



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Morphological and molecular analysis of *Laxus oneistus* juveniles and their bacterial ectosymbiont“

verfasst von

Amir Schmidt

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, im September 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 444

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Ökologie

Betreut von:

Univ. Prof. Dr. Jörg Ott



# INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                                              |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>EINLEITUNG .....</b>                                                                      | <b>5</b>  |
| DER BEGRIFF SYMBIOSE IM HISTORISCHEN KONTEXT .....                                           | 5         |
| FORMEN DER SYMBIOSE .....                                                                    | 5         |
| CHEMOAUTOTROPHE SYMBIOSEN .....                                                              | 7         |
| TRANSMISSION DER BAKTERIELLEN SYMBIONTEN .....                                               | 9         |
| EINFÜHRUNG IN DIE <i>LAXUS ONEISTUS</i> SYMBIOSE .....                                       | 9         |
| <b>FRAGESTELLUNG .....</b>                                                                   | <b>11</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                                        | <b>12</b> |
| <b>INTRODUCTION .....</b>                                                                    | <b>13</b> |
| <b>METHODS .....</b>                                                                         | <b>15</b> |
| SPECIMEN COLLECTION .....                                                                    | 15        |
| SCANNING ELECTRON MICROSCOPY .....                                                           | 15        |
| DNA EXTRACTION AND PCR AMPLIFICATION OF 16S AND 18S rRNA-GENE .....                          | 16        |
| 16S AND 18S rRNA-GENE LIBRARY .....                                                          | 16        |
| PCR AMPLIFICATION OF PLANCTOMYCETES SPECIFIC GENE OBTAINED FROM CLONE LIBRARY .....          | 17        |
| PHYLOGENETIC ANALYSIS .....                                                                  | 17        |
| IMMUNOFLUORESCENCE .....                                                                     | 17        |
| FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION (FISH) .....                                              | 18        |
| <b>RESULTS .....</b>                                                                         | <b>19</b> |
| MEASUREMENTS OF JUVENILE WORMS .....                                                         | 19        |
| AN ADULT-LIKE BACTERIAL COAT COVERS THE CUTICLE OF J1/2 NEMATODES .....                      | 20        |
| JUVENILE GSOS SECRETE THE ECTOSYMBIONT-BINDING LECTIN MERMAID .....                          | 22        |
| IDENTIFICATION AND LOCALIZATION OF BACTERIA ASSOCIATED TO <i>L. ONEISTUS</i> JUVENILES ..... | 23        |
| MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF GAMS .....                                                 | 24        |
| MOLECULAR IDENTIFICATION OF GAMS .....                                                       | 28        |
| THE GSO-ASSOCIATED PLANCTOMYCETE CLUSTERS WITH THE PLA4 LINEAGE .....                        | 31        |
| <b>DISCUSSION .....</b>                                                                      | <b>33</b> |
| JUVENILE NEMATODES AND THEIR ECTOSYMBIONT .....                                              | 33        |
| GAM .....                                                                                    | 34        |
| <b>CONCLUSION .....</b>                                                                      | <b>35</b> |
| <b>REFERENCES .....</b>                                                                      | <b>36</b> |
| <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>                                                                 | <b>43</b> |
| <b>DANKSAGUNG .....</b>                                                                      | <b>44</b> |
| <b>CURRICULUM VITAE .....</b>                                                                | <b>45</b> |



# **EINLEITUNG**

## **Der Begriff Symbiose im historischen Kontext**

Das Wort Symbiose hat seinen Ursprung im Griechischen und formiert sich aus den beiden Wörtern σύν (syn) für „zusammen“ und βίος (bios) für „Leben“. Es existieren verschiedene Definitionen von Symbiose. Die Älteste geht auf den deutschen Arzt und Mykologen Anton de Bary zurück. In seiner Abhandlung „Die Erscheinung der Symbiose“ führte er 1878 den Begriff in die Biologie ein. Er definierte ihn als das „Zusammenleben ungleichnamiger Organismen“ und verwendete Symbiose als Überbegriff für Mutualismus (mit Vorteilen für alle Partner), Kommensalismus (kein Partner geschädigt) und Parasitismus (ein Partner geschädigt) (de Bary, 1878). Diese Definition ist heute weit verbreitet und in der englischsprachigen, wissenschaftlichen Gemeinschaft akzeptiert. Es dauerte bis in die 70er Jahre des 20. Jahrhunderts bis zur Entdeckung der Relevanz der mikrobiellen Symbiosen im Zuge der Evolution der eukaryotischen Zelle (Sagan, 1967). Mit der Entwicklung von Methoden, wie etwa dem „full-cycle rRNA-Ansatz“, wurde es möglich die Vielfalt und die Verteilung von Mikroben in ihrer Umgebung zu analysieren (Amann et al., 1995). Diese und andere neue molekulare Werkzeuge, die in den letzten Jahrzehnten entwickelt wurden, erlaubten völlig neue Ansätze in der Symbioseforschung.

## **Formen der Symbiose**

Je nachdem welche Auswirkungen die jeweiligen Symbiosepartner auf die gegenseitige Fitness haben, werden folgend drei Kategorien unterschieden:

Profitieren beide Partner von dieser Interaktion wird von Mutualismus gesprochen. Zieht lediglich ein Partner einen Nutzen aus der Symbiose, schadet aber dadurch dem anderen nicht, spricht man von Kommensalismus und schadet ein Partner dem anderen, ist von Parasitismus die Rede. Diese Kategorien grenzen sich keineswegs ab, sondern laufen ineinander über. Parasitische Interaktionen können sich zu mutualistischen entwickeln und umgekehrt (Ahmadjian and Paracer, 1986). Besteht ein erheblicher Größenunterschied

zwischen den Symbiosepartnern, wird der größere oft als Wirt bezeichnet. Befindet sich der Symbiont außerhalb des Wirtsorganismus spricht man von Ektosymbiose. Solche Interaktionen können zwischen Bakterien, Archaeen, Protisten, Algen, Pilzen, Pflanzen und mehrzelligen Eukaryoten stattfinden (Bright and Bulgheresi, 2010). Ein Beispiel dafür ist der Einsiedlerkrebs (*Paguristes oculatus*), der eine Schmarotzerrose (*Calliactis parasitica*) auf seinem Gehäuse trägt. Diese sorgt für einen zusätzlichen Schutz vor Fraßfeinden des Krebses und profitiert als Gegenleistung von der Mobilität des Krebses (D.M. Ross, 1979). In der Endosymbiose befindet sich der Symbiont im Wirt und kann dort in den Zellen (intrazellulär) oder zwischen den Zellen (interzellulär) des Wirtes lokalisiert sein (Bright and Bulgheresi, 2010). Ein interessantes Exempel ist die Darmflora von Säugetieren. Es gibt mehr als  $10^{14}$  Zellen in einem menschlichen Körper. Noch faszinierender als diese große Menge an Zellen ist überdies, dass 90% davon nicht „menschlichen“ Ursprungs, sondern auf Mikroben zurückzuführen sind. Von diesem Standpunkt aus betrachtet ist der menschliche Körper ein Konsortium bestehend aus mehr als 300 Arten, zudem die meisten davon Bakterien sind. Manche dieser Arten sind ausschließlich im Darm des Menschen zu finden (Mc Arthur, 2006). In mutualistischen Bakterien-Tier-Symbiosen, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, können mikrobielle Symbionten sehr unterschiedliche Funktionen für den tierischen Wirt haben. In der Symbiose zwischen dem Kopffüßer *Euprymna scolopes* und dem Bakterium *Vibrio fischeri* nutzt der kleine Tintenfisch die Biolumineszenz seiner Symbionten um sich zu tarnen (Wei and Young 1989). Die Symbionten der Ameise *Cyphomyrmex costatus* inhibieren das Wachstum eines Parasiten, welcher einen von den Ameisen kultivierten Pilz befällt (Currie et al., 2006). In vielen Fällen tragen die Symbionten zur Ernährung des Wirtes bei. Bei sich von Pflanzensaft ernährenden Insekten etwa, komplettieren die bakteriellen Symbionten die kohlenhydratreiche Ernährung der Insekten mit der Bereitstellung von essentiellen Aminosäuren (Douglas and Prosser 1992).

## Chemoautotrophe Symbiosen

Chemoautotrophe Organismen (Bakterien und Archaeen) nutzen die Energie die frei wird wenn reduzierte, elektronenreiche, anorganische Verbindungen, wie z.B. Sulfid, Schwefel, Eisen(II)-oxid, Wasserstoff und Ammonium oxidiert werden, um Kohlenstoff zu fixieren (Nakagawa and Takai 2008; Emerson et al., 2007). Eine solche Energiequelle in marinen Lebensräumen sind die geothermisch reduzierten, schwefelwasserstoffreichen Ausstöße von hydrothermalen Quellen am Grund der Tiefsee. Die dort in hoher Abundanz anzutreffenden, chemoautotrophen Bakterien sind die Primärproduzenten in diesen Tiefseelebensgemeinschaften, die auch durch chemosynthetische Symbiosen geprägt sind. Die mund- und darmlosen Bartwürmer der Spezies *Riftia pachyptila*, welche in hoher Dichte um die hydrothermalen Quellen zu finden sind, beherbergen ihre schwefeloxidierenden Symbionten in einem speziellen Organ, dem Trophosom. Die Symbionten werden vom Wirt mit  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  und  $\text{O}_2$  aus dem heißen Wasser der hydrothermalen Quellen und der angrenzenden Wassersäule versorgt. Der Wirt wird im Gegenzug dazu mit organischen Verbindungen beliefert (Cavanaugh et al., 1983; Felbeck, 1981). Nach den ersten Beschreibungen aus der Tiefsee entdeckten Wissenschaftler das Vorkommen von chemoautotrophen Symbiosen in verschiedenen Lebensräumen, wie z.B. auch in küstennahen Sedimenten (Felbeck et al., 1981; Ott et al., 1982; Felbeck et al., 1983). Im Gegensatz zu den Biozönosen um die hydrothermalen Quellen, die elektronenreiche Verbindungen hauptsächlich aus vulkanischer Entgasung beziehen, haben Lebensgemeinschaften in Flachwassersedimenten Zugang zu reduzierten, anorganischen Verbindungen, die das Produkt organischer Zersetzung sind. Durch die Aktivität von heterotrophen Organismen, erhalten sich reduzierte Konditionen, in den meisten marinen Sedimenten, erst unter einer dünnen, oxidierten Schicht. Unter dieser Schicht werden organische Substanzen durch Prozesse wie Fermentation, Denitrifikation, Sulfatreduktion und Methanogenese durch mikrobielle Aktivität remineralisiert. Das durch die Reduktion von Sulfat (Desulfurikation) entstehende Sulfid, präzipitiert größtenteils an Metallionen und bleibt im reduzierten Sediment „gefangen“, während der Rest im Porenwasser gelöst bleibt und die oxische, photische Zone erreicht. Dort wird das Sulfid durch eine spontane,

chemische Reaktion oder von chemoautotrophen und photoautotrophen Bakterien zurück zu Sulfat oxidiert (Jorgensen, 1977; Jorgensen, 1982). Bei chemoautotrophen Symbiosen, in diesen Sedimenten, überbrückt der Wirt diese Lücke für seine thiotrophen Symbionten durch Verhaltensadaption oder durch morphologische Anpassungen. Der Wirt wird im Gegenzug durch die chemoautotrophe Ernährung entschädigt. Durch die Bildung von chemosynthetischen Symbiosen ist es für beide Partner möglich, neue Nischen zu erschließen. Es sind Eukaryoten von sechs verschiedenen Stämmen und ein Archaeon bekannt, die schwefeloxidierende Symbionten beherbergen. Die symbiotischen Bakterien gehören zu den thiotrophen Gamma-, Epsilonproteo- und Alphaproteobakterien (Dubilier et al., 2008; Gruber-Vodicka et al., 2011). Ein Beispiel für solch eine Symbiose sind die Stilbonematinae (Nematoda, Desmodoridae). Der Wirt, ein wenige Millimeter langer Fadenwurm, beliefert seine thiotrophen Symbionten mit Sauerstoff und Sulfid, indem er wiederholt von den tieferen, reduzierten Schichten des Sedimentes in obere, oxische Schichten wechselt. Infolge dieses Verhaltens des Wirtes werden die Symbionten, die sich auf der Kutikula des Wurmes befinden, mit Energie versorgt. Der Nematode weidet seine bakterielle Monokultur als Gegenzug ab (Ott und Novak, 1989; Ott et al., 1991). Ähnlich wie die Stilbonematinae, migrieren Vertreter der Gattung *Olavius* sp. (Oligochaeta/Phallodrilinae) durch das Sediment. Der Oligochaete beherbergt seine extrazellulären, schwefeloxidierenden, bakteriellen Symbionten unter dem Ektoderm, wo sie interzellulär lokalisiert sind (Dubilier et al., 1999). Beim Plathelminthen *Paracatenula* sp. werden die Bakterien als Endosymbionten innerhalb von speziellen Zellen, den Bakteriozyten, gehalten und zugleich nehmen diese einen Großteil des Körpervolumens des Tieres ein (Ott et al., 1982; Gruber-Vodicka et al., 2011; Leisch et al., 2011). Oft haben Wirte mit chemoautotrophen Symbionten einen reduzierten Verdauungstrakt. Nematoden der Gattung *Astomonema* (Ott et al., 1982), weiterhin auch die Bartwürmer (Siboglinidae) um die hydrothermalen Quellen der Tiefsee, besitzen im Adultstadium weder Mundöffnung noch Verdauungstrakt (Felbeck, 1981).

