

Physiologie nährstofflimitierter Bakterien in Membranbioreaktoren

vorgelegt von
Diplom-Biologin
Claudia Keil
aus Berlin

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

- Doktor rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. Matthias Kraume, TU Berlin

Berichter: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Szewzyk, TU Berlin

Berichter: PD Dr. rer. nat. habil. Susann Müller, UFZ Leipzig

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 23.05.2007

Berlin 2007

D83

What diverse beings, with scarcely anything in common,
and yet all belonging to the same species!

Charles Darwin 1809 - 1882

1	EINLEITUNG	1
1.1	Nährstofflimitierung und Erhaltungsstoffwechsel	1
1.2	Anpassungsstrategien von Bakterien an Nährstofflimitierung	2
1.3	Untersuchung von nährstofflimitierten Mikroorganismen	4
1.4	Membranbioreaktoren	7
1.5	Erhaltungsstoffwechsel im MBR	10
1.6	Definitionen und Methoden zur Aktivitätsbestimmung von Bakterien	11
1.7	Modellorganismus <i>Escherichia coli</i>	14
1.8	Fragestellung	16
2	MATERIAL UND METHODEN	18
2.1	Chemikalien, Organismen, Medien und Puffer	18
2.1.1	Chemikalienliste	18
2.1.2	Organismen	19
2.1.3	Medien und Puffer	21
2.1.4	Agarose-beschichtete Objektträger	25
2.2	Etablierung mobiler Membranbioreaktorsystemen zur Anreicherung mariner Mikroorganismen	26
2.2.1	Aufbau der mobilen MBR-Systeme	26
2.2.2	Vorbereitung der Anreicherung	28
2.2.3	Betriebsparameter	28
2.2.4	Kurzzeitige Aufkonzentrierung von marinem Bakterioplankton	29
2.3	Kultivierungsmethoden der Langzeit-Batch-Ansätze von <i>E. coli</i> A3 und <i>E. coli</i> K12	30
2.4	Membranbioreaktor und Batch-Ansatz für die Langzeitkultivierung von <i>E. coli</i> A3	31
2.4.1	Aufbau des MBR-Systems	31
2.4.2	Vorbereitung der Kultivierung	34
2.4.3	Betriebsparameter	34
2.4.4	Probenahme	35
2.4.5	Batch-Ansatz	35
2.5	Analysemethoden	35
2.5.1	Reinheitsuntersuchung mittels ARDRA	35
2.5.2	Fructosegehalt im Medium	38
2.5.3	Biomasseentwicklung	39
2.5.4	Aktivitätsanalysen	41
2.5.5	Proteingehalt der Zellen	49

Inhaltsverzeichnis

2.5.6 Analyse der Zellmorphologie	49
2.5.7 DNA-Gehalt der Bakterien	51
2.5.8 Fraßversuche	52
2.5.9 Proteinexpression	56
3 ERGEBNISSE	58
3.1 Entwicklung von mobilen Membranbioreaktorsystemen zur Anreicherung mariner Mikroorganismen	58
3.1.1 Langzeit-Anreicherungskultur von marinem Bakterioplankton	58
3.1.2 Kurzzeitige Aufkonzentrierung von marinem Bakterioplankton	61
3.2 Stammcharakterisierung von <i>E. coli</i> A3	61
3.2.1 Sequenzanalyse der 16S rDNA von <i>E. coli</i> A3	62
3.2.2 RiboPrint-Analyse von <i>E. coli</i> A3	63
3.3 Vergleichende Untersuchungen von <i>E. coli</i> A3 und <i>E. coli</i> K12	64
3.3.1 Maximale Wachstumsraten	64
3.3.2 Biomasseentwicklung in einem Langzeit-Batch-Ansatz	65
3.3.3 Vitalität der Zellen in einem Langzeit-Batch-Ansatz	66
3.4 Langzeitkultivierung von <i>E. coli</i> A3 im MBR und Batch-Ansatz	68
3.4.1 Sterilität der Anlagen	68
3.4.2 Fructosegehalt im Reaktormedium und Permeat	70
3.4.3 Volumenverlust des Reaktors	72
3.4.4 Entwicklung der Biomasse	72
3.4.5 Entwicklung der Aktivität der Zellen	74
3.4.6 Entwicklung des Proteingehaltes der Zellen	84
3.4.7 Entwicklung der Zellmorphologie	85
3.4.8 Entwicklung des DNA-Gehaltes der Zellen	93
3.4.9 Fraßversuche	100
3.4.10 Proteinexpression der Zellen	104
4 DISKUSSION	114
4.1 Anreicherung von marinem Bakterioplankton	114
4.2 Stammcharakterisierung von <i>E. coli</i> A3	118
4.3 Vergleichende Untersuchungen von <i>E. coli</i> A3 und <i>E. coli</i> K12	119
4.4 Langzeitkultivierungen von <i>E. coli</i> A3 in einem MBR und Batch-Ansatz	120
4.4.1 MBR-Kultivierungen	120
4.4.2 Sterilität der Systeme	121
4.4.3 Wachstum und Biomasseentwicklung der Bakterien	122
4.4.4 Physiologie der Gesamtpopulationen	125

4.4.5 Subpopulationen mit unterschiedlicher Aktivität	125
4.4.6 Subpopulationen mit unterschiedlichem DNA-Gehalt	137
4.4.7 Zellmorphologie	141
4.4.8 Fraßversuche	142
4.4.9 Proteinexpression	144
4.5 Zusammenfassung der Diskussion	148
5 AUSBLICK	152
6 ZUSAMMENFASSUNG	153
7 SUMMARY	155
8 DANKSAGUNG	157
9 LITERATURVERZEICHNIS	159

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

A	-	Adenin
Abb.	-	Abbildung
AODC	-	Acridine Orange direct count
Reinstwasser	-	Reinstwasser aus MilliQ Plus 185, Ultrapure water system, Millipore, Eschborn
ARDRA	-	Amplified ribosomal DNA restriction analysis
ASW	-	Artificial seawater
ATP	-	Adenosintriphosphat
BAH	-	Biologische Anstalt Helgoland
bp	-	Basenpaare
C	-	Cytosin
CTC	-	5-Cyano-2,3-Ditolyltetrazoliumchlorid
CTC GZZ	-	Gesamtzellzahl (ermittelt mittels DAPI Auszählung während CTC)
Cy3	-	5,5'-Disulfo-1,1'-di(γ -carbopentenyl)-3,3,3,3'-tetramethylnolocarbocyanin
Da	-	Dalton
DAPI	-	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DEFT	-	Direkte Epifluoreszenz Filtertechnik
DSMZ	-	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
FISH	-	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FISH GZZ	-	Gesamtzellzahl (ermittelt mittels DAPI Auszählung während FISH)
Durchflusszytometer GZZ	-	Gesamtzellzahl (ermittelt mittels Durchflusszytometer)
G	-	Guanin
GZZ	-	Gesamtzellzahl (ermittelt mittels DEFT)
HNF	-	Heterotrophe Nanoflagellaten
h	-	Stunden
KBE	-	Koloniebildende Einheit
MALDI-TOF MS	-	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
MBR	-	Membranbioreaktor
min	-	Minuten
MW	-	Molekulargewicht
n. a.	-	Nicht auswertbar
n. d.	-	Nicht detektierbar

Abkürzungsverzeichnis

nKBE	-	Nicht kultivierbar
n. z.	-	Nicht zuzuordnen
PCR	-	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PBS	-	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PES	-	Polyethersulfon
PMMA	-	Polymethylmethacrylat
PMSF	-	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	-	Polyvinylidenfluorid
rDNA	-	Ribosomale Desoxyribonukleinsäure
RFLP	-	Restriction fragment length polymorphism
T	-	Thymin
Tab.	-	Tabelle
TEM	-	Transmissionselektronenmikroskop(ie)
UBA	-	Umweltbundesamt
ÜNK	-	Übernachtskultur
VE Wasser	-	Voll entsalztes Wasser aus der Hausanlage FR, TU Berlin
V	-	Volt
VBNC	-	Viable but non culturable (lebend (BacLight positiv) aber nicht kultivierbar)
v/v	-	Volumen/Volumen
w/v	-	Gewicht/Volumen

1 Einleitung

1.1 Nährstofflimitierung und Erhaltungsstoffwechsel

Nicht-sporenbildende Bakterien können in der Umwelt und im Labor mit drei verschiedenen Wachstumssituationen konfrontiert werden: das „normale“, schnelle Wachstum unter nährstoffgesättigten Bedingungen (wie sie meist oder ausschließlich im Labor vorkommen), das langsame Wachstum unter nährstofflimitierenden Bedingungen sowie das Nicht-Wachstum unter Bedingungen, die ein weiteres Wachstum nicht erlauben (Wick et al. 2001). Zu letzterem zählen zum einen Bakterien, die unter nährstofflimitierenden Bedingungen Hungerstadien ausbilden, welche aber noch einen aktiven Erhaltungsstoffwechsel betreiben sowie zum anderen Ruhestadien oder schlafende Zellen, die einen reduzierten Stoffwechsel aufweisen (Dormanz).

Die Untersuchung natürlicher Habitats ergab, dass in vielen, vielleicht in den meisten natürlichen Lebensräumen von Bakterien die Verfügbarkeit von Nährstoffen limitiert ist (Koch 1971; Molin und Givskov 1999; Morita 1986); diese Habitats werden auch als oligotroph bezeichnet (Morita 1997). Der Begriff „oligotroph“ wurde erstmals 1907 eingeführt (Weber 1907) und bezeichnete limnische Ökosysteme mit geringem Nährstoffgehalt. Später wurde der Begriff oligotroph in der Limnologie hauptsächlich auf Phytoplankton bezogen und beschrieb Gewässer mit einem geringen Gehalt an anorganischen Nährstoffen (Naumann 1919). Im heutigen Sprachgebrauch wird der Begriff oligotroph auch für Habitats mit geringer DOM (dissolved organic material) und DOC (dissolved organic carbon) Konzentration verwandt und heterotrophe Bakterien, die auch bzw. nur auf gering konzentrierten Medien wachsen als „oligotrophe Bakterien“ bezeichnet (Morita 1997). Typische Beispiele für solche nährstofflimitierten Lebensräume sind der offene Ozean, die Tiefsee, das Grundwasser, viele Böden und Seen. Aber auch künstliche Wassersysteme, wie z. B. in technischen Anlagen oder Trinkwassersysteme stellen nährstoffarme Habitats dar, in denen die Konzentrationen von nutzbarem Kohlenstoff im Bereich weniger $\mu\text{g l}^{-1}$ liegt (Egli 1995). Da die meisten Habitats als oligotroph anzusehen sind, befindet sich ein Großteil der Mikroorganismen in der Natur in einer Art nicht-wachsendem Hungerzustand (Morita 1986). In diesem Hungerzustand fließt der Hauptteil der Energie und des aufgenommenen Kohlenstoffs in den Erhaltungsstoffwechsel (maintenance energy demand) und nur ein kleiner Teil in die, wenn überhaupt vorhandenen, geringen Wachstumsprozesse. Die Prozesse des Erhaltungsstoffwechsels beinhalten unter anderem die Regulation des intrazellulären pH Wertes, des osmotischen Druckes, die Energetisierung der Zellmembran, die Motilität sowie die Reparatur und den Umsatz von Makromolekülen (Beyeler et al.

1984; Low und Chase 1999). Der Energie- und Kohlenstoffbedarf für diese Prozesse stellt dabei keinen konstanten Wert dar, sondern variiert mit der Wachstumsrate der Bakterien (del Giorgio und Cole 1998; Drews und Kraume 2007; Ferenci 1999a). Während des logarithmischen Wachstums macht der Energiebedarf des Erhaltungsstoffwechsels nur einen sehr geringen Prozentsatz aus, der Großteil der Energie wird für Wachstumsprozesse verwendet. Allerdings nimmt der Absolutwert des Koeffizienten, der den Erhaltungsstoffwechsel beschreibt, mit stark sinkender Wachstumsrate ($< 10 \% \mu_{max}$) ab (Drews und Kraume 2007; Tros et al. 1996; van Verseveld et al. 1984).

In limnischen und marinen Systemen steigt der Anteil des assimilierten Kohlenstoffs, der von pelagischen Bakterien für den Aufbau von Biomasse verwendet wird (BGE = bacterial growth efficiency), mit steigendem Nährstoffgehalt des Wassers an. So beträgt beispielsweise die BGE für pelagische Bakterien im Nord-Atlantik 4 - 5 %, in deutschen Seen 17 - 22 %, in Küstengewässern 10 - 30 % und Ästuaren sogar bis zu 60 % (del Giorgio und Cole 1998). Dies bedeutet, dass in oligotrophen Gewässern, wie dem offenen Ozean, bis zu 95 % des assimilierten Kohlenstoffs nicht für Wachstumsprozesse verbraucht, sondern für einen Erhaltungsstoffwechsel verwendet werden.

Die nährstofflimitierten Mikroorganismen, beispielsweise im offenen Ozean, sind dabei metabolisch nicht inaktiv sondern partizipieren am Kohlenstoffkreislauf, sie sind also nicht in einem Ruhestadium (dormant) sondern haben ihr Wachstum nur sehr stark verlangsamt bzw. fast völlig eingestellt. Für marine Bakterien wurden in situ Generationszeiten von bis zu 144 Tagen beschrieben (Zweifel und Hagström 1995). Viele dieser Bakterien sind allerdings in der Lage, sich bei erneuter Verfügbarkeit von Substraten in kurzer Zeit umzustellen und erneute Proliferationstätigkeit aufzunehmen. Dieses Nicht-Wachstum kann also als ein Stadium im natürlichen Lebenszyklus von Bakterien angesehen werden (Kjelleberg et al. 1993).

1.2 Anpassungsstrategien von Bakterien an Nährstofflimitierung

Obwohl nährstofflimitierende Bedingungen in der Natur recht weit verbreitet sind, ist bisher nur wenig über die Physiologie und die Anpassungsstrategien der in oligotrophen Lebensräumen vorkommenden Bakterien bekannt. Bisherige Untersuchungen zeigten, dass die in oligotrophen Lebensräumen vorkommenden Mikroorganismen unter diesen Bedingungen verschiedene Überlebensstrategien entwickeln können. So führt die durch Ausbildung eines Stieles geschaffene Oberflächenvergrößerung bei dem gram-negativen Alphaproteobakterium *Caulobacter crescentus* unter Phosphat-limitierenden Bedingungen zu einer Verbesserung der Nährstoffaufnahme (Ireland et al. 2002; Wagner und Brun 2007). Eine andere typische Veränderung der Bakterienmorphologie unter Substratlimitie-

rung im Pelagial des Meeres ist die Ausbildung von kleineren, abgerundeten Zellen, sog. „Zwergen“ mit einem Zelldurchmesser von weniger als 0,3 μm (dwarfs) (Dawson et al. 1981) oder von Ultramikrobakterien, die scheinbar zum Teil aus Reduktionsteilungen hervorgegangen sind (Novitsky und Morita 1978; Torrella und Morita 1981). Ein Vorteil einer Verringerung der Zellgröße unter limitierenden Bedingungen wurde in einem verbesserten Verhältnis von Zelloberfläche zum Zellvolumen gesehen. Neben Veränderung der Morphologie sind bei Bakterien eine Reihe weiterer Anpassungen an extrem limitierende Bedingungen beobachtet worden, unter anderem die Anheftung an Oberflächen (Biofilmbildung), um dort adsorbierte organische Moleküle verwerten zu können (Freeman und Lock 1995). Mit der Entdeckung, dass sich Zellen gut beschriebener und normalerweise auch gut kultivierbarer Bakterienstämme unter limitierenden Bedingungen in natürlichen Habitaten in Formen umwandeln können, die nicht mehr mit Standardmethoden kultiviert werden können (VBNC = viable but nonculturable), gab es einen weiteren Hinweis auf entsprechende Adaptionen von Zellen in der Umwelt (Rollins und Colwell 1986). So gut wie alle heute routinemäßig angewandten Screeningmethoden für pathogene Bakterien, z. B. nach Coliformen als Indikatororganismen für fäkale Verunreinigungen in Badegewässern, basieren auf kultivierungsabhängigen Methoden, die damit nicht erkannte, aber dennoch teils infektiöse VBNC Stadien zu einem Gesundheitsrisiko werden lassen (Amel et al. 2007; Huq et al. 2000; Lleo et al. 2005; Roszak und Colwell 1987; Xu et al. 1982). Weitere physiologische Anpassungsstrategien von Bakterien an nährstoffarme Lebensräume basieren auf veränderten Enzymaktivitäten. So wurden Proteine mit einer erhöhten Affinität für Aminosäuren für deren verstärkte Aufnahme aus einem nährstoffarmen aquatischen Habitat verantwortlich gemacht (Griffith und Haight 1973). Auch die Anzahl der für die Nährstoffaufnahme verantwortlichen membrangebundenen Permeasen nimmt unter Substratlimitierung zu, so lässt sich bei *Escherichia coli* unter Glucose-Limitierung eine 20fach verstärkte Expression des OmpF Proteins beobachten, das große Pore in der äußeren Membran ausbildet (Liu und Ferenci 1998). Des Weiteren wurde unter Kohlenstofflimitierung bei Bakterien eine Zunahme des katabolischen Enzymspektrums nachgewiesen, obwohl der zugehörige organische Auslöser im Medium nicht vorhanden war (Egli 1995). Weiterhin wurden sowohl eine Selektion von Mutanten mit einer höheren Glucoseaffinität und einer Hochregulierung der Transportgene für Glucose als auch eine Umgestaltung des zentralen Metabolismus sowie einer Herunterregulierung der Gene der RpoS-abhängigen generellen Stressantwort bei Langzeit-angepassten *E. coli* (> 200 Generationen) mit einer relativ niedrigen Wachstumsrate in einem Chemostaten beobachtet (Franchini 2006).

1.3 Untersuchung von nährstofflimitierten Mikroorganismen

Der Gedanke, dass von Mikroorganismen aufgenommenes Substrat sowohl für Wachstumsprozesse als auch zum Erhalt der Zelle genutzt wird, wurde schon recht früh publiziert (Duclaux 1898 zitiert in van Loosdrecht und Henze 1999). Es dauerte weitere 50 Jahre bis Monod seine ersten experimentellen Beweise dafür veröffentlichte, dass der Ertrag der Zellen von ihrer Wachstumsrate abhängt (Monod 1950 zitiert in van Loosdrecht und Henze 1999). Ähnliche Experimente führten schließlich zur Vorstellung des Erhaltungsstoffwechsel-Konzepts (Pirt 1965). Dies besagt, dass ein gewisser Anteil des Substrats allein für das Überleben der Zelle und nicht zur Reproduktion von Zellmaterial erforderlich ist, also nur Energie zum Überleben der Zellen liefert.

Messungen der Kinetik mikrobiologischer Kultivierungen wurden häufig in Chemostaten durchgeführt, da diese stationär bei einer gewünschten Wachstumsrate betrieben werden können. Dabei zeigte sich unter anderem, dass der Ertrag (produzierte Zellmasse pro verbrauchtes Substrat) mit sinkender Wachstumsrate abnahm (van Loosdrecht und Henze 1999). Zur Untersuchung von Phänomenen bei sehr geringen Wachstumsraten oder Nullwachstum ist der Chemostat jedoch nicht geeignet, da die Wachstumsrate mindestens so hoch sein muss wie die Durchflussrate und demnach immer geringes Wachstum auftritt. Die Grenze der Durchführbarkeit liegt hier bei einer Wachstumsrate von etwa $0,01 \text{ h}^{-1}$ (Tappe et al. 1996; van Loosdrecht und Henze 1999; van Verseveld et al. 1984), bei kleineren Verdünnungsraten ist ein kontinuierlicher Zu- bzw. Abstrom technisch nicht mehr zu gewährleisten. Eine Extrapolation der in Chemostaten erzielten Ergebnissen in den Bereich des Nullwachstums ist allerdings riskant, da die Organismen eine gravierende Umstellung des Stoffwechsels durchführen (Drews und Kraume 2007; van Loosdrecht und Henze 1999; van Verseveld et al. 1984). Selbst bei Glucose-limitierten Chemostat-Kulturen mit noch relativ hohen Wachstumsraten von $0,3 \text{ h}^{-1}$ wurden bei *E. coli* Änderungen des Stoffwechsels auf Ebene der Genexpression mit Microarrays im Vergleich zu einem nicht limitierten Batch-Ansatz nachgewiesen (Franchini und Egli 2006).

Es wurden daher in der Vergangenheit unterschiedliche Ansätze verfolgt, um Bakterien unter extrem wachstumslimitierenden Bedingungen zu kultivieren. Dabei lassen sich grundsätzlich Batch-Verfahren von kontinuierlichen Verfahren unterscheiden (Tab. 1).

Tab. 1: Kultivierungsverfahren zur Untersuchung von Mikroorganismen im Nullwachstum

Batch-Verfahren		Kontinuierliche Verfahren	
Inkubationsbedingungen	Beispiel	Inkubationsbedingungen	Beispiel
Stationäre Phase	Batch-Verfahren	Adsorbierte Biomasse	Biofilmreaktoren Mikro(hohl)kugeln
Starvation Versuche	Zellen werden am Ende der Wachstumsphase geerntet und in nährstoffreies Medium übertragen	Sedimentation	Absetzbecken
Unterdrücktes Wachstum	Durch Zugabe toxischer Substanzen wird Wachstum unterdrückt	(Membran)Filtration	Membranbioreaktoren (MBR)

Da in den Batch-Verfahren typischerweise kein Substrat mehr zugeführt wird, sinkt aufgrund des Verbrauchs von Nährstoffen bzw. wegen der Akkumulation von Stoffwechselendprodukten die Wachstumsrate der Mikroorganismen. Die Bakterien müssen also auf Speicherstoffe und auf Nährstoffe zurückgreifen, die bei der Lyse abgestorbener Zellen frei werden (cryptic growth, kryptisches Wachstum) (Mason et al. 1986; Ryan 1959). Mit Hilfe dieser Batch-Verfahren wurde der Übergang der Bakterienzellen aus der exponentiellen in die stationäre Phase sehr genau untersucht. Hauptaugenmerk dieser Untersuchungen war der Übergangsbereich und der Beginn der Phase des Nicht-Wachsens. In der Phase des langsamen Wachstums und der beginnenden stationären Phase bzw. des abrupten Übergangs von Wachstum zum Hunger (starvation) wurden zahlreiche Untersuchungen zur Veränderung der Physiologie und Morphologie sowie deren Regulation durchgeführt (Hengge-Aronis 2002a; Hengge-Aronis 2002b; Kolter et al. 1993; Kolter 1999; Moreau 2004; Schweder und Hecker 2004; Siegele und Kolter 1992). Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde ein komplexes Regulationsnetzwerk beschrieben, das neben alternativen Sigmafaktoren auch diverse kleinere Regulatormoleküle umfasst (Repoila et al. 2003; Riva et al. 2004; Schweder und Hecker 2004; Wick und Egli 2004). Mit Auftreten dieser verschiedenen Regulatoren werden Eigenschaften der Zelle, wie z. B. Kultivierbarkeit, Stoffwechsel oder Empfindlichkeit gegenüber schädigenden Faktoren grundlegend verändert (Hengge-Aronis 2002b; Kabir et al. 2004). Unter diesen Bedingungen konnte unter anderem die Aktivierung des zellulären Apparates zur Abwehr von Stressfaktoren beobachtet werden. Da viele Gene aktiviert werden, die auch zum Überleben anderer Stressoren, wie Hitze, erhöhte Osmolarität oder Ethanolkonzentrationen notwendig sind, wurde die Reaktion auf eine Substratlimitierung zunehmend als reine Stressreaktion interpretiert. Dies steht jedoch im Widerspruch zu den Befunden der mikrobiellen Ökologie bei der Untersuchung oligotropher Habitats, die nahe legen, dass der Zustand

der Substratlimitierung und des Nicht-Wachstums wesentlich häufiger in der Natur vertreten sind als Wachstumsprozesse. Damit sollten nährstofflimitierende Bedingungen nicht als Stress sondern vielmehr als Normalzustand angesehen werden (Morita 1997).

Eine Zwischenstufe zwischen Batch-Kulturen und kontinuierlichen Verfahren stellen die Fed-Batch-Ansätze dar, bei denen Medium mit organischen Substraten in bestimmten Abständen der Kultur zugeführt wird. Diese diskontinuierliche Substratzugabe kann so eingestellt werden, dass die aufgenommenen Nährstoffe nur ausreichen einen Erhaltungsstoffwechsel durchzuführen.

Von diesen Batch-Verfahren deutlich abzutrennen sind die kontinuierlichen Verfahren, bei denen ständig Substrate zugeführt werden, die aufgrund der Verdünnung und des Verbrauchs durch die Mikroorganismen nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegen. Die Konzentration der Substrate ist in diesen Ansätzen so gering, dass die Zellen nicht mehr genügend Energie für Wachstumsprozesse gewinnen können, sondern nur noch einen Grundstoffwechsel zum Erhalt der Zelle betreiben (Erhaltungsstoffwechsel). Die ständige Zufuhr neuer Nährstoffe reduziert die Bedeutung des kryptischen Wachstums auf Kosten eines Teiles der Population, zugunsten eines Erhaltungsstoffwechsels der gesamten Population.

Kultivierungssysteme mit Biomasserückhalt, in denen die Mikroorganismen kontinuierlich mit gering konzentrierten Nährstoffen versorgt werden können und keine oder nur eine sehr geringe Wachstumsrate aufweisen, sind sehr gut geeignet die Physiologie von nährstofflimitierten Mikroorganismen zu untersuchen (Chesbro et al. 1990). Möglichkeiten des Zellrückhalts oder der Immobilisierung, sind wie in Tab. 1 aufgelistet z. B. Aufwuchs auf Füllkörpern, Einschluss in Mikro(hohl)kugeln, (Membran)Filtration, Sedimentation sowie akustische Filtration (Henzler und Konstantinov 2003). Kultivierungssysteme mit Biomasserückhalt, wie z. B. Membranbioreaktoren (MBR), wurden bereits erfolgreich zur Untersuchung der Physiologie und Substratkinetik im Zusammenhang mit sehr langsamem Wachstum und dem Erhaltungsstoffwechsel von *Nitrosomonas europaea* (Tappe et al. 1996; Tappe et al. 1999), von *Alcaligenes eutrophus* (Müller und Babel 1996) oder *E. coli* (Arbige und Chesbro 1982; Chesbro et al. 1979; Reeve et al. 1984) eingesetzt. Die Veröffentlichungen über *E. coli* Fermentationen in MBR beziehen sich dabei auf teilweise anaerobe Kultivierungen während eines relativ kurzen Zeitraumes von bis zu 7 Tagen, in denen die vierte Phase (siehe Kapitel 4.4.3), das Nullwachstum, noch nicht erreicht wurde. Es liegen daher noch keine physiologischen Daten von *E. coli* während des längerfristigen Null-Wachstums in einem MBR vor.

1.4 Membranbioreaktoren

Bei Membranbioreaktoren (MBR) wird eine herkömmliche, kontinuierliche Kultivierung mit einer Membrantrennstufe kombiniert, die intern oder extern angeordnet werden kann. Bei der externen Anordnung wird die Biomasse während des kontinuierlichen Betriebs über ein Mikrofiltrationsmodul geleitet, in dem das zellfreie Permeat von der Zellsuspension abgetrennt und letztere wieder zurück in den Reaktor geleitet wird. Die Biomasse steigt dabei über die Zeit an. Mit Anstieg der Biomasse nimmt auch die Nährstofflimitierung zu, da der konstante Substrateintrag von einer wachsenden Bakterienpopulation verwertet wird (Konopka 2000).

Je nach Anwendung oder Ziel der Untersuchung haben sich neben dem Begriff MBR verschiedene Bezeichnungen durchgesetzt, z. B. Retentostat (Tappe et al. 1996), Recycling-Fermenter (Lee und Chang 1987; Tros et al. 1996), Filter-Fermenter (Dostálek und Haggstrom 1982) oder Perfusionsreaktor (insbesondere im Bereich der Zellkulturtechnik (Liu et al. 2006)).

Membranbioreaktoren werden weltweit zunehmend zur Reinigung von Industrieabwässern und in jüngster Zeit auch vermehrt zur kommunalen Abwasserreinigung eingesetzt (Binder et al. 2003). Ein großer Vorteil dieses Verfahrens liegt neben der hohen Qualität des gereinigten Abwassers (auch bezüglich pathogener Parasiten, Bakterien und Viren) und dem geringen Platzbedarf der Anlage darin begründet, dass mit dem langen bzw. vollständigen Schlammrückhalt der Anteil des Überschussschlammes und die damit verbundenen Kosten und Probleme der Entsorgung des Klärschlammes stark reduziert werden können. So fielen in der EU im Jahr 2005 schätzungsweise 10,1 Millionen Tonnen Klärschlamm an, der hauptsächlich auf Deponien gelagert, verbrannt oder durch die Aufbringung auf Bodenflächen entsorgt wurde (Wei et al. 2003). Die Aufbringung des Klärschlammes auf Böden ist dabei nur bedingt möglich, da sie aufgrund der im Schlamm enthaltenen toxischen Bestandteile wie Schwermetalle, Pathogene und persistierende Schadstoffe Risiken für Mensch und Tier birgt. Die Verringerung des zur Verfügung stehenden Raumes sowie die Verschärfung der gesetzlichen Vorgaben zur Planung und zum Betrieb einer Mülldeponie haben die Kosten für Bau und Instandhaltung neuer Deponien stark erhöht. Generell ist eine Verbrennung die finale Option zur Entsorgung des Klärschlammes, bei der allerdings Asche anfällt, die aufgrund des hohen Gehalts an Schwermetallen und anderen toxischen Stoffen wiederum nur auf Deponien entsorgt werden kann. Da die Klärschlammaufbereitung und -entsorgung etwa 30 bis 60 % der gesamten Prozesskosten verursacht (Arnot und Howell 2001; Lobos et al. 2005), ist die Verminderung des Überschussschlammes bei der Abwasserreinigung auch ein wirtschaftlich inte-

ressantes Ziel, das mit verschiedenen Forschungsansätzen wie der Entwicklung und der Optimierung von MBRs, dem Einsatz von bakterivoren proto- oder metazoischen Predatoren oder dem „Lyse-kryptisches Wachstum“-Ansatz (Wei et al. 2003) sowie dem Einsatz von Entkopplern (Chen et al. 2002) verfolgt wird.

Ein weiterer Vorteil der MBR in der Abwasserbehandlung liegt in der Möglichkeit, dass sich auch die eventuell langsamer wachsenden Bakterien mit interessanten Abbauspektren im System etablieren können und nicht wie in einer konventionellen Anlage ausgewaschen werden.

In MBR wird die Verringerung des Überschussschlammes dadurch erzielt, dass unabhängig von der hydraulischen Verweilzeit des Abwassers ein hohes Schlammalter bzw. ein vollständiger Schlammrückhalt durch eine Mikrofiltrationseinheit gewährleistet wird, was zu einer hohen Schlammkonzentration führt. Die im Schlamm enthaltenen Mikroorganismen wachsen bis zu einer bestimmten Zelldichte und nutzen dabei einen immer größer werdenden Anteil der mit dem Abwasser eingetragenen Nährstoffe für ihren Erhaltungsstoffwechsel anstatt für Wachstumsprozesse. Somit wird das eingetragene Substrat nicht für den Aufbau von Biomasse in Form von Klärschlamm verwendet sondern hauptsächlich in Form von CO_2 veratmet.

Im realen Betrieb einer kommunalen Kläranlage auf MBR Basis wird immer noch in regelmäßigen Abständen ein geringer Anteil des Schlammes abgezogen. Experimentelle Ansätze zeigten jedoch, dass ein Betrieb eines MBR auch ohne Schlammabzug möglich ist: Mit einem MBR im Labormaßstab und einem externen Membranmodul konnte bei einem Betrieb mit kommunalem Abwasser die Schlammproduktion mit hohen Schlammaltern (50 bzw. 100 Tage) drastisch reduziert werden (Chaize und Huyard 1991; Drews und Kraume 2005). In einer Cross-flow MBR Pilotanlage wurde nur wenig Überschussschlamm produziert, wenn die Schlammkonzentration auf $40 - 50 \text{ g l}^{-1}$ erhöht wurde, wobei der Anteil an in Biomasse umgesetzten Kohlenstoff nur noch 6 % betrug (Muller et al. 1995). Gleichzeitig hatte der vollständige Schlammrückhalt nur geringe Auswirkungen auf die allgemeine Reinigungsleistung, so war z. B. der Gehalt an Schadstoffen (Schwermetallen) mit dem einer konventionellen Kläranlage vergleichbar. Ein MBR, der mit vorbehandeltem kommunalem Abwasser beschickt wurde, konnte ohne Schlammabzug bis zu 300 Tagen betrieben werden, so dass sich ein Gleichgewicht zwischen eingetragener Energie und dem Erhaltungsenergie-Bedarf der vorhandenen Mikroorganismen einstellte (Houten und Eikelboom 1997). Anhand einer weiteren Pilotanlage, die mit künstlichem Abwasser betrieben wurde, konnte gezeigt werden, dass sowohl der Schlammertrag als auch die Lebensfähigkeit (viability) der Biomasse generell mit steigendem Schlammalter

abnahmen (Cicek et al. 2001). Auch ein MBR im Labormaßstab, der mit realem Abwasser betrieben wurde, konnte über 150 Tage ohne die Produktion von Überschussschlamm betrieben werden, wobei die Atmungsaktivität der Biomasse abnahm (Laera et al. 2005; Pollice et al. 2004). Eine Abnahme des Sauerstoffbedarfs der Biomasse beobachteten auch die Autoren einer Studie, in der industrielles Abwasser in einem MBR mit hohen Reinigungsleistungen und ohne den Abzug von Überschussschlamm 300 Tage lang aufbereitet wurde. Die Autoren führen den geringen Sauerstoffbedarf der Biomasse auf deren Erhaltungsstoffwechsel zurück (Sun et al. 2007). In einer Pilotanlage mit einer getauchten Membran und vollständigem Schlammrückhalt wurde im Betrieb mit einer relativ hohen Schlammkonzentration von $15 - 23 \text{ g l}^{-1}$ eine Überschussschlammproduktion ebenfalls fast vollständig verhindert (Rosenberger et al. 2000). Ein Fraßdruck von höheren Organismen wie Protozoen (Flagellaten, Ciliaten) oder Metazoen (Rotatorien, Nematoden) konnte ausgeschlossen werden, so dass die Bakterien in ihrem Erhaltungsstoffwechsel für die unterbundene Überschussschlammproduktion in MBR verantwortlich gemacht wurden (Houten und Eikelboom 1997; Lobos et al. 2005; Muller et al. 1995; Rosenberger et al. 2002; Rosenberger et al. 2000; Wagner und Rosenwinkel 2000; Witzig et al. 2002). Es konnte jedoch keine Erklärung für das offensichtliche Verschwinden der Fraßfeinde gegeben werden.

Während MBR in der Abwasserreinigung und bei enzymkatalysierten Produktionen bereits seit einigen Jahren großtechnisch eingesetzt werden (Kula 2003; Rosenberger 2003; Witzig et al. 2002), konnten sie sich im Bereich der industriellen Kultivierung von Reinkulturen noch nicht durchsetzen. Eine größere Rolle spielen sie jedoch bei der Bestimmung kinetischer Zusammenhänge (Beyeler et al. 1984; Bouillot et al. 1990; Laera et al. 2005; Müller und Babel 1996; Pollice et al. 2004; Tappe et al. 1996; Tros et al. 1996). MBR sind wie auch andere Systeme mit Zellrückhalt geeignet, um Nährstofflimitierungen und niedrige Wachstumsraten zu untersuchen (Chen und LaPara 2006; Chesbro et al. 1990). Aufgrund der Möglichkeit, Mikroorganismen unter kontinuierlich limitierenden Bedingungen über längere Zeiträume zu kultivieren, sind die Lebensbedingungen denen in natürlichen Habitaten näher als in einem Batch-Ansatz oder Chemostaten. Somit lassen sich die mittels eines MBR gewonnenen Daten über den Erhaltungsstoffwechsel zu einem gewissen Maß auch auf die Situation der meisten nährstofflimitierten Mikroorganismen in der Natur übertragen.

Weitere potentielle Anwendungen von MBR in der Biotechnologie sind die (Reaktiv-) Membranextraktion zur Entfernung hemmender Produkte wie Ethanol (Burfeind und Schügerl 1999) oder die Pervaporation zur mikrobiellen Produktion flüchtiger organischer Substanzen (Lipnizki et al. 2000).

1.5 Erhaltungsstoffwechsel im MBR

Die Kinetik der Biomassevermehrung in einem MBR impliziert, dass die Wachstumsrate μ mit der Zeit abnimmt (Abb. 1). Das geringe Netto-Zellwachstum kann dabei auf zwei Ursachen beruhen: entweder wachsen alle Zellen im System mit einer sehr geringen Rate oder es existiert eine kleine Zellpopulation, die mit einer höheren Rate wächst, während sich der große Rest der Zellen so gut wie gar nicht teilt. Die meisten Daten aus Untersuchungen an MBRs suggerieren eher den ersteren Fall (Konopka 2000). In einigen Arbeiten wird nach einer anfänglichen Wachstumsphase bezüglich der Biomasse ein quasi Steady State (keine Änderung über der Zeit) erreicht (Müller und Babel 1996; Tros et al. 1996). Unter diesen Umständen sollte die Substratzufuhr allein für den Erhalt der vorhandenen Zellen genutzt werden.

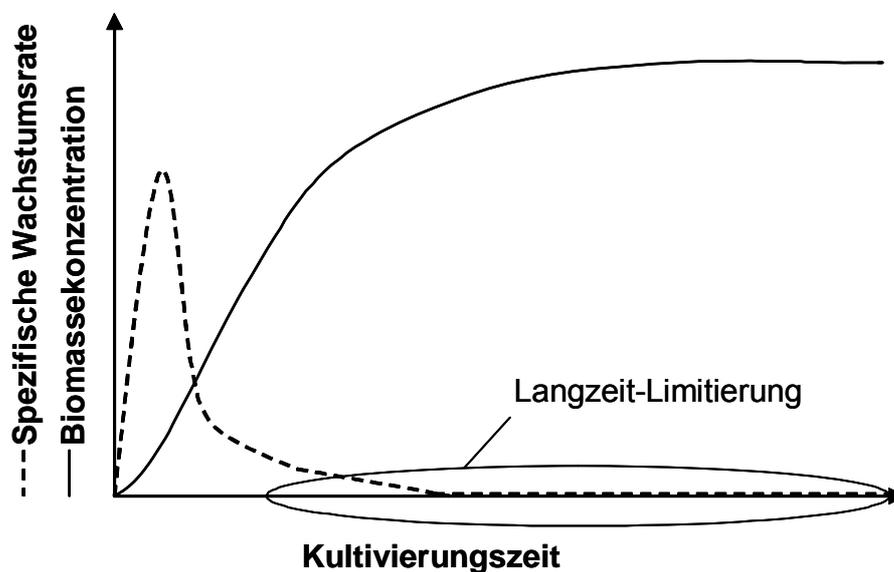


Abb. 1: Entwicklung der Biomasse und der spezifischen Wachstumsrate in einem MBR

Bisherige physiologische Untersuchungen der Biomasse aus einer mit kommunalem Abwasser gespeisten MBR-Pilotanlage ergaben, dass nur 40 – 50 % der Bakterien ein positives FISH Signal zeigten, wohingegen 80 % der Bakterien einer konventionellen Kläranlage, die mit dem gleichen Abwasser beschickt wurde, hybridisierbar waren (Witzig et al. 2002). Gleichzeitig kam es zu einer Abnahme der Protozoen in diesem MBR, welches unter anderem mit einer eventuell veränderten Physiologie der nicht-wachsenden Bakterienzellen begründet wurde (Witzig et al. 2002).

1.6 Definitionen und Methoden zur Aktivitätsbestimmung von Bakterien

Die Aktivität von Bakterien kann über verschiedene physiologische Eigenschaften erfasst werden. Grundsätzlich lässt eine im Phasenkontrast sichtbare, intakte Zelle mit dunklem Cytoplasmabereich noch keine Aussage über deren Lebensfähigkeit oder Aktivität zu. Eine *E. coli* Zelle mit hellem Cytoplasmabereich oder augenscheinlich deformierter Zellwand würde man hingegen als tot bezeichnen. In Tab. 2 sind einige Methoden zur Bestimmung der Vitalität und Aktivität von Bakterien aufgeführt.

Als ein eindeutiger Beweis der Vitalität und Aktivität einer Zelle ist die Teilungsfähigkeit von Bakterien anzusehen, die allerdings erst a posteriori analysiert werden kann. Eine Zelle kann nach dem heutigen Stand der Wissenschaft also erst nach dem Teilungsvorgang als davor potentiell teilungsfähig bezeichnet werden (Barer und Harwood 1999). Die verschiedenen Methoden zur Analyse der Physiologie einer Bakterienzelle erlauben dagegen keine Bestimmung der Teilungsaktivität sondern spiegeln bestimmte Aspekte der zellulären Physiologie bzw. des Metabolismus der Zelle wider. Daher ist eine eindeutige Bestimmung der Vitalität/Lebensfähigkeit im Sinne einer Teilungsfähigkeit der Bakterien mit physiologischen Analysemethoden nicht möglich (Barer et al. 1999; Joux und Lebaron 2000). Für eine Untersuchung von teilungsunabhängigen physiologische Eigenschaften, wie sie seit Mitte der achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts unter anderem bei den vitalen aber nicht kultivierbaren Zellen (VBNC) (Oliver 2005; Roszak und Colwell 1987) durchgeführt wurden, scheint der Einsatz von Fluoreszenz-basierten Methoden zur Bestimmung des Membranpotentials, der Membranintegrität und der intrazellulären Enzymaktivitäten für *E. coli* im Übergang zu nicht kultivierbaren Formen geeignet (Porter et al. 1995). Allerdings ist auch beschrieben, dass jede Methode unterschiedliche Ergebnisse bei der Untersuchung des aktiven Anteils einer Population liefert. Unter Stressbedingungen verlieren die Bakterien verschiedene Zellfunktionen unterschiedlich schnell, so dass es zu einer Heterogenität der Population und einer Abnahme der Aktivität der Zellen bis hin zum Verlust der Membranintegrität kommt (Joux und Lebaron 2000).

