Zell-Zell-Interaktionen heterotropher Bakterien bei der Besiedlung und dem Abbau partikulären organischen Materials im Bodensee

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
an der Universität Konstanz
Fachbereich Biologie

vorgelegt von

Katharina Styp von Rekowski

Tag der mündlichen Prüfung: 04.07.2008
1. Referent: Prof. Dr. Bernhard Schink, Universität Konstanz
2. Referent: Prof. Dr. Karl-Otto Rothhaupt, Universität Konstanz

Konstanzer Online-Publikations-System (KOPS)
URL: http://www.ub.uni-konstanz.de/kops/volltexte/2008/5741/
URN: http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bsz:352-opus-57419

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung 1

2 Abkürzungsverzeichnis 3

3 Einleitung 5

3.1 Die Rolle organischer Partikel und der Abbau durch heterotrophe Bakterien im oligotrophen Bodensee 5

3.2 Interaktionen zwischen heterotrophen Bakterien bei der Besiedlung und dem Abbau organischer Partikel 7

3.3 Quorum Sensing als Beispiel bakterieller Kommunikation 9

3.4 Abbau von Chitin als Beispiel partikulären organischen Materials 11

3.5 Ziele der Arbeit 14

4 Material und Methoden 15

4.1 Chemikalien 15

4.2 Mikrobiologische Methoden 15

4.2.1 Verwendete Bakterienstämme 15

4.2.2 Medien und Substrate 16

4.2.2.1 Medien und Substrate 16

4.2.2.2 Präparation von kolloidalem Chitin 16

4.2.2.3 Herstellung von in Agarose eingebetteten Substraten 17

4.2.3 Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung 17

4.2.4 Wachstumsmessungen 17

4.2.5 Anreicherung und Isolierung von Bakterien in Mikrokosmen 18

4.2.6 Wachstumsversuche mit in Agarose eingebetteten Algen als Substrat 19

4.2.7 Wachstumsversuche mit Chitin als Substrat 19

4.2.8 Gewinnung von Kulturüberständen 20

4.3 Biochemische Methoden 20

4.3.1 Zellernte und Herstellung von Rohextrakten 20

4.3.2 Aktivitätsbestimmung extrazellulärer chitinolytischer Enzyme 21

4.4 Analytische Methoden 21

4.4.1 Organische Extraktion von Acyl-Homoserinlaktonen (AHL) aus Kulturüberständen 21

4.4.2 Nachweis von AHL in Kulturüberständen 21

4.4.3 Charakterisierung von AHL mittels Dünnschichtchromatographie (DC) 22

4.4.4 Ammoniumbestimmung 23

4.4.5 Proteinbestimmung 23

4.4.6 Hochdrucksflüssigkeitschromatographie (HPLC) 23
4.5 Molekularbiologische Methoden 24
4.5.1 Verwendete Vektoren 24
4.5.2 Extraktion von genomischer DNA und Plasmiden 24
4.5.3 DNA-Konzentrationsbestimmung 24
4.5.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen 24
4.5.5 Reinigung von DNA 24
4.5.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR) 25
4.5.7 Agarosegelelektrophorese 26
4.5.8 Restriktionsverdau von DNA 26
4.5.9 Dephosphorylierung geschnittener Plasmide 27
4.5.10 Ligation von DNA, Herstellung kompetenter *E. coli* und Transformation von Ligationsansätzen 27
4.5.11 Sequenzierung 27
4.5.12 Transposonmutagenese von *Aeromonas hydrophila* AH-1N 28
4.5.13 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) 29
5 Ergebnisse 30
5.1 Untersuchungen zur Rolle AHL-vermittelter Zell-Zell-Interaktionen in Mikrokosmen 30
5.1.1 Anreicherung heterotropher Bakterien in Mikrokosmen 30
5.1.2 Screening gewachsener Kolonien auf AHL-Bildung 33
5.1.3 Isolierung und Charakterisierung von Reinkulturen 36
5.1.3.1 Charaktersierung der AHL-bildenden Isolate 36
5.1.3.2 Charakterisierung der schwärmenden nicht-AHL-bildenden Isolate 38
5.1.4 Wachstumsversuche mit *Aeromonas*-Reinkulturen 39
5.1.5 Wachstumsversuche zu Interaktionen zwischen den Stämmen AH-1N und 4D9 41
5.2 Wachstum mit Chitin 43
5.2.1 Wachstum der Stämme AH-1N und 4D9 in Reinkulturen 43
5.2.1.1 Wachstum mit GlcNAc, $GlcNAc_2$ und $GlcNAc_3$ in Flüssigkultur 43
5.2.1.2 Wachstum mit freiem kolloidalen Chitin in Flüssigkultur 44
5.2.1.3 Wachstum der Stämme AH-1N und 4D9 mit eingebettetem Chitin 47
5.2.2 Interaktionen der Stämme AH-1N und 4D9 beim Abbau von Chitin 49
5.2.3 Nachweis von chitinolytischen Enzymen und Chitin-Abbauprodukten 52
5.2.4 Wachstum des Stammes 4D9 mit zellfreiem Überstand des Stammes AH-1N 56
5.2.5 Interaktionen der Stämme AH-1N und PAO1 beim Wachstum mit Chitin 59
5.3 Transposonmutagenese 61

6 Diskussion 63
6.1 Untersuchungen zur Rolle AHL-vermittelter Zell-Zell-Interaktionen in Mikrokosmen 63
6.1.1 Etablierung von Mikrokosmen 63
6.1.2 Charakterisierung isolierter Bakterien 64
6.1.3 Die Rolle AHL-vermittelter Zell-Zell-Kommunikation in Mikrokosmen 66
6.2 Metabolische und physiologische Interaktionen beim Abbau von Chitin 69
6.2.1 Abbau von Chitin durch *Aeromonas hydrophila* AH-1N 69
6.2.2 Abbau von Chitin durch *Cytophaga* sp. 4D9 72
6.2.3 Abbau von Chitin durch *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 74
6.2.4 Charakterisierung der Interaktionen der Stämme AH-1N, 4D9 und PAO1 beim Chitinabbau 74
6.3 Ausblick 77
7 Literaturverzeichnis 78

1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Zell-Zell Interaktionen heterotropher Bakterien aus dem Litoral des Bodensees bei der Besiedlung und dem Abbau partikulären organischen Materials untersucht. Zum einen wurde dabei die Rolle bakterieller Zell-Zell Kommunikation (Quorum Sensing) über N-Acyl-Homoserinlaktone (AHL) unter natürlichen Bedingungen charakterisiert. Zum anderen wurden Interaktionen in einem *mixed species biofilm* beim Abbau von Chitin untersucht. Für diese Untersuchungen wurden Mikrosmos-Experimente etabliert, in denen partikuläres organisches Material (autoklavierte einzellige Algen oder Chitin) in Agarosepartikel eingebettet wurde und entweder der natürlichen Mikroflora des Bodenseelitorals oder definierten Bakterienstämmen als Substrat in Flüssigkulturen angeboten wurde.

1. In Mikrosmos-Experimenten mit eingebetteten Algen und der natürlichen Mikroflora des Bodenseelitorals reicherten sich zwei dominante Gruppen von Bakterien an, welchen eine wichtige Rolle beim Abbau organischer Partikel zugeschrieben wird. Dies waren einerseits AHL-bildende Gammaproteobakterien der Gattung *Aeromonas* und andererseits nicht AHL-bildende Stämme der sehr heterogenen Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium*. Einige Stämme beider Gruppen zeigten bei der Isolierung aus den Mikrokosmen Wechselwirkungen bei der Koloniebildung auf Festmedium.

2. Die starke Anreicherung der AHL-bildenden *Aeromonas*-Stämme unterstützte unsere ursprüngliche Arbeitshypothese, dass AHL-vermittelter Zell-Zell Kommunikation eine wichtige Rolle bei der Besiedelung und dem Abbau von partikulärer organischer Substanz zukommt. Wachstumsversuche mit Rein- und definierten Cokulturen von *Aeromonas hydrophila* Stamm AH-1N und der nicht AHL-bildenden isogenen Mutante AH-1N *ahyI* zeigten jedoch, dass AHL-Bildung unter standortnahen Bedingungen für eine erfolgreiche Etablierung innerhalb der Mikrokosmen nicht erforderlich war. Auch in Konkurrenz mit dem *Cytophaga* sp. Stamm 4D9 war ein Wachstumsvorteil des Stammes AH-1N durch AHL-Bildung nicht zu beobachten.

3. *A. hydrophila* Stamm AH-1N und *Cytophaga* sp. Stamm 4D9 konnten beide mit freiem kolloidalem Chitin als Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle in Flüssigkultur wachsen. Lag Chitin in Agarose eingebettet vor, so war Stamm 4D9 nur noch in Cokultur mit Stamm AH-1N in der Lage, mit Chitin zu wachsen. Dabei integrierte sich Stamm 4D9 in den Biofilm des Stammes AH-1N auf den Agarosepartikeln. Stamm 4D9 konnte auch in Gegenwart zellfreier Kulturüberstände, welche von Stamm AH-1N produzierte extrazelluläre chitinolytische Enzyme enthielten, mit eingebettetem Chitin wachsen. Dabei bildete Stamm 4D9 keinen Biofilm. In Cokultur war eine Biofilmbildung des Stammes 4D9 erforderlich, um Zugang zu den durch die chitinolytischen Enzyme von Stamm AH-1N gebildeten Oligomere von N-Acetylglucosamin (GlcNAc) zu erhalten.

4. Weiterhin unterstützte Stamm AH-1N das Wachstum des *Pseudomonas aeruginosa*-Stammes PAO1 beim Wachstum mit Chitin, welcher in Reinkultur nicht in der Lage war, Chitin abzubauen. In Cokultur mit Stamm AH-1N nutzte Stamm PAO1 das durch Stamm AH-1N während des Wachstums mit Chitin freigesetzte Acetat sowie vermutlich das Chitin-Monomer GlcNAc und zusätzliche bisher nicht identifizierte Chitin-Abbauprodukte, nicht aber die Oligomere $GlcNAc_2$ und $GlcNAc_3$.

Zusammenfassend waren die von uns etablierten Mikrokosmen hervorragend geeignet, um Wechselwirkungen heterotropher Bakterien bei der Besiedlung und dem Abbau organischer Partikel zu untersuchen und dabei die natürlichen Bedingungen des Bodensees zu simulieren. Im Rahmen der Mikrokosmos-Experimente sowie weiterentwickelter Versuche mit Chitin als Substrat wurden neue Zell-Zell Interaktionen standortrelevanter Bakterien entdeckt. Diese Entdeckungen können als Grundlage für weitere Untersuchungen zu spezifischen Wechselwirkungen zwischen heterotrophen Bakterien bei der Biofilmbildung und dem Abbau organischer Partikel dienen.

2 Abkürzungsverzeichnis

4-MU	4-Methylumbelliferon
AHL	Acyl-Homoserinlakton
ATP	Adenosinmonophosphat
BLAST	*Basic Local Alignment Search Tool*
BHL	N-Butanoyl-Homoserinlakton
bp	Basenpaar
CFU	*Colony forming units* (Kolonie bildende Einheiten)
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DC	Dünnschichtchromatographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DOM	*Dissolved organic matter*
E.C.	Kennnummer der *Enzyme Nomenclature* des *Nomenclature Committee* der *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (1992)
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
FISH	Fluorezenz *in situ* Hybridisierung
FITC	Fluorescein-5-Isothiocyanat
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
$GlcNAc_2$	N,N'-Diacetylchitobiose
$GlcNAc_3$	N,N',N''-Triacetylchitotriose
HHL	N-Hexanoyl-L-Homoserinlakton
HPLC	*High Performance Liquid Chromatography*
MCS	*Multiple cloning site*
OD	Optische Dichte
ODHL	N-3-Oxo-Decanoyl-Homoserinlakton
OdDHL	N-3-Oxo-Dodecanoyl-Homoserinlakton
OHL	N-Octanoyl-Homoserinlakton
OHHL	N-3-Oxo-Hexanoyl-Homoserinlakton
OtDHL	N-3-Oxo-Tetradecanoyl-Homoserinlakton
PCR	*Polymerase chain reaction* (Polymerase-Kettenreaktion)
POM	*Particulate organic matter*
QS	*Quorum sensing*
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus

rpm	*Rounds per minute*
TCC	*Total cell counts* (Gesamtzellzahlen)
U	Units (µmol min^{-1})
yfp	*Yellow fluorescent protein*
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtprozent

3 Einleitung

3.1 Die Rolle organischer Partikel und der Abbau durch heterotrophe Bakterien im oligotrophen Bodensee

Der Bodensee ist mit rund 535 km^2 der drittgrößte See Mitteleuropas. Der in den 60er und 70er Jahren durch anthropogene Einflüsse eutrophierte See hat in den letzten 20 Jahren vor allem durch eine effektive Verringerung des Phosphor-Zuflusses seinen ursprünglich oligotrophen Zustand wiedererlangt (Güde et al. 1998). Der Begriff Oligotrophie beschreibt nach limnologischer Definition einen nährstoffarmen Zustand, wobei hier vor allem anorganische Nährstoffe wie Phosphor und Stickstoff, nicht aber die Konzentrationen von gelöstem und partikulärem Kohlenstoff beschrieben werden (Morita 1997). Unabhängig von seiner Gesamtmenge ist der größte Teil des organischen Kohlenstoffs jedoch nicht sofort bioverfügbar, sondern wird nur langsam umgesetzt (Weiss und Simon 1999). Die Konzentrationen des sofort für einen Umsatz zur Verfügung stehenden organischen Kohlenstoffs, vor allem Monosaccharide, belaufen sich auf etwa 5- 20 µM für den Bodensee (Hanisch et al. 1996). Da organischer Kohlenstoff jedoch die Hauptenergiequelle heterotropher Organismen darstellt, kann die Beschreibung der Nährstoffarmut eines oligotrophen Gewässers somit auch die Kohlenstoffquelle miteinbeziehen (Morita 1997). Heterotrophe Bakterien gelten als die wichtigsten Verwerter gelösten organischen Kohlenstoffs (Weiss und Simon 1999). In einem oligotrophen aquatischen System, in dem die Konzentration des frei verfügbaren gelösten organischen Kohlenstoffes (*dissolved organic matter*, DOM) gering ist, wird die Haupt-Kohlenstoff- und –Energiequelle für heterotrophe Bakterien demnach durch organische Partikel repräsentiert. Partikuläres organisches Material (*particulate organic matter*, POM) entsteht durch eine Vielzahl von physikalisch-chemischen sowie biologischen Prozessen. Einer autochthonen Entstehung liegt vor allem der photoautotrophe Biomasseaufbau und anschließender Umsatz in der Nahrungskette zu Detritus-Partikeln zugrunde (Simon et al. 2002), welche oft den größten Teil des POM ausmachen, jedoch dürften auch die Einträge von Partikeln durch Teile absterbender Pflanzen sowie Tiere eine große Rolle spielen. Unter den Bestandteilen organischer Partikel finden sich unter anderem lebende sowie tote Organismen aus dem Phyto- und Zooplankton, Hüllen von Larven und Schalentieren, Bakterien, Biodepositionen sowie anorganische Substanzen wie Mineralien. Dominante Biopolymere sind Kohlenhydrate, Proteine sowie Lipide. Als Mikroaggregate werden Partikel von einer Größe von 1 µm bis 1 mm, als Makroaggregate oder „Lake Snow“ (in marinen Systemen „Marine Snow“) von einer Größe zwischen 1 mm

und mehreren Zentimetern bezeichnet. Die Häufigkeit solcher Aggregate wurde für den Bodensee mit bis zu 50 Makroaggregaten und zwischen 5 und 10^6 Mikroaggregaten pro Liter beschrieben (Simon et al. 2002).

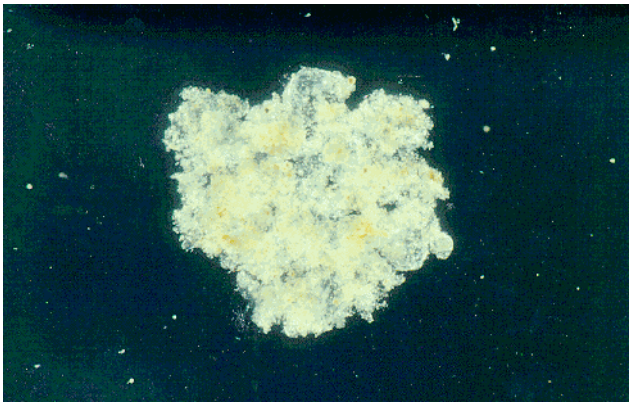


Abbildung 3-1 Fotografie eines *marine snow* Partikels, bestehend aus totem und zerfallendem Phytoplankton, fäkalem Material von Zooplankton sowie deren Exoskeletten (Durchmesser 4 mm). (http://www.noc.soton.ac.uk/GDD/exbio/Rsl_web.htm)

In der nährstoffarmen Umgebung oligotropher Gewässer stellen solche Partikel somit Orte erhöhter Substratkonzentrationen dar (Grossart et al. 2003), weshalb die größte metabolische Aktivität heterotropher Bakterien an solchen Partikeln zu finden ist und diese daher auch als „Metabolic Hot Spots“ bezeichnet werden. Beispielweise zeigten in einer Untersuchung von Partikeln des Bodensees partikelassoziierte Bakterien eine weitaus höhere Atmungsrate als freischwimmende Zellen (Grossart und Simon 1998). Die hohe metabolische Aktivität lässt sich ebenfalls in einer hohen Aktivität Zelloberflächen-gebundener oder freier hydrolytischer Enzyme wiederfinden (Smith et al. 1992), wodurch in großem Maße gelöster organischer Kohlenstoff freigesetzt wird. Durch die hohe Umsatzrate wird partikuläres Material teilweise schneller abgebaut, als die freigesetzten löslichen Substrate aufgenommen werden können. Dadurch treten in der unmittelbaren Umgebung der Partikel sehr hohe Konzentrationen an DOM sowie anorganische Nährstoffe auf (Kiørboe und Jackson 2001). Dieser „Dunstkreis“ an Nährstoffen dient freischwimmenden Bakterien als Wachstumssubstrat, wodurch an und um ein organisches Aggregat hohe bakterielle Zellzahlen auftreten, welche um ein tausendfaches höher sein können im Vergleich zu reinem See- oder Meerwasser (Azam und Long 2001). Die durch die hohen Zelldichten erhöhte bakterielle Biomasse ist die Grundlage für die pelagische Nahrungskette. Protozoen werden angezogen, welche ihrerseits größeren Tieren als Substrat dienen. Somit spielen organische Aggregate eine äußerst wichtige Rolle beim Nährstoffrecycling in der Wassersäule und der gesamten Nahrungskette,

wobei in einem hohen Maße der Kohlenstofffluss und -umsatz durch heterotrophe Bakterien beeinflusst wird (Azam et al. 1993).

3.2 Interaktionen zwischen heterotrophen Bakterien bei der Besiedlung und dem Abbau organischer Partikel

Die Wichtigkeit heterotropher Bakterien für den Kohlenstofffluss in aquatischen Systemen und somit für die gesamte Nahrungskette steht außer Frage. Der Begriff „microbial loop“ beschreibt den Weg des gelösten organischen Kohlenstoffs bis hin zu den letzten Gliedern der Nahrungskette und den Weg zurück zu heterotrophen Bakterien und der erneuten Freisetzung von DOM (Azam et al. 1983). Über die bei der Besiedlung und dem Abbau organischer Partikel ablaufenden Vorgänge, welche letztendlich zur Freisetzung von DOM führen, gibt es zwar bereits einige Untersuchungen, nicht aber für die zwischen den Mitgliedern des „microbial loops“ ablaufenden Interaktionen (Azam et al. 1993).
Für den Abbau partikulären organischen Materials spielt zunächst die Besiedlung sowie die Etablierung auf einem organischen Aggregat eine wichtige Rolle. Der initiale Vorgang ist die irreversible Anheftung einzelner Zellen an eine Oberfläche. Durch Zellteilung entstehen Mikrokolonien, welche durch die Ausbildung von Adhesinen zusätzliche Festigung erhalten und die typische Architektur eines Biofilms verursachen. Diese Architektur gewährleistet durch ihre Hohlräume und Kanäle einschließende dreidimensionale Struktur unter anderem den Nährstoffaustausch (Dunne 2002). Ein wichtiger Faktor bei der Biofilmbildung und- Weiterentwicklung ist die Freisetzung extrazellulärer polymerer Substanzen (EPS), welche aus Polysacchariden, Proteinen sowie Nukleinsäuren bestehen können (Stoodley et al. 2002). EPS dienen einerseits der Festigung der strukturellen Eigenschaften eines Biofilms, andererseits schützen sie die Mitglieder der Biofilmgemeinschaft vor der Zugänglichkeit antimikrobieller Substanzen (Costerton et al.1999). Die Architektur eines Biofilms ist sowohl räumlich als auch zeitlich sehr heterogen, welche sich durch innere sowie äußere Einflüsse ständig ändert (Donlan 2002). Die Heterogenität äußert sich beispielsweise durch verschiedenste komplexe bakterielle Gemeinschaften, deren Zusammensetzungen sich deutlich von denen im umgebenden Wasser unterscheiden (Crump et al. 1999). Die bakteriellen Gemeinschaften sind äußerst dynamisch, verursacht durch Anheftung und Ablösung einiger Zellen, Wachstum und Beweglichkeit innerhalb des Biofilms, die Änderung der Umgebung sowie komplexer intra- und interspezifischer Interaktionen (Kiørboe et al. 2003).
Diese Interaktionen können sowohl kooperativ als auch antagonistisch erfolgen. Innerhalb der antagonistischen Wechselwirkungen wird vor allem die Konkurrenz um Nährstoffe

sowie um Anheftungsstellen auf der Partikeloberfläche im Vordergrund stehen. Die Vorraussetzungen für eine schnelle Besiedlung eines Partikels und einen erfolgreichen Wettbewerb um Nährstoffe sind Motilität sowie chemotaktische Fähigkeiten (Kiørboe et al. 2002, Simon et al. 2002). Nicht-chemotaktische Bakterien sowie langsame oder gar unbewegliche könnten hier klar übervorteilt werden. Die Wachstumsrate eines einzelnen Bakteriums hingegen spielt unter den nährstofflimitierten Bedingungen zunächst keine Rolle (Gottschal 1985). Erst nach erfolgreicher Besiedlung und Nährstoffverfügbarkeit können schnell wachsende Bakterien im Vorteil sein. Auch antagonistische Interaktionen durch die Produktion inhibitorischer Substanzen können zur Durchsetzung einiger Stämme innerhalb einer bakteriellen Gemeinschaft führen (Long und Azam 2001).

Hinsichtlich der verfügbaren Substrate können allerdings auch kooperative Interaktionen auftreten. Ein sehr wichtiger Bereich sind hier metabolische Interaktionen. Durch die komplexe Gemeinschaft innerhalb eines Biofilms auf einem organischen Partikel sind eine ebenfalls große Vielfalt extrazellulärer polymerabbauender Enzyme zu erwarten, darunter Cellulasen, Hemicellulasen, Chitinasen und Amylasen. Allein die Gruppe der bisher bekannten Glycosid-Hydrolasen beinhaltet über 50 verschiedene Familien (Zoppini et al. 2005). Für jede spezifische Bindung innerhalb eines Polymers wird ein spezifisches Enzym produziert, wobei innerhalb einzelner Enzymgruppen wiederum Unterteilungen anhand der entstehenden Produkte möglich sind. Beispielsweise können einige Cellulasen einerseits Cellobiose, andererseits eine Mischung aus verschiedenen Cellodextrinen produzieren (Tomme et al. 1995). Wenn man nun noch die Variabilität verschiedene Polymere innerhalb eines organischen Partikels bedenkt, entsteht eine riesige Vielfalt an löslichen Abbauprodukten. Zusätzlich werden durch die Remineralisierung der Substrate essentielle Nährstoffe frei, welche in oligotropher Umgebung der limitierende Faktor sind. Von den freigesetzten löslichen organischen Substraten sowie anorganischen Nährstoffen profitieren vor allem solche Bakterien innerhalb des Biofilms, welche ihrerseits keine eigenen extrazellulären Enzyme produzieren. Weiterhin werden freilebende chemotaktische Bakterien angelockt (Blackburn et al. 1998). Neben dieser indirekten Interaktion durch gemeinsame Nutzung extrazellulärer Enzyme und freiwerdender Substrate sind auch direkte Interaktionen mittels chemischer intra- und interzellulärer Kommunikation möglich (siehe nächstes Kapitel).

Trotz vieler Studien über die bei der Besiedlung und dem Abbau organischer Partikel ablaufenden Vorgänge und intensiver phylogenetischer Beschreibung bakterieller Gemeinschaften solcher Partikel (siehe hierzu Crump et al. 1999, Lemarchand et al. 2006, Weiss et al. 1996) ist zu den spezifischen Interaktionen, vor allem unter natürlichen Bedingungen, bisher wenig bekannt.

3.3 Quorum Sensing als Beispiel bakterieller Kommunikation

Die bei der Besiedlung und dem Abbau organischer Partikel wichtigen Faktoren wie die Bildung eines Biofilms und die Produktion extrazellulärer hydrolytischer Enzyme in einer Umgebung mit hoher Diffusion sind nur bei einem effektiven Verbrauch der Substrate lohnend. Hohe Zelldichten können einen geringen Verlust löslicher Substrate gewährleisten, weswegen viele der oben genannten Faktoren erst bei dem Erreichen einer bestimmten Zelldichte induziert werden. Diese Populationsdichte-abhängige Genexpression wird als Quorum Sensing (QS) bezeichnet. Der kooperativen Expression spezifischer Gene liegt die Produktion verschiedener diffusibler Signalmoleküle zugrunde (für aktuelle Reviews siehe Waters und Bassler 2005, Keller und Surette 2006). Das Phänomen, dass Bakterien über Signalmoleküle miteinander kommunizieren, wurde erstmals beim marinen Bakterium *Photobacterium* (*Vibrio*) *fischeri* entdeckt (Nealson et al. 1970), dessen Biolumineszenz im Leuchtorgan eines Tintenfisches seine Verwendung findet. Durch die Regulation über das Quorum Sensing-System wird der notwendige Energieaufwand erst ab für die Biolumineszenz relevanten Zelldichten aufgebracht. Freilebende Zellen lumineszieren daher nicht, dicht gepackte im Leuchtorgan dagegen schon. QS spielt oft eine Rolle bei pathogenen Bakterien, die Bildung vieler virulenter Exoenzyme unterliegt dem Regulationsmechanismus über QS. Weitere Beispiele sind Antibiotika-Produktion, DNA-Transfer, Differenzierungsprozesse, Sporulation und Pigmentproduktion. Die Expression der entsprechenden Gene unterliegt der Aktivierung eines spezifischen Regulatorproteins durch die Signalmoleküle. Bakterien nehmen ihre Zelldichte somit über die Konzentration der spezifischen Signalstoffe war. QS ist sowohl in Gram negativen, als auch in Gram positiven Bakterien bekannt, jedoch werden verschiedene Moleküle verwendet. In Gram negativen Bakterien (bisher nur in Alpha-, Beta- und Gammaproteobakterien) sind dies hauptsächlich Acyl-Homoserinlaktone (AHL) (Abbildung 3-2), welche sich in ihrer Seitenkettenlänge und –substitution unterscheiden und dadurch spezifisch für verschiedene Spezies sein können (Eberl 1999, Miller und Bassler 2001). Gram positive Bakterien nutzen dagegen Peptide (Bassler 2002). Weiterhin wird der sogenannte Autoinducer 2 (AI 2) beschrieben, ein Furanon, dessen Boratester seine aktive Form darstellt (Schauder et al. 2001). AI 2 ist sowohl bei Gram negativen, als auch bei Gram positiven Bakterien bekannt. Die Diversität der Signalmoleküle ist sicherlich weitaus größer, als bisher bekannt, jedoch fehlen für diese Vielfalt geeignete Biotests.

Der molekulare Mechanismus von Quorum Sensing kann wie folgt am Beispiel des *luxCDBA*-Sytems aus *P. fischeri* beschrieben werden. Der Autoinducer (N-3-Oxohexanoyl-L-Homoserinlakton, OHHL) wird produziert von der Synthetase LuxI und akkumuliert innerhalb sowie durch Diffusion über die Membran außerhalb der Zelle. Steigt

die Zelldichte, so steigt auch die Konzentration von OHHL. Die Aktivierung des *Response Regulator* LuxR erfolgt durch die Bindung des Signalmoleküls. Nach Bindung dieses Komlexes an ein DNA-Bindemotiv werden sowohl die Lumineszenz–Gene exprimiert, als auch die Expression von *luxI* hochreguliert, wodurch die Signalmoleküle zusätzlich eine positive Rückkopplung bewirken.

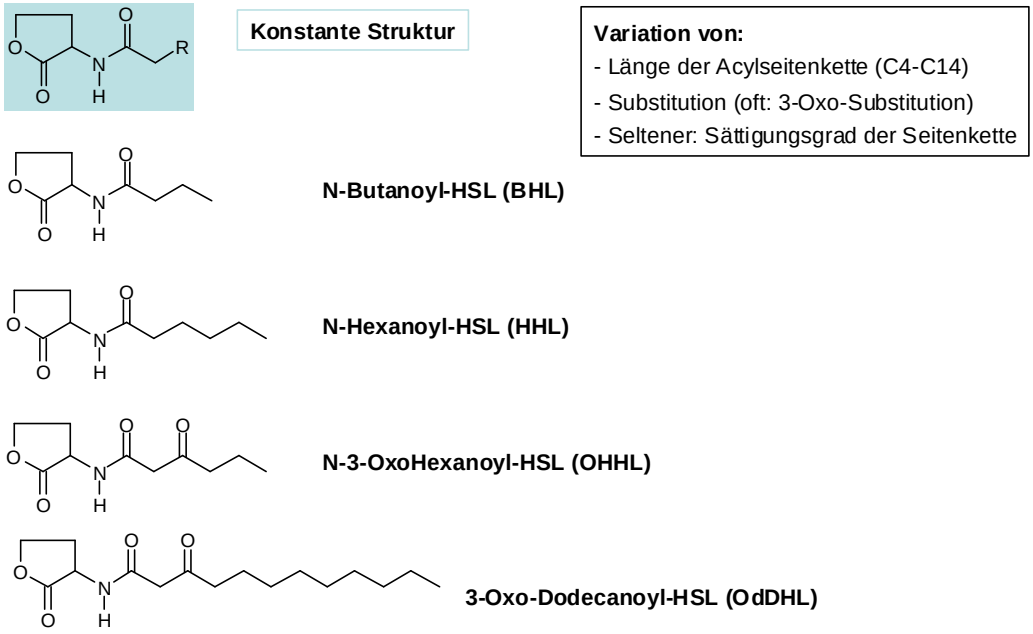


Abbildung 3-2 Übersicht über die strukturelle Vielfalt der Acyl-Homoserinlaktone Gram negativer Bakterien

Da Quorum Sensing aufgrund der Diffusion der Signalmoleküle im Freiwasser kaum eine Rolle spielen dürfte, wird sich diese chemische Kommunikation zwischen Bakterien in erster Linie in Biofilmen abspielen. Einige Untersuchungen (z.B. Voloshin und Kaprelyants 2004, Greenberg 2003) beschreiben die Bedeutung von QS in bakteriellen Biofilmen und Aggregaten. Hier können die Anheftung an eine Oberfläche, die Bildung von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) oder die Differenzierung einzelner Zellen innerhalb des Biofilms einer QS-Regulation unterliegen. Ein im *luxI*-Homolog *lasI* defekter Stamm von *Pseudomonas aeruginosa* weist im Gegensatz zum Wildtyp nur flache, undifferenzierte Biofilme auf (Davies et al. 1998). Auch die Biofilmbildung einer Mutante von *Aeromonas hydrophila* mit einem Defekt in der AHL-Synthese ist gehemmt. Im Gegensatz zum Wildtyp bildet diese Mutante undifferenzierte Biofilms aus (Lynch et al.

2002). Der Phänotyp der Mutante kann weitestgehend durch die Zugabe von exogenem AHL komplementiert werden.

Die beschriebenen Untersuchungen beziehen sich jedoch nur auf Biofilme von Reinkulturen unter Laborbedingungen. Zur Bedeutung von QS in natürlichen Systemen gibt es bisher nur wenige Berichte (Manefield und Turner 2002). So wurden AHL-produzierende Bakterien aus *marine snow* isoliert (Gram et al. 2002) und auch die Anwesenheit von AHL in aquatischen Biofilmen wurde bestätigt (McLean et al. 1997). Die Zugabe von AHL in Anreicherungsmedien erhöhte die Kultivierungseffizienz für marine (Bruns et al. 2003) und Süßwasser-Bakterien (Bussmann et al. 2001). Die Produktion von AHL kann auch zu interspezifischen bakteriellen Wechselwirkungen führen, wie beispielsweise bei Stämmen von *Pseudomonas aeruginosa* und *Burkholderia cepacia* (Lewenza et al. 2002). Auch der Einfluss von AHL-produzierenden Bakterien auf Eukaryoten wurde beobachtet. So nehmen Zoosporen der Grünalge *Ulva* die Anwesenheit von Biofilmen als Anheftungssubstrat durch sich im Biofilm befindende AHL-Produzierer wahr (Joint et al. 2002, Tait et al. 2005). Auch eine Interferenz mit Quorum Sensing-Systemen durch Autoinducer-Antagonisten wurde beschrieben, wie beispielsweise die von der Rotalge *Delisea pulchra* produzierten halogenierten Furanone (Manefield und Turner 2002).

Alle bisherigen Studien über Funktionen und Auswirkungen des Quorum Sensing-Systems suggerieren eine wichtige Rolle auch für die Besiedlung und den Abbau organischer Partikel in aquatischen Systemen. Eine systematische Studie zur Untersuchung der tatsächlich stattfindenden AHL-vermittelten Vorgänge in natürlicher Umgebung fehlt allerdings unseres Wissens vollständig.