## **Transmission der bakteriellen Symbionten**

Bei der Transmission oder dem Weiterreichen von Symbionten von einer Generation zur nächsten, können im Wesentlichen zwei Vorgangsweisen unterschieden werden.

Überträgt man die Symbionten direkt von den „Eltern“ auf die Nachkommen, wird dies als vertikale Transmission bezeichnet. Werden die Symbionten der Nachkommen hingegen ausschließlich aus der Umwelt „rekrutiert“, ist es eine strikte, horizontale Transmission. Oft kommt es jedoch zu einer Vermischung beider Vorgehensweisen, wenn beispielsweise eine vertikale Transmission durch eine gelegentliche oder regulär auftretende, horizontale Transmission komplettiert wird (Bright und Bulgheresi, 2010). Ein guter Indikator für eine strikte, vertikale Transmission ist eine vollkommene Übereinstimmung der Wirt- und Symbiont-Phylogenie über eine große Anzahl von Wirten und Taxa hinweg (Moran et al., 2008).

## **Einführung in die *Laxus oneistus* Symbiose**

Mitglieder der Unterfamilie Stilbonematinae (Nematoda, Desmodoridae) sind für ihre spezifische Assoziation mit schwefeloxidierenden Bakterien als Ektosymbionten unverwechselbar (Zusammengefasst in Ott et al., 2004). Diese freilebenden, marinen Nematoden sind aus allen großen Ozeanen bekannt, mit der höchsten Abundanz und Vielfalt in den tropischen Regionen. Als Teil der Meiofauna bewohnen die Würmer subtidale, poröse Sedimente (Ott und Novak, 1989), aus denen ähnliche symbiotische Beziehungen zwischen thiothrophen Bakterien und anderen wirbellosen Tieren wie Ciliaten, Plathelminthen, Anneliden und andere Nematoden beschrieben wurden (Ott et al., 2004a; Dubilier et al., 2008). Im Falle von *L. oneistus* sind die symbiotischen Bakterien stabförmig und mit einem Pol an die Kutikula des Wurmes angeheftet. Dicht aneinander gereiht, bilden sie eine Monoschicht aus Zellen, die den Großteil der Kutikula des Nematoden bedeckt, mit Ausnahme des Vorderkörpers und der Spitze des Schwanzes. Diese symbiotische Assoziation ist sehr spezifisch, da der Wirt nur einen Phylotyp von  $\gamma$ -Proteobakterien trägt, der zur marinen Oligochaeten und Nematoden thiothrophen Klade (MONTS) gehört (Polz et al., 1994; Bayer et al., 2009; Bulgheresi et al., 2011; Heindl et

al., 2011). Stilbonematide Würmer, einschließlich *L. oneistus*, leben in marinen Sedimenten, wo die Verfügbarkeit von Sauerstoff und die Exposition zu Schwefelwasserstoff häufig die Grenzen für benthische Organismen setzt. Im Sediment wird der Sauerstoff nicht bloß durch physikalische Prozesse wie Wasserbewegungen oder durch Bioturbation hineingespült, sondern auch durch Algen im Sediment selbst produziert. Durch heterotrophe Veratmung ist das Vorhandensein von Sauerstoff, in den meisten marinen Sedimenten, auf die ersten cm beschränkt. In den tieferen Schichten erhalten sich dadurch reduzierte Konditionen und die Grenze zur oxischen Schicht ändert seine Position aufgrund der Wasserbewegungen und assimilatorischer Sauerstoffproduktion. Die oben beschriebenen Aktivitäten verändern die vertikale Schichtung und schaffen so ein komplexes dreidimensionales Muster von oxischen und sulfidischen Mikronischen (Giere, 2009). An dieser Grenze, der Redox-Potential-Diskontinuität-Schicht, kann die höchste Dichte von *L. oneistus* Individuen gefunden werden (Ott und Novak, 1989; Ott et al., 1991). Durch wiederholte Migration in der Grenzschicht und der daraus resultierenden Exposition seines Ektosymbionten zu Sulfid, Sauerstoff und anderen notwendigen Elektronenakzeptoren für chemoautotrophen Schwefelstoffwechsel, profitiert der Ektosymbiont vom Verhalten des Wirtes, fixiert anorganischen Kohlenstoff durch den Calvin Benson Weg und gewinnt Energie durch Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen (Polz et al., 1992; Ott et al., 2004). Die Anwesenheit von ektosymbiontähnlichen Zellen im Darm von *Stilbonema sp.*, ein eng verwandter Nematode aus der gleichen Unterfamilie (Stilbonematinae) und stabile Kohlenstoff-Isotop Experimente zeigten, dass die Bakterien die Hauptquelle für die Kohlenstoffaufnahme des Wirtes sind (Ott et al., 1991). Obwohl die 16S rRNA-Gene von drei stilbonematiden Ektosymbionten in pelagischen Oberflächen-Meerwasser identifiziert werden konnten (Heindl et al., 2011), wurde der Ektosymbiont von *L. oneistus* bis jetzt nur auf der Kutikula des Wurmes lokalisiert. Der Wirt ist morphologisch an den symbiotischen Überzug angepasst. Die Fläche, die vom Ektosymbionten besetzt wird, ist durch eine Abnahme der Kutikuladicke entsprechend der Länge der Bakterien gekennzeichnet (Schiemer et al., 1990). Ein weiteres morphologisches Merkmal von *L. oneistus* und der Stilbonematinae ist der Besitz von glandulären Sinnesorganen (GSO). Diese speziellen GSO sind ein

basiepidermaler Zellkomplex aus mindestens zwei Drüsenzellen und einer neuronalen Zelle, die nur in den stilbonematiden Nematoden in dieser Form bisher beschrieben wurden. Die GSO sind unter der Kutikula des Wurmes zu finden und sondern ihr Sekret, Mucus, durch hohle Körperborsten, den Setae, auf die Kutikula des Nematoden oder auf den bakteriellen Überzug ab. Der Mucus kann als Schnittstelle zwischen dem Fadenwurm und seiner Umwelt und/oder dem Ektosymbiont (Bauer-Nebelsick et al., 1995) betrachtet werden. Bulgheresi et al., 2006 haben gezeigt, dass ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges, mannosebindendes Lektin, genannt Mermaid, das ausschließlich auf der bakterienassoziierten Region detektiert wurde, vom Wurm sekretiert und in der Ektosymbiont-Ektosymbiont Aggregation und Ektosymbiont-Wirt Anheftung involviert ist. Doch alle bisherigen Studien der Spezies *L. oneistus* hatten den Fokus auf adulte Würmer gelenkt und es ist unklar, wie die Bakterien von einer Generation auf die andere übertragen werden.

## FRAGESTELLUNG

Die Existenz von drei juvenilen Größenklassen wurde von Ott et al., 1995 nachgewiesen. Um juvenile Würmer und den Prozess der Ektosymbiontakquisition genauer zu charakterisieren, wurde eine morphologische Untersuchung über juvenile Individuen dieser Art sowie die damit verbundenen Bakterien durchgeführt. Dazu wurden Licht-, Elektronenmikroskopie und Konfokalmikroskopie gekoppelt mit Antikörperfärbungen verwendet. Um die mit juvenilen Würmern assoziierten bakteriellen Gemeinschaften molekular zu beschreiben, wurden 16S rRNA-Gen-Bibliotheken angelegt und Fluoreszenz in situ Hybridisierung angewendet, um die bakteriellen Gene in einem Konfokalmikroskop zu lokalisieren.

## ABSTRACT

Marine nematodes from the subfamily Stilbonematinae are characterized by their ability to engage in highly specific associations with sulfur-oxidizing bacteria. In the species *Laxus oneistus*, these cover almost the entire surface of each adult nematode except for the very tip of the tail and the anterior body region. This is the first study focusing on juveniles of *Laxus oneistus*. Morphological analyses by light-, electron- and laser scanning confocal microscopy revealed that, even specimens belonging to the first two developmental stages (J1/2) carried a bacterial coat. Its spatial delimitation and architecture are the same as observed in adults, and together with the presence of the ectosymbiont binding protein Mermaid, ectosymbiont-recruitment in J1/2 or even before is likely. The associated bacteria were molecularly identified by constructing a bacterial 16S rRNA-gene library and by fluorescence *in situ* hybridization with 16S rRNA-gene-specific probes. *Laxus oneistus* juveniles bear ectosymbiont cells in their gut, displaying a nutritional interaction between host and ectosymbiont. Additionally, we discovered a novel filamentous microbe, mostly, if not exclusively, associated to the openings of the juvenile nematode epidermal glands. The filamentous microbe was assigned to the phylum of Planctomycetes by establishing 16S-rRNA-gene libraries and FISH with specific probes. Exhaustive database searches revealed that its 16S rRNA-gene is only 91% identical to that of the most closely related Planctomycetes bacterium. Given its localization pattern, we hypothesize that it might utilize the worm's secretory or excretory products. If the latter scenario is true, the host might profit from the Planctomycetes related bacteria.

## INTRODUCTION

Members of the subfamily Stilbonematinae (Nematoda) are distinctive for their specific association with sulfur-oxidizing bacteria as ectosymbionts (reviewed in Ott et al., 2004; Ott et al., 2001). These free-living, marine nematodes can be found in all major oceans with highest abundance and diversity in tropical regions. As part of the meiofauna, the worms inhabit, sub-tidal, porous sediments (Ott and Novak, 1989) from which similar symbiotic relationships between thiotrophic bacteria and different invertebrates like ciliophora, plathelminthes, annelida and other nematodes have been reported (Ott et al., 2004a; Dubilier et al., 2008). For example, the gutless oligochaete *Olavius sp.* with its extracellular, sulfur-oxidizing bacterial symbiont located under the worm's cuticle (Dubilier et al., 1999). In the flatworm *Paracatenula sp.* the bacteria reside as endosymbionts inside bacteriocytes taking up major parts of the worm's body lumen (Ott et al., 1982; Leisch et al., 2011; Gruber-Vodicka et al., 2011).

In the case of *Laxus oneistus*, the symbiotic bacteria are rod-shaped and attached with one pole on the cuticle of the worm. Densely packed, they form a monolayer, which covers most of the nematode's cuticle except for the anterior body region and the tip of the tail. The association is very specific, as the host carries only one phylotype of  $\gamma$ -proteobacteria belonging to the marine oligochaete and nematode thiotrophic cluster (MONTs) (Polz et al., 1994; Bayer et al., 2009; Bulgheresi et al., 2011; Heindl et al., 2011). Stilbonematid worms, including *Laxus oneistus*, thrive in marine sediments where availability of oxygen and exposure to hydrogen sulfide often set limits to benthic organisms. In the sediment, oxygen is not only washed in by physical processes like water movement or bioturbation but is produced within the sediment by algae. Due to heterotrophic activity, the distribution of oxygen is limited to the upper first centimeters of most marine sediments. Reduced conditions can be found in the deeper layers below and the boundary zone (redox-potential-discontinuity-layer) between those layers is changing its position due to water movements and assimilatory oxygen production. These activities alter the vertical stratification, creating a more complex three-dimensional pattern of oxic and sulfidic micro niches

(Giere, 2009). In and near the redox-potential-discontinuity-layer, the highest abundance of *L. oneistus* individuals can be found (Ott and Novak, 1989; Ott et al., 1991). By repeatedly migrating across the boundary layer, and thereby exposing its ectosymbiont to sulfide, oxygen and other necessary electron acceptors for chemoautotrophic sulfur metabolism, the host behavior might benefit the ectosymbiont which fix inorganic carbon through the Calvin-Benson pathway and obtain energy by oxidizing reduced sulfur compounds (Polz et al., 1992; Ott et al., 2004). The presence of ectosymbiont-like cells in the gut of *Stilbonema* sp., a closely related worm from the same subfamily (Stilbonematinae) and stable carbon isotope experiments indicate that the bacteria are the major components of the nematode's nutritional carbon uptake (Ott et al., 1991). Although the 16S rRNA-genes of three stilbonematid ectosymbionts are even present in pelagic surface seawater (Heindl et al., 2011), the ectosymbiont of *L. oneistus* could be only detected on the cuticle of the worm so far. The host is morphologically adapted to the symbiotic coat. The area of ectosymbiont settlement is characterized by a decrease in the worm's diameter corresponding to the length of the bacteria (Schiemer et al., 1990).