Einleitung

Tab. 2: Methoden zur Bestimmung der Vitalität und Aktivität von Bakterien

Methoden	Beispiel	Kommentar
Gesamtzellzahl	DEFT ¹ (Direkte Epifluoreszenz Filtertechnik)	Positives Ergebnis bedarf einer Mindestmenge an anfärbbarer DNA pro Zelle
Teilungsstadien	FDC ² (frequency of dividing cells)	Positives Ergebnis bedarf der Zellteilung in situ
Kultivierbarkeit	Drop Plate-Methode ³	Positives Ergebnis bedarf der Fähigkeit der Zellen sich auf einer Agarplatte zu sichtbaren Kolonien zu vermehren
Zell-Elongation	DVC ⁴ (direct viable count)	Positives Ergebnis bedarf der Fähigkeit der Zellen sich in einem Flüssigmedium mindestens einmal zu teilen
Enzyme als Substrat	Fluoresceindiacetat ⁵ Fluoresceindigalactosid ⁶ ChemChromeB ⁷	Enzymexpression ist abhängig von physiologischem Zustand
Redox-Indikatoren	CTC ⁸ INT ⁹	Positives Ergebnis bedarf metabolischer Aktivität, abhängig von intra- und extrazellulären Substraten
Reporter Gene	Induzierte β -Galaktosidase Produktion ¹⁰ GFP ¹¹	Positives Ergebnis bedarf der Transkription und Translation
Energetisierung der Cytoplasmamembran Sonden	Rhodamin 123 Aufnahme ¹² Oxanol Ausschluss ¹³	Positives Ergebnis bedarf intakter Protonenpumpen Kontrollen notwendig um zu bestätigen, dass Färbung/Ausschluss des Farbstoffs auf physiologischen Eigenschaften beruht
Elektrochemisches Transmembranpotential	Cyaninfarbstoffe	
Permeabilitäts-Sonden	Propidiumiodid ¹⁴ Ethidiumbromid Ethidiumhomodimer ¹⁵	Positives Ergebnis bedarf einer ausreichenden Membranintegrität Kein klarer cut-off, einige lebende Zellen sind permeabel
Nukleinsäure Färbung	Hoechst 33258/33342 ¹⁶ DAPI ¹⁷ SYTO series ¹⁸	Quantifizierung der Ziel-Nukleinsäure ist abhängig von dem physiologischen Zustand der Zelle
Markenrechtlich geschützte Vitalitäts-Farbstoffe	SYTOX green ¹⁹ LIVE/DEAD [®] BacLight™ Kit ²⁰	Nukleinsäurefarbstoffe mit unterschiedlicher Permeabilität für Zellen mit intakter bzw. nicht intakter Zellmembran
FISH Sonden	16S rRNA Sonden ²¹ Chromosomal painting ²²	Identifizierung von Zielorganismen bei gleichzeitiger Abschätzung des Ribosomengehaltes
Precursor Einbau	³ H-leucine Einbau mittels Autoradiographie detektiert ²³	Positives Ergebnis bedarf der Translation
Stable Isotope Probing	C ¹³ als Substrat, Einbau in DNA/RNA/Protein Dichtegradientenzentrifugation PCR/Klonierung/Sequenzierung ²⁴	Diversitätsstudien: wer ist in einem Habitat aktiv/inaktiv?

Quellen: 1 = (Hobbie et al. 1977), 2 = (Hagstrom et al. 1979), 3 = (Reed und Reed 1948), 4 = (Kogure et al. 1979), 5 = (Diaper und Edwards 1994) 6 = (Nwoguh et al. 1995), 7 = (Diaper und Edwards 1994), 8 = (Rodriguez et al. 1992), 9 = (Zimmermann et al. 1978), 10 = (Nwoguh et al. 1995), 11 = (Andersen et al. 1998; Lowder und Oliver 2001), 12 = (Kaprelyants und Kell 1992), 13 = (Jepras et al. 1995; López-Amorós et al. 1995), 14 = (Gant et al. 1993), 15 = (Kaneshiro et al. 1993), 16 = (Davey und Kell 1996), 17 = (Kepner und Pratt 1994), 18 = (Lebaron et al. 1998), 19 = (Roth et al. 1997), 20 = (Joux et al. 1997; Rigsbee et al. 1997), 21 = (Amann et al. 1995), 22 = (Davey und Kell 1996; Lanoil und Giovannoni 1997), 23 = (Nayak et al. 2005), 24 = (Haichar et al. 2007)

Die unspezifische klassische DEFT (Direkte Epifluoreszenz Filtertechnik) DAPI Färbung ist wahrscheinlich die einzige Methode, die am ehesten alle mit anderen Methoden detektierten Zellen in der vorliegenden Arbeit beinhaltet. Sie ist darüber hinaus die am weitesten verbreitete Methode zur Bestimmung der Gesamtzellzahl in aquatischen Proben und birgt gegenüber der Färbung mit Acridin Orange den Vorteil, weniger unspezifische Färbungen von verschiedenen organischen Partikeln zu erlauben (Sieracki und Viles 1992). Daher wurde die unspezifische DEFT DAPI Färbung als Referenz für die bakterielle Gesamtzellzahl herangezogen.

In dieser Arbeit wird derjenige Anteil an Zellen einer Population, der sich nicht auf LB Agar kultivieren lässt und dennoch ausreichend Membranintegrität besitzt, um ein BacLight positives Signal zu geben, als VBNC (viable but nonculturable) bezeichnet. In diese Zellen kann der DNA-Farbstoff Propidiumiodid aufgrund der Membranintegrität der Zellmembran nicht eindringen und die Bakterien geben aufgrund der Gegenfärbung mit Syto9 ein grünes Fluoreszenzsignal. Obwohl einige Autoren eine striktere Definition bevorzugen, in der die Bezeichnung VBNC nur für zeitweise auf Standardmedien nicht-kultivierbare Zellen gilt, deren Wiederbelebung eindeutig nachgewiesen werden konnte (Kell et al. 1998; Oliver 2005), wird hier dieser Ausdruck als Standardbegriff in der betreffenden Fachliteratur etwas allgemeiner gefasst (Barer und Bogosian 2004). Weitere Begriffsdefinitionen, wie sie in der vorliegenden Arbeit Verwendung finden, werden in Tab. 3 zusammengefasst.

Die Reaktion von Bakterien auf eine „Substratlimitierung“ wurde vielfach untersucht. Dabei wurde dieser Begriff in der Literatur für unterschiedliche Nährstoff- und Kultivierungsbedingungen verwendet. Als substratlimitiert wurden sowohl Zellen in „starvation“-Experimenten, in denen Zellen am Ende der Wachstumsphase geerntet und in neues Medium übertragen werden, bezeichnet als auch Bakterien in Fed-Batch-Ansätzen bzw. Batch-Ansätzen mit einer anfänglichen Glucosekonzentration von 5 mM. Auch für Zellen in Chemostaten, die sich mit einer suboptimalen Wachstumsrate vermehrten, wurde der Begriff Substratlimitierung angewandt (Ferenci 1999b; Raman et al. 2005; Wick et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit werden Bakterien, die in einem Batch-Ansatz ohne weitere Zufütterung nach der Wachstumsphase in die stationäre Phase übergehen und dort scheinbar längerfristig verbleiben als *hungernde* Zellen bezeichnet. Wenn nicht weiter spezifiziert, werden die Zellen in einem MBR, in dem sie kontinuierlich mit geringen Substratkonzentrationen versorgt werden, als *substratlimitiert* bezeichnet.

Tab. 3: Begriffsdefinitionen bezüglich der Zellaktivitätsbestimmung in dieser Arbeit (GZZ = Gesamtzellzahl)

Begriff	Methode	Bedeutung
Vermeintlich lebend/tot	LIVE/DEAD® BacLight™ Kit [% der BacLight GZZ]	BacLight positive, vermeintlich lebende Zellen besitzen eine ausreichende Membranintegrität, um den Farbstoff Propidiumiodid nicht in die Zelle eindringen zu lassen. Bei einigen Bakterienspezies wurden falsch-negative Ergebnisse beobachtet, daher werden die Zellen als „vermeintlich“ lebend bzw. tot bezeichnet.
Metabolisch aktiv	CTC [% der CTC GZZ]	CTC positive, metabolisch aktive Zellen besitzen eine relativ hohe metabolische Aktivität sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen.
Potentiell teilungsfähig	DVC (direct viable count) [% der DVC GZZ]	DVC positive, teilungsfähige Zellen sind in der Lage, sich in einem LB Flüssigmedium mit Antibiotikazusatz um das 1,5fache der Kontrollzellen zu elongieren. Daraus wird geschlossen, dass sie sich mindestens einmal hätten teilen können.
Kultivierbar	KBE Koloniebildende Einheiten) [% der DEFT GZZ]	Die KBE positiven, kultivierbaren Zellen werden mit DAPI angefärbt und sind in der Lage, sich auf LB Agarplatten so oft zu teilen, dass sie sichtbare Kolonien ausbilden.
Nicht kultivierbar	nKBE [% der DEFT GZZ]	Die KBE negativen, nicht kultivierbaren Zellen werden mit DAPI angefärbt, sind aber nicht in der Lage, sich auf LB Agarplatten so oft zu teilen, dass sie sichtbare Kolonien ausbilden.
Hybridisierbar	FISH (Fluoreszenz in situ Hybridisierung) [% der FISH GZZ]	Die FISH positiven, hybridisierbaren Zellen besitzen eine ausreichende Zahl an Ribosomen, um ein detektierbares Fluoreszenzsignal abzugeben. Dies lässt allerdings kaum Rückschlüsse auf deren Aktivität zu, da sowohl Zellen mit hoher also auch mit geringer Ribosomenzahl aktiv oder inaktiv sein können. Eine Mindestmenge an Ribosomen stellt allerdings eine Voraussetzung für die Teilungsfähigkeit einer Zelle dar.
VBNC	BacLight positiv minus KBE [% der BacLight positiven]	Die lebenden aber nicht kultivierbaren Zellen (VBNC) zeigen eine ausreichende Membranintegrität, um den Farbstoff Propidiumiodid nicht in die Zelle eindringen zu lassen bei gleichzeitiger Unfähigkeit auf LB Agar sichtbaren Kolonien zu bilden.

1.7 Modellorganismus *Escherichia coli*

E. coli ist ein gram-negatives Stäbchen, welches zur Klasse der Gammaproteobakterien gehört, keine Sporen ausbildet und in zwei unterschiedlichen Habitaten vorkommt: das primäre Habitat stellt der Darm von Warmblütlern also auch Menschen dar, von dem es durch die Abgabe von Fäzes in das sekundäre Habitat, der Umwelt gelangt und im Boden und Gewässern nachzuweisen ist. Das primäre Habitat ist dabei durch nährstoffreiche Bedingungen mit einem Überschuss an Kohlenstoffquellen und einer Sauerstofflimitierung charakterisiert, wohingegen das sekundäre Habitat als oligotroph anzusehen ist. In dieser

meist gut mit Sauerstoff versorgten Umgebung müssen sich die Zellen an die nährstoffarmen Bedingungen anpassen. Dabei galt lange Zeit das Dogma, dass in die Umwelt entlassende *E. coli* Zellen schnell absterben. In den letzten beiden Jahrzehnten wurden jedoch die Überlebensfähigkeit und das Wachstumspotential von *E. coli* sowohl in tropischen Gewässern (Jiménez et al. 1989) als auch in teilweise tropischen Sedimenten (Burton et al. 1987; LaLiberte und Grimes 1982; Solo-Gabriele et al. 2000) und in Böden gemäßigter Klimata (Ishii et al. 2006) sowie in Wasserreservoirs tropischer Epiphyten nachgewiesen (Rivera et al. 1988). Im marinen Sediment überlebten *E. coli* (ATCC 25922) mehr als 28 Tage bei 4 °C (Craig et al. 2004), in sonnengetrockneten marinen Algenmatten konnten nach über 6 Monaten bei 4 °C lebende und erneutes Wachstum aufnehmende *E. coli* Zellen beobachtet werden (Whitman et al. 2003). Dabei stieg der Anteil der überlebenden Zellen mit sinkender Temperatur (Craig et al. 2004). In filtriertem Seewasser überlebten *E. coli* (ATCC 25922) mehr als 40 Tage (Korhonen und Martikainen 1991). Insgesamt häufen sich die Berichte von autochthonen *E. coli* Populationen, die nicht aus einer Eintragsquelle stammen, sondern in den natürlichen Habitaten persistieren und sich dort auch vermehren (Byappanahalli et al. 2003; Jiménez et al. 1989; Power et al. 2005; Solo-Gabriele et al. 2000; Whitman und Nevers 2003; Winfield und Groisman 2003). Als Reaktion der Bakterien auf eine unter anderem oligotrophe Umgebung wurde auch der Übergang der *E. coli* Zellen in einen genetisch vorprogrammierten und reversiblen Ruhezustand beobachtet, in dem die Mikroorganismen lebensfähig aber nicht kultivierbar waren (Arana et al. 2004; Na et al. 2006). Solche Stadien wurden als „viable but nonculturable“ (VBNC) bezeichnet (Colwell und Grimes 2000; Na et al. 2006; Roszak und Colwell 1987; Xu et al. 1982). Ein besonderes Interesse der Trinkwasser-Mikrobiologie gilt daher auch der Fähigkeit der Bakterien in Gewässern zu überleben und sich fortzupflanzen, da *E. coli* weltweit als Indikatororganismus für fäkale Kontaminationen in Gewässern und Trinkwasserreservoirs genutzt wird (WHO 1996). Dabei indiziert das Vorkommen von *E. coli* im Wasser, dass andere, eventuell pathogene Mikroorganismen von kranken Menschen oder Tieren in die Umwelt entlassen wurden, was zu einer Ausbreitung von Krankheiten führen kann. Eine Schwierigkeit liegt dabei in der Detektion von VBNC Stadien, die mit routinemäßig angewandten Kultivierungsmethoden nicht erfasst werden und damit ein nicht unerhebliches hygienisches Gesundheitsrisiko darstellen können (Colwell und Grimes 2000). *E. coli* gehört zu den am besten untersuchten Organismen in Bezug auf seine Physiologie, seine Biochemie und seinem Genom (Blattner et al. 1997; Han und Lee 2006; Neidhardt et al. 1996). Abgesehen davon ist allerdings noch recht wenig über das Wachstum, das Konkurrenzverhalten und die Überlebensfähigkeit von *E. coli* in seinem primären und vor allem sekundären Habitat bekannt (Franchini 2006).

1.8 Fragestellung

Viele der unter nährstofflimitierenden Bedingungen ausgebildeten Zellantworten von Bakterien scheinen eng mit der Wachstumsrate der Mikroorganismen verknüpft zu sein, die die bakterielle Zelle in vielerlei Hinsicht formt: von dem DNA- und Proteinmuster, über die Zellgröße und –struktur bis hin zur biochemischen Zusammensetzung der Zelle (Bremer und Dennis 1996; Wanner und Egli 1990). Exponentiell wachsende Zellen unterscheiden sich dabei in ihrer Zellzusammensetzung von Zellen in der stationären Phase (Kolter et al. 1993; Roszak und Colwell 1987). Die Proteinzusammensetzung des Kernäquivalents, die Einfluss auf die Transkription hat, wird ebenfalls wachstumsratenabhängig reguliert, indem einige Gene nur während des Wachstums und andere nur während der stationären Phase exprimiert werden (Ali Azam et al. 1999). Weiterhin wurden unterschiedliche Subpopulationen während des Wachstums und während der stationären Phase in einem Komplexmedium beobachtet, die verschiedene Dichte aufwiesen (Makinoshima et al. 2002). Bei diesen Untersuchungen wurde allerdings nur die kurzfristige Adaption der Zellen an unterschiedliche Formen der Nährstofflimitierung untersucht, der langfristigen Anpassung von nicht-wachsenden heterotrophen Bakterien an eine Substratlimitierung, die kein Wachstum der Zellen mehr ermöglicht, wurde bisher nur wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Da der reine Erhaltungsstoffwechsel aber sowohl in der Natur als auch in technischen Systemen eine große Rolle spielt, soll er Gegenstand dieser Arbeit sein.

Während das Konzept und die Vorteile des Einsatzes von Bakterien im Erhaltungsstoffwechsel in MBR in der Umweltbiotechnologie bereits bekannt sind und zunehmend genutzt werden, ist nur wenig über das Verhalten und die Physiologie der Mikroorganismen bekannt, die diesem nährstofflimitierenden Zustand zugrunde liegen (Coello Oviedo et al. 2003; Lobos et al. 2005). Zumeist wurden die Untersuchungen z. B. an *E. coli* in einem MBR nur über einen relativ kurzen Zeitraum durchgeführt (Arbige und Chesbro 1982), damit konnte die Langzeitanpassung der Zellen an die Bedingungen im MBR jedoch noch nicht erfasst werden. In MBR zur Abwasserreinigung konnte ein Rückgang der Protozoen beobachtet werden, der auf einen vermeintlich veränderten Metabolismus der Bakterien zurückgeführt wurde (Rosenberger et al. 2002; Witzig et al. 2002).

Untersuchungen an Bakterien, die sich im nicht-wachsenden Zustand befinden, sind aber nicht nur zum Verständnis natürlicher Systeme sondern auch für die biotechnologische Nutzung interessant. Mögliche Anwendungen nicht-wachsender Zellen in der Biotechnologie sind der Abbau von Spurenverunreinigungen, die Produktion von spezifischen Sekundärmetaboliten, beispielsweise durch den Einbau von entsprechenden Genen hinter Promotoren, die hauptsächlich während des Nicht-Wachstums aktiviert sind, sowie der

Betrieb von Reaktoren ohne Biomassezunahme bei gleichzeitig guten Umsatzraten. Mit einem verbesserten Verständnis der grundlegenden Prozesse und Regulationsvorgänge beim Übergang von Wachstum zum Erhaltungsstoffwechsel sollte es auch möglich sein, gezielt die Produktion von Überschussschlamm bei der Abwasserreinigung weiter zu reduzieren.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung von verschiedenen MBR-Systemen, mit Hilfe derer die physiologischen und morphologischen Eigenschaften von nicht oder nur sehr langsam wachsenden Bakterien aus natürlichen und künstlichen Systemen mit unterschiedlichem Kohlenstoffeintrag über einen Zeitraum von einigen Wochen untersucht werden sollten. Folgende Fragestellungen standen dabei im Mittelpunkt:

1. In MBR zur Abwasserreinigung kam es zu einer konstant hohen Bakterienkonzentration bei gleichzeitiger Abnahme der Protozoen. Sind ähnliche Phänomene in MBR im Labormaßstab zu beobachten, in denen marine Mikroorganismen aus natürlichem Meerwasser angereichert werden?
2. Lassen sich in einem MBR im Labormaßstab mit einer *E. coli* Reinkultur die in der Abwasserreinigung beobachteten Phänomene, wie beispielsweise die gleich bleibend hohe Biomasse, der geringe Anteil an hybridisierbaren Zellen sowie der Rückgang der Protozoen bestätigen und erklären? Zeigt dabei das *E. coli* A3 Umweltisolat, welches in den Experimenten Verwendung finden sollte, grundsätzlich ein höheres Überlebenspotential als ein *E. coli* K12 Laborstamm?
3. Bildet sich im MBR mit *E. coli* A3 eine stabile und eher homogene oder heterogene Population aus und worin unterscheiden sich die nährstofflimitierten Bakterien aus dem MBR von hungernden Bakterien aus einem Batch-Ansatz bzw. Zellen aus der frühen stationären Phase hinsichtlich
 - ihrer Lebensfähigkeit (LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Kit)
 - ihrer Aktivität (metabolische Aktivität, CTC)
 - ihrer potentiellen Teilungsfähigkeit bzw. Kultivierbarkeit (DVC, KBE)
 - ihrer Hybridisierbarkeit (FISH)
 - ihrer Reaktivierbarkeit (erneutes Zellwachstums in neuem Medium)
 - ihrer Zellmorphologie (Fluoreszenzmikroskopie)
 - ihres DNA-Gehaltes (Durchflusszytometrie)
 - ihres Proteinmusters (2D-Gelelektrophorese, MALDI-TOF MS) sowie
 - ihrer Verwertbarkeit für Protozoen (Fraßversuche)?

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Organismen, Medien und Puffer

2.1.1 Chemikalienliste

Tab. 4: Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Firma
Agar (Bacto™ Agar)	Becton, Dickinson & Co., Le Pont de Claix (F)
Agarose (Agarose-beschichtete OT, Agarosegele)	Genaxxon, BioScience GmbH, Biberach
Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄), p. a.	Roth, Karlsruhe
Araldit	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid (CaCl ₂ × 2 H ₂ O), p. a.	Merck, Darmstadt
Bleinitrat (Pb(NO ₃) ₂)	Merck, Darmstadt
Colchicin (C ₂₂ H ₂₅ NO ₆)	Sigma, Deisenhofen
Citifluor (Glycerol solution AF2)	Citifluor Ltd, London (UK)
CTC (5-Cyano-2,3-Ditolyltetrazoliumchlorid)	Polysciences, Eppelheim
Cycloheximid (C ₁₅ H ₂₃ NO ₄)	Sigma, Deisenhofen
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid)	Sigma, Deisenhofen
DDSA (Härter für TEM Probenaufbereitung)	Agar Scientific, Stansted (UK)
D-Fructose (C ₆ H ₁₂ O ₆), für die Mikrobiologie	Roth, Karlsruhe
D-Glucose / D-Fructose Test Kit	R-Biopharm AG, Darmstadt
2,3-Dihydroxybenzoesäure (DHB)	Sigma, Deisenhofen
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄), p. a.	Sigma, Deisenhofen
DMP30 (Beschleuniger für TEM Probenaufbereitung)	Agar Scientific, Stansted (UK)
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure, C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	Sigma, Deisenhofen
Eisenchlorid (FeCl ₃ × 6 H ₂ O), p. a.	Merck, Darmstadt
Eisessig (C ₂ H ₄ O ₂)	Roth, Karlsruhe
Ethanol, 96 %, vergällt	Merck, Darmstadt
Ethanol, 96 %, unvergällt für TEM	Roth, Karlsruhe
Ethanol, 96 %, unvergällt mit Molekularsieb 3 Å	Roth, Karlsruhe
Formaldehydlösung (CH ₂ O), 37 %, p. a.	Merck, Darmstadt

Chemikalie	Firma
Formamid (CH ₃ NO), > 99,0 %, p. a.	Roth, Karlsruhe
Glutardialdehyd (C ₅ H ₈ O ₂) [25 %]	Sigma, Deisenhofen
Immersionsöl (Immersol 518 F)	Zeiss, Jena
LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability kit	Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ × 6 H ₂ O), p. a.	Merck, Darmstadt
Natriumcacodylat (C ₂ H ₆ AsNaO ₂ × 3 H ₂ O)	Serva, Heidelberg
Natriumchlorid (NaCl), p. a.	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat (Na ₃ (C ₆ H ₅ O ₇) × 2 H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Proteose Peptone No.3, Bacto™	Becton, Dickinson & Co., Le Pont de Claix (F)
Protoxkit F™	MicroBio Tests Nazareth (B)
Reef Crystal (Artificial Seawater, ASW)	Aquarium Systems, Mentor, OH (USA)
Salzsäure (HCl), 0,1 M	Roth, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat, C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	Sigma, Deisenhofen
Sudan-Schwarz (Sudan black)	Sigma, Deisenhofen
Tris base (Tris[hydroxymethyl]aminomethan)	Merck, Darmstadt
Trypton	Roth, Karlsruhe
Uranylacetat ((CH ₃ COO)UO ₂ × 2 H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Volvic Wasser	Danone Waters, Wiesbaden

2.1.2 Organismen

In dieser Arbeit kamen neben den marinen Mikroorganismen aus pelagischem Meerwasser vor der Küste Helgolands (54° 11' N, 7° 53' O) zum einen die beiden Bakterienstämme *Escherichia coli* K12 und *E. coli* A3 sowie der eukaryotische Einzeller *Tetrahymena thermophila* als bakterivorer Ciliat zum Einsatz.

2.1.2.1 Marine Mikroorganismen

In den Anreicherungen von pelagischem Meerwasser wurden neben marinen Bakterien auch Protozoen, wie Nanoflagellaten, Ciliaten und Amöben sowie Metazoen wie Nematoden kultiviert.

2.1.2.2 Bakterium *E. coli* K12

Der Laborstamm *E. coli* K12 wurde erstmals von Migula 1895 beschrieben und über die DSMZ käuflich erworben (DSM Nr. 498, ATCC Nr. 23716).

2.1.2.3 Bakterium *E. coli* A3

Das Umweltisolat *E. coli* A3 wurde aus einem Oberflächengewässer in Berlin auf Chromocult-Coliformen-Agar isoliert (Neitzel 2002). Es erwies sich in ersten Untersuchungen als relativ robust gegenüber verschiedenen Umweltfaktoren, so zeigte der Stamm eine Resistenz gegenüber Coliphagen (Coliphage f2, Coliphage 138, Coliphage 241, Dizer, UBA 2005 persönliche Mitteilung) und war in der Lage, langfristig in Sandfiltern zu persistieren, in denen er nach 50 Tagen noch mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung nachgewiesen werden konnte (Koch 2005). Darüber hinaus wurde mittels PCR ausgeschlossen, dass dieser Stamm Träger der Shigatoxin-Gene stx1 und stx2 ist, wie sie für den Pathotypen EHEC (Enterohämorrhagische *Escherichia coli*) charakteristisch sind (Neitzel 2002).

2.1.2.4 Sequenzierung der 16S rDNA und RiboPrint-Analyse von *E. coli* A3

Das Umweltisolat *E. coli* A3 wurde anhand der Sequenz der 16S rDNA phylogenetisch eingeordnet. Dazu wurde die 16S rDNA mit Hilfe des Primerpaares 616 vorwärts und 1492 rückwärts mittels PCR amplifiziert und sequenziert (Dr. Martin Meixner, Firma SMB, Berlin) und durch Vergleich der erhaltenen Sequenzdaten mit der EMBL Nukleotidsequenz-Datenbank identifiziert.

Zur weiteren Einordnung des Stammes *E. coli* A3 innerhalb der *E. coli* Stämme der DSMZ wurde zum anderen von Dr. Peter Schumann in der DSMZ, Braunschweig, ein RiboPrint erstellt (Bruce 1996; Bruce et al. 1995; Webster et al. 1994). Dazu wurden mit Hilfe des QualiconTM RiboPrinter Systems (Wilmington, DE, USA), die Zellen lysiert, mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut und die DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Im Anschluss daran wurden die DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer chemolumineszenten *rrnB* Operon Sonde (aus *E. coli* generiert) hybridisiert. Die das *rrnB* Operon tragenden Banden wurden aufgrund ihrer chemolumineszenten Markierung mittels einer computergesteuerten Bildanalyse detektiert und deren Muster mit den Daten der DuPont Identification Library verglichen.

2.1.2.5 Konservierung der Bakterienstämme

Die Konservierung der Bakterienstämme erfolgte bei – 80 °C. Zur Erstellung der Kryokulturen wurden die Mikroorganismen in LB Medium bei 37 °C bis zu einer OD_{600 nm} (DU-64 Spectrophotometer, Beckman Coulter, Krefeld) von mindestens 0,3 angezogen, in Kryoröhrchen mit sterilem Glycerin (10 % Endkonzentration) versetzt und nach einer kurzen Homogenisierung 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um den Schutzstoff in die Zelle eindringen zu lassen. Im Anschluss wurden die Zellen in Flüssigstickstoff schockgefroren und im Gefrierschrank bei – 80 °C aufbewahrt. Zur Reaktivierung und zum Einsatz in den Kultivierungsexperimenten wurde die gefrorene Bakteriensuspension auf eine LB-Agarplatte ausgestrichen und nach einer Inkubation von 24 h bei 37 °C wurde eine Einzelkolonie zum Animpfen einer Übernachtskultur in LB Medium (15-17 h) verwendet. Aus dieser Übernachtskultur erfolgte dann wiederum das Animpfen der verschiedenen Kultivierungsansätze.

2.1.2.6 Ciliat *Tetrahymena thermophila*

Der Ciliat *Tetrahymena thermophila* wurde freundlicherweise von Dr. W. Pauli, FU Berlin zur Verfügung gestellt.

Die axenische Dauerkultur von *T. thermophila* erfolgte in einem Reagenzglas auf autoklavierten Kichererbsen bei Raumtemperatur. Dazu wurde eine Kichererbse in 10 ml Reinstwasser pro Reagenzglas eingesetzt, 20 min bei 121 °C autoklaviert, unter sterilen Bedingungen beimpft und für 3 Tage bei 33 °C inkubiert. Das Überimpfen der Dauerkulturen erfolgte alle 3 Monate.

2.1.3 Medien und Puffer

2.1.3.1 Reinstwasser

Reinstwasser wurde einer Umkehrosmose-Anlage MilliQ Plus 185 (Ultrapure Water System, Millipore, Eschborn) entnommen.

2.1.3.2 AB Mineralmedium

Sowohl für Fermentationen in den Membranbioreaktoren als auch für jeweils parallel laufende Batch-Kultivierungen wurde das mit Fructose versetzte AB Mineralmedium modifiziert nach Clark und Maaloe (1967) eingesetzt (Tab. 5). Die darin enthaltenen Substanzen wurden in zwei Komponenten getrennt voneinander autoklaviert, um ein Ausfallen der Salze zu verhindern. Die Salze der Medienkomponente B (Tab. 5) wurden in Reinstwas-

Material und Methoden

ser gelöst, auf 500 ml aufgefüllt und autoklaviert. Diese Stammlösungen wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt und Aliquote ausschließlich unter sterilen Bedingungen entnommen.

Tab. 5: Zusammensetzung des AB-Mineralmediums, modifiziert nach Clark und Maaloe 1967

Komponenten	Konzentration [mmol l ⁻¹]	Masse bzw. Volumen in 1 l	Masse bzw. Volumen in 20 l	Konzentration Stammlösung	
A	Na ₂ HPO ₄	42,250	6,000 g	120,000 g	
	KH ₂ PO ₄	22,040	3,000 g	60,000 g	
	((NH ₄) ₂ SO ₄)	15,140	2,000 g	40,000 g	
	NaCl	51,330	3,000 g	60,000 g	
	Na ₂ SO ₄	0,077	0,011 g	0,220 g	
B	MgCl ₂ × 6 H ₂ O	0,984	1,0 ml	20,0 ml	200 g l ⁻¹
	CaCl ₂ × 2 H ₂ O	0,068	1,0 ml	20,0 ml	10 g l ⁻¹
	FeCl ₃ × 6 H ₂ O	0,002	1,0 ml	20,0 ml	0,5 g l ⁻¹
Fructose	11,100	5,0 ml	40,0 g	400 g l ⁻¹	

Herstellung von 1 l AB Mineralmedium

Die Salze der Komponente A wurden in Reinstwasser gelöst und auf 500 ml aufgefüllt. Von den Stammlösungen der Komponente B wurden je 1 ml zu 497 ml Reinstwasser in einer 1 l Schottflasche pipettiert. Die beiden Medienkomponenten wurden getrennt autoklaviert. Nach Abkühlen der Flüssigkeiten wurde die Komponente A zur Komponente B zugegeben und vermischt. Vor Gebrauch des Mediums wurden 5 ml einer 40 % (w/v) Fructoselösung steril dem Medium zugeführt.

Herstellung von 20 l AB Mineralmedium

Die Salze der Komponente A wurden in Reinstwasser gelöst, auf 4 l aufgefüllt und in einer 5 l Schottflasche 40 min bei 121 °C autoklaviert. Von den Stammlösungen der Medienkomponente B wurden jeweils 20 ml zu 16 l Reinstwasser in einer 20 l Flasche (Nalgene, Hereford, UK) mit einer Glaspipette steril zugegeben. Die Medienkomponente B wurde 120 min bei 121 °C autoklaviert. Mit Hilfe von Druckluft, die über ein autoklaviertes Wattegefäß geführt wurde, konnte die Medienkomponente A aus der 5 l Flasche über einen Luerlock-Anschluss in die 20 l Flasche überführt werden. Vor Gebrauch des Mediums wurden 40 g Fructose in 100 ml Reinstwasser gelöst, über einen Spritzenvorsatzfilter

(0,2 µm Porengröße, Minisart, Sartorius, Göttingen) steril in die Medienflasche eingespritzt und im Anschluss durch Schütteln des Gefäßes mit dem Medium vermischt.

2.1.3.3 LB Medium

LB Medium (Luria Bertani) wurde für die Übernachtskulturen, für die Aktivierungen bei der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) sowie in Form von Agarplatten für die Bestimmung der Koloniebildenden Einheiten (KBE) genutzt.

Für die Herstellung des LB Mediums wurden die Medienkomponenten (Tab. 6) in Reinstwasser gelöst, der pH-Wert auf 7,0 eingestellt (Handylab 2BNC, Schott AG Mainz) und auf 1 l aufgefüllt. Nach eventueller Zugabe des Agars wurde der Ansatz für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

Tab. 6: Zusammensetzung des LB Mediums nach Sambrook und Russel 2001

Komponente	Konzentration [g l ⁻¹]
Trypton	10
Hefeextrakt	5
NaCl	10
Agar	15,5

2.1.3.4 PPY Medium

Zur Herstellung des für die axenische Kultivierung der Protozoen genutzten PPY Mediums [1 % (w/v) Proteose Pepton, 0,15 % (w/v) Hefeextrakt] wurden 10 g Proteose Pepton und 1,5 g Hefeextrakt in 1 l Reinstwasser gelöst und bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

2.1.3.5 PBS Puffer

PBS (phosphate buffered saline) fand unter anderem bei der Verdünnung von Zellsuspensionen Verwendung. Die Salze wurde wie in Tab. 7 dargestellt abgewogen und in 800 ml Reinstwasser gelöst.

Tab. 7: Zusammensetzung des PBS Puffers Sambrook und Russel 2001

Komponente	Konzentration [mM]	Konzentration [g l ⁻¹]
NaCl	137	8
KCl	2,7	0,2
Na ₂ HPO ₄	10	1,44
KH ₂ PO ₄	2	0,24

Der pH Wert wurde auf 7,4 eingestellt und das Volumen mit Reinstwasser auf 1 l aufgefüllt. Der Puffer wurde aliquotiert, bei 121 °C für 20 min autoklaviert und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.1.3.6 TAE Puffer

TAE Puffer wurde sowohl zur Herstellung von Agarosegelen benötigt als auch während der Gelelektrophorese in den Kammern eingesetzt. Zur Herstellung von TAE Puffer (50 ×) wurden 242 g Tris-base in 500 ml Reinstwasser gelöst, 57,1 ml Eisessig und 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8) zugegeben und mit Reinstwasser auf 1 l aufgefüllt (Sambrook und Russel 2001). Zur Herstellung der Agarosegele und des Laufpuffers für die Elektrophoresekammer wurde der Puffer 1:50 verdünnt.

2.1.3.7 NaCl-Phosphat Puffer

Der NaCl-Phosphat Puffer enthielt 0,4 M Na₂HPO₄ und Na₂H₂PO₄ sowie 150 mM NaCl bei einem pH von 7,2.

2.1.3.8 Lysepuffer

Für die Gesamtproteinbestimmung und zur DNA-Extraktion wurden die Zellen mittels einer alkalischen Lyse aufgeschlossen. Der dazu benötigte Puffer wurde jeweils frisch hergestellt. Dazu wurden 25 µl 10 % SDS mit 50 µl 1 M Natronlauge und 925 µl Reinstwasser gemischt.

2.1.3.9 Cacodylatpuffer

Zur Herstellung des 0,2 M Cacodylatpuffers wurden 8,56 g Natriumcacodylat in 100 ml Reinstwasser gelöst, auf einen pH von 7,2 eingestellt und mit Reinstwasser auf 200 ml aufgefüllt.

2.1.3.10 2D-Puffer

Der Puffer, in dem die Zellen für die 2D-Gelelektrophorese mittels Ultraschall aufgeschlossen wurden, enthielt 10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA sowie 0,3 mg ml⁻¹ PMSF.

2.1.3.11 Steriles Reinstwasser / Seewasser

Für die Herstellung von sterilem Reinstwasser, wie es für verschiedene Methoden wie der Gesamtzellzahlbestimmung zur Anwendung kam, wurde MilliQ Wasser (MilliQ Plus 185, Ultrapure water system, Millipore, Eschborn) bei 121 °C für 20 min autoklaviert und anschließend mittels eines Spritzenvorsatzfilters (0,1 µm, Minisart, Sartorius, Göttingen) in autoklavierte Schottflaschen aliquotiert.

Bakterienfreies Seewasser wurde gewonnen, indem Seewasser zunächst autoklaviert und im Anschluss ebenfalls in autoklavierte Schottflaschen sterilfiltriert wurde (0,1 µm, Minisart, Sartorius, Göttingen).

2.1.4 Agarose-beschichtete Objektträger

Für die mikroskopische Betrachtung von Bakterien wurden mit Agarose (4 %) beschichtete Objektträger verwendet. Für deren Herstellung wurden 2 g Agarose in 50 ml Reinstwasser in der Mikrowelle gelöst und im Wasserbad bei 60 °C flüssig gehalten (Pfennig und Wagener 1986). Mittels einer Pipette wurde 1 ml flüssige Agarose auf einen Objektträger pipettiert und großflächig verteilt. Nachdem die Agarose getrocknet war, konnten die Objektträger in einer Aufbewahrungsbox bei Raumtemperatur gelagert werden. Das Aufbringen der Zellsuspension auf beschichtete Objektträger führt zum Aufquellen der Agarose und damit dazu, dass sich bei der mikroskopischen Untersuchung der überwiegende Teil der Zellen in einer Fokusebene und zusätzlich in einer Seitenansicht befindet, so dass man sie gut darstellen und vermessen kann (Abb. 44).

Sudan-Schwarz Agarose-beschichtete Objektträger

Bei der Fluoreszenzmikroskopie ist die Eigenfluoreszenz der Agarose ein Störfaktor, der dadurch kompensiert werden kann, dass Sudan-Schwarz bei der Präparation der Objektträger hinzu gegeben wird. 25 ml einer ethanolischen 2 g l⁻¹ Sudan-Schwarz Lösung (Pfennig und Wagener 1986) wurden mit 25 ml Reinstwasser verdünnt, im Wasserbad auf 60 °C temperiert und vor dem Beschichten der Objektträger mit 50 ml der flüssigen Agarose vermischt.

2.2 Etablierung mobiler Membranbioreaktorsystemen zur Anreicherung mariner Mikroorganismen

Zur Anreicherung von marinen Mikroorganismen aus dem Pelagial wurden mobile Membranbioreaktoren (MBR) etabliert und eingesetzt. Die Anreicherung erfolgte in der Biologischen Anstalt Helgoland von Mai bis September 2002.

2.2.1 Aufbau der mobilen MBR-Systeme

Zwei gläserne Reaktorgefäße, die ein Arbeitsvolumen von je 500 ml besaßen und mit einem Temperiermantel versehen waren, wurden von der Fa. Ochs, Bovenden-Lenglern angefertigt und waren mit 7 Zugängen im Planflanschdeckel und einem am Seitenrand in Bodennähe ausgestattet. Die Sauerstoffversorgung erfolgte durch den Eintrag sterilfiltrierter Luft (Midisart 2000, Porengröße 0,2 µm, Durchmesser 7 cm, Sartorius, Göttingen) aus der hauseigenen Druckluftleitung. Zur besseren Verteilung der Luftblasen und des eintropfenden Meerwasser kam ein Rührfisch zum Einsatz, der über einen Magnetrührer (MiniMR Standard, IKA Labortechnik, Staufen) bewegt wurde. Die Abluft verließ die Reaktoren über einen sterilen Abluffilter, der aus einem Glasgefäß mit Filterwatte bestand. Neben der Be- und Entlüftung befanden sich in den Stützen der Kopfplatte Sonden für verschiedene Online-Messungen. Dazu zählte die Ermittlung der Temperatur und des Sauerstoffgehaltes über eine O₂-Sonde (Mikro-Sauerstoffsensoren, 200 mm Länge, UMS, Meiningen) sowie die Aufnahme des pH Wertes (pH-Einstabmeßkette Typ Nr. N 6280, Schott-Geräte, Hofheim). Die Daten wurden alle 2 Stunden mit dem OxyScan Graphic Mikroprozessor-Sauerstoffmeßgerät 561 (UMS, Meiningen), das zusätzlich mit einer pH Messfunktion ausgestattet war, generiert und gespeichert. Die Datenübertragung erfolgte über eine Infrarotschnittstelle auf einen Laptop.

Der Füllstand wurde mit Hilfe eines Schwimmerschalters geregelt, der über eine Füllstandsregeleinheit ein Magnetventil (Magnetventil für aggressive Medien, in Ruhestellung geöffnet, aus PVDF, Bürkert, Ingelfingen) ansteuerte. Befand sich der Füllstand unter einem kritischen Wert, blieb das Magnetventil geöffnet und das Permeat floss zurück in den Reaktor. War der Füllstand zu hoch, so wurde für eine Ventilzeit von 1 Minute das Magnetventil geschlossen, und das Permeat wurde in die erhöht stehende Abflussflasche gedrückt. Nach einer Karenzzeit von 2 Sekunden wurde der Füllstand erneut überprüft und ggf. korrigiert.

Die Anreicherung der marinen Mikroorganismen erfolgte über je ein Membranmodul zur Mikrofiltration (XAMPLER™, CFP-1E-3A, Schleicher und Schuell, Dassel) aus PES mit

einer Porengröße von 0,1 µm, einer Gesamtlänge von 34 cm und einem Durchmesser der Hohlfasern von 1 mm sowie einer Membranfläche von 0,01 m².

Für die Umlaufpumpe im Dauerbetrieb (Schlauchdosierpumpe Watson-Marlow (Smith & Nephew Watson-Marlow, Falmouth (UK)) mit einem Pumpkopf 313 wurde ein Peripren[®] Schlauch (8,0 mm Innendurchmesser, 1,6 mm Wandstärke, Petro Gas, Berlin) verwendet. Für die Mehrkanalschlauchpumpen (IPC ISM 931, Ismatec, Wertheim-Mondfeld) kam ein Tygon[®] Schlauch (SC0022, Ismatec, Wertheim-Mondfeld) zum Einsatz; alle weiteren Schläuche waren aus Silikon (Ochs, Bovenden-Lenglern).

Die Entnahmestelle der hausinternen Seewasserleitung der Biologischen Anstalt Helgoland befand sich an einer Mole, wo das Meerwasser aufgrund der starken Strömung wenig vom Land beeinflusst war. Die Länge der Seewasserleitung betrug 300 m und bestand u. a. aus PVC, Gusseisen, Asbest und Ton und war mit einem Grobfilter (1 cm²) versehen. Die Wassertemperatur des Meeres schwankte während der 43-tägigen Anreicherung zwischen 13,8 und 17,3 °C (Wetterdienst Helgoland 2002).