3.4 Abbau von Chitin als Beispiel partikulären organischen Materials

Chitin ist nach Cellulose das zweithäufigste Biopolymer der Erde (Gooday 1990a). Die jährliche Produktionsrate beläuft sich auf geschätzte 10^{11} t (Keyhani und Roseman 1999), der Hauptanteil wird vor allem durch Krill eingetragen. Chitin besteht aus alternierenden β-1,4-verknüpften N-Acetylglucosamin-Einheiten, welche zusätzlich durch Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind (Abbildung 3-3). Die häufigste Form von Chitin ist α-Chitin, bei dem die einzelnen Polymerstränge in antiparalleler Richtung verlaufen, welche wiederum durch Wasserstoffbrücken zusammengehalten werden, wodurch eine äußerst stabile Struktur entsteht (Gooday 1990a). Chitin liegt fast immer quervernetzt mit anderen strukturellen Komponenten wie Proteinen vor, zusätzlich sind variierende Grade von Mineralien-Einlagerungen, vor allem durch Verkalkung, zu finden. Es ist ein wichtiger Bestandteil der Zellwände von Pilzen, einigen Grünalgen sowie

Diatomeen und ist das Hauptstrukturelement der Kutikula von Würmern, Weichtieren und Arthropoden (Keyiani und Roseman 1999). Sporadisch wird Chitin auch in Ciliaten, Flagellaten und Amöben gefunden. Bis auf die Ausnahme von Streptomyceten ist das Vorkommen in Prokaryoten nicht bekannt. Chitin-abbauende Enzyme sind weit verbreitet bei Pflanzen, Pilzen, Bakterien und einigen Tieren, jedoch gelten vor allem die bakteriellen chitinolytischen Enzyme als die wichtigsten Umwandler des enormen weltweiten Chitin-Vorrates zu frei verfügbaren gelösten organischen Kohlenstoff sowie Stickstoff (Baty et al. 2001).

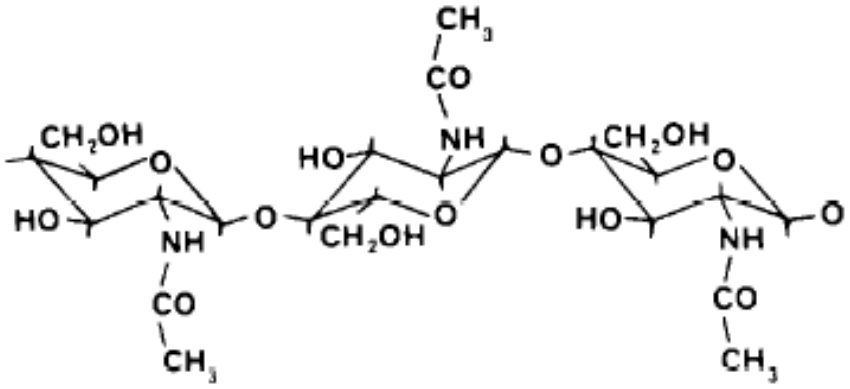


Abbildung 3-3 Molekulare Struktur von Chitin (Gooday 1990b).

Der Abbau von Chitin verläuft zunächst über die Spaltung der glycosidischen Bindungen des Polymers durch eine Chitinase (1,4-β-poly-N-Acetylglucosaminidase, E.C. 3.2.1.14). Hierbei wird zwischen zwei verschiedenen Chitinasen unterschieden. Exochitinasen spalten Diacetylchitobiose vom nicht-reduzierenden Ende ab, Endochitinasen schneiden die glycosidischen Bindungen wahllos entlang des Stranges (Muzzarelli 1977), wodurch Oligomere verschiedener Längen entstehen, welche wiederum der Exochitinase als Substrat dienen. Entstehende Dimere (Acetylchitobiose) werden durch eine Chitobiase, (E.C. 3.2.1.52) zu den Monomeren hydrolysiert. Einige dieser Enzyme haben auch Exoenzym-Eigenschaften und können als N-Acetylglucosaminidase (GlcNAcidase) einzelne Monosaccharide vom nicht-reduzierenden Ende von Oligomeren abspalten (Gooday 1990b) (Abbildung 3-4). Endochitinasen sind ausschließlich extrazellulär vorzufinden, da sie am unlöslichen Chitin-Polymer agieren. Die aus der Aktivität extrazellulärer Exo- und Endochitinasen resultierenden löslichen Oligosaccharide werden durch spezifische Porine in den periplasmatischen Raum überführt, wo sie weiteren Exochitinasen sowie Chitobiasen als Substrat dienen. Entstehende Monomere werden

über einen spezifischen PTS-Transporter als GlcNAc-6-Phosphat in das Cytosol überführt. Alternativ können Dimere und auch Trimere über Permeasen ins Cytosol transportiert werden, wo sie durch Chitobiasen bzw. GlcNAcidasen zu den zu Monomeren hydrolysiert werden, welche anschließend durch eine ATP-abhängige Kinase zu GlcNAc-6-P phosphoryliert werden (Baty et al. 2001, Bassler et al. 1991).

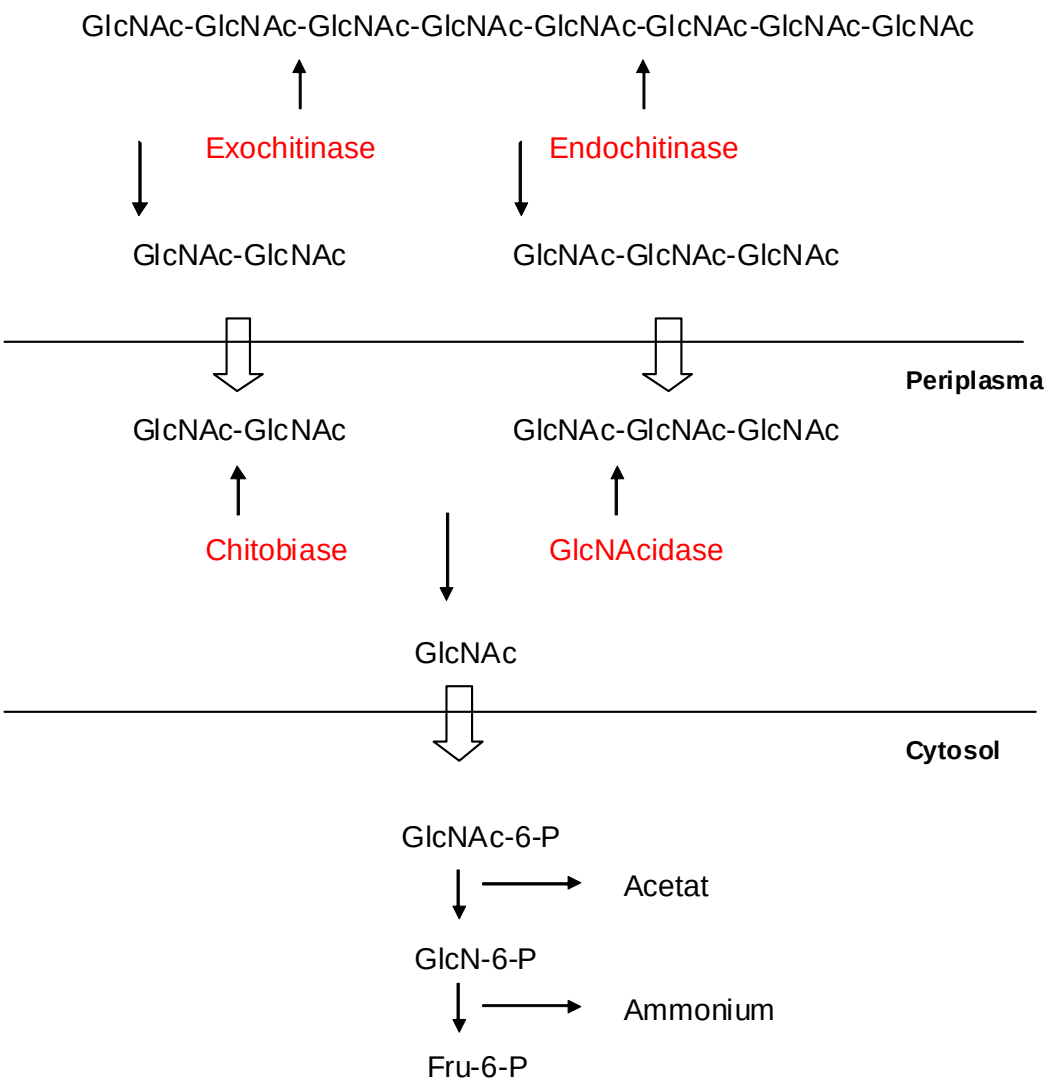


Abbildung 3-4 Schematische Darstellung eines möglichen Abbaus von Chitin durch die Aktivität von Chitinasen und Chitobiasen zum Endprodukt N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und dem weiteren Abbau durch hydrolytische Deacetylasen und Deaminasen.

Das Endprodukt der Chitin-Hydrolysierung, GlcNAc-6-P, wird nun hydrolytisch deacetyliert (Roseman 1957, E.C. 3.5.1.25), wodurch Acetat sowie Glucosamin-6-P entstehen.

Letzteres wird wiederum durch eine Glucosamin-6-P Deaminase (Glucosamin-6-Phosphat Ketol-Isomerase, E.C. 3.5.99.6) deaminiert (Comb und Roseman 1958), wodurch Fructose-6-P entsteht, welches nun in die Glycolyse eingehen kann. Alternativ zur Deacetylierung des Monomers kann dies bereits am Polymer mit der Bildung von Chitosan geschehen, wobei die folgenden Hydrolysierungsschritte analog derer mit den acetylierten Substraten erfolgen.
Neben der extrazellulären Bildung von Oligomeren wurden für viele Reinkulturen auch die Freisetzung von GlcNAc, Glucosamin, Acetat und Ammonium in den Kulturüberstand beschrieben (Gooday 1990a). Übertragen auf die Umwelt bedeutet dies eine Bereitstellung wichtiger Substrate. Für den Bodensee wurde der prozentuale Anteil von GlcNAc an der Menge aller freien Monosaccharide durchschnittlich mit 10-14 % ermittelt (Bunte und Simon 1999), und auch in Ozeanen besteht der Pool freier Aminozucker zu einem großen Teil aus GlcNAc (Riemann und Azam 2002). Dies verdeutlicht die Wichtigkeit chitinabbauender Bakterien für die Umsetzung partikulärer Substrate zu gelösten Nährstoffen in der Umwelt.

3.5 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit sollten die bei der Besiedlung und dem Abbau organischer Partikel stattfindenen Interaktionen zwischen heterotrophen Bakterien der Litoralzone des Bodensees näher charakterisiert werden. Hierzu sollten zunächst geeignete Mikrokosmen etabliert werden, welche die natürlichen Bedingungen im Bodensee nachstellen sollten. Diese Mikrokosmen sollten dazu dienen, solche Bakterien anzureichern, welche tatsächlich an der Besiedlung und dem Abbau organischer Partikel beteiligt sind. Weiterhin sollten die in den Mikrokosmen dominierenden Bakterien auf die Bildung von Acyl-Homoserinlaktonen (AHL) untersucht werden, um die Rolle AHL-vermittelter Kommunikation bei dem Abbau organischer Partikel unter natürlichen Bedingungen zu untersuchen. Hierzu sollten Wachstumsversuche mit Rein- und definierten Mischkulturen der aus den Mikrokosmen isolierten Bakterien hinsichtlich der Funktion AHL-vermittelter Interaktionen durchgeführt werden. Neben der Betrachtung dieser chemischen Kommunikation zwischen Bakterien sollten zusätzlich Untersuchungen zu metabolischen und physiologischen Interaktionen einbezogen werden.

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien

Chemikalien und Biochemikalien wurden von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Fluka (Neu-Ulm), Difco und Roth bezogen. Einige Spezialchemikalien wurden bei anderen Firmen bezogen und werden im Text angegeben.

4.2 Mikrobiologische Methoden

4.2.1 Verwendete Bakterienstämme

Tabelle 4-1 Auflistung aller verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Charakteristika	Referenz
Cytophaga sp. 4D9	Bodenseeisolat; *gene bank accession number* (NCBI): EF395377	Styp von Rekowski et al. 2007
Aeromonas hydrophila		
AH-1N	Wildtyp	Lynch et al. 2002
AH-1N *ahyI*	Isogene Mutante, defekt in AHL-Synthese	Lynch et al. 2002
Pseudomonas aeruginosa		
PAO1	Wildtyp	Holloway collection
PAO1-Tn7-*yfp*	Tn7 chromosomale Insertion von *yfp*, Gm^r	Klebensberger et al. 2007
Chromobacterium violaceum CV026	Mini-Tn5-Mutante vom Wildtyp (ATCC 31532); defekt in AHL-Synthese	McClean et al. 1997
Escherichia coli	Biolumineszierende AHL-Indikatorstämme	
pSB 401	*lux*CDABE unter Kontrolle von P_{luxI}, Tet^r	Winson et al. 1998
pSB 536	*lux*CDABE unter Kontrolle von P_{ahyR}, Ap^r	Winson et al. 1998
pSB 1075	*lux*CDABE unter der Kontrolle P_{lasR}, Tet^r	Winson et al. 1998
E. coli DH5α	Chemisch-kompetenter Stamm	Sambrook und Russel 1989
E. coli S17-1	Donorstamm für biparentale Konjugation	Simon et al. 1983

4.2.2 Medien und Substrate

4.2.2.1 Medien und Substrate

Als Grundmedium für die Isolierung von Bakterien aus Mikrokosmen (4.2.5) sowie für Wachstumsexperimente mit den Stämmen 4D9, AH-1N und PAO1 zur Untersuchung des Chitin-Abbaus diente ein HEPES-gepuffertes Komplexmedium (Medium B) mit folgenden Bestandteilen: 0,05 % Trypton, 0,0005 % Hefeextrakt, 10 mM HEPES, 5 mM NH_4Cl, 0,5 mM $MgSO_4$, 14 mM KCl, 7,2 mM NaCl. Nach Einstellung des pH-Wertes mit NaOH auf pH 7 und Sterilisation durch Autoklavierung wurde das Medium mit folgenden Zusätzen komplementiert: 0,01 mM $CaCl_2$, 0,15 mM Phosphatlösung (pH 7; 0,105 mM K_2HPO_4 und 0,045 mM NaH_2PO_4) und Spurenelementlösung SL 10 (Widdel et al. 1983). Alle AHL-Indikatorstämme wurden mit Luria-Bertani-Medium (1 % Trypton, 1 % NaCl, 0,5 % Hefeextrakt) und dem entsprechenden Antibiotikum kultiviert. Festmedien enthielten 1,5 % Agar.

Als Wachstumssubstrat für die Untersuchungen zur AHL-vermittelten Interaktion dienten autoklavierte Algen (*Scenedesmus obliquus*). Für weitere Wachstumsversuche wurde das oben beschriebene Medium B ohne Trypton und NH_4Cl mit 0,5 % (w/v) Chitin, 5 mM N-Acetylglucosamin (GlcNAc), 2,5 mM N,N'-Diacetylchitobiose ($GlcNAc_2$) oder 1,7 mM N,N',N''-Triacetylchitotriose ($GlcNAc_3$) als Kohlenstoff- und Stickstoffquellen verwendet.

Als Selektionsmedium für Transposonmutanten diente ein Minimalmedium (Philipp et al. 2006) mit 5 mM Glucose.

4.2.2.2 Präparation von kolloidalem Chitin

Zur Herstellung des für Wachstumsexperimente benötigten kolloidalen Chitins wurde kommerzielles Chitin (*practical grade*, gemahlen, Sigma) modifiziert nach Reichenbach (2006a) folgendermaßen behandelt: 20 g Chitinflocken wurden langsam unter ständigem Rühren zu wenigstens 200 ml konzentrierter HCl gegeben. Nach etwa 20 min wurde die entstandene braune Lösung unter Rühren in 4 l eiskaltes entsalztes Wasser geschüttet, wobei sich das Chitin als weißes Material absetzte. Durch wiederholtes Abschütten des Überstandes nach Präzipitation des Chitins und Auffüllen mit Wasser wurde nach Erreichen eines pH-Wertes von etwa 4 die Suspension mit NaOH neutralisiert und anschließend mittels Filtration durch einen Faltenfilter eingeengt, bis das Chitin eine Konzentration von rund 2 % erreichte. Die Konzentration wurde einmalig mittels Trockengewichtsbestimmung ermittelt, da der Wert jedoch lediglich 2 % unter dem anhand der Ausgangsmenge errechneten lag, wurde für jede weitere Präparation ein abgeschätzter Wert als Endkonzentration angenommen.

4.2.2.3 Herstellung von in Agarose eingebetteten Substraten

Herstellung von in Agarose eingebetteten Algen: 50 ml einer Kultur der einzelligen Alge *Scenedesmus obliquus* (zur Verfügung gestellt von E. von Elert) mit einem Gesamtkohlenstoffgehalt von 12,6 mg wurden bei 10000 rpm für 20 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Resuspension im gleichen Volumen 0,9 % NaCl erneut zentrifugiert und anschließend in 4 ml 0,9 % NaCl und 16 ml destilliertem Wasser aufgenommen. Nach Zugabe von 1% Agarose (SaeKem® LE Agarose, BMA) wurde die Suspension bei 121 °C für 20 min autoklaviert und in eine Petrischale gegossen (Ø 8,5 cm). Nach Erhärten der Agarose wurden Kugeln (Kohlenstoffgehalt ~ 0,06 mg) mittels einer abgeschnittenen 1 ml Pipettenspitze ausgestochen.

Herstellung von in Agarose eingebettetem Chitin: Medium B (ohne N und C) wurde mit 1 % Chitin versetzt. Die weiteren Schritte erfolgten analog der Herstellung der in Agarose eingebetteten Algen.

4.2.3 Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung

Die genauen Kultivierungsbedingungen der Wachstumsversuche sind den jeweiligen Experimenten zu entnehmen. Die Wachstumsversuche mit Algen oder Chitin als Substrat erfolgten in der Regel bei 16 °C, abweichend wurden die Ansätze bei maximal 25 °C inkubiert. Vorkulturen für Experimente mit Reinkulturen wurden in der Regel nach Animpfen von Platte in 5 ml Medium B in 10 ml-Röhrchen angezogen. Inkubiert wurden die Vorkulturen auf einem Rotationsschüttler (CMV-ROM, Fröbel GmbH) bei 120 rpm und 30 °C. Arbeitskulturen aller Stämme wurden auf Fest medium bei 30 °C angezogen und bei 4 °C aufbewahrt sowie wöchentlich übertragen. In regelmäßigen Abständen wurden die Stämme aus Glycerinkulturen (40 % w/v), welche in flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurden, auf Festmedium ausgestrichen.

4.2.4 Wachstumsmessungen

Die Wachstumsmessungen bei löslichen Substraten erfolgten über die Ermittlung der optischen Dichte bei 600 nm in einem Spektralphotometer (Hitachi, Modell, Tokyo, Japan). Bei nichtlöslichen Substraten wurde das Wachstum über die Ermittlung der Gesamtzellzahl (*total cell counts*, TCC) oder der koloniebildenden Einheiten (*colony forming units*, CFU) bestimmt.

Zur Bestimmung der TCC wurden die Zellen durch Vakuum-Filtration auf einem schwarzen Polycarbonatfilter (Porengröße 0,2 µm, Millipore) gesammelt und mit 1 µg ml^{-1} DAPI (4', 6-Diaminido -2-Phenylindol) gefärbt. Die Zellen wurden mittels

Epifluoreszenzmikroskopie (Axiophot, Zeiss) unter Benutzung eines Okular-Mikrometers (10x10 Quadrate, Zeiss) gezählt. Die Zellzahl pro Milliliter wurde über die Formel

$$TCC\ ml^{-1} = (N*A_F)/(A_K*V_f)$$

bestimmt, mit N: Anzahl der Zellen pro Quadrat des Okularmikrometers, A_F: Fläche des Filters (3,14 cm^2), A_K: Fläche eines Quadrates ($3,8*10^{-6}$ cm^2 bei 640-facher Vergrößerung) und V_f: filtriertes Volumen (ml).

Die Bestimmung der CFU erfolgte über die Plattierung einer Verdünnungsreihe (Klebensberger et al. 2006) auf Medium B- Festmedium. Hierfür wurden je dreimal 10 µl einer Verdünnung auf Festmedium getropft und die CFU über die Anzahl der gewachsenen Kolonien berechnet.

4.2.5 Anreicherung und Isolierung von Bakterien in Mikrokosmen

Zur Anreicherung und Isolierung von bei der Besiedelung und dem Abbau organischer Partikel beteiligten Bakterien wurden Mikrokosmosexperimente etabliert, welche den natürlichen Bedingungen im Bodensee entsprechen sollten. Seewasser, welches die natürliche Mikroflora des Bodensees enthielt, wurde von der Litoralzone des Bodensees aus einer Wassertiefe von etwa 40 cm mit einem sterilen Gefäß entnommen. 7,5 ml des Seewassers wurden in sterilen Glasröhrchen auf einem Rotationsinkubator (CVM, Fröbel) mit 100 rpm bei 16 °C inkubiert. Als Nährstoffquelle dienten autoklavierte, in Agarose eingebettete einzellige Algen (*Scenedesmus obliquus*), welche im Phytoplankton des Bodensees vorkommen. Je eine dieser Agarosekugeln, welche einen Kohlenstoffgehalt von etwa 0,06 mg besaß, wurde einem Mikrokosmos zugefügt. Als Kontrolle dienten algenfreie Agarosekugeln sowie Mikrokosmen ohne Kugel. Nach 0 h, 24 h sowie 48 h wurden Proben aus der Suspension entnommen (suspendierte Fraktion), um einerseits die Gesamtzellzahl (TCC) und andererseits die *colony forming units* (CFU) zu bestimmen. Um Bakterien zu quantifizieren und zu isolieren, welche sich auf der Agarosekugel angesiedelt hatten (Biofilm-Fraktion), wurden die Kugeln in je 100 µl Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 6) zunächst mit einem sterilen Plastikstößel zerstoßen und anschließend mit 50 µl (50 Units) Agarase (Agarase aus *Pseudomonas atlantica*, Sigma) für 90 min bei 30 °C behandelt, um eine möglichst schonende Ablösung von Zellen aus der Biofilm-Fraktion zu gewährleisten. Die Bakterien aus dieser Fraktion wurden über CFU quantifiziert. Die Bestimmung der Gesamtzellzahl der Biofilmfraktion war technisch nicht möglich.

Kolonien aus CFU-Verdünnungsreihen der suspendierten sowie der Biofilmfraktion wurden auf AHL-Bildung überprüft (siehe 4.4.2). AHL-positive Stämme wurden durch mehrmaliges Ausstreichen und Übertragen von Einzelkolonien gereinigt und über

Standardtests zur phänotypischen Einordnung (Gram-Bestimmung durch KOH-Test, Oxidase- und Katalase-Bestimmung) und einer RFLP-Analyse (siehe 4.5.8) näher charakterisiert.

4.2.6 Wachstumsversuche mit in Agarose eingebetteten Algen als Substrat

Wachstumsversuche mit den Stämmen AH-1N, AH-1N *ahyI* und 4D9 in Rein- und definierten Co-Kulturen erfolgte in Glasröhrchen analog der Mikrokosmen. In Agarose eingebettete Algen wurden wie in 4.2.2.3 beschrieben hergestellt, abweichend enthielten die Agarosekugeln die doppelte Menge an Algen (0,12 mg C). Als Hintergrundmedium diente 7,5 ml sterilfiltriertes (Whatman FP 30/0,2 CA-S, 0,2 µm, Schleicher&Schuell) Seewasser. Vorkulturen wurden in Medium B-Flüssigmedium über Nacht bei 30 °C inkubiert und die Gesamtzellzahlen wurden bestimmt. Für die Wachstumsversuche wurde ein Inokulum von 10^6 Zellen ml^{-1} eingesetzt und die Röhrchen bei 16 °C inkubiert. Nach 0 h, 24 h und 48 h wurden Proben der suspendierten und der Biofilmfraktion entnommen und die TCC und CFU bestimmt. Die Verdünnungsreihen der CFU wurden abweichend auf Medium B mit 1 % Trypton plattiert, um das Schwärmverhalten des Stammes 4D9 zu reduzieren und eine Koloniebildung zu unterstützen. Kolonien aus Mischkulturen der Stämme AH-1N bzw. AH-1N *ahyI* mit Stamm 4D9 konnten eindeutig durch die verschiedenen Kolonie-Morphologien unterschieden werden. Kolonien der *Aeromonas*-Stämme wurden mittels des CV026 AHL-Bioassays differenziert (4.4.2).

4.2.7 Wachstumsversuche mit Chitin als Substrat

Vorkulturen der Stämme AH-1N, 4D9 und PAO1 wurden wie beschrieben angesetzt und die Gesamtzellzahl bestimmt. Als Hintergrundmedium diente Medium B ohne Trypton mit oder ohne Ammonium, wodurch das eingesetzte Chitin einerseits als Kohlenstoffquelle und andererseits zusätzlich als Stickstoffquelle diente. Chitin lag entweder frei suspendiert mit einer Konzentration von 0,5 % (w/v) oder eingebettet in Agarosekugeln (1% pro Kugel) vor. Das Inokulum der Stämme betrug 10^6 Zellen ml^{-1}. Die Versuche wurden in Glasröhrchen mit 5 ml Medium oder, falls größere Volumina benötigt wurden, in Erlenmeyerkolben angesetzt und bei 16 °C und 150 rpm inkubiert. Nach 0 h, 24 h, 48 h und 72 h oder nach längeren Inkubationszeiten wurden Proben zur Bestimmung der TCC oder CFU entnommen. Auch hier wurden wie beschrieben die Agarosekugeln desintegriert, um die Biofilmfraktion der Bakterien zu gewinnen und zu quantifizieren. In einigen Fällen wurde zusätzlich die Menge an Ammonium im Kulturüberstand bestimmt. Die Abnahme des Chitins in frei suspendierter Form wurde über die Abnahme der Füllhöhe in Glasröhrchen bestimmt. Hierzu wurde bei jeder Probennahme der Abstand der Chitin-Füllhöhe vom Röhrchen-Boden mit einem Lineal gemessen.

Für Wachstumsversuche mit Stamm 4D9 mit eingebettetem Chitin und zellfreien Kulturüberständen des Stammes AH-1N wurden die Überstände sterilfiltriert (4.2.8) und zu 1/5 des Gesamtvolumens im Versuch eingesetzt. Diese Versuche wurden in 24 Well-Platten im 2 ml-Maßstab durchgeführt und bei 25 °C inkubiert.

4.2.8 Gewinnung von Kulturüberständen

Kulturüberstände der Stämme AH-1N und 4D9 wurden einerseits für Wachstumsexperimente (4.2.7) und zum anderen für die Bestimmung von Enzymaktivitäten sowie der beim Abbau von Chitin entstehenden Produkte (4.3.2) verwendet. Nach Wachstum mit 5 mM GlcNAc oder 0,5 % Chitin im 100 ml-Maßstab in 250 ml Erlenmeyerkolben mit einer Inkubationszeit von 24 h (GlcNAc) bzw. 72 h (Chitin) wurden die Kulturen bei 10 °C mit einer Geschwindigkeit von 10000 rpm für 10 min zentrifugiert (Eppendorf, 5804R, Rotor F34-6-38). Die Überstände wurden mit einem Filter (Whatman FP 30/0,2 CA-S, 0,2 µm, Schleicher&Schuell) zweimal sterilfiltriert. Zur Entfernung extrazellulärer Enzyme wurden die Überstände vor der zweiten Sterilfiltration zunächst mit einem Molekulargewichts-Ausschlußfilter (Amicon Ultra-15 Ultracel-10k, Millipore) durch Zentrifugation bei 3000 rpm (Eppendorf, 5804R, Rotor F34-6-38). fraktioniert.

4.3 Biochemische Methoden

4.3.1 Zellernte und Herstellung von Rohextrakten

Die Herstellung von Rohextrakten der Stämme AH-1N und 4D9 erfolgte analog der Gewinnung von Kulturüberständen nach Wachstum mit 5 mM GlcNAc oder 0,5 % Chitin als Wachstumssubstrat. Chitin-gewachsene Kulturen wurden hierbei zunächst über eine grobmaschige Gaze filtriert, um verbliebene Chitin-Partikel zu entfernen. Die Zellpellets wurden einmalig im gleichen Volumen K/Na-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach Aufnahme der Pellets in 2 ml K/Na-Puffer und Überführung in Serumgefäße erfolgte der Zellaufschluss mit einer gekühlten French Press Zelle (Aminco, Silver Spring, USA) durch 4 Passagen bei 138 MPa. Die Zelltrümmer wurden bei 13000 rpm (Zentrifuge 5417R, Eppendorf) und 10 °C pelletiert und der somit gewonnene zellfreie Extrakt weiterverwendet (4.3.2).

4.3.2 Aktivitätsbestimmung extrazellulärer chitinolytischer Enzyme

Zur Bestimmung der chitinolytischen Aktivität extrazellulärer Enzyme der Stämme AH-1N und 4D9 wurde ein Enzymtest basierend auf mit 4-Methylumbelliferon (4-MU) derivatisierten Substraten durchgeführt (Colussi et al. 2005). Verwendet wurden die Substrate 4-MU N'-Acetyl- β-D-Glucosaminid (4-MU GlcNAc, Sigma) und 4-MU N',N''-Diacetyl-β-D-Chitobiosid (4-MU-$GlcNAc_2$, Sigma) in einer Konzentration von 50 µM. Der verwendete McIlvaine-Puffer besaß einen pH von 7. Der Test wurde wie bei Colussi et al. beschrieben in einem Mikrotiterplattenlesegerät (Genios, Tecan) durchgeführt und die erhaltenen Resultate mittels einer 4-MU-Standardkurve (0-20 µM) quantifiziert.

Für die Bestimmung der durch chitinolytische Enzyme entstehenden Chitinabbauprodukte wurden diskontinuierliche Enzymtests durchgeführt, bei denen die Produkte mittels HPLC nachgewiesen wurden. Hierfür wurden 2 ml zellfreier Überstand oder 200 µl Rohextrakt in 1,8 ml Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7) mit folgenden Substraten versetzt: 5 mM GlcNAc, 1mM $GlcNAc_2$, 0,5 mM $GlcNAc_3$ oder 0,2 % Chitin. Die Ansätze wurden bei 30 °C inkubiert und in regelmäßigen Abständen beprobt. Um potenziell ablaufende enzymatische Reaktionen zu stoppen, wurden die Proben direkt nach ihrer Entnahme für 5 min bei 100 °C inkubiert. Die Proben wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Abweichend wurden Inkubationen mit zellfreiem Überstand mit 0,5 % Chitin bei 20 °C für mehrere Tage inkubiert. Vor einer HPLC-Analyse wurden die Proben mit 200 mM H_2SO_4 versetzt und für 5 min bei 13000 rpm (Zentrifuge 5415D, Eppendorf) zentrifugiert. Der partikelfreie Überstand wurde direkt für die HPLC verwendet.

4.4 Analytische Methoden

4.4.1 Organische Extraktion von Acyl-Homoserinlaktonen (AHL) aus Kulturüberständen

Überstände ausgewachsener Kulturen (50 ml-200 ml) wurden mit HCl angesäuert (pH 1), um gegebenenfalls hydrolysierte Laktonringe zu schließen. AHL wurden anschließend mit Dichlormethan extrahiert (Yates et al. 2002) und nach Entfernung des Lösungsmittels in einem Rotationsverdampfer (Rotovapor RE, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Schweiz) in 50 µl Acetonitril aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

4.4.2 Nachweis von AHL in Kulturüberständen

Die aus Mikrokosmen isolierten Bakterien wurden mittels zweier Bioassays auf AHL-Bildung überprüft. Zum einen wurden einzelne Kolonien direkt zusammen mit einer in der AHL-Synthese defekten Mutante von *Chromobacterium violaceum* Stamm CV026 auf LB-

Festmedium plattiert. Im Falle von AHL-positiven Teststämmen produziert die Mutante das durch kurzkettige AHL induzierte charakteristische Pigment Violacein des Wildtyps (McClean et al. 1997). Der zweite Test beruht auf ein Biolumineszenz-System in drei verschiedenen *E. coli* Stämmen, welche je ein Plasmid mit durch verschiedene AHL aktivierbare Bioloumineszenz-Reportergenen enthalten Die Plasmide basieren auf dem *luxCDABE*-Operon aus *Photorhabdus luminescens* sowie je einem LuxR-Homolog zur Interaktion mit AHL und Bindung an eine entsprechende Promoterregion, unter deren Kontrolle *luxCDABE* liegen (Winson et al. 1998). Für den Test wurden einzelne zu untersuchende Kolonien aus CFU-Verdünnungsreihen (4.2.5) in Medium B Flüssigmedium in 96-Well Mikrotiterplatten (Nunc™) inokuliert und bei 16 °C und 200 rpm für 48 h inkubiert (Schüttelinkubator, Stuart Scientific). Anschließend wurden die Platten bei 1700 rpm für 15 min zentrifugiert (Eppendorf, 5804R, Rotor: A-2-DWP) und die Überstände entnommen. Die Indikatorstämme wurden über Nacht bei 30 °C mit LB-Flüssigmedium angezogen und auf eine OD (600 nm) von 0,2 eingestellt. Je 150 µl der verdünnten *E.coli*-Kulturen wurden mit 50 µl der zu testenden Kulturüberstände in schwarzen 96-Well Mikrotiterplatten (Nunc™) gemischt. Nach 0, 2, 4 und 6 h wurden sowohl die OD (595 nm) als auch die Biolumineszenz in einem Mikrotiterplattenlesegerät (Genios, Tecan, Österreich) gemessen. Die Auswertung erfolgte über das Microsoft Excel Makro „Xfluor“. Als Positivkontrollen für den jeweiligen Indikatorstamm dienten je 0,1 µM N-Hexanoyl-L-Homoserin-Lakton (HHL, für psB 401), N-Butanoyl-L-Homoserin-Lakton (BHL, für psB 536) sowie N-3-Oxododecanoyl-L-Homoserin-Lakton (OdDHL, für psB 1075). Alle Standards wurden von Sigma bezogen mit Ausnahme von OdDHL, welches uns von Herrn Paul Williams (Nottingham) zur Verfügung gestellt wurde.

4.4.3 Charakterisierung von AHL mittels Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur Identifizierung von AHL einiger aus Mikrokosmen isolierter Stämme wurden organische Extrakte aus Kulturüberständen (siehe 4.4.1) mittels DC getrennt. Für die Trennung langkettiger AHL wurden Alugram® RP-2 / UV $_{254}$ Platten (20x20 cm, Macherey-Nagel) mit einem Methanol:Wasser Gemisch von 40:60 (v/v) als mobile Phase benutzt. Kurzkettige AHL wurden mit RP-18 F254s (20x20 cm, Merck) und einem Methanol:Wasser-Gemisch von 60:40 (v/v) getrennt (Shaw et al. 1997). Etwa 5 µl der Proben sowie unterschiedliche Mengen an Standards (Kurzkettige: 0,4 nmol HHL, 4 nmol BHL, 20 nmol OHL. Langkettige: 110 pmol ODHL, 50 pmol OdDHL, 100 pmol OtDHL) wurden etwa 2 cm vom unteren Rand entfernt aufgetropft und getrocknet. Die Extrakte wurden mit 100 ml Laufmittel für 3 h (RP-18) bzw. über Nacht (RP-2) getrennt und anschließend getrocknet.