Another morphological characteristic of *L. oneistus* and Stilbonematinae is the possession of glandular sensory organs (GSOs). These particular organs are a basiepidermal complex of at least two gland cells and one neuronal cell and have only been described in the stilbonematid nematodes so far. The GSOs are located under the cuticle of the worm and secrete mucus through setae, onto the cuticle or the bacterial coat. The mucus may be regarded as the interface between the nematode and the environment and/or the ectosymbiont (Bauer-Nebelsick et al., 1995). Bulgheresi et al., 2006 showed that the  $\text{Ca}^{2+}$  - dependent, mannose-binding lectin Mermaid, which is exclusively secreted onto the bacteria-associated region, mediates both ectosymbiont-ectosymbiont aggregation and ectosymbiont-host attachment. However, all previous studies of the species *L. oneistus* focused on adult worms and it is unclear how the bacteria are transmitted from one generation to the other. The existence of four juvenile developmental stages has been shown by Ott et al., 1995.

To shed more light on juvenile worms in general and the process of symbiont acquisition we performed a morphological investigation of juveniles of this species, as well as its associated bacteria. This employed light and electron microscopy, and immunostaining coupled to laser scanning confocal microscopy. To molecularly characterize the juvenile-associated bacterial community, we used 16S rRNA-gene libraries and fluorescence in situ hybridization.

## **METHODS**

### **Specimen collection**

Samples from the sediment were taken at around 1m depth in the back-reef-lagoon of Carry Bow Cay island in Belize. Specimens were extracted from the sediment by shaking the sand in seawater and pouring the supernatant through a 63 µm mesh screen. Individuals of *L. oneistus* were identified under a dissecting microscope. Freshly collected worms were fixed in methanol for immunostaining, genomic DNA extraction and fluorescence in situ hybridization (FISH). For scanning electron microscopy the nematodes were fixed with 2.5% Glutaraldehyde in a 0.1 M Sodium- Cacodylate buffer for 12 hours at 4°C and stored in the same buffer.

### **Scanning electron microscopy**

Specimens were post fixed in a 1% Osmiumtetroxide solution for 2 hours on ice and washed three times with 0.1 M Sodium-Cacodylate buffer.

After the worms were dehydrated in ethanol (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%) and chemically dried overnight with HDMS, they were sputtercoated with gold for 20 minutes and viewed in a SEM Philips XL 20. Adobe Photoshop CS 5 was used to take measurements.

## **DNA extraction and PCR amplification of 16S and 18S rRNA-gene**

DNA was extracted from 7 single specimens by using a slightly modified protocol after (Schizas et al., 1997). For 16S rRNA analysis, PCR was performed by using the general eubacterial primers 616V (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTC-3'; Juretschko et al., 1998) and 1492R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3'; Kane et al., 1993).

Cycling conditions were: 94°C for 4 min; 94°C for 45 s, 50°C for 45 s, 72°C for 1 min 30 s 35x; 72°C for 10 min. Each PCR product was 1499 nt.

18S rRNA genes were amplified by PCR with the general eukaryotic primers 1f (5'-CTGGTTGATYCTGCCAGT-3'; Winnepenninckx et al., 1995) and 2023r (5'-GGTTCACCTACGGAAACC-3'; Pradillon et al., 2007).

Cycling conditions were 94°C for 4 min; 94°C for 45 s, 49°C for 30 s, 72°C for 1 min 45 s 35x; 72°C for 10 min. The PCR product was 1779 nt.

## **16S and 18S rRNA-gene library**

The bands were cut out of the gel and eluted with MACHERY – NAGEL, NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit. Cloning of eluted PCR-products was done by using INVITROGEN TOPO TA Cloning® Kit For Sequencing pCR® 4-TOPO® Vector.

A total number of 96 clones were send to LGC Genomics GmbH for sequencing. Additional 20 clones were sequenced at the Biocenter Vienna.

Phylogenetic assignment of sequences was done with the MEtaGenome ANalyzer software MEGAN 4 (Lanzen et al., 2012).

## **PCR amplification of Planctomycetes specific gene obtained from clone library**

*Planctomycetes* specific rRNA genes were amplified by PCR with the specific primers LoP170f (5'-AATACCGCATGAGGTTG-3') and LoP1019r (5'-ATGGCTCCACACCGAAG-3').

Cycling conditions were 95°C for 4 min; 95°C for 48 s, 50°C for 30 s, 72°C for 2 min 10 s 35x; 72°C for 10 min. The PCR product was 1080 nt.

## **Phylogenetic analysis**

For comparison of 16S rRNA sequences with those in GENBANK, BLASTN was used. For a phylogenetic placement of the obtained 16S rRNA sequences we aligned the clones using the sina web alinger ([www.arb-silva.de](http://www.arb-silva.de)) (Pruesse et al., 2012). We then added them to the arb-silva 16S rRNA database 111NR using the quick-add-to-tree function as implemented in arb 5.5 (Ludwig et al., 2004).

## **Immunofluorescence**

Fixed worms were rinsed with PBS containing 0.1% Tween 20- (PBS-T, washing solution) three times before blocking for 1 hour with 2% bovine serum albumin in PBS-T. Anti-Mermaid antibody (Bulgheresi et al., 2006) was applied 1:500 diluted in blocking solution, overnight at 4°C. Upon three washing steps in washing solution, 1:500 diluted Alexa 488-conjugated secondary anti-rabbit antibody (Molecular probes) in blocking solution was added for 1h at room temperature. After washing the worms for three times in washing solution the nematodes were mounted with Slow-Fade Antifade kit (Molecular Probes). Images were taken by using a Leica TCS-NT confocal microscope.

## **Fluorescence in situ hybridization (FISH)**

Two probes (LoP610, LoP170) specifically targeting the Planctomycetes 16S rRNA-gene fragment identified in the 16S rRNA gene library were designed by using the ARB PROBE\_DESIGN tool (arb software package Ludwig et al., 2004;), and confirmed its specificity by comparing it with all available sequences in GenBank, SILVA and Greengenes using probeCheck (Loy et al., 2008). In addition an ectosymbiont specific probe (MONTs) was used. FISH was performed according to Manz et al., 1992. Specimens were coated with a 1% agarose-solution in ddH<sub>2</sub>O on glass slides and left on the bench till dry. The nematodes were incubated overnight in hybridization buffer [0.9 M NaCl, 20 mM Tris·HCl (pH 8.0), 0.001% SDS] together with the selected probes at 46°C. After three rinsing steps with washing solution [70mM NaCl, 20mMTris.HCl (pH 8.0), 0.125M EDTA] for 10 min at 48°C, the nematodes were covered subsequently in ice-cold ddH<sub>2</sub>O for 5 seconds. The worms were dried with compressed air, mounted with Slow-Fade Antifade kit (Molecular Probes) and viewed in a Leica TCS-NT confocal microscope.

## RESULTS

### Measurements of Juvenile worms

We measured 6 juveniles using SEM, 6 worms using laser scanning confocal microscopy and 3 live ones under a light microscope right after sampling. Their length ranged from 862  $\mu\text{m}$  to 2.172  $\mu\text{m}$  and therefore we attributed them as J1/2 stage after Ott et al., 1995.

| Juvenile #  | Size               | Method | Probable stage |
|-------------|--------------------|--------|----------------|
| Juvenile 1  | 862 $\mu\text{m}$  | SEM    | J1             |
| Juvenile 2  | 833 $\mu\text{m}$  | SEM    | J1             |
| Juvenile 3  | 1162 $\mu\text{m}$ | SEM    | J1/2           |
| Juvenile 4  | 1199 $\mu\text{m}$ | SEM    | J1/2           |
| Juvenile 5  | 1466 $\mu\text{m}$ | SEM    | J2             |
| Juvenile 6  | 1859 $\mu\text{m}$ | SEM    | J2             |
| Juvenile 7  | 1496 $\mu\text{m}$ | CLSM   | J2             |
| Juvenile 8  | 1463 $\mu\text{m}$ | CLSM   | J2             |
| Juvenile 9  | 1731 $\mu\text{m}$ | CLSM   | J2             |
| Juvenile 10 | 1774 $\mu\text{m}$ | CLSM   | J2             |
| Juvenile 11 | 2152 $\mu\text{m}$ | CLSM   | J2             |
| Juvenile 12 | 2172 $\mu\text{m}$ | CLSM   | J2             |
| Juvenile 13 | 857 $\mu\text{m}$  | LM     | J1             |
| Juvenile 14 | 941 $\mu\text{m}$  | LM     | J1             |
| Juvenile 15 | 1013 $\mu\text{m}$ | LM     | J1/2           |

Table 1: Measurements of juvenile individuals fixed for scanning electron microscopy (SEM) and confocal laser scanning microscopy (CLSM). Light microscope (LM) photographs from live worms in seawater after sampling were used additionally to measure length. Worms were staged based on their length.

### **An adult-like bacterial coat covers the cuticle of J1/2 nematodes**

Symbiotic bacteria coated all 13 juvenile individuals, which we investigated using SEM. As previously observed for adult worms, they appeared tightly packed and attached onto the cuticle of the host with one pole, thus forming a monolayer. This starts with a sharp onset after some distance from the anterior end of the nematode and continues until the tip of the tail (Fig. 1). We could not detect morphological differences in the organization of the symbiotic layer between juvenile (J1/2) and adult worms. Further, we did not observe any sign of molting (e.g. two overlying bacteria-coated cuticles) in any of the observed specimens. Nevertheless, we found a filamentous microbe, provisionally called GSO-Associated Microbe (GAM), associated with the setae of juvenile nematodes (see below).

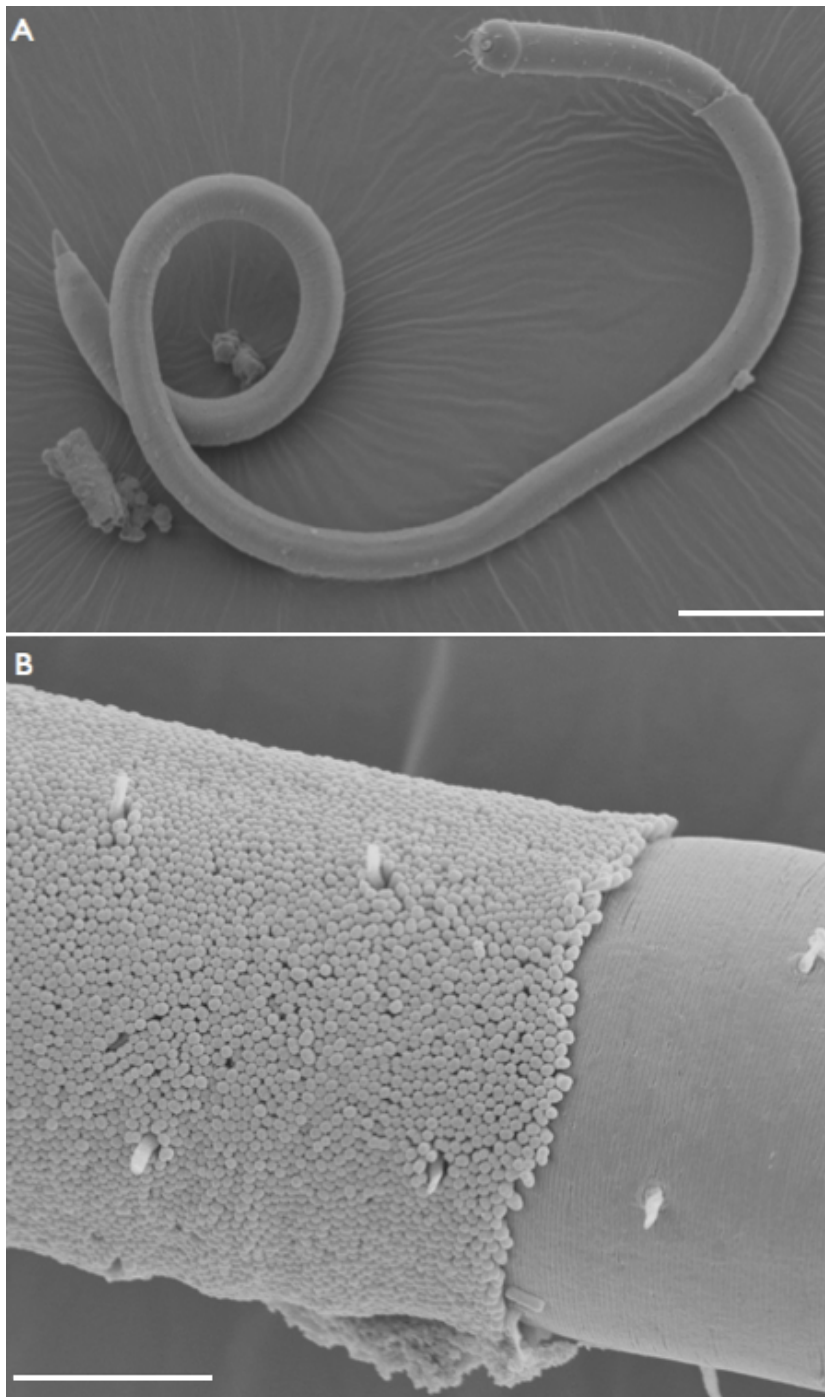


Fig. 1: Scanning electron microscopy micrographs of juvenile worms and their ectosymbiont. A. The bacterial coat starts anteriorly and cover the worm's cuticle except for the very tip of the tail. B. The bacteria are tightly packed and attached to the cuticle of the host with one pole, forming a monolayer which starts with a sharp onset. Scale bar is 100  $\mu\text{m}$  in A, 10  $\mu\text{m}$  in B.

