzw. Mutualisten (siehe Kapitel 3.5) bezeichnet werden.

Folgende Übersichten (Tabelle 14) zeigen, welche bzw. wie viele Versuche durchgeführt wurden und wie viele Bakterien gewachsen sind:

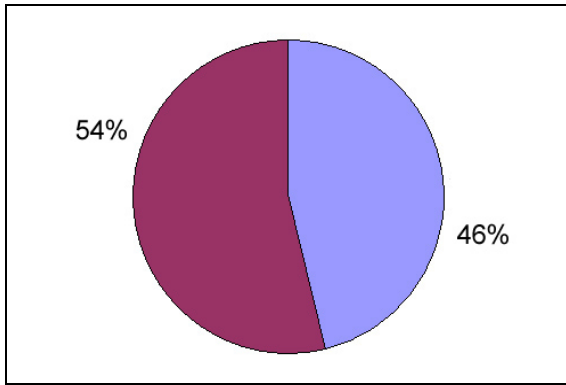
Selektivmedium	<i>Sarracenia</i>		<i>Nepenthes</i>	
	gesamt	davon positiv	gesamt	davon positiv
Harnstoffspalter	13	13 (100%)	5	5 (100%)
Proteinspalter	20	20 (100%)	20	19 (95%)
Purpurbakterien	20	12 (60%)	20	6 (30%)
Schwefeloxidierer autotroph	20	6 (30%)	20	2 (10%)
Schwefeloxidierer herterotroph	20	7 (35%)	20	1 (5%)
Schwefelspalter Cystin	13	3 (23%)	17	2 (12%)
Schwefelspalter Methionin	13	3 (23%)	17	2 (12%)

**Tabelle 14: Testdurchläufe und Ergebnisse mit prozentuellen Anteilen der Selektivmedien**

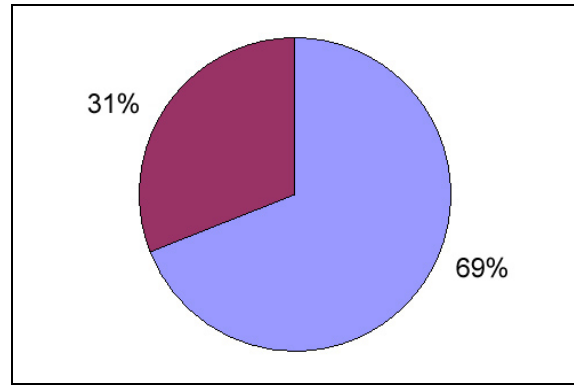
Auf Grund von Mangel an beprobaren Fallen konnten von Schwefelspaltern und Harnstoffspaltern nur 13 statt 20 Durchgänge angesetzt werden.

Rechnet man die Ergebnisse aus Tabelle 1 in Prozent um, zeigt sich, dass bei *Sarracenia* 54% aller Testdurchläufe positiv ausfielen, bei *Nepenthes* hingegen nur 31% (Grafik 10, Grafik 11).

Aus diesen Daten wird sichtbar, dass in den Fallen von *Sarracenia* deutlich mehr mögliche Symbionten nachgewiesen wurden als in jenen von *Nepenthes*.



**Grafik 10: *Sarracenia purpurea*, 54% der Bakterien sind mögliche Symbionten.**



**Grafik 11: *Nepenthes x ventrata*, nur 31% der Bakterien sind mögliche Symbionten**

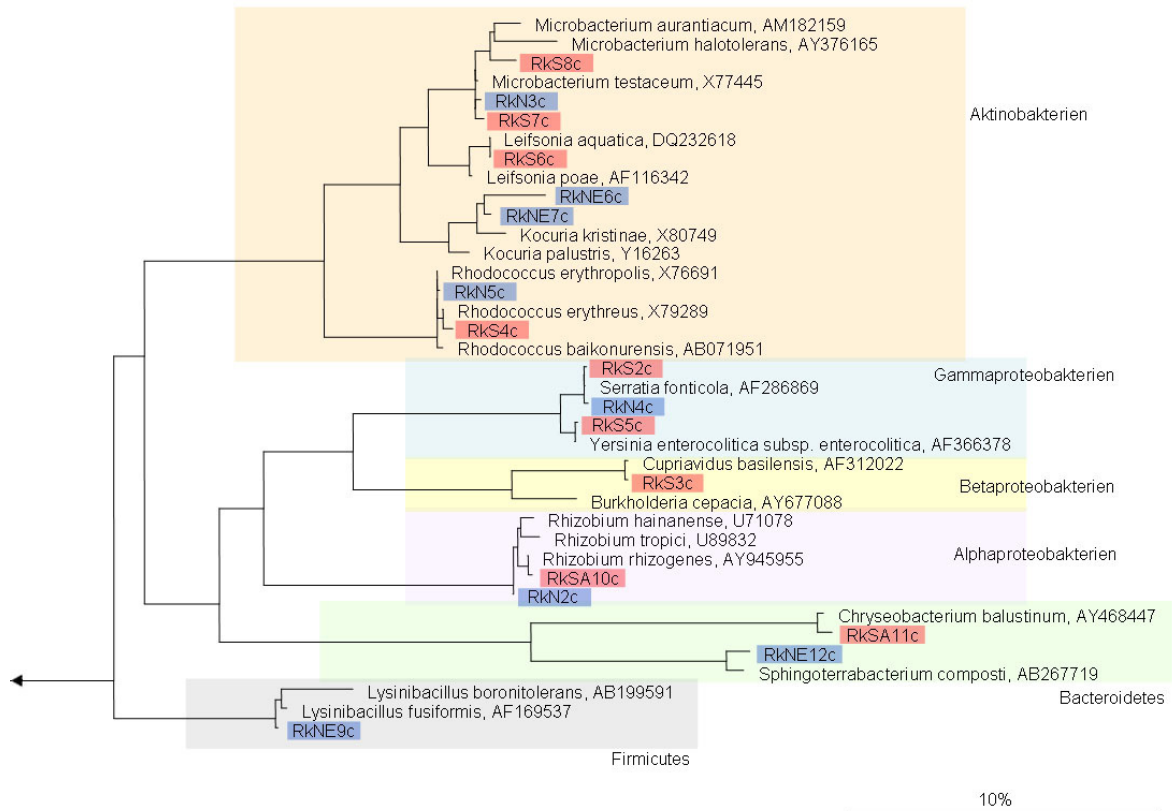
## 5.3 Reinkulturen

### Phylogenetische Analyse

Aus den den Pflanzen entnommenen Proben wurden Reinkulturen angelegt (siehe Kapitel 4.5b), deren DNA isoliert und direkt sequenziert. Zur Sequenzierung wurden Kulturen mit unterschiedlichem Habitus (Form und Farbe) ausgewählt. Die Teilsequenzen wurden im Baumberechnungsprogramm „Arb“ zusammengesetzt und in einen allgemeinen Stammbaum eingerechnet (siehe Kapitel 4.4b).

Folgender Stammbaum (Abbildung 70) zeigt die eingerechneten Reinkulturen (*Sarracenia* rot, *Nepenthes* blau) mit ihren nächsten Verwandten und ihrem Phylum.



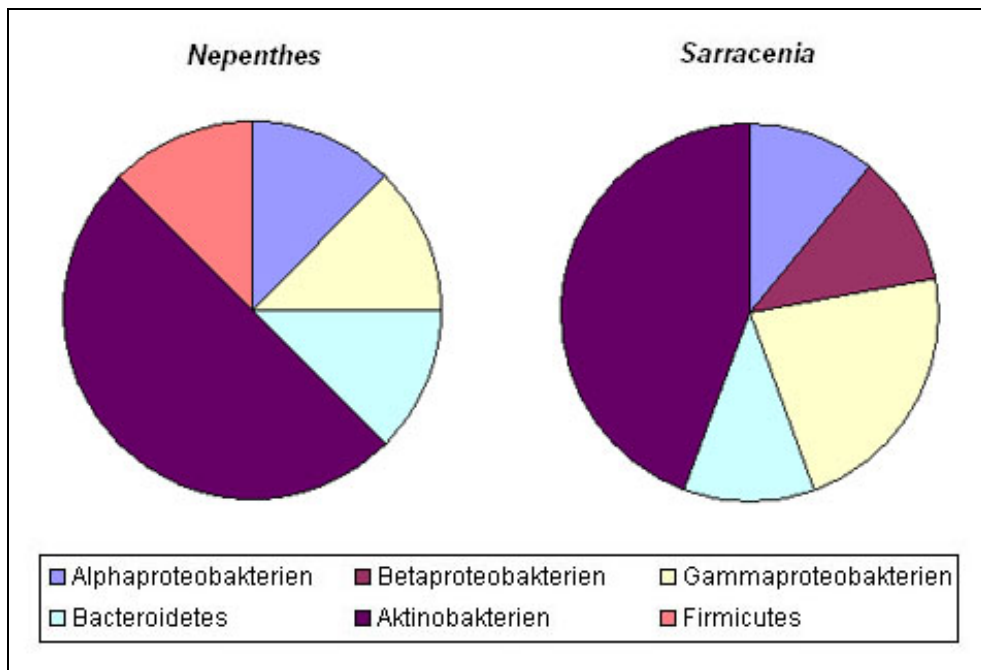


**Abbildung 70: Aus den Reinkulturen berechneter Stammbaum**

Folgende Zusammenstellungen (Tabelle 15, Grafik 12) der Ergebnisse zeigen die Daten in Zahlen bzw. Verhältnissen:

	$\Sigma$	<i>Nepenthes</i>	<i>Sarracenia</i>
<b>Alphaproteobakterien</b>	2	1	1
<b>Betaproteobakterien</b>	1	0	1
<b>Gammaproteobakterien</b>	3	1	2
<b>Bacteroidetes</b>	2	1	1
<b>Aktinobakterien</b>	8	4	4
<b>Firmicutes</b>	1	1	0
$\Sigma$	17	8	9

**Tabelle 15: Ergebnisse des Stammbaumes in tabellarischer Form**



Grafik 12: Bakterienanteile der Reinkulturen

**Aktinobakterien** kamen im Gegensatz zu den anderen Bakteriengruppen in beiden Pflanzen wesentlich häufiger vor. Folgende Abbildungen zeigen Mikroskopie- und Makroaufnahmen dieser Bakterien:

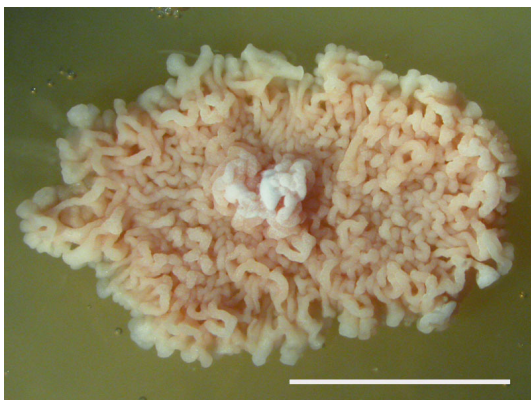


Abbildung 71: Aktinobakterienkultur;  
Markierung ~ 1 cm

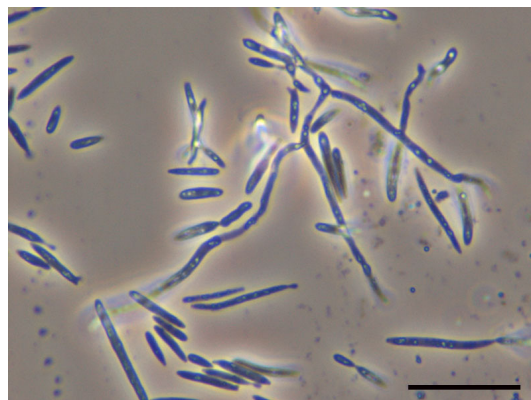
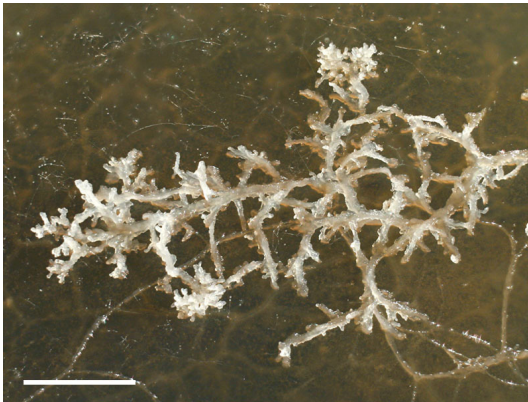


Abbildung 72: Aktinobakterien im Hellfeld;  
Markierung ~ 20 µm

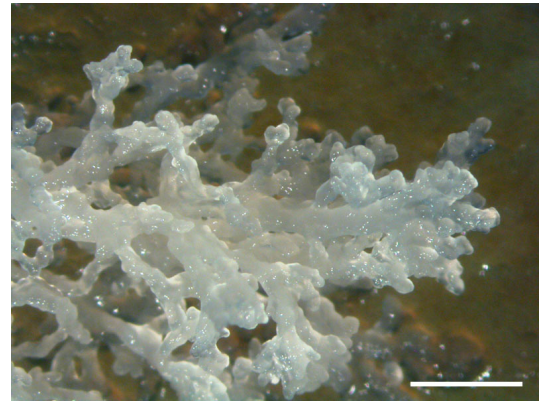
### Myxobakterien

Mit Hilfe eines speziellen Nährmediums sollte festgestellt werden, ob Myxobakterien (Deltaproteobakterien) in den Fallen zu finden sind. Es wurden 5 Proben von jeder Pflanze

ausplattiert. Kolonien von Myxobakterien konnten nur in *Sarracenia* Fallen nachgewiesen werden (Abbildung 73-74).



**Abbildung 73: Myxobakterien-Kolonie; Markierung ~ 5 mm**



**Abbildung 74: Ausschnitt einer Myxobakterien Kolonie; Markierung ~ 0,5 mm**

## 5.4 16SrRNA Ansatz

Die zusammengesetzten 16S rRNA Vollsequenzen wurden in einen allgemeinen bakteriellen Stammbaum eingerechnet (Abbildung 75). Bei *Nepenthes* wurde mit 25 Klonen gearbeitet, bei *Sarracenia* nur mit 19, da einige Klone auf Grund von Kontaminationen und Chimären nicht verwendet werden konnten.

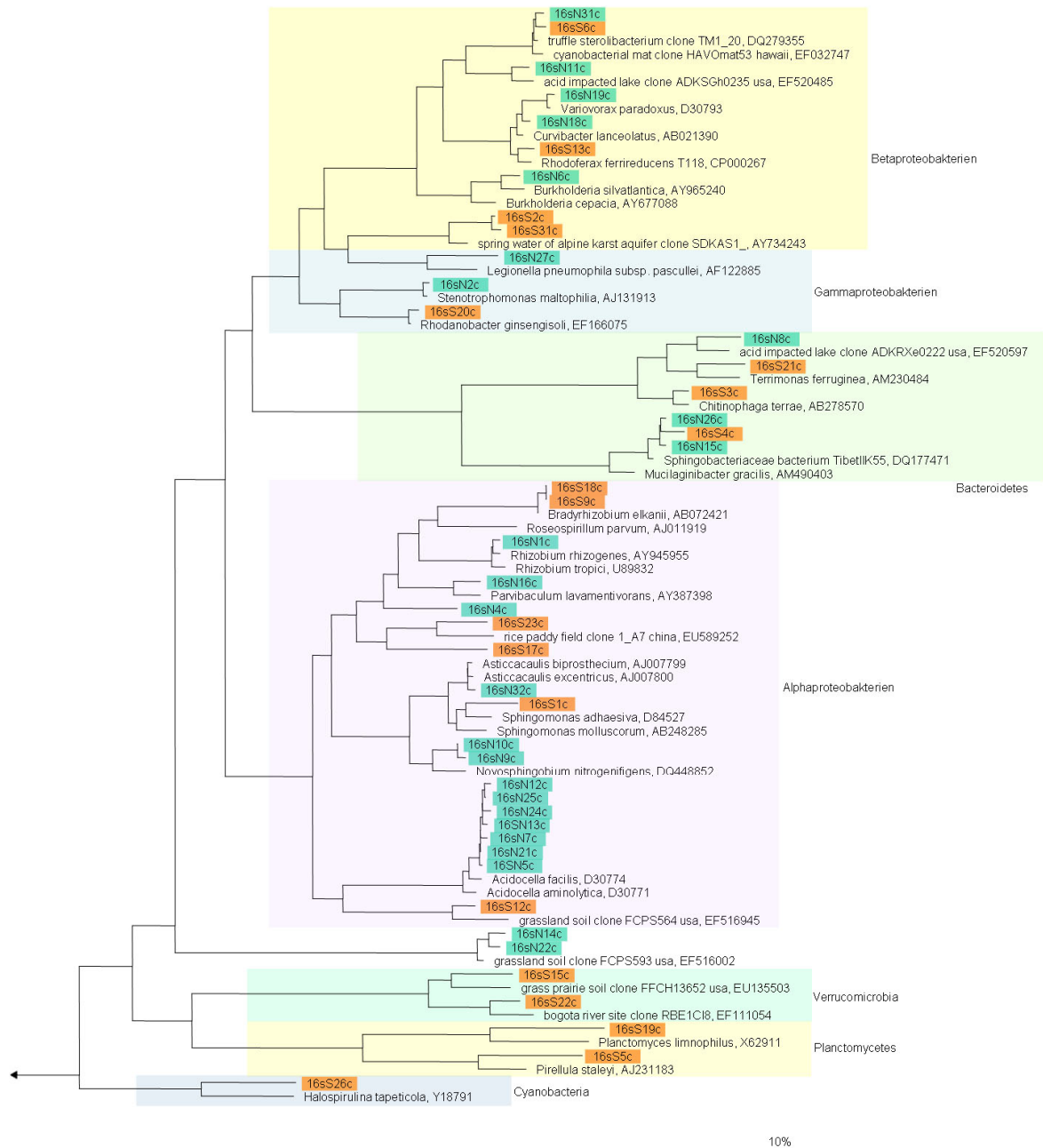
### *Nepenthes*

In der Kannenflüssigkeit von *Nepenthes* wurden insgesamt zwei verschiedene Phyla nachgewiesen: Proteobakterien und Bacteroidetes. Des Weiteren liegen noch zwei Klone vor, die im Stammbaum weit weg von allen anderen Gruppen liegen bzw. nirgendwo eingerechnet werden konnten. Ihre nächsten Verwandten sind ebenfalls weitgehend unbekannte Klone aus diversen Umweltproben.

Einen Großteil der nachgewiesenen Bakterien stellen Proteobakterien dar. 20 von 25 Klonen, was etwa 80% entspricht, konnten diesem Phylum zugeordnet werden. Auffallend ist, daß *Acidocella sp.* (Alphaproteobakterien) sieben Mal nachgewiesen wurde und somit etwa 28% der Klone ausmacht. Diese Gattung scheint relativ häufig in den Kannen vorzukommen.

## *Sarracenia*

In den Proben aus *Sarracenia* konnten fünf verschiedene Phyla nachgewiesen werden: Proteobakterien, Bacteroidetes, Verrucomicrobia, Planctomyces und Cyanobacteria. Einen großen Teil davon machen hier, wie auch in *Nepenthes*, die Proteobakterien aus: 11 von 19 Klonen, was etwa 58% entspricht.