Die Detektion der getrenneten AHL erfolgte über die AHL-Indikatorstämme *C. violaceum* CV026 (für RP-2) bzw. *E. coli* psB 1075 (für RP-18). Hierzu wurde die jeweilige DC-Platte mit 100 ml LB-Soft-Agar (0,4 %, Endvolumen), welcher 7,5 ml einer Übernachtkultur eines Indikatorstammes enthielt, überschichtet und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Kurzkettige AHL wurden durch die Pigmentierung des Stammes CV026 angezeigt, langkettige durch die induzierte Biolumineszenz des Stammes pSB 1075. Die Visualisierung der Lumineszenz erfolgte durch das Fluor-S Max MultiImager-System (Biorad) mittels einer lichtempfindlichen CCD-Kamera (Kühltemperatur -35 °C).

4.4.4 Ammoniumbestimmung

Ammonium wurde im Verlauf des Wachstums der Stämme 4D9 und AH-1N mit Chitin nach einer nach dem Deutschen Einheitsverfahren zur Wasser- Abwasser- und Schlammuntersuchung modifizierten Methode bestimmt. Hierzu wurden 1 ml der Kulturüberstände (1:20 verdünnt) sowie der Standards im Bereich von 0-100 µm mit 100 µl Lösung A (0,65 g Na-Salicylat, 0,65 g Trinatriumcitrat●2 H_2O und 10 mg Na-Nitroprussid, ad 5 ml H_2O) und 100 µl Lösung B (10 mg NaOH ad 50 ml H_2O) gemischt. Die Ansätze wurden etwa eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend die Absorption bei 655 nm im Photometer gemessen.

4.4.5 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des löslichen Proteins in Kulturüberständen sowie in Rohextrakten wurde die Methode nach Bradford (Bradford 1976) angewandt.

4.4.6 Hochdrucksflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Acetat, GlcNAc, Chitobiose und Chitotriose wurden mittels HPLC bestimmt. Das System bestand aus einer Hochdruckpumpe (LC-10AT, Sykam), einem Brechungsindexdetektor (ERC 7512, Sykam) und einem Autoinjektor (Gilson 234, Abimed). Zur Trennung der Substanzen wurde eine Ionenaustausch-Säule (Aminex HPX-87H, BioRad) mit 5 mM H_2SO_4 als Laufmittel und einer Flussrate von 0,6 ml min^{-1} bei 40 °C verwendet. Eingesetzt wurden je 100 µl Überstand einer Probe, welche vor der Analyse mit 200 mM H_2SO_4 versetzt wurden und für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert wurden.

4.5 Molekularbiologische Methoden

4.5.1 Verwendete Vektoren

Folgende Vektoren wurden zur Transposonmutangenese und Klonierung von PCR-Produkten bzw. DNA-Fragmenten verwendet: pUT-mini-Tn5-Km1 (de Lorenzo et al. 1990) und pUC18 (Yanisch-Perron et al. 1985).

4.5.2 Extraktion von genomischer DNA und Plasmiden

Genomische DNA aus Zellkulturen wurde anhand des Protokolls des Puregene Tissue Core Kit B (Gentra Systems) extrahiert. Abweichend vom Protokoll wurden mindestens 2 ml einer mit LB-Medium gewachsenen Übernachtkultur verwendet und für 1 min bei 13000 rpm (Zentrifuge 5415D, Eppendorf) zentrifugiert. Die Behandlung mit RNase erfolgte erst nach Abkühlung des Zelllysates auf Raumtemperatur. Für die Fällung des Proteins wurde der Ansatz vor der Zentrifugation für etwa 15 min bei 4 °C inkubiert. Gewaschene und getrocknete DNA wurde schließlich in 100 bis 200 µl hochreinem Wasser („PCR-Wasser“, MO BIO Laboratories) aufgenommen und bei 4 °C gelagert.
Die Präparation des Plasmides pUC18 aus dem Stamm DH5α erfolgte nach Anleitung eines Kits (Qiaprep Spin Miniprep Kit, Qiagen). Der Stamm wurde hierzu für etwa 5 Stunden in 5 ml flüssigem LB-Medium mit 20 µg ml^{-1} Ampicillin (bei Extraktion des leeren Vektors) bzw. 50 µg ml^{-1} Kanamycin (bei Extraktion des ligierten Vektors) bei 37 °C und 200 rpm angezogen.

4.5.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentrationen von PCR-Produkten, Plasmiden und genomischer DNA wurden durch Messung der Absorption bei 260 nm in einem Biophotometer (Eppendorf) bestimmt.

4.5.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Für die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde ein Gelextraktions-Kit (MinElute Gel Extraction Kit, Qiagen) verwendet.

4.5.5 Reinigung von DNA

Die Reinigung von PCR-Produkten, Restriktionsverdau-Ansätzen und Plasmiden wurde mithilfe eines Kits (QiaQuick PCR Purification Kit, Qiagen) durchgeführt.

4.5.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

PCR-Reaktionensansätze zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden nach folgendem Standardprotokoll zusammengestellt.

Tabelle 4-2 Standardprotokoll für einen PCR-Ansatz; Endvolumen 25-50 µl

Bestandteil	Konzentration
Primer 1 (MWG)	0,5 µM
Primer 2 (MWG)	0,5 µM
Puffer (Eppendorf oder NEB)	1x
dNTPs (Eppendorf)	50 µM
Template-DNA	25-50 ng
Taq DNA-Polymerase (Eppendorf oder NEB)	1 U

Die PCR-Reaktionen erfolgten in einem Mastercycler *personal* - oder *gradient* – Thermocycler (Eppendorf) nach folgendem Standard-Protokoll.

Tabelle 4-3 Standard PCR-Programm

Schritt	Prozess	Temperatur (°C)	Zeit (min)
1	Vordenaturierung	94	3
2	Denaturierung	94	0,5
3	Annealing	55	0,5
4	Elongation	72	1
5	Wiederholung der Schritte 2-4 (29x)		
6	Nachelongation	72	7

<u>16S-PCR:</u> Diese PCR wurde zur Amplifikation und Sequenzierung des 16S rRNA-Gens durchgeführt. Die verwendeten Primer wurden von der Firma MWG bezogen und besaßen folgende Sequenzen:

Primer 27F 5’-CAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’

Primer 1492R 5’-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3’

M13-PCR: Diese PCR diente der Überprüfung der in pUC18 klonierten Fragmente der genomischen DNA der Chitin-Abbaumutante von Stamm AH-1N. Die Primersequenzen sind wie folgt zu entnehmen:

M13F	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
M13R	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

4.5.7 Agarosegelelektrophorese

Zum Nachweis von PCR-Produkten sowie zur Trennung von DNA-Fragmenten nach Restriktionsverdau wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Nach Herstellung der Gele mit 1 % Agarose (SaeKem® LE Agarose, BMA) in 0,5xTBE (89 mM Tris, 89 mM Borat, 2mM EDTA (pH8)) wurde die DNA für etwa 30 min bei 120 V getrennt (Power Pac3000, BioRad). Abweichend wurde für die RFLP-Analyse der aus Mikrokosmen isolierten Stämme eine für kleine Fragmente geeignete Agarose (NuSieve® 3:1 Agarose, Cambrex) mit einer Konzentration von 4 % in 1xTBE verwendet. Die Trennung erfolgte hier bei 100 V für 4 Stunden.

Als Größenreferenz dienten kommerzielle DNA-Marker (GeneRuler DNA Ladder Mix, GeneRuler 100 bp plus, Fermentas). Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele in einer 0,0001 %-igen Ethidiumbromidlösung gefärbt und die DNA auf einem UV-Tisch sichtbar gemacht.

4.5.8 Restriktionsverdau von DNA

Msp I- Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) Analyse des 16S-rRNA-Gen PCR-Produktes der aus Mikrokosmen isolierten Stämme erfolgte nach Schmitt-Wagner et al. (2003).

Genomische DNA der Transposonmutante wurde mithilfe des Enzyms *Sau 3AI* (Fermentas) geschnitten. Ein 20 µl-Ansatz bestand aus 3 µg DNA und 0,1 U des Enzyms sowie des zugehörigen Puffers (1x, Fermentas) und wurde für 20 min bei 37 °C inkubiert. Drei dieser Ansätze wurde vereinigt und mittels Agarose-Gelelektrophorese getrennt.

Die *Multiple Cloning Site* des Vektors pUC18 wurde für 5 Stunden bei 37 °C mit 1 U des Enzyms *BamHI* (Fermentas) geschnitten, welches kompatible Enden zu den Schittstellen des Enzyms *Sau 3AI* verursacht, um eine spätere Ligation der DNA-Fragmente in pUC18 zu ermöglichen. Geschnittene genomische DNA sowie Plasmide wurden nach dem Restriktionsverdau gereinigt.

4.5.9 Dephosphorylierung geschnittener Plasmide

Um die Rezirkularisierung geschnittener Plasmide zu vermeiden, wurden diese mit einer Phosphatase (*Antarctic Phosphataese*, NEB) behandelt. Ein 40 µl-Ansatz enthielt neben dem gereinigten zu dephosphorylierenden Vektor 5 U der Phosphatase sowie den zugehörigen Puffer (1x, NEB) und wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz gereinigt und mit 40 µl PCR-Wasser eluiert.

4.5.10 Ligation von DNA, Herstellung kompetenter *E. coli* und Transformation von Ligationsansätzen

Mit Gelelektrophorese getrennter und aus dem Gel extrahierter Fragmente genomischer DNA der Transposonmutante wurden in den geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pUC18 ligiert. Das Mengenverhältnis betrug 120 ng:40 ng (DNA:Plasmid in 20 µl) bzw. 50 ng:25 ng (DNA:Plasmid in 10 µl). Für die Ligationsreaktion wurden 1 U bzw. 0,5 U einer T4 DNA-Ligase (Fermentas) mit dem entsprechenden Puffer (1x, Fermentas) über Nacht bei 15 °C inkubiert. Diese Ansätze wurden direkt für die Transformation in den Stamm DH5α verwendet.

Hierfür wurden 500 µl einer Übernachtkultur (LB-Medium) des Stammes als Inokulum von 10 ml LB-Medium verwendet und bei 37 °C für 45 min bei 200 rpm geschüttelt, bis eine OD von 0,5 bis 0,6 erreicht war. Die Kultur wurde bei 4 °C mit 8000 rpm für 3 min zentrifugiert (5417R, Eppendorf) und in 500 µl LB-Medium sowie 500 µl 1x TSS (*Transformation and storage solution*; Chung et al. 1989) aufgenommen und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Für die Transformation wurden 140 µl der inkubierten Zellen mit 10 µl Ligationsansatz gemischt und erneut für etwa eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (42 °C für 2 min) wurden dem Ansatz 800 µl SOC-Medium (2 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM Glucose) zugefügt und dieser bei 200 rpm und 37 °C für eine Stunde geschüttelt. Die Kultur wurde auf LB-Agarplatten mit 50 µg ml^{-1} Kanamycin plattiert und bei 37 °C inkubiert. Gewachsene Kolonien wurden für eine Plasmidpräparation in flüssigem LB-Medium mit Kanamycin angezogen. Die Plasmide wurden einem Restriktionsverdau mit *BamHI* zur Überprüfung der Ligation sowie einer PCR mit M13-Primern unterzogen und für Sequenzierreaktionen verwendet.

4.5.11 Sequenzierung

Einige der aus den Mikrokosmen isolierten Stämme wurden nach RFLP-Analyse durch Sequenzierung des 16S rRNA-Gens mithilfe der Primer 27F und 1492R sequenziert. Für die Sequenzierung des das Mini-Tn5-Transposon enthaltene Insert in pUC 18 wurden die

Vektorprimer M13F sowie M13R verwendet. Die Sequenzierreaktion sowie die Analyse der Sequenz wurden von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Analyseprogramm Lasergene (DNAStar, Inc.) ausgewertet. Zur Suche nach Sequenzhomologien wurde ein Sequenzvergleich (*Basic Local Alignment Search Tool*, BLAST, Altschul et al. 1997) auf Nukleotid- (*blastn*) sowie auf Aminosäure- (*blastx*) Ebene in der NCBI-Datenbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) durchgeführt.

4.5.12 Transposonmutagenese von *Aeromonas hydrophila* AH-1N

Konjugation: Die Einführung des mini Tn5-Transposons in Stamm AH-1N wurde mittels biparentaler Konjugation durchgeführt. Der Donorstamm S17-1 pUT-mini-Tn5-Km1 wurde in 5 ml LB-Medium mit 10 µg ml^{-1} Kanamycin bei 30 °C und 150 rpm über Nacht geschüttelt (Orbital Incubator, Stuart Scientific). Der Empfängerstamm AH-1N wurde ebenfalls über Nacht in LB-Medium unter gleichen Bedingungen kultiviert. Nach Bestimmung der OD bei 600 nm wurden beide Kulturen für 3 min bei 8000 rpm (Tischzentrifuge 5415D, Eppendorf) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Stamm S17-1 wurde durch Resuspension in warmem (30 °C) LB-Medium und einem weiteren Zentrifugationsschritt gewaschen, um alle Reste des Antibiotikums zu entfernen. Nach Resuspension der Zellen in warmem LB-Medium wurden von beiden Stämmen je $2*10^9$ Zellen entnommen, wobei davon ausgegangen wurde, dass eine OD von 1 etwa 10^9 Zellen ml^{-1} entspricht.

Die Zellen wurden in einem Reaktionsgefäß vereint und erneut zentrifugiert, um ein möglichst kleines Volumen zu erhalten (etwa 50 µl). Das Zell-Gemisch wurde komplett auf einen sterilen Cellulosefilter (OE66, 0,2 µm, Ø 25 mm, Schleicher & Schuell), welcher sich auf einer LB-Agar-Platte befand, überführt. Der Ansatz wurde für etwa 5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml einer 0,9 %-igen NaCl-Lösung vom Filter gewaschen. Dieses Volumen wurde auf 700 µl durch einen Zentrifugationsschritt bei 8000 rpm für 3 min und Resuspension mit 0,9 % NaCl eingeengt. Das gesamte Volumen wurde auf mehrere Selektionsplatten (Minimalmedium mit 5 mM Glucose und 50 µg ml^{-1} Kanamycin) verteilt und plattiert.

Screening der Mutanten: Auf Selektionsplatten gewachsene Kolonien wurden mit sterilen Zahnstochern auf Minimalmedium-Platten gepickt, welche außer der Kohlenstoffquelle Glucose und des Antibiotikums zusätzlich 0,2 % Chitin enthielten.

4.5.13 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit den Sonden GAM42a, CF319a, EUB338 sowie NONEUB338 (alle MWG) wurde nach Schmitt-Wagner et al. (2003) durchgeführt. Abweichend wurden Proben, welche Chitin-Partikel enthielten, nach Entfernung der Hybridisierungslösung in Waschpuffer nicht zusätzlich mit Wasser gewaschen, um ein Lösen der Partikel von den Objektträgern zu vermeiden. Ein Waschschritt erfolgte erst nach vollständiger Trocknung und anschließender Färbung mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, 1µg ml^{-1}). Die Dokumentation erfolgte mittels Epifluoreszenzmikroskopie (Axiophot, Zeiss) mit den entsprechenden Filtersets (Zeiss, AHF) und der Software MagnaFire 2.0 (Optronics).

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchungen zur Rolle AHL-vermittelter Zell-Zell-Interaktionen in Mikrokosmen

5.1.1 Anreicherung heterotropher Bakterien in Mikrokosmen

Um die bei der Besiedlung und dem Abbau organischer Partikel auftretenden bakteriellen Interaktion näher zu untersuchen, wurden zunächst Mikrokosmen etabliert, die der Anreicherung partikelassoziierter Bakterien dienen sollten. In Agarose eingebettete einzellige Algen wurden der natürlichen Mikroflora des Bodensees als partikuläre Nährstoffquelle angeboten (Abbildung 5-1). Die Verwendung von Agarose als Matrix zur Untersuchung von Oberflächenbesiedlung aquatischer Bakterien wurde bereits beschrieben (Grossart et al. 2003). Bakterielles Wachstum wurde durch Bestimmung der Gesamtzellzahlen (TCC) sowie der koloniebildenden Einheiten (CFU) in der suspendierten und der Biofilm-Fraktion dokumentiert.

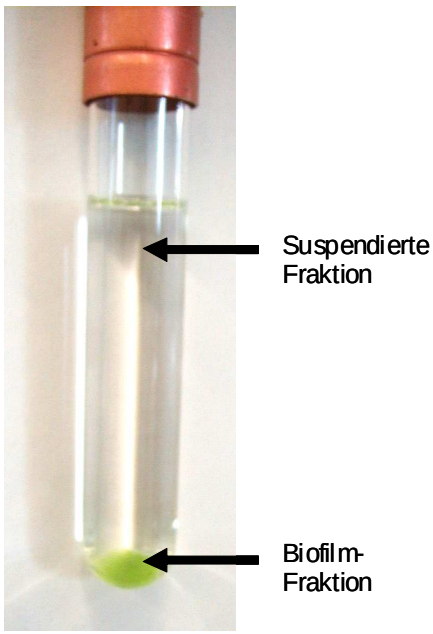


Abbildung 5-1 Mikrokosmos mit Seewasser und einer Algen-Agarosekugel als partikuläre Nährstoffquelle. Das Wachstum der Bakterien wurde im Seewasser (suspendierte Fraktion) und auf der Kugel bestimmt (Biofilmfraktion).

Sowohl die TCC als auch die CFU der suspendierten Fraktion nahmen in allen Mikrokosmen über die Zeit zu (Abbildung 5-2). Die TCC der suspendierten Zellen in Mikrokosmen mit Algen-Agarosekugeln nahmen innerhalb von 48 h um etwa das zehnfache von 10^6 Zellen pro ml auf rund 10^7 Zellen pro ml zu. Dieser Anstieg war auch in den Mikrokosmen mit algenfreien Agarosekugeln zu beobachten. Nach 72 h war jedoch nur in den Mikrokosmen mit zusätzlichem Nährstoffangebot ein weiterer signifikanter Anstieg um etwa das doppelte auf $2*10^7$ Zellen pro ml zu beobachten, wohingegen in Mikrokosmen ohne Algen kein weiterer deutlicher Anstieg stattfand.

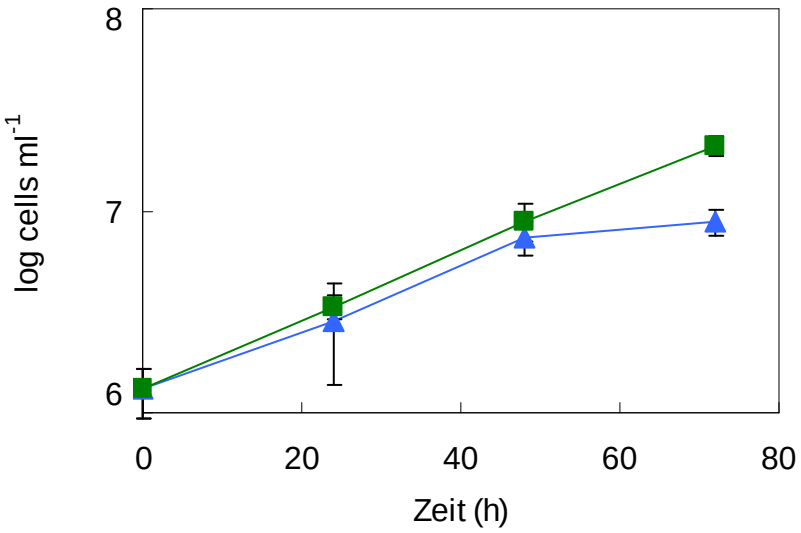


Abbildung 5-2 Seewassermikrokosmos zur Anreicherung heterotropher Bakterien. TCC der suspendierten Fraktion aus Mikrokosmen mit (■) und ohne (▲) Algen in Agarosekugeln. (± Standardabweichung; n = 6).

Die starke Anreicherung von Bakterien in Mikrokosmen mit Algen wird vor allem deutlich, betrachtet man die Zunahme der CFU über die Zeit (Abbildung 5-3 oben). Hier erhöhte sich die Zahl der lebensfähigen Bakterien innerhalb von 48 h um den Faktor 10000 von anfangs rund 250 Zellen pro ml auf fast $3*10^6$ CFU ml^{-1}. In Mikrokosmen ohne Algen war ebenfalls eine Zunahme der CFU zu beobachten, jedoch nahm der Wert hier lediglich um den Faktor 100 auf $2*10^4$ CFU ml^{-1} zu und war vergleichbar mit der Zunahme in Kontrollmikrokosmen ohne in Agarose eingebetteten Algen.

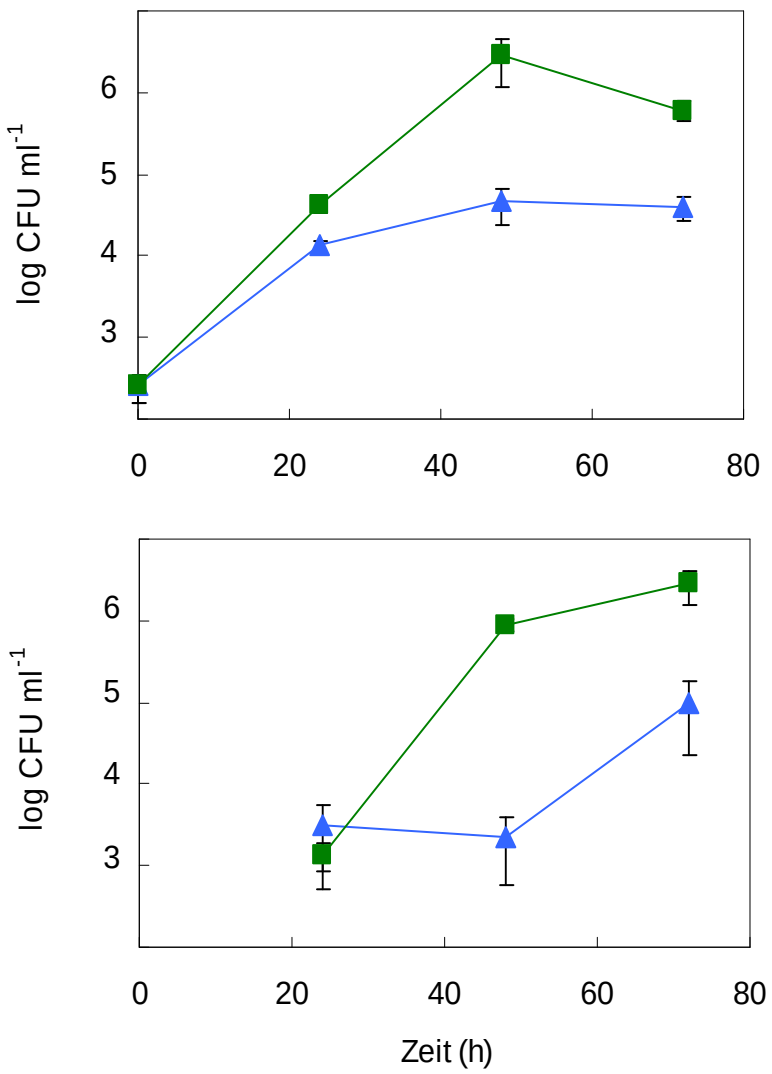


Abbildung 5-3 Seewassermikrokosmos zur Anreicherung heterotropher Bakterien. CFU der suspendierten (oben) und der Biofilm-Fraktion (unten) mit (■) und ohne (▲) Algen in Agarosekugeln. (± Standardabweichung; n = 6).

Auch in der Biofilmfraktion wird der Einfluss des zusätzlichen Nährstoffangebotes durch die Algen deutlich (Abbildung 5-3 unten). Die CFU des Biofilms auf der Kugel mit Algen stiegen innerhalb von 24 h um das rund 700-fache von $1{,}3*10^3$ CFU ml^{-1} auf $8{,}8*10^5$ CFU ml^{-1} an, während im Biofilm der Kugel ohne Algen zunächst kein Anstieg zu beobachten war. Hier stiegen die CFU erst nach 48 an, jedoch lediglich um den Faktor 30.

Der Anteil der kultivierbaren Bakterien an der Gesamtzellzahl gibt die Kultivierungseffizienz an. Diese belief sich für die suspendierte Fraktion zum Zeitpunkt t = 0 auf rund 1 % und überschritten diesen Wert in Mikrokosmen ohne Algen nicht. In Mikrokosmen mit Algen jedoch machten die kultivierbaren Bakterien nach 48 h mit über 60 % den Großteil der Gesamtzellen aus (Abbildung 5-4). Die Kultifvierungseffizienzen

von Kontrollmikrokosmen ohne Agarosekugeln waren vergleichbar mit denen der Mikrokosmen, welche Agarosekugeln ohne Algen enthielten.

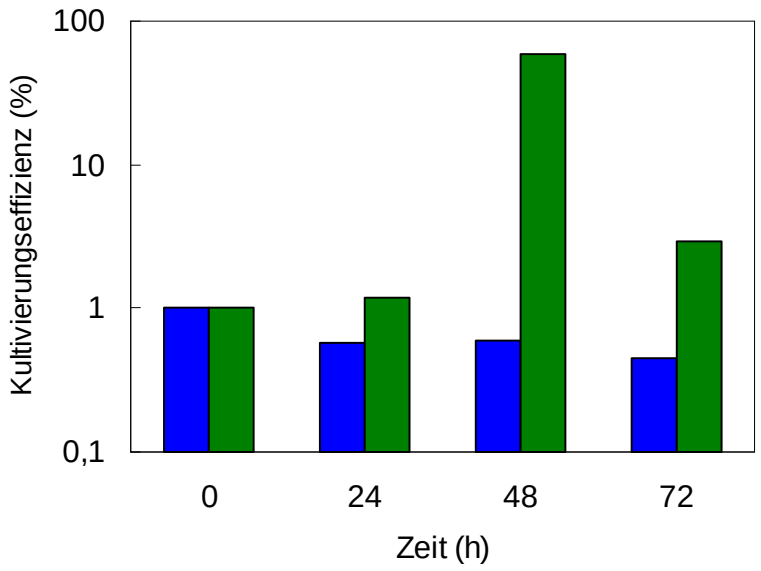


Abbildung 5-4 Kultivierungseffizienz (CFU/TCC) der Seewasser-Mikrokosmen in der suspendierten Fraktion mit (■) und ohne (▲) in Agarose eingebetteten Algen.

5.1.2 Screening gewachsener Kolonien auf AHL-Bildung

Wie in der Einleitung beschrieben sind viele bei der Biofilmbildung und dem Abbau polymerer Substanzen wichtige Vorgänge bei einigen Bakterien durch AHL-basiertes Quorum Sensing reguliert. Die naheliegende Frage war demnach, ob AHL-vermittelte Prozesse auch bei typischen aquatischen Bakterien in oligotrophen Verhältnissen eine Rolle spielen.

905 der aus oben beschriebenen Mikrokosmosexperimenten gewonnenen Kolonien aus CFU-Verdünnungsreihen wurden auf AHL-Bildung untersucht. Da nicht alle der gewachsenen Kolonien auf LB-Festmedium wuchsen, konnten diese nicht mit dem AHL-Indikatorstamm CV026 getestet werden. Zusätzlich reagiert dieser Stamm nur auf kurzkettige AHL und besitzt eine geringe Sensitivität gegenüber AHL. Daher wurde eine Screening-Methode mit den im Methodenteil beschriebenen *E. coli*-Indikatorstämmen entwickelt, welche einerseits den Nachweis des gesamten AHL-Spektrums im nM-Bereich erlaubte (Abbildung 5-5) und andererseits ein schnelles Screening vieler Teststämme ermöglichte.

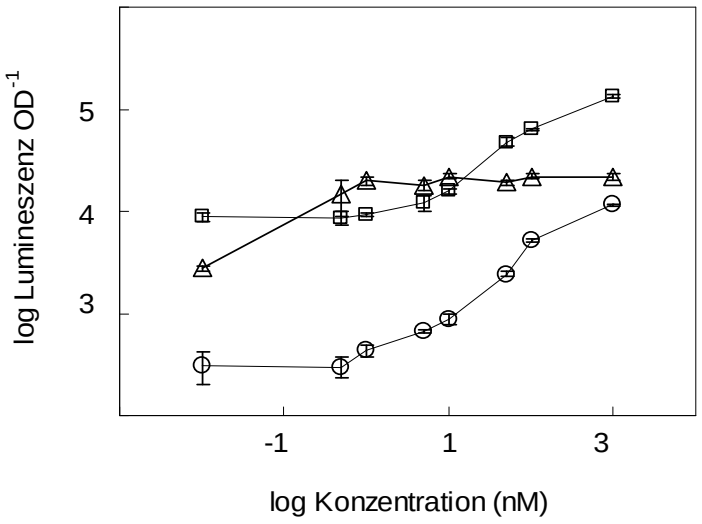


Abbildung 5-5 Biolumineszenz der AHL-Indikatorstämme bei verschiedenen AHL-Konzentrationen. *E .coli* psB 401 (□) mit HHL, psB 536 (○) mit BHL, pSB 1075 (△) mit OdDHL. (± Standardabweichung; n = 3).

244 der getesteten Kolonien regten einen oder mehr der vier Indikatorstämme an, der Anteil AHL-bildender Bakterien betrug demnach 27 %. Eine Korrelation zwischen dem angeregten Indikatorstamm (und demnach der produzierten AHL) und der Herkunft des Teststammes (Biofilm, Suspension, mit oder ohne Alge) war nicht erkennbar. Der Anteil AHL-bildender Kolonien an den Gesamt-CFU in den jeweiligen Mikrokosmen wurde für die Berechnung der AHL-bildenden CFU verwendet (Abbildung 5-6).

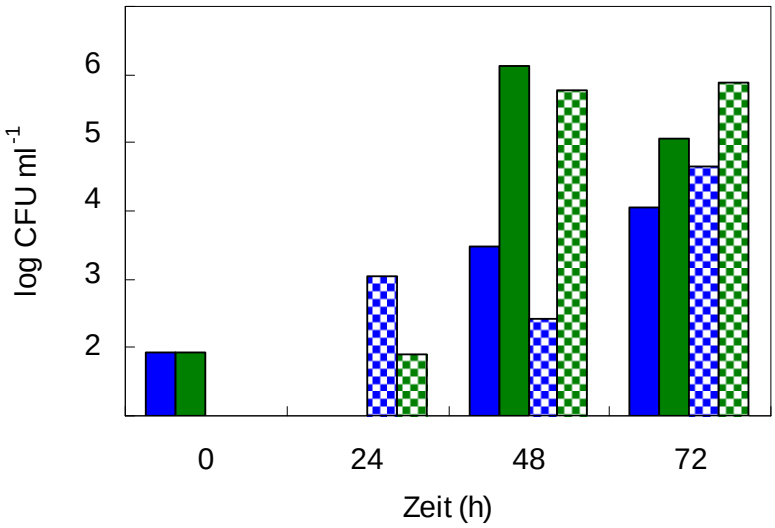


Abbildung 5-6 Berechnete CFU ml^{-1} AHL- bildender Bakterien. Suspendierte (■) und Biofilmfraktion (▩) der Mikrokosmen mit Algen. Suspendierte (■) und Biofilmfraktion (▩) der Mikrokosmen ohne Algen.

Die höchste Anzahl AHL-bildender Kolonien konnten aus solchen Mikrokosmen isoliert werden, welche Agarosekugeln mit Algen enthielten. Nach 48 h befanden sich mehr als 10^6 AHL-bildende CFU ml^{-1} in der suspendierten Fraktion eines solchen Mikrokosmos. Dies entspricht fast 50 % aller CFU und einer 10^4-fachen Anreicherung verglichen mit Seewasser zum Zeitpunkt t = 0. AHL-bildende CFU aus der Biofilmfraktion des Mikrokosmos mit Algen machten nach 48 h fast 70 % der kultivierbaren Bakterien des Biofilms aus. Eine solch extreme Anreicherung AHL-bildender Bakterien ließ sich in Mikrokosmen ohne Algen nicht beobachten, hier war die höchste Anzahl nach 72 h in der suspendierten Fraktion mit rund 10^4 CFU ml^{-1} zu beobachten, was etwa 30 % der gesamt-CFU entspricht. Lediglich in der Biofilmfraktion machten die AHL-bildenden Bakterien etwa 45 % der CFU aus, die Gesamtmenge lag jedoch um etwa das zehnfache unter der des Biofilms auf einer Kugel mit Algen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich AHL-bildende Bakterien in den von uns etablierten Mikrokosmen anreicherten und dieser Effekt vor allem durch ein zusätzliches Nährstoffangebot in Form autoklavierter Algen unterstützt wurde.

Der Nachweis AHL-bildender Bakterien erfolgte nach Wachstum in Flüssigmedium und Detektion der AHL im Kulturüberstand. Hierfür wurden optische Dichten erreicht, wie sie unter den natürlichen Bedingungen der Mikrokosmen nicht zu erreichen waren. Mit 10^7 TCC ml^{-1} als Maximalwert lagen die Kulturen der Mikrokosmen um das hundertfache unter den Zellzahlen, wie sie in nährstoffhaltigem Medium vorzufinden wären. Demnach stellte sich die Frage, ob die Anreicherung AHL-bildender Bakterien in Mikrokosmen auch einer nachweisbaren Akkumulation von AHL entsprach. Neben der Überprüfung des reinen Kulturüberstandes wurden organische Extrakte der Mikrokosmen auf AHL-Bildung überprüft, da durch die deutlich geringeren Zellzahlen auch deutlich geringere Konzentrationen an AHL zu erwarten wären und der Nachweis möglicherweise nur durch Anreicherung der AHL mittels Extraktion möglich wäre. Überrachenderweise konnte in keinem der Mikrokosmen AHL nachgewiesen werden, auch nach Extraktion eines 50 ml-Mikrokosmos, welcher 20 Agarosekugeln enthielt, und Konzentrierung des Extraktes auf 100 µl reagierte keiner der Indikatorstämme. Demnach lagen potentiell gebildete AHL sogar in dieser 500-fachen Anreicherung unter der Nachweisgrenze der Indikatorstämme, welche sich wie oben beschrieben im nM-Bereich befindet.

5.1.3 Isolierung und Charakterisierung von Reinkulturen

Von 244 AHL-bildenden Kolonien aus Mikrokosmen wurden 193 über mehrfache Übertragungen von Einzelkolonien isoliert und physiologisch charakterisiert. Alle Isolate waren Gram negativ sowie Oxidase und Katalase positiv.