## Juvenile GSOs secrete the ectosymbiont-binding lectin Mermaid

To evaluate if Mermaid is already expressed and secreted in early juveniles, we immunostained them with anti-Mermaid antibody (Bulgheresi et al., 2006). Confocal laser scanning microscopy of immunostained juveniles showed the Mermaid signal in the secretory canals of J1/2 juvenile's posterior GSOs and in the overlying bacterial coat (Fig. 2). Surprisingly, GAMs were also strongly stained by the anti-Mermaid antibody (Fig. 6B and GAMs).

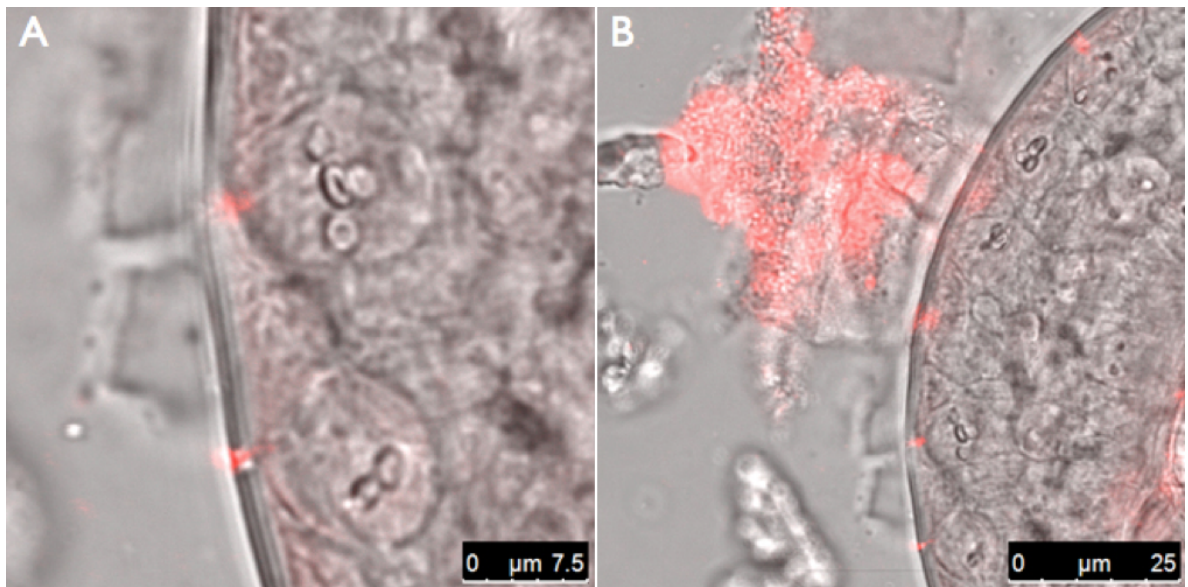


Fig. 2: Epifluorescence and bright field-overlay micrographs of immunostained whole mount juvenile *L. oneistus* nematodes. Juveniles were immunostained with anti-Mermaid primary antibody and Alexa 555-conjugated secondary antibody (red). A. Stained Mermaid proteins inside the secreting canals of two GSOs. B. Juvenile with stained bacterial coat.

## **Identification and localization of bacteria associated to *L. oneistus* juveniles**

In order to assess if sulfur-oxidizing bacteria belonging to the Marine Nematode and Oligochaete Thiotrophic Symbionts (MONTs) cluster cover the surface of *L. oneistus* juveniles, we established general eubacterial 16S rRNA-gene clone libraries and performed FISH. Out of 86 clones, 72 could be assigned to the *L. oneistus* MONTs. Amongst the remaining 14 clones we could identify sequences from groups of bacteria as follows: *Vibrio* (3 sequences), *Pseudoalteromonas* (4 Sequences), *Methylophaga* (2 Sequence), *Ponticaulis* (1 Sequence), *Idiomarina* (1 Sequence), *Cytophaga* (1 Sequence), *Alteromonas* (1 Sequence), and Planctomycetes (1 Sequence). To verify whether the retrieved *L. oneistus* symbiont sequences originated from the ectosymbiont and not from the water column we applied a MONTs-specific probe on the symbiotic worm. This resulted in strongly stained bacterial coats (Fig. 3 B, E) and confirmed the identification of 72 ectosymbiont sequences (MONTs) in 16S rRNA-gene clone libraries. Taken together, our data suggests that J1/2 juveniles and adult worms are coated by the same bacterial phylotype. MONTs probe-positive cells were additionally localized throughout the whole gut from the pharynx to the anus (Fig. 3 B, E). These had the same size and morphology of the surface-associated bacteria.

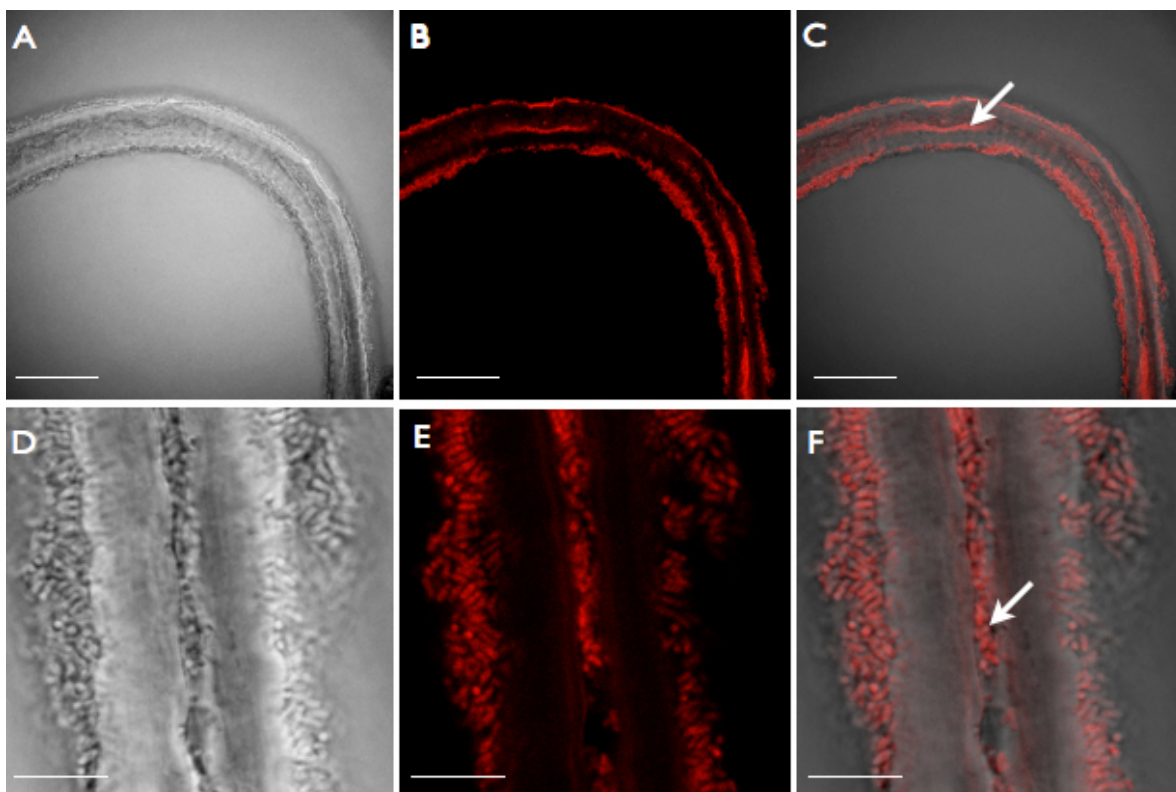


Fig. 3: Confocal laser scanning microscope micrographs of nematodes hybridized with a fluorescent MONTs specific probe (red). A and D. Bright field microscope photographs showing a part of the worm's body with the ectosymbiont. B and E epifluorescence image. Hybridized MONTs specific probe showing the bacterial symbiont in red, localizing single cells on the cuticle and in the gut. C and F are overlay pictures of (A-B) and (D-E) respectively. Arrows are indicating ectosymbiont cells in the gut of the nematode. Scalebar is 50  $\mu\text{m}$  in A, B, C; 10  $\mu\text{m}$  in D, E, F.

## Morphological characterization of GAMs

We found a microorganism to be associated with the setae of juvenile nematodes (Fig. 4, 5, 6, 7). GAMs not only appeared wrapped around the setae but also extended onto the cuticle of the worm (Fig. 4) or on the bacterial monolayer (Fig. 5). In light microscope pictures and laser scanning confocal microscope micrographs, filament septation can be observed (Fig. 6). We discovered non-filamentous, more bag-like morphological features with about 5  $\mu\text{m}$

length as well (Fig. 7). The septated filaments can be up to 50  $\mu\text{m}$  long and are frequently coiled.

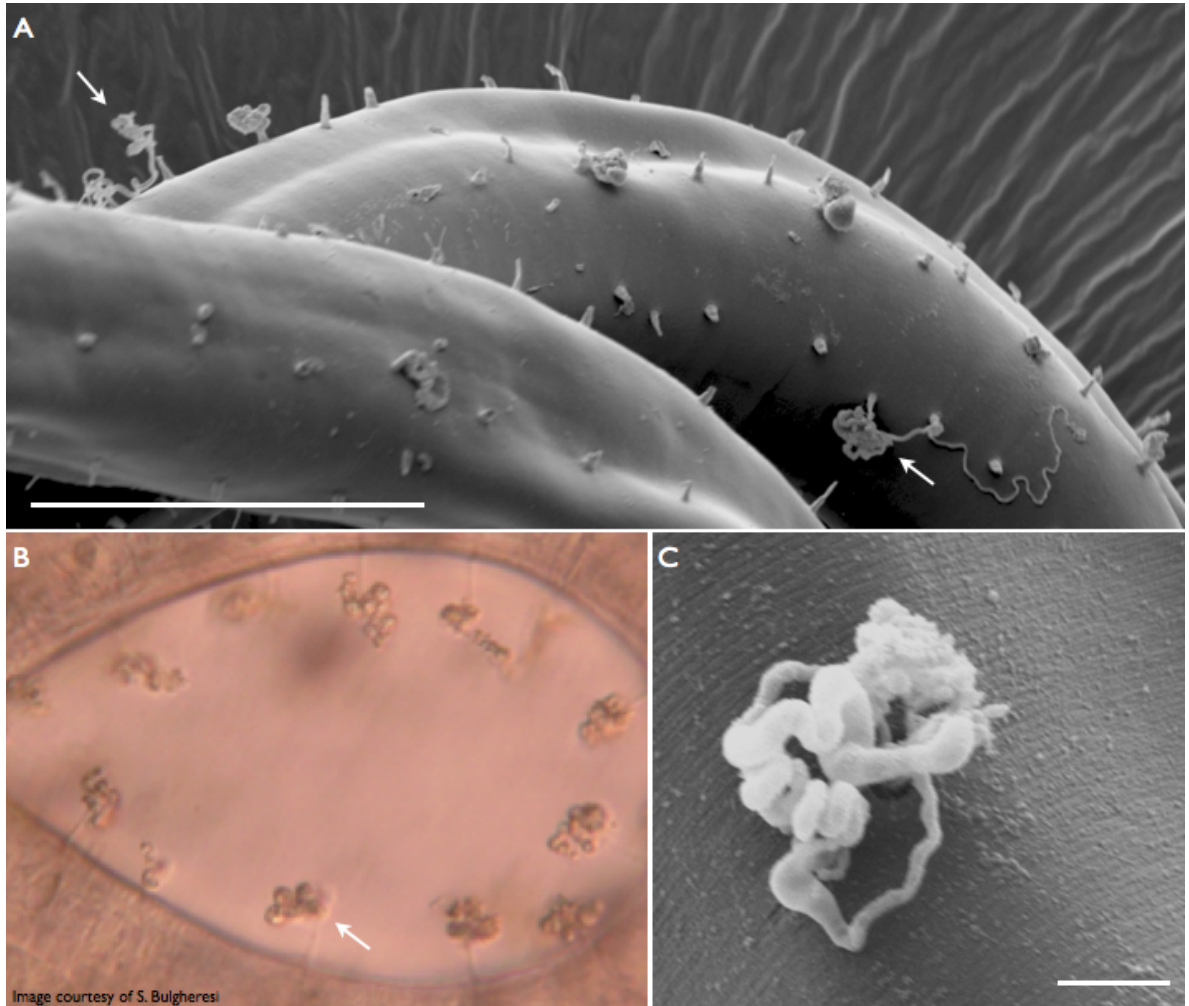


Fig. 4: Scanning electron micrographs of fixed (A, C) and photographs of live GAMs from Carry Bow Key coral reef sediment (B). Filaments are attached to the setae (A, B, C) and extend onto the cuticle (A, C) Scale bar is 50  $\mu\text{m}$  in A; 2  $\mu\text{m}$  in C. Arrows are indicating GAMs.