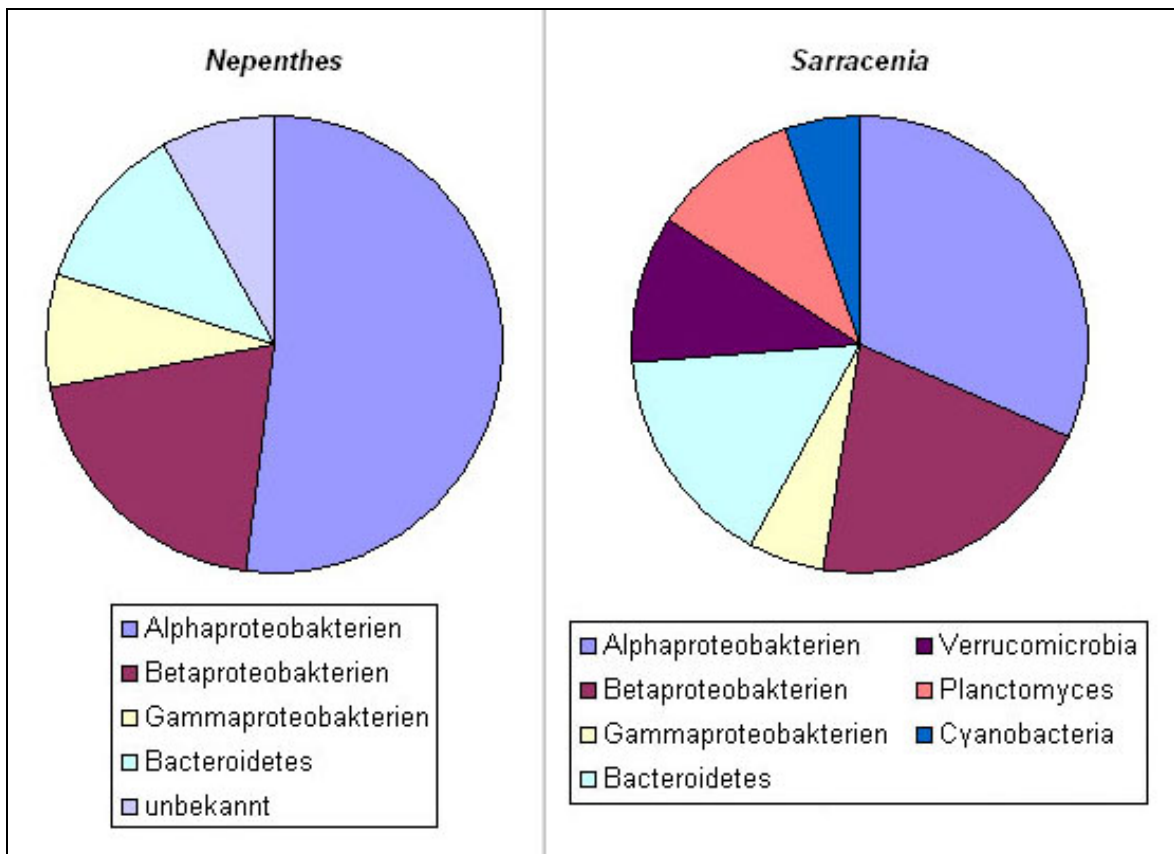


**Abbildung 75: Aus den 16S rRNA Sequenzen berechneter Stammbaum**

Folgende Zusammenstellungen (Tabelle 16 und Grafik 13) der Ergebnisse zeigen die Daten des Stammbaumes in Zahlen und prozentuellen Verhältnissen:

	$\Sigma$	<i>Nepenthes</i>	<i>Sarracenia</i>
<b>Alphaproteobakterien</b>	19	13	6
<b>Betaproteobakterien</b>	9	5	4
<b>Gammaproteobakterien</b>	3	2	1
<b>Bacteroidetes</b>	6	3	3
<b>Verrucomicrobia</b>	2	0	2
<b>Planctomycetes</b>	2	0	2
<b>Cyanobacteria</b>	1	0	1
<b>unbekannt</b>	2	2	0
$\Sigma$	44	25	19

Tabelle 16: Bakterienanzahl der nachgewiesenen Bakterien in Phyla und Klassen



Grafik 13: Prozentuelle Anteile der Phyla und Klassen der 16S rRNA Klone



## 5.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die den Pflanzen entnommenen Proben wurden fixiert und mittels fluoreszenzmarkierten Nukleotidsonden auf Proteobakterien, Aktinobakterien, Planctomyces und den Anteil an gram<sup>+</sup> bzw. gram<sup>-</sup> Bakterien untersucht. Jeweils 5 Proben von verschiedenen *Sarracenia purpurea* und *Nepenthes x ventrata* Fallen wurden analysiert. Es wurde mit 8 Sonden und 2 verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, Fluos (grün) und Cy3 (rot), gearbeitet. (siehe Kapitel 4.4b, 5)

### Nachweis der Phyla

Die Fluos markierte EUB mix Sonde wurde als allgemeiner Bakterienmarker verwendet, während die Cy3 (rot) markierten Sonden für die jeweiligen Phyla und Klassen eingesetzt wurden. Die Mischfarbe gelb bedeutet, daß beide Sonden (grün und rot) gebunden haben.

Proteobakterien konnten in den Fallen beider Pflanzenarten nachgewiesen werden, wobei sie meistens sehr häufig zu finden waren. Bei *Sarracenia* konnten Proteobakterien in drei von fünf Fallen, bei *Nepenthes* in zwei von fünf Fallen nachgewiesen werden. In den anderen Proben war die Autofluoreszenz teilweise sehr hoch, weswegen sie dort nicht sichtbar gewesen sein könnten. (Abbildung 76-79)

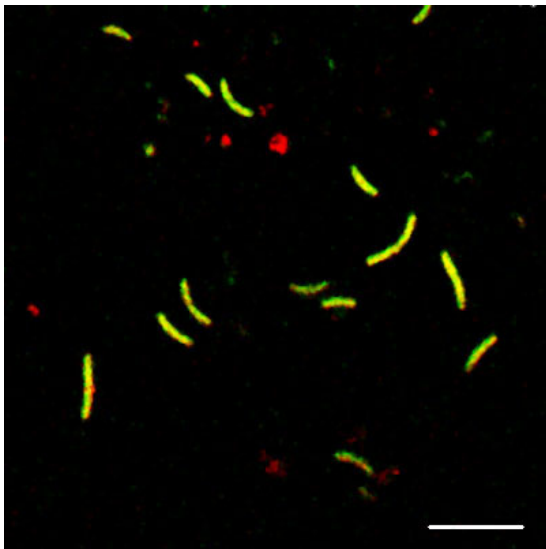


Abbildung 76: Proteobakterien (gelb) in *Nepenthes*, FISH; Balken ~ 10 µm

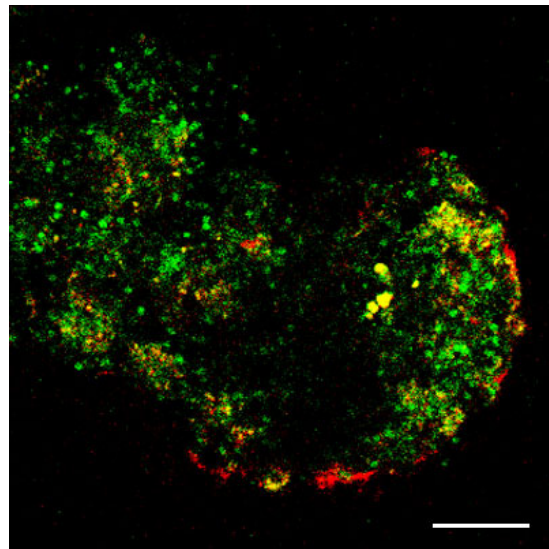


Abbildung 77: Proteobakterien (gelb) in *Sarracenia*, FISH; Balken ~ 20 µm

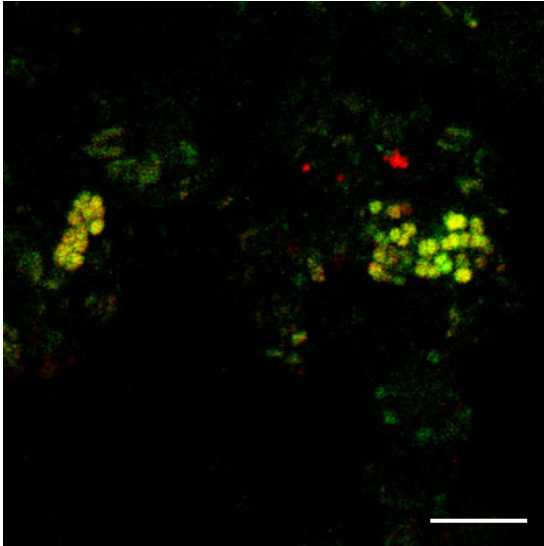


Abbildung 78: Proteobakterien (gelb) in *Sarracenia*, FISH; Balken ~ 10  $\mu\text{m}$

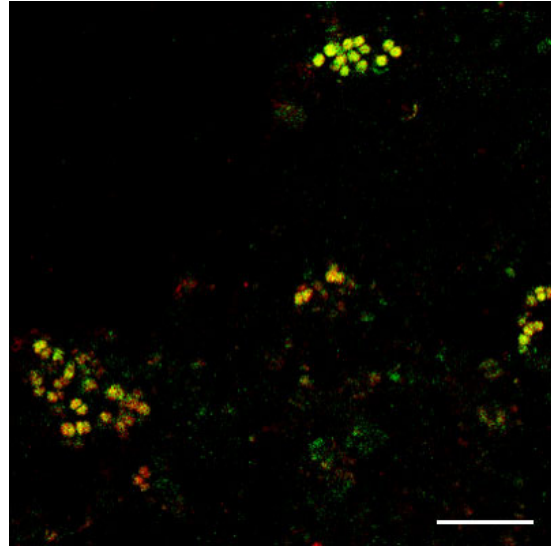


Abbildung 79: Proteobakterien (gelb) in *Sarracenia*, FISH; Balken ~ 12  $\mu\text{m}$

Planctomyces kommen ebenfalls in beiden Pflanzenarten vor, konnten aber nur äußerst vereinzelt gefunden werden. Aktinobakterien hingegen konnten mittels FISH gar nicht nachgewiesen werden. (Abbildung 80)

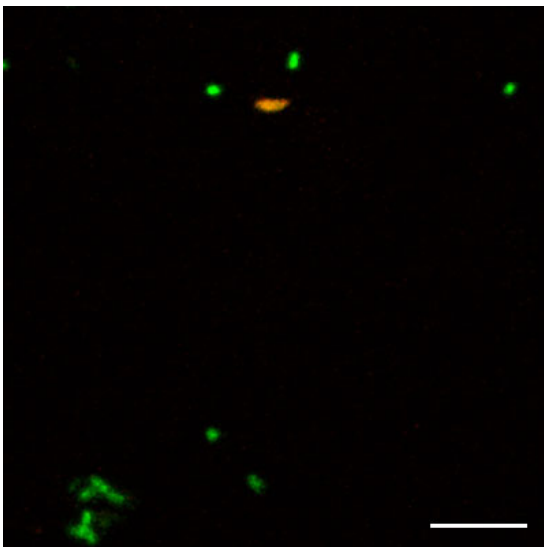


Abbildung 80: Doppelte Sondenbindung (gelb) im mittleren, oberen Bildrand, FISH; Balken ~ 7  $\mu\text{m}$

## Grampositive Bakterien

Die Versuche mit grampositiven und gramnegativen Bakterien wurden mit einem allgemeinen Marker und zwei Cy3-markierten Sonden durchgeführt. Diese decken einen Großteil der grampositiven Bakterien, Aktinobakterien und Firmicutes, ab. Die Doppelbindung der allgemeinen Bakteriensonde (grün) und der Sonde für grampositive Bakterien (rot), ergibt bei grampositiven die Mischfarbe gelb.

In keiner der fünf Proben von *Sarracenia purpurea* konnten grampositive Bakterien nachgewiesen werden. (Abbildung 81-82)

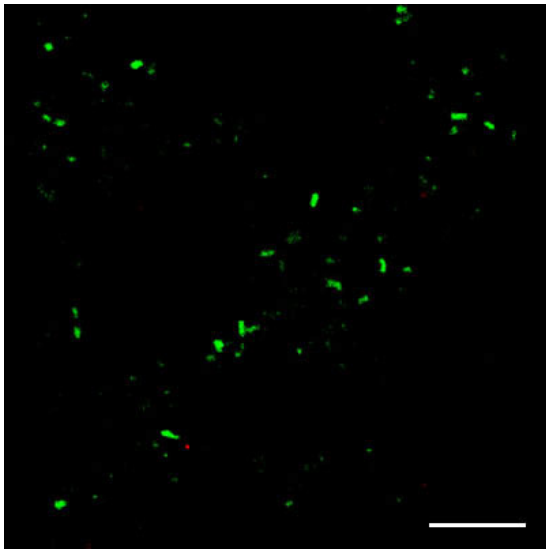


Abbildung 81: *Sarracenia*, es sind nur Sonden-signale der allgemeinen Sonde zu sehen (grün), FISH; Balken ~ 10  $\mu\text{m}$

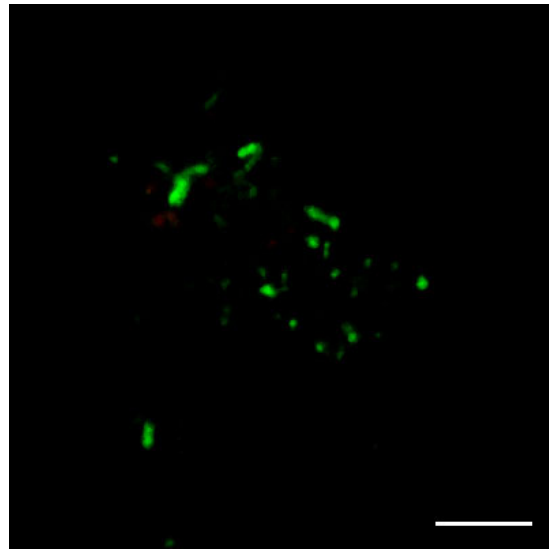


Abbildung 82: *Sarracenia*, es sind nur Sonden-signale der allgemeinen Sonde zu sehen (grün), FISH; Balken ~ 7  $\mu\text{m}$

In den Proben von *Nepenthes x ventrata* waren grampositive Bakterien häufiger vertreten. Sie wurden in drei von fünf Proben gefunden. In den anderen zwei Proben war die Autofluoreszenz sehr hoch bzw. waren nur sichelförmige Algen zu sehen, weswegen die Signale nicht zu finden gewesen sein könnten. (Abbildung 83-84)



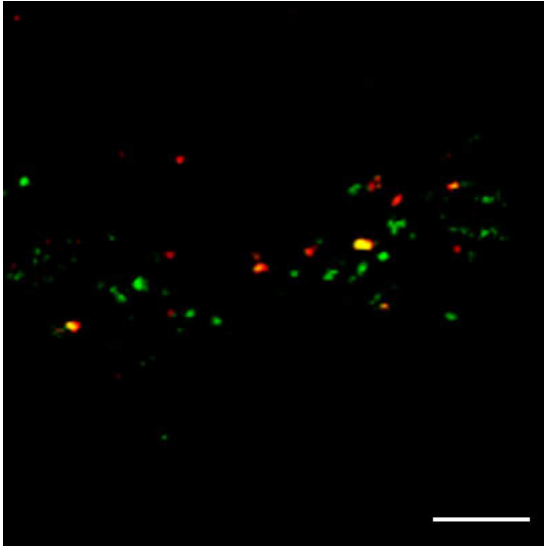


Abbildung 83: Grampositive Bakterien (gelb) in *Nepenthes*, FISH; Balken ~ 20 µm

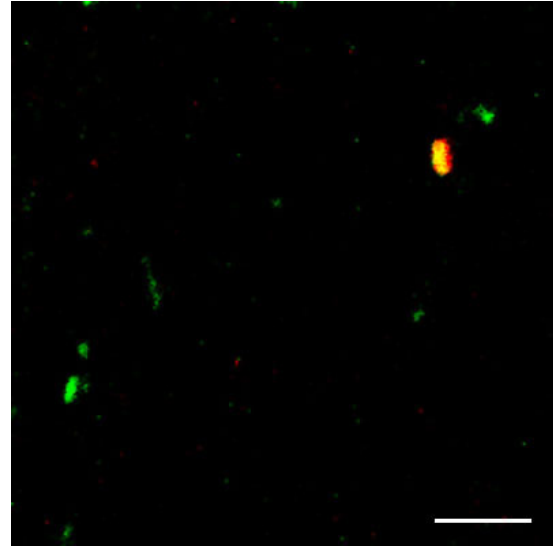


Abbildung 84: Grampositive Bakterien (gelb) in *Nepenthes*, FISH; Balken ~ 5 µm

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß Proteobakterien und Planctomyces in den Fällen beider Pflanzenarten vorkommen. Aktinobakterien hingegen konnten in keiner der Proben nachgewiesen werden. Grampositive Bakterien wurden nur in den Fällen von *Nepenthes* gefunden.

Folgende Tabelle (Tabelle 17) zeigt die Häufigkeiten der nachgewiesenen Bakterien.

nachgewiesene Bakterien	<i>Nepenthes</i>	<i>Sarracenia</i>
Proteobakterien	+	+
Planctomyces	+/-	+/-
Aktinobakterien	-	-
Grampositive	+	-

Tabelle 17: Häufigkeiten der mit FISH nachgewiesenen Bakteriengruppen (+ häufig, +/- selten, - nicht nachweisbar)

## 5.6 Geschlossene *Nepenthes*-Falle

Um festzustellen, ob und welche Organismen in jungen, geschlossenen Fallen vorkommen, wurden folgende Versuche durchgeführt.

### Keimzahlbestimmungen

Um die Anzahl der kultivierbaren Bakterien in der Kannenflüssigkeit zu bestimmen, wurde die Probe ausplattiert und die entstandenen Kolonien gezählt (siehe Kapitel 4.5c). Das Wachstum der Kolonien war wesentlich langsamer als das der Bakterien von offenen, älteren Fallen. Nach 2 Tagen Inkubation waren noch keine Kolonien sichtbar, nach 3 Tagen einige wenige, deshalb wurde letztendlich nach 6 Tagen ausgezählt (Abbildung 85). Bei der absoluten Keimzahlbestimmung, der Quantifizierung mit DAPI, wurden in einer Falle 711.772 Zellen pro Milliliter bestimmt.

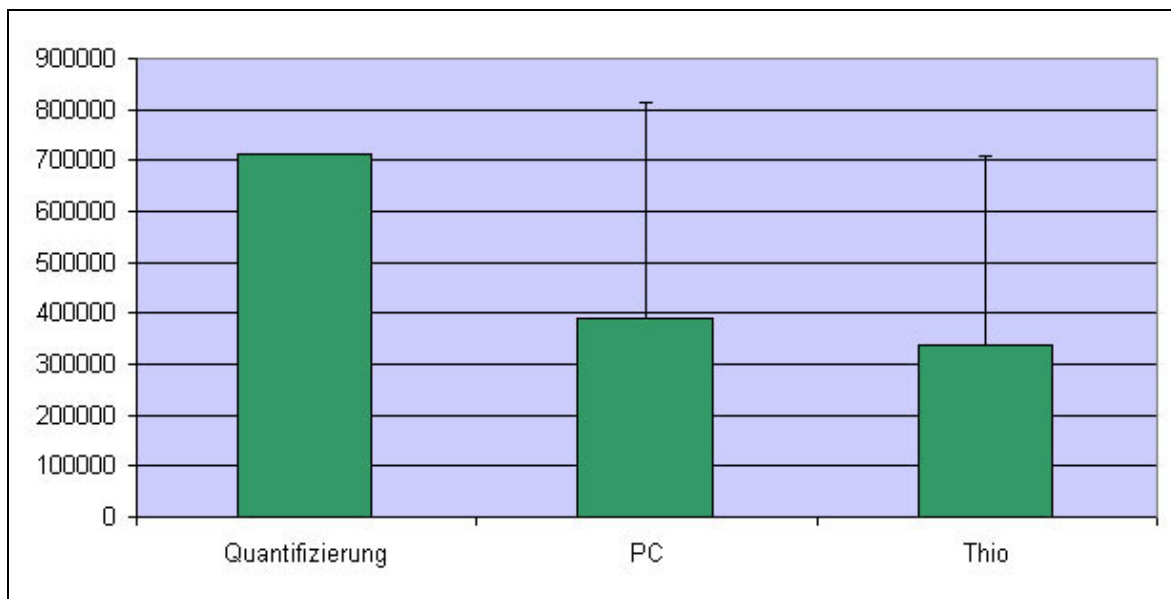


Abbildung 85: Bestimmung der Keimzahlen, [Zellen pro Milliliter]

### **Phylogenetische Analyse**

Aus der Probe wurden Reinkulturen angelegt (siehe Kapitel 4.5b), deren DNA isoliert und direkt sequenziert. Die Teilsequenzen wurden im Baumberechnungsprogramm „Arb“ zusammengesetzt und in einen allgemeinen Stammbaum eingerechnet (siehe Kapitel 4.4b).

Es wurden *Agrococcus* (Aktinobakterien, nächster Verwandter *Agrococcus jenensis*) und *Lysinibacillus* (Firmicutes, nächster Verwandter *Lysinibacillus boronitolerans*) nachgewiesen.

Die Ergebnisse aller drei Methoden widerlegen jene Studien, in der geschlossene Fallen lange als steril galten und bestätigen Ergebnisse von Sota (1998) und Mayer (2005). Sie stellten fest, dass die jungen Fallen sehr bakterienarm, aber nicht steril sind.



## Teil 2

### Pilze, Algen & Fallenchemismus



## 6. MATERIAL & METHODEN

### 6.1 Pflanzenmaterial

Die Versuche wurden mit den Arten *Sarracenia purpurea* und *Nepenthes x ventrata* durchgeführt.

Die Versuchspflanzen wurden in den Glashäusern der Universität Wien (Biozentrum) und der Bundesgärten Schönbrunn unter denselben Bedingungen kultiviert.

Die Probennahmen der Kannenflüssigkeit wurden mit sterilen Pipettenspitzen und sterilen Eppendorfcups oder anderen Behältnissen durchgeführt.

Von etlichen Fallen wurde zusätzlich der pH-Wert gemessen, um eventuelle Unterschiede der Verdauungsflüssigkeit untersuchen zu können.