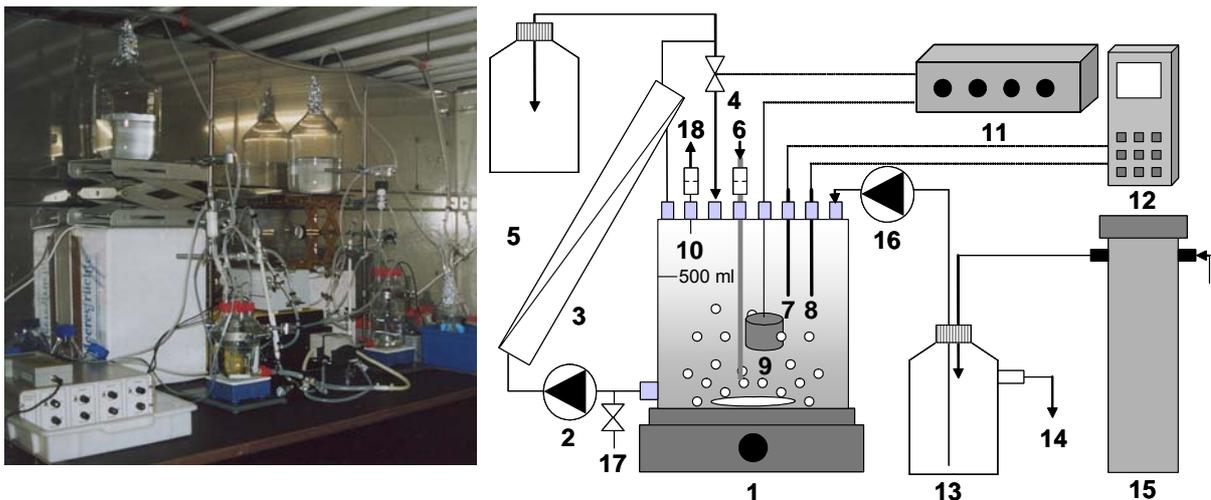


Abb. 2: Aufbau des Mikrofiltrations- Membranbioreaktorsystems zur Anreicherung mariner Bakterien:
 1) Reaktor mit Magnetrührer, 2) Umlaufpumpe, 3) Membranmodul, 4) Magnetventil, 5) Ablaufbehälter,
 6) Zuluft, 7) pH-Elektrode, 8) Sauerstoff- und Temperatursonde, 9) Schwimmerschalter, 10) Abluftfilter,
 11) Füllstandsregleinheit, 12) OxyScan (Datenaufnahme), 13) Vorlagebehälter, 14) Überlauf,
 15) Vorfilter (~ 10 µm), 16) Seewasserleitung, 17) Probenahmestelle, 18) Abluft

Das Reaktorsystem wurde in einer temperierbaren Kühlzelle untergebracht, in der die Raumtemperatur in Anlehnung an die in situ Wassertemperatur 16 ± 1 °C betrug. Zur Verhinderung von Algenwachstum wurde die Beleuchtungsdauer durch Neonröhren möglichst gering gehalten, so dass die Anreicherungen größtenteils ohne Lichteinwirkung stattfanden.

2.2.2 Vorbereitung der Anreicherung

Das Reaktorgefäß wurde gemeinsam mit den Schläuchen und dem Vorlagegefäß für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Nicht autoklavierbare Bestandteile des Systems wie beispielsweise die O₂-Sonde oder der Schwimmerschalter wurden mit Ethanol [70 %] sterilisiert und unter sterilen Bedingungen in den Reaktor eingefügt. Zur Sterilisation der Membran wurde 0,5 M Natronlauge 60 min bei 50 °C und mit einer Scherrate von 4.000 s⁻¹ durch die Membran rezirkuliert und diese im Anschluss mit mehreren Litern sterilem Reinstwasser gewaschen.

2.2.3 Betriebsparameter

Das Meerwasser wurde zunächst über einen gewickelten Patronenfilter (10 µm) geführt, um größere eukaryotische Mikroorganismen und Partikel zurückzuhalten. Danach floss es mit einer Geschwindigkeit von mindestens einem Volumenaustausch pro Minute durch ein 800 ml Vorlagegefäß. Das Vorlagegefäß wurde im Austausch wöchentlich mit Salzsäure [3,2 %] gespült, in einer Spülmaschine gewaschen und erneut autoklaviert, um einer Biofilmbildung entgegenzuwirken. Aus dem Vorlagegefäß wurde das Meerwasser mit einer durchschnittlichen Pumprate von 1,1 ml min⁻¹ (IPC ISM 931, Ismatec, Wertheim-Mondfeld) in die beiden Membranreaktoren gepumpt und die marinen Mikroorganismen aus je 70 l Seewasser so über einen Zeitraum von 43 Tagen angereichert.

Der für den erforderlichen Permeatfluss von 10 ml min⁻¹ benötigte Transmembrandruck wurde durch Reduzierung des Retentatschlauch-Durchmessers und durch Anpassung der Überströmrate auf 75 – 200 ml min⁻¹ sichergestellt. Dabei war bei der Auslegung des Systems darauf zu achten, dass der mittlere Permeatfluss der Membran stets höher war als die mittlere Zulauftrate des Meerwassers, um ein Überlaufen des Reaktors zu vermeiden. Scherraten von 2.000 – 4.000 s⁻¹, wie sie für Perfusionskulturen empfohlen werden, wurden bei diesen Überströmgeschwindigkeiten laut Herstellerangaben nicht überschritten. Nach der Hälfte der Anreicherungszeit (20 Tage) mussten die Membranen zur Aufrechterhaltung der Permeatflüsse aus den Systemen entnommen und gereinigt werden.

Die Probenahme erfolgte an der Probenahmestelle (Abb. 2), indem der verchromte Luerlockverbinder mit 70 % Ethanol benetzt und abgeflammt wurde, bevor eine Spritze zum Einsatz kam. Die Interferenzkontrast-Aufnahmen wurden an einem Axioskop 2 (Zeiss, Jena) angefertigt und die belichteten Negative mittels eines Flachbettscanners (Epson Perfection 4990, Epson, Meerbusch) digitalisiert.

2.2.4 Kurzzeitige Aufkonzentrierung von marinem Bakterioplankton

Um eine höhere Anreicherung der marinen Bakterien zu ermöglichen, sollten aus einer kurzzeitigen sehr viel stärkeren Aufkonzentrierung der Seewasserorganismen die eukaryotischen bakterivoren Protozoen mit Hilfe von Bioziden eliminiert werden, um im Anschluss die Physiologie der Bakterien *in vitro* mit Hilfe von Membranbioreaktoren untersuchen zu können.

Dazu wurden mittels einer Ultrafiltrationsanlage (Diaflo® Hollow Fiber Cartridge H5P100-43) mit einer nominalen Ausschlussgröße von 100 kDa, einer Membranfläche von 0,45 m² sowie einem Durchmesser der Hohlfasern von 1,1 mm die Organismen aus 910 l Meerwasser in 48 h angereichert (Abb. 3).

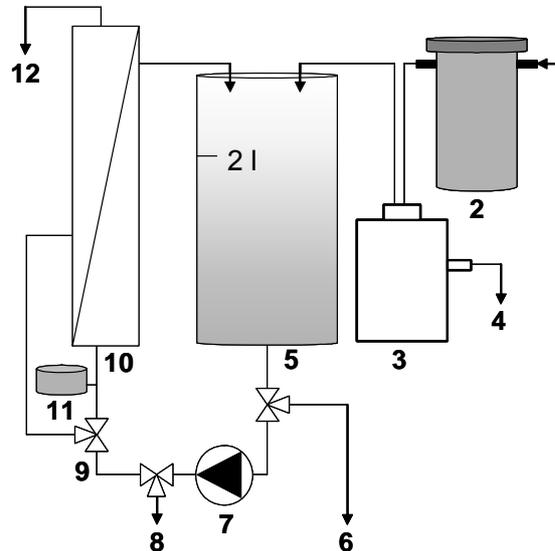


Abb. 3: Aufbau des Ultrafiltrations-Membranbioreaktorsystems zur kurzzeitigen Anreicherung mariner Mikroorganismen: 1) Seewasserleitung, 2) Vorfilter (~ 10 µm), 3) Vorlagebehälter, 4) Überlauf, 5) Reaktorgefäß, 6) Dreiwegehahn zur Entnahme der Anreicherungskultur, 7) Umlaufpumpe, 8) Dreiwegehahn zur Probennahme, 9) Dreiwegehahn zur Rückspülung der Membran, 10) Ultrafiltrations-Membranmodul, 11) Barometer, 12) Permeat

Zur Sterilisation wurde die Filtrationseinheit mehrmals mit auf 50 °C erwärmter 0,1 M Natronlauge gespült und diese im Anschluss mit mehreren Litern sterilem Reinstwasser ausgewaschen. Die zweitägige Anreicherung der marinen Mikroorganismen erfolgte nach Passage des Vorfilters (~ 10 µm) mit einer Permeatrate von durchschnittlich 0,32 l min⁻¹ ebenfalls in der auf 16 ± 1 °C temperierten Kühlzelle in der Biologischen Anstalt Helgoland.

Nach der Anreicherung wurden die marinen Organismensuspensionen im Labor in Batch-Ansätzen (300 ml in 2 l Erlenmeyerkolben mit Wattestopfen und Aluminiumfolie verschlos-

sen) in einem Kühlraum bei 13 °C mit unterschiedlich hohen Biozidkonzentrationen auf einem Schüttler (Certomat® U, B Braun, Melsungen, 100 min⁻¹) inkubiert. Cycloheximid und Colchicin kamen in Konzentrationen von jeweils 2 g l⁻¹, 1 g l⁻¹ sowie 0,2 g l⁻¹ zum Einsatz. Die Antibiotika wurden in zuvor autoklaviertem und sterilisiertem ASW suspendiert bevor sie den Batch-Ansätzen zugesetzt wurden. Nach 2, 5, 10 und 14 Tagen wurden die Kulturen lichtmikroskopisch auf das Vorhandensein von lebenden Protozoen hin untersucht.

2.3 Kultivierungsmethoden der Langzeit-Batch-Ansätze von *E. coli* A3 und *E. coli* K12

Bevor das Umweltisolat *E. coli* A3 für die Untersuchung seines Erhaltungsstoffwechsels in einem MBR eingesetzt wurde, sollte zuerst das Überlebenspotential dieses Stammes gegenüber einem Laborstamm (*E. coli* K12) anhand der Wachstumsraten und der Zellvitalität nach längeren Hungerperioden analysiert werden. Für die Bestimmung der maximalen Wachstumsraten der Bakterien bei 37 °C wurden je Stamm drei parallele 350 ml Erlenmeyerkolben, die mit Schikanen sowie einem Glasrohr für photometrische Messungen versehen waren, mit 100 ml LB Medium befüllt und bei 37 °C über Nacht vorgewärmt. Es wurde mit soviel Bakteriensuspension angeimpft, dass alle Kolben zu Beginn eine OD_{578 nm} von 0,1 aufwiesen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C auf einem Schüttler (100 min⁻¹, KS10, Edmund Bühler, Tübingen). Als Negativkontrolle wurde ein weiterer Kolben mit Medium ohne Zellen mitgeführt. Die OD_{578 nm} wurde über das Glasrohr in einem Photometer (Küvetten-Test® Photometer, Dr. Lange, Düsseldorf) gemessen, so dass keine Probenahmen erforderlich waren. Dieses Vorgehen bedeutete allerdings, dass die Kulturen nicht auf den notwendigen OD-Bereich von 0,1 – 0,5 verdünnt werden konnten, in dem nach dem Lambert-Beerschen Gesetz die Extinktion linear mit der Bakterienkonzentration korreliert.

Für die Untersuchung der Zellvitalität während der Langzeit-Batch-Kultivierung bei Raumtemperatur wurden 500 ml AB Mineralmedium in einem 2 l Erlenmeyerkolben mit 1 % der jeweiligen Übernachtskultur angeimpft und auf einem Schüttler (100 min⁻¹, Typ 3019, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) bei Raumtemperatur (~ 20 °C) inkubiert. Der Kolben wurde mit einem Silikonstopfen verschlossen, durch den drei Glasstäbe führten und der Stopfen nochmals mit fester Alufolie umwickelt, die nur unter sterilen Bedingungen geöffnet wurde. Zur Belüftung der Kolben kam eine Membranpumpe (Typ Elite802, Hagen, Holm) zum Einsatz. Die Probeentnahme erfolgte unter der Sterilbank (HeraSafe, Heraeus, Hanau) über die Probenahmestellen (Abb. 4), die mit einem Luerlock - Verbindungsstück versehen und mit Alufolie umwickelt waren mittels einer sterilen Spritze.

Dazu wurde vor und nach der Probenahme die Probenahmestelle mit Ethanol [70 %] benetzt und abgeflammt.

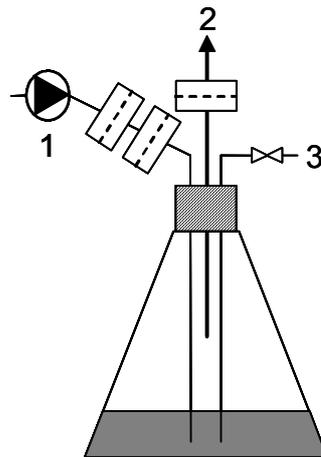


Abb. 4: Schematischer Aufbau des Batch-Ansatzes: 2 l Erlenmeyerkolben mit 1) Zuluftpumpe mit Filter, 2) Abluft mit Filter, 3) Probenahmeverrichtung

2.4 Membranbioreaktor und Batch-Ansatz für die Langzeitkultivierung von *E. coli* A3

2.4.1 Aufbau des MBR-Systems

Der Fermenter, Typ Biostat B5, (Braun, Melsungen) bestand aus Borosilikatglas und besaß ein Arbeitsvolumen von 5 l. Er war mit zwei 6-Blatt-Scheibenrührern (Durchmesser 64 mm) und vier Stromstörern ausgestattet (Abb. 5, Abb. 6). Die Begasung mit sterilfiltrierter Luft (bzw. Stickstoff zur Kalibrierung der pO_2 -Sonde) erfolgte über einen Ringbegaser unterhalb des Rührers. Dabei dienten zwei hintereinander geschaltete Sterilfilter (Porengröße 0,2 μm , Durchmesser 7 cm, Midisart 2000, Sartorius, Göttingen) als Schutz vor über die Zuluft eingetragenen Kontaminationen. Der Vordruck des jeweiligen Gases betrug 0,8 bar Überdruck. Die Abluft verließ den Reaktor durch einen Abgaskühler zum Auskondensieren von Wasserdampf sowie einen Abluftfilter, vor den eine sterile Wulff'sche Flasche zum Auffangen des eventuell austretenden Schaums angebracht war. Im Deckel befanden sich Stutzen für die Zufuhr von Korrekturmedien sowie Sonden für verschiedene Online-Messungen. Dazu zählte die Ermittlung der Temperatur über einen Temperaturfühler, Pt 100 mit 316 mm Einbautiefe, sowie die Messung des pH Wertes über eine Glaselektrode (12 mm Durchmesser, 325 mm Einbautiefe, Mettler-Toledo, Urdorf, Schweiz). Diese wurde vor dem Autoklavieren mit pH 4 und pH 7 Standard-Pufferlösungen kalibriert. Der pH Wert wurde regelmäßig (alle 3 Tage) extern anhand des Permeats kontrolliert (Handylab 2BNC, Schott AG, Mainz) und die Elektrode über die Kontrolleinheit gegebenenfalls nachkalibriert. Ferner war eine Antischaumsonde im Deckel integriert, die bei zu

hohem Füllstand eine der 4 Pumpköpfe der Kontrolleinheit ansteuerte, die das Permeat in den Ablaufbehälter pumpte und damit den Füllstand wieder senkte. Die Sauerstoffsonde (12 mm Durchmesser, 320 mm Einbautiefe, Mettler-Toledo, Urdorf, Schweiz) wurde zu Beginn des Experimentes im Anschluss an den Autoklaviervorgang durch Begasung des Reaktorinhalts mit Stickstoff und Luft bei 6 l min^{-1} und einer Drehfrequenz von 500 min^{-1} kalibriert. Alle die Kulturbrühe berührenden metallischen Einbauten wie Stromstörer und Rührer bestanden aus Edelstahl 1.4571, sonstige Metallteile aus Edelstahl 1.4301.

Für die Umlaufpumpe im Dauerbetrieb (bei 55 % der maximalen Drehfrequenz, VC 380, Ismatec, Wertheim-Mondfeld) wurde ein Peripren[®] Schlauch (8,0 mm Innendurchmesser, 1,6 mm Wandstärke, Petro Gas, Berlin) verwendet, für die Mehrkanalschlauchpumpe (IPC ISM 931, Ismatec, Wertheim-Mondfeld) kam ein Tygon[®]Schlauch (SC0022, Ismatec, Wertheim-Mondfeld) zum Einsatz; alle weiteren Schläuche waren aus Silikon (Ochs, Bovenenden-Lenglern).

Die Kontrolleinheit enthielt einen Thermostaten und vier Schlauchpumpen zur Dosierung von Titrierlösungen. Ebenso waren Regelungen für Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffsättigung und Füllstand integriert. Die Daten wie Drehfrequenz, pH-Wert, Temperatur, $p\text{O}_2$ wurden dreimal täglich protokolliert.

Der Biomasserückhalt erfolgte mit Hilfe eines Hohlfasermembranmoduls (UMP-1047R, Pall, New York, USA) aus PVDF. Das Membranmodul besaß eine Länge von 32 cm, die Durchmesser der Hohlfasern betrug 1,4 mm und die Porengröße $0,2 \mu\text{m}$ bei einer Membranfläche von insgesamt $0,09 \text{ m}^2$. Das Modul ist laut Herstellerangaben bis zu 20 mal autoklavierbar und wurde vor dem Sterilisationsvorgang im Autoklaven an das Fermentergefäß angeschlossen und gemeinsam mit diesem autoklaviert.

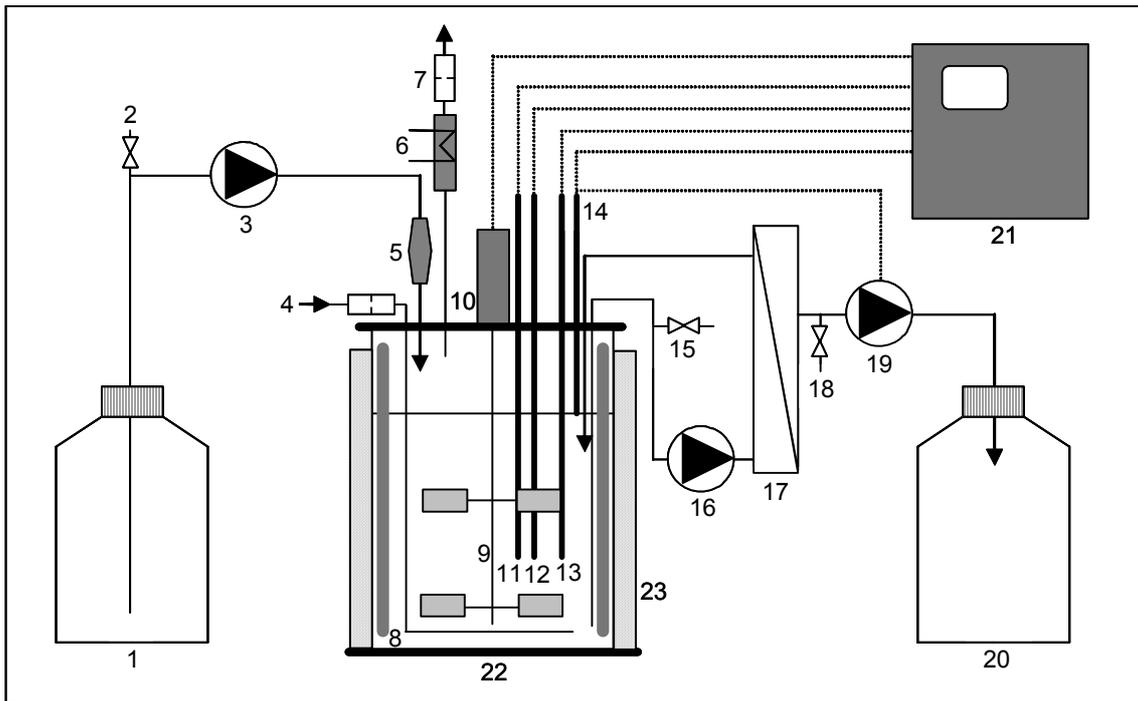


Abb. 5: Aufbau des MBR-Systems zur Langzeitkultivierung von *E. coli*: 1) Vorlagebehälter (20 l), 2) Probenahmestelle, 3) Zulaufpumpe, 4) Zuluft, 5) Hitzequelle, 6) Abluftkühler 7) Abluftfilter, 8) Stromstörer, 9) 6-Blatt-Scheibenrührer, 10) Rührermotor, 11) pO_2 -Sonde, 12) pH-Sonde, 13) Temperatur-Sonde, 14) Schaum- bzw. Füllstandssonde, 15) Probenahmestelle, 16) Umlaufpumpe, 17) Membranmodul, 18) Probenahmestelle, 19) Permeatpumpe, 20) Ablaufbehälter, 21) Kontrolleinheit, 22) Fermentergefäß, 23) Temperiermantel



Abb. 6: Membranbioreaktorsystem zur Langzeitkultivierung von *E. coli*

2.4.2 Vorbereitung der Kultivierung

Das Fermentergefäß, befüllt mit 2,06 l der Komponente B des AB-Mineralmediums, wurde zusammen mit den angeschlossenen Schläuchen und dem Membranmodul für 40 min bei 121 °C über Nacht autoklaviert, damit sich die Reaktorkomponenten langsam abkühlen konnten. Nach steriler Zugabe von 2,06 l der separat autoklavierten Medienkomponente A und der Fructoselösung sowie der Kalibrierung der Sauerstoff-Sonde wurde das System einen Tag ohne Bakterien betrieben, um die technische Stabilität sowie die Sterilität zu überprüfen. Der Reaktor wurde über die Probenahmestelle mit 412 ml einer *E. coli* A3 Übernachtskultur ($OD_{600\text{ nm}} = 0,42$) 10%ig angeimpft und ohne Unterbrechung kontinuierlich betrieben.

2.4.3 Betriebsparameter

Das Medium wurde aus einem 20 l Vorlagegefäß (Nalgene, Hereford, UK) mittels einer Mehrkanalschlauchpumpe (IPC ISM 931, Ismatec, Wertheim-Mondfeld) über eine Hitze-falle (zur Reduktion des Rückwachstums der Organismen in den Medienschlauch, Ochs, Bovenden-Lengler) in das Fermentergefäß geleitet. Die Zulauftrate betrug konstant 100 ml h^{-1} , so dass sich bei einem realen Arbeitsvolumen von 4,07 l eine Verweilzeit von 40,7 h bzw. eine Verdünnungsrate von $0,025\text{ h}^{-1}$ sowie ein Transmembranfluss von durchschnittlich $1,11\text{ l (m}^2\text{ h)}^{-1}$ ergab. Die Fermentationsbrühe wurde mittels eines externen Thermostaten auf eine Temperatur von $25,0 \pm 0,1\text{ °C}$ temperiert. Die Rührerdrehfrequenz betrug konstant 200 min^{-1} und wurde nicht über den Sauerstoffpartialdruck geregelt. Der Sauerstoffgehalt sank während der gesamten Fermentation jedoch nicht unter 50 %. Der pH Wert wurde mit Hilfe von 0,1 M HCl und 1 M Natronlauge automatisch auf $6,95 \pm 0,2$ eingestellt. Die Belüftungsrate betrug $4 \pm 1\text{ l min}^{-1}$.

Eine Umlaufpumpe (VC 380, Ismatec, Wertheim-Mondfeld) führte die Fermentationsbrühe mit einer Überströmrate von $1,9\text{ l min}^{-1}$ über das Membranmodul. Der Hersteller empfiehlt für Perfusionskulturen Überströmraten von $1,8 - 4,6\text{ l min}^{-1}$. Um die eventuell empfindlicheren Bakterien auf dem Weg zum Erhaltungsstoffwechsel keinen allzu großen Scher-raten aus zu setzen, wurde eine möglichst geringe Überströmrate gewählt. Da die Überströmrate aber nur knapp über den vom Hersteller empfohlenen Raten lag, wurde für den Fall des Verblockens der Membran eine Rückspülvorrichtung (Pumpschlauch innerhalb des Permeatschlauches sowie steriles AB Medium ohne Fructose in einer 1 l Schottfla-sche mit passendem Luerlock Verbinder) eingeplant, die allerdings nicht zum Einsatz kam.

Das Permeat wurde bei Überschreitung eines bestimmten Füllstandes (Kontakt der Antischaumsonde mit der Fermentationsbrühe) über den Antischaummittel-Pumpkopf der Kontrolleinheit in den Ablaufbehälter geleitet. Dabei wurde bei der Auslegung des Systems darauf geachtet, dass der maximal mögliche Permeatfluss der Membran stets höher war als die Pumprate des Pumpkopfes, um ein Verblocken der Membran zu verhindern. Der Betrieb erfolgte über 65 Tage mit einer kontinuierlichen Medienzufuhr und wurde bis zum 73. Tag als Batch-Kultur weiter geführt.

2.4.4 Probenahme

Die Probenahme erfolgte an der Probenahmestellen (15, Abb. 5), indem der verchromte Luerlockverbinder mit 70 % Ethanol benetzt und abgeflammt wurde, bevor eine sterile Spritze zum Einsatz kam. Der Schlauch zum Membranmodul wurde abgeklemmt und das Totvolumen von circa 4 ml zwischen Reaktor und Probenahmestelle mindestens fünfmal durchspült, bevor das benötigte Volumen der Fermenterbrühe entnommen wurde. Im Anschluss an die Probenahme erfolgten wiederum eine Benetzung des Luerlockverbinders mit Ethanol sowie ein Abflammen. Zur Bilanzierung wurde das gesamte entnommene Probevolumen protokolliert. Die Proben an den Probenahmestellen 2) und 18) (Schlauchverbinder in T-Form mit Septum, Abb. 5) wurde mit Hilfe einer Spritze entnommen, an die eine sterile Kanüle angebracht war. Nach einer Desinfektion des Septums mit 70 % Ethanol wurde dieses mit Hilfe der Kanüle durchstoßen und das Medium bzw. das Permeat langsam in die Spritze aufgezogen. Anschließend wurde das T-Stück wieder mit steriler Alufolie umwickelt.

2.4.5 Batch-Ansatz

Für die Langzeit-Batch-Kultivierung kamen zwei der in Kapitel 2.3, Abb. 4 beschriebenen Erlenmeyerkolben in einem wassertemperierten Linearschüttler mit einer Auslenkung von 25 mm (25 ± 2 °C, 40 % Schüttelleistung, Gesellschaft für Labortechnik m.b.H., Burgwedel) zum Einsatz. Dabei wurden beide Batch-Ansätze mit je 10 % derselben *E. coli* A3 Übernachtskultur angeimpft wie der Reaktor. Der erste Batch-Ansatz wurde vom 1. bis zum 41. Tag und der zweite ab dem 42. Tag beprobt.

2.5 Analysemethoden

2.5.1 Reinheitsuntersuchung mittels ARDRA

Die Sterilität der Kulturen wurde mit Hilfe der ARDRA-Methode („amplified ribosomal DNA restriction analysis“) auf Grundlage des RFLP („restriction fragment length polymorphism“)

Material und Methoden

untersucht. Dafür wurde die mittels PCR amplifizierte 16S rDNA mit Hilfe eines Restriktionsenzym geschnitten und das durch Gelelektrophorese entstandene Bandenmuster analysiert. Wenn das erhaltene Bandenmuster nicht dem theoretischen bzw. dem mit einer Reinkultur erhaltenen Bandenmuster entspricht, so muss von einer Kontamination der Probe ausgegangen werden. Diese Methode wird meist für Diversitätsstudien (Laguerre et al. 1994; Liu et al. 1997; Moyer et al. 1994) aber auch zur Identifikation eines Organismus (Amel et al. 2007) angewendet.

Je 1 ml der Reaktor- und Batchproben des 30. und 65. Fermentationstages wurden bis zur Analyse bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren. Die DNA der Proben sowie einer *E. coli* Übernachtskultur wurde zuerst mit dem „GeneMATRIX Bacterial GenomicGram^{+/-} DNA Purification Kit“ der Firma EURX (Gdansk, Polen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Der Erfolg der DNA-Extraktion wurde mit einer Gelelektrophorese überprüft. Mittels des Primerpaares 27F (vorwärts) und 1492R (rückwärts) sowie der DNA Polymerase Opti-Taq (Roboklon, Berlin) wurde die 16S rDNA der Proben sowie einer *E. coli* Übernachtskultur als Positivkontrolle und einem Ansatz mit sterilem Reinstwasser als Negativkontrolle amplifiziert.

Tab. 8: Ansatz für die Amplifikation der 16S rDNA mittels PCR

Komponente	Volumen für eine Probe [μl]	Volumen für 6 \times Mastermix [μl]
Puffer B (10 \times)	5	30
MgCl ₂ (50 mM)	1	6
dNTPs (je 0,2 mM)	2	12
Primer 27f (20 pM)	2,5	15
Primer 1492r (20 pM)	2,5	15
Opti-Taq	0,25	1,5
Templat	1 bzw. 2	-
PCR-H ₂ O	35,75 bzw. 34,75	214,5
Gesamtvolumen	50	294

Jeweils 49 μl des Mastermixes wurden in 6 eisgekühlten PCR Reaktionsgefäßen zusammen mit 1 μl Templat (extrahierte DNA) pipettiert und die DNA mit Hilfe des Thermocyclers TGradient (Biometra[®], Göttingen) amplifiziert. Das Thermocyclerprogramm ist in Tab. 9 dargestellt. Als Negativkontrolle wurde statt der Templat-DNA PCR-H₂O verwendet.

Tab. 9: Programm des Thermocyclers für die Amplifikation der 16S rDNA mittels PCR

	Temperatur [°C]	Dauer [min]	
	95	2	
Denaturierung	95	0,75	
Annealing	56	1	30 Zyklen
Elongation	72	3	
Finale Extension	72	10	
Ende	4		

Die erfolgreiche DNA-Extraktion sowie Amplifikation der 16S rDNA wurden mittels einer Gelelektrophorese in einem 1,25 %igen Agarosegel bestätigt. Zur Herstellung des Gels wurde 1 g Agarose in 80 ml TAE Puffer gelöst. Der Ansatz wurde in der Mikrowelle kurz aufgekocht. Vor dem Giessen des Gels in die Elektrophoresekammer (Cosmobio, Serva, Heidelberg) wurden dem Ansatz 3 µl Ethidiumbromid zugegeben und durch Schwenken gut vermischt. In einer Mikrotiterplatte wurden je 5 µl der extrahierten DNA bzw. des PCR Produktes mit 2 µl Ladepuffer (6 × Orange Loading Dye, Fermentas, St. Leon-Rot) vermischt und im Anschluss in die Taschen des auspolymerisierten Agarosegels pipettiert. Als Marker dienten 5 µl der O'RangeRuler™ 100bp+500bp DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100 V für 50 min.

Für den Restriktionsenzymverdau wurden Aliquots der DNA Amplifikate gemeinsam mit dem Enzym *EcoRI* (Promega, Mannheim) in einem Wasserbad bei 37 °C für 3 h inkubiert. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt 1-5 µl DNA, 1 µl *EcoRI*, 1 µl Puffer H und 2-6 µl H₂O in einem finalen Volumen von 10 µl. Die Reaktionsgefäße wurden zusätzlich mit Parafilm verschlossen, um ein Verdunsten des Ansatzes zu vermeiden. Die Zugabe von BSA [0,1 mg ml⁻¹] diente der Stabilisierung des Enzyms.

Material und Methoden

Tab. 10: Pipettierschema für den Restriktionsenzymverdau mit *EcoRI*

Nummer	Probe	Puffer H [μ l]	DNA [μ l]	<i>EcoRI</i> [μ l]	BSA [μ l]	H ₂ O [μ l]	Temperatur [°C]
1	R 30 d	1	5	1	1	2	37
2	R 65 d	1	5	1	1	2	37
3	ÜNK	1	5	1	1	2	37
4	B 30 d	1	5	1	1	2	37
5	B 65 d	1	5	1	1	2	37
6	H ₂ O	1	-	1	1	7	37
7	R 30 d	1	5	-	1	3	37
8	R 65 d	1	5	-	1	3	37
9	ÜNK	1	5	-	1	3	37
10	B 30 d	1	5	-	1	3	37
11	B 65 d	1	5	-	1	3	37
12	ÜNK	-	5	-	1	4	RT

Bei den Proben 1 und 2 sowie 7 und 8 wurde ursprünglich 1 μ l Templat zur Amplifikation der 16S rDNA eingesetzt und bei den Proben 4 und 5 sowie 10 und 11 jeweils 2 μ l. Als Negativkontrollen wurden zusätzlich alle Proben auch ohne Enzym bei 37 °C inkubiert. Bei einer erfolgte die Inkubation der amplifizierten DNA der Übernachtskultur ohne Enzym bei Raumtemperatur, um ein Wirken eines eventuell in den Proben bzw. Chemikalien vorhandenen anderen Enzyms mit geringerem Temperaturoptimum auszuschließen.

Zur elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente wurde ein 0,7 %iges Agarosegel eingesetzt, für dessen Herstellung 1,05 g Agarose in 150 ml 1 \times TAE Puffer in der Mikrowelle gelöst wurde. Nach dem Verdau wurden 8 μ l der Ansätze in neue Reaktionsgefäße überführt und mit 2 μ l Ladepuffer (6 \times Orange Loading Dye, Fermentas, St. Leon-Rot) vermischt. 1 μ l des Markers (O'RangeRuler™ 100bp+500bp DNA Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot) wurde in einem weiteren Reaktionsgefäß mit 2 μ l Ladepuffer und 7 μ l PCR-H₂O vermengt. Jeweils 10 μ l der Proben wurden in die Taschen des Agarosegels pipettiert und bei 100 V für 90 min elektrophoretisch aufgetrennt.

2.5.2 Fructosegehalt im Medium

Die Fructosekonzentration im zugeführten Medium und im Permeat wurde bestimmt, um zum einen die Sterilität des Mediums und zum anderen die Kohlenstofflimitierung der Bak-

terien im Reaktor zu dokumentieren. Die Bestimmung der Fructosekonzentration erfolgte photometrisch mit Hilfe des D-Glucose/D-Fructose UV-Tests (Boehringer Mannheim, R-Biopharm GmbH, Darmstadt) nach Herstellerangaben. Die Nachweisgrenze dieses Tests liegt bei $0,4 \text{ mg l}^{-1}$. Der Test beruht auf der mehrstufigen Umwandlung von Fructose durch verschiedene Enzyme zu D-Gluconat-6-Phosphat und NADPH. Die bei den Reaktionen gebildete Menge an NADPH ist dabei der Fructosemenge äquivalent und kann bei einer Wellenlänge von 340 nm photometrisch quantifiziert werden.

Es wurden einmal wöchentlich Proben des Medienzulaufs zu Beginn und am Ende der Nutzung einer Medienflasche entnommen und genau wie die Permeatproben zur Sicherung der Sterilität mittels eines Spritzenvorsatzfilters ($0,2 \text{ }\mu\text{m}$ Porengröße, Minisart, Sartorius, Göttingen) in Reaktionsgefäße filtriert und bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zur Analyse aufbewahrt. Die Proben wurden je nach erwartetem Fructosegehalt mit sterilem Reinstwasser verdünnt und der Fructosegehalt mittels des UV-Tests nach Herstellerangaben in 1,5 ml Einmalküvetten aus PMMA (Roth, Karlsruhe) ermittelt.

2.5.3 Biomasseentwicklung

2.5.3.1 Bestimmung der optischen Dichte

Die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm erfolgte in einem DU-64 Spectrophotometer (Beckman Coulter GmbH, Krefeld). Dazu wurden die Proben mit sterilem Reinstwasser auf eine $OD_{600 \text{ nm}}$ von 0,1- 0,5 verdünnt, da bei einem Wert höher als 0,5 die Linearität zwischen optischer Dichte und Zellzahl (Lambert-Beersches Gesetz) nicht mehr gegeben ist. Es wurden je 3 parallele Ansätze verdünnt und gemessen und daraus der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet.

Für die Bestimmung der optischen Dichte bei 578 nm wurde ein Küvetten-Test[®] Photometer (Dr. Lange, Düsseldorf) genutzt, welcher eine Messung der $OD_{578 \text{ nm}}$ der Bakteriensuspension in einem am Schüttelkolben angebrachten Glasrohr ermöglichte. Vorteil hierbei ist die Tatsache, dass aufgrund der fehlenden Probennahmen sowohl die Sterilität als auch das Volumen der Kultur gewahrt wird und die Kolben nur für sehr kurze Zeit für die Messungen den Inkubationsbedingungen entzogen werden. Die fehlende Möglichkeit die Proben entsprechend des Bakterienwachstums zu verdünnen, erlaubt nur eine qualitative Beurteilung der Ergebnisse.

2.5.3.2 Bestimmung der Gesamtzellzahl mittels DEFT

Die bakterielle Gesamtzellzahl wurde mit Hilfe der direkten Epifluoreszenz Filtertechnik (DEFT) mikroskopisch ermittelt nachdem die Mikroorganismen mit dem DNA-Farbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol, Absorptionsmaximum 358 nm, Emissionsmaximum 461 nm) gefärbt und auf einen Filter verbracht wurden (Hobbie et al. 1977; Kepner und Pratt 1994; Lebaron et al. 1994; Lisle et al. 2004).

Für die Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden die Proben mit 2 % bzw. oberhalb einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 1 mit 4 % Formaldehyd (Endkonzentration) fixiert und bis zur weiteren Auswertung bei 4 °C aufbewahrt. Die Zellsuspension wurde mit sterilem Reinstwasser auf circa 10^5 Zellen ml^{-1} verdünnt und 1 ml der Zellsuspension zusammen mit 10 μl DAPI Lösung [$100\ \mu\text{g}\ \text{ml}^{-1}$] 10 min in einem Reaktionsgefäß im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurde die Bakteriensuspension unter Verwendung einer Unterdruck-Filtrationseinheit (Sartorius, Göttingen) durch einen schwarzen Polycarbonatfilter (0,2 μm Porengröße, Isopore™ Membrane Filters GTBP, Millipore, Eschborn) filtriert. Dazu wurden 2 ml bakterienfreies Wasser in der Filtrationseinheit vorgelegt, mit denen die Bakteriensuspension vor der Filtration verdünnt wurde, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf dem Filter zu gewährleisten. Ein unter dem Polycarbonatfilter befindlicher Zellulosenitratfilter (0,45 μm , Sartorius, Göttingen) diente als Stützskelett. Die auf dem Filter zurückbleibenden Bakterien wurden mit einem Antifading-Reagenz (Citifluor AF) überschichtet und epifluoreszenzmikroskopisch ausgewertet (Axioplan 2, Zeiss, Jena, ausgestattet mit einer HBO 103 Quecksilberdampfampe, Filter no. 01: Anregung 365 nm, Strahlenteiler 395 nm, Sperrfilter 397 nm). Es wurden mindestens 10 Zählfelder ($150 \times 150\ \mu\text{m}$) und mindestens 1.000 Zellen ausgezählt und daraus die Zellkonzentration der ursprünglichen Suspension berechnet.

Als Teilungsstadien wurden jene Zellen gezählt, die eine sichtbare Einschnürung (Septenbildung) bzw. eine Hantelform aufwiesen.

2.5.3.3 Bestimmung der Gesamtzellzahl mittels Durchflusszytometrie

Die bakterielle Gesamtzellzahl wurde des Weiteren mit Hilfe eines Durchflusszytometers ebenfalls nach einer DAPI Färbung ermittelt. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte wie in Kapitel 2.5.7 beschrieben. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl dienten fluoreszierende Beads (5 μl Stammlösung Polybead Microspheres, Durchmesser 0,483 μm , flow check BB/Green Compensation Kit, Blue Alignment Grade, ref. 23520, Polyscience, USA). Diese wurden mit den gefärbten Zellen vermischt und im Durchflusszytometer analysiert. In den aus den Daten resultierenden Histogrammen (Dot Plots, Summit software, DakoCytomati-

on, Fort Collins, CO, USA) wurden die Subpopulationen und die Beads mit Hilfe jeweils eines Gates zusammengefasst und die Zellzahlen in Excel (Microsoft, Unterschleißheim) berechnet.

2.5.3.4 Bestimmung der biologischen Trockensubstanz

Zur Bestimmung der biologischen Trockensubstanz (BTS) wurden die Proben sofort mit 2 bzw. ab einer $OD_{600\text{ nm}}$ von > 1 mit 4 % Formaldehyd (Endkonzentration) fixiert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei 4 °C aufbewahrt. Vorbereitend wurden je Probe drei weiße Polycarbonatfilter (Porengröße 0,2 μm , Isopore™ Membrane Filters GTTP, Millipore, Eschborn) in mit Alufolie ausgelegten Glaspetrischalen bei 105 °C für 60 min getrocknet und für weitere 30 min zum Abkühlen in einen Exsikkator verbracht, bevor ihr Gewicht mittels einer Analysenwaage (Typ R180D, Sartorius, Göttingen) bestimmt wurde. Mit Hilfe eines Vakuumfiltrationsgerätes (Sartorius, Göttingen) wurde 1 ml der ggf. vorher mit Reinstwasser verdünnten Bakteriensuspension auf den Filter gezogen und mit 2 ml Reinstwasser gespült. Auch hierbei diente ein darunter liegender Zellulosenitratfilter (0,45 μm , Sartorius, Göttingen) als Stützskelett. Die Filter mit den auf ihnen befindlichen Bakterien wurden anschließend in den Petrischalen für 12 – 18 h im Trockenschrank (Typ U150, Memmert, Schwabach) bei 105 °C getrocknet. Die Abkühlung erfolgte wiederum in einem Exsikkator bevor die Filter erneut ausgewogen wurden. Für die Berechnung der Trockensubstanz wurde das Leergewicht der trockenen Filter vom ermittelten Gewicht der getrockneten Filter nach der Filtration subtrahiert und die Differenz durch das Volumen der filtrierten Zellsuspension dividiert sowie ggf. mit einem Verdünnungsfaktor multipliziert. Die biologische Trockensubstanz wurde pro Probe in drei parallelen Ansätzen gemessen und daraus der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet.