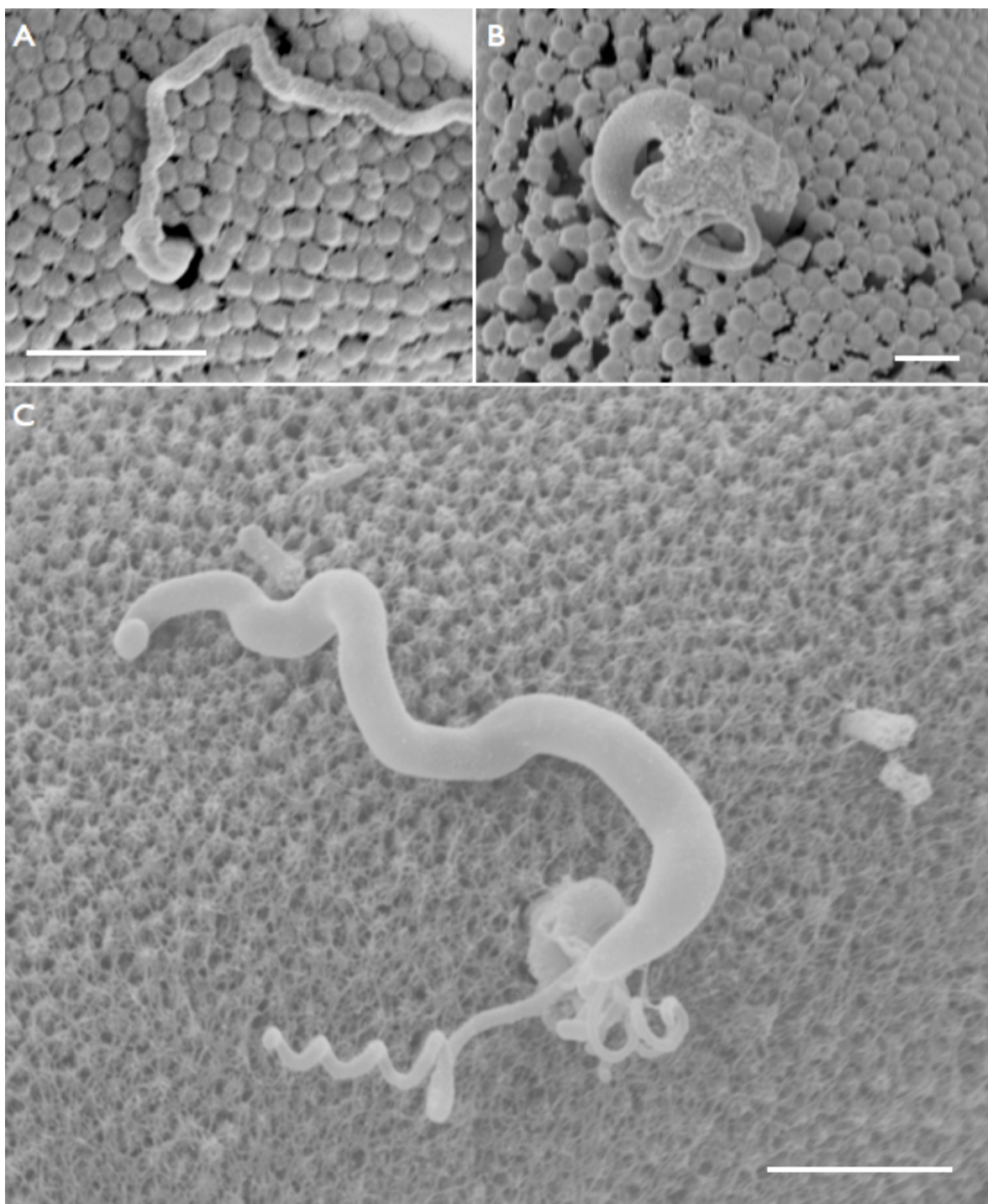


Fig. 5: Scanning electron microscopy micrographs of fixed juvenile worms. Filaments are attached to the setae and extend onto the bacterial coat (A, B, C) Scale bar is 5  $\mu\text{m}$  in A, C and 2  $\mu\text{m}$  in B.

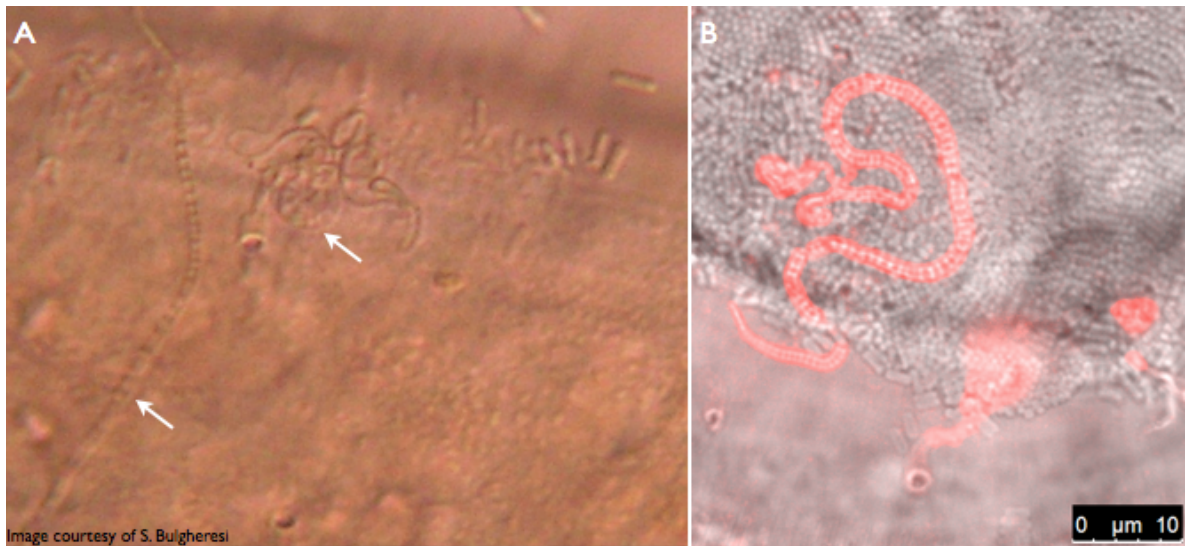


Fig. 6: Light microscope pictures of live GAMs (A) and laser scanning electron microscopy micrograph of anti-Mermaid immunostained GAMs (B) showing septation.

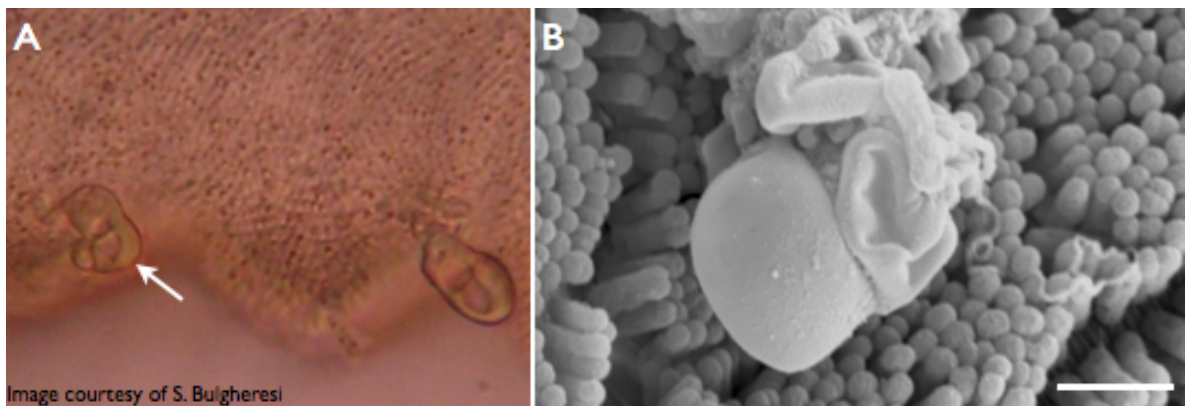


Fig. 7: Light microscope pictures of live GAMs (A) and scanning electron microscopy micrographs of GAMs (B) displaying non filamentous morphology.  
Scale bar is 2 μm in B. Arrow indicates GAM.

## **Molecular identification of GAMs**

In the clone library mentioned above we identified a Planctomycetes related sequence. Given that many bacteria belonging to the phylum Planctomycetes are filamentous and have complex life cycles, involving different morphotypes (Fuerst 1995), we tested if the GAMs discovered by SEM analysis were indeed Planctomycetes bacteria. We designed two FISH probes (LoP610, LoP170) specifically targeting the Planctomycetes 16S rRNA-gene obtained in our library. Both FISH-probes stained GAMs on the nematode surface but the LOP610-probe gave stronger signals (Fig. 8, 9, 10) and it was preferentially applied in all subsequent FISH analyses. In order to (1) ensure that the juvenile nematode – Planctomycete association is not occasional and (2) to compare different Planctomycetes sequences derived from different individual juveniles; we targeted genomic DNA extracted from three additional juvenile worms with the specific PCR primers LoP170f and LoP1019r. We successfully amplified a Planctomycetes-specific 16S rRNA gene-fragment (1080bp) from all three additional juveniles. This confirms that all tested juvenile worms were also associated to bacteria belonging to the Planctomycetes phylum.