### 6.2 Mikroskopische Methoden

#### 6.2a Lichtmikroskopische Methoden

Zur Untersuchung der Schimmelpilze, Pflanzen und deren Beute wurden verschiedene Techniken angewandt:

Mikroskopische Untersuchungen zur Bestimmung der Schimmelpilze und von pflanzlichen Drüsen wurden mit dem Forschungsmikroskop Olympus BX-41 durchgeführt.

Weiters kam ein Nikon SMZU Stereomikroskop mit Tritubus zum Einsatz.

Der Farbstoff Methylenblau ( $C_{16}H_{18}N_3SCl$ ) wurde eingesetzt, um die meistens sehr hellen und somit unter dem Mikroskop schwer erkennbaren Pilzhyphen und Sporen einzufärben. Dazu wurde eine 1:1000 verdünnte Methylenlösung hergestellt und auf die Präparate getropft. Der Farbstoff wurde nicht ausgewaschen.

## 6.2b Elektronenmikroskopische Methoden

Die Fixierung/Präparation der Proben wurde wie folgt durchgeführt:

Die Pflanzenteile wurden vor der Fixierung mit einer Saugflasche entlüftet.

- Fixierung

Als Fixierlösung diente pro Ansatz eine Mischung aus 1 ml Glutaraldehyd (25 %), 2,5 ml Formaldehyd (37 %), 1 ml Cadodylat-Puffer (pH 7) und 5,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>. Fixiert wurde in 10 ml Schnappdeckelgläsern mindestens 4 Stunden lang. Die Proben wurden anschließend 1x im Puffer gewaschen, danach 3x je 5 min in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>.

- Entwässerung

Die Proben wurden 30 min in eine Lösung aus Dimethoxypropan mit 1 Tropfen HCl (37 %) eingelegt, anschließend 30 min in reines DMP. Vom Glas abstrahlende Kälte zeigt, dass die Reaktion (DMP reagiert mit Wasser zu Aceton und Methanol) funktioniert. Anschließend wurden die Objekte 30 min in wasserfreies Aceton überführt. Bis zum Fortführen der Arbeit wurden die Proben in reinem Aceton gelagert.

- Kritisch-Punkt-Trocknung

Ein bis mehrere Probeobjekte wurden in ein kleines, verschließbares Sieb gegeben und dieses in die Druckkammer des „Balzers CPD 030 Critical Point Dryer“ gelegt. Das sich dort befindliche Aceton wurde gegen flüssiges CO<sub>2</sub> ausgetauscht und die Kammer danach auf 42° C erwärmt. Der Druck wurde auf etwa 100 bar gesteigert, bis der Kritische Punkt (31° C bei 71 bar für CO<sub>2</sub>) überschritten wurde. Das Kohlendioxid konnte nun über ein Ventil abgelassen und die getrockneten Objekte entnommen werden. Durch diese Technik wird das Kollabieren der Zellen während der Trocknung vermieden.

- Goldbedampfung

Die Objekte wurden mit doppelseitigem Klebeband auf den Stubs befestigt. Beim „besputtern“ werden die Proben mit einem hauchdünnen Goldfilm (60 - 80 nm) beschichtet (Abbildung 86). Gasmoleküle (Argon) lenken die Goldmoleküle auf dem Weg zur Anode ab, wodurch sich diese gleichmäßig auf der Probe festsetzen. Die Bedampfung wurde mit einem „Balzers Union FL-9496“ durchgeführt.



- Analyse im Rasterelektronenmikroskop (REM/SEM)

Die Stubs wurden einzeln in der Vakuumkammer des Mikroskopes befestigt und im Hochvakuum ausgewertet. Das verwendete Gerät war ein „JEOL–JSM–6390 Scanning Electron Microscope“ (Abbildung 87).

Für die Aufnahmen der Wachskristalle an der Innenwand der *Nepenthes*-Fallen wurde ein Stück der Fallenwand im Wärmeschrank bei 60°C einige Stunden getrocknet. Die Probe wurde danach direkt auf einen Stub geklebt und *besputtert*. Diese Präparation wurde durchgeführt, da die Gefriertrocknung die Kristalle aufgelöst hätte.



**Abbildung 86: Goldbeschichteter Stub mit aufgeklebter Probe**



**Abbildung 87: JEOL–JSM–6390 Raster Elektronenmikroskop**

### 6.3 Dokumentation

Zur Dokumentation der Pflanzen sowie für Makroaufnahmen von Pilzkulturen wurden digitale Spiegelreflexkameras Olympus E-330 und Canon EOS 400D mit Stativ und eine Olympus  $\mu$ 770 Digitalkamera freihändig verwendet.

Zur Dokumentation der Beobachtungen am Olympus Forschungsmikroskop wurde mit einer Mikroskop-Digitalkamera, ColorView von Soft Imaging Systems, gearbeitet.

Am Stereomikroskop kam die Kamera Nikon Coolpix 4500 zum Einsatz.

## 6.4 Kulturmethoden

### 6.4a Herstellung der Nährmedien

Die benötigten Mengen der Inhaltsstoffe wurden eingewogen, gemischt und, wenn im Rezept nicht anders angegeben, auf dem Magnetrührer aufgekocht. Im kalten bis lauwarmen Zustand wurde der pH-Wert mittels pH-Meter gemessen und gegebenenfalls mit 1 molarer NaOH oder HCl richtig eingestellt. Die Sterilisation der Medien erfolgte durch 30 minütiges Autoklavieren bei 121°C. Nach anschließendem wieder Verflüssigen auf der Magnetkochplatte wurden die Medien in der Sterilbank in Petrischalen gegossen und beimpft.

### 6.4b Herstellung von Reinkulturen

Die ausgestrichenen Proben bildeten nach wenigen Tagen einen mehr oder weniger dichten Schimmelrasen aus verschiedensten Arten. Um Reinkulturen zu isolieren, wurden in der Sterilbank Hyphen oder Sporen der einzelnen Pilze auf neue Petrischalen überimpft. Der Vorgang wurde solange wiederholt, bis die Kulturen „rein“ waren.

### 6.4c Verwendete Nährmedien

Für die Kultivierung, Züchtung von Reinkulturen und anschließende Bestimmung der Schimmelpilze wurden folgende Medien verwendet (Samson et al., 2004):

#### **Czapek Yeast Agar (CYA)**

NaNO<sub>3</sub> 3g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g

KCl 0,5g

MgSO<sub>4</sub> 0,5g

FeSO<sub>4</sub> 0,01g

Hefe Extrakt 5g

Saccharose 30g

Agar 20g

Dest. Wasser 1l

TMS 1ml (TMS: 100ml dest. Wasser, 1g ZnSO<sub>4</sub>, 0,5g CuSO<sub>4</sub>)

pH = 6 - 6,5

#### **Malt Extract Agar (MEA)**

Malzextrakt 20g

Pepton 1g

Glucose 20g

Agar 20g

Dest. Wasser 1l

pH = 5 - 5,5

Zur Kultivierung wurde ein weiteres Medium, nach Kimmig (1953), hergestellt:

#### **Kimmig Agar**

Pepton 15g

NaCl 1g

Glucose 10g

Agarose 15g

Glycerin 5ml

Dest. Wasser 1l

pH = 6,2

Nach dem Autoklavieren wurden in der Sterilbank 100mg/l Tetracyclin hinzufiltriert, um die Bildung von Bakterienkolonien zu verhindern.

Die Reinkulturen der Schimmelpilze wurden anhand des Bestimmungsschlüssels nach Samson (2004) bestimmt, der sich auf MEA- und CYA-Medien bezieht. Besondere Merkmale wie Farbe, Form, Konidien- und Sporenbildung wurden auf den beiden Nährböden untersucht und verglichen.

## 6.5 Fallenchemie und Statistik

Die pH-Werte der Fallenflüssigkeiten wurden mit dem pH-Meter „PH-201“ der Firma Lutron gemessen.

Die Statistiken wurden mit der Software SPSS 16.01 durchgeführt. Da alle Stichproben nicht normalverteilt waren, wurde der Mann-Whitney-Test zur Berechnung angewandt.

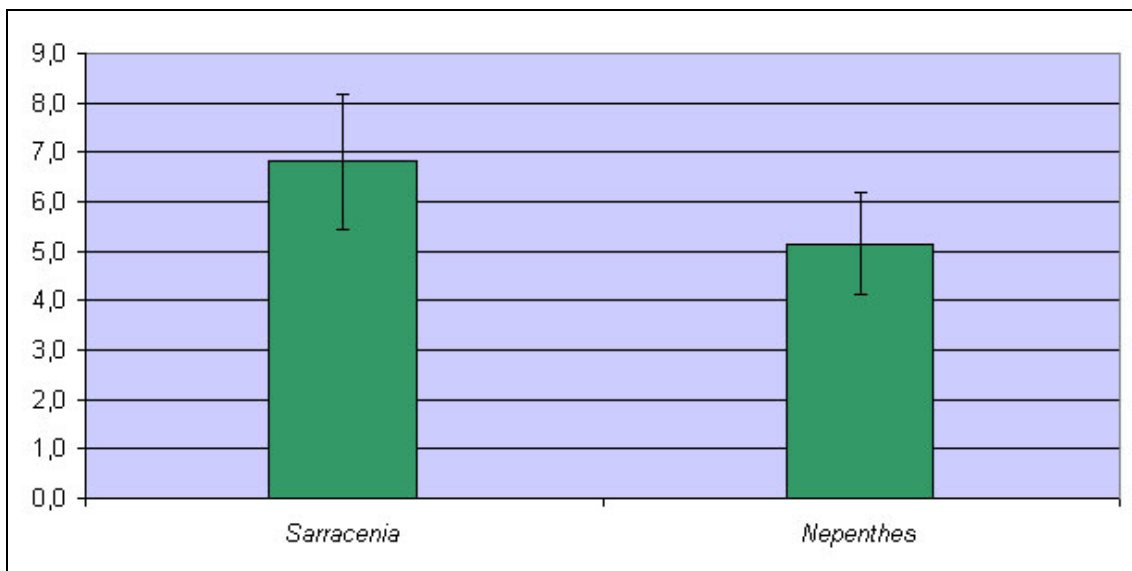


## 7. ERGEBNISSE

### 7.1 pH-Werte der Fallen

Die pH-Werte von etwa 30 Fallen jeder Pflanzenart wurden gemessen. Die Werte von *Sarracenia* sind durchschnittlich um 2 Stufen höher und damit eindeutig neutraler bzw. basischer als die von *Nepenthes* (Grafik 14). Dieser Unterschied ist hochsignifikant ( $p < 1\%$ ).

Die Einzelwerte schwankten bei *Sarracenia* von pH 4,25-9, bei *Nepenthes* hingegen von pH 2-7.



**Grafik 14: pH-Werte der untersuchten Fallen**

### 7.2 Bestimmung der Schimmelpilze

Um eventuelle Unterschiede in der Pilzflora der beiden Versuchspflanzen festzustellen, wurde folgende Untersuchung durchgeführt:

Die den Pflanzen entnommenen Proben wurden auf Nährmedien (siehe Kapitel 6.4c) kultiviert und vereinzelt, bis Reinkulturen verfügbar waren (siehe Kapitel 6.4b). Die Bestimmung erfolgte anhand morphologischer Merkmale der Kulturen und der Sporangien

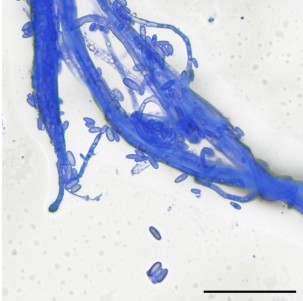
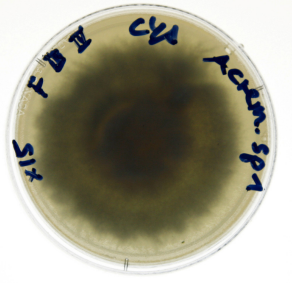
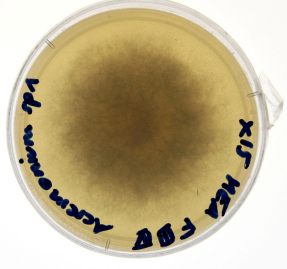
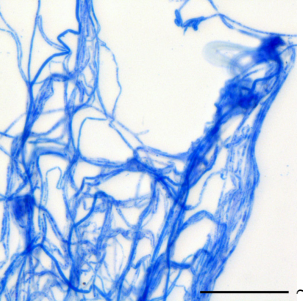
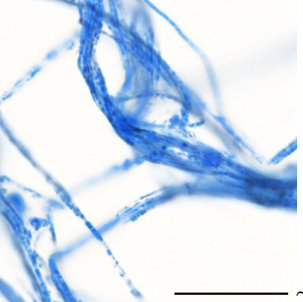
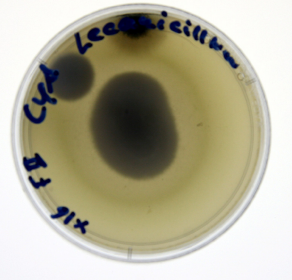

bzw. Sporen nach Samson (2004). In der Fallenflüssigkeit selbst wurden nie bestimmbare Pilze, sondern nur vegetative Myzelien gefunden.

In *Nepenthes* wurden 5 Arten gefunden, in *Sarracenia* 13. Die beiden Pflanzen beherbergen zur Gänze verschiedene Artenzusammensetzungen - keine Schimmelpilzart war in beiden Versuchspflanzen zu finden.

Folgende Tabellen zeigen die untersuchten Gattungen und Spezies anhand von Mikroskopie- und Kulturfotos auf verschiedenen Nährmedien (Tabelle 18, Tabelle 19):

Die Kolonien wurden bei Raumtemperatur, ca. 25°C, 8 bis 9 Tage lang inkubiert und anschließend fotografiert. Der Durchmesser der Petrischalen beträgt, wenn nicht anders angegeben, 5,5 cm. Die mit \* markierten Schalen haben einen Durchmesser von 9 cm. Die Balken der Mikroskopiefotos haben eine Länge von 50 µm, sind sie mit ~ markiert, 200 µm.

**Tabelle 18: Pilze in *Nepenthes x ventrata***

	Mikroskopie	CYA-Medium	MEA-Medium
<i>Acremonium sp.1</i>			
<i>Acremonium sp.2</i>			
<i>Lecanicillium sp.</i>			

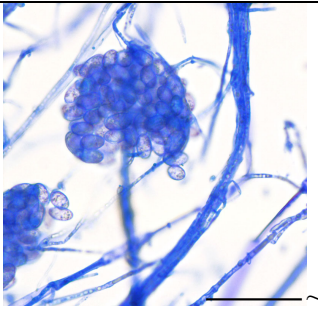
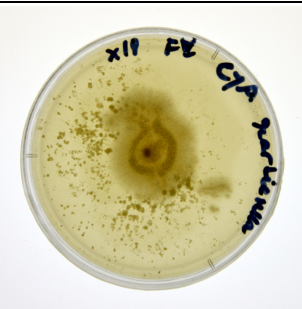

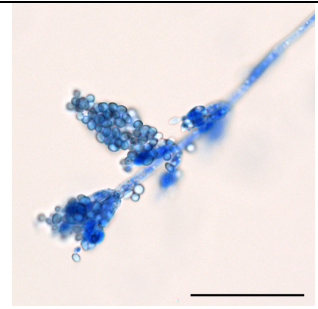

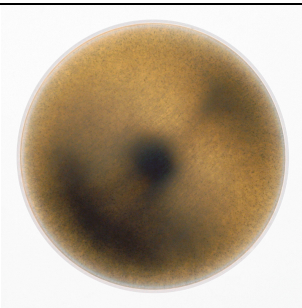
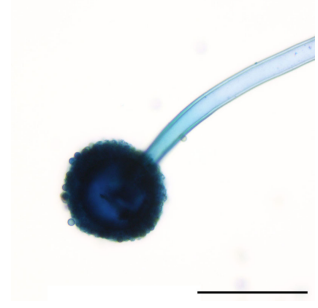
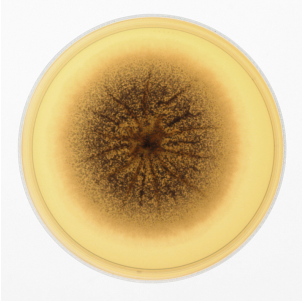
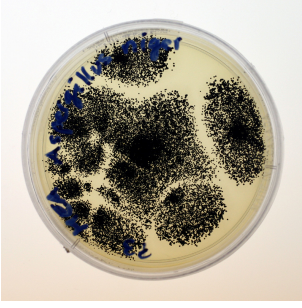
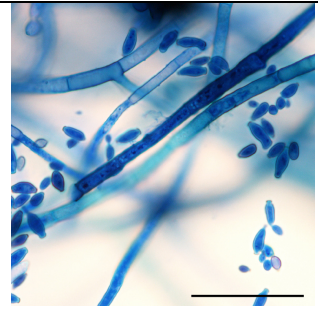
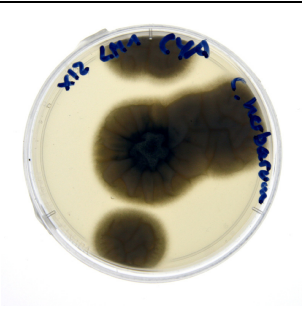
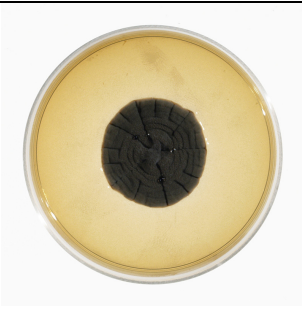

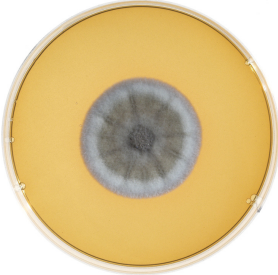
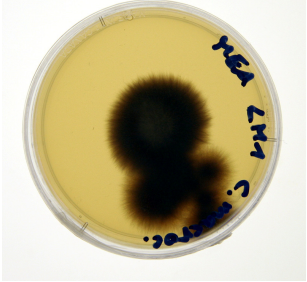
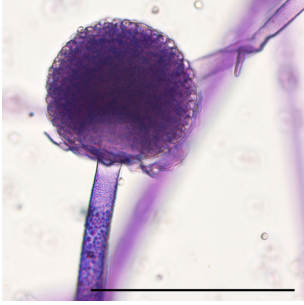


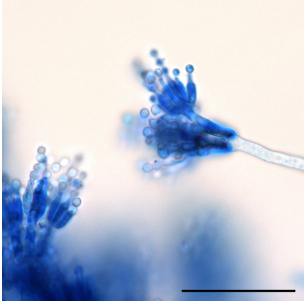

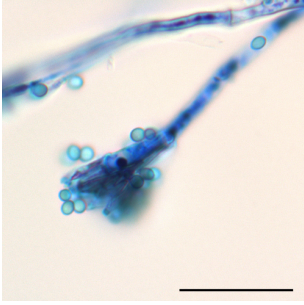

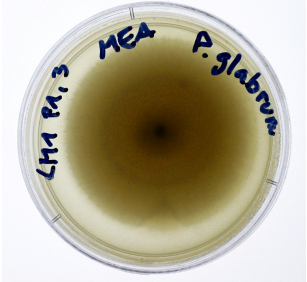
	Mikroskopie	CYA-Medium	MEA-Medium
<i>Mortierella</i> sp.			
<i>Penicillium</i> sp.			