Während der Isolierung AHL-bildender Bakterien stellte sich heraus, dass etwa die Hälfte der AHL-positiven Kolonien eine Mischkultur eines AHL-Produzenten und eines nicht AHL-produzierenden Bakteriums darstellte. Die Anwesenheit eines zweiten Bakteriums war nach einigen Tagen auf Medium B-Platten durch Ausschwärmen von Zellen aus der vom AHL-Produzenten gebildeten Kolonie sichtbar (Abbildung 5-8). Die Trennung beider Stämme war über Plattierung auf LB-Platten möglich, da die schwärmenden Bakterien kein Wachstum mit LB zeigten. Da die isolierten schwärmenden Stämme sich ebenfalls in großen Mengen in den Mikrokosmen anreicherten und ihnen demnach eine wichtige Rolle bei der Besiedlung organischer Partikel zukommen könnte, wurden sie trotz fehlender AHL-Bildung weiter charakterisiert (5.1.3.2).

Von allen isolierten Reinkulturen wurde eine PCR zur Amplifizierung des Gens für die 16S rRNA durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden einem Restriktionsverdau mit einer Restriktionsendonuklease (*MspI*) unterzogen und die Fragmente mittels Gelelektrophorese getrennt.

5.1.3.1 Charaktersierung der AHL-bildenden Isolate

Alle AHL-bildenden Isolate besaßen das gleiche Bandenmuster und konnten nach Ansequenzierung des 16S rRNA-Gen PCR-Produktes einiger ausgewählter Isolate allesamt der Gattung *Aeromonas* zugeordnet werden. Darunter befanden sich verschiedene Arten dieser Gattung, unter anderem *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. salmonicida* und *A. veronii*. Stämme von *Aeromonas* sind kleine Stäbchen von etwa 0,5 µm bis 3,5 µm Länge und besitzen oft ein polares Flagellum (z. B. *Aeromonas hydrophila)* (Carnahan und Joseph 2005). Zur phylogenetischen Sequenzanalyse muss hinzugefügt werden, dass viele der Stämme nicht eindeutig einer bestimmten Art zugeordnet werden konnten, da die Sequenzanalyse lediglich auf einen Teil des 16S rRNA Gens beruhte. Zur weiteren phylogenetischen Einordnung müsste das Gen vollständig sequenziert werden.

Zu weiteren Charakterisierung der AHL-bildenden *Aeromonas*-Stämme wurde eine organische Extraktion von mit Medium B gewachsenen Reinkulturen durchgeführt und die Extrakte mittels Dünnschichtchromatographie getrennt (Abbildung 5-7). Es ließen sich mehrere unterschiedliche Muster der gebildeten AHL erkennen, jedoch war eine Korrelation hinsichtlich gebildeter AHL und phylogenetischer Einordnung der Stämme nicht erkennbar.

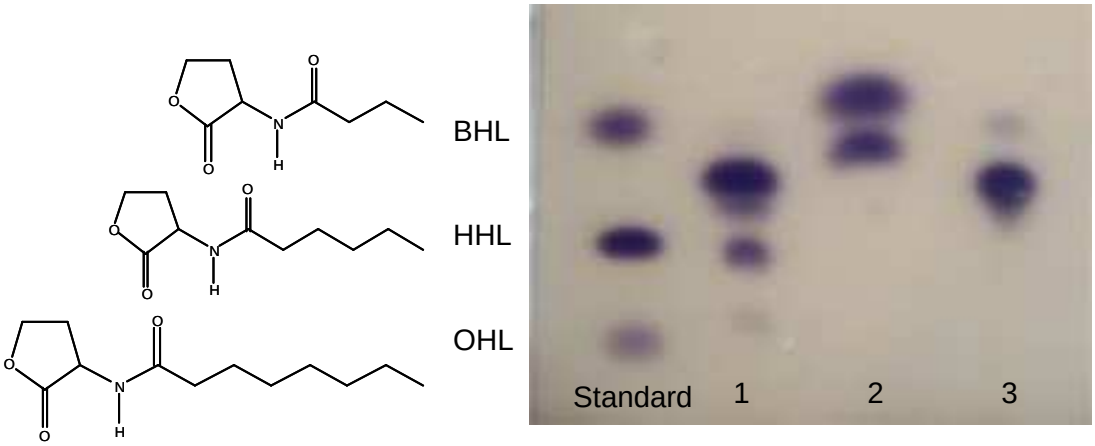


Abbildung 5-7 Exemplarische Darstellung einer mit dem Indikatorstamm CV026 überschichtete Dünnschichtchromatographie-Platte nach Trennung der AHL aus organischen Extrakten dreier *Aeromonas*–Kulturen (1: Stamm 2C5, 2: Stamm 7B9, 3: der mit Stamm 4D9 assoziierte *Aeromonas hydrophila*-Stamm).

Es wurden größtenteils kurzkettige AHL mit einer Acyl-Seitenkettenlänge zwischen C4 und C8 gebildet, darunter HHL und BHL. Viele der getesteten Stämme produzierten ein weiteres HHL, welches in der Dünnschichtchromatographie zwischen HHL und BHL detektiert wurde und vermutlich 3-oxo-HHL (OHHL) darstellte (Abbildung 5-7, Stamm 1 und 2). Das AHL-Muster des in der Abbildung exemplarisch dargestellten Stammes 2 könnte BHL sowie eine modifizierte Variante, beispielsweise 3-oxo-BHL darstellen. Insgesamt wurden die Moleküle HHL sowie OHHL am häufigsten detektiert.

Längerkettige AHL wurden mittels Dünnschichtchromatographie nicht detektiert, obwohl einige Isolate den Indikatorstamm *E. coli* pSB 1075, welcher vor allem auf langkettige AHL reagiert, zur Biolumineszenz induzierten. *Aeromonas*-Stämme produzieren kurzkettige AHL bis zu einer Kettenlänge von C8 (Swift et al. 1997, Bruhn et al. 2005), daher lässt sich schlussfolgern, dass *E. coli* pSB 1075 auch sensitiv gegenüber dieser Moleküle ist.

5.1.3.2 Charakterisierung der schwärmenden nicht-AHL-bildenden Isolate

Die mitangereicherten, nicht AHL-bildenden Isolate konnten anhand ihrer Bandenmuster drei dominanten Gruppen zugeordnet werden, welche jeweils zu einem gleichen Anteil insgesamt 70 % der AHL-negativen Isolate ausmachten. Nach Sequenzierung ausgewählter PCR-Produkte konnten ausnahmslos alle dem *Cytophaga-Flavobacterium* Cluster der *Bacteroidetes* zugeordnet werden. Eine genauere phylogenetische Einordnung war durch die unklare taxonomische und physiologische Definition der *Cytophaga-Flavobacterium*- Gruppe nicht möglich (siehe Diskussion). Ein charakteristisches Merkmal ist die Pigmentierung vieler dieser Bakterien, welche durch die Bildung von Flexirubin und ähnlichen Pigmenten verursacht wird (Reichenbach 2006b).

Auf dem für die Isolierung von Bakterien aus Mikrokosmen verwendeten Festmedium wuchsen die Stämme der *Cytophaga/Flavobacterium*-Gruppe nicht als einzelne Kolonien, sondern breiteten sich innerhalb weniger Tage als Schwarm über die gesamte Agarplatte aus. Eine Fortbewegung in Flüssigkultur war jedoch nicht zu beobachten, da diese Bakterien kein Flagellum besitzen und die auf Agarplatten beobachtete „gliding motility“ eine Bewegung auf Oberflächen darstellt (McBride 2004). Das Schwärmverhalten der näher untersuchten Stämme konnte fast vollständig reduziert werden, wurden die Zellen auf Festmedium mit einem hohen Trypton-Gehalt von 1% kultiviert. Hier bildeten die Stämme klar definierte Kolonien (Abbildung 5-8 a), welche die charakteristische gelbe Pigmentierung aufwiesen. Ein ähnliches Verhalten konnte bei dem für weitere Versuche ausgewählten *Cytophaga*-Stamm 4D9 beobachtet werden, wurde dieser mit einem *Aeromonas hydrophila*-Stamm cokultiviert. Zunächst bildeten sich auch auf Platten mit geringem Trypton-Gehalt schnell wachsende Kolonien aus, wie sie auch von *Aeromonas*-Reinkulturen gebildet wurden. Mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung jedoch konnte gezeigt werden, dass diese Kolonien zu einem großen, teilweise dominierendem Teil aus Zellen des Stammes 4D9 bestanden. Das typische Schwärmverhalten setzte deutlich später als bei der Reinkultur beobachtet ein (Abbildung 5-8 d). Demnach unterdrückten sowohl ein hoher Nährstoffgehalt, als auch die Anwesenheit eines koloniebildenden Bakteriums, zumindest Stämme von *Aeromonas*, die Fortbewegung durch Gleiten der untersuchten *Cytophaga/Flavobacterium*-Stämme.

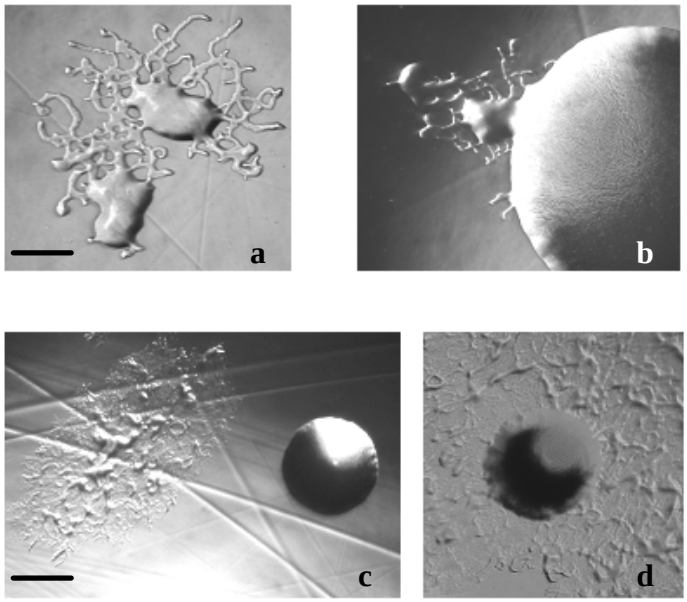


Abbildung 5-8 Fotografische Aufnahmen gewachsener Kolonien von Stamm 4D9 (a) auf Festmedium mit 1 % Trypton sowie Mischkulturen von Stamm 4D9 und AH-1N auf Festmedium mit 1 % Trypton (b) bzw. 0,05 % Trypton (c und d). Stamm AH-1N bildet runde, glatte Kolonien (b-d). Stamm 4D9 bildet stark strukturierte (a und b) oder schwärmende Kolonien (c und d). Balken 0,2 mm für a und b; 1 mm für c und d.

5.1.4 Wachstumsversuche mit *Aeromonas*-Reinkulturen

Da sich AHL-bildende Bakterien der Gattung *Aeromonas* in den Mikrokosmen anreicherten, sollte untersucht werden, ob der offensichtliche Wachstumsvorteil der Stämme unter den beschriebenen Bedingungen abhängig von der Fähigkeit war, AHL zu bilden. Hierfür wurden Wachstumsversuche analog der Mikrokosmen durchgeführt. Als Hintergrundmedium diente sterilfiltriertes Seewasser, welches in Agarose eingebettete Algen enthielt. Als Modellorganismen wurden für die Versuche der *Aeromonas hydrophila* Stamm AH-1N sowie die isogene Mutante AH-1N *ahyI*, welche defekt in der AHL-Synthese ist, eingesetzt. Für diese beiden Stämme wurde bereits beschrieben, dass AHL-basiertes Quorum Sensing eine wichtige Funktion sowohl bei der Biofilmbildung (Lynch et al. 2002) als auch bei der Produktion von Exoenzymen (Swift et al. 1999) besitzt.

Beide Stämme erreichten in Reinkulturen gleich hohe Zellzahlen mit rund 10^7 CFU ml^{-1} nach 48 h in der suspendierten Fraktion sowie ähnliche Werte in der Biofilmfraktion nach 72 h (nicht gezeigt), demnach war zwischen dem Wildtyp und dem AHL negativen Stamm zumindest in Reinkultur kein Wachstumsunterschied zu erkennen. Zur Untersuchung eines potenziellen Wachstumsvorteils des AHL-produzierenden Wildtyp-Stammes wurde ein Wachstumsexperiment mit einer Cokultur des Stammes AH-1N sowie der Mutante AH-1N *ahyI* durchgeführt. Beide Stämme wurden im Verhältnis 1:1 als Inokulum eingesetzt.

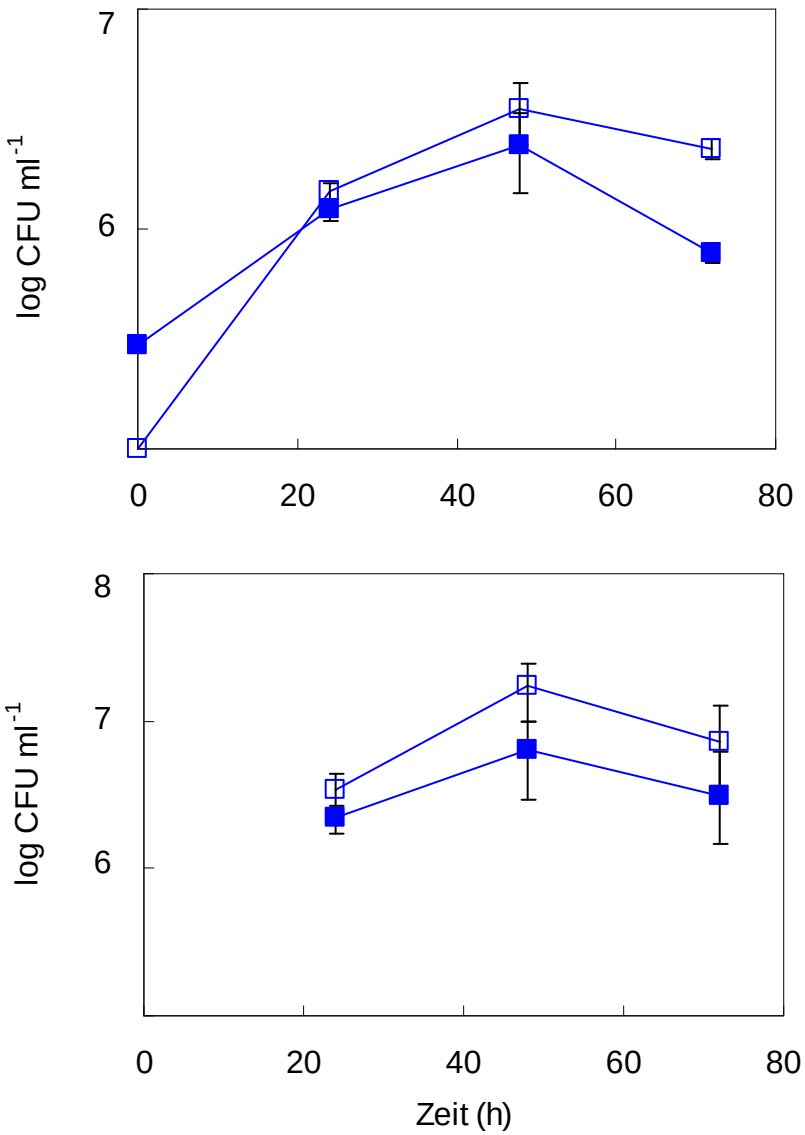


Abbildung 5-9 Wachstumsversuche mit in Agarose eingebetteten Algen. CFU der suspendierten (oben) und der Biofilm-Fraktion (unten) einer Co-Kultur der Stämme AH-1N (■) und AH-1N *ahyI* (□) beim Wachstum mit in Agarose eingebetteten Algen. (± Standardabweichung; n = 9).

Das eingesetzte Verhältnis beider Stämme änderte sich sowohl in der suspendierten (Abbildung 5-9 oben) als auch in der Biofilmfraktion kaum (Abbildung 5-9 unten). Beide Stämme erreichten ähnlich hohe Zellzahlen von etwa $5*10^6$ CFU ml^{-1} in der Suspension sowie 10^7 CFU ml^{-1} im Biofilm.

Ein Wachstumsvorteil für den Wildtyp ließ sich nicht erkennen. Da die Mutante zwar keine AHL produzieren, wohl aber darauf reagieren kann, wurde ein weiteres Cokultur-Experiment durchgeführt, welches zur Überprüfung eines möglichen Profits der Mutante von den vom Wildtyp produzierten AHL dienen sollte. Da die Mutante keine Energie für die Synthese von AHL aufwenden muss, würde sich ein Profit eventuell in einer stärkeren

Zunahme der CFU im Vergleich zum Wildtyp äußern, wenn die Mutante im Inokulum deutlich in der Minderheit vorliegt. Demnach wurden die Stämme für das Wachstumsexperiment in einem Verhältnis von 9:1 (Wildtyp:Mutante) eingesetzt. Jedoch zeigte sich auch hier keinerlei Veränderung dieses Verhältnisses (nicht gezeigt), wonach zu schließen war, dass sich beide Stämme unabhängig von AHL in gleichem Maße vermehrten. Die Möglichkeit der AHL-induzierten Genexpression ist demnach für *Aeromonas hydrophila* unter den gewählten Bedingungen nicht von Bedeutung. Anhand dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, ob in den durchgeführten Experimenten überhaupt nachweisbare Mengen an AHL produziert wurden. Dazu wurden organische Extrakte aus Mikrokosmen mit AHL-Indikatorstämmen untersucht und eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Jedoch konnten mit beiden Testsystemen keine AHL nachgewiesen werden.

5.1.5 Wachstumsversuche zu Interaktionen zwischen den Stämmen AH-1N und 4D9

Ein Vorteil durch die Bildung von AHL könnte sich für *Aeromonas hydrophila* in einer Konkurrenzsituation mit anderen, nicht AHL produzierenden Bakterien ergeben. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde ein weiteres Wachstumsexperiment mit einer Cokultur der Stämme AH-1N sowie 4D9 durchgeführt. Der ebenfalls aus den Mikrokosmen isolierte Stamm 4D9 produziert keine AHL. Bei der Bildung eines Biofilms und der Exkretion von Exoenzymen sollte sich ein Vorteil durch AHL-induzierte Genexpression in Stamm AH-1N hierbei deutlich im Wachstum im Vergleich zur Mutante widerspiegeln. Beide *Aeromonas*-Stämme wurden in Cokultur mit Stamm 4D9 im Verhältnis 1:1 eingesetzt und das Wachstum in der suspendierten und der Biofilm-Fraktion verfolgt. Die Stämme wurden anhand ihrer sehr unterschiedlichen Koloniemorphologien unterschieden.

Stamm 4D9 erreichte sowohl in Rein- (nicht gezeigt) als auch in Cokultur mit je einem der *Aeromonas*-Stämme gleiche Zellzahlen von rund $5*10^7$ CFU ml^{-1} in der suspendierten (Abbildung 5-10 oben) und der Biofilmfraktion (Abbildung 5-10 unten). Bei Stamm AH-1N hingegen nahm nach 24 h die Zellzahl um das zehnfache im Vergleich zum Inokulum ab und stieg nach 48 h wieder auf den Ursprungswert. Der gleiche Wachstumsverlauf wurde auch bei der *Aeromonas*-Mutante beobachtet.

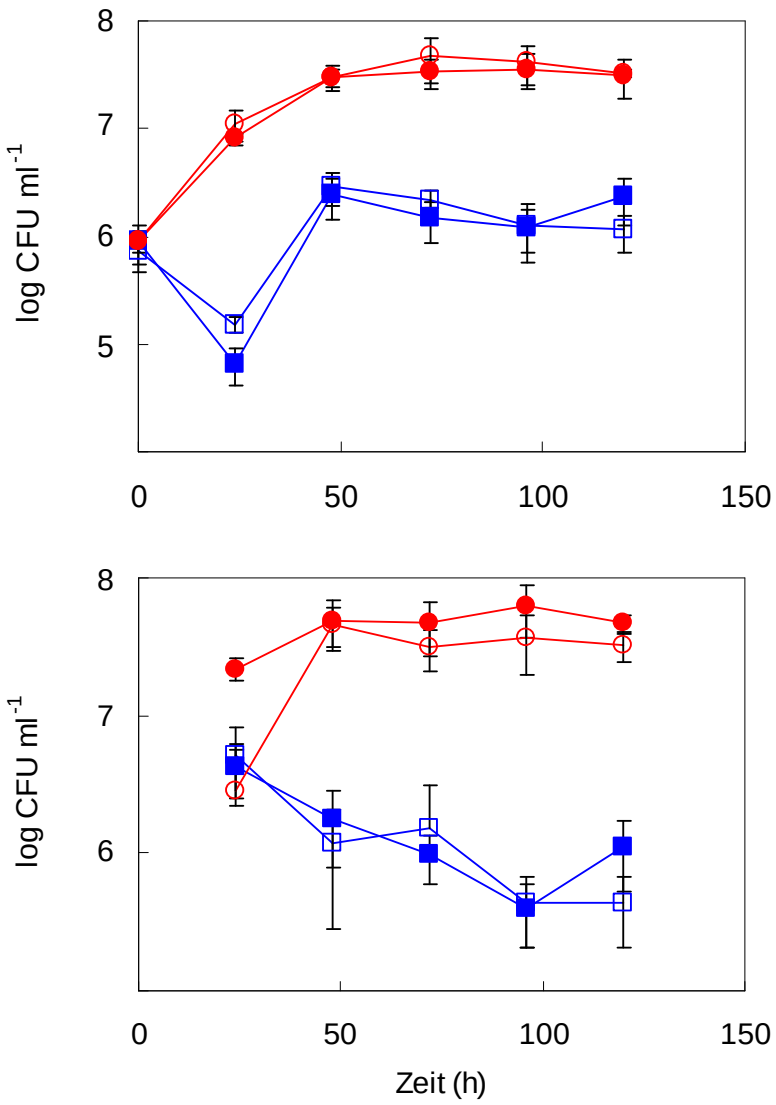


Abbildung 5-10 Wachstumsversuche mit in Agarose eingebetteten Algen. CFU der suspendierten (oben) und der Biofilm-Fraktion (unten) des Stammes AH-1N (■) in Cokultur mit Stamm 4D9 (●) und Stamm AH-1N *ahyI* (□) in Cokultur mit Stamm 4D9 (○). (± Standardabweichung; n = 9).

Auch die Biofilmfraktion der *Aeromonas*-Stämme in Cokultur mit Stamm 4D9 (Abbildung 5-10 unten) zeigte ein vollständig anderes Bild im Vergleich zu den Reinkulturen. Hier waren die CFU nach 24 h zwar vergleichbar mit den Reinkulturen mit rund $5*10^6$ CFU ml^{-1}, jedoch war anschließend eine drastische Abnahme der CFU um mehr als das zehnfache zu vermerken. Dies galt sowohl für den Wildtyp-Stamm, als auch für die AHL-negative Mutante. Die Abnahme der Zellen im Biofilm könnte im Zusammenhang mit der Zunahme in der Suspension nach 48 h stehen, welche demnach nicht durch Wachstum, sondern durch Ablösen der Zellen aus dem Biofilm und Verteilung in der Suspension begründet sein könnte.

Insgesamt war auch in Konkurrenz mit Stamm 4D9 kein Unterschied im Wachstum zwischen dem *Aeromonas*-Wildtyp und der Mutante zu vermerken. Dies deutet wiederum auf ein AHL- unabhängiges Verhalten der Stämme bei der Besiedlung der Agarosekugel hin. Da wie in 5.1.4 beschrieben in diesem System keine AHL nachgewiesen werden konnten, wurde das Experiment mit 4D9 als Konkurrenten unter gleichen Bedingungen wiederholt, jedoch zusätzlich 1 µM BHL zugegeben, um eine AHL-Produktion durch Stamm AH-1N zu simulieren. Jedoch zeigte sich auch hier keinerlei Einfluss auf das Wachstumsverhalten sowohl der *Aeromonas*-Stämme, als auch auf Stamm 4D9 (nicht gezeigt). Demnach spielte AHL-basierte Genexpression auch bei nachweisbarer Anwesenheit von AHL keine Rolle unter den von uns gewählten Bedingungen.

5.2 Wachstum mit Chitin

Die Stämme 4D9 und AH-1N zeigten wie in Kapitel 5.1.3.2 beschrieben Wechselwirkungen hinsichtlich der Koloniebildung auf Festmedium. Zusätzlich wurde eine Beeinflussung des Stammes AH-1N durch Stamm 4D9 beim Wachstum mit in Agarose eingebetteten Algen beobachtet (siehe 5.1.5). Eine nähere Untersuchung dieser interspezifischen Wechselwirkungen lag nahe, jedoch war die Verwendung eines definierteren Substrates als die verwendeten Algen vonnöten. Die Anwesenheit dieses natürlichen Substrates gab zwar Auskunft über die Biofilmbildung, lieferte jedoch keinerlei Auskünfte über den spezifischen Abbau. Um dieses Problem zu umgehen, wurde für weitere Experimente das natürliche Biopolymer Chitin als Substrat eingesetzt, mit welchem beide Stämme wachsen konnten.

5.2.1 Wachstum der Stämme AH-1N und 4D9 in Reinkulturen

5.2.1.1 Wachstum mit GlcNAc, $GlcNAc_2$ und $GlcNAc_3$ in Flüssigkultur

Zur näheren Charakterisierung der Stämme AH-1N und 4D9 beim Abbau von Chitin wurden Wachstumsversuche mit Chitinabbauprodukten durchgeführt. Zunächst wurde das Wachstum mit dem Hauptabbauprodukt N-Acetylglucosamin (GlcNAc) als Energie-, Kohlenstoff- und Stickstoffquelle überprüft. Beide Stämme nutzten GlcNAc sowohl als Kohlen- als auch als Stickstoffquelle und erreichten ähnliche optische Dichten von etwa 0,3 (Abbildung 5-11). Stamm AH-1N war nach 48 Stunden ausgewachsen, das Wachstum des Stammes 4D9 erfolgte dagegen deutlich langsamer. Hier war die stationäre Phase erst nach etwa 150 Stunden erreicht. Das Wachstum des *Aeromonas*-Stammes vollzog sich mit einer gleichzeitigen Freisetzung von Ammonium ins Kulturmedium bis zu einer Konzentration von 1 mM gegen Ende der exponentiellen Phase. Im Laufe der stationären

Phase wurde das Ammonium wieder aufgenommen, dieser Prozess wurde jedoch nur bis zum Ende des Wachstums verfolgt, sodass unklar ist, ob die Gesamtmenge des Ammoniums wieder aufgenommen wurde. Stamm 4D9 setzte im Laufe des Wachstums kontinuierlich Ammonium frei, jedoch blieben die Konzentrationen im Vergleich zu Stamm AH-1N gering.

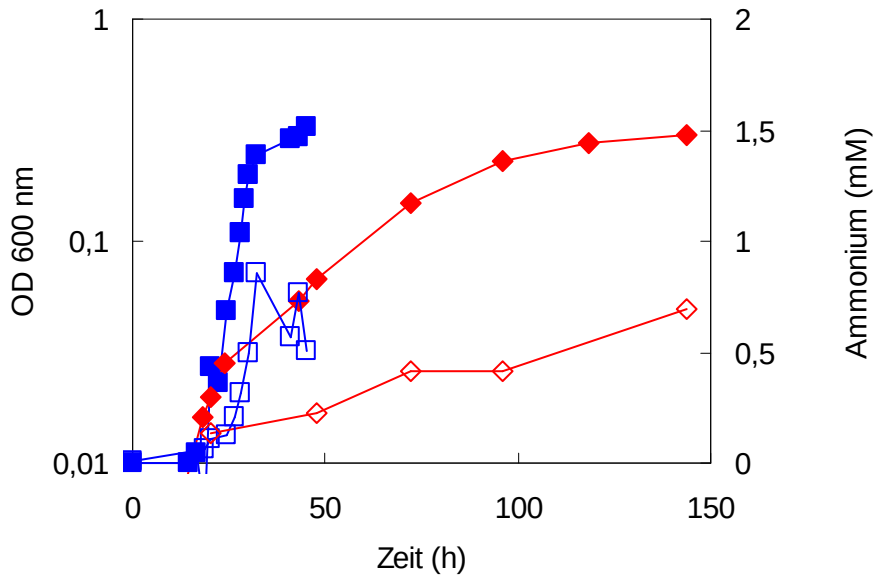


Abbildung 5-11 Wachstum der Stämme AH-1N (■) und 4D9 (◆) mit 2 mM GlcNAc als Kohlen- und Stickstoffquelle, sowie Freisetzung von Ammonium durch Stamm AH-1N (□) und 4D9 (◇).

Auch die Oligomere N,N'-Diacetylchitobiose ($GlcNAc_2$) und N,N',N''-Triacetylchitotriose ($GlcNAc_3$) wurden beiden Stämmen als Kohlen- und Stickstoffquellen angeboten. Hier wurde das Wachstum mittels Endwert- OD-Bestimmung in einem Mikrotiterplattenlesegerät (Genios, Tecan) bestimmt, da diese Wachstumsversuche aufgrund der nur begrenzt verfügbaren Substrate im 100 µl-Maßstab in einer 96 Well-Mikrotiterplatte durchgeführt wurden. Auch diese Substrate konnten von beiden Stämmen sowohl als Kohlenstoff- als auch als Stickstoffquelle genutzt werden. Die erreichten OD-Werte nach Wachstum mit den Oligomeren entsprachen denen nach Wachstum mit der entsprechenden Menge an Monomeren.

5.2.1.2 Wachstum mit freiem kolloidalen Chitin in Flüssigkultur

Freies kolloidales Chitin wurde in einer Konzentration von 0,5 % (w/v) als Substrat eingesetzt. Dies entspricht einer Monomer-Konzentration von rund 22 mM, wenn man von einem vollständigen Acetylierungsgrad des Chitins ausgeht. Der Einsatz dieser relativ hohen Konzentration war nötig, da zum einen nicht von einem vollständigen Abbau des Chitins ausgegangen werden konnte und zum anderen die Quantifizierung des Chitins

über die Abnahme der Füllhöhe im Röhrchen erfolgte und dies einen gewissen Ausgangs-Füllstand voraussetzte. Chitin wurde zum einen als Kohlenstoffquelle in Ammonium-haltigem (5 mM) Medium als auch als Kohlen- und Stickstoffquelle in stickstoffreiem Medium eingesetzt. Die Ansätze wurden bei 16 °C und 150 rpm inkubiert. Die Gesamtzellzahlen der Vorkulturen wurden bestimmt, um die Inokula auf 10^6 Zellen ml^{-1} einzustellen. Das Wachstum der Kulturen wurde ebenfalls über die Ermittlung der Gesamtzellzahlen bestimmt, da eine OD- Bestimmung durch das unlösliche Substrat nicht möglich war. Zusätzlich wurde die Ammoniumkonzentration in den Kulturüberständen im Laufe des Wachstums bestimmt.

Beide Stämme nutzen freies kolloidales Chitin in Flüssigkultur sowohl als Kohlenstoff- als auch als Stickstoffquelle in Ammonium-freiem Medium und erreichten ähnlich hohe Zellzahlen von rund 10^9 Zellen ml^{-1} nach fast vollständigem Abbau des Chitins (Abbildung 5-12). Das Wachstum beider Stämme verlief ähnlich, jedoch baute der *Aeromonas*-Stamm AH-1N das Chitin schneller ab. Hier war das zur Verfügung stehende Chitin bereits nach 100 h fast vollständig abgebaut, bei Stamm 4D9 hingegen erst nach etwa 150 h. Eine weitere interessante Beobachtung war, dass der Chitinabbau durch Stamm 4D9 bevorzugt bei niedrigen (16 °C bis 25 °C) Tempe raturen ablief. Bei 30 °C erfolgten der Abbau sowie das Wachstum sehr langsam oder überhaupt nicht. Für Stamm AH-1N hingegen schien die Inkubationstemperatur keine Rolle zu spielen, hier erfolgten der Abbau und das Wachstum bei 30 °C sogar etwas schnel ler.

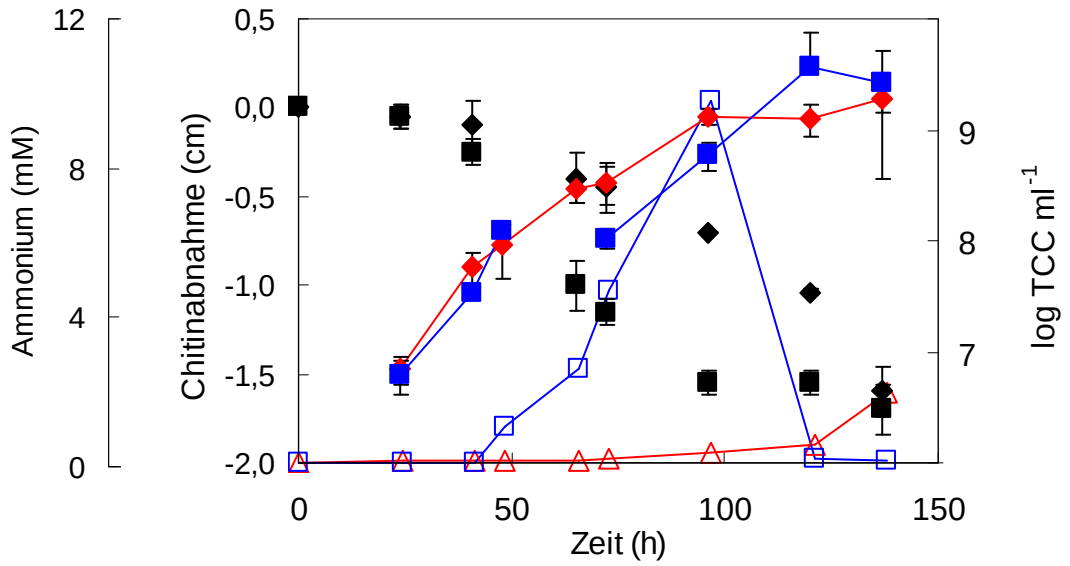


Abbildung 5-12 Wachstum der Stämme AH-1N (■) und 4D9 (◆) mit gleichzeitigem Abbau von kolloidalem Chitin (AH-1N: ■, 4D9: ◆) als Kohlen- und Stickstoffquelle sowie Freisetzung von Ammonium (AH-1N: □, 4D9: △). (± Standardabweichung; n = 3).