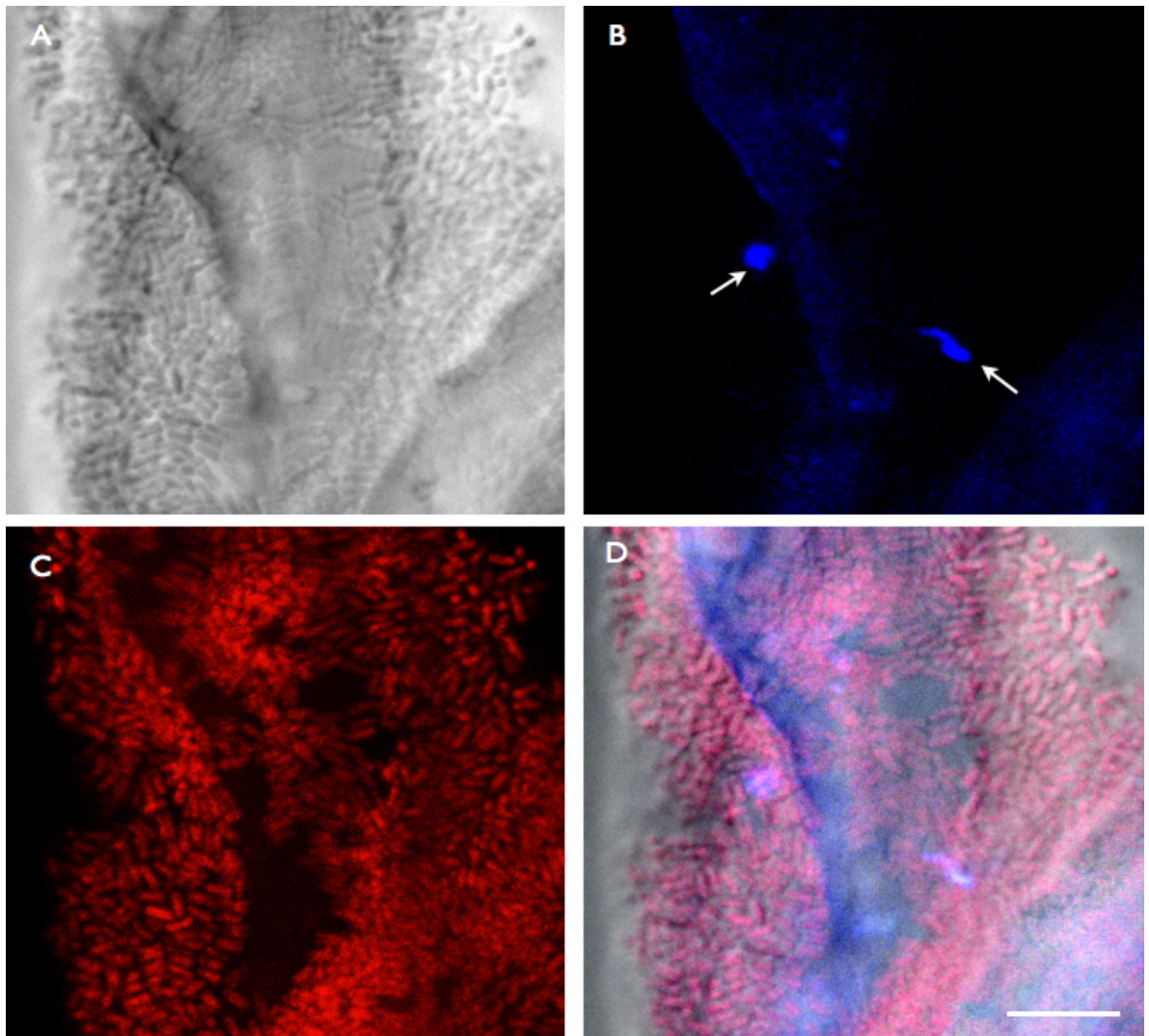


Fig. 8: Laser scanning confocal microscope micrographs of FISH on the tail-region of the nematode with the specific planctomycete probe LOP610 (blue; B) and the MONTS specific probe (red; C). A. Corresponding bright field picture. D. Overlay of A, B and C. Arrows are indicating GAMs. Scale bar is 10  $\mu$ m.

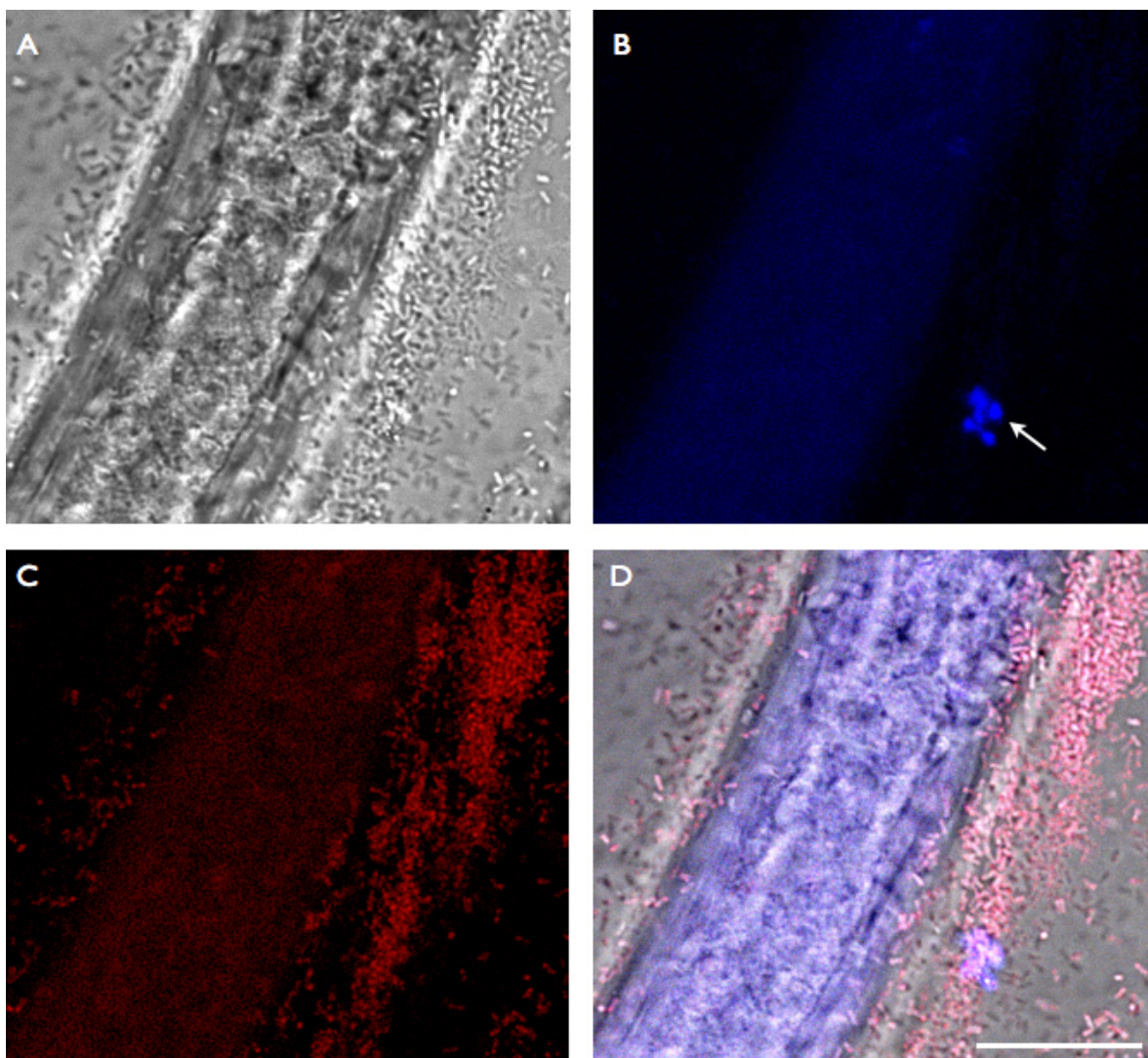


Fig. 9: Laser scanning confocal microscope micrographs of FISH on the nematode with the specific planctomycete probe LOP610 (blue; B) and the MONTs specific probe (red; C). A. Corresponding bright field picture. D. Overlay of A, B and C. Arrow is indicating GAMs. Scale bar is 25  $\mu$ m.

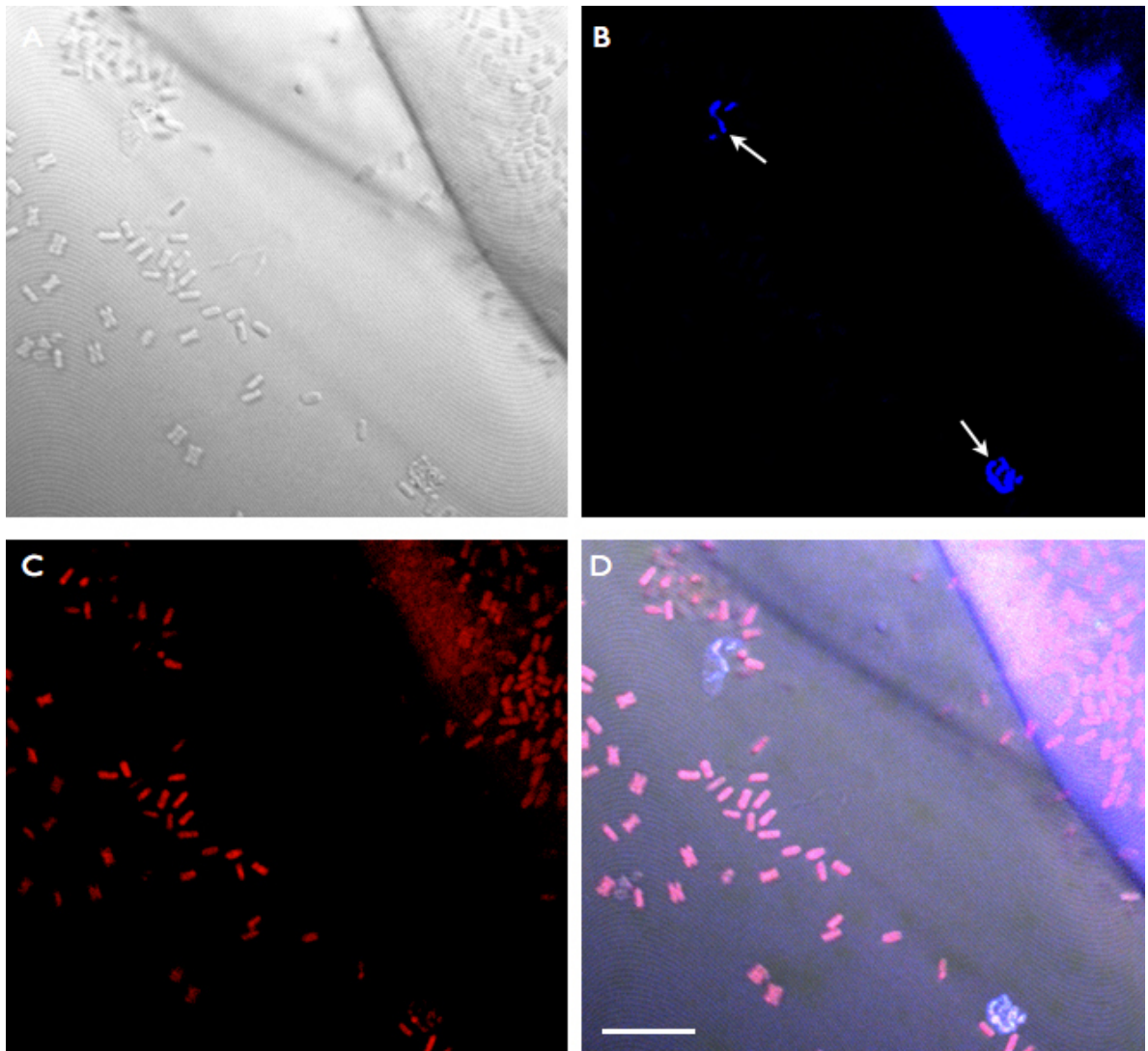


Fig. 10: Laser scanning confocal microscope micrographs of FISH on the nematode with the specific planctomycete probe LOP610 (blue; B) and the MONTS specific probe (red; C). A. Corresponding bright field picture. D. Overlay of A ,B and C. Arrows are indicating GAMs. Scale bar is 10  $\mu$ m.

### **The GAM clusters with the Pla4 lineage**

The obtained 16S rRNA-gene sequences clusters with the Pla4 lineage (blue) within the phylum of Planctomycetes bacteria (Fig. 11). The Pla4 cluster consists so far of 85 uncultured clones and is closely related to the Pla3 lineage within the phylum of Planctomycetes.