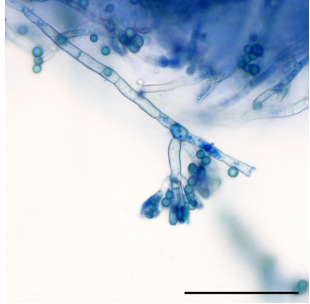
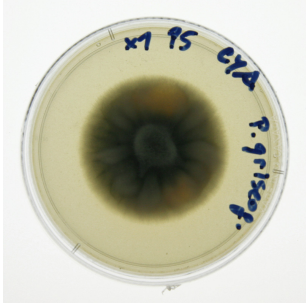
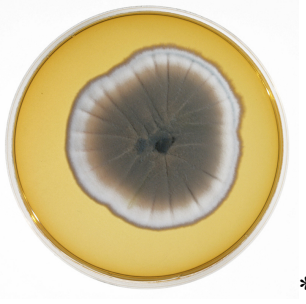
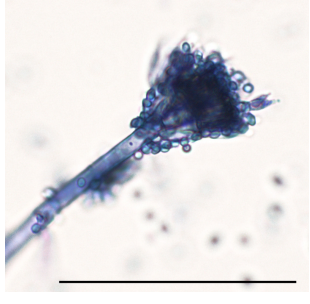
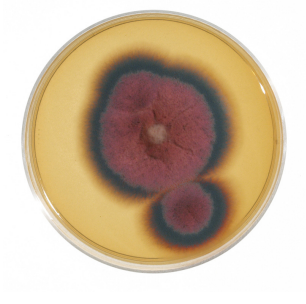
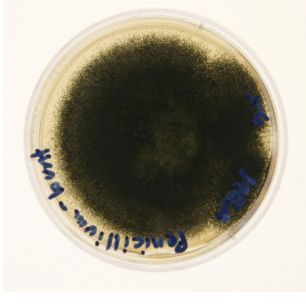
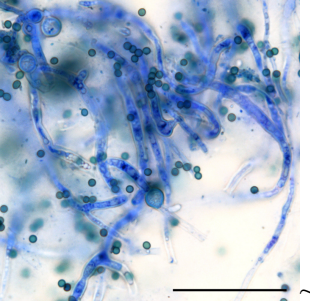
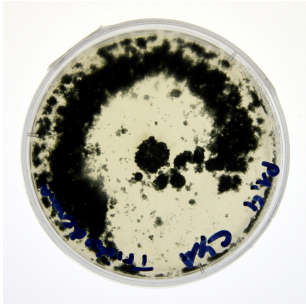
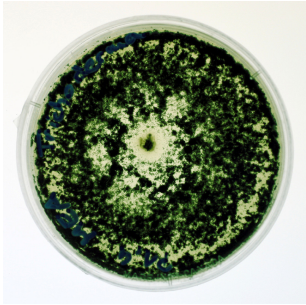
Tabelle 19: Pilze in *Sarracenia purpurea*

	Mikroskopie	CYA-Medium	MEA-Medium
<i>Absidia corymbifera</i>			
<i>Aspergillus niger</i>			
<i>Cladosporium herbarum</i>			



	Mikroskopie	CYA-Medium	MEA-Medium
<i>Cladosporium macrocarpum</i>		 *	 MEA 21.4 C. macroc.
<i>Cladosporium</i> sp.1	Keine Fotos verfügbar		
<i>Cladosporium</i> sp.2	Keine Fotos verfügbar		
<i>Mucor racemosus</i>			 Mucor racemosus P4 MEA
<i>Mucor</i> sp.	Keine Fotos verfügbar		
<i>Penicillium corylophilum</i>			
<i>Penicillium</i> cf. <i>glabrum</i>		 *	 MEA P. glabrum LM1 P1.3



	Mikroskopie	CYA-Medium	MEA-Medium
<i>Penicillium griseofolium</i>			
<i>Penicillium cf. variabile</i>			
<i>Trichoderma sp.</i>			

Hefen wurden in den Proben von *Nepenthes* wesentlich häufiger nachgewiesen als in jenen von *Sarracenia*.

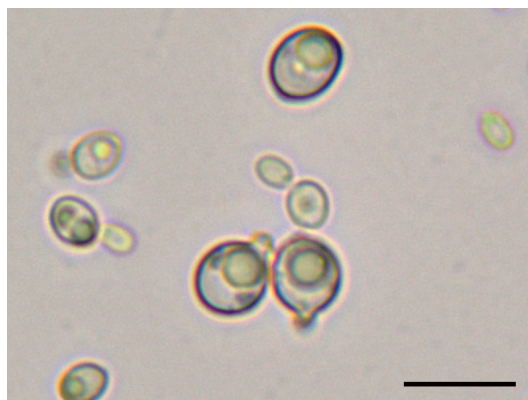
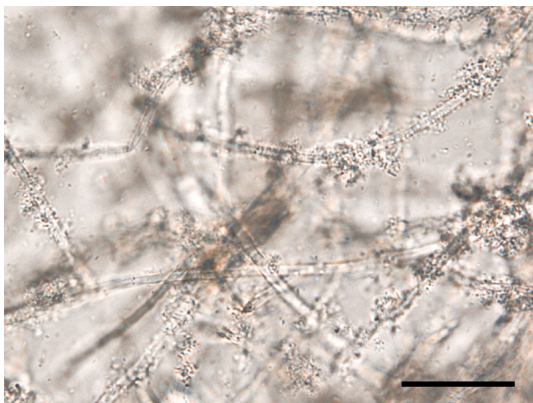


Abbildung 88: Reinkultur von Hefezellen, zum Teil knospend; Markierung ~ 10 µm

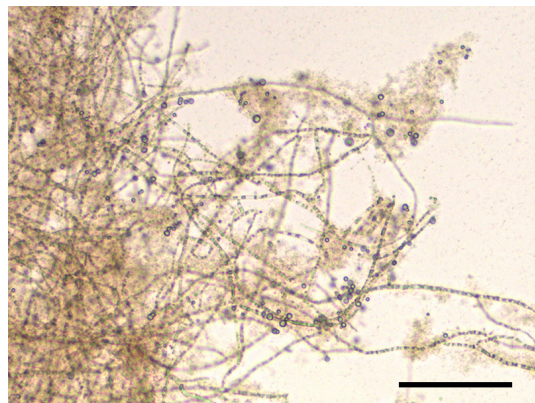
### 7.3 Myzel-Sporangien-Versuch

Nur selten sind Pilze in der Lage, unter Wasser Sporangien bzw. Sporen zu bilden und sich so zu verbreiten. Sporen, die in Gewässer gelangen, haben jedoch die Fähigkeit zu keimen, Pilzhyphen auszubilden und zu wachsen. (persönliche Mitteilung von Hermann Voglmayr)  
Ziel des folgenden Experiments war es, fallenbewohnende Schimmelpilze auf mögliche Sporenbildung in der Kannenfalle zu testen.

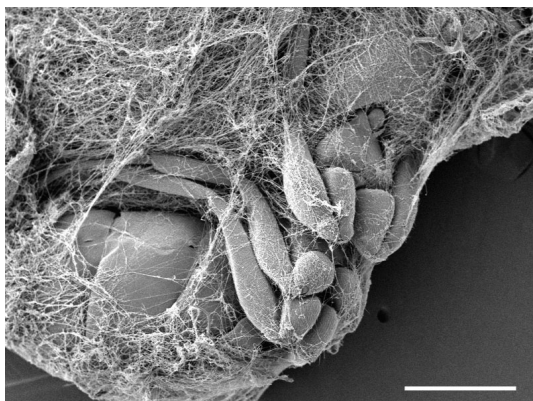
Zu Beginn wurden Flüssigkeitsproben aus mehreren Fallen entnommen und unter dem Mikroskop auf vorhandene Sporen untersucht. In den Proben waren weder Sporen noch Sporangien zu finden (Abbildung 89-90). Besonders häufig waren Pilzhyphen auf toten Beutetieren zu finden (Abbildung 91-94).



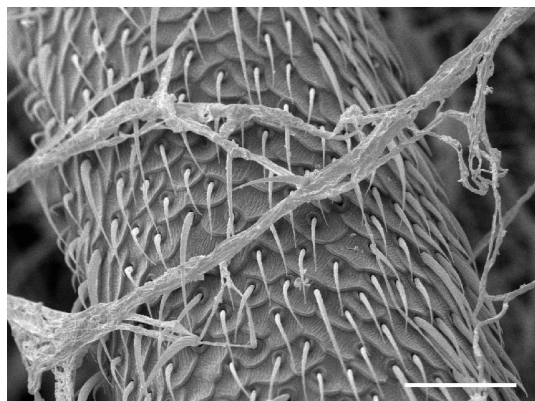
**Abbildung 89: Pilzhyphen und Bakterien;  
Markierung ~ 40 µm**



**Abbildung 90: Pilzhyphen und Bakterien;  
Markierung ~ 100 µm**

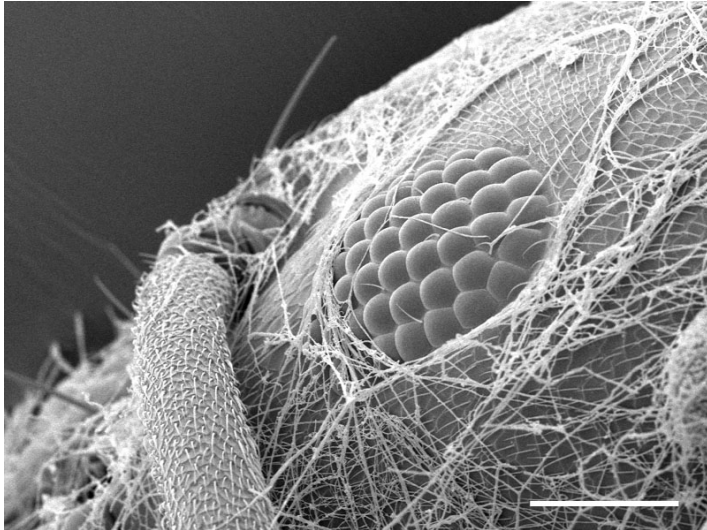


**Abbildung 91: Ameise, umwachsen von  
Pilzhyphen; REM, Markierung ~ 500 µm**

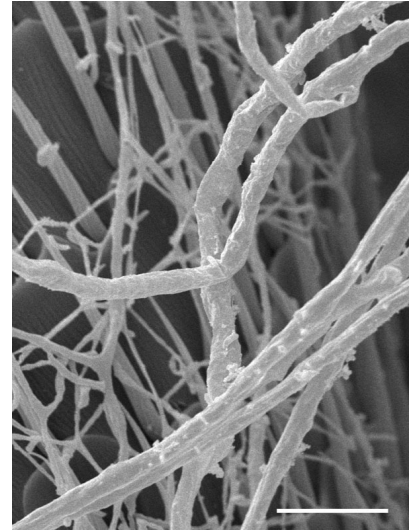


**Abbildung 92: Ameisenfühler;  
REM, Markierung ~ 20 µm**





**Abbildung 93: Ameisenkopf, Fühler und Auge, von Hyphen überwachsen; REM, Markierung ~ 75  $\mu$ m**



**Abbildung 94: Teil des Hyphengeflechtes; REM, Markierung ~ 7  $\mu$ m**

Anschließendes Anstechen einiger Fallen bzw. die Simulation von Bisslöchern am Boden der Kannen bewirkte das fast vollständige Austropfen der Flüssigkeit (Abbildung 95, Abbildung 96).



**Abbildung 95: Angestochene Falle**



**Abbildung 96: Auslaufende Flüssigkeit am Boden der Falle**

Nach einigen Tagen wurden erneut Proben entnommen, die nun aus verschimmelten Beuteteilen, nicht aus Flüssigkeit bestanden. Im Mikroskop waren Sporangien und unzählige Sporen zu erkennen (Abbildung 97-100).



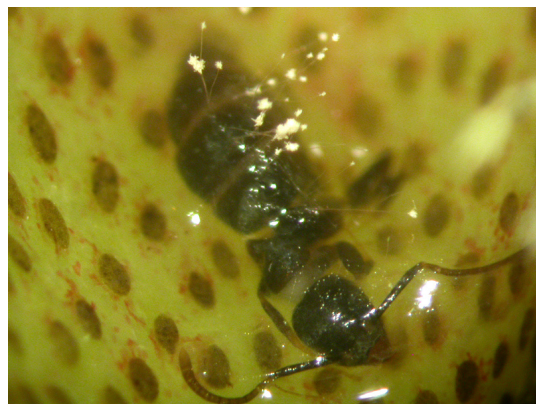
**Abbildung 97: Penicillium-Sporangien, Falle 1; Markierung ~ 20  $\mu$ m**



**Abbildung 98: Penicillium-Sporangien, Falle 3; Markierung ~25  $\mu$ m**



**Abbildung 99: Hyphengeflecht über Beutetieren; Größe der Ameisen ca. 4 mm**



**Abbildung 100: Am Beutetier sind gestielte Sporangien zu sehen; Größe der Ameise ca. 4 mm**

Als letztes sollte überprüft werden, ob die entstandenen Sporen wieder Hyphen ausbilden und in der Lage sind sich von Beutetieren zu ernähren. Unter sterilen Bedingungen wurden steriles Wasser und sterile Beutetiere in Eprovetten gefüllt und Pilzsporen von den Beutetieren hinzugefügt. Nach einigen Tagen war um die Tiere ein dichtes Pilzgeflecht zu erkennen (Abbildung 101, Abbildung 102).



**Abbildung 101: Rund um den Mehlwurm ist ein dichtes Hyphengeflecht zu erkennen**



**Abbildung 102: Rund um die Fliege ist ein dichtes Hyphengeflecht zu erkennen**

## 7.4 Algen

Bei diesen Untersuchungen sollte festgestellt werden ob sich *Sarracenia purpurea* und *Nepenthes x ventrata* in ihrer Algenvielfalt unterscheiden bzw. welche Algen in den Kannen der Pflanzen vorkommen.

Von jeder Pflanze wurden Proben aus 6 Fallen entnommen und untersucht (Tabelle 20). In den Fallen von *Sarracenia* wurden mehrere verschiedene Grünalgen nachgewiesen (Abbildung 103-106), während in den meisten Proben von *Nepenthes* keine Algen zu finden waren. Was allerdings nachgewiesen werden konnte, sind verschiedene Cyanobakterien/Blualgen (Abbildung 107-108).

	Probe	pH-Wert	Gefundene Gattungen
<i>Sarracenia</i>	1	4,75	<i>Ulothrix, Planktosphaeria</i>
	2	4,5	<i>Ankistrodesmus, Ulothrix, Chlorella, Chlamydomonas</i>
	3	9	-
	4	5	-
	5	nicht bestimmt	-
	6	6,5	<i>Planktosphaeria</i>
<i>Nepenthes</i>	1	5,25	-
	2	3,75	-
	3	5,25	-
	4	3,5	-
	5	5	-
	6	nicht bestimmt	<i>Anabaena, Oscillatoria</i>

Tabelle 20: Proben, die auf Algen untersucht wurden (- keine Algen)



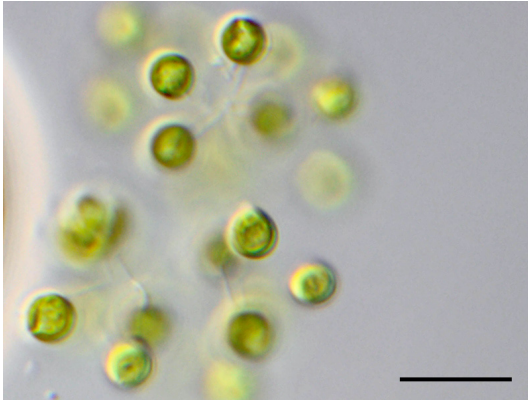


Abbildung 103: *Planktosphaeria* sp.;  
Markierung ~ 20 µm



Abbildung 104: *Ulothrix* sp.;  
Markierung ~ 15 µm

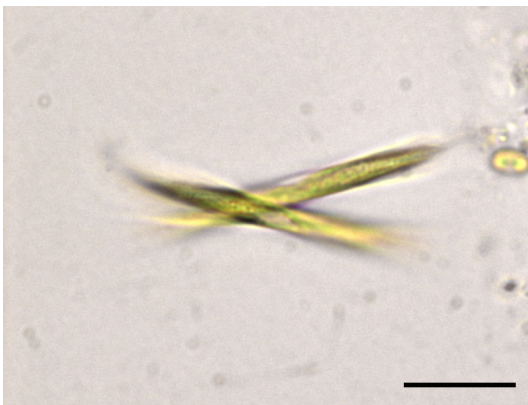


Abbildung 105: *Ankistrodesmus* sp.;  
Markierung ~ 15 µm



Abbildung 106: *Chlamydomonas* sp.;  
Markierung ~ 10 µm



Abbildung 107: *Anabaena* sp.;  
Markierung ~ 50 µm

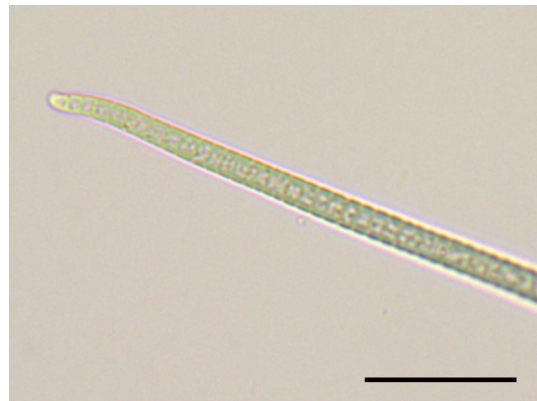


Abbildung 108: *Oscillatoria* sp.;  
Markierung ~ 100 µm

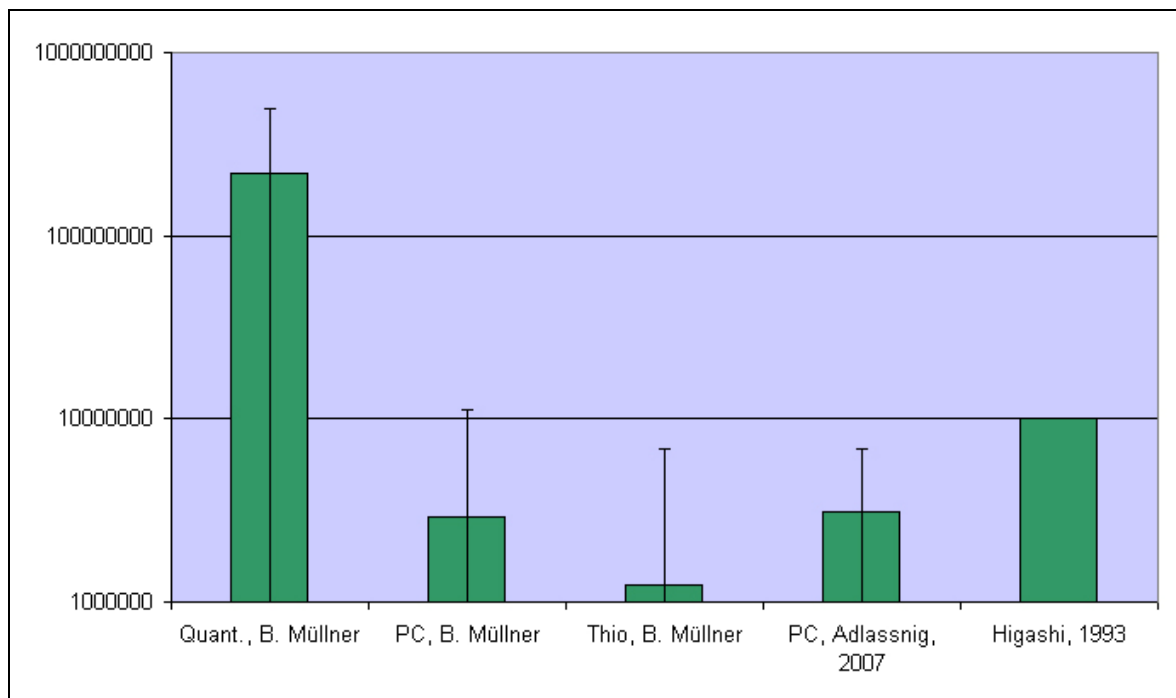




## 8. DISKUSSION

### 8.1 Keimzahlen

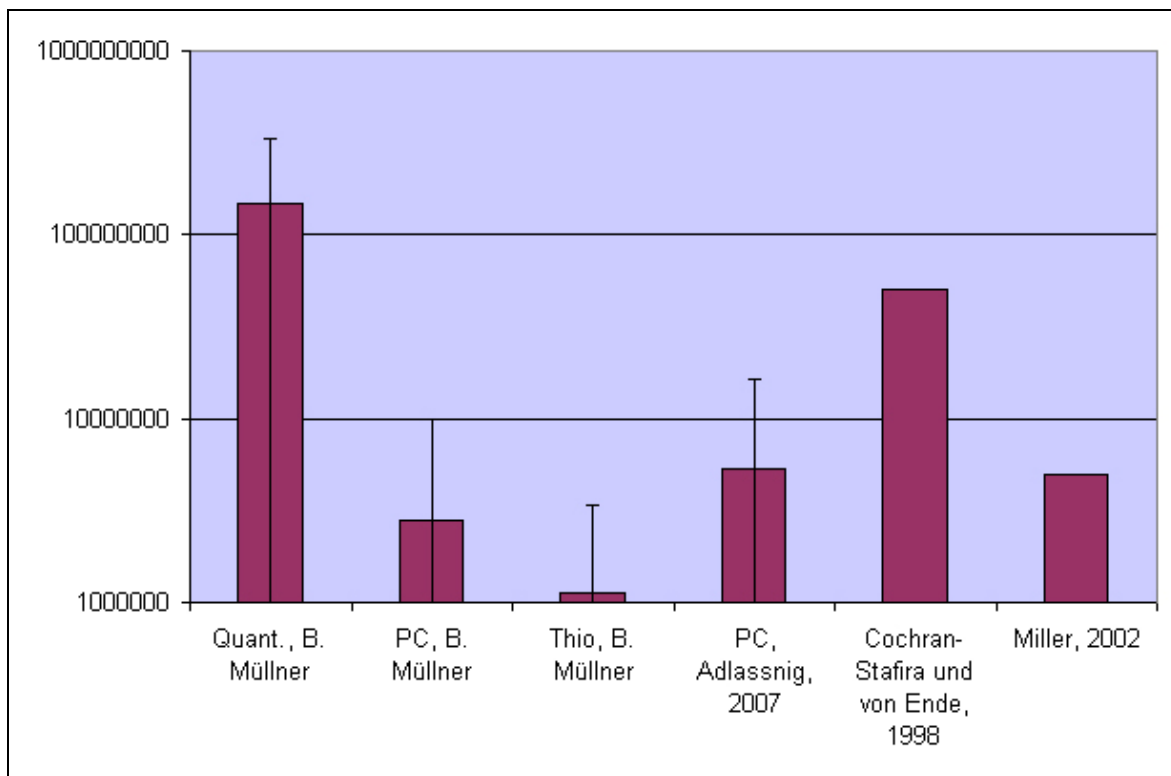
Frühere Untersuchungen zur Keimzahl (z.B. Adlassnig, 2007; Higashi, 1993) verwendeten nur Kulturmethode. Die vorliegende Arbeit bestimmt erstmals auch die Gesamtkeimzahl. Ein Vergleich von meinen Ergebnissen mit der Literatur (Grafik 15 und Grafik 16) zeigt, dass durch die Quantifizierung bzw. Bestimmung der absoluten Keimzahl deutlich mehr Zellen pro Milliliter nachgewiesen wurden. Da durchschnittlich nur 2% der Bakterien kultivierbar sind, ist hier die Sinnhaftigkeit der üblicherweise verwendeten Kulturmethode zu hinterfragen. Die Ergebnisse sind zwar reproduzierbar, liegen jedoch weit unter der tatsächlichen Keimzahl.