Wie schon beim Wachstum mit GlcNAc beobachtet, setzte Stamm AH-1N während der exponentiellen Phase Ammonium in das Kulturmedium frei, welches in der stationären Phase wiederaufgenommen wurde. Die maximale gemessene Konzentration von Ammonium im Kulturüberstand von Stamm AH-1N betrug rund 10 mM nach etwa 100 h. Bei 4D9 war keine Freisetzung von Ammonium festzustellen, wenn dieser mit Chitin als Kohlen- und Stickstoffquelle wuchs, lediglich gegen Ende des Wachstums war eine geringe Menge messbar. Beide Stämme wuchsen in Ammonium-haltigem Medium langsamer und erreichten etwa zehnfach geringere Zellzahlen. Auch der Abbau des Chitins erfolgte im Vergleich zum Abbau im Ammonium-freien Medium langsamer. Ein weiteres Chitinabbauprodukt, welches neben Ammonium im Kulturüberstand von AH-1N beim Wachstum mit Chitin akkumulierte, konnte mittels HPLC als Acetat identifiziert werden. Hier waren bis zu 5 mM Acetat gegen Ende des Wachstums messbar. Zusätzlich war ein weiterer Peak in HPLC-Chromatogrammen Chitin-gewachsener AH-1N Kulturen zu erkennen, welcher bei rund 13,4 min eluierte. Dieser Peak konnte jedoch nicht identifiziert werden und war zudem nicht in allen Proben zu finden. Auch in einigen Proben von 4D9-Kulturüberständen war ein solcher Peak zu erkennen. Hierbei könnte es sich um ein unbekanntes Chitinabbauprodukt handeln.

Deutliche Unterschiede zwischen den Stämmen Stämmen AH-1N und 4D9 während des Wachstums mit freiem Chitin in Flüssigkultur waren vor allem im mikroskopischen Bild sichtbar. Hier zeigte sich, dass Zellen von AH-1N sowohl suspendiert, als auch in großen Mengen assoziiert mit den Chitinpartikeln vorzufinden waren, wohingegen Stamm 4D9 vor allem suspendiert vorlag und nur vereinzelt auf oder an den Partikeln (Abbildung 5-13). Die Biofilmbildung des Stammes AH-1N auf Chitinpartikeln wurde besonders nach Färbung der Zellen mit DAPI sichtbar.

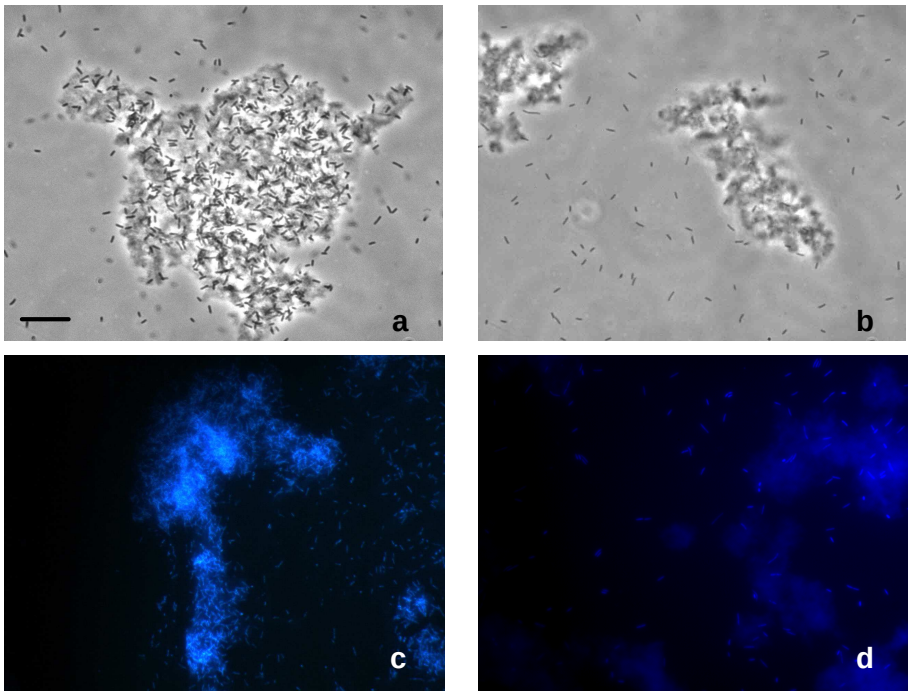


Abbildung 5-13 Phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Chitinpartikeln und Zellen aus Kulturen der Stämme AH-1N (a + c) und 4D9 (b + d). Balken = 10 µm.

Des Weiteren sei angemerkt, dass auch die AHL-negative Mutante AH-1N *ahyI* mit Chitin wachsen konnte und keine Unterschiede bezüglich des Wachstums im Vergleich zum Wildtyp aufwies (nicht gezeigt). Die Mutante erreichte beim Abbau von freiem Chitin in Flüssigkultur gleiche Zellzahlen wie der Wildtyp und zeigte ebenso die Freisetzung von Ammonium während der exponentiellen Phase.

5.2.1.3 Wachstum der Stämme AH-1N und 4D9 mit eingebettetem Chitin

Die von uns isolierten Stämme sowie Stamm AH-1N wurden auf das Wachstum mit in Agar eingebettetem Chitin überprüft. Hierfür wurden die Stämme auf Medium B-Festmedium mit Chitin als alleiniger Kohlen- und Stickstoffquelle ausgestrichen. Die getesteten *Aeromonas*-Stämme konnten ausnahmslos auf Chitin-Agarplatten wachsen und zeigten bereits nach zwei Tagen Wachstumsdauer eine um die Kolonien verbreitete Hydrolyse-Zone (Abbildung 5-14). Dies deutete auf diffusible extrazelluläre chitinolytische Enzyme hin. Im Gegensatz dazu zeigten die getesteten *Cytophaga-Flavobacterium*-Stämme kein oder nur ein begrenztes Wachstum und nur in einzelnen Fällen Hydrolysezonen.

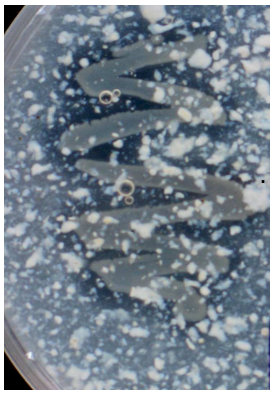


Abbildung 5-14 Wachstum des Stammes AH-1N auf einer Chitin enthaltende Agarplatte mit Entstehung einer Hydrolysezone.

Vor allem bei Stamm 4D9 war auch nach Inkubationszeiten bis zu 2 Wochen kein Wachstum auf Chitin-Agarplatten zu erkennen. Der Stamm verbreitete sich zwar schwärmend in einem dünnen Film über die Platte, zeigte jedoch kein vermehrtes Wachstum im Vergleich zu Kontrollplatten, welche kein Chitin enthielten. Auch eine Hydrolyse des Chitins war in keiner Weise zu beobachten. Demnach war Stamm 4D9 lediglich in Flüssigkultur in der Lage, Chitin abzubauen.

Um zu überprüfen, ob dies mit dem Wachstum in Flüssigkultur zusammenhing, oder die verringerte Verfügbarkeit des Chitins in eingebetteter Form eine Rolle spielte, wurden Wachstumsexperimente analog der Mikrokosmen mit Algen als Substrat durchgeführt. Chitin wurde als Substrat in Flüssigkultur angeboten, jedoch nicht frei verfügbar sondern eingebettet in Agarose. Das Wachstum der Zellen in der Suspension wurde über die

Bestimmung der TCC oder CFU ermittelt. Die Menge der Zellen im Biofilm auf der Kugel wurden nach enzymatischem Auflösen der Kugel über CFU bestimmt.

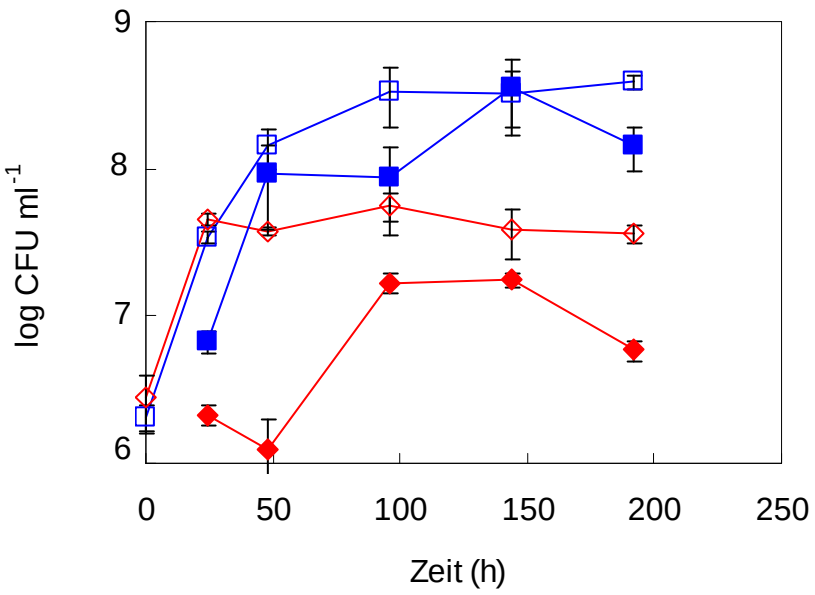


Abbildung 5-15 CFU der Stämme AH-1N (■/□) und 4D9 (◆/◇) in Reinkulturen in der Suspension (offene Symbole) sowie im Biofilm (gefüllte Symbole) mit eingebettetem Chitin als Kohlen- und Stickstoffquelle. (± Standardabweichung; n = 9).

Obwohl Stamm 4D9 mit freiem Chitin in Flüssigkultur wachsen und das Substrat vollständig abbauen konnte, so war mit eingebettetem Chitin in Flüssigkultur nach 24 h kein Wachstum zu erkennen. Der leichte Anstieg der TCC (Abbildung 5-16) und der CFU (Abbildung 5-15) nach 24 h war auch in Kontrollmikrokosmen ohne Chitin zu beobachten und wurde vermutlich durch Substrate verursacht, welche beim Autoklavieren aus der Agarose freigesetzt wurden. Stamm AH-1N hingegen zeigte eine starke Zunahme der TCC und CFU bis zu 10^9 Zellen ml^{-1} in der suspendierten Fraktion. Der Abbau von Chitin war durch das Verschwinden der Chitinpartikel aus der Agarosekugel deutlich zu erkennen. Auch die Biofilmfraktion der Reinkultur von Stamm AH-1N zeigte innerhalb von 72 einen starken Anstieg der CFU von 10^6 CFU ml^{-1} auf fast 10^9 CFU ml^{-1}. Die Zellen im Biofilm von Stamm 4D9 dagegen nahmen zwar ebenfalls leicht zu, jedoch wurden lediglich Werte erreicht, welche um das Tausendfache unter denen des Stammes AH-1N lagen.

Da demnach die Kultivierung in Flüssigmedium für Stamm 4D9 keine Rolle spielte sondern offensichtlich die Verfügbarkeit des Chitins ausschlaggebend war, stellte sich die Frage, ob dies mit der fehlenden Bildung eines Biofilms auf der Agarosekugel zusammenhing. Aufgrund des bereits beobachteten Phänomens, dass Stamm 4D9 Assoziationen mit Stamm AH-1N gezeigt hatte und auf Agarplatten in Kolonien desselben vorzufinden war, wurde ein Wachstumsversuch mit in Agarose eingebettetem Chitin und einer Cokultur beider Stämme durchgeführt.

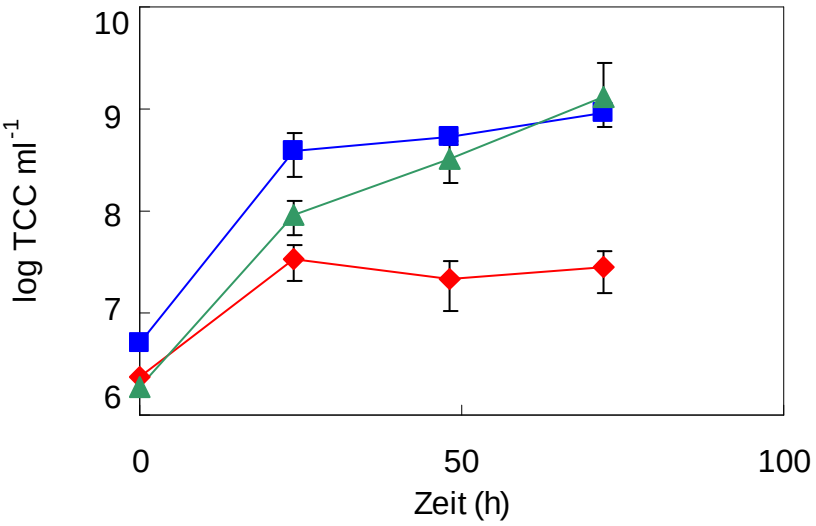


Abbildung 5-16 TCC der Stämme AH-1N (■) und 4D9 (◆) in Reinkulturen sowie der Mischkultur (▲) in der Suspension beim Wachstum mit eingebettetem Chitin. (± Standardabweichung; n = 3).

Die Zellen der Cokultur nahmen in der Suspension ähnlich der AH-1N-Reinkultur zu und erreichten einen Wert von etwa 10^9 TCC ml^{-1} nach 72 h (Abbildung 5-16). Zur Bestimmung der jeweiligen Anteile der beiden Stämme an der Gesamtzellzahl wurden die CFU bestimmt und die Stämme anhand ihrer sehr unterschiedlichen Koloniemorphologien unterschieden (siehe nächstes Kapitel).

5.2.2 Interaktionen der Stämme AH-1N und 4D9 beim Abbau von Chitin

Wie oben beschrieben wurde ein Wachstumsversuch mit in Agarose eingebettetes Chitin als Substrat mit Cokulturen der Stämme AH-1N und 4D9 durchgeführt, um einen möglichen Einfluss des Stammes AH-1N auf Stamm 4D9 zu untersuchen. Anhand ihrer sehr verschiedenen Koloniemorphologien wurden beide Stämme unterschieden, sodass ihr jeweiliger Anteil an der Gesamtlebendzellzahl in der suspendierten und der Biofilmfraktion ermittelt werden konnte.

Zeigte Stamm 4D9 in Reinkultur kein Wachstum mit in Agarose eingebettetem Chitin und keine Biofilmbildung, so war in Cokultur mit Stamm AH-1N ein völlig anderes Verhalten zu beobachten. In der suspendierten Fraktion wuchs Stamm 4D9 gleichauf mit Stamm AH-1N und dominierte in der Suspension gegen Ende des Wachstums (Abbildung 5-17). Stamm AH-1N hingegen wuchs zwar anfangs um etwa das zehnfache, zeigte jedoch nach 24 h keine weitere Zunahme.

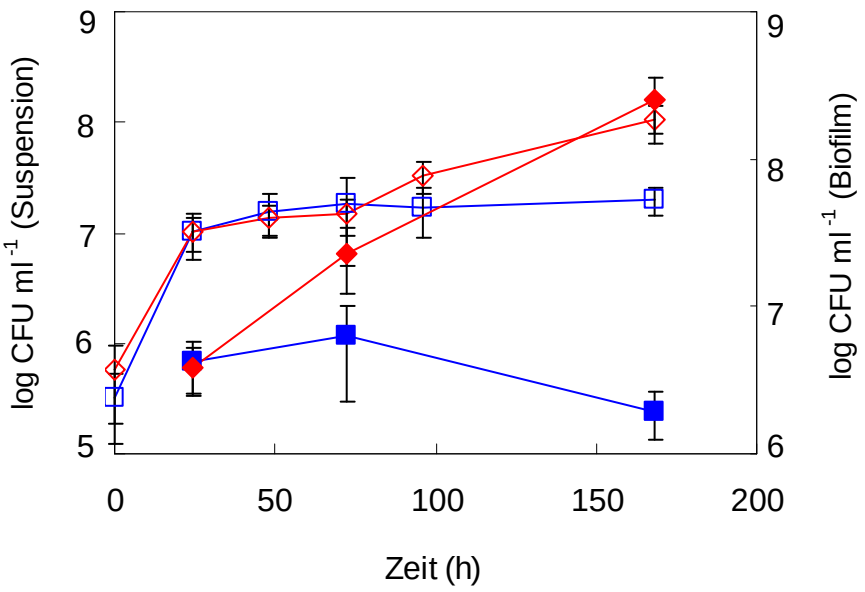


Abbildung 5-17 CFU der Stämme AH-1N (■/□) und 4D9 (◆/◇) in Co-Kultur in der Suspension (offene Symbole) sowie im Biofilm (gefüllte Symbole) mit eingebettetem Chitin als Kohlen- und Stickstoffquelle. (± Standardabweichung; n = 9).

Besonders gravierend waren die Unterschiede in der Biofilmfraktion im Vergleich zu den Reinkulturen. Hier zeigte Stamm 4D9 eine starke Zunahme der CFU im Laufe der Zeit um das tausendfache. Da die Agarosekugeln vor ihrer enzymatischern Auflösung gewaschen wurden, um lose angeheftete Zellen zu entfernen, ist anzunehmen, dass es sich bei den gewonnenen CFU des Stammes 4D9 um tatsächlich im Biofilm vorkommende Zellen handelte. Demnach war Stamm 4D9 in einer Cokultur mit Stamm AH-1N entgegen des Verhaltens in Reinkultur in der Lage, einen Biofilm zu bilden. Stamm AH-1N hingegen wuchs im Vergleich zur Reinkultur deutlich schlechter im Biofilm der Cokultur. In einigen Wachstumsversuchen nahmen die CFU des Stammes AH-1N im Biofilm sogar ab und erreichten gegen Ende des Wachstums einen 10000-fach geringeren Wert als Stamm 4D9. Die Anwesenheit von Stamm 4D9 im Biofilm war nicht nur durch die Bestimmung der CFU, sondern auch mit bloßem Auge zu erkennen Das von Stamm 4D9 gebildete Pigment Flexirubin verursachte eine gelbliche Färbung der Agarosekugel (Abbildung

5-18 a). Zum Nachweis des Pigmentes wurde die Kugel mit einer 20 %igen wässrigen KOH-Lösung behandelt. Durch Alkalisierung erfolgt eine Änderung der Farbe von gelb zu rötlich-braun (Reichenbach et al. 1980) (Abbildung 5-18 b).

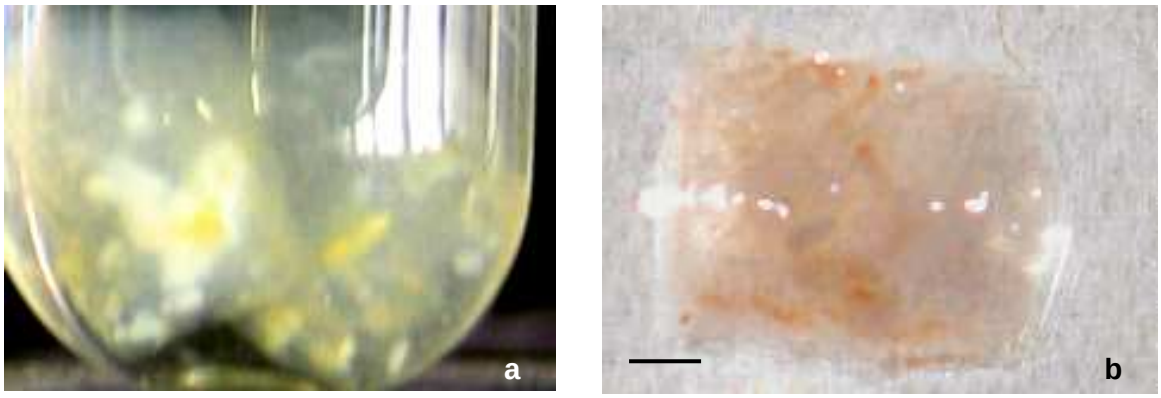


Abbildung 5-18 Gelbe Kolonien des Stammes 4D9 im Biofilm auf der Chitin-Agarosekugel (a) und Nachweis des Pigmentes Flexirubin durch KOH-Behandlung (b). Balken = 1 mm.

Eine endgültige Bestätigung der Anwesenheit von Zellen des Stammes 4D9 im Biofilm einer Mischkultur mit Stamm AH-1N erfolgte durch spezifische Färbung der Zellen mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung. Nach Waschen einer Chitin-Agarosekugel wurde mit einer Rasierklinge eine Probe der Kugeloberfläche entnommen und einer Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde für *Cytophaga-Flavobacterium* zum Nachweis von Stamm 4D9 sowie einer Sonde für Gammaproteobakterien zum Nachweis von Stamm AH-1N unterzogen (Abbildung 5-19).

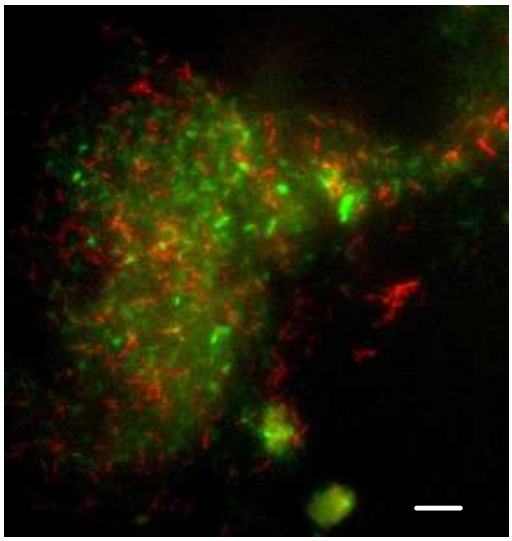


Abbildung 5-19 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Biofilms einer Mischkultur der Stämme AH-1N und 4D9 auf in Agarose eingebettetem Chitin und Identifizierung der Stämme durch spezifische Färbung mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung unter Verwendung der Sonden CF319a-Cy3 für Stamm 4D9 (rot) und GAM42a-FITC für Stamm AH-1n (grün). Balken = 4 µm.

5.2.3 Nachweis von chitinolytischen Enzymen und Chitin-Abbauprodukten

Um Polymere wie Chitin abzubauen, sind extrazelluläre Enzyme vonnöten, welche das Polymer zunächst in lösliche Oligomere zerlegen, welche anschließend zum weiteren Abbau durch spezifische Transporter in die Zelle gebracht werden. Wie in der Einleitung beschrieben, sind für den Abbau von Chitin zwei Gruppen von Enzymen bekannt, welche als Chitinase einerseits das Polymer und andererseits als Chitobiase die Oligomere, vor allem Chitobiose, abbauen. Letztere Enzyme können sowohl extrazellulär als auch intrazellulär, meist im Periplasma vorkommen.

Enzymaktivitäten mit künstlichen Substraten: Um die chitinolytische Aktivität der Stämme AH-1N sowie 4D9 näher zu untersuchen, wurde ein Enzymtest mit zwei spezifischen Substraten für den Nachweis der Chitinase einerseits und der Chitobiase andererseits durchgeführt. Die enzymatische Aktivität wird anhand der Freisetzung einer fluoreszierenden Gruppe (4-MU), welche mit dem Substrat derivatisiert vorliegt, bestimmt.

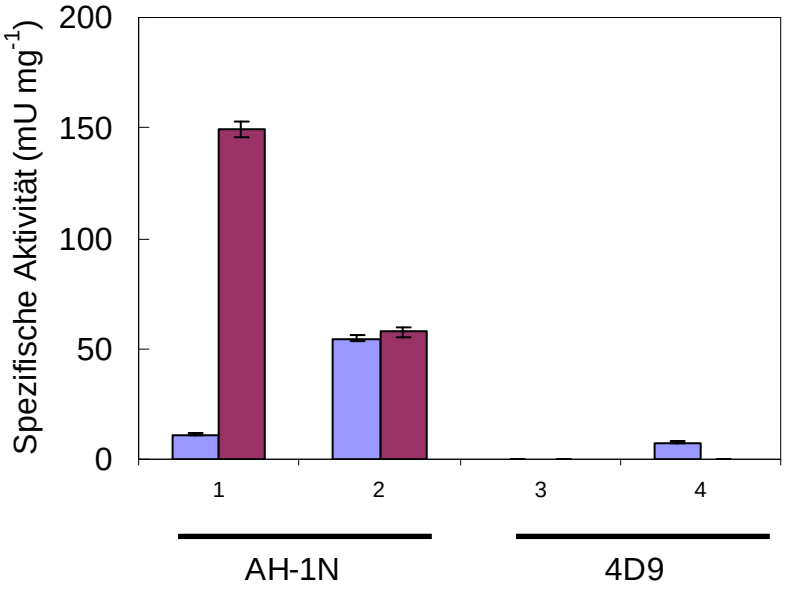


Abbildung 5-20 Spezifische Aktivität der Chitobiase (■) und Chitinase (■) der Stämme AH-1N und 4D9 in zellfreien Überständen (1 + 3) gewachsener Kulturen sowie in Überständen Triton X-100 behandelter Chitin-Zellpellets (2 + 3). (± Standardabweichung; n = 3).

Im Kulturüberstand des Stammes AH-1N war sowohl für Chitinase als auch für Chitobiase Aktivität zu messen, wenn auch die spezifische Aktivität der Chitinase in der Regel deutlich höher war als die der Chitobiase (Abbildung 5-20, Nr. 1). Die Höhe der spezifischen Aktivitäten war abhängig vom Wachstumsfortschritt der Zellen, wobei die Aktivität der Chitobiase sich gegen Ende des Wachstums erhöhte und die der Chitinase etwas abnahm (nicht gezeigt). Da diese Messungen mit zellfreiem Überstand des

Stammes AH-1N durchgeführt wurden, müssen demzufolge beide Enzyme extrazellulär vorliegen und sind nicht zellassoziiert. Diese Beobachtung schließt jedoch nicht aus, dass zumindest die Chitobiase zusätzlich intrazellulär bzw. periplasmatisch vorkommt. Zusätzlich konnten Aktivitäten der Enzyme sowohl in Überständen Chitin- oder GlcNAc-gewachsener Kulturen als auch in Überständen von mit Trypton gewachsenen Zellen gemessen werden. Die chitinolytischen Enzyme des Stammes AH-1N werden demnach auch beim Wachstum mit anderen Substraten exprimiert.

Im Gegensatz zum *Aeromonas*-Stamm konnte im Kulturüberstand des Stammes 4D9 keinerlei Aktivität mit den verwendeten Substraten gemessen werden (Abbildung 5-20, Nr. 3). Da jedoch ein offensichtlicher Chitinabbau stattfand, könnten die dafür notwendigen extrazellulären Enzyme mit dem Substrat einerseits oder mit den Zellen andererseits assoziiert sein und somit nicht frei vorliegen. Um dies zu überprüfen, wurde eine mit freiem Chitin gewachsene Kultur des Stammes 4D9 nach unvollständigem Abbau des Chitins zentrifugiert und das einmalig gewaschene Chitin-Zell-Pellet mit 0,1 % (v/v) Triton-X-100 behandelt, um Partikel-assoziierte Enzyme zu solubilisieren (Rath und Herndl 1994). Im Überstand des behandelten Pellets konnte anschließend enzymatische Aktivität gemessen werden (Abbildung 5-20, Nr. 4), jedoch ausschließlich das Dimer spaltende Enzym Chitobiase, nicht jedoch das Polymer abbauende Enzym Chitinase. Da Triton X-100 auch Zellmembranen solubilisiert, ist unklar, ob das gemessene Enzym tatsächlich Chitin-assoziert, oder intrazellulär vorlag und durch die Behandlung freigesetzt wurde. Um zu überprüfen, ob die Aktivität der mit den künstlichen Substraten gemessenen Chitobiase des Stammes 4D9 nach Triton X-100-Behandlung von periplasmatisch oder intrazellulär vorliegenden Enzymen herrührte, wurde für den Enzymtest mit künstlichen Substraten statt des Überstandes Rohextrakt Chitin- bzw. GlcNAc-gewachsener Zellen des Stammes 4D9 eingesetzt. Hier konnte eine geringe Chitobiaseaktivität von etwa 0,2 mU mg^{-1} bestimmt werden. Mit dem Substrat zur Messung der Chitinase konnte keine Aktivität gemessen werden.

Auch ein Chitin-Zell-Pellet des Stammes AH-1N wurde entsprechend des Stammes 4D9 mit Triton X-100 behandelt. Hier erhöhte sich die Aktivität der Chitobiase (Abbildung 5-20, Nr. 2), was darauf schließen lässt, dass dieses Enzym bei Stamm AH-1N vermutlich intrazellulär vorlag.

Nachweis von Abbauprodukten: Wie in Kapitel 5.2.1.2 beschrieben, setzte Stamm AH-1N beim Wachstum mit freiem Chitin Acetat und Ammonium in den Kulturüberstand frei. Andere Chitin-Abbauprodukte wie Oligomere oder das Monomer GlcNAc konnten nicht nachgewiesen werden. Da Stamm AH-1N extrazelluläre chitinolytisch aktive Enzyme freisetzt, wurden Kulturüberstände des mit Chitin gewachsenen Stammes sterilfiltriert und für eine Inkubation mit Chitin oder Oligomeren verwendet. Da die Enzyme auch nach der Filtration nachweislich aktiv waren, sollten aus den angebotenen Substraten Produkte freigesetzt werden, welche durch die Abwesenheit der Zellen nicht weiter verwertet würden und somit messbar wären. Die Substrate (1 mM $GlcNAc_2$ oder 0,5 mM $GlcNAc_3$) wurden mit zellfreiem Überstand oder Rohextrakt aus mit Chitin gewachsenen Kulturen der Stämme AH-1N und 4D9 inkubiert.

.

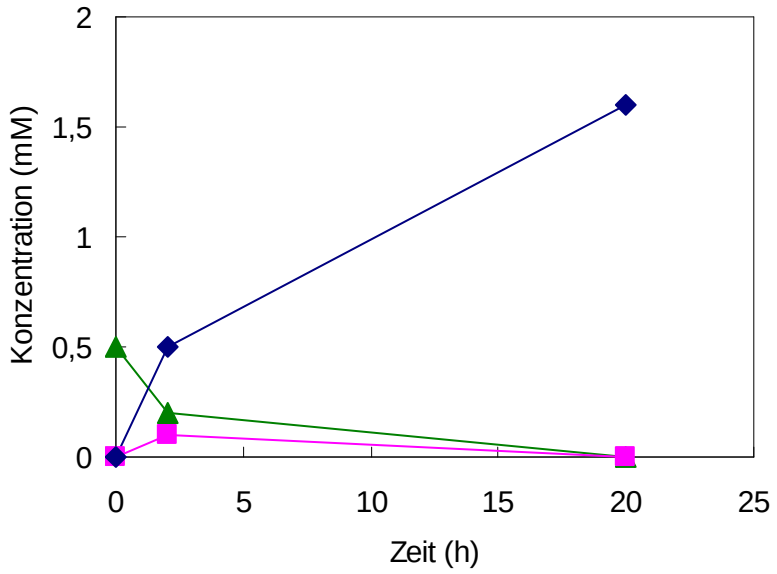


Abbildung 5-21 Freisetzung von GlcNAc (◆) und $GlcNAc_2$ (■) aus $GlcNAc_3$ (▲) nach Inkubation mit zellfreiem Überstand einer mit Chitin gewachsenen Kultur von Stamm AH-1N.

Die Umsetzung des Trimers durch Enzyme des zellfreien Überstandes des Stammes AH-1N erfolgte über die Bildung des Dimers sowie des Monomers. Nach 2 h Inkubation waren 0,3 mM des eingesetzten Substrates zu 0,1 mM Dimer sowie 0,5 mM GlcNAc umgesetzt (Abbildung 5-21). Schlussendlich wurden alle Oligomere zur äquimolaren Menge GlcNAc von 1,5 mM umgesetzt. Die spezifische Aktivität der Trimerabbaus betrug hier 76 mU mg^{-1}. Wurde das Dimer als Substrat eingesetzt, so war nach 2 h etwa die Hälfte zu 1 mM GlcNAc umgesetzt, was einer spezifischen Aktivität von rund 125 mU mg^{-1} entsprach. Die Aktivitäten der Enzyme befanden sich somit im gleichen Bereich wie diejenigen, wie sie mit den künstlichen Substraten ermittelt wurden. Die höchsten

Aktivitäten chitinolytischer Enzyme des Stammes AH-1N konnten jedoch mit dem Einsatz von Rohextrakt Chitin-gewachsener Kulturen errechnet werden. Hier waren die Substrate schon nach wenigen Minuten vollständig umgesetzt. Die ermittelten spezifischen Aktivitäten lagen bei 1,85 U mg^{-1} für $GlcNAc_2$ und 0,6 U mg^{-1} für $GlcNAc_3$.

In Überständen Chitin-gewachsener Kulturen des Stammes 4D9 hingegen konnte keine Umsetzung der Substrate beobachtet werden. Wie schon durch die Enzymtests mit künstlichen Substraten angezeigt, setzte dieser Stamm keine nachweisbaren freien Chitinasen ins extrazelluläre Milieu frei. Somit waren auch im zellfreien Überstand keine Produkte zu erwarten. Da wie oben beschrieben eine geringe Aktivität der Chitobiase mit künstlichen Substraten durch Einsatz von Rohextrakt bestimmt werden konnte, wurden auch für diesen Stamm mögliche Produkte beim Abbau des Trimers und des Dimers durch Einsatz von Rohextrakt bestimmt. Durch diesen Test konnte der vollständige Abbau des Dimers zum Monomer GlcNAc nachgewiesen werden, die Aktivität betrug hier rund 80 mU mg^{-1}. Eine Umsetzung des Trimers jedoch war unter den gewählten Bedingungen nicht zu beobachten.

Ein weiterer Untersuchungspunkt war die Freisetzung von Acetat durch Stamm AH-1N. Um auszuschließen, dass die Deacetylierung extrazellulär vonstatten ging, wurden oben beschriebene Ansätze ebenfalls auf Acetatbildung durch HPLC-Analyse überprüft. Mit keinem der Substrate (Chitin, Monomer, Dimer, Trimer) konnte auch nach 20-stündiger Inkubation mit sterilfiltrierten Überständen eine Zunahme des im Überstand vorhandenen Acetats nachgewiesen werden. Durch den Einsatz von Rohextrakt hingegen konnte sowohl bei Stamm AH-1N als auch bei Stamm 4D9 eine geringe Acetatbildung nach 20 Stunden mit GlcNAc als Substrat beobachtet werden. Dies korrelierte mit einer Abnahme von GlcNAc. Das durch die Deacetylierung entstehende Produkt Glucosamin ist durch seine positive Ladung in unserem Analysesystem nicht nachweisbar. Da die Deacetylierung intrazellulär womöglich vom phosphorylierten Substrat (GlcNAc-6-P) erfolgt, wurden den Ansätzen zusätzlich ATP zugegeben. Dadurch beschleunigte sich jedoch die Acetat-Freisetzung nicht.