2.5.4 Aktivitätsanalysen

2.5.4.1 Bestimmung des Anteils lebender Zellen (LIVE/DEAD® BacLight™ Kit)

Die im LIVE/DEAD® BacLight™ Kit (Molecular Probes, Leiden, NL) enthaltenen DNA Fluoreszenzfarbstoffe Syto9 (Anregungsmaximum 480 nm, Emmissionsmaximum 500 nm) und Propidiumiodid (Anregungsmaximum 490 nm, Emmissionsmaximum 635 nm) dienen zur Untersuchung der Membranintegrität der bakteriellen Cytoplasmamembran. Die Bakterien werden mit dieser Methode je nach Färbung als potentiell lebend oder tot angesehen (Haugland 1996). Dabei dringt der DNA-Farbstoff Syto9 in alle Zellen ein und lässt diese grün fluoreszieren, während der Farbstoff Propidiumiodid nur in Zellen gelangen

kann, deren Membranintegrität nicht mehr in ausreichendem Maß gegeben ist - solche Zellen fluoreszieren dann die grüne Fluoreszenz überdeckend rot.

Die beiden Fluoreszenzfarbstoffe Propidiumiodid und Syto9 des LIVE/DEAD® BacLight™ Kit 7012 (Molecular Probes, Leiden, NL) wurden nach Lieferung aliquotiert, wieder eingefroren und zur Verwendung nur ein weiteres Mal aufgetaut. Die Bakteriensuspensionen wurden im Anschluss an die Probenahme sofort mit sterilem Reinstwasser auf circa 10^9 Zellen ml^{-1} verdünnt. Von der Verwendung von Puffern wird vom Hersteller abgeraten, da diese die Färbung beeinträchtigen können. Zu 1 ml Bakteriensuspension wurden nach Herstellerangaben je 1,5 μl der beiden Fluoreszenzfarbstoffe pipettiert, gut durchmischt und genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. 10 μl der gefärbten Zellsuspension wurden auf einen schwarzen Agarose-Objektträger pipettiert und am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt (Axioplan 2, Zeiss, Jena, ausgestattet mit einer HBO 103 Quecksilberdampfampe, Filter: no. 15 TRITC (Anregung 546 nm, Strahlenteiler 480 nm, Sperrfilter 590 nm). Je Probe wurden mindestens 1.000 Zellen ausgewertet und der prozentuale Anteil der grün fluoreszierenden, also vermeintlich lebenden Zellen, an der Summe von grün und rot gefärbten Zellen bestimmt.

2.5.4.2 Bestimmung des Anteils kultivierbarer Zellen (KBE)

Für die Bestimmung des Anteils der kultivierbaren Zellen wurde aus derselben Probe, aus der die Gesamtzellzahl (DEFT) bestimmt wurde, mit sterilem PBS eine Verdünnungsreihe hergestellt. Aus 3 geeigneten Verdünnungen wurden nach der Drop Plate-Methode jeweils 8 mal 10 μl auf eine LB Agarplatte pipettiert und diese bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Zur Kontrolle wurden zusätzlich 10 μl des für die Verdünnungsreihe genutzten PBS auf die Agarplatte aufgebracht. Die Kolonieanzahlen der Verdünnung, die zwischen 20 und 60 Kolo-

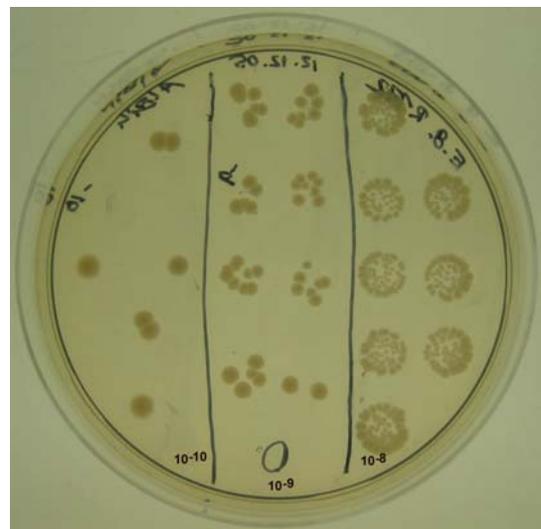


Abb. 7: Agarplatte für Drop Plate-Methode zur Bestimmung der KBE

niebildende Einheiten (KBE) je Tropfen aufwies, wurden ausgezählt, auf die ursprüngliche Zellkonzentration zurückgerechnet und der Mittelwert sowie die Standardabweichung der 8 Parallelen ohne die Anwendung weiterer statistischer Verfahren berechnet (Herigstad et al. 2001; Hoben und Somasegaran 1982; Reed und Reed 1948).

2.5.4.3 Bestimmung des Anteils an hybridisierbarer Zellen (FISH)

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) der rRNA erlaubt neben den Untersuchungen der phylogenetischen Identität sowie der Quantifizierung und räumlichen Anordnung von Mikroorganismen (Lipski et al. 2001) auch qualitative Aussagen über den Ribosomengehalt einer Zelle. Die Methode basiert auf der Hybridisierung von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden an ihre komplementäre Sequenz auf dem Zielmolekül rRNA. Bakterien mit einer gewissen Mindestmenge an Ribosomen zeigen dabei ein positives FISH Signal. Zellen ohne ausreichendes FISH Signal wurden mit einer DAPI Gegenfärbung detektiert. In dieser Arbeit sollte die Bestimmung des Anteils an Zellen mit FISH Signal einen weiteren Einblick in die Physiologie und Aktivität der nicht-wachsenden Zellen erlauben. Grundsätzlich gilt: je teilungsaktiver eine Zelle ist, desto mehr Ribosomen weist sie auf und desto stärker ist das FISH Signal. Liefert eine Zelle kein oder nur ein sehr geringes FISH Signal, so ist von einem sehr niedrigen Ribosomengehalt auszugehen, der mit einer verringerten Teilungsaktivität interpretiert werden kann (Bouvier und del Giorgio 2003).

Für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung der *E. coli* A3 Zellen wurde die Enterobakterien-spezifische Sonde „probe D“ verwendet (5'-TGC TCT CGC GAG GTC GCT TCT CTT-3') (Ootsubo et al. 2002), die an einen hoch konservierten Bereich der 16S rRNA (Zielsequenz: 834 – 856, *Escherichia coli*) bindet. Am 5'-Ende war die Sonde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert.

Die Bakteriensuspensionen der Reaktor- und Batch-Kulturen sowie einer Übernachtskultur als Positivkontrolle wurden für die FISH Analyse zunächst ggf. auf circa 10^9 Zellen ml^{-1} mit sterilem Reinstwasser verdünnt und in 2 % Formaldehyd (Endkonzentration) für 30 min bei 4 °C fixiert. Anschließend wurden die Proben abzentrifugiert (3 min bei 13.000 min^{-1} bei 4 °C in einer Zentrifuge 5403, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf), der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml Ethanol/PBS (1:2) aufgenommen und bei 4 °C aufbewahrt.

FISH nach Aktivierung der Zellen

Eine Inkubation der Bakterien in LB Medium sollte den Anteil der Zellen sichtbar machen, der zwar über relativ wenige Ribosomen verfügt, aber dennoch in der Lage ist innerhalb eines relativ kurzen Zeitraumes aufgrund des Nährstoffangebotes neue Ribosomen zu produzieren.

Bei diesen Proben wurde nach einem ersten Zentrifugationsschritt (3 min bei 13.000 min^{-1} bei 4 °C, Zentrifuge 5403, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) das Pellet in 1 ml LB Medium resuspendiert und für 1 h bei 37 °C im Wärmeschrank (Typ BK5060 EL, Heraeus, Hanau)

Material und Methoden

inkubiert. Nach diesem Aktivierungsschritt erfolgte die weitere Probenaufarbeitung wie oben geschildert.

Jeweils 3 μl der aufbereiteten Proben wurden in die Aussparungen eines teflonbeschichteten Objektträgers pipettiert und an der Luft getrocknet. Im Anschluss wurden die Objektträger in einer Ethanolreihe [50 %, 80 %, 96 %] für je 2 min entwässert und auf die wieder trockenen Aussparungen 10 μl der Sondensuspension gegeben. Die Sondensuspension wurde je Probe aus 1 μl der Oligonukleotidstammlösung [50 ng μl^{-1}] und 9 μl Hybridisierungspuffer (Tab. 11) mit einer Stringenz von 20 % hergestellt. Der Objektträger wurde in eine feuchte Kammer (50 ml Falcontube) verbracht und im Hybridisierungssofen (Typ 2770 Köttermann, Hänigsen) bei 46 °C für 3 h inkubiert.

Tab. 11: Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers für FISH

Reagenz	Volumen [μl]
Reinstwasser	600
5 M NaCl	180
1 M Tris pH 8	20
Formamid [$> 99,0\%$]	200
SDS [10 %]	1-2

Neben den aktivierten und nicht-aktivierten Reaktor- und Batchproben kamen als Negativkontrollen noch Zellen einer *E. coli* A3 Übernachtskultur zum Einsatz, die nicht hybridisiert wurden, sowie ein Aussparung, die ohne Zellen der Hybridisierungsprozedur unterzogen wurde. Als Positivkontrolle diente eine *E. coli* Übernachtskultur.

Tab. 12: Zusammensetzung des Waschpuffers für FISH

Reagenz	Volumen [ml]
5 M NaCl	2,5
1M Tris pH 8	1
Mit Reinstwasser auf 50 ml auffüllen	
SDS [10 %]	0,05

Nach der dreistündigen Inkubation wurde der Objektträger in das Reaktionsgefäß mit dem vorgewärmten Waschpuffer (Tab. 12) verbracht und 20 min bei 46 °C gewaschen. Im Anschluss wurde der Objektträger vorsichtig mit VE Wasser abgespült und luftgetrocknet.

Für die Gegenfärbung wurde in jede Aussparung des Objektträgers 10 µl einer DAPI Lösung [$100 \mu\text{g ml}^{-1}$] pipettiert und für 10 min im Dunkeln inkubiert. Die DAPI Lösung wurde mittels VE Wasser vorsichtig vom Objektträger abgewaschen und die Proben luftgetrocknet. Zum Mikroskopieren (Axioplan 2, Zeiss, Jena, ausgestattet mit einer HBO 103 Quecksilberdampflampe, Filter für Cy3 markierte Sonde: HQ light filter set 41007 (Anregung 535-550 nm, Strahlenteiler 565 nm, Sperrfilter 610-675 nm), Filter für DAPI: Filter no. 01: Anregung 365 nm, Strahlenteiler 395 nm, Sperrfilter 397 nm) wurde auf jede Probe ein Tropfen des Antifading Reagenz Citifluor gegeben und die Aussparungen mit einem großen Deckglas versehen. Ein Minimum von 300 Zellen wurde je Probe ausgewertet und der prozentuale Anteil der Zellen mit einem positiven FISH Signal an der hier mittels DAPI bestimmten Gesamtzellzahl berechnet.

2.5.4.4 Bestimmung des Anteils metabolisch aktiver Zellen (CTC)

Die CTC Methode indiziert metabolische Aktivität und ist somit ein direkter Indikator für sowohl einen aktiven Metabolismus als auch für die Lebensfähigkeit der Zelle (Smith und McFeters 1997). Das 5-Cyano-2,3-Ditolyltetrazoliumchlorid (CTC) ist ein wasserlöslicher Monotetrazolium-Redox-Farbstoff, der, sofern er in den Bakterien reduziert wird, ein fluoreszierendes, wasserunlösliches Formazansalz (CTF) bildet.

Für die Analyse der metabolischen Aktivität wurde jeweils frisch vor der Probenahme eine CTC working solution aus 5,25 mg CTC und 350 µl sterilem Reinstwasser hergestellt (Endkonzentration: 50 mM) (Polysciences Inc. 1999; Rodriguez et al. 1992). Die Lösung wurde bis zum Gebrauch bei 4 °C aufbewahrt.

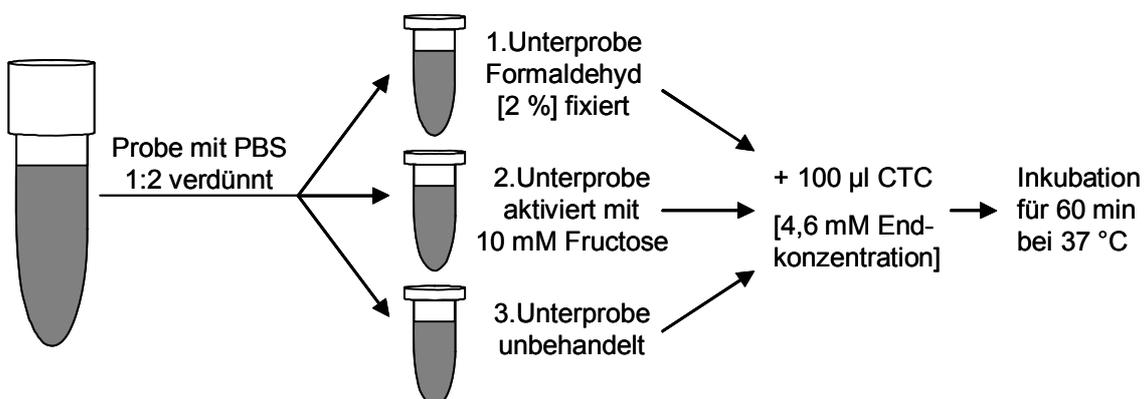


Abb. 8: Probenaufbereitung für CTC Analysen

Aus jeder Probe wurden drei Unterproben generiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen wie folgt behandelt (Abb. 8): 0,5 ml Zellsuspension wurden mit 0,5 ml sterilem PBS Puffer 1:2

verdünnt. Die erste Unterprobe wurde als Negativkontrolle mit 50 µl Formaldehyd [37 %, Endkonzentration 2 %] fixiert. Die 2. Unterprobe wurde mit 10 µl einer sterilen 1 M Fructoselösung in PBS Puffer (Endkonzentration im Ansatz: 10 mM) aktiviert und die 3. Unterprobe nicht weiter behandelt. Allen Unterproben wurden 100 µl der 50 mM CTC Lösung (Endkonzentration 4,6 mM) zugegeben und bei 37 °C für 1 h inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150 µl Formaldehyd [37 %, Endkonzentration 6 %] beendet.

Zur Gegenfärbung wurden jedem Ansatz 10 µl einer DAPI Lösung [100 µg ml⁻¹] zugegeben und die Reaktionsgefäße 10 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen mit sterilem PBS Puffer auf circa 10⁹ Zellen ml⁻¹ verdünnt und auf Sudan-Schwarz Agarose-beschichteten Objektträgern ausgezählt. Dabei wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2, Zeiss, Jena, ausgestattet mit einer HBO 103 Quecksilberdampflampe, Filter für CTC: FLUOS-Filter no. 9 (Anregung 450-490 nm, Strahlenteiler 510 nm, Sperrfilter 520 nm) sowie Filter für DAPI: Filter no. 01: Anregung 365 nm, Strahlenteiler 395 nm, Sperrfilter 397 nm) je Probe 400 Zellen ausgewertet. Die CTC positiven Zellen wurden dabei als prozentualer Anteil der hier mit DAPI bestimmten Gesamtzellzahl dargestellt.

2.5.4.5 Bestimmung des Anteils potentiell teilungsfähiger Zellen (DVC)

Die direct viable count (DVC) Methode (Kogure et al. 1979) erlaubt die Bestimmung desjenigen Anteils von Zellen einer Bakterienpopulation, der in der Lage ist, sich nach Einstellung ausreichender Wachstumsbedingungen zu teilen. Dabei verhindert ein Antibiotikum den Vorgang der kompletten Zellteilung. Die Elongation von Zellen, die sich eigentlich teilen würden, ist von der Wirkungsweise des Antibiotikums nicht betroffen. So lässt sich anhand der Anzahl der elongierten Zellen einer Population der Anteil der Bakterien bestimmen, die sich potentiell teilen können. Das in dieser Arbeit eingesetzte Antibiotikum Nalidixinsäure inhibiert spezifisch die DNA-Synthese der Bakterienzellen und verhindert damit die Zellteilung, ohne andere metabolische Aktivitäten wie RNA-Synthese oder Proteinbiosynthese zu beeinflussen (Goss et al. 1964; Kantor und Deering 1968). Die damit behandelte Zelle kann weiterhin vorhandene Nährstoffe metabolisieren aber elongiert nur während der Inkubation aufgrund der Hemmung der Gyrase.

Zur Herstellung der Antibiotikum-Stammlösung wurden 20 mg Nalidixinsäure in 2 ml 0,05 M Natronlauge gelöst und sterilfiltriert. Die wöchentlich entnommenen Proben aus dem Reaktor und aus dem Batch-Ansatz wurden mit sterilem PBS Puffer auf 10⁸ Zellen ml⁻¹ verdünnt. Im Anschluss wurden je 15 ml der Bakteriensuspension mit 15 ml sterilem 0,1 × LB Medium 1:2 auf 5 × 10⁷ Zellen ml⁻¹ verdünnt und je 10 ml auf drei sterile 100 ml Erlenmeyerkolben aufgeteilt (Abb. 9).

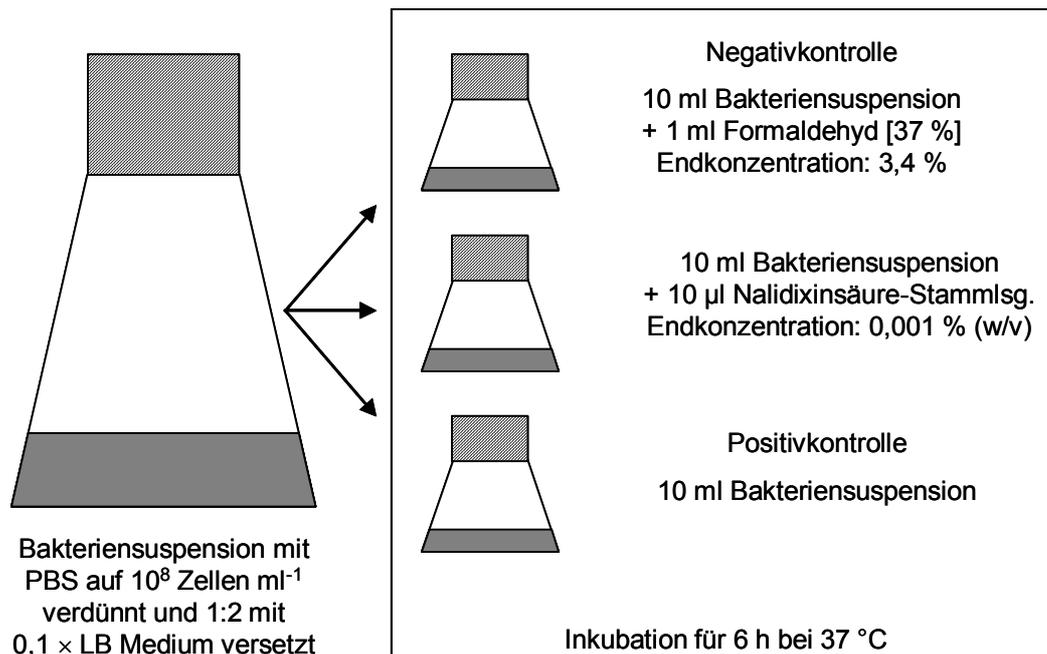


Abb. 9: Probenaufbereitung für DVC Methode

Die erste der so generierten Unterproben wurde mit der Zugabe von Formaldehyd [3,4 % Endkonzentration] sofort fixiert, um die durchschnittliche Zelllänge der unbehandelten Probe zu ermitteln (Negativkontrolle). Zu der zweiten Unterprobe wurden 10 μl der Nalidixinsäure-Stammlösung [10 mg ml^{-1}] gegeben, was einer Endkonzentration von $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ bzw. 0,001 % (w/v) entsprach. Die dritte Unterprobe wurde nicht weiter behandelt und diente als Positivkontrolle zum Vergleich der Zelllängen mit und ohne Aktivierung (3.4.7.3). Die Unterproben wurden für 6 h auf einem Rundschüttler (KS10, Edmund Bühler, Laborgerätebau, Tübingen, 100 min^{-1}) bei 37 °C inkubiert. Die danach entnommenen Proben aus der 2. und 3. Unterprobe wurden mit Formaldehyd [4 %] fixiert und inklusive der Proben aus der Unterprobe 1 bis zur Auswertung bei 4 °C aufbewahrt.

Für die Bestimmung der Zelllängen wurden circa 6 μl der fixierten Zellsuspension auf einen Agarose-beschichteten Objektträger aufgebracht und unter dem Mikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Jena, ausgestattet mit einer 12-bit Digitalkamera (CCD Farbkamera, SIS Colorview 12, 1300×1030 Pixel, Soft Imaging Solutions GmbH, Münster)) im Phasenkontrast fotografiert. Die Zelllängen von mindestens 100 Zellen je Unterprobe wurden über das Bildbearbeitungsprogramm AnalySIS (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster) vermessen. Der Mittelwert der Zelllängen der Negativkontrolle wurde berechnet und diente als Referenz für die durchschnittliche Zelllänge der unbehandelten Probe. Im Anschluss wurde der prozentuale Anteil der Zellen der behandelten Probe ermittelt, welche länger

als das 1,5fache der durchschnittlichen Zelllänge der Negativkontrolle war (Singh et al. 1990). Dieser Anteil wurde als potentiell teilungsfähig eingestuft.

2.5.4.6 Bestimmung des ATP-Gehalts

Die Reaktionsgeschwindigkeit der ATP-Bildung der Bakterienzellen aus dem Reaktor und dem Batch-Ansatz auf eine Aktivierung durch LB Medium wurde anhand der ATP-Produktion mit Hilfe eines Luminometers (BioFix[®] Lumi10, Macherey-Nagel, Düren) verfolgt. Dabei kam das Testkit BioFix[®] Lumi ATP für Flüssigproben zum Einsatz, welches den intra- und extrazellulären ATP-Gehalt mittels der Luciferin-Luciferase-Reaktion quantitativ bestimmt. Das hierbei ausgestrahlte Licht wird mit Hilfe des Luminometers gemessen und als relative Leuchteinheiten (RLU = relative light units) angezeigt.

Die Proben wurden 1:100 mit sterilem LB Medium verdünnt und analog zu den Herstellerangaben weiter bearbeitet. 100 µl der Bakteriensuspension wurde in einer Einwegküvette mit 4 Tropfen BioFix[®] Lumi ATP Extraktionsreagenz versetzt, geschüttelt und 60 s bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 10 Tropfen BioFix[®] Lumi ATP Biolumineszenzreagenz und eine weitere Inkubation bei Raumtemperatur für 30 s bevor die Messung durchgeführt werden konnte. Die Inkubationszeiten mussten dabei genau eingehalten werden.

2.5.4.7 Bestimmung der Wiederaufnahmegeschwindigkeit des Zellwachstums

Zur weitergehenden Untersuchung wie schnell die aus dem Reaktor bzw. aus dem Batch-Ansatz stammenden Zellen im Erhaltungsstoffwechsel bzw. in einer längerfristigen Hungerphase ein erneutes Zellwachstum aufnehmen, wurde die Zunahme der OD_{578 nm} des mit Bakterien aus dem Reaktor- bzw. Batch-Ansatz angeimpften Mediums verfolgt.

Dazu wurden je 3 parallele mit 100 ml LB Medium gefüllte vorgewärmte 300 ml Erlenmeyerkolben mit je 1 % Bakteriensuspension aus dem Reaktor bzw. dem Batch-Ansatz (jeweils vom 64. Fermentationstag, mit PBS Puffer auf eine OD_{600 nm} = 1 verdünnt) angeimpft (endgültige OD_{600 nm} zu Beginn des Experimentes: 0,01) und bei 37 °C auf einem Rundschtüttler (KS10, Edmund Bühler, Laborgerätebau, Tübingen, 100 min⁻¹) inkubiert. Die OD_{578 nm} wurde in regelmäßigen Abständen mit Hilfe des in den Erlenmeyerkolben integrierten Glasrohres in einem Küvetten-Test[®] Photometer (Dr. Lange, Düsseldorf) ermittelt.

2.5.5 Proteingehalt der Zellen

Der Gehalt an löslichen Proteinen in den Bakterienzellen wurde nach einer Modifikation der Lowry Methode (Lowry et al. 1951) nach Peterson (Peterson 1977) mit Hilfe des Protein Assay Kits (Procedure No. P5656) von Sigma, Deisenhofen bestimmt. Dabei wird durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat auch die Lösung relativ unlöslicher Lipoproteine ermöglicht.

Für die Proteinbestimmung wurden zweimal wöchentlich Proben aus dem Reaktor und dem Batch-Ansatz entnommen und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Analyse tiefgefroren. Der Zellaufschluss erfolgte mittels alkalischer Lyse, indem die aufgetauten Zellen abzentrifugiert (13.000 min^{-1} , 5 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, Centrifuge 5403, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf), und das Pellet in $20\text{ }\mu\text{l}$ Lysepuffer aufgenommen wurde. Die alkalische Lyse erfolgte dann 15 min bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Thermoschüttler (Thermomixer 5436, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf). Nach Zugabe von $980\text{ }\mu\text{l}$ Reinstwasser wurde der Ansatz erneut zentrifugiert und der die löslichen Proteine enthaltende Überstand je nach ursprünglicher Zellkonzentration weiter mit Reinstwasser verdünnt. Je $500\text{ }\mu\text{l}$ der Proben wurden in zweifacher Ausführung weiter nach Herstellerangaben behandelt, photometrisch vermessen und der Proteingehalt anhand einer mit Rinderserumalbumin erstellten Kalibrierungskurve bestimmt.

2.5.6 Analyse der Zellmorphologie

2.5.6.1 Zelllängen und -volumina

Zur Bestimmung der Zelllängen und -volumina bei den Reaktorläufen wurde wöchentlich 1 ml Probe mit $50\text{ }\mu\text{l}$ Formaldehyd [37 %] fixiert, so dass eine Endkonzentration von 2 % erreicht wurde. Ab einer Zellkonzentration von 10^{10} Zellen ml^{-1} wurden die Proben mit $100\text{ }\mu\text{l}$ Formaldehyd versetzt, um eine bessere Fixierung zu gewährleisten. Die so fixierten Proben wurden bis zur weiteren Behandlung bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank aufbewahrt. Zur Vermessung der Zellen wurde die Suspension mit sterilem Reinstwasser auf eine Zelldichte von circa 10^8 Zellen ml^{-1} verdünnt und 10 min mit DAPI in einer Endkonzentration von $1\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ im Dunkeln inkubiert. $6\text{ }\mu\text{l}$ der gefärbten Zellsuspension wurden auf einen agarose-beschichteten Objektträger pipettiert und unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Jena, angeschlossen an eine HBO 103 Quecksilberdampfampe, ausgestattet mit einem $100\times$ Öl-immersions-Objektiv, Plan Neofluar, Phaco und verbunden mit einer 12-bit Digitalkamera (CCD Farbkamera, SIS Colorview 12, 1300×1030 Pixel, Soft Imaging Solutions GmbH, Münster)) analysiert. Dafür wurden die Zellen in einer kombinierten Fluoreszenz-Phasenkontrast Einstellung mittels der Bildbearbeitungssoftware AnalySIS (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster) photographiert und an-

schließlich vermessen. Die DAPI Färbung diente dabei zur Lokalisierung des genetischen Materials innerhalb der Zelle. Pro Probe wurden so die Zelllängen und –breiten von mindestens 100 Zellen bestimmt.

Die Berechnung der Zellvolumina erfolgte mit Hilfe folgender Näherungsgleichung (Posch et al. 1997):

$$V = \left(\frac{B^3}{6} \times \pi \right) + (L - B) \times \left(\frac{B^2}{4} \times \pi \right)$$

Die Formel berechnet mit der Länge L und der Breite B einer Zelle das Volumen eines geraden Kreiszylinders mit halbkugelförmigen Enden. Sind Länge und Breite gleich, ergibt sich das Volumen einer Kugel.

2.5.6.2 Statistische Auswertung der Zelllängen und -volumina

Die einzelnen Stichproben (von je mindestens 100 Zellen) wurden - Zelllängen unabhängig von Zellvolumina - mittels der Statistiksoftware Statgraphics for Windows (Statgraphics Plus 5.1, UMEX GmbH, Dresden) analysiert.

Die Daten wurden zu Beginn log-transformiert, um bei so gut wie allen Stichproben eine Normalverteilung zu erreichen. Nicht normalverteilt blieben die Stichproben der Zelllängen R 3 d und B 17 d, die in den folgenden Analysen nicht betrachtet wurden. Mit Hilfe des Grubbs-Tests wurden die Stichproben auf Ausreißer hin untersucht. Als Ausreißer wurden die Werte eliminiert, die nach Grubbs mit einem P-Wert von $P < 0,1$ als solche identifiziert wurden.

Anschließend wurden die Stichproben mittels des Cochran's C-Test, des Barlett-Tests und des Levene-Tests auf Varianzhomogenität überprüft. Weder bei den Zelllängen noch bei den Zellvolumina der Reaktor- und Batchproben konnte Varianzhomogenität festgestellt werden ($P < 0,05$). Daher musste für einen Mittelwertvergleich innerhalb der Ansätze ein Medianvergleich mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests durchgeführt werden. Alle bisher genannten Tests sowie der folgende F-Test wurden in Bezug auf eine zweiseitige Fragestellung durchgeführt.

Für einen Vergleich der Mittelwerte der Stichproben zwischen den Reaktor- und Batchproben desselben Zeitpunktes wurde ebenfalls die Varianzhomogenität – diesmal zwischen den Stichprobenpaarungen – überprüft. Dabei fand der F-Test Verwendung. Die Stichprobenpaarungen Reaktor und Batch 3 d, sowie Reaktor und Batch 17 d entfielen, da je eine Stichprobe der Paarungen nicht normalverteilt war (siehe oben). Bei den Stichprobenpaarungen, bei denen der F-Test Varianzhomogenität festgestellt hat ($P > 0,05$), wur-

de im folgenden ein t-Test zum Vergleich der arithmetischen Mittelwerte durchgeführt. Bei den Stichprobenpaarungen, bei denen dies nicht der Fall war, wurde der Mann-Whitney-Test zum Vergleich der Mediane verwendet. Die Tests zum Vergleich zweier Mittelwerte wurden einseitig durchgeführt, um eine Aussage darüber treffen zu können, welcher Mittelwert größer bzw. kleiner ist als der andere ($P < 0,05$).

2.5.6.3 Fotografische Dokumentation der Zellmorphologie

Die in Abb. 44 dargestellten Fotografien wurden an einem Epifluoreszenzmikroskop angefertigt, an das eine 100 W Quecksilber UV Lampe angeschlossen war (Axioskop, Objektiv 100er Plan Neofluar, Zeiss, Jena). Als Filter kam ein UG1 Filter Würfel (Anregungsfilter 20 UG1, IF 17L420) zum Einsatz und die Fotografien wurden mit Hilfe einer DXC-8100P Kamera (Sony, Japan) erstellt. Je ein epifluoreszenzmikroskopisches Bild wurde zum Schluss mittels des Bildbearbeitungsprogramms Openlab 3.1.4 Software (Improvision, USA) mit einer Phasenkontrastaufnahme überlagert, so war es möglich, sowohl das DAPI Signal als auch die Zelle an sich darzustellen. Die Fixierung und DAPI-Färbung der Zellen erfolgte wie in 2.5.7 beschrieben.

2.5.7 DNA-Gehalt der Bakterien

Der Chromosomengehalt der Bakterien aus dem MBR und aus dem Batch-Ansatz wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Dazu wurde 1 ml der Zellsuspension mit sterilem Reinstwasser auf eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,8 – 1,0 verdünnt und die Zellen für 5 min bei nur 6.000 min^{-1} abzentrifugiert (Centrifuge 5403, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf), um ein zu starkes Agglomerieren der Bakterien zu vermeiden. Das Zellpellet wurde in 10 % Natriumazid aufgenommen und bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. So aufbereitet waren die Proben für mindestens 3 Monate stabil.

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden die fixierten Zellen nochmals zentrifugiert, in NaCl-Phosphat Puffer gewaschen und auf eine Konzentration von 3×10^8 Zellen ml^{-1} resuspendiert. Die Zellen wurden im Anschluss 10 min mit DAPI [$0,68\text{ }\mu\text{M}$] gefärbt (Meistrich et al. 1978). Diese Färbung ist AT-spezifisch und stöchiometrisch und bietet daher quantitative Information über den Gehalt an Chromosomenäquivalenten in einzelnen Zellen. In dieser Arbeit werden die Zellen mit einem Vielfachen an Chromosomenäquivalenten nach dem sich verdoppelnden Mittelwert der Positionen (mean value) jeder auftretenden Subpopulation im DNA-Muster als C2, C4, C8 und C16 bezeichnet.

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden mit einem MoFlo Cell Sorter (DakoDytomation, Fort Collins, CO, USA) durchgeführt, der mit 2 wassergekühlten Argon-

Ionen Lasern (Innova 90c und Innova 70c, Coherent, Santa Clara, CA, USA) ausgestattet war. DAPI wurde mit einem Multi-line-UV (333-365 nm, 110 mW) angeregt. Das Signal der Vorwärtsstreuung (forward scatter, FSC, abhängig von der Zellgröße) wurde mittels der 488 nm Anregung und unter Verwendung eines neutralen Dichtefilters (2,3) detektiert. Die orthogonale Seitwärtsstreuung (side scatter, SSC, abhängig von der Zellgranularität) wurde zuerst von einem Teilerspiegel reflektiert und anschließend über einen Bandpass D488/10 aufgenommen. Fluoreszierende monodisperse Latex-Kugeln (yellow-green fluorescent beads: 2 μm , FluoSpheres 505/515, F-8827, blue fluorescent beads: 1 μm , FluoroSpheres 350/440, F-8815, crimson fluorescent beads: 1 μm , FluoroSpheres 625/645, F-8816, Invitrogen, Oregon, USA) wurden zur Justierung des MoFlo auf einen CV Wert von circa 2 % eingesetzt. Darüber hinaus wurde ein interner Standard aus mit DAPI gefärbten *E. coli* Zellen genutzt, um das Durchflusszytometer auf einen CV Wert < 6 % einzustellen. Die erhaltenen Daten wurden mit der Summit software (DakoCytomation, Fort Collins, CO, USA) aufgenommen und ausgewertet. Es wurden pro Probe mindestens 3×10^4 Zellen ausgewertet.

2.5.8 Fraßversuche

2.5.8.1 Wachstum von *Tetrahymena thermophila* auf *E. coli* A3 Zellen

Um die Verwertbarkeit von Bakterien, die sich in unterschiedlichen physiologischen bzw. Wachstumszuständen befinden, zu untersuchen, wurden bakterivore Protozoen mit nicht mehr wachsenden *E. coli* Zellen aus dem Reaktor, aus dem Batch-Ansatz und wachsenden *E. coli* Zellen aus einer Übernachtskultur gefüttert und die Zunahme der Zelldichte der Eukaryoten ermittelt.

Vier Tage vor dem Experiment wurde eine axenische *T. thermophila* Kultur in sterilem PPY Medium angesetzt und bei 30 °C inkubiert (Schüttler Thys2, MLW, Schöneiche, Brutschrank UnieChromat 700, UniEquipe, Martinsried). Am Tag des Experimentes wurde die Protozoensuspension abzentrifugiert (3.100 min^{-1} , ($1.000 \times g$) 10 min, Centrifuge 5403, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf), einmal mit Volvic Wasser gewaschen und in Volvic Wasser auf $\sim 1.000 \text{ Zellen ml}^{-1}$ verdünnt. Die Konzentration der Protozoen wurde mit Hilfe der Kalibriergeraden aus dem Protokit FTM für *T. thermophila* (MicroBio Tests Inc. 1998) bei einer OD_{330 nm} bestimmt (DU-64 Spectrophotometer, Beckman Coulter GmbH, Krefeld).

Die Bakterien aus dem Reaktor, dem Batch-Ansatz (jeweils vom 63. Fermentationstag) und einer Übernachtskultur wurden mit Volvic Wasser gewaschen, zentrifugiert (13.000 min^{-1} , 5 min, Centrifuge 5403, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf), für 10 min bei 95 °C auf einem Thermoschüttler inaktiviert (Thermomixer 5436, Eppendorf, Wesseling-

Berzdorf) und mit Volvic Wasser auf eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 1 verdünnt (DU-64 Spectrophotometer, Beckman Coulter GmbH, Krefeld).

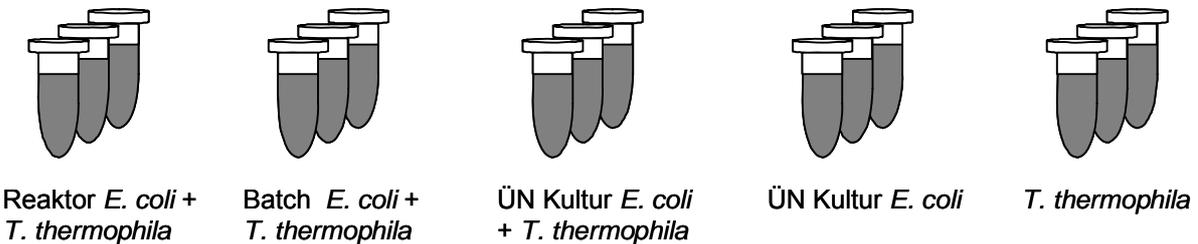


Abb. 10: Versuchsansatz Wachstum von *T. thermophila* auf *E. coli*

Jeder Versuchsansatz wurde in 3 Parallelen durchgeführt. Pro Ansatz wurden jeweils 100 µl Bakteriensuspension und 100 µl der Tetrahymenasuspension mit 800 µl Volvic Wasser aufgefüllt, so dass zu Beginn des Experimentes die Bakterien in allen Ansätzen eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,1 und die Protozoen eine Zellkonzentration von $\sim 100\text{ Zellen ml}^{-1}$ aufwiesen. Untersucht wurde das Wachstum von *T. thermophila* auf Bakterien aus dem Reaktor und dem Batch-Ansatz sowie aus einer Übernachtskultur. Um sicher zu gehen, dass die Konzentration der *E. coli* Zellen sich nicht weiter erhöht und eventuell den Fraßversuch beeinflusst, wurde in einem weiteren Ansatz 100 µl der inaktivierten Bakterien ohne *T. thermophila* in 900 µl Volvic Wasser inkubiert. Um auszuschließen, dass ein eventuelles Wachstum der Protozoen auf anderen Stoffen beruht, wurde die Negativkontrolle abschließend mit 100 µl der *T. thermophila* Suspension in 900 µl Volvic Wasser bestückt.

Die Ansätze wurden für 24 h bei 30 °C inkubiert (Schüttler Thys2, MLW, Schöneiche, Brutschrank UnieChromat 700, UniEquipe, Martinsried). Nach der Inkubation wurden alle Ansätze abzentrifugiert (3.100 min^{-1} ($1.000 \times g$), 10 min, Centrifuge 5403, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf), das Pellet in je 1 ml Volvic Wasser resuspendiert und photometrisch bei 330 nm vermessen. Mit Hilfe der Kalibriergeraden wurde von der optischen Dichte auf die Zellkonzentration der Protozoen geschlossen. Aus den 3 parallelen Ansätzen wurden der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet.

2.5.8.2 Verwertbarkeit von *E. coli* Zellen durch *T. thermophila*

Zur Untersuchung der Aufnahme und Verwertbarkeit von *E. coli* Zellen, die sich in unterschiedlichen physiologischen Zuständen befinden, wurden diese an bakterivore Protozoen verfüttert und deren Nahrungsvakuolen zu verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) fotografisch dargestellt und semiquantitativ ausgewertet.

Phagocytoseversuche

Fünf Tage vor dem Experiment wurde eine axenische *T. thermophila* Kultur in sterilem PPY Medium angesetzt und bei 30 °C inkubiert (Schüttler Thys2, MLW, Schöneiche, Brutschrank UnieChromat 700, UniEquipe, Martinsried). Einen Tag vor dem Experiment wurden 200 ml der Protozoensuspension abzentrifugiert (10 min 2.500 min⁻¹ (1017 × g), Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Du Pont Instruments (jetzt TA Instruments), Eschborn), zweimal mit sterilem Volvic Wasser gewaschen, in 90 ml sterilem Volvic Wasser aufgenommen und bei 30 °C für 24 h Hungerbedingungen ausgesetzt. Im Phasenkontrast wurde die axenische Protozoensuspension nochmals mikroskopisch auf Bakterien hin überprüft. Die Abtrennung der Protozoen vom axenischen Medium wurde bereits 24 h vor dem Beginn des Phagocytoseversuchs durchgeführt, um den Zellen Gelegenheit zu geben, sich an die veränderten Kulturbedingungen anzupassen (Burzlaff 1995). Am Versuchstag wurden die Bakterien mittels Zentrifugation einmal in Volvic Wasser gewaschen (13.000 min⁻¹, 5 min, Centrifuge 5403, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) und auf eine einheitliche OD_{600 nm} von 1 verdünnt. Jeweils 1 ml der Bakteriensuspensionen wurde steril zu 100 ml der Tetrahymenasuspensionen gegeben und bei 30 °C für 150 min inkubiert (Schüttler Thys2, MLW, Schöneiche, Brutschrank UnieChromat 700, UniEquipe, Martinsried). Die OD_{600 nm} der Bakterien betrug im Versuchsansatz demnach 0,01 und die Konzentration der Protozoen lag nach mikroskopischen Zählungen zwischen 20.000 und 60.000 Zellen ml⁻¹. Der eigentliche Phagocytoseversuch wurde nach 45 min beendet, indem die Ansätze in sterilen 250 ml Zentrifugengefäßen abzentrifugiert (10 min 2.500 min⁻¹ (1.017 × g) wurden (Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Du Pont Instruments (jetzt TA Instruments), Eschborn), und der Überstand durch steriles Volvic Wasser ersetzt wurde. Die nun fast reine Protozoensuspension wurde in 500 ml Erlenmeyerkolben weiter bei 30 °C inkubiert. Die Proben für die TEM Analyse wurden jeweils 45, 90, 120 und 150 min nach Beginn des Phagocytoseversuchs entnommen, da für *Tetrahymena* Verdauungsvorgänge im Bereich von 2 h beschrieben werden (Nilsson 1979).