**Grafik 15: Vergleich von Keimzahlbestimmungen, *Nepenthes x ventrata*, [Zellen/ml]**

Vergleicht man die beiden Kulturmedien (PC und Thio) bei *Nepenthes x ventrata*, ist ein deutlicher Unterschied zu erkennen. Die Anzahl der Bakterien ist auf dem PC-Medium signifikant ( $p < 5\%$ ) höher, während bei *Sarracenia purpurea* beide Medien etwa gleich gut funktionieren.

Hepburn (1918) kultivierte Bakterien aus *Nepenthes sp.* mit einem nicht näher erläuterten Medium bei 37°C und liegt mit den bestimmten Keimzahlen zwischen den Ergebnissen meiner Auszählungen mit PC und Thio. Da meine Kulturen bei etwa 25°C inkubiert wurden und somit ein Temperaturunterschied von mehr als 10°C besteht, ist es wahrscheinlich, dass die Temperatur keine entscheidende Rolle bei der Kultivierung spielt.



**Grafik 16: Vergleich von Keimzahlbestimmungen, *Sarracenia purpurea*, [Zellen/ml]**

Die Gesamtkeimzahl liegt bei *Nepenthes x ventrata* etwas über dem Wert von *Sarracenia purpurea*, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Der Grund dafür kann der unterschiedliche Beuteeintrag in die Fallen sein, da die Bakterienzahl nach dem Fang eines Tieres deutlich zunimmt und somit eventuelle Unterschiede in den Fallen verwischt (Mayer, 2005). Eine andere Erklärung wäre die geringe Anzahl der Stichproben und die hohe Standardabweichung.

Die Standardabweichung war nicht bei allen Literaturdaten angegeben, wäre aber für den Vergleich von Ergebnissen wichtig. Deren Fehlen bei Higashi (1993) oder Cochran-Stafira (1998) lässt keine Aussage darüber zu, ob tatsächlich mehr Bakterien kultiviert wurden oder nicht.

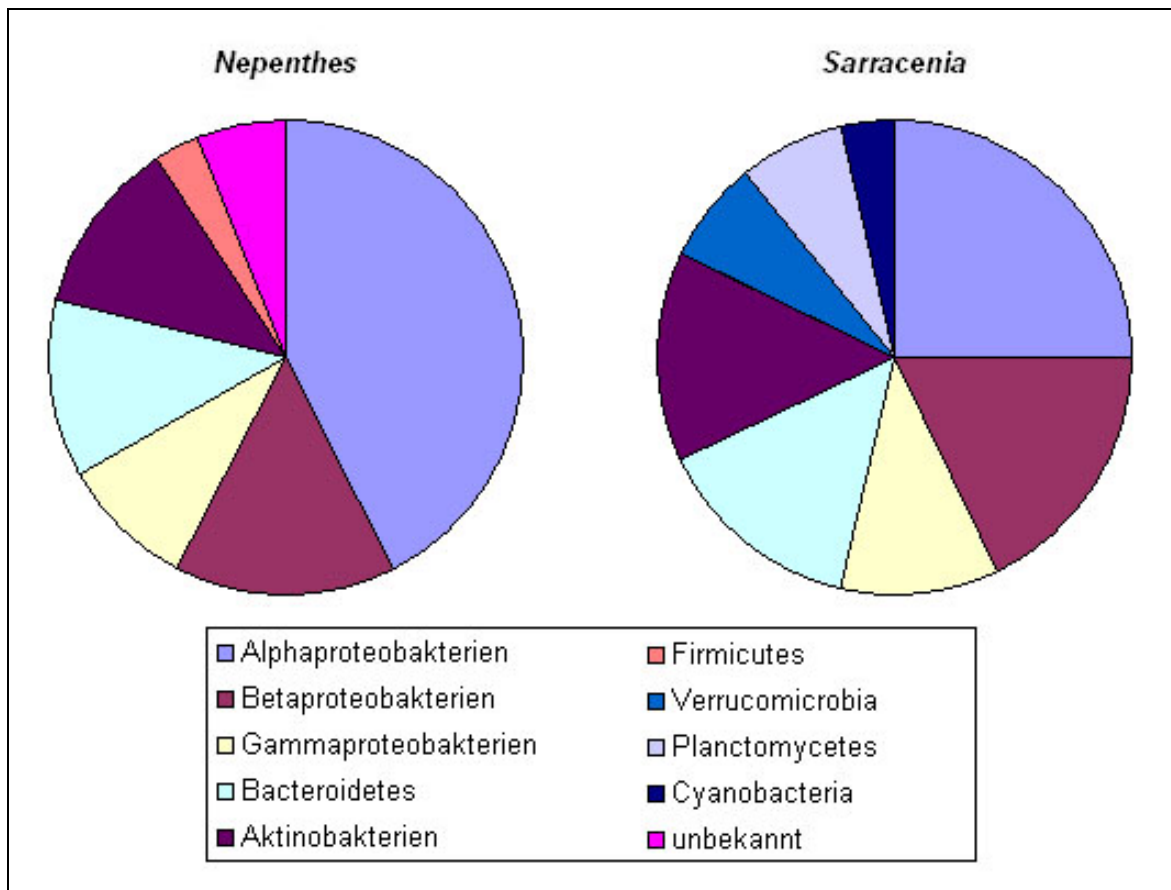
## 8.2 Diversität der Bakterien

Wie schon in den Ergebnissen erläutert, wurden in beiden Pflanzenarten etliche Bakteriengruppen bzw. Phyla gefunden. Folgender Stammbaum (Abbildung 109) zeigt die durch Reinkulturen und Full Cycle 16S rRNA Ansatz nachgewiesenen Bakterien.

In *Sarracenia* wurden insgesamt 6, in *Nepenthes* hingegen nur 4 Phyla gefunden. Davon konnten Aktinobakterien und Firmicutes nur durch Reinkulturen, nicht aber im 16S rRNA Ansatz nachgewiesen werden.

Wie in folgenden Zusammenstellungen (Grafik 17 und Tabelle 21) zu sehen ist, kommen in den Fallen von *Sarracenia* mehr Phyla bzw. Klassen vor. Myxobakterien (Deltaproteobakterien) fanden sich nur in *Sarracenia*. Da sie ausschließlich mittels Selektivmedium nachgewiesen werden konnten, sind sie nicht in der Grafik vertreten.

Da die Klone und Reinkulturen beliebig ausgewählt wurden, kann die prozentuelle Verteilung verschoben sein.



**Grafik 17: Anteile der Phyla bzw. Klassen der Reinkulturen und 16S rRNA Klone**

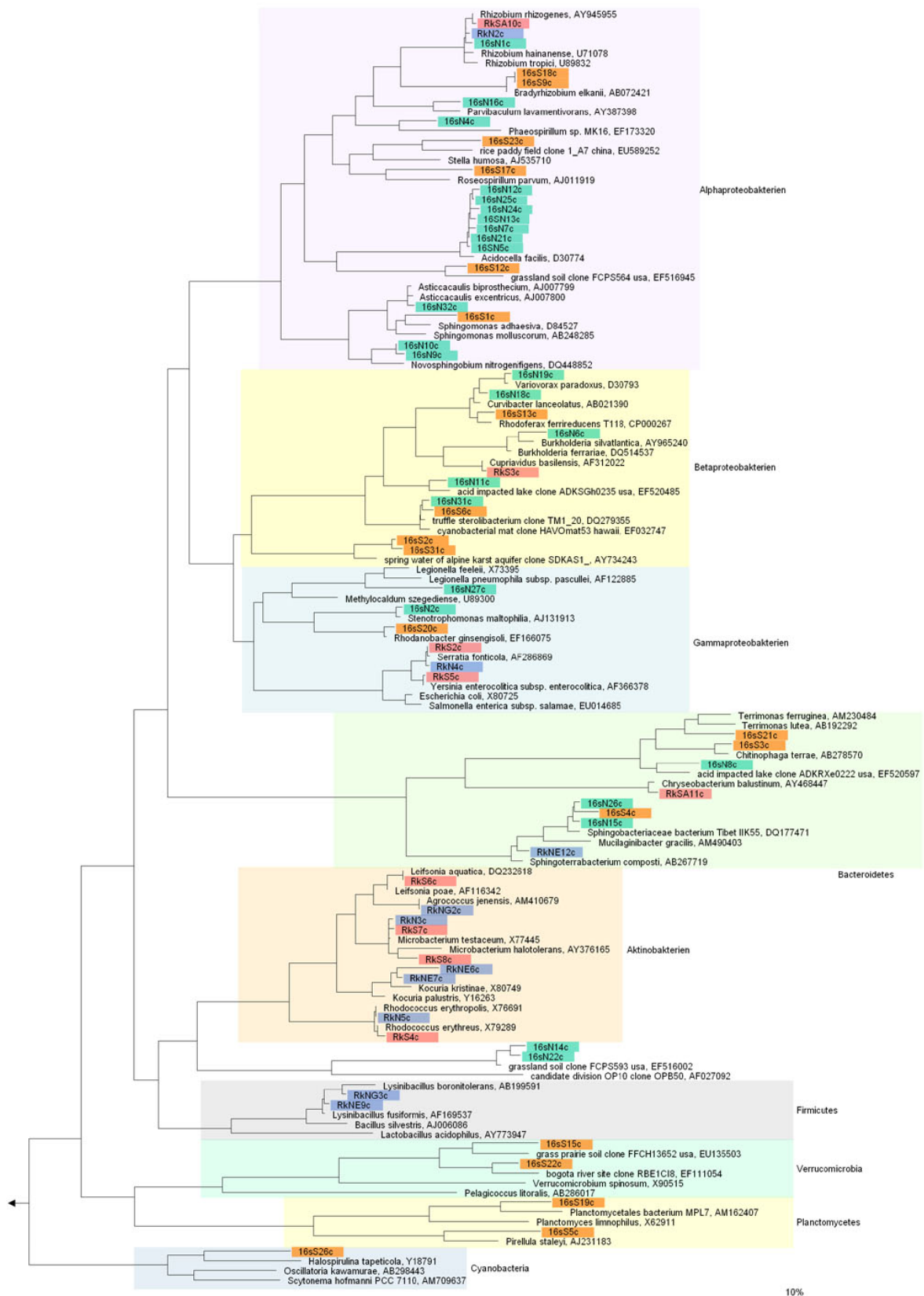


Abbildung 109: Stammbaum der Reinkulturen und der Bakterien des 16S rRNA Ansatzes

<b>Bakterien</b>	<i>Sarracenia</i>	<i>Nepenthes</i>
Alphaproteobakterien	+	+
Betaproteobakterien	+	+
Gammaproteobakterien	+	+
Bacteroidetes	+	+
Aktinobakterien	+	+
Firmicutes	-	+
Verrucomicrobia	+	-
Planctomycetes	+	-
Cyanobacteria	+	-
Myxobakterien	+	-

**Tabelle 21: Übersicht der untersuchten Bakterien (+ nachgewiesen, - nicht nachgewiesen)**

Manche Bakterien, vor allem Aktinobakterien, waren bei den Reinkulturen häufig vertreten, konnten aber mit FISH nicht nachgewiesen werden. Reinkulturen oder Klone sagen aber nichts über bakterielle Häufigkeiten aus, da die Kultivierungsbedingungen eine Rolle spielen bzw. die Klone zufällig ausgewählt werden. Durch DNA-Extraktion, PCR und Klonierung treten schon im Voraus Verfälschungen auf. FISH ist die einzige Methode um relevante Aussagen über die Häufigkeit von Bakterien treffen zu können.

Gram positive Bakterien (Aktinobakterien und Firmicutes) konnten in *Sarracenia* mit FISH nicht nachgewiesen werden, in *Nepenthes* jedoch relativ häufig.

Ein möglicher Grund dafür könnte folgender sein: Ein spezielles Aktinobakterien-Nährmedium bewirkt nahezu optimale Bedingungen für die Entwicklung von Kolonien. Kommen Aktinobakterien in *Sarracenia* selten vor ist die Chance gering, sie in 10 µl Probe, die auf FISH Slides pipettiert werden, zu finden. Auf den Nähemedien wurden, im Vergleich dazu, 100 µl der Probe ausgestrichen und jede Zelle ist in der Lage eine Kolonie zu bilden.

Bisher ist noch relativ wenig über Bakterien in Kannenfallen von *Sarracenia purpurea* bekannt. Von *Nepenthes x ventrata* existieren dagegen noch gar keine Aufzeichnungen, weshalb hier Daten von *Nepenthes mirabilis* zum Vergleich herangezogen werden. Tabelle 22 gibt einen Überblick über die vorhandene Literatur.

Wirtspflanze	Bakterienart	Klasse	Autor
<i>S. purpurea</i>	<i>Azomonas insignis</i>	Gamma-Proteobacteria	(Prankevicius und Cameron, 1991)
<i>S. purpurea</i>	<i>Azotobacter beijerinckii</i>	Alpha-Proteobacteria	(Prankevicius und Cameron, 1991)
<i>S. purpurea</i>	<i>Azotobacter vinlandii</i>	Alpha-Proteobacteria	(Prankevicius und Cameron, 1991)
<i>S. purpurea</i>	<i>Caulobacter sp.</i>	Alpha-Proteobacteria	(Juniper et al., 1989)
<i>S. purpurea</i>	<i>cf. Acinetobacter sp.</i>	Gamma-Proteobacteria	(Juniper et al., 1989)
<i>S. purpurea</i>	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Beta-Proteobacteria	(Juniper et al., 1989)
<i>S. purpurea</i>	<i>Escherichia coli</i>	Gamma-Proteobacteria	(Lindquist, 1975)
<i>S. purpurea</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gamma-Proteobacteria	(Cochran-Stafira und von Ende, 1998)
<i>S. purpurea</i>	<i>Rhodobacter sp.</i>	Alpha-Proteobacteria	(Lindquist, 2003)
<i>S. purpurea</i>	<i>Rhodomicrobium sp.</i>	Alpha-Proteobacteria	(Lindquist, 2003)
<i>S. purpurea</i>	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Alpha-Proteobacteria	(Bradshaw und Creelman, 1984)
<i>S. purpurea</i>	<i>Rhodopseudomonas sp.</i>	Alpha-Proteobacteria	(Lindquist, 2003)
<i>S. purpurea</i>	<i>Rhodospirillum sp.</i>	Alpha-Proteobacteria	(Lindquist, 2003)
<i>N. mirabilis</i>	<i>Bacterium colianindolcum</i>	?	(Okahara, 1933)
<i>N. mirabilis</i>	<i>Bacterium diffusum</i>	?	(Okahara, 1933)
<i>N. mirabilis</i>	<i>Bacterium gastricum</i>	?	(Okahara, 1933)

**Tabelle 22: Literaturdaten der bisher bekannten Bakterien**

Die meisten in der Literatur beschriebenen Bakterien sind Alphaproteobakterien. Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen aus dem 16S rRNA Ansatz und den Reinkulturen überein, obwohl es in den einzelnen Arten keine Parallelen gibt. Aus den Daten von

Okahara (1933) können in diesem Fall keine Schlüsse gezogen werden, da die Bakterien unter diesen Namen nicht mehr existieren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit dem 16S rRNA Ansatz und dem Sequenzieren von Reinkulturen weitaus mehr Bakterien bestimmt wurden als bisher von allen anderen Autoren.

Im Bezug auf Sauerstoff scheinen die meisten der nachgewiesenen Bakterien aerob zu sein. Es standen zwar nur von einigen Bakterien Daten zur Verfügung, da sich aber alle davon als Aerobier erwiesen (Tabelle 23), kann angenommen werden, daß eine Vielzahl der Bakterien in den Fallen aerob sind. Tatsächlich weist die Kannenflüssigkeit meist eine hohe Sauerstoffsättigung auf (Adlassnig, 2007).

<b>Gattung</b>	<b>Sauerstoffbedarf</b>	<b>Quelle/Autor</b>
<i>Acidocella</i>	Aerob	(Kishimoto et al., 1996)
<i>Asticcacaulis</i>	Aerob	(Poindexter, 2006)
<i>Sphingomonas</i>	Aerob	(Yabuuchi et al., 2005)
<i>Variovorax</i>	Aerob	(Willems et al., 2005)
<i>Rhodoferax</i>	Anaerob im Licht, aerob in Dunkelheit	(Imhoff, 2006)
<i>Cupriavidus</i>	Aerob	(Makkar und Casida, 2005)
<i>Stenotrophomonas</i>	Aerob	(Moore et al., 2006)
<i>Burkholderia</i>	Obligat aerob	(Moore et al., 2006)

**Tabelle 23: Sauerstoffbedarf einiger nachgewiesener Bakterien**

### Bakterien in geschlossenen Fallen

Da Hepburn (1918) in geschlossenen Fallen mittels Kulturmethoden keine Bakterien nachweisen konnte, hielt man sie lange Zeit für steril. Sota (1998) und Mayer (2005) zeigten mit verbesserten Kulturbedingungen, dass die Flüssigkeit junger, geschlossener Kannen nicht steril, sondern lediglich sehr bakterienarm ist.

Auch bei meinen Versuchen war die Keimzahl pro Milliliter wesentlich geringer als in älteren, geöffneten Fallen, aber es sind doch zahlreiche Bakterien vorhanden. Die absolute



Keimzahl liegt bei etwas über 700.000 Zellen/ml in geschlossenen, der Durchschnittswert der absoluten Keimzahlen offener Fallen dagegen bei über 200 Millionen Zellen/ml.

Da die Artenvielfalt hier nur mit Kulturmethoden untersucht wurde, konnte nur ein sehr kleiner Teil der Bakterien wachsen und so keine Schlüsse auf die Artenvielfalt gezogen werden. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass geschlossene Fallen artenärmer sind als geöffnete, da jedes Beutetier eine Vielzahl an eigenen Keimen mit sich bringt.

Das in der geschlossenen Falle nachgewiesene Bakterium *Agrococcus sp.* (wahrscheinlich *Agrococcus jenensis*) ist microaerophil (Groth et al., 1996), d.h. es bevorzugt eine sehr sauerstoffarme Umgebung. Da noch niemand den Sauerstoffgehalt in geschlossenen Fallen gemessen hat, ist es schwer hier Vermutungen anzustellen. Womöglich ist die Sauerstoffkonzentration und somit auch die Bakterienvielfalt in jungen, ungeöffneten Fallen sehr gering. Öffnet sich die Falle, kann es sein, daß Bakterien, die in der geschlossenen Falle leben konnten, von anderen verdrängt werden.

Wie Bakterien in junge, ungeöffnete Fallen gelangen ist noch unklar. Möglicherweise werden intrazelluläre Symbionten mit dem Guttationswasser in die geschlossenen Fallen abgegeben.