Die oben beschriebenen Tests wurden allesamt in kleinem Maßstab bei 30 °C durchgeführt. Wachstumsexperimente mit freiem oder eingebettetem Chitin erfolgten jedoch für mehrere Tage bei 16 °C bis 20 °C. Um die Freisetzung von Abbauprodukten durch Stamm AH-1N unter üblichen Kultivierungsbedingungen zu simulieren, wurde freies bzw. in Agarosekugeln eingebettetes Chitin mit chitinolytisch aktivem Überstand dieses Stammes bei 25 °C inkubiert und die Bildung von Produkten mittels HPLC bestimmt. Durch Co-Chromatographie des Überstandes mit definierten Standards konnten diese Produkte zweifelsfrei identifiziert werden. Im Laufe der Inkubationszeit von 96 h konnten sowohl mit freiem als auch mit eingebettetem Chitin die Chitin-Abbauprodukte GlcNAc,

$GlcNAc_2$ und $GlcNAc_3$ nachgewiesen werden, welche über die Zeit zunahmen (Abbildung 5-22). Demnach liegen diese Produkte auch beim Wachstum des Stammes AH-1N frei vor, sind jedoch nicht nachweisbar, da sie vermutlich unmittelbar in die Zelle aufgenommen werden. Die Verfügbarkeit des Chitins in freier oder eingebetteter Form scheint für die Zugänglichkeit durch die Enzyme keine Rolle zu spielen.

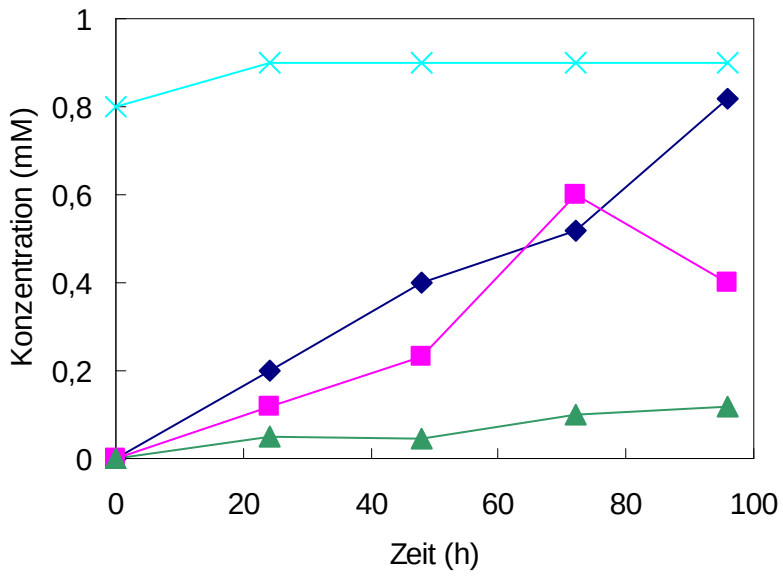


Abbildung 5-22 Freisetzung von GlcNAc (◆), $GlcNAc_2$ (■) und $GlcNAc_3$ (▲) aus eingebettetem Chitin nach Inkubation mit chitinolytisch aktivem zellfreiem Kulturüberstand des Stammes AH-1N. Das im Überstand vorhandene Acetat (×) blieb unverändert.

Das im Überstand vorhandene Acetat, welches von Stamm AH-1N beim Abbau von Chitin freigesetzt wurde, nahm nicht weiter zu. Dies bestätigte erneut, daß die Freisetzung des Acetats nicht durch extrazelluläre Enzyme vonstatten ging, sondern nur beim Wachstum einer Kultur des Stammes AH-1N mit Chitin.

5.2.4 Wachstum des Stammes 4D9 mit zellfreiem Überstand des Stammes AH-1N

Da wie im vorherigen Kapitel beschrieben allein der chitinolytisch aktive Überstand des Stammes AH-1N genügte, um Produkte aus freiem sowie eingebettetem Chitin freizusetzen, stellte sich die Frage, ob Stamm 4D9 mit diesem aktiven Überstand in der Lage war, eingebettetes Chitin zu nutzen, oder ob die Anwesenheit des Stammes AH-1N vonnöten war. Besonders die Beobachtung, dass Stamm 4D9 in den von Stamm AH-1N gebildeten Biofilm auf der Agarosekugel integrierte, ist in diesem Zusammenhang besonders interessant. Hier stellte sich die Frage, ob Stamm 4D9 auch ohne Stamm AH-1N allein durch die Anwesenheit chitinolytischer Enzyme einen Biofilm bildet. Daher

wurden Wachstumsexperimente mit Stamm 4D9 mit in Agarose eingebettetem Chitin durchgeführt, bei denen die Ansätze zusätzlich mit sterilfiltriertem Überstand des Stammes AH-1N versetzt wurden. Als Kontrollen dienten Kulturen ohne Überstand sowie Kulturen mit Überstand, welcher mittels Filtration durch einen 10000 Da *cut off* Filter keine chitinolytisch aktiven Enzyme mehr enthielt.

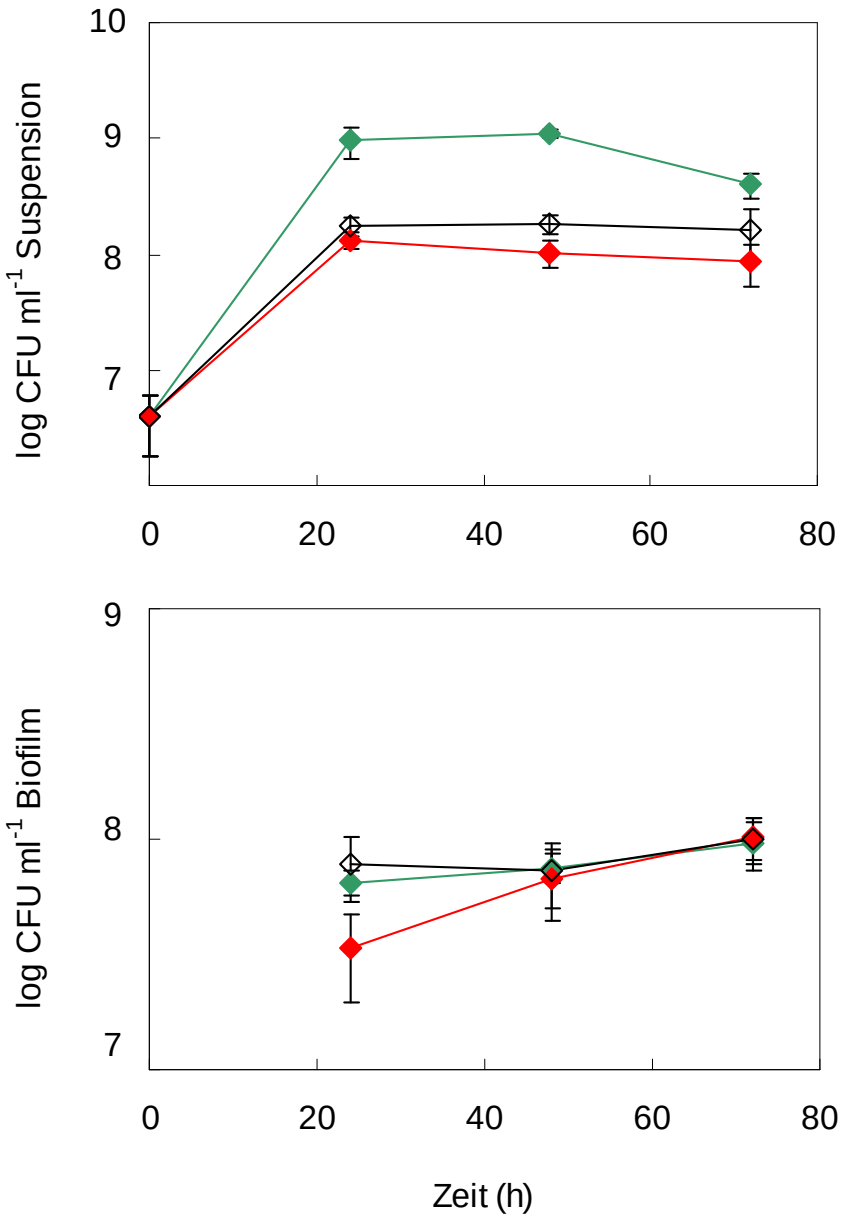


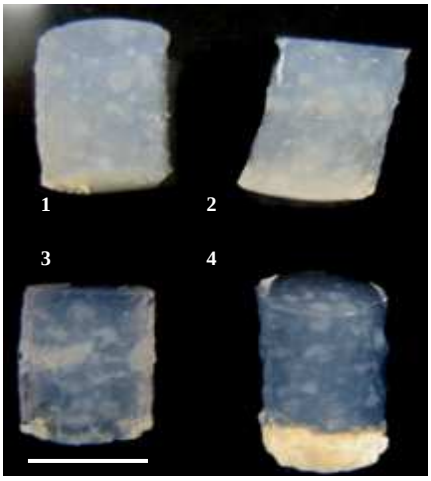
Abbildung 5-23 CFU in der Suspension (oben) und im Biofilm (unten) des Stammes 4D9 bei der Kultivierung mit eingebettetem Chitin in Gegenwart von chitinolytisch aktivem Überstand von Stamm AH-1N (◆), von filtriertem Überstand (◇) sowie ohne Überstand (◆). (± Standardabweichung; n = 9).

Das Wachstum des Stammes 4D9 in der Suspension in Kulturen ohne Überstand sowie mit filtriertem Überstand war vergleichbar (Abbildung 5-23 oben). Hier nahmen die CFU zwar innerhalb der ersten 24 h um das zehnfache auf rund 10^8 CFU ml^{-1} zu, jedoch erhöhte sich dieser Wert anschließend nicht mehr. Der Anstieg der CFU könnte durch Freisetzung von Substraten aus dem Chitin bzw. der Agarose durch den Autoklaviervorgang bei der Herstellung der Kugeln begründet sein. Da wie erwähnt kein Unterschied zwischen den CFU mit filtriertem Überstand oder ohne Überstand zu erkennen war, wuchs Stamm 4D9 demnach auch nicht mit im Überstand vorhandenen Abbauprodukten wie beispielsweise Acetat. Die im Überstand vorhandene Menge an Acetat nahm während des Versuchs nicht ab. Wurde Stamm 4D9 hingegen neben den Chitin-Agarosekugeln zusätzlich mit aktivem Überstand kultiviert, so nahmen die CFU in der Suspension um das hundertfache auf rund 10^9 CFU ml^{-1} zu. Diese Zunahme war nicht auf im aktiven Überstand vorhandene Produkte zurückzuführen, da Stamm 4D9 mit reinem Überstand ohne Chitin-Agarosekugeln kein Wachstum zeigte (nicht gezeigt). Demnach nutzte Stamm 4D9 die durch die aktiven Enzyme des Stammes AH-1N freigesetzten Produkte wie GlcNAc, $GlcNAc_2$ und $GlcNAc_3$, nicht aber das ohnehin im Überstand vorhandene Acetat. In einem unabhängigen Versuch wurde bestätigt, dass Stamm 4D9 nicht in der Lage war, mit Acetat zu wachsen. Im Verlaufe des Wachstumsversuches wurden Proben für die HPLC entnommen, hier konnten keine durch die Enzyme gebildeten Produkte nachgewiesen werden, was auf einen sofortigen Verbrauch durch Stamm 4D9 hinwies.

Die CFU der Biofilm-Fraktion zeigten im Gegensatz zur Suspension keinen Unterschied zwischen der Kultivierung mit oder ohne aktiven Überstand (Abbildung 5-23 unten). Nahmen die Zellen des Stammes 4D9 in Cokultur mit Stamm AH-1N im Biofilm drastisch zu, so bewirkte die Anwesenheit der Enzyme keinerlei verstärkte Biofilmbildung. Demnach war allein die Anwesenheit des Stammes AH-1N für die Biofilmbildung des Stammes 4D9 verantwortlich, nicht aber die extrazellulären Enzyme und die durch deren Aktivität resultierenden Chitin-Abbauprodukte.

Auch die Abnahme des unlöslichen Chitins durch die Aktivität der Enzyme konnte beobachtet werden. Kugeln, welche in einer Kultur des Stammes 4D9 mit aktivem Überstand des Stammes AH-1N vorlagen, waren gegen Ende des Versuchs frei von Chitinpartikeln. Kugeln, welche mit reinem Überstand aber ohne Stamm 4D9 inkubiert wurden, zeigten eine leichte Abnahme der Chitinpartikel. Da hier zwar Abbauprodukte entstanden, jedoch keine weitere Verwertung durch Stamm 4D9 stattfand, könnte der Chitinabbau durch einen fehlenden Abzug der Produkte nach einiger Zeit zum Erliegen kommen. Kugeln, welche nur mit einer Kultur von Stamm 4D9 inkubiert wurden, zeigten keinerlei Reduzierung der Chitin-Partikel. Bestätigt wurden diese Beobachtungen durch

Färbung des sich in der Kugel befindenden Chitins mit einer Congo Red-Lösung (0,1 % (w/v)) und Auswaschen des nichtgebundenen Farbstoffes mit einer 1M NaCl-Lösung. Je mehr Chitin sich noch in den Kugeln befand, desto weniger Farbstoff enthielt die Waschlösung (Abbildung 5-24).



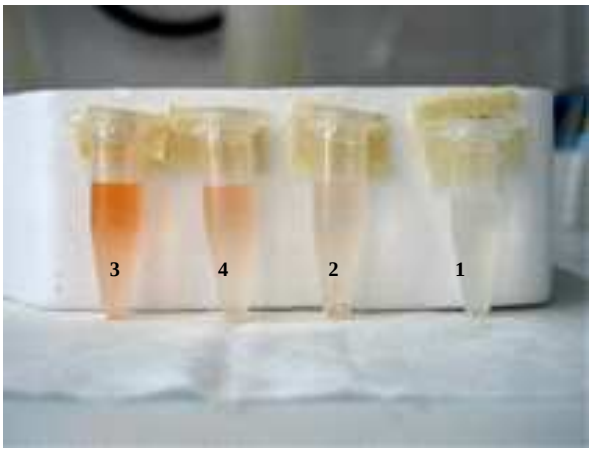


Abbildung 5-24 Vergleich der chitinenthaltenden Agarosekugeln nach Wachstum des Stammes 4D9 ohne Überstand des Stammes AH-1N (1), mit filtriertem Überstand des Stammes AH-1N (2), mit chitinolytisch aktivem Überstand des Stammes AH-1N (3) sowie einer Kugel, welche ausschließlich mit aktivem Überstand inkubiert wurde (4). Fotografie der Kugeln (a) und Farbintensitität der Waschlösung nach Färbung des Chitins mit Congo Red (b). Balken = 0,5 cm.

5.2.5 Interaktionen der Stämme AH-1N und PAO1 beim Wachstum mit Chitin

In der Literatur wird die Produktion von Chitinasen sowie Chitin-Bindeproteinen durch das opportunistisch pathogene Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben (Folders et al. 2001, Nouwens et al. 2002). Überraschenderweise wächst der *P. aeruginosa*-Stamm PAO1 jedoch nicht mit Chitin als alleiniger Kohlen- bzw. Stickstoffquelle. Abbau von Chitin wurde lediglich durch sichtbare Hydrolysehöfe beim Wachstum auf Chitin-enthaltendem LB-Festmedium beobachtet (Folders et al. 2000). Unter den von uns gewählten Wachstumsbedingungen war jedoch weder ein Abbau noch ein Wachstum mit Chitin zu beobachten, unnabhängig ob das Chitin frei suspendiert in Flüssigkultur oder in Agar-Festmedium angeboten wurde. Auch die Oligomere $GlcNAc_2$ und $GlcNAc_3$ konnten nicht als Substrat genutzt werden. Die oben beschriebene Beobachtung, dass Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* in LB-Festmedium eingebettetes Chitin abbauten, konnte von uns nicht bestätigt werden.

Kulturüberstände von mit LB-Medium gewachsenen Kulturen des Stammes PAO1 wurden einem Enzymtest mit den mit 4MU-derivatisierten Substraten unterzogen. Es konnte keine

Aktivität gemessen werden, wonach Stamm PAO1 beim Wachstum mit LB im Gegensatz zu Stamm AH-1N keine chitinolytisch aktiven Enzyme freisetzte. Auch nach Wachstum mit GlcNAc (siehe unten) wurde keine Aktivität gemessen.

Im Gegensatz zu kolloidalem Chitin sowie den Chitin-Oligomeren konnte das Monomer GlcNAc von Stamm PAO1 sowohl als Kohlenstoff- als auch als Stickstoffquelle verwendet werden. Eine naheliegende Vermutung war daher, dass Stamm PAO1 zwar nicht alleine, wohl aber in Cokultur mit chitinabbauenden Bakterien wachsen und die durch das cokultivierte Bakterium freigesetzten Abbauprodukte wie GlcNAc oder Acetat nutzen könnte, oder möglicherweise sogar selbst zum Chitinabbau befähigt wäre.

Daher wurde ein Wachstumsexperiment mit freiem Chitin in Flüssigkultur durchgeführt und die Stämme AH-1N und PAO1 in gleichem Verhältnis als Inokulum eingesetzt. Um Stamm PAO1 eindeutig identifizieren zu können, wurde ein mit *yfp* markierter Stamm für die Versuche verwendet, welcher physiologisch keinen Unterschied zum Wildtyp aufwies (Klebensberger at al. 2007). Als Kontrollen dienten Reinkulturen beider Stämme. Zellzahländerungen wurden über die Bestimmung der CFU in der suspendierten Fraktion erfasst. Die Unterscheidung beider Stämme in Cokultur war durch die unterschiedliche Koloniemorphologie möglich. Als zusätzliche Kontrolle wurden Stichproben der CFU entnommen und Stamm PAO1 *yfp* nach Wachstum in flüssigem LB-Medium durch Fluoreszenz des exprimierten Fluoreszenzproteins eindeutig identifiziert. Partikelassoziierte Zellen konnten zwar nicht quantifiziert werden, eine qualitative Unterscheidung beider Stämme war jedoch durch Nutzung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit spezifischen Sonden möglich.

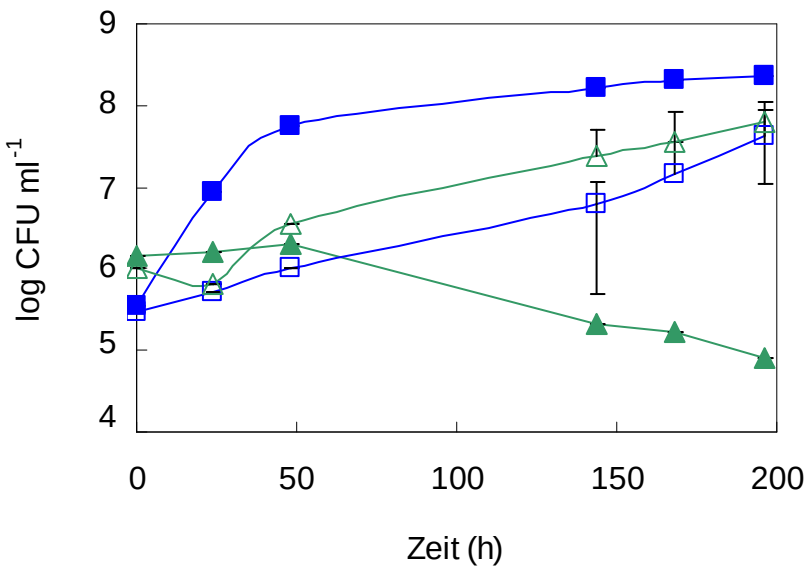


Abbildung 5-25 Wachstum der Stämme AH-1N in Rein- (■) und Cokultur (□) sowie PAO1 in Rein- (▲) und Cokultur (△) mit freiem kolloidalem Chitin. (± Standardabweichung; n = 9).

In Reinkultur des Stammes PAO1 war mit freiem Chitin als alleiniger Kohlen- und Stickstoffquelle kein Wachstum festzustellen (Abbildung 5-25). Im Laufe der Inkubationszeit nahmen die frei suspendierten Zellen sogar um das zehnfache von anfangs 10^6 CFU ml^{-1} auf 10^5 CFU ml^{-1} ab. Mikroskopisch war festzustellen, dass Stamm PAO1 auch partikel-assoziiert vorlag, wodurch eventuell die Abnahme der frei suspendierten Zellen zu erklären wäre. Eine Abnahme des Chitins war nicht festzustellen. Wurde Stamm PAO1 jedoch mit Stamm AH-1N kultiviert, so erfolgten eine Abnahme des Chitins sowie eine Zunahme der Zellzahlen beider Stämme im Laufe der Zeit. Stamm AH-1N wuchs hierbei bedeutend geringer als in Reinkultur, die ermittelten CFU ml^{-1} dieses Stammes in der Mischkultur lagen zeitweise um das hundertfache unter denen der Reinkultur. Das Wachstum des Stammes PAO1 war vergleichbar mit dem des Stammes AH-1N, wobei Stamm PAO1 in einigen Versuchen sogar die Mischkultur dominierte (nicht gezeigt). Wie bereits beschrieben, setzte Stamm AH-1N im Laufe des Chitinabbaus Acetat ins Kulturmedium frei. Diese teilweise erheblichen Mengen von bis zu 5 mM könnten als Wachstumssubstrat für Stamm PAO1 zur Verfügung stehen. Um dies zu überprüfen, wurde Stamm PAO1 in sterilfiltriertem Überstand von mit Chitin gewachsenen Zellen von Stamm AH-1N inkubiert. Das Wachstum mit im Überstand vorhandenen Substraten wurde durch Bestimmung der optischen Dichte bestätigt. Der erreichte Wert war jedoch höher, als mit den im Überstand zur Verfügung stehenden Mengen an Acetat möglich wäre. Dies wurde durch einen Vergleich der optischen Dichte bei Wachstum in Minimalmedium mit gleicher Menge Acetat bestätigt. Somit müssen im Überstand noch weitere für PAO1 nutzbare Substrate vorhanden gewesen sein, welche jedoch mit den von uns verwendeten Analysemethoden nicht detektiert werden konnten. Die Analyse der Chitin-Partikel in der Mischkultur mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung ergab, dass beide Stämme wie auch in den jeweiligen Reinkulturen partikelassoziiert vorlagen, wobei beide Stämme etwa im gleichen Verhältnis vorlagen.

5.3 Transposonmutagenese

Extrazelluläre chitinolytische Enzyme von *Aeromonas hydrophila* wurden bereits sowohl biochemisch als auch auf genetischer Ebene teilweise charakterisiert (Lan et al. 2006, Wu et al. 2001). Studien über die Physiologie des Chitinabbaus durch dieses Bakterium sind jedoch nicht vorhanden. Aus diesem Grunde wurde eine Transposonmutangenese des Stammes AH-1N durchgeführt, um mehr über den Chitinabbau dieses Bakteriums zu erfahren. Nach erfolgreicher Konjugation wurden die erhaltenen Mutanten auf Defekte im Chitinabbau untersucht, indem sie auf Chitin enthaltendes Minimal-Mestmedium mit Glucose und dem entsprechenden Antibiotikum übertragen wurden. Von etwa 500

getesteten Kolonien, welche eine Kanamycin-Resistenz aufwiesen und somit das Transposon enthielten, war bei einer kein Hydrolysehof um die gewachsene Kolonie zu erkennen. Auch bei einer Inkubation in Flüssigkultur mit freiem kolloidalem Chitin war kein Wachstum zu beobachten. Die Mutante wuchs zwar sowohl mit GlcNAc, als auch mit den Oliomeren $GlcNAc_2$ und $GlcNAc_3$, jedoch konnten keine chitinolytisch aktiven Enzyme im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Wurde die Mutante für mehrere Tage inkubiert, so ließen sich sowohl Chitinasen, als auch Chitobiasen im Überstand messen.

Fragmente genomischer DNA der Mutante konnten erfolgreich nach Ligation in einen geeigneten Vektor und Transformation in *E. coli* kloniert werden. Ein Kanamycin-Resistenz vermittelndes Insert wurde nach einer Plasmidpräparation von beiden Seiten der *multiple cloning site* (MCS) des Vektors sequenziert. In Vorwärts-Richtung konnte ein etwa 800 bp großes Stück sequenziert werden, welches zu etwa 2/3 aus Transposon-Sequenz bestand (3'-Ende). Am 5'-Ende konnte eine etwa 245 bp lange Sequenz erhalten werden, welche eine 97 % ige Übereinstimmung auf Nukleotidebene und eine 100 % ige Übereinstimmung auf Proteinebene zu einem Fragment des Gens für das *General Secretion Pathway Protein* L, GspL, aus dem Typstamm *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 (Seshadri et al. 2006) aufwies. In Rückwärtsrichtung konnte ein 616 bp langes Stück sequenziert werden, welches eine 100 % ige Identität auf Proteinebene zu *gspL* (326 bp, 5'-Ende) sowie zu einem nachfolgenden Gen, *gspM* (290 bp, 3'-Ende), ebenfalls aus dem Typstamm, zeigte. Weitere hohe Identitäten zeigten die erhaltenen Sequenzen zu *exeL* bzw. *exeM* aus einem weiteren Stamm von *A. hydrophila* (Jiang und Howard 1992) sowie zu *gspL* und *gspM* aus dem Typstamm *A. salmonicida* A449. Das 1,8 kb große Transposon konnte nach der Sequenzanalyse etwa 560 bp *upstream* des 3'-Endes von *gspL* lokalisiert werden. Das Ende von *gspL* war durch das Stoppcodon TGA gekennzeichnet und nach drei weiteren Basen folgte bereits das Startcodon (ATG) für *gspM*.

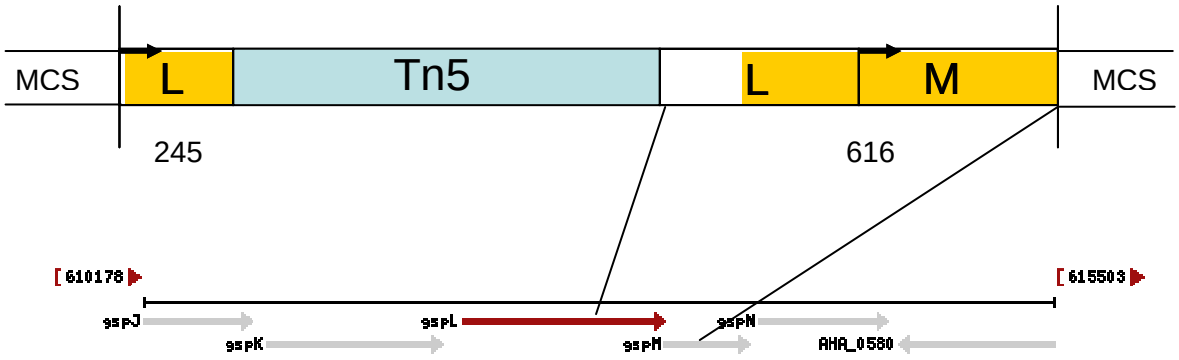


Abbildung 5-26 Genomischer Kontext des Transposon-Inserts im Vergleich zu den homologen Genen *gspL* bzw. *gspM* aus *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966. Die bereits sequenzierten Bereiche sind gelb markiert, die Zahlen geben die Längen der Sequenzen in Nukleotiden an.

6 Diskussion

6.1 Untersuchungen zur Rolle AHL-vermittelter Zell-Zell-Interaktionen in Mikrokosmen

6.1.1 Etablierung von Mikrokosmen

Ein Ziel dieser Arbeit war es zunächst, ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung von Zell-Zell-Interaktionen heterotropher Bakterien bei der Besiedlung und dem Abbau organischer Partikel unter natürlichen Bedingungen zu etablieren. Als Modell eines organischen Partikels dienten autoklavierte einzellige Grünalgen, welche in Agarose eingebettet waren. Diese Kugeln wurden der natürlichen Mikroflora der Litoralzone des Bodensees als Anheftungs- und Abbausubstrat angeboten. Durch die Anreicherung von Bakterien in den Mikrokosmen und Vergleich der Zellzahlen konnte bestätigt werden, dass die von uns etablierten Systeme hervorragend für die angestrebten Untersuchungen geeignet waren. Die höchsten Zellzahlen waren in solchen Mikrokosmen zu beobachten, welche die in Agarose eingebetteten Algen enthielten. Die Agarose selbst diente nicht als Substrat, da in Kontrollmikrokosmen mit algenfreien Kugeln einerseits und komplett algen- und kugelfreien Mikrokosmen andererseits gleiche Zellzahlen erreicht wurden. Demnach konnte Agarose als Matrix für partikulären Kohlenstoff verwendet werden und hatte während des Beobachtungszeitraumes keinen Einfluss auf das Wachstum der Bakterien. Die verwendeten Algen stellten sich als geeignete Nährstoffquelle heraus, da sie einen ähnlichen Kohlenstoffgehalt aufwiesen, wie es bereits für im Bodensee vorkommende organische Partikel berechnet wurde (Grossart und Simon 1998). Zusätzlich förderten die eingesetzten Algen das Wachstum der planktonischen Bakterien. Von anfangs 10^6 Zellen ml^{-1} erhöhten sich die Zellzahlen auf das zehnfache in Algenkugeln enthaltendem Seewasser. Dies entspricht genau den Werten, wie sie bereits für die Wassersäule des Bodensees beim Vergleich der Zelldichten im Winter sowie nach Einsetzen des Algenwachstums im Frühjahr beschrieben wurden (Güde et al. 1985). In dieser Studie wurde auch die Erhöhung der Kultivierungseffizienz zur Zeit der Algenblüte beschrieben, welches sich ebenfalls deutlich mit den aus den Mikrokosmen erhaltenen Resultaten deckt. Hier blieben die Kultivierungseffizienzen in Mikrokosmen ohne Algen unter 1 % während des gesamten Experimentes, in Mikrokosmen mit Algen jedoch wurden Werte von über 60 % erreicht. Die Erhöhung der Kultivierungseffizienz durch die Zugabe von Nährstoffen könnte in Zusammenhang mit der Hypothese stehen, dass einige pelagische Bakterien in der Lage sind, auf ein schnelles Wachstum umzustellen, sobald hohe

Nährstoffkonzentrationen zur Verfügung stehen und sich diese Bakterien durch ihr schnelles Wachstum stark anreichern (Azam et al. 1993). Die verwendeten Algen förderten nicht nur das Wachstum planktonischer, sondern vor allem das der partikel-assoziierten Bakterien, welche fast tausendfach konzentrierter auf solchen Kugeln, welche Algen enthielten, vorzufinden waren. Auch für marine Partikel wurde beschrieben, dass die bakteriellen Zellzahlen auf organischen Partikeln um drei Potenzen höher als im Vergleich zum Umgebungswasser lagen (Azam et al 1993).
Zusammenfassend konnten mit den von uns etablierten Mikrokosmen Bedingungen vergleichbar mit der natürlichen Situation erreicht werden. Demnach ist dieses System gut geeignet, um die ökologischen Interaktionen zwischen Mikroorganismen abweichend von typischen Laborbedingungen näher zu untersuchen.

6.1.2 Charakterisierung isolierter Bakterien

In den von uns durchgeführten Mikrokosmosexperimenten reicherten sich zwei Gruppen von Bakterien sowohl in der suspendierten, als auch in der Biofilm-Fraktion an. Zum einen waren dies Bakterien, welche zur AHL-produzierenden Gattung *Aeromonas* gehörten. Diese Gammaproteobakterien sind weit verbreitet in aquatischer Umgebung, aus der sie leicht isoliert werden können (von Graevenitz 1987). Gammaproteobakterien stellen bei phylogenetischen Untersuchungen mikrobieller Gemeinschaften partikelassoziierter Bakterien oft nur einen geringen Anteil dar (Simon et al. 2002). Auch für den Bodensee sind Daten zur mikrobiellen Zusammensetzung von *lake snow* erhältlich, hier machten Alpha- und Betaproteobakterien meist den Hauptanteil der Population aus, gefolgt von Bakterien der *Cytophaga/Flavobakterien*-Gruppe und dem geringsten Anteil der Gammaproteobakterien (Schweitzer et al. 2001). Stämme der Gattung *Aeromonas* kommen in niedrigen Zellzahlen von 10 bis 10^3 CFU ml^{-1} in Oberflächengewässern vor und weisen eine vergleichsweise niedrige Überlebensrate in oligotrophen Gewässern auf (Hazen et al. 1978, Kersters et al. 1996). Trotz ihrer geringen Abundanz in aquatischen Systemen wurde bereits häufig beobachtet, dass sich schnell wachsende Gammaproteobakterien vorübergehend an Orten mit hoher Nährstoffverfügbarkeit stark anreichern können (Pernthaler und Amann 2005, Fuchs et al. 2000). Dies deckte sich mit unserer Beobachtung, dass die Zellzahlen der aus unseren Mikrokosmen isolierten *Aeromonas*-Stämme Werte von 10^6 CFU ml^{-1} erreichten. Viele *Aeromonas*-Stämme können Pathogene für Fische (Bruhn et al. 2005) und auch für Menschen sein (von Graevenitz 2007). Dabei setzen sie viele extrazelluläre Proteine frei, welche mit der Pathogenität und der ökologischen Anpassungsfähigkeit dieser Bakterien verbunden sind (Yu et al. 2007). Auch die Sekretion vielfältiger polymerabbauender Enzyme wie Amylasen, Chitinasen und Proteasen durch *Aeromonas* spp. wurde untersucht (Janda

1985). Jedoch ist bisher über die Rolle der Gattung *Aeromonas* im Nährstoff-Zyklus in der aquatischen Umwelt und über Interaktionen mit anderen prokaryotischen Organismen wenig bekannt (Seshadri et al. 2006).

Die zweite dominante Gruppe der aus den Mikrokosmen isolierten Stämme gehört zu der sehr heterogenen Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* der *Bacteroidetes*. Stämme dieser Gruppe sind sehr häufig in aquatischen Habitaten und sind bekannt für den Abbau polymerer Substrate wie Cellulose und Chitin (Kirchman 2002, Lemarchand et al. 2006). Vor allem in marinen Systemen machen diese Bakterien einen oft dominierenden Anteil partikelassoziierter Populationen aus (DeLong et al. 1993, Zoppini et al. 2005), einige Studien belegen dies auch für Süßwasser-Aggregate (Schweitzer et al. 2001).