Probenfixierung

Je 5 ml der Protozoensuspension wurden in 2,5 % Glutardialdehyd in 0,05 M Cacodylatpuffer für 30 min auf Eis fixiert und im Anschluss dreimal mit 0,05 M Cacodylatpuffer gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt (10 min 2.500 min⁻¹ (1017 × g), Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Du Pont Instruments (jetzt TA Instruments), Eschborn) wurde das Pellet in 2 % Osmiumtetroxid in 0,05 M Cacodylatpuffer nachfixiert.

Die Proben wurden wiederum dreimal mit 0,05 M Cacodylatpuffer gewaschen und im letzten Waschpuffer bei 4 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

Entwässern und Einbetten der Proben

Die Voreinbettung der Proben erfolgte in 3%iger Agarose bevor die eingebetteten Zellen in einer aufsteigenden Ethylalkoholreihe entwässert wurden. Die insgesamt 120 Präparate wurden danach in Blockschälchen über Propylenoxid stufenweise in das Einbettungsmittel Araldit überführt (Tab. 13).

Tab. 13: Arbeitsschritte zum Entwässern und Einbetten der Proben für TEM Analyse

Dauer	Reagenz
10 min	50 % Ethanol
10 min	70 % Ethanol
10 min	90 % Ethanol
2 × 10 min	100 % Ethanol
2 × 10 min	100 % Ethanol mit Molekularsieb 3 Å
15 min	Propylenoxid/Ethanol mit Molekularsieb 3 Å 1:2
45 min	Propylenoxid
Über Nacht offen unter dem Abzug	Propylenoxid/Araldit 1:2
30 min	Araldit
2 d bei 63 °C	Einbetten in Araldit in Gelatine kapsel

Für die Herstellung des Einbettungsmittels Araldit wurden 44 g Araldit mit 40 g DDSA (Härter) mittels eines Holzspatels vermischt und mit 1,2 ml DMP30 (Beschleuniger) versetzt. Nach dem Einbetten der Proben in die Gelatine kapseln härtete das Araldit bei 63 °C für 2 Tage aus.

Schneiden und Nachkontrastieren der Proben

Die Ultradünnschnitte (50 nm) wurden an einem Mikrotom (Ultracut, Reichert-Jung, Nussloch) mit Glasmessern (2178 Knifemaker II, LKB Bromma (S)) durchgeführt. Die Schnitte wurden mit Chloroform gespreitet und anschließend auf Kupfergrids aufgebracht. Die Doppelkontrastierung der Dünnschnitte erfolgte mittels Uranylacetat und Bleicitrat (Reynolds 1963).

TEM Analyse

Die transmissionselektronenmikroskopische Analyse erfolgte am Elektronenmikroskop Philips EM 208, Hamburg mit 80 kV. Die dort belichteten Negative wurden mit Hilfe eines Flachbettscanners (Epson Perfection 4990, Epson, Meerbusch) digitalisiert.

2.5.9 Proteinexpression

2.5.9.1 2D-Gelelektrophorese

Die Proben für die zweidimensionale Gelelektrophorese wurden sofort nach der Probenahme auf Eis gelagert, schnellstmöglich abzentrifugiert (10 min, 13.000 min⁻¹, 4 °C Centrifuge 5403, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) und das Pellet bei – 80 °C tiefgefroren.

Das aufgetaute Pellet wurde in 2D-Puffer aufgenommen, mit Ultraschall (4 min, Stärke 2,5, Puls 50 %) aufgeschlossen und abzentrifugiert (15 min, 15.000 min⁻¹, 4 °C). Der Überstand wurde in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei – 80 °C gelagert.

Die zweidimensionale elektrophoretische Auftrennung der Proteine wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Birgit Voigt, Universität Greifswald durchgeführt (Voigt et al. 2004).

2.5.9.2 MALDI-TOF MS

Zur Bestimmung des Proteinmusters der Zellen im niedermolekularen Bereich (2.000 – 20.000 Da) wurden Proben der Reaktor- und Batch-Kulturen zu unterschiedlichen Zeitpunkten massenspektrometrisch analysiert. Dazu wurden je 100 µl Bakteriesuspension sofort nach der Probenahme in 1,5 ml Reaktionsgefäße bei – 80 °C tiefgefroren. Für die Probenaufbereitung wurden die aufgetauten Proben abzentrifugiert (15.000 min⁻¹, 5 min, 4°C, Centrifuge 5403, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) und mit 100 µl Reinstwasser einmal gewaschen. 0,5 µl der Bakteriesuspension wurden im Anschluss auf dem MALDI Probenhalter mit 0,5 µl Matrix DHB (2,3-Dihydroxybenzoesäure) vermischt und bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte an einem Voyager DE-PRO – time-of-flight Massenspektrometer der Firma Applied Biosystems, Foster City (USA). Die Massenspektren wurden im linearen „Delayed Extraction Modus“ aufgenommen, wobei eine Beschleunigungsspannung von 20 kV und ein low mass gate von 1.500 Da angelegt wurde. Mindestens 100 Schüsse pro Spektrum wurden für den Massenbereich zwischen 2.000 und 20.000 Da aufsummiert. Die Spektren wurden mit Hilfe der Grundlinienkorrektur- und Peakdetektionsoptionen der DataExplorer 4.0 Software (Applied Biosystems, Foster City (USA)) prozessiert.

Signifikante Peaks konnten aufgrund ihres Molekulargewichtes einzelnen Protein-Einträgen der Swiss-Prot und TrEMBL Datenbank (www.expasy.org) mittels des TagIdent tools zugeordnet werden.

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung von mobilen Membranbioreaktorsystemen zur Anreicherung mariner Mikroorganismen

Zur Anreicherung von marinen Mikroorganismen wurden mobile Membranbioreaktorsysteme entwickelt und getestet (siehe 2.2.1). Dabei zeigte sich, dass die etablierten MBR zur Langzeit-Anreicherung von marinen Mikroorganismen geeignet waren. Allerdings ließ sich ein Teil der Proto- und Metazoen nicht mit dem vorgeschalteten 10 µm Filter zurückhalten, so dass auch diese teilweise bakterivoren Eukaryoten in den Reaktoren angereichert wurden.

3.1.1 Langzeit-Anreicherungskultur von marinem Bakterioplankton

Zur Sicherstellung der Vergleichbarkeit der bakteriellen Gesamtzellzahl des Meerwassers aus der Wasserleitung der Biologischen Anstalt Helgoland (BAH) mit der des Pelagials in situ wurden die Zellkonzentrationen beider Proben mittels der DEFT Methode ermittelt. Darüber hinaus wurde die Zellzahl pro Milliliter nach Passage des Seewassers durch den Vorfilter ermittelt, um den Einfluss des Vorfilters auf die Bakterienzahl zu untersuchen.

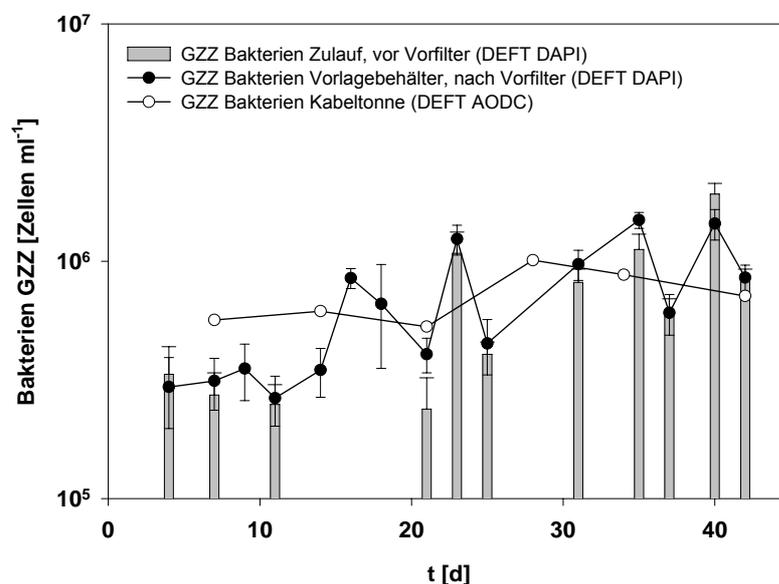


Abb. 11: Gesamtzellzahl der Bakterien [Zellen ml⁻¹] am Probenahmeort Kabeltonne (Pelagial) sowie hinter der Seewasserleitung im Keller der BAH vor und nach dem Vorfilter

Die bakteriellen Gesamtzellzahlen im Pelagial (Probenahmeort Kabeltonne) bewegen sich in der gleichen Größenordnung wie die des Seewassers aus der Seewasserleitung der

BAH. Auch der Vorfilter scheint keinen gravierenden Einfluss auf die Zellzahl der Bakterien zu haben.

Während der Langzeit-Anreicherungskultur wurden über einen Zeitraum von 44 Tagen die Mikroorganismen aus circa 70 l Meerwasser aufkonzentriert. Der pH Wert in den Anreicherungsreaktoren betrug 8,0 bis 8,4 und der Sauerstoffgehalt 80 – 95 %. Wie aus Abb. 12 ersichtlich, kam es jedoch noch nicht zu der theoretisch berechneten Anreicherung der Bakterien auf bis zu $8,6 \times 10^7$ Zellen ml^{-1} nach 44 Tagen, wie sie bei einem vollständigen Rückhalt der Zellen durch die Membran sowie der mit einbezogenen Probenahmeverolumina zu erwarten gewesen wäre. Die Zellkonzentration in den Reaktoren erhöhte sich von 3×10^5 Zellen ml^{-1} im Zulauf lediglich um circa eine Zehnerpotenz.

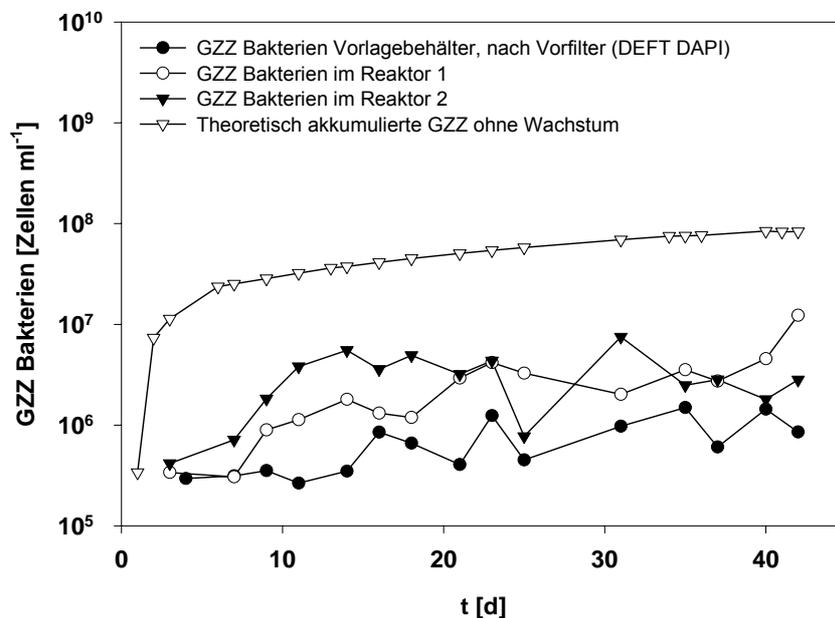


Abb. 12: Gesamtzellzahl der Bakterien im Zulauf (im Vorlagebehälter, nach Vorfilter) sowie theoretisch ange-reicherte und tatsächlich gemessene Bakterienkonzentration in den Reaktoren im Laufe der Langzeit-Anreicherungskultur

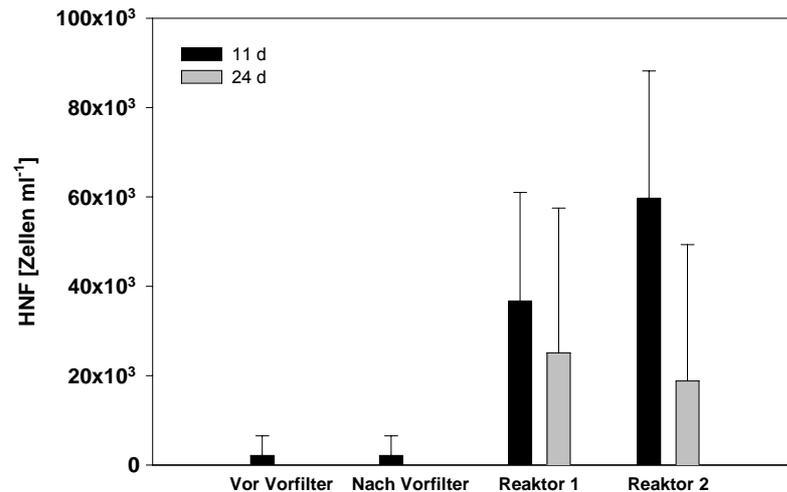


Abb. 13: Gesamtzellzahl der HNF (heterotrophen Nanoflagellaten) vor und nach dem Vorfilter sowie im 1. und 2. Reaktor am 11. bzw. 24. Tag der Anreicherung

Die Quantifizierung der heterotrophen Nanoflagellaten (HNF) deutet darauf hin, dass sie den Vorfilter passieren und über den Vorlagebehälter in die Reaktoren gelangen konnten, wo sie wie alle Mikroorganismen angereichert wurden.

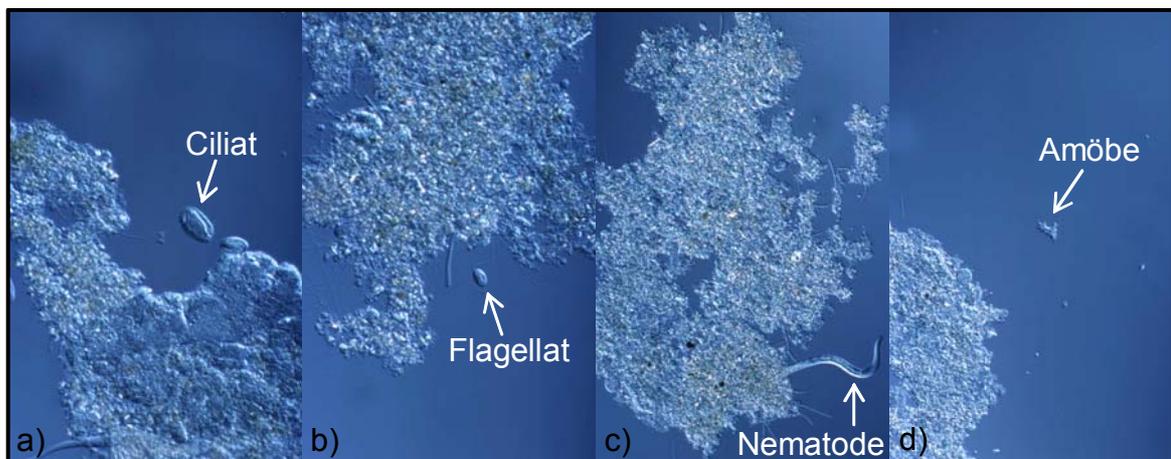


Abb. 14: Interferenzkontrastaufnahmen von Aufwuchsflocken der Reaktorwand, die neben bakteriellen Lebensgemeinschaften auch durch Protozoen (Ciliaten (a), Flagellaten (b) und Amöben (d)) sowie Metazoen (c) charakterisiert sind. a), b) mit 40fach, c), d) mit 20fach Objektiv aufgenommen

In und an den Biofilmen auf der Reaktorinnenwand konnten neben bakteriellen Lebensgemeinschaften unterschiedlicher Morphotypen auch Protozoen (Ciliaten, Flagellaten und Amöben) sowie Metazoen (Nematoden) angesprochen werden.

Um die Physiologie von nicht-wachsenden oligotrophen marinen Bakterien in einem MBR untersuchen zu können, bedurfte es also zu allererst der Elimination der potentiellen eukaryotischen Fraßfeinde.

3.1.2 Kurzzeitige Aufkonzentrierung von marinem Bakterioplankton

Damit die ursprüngliche Bakteriendiversität während der Kultivierung erhalten bleibt, und schnell wachsende Vertreter die Population nicht rasch dominierten, wurden in einer weiteren Anreicherung in einer relativ kurzen Zeit von 48 Stunden die Mikroorganismen aus einem weitaus größeren Volumen (910 l Seewasser) in einem Membranbioreaktor angereichert. Mit Hilfe von Membranbioreaktoren sollte im Anschluss die Physiologie der angereicherten Bakterien untersucht werden. Zuerst sollten jedoch die bakterivoren Fraßfeinde wie Nanoflagellaten und Ciliaten mit einer Mischung aus den Eukaryoten-Antibiotika Cycloheximid und Colchicin abgetötet werden.

Tab. 14: Auftreten von Protozoen in der marinen Anreicherungskultur unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen von Cycloheximid und Colchicin (n. d. = nicht detektierbar)

Zeit [d]	Unbehandelt	Cycloheximid und Colchicin je [2 g l ⁻¹]	Cycloheximid und Colchicin je [1 g l ⁻¹]	Cycloheximid und Colchicin je [0,2 g l ⁻¹]
2	Flagellaten	n. d.	n. d.	n. d.
5	Flagellaten	n. d.	n. d.	Flagellaten
10	Flagellaten	n. d.	Flagellaten	Große, gestielte Ciliaten
14	Flagellaten	Große, gestielte Ciliaten	Flagellaten	Flagellaten

Der Einsatz von Cycloheximid und Colchicin zeigte selbst bei der höchsten Konzentration von 2 g l⁻¹ keine Langzeitwirkung bezüglich der Eliminierung bakterivorer Einzeller, denn spätestens nach 14 Tagen waren in allen Ansätzen Protozoen mikroskopisch nachweisbar.

Das regelmäßige Auftreten von Fraßfeinden ließ eine Untersuchung der Bakterien im Erhaltungsstoffwechsel nicht zu. Da eine weitere Erhöhung der Toxinkonzentration unabsehbare Auswirkungen auf die Bakterienpopulation gehabt hätte, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

3.2 Stammcharakterisierung von *E. coli* A3

Zur Identifikation des Umweltisolates *Escherichia coli* A3, welches als Reinkultur zur Untersuchung des Erhaltungsstoffwechsels in MBR zum Einsatz kam, wurde zum einen die 16S rDNA amplifiziert, sequenziert und das Ergebnis durch ein „alignment“ mit Datenbankeinträgen abgestimmt, um den Stamm phylogenetisch einzuordnen. Des Weiteren

Ergebnisse

wurde ein Ribotyping der genomischen DNA erstellt, um das Umweltisolat über die erhaltenen Bandenmuster mit anderen *E. coli* DSMZ Stämmen vergleichen und innerhalb des Genus *Escherichia* genauer einordnen zu können.

3.2.1 Sequenzanalyse der 16S rDNA von *E. coli* A3

Die Sequenzierung der 16S rDNA von *E. coli* A3, die mit dem Primerpaar 616 forward und 1492 reverse amplifiziert worden war, ergab folgende Sequenz (Tab. 15):

Tab. 15: Ergebnis der Sequenzierung der 16S rDNA von *E. coli* A3

Sequenz der 16S rDNA von *E. coli* A3

```
TNTGACGCTTTTGGCAGGCCTTCACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGAAGCTTGCTT
CTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGA
TAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTT
CGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTC
ACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACA
CGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGA
TGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAG
GAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTA
ACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGC
GTAAAGCGCACGCAGGCGGTTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCACCTGGGAAC
TGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTT
```

Ein Vergleich mit den Stämmen der Datenbank des National Center for Biotechnology Information, GenBank, ergab eine 99% Übereinstimmung des 649 Basenpaare langen Sequenzbereichs von *E. coli* A3 mit dem Sequenzbereich 223822 bis 224469 des voll sequenzierten *E. coli* K-12 MG1655.

Bei einem Vergleich dieser Sequenz des Umweltisolates mit der Datenbank des Ribosomal Database Project – II Release 9 wurde als nächster Verwandter der Stamm *E. coli* mit der GenBank Nummer Z83205 identifiziert.

3.2.2 RiboPrint-Analyse von *E. coli* A3

Zur genaueren Einordnung des Umweltisolates in die Stämme des Genus *Escherichia* der DSMZ wurde unter Verwendung der genomischen DNA und des Restriktionsenzym *EcoRI* ein RiboPrint erstellt. Das Umweltisolat *E. coli* A3 wurde anhand der RiboPrint-Untersuchungen mit Hilfe der DSMZ-internen Datenbank DuPont Identification Library zunächst als *Escherichia coli* identifiziert.

Das RiboPrintmuster des Umweltisolates *E. coli* A3 stimmte mit keinem bisherigen Eintrag der Datenbank vollständig überein. Die höchste Ähnlichkeit im RiboPrint-Muster zu den Einträgen der DSMZ-internen Datenbank wurde mit 0,82 zum Stamm *E. coli* DSM 5923 gefunden (Abb. 15).

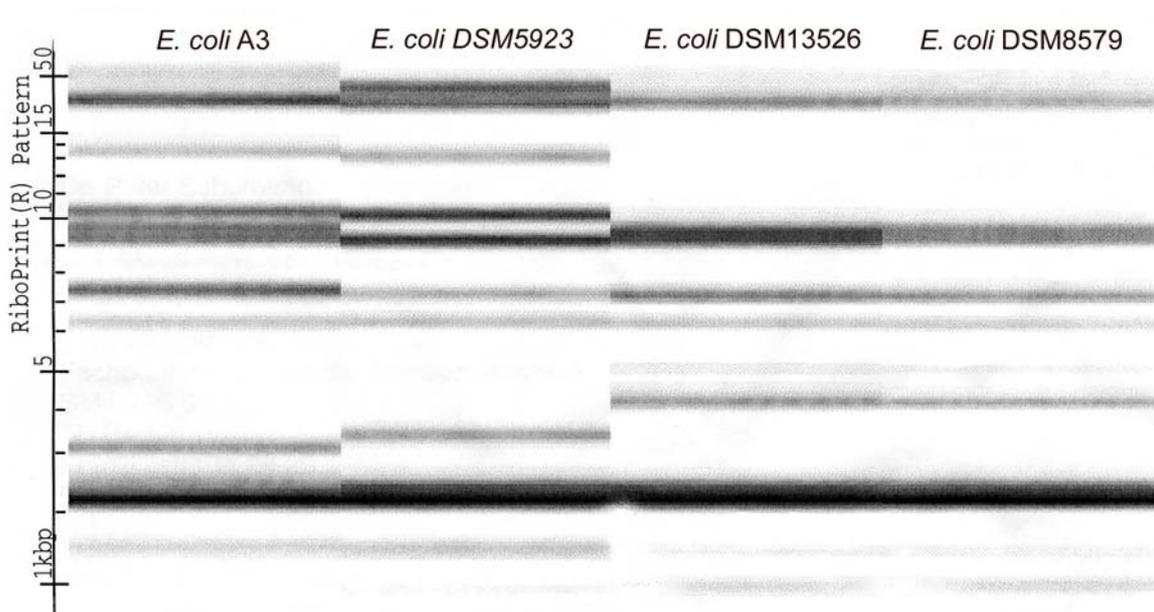


Abb. 15: Riboprint Muster des *E. coli* A3 Stammes sowie dreier DSMZ Stämme

Dagegen zeigt der Stamm *E. coli* A3 zu den beiden DSM-Stämmen der EHEC-Gruppe nur eine relativ geringe Ähnlichkeit im RiboPrint-Muster: zu dem Stamm *E. coli* DSM 8579 besteht eine Ähnlichkeit von 0,66 und zu dem Stamm *E. coli* DSM 13526 eine Ähnlichkeit von 0,67. Die Ähnlichkeit der beiden EHEC Stämme DSM 8579 und DSM 13526 ist dabei so hoch (0,98), dass sie der gemeinsamen RiboGruppe RIBO1 198-291-S-3 zugeordnet wurden und deshalb im Sinne der RiboPrint-Analyse als identisch anzusehen sind.

3.3 Vergleichende Untersuchungen von *E. coli* A3 und *E. coli* K12

Zur Abschätzung des Überlebenspotentials des Stammes *E. coli* A3 wurde in Langzeit-Batch-Experimenten die Kultivierbarkeit und Vitalität der Zellen im Vergleich zu dem Laborstamm *E. coli* K12 (DSM Nr. 498) untersucht.

3.3.1 Maximale Wachstumsraten

Ein Vergleich der maximalen Wachstumsraten des Umweltisolates *E. coli* A3 und des Laborstammes *E. coli* K12 in LB Medium bei 37 °C ergab, wie in Tab. 16 dargestellt, dass das Umweltisolat eine etwas höhere maximale Wachstumsrate und damit eine etwas geringere Generationszeit (30,0 Minuten) aufwies als der Laborstamm mit 34,7 Minuten. Die Negativkontrolle zeigte kein Wachstum. Wurden die Bakterien bei 25 °C statt bei 37 °C inkubiert, so betrug die Generationszeit von *E. coli* A3 131 Minuten und von *E. coli* K12 231 Minuten.

Tab. 16: Vergleich der maximalen Wachstumsraten und Generationszeiten von *E. coli* K12 und *E. coli* A3

	Maximale Wachstumsrate μ_{\max} [h ⁻¹]	Generationszeit [min]	Maximale Wachstumsrate μ_{\max} [h ⁻¹]	Generationszeit [min]
	Bei 37 °C in LB Medium		Bei 25 °C in AB Medium [2 g Fructose l ⁻¹]	
<i>E. coli</i> A3	1,41 ± 0,16	30,0 ± 3,1	0,32	130,8
<i>E. coli</i> K12	1,20 ± 0,05	34,7 ± 1,5	0,18	231,0

3.3.2 Biomasseentwicklung in einem Langzeit-Batch-Ansatz

Der Vergleich der photometrisch bestimmten Biomasseentwicklung von *E. coli* A3 und *E. coli* K12 über einen längeren Zeitraum zeigte, dass die optische Dichte bei 578 nm des Umweltisolates stets etwas über der des Laborstammes lag (Abb. 16 und Abb. 17).

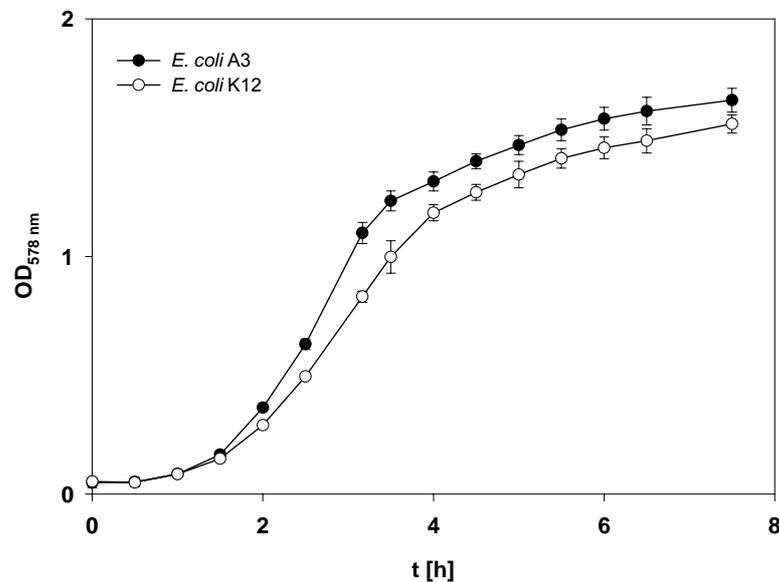


Abb. 16: Wachstumskurve von *E. coli* A3 und *E. coli* K12 in LB Medium bis 8 h

Auch während der Langzeitkultur bis 114 Tagen verblieb die optische Dichte des Umweltisolates *E. coli* A3 größtenteils über der des Laborstammes *E. coli* K12.

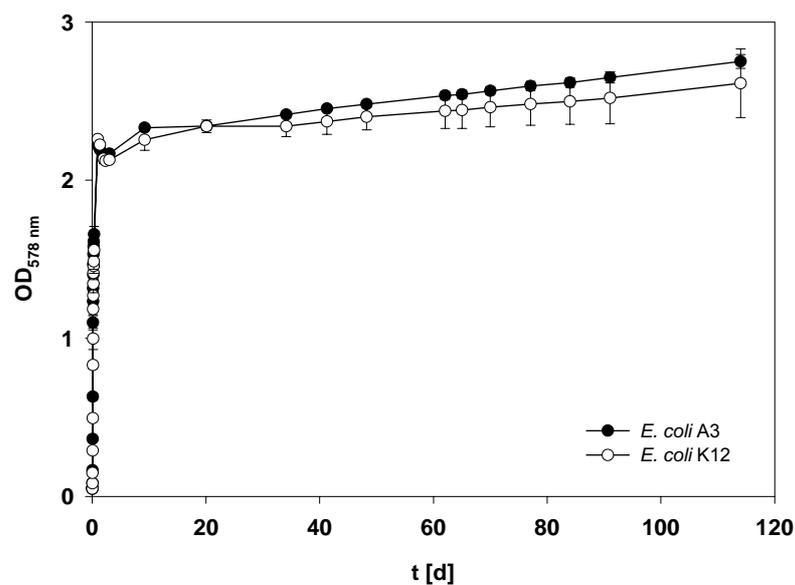


Abb. 17: Wachstumskurve von *E. coli* A3 und *E. coli* K12 in LB Medium bis 2.700 h

3.3.3 Vitalität der Zellen in einem Langzeit-Batch-Ansatz

Der Anteil der kultivierbaren Bakterien blieb vom 1. bis 26. Tag bei beiden Stämmen relativ konstant und lag bei *E. coli* A3 im Durchschnitt bei $1,95 \pm 0,30 \times 10^9$ Zellen ml^{-1} und bei *E. coli* K12 bei $2,15 \pm 0,21 \times 10^9$ Zellen ml^{-1} . Ab dem 27. Tag ist in Abb. 18 bei beiden Stämmen eine deutliche Abnahme der KBE zu erkennen, die bei *E. coli* K12 stärker ausgeprägt war als bei *E. coli* A3. Insgesamt nahm der Anteil der kultivierbaren Zellen in beiden Stämmen um drei bzw. vier Zehnerpotenzen auf 0,24 % des Durchschnittswertes der ersten 26 Tage bei *E. coli* A3 bzw. auf 0,08 % des vergleichbaren Durchschnittswertes bei *E. coli* K12 ab.

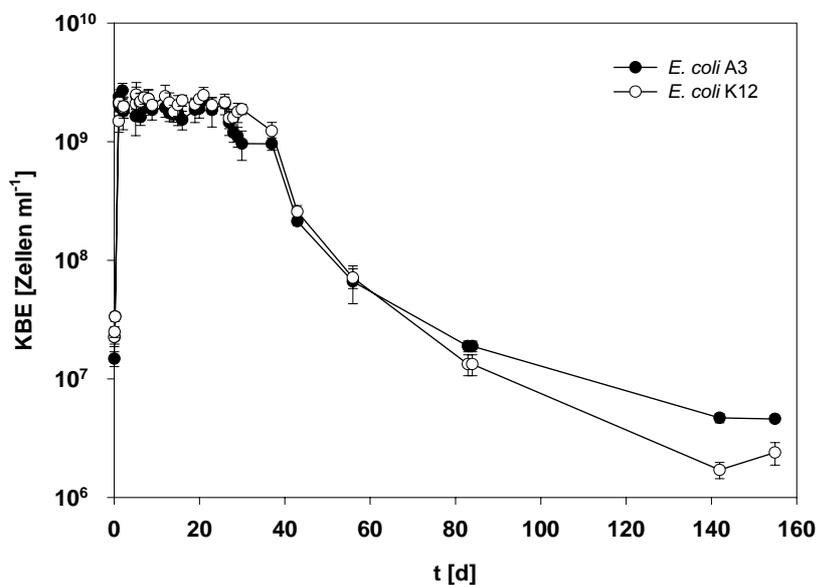


Abb. 18: Zeitliche Entwicklung der Kultivierbarkeit (KBE = Koloniebildende Einheiten) von *E. coli* A3 und *E. coli* K12

Auch der Anteil der mit dem LIVE/DEAD® BacLight™ Kit nachgewiesenen vermeintlich lebenden Zellen blieb in beiden Stämme bis mindestens zum 43. Tag konstant bei durchschnittlich $99,3 \pm 0,4$ % bei *E. coli* A3 und $98,5 \pm 1,5$ % bei *E. coli* K12. Im Gegensatz zum Umweltisolat, das am 142. Tag noch $86,2 \pm 2,5$ % und am 155. Tag noch $77,2 \pm 1,8$ % vermeintlich lebende Zellen aufwies (Abb. 19 und Abb. 21), hatte jedoch zu diesen Zeitpunkten der Anteil an „lebenden“ Zellen im Laborstamm schon auf $17,2 \pm 10,4$ % bzw. $8,4 \pm 4,2$ % abgenommen (Abb. 20 und Abb. 21).

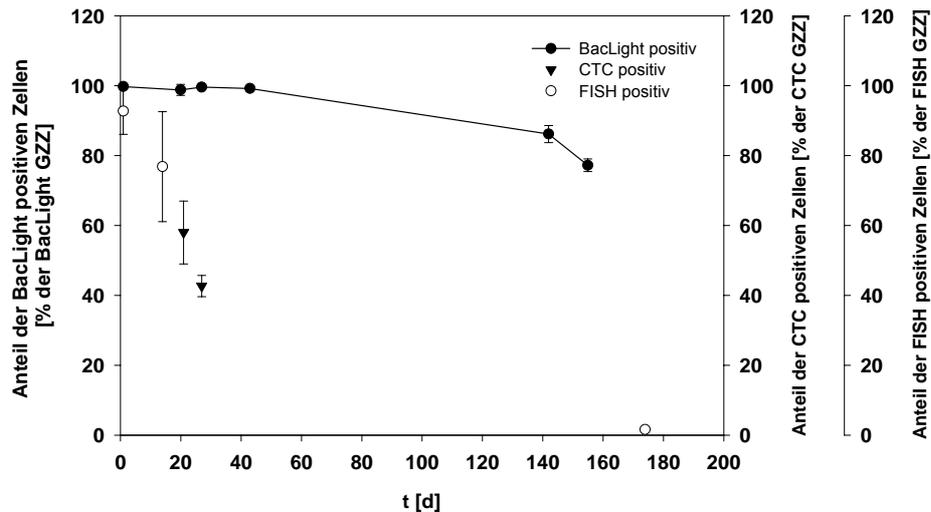


Abb. 19: Zeitliche Entwicklung verschiedener Vitalitätsparameter (BacLight, CTC, FISH) von *E. coli* A3 in einer Langzeit-Batch-Kultur

Während der Anteil der metabolisch aktiven (CTC positiven) Zellen bei beiden Stämmen am 21. und 27. Tag zwischen 35 und 60 % lag, war der Anteil der hybridisierbaren (FISH positiven) Zellen am 1. und 14. Tag mit 75 – 95 % relativ hoch. Bei beiden Stämmen sank der Anteil der hybridisierbaren Zellen am 174. Tag auf unter 2 % ab (Abb. 19 und Abb. 20).

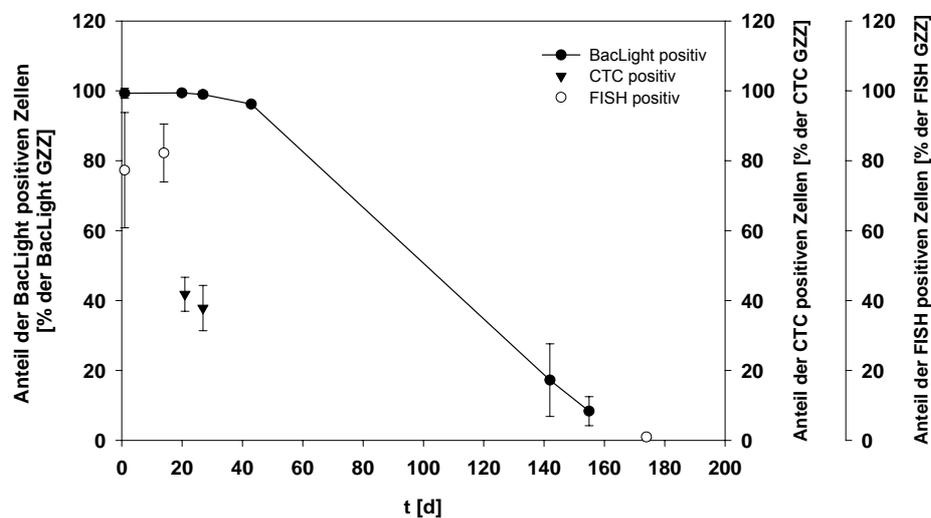


Abb. 20: Zeitliche Entwicklung verschiedener Vitalitätsparameter (BacLight, CTC, FISH) von *E. coli* K12 in einer Langzeit-Batch-Kultur

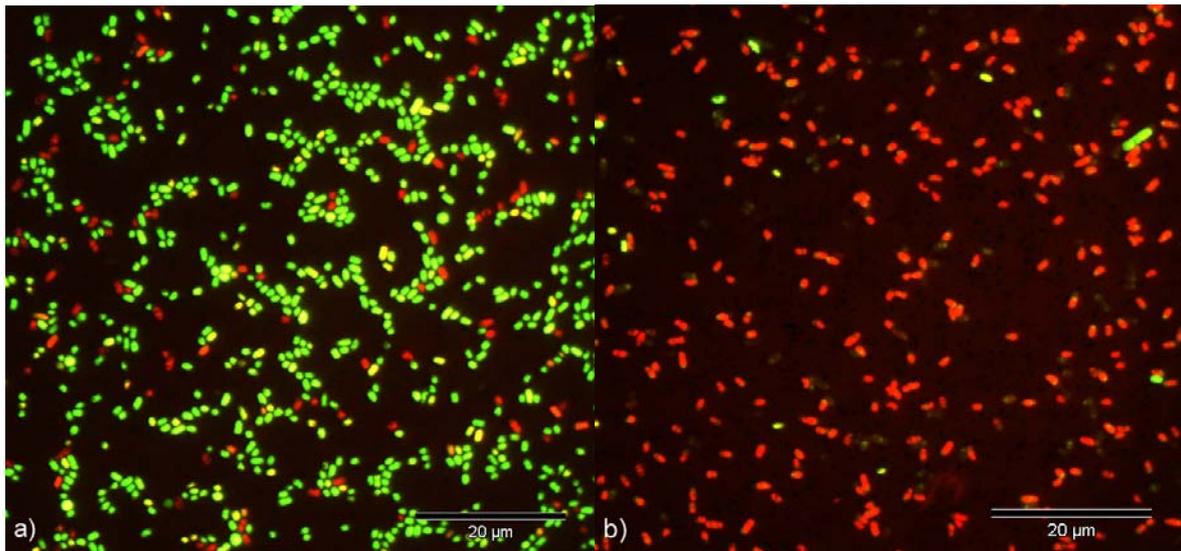


Abb. 21: Fluoreszenzaufnahmen von mit dem LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability kit gefärbten Zellen nach 142 Tagen in einer Langzeit-Batch-Kultur (grün = vermeintlich lebend, rot = vermeintlich tot), a) *E. coli* A3, b) *E. coli* K12

Die großen Unterschiede im Anteil an vermeintlich lebenden Zellen (Abb. 21) deuten darauf hin, dass das Umweltisolat *E. coli* A3 an lange Hungerperioden besser angepasst ist als der Laborstamm *E. coli* K12.

3.4 Langzeitkultivierung von *E. coli* A3 im MBR und Batch-Ansatz

Ein Membranbioreaktorsystem (MBR) wurde zur Untersuchung des Erhaltungsstoffwechsels einer bakteriellen Reinkultur von *E. coli* A3 etabliert (siehe 2.4.1). Der Rückhalt der Biomasse im System erfolgte dabei mittels eines Membranmoduls, so dass die Bakterien kontinuierlich mit gering konzentrierten Nährstoffen versorgt und verbrauchtes Medium ausgewaschen wurde. Während der Langzeitkultivierung von *E. coli* A3 in einem MBR wurden die Zellen in einem Reaktor, der ein Arbeitsvolumen von 4,07 l aufwies, mit einer Medien-Zuflussrate von 0,1 l h⁻¹ versorgt. Daraus ergab sich eine Verweilzeit des Mediums von 40,7 h und damit eine Verdünnungsrate von 0,025 h⁻¹.

Parallel zu den Fermentationen im MBR erfolgte die Kultivierung von *E. coli* A3 Zellen aus derselben Übernachtskultur innerhalb eines Batch-Ansatzes, für den das gleiche AB Mineralmedium mit Fructose Verwendung fand.

3.4.1 Sterilität der Anlagen

Zur Kontrolle des zu- und abgeführten Mediums wurden je 100 µl des zulaufenden Mediums sowie des Permeats wöchentlich unverdünnt auf LB Agar ausplattiert. Auf keiner dieser Platten waren Bakterienkolonien nachweisbar. Um auch das Vorhandensein von nichtkultivierbaren Kontaminanten auszuschließen, wurden dieselben Proben auf einem

mit Agarose beschichteten Objektträger im Phasenkontrast unter dem Mikroskop inspiert, auch hier gab es keine Hinweise auf das Vorhandensein von Kontaminanten mit einer *E. coli* untypischen Zellmorphologie.

Zur Sicherstellung der Reinheit der *E. coli* Kulturen im Reaktor und im Batch-Ansatz dienten zum einen die dreimal wöchentlich vorgenommenen Kultivierungsansätze auf LB-Agar, auf denen nach der 24stündigen Inkubation sowie der wöchentlich durchgeführten Nach-Inspektion keine *E. coli* untypischen Koloniemorphologien zu erkennen waren. Auch bei den mikroskopischen Untersuchungen (Phasenkontrast sowie Fluoreszenzmikroskopie) wurde auf ein eventuelles Vorhandensein von andersartigen Zellmorphologien (unter Umständen unkultivierbarer Bakterien) geachtet, die allerdings nie beobachtet wurden.

Des Weiteren wurde ein Restriktionsenzymverdau basierend auf der RFLP Methode (Restriction fragment length polymorphism) am 30. und 65. Tag der Fermentation durchgeführt. Da für diese Untersuchung ein Teil der 16S rDNA amplifiziert und verdaut wurde, wird die Methode als ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis) bezeichnet.

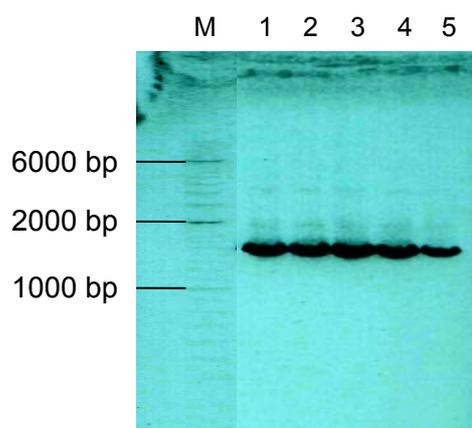


Abb. 22: Agarosegel mit 16S rDNA Amplifikaten
(Fotografie invertiert)

Wie in Abb. 22 erkennbar, wurden die betreffenden Bereiche auf der 16S rDNA erfolgreich amplifiziert. Die vervielfältigten DNA Stücke entsprechen der erwarteten Größe von circa 1400 bp.