### 8.3 Pilze

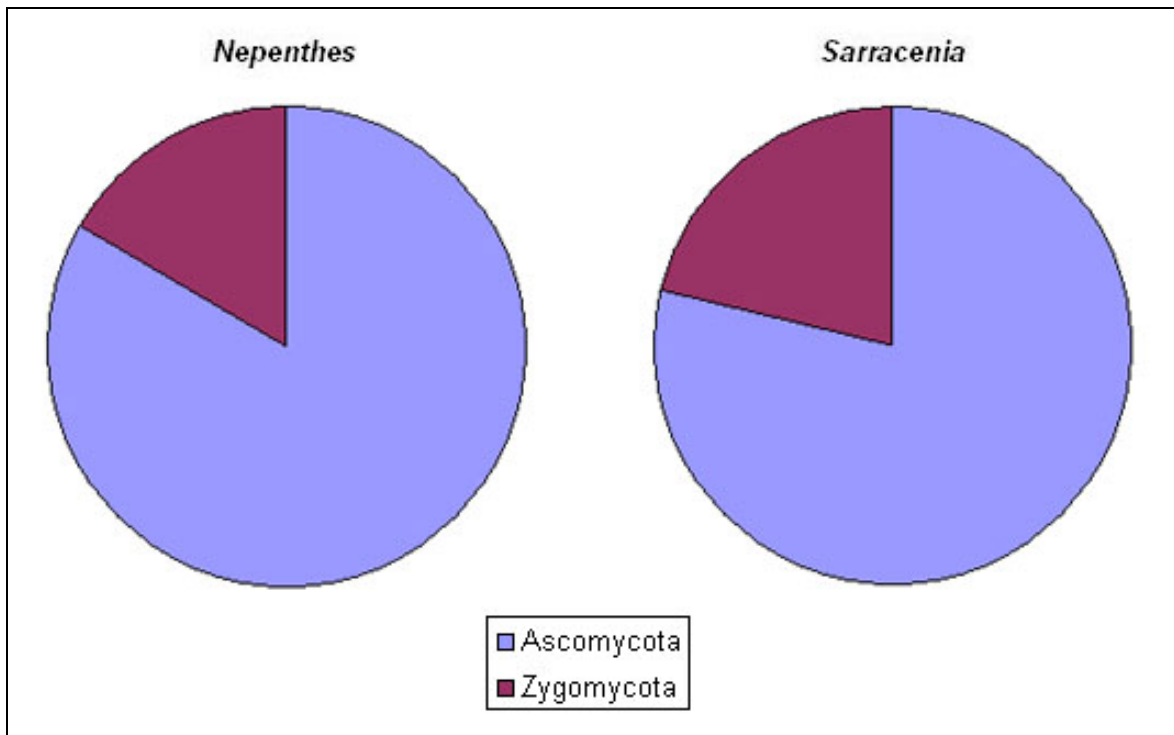
Folgende Pilzarten (Tabelle 24) wurden aus *Sarracenia* und *Nepenthes* isoliert, kultiviert und morphologisch bestimmt. Auffallend ist, daß die Pflanzen völlig unterschiedliche Pilzfloren aufweisen. Die Arten überschneiden sich nicht. *Sarracenia* ist darüber hinaus auch wesentlich artenreicher als *Nepenthes*.

Pilzart	<i>Sarracenia purpurea</i>	<i>Nepenthes x ventrata</i>
<i>Absidia corymbifera</i>	+	
<i>Acremonium sp.1</i>		+
<i>Acremonium sp.2</i>		+
<i>Aspergillus niger</i>	+	
<i>Cladosporium herbarum</i>	+	
<i>Cladosporium macrocarpum</i>	+	
<i>Cladosporium sp.1</i>	+	
<i>Cladosporium sp.2</i>	+	
Unbestimmte Hefen	+	+
<i>Lecanicillium sp.1</i>		+
<i>Mortierella sp.1</i>		+
<i>Mucor racemosus</i>	+	
<i>Mucor sp.1</i>	+	
<i>Trichoderma sp.1</i>	+	
<i>Penicillium corylophilum</i>	+	
<i>Penicillium cf. glabrum</i>	+	
<i>Penicillium griseofolium</i>	+	
<i>Penicillium cf. variabile</i>	+	
<i>Penicillium sp.1</i>		+
Σ	14	6

**Tabelle 24: Vorkommen der nachgewiesene Pilzarten**

Die bestimmten Pilze lassen sich ausnahmslos in die Phyla der Ascomycota (Schlauchpilze) und Zygomycota (Jochpilze) einordnen. Folgende Grafik (Grafik 18) veranschaulicht die Verteilung der beiden Phyla. Bei beiden Pflanzenarten sind Ascomycota zu mehr als 75% vertreten. Dieser Prozentsatz bezieht sich jedoch nur auf die verschiedenen Pilzarten, nicht auf die allgemeine Häufigkeit der einzelnen Pilze.

Ascomycota repräsentieren allerdings etwa 75% aller beschriebenen Pilze (Quelle: <http://tolweb.org>), wodurch dieses Ergebnis relativ typisch erscheint.



**Grafik 18: Anteile der Phyla der bestimmten Schimmelpilze**

Es wurden keine aquatischen Pilze, wie z.B. Oomycota (Heterokontophyta) oder Chytridiomycota gefunden. Ein Grund für ihre Abwesenheit könnte sein, dass der Lebenszyklus dieser Pilze kein Ausbreitungsstadium in der Luft beinhaltet. Die unter Wasser gebildeten Zoosporen können daher nicht mit den Fallen in Berührung kommen.

In den entnommenen Proben waren ausschließlich vegetative Myzelien zu finden. Die meisten Schimmelpilze sind nicht in der Lage unter Wasser Sporen zu bilden. Gelangen Sporen jedoch in Gewässer, können sie auskeimen, Hyphen bilden und wachsen. (persönliche Mitteilung von Hermann Voglmayr)

In einem Versuch (Kapitel 7.3) wurde gezeigt, daß sich Pilze nach dem Absterben und Auslaufen der Kannenfallen vermehren können. Sporen werden gebildet, verbreitet, keimen auch unter Wasser, bilden Hyphen und wachsen zu einem Myzel heran.

In der Literatur (Tabelle 25) ist sehr wenig über fallenbewohnende Schimmelpilze bekannt. Über Pilze in *Nepenthes x ventrata* existieren überhaupt keine Daten, von *Sarracenia*

*purpurea* ist lediglich ein Schimmelpilz bekannt (Reeves, 2004). Auf Grund dessen werden zusätzlich Daten von nahe verwandten Arten zum Vergleich herangezogen.

Wirtspflanze	Pilzart	Gruppe	Autor
<i>S. purpurea</i>	<i>Smittium culisetae</i>	Trichomycota	(Reeves, 2004)
<i>S. alata</i>	<i>Mucor sp.</i>	Zygomycota	(Juniper et al., 1989)
<i>N. melamphora</i>	<i>Merismopedium glaucum</i>	Myxomycota	(van Oye, 1921)
<i>N. mirabilis</i>	<i>Mucor mucido</i>	Zygomycota	(Okahara, 1933)
<i>N. mirabilis</i>	<i>Mucor racemosus</i>	Zygomycota	(Okahara, 1933)
<i>N. mirabilis</i>	<i>Rhizopus nigricans</i>	Zygomycota	(Okahara, 1933)
<i>N. mirabilis</i>	<i>Aspergillus glaucus</i>	Ascomycota	(Okahara, 1933)
<i>N. mirabilis</i>	<i>Penicillium glaucum</i>	Ascomycota	(Okahara, 1933)
<i>N. madagascariensis</i>	Unbestimmte Hefen	Ascomycota	(Ratsirarson und Silander, 1996)

**Tabelle 25: Literaturdaten der bisher bekannten Pilze**

Im Vergleich mit der Literatur finden sich nur bei den unbestimmten Hefen und *Mucor racemosus* Parallelen. Es ist dennoch ersichtlich, daß auch bei den Untersuchungen aus der oben angegebenen Literatur Ascomycota und Zygomycota dominieren.

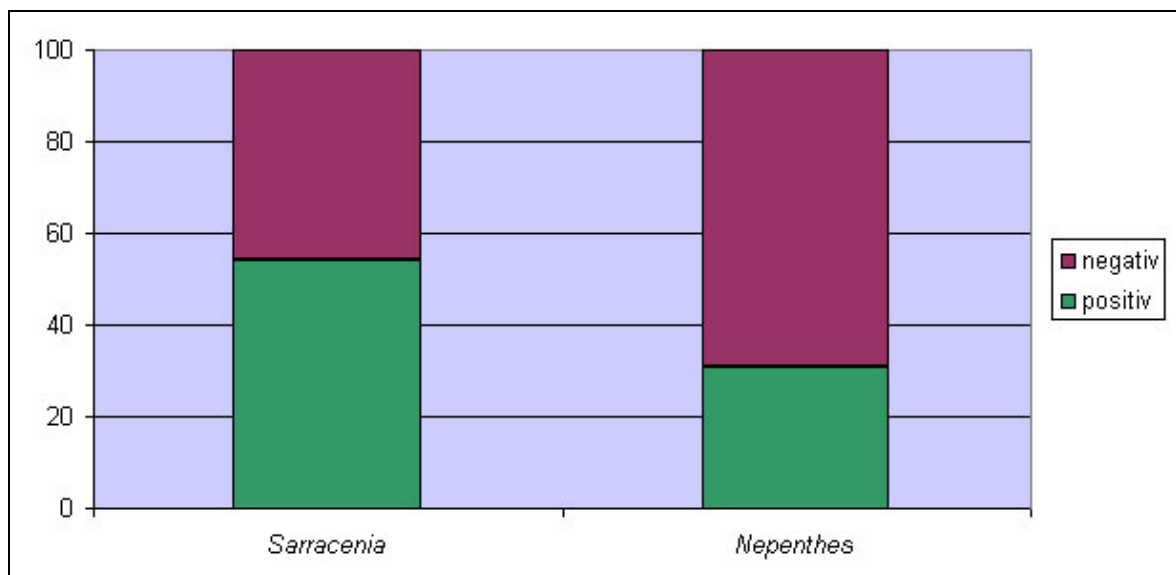
In der vorliegenden Arbeit wurden die Schimmelpilze kultiviert und morphologisch bestimmt, da eine phylogenetische Analyse mit der 18S rRNA durchgeführt werden müßte und dabei einige Schwierigkeiten auftreten können. Die 18S rRNA enthält oft stark repetitive und GC-reiche Regionen, was das Auslesen bei der Sequenzierung erschwert. Des Weiteren sind die Sequenzen der Schimmelpilze oft so ähnlich, dass eine Unterscheidung einzelner Arten kaum möglich ist. Aus diesen Gründen muß oft mit den *Internally Transcribed Spacer Regions* (schnell mutierende, funktionslose Bereiche zwischen 5,8S, 18S und 28S rRNAs) gearbeitet werden. (persönliche Mitteilung von Sebastian Lücker). Diese Methoden hätten den Rahmen der Diplomarbeit überschritten. Zur Bestimmung der Hefen wären ebenfalls andere, zum Teil langwierige Kultivierungsmethoden erforderlich.

## 8.4 Symbiose/Mutualismus

### Bakterien

Besitzen Bakterien Eigenschaften, die den Pflanzen von Nutzen sein können bzw. zur Beuteverdauung beitragen, können sie als Mutualisten bezeichnet werden. Ihre Anwesenheit in der Falle allein sagt jedoch nichts über ihren Einfluß auf die Beuteverdauung aus.

Aus den Versuchen mit Selektivmedien geht hervor, daß *Sarracenia* eine größere Zahl verschiedener möglicher Symbionten beherbergt als *Nepenthes*. Die Testergebnisse fielen bei *Sarracenia* zu 54% positiv aus, bei *Nepenthes* dagegen nur zu 31% (Grafik 19). Diese Ergebnisse bestätigen die Versuche von Mayer (2005), die zeigte, dass *Sarracenia* mehr Symbionten enthält als andere Kannenpflanzen.



**Grafik 19: Prozentuelle Verteilung möglicher Symbionten der Selektivmedien-Versuche**

Die Selektivmedien-Versuche umfaßten folgende Bakteriengruppen:

- Purpurbakterien
- Schwefelabspaltende Bakterien
- Harnstoffspaltende Bakterien
- Proteinspaltende Bakterien
- Schwefeloxidierende Bakterien

Die Ergebnisse der Selektivmedien ergänzen sich durch die nachgewiesenen Bakterien aus Reinkulturen und dem 16S rRNA Ansatz, deren Eigenschaften mittels Literatur recherchiert wurden. Da die Bakteriengruppen der Selektivmedien-Versuche keinen einzelnen Phyla zuzuordnen sind, sondern sich nur auf Eigenschaften beziehen, ist es möglich, daß Doppelnachweise vorliegen.

Anhand der **Literatur** wurden Eigenschaften der nachgewiesenen Bakterien recherchiert. Da etliche Bakterien noch nicht kultiviert bzw. beschrieben worden sind, liegen für diese keine genaueren Daten vor. Einige Klone liegen im Stammbaum mehr oder weniger isoliert, was keine Rückschlüsse auf Gattungen oder gar Arten zuläßt. Diese Bakterien wurden aus der Datensuche ausgeschlossen, da die einzelnen Gattungen und Familien so divers sind, daß keine hier relevanten, allgemeinen Eigenschaften vorliegen. Lediglich die wissenschaftlichen Namen der nächsten berechneten Verwandten lassen einige wage Vermutungen zu.

Bei manchen der folgenden Bakterien waren Merkmale erkennbar, die für die Falle von positiver Bedeutung sind, jedoch auch solche die ihr schaden könnten.

- Rhizobien wurden in *Sarracenia purpurea* und *Nepenthes x ventrata* nachgewiesen. Diese chemoheterotrophen Bakterien spielen im Stickstoffkreislauf von Ökosystemen eine oft bedeutende Rolle, unter anderem durch die Stickstoff-Fixierung. Dabei wird atmosphärischer Stickstoff in stickstoffhaltige Mineralien eingebaut, die für die Pflanze verfügbar sind. (Campbell, 2000)
- *Acidocella sp.* kommt in *Nepenthes x ventrata* anscheinend sehr häufig vor. Die aeroben, acidophilen Bakterien bevorzugen Lebensräume mit niederem pH-Wert, von etwa 2,5-6 (Kishimoto et al., 1996). Ihre Häufigkeit in *Nepenthes x ventrata* erscheint auf Grund dessen schlüssig.
- *Asticcacaulis sp.* in *Nepenthes x ventrata*: Die typisch aquatischen, aeroben Bakterien mineralisieren, zusammen mit anderen Bakteriengruppen, einen Großteil der gelösten organischen Masse (Poindexter, 2006). Durch diesen Abbau werden Nährstoffe für die Pflanze verfügbar.
- Legionellen wurden in *Nepenthes x ventrata* nachgewiesen. Die Bakterien gelangten wahrscheinlich über die Bewässerungsanlage des Glashauses in die Fallen. Die Anwesenheit von Legionellen in der Warmwasseranlage der Universität Wien ist bekannt. Die Bakterien sind aquatisch und humanpathogen (Edelstein und Cianciotto, 2006).

- *Stenotrophomonas sp.* kommt in zahlreichen Lebensräumen vor und wurde in *Nepenthes x ventrata* nachgewiesen. Die Bakterien gelten als Pathogene von Mensch, Tier und Pflanze, sind oft Antibiotika resistent und besiedeln die Rhizosphäre oder kommen als Biofilm auf Pflanzen vor (Moore et al., 2006). In diesem Fall kann man vermuten, daß die Bakterien durch befallene Beutetiere in die Falle gelangt sind.
- Die Gattung *Serratia*, die in beiden Pflanzenarten gefunden wurde, bildet den roten Pigmentfarbstoff Prodigiosin, der toxisch auf Protozoen wirkt (Grimont und Grimont, 2006). Die Anwesenheit dieser Bakterien könnte zu zusätzlichen Nährstoffen führen, da Protozoen abgetötet und verdaut werden. Unter normalen Umständen bilden die Fallen Lebensraum für Protozoen (Mayer, 2005).
- *Yersinia sp.*, aus *Sarracenia purpurea*, umfaßt 11 Spezies, von denen 3 pathogen für Mensch und Tier (z.B. Pesterreger) sind (Carniel et al., 2006). Es ist wahrscheinlich, daß die Bakterien mit Beutetieren in die Falle gelangt sind.
- Das im Lichtmikroskop bestimmte Cyanobakterium *Anabaena sp.* besitzt Chlorophyll a und damit die Fähigkeit Photosynthese zu betreiben. Dabei entsteht O<sub>2</sub> als Nebenprodukt. Außerdem fixieren diese Blaualgen Stickstoff und bilden Neurotoxine (Campbell, 2000).
- Myxobakterien wurden nur in *Sarracenia purpurea* gefunden. Sie produzieren eine Reihe von wichtigen Substanzen für die Medizin und Industrie, beispielsweise Antibiotika und Stoffe zur Krebsbekämpfung.

Das Ökosystem einer Falle ist ein sehr komplexer Lebensraum, in dem die Bedeutung verschiedener Organismen sehr schwer zu definieren ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Fallen beider Pflanzenarten viele Mutualisten, allerdings auch Kommensalen und Parasiten, beinhalten.

Bakterienarten, die atmosphärischen Stickstoff fixieren, liefern der Pflanze auch ohne Beutetiere Stickstoff (Prankevicus und Cameron, 1991). Versuche von Mouquet (2008) an *Sarracenia purpurea* zeigten, daß Pflanzen-Bakterien Interaktionen hauptsächlich mutualistisch, Pflanzen-Bakterivoren Interaktionen (Protozoen und Rädertierchen) meistens parasitisch sind. Bakterien, Protozoen und andere Organismen produzieren anorganische Ionen die von der Fallenepidermis absorbiert werden können (Plummer und Kethley, 1964). Von diesem Standpunkt aus könnte man sie als Mutualisten bezeichnen.

Andererseits ernähren sich Protozoen und andere Lebewesen von Bakterien, die der Pflanze nützlich sein könnten und sind somit Parasiten (Mouquet et al., 2008).

## Pilze

Die Eigenschaften der kultivierten und bestimmten Schimmelpilze (Tabelle 26 und Tabelle 27) sollen in diesem Kapitel genauer betrachtet werden. Als Literatur dient Samson (2004).

<b>Pilzart</b>	<b>Verbreitung</b>	<b>Bekannte toxische Metabolite</b>
<i>Absidia corymbifera</i>	Weltweit, Lebensmittel, Innenräume, Boden	0
<i>Aspergillus niger</i>	Lebensmittel, Innenräume	3
<i>Cladosporium herbarum</i>	Weltweit, Lebensmittel, Innenräume	0
<i>Cladosporium macrocarpum</i>	Weltweit, Innenräume	0
<i>Cladosporium sp.</i>	Weltweit, Lebensmittel, Innenräume, teilweise Pflanzenpathogene	0
<i>Mucor racemosus</i>	Weltweit, Lebensmittel, Innenräume, Boden	0
<i>Mucor sp.</i>	Weltweit, Lebensmittel, Innenräume	0
<i>Trichoderma sp.</i>	Lebensmittel, Innenräume	0
<i>Penicillium corylophilum</i>	Lebensmittel, Innenräume	0
<i>Penicillium cf. glabrum</i>	Lebensmittel, Innenräume	1
<i>Penicillium griseofolium</i>	Weltweit, Lebensmittel, Boden	4
<i>Penicillium cf. variable</i>	Lebensmittel, Innenräume	1

**Tabelle 26: Eigenschaften der Pilzarten in *Sarracenia purpurea***



Pilzart	Verbreitung	Toxische Metabolite
<i>Acremonium sp.</i>	Weltweit, Boden, teilweise Pflanzen-pathogene	0
<i>Lecanicillium sp.</i>	-	-
<i>Mortierella sp.</i>	-	-
<i>Penicillium sp.</i>	Die Gattung ist zu divers um allgemeine Eigenschaften zu erkennen.	

**Tabelle 27: Eigenschaften der Pilzarten in *Nepenthes x ventrata***

Die aufgelisteten toxischen Metabolite werden während des Wachstums gebildet (Samson et al., 2004).

In anderen Untersuchungen konnten toxische Metabolite von *Lecanicillium spp.* (Goettela M. S. et al., 2008), *Mortierella wolfii* (Davey et al., 1975) und eine antibiotische Wirkung von *Mortierella alpina* auf grampositive Bakterien (Streekstra, 1997) nachgewiesen werden.

In *Nepenthes* wurden wesentlich weniger verschiedene Pilze nachgewiesen, wovon keine Gattung besonders auffällige Eigenschaften zu haben scheint. Die Gattung der Penicillien ist jedoch so divers, daß keine Aussagen über die ganze Gattung gemacht werden können. Einige Arten produzieren etliche toxische Metabolite, andere gar keine. Da *Penicillium spp.* auch in *Sarracenia* vertreten ist, deutet somit nichts darauf hin, daß Schimmelpilze bzw. ihre Gifte ein Grund für die Artenarmut in *Nepenthes x ventrata* sein könnten.

## Algen

Die Tatsache, daß in *Sarracenia purpurea* die größere Diversität an Algen nachgewiesen werden konnte, wird durch einige andere Untersuchungen bestätigt. Arbeiten von Gebühr (2005) und Addicott (1974) weisen ausführliche Artenlisten von über 70 Arten auf. Von *Nepenthes x ventrata* existieren jedoch noch keine Daten über Algen.