Hohe phylogenetische Übereinstimmungen innerhalb der physiologisch sehr heterogenen *Cytophaga/Flavobacterium*-Gruppe gestalten die taxonomische Zuordnung bekannter sowie neu isolierter Stämme äußerst schwierig. Grundsätzlich teilen sich die Gattungen *Cytophaga* und *Flavobacterium* einige typische Charakteristika wie die häufige Pigmentierung und die Abwesenheit eines Flagellums (Christensen 1977). Die Zuordnung zu jeweils einer der Gattungen erfolgte ursprünglich meist über die Eigenschaft der Fortbewegung durch die sogenannte *gliding motility*, welche ausschließlich auf die Ordnung *Cytophagales* beschränkt war (Reichenbach 2006b). Durch die Bestimmung von *Flavobacterium aquatile* zum Typstamm der Gattung *Flavobacterium* jedoch wurden Vorschläge zur Neuorganisation der gesamten *Cytophaga/Flavobacterium-Gruppe* gemacht, da eben erwähnter Typstamm sowohl physiologisch als auch genetisch hohe Verwandtschaft zu vielen *Cytophaga*-Stämmen, nicht aber zu *Flavobacterium*-Stämmen aufweist. Die Aufforderung, diesen Typstamm durch einen andern zu ersetzen, wurde jedoch abgelehnt (Bernadet et al. 1996). Daher werden neu isolierte Stämme oft der Gattung *Flavobacterium* zugehörig klassifiziert, obwohl sie anhand ihrer physiologischen Eigenschaften die für *Cytophaga* charakteristischen Eigenschaften, vor allem der *gliding motility*, aufweisen. Da die Gattung *Flavobacterium* jedoch weiterhin als unbeweglich (einschließlich des Gleitens) beschrieben wird (Holt et al. 1994), wurden die von uns isolierten und näher charakterisierten Stämme wie beispielsweise Stamm 4D9 aufgrund ihrer offensichtlichen *gliding motility* der Gattung *Cytophaga* zugeordnet.

Die von uns isolierten Stämme der *Cytophaga/Flavobacterium*-Gruppe zeigten durchweg ein schwärmendes Wachstum auf Agarplatten mit einem geringen Trypton-Gehalt von 0,05 %. Bei einem Trypton-Gehalt von 1 % jedoch wurde das Schwärmverhalten fast vollständig unterdrückt und die Stämme bildeten klar definierte Kolonien. Der Einfluss des Nährstoffgehaltes auf das Schwärmverhalten dieser Bakterien ist eine alte Beobachtung (Stanier 1946, Christensen 1977). Chemotaktische Antworten sowie der Einfluss verschiedener Zucker auf physiologische Eigenschaften des bei Fortbewegung

exkretierten Schleimes wurden als mögliche Ursachen diskutiert (Wolkin und Pate 1984), neuere Untersuchungen hierzu sind jedoch nicht vorhanden. Eine sehr interessante Beobachtung konnte beim Schwärmverhalten des Stammes 4D9 gemacht werden. Dieser Stamm wies ein verzögertes Schwärmen auf Agarplatten mit geringem Tryptongehalt auf, sobald er zusammen mit einem Stamm von *Aeromonas hydrophila* kultiviert wurde. Die Morphologie der zunächst sichtbaren Kolonien entsprach denen der *Aeromonas*-Reinkultur, die Kolonien bestanden jedoch zu einem großen, teilweise dominierendem Teil, aus Zellen des Stammes 4D9. Diese offensichtlich starke Assoziation beider Bakterien schien einen Einfluss auf das Schwärmverhalten des Stammes 4D9 zu haben, da dieser erst nach einiger Zeit aus der Kolonie herausschwärmte. Ob es hier einen Zusammenhang mit der Nährstoffverfügbarkeit gibt, ist unklar. Grundsätzlich ist jedoch die Assoziation von *Cytophaga* mit anderen Bakterien kein unbekanntes Phänomen (v. Hofsten et al. 1971, Speyer 1953).

6.1.3 Die Rolle AHL-vermittelter Zell-Zell-Kommunikation in Mikrokosmen

Die starke Anreicherung AHL-produzierender Bakterien der Gattung *Aeromonas* deutete auf eine wichtige Funktion AHL-vermittelter Zell-Zell-Kommunikation beim Wachstum in den von uns etablierten Mikrokosmen für diese Stämme an. Zudem werden für die Besiedlung und den Abbau organischer Partikel wichtige Faktoren wie die Produktion vieler extrazellulärer Enzyme (Swift et al. 1999, Bi et al. 2007) sowie die Biofilmbildung (Lynch et al. 2002) in *Aeromonas hydrophila* durch AHL-vermitteltes Quorum Sensing reguliert. Entgegen unserer Erwartung konnten wir jedoch keine AHL in den Mikrokosmen nachweisen, auch nach einer 500-fachen Anreicherung durch organische Extraktion reagierte keiner der AHL-Indikatorstämme. Daraus lässt sich schließen, dass die natürliche Mikroflora keine signifikanten Mengen an AHL produzierte. Nichtsdestotrotz schließt dies nicht die Anwesenheit höherer AHL-Konzentrationen innerhalb von Mikrobereichen eines auf der Agarosekugel gebildeten Biofilms aus. Die modifizierten Quorum Sensing Konzepte des *diffusion sensing* (Redfield 2002) und *compartment sensing* (Koerber et al. 2005) sprechen die Funktionalität chemisch vermittelter Zell-Zell-Kommunikation auch bei geringen Zellzahlen an. Hierbei müssen die Zellen in Bereichen mit geringer Diffusion bzw. dicht zusammengedrängt in Aggregaten vorliegen. In solchen Fällen würde zwar kein die Gesamtpopulation betreffender Effekt AHL-vermittelter Kommunikation auftreten, in zeitlich und räumlich begrenzten Bereichen jedoch schon. Dabei könnten sich in solchen Bereichen höherer AHL- Konzentrationen auch AHL-produzierende Bakterien durchsetzen und ein vermehrtes Wachstum aufweisen. Um diese Theorie zu überprüfen, wurde das Wachstum des *Aeromonas hydrophila*-Stammes AH-1N mit dem der isogenen AHL-defekten Mutante AH-1N *ahyI* in Mikrokosmen in

Cokultur beider Stämme verglichen. Zusätzlich wurden Cokultur-Experimente mit dem nicht-AHL-produzierenden Stamm 4D9 durchgeführt, da dieser im Gegensatz zur *Aeromonas*-Mutante möglicherweise auch nicht in der Lage ist, auf potenziell gebildete AHL zu reagieren. Sollte die Fähigkeit, AHL zu produzieren, in kleinen Bereichen des Biofilms eine Rolle spielen, so sollte sich der AHL-bildende Wildtyp zumindest in der Biofilmfraktion durchsetzen und höhere Zellzahlen als die Mutante aufweisen. Jedoch waren im Vergleich zum Wildtyp keinerlei Wachstumsnachteile der Mutante zu beobachten, beide Stämme erreichten vergleichbare Zellzahlen. Dadurch schließt sich auch die Möglichkeit eines Profits der Mutante durch die vom Wildtyp produzierten AHL aus, da die Mutante keine Energie für die Produktion der Signalmoleküle aufwenden muss. Ein selektiver Vorteil sogenannter „cheater“ wurde bereits mehrfach diskutiert (Diggle et al. 2007, Keller und Surette 2006, Kreft 2005), eine systematische Studie zu dieser Hypothese sowie auch zu denen des *diffusion* und *compartment sensing* fehlt jedoch.

Unabhängig von der möglichen Anwesenheit lokal erhöhter AHL-Konzentrationen ließ sich ein globaler Effekt bezüglich des Wachstums in Mikrokosmen auch durch Zugabe des von Stamm AH-1N hauptsächlich produzierten Moleküls BHL nicht induzieren. Daher kann postuliert werden, dass AHL-vermitteltes Quorum Sensing für *Aeromonas hydrophila* beim Wachstum mit organischen Partikeln unter den von uns gewählten Bedingungen grundsätzlich nicht erforderlich ist. Selbst bei der Anwesenheit von AHL in Mikrokompartimenten innerhalb eines Biofilms ist dies keine Vorraussetzung für die erfolgreiche Besiedlung von Partikeln durch dieses Bakterium. Eine mögliche Erklärung könnten die nährstoffarmen Bedingungen sein, wie sie für die Mikrokosmen gewählt wurden. Anfangs erwähnte Studien zu AHL-regulierten Vorgängen in *Aeromonas hydrophila* wie die Produktion extrazellulärer Enzyme und die Bildung eines Biofilms wurden unter Standard-Laborbedingungen in nährstoffreichen Medien durchgeführt. Möglicherweise spielt eine AHL-vermittelte Genexpression für *Aeromonas hydrophila* tatsächlich erst bei hohen Nährstoffkonzentrationen eine Rolle. So wurden beispielsweise AHL aus infizierten Fischen extrahiert (Bruhn et al. 2005), weshalb in oligotrophen Verhältnissen die Produktion von AHL in Zusammenhang mit der Pathogenität und der damit verbundenen plötzlichen starken Nährstoffverfügbarkeit stehen könnte. Hierbei ergibt sich ein Wachstumsvorteil nicht ausschließlich durch das Signalmolekül, sondern auch durch die Selektivität mittels spezifischer Pathogenitätsfaktoren. Unter nährstoff- und energiearmen Bedingungen hingegen lohnt sich der Energieaufwand für die Produktion von solch relativ unspezifischen Signalmolekülen wie AHL nicht. Daher stellt sich die Frage, ob nicht andere, spezifischere Signalmoleküle bei der Besiedlung organischer Partikel unter nährstofflimitierten Bedingungen involviert sein könnten. Neuste

Untersuchungen zeigten beispielsweise, dass *Rhodopseudomonas palustris* ein neuartiges Quorum Sensing Signalmolekül verwendet. Dieses Bakterium nutzt nicht die typischen Acyl-Homoserinlaktone, sondern eine nicht-fettige Variante bestehend aus dem AHL-typischen Laktonring, welcher statt einer Acylseitenkette mit p-Cumarat verbunden ist (Greenberg 2008). Dies ist der erste Bericht, dass Bakterien ein Signalmoldekül aus einem spezifischen Substrat synthetisieren, in diesem Falle p-Coumarat, dessen Aldehyd ein Monomer des Lignins darstellt. Die Suche nach weiteren, spezifischeren Signalmolekülen könnte daher zu neuen Erkenntnissen bei der chemischen Interaktion von Bakterien unter natürlichen Bedingungen führen.

Wie bereits erwähnt spielte die Fähigkeit, AHL zu produzieren, für *Aeromonas hydrophila* AH-1N keine Rolle beim Wettbewerb um die Besiedlung der Agarosekugel mit dem *Cytophaga*-Stamm 4D9. Dennoch zeigten sich beim Wachstum des Stammes AH-1N sowie der Mutante drastische Unterschiede im Vergleich der Reinkulturen mit der Konkurrenzsituation in der Cokultur mit Stamm 4D9. Im Gegensatz zu den jeweiligen Reinkulturen zeigten beide *Aeromonas*-Stämme in Cokultur mit Stamm 4D9 kein Wachstum. Besonders auffallend war die kontinuierliche Abnahme der *Aeromonas*-CFU im Biofilm. Diese Abnahme ging lediglich nach 48 h einher mit einer Zunahme der suspendierten *Aeromonas*-Zellen, anschließend jedoch war ausschließlich eine Abnahme der Gesamt-CFU zu vermerken. Stamm 4D9 hingegen zeigte in der Cokultur ein ähnliches Wachstumsverhalten wie die Reinkultur und wurde demnach nicht durch die Anwesenheit eines zweiten Stammes beeinflusst. Die Verdrängung der *Aeromonas*-Stämme kann nicht ausschließlich einen Vorteil des Stammes 4D9 bei der Anheftung an die Kugeloberfläche bedeuten, da die CFU des Biofilms beider Bakterien zunächst ähnliche Werte zeigen und Stamm AH-1N erst allmählich verdrängt wurde. Daher ist die aktive Verdrängung des Stammes AH-1N durch Stamm 4D9, beispielsweise durch die Produktion inhibitorischer Substanzen sehr wahrscheinlich. Viele Stämme der *Cytophaga/Flavobacterium*-Gruppe produzieren eine Reihe von Sekundärmetaboliten, wie beispielsweise β-Laktame, die eine inhibitorische Wirkung auf andere Bakterien haben können (Reichenbach 2006b). Die tatsächliche Inhibierung eines Bakteriums durch einen *Cytophaga*-Stamm wurde bereits in einem marinen Biofilm untersucht (Burchard und Sorongon 1998).

6.2 Metabolische und physiologische Interaktionen beim Abbau von Chitin

6.2.1 Abbau von Chitin durch *Aeromonas hydrophila* AH-1N

Der in unseren Experimenten verwendete Stamm *Aeromonas hydrophila* AH-1N wuchs mit kolloidalem Chitin als alleiniger Kohlen- und Stickstoffquelle. Im Kulturüberstand des Stammes konnten extrazellulär vorliegende chitinabbauende Enzyme mittels spezifischer Enzymtests nachgewiesen werden. Die Produktion extrazellulärer chitinolytischer Enzyme durch *Aeromonas* spp., unter anderem *Aeromonas hydrophila* wurden bereits in einigen Studien beschrieben. Untersucht wurden vor allem zwei Endochitinasen, welche durch die Gene *chiA* bzw. *chi92* kodiert werden (Lan et al. 2006, Wu et al. 2001), sowie eine β-N-Acetylglucosaminidase (Lan et al. 2004), welche die Hydrolyse von $GlcNAc_2$ zu GlcNAc katalysiert. Diese Studien beziehen sich jedoch hauptsächlich auf Sequenzanalysen der Chitinbindedomänen dieser Enyzme sowie auf Studien zur Bindekapazität nach ortsgerichteter Mutagenese dieser Domänen. Über die genaue Funktionsweise all dieser Enzyme sowie über den Transport der Oligosaccharide und Monosaccharide und deren weitere Verstoffwechselung ist für *Aeromonas hydrophila* bis dato nichts bekannt. Biochemische und physiologische Studien, insbesondere zur Charakterisierung der Abbauprodukte wurden bisher kaum bzw. lediglich mit in *E. coli* exprimierten Chitinasen aus verschiedenen *Aeromonas*-Stämmen durchgeführt (Chen et al. 1991). Einige wenige Studien beschäftigten sich mit dem Abbau von Chitin durch *Aeromonas hydrophila* und der physiologischen Charakterisierung des Abbaus (Kuk et al. 2005, Sashiwa et al. 2002). Hier wurden durch zellfreie Überstände vor allem das Produkt GlcNAc, zu einem geringen Anteil auch die Oligomere $GlcNAc_2$ und $GlcNAc_3$, bei der Hydrolyse von Chitin freigesetzt. Dies entspricht unseren Beobachtungen bei der Inkubation zellfreien Kulturüberstandes des Stammes AH-1N mit kolloidalem Chitin und den Oligomeren. Aus Chitin wurden sowohl die beiden Oligomere $GlcNAc_2$ und $GlcNAc_3$ sowie das Monomer GlcNAc freigesetzt, wobei das Endprodukt nach längerer Inkubation ausschließlich das Monomer war. Demnach werden von Stamm AH-1N neben Polymer-hydrolysierenden Endo- oder Exoenzymen auch solche Enzyme freigesetzt, welche die Entstehung des Monomers katalysieren. Diese können einerseits Exoenzyme oder Chitobiasen sein, welche Monomere von längerkettigen Oligomeren abspalten, oder das Dimer hydrolytisch spalten. Da durch die Aktivität der Chitinasen im Kulturüberstand auch Dimere extrazellulär entstehen, ist die Anwesenheit einer Chitobiase, welche ausschließlich Dimere spaltet, auch außerhalb der Zelle zu vermuten. Vermutlich liegen jedoch die Oligomer-abbauenden Enzyme des Stammes AH-1N hauptsächlich intrazellulär bzw. periplasmatisch vor. Durch den Einsatz von Rohextrakt und somit periplasmatischer und

intrazellulärer Enzyme erhöhte sich die spezifische Aktivität für den Abbau des Dimers zu GlcNAc um etwa das 20-fache, die des Abbaus des Trimers um etwa das 5-fache. Auch beim Einsatz künstlicher Substrate für den Nachweis von Chitinase und Chitobiase erhöhte sich nach Behandlung der Zellen mit einem Detergenz die Chitobiase-Aktivität.

Grundsätzlich wurden diese chitinolytischen Enzyme des Stammes AH-1N nicht nur beim Wachstum mit Chitin oder Chitinabbauprodukten, sondern ebenfalls beim Wachstum mit Trypton oder Glucose gemessen. Daher lässt sich vermuten, dass diese Enzyme in Stamm AH-1N nicht induziert werden wie beispielsweise die durch Chitin induzierte Chitinase eines anderen *Aeromonas hydrophila*- Stammes (Hiraga et al. 1997) oder die durch Chitin-Oligomere induzierte Chitinase aus *Serratia marcescens* (Monreal und Reese 1969).

Stamm AH-1N setzte beim Wachstum mit Chitin sowohl Ammonium als auch Acetat in den Kulturüberstand frei. Allein durch die Aktivität extrazellulärer Enzyme des Stammes AH-1N war dies nicht zu beobachten, daher lässt sich schlussfolgern, dass die Deacetylierung und die Deaminierung intrazellulär bei diesem Stamm vonstatten gehen. Möglicherweise führen hohe Aktivitäten der hydrolytischen Deacetylierung bzw. Deaminierung zu einer Akkumulation von Acetat und Ammonium innerhalb der Zelle, welche zunächst exportiert werden. Eine ähnliche Beobachtung wurde für *Chromobacterium violaceum* beim Wachstum mit Chitin gemacht (Streichsbier 1983). Hier wurde diskutiert, dass der Katabolismus für Acetat durch die Anwesenheit von Chitin und Abbauprodukten reprimiert sein könnte und Acetat daher erst nach Erschöpfung des eigentlichen Substrates genutzt wird. Die Akkumulation von Ammonium wurde durch das enge C:N-Verhältnis von Chitin begründet, wodurch der Stickstoff-Bedarf der Zelle unter dem Angebot läge. Im Falle des Stammes AH-1N jedoch verschwand das freigesetzte Ammonium vollständig aus dem Kulturüberstand beim Wachstum mit GlcNAc oder Chitin gegen Ende der exponentiellen Phase, wodurch ein Überschuss an Ammonium für Stamm AH-1N nicht zu vermuten ist.

Durch die Freisetzung der Chitinabbauprodukte GlcNAc, $GlcNAc_2$ und $GlcNAc_3$ durch extrazelluläre Enzyme des Stammes AH-1N sowie der Exkretion von Ammonium und Acetat entstehen frei verfügbare Substrate, welche durch Diffusion leicht verloren gehen könnten und zusätzlich unter natürlichen Bedingungen auch anderen Bakterien zur Verfügung stünden. In dieser Konkurrenzsituation kann Stamm AH-1N beispielsweise durch die Ausbildung eines Biofilms eine direkte Aufnahme der Substrate begleitend zum Abbau des Polymers gewährleisten. Tatsächlich konnte beim Wachstum mit Chitin in Flüssigkultur mikroskopisch beobachtet werden, dass dieser Stamm dichte Biofilme auf den Chitinpartikeln ausbildete. Die Freisetzung von Chitin-Oligomeren und Monomeren war ausschließlich bei der Inkubation des Substrates mit zellfreien Enzymen, nicht aber in

Gegenwart von Zellen zu vermerken. Dies spricht für ein effektives Aufnahmesystem der Substrate ohne Verluste in die Umgebung. Die Ausbildung eines Biofilms auf Chitin steht bei untersuchten *Vibrio*-Spezies in Zusammenhang mit Bindung an Chitin durch Zucker-spezifische Lektine. In *Vibrio furnissii* ist dieser Lektin-Bindeapparat nicht nur für die Adhesion an Chitin, sondern auch für die Überprüfung des Nährstoffzustandes der näheren Umgebung zuständig (Yu et al. 1991).

Über die komplexen Vorgänge der Wahrnehmung des Substrates Chitin und der Bindung an selbiges sowie der Zusammenhang mit dem Abbau des Polymers und der Aufnahme der Oligosaccharide ist für *Aeromonas hydrophila* bisher nichts bekannt. Daher wurde zur näheren Charakterisierung des Chitinabbaus durch Stamm AH-1N eine Transposonmutagenese durchgeführt. Es konnte eine Mutante isoliert werden, welche weder in Flüssigkultur noch auf Festmedium mit Chitin wachsen konnte. Durch Klonierung genomischer DNA-Fragmente der Mutante in *E.coli* und anschließender Sequenzierung konnte das Transposon in einem Gen lokalisiert werden, dessen Sequenz eine 100 % ige Übereinstimmung auf Proteinebene mit dem Gen *gspL* aus dem Typstamm *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* ATCC 7966 aufwies. Eine ebenfalls sehr hohe Ähnlichkeit konnte zu *exeL* aus einem weiteren *Aeromonas hydrophila* Stamm festgestellt werden. Diese Gene codieren für Proteine des *general secretion pathway*- (GSP) Systems Gram negativer Bakterien. In einem zweistufigen System werden extrazelluläre Proteine zunächst über das *sec*-System in den periplasmatischen Raum überführt und anschließend über das GSP-System über die äußere Membran transportiert (Pugsley 1993). Die Proteine dieses Systems werden von einem Gencluster, bestehend aus 12 bis 14 Genen (*gspC – gspN* in *A. hydrophila* ATCC 7966) codiert. In *Aeromonas hydrophila* ist dieses Gencluster für die Sekretion nahezu aller extrazellulären Enzyme verantwortlich, welche bei der Pathogenität dieses Bakteriums eine wichtige Rolle spielen (Howard et al. 1993). Da die von uns isolierte Mutante keinerlei Wachstum mit Chitin zeigte, werden bei diesem Bakterium demnach auch chitinolytische Enzyme über dieses System transportiert. Der Transport einer Chitinase über das GSP-System konnte bereits für einen *Vibrio*-Stamm gezeigt werden (Connell et al. 1998), für *Aeromonas hydrophila* war dies bisher nicht bekannt. Da lediglich der Transport, nicht aber die Produktion der Enzyme defekt ist, akkumulieren die von der Mutante produzierten Chitinasen vermutlich im periplasmatischen Raum, wie es bereits für verschiedene Enzyme eines *Aeromonas hydrophila*-Stammes gezeigt wurde (Howard und Buckley 1983). In der Tat konnte zu Beginn des Wachstums der Mutante mit Trypton oder GlcNAc keine Aktivität extrazellulärer chitinolytischer Enzyme festgestellt werden, nach längerer Inkubation von etwa drei Tagen war jedoch eine mit dem Wildtyp vergleichbare Aktivität messbar und kam vermutlich durch die Lyse der Zellen in der stationären Phase zustande. Die

Fähigkeit der Mutante, trotz des Defekts mit den Chitinoligomeren zu wachsen, spricht wie bereits oben diskutiert für die Anwesenheit Oligomer-hydrolysierender Enzyme im Periplasma oder Cytosol. Ob *gspL* tatsächlich für den Transport chitinolytischer Enzyme des Stammes AH-1N benötigt wird, könnte durch Komplementation der Mutante mit dem Wildtyp-Gen untersucht werden. Geeignete Primer zur Amplifikation des Gens könnten aufgrund der Übereinstimmung aus *gspL* des Typstammes abgeleitet werden. Ein polarer Effekt durch das Transposon ist eher nicht zu vermuten, da dieses keine Terminator-Sequenz besitzt und daher das Transkript der nachfolgenden Gene (*gspM* und *gspN*) nicht beeinflussen sollte.

Die Isolierung einer „echten“ Chitinabbaumutante wird mit einer Transposonmutagenese nicht zu erreichen sein, da Stamm AH-1N vermutlich mehrere Chitinasen besitzt. So sind im Genom des Typstammes drei putative Chitinasen und wenigstens zwei Oligomer-abbauende Enzyme zu finden. Zur weiteren Untersuchung des Chitinabbaus durch Stamm AH-1N wäre beispielsweise das Screening nach einer Mutante, welche einen Defekt in der Bindung an Chitin aufweist, erfolgversprechender.

6.2.2 Abbau von Chitin durch *Cytophaga* sp. 4D9

Viele Stämme der *Cytophaga-Flavobacterium* Gruppe sind bekannt für die Fähigkeit, Polysaccharide wie Chitin abzubauen (Reichardt 1974). Auch Stamm 4D9 konnte mit freiem kolloidalem Chitin als alleiniger Kohlen- und Stickstoffquelle wachsen. Ein bemerkenswerter Unterschied zu Stamm AH-1N beim Wachstum mit Chitin war jedoch, dass Stamm 4D9 keine extrazellulären chitinabbauenden Enzyme zu sekretieren schien. Im Kulturüberstand dieses Stammes konnte keinerlei chitinolytische Aktivität mit künstlichen Substraten einerseits sowie mit natürlichen Substraten wie $GlcNAc_2$, $GlcNAc_3$ und Chitin gemessen werden. Durch Einsatz von Rohextrakt jedoch konnte die Aktivität einer Chitobiase beim Einsatz des künstlichen Substrates 4-MU-GlcNAc nachgewiesen werden. Auch bei der Inkubation von Rohextrakt mit dem natürlichen Substrat $GlcNAc_2$ wurde dieses vollständig zu GlcNAc umgesetzt. Demnach liegt die Dimer-spaltende Chitobiase bei Stamm 4D9 wahrscheinlich ausschließlich periplasmatisch bzw. intrazellulär vor. Die Anwesenheit einer Oligomer-abbauenden GlcNAcidase, welche Monomere vom nicht-reduzierenden Ende spaltet, ist nicht anzunehmen, da das Trimer auch nach längerer Inkubationszeit durch den Einsatz von Rohextrakt nicht umgesetzt wurde. Stamm 4D9 besitzt demnach weder eine extrazelluläre polymerabbauende Chitinase, noch eine frei vorliegende intrazelluläre oligomerabbauende GlcNAcidase. In der Tat ist das Fehlen freier extrazellulärer Chitinasen trotz eines offensichtlichen Chitinabbaus bei Stämmen der *Cytophaga/Flavobacterium*-Gruppe kein unbekanntes Phänomen (Sundarraj und Bhat 1972). In dieser Studie wurden einerseits Stämme von

Cytophaga johnsonii beschrieben, welche freie Enzyme in den Kulturüberstand sekretierten und andererseits einige Stämme, bei denen keine Aktivität im Überstand nachgewiesen werden konnte. Zweitere zeigten auf Chitin-Agarplatten keine Hydrolysezone, sondern lediglich eine Hydrolyse des Chitins direkt unterhalb der Kolonie. Die Autoren postulierten, dass für diese Stämme ein direkter Kontakt zum Substrat vonnöten ist. Dies deckt sich nur teilweise mit den von uns gemachten Beobachtungen zum Abbau von Chitin durch Stamm 4D9. Dieser zeigte auf Agarplatten mit Chitin als einzigem Substrat kein Wachstum und auch keine Hydrolyse des Chitins. In Flüssigkultur war mikroskopisch lediglich ein loser Kontakt, keinesfalls aber eine starke Bindung an die Partikel kolloidalen Chitins zu beobachten. Da eine polymerabbauende Chitinase des Stammes 4D9 weder extrazellulär noch frei vorliegend intrazellulär vorhanden ist, liegt diese wahrscheinlich zellassoziiert vor. Eine membranassoziierte Cellulase eines *Cytophaga*-Stammes wurde bereits näher untersucht, auch hier setzten die Autoren einen engen Kontakt zum Substrat voraus (Chang und Thayer 1977). Möglicherweise ist für Stamm 4D9 eine Biofilmbildung auf Chitinpartikeln nicht obligatorisch, sondern ein loser Kontakt zur Funktionalität des Enzyms ausreichend. Dies würde auch die Beobachtung erklären, dass Stamm 4D9 nicht in der Lage war, in Agar oder Agarose eingebettetes Chitin abzubauen, da hier ein direkter Kontakt der Zellen zum Substrat durch die Matrix verhindert wird, zumal Stamm 4D9 keine Biofilmbildung auf den im Versuch eingesetzten Agarosekugeln aufwies. Einige wenige Studien machen deutlich, dass die Beweglichkeit durch Schwärmen in engem Zusammenhang mit der Ausbildung von Biofilmen und dem Abbau von Polymeren wie Chitin steht. Eine *Flavobacterium gliding motility*-Mutante wurde zur Biofilmbildung induziert (Álvarez et al. 2006), während eine andere Mutante die Eigenschaft des Chitinabbaus verlor (Nelson und McBride 2006). Da sowohl die Biofilmbildung (Dunne 2002), als auch die *gliding motility* die Produktion von Oberflächenproteinen erfordern (McBride 2004), könnte hier ein Zusammenhang mit ebenfalls zellassoziierten Chitinasen einiger *Cytophaga/Flavobacterium*-Stämme vorliegen.

Grundsätzlich scheint die Nutzung verschiedener Chitinase-Systeme in der *Cytophaga/Flavobacterium*-Gruppe weit verbreitet zu sein. Auch bei den von uns isolierten Stämmen dieser Gruppe zeigten einige eine Hydrolyse des Chitins auf Agarplatten, während andere ein ähnliches Verhalten wie Stamm 4D9 aufwiesen. In vielen Studien wurden Stämme dieser Gruppe lediglich beim Wachstum auf Agarplatten auf ihre Fähigkeit, Chitin abzubauen, untersucht. Daher wird die Häufigkeit chitinabbauender Stämme innerhalb der *Cytophaga/Flavobacterium*-Gruppe möglicherweise unterschätzt. Eine Überprüfung des Wachstums mit Chitin sollte folglich auch in Flüssigkultur mit freiem Chitin erfolgen.

6.2.3 Abbau von Chitin durch *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Das opportunistisch pathogene Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* kommt ubiquitär in der Natur vor. Durch die Pathogenität der Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* ist dieses Bakterium ein Parameter bei der mikrobiologischen Qualitätsbestimmung von Badegewässern. In Zusammenhang mit dem Abbau organischer Partikel ist der Stamm *P. aeruginosa* PAO1 besonders interessant, da dieser Stamm extrazelluläre Chitinasen sowie Chitin-Bindeproteine sekretiert (Folders et al. 2001, Folders et al. 2000, Nouwens et al. 2002). Umso erstaunlicher ist, dass eine systematische Studie zum tatsächlichen Abbau von Chitin durch diesen Stamm nicht existiert. Der von uns untersuchte Stamm PAO1 zeigte keinerlei Wachstum mit freiem kolloidalem Chitin in Flüssigkultur oder in eingebetteter Form auf Festmedium. Auch die Chitinoligomere $GlcNAc_2$ und $GlcNAc_3$ wurden nicht verwertet. Das Monomer GlcNAc hingegen wurde sowohl als Kohlen- als auch als Stickstoffquelle verwendet. In Kulturüberständen des Stammes PAO1 nach Wachstum mit LB-Medium oder Minimalmedium mit GlcNAc konnte keinerlei chitinolytische Aktivität festgestellt werden. Daher stellt sich die Frage, ob Stamm PAO1 überhaupt chitinolytisch aktive Enzyme sekretiert. Möglicherweise spielt auch die Unfähigkeit dieses Stammes, Chitin-Oligomere als Substrat zu nutzen, eine Rolle. Für *Vibrio furnissii* wurde die Benötigung spezifischer Porine für den Transport der Oligosaccharide in den periplasmatischen Raum postuliert. Für dieses Bakterium wurde auch die Induktion der Chitin-abbauenden Enzyme durch $GlcNAc_2$ festgestellt (Bassler et al. 1991). Sollte Stamm PAO1 ein ähnliches regulatives System besitzen, so würde durch einen Defekt im Chitin-Oligomer Transport auch keine Induktion zur Produktion chitinolytischer Enzyme stattfinden.

6.2.4 Charakterisierung der Interaktionen der Stämme AH-1N, 4D9 und PAO1 beim Chitinabbau

Für die Stämme AH-1N und 4D9 waren bereits in Zusammenhang mit den Mikrokosmosexperimenten einige interessante Wechselwirkungen bezüglich der Koloniebildung und gegenseitiger Beeinflussung bei der Besiedlung der Algen-Agarosekugeln gemacht worden. Die Untersuchung des Wachstums einer Mischkultur beider Stämme mit in Agarosekugeln eingebettetem Chitin lag daher nahe. Konnte Stamm 4D9 in Reinkultur kein eingebettetes Chitin nutzen, so war er teilweise dominant in Suspension und Biofilm auf der Kugel bei Anwesenheit des Stammes AH-1N. Die Anwesenheit des *Aeromonas*-Stammes war für Stamm 4D9 jedoch nicht obligatorisch, da dieser eingebettetes Chitin allein durch die Aktivität der chitinolytisch aktiven Enzyme des Stammes AH-1N nutzen konnte. Hier verwertete Stamm 4D9 vermutlich die entstehenden Produkte $GlcNAc_3$, $GlcNAc_2$ sowie GlcNAc, nicht jedoch das im Überstand vorhandene

Acetat. Da Stamm AH-1N beim Wachstum mit eingebettetem Chitin jedoch neben Ammonium ausschließlich Acetat in den Kulturüberstand freisetzte, stellt sich die Frage, welche Substrate Stamm 4D9 im Falle des Wachstums in Cokultur mit Stamm AH-1N nutzte. Die Antwort könnte im veränderten Wachstumsverhalten von Stamm 4D9 in Cokultur zu finden sein. Im Gegensatz zur Reinkultur war Stamm 4D9 hier ebenfalls in der Biofilm-Fraktion zusammen mit Stamm AH-1N zu finden. Innerhalb des Biofilms dürften die durch extrazelluläre Enzyme des Stammes AH-1N freigesetzten Chitin-Abbauprodukte wie $GlcNAc_2$, $GlcNAc_3$ und GlcNAc zu finden sein. Durch die Integration in den Biofilm hätte Stamm 4D9 somit auch Zugang zu diesen Substraten. Unklar ist nun, was der Induktor für die Bildung eines Biofilms durch Stamm 4D9 ist. *Vibrio furnissii* zeigt eine starke Chemotaxis zu Chitinoligomeren (Bassler et al. 1991), durch die Unbeweglichkeit des Stammes 4D9 schließt sich aber eine aktive Bewegung zum Substrat aus. Möglich wäre ein zufälliges Zusammentreffen und einer gleichzeitigen Erkennung der Substrate. Die Umstellung von der planktonischen zur an die Kugel angehefteten Lebensweise kann aber nicht allein durch die Aktivität der Enzyme des Stammes AH-1N und der damit verbundenen Freisetzung der Substrate begründet werden, da Stamm 4D9 ausschließlich bei Anwesenheit des Stammes AH-1N einen Biofilm bildete. Möglicherweise erkennt Stamm 4D9 spezifische durch Stamm AH-1N ausgebildete Oberflächenmerkmale, wie es bereits für die Ausbildung einiger Biofilme (Dunne 2002) oder die Co-Aggregation unterschiedlicher Bakterien (Rickard et al. 2003) beschrieben wurde. Weiterhin bleibt zudem aufzuklären, ob Stamm 4D9 lediglich die durch die Enzyme des Stammes AH-1N freigesetzten Substrate nutzt, oder durch die umgestellte Lebensweise aktiv am Abbau von Chitin beteiligt ist.