Tab. 17: Belegung der Taschen im Agarosegel

Bande	Probe
M	DNA Leiter (O'RangeRuler™)
1	Reaktorzellen 30 d
2	Reaktorzellen 65 d
3	ÜNK <i>E. coli</i> A3 (Positivkontrolle)
4	Batchzellen 30 d
5	Batchzellen 65 d
5	Batchzellen 65 d



Abb. 23: Agarosegel mit *EcoRI* verdauten und unverdauten 16S rDNA Amplifikaten (Fotografie invertiert)

Tab. 18: Belegung der Taschen im Agarosegel

Bande	Probe
1	Restriktionsansatz Reaktor 30 d
2	Restriktionsansatz Reaktor 65 d
3	Restriktionsansatz ÜNK <i>E. coli</i> A3 (Positivkontrolle)
4	Restriktionsansatz Batch 30 d
5	Restriktionsansatz Batch 65 d
6	PCR Wasser (Negativkontrolle)
7	Reaktor 30 d unverdaut
8	Reaktor 65 d unverdaut
9	<i>E. coli</i> A3 ÜNK unverdaut
10	Batch 30 d unverdaut
11	Batch 65 d unverdaut
12	<i>E. coli</i> A3 unverdaut bei RT

Nach dem Verdau des 16S rDNA Amplifikates mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* lag der circa 1400 bp lange DNA Abschnitt von *E. coli* A3 in 2 DNA Teilstücken vor, wie die beiden Banden der Positivkontrolle mit einer Reinkultur von *E. coli* A3 in der 3. Spur in Abb. 23 zeigen. Nach einem „virtuellen“ Verdau mit Hilfe der Software NEBcutter der Firma Bio-Labs, New England, sollten diese Teilstücke 818 bzw. 647 bp lang sein. Damit entsprachen die beiden Banden in ihrer Größe den erwarteten Ergebnissen. Da die Proben des Reaktors sowie des Batch-Ansatzes vom 30. und 65. Tag das gleiche Muster wie die *E. coli* Kontrolle aufwiesen, gibt es aufgrund dieser ARDRA Untersuchung keine Hinweise auf das Vorhandensein von Kontaminanten im Reaktor sowie im Batch-Ansatz.

Bei den Banden 1 und 2 sowie 7 und 8 wurden ursprünglich 1 µl Templat zur Amplifikation der 16S rDNA eingesetzt und bei den Banden 4 und 5 sowie 10 und 11 jeweils 2 µl. Das Volumen des eingesetzten Templats hatte jedoch keine Auswirkungen auf das Bandenmuster.

3.4.2 Fructosegehalt im Reaktormedium und Permeat

Zur quantitativen Kontrolle des Fructosegehalts im Medium sowie zur Reinheitsbestimmung desselben wurde zu Beginn sowie am Ende des Einsatzes einer Medienflasche der

Fructosegehalt des Mediums photometrisch bestimmt. Auch vom Permeat wurde einmal wöchentlich die Fructosekonzentration gemessen.

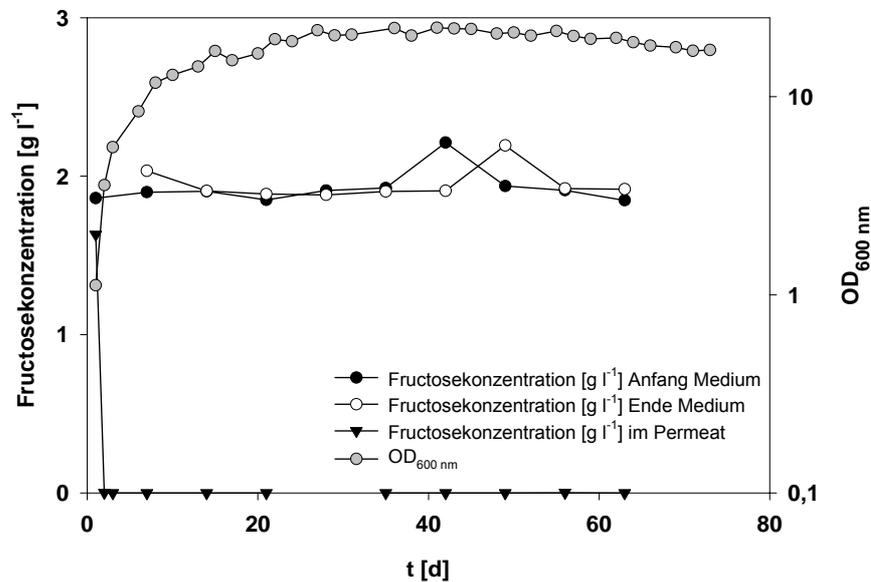


Abb. 24: Zeitlicher Verlauf der Fructosekonzentration im Medium und im Permeat

Der Fructosegehalt des Mediums lag mit einer Ausnahme bei durchschnittlich $1,91 \pm 0,04 \text{ g l}^{-1}$. Am 42. Tag zu Beginn des Medium-Einsatzes sowie am Ende desselben Vorlagebehälters am 49. Tag der Fermentation lag der Fructosegehalt mit $2,21$ bzw. $2,19 \text{ g l}^{-1}$ etwas höher. Da zu keiner Zeit ein größerer Unterschied im Fructosegehalt zwischen Beginn und dem Ende einer Vorlageflasche zu erkennen war, ist davon auszugehen, dass keine Kontamination des Mediums vorlag. Heterotrophe Kontaminanten hätten vermutlich eine reduzierte Fructosekonzentration zum Ende des Mediums zur Folge gehabt. Des Weiteren kann auch eine Schichtung der Kohlenstoffkonzentration im Vorlagebehälter aufgrund dieser Datenlage ausgeschlossen werden.

Der Fructosegehalt im Permeat sank rapide von $1,63 \text{ g l}^{-1}$ nach 24stündiger Betriebszeit auf unterhalb der Nachweisgrenze von $0,0004 \text{ g l}^{-1}$ ab dem 3. Fermentationstag ab.

3.4.3 Volumenverlust des Reaktors

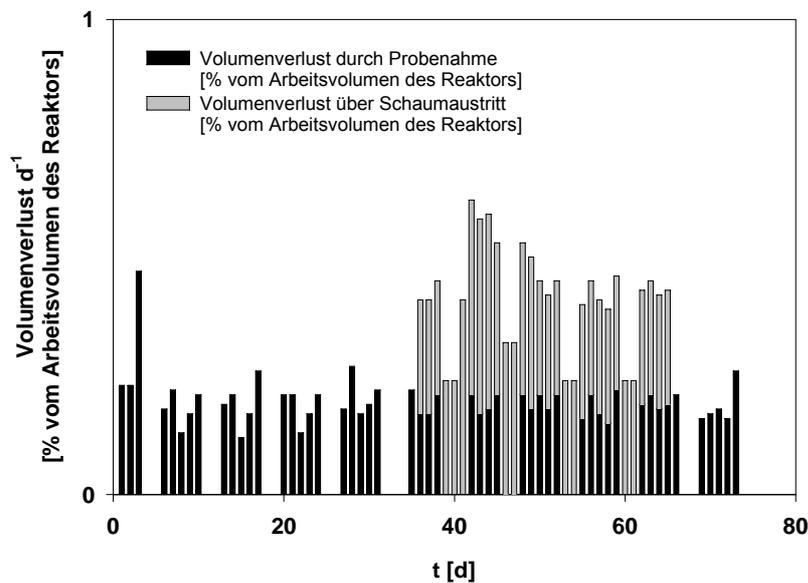


Abb. 25: Täglicher Volumenverlust der Fermentationsbrühe aufgrund von Probenahmen bzw. Schaumaustritt über die Abluft

Der Volumenverlust im Reaktor, der durch die Probenahme sowie den zeitweise auftretenden Schaumaustritt bedingt war, betrug im Durchschnitt $0,25 \pm 0,17$ % des Reaktorvolumens pro Tag. Selbst an Tagen mit einem hohen Volumenverlust, wie beispielsweise am 42. Tag lag dieser mit 0,6 % des Reaktorvolumens pro Tag deutlich unter einem Prozent.

3.4.4 Entwicklung der Biomasse

Reaktor

Die Zellen zeigten während der Fermentation eine vierwöchige Wachstumsphase bevor die gemessenen Parameter der Biomassekonzentration (wie Gesamtzellzahl, optische Dichte und biologische Trockensubstanz) jeweils einen relativ konstanten Level erreichten (Abb. 26). Die mittels der DEFT-Methode erfasste Gesamtzellzahl verblieb ab dem 28. Tag bis zum Ende im Durchschnitt bei $1,1 \times 10^{10} \pm 8,2 \times 10^8$ Zellen ml^{-1} . Die Gesamtzellzahl der mit dem Durchflusszytometer analysierten Proben lag fast immer unterhalb der Werte der Filterproben und betrug ab Beginn der fünften Woche im Durchschnitt bis zum Ende des Laufs $8,4 \times 10^9 \pm 1,2 \times 10^9$ Zellen ml^{-1} . Während desselben Zeitraumes lag die biologische Trockensubstanz im Mittel bei $6,6 \pm 0,6$ g l^{-1} und die $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ bei $20,2 \pm 1,6$, wobei letztere ab dem 59. Tag eine leicht abnehmende Tendenz aufwies.

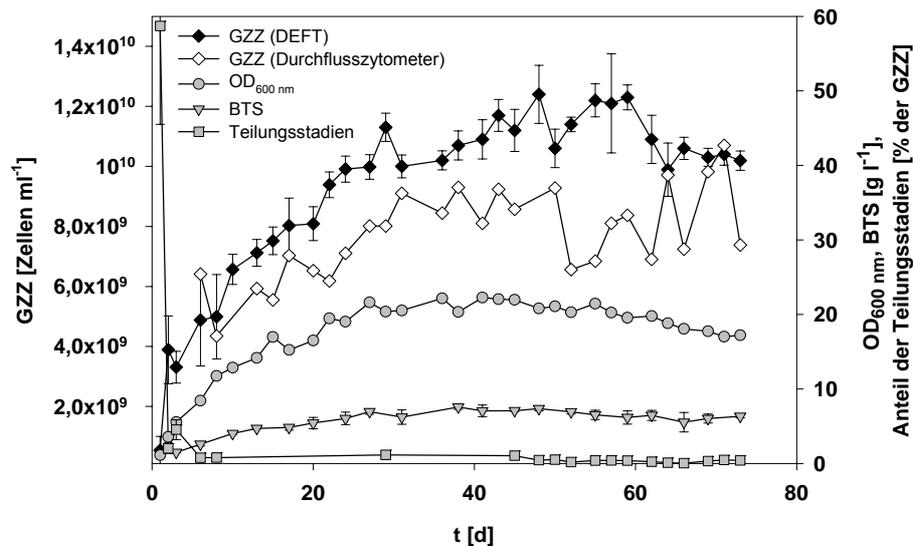


Abb. 26: Zeitliche Entwicklung der Biomasse (GZZ = Gesamtzellzahl, BTS = biologische Trockensubstanz) im Reaktor

Der Anteil der sich in einem mikroskopisch sichtbaren Teilungsstadium befindlichen Zellen nahm von 58 % am 1. Tag rapide ab und verblieb ab dem 6. Tag bis zum Ende der Fermentation bei einem Wert von 0,1 – 1,1 %.

Batch-Ansatz

Die Batchkultur wurde in 2 parallelen Ansätzen untersucht, wobei vom 1. bis zum 41. Tag der erste Ansatz und ab dem 42. Tag der zweite Ansatz beprobt wurde. Die Biomasse im Batch-Ansatz nahm, wie in Abb. 27 dargestellt, nach einer anfänglichen Wachstumsphase weiter kontinuierlich zu. Dabei begann die Probennahme des 2. Parallelansatzes ab dem 42. Tag insgesamt auf einem niedrigeren Niveau als die letzten Werte des 1. Ansatzes. Die optische Dichte stieg dabei auf einen Wert von bis zu 5,0 im ersten und bis auf 3,8 im zweiten Parallelansatz. Die Gesamtzellzahl lag am Ende des ersten Ansatzes bei $3,6 \times 10^9$ Zellen ml^{-1} und am Ende des zweiten Ansatzes bei $4,3 \times 10^9$ Zellen ml^{-1} . Die biologische Trockenmasse stieg bis auf $1,64 \text{ g l}^{-1}$ am Ende des ersten, bzw. $1,65 \text{ g l}^{-1}$ am Ende des 2. Parallelansatzes.

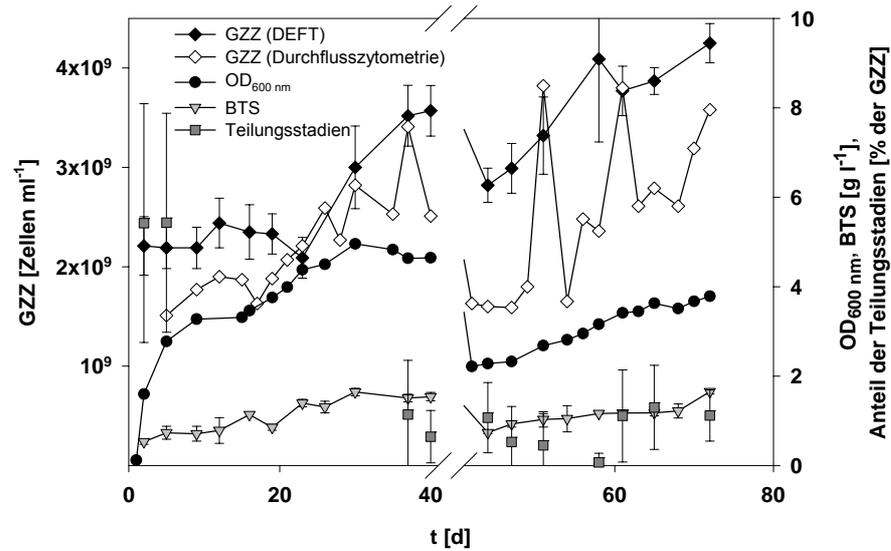


Abb. 27: Zeitliche Entwicklung der Biomasse (GZZ = Gesamtzellzahl, BTS = biologische Trockensubstanz) im Batch-Ansatz, ab dem 42. Tag wurde zweiter Parallelansatz beprobt

Der Anteil der mikroskopisch sichtbaren Teilungsstadien nahm von 5,42 % bzw. 5,43 % am 2. und 5. Tag auf einen Durchschnittswert von $0,83 \pm 0,76$ % zwischen dem 37. und 72. Tag ab.

3.4.5 Entwicklung der Aktivität der Zellen

Während der Langzeitkultivierung von *E. coli* A3 fand eine Bestimmung des Anteiles aktiver Zellen an der Gesamtpopulation nach unterschiedlichen Kriterien statt. Als Aktivitätsmerkmale wurden sowohl die Teilungsfähigkeit (DVC), die Kultivierbarkeit (KBE) und die Hybridisierbarkeit der Zellen (FISH) als auch die metabolische Aktivität (CTC) der Mikroorganismen untersucht. Des Weiteren wurde die ATP-Produktion sowie die Geschwindigkeit der Aufnahme erneuter Zellteilung nach einer Aktivierung ermittelt.

3.4.5.1 Entwicklung des Anteils an lebenden Zellen sowie der Teilungsfähigkeit und Kultivierbarkeit der Zellen

Reaktor

Wie aus Abb. 28 ersichtlich, sinkt der Anteil der BacLight positiven, also vermeintlich lebenden Zellen, während des kontinuierlichen Betriebes von 65 Tagen zwar leicht ab, unterschreitet dabei jedoch nicht einen Wert von 90 %. Dies bedeutet, dass der Anteil an vermeintlich toten Zellen im Reaktor während der gesamten kontinuierlichen Fermentationsdauer nicht mehr als 10 % betrug. Erst nach Umstellung des Systems auf einen Batch-Betrieb stieg der Anteil an vermeintlich toten Zellen auf 25 % an.

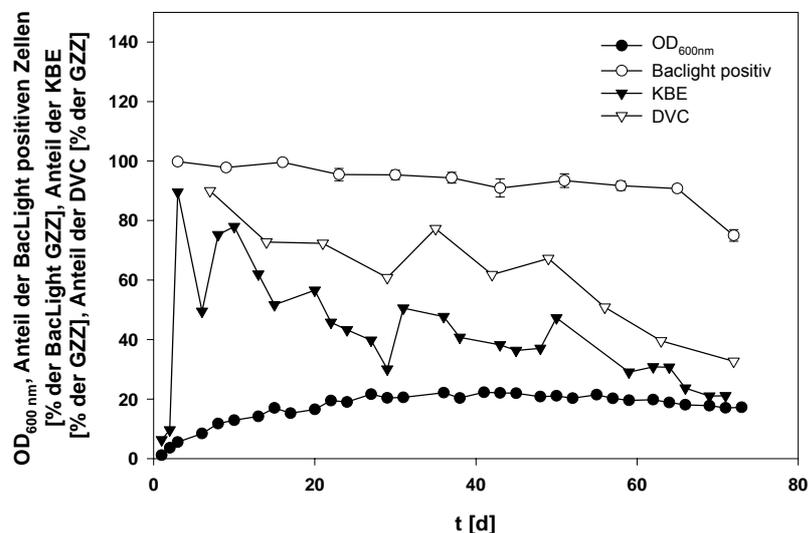


Abb. 28: Zeitliche Entwicklung der Aktivität der Zellen im Reaktor

Im Verlauf des Experimentes nahm der Anteil an kultivierbaren Zellen von anfangs 90 % am 3. Tag über 30 % zum Ende des kontinuierlichen Betriebes am 64. Tag auf 21 % am 73. Tag ab. Dabei bezog sich der Anteil der kultivierbaren Zellen auf die mittels der DEFT-Methode ermittelte Gesamtzellzahl. Der Anteil an potentiell teilungsfähigen Zellen (DVC) ist stets 9 - 30 % höher als der Anteil an kultivierbaren Bakterien und sinkt im Laufe des Experimentes ebenfalls kontinuierlich von 90 % am 7. Tag auf 33 % am 72. Tag.

Batch-Ansatz

Der Anteil der vermeintlich lebenden Zellen blieb, wie aus Abb. 29 ersichtlich, auch im Batch-Ansatz während der gesamten Fermentationszeit relativ hoch und betrug mindestens 96 %.

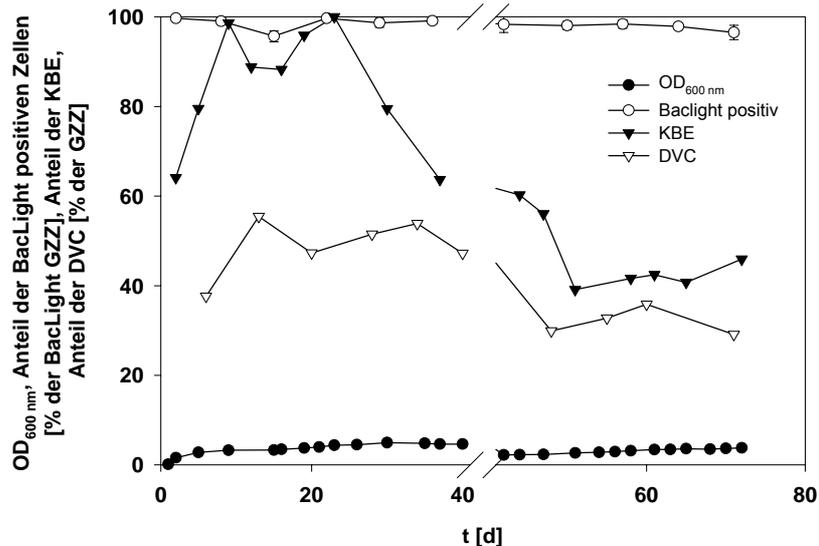


Abb. 29: Zeitliche Entwicklung der Aktivität der Zellen im Batch-Ansatz, ab dem 42. Tag wurde zweiter Parallel-Ansatz beprobt

Nach einem Anstieg bis zum 9. Tag auf 99 % und einem erneuten Maximum von 100 % am 23. Tag sank der Anteil der kultivierbaren Zellen (KBE) kontinuierlich auf einen Durchschnittswert von 42 % ab dem 51. Tag ab. Der Anteil der potentiell teilungsfähigen Zellen (DVC) ist durchgehend kleiner als der Anteil der kultivierbaren Zellen und sinkt nach einem kurzen Anstieg von 37 % am 6. Tag auf 56 % am 13. Tag auf einen Durchschnittswert von 32 % ab dem 48. Tag.

3.4.5.2 Entwicklung des Anteils an VBNC Zellen

Reaktor

Aus den Daten der KBE Bestimmung lassen sich Rückschlüsse auf die Entwicklung des Anteils von VBNC Zellen ziehen. In Abb. 30 ist der Verlauf des Anteils der mit DAPI gefärbten (nKBE) bzw. der Anteil der vermeintlich lebenden aber nicht kultivierbaren Zellen dargestellt (VBNC). Dabei wurde zum einen der Anteil der nicht-kultivierbaren Zellen auf die Gesamtzellzahl (DEFT) bezogen und zum anderen auf den Anteil der BacLight positiven Bakterien, so dass bei letzterer Betrachtungsweise die vermeintlich toten Zellen von vorneherein ausgeschlossen wurden.

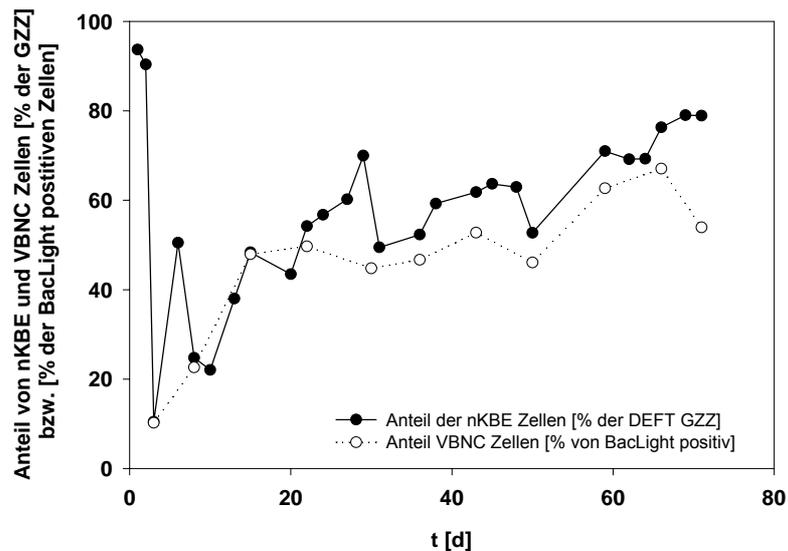


Abb. 30: Zeitliche Entwicklung des Anteils von nKBE und VBNC Zellen im Reaktor

Es war insgesamt eine kontinuierliche Zunahme von nKBE und VBNC Zellen im Reaktor während des Fermentationszeitraumes zu beobachten. Dabei stieg der Anteil der nKBE von 10 % am 3. Tag auf 79 % am 69. Tag an. Da der Anteil der vermeintlich toten Zellen während des gesamten Fermentationszeitraumes einen Wert von 10 % nicht überstieg, lagen die Werte des VBNC Anteils bezogen auf die BacLight positiven Zellen nur knapp unterhalb der nKBE-Werte. Nach Beendigung des kontinuierlichen Reaktorbetriebes sank der Anteil der VBNC Zellen bezogen auf den Anteil der mit BacLight als lebend eingestuft Zellen analog zur allgemeinen Abnahme der vermeintlich lebenden Zellen ab.

Batch-Ansatz

Im Batch-Ansatz kam es nach einer anfänglichen Abnahme der VBNC Stadien von 36 % auf 1 % am 9. Fermentationstag bzw. auf 0 % am 23. Fermentationstag zu einem kontinuierlichen Anstieg der lebenden aber nicht kultivierbaren Zellen auf einen Durchschnittswert von 59 % ab dem 51. Fermentationstag (Abb. 31).

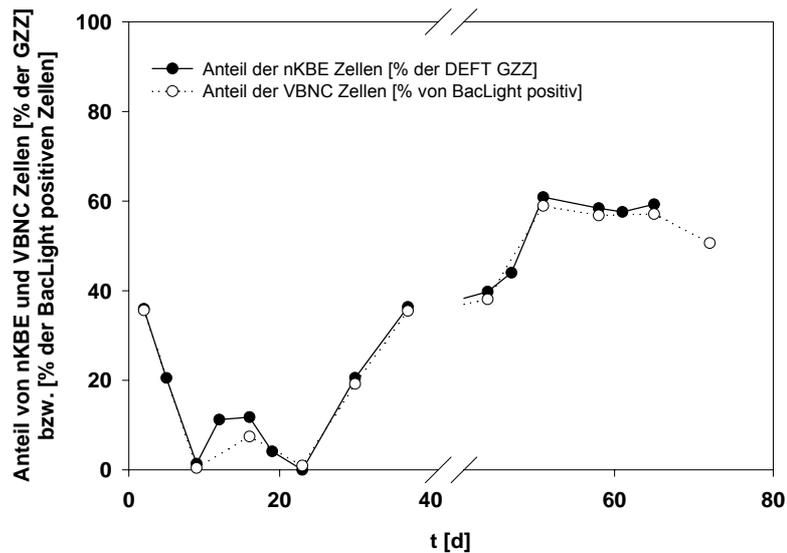


Abb. 31: Zeitliche Entwicklung des Anteils von VBNC Zellen im Batch-Ansatz, ab dem 42. Tag wurde zweiter Parallel-Ansatz beprobt

Die Anteile der nKBE Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl wiesen keinen großen Unterschied zu denen auf, die auf den Anteil der BacLight positiven Zellen als vermeintlich lebende Bakterien bezogen wurden.

3.4.5.3 Entwicklung des Anteils an hybridisierbaren Zellen

Reaktor

Der Anteil der mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) hybridisierbaren Zellen gibt einen Einblick in den Ribosomengehalt und damit einen Hinweis auf die Teilungsaktivität einzelner Zellen (Bouvier und del Giorgio 2003).

Der Anteil an hybridisierbaren Zellen im Reaktor sank, wie in Abb. 32 dargestellt, während der vierwöchigen Wachstumsphase von anfänglich 98 % am 6. Tag auf 69 % am 36. Tag und schwankte in der Zeit gleich bleibender Biomasse zwischen 61 und 82 %.

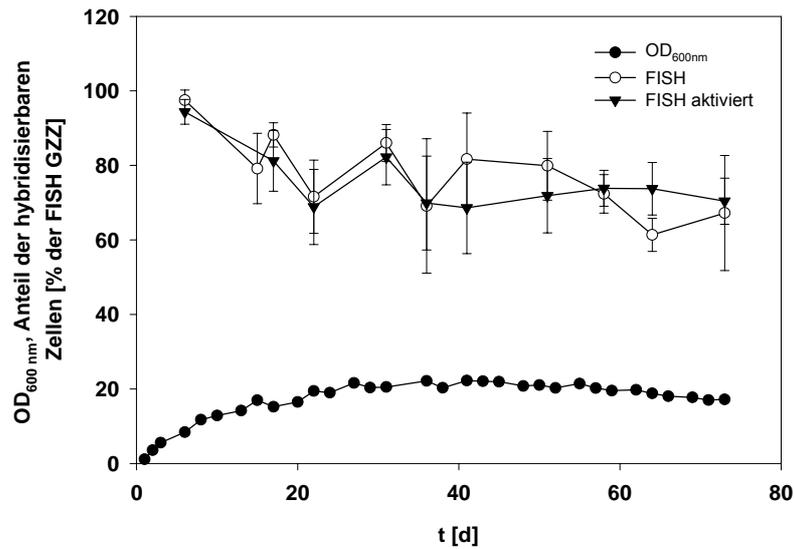


Abb. 32: Zeitliche Entwicklung des Anteils von hybridisierbaren Zellen im Reaktor

Eine Zugabe von LB Medium hatte keine eindeutige Erhöhung des Anteils an hybridisierbaren Zellen zur Folge. Auch die Intensität des Sondensignals wurde dadurch nicht verstärkt, da schon die unbehandelten Proben ein starkes Signal aufwiesen.

Insgesamt nahm die Intensität des Sondensignals über den Versuchszeitraum nicht merklich ab.

Batch-Ansatz

Wie aus Abb. 33 ersichtlich, zeigten die Zellen aus dem Batch-Ansatz eine Abnahme des Anteils an hybridisierbaren Zellen von 92 % am 5. Tag auf 58 % nach 3 Wochen. Im weiteren Verlauf kam es zu starken Schwankungen bis sich der Anteil der hybridisierbaren Zellen bei einem Durchschnittswert von 65 % ab dem 50. Tag einpendelte. Auch bei den Zellen aus dem Batch-Ansatz resultierte aus einer Zugabe von LB Medium keine signifikante Änderung des Anteils an hybridisierbaren Zellen.

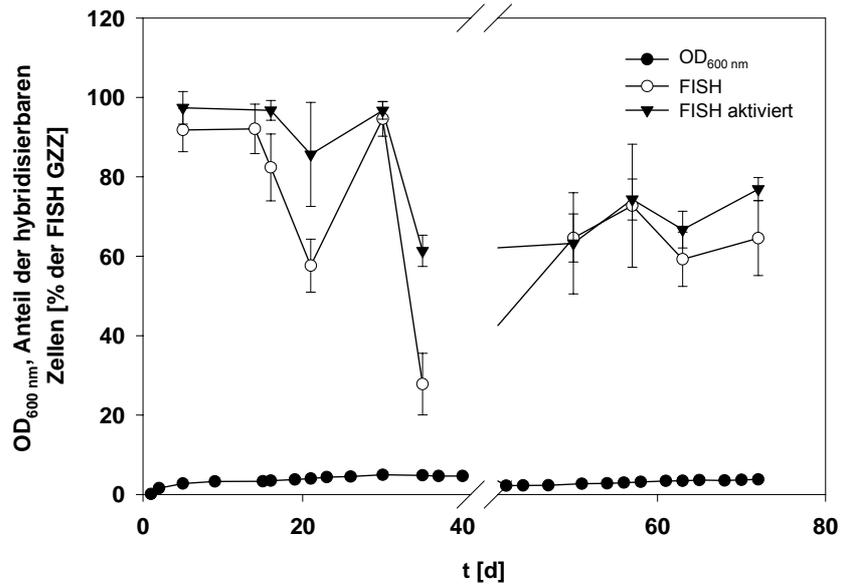


Abb. 33: Zeitliche Entwicklung des Anteils an hybridisierbaren Zellen im Batch-Ansatz, ab dem 42. Tag wurde zweiter Parallel-Ansatz beprobt

3.4.5.4 Entwicklung des Anteils an metabolisch aktiven Zellen

Reaktor

Der Anteil an CTC positiven, also metabolisch aktiven Zellen schwankte in den ersten Wochen zwischen 82 % und 100 % und nahm nach Beendigung der vierwöchigen Wachstumsphase von 97 % am 28. Tag auf 73 % am 62. Tag ab. Nach Beendigung des kontinuierlichen Betriebes am 65. Tag sank der Anteil weiter auf 65 % am 70. Tag ab (Abb. 34).

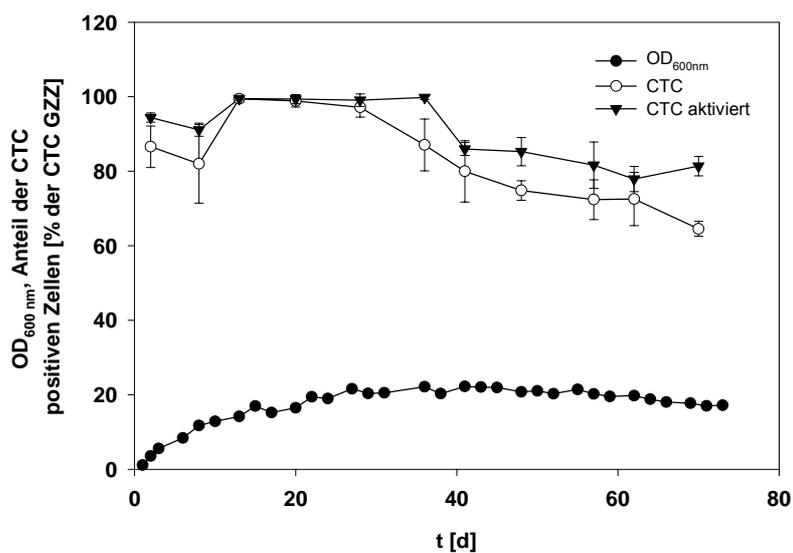


Abb. 34: Zeitliche Entwicklung des Anteils an metabolisch aktiven, CTC positiven Zellen im Reaktor

Eine Aktivierung mit Fructose konnte während der Zeit des Nicht-Wachstums der Zellen eine leichte Erhöhung des Anteils an metabolisch aktiven Zellen um durchschnittlich $8,9 \pm 4,3$ % bewirken.

Batch-Ansatz

Der Anteil metabolisch aktiver Zellen im Batch-Ansatz stieg zuerst von 59 % am 12. Tag auf 99 % am 27. Tag, um danach kontinuierlich auf 43 % am 68. Tag abzufallen (Abb. 35).

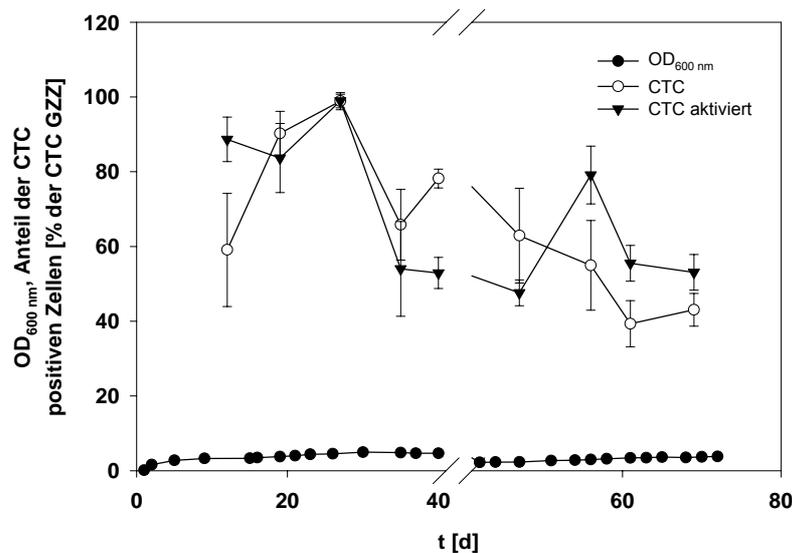


Abb. 35: Zeitliche Entwicklung des Anteils an metabolisch aktiven, CTC positiven Zellen im Batch-Ansatz, ab dem 42. Tag wurde zweiter Parallel-Ansatz beprobt

Eine Aktivierung mit Fructose ergab nur bei 4 von 9 Wertepaaren eine eindeutige Steigerung des Anteils an hybridisierbaren Zellen. Bei 2 Wertepaaren lag der Anteil der hybridisierbaren Zellen der nicht aktivierten Proben sogar deutlich über denen der aktivierten (Tag 40 und 47).

3.4.5.5 ATP-Produktion der Zellen nach Aktivierung

Die Reaktionsgeschwindigkeit der ATP-Bildung der *E. coli* Zellen aus dem Reaktor am 62. Tag der Fermentation sowie der Zellen aus dem Batch-Ansatz zum selben Zeitpunkt auf eine Substrataktivierung wurde im Folgenden über die Änderung des ATP-Gehaltes der Zellsuspension mittels eines Luminometers bestimmt. Dem Absolutwert kommt hierbei keine Bedeutung zu, da die Zellsuspensionen vor der Messung aus Zeitgründen nicht auf eine einheitliche Zellkonzentration eingestellt werden konnten. Abb. 36 lässt darauf schließen, dass die Zellen aus dem Reaktor schneller und verstärkt auf eine Substrataktivierung mit der Bildung von ATP reagieren als die Zellen aus dem Batch-Ansatz.

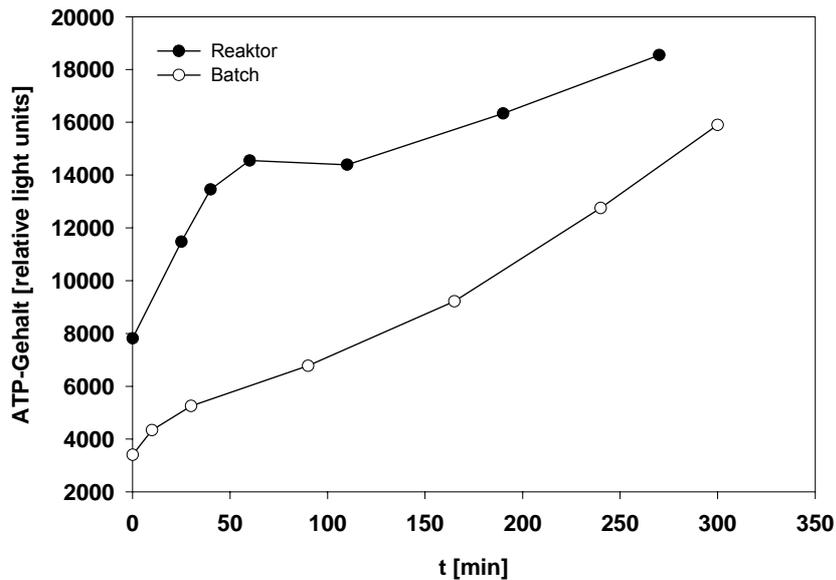


Abb. 36: ATP-Gehalt [relative light units] der Zellsuspensionen aus dem Reaktor bzw. dem Batch-Ansatz nach einer Aktivierung mit LB Medium

3.4.5.6 Geschwindigkeit der Wiederaufnahme des Zellwachstums

Außerdem wurde untersucht, wie schnell die aus den unterschiedlichen Langzeitkultivierungsansätzen stammenden Bakterien ein erneutes Zellwachstum aufnehmen. Dazu wurden je 3 parallele mit LB Medium gefüllte vorgewärmte Schüttelkolben mit je 1 % Bakterien suspension mit einer $OD_{600\text{ nm}} = 1$ angeimpft und bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden den Langzeit-Kultivierungsansätzen am 64. Tag entnommen. Anhand der Wachstumskurven in Abb. 37 lässt sich erkennen, dass die Übernachtskultur am schnellsten auf das vorhandene Substrat reagierte und die Zellen anfangen sich zu teilen. Es folgte der Batch-Ansatz; am langsamsten reagierten jedoch die Zellen aus dem Reaktor auf die erneut in hoher Konzentration zur Verfügung stehenden Nährstoffe.

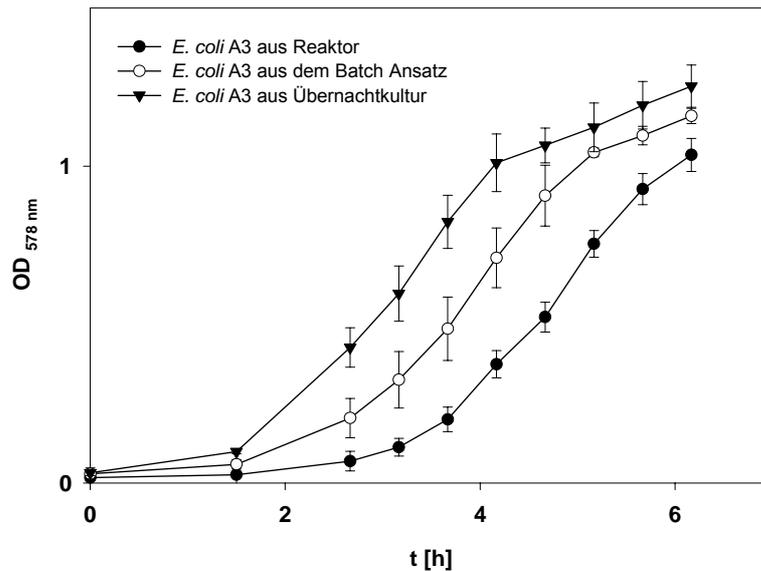


Abb. 37: Zeitliche Entwicklung der optischen Dichte bei 578 nm von *E. coli* A3 Zellen aus unterschiedlichen Kultivierungsansätzen nach einer Aktivierung mit LB Medium

Die maximalen Wachstumsraten und Generationszeiten der Ansätze sind in Abb. 38 dargestellt und wiesen nur marginale Unterschiede auf. Die größte maximale Wachstumsrate von 75 min^{-1} war bei der Übernachtskultur zu beobachten, was einer Generationszeit von 33 min entspricht. Es folgte die Reaktorkultur, deren Zellen nach der Aktivierung eine maximale Wachstumsrate von 70 min^{-1} zeigten (Generationszeit 36 min) und die Zellen aus dem Batch-Ansatz mit einer maximalen Wachstumsrate von 59 min^{-1} und einer Generationszeit von 43 min. Insgesamt reagierten die Zellen aus dem Reaktor mit einer längeren lag-Phase auf die Aktivierung mit LB Medium als die Zellen aus dem Batch-Ansatz, wiesen aber eine höhere Wachstumsrate als diese auf.