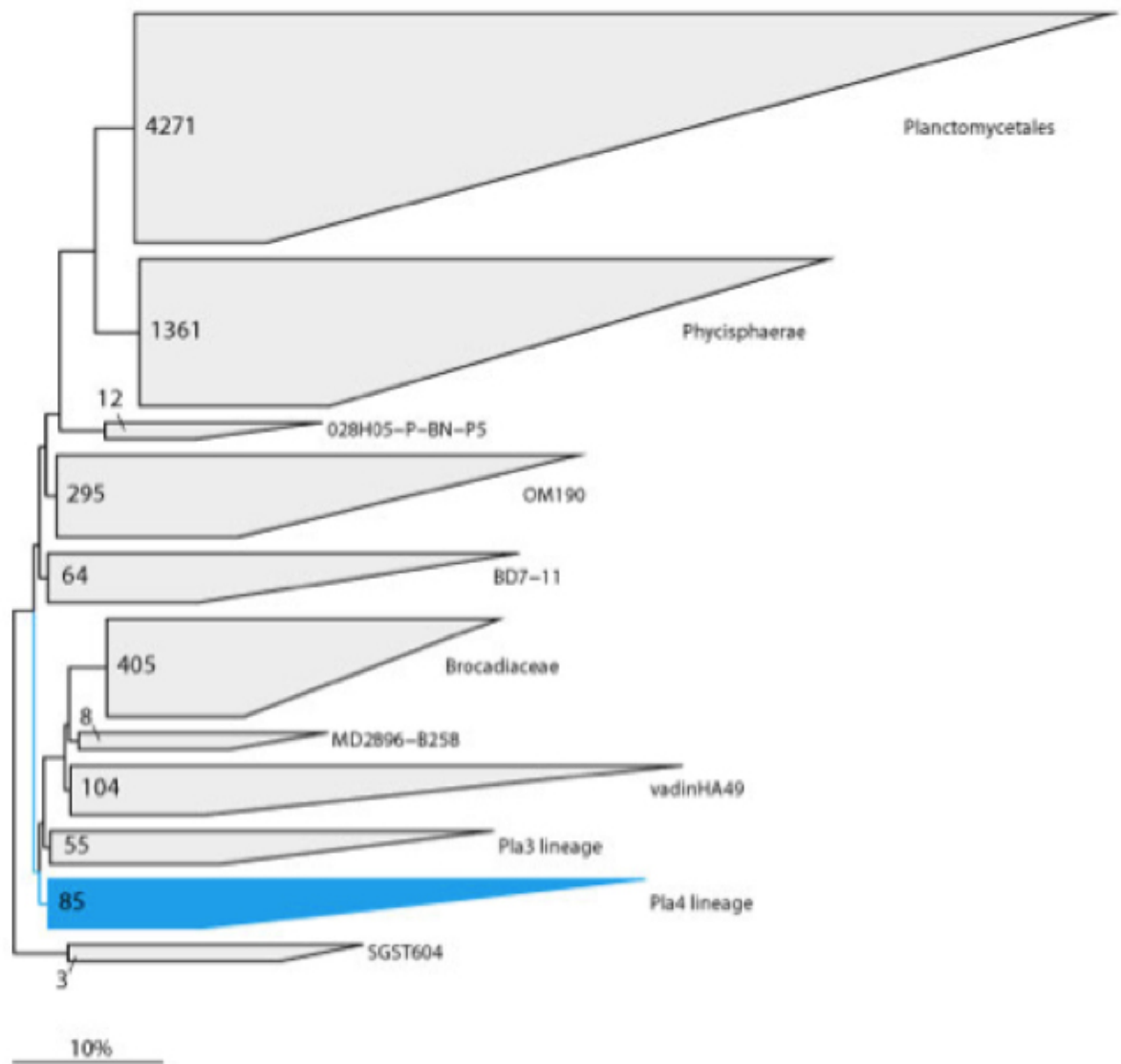


Fig. 11: 16S rRNA-gene based phylogenetic tree based on sina web alinger and arb-silva 16S rRNA database showing the affiliation of the Pla4 lineage with other sequences within the Planctomycetes phylum. Number of clones are depicted in the respective cluster. The scale bar represents 10% estimated sequence divergence.

## DISCUSSION

### Juvenile nematodes and their ectosymbiont

The majority of nematodes undergo one embryonic and four juvenile stages before reaching the final adult stage (Malakhov, 1994). In their biometrical analysis of the marine nematode *L. oneistus*, Ott et al., 1995 demonstrated the presence of three size classes. They attributed them to one adult stage and four juvenile stages. The smallest of these juvenile nematodes, were reported to be 1,100 µm long. In this study, we described juveniles shorter than 1,100 µm, which are the smallest juveniles reported so far. Investigating early juvenile development could help to understand the so far unknown ectosymbiont transmission mode from adult to offspring, as it is not clear whether the bacteria are obtained through horizontal transmission from the environment or passed vertically from the mother to the offspring. Genes from the ectosymbiont of the stilbonematid nematode *Robbea sp.* (*R.sp1*, *R.sp2*, *R.sp3*) could be identified in the water column (Heindl et al., 2011) but so far the ectosymbiont of *L. oneistus* could be only localized on the cuticle of the nematode. Artificially induced un-hatched embryos of *L. oneistus* were found to be aposymbiotic (Silvia Bulgheresi and Joerg A. Ott, unpublished). In this study ectosymbiont-free juveniles were not observed. Even the smallest specimen (862 µm) was covered with the symbiotic bacteria in the same pattern as in adults. This data, together with the presence of the protein Mermaid on the bacterial coat and inside the J1/2 GSOs, suggests ectosymbiont recruitment in J1/2 or before. FISH experiments revealed the presence of MONTS probe labeled ectosymbiont cells throughout the length of the gut of juveniles of *L. oneistus*. These resembled the cuticle-associated ectosymbiont cells. Ectosymbiont cells in the gut of Stilbonematinae have been reported from *Stilbonema sp.* (Ott et al., 2004) but not for the species *L. oneistus*. This finding supports the importance of the bacterial epibionts as a major food source for the nematode as proposed by OTT et al., 1991.

## GAM

We found a filamentous microorganism associated with the setae (Glandular Sense Organ Associated Microbe, GAM) of juvenile nematodes. As the GAMs are present on nematodes collected from several different sampling occasions, this organism seems not to be a temporal occurrence but is found on most, if not all juveniles investigated so far. The fact that some structures are shrunk on SEM micrographs might be due to a fixation artifact, as various fixation methods might lead to changes in morphology of bacterial cells (Lindsay et al., 1995). Nevertheless, light microscope pictures of live GAMs are displaying the same morphological features as on SEM micrographs, therefore excluding an artifact. Given the detection of different morphotypes by SEM, light microscopy and laser scanning confocal microscopy we cannot exclude that more than one microorganism is localized to the setae. Alternatively, this microbe displays morphologically different life cycle stages. In order to investigate the GAM phylogenetic identity, we focused on a 16S rRNA-gene sequence related to Planctomycetes bacteria due to the various cell shapes this group of bacteria can display (Fuerst, 1995; Fuerst and Sagulenko, 2011). Furthermore, the occurrence of Planctomycetes bacteria in marine sediments (Musat et al., 2005) and associations with eukaryotes, for example with the tiger shrimp (Fuerst et al., 1997) or *Aplysina* sponges (Pimentel-Elarado et al., 2003) made the Planctomycetes related sequence likely to derive from the GAMs. By employing FISH, we showed that the specific probes LoP610 and LoP170 hybridized with the GAMs on the cuticle of the nematode. The detection of only a single Planctomycetes related sequence in clone libraries might be due to DNA extraction bias. Multiple extractions might yield additional sequences (Feinstein et al., 2009). So far, their relation to the symbioses is yet unknown. Taking advantage of the worm's setae as structures to attach to and so being carried around in the sediment might be a benefit for the GAMs. Furthermore, in some cases, the GAMs appeared to penetrate into the setae, suggesting that they are nutritionally interacting with the nematode. Generally, mucopolysaccharides and glycoproteins have been described from the surface coat of nematodes (Zuckerman et al., 1979; Bird & Zuckerman, 1989; Page et al., 1992). Indeed, the mucus secreted from the GSOs of *L. oneistus* is rich in proteins (Bulgheresi et al.,

2006). Surprisingly, the GAMs were stained by the anti-Mermaid antibody, suggesting that these are embedded in the proteins secreted by the worm. Nematode mucus tracks are high in bacterial abundance. Furthermore, a mutualistic relationship where the nematode feeds on the microorganisms colonizing its tracks has been shown e.g. mucus-trap hypothesis (Riemann & Schrange, 1978; Moens et al., 2005). Aquatic nematodes continually excrete ammonia into the environment as it is produced, thus avoiding the toxic storage problem (Perry R.N. and D.J. Wright, 1998). Planctomycetes bacteria from the Pla4 lineage have been shown to be capable of anaerobic ammonia oxidation (Tal et al., 2005) and the excretions of the worm could be an ammonia source and so explaining the close proximity of these filamentous bacteria to the setae and cuticle of the nematode. Furthermore, the GSOs of juvenile *L. oneistus* nematodes might be more metabolic active than those of adults due to developmental processes e.g. ecdysis followed by ectosymbiont acquisition and are therefore producing more secretory or excretory products, which might explain the almost exclusive occurrence of GAMs on juvenile nematodes.

## CONCLUSION

The presence of the symbiotic bacteria on even the smallest juveniles (J1/2 stage), arranged in the same morphological pattern as observed for adult nematodes and the presence of the ectosymbiont-binding protein (Mermaid) is indicating an early time point in ectosymbiont acquisition. The localization of ectosymbiont cells in the gut of juveniles suggests a trophic interaction between host and ectosymbiont. A microbe associated with the juvenile nematodes, for reasons we still ignore, was reproducibly found on most if not all juveniles. Given that GAMs are localized to the GSOs of juvenile nematodes, the secretory and excretory products of the nematode might be of a nutritional relevance for these filamentous microbes. Phylogenetic analyses place them into the Pla4 lineage within the phylum of Planctomycetes.

## REFERENCES

Amann RI, Ludwig W, Schleifer K-H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews* 59: 143-169.

Bary A. (1879). *Die Erscheinung der Symbiose*. Vortrag gehalten auf der Versammlung Deutscher Naturforscher und Aerzte zu Cassel: KJ Trübner.

Bauer-Nebelsick M, Blumer M, Urbancik W, Ott JrA. (1995). The glandular sensory organ of Desmodoridae (Nematoda)-ultrastructure and phylogenetic implications. *Invertebrate biology*: 211-219.

Bayer C, Heindl NR, Rinke C, Lückner S, Ott JA, Bulgheresi S. (2009). Molecular characterization of the symbionts associated with marine nematodes of the genus *Robbea*. *Environmental microbiology reports* 1: 136-144.

Bird AF, Zuckerman BM. (1989). Studies on the surface coat (glycocalyx) of the dauer larva of *Anguina agrostis*. *International Journal for Parasitology* 19: 235-240.

Bright M, Bulgheresi S. (2010). A complex journey: transmission of microbial symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 8: 218-230.

Bulgheresi S, Gruber-Vodicka HR, Heindl NR, Dirks U, Kostadinova M, Breiteneder H, Ott JA. (2011). Sequence variability of the pattern recognition receptor Mermaid mediates specificity of marine nematode symbioses. *The ISME journal* 5: 986-998.

Bulgheresi S, Schabussova I, Chen T, Mullin NP, Maizels RM, Ott JA. (2006). A new C-type lectin similar to the human immunoreceptor DC-SIGN mediates symbiont acquisition by a marine nematode. *Applied and environmental microbiology* 72: 2950-2956.

Currie CR, Poulsen M, Mendenhall J, Boomsma JJ, Billen J. (2006). Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. *Science* 311: 81-83.

Douglas AE & Prosser WA. (1992). Synthesis of the essential amino acid tryptophan in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) symbiosis. *Journal of Insect Physiology*, 38(8), 565-568.

Dubilier N, Amann R, Erseus C, Muyzer G, Park S, Giere O, Cavanaugh CM. (1999). Phylogenetic diversity of bacterial endosymbionts in the gutless marine oligochaete *Olavius loisei* (Annelida). *Marine ecology. Progress series* 178: 271-280.

Dubilier N, Bergin C, Lott C. (2008). Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis. *Nature Reviews Microbiology* 6: 725-740.

Emerson D, Rentz JA, Lilburn TG, Davis RE, Aldrich H, Chan C, Moyer CL. (2007). A novel lineage of proteobacteria involved in formation of marine Fe-oxidizing microbial mat communities. *PloS one* 2: e667.

Feinstein L, Sul WJ, Blackwood C. (2009). Assessment of bias associated with incomplete extraction of microbial DNA from soil. *Applied and environmental microbiology* 75: 5428-5433.

Felbeck H. (1981). Chemoautotrophic potential of the hydrothermal vent tube worm, *Riftia pachyptila* Jones (Vestimentifera). *Science* 213: 336-338.

Felbeck H, Childress JJ, Somero GN. (1981). Calvin-Benson cycle and sulphide oxidation enzymes in animals from sulphide-rich habitats. *Nature* 293, 291-293.

Felbeck H, Liebezeit G, Dawson R, Giere O. (1983). CO<sub>2</sub> fixation in tissues of marine oligochaetes (*Phallodrilus leukodermatus* and *P. planus*) containing symbiotic, chemoautotrophic bacteria. *Marine Biology* 75: 187-191.

Fuerst JA. (1995). The planctomycetes: emerging models for microbial ecology, evolution and cell biology. *Microbiology* 141 ( Pt 7): 1493-1506.

Fuerst JA, Gwilliam HG, Lindsay M, Lichanska A, Belcher C, Vickers JE, Hugenholtz P. (1997). Isolation and molecular identification of planctomycete bacteria from postlarvae of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Applied and environmental microbiology* 63: 254-262.

Fuerst JA, Sagulenko E. (2011). Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function. *Nature reviews. Microbiology* 9: 403-413.

Giere O. (2009). *Meiobenthology: the microscopic motile fauna of aquatic sediments*: Springer.