Die Fähigkeit, in Cokultur mit Stamm AH-1N mit eingebettetem Chitin zu wachsen, konnte auch für Stamm PAO1 bestätigt werden. Da dieser Stamm jedoch die freigesetzten Chitinoligomere nicht nutzen konnte, stellte sich die Frage, welches Wachstumssubstrat Stamm PAO1 in Cokultur nutzte. Bei Wachstumsexperimenten, in denen ein zellfreier Überstand einer mit Chitin gewachsenen Kultur des Stammes AH-1N als Substrat verwendet wurde, verbrauchte Stamm PAO1 rasch das im Überstand vorhandene Acetat. Die Zelldichte, die dadurch erreicht wurde, war jedoch höher, als mit der vorhandenen Menge an Acetat möglich wäre. Daher müssen weitere Abbauprodukte im Überstand vorhanden sein, welche das Wachstum von Stamm PAO1 ermöglichen. Eine Möglichkeit wäre das Chitinabbauprodukt Glucosamin, welches aufgrund seiner positiven Ladung mit dem von uns verwendeten HPLC-System nicht detektierbar ist. Glucosamin könnte einerseits sekretiert werden, oder auch ein extrazelluläres Produkt durch den Abbau von nicht vollständig acetyliertem Chitin und Chitin-Oligosacchariden sein (Mitsutomi et al. 1990). Auch die Nutzung des durch die Enzyme des Stammes AH-1N freigesetzten

Monomers GlcNAc ist denkbar. Hierzu müsste Stamm PAO1 ähnlich wie Stamm 4D9 in den Biofilm integrieren. Dies wurde bereits andeutungsweise mittels Fluorszenz *in situ* Hybridisierung bestätigt. Da Stamm PAO1 in Cokultur Zellzahlen von bis zu 10^9 CFU ml^{-1} erreichte, muss für dieses Bakterium auch der Aspekt der Umwelthygiene bedacht werden. Durch das kommensale Wachstum mit chitinabbauenden Bakterien in der Umwelt könnte *Pseudomonas aeruginosa* beispielsweise bei Zooplanktonblüten gesundheitsgefährdende Zellzahlen auch im Bodensee erreichen.

Aus den Beobachtungen der Reinkulturen und der Cokulturen beim Wachstum mit Chitin kann ein hypothetisches Bild der erfolgenden metabolischen und nicht-metabolischen Interaktionen zwischen den Stämmen AH-1N, 4D9 und PAO1 aufgestellt werden.

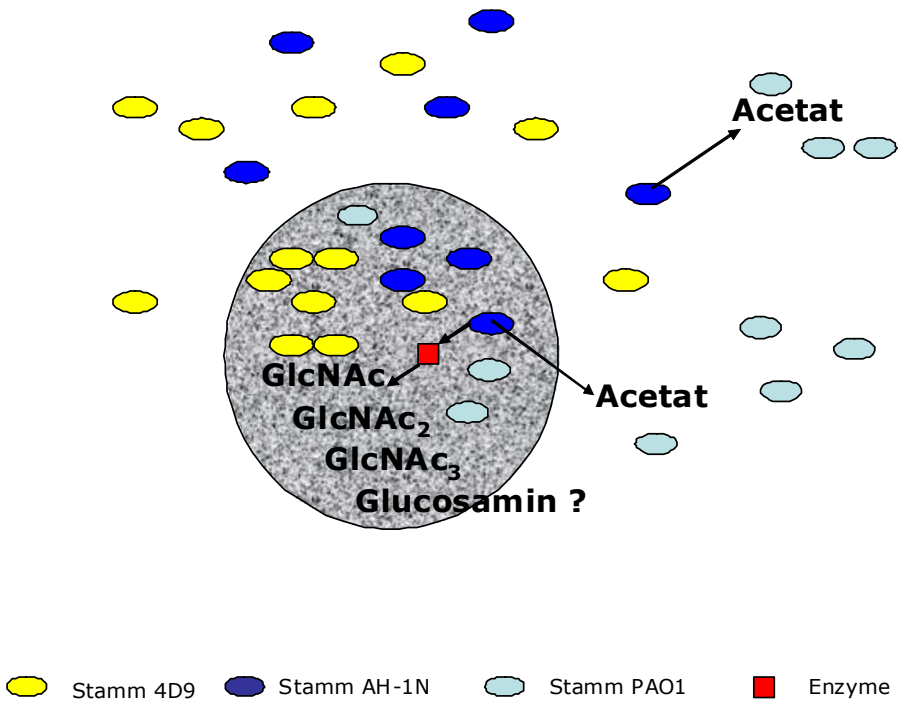


Abbildung 6-1 Hypothetisches Bild metabolischer und nicht-metabolischer Interaktionen beim Abbau von Chitin. Stamm AH-1N wächst sowohl suspendiert, als auch im Biofilm auf in Agarose eingebettetem Chitin. Extrazelluläre Enzyme des Stammes setzen die Chitinabbauprodukte GlcNAc, $GlcNAc_2$ und $GlcNAc_3$, möglicherweise auch Glucosamin (GlcN) frei. Diese diffundieren jedoch durch die Anwesenheit des Biofilms nicht ins umgebende Medium. Um Zugang zu den Substraten zu bekommen, ändert Stamm 4D9 seine Lebensweise und integriert in den Biofilm, möglicherweise induziert durch Oberflächenmerkmale des Stammes AH-1N. Im Biofilm hat Stamm 4D9 Zugang zu den gebildeten Substraten und ist eventuell aktiv am Chitinabbau beteiligt. Stamm PAO1 nutzt das durch Stamm AH-1N sekretierte Acetat als Substrat in der Suspension, zusätzlich findet er Zugang zu den Abbauprodukten GlcNAc sowie GlcN innerhalb des Biofilms.

6.3 Ausblick

Die in dieser Arbeit beobachteten Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Bakterien beim Abbau von Chitin weisen auf die hohe Komplexität der zwischen den Mitgliedern des Biofilms vorgehenden Interaktionen hin. Über die Rolle des Stammes AH-1N in dieser bakteriellen Gemeinschaft könnte die nähere Untersuchung des Chitinabbaus durch diesen Stamm Aufschluss geben. Hierzu wäre die Herstellung weiterer Mutanten hilfreich, welche einerseits einen Defekt im Chitinabbau aufweisen, andererseits in ihrer Biofilmbildung auf den Chitinpartikeln inhibiert sind. Diese könnten Aufschluss über die für die Coaggregation des Stammes AH-1N mit anderen Bakterien wichtigen Parameter, wie beispielsweise der Ausbildung spezifischer Zelloberflächen-Moleküle, geben.

Über den Chitinabbau der *Cytophaga/Flavobacterium*-Stämme ist bisher nur sehr wenig bekannt. Auch hier könnte die Herstellung von Mutanten des Stammes 4D9 mit einem Defekt im Chitinabbau hilfreich sein. Weiterhin sollten für diesen Stamm weitere Untersuchungen zur Lokalisierung der Chitinase durchgeführt werden. Auch der Vergleich mit weiteren isolierten Stämmen der *Cytophaga/Flavobacterium*-Gruppe, welche unterschiedliche Strategien des Chitinabbaus nutzen, könnte zur Untersuchung des Chitinabbaus durch Stamm 4D9 beitragen.

Aufgrund der Verfügbarkeit beliebiger Mutanten des sequenzierten Stammes PAO1 sind viele Wachstumsversuche einer Cokultur dieses Stammes mit Stamm AH-1N und Stamm 4D9 denkbar, um die für das kommensale Wachstum des Stammes PAO1 mit chitinabbauenden Bakterien notwendigen Parameter zu untersuchen.

7 Literaturverzeichnis

Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res **25**(17): 3389-3402.

Álvarez, B., P. Secades, M. Prieto, M. J. McBride and J. A. Guijarro (2006). "A mutation in *Flavobacterium psychrophilum* tlpB inhibits gliding motility and induces biofilm formation." Appl Environ Microbiol **72**(6): 4044-4053.

Azam, F., T. Fenchel, J. G. Field, J. S. Gray, L. A. Meyer-Reil and F. Thingstad (1983). "The ecological role of water-column microbes in the sea." Mar Ecol Prog Ser **10**: 257-263.

Azam, F. and R. A. Long (2001). "Sea snow microcosms." Nature **414**(6863): 495, 497-498.

Azam, F., D. C. Smith, G. F. Steward and Å. Hagström (1993). "Bacteria-organic matter coupling and its significance for oceanic carbon cycling." Microb Ecol **28**: 167-179.

Bassler, B. L. (2002). "Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria." Cell **109**(4): 421-424.

Bassler, B. L., P. J. Gibbons, C. Yu and S. Roseman (1991). "Chitin utilization by marine bacteria. Chemotaxis to chitin oligosaccharides by *Vibrio furnissii*." J Biol Chem **266**(36): 24268-24275.

Bassler, B. L., C. Yu, Y. C. Lee and S. Roseman (1991). "Chitin utilization by marine bacteria. Degradation and catabolism of chitin oligosaccharides by *Vibrio furnissii*." J Biol Chem **266**(36): 24276-24286.

Baty, A. M., 3rd, Z. Diwu, G. Dunham, C. C. Eastburn, G. G. Geesey, A. E. Goodman, P. A. Suci and S. Techkarnjanaruk (2001). "Characterization of extracellular chitinolytic activity in biofilms." Methods Enzymol **336**: 279-301.

Bernadet, J.-F., P. Segers, M. Vancanneyt, F. Berthe, K. Kersters and P. Vandamme (1996). "Cutting a gordian knot: Emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family *Flavobacteriaceae*, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (basonym, *Cytophage aquatilis* Strohl and Tait 1978)." Int J Syst Bacteriol **46**(1): 128-148.

Bi, Z. X., Y. J. Liu and C. P. Lu (2007). "Contribution of AhyR to virulence of *Aeromonas hydrophila* J-1." Res Vet Sci **83**(2): 150-156.

Blackburn, N., T. Fenchel and J. Mitchell (1998). "Microscale nutrient patches in planktonic habitats shown by chemotactic bacteria." Science **282**(5397): 2254-2256.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.

Bruhn, J. B., I. Dalsgaard, K. F. Nielsen, C. Buchholtz, J. L. Larsen and L. Gram (2005). "Quorum sensing signal molecules (acylated homoserine lactones) in gram-negative fish pathogenic bacteria." Dis Aquat Organ **65**(1): 43-52.

Bruns, A., U. Nubel, H. Cypionka and J. Overmann (2003). "Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton." Appl Environ Microbiol **69**(4): 1980-1989.

Bunte, C. and M. Simon (1999). "Bacterioplankton turnover of dissolved free monosaccharides in a mesotrophic lake." Limnol Oceanogr **44**(8): 1862-1870.

Burchard, R. P. and M. L. Sorongon (1998). "A gliding bacterium strain inhibits adhesion and motility of another gliding bacterium strain in a marine biofilm." Appl Environ Microbiol **64**(10): 4079-4083.

Bussmann, I., B. Philipp and B. Schink (2001). "Factors influencing the cultivability of lake water bacteria." J Microbiol Methods **47**(1): 41-50.

Carnahan, A. M. and S. W. Joseph (2005). Genus I *Aeromonas*, p. 557-578. *In* G. M. Garrity (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed, vol 2 part B. New York, Springer.

Chang, W. T. and D. W. Thayer (1977). "The cellulase system of a *Cytophaga* species." Can J Microbiol **23**(9): 1285-92.

Chen, J. P., F. Nagayama and M. C. Chang (1991). "Cloning and expression of a chitinase gene from *Aeromonas hydrophila* in *Escherichia coli*." Appl Environ Microbiol **57**(8): 2426-2428.

Chung, C. T., S. L. Niemela and R. H. Miller (1989). "One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(7): 2172-2175.

Christensen, P. J. (1977). "The history, biology, and taxonomy of the *Cytophaga* group." Can J Microbiol **23**(12): 1599-653.

Colussi, P. A., C. A. Specht and C. H. Taron (2005). "Characterization of a nucleus-encoded chitinase from the yeast *Kluyveromyces lactis*." Appl Environ Microbiol **71**(6): 2862-2869.

Comb, D. G. and S. Roseman (1958). "Glucosamine metabolism. IV. Glucosamine-6-phosphate deaminase." J Biol Chem **232**(2): 807-827.

Connell, T. D., D. J. Metzger, J. Lynch and J. P. Folster (1998). "Endochitinase is transported to the extracellular milieu by the eps-encoded general secretory pathway of *Vibrio cholerae*." J Bacteriol **180**(21): 5591-5600.

Costerton, J. W., P. S. Stewart and E. P. Greenberg (1999). "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections." Science **284**(5418): 1318-1322.

Crump, B. C., E. V. Armbrust and J. A. Baross (1999). "Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia river, its estuary, and the adjacent coastal ocean." Appl Environ Microbiol **65**(7): 3192-3204.

Davies, D. G., M. R. Parsek, J. P. Pearson, B. H. Iglewski, J. W. Costerton and E. P. Greenberg (1998). "The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm." Science **280**(5361): 295-298.

de Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik and K. N. Timmis (1990). "Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria." J Bacteriol **172**(11): 6568-6572.

DeLong, E. F., D. G. Franks and A. L. Alldredge (1993). "Phylogenetic diversity of aggregate attached vs. free-living marine bacterial assemblages." Limnol Oceanogr **38**: 924-934.

Diggle, S. P., A. S. Griffin, G. S. Campbell and S. A. West (2007). "Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations." Nature **450**(7168): 411-414.

Donlan, R. M. (2002). "Biofilms: microbial life on surfaces." Emerg Infect Dis **8**(9): 881-890.

Dunne, W. M., Jr. (2002). "Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?" Clin Microbiol Rev **15**(2): 155-166.

Eberl, L. (1999). "N-acyl homoserinelactone-mediated gene regulation in gram-negative bacteria." Syst Appl Microbiol **22**(4): 493-506.

Folders, J., J. Algra, M. S. Roelofs, L. C. van Loon, J. Tommassen and W. Bitter (2001). "Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* chitinase, a gradually secreted protein." J Bacteriol **183**(24): 7044-7052.

Folders, J., J. Tommassen, L. C. van Loon and W. Bitter (2000). "Identification of a chitin-binding protein secreted by *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **182**(5): 1257-1263.

Fuchs, B. M., M. V. Zubkov, K. Sahm, P. H. Burkill and R. Amann (2000). "Changes in community composition during dilution cultures of marine bacterioplankton as assessed by flow cytometric and molecular biological techniques." Environ Microbiol **2**(2): 191-201.

Gooday, G. W. (1990a). "The ecology of chitin degradation." Adv Microb Ecol **11**: 387-430.

Gooday, G. W. (1990b). "Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan." Biodegradation **1**: 177-190.

Gottschal, J. C. (1985). "Some reflections on microbial competitiveness among heterotrophic bacteria." Antonie Van Leeuwenhoek **51**(5-6): 473-494.

Gram, L., H. P. Grossart, A. Schlingloff and T. Kiørboe (2002). "Possible quorum sensing in marine snow bacteria: production of acylated homoserine lactones by *Roseobacter* strains isolated from marine snow." Appl Environ Microbiol **68**(8): 4111-4116.

Greenberg, E. P. (2003). "Bacterial communication and group behavior." J Clin Invest **112**(9): 1288-1290.

Greenberg, E. P. (2008). What's new in acyl-homserine lactone quorum sensing: strange signlas and strange receptors. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM). Frankfurt.

Grossart, H. P., T. Kiørboe, K. Tang and H. Ploug (2003). "Bacterial colonization of particles: growth and interactions." Appl Environ Microbiol **69**(6): 3500-3509.

Grossart, H. P. and M. Simon (1998). "Bacterial colonization and microbial decomposition of limnetic organic aggregates (lake snow)." Aquat Microb Ecol **15**: 127-140.

Güde, H., B. Haibel and H. Müller (1985). "Development of planktonik bacterial poulations in a water column of Lake Constance (Bodensee-Obersee)." Arch Hydrobiol **105**(1): 59-77.

Güde, H., H. Rossknecht and G. Wagner (1998). "Anthropogenic impacts on the trophic state of Lake Constance during the 20th century." Arch Hydrobiol Spec Issues Advanc Limnol **53**: 85-108.

Hanisch, K., B. Schweitzer and M. Simon (1996). "Use of dissolved carbohydrates by planktonic bacteria in a mesotrophic lake." Microb Ecol **31**: 41-55.

Hazen, T. C., C. B. Fliermans, R. P. Hirsch and G. W. Esch (1978). "Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States." Appl Environ Microbiol **36**(5): 731-738.

Hiraga, K., L. Shou, M. Kitazawa, S. Takahashi, M. Shimada, R. Sato and K. Oda (1997). "Isolation and characterization of chitinase from a flake-chitin degrading marine bacterium, *Aeromonas hydrophila* H-2330." Biosci Biotechnol Biochem **61**(1): 174-176.

Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath and S. T. Williams (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology. Baltimore, Williams & Wilkins

Howard, S. P. and J. T. Buckley (1983). "Intracellular accumulation of extracellular proteins by pleiotropic export mutants of Aeromonas hydrophila." J Bacteriol 154(1): 413-418.

Howard, S. P., J. Critch and A. Bedi (1993). "Isolation and analysis of eight exe genes and their involvement in extracellular protein secretion and outer membrane assembly in *Aeromonas hydrophila*." J Bacteriol **175**(20): 6695-6703.

Janda, J. M. (1985). "Biochemical and exoenzymatic properties of *Aeromonas* species." Diagn Microbiol Infect Dis **3**(3): 223-232.

Jiang, B. and S. P. Howard (1992). "The *Aeromonas hydrophila* exeE gene, required both for protein secretion and normal outer membrane biogenesis, is a member of a general secretion pathway." Mol Microbiol **6**(10): 1351-1361.

Joint, I., K. Tait, M. E. Callow, J. A. Callow, D. Milton, P. Williams and M. Cámara (2002). "Cell-to-cell communication across the prokaryote-eukaryote boundary." Science **298**(5596): 1207.

Keller, L. and M. G. Surette (2006). "Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective." Nat Rev Microbiol **4**(4): 249-258.

Kersters, I., G. Huys, H. Van Duffel, M. Vancanneyt, K. Kersters and W. Verstraete (1996). "Survival potential of *Aeromonas hydrophila* in freshwaters and nutrient-poor waters in comparison with other bacteria." J Appl Bacteriol **80**(3): 266-276.

Keyhani, N. O. and S. Roseman (1999). "Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria." Biochim Biophys Acta **1473**(1): 108-122.

Kiørboe, T., H. P. Grossart, H. Ploug and K. Tang (2002). "Mechanisms and rates of bacterial colonization of sinking aggregates." Appl Environ Microbiol **68**(8): 3996-4006.

Kiørboe, T. and G. A. Jackson (2001). "Marine snow, organic solute plumes, and optimal chemosensory behavior of bacteria." Limnol Oceanogr **46**(6): 1309-1318.

Kiørboe, T., K. Tang, H. P. Grossart and H. Ploug (2003). "Dynamics of microbial communities on marine snow aggregates: colonization, growth, detachment, and grazing mortality of attached bacteria." Appl Environ Microbiol **69**(6): 3036-3047.

Kirchman, D. L. (2002). "The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments." FEMS Microbiol Ecol **39**: 91-100.

Klebensberger, J., K. Lautenschlager, D. Bressler, J. Wingender and B. Philipp (2007). "Detergent-induced cell aggregation in subpopulations of *Pseudomonas aeruginosa* as a preadaptive survival strategy." Environ Microbiol **9**(9): 2247-2259.

Klebensberger, J., O. Rui, E. Fritz, B. Schink and B. Philipp (2006). "Cell aggregation of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 as an energy-dependent stress response during growth with sodium dodecyl sulfate." Arch Microbiol **185**(6): 417-427.

Koerber, A. J., J. R. King and P. Williams (2005). "Deterministic and stochastic modelling of endosome escape by *Staphylococcus aureus*: "quorum" sensing by a single bacterium." J Math Biol **50**(4): 440-488.

Kreft, J.-U. (2005). "Conflicts of interest in biofilms." Biofilms **1**(4): 265-276.

Kuk, J. H., W. J. Jung, G. H. Jo, Y. C. Kim, K. Y. Kim and R. D. Park (2005). "Production of N-acetyl-beta-D-glucosamine from chitin by *Aeromonas* sp. GJ-18 crude enzyme." Appl Microbiol Biotechnol **68**(3): 384-389.

Lan, X., N. Ozawa, N. Nishiwaki, R. Kodaira, M. Okazaki and M. Shimosaka (2004). "Purification, cloning, and sequence analysis of beta-N-acetylglucosaminidase from the chitinolytic bacterium *Aeromonas hydrophila* strain SUWA-9." Biosci Biotechnol Biochem **68**(5): 1082-1090.

Lan, X., X. Zhang, J. Hu and M. Shimosaka (2006). "Cloning, expression, and characterization of a chitinase from the chitinolytic bacterium *Aeromonas hydrophila* strain SUWA-9." Biosci Biotechnol Biochem **70**(10): 2437-2442.

Lemarchand, C., L. Jardillier, J. F. Carrias, M. Richardot, D. Debroas, T. Sime-Ngando and C. Amblard (2006). "Community composition and activity of prokaryotes associated to detrital particles in two contrasting lake ecosystems." FEMS Microbiol Ecol **57**(3): 442-451.

Lewenza, S., M. B. Visser and P. A. Sokol (2002). "Interspecies communication between *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa*." Can J Microbiol **48**(8): 707-716.

Long, R. A. and F. Azam (2001). "Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria." Appl Environ Microbiol **67**(11): 4975-4983.

Lynch, M. J., S. Swift, D. F. Kirke, C. W. Keevil, C. E. Dodd and P. Williams (2002). "The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*." Environ Microbiol **4**(1): 18-28.

Manefield, M. and S. L. Turner (2002). "Quorum sensing in context: out of molecular biology and into microbial ecology." Microbiology **148**: 3762-3764.

McBride, M. J. (2004). "*Cytophaga-Flavobacterium* gliding motility." J Mol Microbiol Biotechnol **7**(1-2): 63-71.

McClean, K. H., M. K. Winson, L. Fish, A. Taylor, S. R. Chhabra, M. Cámara, M. Daykin, J. H. Lamb, S. Swift, B. W. Bycroft, G. S. Stewart and P. Williams (1997). "Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones." Microbiology **143**: 3703-3711.

McLean, R. J., M. Whiteley, D. J. Stickler and W. C. Fuqua (1997). "Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms." FEMS Microbiol Lett **154**(2): 259-263.

Miller, M. B. and B. L. Bassler (2001). "Quorum sensing in bacteria." Annu Rev Microbiol **55**: 165-199.

Mitsutomi, M., A. Ohtakara, T. Fukamizo and S. Goto (1990). "Action pattern of *Aeromonas hydrophila* chitinase on partially N-acetylated chitosan." Agric Biol Chem **54**(4): 871-877.

Monreal, J. and E. T. Reese (1969). "The chitinase of *Serratia marcescens*." Can J Microbiol **15**(7): 689-696.

Morita, R. Y. (1997). Bacteria in oligotrophic environments: starvation-survival lifestyle, p. 529. *In* (ed.), Chapman and Hall Microbiology Series, New York, Chapman and Hall.

Muzzarelli, R. A. A. (1977). Chitin. Oxford, Pergamon Press

Nealson, K. H., T. Platt and J. W. Hastings (1970). "Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system." J Bacteriol **104**(1): 313-322.

Nelson, S. S. and M. J. McBride (2006). "Mutations in *Flavobacterium johnsoniae* secDF result in defects in gliding motility and chitin utilization." J Bacteriol **188**(1): 348-351.

Nouwens, A. S., M. D. Willcox, B. J. Walsh and S. J. Cordwell (2002). "Proteomic comparison of membrane and extracellular proteins from invasive (PAO1) and cytotoxic (6206) strains of *Pseudomonas aeruginosa*." Proteomics **2**(9): 1325-1346.

Pernthaler, J. and R. Amann (2005). "Fate of heterotrophic microbes in pelagic habitats: focus on populations." Microbiol Mol Biol Rev **69**(3): 440-461.

Philipp, B., H. Erdbrink, M. J. Suter and B. Schink (2006). "Degradation of and sensitivity to cholate in *Pseudomonas* sp. strain Chol1." Arch Microbiol **185**(3): 192-201.

Pugsley, A. P. (1993). "The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria." Microbiol Rev **57**(1): 50-108.

Rath, J. and G. J. Herndl (1994). "Characteristics and Diversity of beta-d-Glucosidase (EC 3.2.1.21) Activity in Marine Snow." Appl Environ Microbiol **60**(3): 807-813.

Redfield, R. J. (2002). "Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing?" Trends Microbiol **10**(8): 365-370.

Reichardt, W. (1974). "[Ecophysiology of some aquatic bacteria from the *Flavobacterium-Cytophaga* group]." Zentralbl Bakteriol [Orig A] **227**(1-4): 85-93.

Reichenbach, H. (2006a). The genus *Lysobacter*, p. 939-957. *In* M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer and E. Stackebrandt (ed.), The Prokaryotes. 3rd ed, vol 6, Springer.

Reichenbach, H. (2006b). The order *Cytophagales*, p. 549-590. *In* M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer and E. Stackebrandt (ed.), The Prokaryotes. 3rd ed, vol 7, Springer.

Reichenbach, H., W. Kohl, A. Böttger-Vetter and H. Achenbach (1980). "Flexirubin-Type Pigments in *Flavobacterium*." Arch Microbiol **126**: 291-293.

Rickard, A. H., P. Gilbert, N. J. High, P. E. Kolenbrander and P. S. Handley (2003). "Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms." Trends Microbiol **11**(2): 94-100.

Riemann, L. and F. Azam (2002). "Widespread N-acetyl-D-glucosamine uptake among pelagic marine bacteria and its ecological implications." Appl Environ Microbiol **68**(11): 5554-5562.

Roseman, S. (1957). "Glucosamine metabolism. I. N-acetylglucosamine deacetylase." J Biol Chem **226**(1): 115-124.

Sambrook, J. and D. W. Russel, Eds. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sashiwa, H., S. Fujishima, N. Yamano, N. Kawasaki, A. Nakayama, E. Muraki, K. Hiraga, K. Oda and S. Aiba (2002). "Production of N-acetyl-D-glucosamine from alpha-chitin by crude enzymes from *Aeromonas hydrophila* H-2330." Carbohydr Res **337**(8): 761-763.

Schauder, S., K. Shokat, M. G. Surette and B. L. Bassler (2001). "The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule." Mol Microbiol **41**(2): 463-476.

Schmitt-Wagner, D., M. W. Friedrich, B. Wagner and A. Brune (2003). "Phylogenetic diversity, abundance, and axial distribution of bacteria in the intestinal tract of two soil-feeding termites (Cubitermes spp.)." Appl Environ Microbiol **69**(10): 6007-6017.

Schweitzer, B., I. Huber, R. Amann, W. Ludwig and M. Simon (2001). "Alpha- and beta-*Proteobacteria* control the consumption and release of amino acids on lake snow aggregates." Appl Environ Microbiol **67**(2): 632-645.

Seshadri, R., S. W. Joseph, A. K. Chopra, J. Sha, J. Shaw, J. Graf, D. Haft, M. Wu, Q. Ren, M. J. Rosovitz, R. Madupu, L. Tallon, M. Kim, S. Jin, H. Vuong, O. C. Stine, A. Ali, A. J. Horneman and J. F. Heidelberg (2006). "Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack of all trades." J Bacteriol **188**(23): 8272-8282.

Simon, M., H. P. Grossart, B. Schweitzer and H. Ploug (2002). "Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems." Aquat Microb Ecol **28**: 175-211.

Simon, R., U. Priefer and A. Pühler (1983). "A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria." Biotechnology **1**: 784-791.

Smith, D. C., M. Simon, A. L. Alldredge and F. Azam (1992). "Intense hydrolytic enzyme activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution." Nature **359**(6391): 139-142.

Speyer, E. (1953). "[Studies on *Sporocytophaga myxococcoides*, Stanier 1940.]." Arch Mikrobiol **18**(3): 245-272.

Stanier, R. Y. (1946). "Studies on non-fruiting myxobacterium 1. *Cytophaga johnsonae* sp., a chitin decomposing myxobacterium." J Bacteriol **53**: 297-315.

Stoodley, P., K. Sauer, D. G. Davies and J. W. Costerton (2002). "Biofilms as complex differentiated communities." Annu Rev Microbiol **56**: 187-209.

Streichsbier, F. (1983). "Utilization of chitin as sole carbon and nitrogen source by *Chromobacterium violaceum*." FEMS Microbiol Lett **19**(1): 129-132.

Styp von Rekowski, K., M. Hempel and B. Philipp (2007). "Quorum sensing by N-acylhomoserine lactones is not required for *Aeromonas hydrophila* during growth with organic particles in lake water microcosms." Arch Microbiol: Epub ahead of print.

Sundarraj, N. and J. V. Bhat (1972). "Breakdown of chitin by *Cytophaga johnsonii*." Arch Mikrobiol **85**(2): 159-167.

Swift, S., A. V. Karlyshev, L. Fish, E. L. Durant, M. K. Winson, S. R. Chhabra, P. Williams, S. Macintyre and G. S. Stewart (1997). "Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: identification of the LuxRI homologs AhyRI and AsaRI and their cognate N-acylhomoserine lactone signal molecules." J Bacteriol **179**(17): 5271-5281.

Swift, S., M. J. Lynch, L. Fish, D. F. Kirke, J. M. Tomas, G. S. Stewart and P. Williams (1999). "Quorum sensing-dependent regulation and blockade of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila*." Infect Immun **67**(10): 5192-5199.

Tait, K., I. Joint, M. Daykin, D. L. Milton, P. Williams and M. Cámara (2005). "Disruption of quorum sensing in seawater abolishes attraction of zoospores of the green alga *Ulva* to bacterial biofilms." Environ Microbiol **7**(2): 229-240.

Tomme, P., R. A. Warren and N. R. Gilkes (1995). "Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi." Adv Microb Physiol **37**: 1-81.

v. Hofsten, B., B. Berg and S. Besfow (1971). "Observations on bacteria occuring together with *Sporocytophaga* in aerobic enrichment cultures on cellulose." Arch Mikrobiol **79**: 69-79.

Voloshin, S. A. and A. S. Kaprelyants (2004). "Cell-cell interactions in bacterial populations." Biochemistry (Mosc) **69**(11): 1268-1275.

von Graevenitz, A. (1987). "Research on *Aeromonas* and *Plesiomonas*." Experientia **43**(4): 348-358.

von Graevenitz, A. (2007). "The role of *Aeromonas* in diarrhea: a review." Infection **35**(2): 59-64.

Waters, C. M. and B. L. Bassler (2005). "Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 319-346.

Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier and D. J. Lane (1991). "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study." J Bacteriol **173**(2): 697-703.

Weiss, M. and M. Simon (1999). "Consumption of labile organic matter by limnetic bacterioplankton: the relative significance of amino acids and carbohydrates." Aquat Microb Ecol **17**: 1-12.

Weiss, P., B. Schweitzer, R. Amann and M. Simon (1996). "Identification in situ and dynamics of bacteria on limnetic organic aggregates (lake snow)." Appl Environ Microbiol **62**(6): 1998-2005.

Widdel, F., G.-W. Kohring and F. Mayer (1983). "Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. III. Characterization of filamentous gliding *Desulfonema limicola* gen. nov. sp. nov., and *Desulfonema magnum* sp. nov." Arch Microbiol **134**: 286-294.

Winson, M. K., S. Swift, L. Fish, J. P. Throup, F. Jørgensen, S. R. Chhabra, B. W. Bycroft, P. Williams and G. S. Stewart (1998). "Construction and analysis of *luxCDABE*-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing." FEMS Microbiol Lett **163**(2): 185-192.

Wolkin, R. H. and J. L. Pate (1984). "Translocation of motile cells of the gliding bacterium *Cytophaga johnsonae* depends on a surface component that may be modified by sugars." J Gen Microbiol **130**: 2651-2669.

Wu, M. L., Y. C. Chuang, J. P. Chen, C. S. Chen and M. C. Chang (2001). "Identification and characterization of the three chitin-binding domains within the multidomain chitinase Chi92 from *Aeromonas hydrophila* JP101." Appl Environ Microbiol **67**(11): 5100-5106.

Yanisch-Perron, C., J. Vieira and J. Messing (1985). "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors." Gene **33**(1): 103-119.

Yates, E. A., B. Philipp, C. Buckley, S. Atkinson, S. R. Chhabra, R. E. Sockett, M. Goldner, Y. Dessaux, M. Cámara, H. Smith and P. Williams (2002). "N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*." Infect Immun **70**(10): 5635-5646.

Yu, C., A. M. Lee, B. L. Bassler and S. Roseman (1991). "Chitin utilization by marine bacteria. A physiological function for bacterial adhesion to immobilized carbohydrates." J Biol Chem **266**(36): 24260-24267.

Yu, H. B., R. Kaur, S. Lim, X. H. Wang and K. Y. Leung (2007). "Characterization of extracellular proteins produced by *Aeromonas hydrophila* AH-1." Proteomics **7**(3): 436-449.

Zoppini, A., A. Puddu, S. Fazi, M. Rosati and P. Sist (2005). "Extracellular enzyme activity and dynamics of bacterial community in mucilaginous aggregates of the northern Adriatic Sea." Sci Total Environ **353**(1-3): 270-286.

Danksagung

Diese Doktorarbeit wurde im Zeitraum von November 2004 bis April 2008 durchgeführt am Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie von Prof. Dr. Bernhard Schink.

Herrn Prof. Schink möchte ich für die Möglichkeit, an seinem Lehrstuhl zu promovieren, danken. Durch die hervorragenden Arbeitsbedingungen habe ich eine interessante und lehrreiche Zeit erlebt.

Herrn Dr. Bodo Philipp danke ich für die tolle Betreuung während meiner Doktorarbeit und die vielen hilfreichen Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Rothhaupt danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei allen Mitarbeitern möchte ich mich für eine tolle Zeit mit vielen Gesprächen, Kuchen und Fasnacht bedanken. Besonders Toni, Nina, Antje und Julia gilt mein Dank für die wunderbare Zeit im tollsten Labor der Welt!

Ilona Kindinger danke ich für die Unterstützung bei den Arbeiten mit *Pseudomonas aeruginosa.*

Für viele lebensrettende Tipps bei der HPLC-Analytik danke ich Nicolai Müller.

Bei Karin Denger bedanke ich mich für viele Tipps und Tricks aus meinem Ex-Labor.

Eva, Reinhard, Anne und Dennis danke ich für die Unterstützung während der gesamten Zeit.