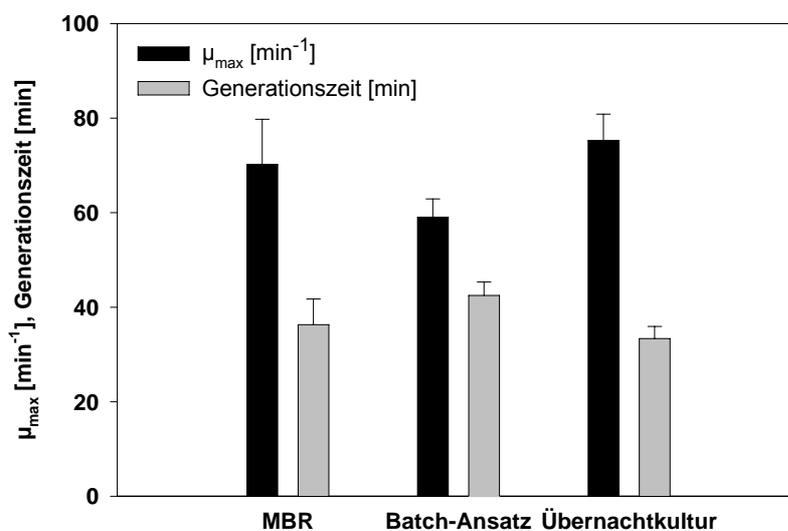


Abb. 38: Maximale Wachstumsrate von aktivierten *E. coli* A3 Zellen aus unterschiedlichen Kultivierungsansätzen

3.4.6 Entwicklung des Proteingehaltes der Zellen

Reaktor

Der Gehalt an wasserlöslichen Gesamtzellproteinen aus dem Reaktor stieg analog zur Biomasse bis zur fünften Woche an. Nach Beendigung der Wachstumsphase kam es bei der Proteinkonzentration darüber hinaus noch zu einem weiteren kleinen Anstieg ab der 6. Woche mit anschließendem leichten Abfall bis zum Ende des Reaktorlaufes. Wie aus Abb. 39 ersichtlich, entspricht der Proteingehalt pro Zelle im Durchschnitt in etwa einem Viertel der biologischen Trockenmasse pro Zelle und liegt damit in einem realistischen Bereich. In der Literatur geht man zwar davon aus, dass Proteine circa 50 % der Trockenmasse von Bakterien ausmachen (Cypionka 1999). Bei dem angewandten Zellaufschlussverfahren für die Proteinbestimmung werden allerdings größere Zellwandbestandteile u. ä. abzentrifugiert und nur die gelösten Proteine im Überstand gemessen, wodurch es zu einer Unterschätzung des Proteingehalts kommen kann.

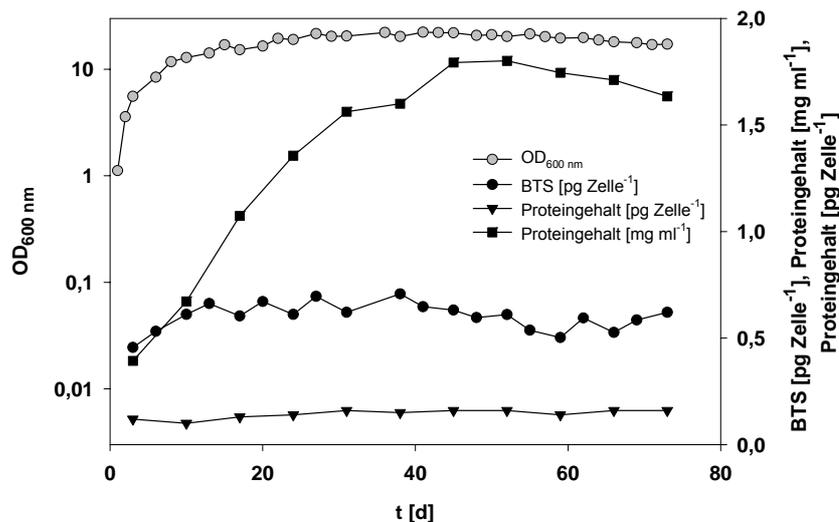


Abb. 39: Zeitliche Entwicklung des Trockengewichts der Zellen und des Proteingehalts des Kulturmediums [mg ml⁻¹] bzw. der Zellen [pg Zelle⁻¹]

Batch-Ansatz

Der Gehalt an wasserlöslichen Gesamtzellproteinen aus dem Batch-Ansatz stieg analog zur biologischen Trockenmasse pro Zelle bis zum 30. Tag auf 0,42 mg ml⁻¹ bzw. 0,55 pg Zelle⁻¹ an. Dabei blieb der Proteingehalt pro Zelle relativ konstant bei im Durchschnitt 0,12 pg Zelle⁻¹ im 1. Parallelansatz und bei 0,07 pg Zelle⁻¹ im 2. Parallelansatz.

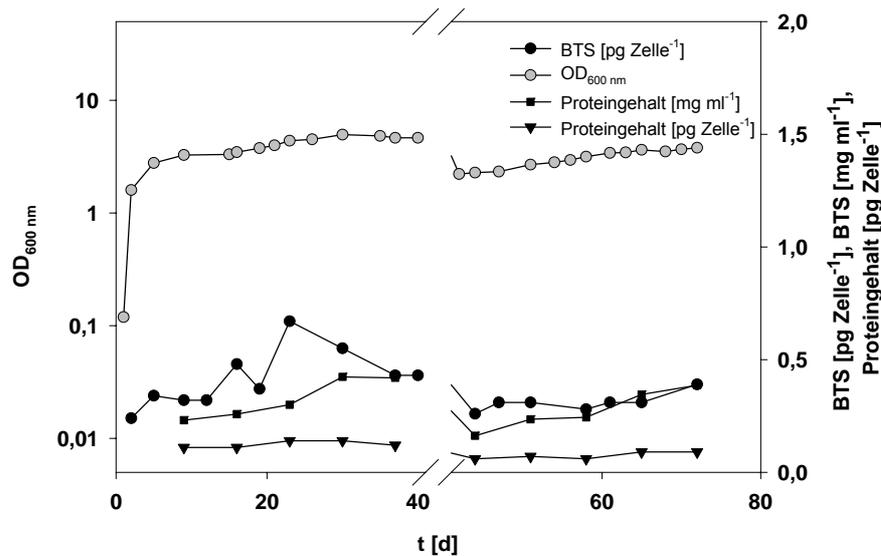


Abb. 40: Zeitliche Entwicklung des Trockengewichts der Zellen und des Proteingehalts der Zellsuspension bzw. der Zellen im Batch-Ansatz, ab dem 42. Tag wurde zweiter Parallel-Ansatz beprobt

Auch beim Batch-Ansatz entspricht der Proteingehalt pro Zelle im Durchschnitt einem Viertel der biologischen Trockenmasse pro Zelle und liegt damit in einem realistischen Bereich.

3.4.7 Entwicklung der Zellmorphologie

Zur Auffindung von zellmorphologischen Unterschieden der Bakterien im zeitlichen Verlauf eines Kultivierungsansatzes bzw. zwischen den beiden Kultivierungsansätzen Reaktor und Batch wurden die Zelllängen und -breiten von mindestens 100 Zellen je Probe vermessen und das daraus resultierende Zellvolumen errechnet und statistisch ausgewertet (2.5.6.2). Um herauszufinden, ob die optische Dichte bei längerer Kultivierungsdauer sowie hohen Zellkonzentrationen auch weiterhin einen guten Indikator für die Zellzahl darstellt oder ob dies aufgrund von Änderungen in der Zellmorphologie (z. B. Übergang zu kokkoiden Morphotypen) nicht mehr der Fall ist, wurde in Abb. 43 die Gesamtzellzahl (GZZ) der Reaktorkultur über der optischen Dichte aufgetragen und mit einer linearen Regression versehen.

3.4.7.1 Entwicklung der Zelllängen

Im Laufe der Fermentation kam es, wie in Abb. 41 zu erkennen, zu keiner gravierenden Änderung der durchschnittlichen Zelllängen bei den Bakterien aus der Reaktorkultur. Eine statistische Auswertung ergab, dass die Mediane der logarithmierten Zelllängen an den Probenahmetagen 10, 45, 52, 59, 66 und 72 statistisch nicht signifikant voneinander abweichen, also als gleich anzusehen sind. Die Mediane der Probenahmetage 17 und 31

Ergebnisse

sind in diesem Sinne ebenfalls gleich. Signifikant verschieden von allen anderen Medien sind die der Probenahmetage 24 und 38.

Der zeitliche Verlauf der mittleren Zelllängen der Reaktor-Kultur (Abb. 41) zeigt zunächst einen Anstieg vom 3. auf den 10. Tag von $1,51 \pm 0,39$ auf $1,85 \pm 0,36 \mu\text{m}$. Danach erfolgt ein leichter Abfall auf das Niveau des Probenahmetages 17 und erreicht am 24. Tag ein Maximum von $2,02 \pm 0,63 \mu\text{m}$. Anschließend sinkt die mittlere Zelllänge bis zu einem Minimum von $1,62 \pm 0,43$ am 38. Tag. Danach steigt sie erneut und verbleibt bis zum Ende des Experimentes auf einem Niveau von $1,85 \mu\text{m}$.

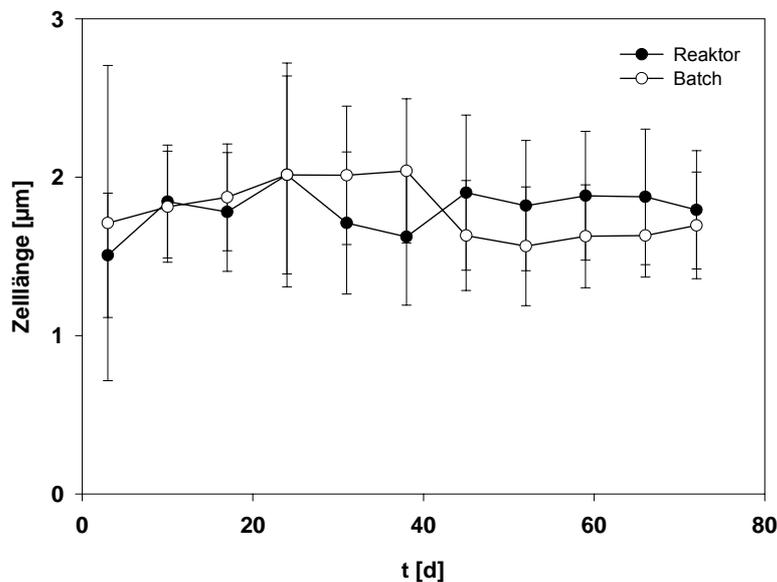


Abb. 41: Zeitliche Entwicklung der Zelllängen der Bakterien aus dem Reaktor und dem Batch-Ansatz

In Tab. 19 sind die mittleren Zelllängen der Bakterien aus der Reaktorkultur an den entsprechenden Probenahmetagen aufgeführt.

Tab. 19: Zuordnung der mittleren Zelllängen statistisch gleicher Stichproben der Bakterien aus dem Reaktor zu den Probenahmetagen, Zelllängen nicht logarithmiert

Reaktor Probenahmetage	Arithmetischer Mittelwert der Mediane der Zelllängen [μm]
10, 45, 52, 59, 66, 72	1,81
17, 31	1,80
24	2,02
38	1,53

Wie ebenfalls in Abb. 41 sichtbar, kam es auch bei den Bakterien aus dem Batch-Ansatz nur zu einer geringfügigen Änderung der Zelllängen. Die statistische Analyse der Daten ergab, dass die Mediane der logarithmierten Zelllängen der Stichproben der Batchkultur

an den Probenahmetagen 3, 45, 52, 59, 66, und 72 nicht signifikant verschieden, also als gleich anzusehen sind. Ebenso besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Medianen der Probenahmetage 31 und 38. Die Mediane der Probenahmetage 10 und 24 sind dagegen signifikant verschieden von allen anderen Zelllängen-Medianen.

Der Verlauf der Zelllängen des Batch-Ansatzes zeigt demnach einen Anstieg bis zum Maximum von $2,04 \pm 0,46 \mu\text{m}$ am 38. Fermentationstag, sinkt dann auf das Niveau von $1,56 \pm 0,38 \mu\text{m}$ am 52. Tag, um schließlich ab dem 52. Tag auf einem Niveau von $1,65 \mu\text{m}$ zu verweilen.

Die mittleren Zelllängen der als statistisch gleich interpretierten Probenahmetage, sind in Tab. 20 aufgeführt.

Tab. 20: Zuordnung der mittleren Zelllängen statistisch gleicher Stichproben der Bakterien aus dem Batch-Ansatz zu den Probenahmetagen, Zelllängen nicht logarithmiert

Batch Probenahmetage	Arithmetischer Mittelwert der Mediane der Zelllängen [μm]
3, 45, 52, 59, 66, 72	1,60
10	1,82
24	2,13
31, 38	1,98

Der statistische Vergleich der Mittelwerte zwischen den Zelllängen der Bakterien aus dem Reaktor und dem Batch-Ansatz an jeweils dem gleichen Probenahmetag ist in Tab. 21 dargestellt und ergab, dass die mittlere Zelllänge am 10. Tag nicht signifikant verschieden also als gleich anzusehen ist. Am 24., 31. und 38. Fermentationstag ist die mittlere Zelllänge der Bakterien des Batch-Ansatzes statistisch signifikant größer als die der Zellen aus dem Reaktor. Ab dem Probenahmetag 45 ist umgekehrt die mittlere Zelllänge der Bakterien aus dem Reaktor signifikant größer als die der Bakterien aus dem Batch-Ansatz. Bei der statistischen Auswertung fanden zwei verschiedene Tests Anwendung; Tab. 21 zeigt, welcher Test jeweils mit welchem Ergebnis Verwendung gefunden hat.

Ergebnisse

Tab. 21: Übersicht der statistischen Tests für den Mittelwertvergleich der Stichprobenpaarungen für die Zelllängen; die Vergleiche von 3 d und 17 d entfallen, da jeweils eine Stichprobe nicht normalverteilt ist; n. a. = nicht auswertbar

Tag	Test	Ergebnis
3	n. a.	n. a.
10	t-Test	Die Zelllängen sind gleich
17	n. a.	n. a.
24	t-Test	Die Zelllängen der Batch-Bakterien sind größer als die der Reaktor-Bakterien
31	Mann-Whitney	Die Zelllängen der Batch-Bakterien sind größer als die der Reaktor-Bakterien
38	t-Test	Die Zelllängen der Batch-Bakterien sind größer als die der Reaktor-Bakterien
45	Mann-Whitney	Die Zelllängen der Batch-Bakterien sind kleiner als die der Reaktor-Bakterien
52	t-Test	Die Zelllängen der Batch-Bakterien sind kleiner als die der Reaktor-Bakterien
59	t-Test	Die Zelllängen der Batch-Bakterien sind kleiner als die der Reaktor-Bakterien
66	Mann-Whitney	Die Zelllängen der Batch-Bakterien sind kleiner als die der Reaktor-Bakterien
72	t-Test	Die Zelllängen der Batch-Bakterien sind kleiner als die der Reaktor-Bakterien

3.4.7.2 Entwicklung der Zellvolumina

Wie bei den Zelllängen kam es auch bei den Zellvolumina, wie aus Abb. 42 ersichtlich, nur zu geringfügigen Veränderungen sowohl in der Reaktorkultur als auch im Batch-Ansatz.

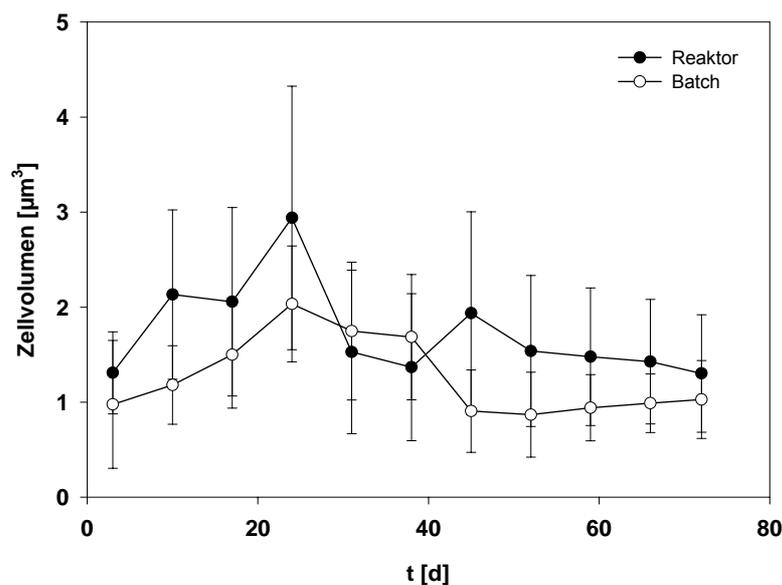


Abb. 42: Zeitliche Entwicklung der Zellvolumina der Bakterien aus dem Reaktor und dem Batch-Ansatz

Der Verlauf der mittleren Zellvolumina der Reaktor-Zellen zeigt zunächst einen signifikanten Anstieg bis zu einem Maximum von $2,94 \pm 1,39 \mu\text{m}^3$ am 24. Tag. Dann sinkt das mittlere Zellvolumen an den Probenahmetagen 31 und 38 auf das Anfangsniveau ab, steigt danach jedoch noch einmal erneut auf das Niveau des Probenahmetages 45. Ab dem 52. Tag unterscheiden sich die Werte nicht mehr signifikant und verbleiben auf einem Niveau von $1,44 \mu\text{m}^3$.

Die statistische Auswertung ergab, dass die mittleren Zellvolumina der Reaktorkultur an den Probenahmetagen 3, 31, 38, 52, 59, 66 und 72 nicht signifikant verschieden, also als gleich anzusehen sind. Ebenfalls in diesem Sinne gleich sind die Mediane der Probenahmetage 10, 17 sowie 45. Signifikant verschieden von allen anderen mittleren Zellvolumina ist der Median des Probenahmetages 24. Tab. 22 zeigt die Zuordnung der mittleren Zellvolumina zu den Probenahmetagen.

Tab. 22: Zuordnung der mittleren Zellvolumina statistisch gleicher Stichproben der Bakterien aus dem Reaktor zu den Probenahmetagen, Zellvolumina nicht logarithmiert

Reaktor Probenahmetage	Arithmetischer Mittelwert der Mediane der Zellvolumina [μm^3]
3, 31, 38, 52, 59, 66, 72	1,27
10, 17, 45	1,88
24	3,11

Wie ebenfalls in Abb. 42 sichtbar, kam es auch bei den Bakterien aus dem Batch-Ansatz zu einer geringfügigen Veränderung der Zellvolumina über die Zeit.

Die mittleren Zellvolumina der Bakterien des Batch-Ansatzes weisen bis zum 24. Tag einen signifikanten Anstieg von $0,98 \pm 0,67 \mu\text{m}^3$ auf $2,03 \pm 0,61 \mu\text{m}^3$ auf und fallen im Anschluss auf das Niveau vom 31. ($1,75 \pm 0,73 \mu\text{m}^3$) bzw. 38. Tag ($1,69 \pm 0,66 \mu\text{m}^3$) ab, um bis zum 45. Tag noch einmal weiter stark abzufallen. Ab dem 45. Tag steigen die mittleren Zellvolumina wieder leicht bis über das Anfangsniveau an.

Wie in Tab. 23 beschrieben, sind die Zellvolumen-Mediane des Batch-Ansatzes an den Probenahmetagen 3, 59, 66 und 72 statistisch nicht signifikant verschieden, also als gleich anzusehen. Auch an den Probenahmetagen 31 und 38, sowie an den Probenahmetagen 45 und 52 sind sie in diesem Sinne gleich. Signifikant verschieden von allen anderen Medianen sind die der Probenahmetage 10, 17 und 24.

Ergebnisse

Tab. 23: Zuordnung der mittleren Zellvolumina statistisch gleicher Stichproben der Bakterien aus dem Batch-Ansatz zu den Probenahmetagen, Zellvolumina nicht logarithmiert

Batch Probenahmetage	Arithmetischer Mittelwert der Mediane der Zellvolumina [μm^3]
3, 59, 66, 72	0,93
10	1,25
17	1,42
24	2,00
31, 38	1,64
45, 52	0,78

Der statistische Vergleich der Mittelwerte zwischen den Zellvolumina der Reaktor- und der Batch-Bakterien an jeweils dem gleichen Probenahmetag ist in Tab. 24 dargestellt und ergab, dass das mittlere Zellvolumen der Bakterien aus dem Batch-Ansatz statistisch signifikant kleiner ist als das der Bakterien aus dem Reaktor. Die Ausnahmen stellen die Proben der Tage 31 und 38 dar, an denen die Zellvolumen-Mediane der Zellen aus dem Batch-Ansatz signifikant kleiner waren als die der Reaktor-Zellen. Auch bei der Auswertung dieser Stichprobenpaarungen wurden zwei verschiedene statistische Tests verwendet deren Anwendung und Ergebnisse in Tab. 24 zusammengefasst sind.

Tab. 24: Übersicht der statistischen Tests für den Mittelwertvergleich der Stichprobenpaarungen für die Zellvolumina

Tag	Test	Ergebnis
3	t-Test	Die Zellvolumina der Batch-Bakterien sind kleiner als die der Reaktor-Bakterien
10	t-Test	Die Zellvolumina der Batch-Bakterien sind kleiner als die der Reaktor-Bakterien
17	t-Test	Die Zellvolumina der Batch-Bakterien sind kleiner als die der Reaktor-Bakterien
24	Mann-Whitney	Die Zellvolumina der Batch-Bakterien sind kleiner als die der Reaktor-Bakterien
31	Mann-Whitney	Die Zellvolumina der Batch-Bakterien sind größer als die der Reaktor-Bakterien
38	Mann-Whitney	Die Zellvolumina der Batch-Bakterien sind größer als die der Reaktor-Bakterien
45	Mann-Whitney	Die Zellvolumina der Batch-Bakterien sind kleiner als die der Reaktor-Bakterien
52	t-Test	Die Zellvolumina der Batch-Bakterien sind kleiner als die der Reaktor-Bakterien
59	Mann-Whitney	Die Zellvolumina der Batch-Bakterien sind kleiner als die der Reaktor-Bakterien
66	Mann-Whitney	Die Zellvolumina der Batch-Bakterien sind kleiner als die der Reaktor-Bakterien
72	t-Test	Die Zellvolumina der Batch-Bakterien sind kleiner als die der Reaktor-Bakterien

Zusammenfassung

Zu Beginn der Kultivierungen stiegen Zelllänge wie auch Zellvolumen in der Reaktor- und der Batch-Kultur bis um den 30. Tag leicht an. Ab dem 40. Tag sanken die Werte der Batch-Zellen wieder leicht ab, wobei sowohl die Zelllängen als auch die Zellvolumina der Bakterien aus dem MBR während des Erhaltungsstoffwechsels durchschnittlich um $0,23 \mu\text{m}$ bzw. $0,59 \mu\text{m}^3$ größer waren als in der Batch-Kultur.

3.4.7.3 Vergleich der Zelllängen vor und nach einer Aktivierung

Zum Vergleich der Zelllängen vor und nach der Aktivierung mit LB Medium wurden die während des DVC Experimentes ermittelten Zelllängen der Negativkontrolle (Zellen wurden sofort fixiert) mit denen der Positivkontrolle (Zellen wurden mit LB Medium versetzt und ohne Antibiotikum inkubiert) verglichen. Es zeigte sich, dass die Zelllängen der mit $0,1 \times$ LB Medium aktivierten Bakterien aus dem Reaktor und dem Batch-Ansatz bis auf zwei Ausnahmen statistisch signifikant um durchschnittlich $0,34 \mu\text{m}$ bzw. $0,37 \mu\text{m}$ größer waren (t-Test bzw. bei fehlender Varianzhomogenität Mann-Whitney-Test, $P < 0,05$) als die der Formaldehyd-fixierten Negativkontrolle.

3.4.7.4 Verhältnis von optischen Dichte zur Zelldichte

In Abb. 43 ist die Gesamtzellzahl über die optische Dichte der Bakteriensuspension während des Reaktorlaufs aufgetragen. Da die Werte eine lineare Regression zulassen ($r^2 = 0,90$), ist davon auszugehen, dass auch bei hohen Zelldichten in der späten Phase des Nicht-Wachstums eine eventuelle Veränderung der Zellmorphologie bzw. -größe keinen Einfluss auf die Messung der optischen Dichte hat. Die $OD_{600 \text{ nm}}$ Werte der 2. Hälfte des Reaktorlaufs können also mit denen der Anfangsphase verglichen werden.

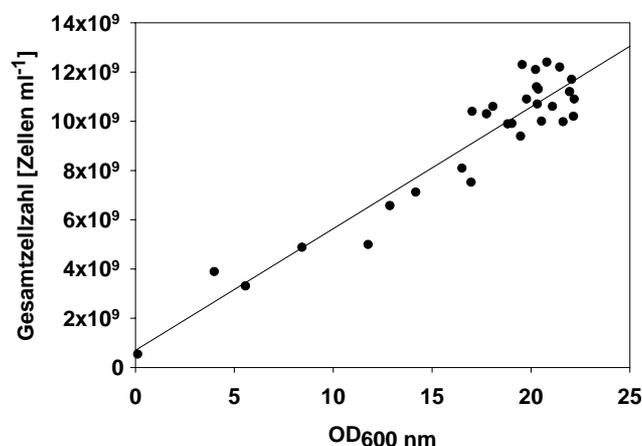


Abb. 43: Gesamtzellzahl in Abhängigkeit von der $OD_{600 \text{ nm}}$ im Reaktor

3.4.7.5 Fotografische Dokumentation der Zellmorphologie der Bakterien

Wie aus Abb. 44 ersichtlich, nimmt die Intensität des DAPI Signals in den Zellen aus dem Reaktor im Laufe des Fermentationsprozesses ab, wohingegen die Intensität in den Zellen des Batch-Ansatzes weitgehend konstant bleibt. Dabei lässt sich bei den Reaktorzellen nicht nur eine Abnahme der Signalintensität sowie eine Verkleinerung des mit DAPI gefärbten Zellbereichs erkennen, sondern auch ein mit der Zeit zunehmender Anteil von Zellen, die gar kein sichtbares DAPI Signal zeigten. Diese „low DNA cells“ wiesen zudem eine ähnliche Zellgröße wie alle anderen Zellen auf und waren daher nicht als Minizellen zu bezeichnen. Dazu erschien im Phasenkontrastbild das Cytoplasma dunkel gefärbt, es sollte sich also auch nicht um sog. „ghosts“ handeln, deren DNA und Cytoplasma nicht mehr vollständig vorhanden ist, denn deren Zellinnenraum würde im Phasenkontrast als helle Struktur sichtbar sein.

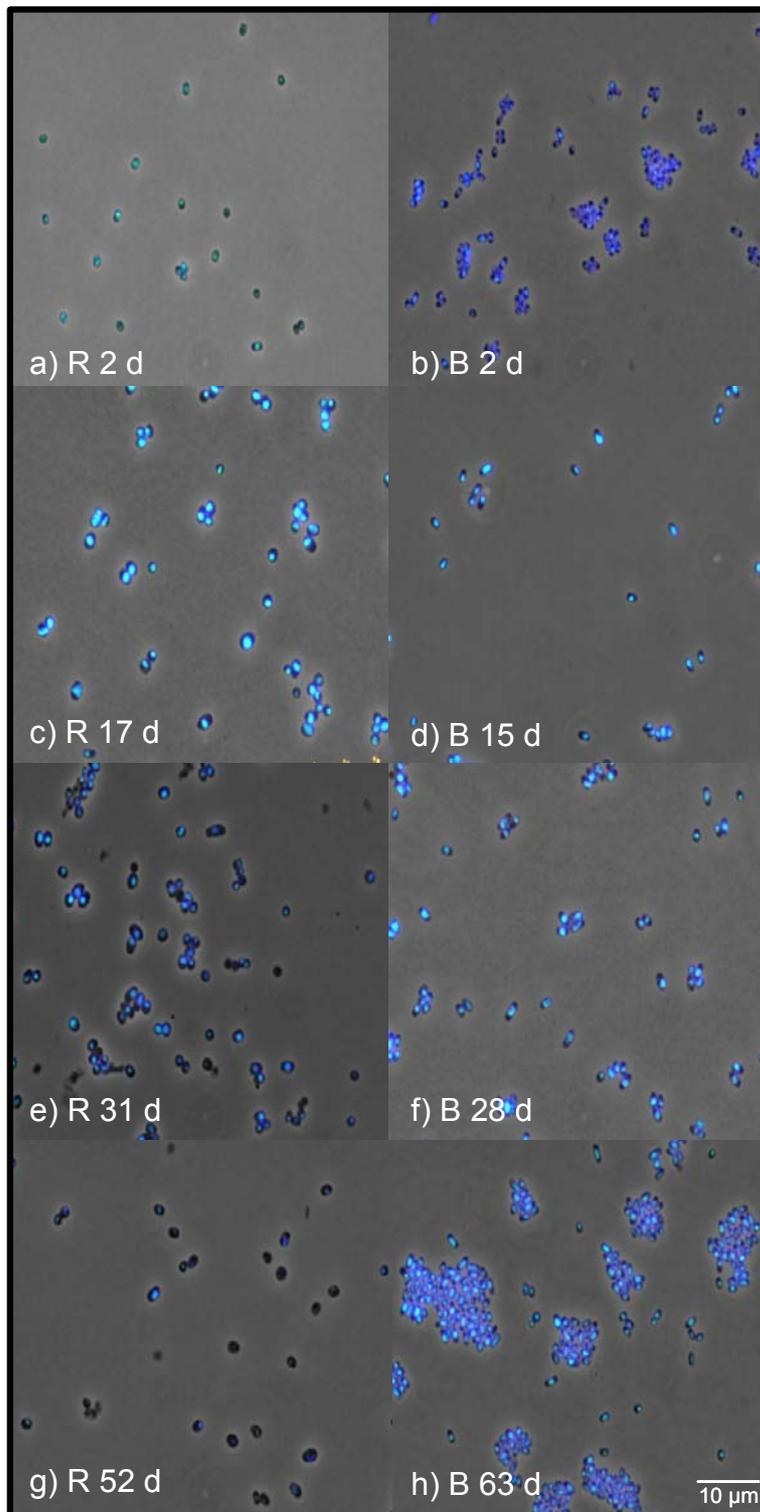


Abb. 44: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *E. coli* Zellen aus dem Reaktor (a, c, e, g) und dem Batch-Ansatz (b, d, f, h) nach DAPI Färbung zu unterschiedlichen Zeitpunkten

3.4.8 Entwicklung des DNA-Gehaltes der Zellen

3.4.8.1 Entwicklung des DNA-Gehaltes der Zellen im Reaktor

Mit Hilfe eines Durchflusszytometers wurden in den *E. coli* Kulturen anhand der Größe, der Granularität und des DNA-Gehaltes der Zellen verschiedene Subpopulationen identifiziert. So sind bei den Zellen aus der Reaktorkultur, wie aus Abb. 45 – Abb. 47 ersichtlich, am 1. Tag noch die Auswirkungen der anfänglichen Wachstumsphase anhand des entkoppelten DNA-Synthesemusters zu erkennen. Schon ab dem 2. Tag trat dagegen eine deutliche Aufteilung der gesamten Population in je eine C2 und eine C4 Subpopulation auf. Während der darauf folgenden Tage nahm der Anteil der C2 Population etwas ab und es kamen C8 bzw. C16 Populationen in sehr geringen Anteilen hinzu. Nach Beenden der vierwöchigen Wachstumsphase der Zellen im Reaktor, erschien ab dem 41. Tag eine weitere Subpopulation, deren geringer DNA-Gehalt weniger als dem einer C1 Population entsprach ($< C1$). Der Anteil dieser „low DNA cells“ nahm im weiteren Verlauf der Fermentation zu, während der Anteil der C4 Zellen gleichzeitig abnahm (s. Abb. 48). Dabei scheint ein Teil der $< C1$ Zellen ein gleiches Zellgrößenspektrum wie die C2 Fraktion und ein anderer Teil ein gleiches Größenspektrum wie die C4 Zellen zu zeigen. Ab dem 55. Tag erhöhte sich jedoch der Anteil der „low DNA cells“, die der Zellgröße der C4 Subpopulation entsprachen.

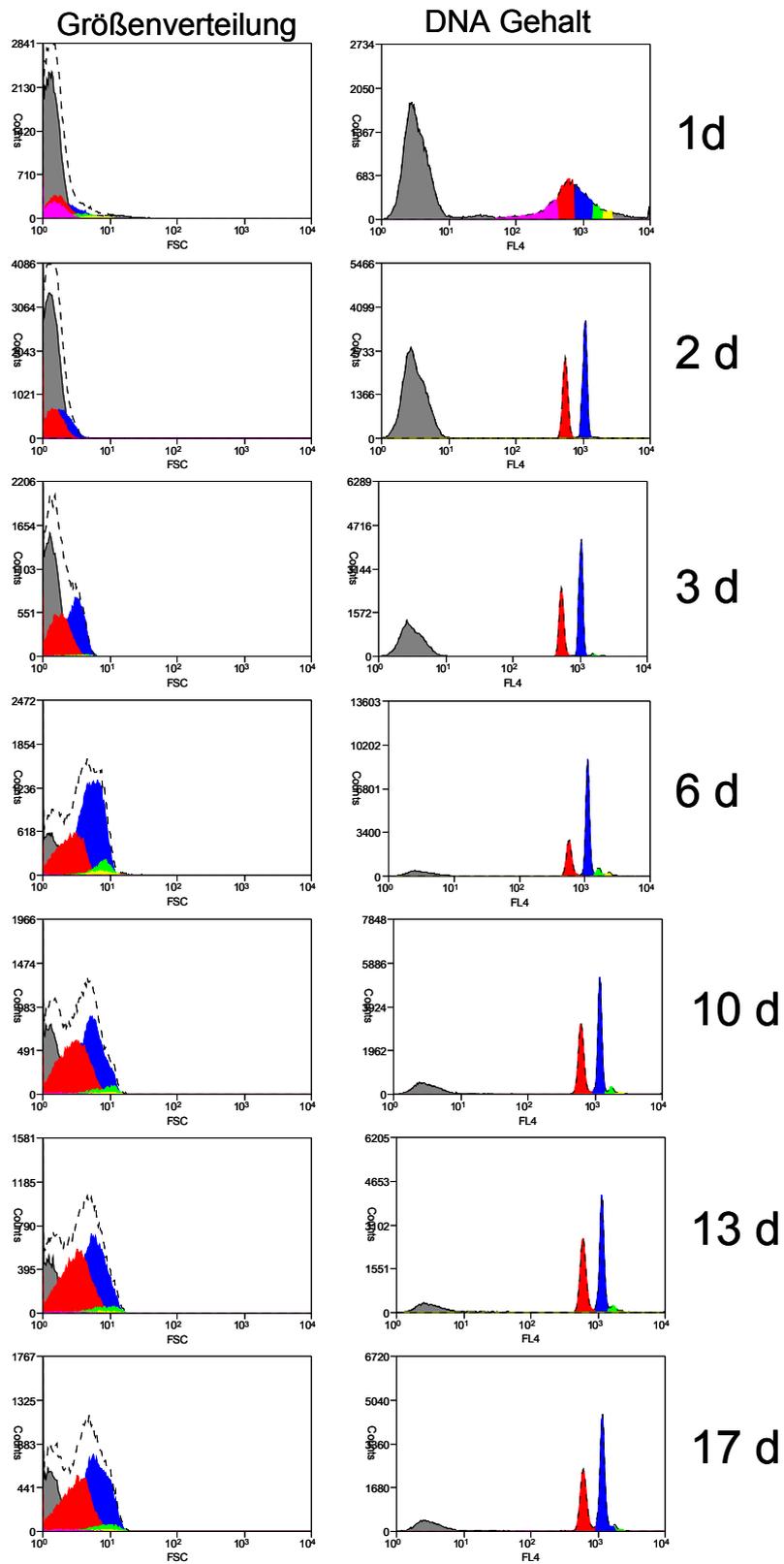


Abb. 45: Zeitliche Entwicklung der Größenverteilung und des DNA-Gehaltes der Zellen aus dem Reaktor (C2 = rot, C4 = blau, C8 = grün, C16 = gelb, < C1 = violett)

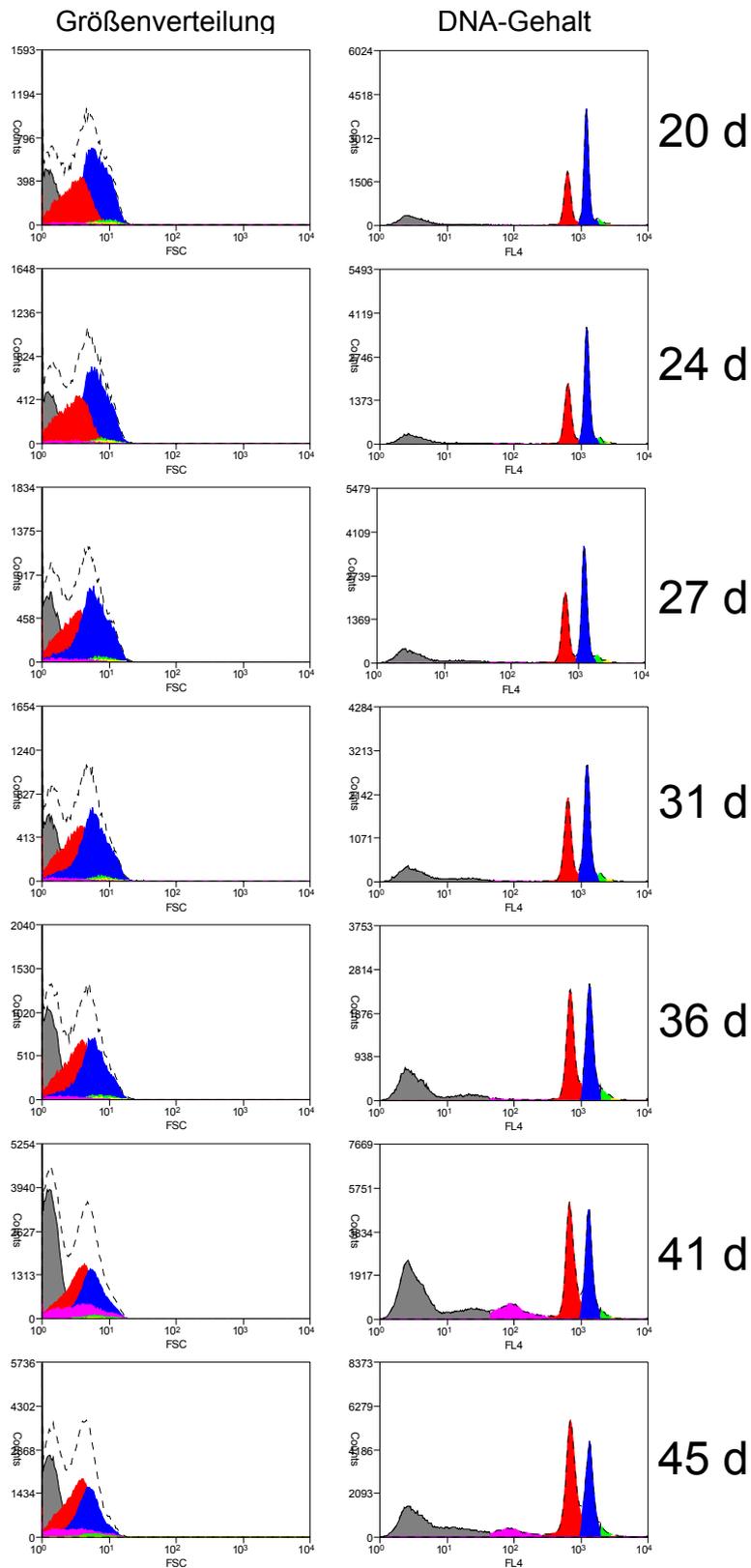


Abb. 46: Zeitliche Entwicklung der Größenverteilung und des DNA-Gehaltes der Zellen aus dem Reaktor (C2 = rot, C4 = blau, C8 = grün, C16 = gelb, <C1 = violett)

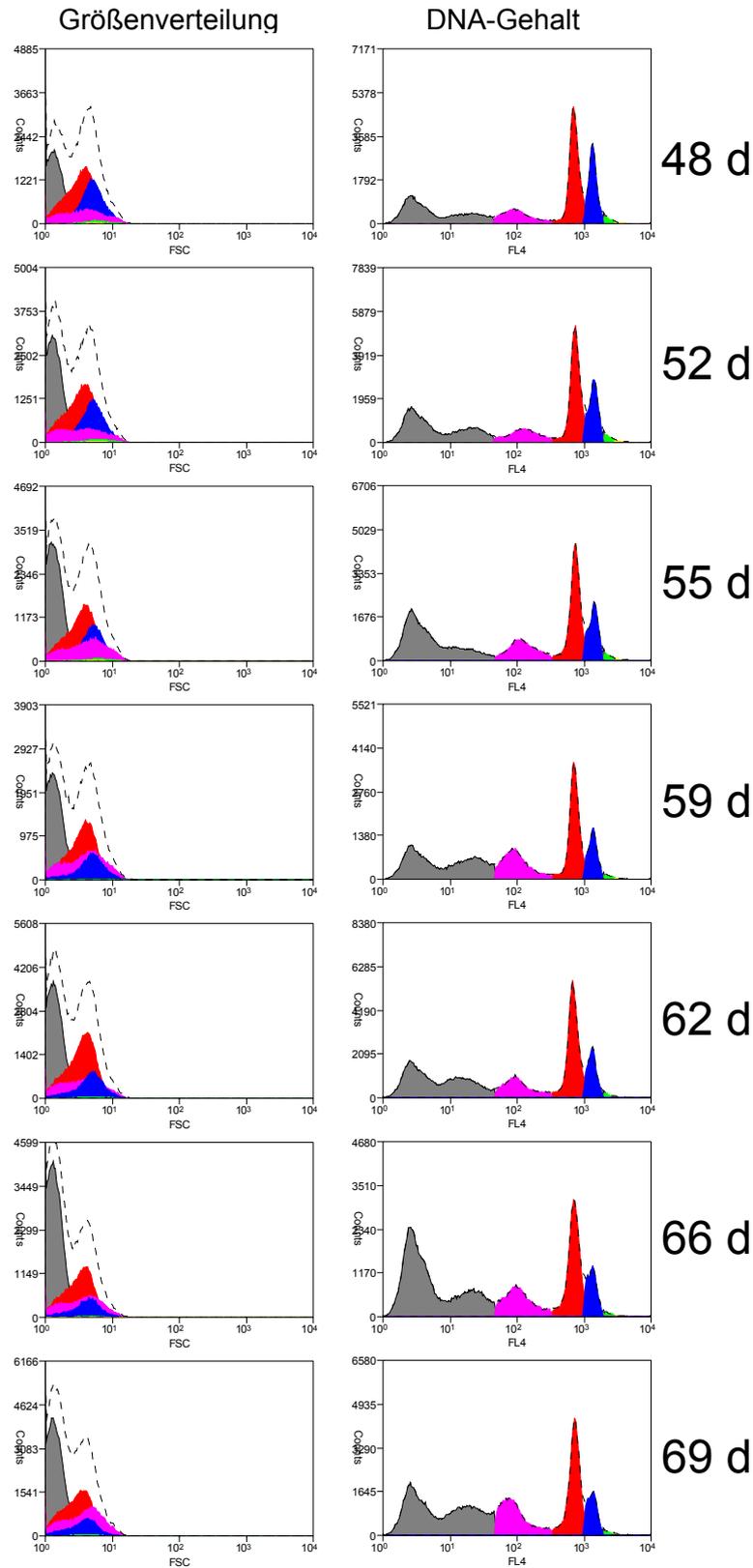


Abb. 47: Zeitliche Entwicklung der Größenverteilung und des DNA-Gehaltes der Zellen aus dem Reaktor (C2 = rot, C4 = blau, C8 = grün, C16 = gelb, < C1 = violett)

Die quantitative Auswertung der Subpopulationen ist in Abb. 48 dargestellt. Der Anteil der C2 Population lag während des 65tägigen kontinuierlichen Betriebs weitgehend konstant bei ungefähr 40 %. Während der Anteil der C4 Fraktion von anfangs 60 % auf 15 % zum Ende des kontinuierlichen Betriebs und weiter auf 8 % am Ende des Reaktorlaufs sank, kam es bei den Zellen mit weniger als einem Chromosomenäquivalent ($< C1$) zu einem steten Anstieg von anfangs 2 % auf 41 % zum Ende des kontinuierlichen Betriebs und weiter auf 65 % zum Ende des Reaktorlaufs.