Meine Ergebnisse erweitern die bisher bestehenden Artenlisten von *S. purpurea* mit *Ankistrodesmus sp.*, *Ulothrix sp.* und *Planktosphaeria sp.*.

Ein Grund für die unterschiedliche Algendiversität in den Fallen beider Pflanzenarten kann der pH-Wert sein. Die Kannenflüssigkeit von *Sarracenia purpurea* weist im Durchschnitt einen wesentlich neutraleren bzw. basischeren (pH 6-8) Wert auf als *Nepenthes x ventrata* (pH 4-6) und ist somit weniger aggressiv.

Dazu muss erwähnt werden, dass Gebühr (2005) eingebürgerte Pflanzen in Deutschland untersucht hat. Mayer (2005) und Adlassnig (2007) fanden bei Glashauspflanzen allerdings keine Algen vor. Möglicherweise hängt die Algen Diversität in den Kannen vom Standort der Pflanzen ab.

Algen benötigen, ebenso wie Pflanzen, bestimmte Nährstoffe (z.B. Stickstoff, Phosphor, ect.) um zu überleben. Dementsprechend könnte man sie als Konkurrenten ihres Wirtes ansehen, nicht als Fallenbewohner oder gar Mutualisten. Werden sie jedoch verdaut und in ihre Bestandteile zerlegt, kann die Wirtspflanze diese Nährstoffe wieder aufnehmen.

## 8.5 Vergleich: *S. purpurea* / *N. x ventrata*

Vergleicht man die Artenzusammensetzung der beiden Pflanzenarten, ist *Sarracenia purpurea* in allen Hinsichten artenreicher. Sie beherbergt mehr Arten von Pilzen, Algen und auch Bakterien. Mayer (2005) beschreibt die selben Ergebnisse bei Protozoen und höheren Organismen.

Ein Grund für den Artenreichtum könnte der nahezu neutrale pH-Wert der Fallenflüssigkeit sein. Es wurden bis heute keine eigenen Verdauungsenzyme von *Sarracenia purpurea* nachgewiesen (Gallie und Chang, 1997). *Nepenthes x ventrata* produziert möglicherweise eine Reihe von Giftstoffen (Ratsirarson und Silander, 1996), oder ihre Fallen beinhalten Bakterien oder andere Organismen, die Antibiotika und Ähnliches produzieren. Letztere Theorie erscheint wahrscheinlicher, andererseits spricht die Artenvielfalt von *Sarracenia purpurea* dagegen. Wenn in *Nepenthes x ventrata* Bakterien leben können, die Gifte und Antibiotika produzieren, sollten sie theoretisch auch in der wesentlich weniger aggressiven Fallenflüssigkeit von *Sarracenia purpurea* leben können.

Die Fallenflora von *Nepenthes x ventrata* ist, vermutlich wegen der saueren und aggressiven Fallenflüssigkeit sehr artenarm (Pant und Bhatnagar, 1977; van Oye, 1921). Frazier (2000) nimmt an, daß Bakterien auch bei *Nepenthes x ventrata* eine Rolle beim Zersetzungsprozess der Beute spielen, aber eine wesentlich kleinere als bei *Sarracenia purpurea*.



## 9. AUSBLICK

Die vorliegende Diplomarbeit untersucht die Mikroorganismen in den Phytotelmata zweier ausgewählter fleischfressender Pflanzen, *Sarracenia purpurea* und *Nepenthes x ventrata*. Fragestellungen zur Artenvielfalt und zum Thema Symbiose wurden mit einer Kombination von Arbeitsmethoden analysiert, die teilweise erstmalig für dieses Gebiet zum Einsatz kamen und neue Ergebnisse ermöglichten. Auf Grund der Komplexität und Vielfältigkeit des Themas konnten jedoch nicht alle offene Fragen im Detail untersucht werden. Zudem bedingen die Ergebnisse teilweise weitere, neue Fragestellungen und somit Ansätze für weitere Arbeiten zu diesem Thema.

Obwohl eine große Anzahl von Bakterien und Pilzen nachgewiesen wurde, sind die Artenlisten keineswegs vollständig. Mittels Full Cycle 16S rRNA Ansatz könnten noch zahlreiche weitere Taxa gefunden werden. Dagegen ist es zweifelhaft ob Kulturmethoden noch viele weitere Spezies hinzufügen könnten.

Die ungefähre Verteilung der Bakterien, im Bezug auf Phyla und Klassen, wurde in beiden Pflanzenarten mit Kultur- und mikrobiologischen Methoden bestimmt. Die Bakterienvielfalt, sowie deren prozentuelle Verteilung unterscheiden sich, wobei *Sarracenia purpurea* wesentlich mehr Mutualisten enthält. Hier könnten weitere Versuche mit einzelnen Bakterienstämmen (beispielsweise Aktinobakterien, Myxobakterien, *Serratia sp.* oder *Anabaena sp.*) mehr Klarheit über die Symbiosen bringen.

Des Weiteren konnten etliche noch nicht beschriebene Arten und Bakterien gefunden werden, die im allgemeinen Stammbaum mehr oder weniger isoliert stehen. Da auch im Meer und anderen Ökosystemen nach neuen Bakterienarten und nützlichen Eigenschaften für Medizin und Industrie gesucht wird, bieten karnivore Kannenpflanzen eventuell neue Ansatzpunkte auf diesem Gebiet.

Der Vergleich von Keimzahlen der Kultivierbaren Bakterien und der absoluten Keimzahlen belegt, daß nur etwa 2% der in den Fallen lebenden Bakterien kultivierbar sind. Somit sind Versuche, die sich nur auf kultivierbare Bakterien beziehen, zu hinterfragen.

Geschlossene Fallen von *Nepenthes x ventrata* enthalten eine relativ hohe Keimzahl und mikroaerophile Bakterien (*Agrococcus jenensis*), obwohl sie lange Zeit als steril galten. Eine Klärung des Sauerstoffgehaltes in ungeöffneten Fallen und eine genauere Artenliste wäre von Interesse, ebenso die Frage, wie die Bakterien in die sich bildenden Fallen gelangen.

Die Schimmelpilzflora der beiden untersuchten Pflanzenarten unterscheidet sich vollkommen, wobei *Sarracenia purpurea* auch hier mehr Arten beherbergt. Eine weitere interessante Frage wäre, welche Rolle die Mykotoxine in der Falle spielen. Ebenso ist die Artenvielfalt der Hefen noch völlig unbekannt.

Darüber hinaus wäre es interessant mit den selben Methoden Glashauspflanzen und Pflanzen am Naturstandort zu vergleichen und zu untersuchen ob die hier nachgewiesenen, meistens weltweit verbreiteten Bakterien und Pilze auch am Naturstandort zu finden sind.

Die Chemie der Fallenflüssigkeiten ist ebenfalls noch nicht geklärt. Hier wäre noch festzustellen, welche Stoffe bzw. Gifte von den Pflanzen selbst gebildet werden können.

Die Fallen von karnivoren Kannenpflanzen sind auf Grund ihrer Physiologie und des eigenständigen, teilweise artenreichen Lebensraumes ein Modellsystem der Ökologie, an dem noch viele Aspekte auf verschiedensten Gebieten zu erforschen bleiben.

## 10. ANHANG

### 10.1 Protokoll - Quantifizierung mit Dapi

(Quelle: persönliche Mitteilung von Susanne Haider, Department of Microbial Ecology, Vienna)

Probe, falls eingefroren, im Wasserbad bei 37°C auftauen, anschließend auf Eis

10 µl (oder 1 µl falls sehr konzentriert) der Probe in etwa 5 ml sterilfiltriertem 1x PBS (phosphatgepuffertes Kochsalz) aufnehmen.

Filterturmaufsatz mit Ethanol durch Abflammen sterilisieren und zusammenbauen (Filter: Millipore, 0,2 µm Porengröße, Typ GTBP Black, Polycarbonate, + Stützfilter).

Etwa 5 ml sterilfiltriertes 1xPBS mit der Vakuumpumpe (Millipore) abfiltrieren, nicht zu stark saugen (~ 250 mm Hg vac).

Verdünte Probe abfiltrieren und gut spülen (Filter verstopft sehr schnell, wenn die Konzentration zu hoch ist).

Etwa 150-200 µl DAPI Arbeitslösung (1:1000) auf Filter tropfen, Filterturm mit Alufolie abdecken und 5 min inkubieren.

Mit sterilfiltriertem 1xPBS nachwaschen und wieder abfiltrieren.

Filter mit Pinzette auf Objektträger legen, mit Citifluor einbetten, Anzahl der Bakterien im Epifluoreszenzmikroskop mittels Gitternetz im Zählkular bestimmen (10 Wiederholungen).

Auszählung:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{gezählte Zellen in Probe}}{\text{Zahl der ausgezählten Felder (10)}} \times M \times V$$

$$\text{Mikroskopfaktor (M)} = \frac{\text{gesamte effektive Filterfläche (pi x r}^2 = 176 \text{ mm}^2\text{)}}{\text{Fläche des Gitternetzes (= 0,015625 mm}^2\text{)}} = 11264$$

effektive Filterfläche:

gilt für Ø 25 mm Filter, eff. Filterfläche = Ø 15 mm, r = 7,5 mm

Fläche des Gitternetzes berechnet sich folgendermaßen:

100er Objektiv, Kantenlänge des Gitternetzes im Okular: 12,5 mm

$12,5:100 = 0,125 \text{ mm}$ ,  $A = (0,125)^2 = 0,015625 \text{ mm}^2$

Verdünnungsfaktor (V):

wenn aus 10  $\mu\text{l}$  ausgezählt wird, x 100 (auf 1 ml hochgerechnet), wenn aus 1  $\mu\text{l}$  ausgezählt wird, x 1000 etc.

## 10.2 Sequenzierung mit der Kettenabbruchmethode

Ähnlich wie bei der PCR wird der zu sequenzierende DNA-Strang mit Nukleotidtriphosphaten (dNTPs), die für die Basen (Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin) stehen, versehen. Dazu kommen mit jeweils anderen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Didesoxy-Varianten (ddNTPs) jeder Base. In einem Reaktionsgefäß wird der DNA-Doppelstrang getrennt, Primer und DNA-Polymerase starten die Synthese. Wird eines der markierten ddNTPs eingebaut, kommt es zum Kettenabbruch. Die Verlängerung der DNA ist nicht mehr möglich, da die OH-Gruppe zur Verknüpfung fehlt. Es entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mit einem Laser zur Fluoreszenz angeregt werden. Ein Detektor erkennt die farbigen ddNTPs an jedem Fragment-Ende und erstellt ein Chromatogramm des sequenzierten Stranges.

Bei der Kapillarelektrophorese werden geladene Teilchen im elektrischen Feld aufgetrennt.

Die Trennung erfolgt in einer Elektrolytlösung, in einem dünnen Kapillarrohr.

Gilbert und Sanger erhielten 1980 für die Arbeit den Nobelpreis für Chemie.

## 10.3 Fixierung von Umweltproben

### **Fixierung mit Ethanol**

- Die Probe wurde mit derselben Menge (1:1) eiskaltem, 96% EtOH versetzt.

### **Fixierung mit Paraformaldehyd**

- Die Probe wurde 1:3 mit 4% PFA versetzt und mindestens 30 min bei Raumtemperatur fixiert.
- Zur Endfixierung wurde zentrifugiert (15000 rpm, 15 min) und der Überstand verworfen. Das entstandene Pelett wurde mit PBS gewaschen und erneut



zentrifugiert (15000 rmp, 15 min). Das Pelett wurde, je nach Größe, in 100-500 µl PBS gelöst und mit derselben Menge EtOH versetzt.

Die so fixierten Proben können im Gefrierschrank längere Zeit aufbewahrt werden.

## 10.4 Rezepte I

### **Plate Count Agar (PC)**

PC-Agar 22,5g

Dest. Wasser 1l

pH = 7,2

Das Medium wurde als fertiges Granulat von der Firma Merck bestellt.

### **Thioglycolat Agar** (Braune et al., 1982)

Hefeextrakt 5g

Caseinpepton 15g

Glucose 5,5g

Na-Thioglycolat 0,5g

NaCl 2,5g

1-Cysteinhydrochlorid 0,5g

Agarose 15g

Dest. Wasser 1l

pH = 7,2

## 10.5 Rezepte II - Selektivmedien

### **Medium für Purpurbakterien** (Lindquist, 1975)

Kaliumdihydrogensulfat 0,33g

Magnesiumsulfat 0,33g

NaCl 0,33g

Calciumchlorid 0,05g

Bernsteinsäure 0,8g

Hefeextrakt 0,02g

Spurenelemente 1ml

Dest. Wasser 1l

pH = 7

Nach dem Autoklavieren und Zugabe der Probe wird das Medium mit sterilem Paraffinöl überschichtet, um zu verhindern daß Sauerstoff nach unten dringt.

### **Medium für schwefelabspaltende Bakterien** (Schröder, 1977)

Das Medium wurde in zwei Ansätzen, mit jeweils anderer Schwefelquelle, hergestellt.

PC 22,5g/l

EisenIIIzitat 1g/l

Cystin 1g/l

und

PC 22,5g/l

EisenIIIzitat 1g/l

Methionin 1g/l

Die Proben werden nach Autoklavieren des Mediums ausgestrichen.

### **Medium für harnstoffspaltende Bakterien**

Modifiziert nach (Schröder, 1977)

Plate-Count Agar für 150ml

Dest. Wasser 100ml

Bromthymolblau

Das Medium wird mit Bromthymolblau gefärbt, bis es eine satte grüne Farbe entwickelt hat. Nach dem Autoklavieren werden 50ml einer sterilen, 3%igen Harnstofflösung zugegeben.

### **Medium für proteinspaltende Bakterien** (Migula, 1903)

Pepton 5g

Glucose 1g

Hefeextrakt 2,5g

Gelatine 100g

Dest. Wasser 1l

pH = 7

Beim Ansetzen des Mediums sollte die Gelatine eine Zeit lang quellen und anschließend erwärmt, aber nicht aufgekocht werden. Das Sterilisieren erfolgt 2 Mal im strömenden Dampf, da anders die Gelierfähigkeit verloren geht.

#### **Medium für schwefeloxidierende Bakterien** (Hines et al., 2002)

NH<sub>4</sub>Cl 200mg

CaCl<sub>2</sub> 225mg

KCl 200mg

MgCl<sub>2</sub> 200mg

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20mg

Spurenelemente (Widdel und Hansen, 1991) 1ml

Agarose 30g

Dest. Wasser 1l

Bromthymolblau

Das Medium wird 2 Mal angesetzt, mit Bromthymolblau grün gefärbt und mit folgenden 5 Zusätzen getrennt autoklaviert:

2 Mal 2g Natriumcarbonat/100ml

2 Mal 25g NaThiosulfat/100ml

0,4g NaAcetat/50ml

In der Sterilbank werden die Ansätze zu den Medien zugegeben, wobei bei einem Teil des Mediums NaAcetat für heterotrophe Bakterien zugegeben wird.

Da die Bakterien photosynthetisch aktiv sein können, werden die Petrischalen in einem hellen Raum inkubiert.

## 10.6 Rezepte III

#### **Nährmedium für Aktinobakterien** (Papageorgiou, 2003)

Fleischextrakt: Zu Faschiertem (Rind- oder/und Schweinefleisch) doppelte Menge dest. Wasser hinzufügen, 30 Minuten kochen, abseihen.

Medium:

Glycerin 20ml

MgSO<sub>4</sub> 0,1g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g

Agar 15g

Glyzin 2,5g

Extrakt 1l

pH = 7

Nach dem Autoklavieren, werden 0,1g/l des Antibiotikums Tetracyclin steril dazufiltrierte.

### **Champignon Nährmedium für Myxobakterien (Url, 1987)**

Champignonextrakt:

Champignons 100g

NaCl 5g

Dest. Wasser 1l

Den Ansatz 30 Minuten kochen, filtrieren und auf 1l auffüllen.

Nährmedium:

Champignonextrakt 500ml

NaHPO<sub>4</sub> 1g

NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1g

MgSO<sub>4</sub> 0,5g

Agar 20g

Dest. Wasser 500ml

pH = 6,8 – 7,2

## 11. Literaturverzeichnis

- Adamec L. (1997) Will the rare aquatic carnivorous plant *Aldrovanda vesiculosa* survive in Europe? *Aquaphyte Newsletter* 17, 4-5
- Addicott J. F. (1974) Predation and prey community structure: an experimental study of the effect of mosquito larvae on the protozoan communities of pitcher plants. *Ecology* 55, 475-492
- Adlassnig W. (2007) Ökophysiologie karnivorer Kesselfallenpflanzen. Dissertation, Universität Wien, Wien. 541 pp.
- Adlassnig W., Peroutka M., Lichtscheidl I. K. und Lambers H. (2005a) Roots of carnivorous plants. In: Lambers H. und Colmer T. D. (Ed.), *Root physiology: from gene to function*. Kluwer Academic Publishing, 127-140
- Adlassnig W., Peroutka M., Lichtscheidl I. K. und Lambers H. (2005b) Roots of carnivorous plants. *Plant and Soil* 274, 127-140
- Aeschimann D., Lauber K., Moser D. M. und Theurillat J.-P. (2004) *Flora Alpina*. Ein Atlas sämtlicher 4500 Gefäßpflanzen der Alpen. Haupt-Verlag, Bern. 1159 pp.
- Amann I. R. (1995) In situ hybridisation of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. *Molecular Microbial Ecology* 1-15
- Amann R., Binder B. J., Olseon R. J., Chiholm S. W., Devereux R. und Stahl D. A. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analysing mixed microbial populations. *Applied Environmental Microbiology* 56, 1919-1925
- Barthlott W., Porembski S., Seine R. und Theisen I. (2004) *Karnivoren*. Biologie und Kultur fleischfressender Pflanzen. Eugen Ulmer, Stuttgart. 224 pp.
- Benzing D. H. (1987) The origin and rarity of botanical carnivory. *TREE* 2, 364-369
- Benzing D. H. und Renfrow A. (1974) The mineral nutrition of Bromeliaceae. *Botanical Gazette* 135, 281-288
- Bradshaw W. E. und Creelman R. A. (1984) Mutualism between the carnivorous purple pitcher plant and its inhabitants. *American Midland Naturalist* 112, 294-304
- Braem G. (2002) *Fleischfressende Pflanzen*. Arten und Kultur. Augustus Verlag, München. 134 pp.
- Braune W., Leman A. und Taubert H. (1982) *Planzenanatomisches Praktikum II*. Einführung in den Bau, das Fortpflanzungsgeschehen und die Ontogenie der niederen Pflanzen und die Embryologie der Spermatophyta. Gustav Fischer Verlag, Jena. 426 pp.

- Brewer J. S. (1999) Short-term effects of fire and competition on growth and plasticity of the yellow pitcher plant, *Sarracenia alata* (Sarraceniaceae). *American Journal of Botany* 86, 1264
- Brown W. H. (1916) The mechanisms of movement and the duration of the effect of stimulation in the leaves of *Dionaea*. *American Journal of Botany* 3, 68-90
- Burdon-Sanderson J. S. (1873) Note on the electrical phenomena which accompany stimulation of the leaf of *Dionaea muscipula*. *Proceedings of the Royal Society (London)* 21, 495-496
- Caldwell D. E., Caldwell S. J. und Tiedje J. M. (1975) An ecological study of the sulfur-oxidizing bacteria from the littoral zone of a Michigan lake and a sulfur spring in Florida. *Plant and Soil* 43, 101-114
- Campbell N. A. (2000) *Biologie*. Spektrum, Heidelberg. 1440 pp.
- Canby W. M. (1875) *Darlingtonia californica*. Eine Insektenfresserin. *Österreichische Botanische Zeitschrift* 9, 287-293
- Carniel E., Autenrieth I., Cornelis G., Fukushima H., Guinet F., Isberg R., Pahn J., Prentice M., Simonet M., Skurnik M. und Wauters G. (2006) *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H. und Stackebrandt E. (Ed.), *The Prokaryotes*. Springer, New York. 270-398
- Carow T. und Fürst R. (1990) *Fleischfressende Pflanzen. Artenübersicht - Kultur - Vermehrung. Mit neu überarbeiteter Insektivoren-Artenliste*. Verlag Thomas Carow, Nüdlingen. 71 pp.
- Clarke C., Moran J., Merbach M., Frazier C. und Chua L. (2001) *Nepenthes* of Summatra and peninsular Malaysia. *Natural History Publications (Borneo)*, Kota Kinabalu. 325 pp.
- Cochran-Stafira D. L. und von Ende C. N. (1998) Integrating bacteria into food webs: studies with *Sarracenia purpurea* inquilines. *Ecology* 79, 880-898
- Corbet P. S. (1983) Odonata in phytotelmata. In: Frank J. H. und Lounibos L. P. (Ed.), *Phytotelmata: Terrestrial plants as hosts for aquatic insect communities*. Plexus Publishing, Medford. 29-54
- D'Alessi F. (2004) Report of a high latitude population of *Sarracenia purpurea* ssp. *purpurea* growing on poisonous deep mantle rocks. 5 I. C. P. S. Congress, Lyon. 33
- Danser B. H. (1928) The Nepenthaceae of the Netherland Indies. *Bulletin du Jardin Botanique Buitenzorg* 9, 249-438
- Darwin C. (1875) *Insectivorous Plants*. John Murray, London. 462 pp.
- Davey G., Simpson L. O. und Kalmakoff J. (1975) Localisation and pathology of *Mortierella wolfii* toxin in mice. *Journal of Pathology* 117, 33-37
- de Bary H. A. (1879) *Die Erscheinung der Symbiose*. Karl J. Trübner Verlag, Stassburg, Deutschland. 30 pp.