Gruber-Vodicka HR, et al. (2011). Paracatenula, an ancient symbiosis between thiotrophic Alphaproteobacteria and catenulid flatworms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 12078-12083.

Heindl NR, Gruber-Vodicka HR, Bayer C, Lucker S, Ott JA, Bulgheresi S. (2011). First detection of thiotrophic symbiont phylotypes in the pelagic marine environment. *FEMS microbiology ecology* 77: 223-227.

Jorgensen BB. (1977). The sulfur cycle of a coastal marine sediment (Limfjorden, Denmark). *Limnology and Oceanography*: 814-832.

Jorgensen BB. (1982). Mineralization of organic matter in the sea bed, the role of sulphate reduction.

Leisch N, Dirks U, Gruber-Vodicka HR, Schmid M, Sterrer W, Ott JA. (2011). Microanatomy of the trophosome region of *Paracatenula* cf. *polyhymnia* (Catenulida, Platyhelminthes) and its intracellular symbionts. *Zoomorphology* 130: 261-271.

Lindsay MR, Webb RI, Hosmer HM, Fuerst JA. (1995). Effects of fixative and buffer on morphology and ultrastructure of a freshwater planctomycete, *Gemmata obscuriglobus*. *Journal of Microbiological Methods* 21: 45-54.

Loy A, Arnold R, Tischler P, Rattei T, Wagner M & Horn M. (2008). probeCheck—a central resource for evaluating oligonucleotide probe coverage and specificity. *Environmental microbiology*, 10 (10), 2894-2898.

Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, Buchner A, ... & Schleifer KH. (2004). ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic acids research*, 32(4), 1363-1371.

Malakhov VV. (1994). *Nematodes*. London: Smithsonian Institution Press.

Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., & Schleifer, K. H. (1992). Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology*, 15(4), 593-600.

McArthur JV. (2006). *Microbial ecology: an evolutionary approach*, Access Online via Elsevier.

Moens T, dos Santos GAP, Thompson F, Swings J, Fonseca-Genevois Vn, Vincx M, De Mesel I. (2005). Do nematode mucus secretions affect bacterial growth? *Aquatic Microbial Ecology* 40: 77-83.

Moran NA, McCutcheon JP, Nakabachi A. (2008). Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annual review of genetics* 42: 165-190.

Muller F, Brissac T, Le Bris N, Felbeck H, Gros O. (2010). First description of giant Archaea (Thaumarchaeota) associated with putative bacterial ectosymbionts in a sulfidic marine habitat. *Environmental Microbiology* 12: 2371-2383.

Musat N, Werner U, Knittel K, Kolb S, Dodenhof T, van Beusekom JEE, de Beer D, Dubilier N, Amann R. (2006). Microbial community structure of sandy intertidal sediments in the North Sea, Sylt-Romo Basin, Wadden Sea. *Systematic and Applied Microbiology* 29: 333-348.

Nakagawa S, Takai K. (2008). Deep-sea vent chemoautotrophs: diversity, biochemistry and ecological significance. *FEMS microbiology ecology* 65: 1-14.

Ott JA, Bauer-Nebelsick M, Novotny V. (1995). The genus *Laxus* Cobb, 1984 (Stilbonematinae : Nematoda) : Description of two new species with ectosymbiotic chemoautotrophic bacteria. *Proceedings of the biological society of Washington* 108:508-527.

Ott J, Bright M, Bulgheresi S. (2004a.) Marine microbial thiotrophic ectosymbioses. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev* 42: 95-118.

Ott J, Bright M, Bulgheresi S. (2004). Symbioses between marine nematodes and sulfur-oxidizing chemoautotrophic bacteria. *Symbiosis* 36: 103-126.

Ott J and R Novak (1989). Living at an interface: meiofauna at the oxygen/sulfide boundary of marine sediments, page 415-422. In J.S Ryland and P.A. Tyler (ed.), Reproduction, genetics and distributions of marine organisms. Olsen and Olsen, Fredensborg, Denmark.

Ott J, Novak R, Schiemer F, Hentschel U, Nebelsick M, Polz M. (1991). Tackling the sulfide gradient: a novel strategy involving marine nematodes and chemoautotrophic ectosymbionts. PSZN I: Marine Ecology 12(3): 261-279.

Ott J, Rieger G, Rieger R, Enderes F. (1982). New Mouth less Interstitial Worms from the Sulfide System: Symbiosis with Prokaryotes. PSZN I: Marine Ecology 3(4): 313-333.

Page AP, Rudin W, Fluri E, Blaxter ML, Maizels RM. (1992). *Toxocara canis*: A labile antigenic surface coat overlying the epicuticle of infective larvae. Experimental Parasitology 75: 72-86.

Pimentel-Elardo S, Wehrli M, Friedrich AB, Jensen PR, Hentschel U. (2003). Isolation of planctomycetes from *Aplysina* sponges. Aquatic microbial ecology 33: 239-245.

Polz MF, Distel DL, Zarda B, Amann R, Felbeck H, Ott JA, Cavanaugh CM. (1994). Phylogenetic analysis of a highly specific association between ectosymbiotic, sulfur-oxidizing bacteria and a marine nematode. Applied and environmental microbiology 60: 4461-4467.

Polz MF, Felbeck H, Novak R, Nebelsick M, Ott JrA. (1992). Chemoautotrophic, sulfur-oxidizing symbiotic bacteria on marine nematodes: morphological and biochemical characterization. Microbial ecology 24: 313-329.

Riemann F, Schrage M. (1978). The mucus-trap hypothesis on feeding of aquatic nematodes and implications for biodegradation and sediment texture. Oecologia 34: 75-88.

Ross D. (1979). 'Stealing' of the symbiotic anemone, *Calliactis parasitica*, in intraspecific and interspecific encounters of three species of Mediterranean pagurids. *Canadian Journal of Zoology* 57: 1181-1189.

Sagan L. (1967). On the origin of mitosing cells. *Journal of theoretical biology* 14: 225-226.

Schiemer F, Novak R, Ott J. (1990). Metabolic studies on thiotrophic free-living nematodes and their symbiotic microorganisms. *Marine biology* 106: 129-137.

Tal Y, Watts JE, Schreier HJ. (2005). Anaerobic ammonia-oxidizing bacteria and related activity in Baltimore inner harbor sediment. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1816-1821.

Wei S, Young R. (1989). Development of symbiotic bacterial bioluminescence in a nearshore cephalopod, *Euprymna scolopes*. *Marine Biology* 103: 541-546.

Wright D, Perry R. (1998). Respiratory physiology, nitrogen excretion and osmotic and ionic regulation. The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes.: 103-131.

Zuckerman BM, Kahane I, Himmelhoch S. (1979). *C. briggsae* and *C. elegans*: Partial characterization of cuticle surface carbohydrates. *Experimental Parasitology* 47: 419-424.

## ZUSAMMENFASSUNG

Marine Nematoden aus der Unterfamilie der Stilbonematinae sind durch ihre Fähigkeit, sehr spezifische Assoziationen mit schwefeloxidierenden Bakterien einzugehen, charakterisiert. Bei der Spezies *Laxus oneistus* bedecken diese fast die gesamte Oberfläche der Kutikula jedes erwachsenen Nematoden, mit Ausnahme der äußersten Spitze des Schwanzes und des Vorderkörpers. Dies ist die erste Studie, die sich ausschließlich mit juvenilen Individuen von *L. oneistus* befasst. Morphologische Analysen durch Licht-, Elektronen- und Konfokalmikroskopie zeigten, dass auch juvenile Nematoden, die zum ersten frei lebenden Entwicklungsstadium (J1/2) gehören, einen bakteriellen Überzug aufweisen. Seine räumliche Begrenzung und Architektur ist die gleiche wie bei adulten Exemplaren. Zusammen mit der Detektion des ektosymbiontbindenden Proteins „Mermaid“ wird eine Ektosymbiontrekrutierung in J1/2 Stadien oder sogar vorher vermutet. Die Bakterien wurden molekular charakterisiert indem eine 16S rRNA-Gen-Bibliothek angelegt und Fluoreszenz in situ Hybridisierung angewandt wurde. Mit Hilfe von 16S rRNA-Gen-spezifischen Sonden konnten zum ersten Mal Ektosymbiontzellen im Darm molekular identifiziert werden. Zusätzlich zum Ektosymbiont wurde eine neuartige, filamentöse Mikrobe entdeckt, die meistens, wenn nicht sogar ausschließlich, mit den Öffnungen der epidermalen Drüsen von juvenilen Nematoden verbunden ist. Die filamentöse Mikrobe wurde zum Stamm der Planctomyceten unter Anwendung von 16S rRNA Klonbibliotheken und FISH mit spezifischen Sonden zugeordnet. Datenbankanalysen ergaben, dass die 16S-rRNA-Gene nur zu 91% identisch mit dem am nächsten verwandten Planctomyceten Bakterium ist. Aufgrund des Lokalisierungsmusters wird vermutet, dass dieses filamentöse Bakterium die sekretorischen und oder auch exkretorischen Produkte nutzen kann. Würde sich das letztere Szenario als wahr erweisen, könnte der Wirt überdies von diesen, mit den Planctomyceten verwandten Bakterien, profitieren.

Diese Arbeit ist ein neues Glied einer langen Kette von Forschungen, die an *Laxus oneistus* durchgeführt wurden. Durch die Beschreibung von juvenilen Individuen ist ein weiteres Puzzlestück zur Frage der Transmission der Symbionten dazugekommen. Die Detektion und erstmalige molekulare Identifikation von Ektosymbiontzellen im Darmtrakt der juvenilen Fadenwürmer zeigen eine trophische Interaktion zwischen dem Wirt und dem Ektosymbiont.

## DANKSAGUNG

Ein herzliches Dankeschön geht an meine beiden Betreuer Jörg Ott und Silvia Bulgheresi, die mir die Möglichkeit gaben meine Diplomarbeit im Bereich der Symbioseforschung durchzuführen. Ich danke Prof. Jörg Ott für die Unterstützung beim Verfassen dieser Arbeit und den tieferen Einblick in marine Lebensräume, den ich durch zahlreiche Diskussionen bei Arbeitsgruppentreffen und Vorträgen erhalten habe. Spezieller Dank geht auch an Silvia Bulgheresi für ihre konstante und sehr herzliche Betreuung. Sie motivierte mich stets und förderte meine ersten selbstständigen Schritte. Des Weiteren danke ich Harald Gruber-Vodicka für die tatkräftige Unterstützung bei den phylogenetischen Analysen. Den ehemaligen Mitgliedern der Shallow Water Symbioses Group, Uli Dirks, Niko Leisch, Lisa Bauer und Nika Pende danke ich für ihr hilfreiches Feedback bei Präsentationsvorbereitungen und für die vielen Ratschläge bei Laborarbeiten. Besonderer Dank gilt auch dem Department of Genetics in Ecology-Team, das mir, unter der Leitung von Christa Schlepper, einen gut ausgestatteten Arbeitsplatz zur Verfügung stellte und durch die besonders kollegiale Atmosphäre meine Arbeiten im Labor zu einer Erfahrung machte, die ich nicht missen möchte. Weiters möchte ich Daniela Gruber, Vanessa Zheden und Norbert Cyran für ihre Unterstützung bei Arbeiten im Labor der Abteilung für Ultrastruktur unter der Leitung von Prof. Klepal danken.

# Curriculum Vitae

## PERSÖNLICHE DATEN:

Name: Schmidt Amir  
E-Mail Adresse: megalodon@riseup.net  
Geburtsdatum: 15.11.1983  
Geburtsort: Male' / Malediven



## SCHULBILDUNG:

1990-1994: öffentliche Volksschule in Hermagor/Kärnten  
1994-1998: Hauptschule in Hermagor  
1998-2002: Bundesoberstufengymnasium in Hermagor  
18. Juni 2002: Matura

## STUDIUM:

2002-2004: Diplomstudium Biologie an der Universität Wien  
SoSe 2004: Studienunterbrechung wegen eines Praktikums  
WiSe 2004: Diplomstudium Biologie an der Universität Wien  
SoSe 2005: Studienunterbrechung wegen eines Praktikums  
2005-2013: Diplomstudium Biologie an der Universität Wien  
SoSe 2011: Beginn der Diplomarbeit  
WiSe 2013: Abgabe der Diplomarbeit

„SKILLS“:

- Molekulare Techniken (PCR, DNA-Klonierung, Sequenzierung, FISH)
- Mikroskopie (Lichtmikroskopie, Elektronenmikroskopie, Konfokalmikroskopie)
- Unterwasserarbeiten (diverse Probenentnahmen, „Reef Check“)

Wien, am 01.09.2013

*Amir Schmidt*