- Devecka A. (2007) Diversität der *Nepenthes*-Falle unter besonderer Berücksichtigung der Oberflächenstrukturen und ihrer Rolle beim Beutefang. Diploma Thesis, Technische Universität Zvolen, Zvolen. 123 pp.
- Diderot D. und d'Alembert J. (Ed.) (1775) Encyclopedie, ou dictionnaire universel raisonne des connoissances humaines. M. Felice Plance, Yverdon. 130 pp.
- Edelstein P. und Cianciotto N. (2006) *Legionella* species and legionnaire's lisease. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H. und Stackebrandt E. (Ed.), The Prokaryotes. Springer, New York. 988-1033
- Ellison A. M. (2005a) Nutrient limitation and stoichiometry of carnivorous plants: is it time to reassess the costbenefit model for their evolution? XVII International Botanical Congress, Vienna.
- Ellison A. M. (2005b) Turning the tables: Plants bite back. FALL 2005, 25-30
- Ellison A. M. (2006) Nutrient limitation and stoichiometry of carnivorous plants. Plant Biology 8, 740-747
- Ellison A. M., Buckley H. L., Miller T. E. und Gotelli N. J. (2004) Morphological variation in *Sarracenia purpurea* (Sarraceniaceae): geographic, environmental, and taxonomic correlates. American Journal of Botany 91, 1930-1935
- Ellison A. M. und Gotelli N. J. (2001) Evolutionary ecology of carnivorous plants. Trends in Ecology & Evolution 16, 623 - 629
- Fleming R. (1979) Hybrid *Nepenthes*. Carnivorous Plants Newsletter 8, 10 - 12
- Frank J. H. und Lounibos L. P. (Ed.) (1983) Phytotelmata: Terrestrial plants as hosts for aquatic insect communities. Plexus Publishing, New Jersey. 293 pp.
- Frazier C. K. (2000) The enduring controversies concerning the process of protein digestion in *Nepenthes* (Nepenthaceae). Carnivorous Plant Newsletter 29, 56-61
- Fürsch H. (2001) *Sarracenia purpurea* im Bayrischen Wald. Berichte der Bayrischen Botanischen Gesellschaft 71, 169-170
- Gallie D. R. und Chang S.-C. (1997) Signal transduction in the carnivorous plant *Sarracenia purpurea*. Plant Physiology 115, 1461-1471
- Gebühr C., Pohlson E., Schmidt A. R. und Küsel K. (2005) Development of the microalgae communities in the phytotelmata of *Sarracenia purpurea* L. XVII International Botanical Congress, Vienna.
- Gibson T. C. (1999) Differential escape from insects from carnivorous plant traps. American Midland Naturalist 125, 55-62
- Givnish T. J. (1989) Ecology and evolution of carnivorous plants. In: Abrahamson W. G. (Ed.), Plant-animal interactions. McGraw-Hill, New York. 243-290

- Goettela M. S., Masanori K., Kim J. J., Aiuchib D., Shinyad R. und Brodeure J. (2008) Potential of *Lecanicillium spp.* for management of insects, nematodes and plant diseases. *Journal of Invertebrate Pathology* 98, 256-261
- Grabherr G. (1997) *Farbatlas Ökosysteme der Erde. Natürliche, naturnahe und künstliche Land-Ökosysteme aus geobotanischer Sicht.* Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart. 364 pp.
- Grimont F. und Grimont P. (2006) The genus *Serratia*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H. und Stackebrandt E. (Ed.), *The Prokaryotes.* Springer, New York. 219-244
- Groth I., Schumann P., Weiss N., Martin K. und Rainey F. A. (1996) *Agrococcus jenensis* gen. nov., sp. nov., a new genus of actinomycetes with diaminobutyric acid in the cell wall. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46, 234-239
- Hartmeyer S. (1998) Carnivory in *Byblis* Revisited II: The phenomenon of symbiosis on insect trapping plants. *Carnivorous Plant Newsletter* 27, 110-113
- Hepburn J. S. (1918) Biochemical studies of the pitcher liquor of *Nepenthes*. *Proceedings of the American Philosophical Society* 57, 112-129
- Hepburn J. S., Jones F. M. und St. John E. Q. (1927) The biochemistry of the American pitcher plants: Biochemical studies of the North American Sarraceniaceae. *Transactions of the Wagner Free Institute of Science of Philadelphia* 11, 1-95
- Higashi S., Nakashima A., Ozaki H., Abe M. und Uchiumi T. (1993) Analysis of feeding mechanism in a pitcher of *Nepenthes hybrida*. *Journal of Plant Research* 106, 47-54
- Hines M. E., Visscher P. T. und Devereux R. (2002) Sulfur Cycling. In: Crawford R. L., Knudsen G. R., McInerney M. J. und Stetzenbach L. D. (Ed.), *Manual of environmental microbiology.* ASM Press, Washington D.C. 427-438
- Holmes B. (1993) Evolution's neglected superstars: There is nothing glamorous about fleas, flukes or intestinal worms. So why are they suddenly attracting so much attention? *New Scientist Magazine* 1898, 30-33
- Imhoff J. F. (2006) The Phototrophic Betaproteobacteria. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H. und Stackebrandt E. (Ed.), *The Prokaryotes.* Springer, New York. 593-601
- Isack H. A. und Reyer H. U. (1989) Honeyguides and honey gatherers: Interspecific communication in a symbiotic relationship. *Science* 243, 1343-1346
- Johnson P. T. J., Lunde K. B., Ritchie E. G. und Launer A. E. (1999) The effect of trematode infection on amphibian limb development and survivorship. *Science* 284, 802-804
- Juniper B. E., Robins R. J. und Joel D. M. (1989) *The carnivorous plants.* Academic Press Limited, London. 353 pp.
- Juretschko S., Timmerman G., Schmid M., Schleifer K. H., Pommerenig-Roser A., Koops H. P. und Wagner M. (1998) Combined molecular and conventional analysis of



- nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3024-3051
- Kane M. D., Poulsen L. K. und Stahl D. A. (1993) Monitoring the enrichment and isolation of sulfate-reducing bacteria by using oligonucleotide hybridisation probes designed from environmentally derived 16SrRNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 682-686
- Kelly M. S. (1989) Distribution and biomass of aquatic macrophytes in an abandoned nuclear cooling reservoir. *Aquatic Botany* 35, 133-152
- Kimmig J. und Rieth H. (1953) Antimykotica in Experiment und Klinik. *Arzneimittelforschung* 3, 267-276
- Kingsolver J. G. (1981) The effect of environmental uncertainty on morphological design and fluid balance in *Sarracenia purpurea* L. *Oecologia* 48, 364-370
- Kishimoto, Kosako, Wakao, Tano und Hiraishi (1996) Genus IV *Acidocella*. In: Garrity G. (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Biology*. Springer, New York. 65-68
- Kitching R. L. (2000) Food webs and container habitats. The natural history and ecology of phytotelmata. Cambridge University Press, Cambridge. 431 pp.
- Kristinsson H. (2006) Flowering plants and ferns of iceland. Edda UK Ltd., Reykjavik. 311 pp.
- Lendl T., Adlassnig W., Peroutka M. und Lichtscheidl I. K. (2006) The carnivorous syndrome of *Genlisea*. XV FESPB Congress, Lyon. 195
- Li H. (2005) Early cretaceous sarraceniaceae-like pitcher plants from China. *Acta Botanica Gallica* 152, 227-234
- Lindquist J. (1975) Bacteriological and ecological observations of the Northern Pitcher Plant, *Sarracenia purpurea* L. *Carnivorous Plant Newsletter* 4, 65 - 66
- Lloyd F. E. (1942) The carnivorous plants. Ronald Press, New York. 352 pp.
- Lücker S. (2004) Entwicklung und Evaluierung 16S-rRNA-gerichteter Oligonukleotidsonden zum spezifischen Nachweis deltaproteobakterieller Sulfatreduzierer mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung und Erweiterung des dsrAB-Sequenzdatensatzes. Diplomarbeit, Technische Universität, München. 125 pp.
- Mabberley W. J. (2000) The Plant Book. Cambridge University Press, Cambridge. 858 pp.
- Makkar und Casida (2005) *Cupriavidus*. In: Garrity G (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Biology*. Springer, New York. 600-604
- Mayer E. (2005) Karnivore Kesselfallenpflanzen - Untersuchungen zur Verdauung, Nährstoffaufnahme und Mikroflora. Diplomarbeit, Universität Wien, Wien. 171 pp.

- Mette N., Wilbert N. und Barthlott W. (2000) Food composition of aquatic bladderworts (*Utricularia*, Lentibulariaceae) in various habitats. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* 72, 1-13
- Meyers-Rice B. (1998) Testing the appetites of *Ibicella* and *Drosophyllum*. *Carnivorous Plant Newsletter* 28, 40-43
- Midgley J. J. und Stock W. D. (1998) Natural abundance of  $\delta^{15}\text{N}$  confirms insectivorous habit of *Roridula gorgonias*, despite it having no proteolytic enzymes. *Annals of Botany* 82, 387-388
- Migula W. (1903) *Die Bakterien*. Verlagsbuchhandlung von J. J. Weber, Leipzig. 191 pp.
- Migula W. (1912) *Pflanzenbiologie*. G.J. Gößchen'sche Verlagshandlung, Leipzig. 127 pp.
- Miyagawa K. (1989) Experimental Analysis of the symbiosis between anemonefish and sea anemones. *Ethology* 80, 19-46
- Moore E., Tindall B., Martins dos Santos V., Pieper D., Ramos J. und Palleroni N. (2006) Nonmedical: Pseudomonas. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H. und Stackebrandt E. (Ed.), *The Prokaryotes*. Springer, New York. 646-703
- Moran J. A. (1996) Pitcher dimorphism, prey composition and the mechanisms of prey attraction in the pitcher plant *Nepenthes rafflesiana* in Boreo. *Journal of Ecology* 84, 515-525
- Mouquet N., Daufresne T., Gray S. M. und Miller T. E. (2008) Modelling the relationship between a pitcher plant (*Sarracenia purpurea*) and its phytotelma community: mutualism or parasitism? *Functional Ecology* 22, 728-737
- Müller K., Borsch T., Legendre L., Porembski S., Theisen I. und Barthlott W. (2004) Evolution of carnivory in Lentibulariaceae and Lamiales. *Plant Biology*. 6, 477-490
- Napp-Zinn K. (1984) Experimentelle und ökologische Anatomie des Angiospermenblattes. C. Karnivore Angiospermen. In: Braun H. J., Carlquist S., Ozenda P. und Roth I. (Ed.), *Handbuch der Pflanzenanatomie*. Gebrüder Borntraeger, Berlin. 394-422
- Okahara K. (1933) Physiological studies on *Drosera* IV: On the function of microorganisms in the digestion of insect bodies by insectivorous plants. *Scientific Reports of Tohoku Imperial University* 151-168
- Pant D. D. und Bhatnagar S. (1977) Morphological studies in *Nepenthes* (Nepenthaceae). *Phytomorphology* 27, 13-34
- Papageorgiou B. (2003) Untersuchung zur phytosantiären Wirksamkeit und zu Wirkmechanismen wässriger Extrakte aus westafrikanischen Bioabfallkomposten gegen pilzliche Pathogene. PhD-Arbeit, Humboldt-Universität, Berlin. 133 pp.
- Peroutka M., Adlassnig W., Lendl T., Pranjic K. und Lichtscheidl I. K. (2008a) Functional Biology of Carnivorous Plants. In: Silva J. A. T. d. (Ed.), *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*. Global Science Books, Isleworth, UK. 267-286

- Peroutka M., Adlassnig W., Lendl T., Volgger M., Url W. G. und Lichtscheidl I. (2008b) *Utricularia* - eine vegetarische karnivore Pflanze? XVII ATSPB Congress, Stainz, Austria. 143
- Plummer G. L. und Kethley J. B. (1964) Foliar absorption of amino-acids, peptides and other nutrients by the pitcher-plant *Sarracenia flava*. Botanical Gazette 125, 245-260
- Poindexter J. S. (2006) Dimorphic prosthecate bacteria: The genera *Caulobacter*, *Asticcacaulis*, *Hyphomicrobium*, *Pedomicrobium*, *Hyphomonas* and *Thiodendron*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H. und Stackebrandt E. (Ed.), The Prokaryotes. Springer New York, 72-90
- Pranjic K. (2004) Zur Ökologie Karnivorer Pflanzen: Die Rolle von Mikroorganismen beim Abbau von Tieren durch fleischfressende Pflanzen. Diplomarbeit, Universität Wien, Wien. 145 pp.
- Prankevicius A. B. und Cameron D. M. (1991) Bacterial dinitrogen fixation in the leaf of the northern pitcher plant (*Sarracenia purpurea*). Canadian Journal of Botany 69, 2296-2298
- Ratsirarson J. und Silander J. A. (1996) Structure and dynamics in *Nepenthes madagascariensis* pitcher plant micro-communities. Biotropica 28, 218-227
- Raven J. A. (1997) Phagotrophy in phototrophs. Limnology and Oceanography 42, 198-205
- Reeves W. K. (2004) Temporal distributions of *Smittium culisetae* in a wild population of *Wyemyia smithii* from pitcher plants. Mycologia 96, 1233-1235
- Reuter L. (1938) Protoplasmatik der Stomata-Zellen der Gleitzzone der *Nepenthes*-Kanne. Protoplasma 30, 273-282
- Rice B. (2007) Carnivorous plants with hybrid trapping strategies. Carnivorous Plant Newsletter 36, 23-27
- Roberts P. R. und Oosting J. J. (1958) Responses of Venus fly trap (*Dionea muscipula*) to factors involved in its endemism. Ecological Monographs 28, 193 - 218
- Ruby J. und Goldner M. (2007) Nature of symbiosis in oral disease. Journal of Dental Research 86, 8-11
- Samson R. A., Hoekstra E. S. und Frisvad J. C. (2004) Introduction to food- and airborne fungi. CBS, Wageningen, 398 pp.
- Sanger F., Nicklen S. und Coulson A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 74, 5463-5467
- Schnepf E. (1963) Zur Cytologie und Physiologie pflanzlicher Drüsen. 1. Teil. Über den Fangschleim der Insectivoren. Flora 153, 1-22
- Schröder H. (1977) Mikrobiologisches Praktikum. Volk und Wissen Volkseigener Verlag, Berlin. 220 pp.

- Schulze E.-D., Beck E. und Müller-Hohenstein K. (2002) Plant Ecology. Springer, Berlin. 702 pp.
- Sessions S. K. und Ruth S. B. (1990) Explanation for naturally occurring supernumerary limbs in amphibians. *Journal of Experimental Zoology* 254, 38-47
- Slack A. (1985) Karnivoren. Biologie und Kultur der insektenfangenden Pflanzen. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart. 267 pp.
- Slack A. (2000) Carnivorous Plants. MIT-Press, Yeovil. 240 pp.
- Sota T., Mogi M. und Kato K. (1998) Local and regional-scale food web structure in *Nepenthes alata* pitchers. *Biotropica* 30, 82-91
- Srivastava D. S., Kolasa J., Bengtsson J., Gonzalez A., Lawler S. P., Miller T. E., Munguia P., Romanuk T., Schneider D. C. und Trzcinski M. K. (2004) Are natural microcosms useful model systems for ecology? *Trends in Ecology & Evolution* 19, 379-384
- Streekstra H. (1997) On the safety of *Mortierella alpina* for the production of food ingredients, such as arachidonic acid. *Journal of Biotechnology* 56, 153-165
- Taylor P. (1994) The genus *Utricularia* - a taxonomic monograph. Royal Botanic Gardens, Kew, London. 724 pp.
- Trécul M. A. (1855) Feuilles du *Drosera rotundifolia*. *Annales de Sciences Naturelles* 4e, 303-311
- Url E. (1987) Vorkommen und Nachweis von Myxobakterien im Grundwasser und ihre Bedeutung als Indikator bei der Beurteilung der Wasserqualität. Dissertation, Universität Wien, Wien. 147 pp.
- van Oye P. (1921) Zur Biologie der Kanne von *Nepenthes melamphora* Reinw. *Biologisches Zentralblatt* 41, 529-534
- Varga L. (1928) Ein interessanter Biotop der Biocönose von Wasserorganismen. *Biologisches Zentralblatt* 48, 143-162
- Veitch H. J. (1897) *Nepenthes*. *Journal of the Royal Horticultural Society* 21, 226-256
- Wagner M., Horn M. und Daims H. (2003) Fluorescence in situ hybridisation for the identification of prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology* 6, 302-309
- Widdel F. und Hansen T. A. (1991) The dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing bacteria. In: Balows A., Trüper H. G., Dworkin M., Harder W. und Schleifer K. H. (Ed.), *The Prokaryotes*. Springer, New York. 583-634
- Willems A., De Ley J., Gillis M. und Kersters K. (2005) Comamonadaceae, a New Family Encompassing the acidovorans rRNA Complex, Including *Variovorax paradoxus* gen. nov., comb. nov., for *Alcaligenes paradoxus* (Davis 1969). *International Journal of Systematic Bacteriology* 41, 445-450

Yabuuchi, Yano, Oyaizu, Hashimoto, Ezaki und Yamamoto (2005) *Sphingomonas*. In:  
Garrity G (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, New York.  
234-258

## LEBENS LAUF

### Barbara Christina Müllner

Universität Wien, Fakultät für Lebenswissenschaften,  
Abteilung Zellphysiologie und Wissenschaftlicher Film,  
Althanstrasse 14, A-1090 Wien

E-Mail: [a0206166@unet.univie.ac.at](mailto:a0206166@unet.univie.ac.at)

Homepage: <http://www.univie.ac.at/IECB/cell/staff/barbara.htm>

Geboren am: 12. Januar 1983  
Geboren in: Wien  
Familienstand: ledig  
Staatsbürgerschaft: Österreich

### Schulbildung

1988 – 1992 Volksschule Leobersdorf, NÖ  
1992 – 2001 BG und BRG Frauengasse, Baden, NÖ  
Februar – März 2000 Sprachreise nach Washington D.C., USA  
Juni 2001 Matura am BRG Frauengasse, Spezialgebiete  
Biologie und Musik

### Hochschulstudium

2001 – 2002 Pädagogische Akademie Baden  
Oktober 2002 Immatrikulation an der Universität Wien, Inskription  
der Studienrichtung Biologie  
Juni 2006 Abschluss des ersten Studienabschnittes, Inskription  
der Studienrichtung Ökologie  
Mai 2007 Beginn der Diplomarbeit an der Abteilung  
Zellphysiologie und Wissenschaftlicher Film  
Mai 2009 Abschluss des Diplomstudiums Ökologie

## Tutorien an der Universität Wien

- März 2008 – Juni 2008  
Analoge und Digitale Fotografie zur wissenschaftlichen Dokumentation
- Oktober 2008 – Februar 2009  
Projektpraktikum: Funktionelle Cytologie und Anatomie der Pflanze - Struktur und Funktion der Drüsen fleischfressender Pflanzen
- März 2009 – Juni 2009  
Lebenszyklen der Pflanzen

## **Publikationen**

- Mitwirkung am Unterrichtsfilm: W. Adlassnig, T. Lendl, M. Peroutka, I. K. Lichtscheidl: Ökosystem Moor, Dvd 60 min, Universität Wien, Abteilung Zellphysiologie und Wissenschaftlicher Film, 2008
- B. C. Müllner, W. Adlassnig, E. Mayer, I. K. Lichtscheidl: Mikroorganismen als Symbionten karnivorer Kesselfallenpflanzen - Bakterien, Pilze und Protisten in den Fallen von *Nepenthes ventrata* und *Sarracenia purpurea*, ÖAPP-Tagung in Stainz (Steiermark), Juni 2008
- B. C. Müllner, W. Adlassnig, E. Mayer, I. K. Lichtscheidl: Microorganisms as Symbionts of Carnivorous Pitcher Plants - Bacteria, Fungi and Protists in Traps of *Nepenthes ventrata* and *Sarracenia purpurea*, FESPB-Kongress in Tampere (Finnland), August 2008