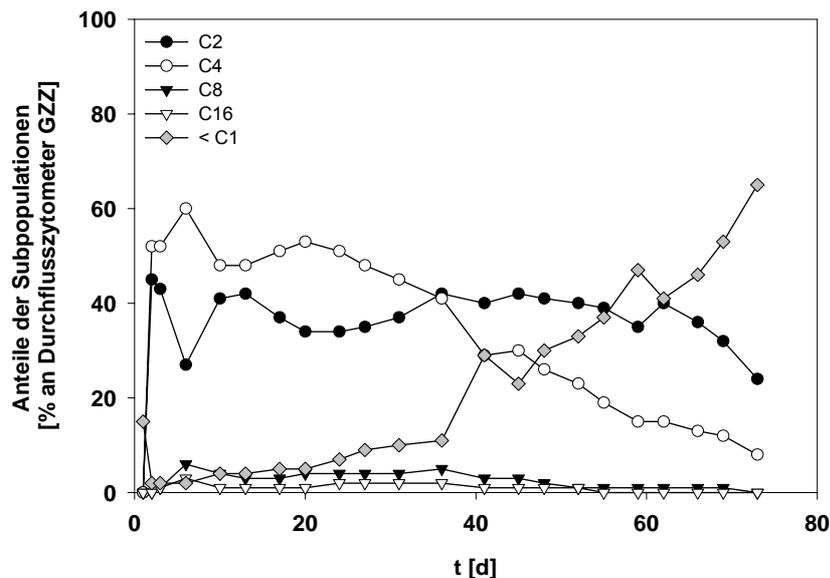


Abb. 48: Zeitliche Entwicklung der Subpopulationen von *E. coli* A3 mit unterschiedlichem Gehalt an Chromosomenäquivalenten ($< C1 - C16$) im Reaktor

3.4.8.2 Entwicklung des DNA-Gehaltes der Zellen im Batch-Ansatz

Wie aus Abb. 49 und Abb. 50 ersichtlich, bestand die Gesamtheit der Zellen im Batch-Ansatz, ähnlich wie bei den Reaktorzellen, aus C2 und C4 Zellen. Ab dem 9. Tag traten zusätzlich noch je eine kleine C8 und C16 Population auf, die ab dem 42. Tag jedoch mit der beginnenden Beprobung des 2. Ansatzes wieder abnahm. Im 2. Ansatz war auch der Anteil der C4 Subpopulation im Vergleich zur C2 Fraktion etwas geringer, veränderte sich aber bis zum Ende der Probenahme nicht mehr. Im Gegensatz zu den Zellen aus dem Reaktor konnte im Batch-Ansatz keine Subpopulation von Zellen mit weniger als einem Chromosomenäquivalent ($< C1$) nachgewiesen werden.

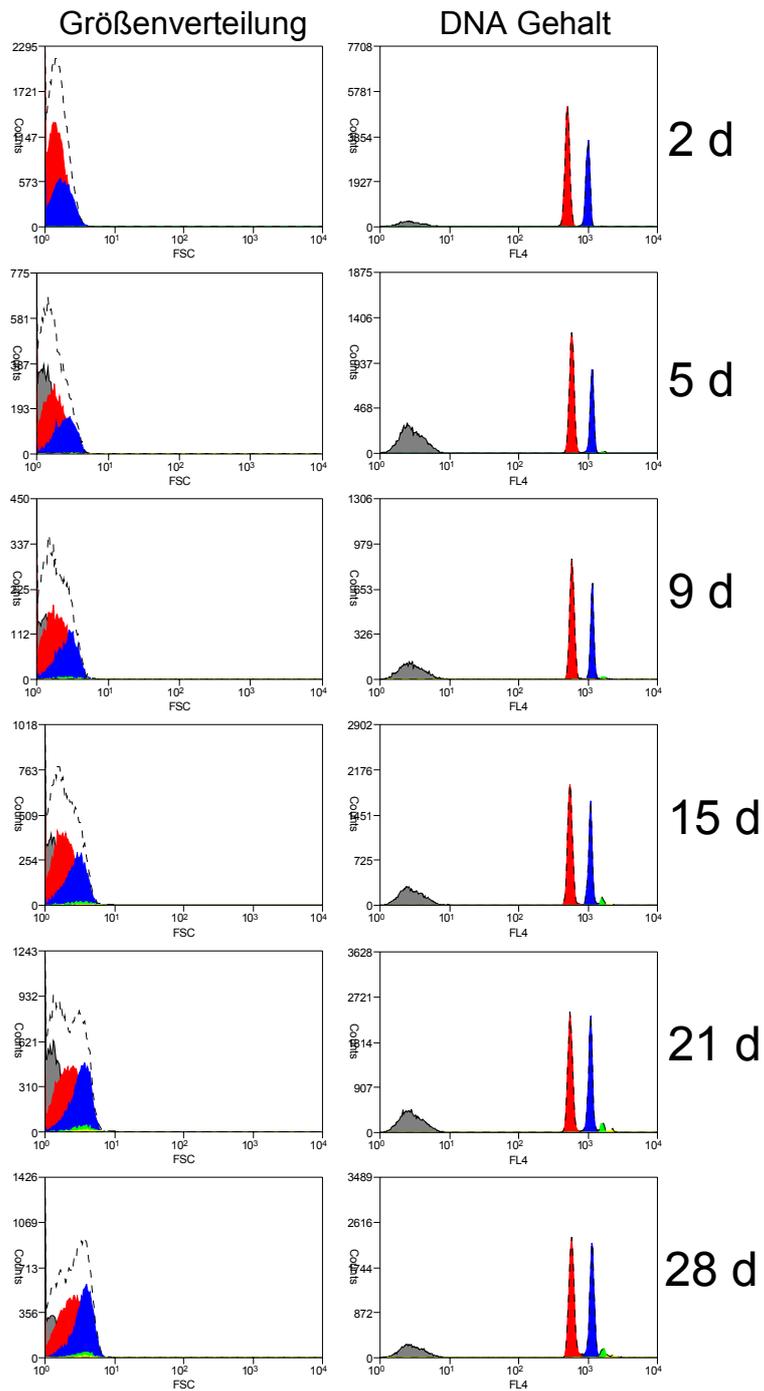


Abb. 49: Zeitliche Entwicklung der Größenverteilung und des DNA-Gehaltes der Zellen aus dem Batch-Ansatz (C2 = rot, C4 = blau, C8 = grün, C16 = gelb)

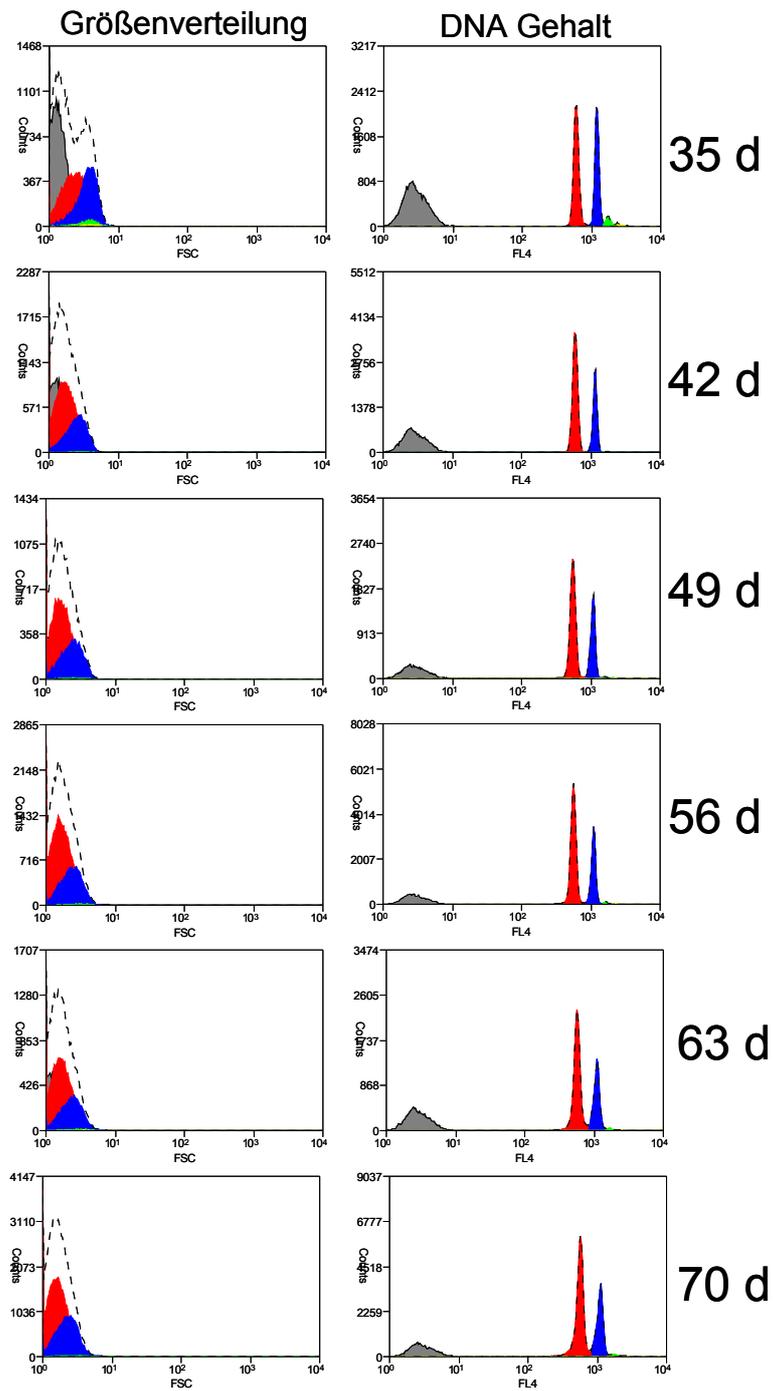


Abb. 50: Zeitliche Entwicklung der Größenverteilung und des DNA-Gehaltes der Zellen aus dem Batch-Ansatz (C2 = rot, C4 = blau, C8 = grün, C16 = gelb)

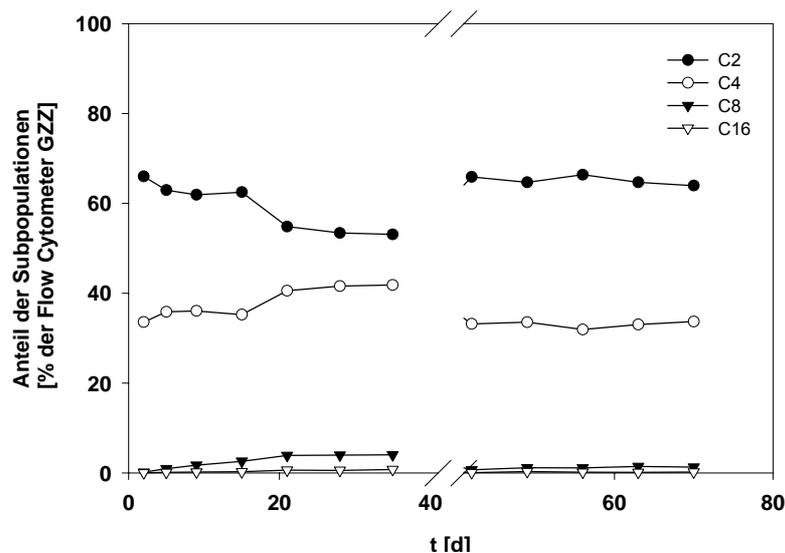


Abb. 51: Zeitliche Entwicklung der Subpopulationen von *E. coli* A3 mit unterschiedlichem Gehalt an Chromosomenäquivalenten (C2 – C16) im Batch-Ansatz, ab dem 42. Tag wurde zweiter Parallel-Ansatz beprobt

3.4.9 Fraßversuche

Zur Beantwortung der Frage, ob Bakterien, die sich im Erhaltungsstoffwechsel befinden schlechter von Protozoen aufgenommen und verdaut werden bzw. die Protozoen diese weniger gut verwerten und mit ihnen als einzige Futterquelle wachsen können, wurden die folgenden Fraßversuche mit *Tetrahymena thermophila* und *E. coli* A3 aus unterschiedlichen Kultivierungsansätzen durchgeführt.

3.4.9.1 Wachstum von *T. thermophila* auf *E. coli* A3 Zellen

Zur Untersuchung der Verwertbarkeit der *E. coli* A3 Zellen aus verschiedenen Wachstumsphasen für den Räuber *T. thermophila* wurden jeweils circa 100 Zellen des Ciliaten gemeinsam mit den *E. coli* Zellen für 24 h bei 37 °C inkubiert. Wie in Abb. 52 dargestellt, lag in dem Kontrollansatz, der keine Futterbakterien enthielt, die Konzentration von *T. thermophila* am Ende des Experimentes unterhalb der Nachweisgrenze von circa 5.000 Zellen ml⁻¹. Bei allen anderen Ansätzen kam es zu einer Vermehrung des Räuberorganismus, wobei sich die Protozoen auf den Batch- und den Bakterien der Übernachtskultur ähnlich gut entwickelten (32.000 bzw. 35.000 Zellen ml⁻¹). Auf den *E. coli* Zellen aus dem Reaktor wuchsen sie hingegen nur auf 18.000 Zellen ml⁻¹ an, was einen Anteil von 51 % im Vergleich zum Ansatz mit den *E. coli* Zellen der Übernachtskultur ausmacht.

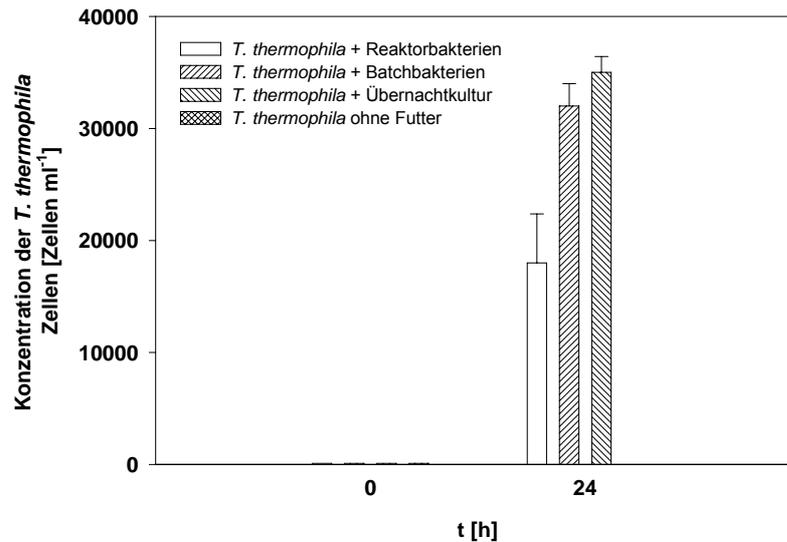


Abb. 52: Entwicklung von *T. thermophila* mit *E. coli* Zellen aus unterschiedlichen Wachstumsphasen vor und nach einer Inkubation von 24 Stunden

Die $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ des Ansatzes mit den inaktivierten *E. coli* Zellen allein zeigte nach der 24 stündigen Inkubation keine nennenswerten Änderungen.

3.4.9.2 Verwertbarkeit von *E. coli* Zellen durch *T. thermophila*

Mit Hilfe von Fraßversuchen sollte ermittelt werden, ob Bakterien in unterschiedlichen physiologischen Zuständen verschieden gut vom Räuber verdaut werden können. Dafür wurden den axenisch kultivierten *T. thermophila* nach einer eintägigen Hungerphase *E. coli* A3 Zellen aus dem Reaktor, aus dem Batch-Ansatz und aus einer Übernachtskultur angeboten. Nach einer 45minütigen Periode der Nahrungsaufnahme wurden die Bakterien durch Zentrifugation von den Protozoen abgetrennt und letztere weiter bei 30 °C inkubiert. Nach 45, 90, 120 bzw. 150 min erfolgten die Probenahmen und um Anschluss die Aufbereitung für die TEM Mikroskopie. Abb. 53 zeigt die TEM Aufnahme eines Querschnitts einer *T. thermophila* Zelle mit Kennzeichnung einiger für Ciliaten typischen Zellorganellen wie Mitochondrien, Nahrungsvakuolen, Trichocysten, den Mikro- sowie den Makronucleus.

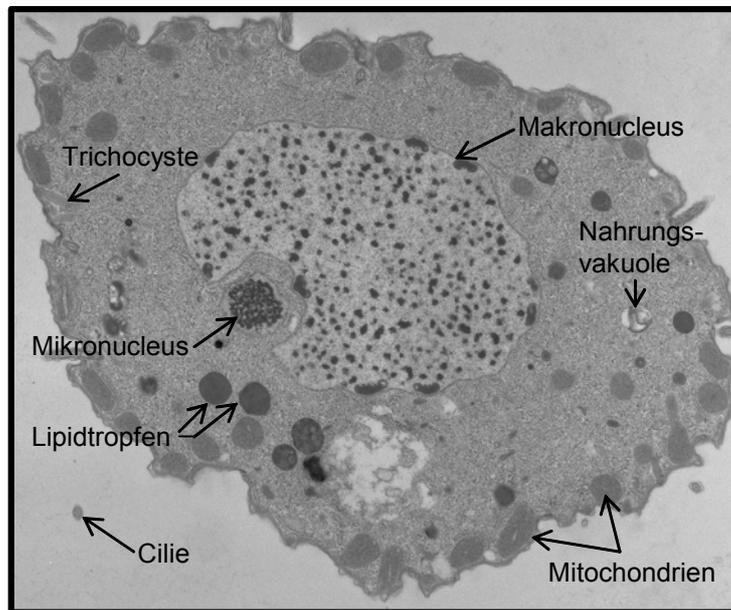


Abb. 53: TEM Aufnahme eines Querschnitts von *T. thermophila*, Vergrößerung 3.200fach

Bei der Durchmusterung der Dünnschnitte mit dem TEM fiel auf, dass die Abbaustadien der Bakterien aus dem Reaktor bzw. dem Batch-Ansatz vermehrt eine dicke, elektronendichte Zellwand und helle Innenbereiche aufwiesen. Im Gegensatz dazu zeigten die Abbaustadien der Übernachtskultur eher diffuse Überreste. Darüber hinaus war bei vielen Bakterien aus dem Reaktor kaum eine eindeutige äußere Zellmembran auszumachen. Die Befunde sind exemplarisch in Abb. 54 dargestellt.

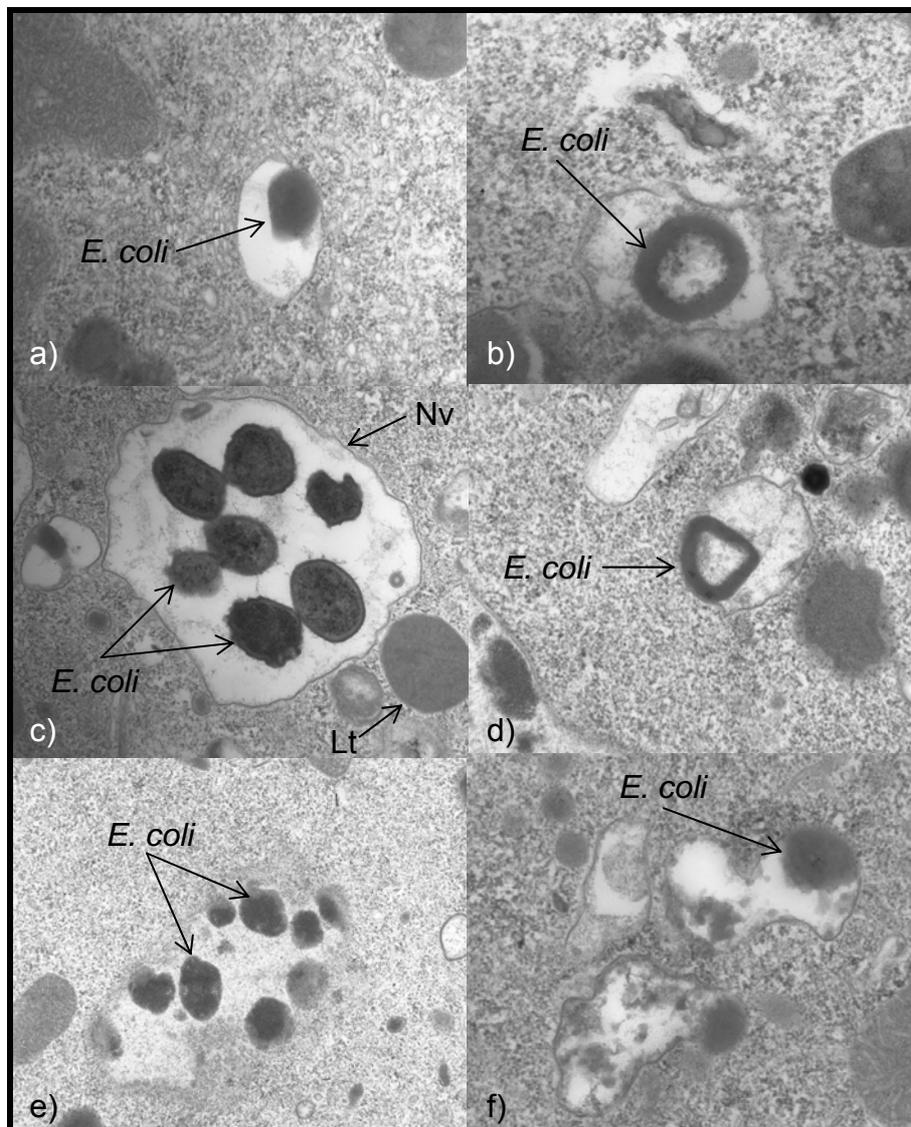


Abb. 54: TEM Aufnahmen von Nahrungsvakuolen in *T. thermophila* nach Ingestion von *E. coli* Zellen (a) Reaktor 45 min, b) Reaktor 120 min, c) Batch 45 min, d) Batch 120 min, e) ÜNK 45 min, f) ÜNK 120 min), Vergrößerungen: a) 32.000fach, b) 20.000fach, c) 16.000fach, d) 40.000fach, e) 32.000fach, f) 32.000fach, Nv = Nahrungsvakuole, Lt = Lipidtropfen

3.4.10 Proteinexpression der Zellen

3.4.10.1 Untersuchung der Bakterienzellen mittels 2D-Gelelektrophorese

Der Vergleich von je zwei Proben aus dem Reaktor mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (Abb. 55) ergab, dass nach einer vierwöchigen Phase des Nicht-Wachstums am 63. Tag des Reaktorlaufs die Bakterien circa 54 andere Proteine exprimiert hatten als zu Beginn dieser Phase nach 35 Tagen Fermentationszeit.

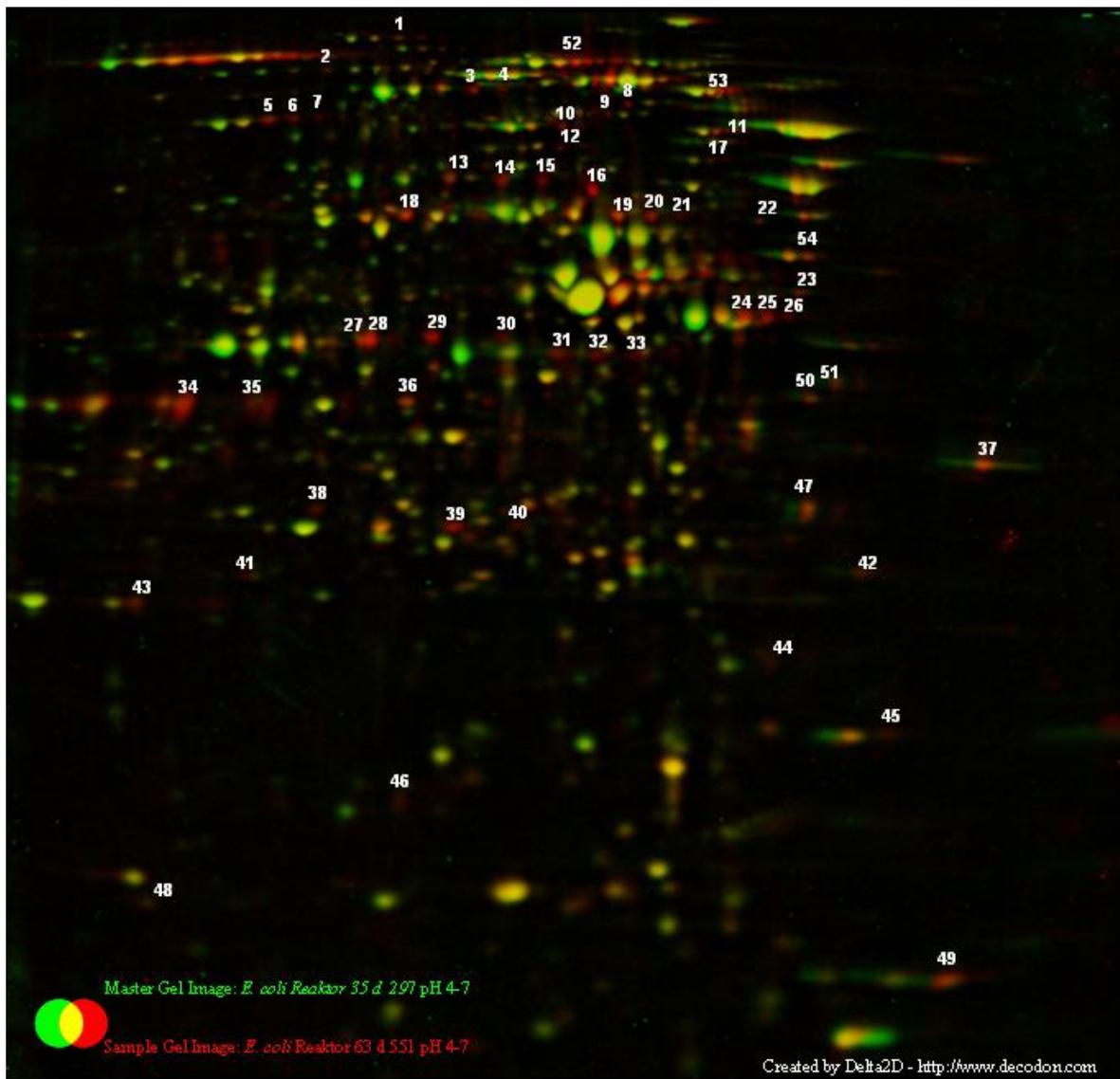


Abb. 55: Bild eines 2D-Gelelektrophorese-Gels, grün: Proteinspots der Reaktorprobe nach 35 Tagen (Ende der Wachstumsphase), rot: Proteinspots der Reaktorprobe nach 63 Tagen (nach 4 Wochen gleich bleibender Biomasse), gelb: Proteinspots, die in beiden Proben vorkommen

Vergleicht man die Zellen aus der Wachstumsphase (3 Tage) mit den Langzeitnährstofflimitierten Zellen nach 63 Tagen, sind in letzteren sogar 77 neue Proteine nachzuweisen (Abb. 56).

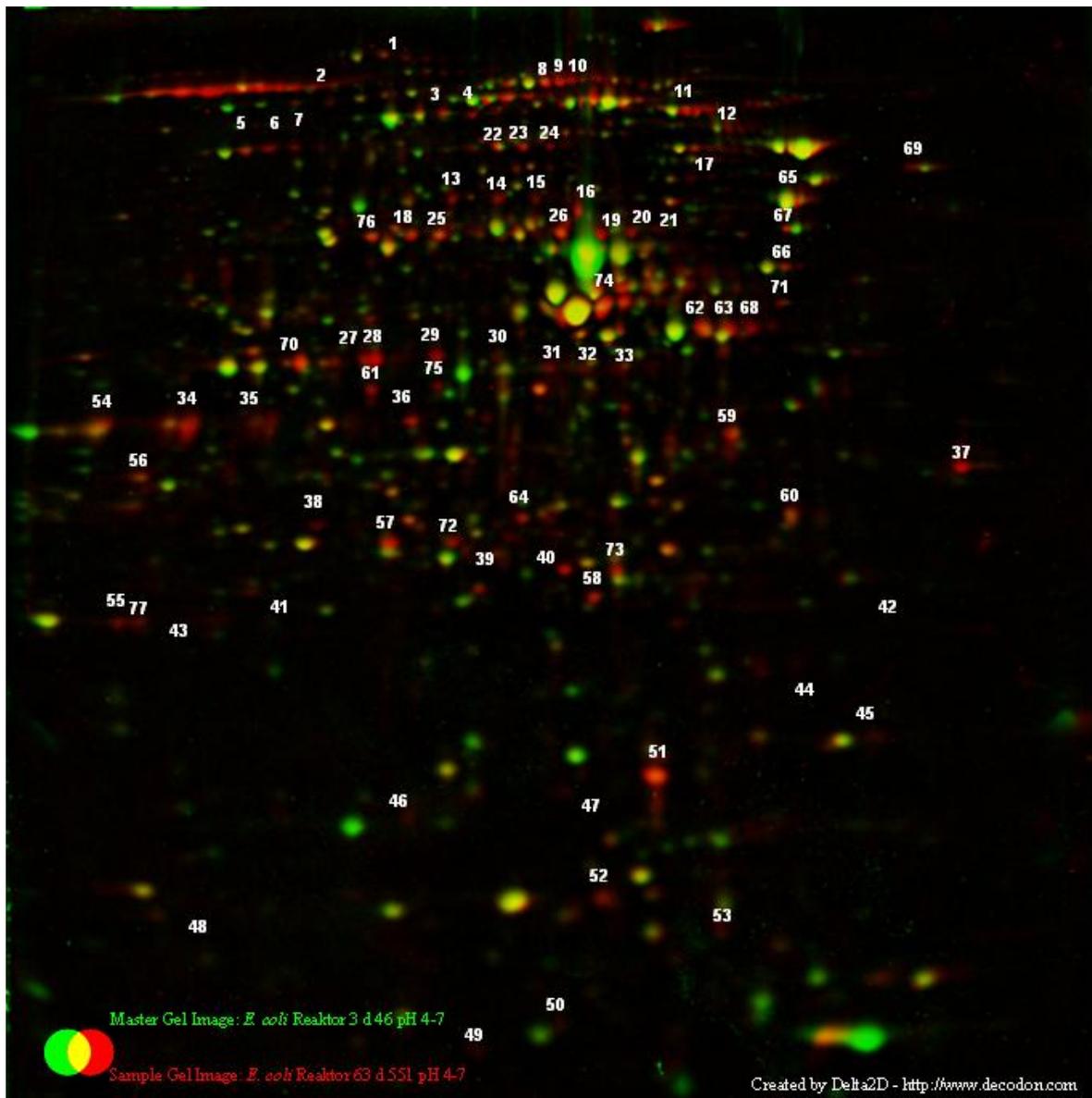


Abb. 56: Bild eines 2D-Gelelektrophorese-Gels, grün: Proteinspots der Reaktorprobe nach 3 Tagen, rot: Proteinspots der Reaktorprobe nach 63 Tagen (nach 4 Wochen gleich bleibender Biomasse), gelb: Proteinspots, die in beiden Proben vorkommen

Ergebnisse

Während im Vergleich der Langzeit-nährstofflimitierten Zellen mit den wachsenden (3 Tage) bzw. gerade nicht mehr wachsenden Zellen (35 Tage) große Unterschiede sichtbar waren, sind in den gerade nicht mehr wachsenden Zellen nur 30 neue Proteine im Gegensatz zu den wachsenden Zellen nachzuweisen (Abb. 57).

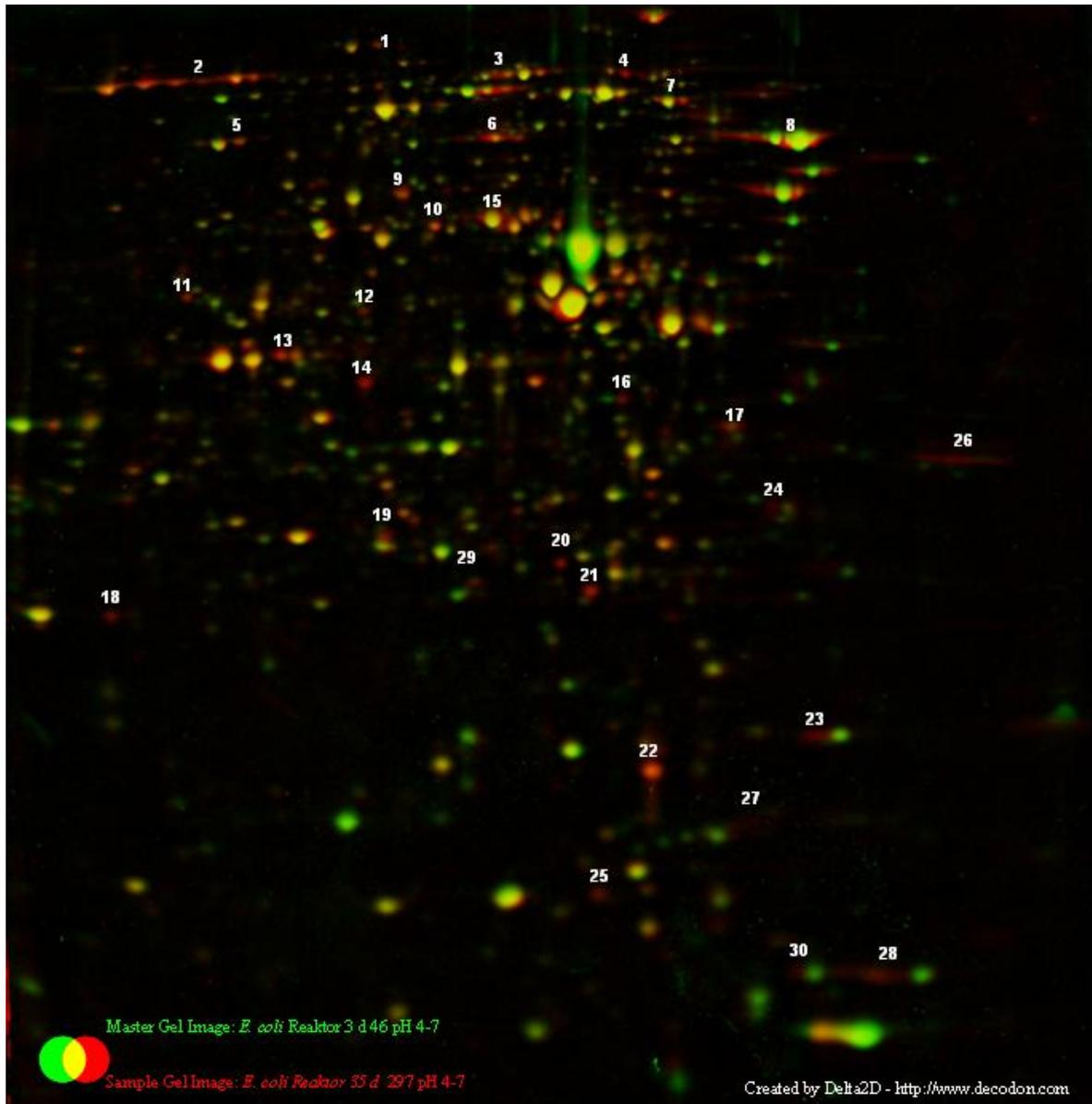


Abb. 57: Bild eines 2D-Gelelektrophorese-Gels, grün: Proteinspots der Reaktorprobe nach 3 Tagen, rot: Proteinspots der Reaktorprobe nach 35 Tagen (Ende der Wachstumsphase), gelb: Proteinspots, die in beiden Proben vorkommen

Tab. 25: Anzahl der nur in einer Probe (Spalte) exprimierten Proteine im Vergleich zur einer anderen Probe (Zeile)

Zusätzlich exprimierte Proteine nach Tag x im Vergleich zu Tag y				
y \ x	3. Tag	35. Tag	63. Tag	
3. Tag	-	30	77	
35. Tag	60	-	54	
63. Tag	69	19	-	

Ein ähnlicher Trend ließ sich auch bei dem Vergleich der in der jeweils jüngeren Probe zusätzlich exprimierten Proteine erkennen. So ließen sich insgesamt 69 zusätzliche Proteine in der Probe vom 3. Tag gegenüber der Probe vom 63. Tag nachweisen, wohingegen am 35. Tag nur 19 zusätzlich exprimierte Proteine im Vergleich zur Probe vom 63. Tag auftraten.

Der größte Unterschied im Proteinmuster ist also bei den Proben zwischen dem 3. und 63. Tag zu erkennen. Die Zellen vom Beginn des Erhaltungsstoffwechsels am 35. Tag wiesen immerhin noch 19 zusätzliche Proteinspots im Vergleich zum Ende der Langzeitnährstofflimitierten Phase auf. Umgekehrt wurden nach dem vier Wochen andauernden Erhaltungsstoffwechsel im Vergleich zum Beginn dieser Phase 54 andere Proteine exprimiert.

3.4.10.2 Untersuchung der Bakterienzellen mittels MALDI-TOF MS

Zur Analyse des Fingerprint-Proteinmusters (m/z 2.000 – 20.000) der *E. coli* Zellen im zeitlichen Verlauf der Fermentation wurden Proben des Reaktors sowie des Batch-Ansatzes mittels der Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight Massenspektrometrie untersucht. Einzelne Proteine konnten aufgrund ihres Molekulargewichtes Einträgen der Swiss-Prot und TrEMBL Datenbank (www.expasy.org) mittels des TagIdent tools zugeordnet werden.

Reaktor

Im MALDI-TOF MS Fingerprint der Reaktorzellen sind einige Veränderungen der Spektren im zeitlichen Verlauf zu erkennen, die das Auftreten bzw. die Intensitäten einzelner Peaks betreffen (Abb. 58). So trat ab dem 50. Tag ein vorher nicht sichtbarer Peak bei m/z 3423 auf, der am 62. Tag die höchste Intensität aufweist und in der Swiss-Prot und TrEMBL Datenbank nicht zugeordnet werden konnte (Tab. 27). Auch der Peak bei m/z 5098, der wahrscheinlich das ribosomale stationärphaseinduzierte Protein RS22 (Protein D) darstellt, nahm an Intensität zu. Dagegen nahm die Intensität der nicht zuordenbaren Peaks bei m/z 5872 und 5753 ab dem 6. Tag kontinuierlich ab. Die Expression der im *E. coli* Fingerprint typischen ribosomalen Proteine (Pineda et al. 2003) unterlag dagegen keinen größeren Schwankungen. Genauso schienen auch die Proteine HU- α und HU- β konstant exprimiert zu werden. Hierbei handelte es sich um histonartige, DNA-bindende Proteine, welche die DNA zur Stabilisierung verpacken können und damit eine Denaturierung unter extremen Umweltbedingungen verhindern (Swinger und Rice 2004). Auch die als periplasmatische Chaperone HdeA und HdeB zuordenbaren Peaks bei m/z 9747 und 9070 unterlagen keinen großen Schwankungen. Diese Proteine tragen zur Säureresistenz von *E. coli* Zellen bei (Gajiwala und Burley 2000; Kern et al. 2007)

Tab. 26: Molekulargewicht ausgewählter Peaks der MALDI-TOF MS Spektren der Bakterien aus dem Reaktor, Tendenz der Expressionsstärke im Laufe der Fermentationszeit am 6., 31., 50. und 62. Tag und die aufgrund des Datenbankvergleichs (Swiss-Prot und TrEMBL) ermittelten zuordenbaren Proteine (↗ : nimmt zu, ↘: nimmt ab, →: bleibt gleich, n. z.: nicht zuzuordnen, MW = Molekulargewicht)

Molekulargewicht [Da]	Expressionsintensität im zeitlichen Verlauf	Zuordenbares Protein (Primary accession number)	Literatur
3425	↗	n. z.	
3446	→	n. z.	
4053	→	n. z.	
4365	↗	RL36 ECOLI (P0A7Q6) 50S ribosomales Protein L36 MW: 4364,33 Da	(Arnold und Reilly 1999)
5098	↗	RS22 ECOLI (P68191) 30S ribosomales Protein S22 MW: 5095,82 Da Stationärphase induziertes, ribosomenassoziiertes Protein (SRA) (Protein D)	(Arnold und Reilly 1999; Izutsu et al. 2001)
5383	→	RL34 ECOLI (P0A7P5) 50S ribosomales Protein L34 MW: 5380,39 Da	(Arnold und Reilly 1999)
5755	↘	n. z.	
5872	↘	n. z.	
6318	→	RL32 ECOLI (P0A7N4) 50S ribosomales Protein L32 MW: 6315,19 Da	(Arnold und Reilly 1999)
7191	↗	n. z.	
7270	→	RL29 ECOLI (P0A7M6) 50S ribosomales Protein L29 MW: 7273,45 Da	(Arnold und Reilly 1999)
7865	→	RL31 ECOLI (P0A7M9) 50S ribosomales Protein L31 MW: 7871,06 Da	(Arnold und Reilly 1999)
9070	→	HDEB ECOLI (P0AET2) Protein hdeB precursor MW: 9065,24 Da	(Reid et al. 2002)
9226	→	DBHB ECOLI (P0ACF4) DNA-bindendes Protein HU-β MW: 9225,58 Da	(Goshima et al. 1990)
9546	→	RS20 ECOLI (P0A7U7) 30S ribosomales Protein S20 MW: 9553,20 Bindet direkt an die 16S rRNA oder DBHA ECOLI (P0ACF0) DNA-bindendes Protein HU-α MW: 9534,98 Da	(Arnold und Reilly 1999) (Dai et al. 1999)
9747	→	HDEA ECOLI (P0AES9) Protein HdeA precursor MW: 9740,41 Da	(Gajiwala und Burley 2000; Reid et al. 2002)

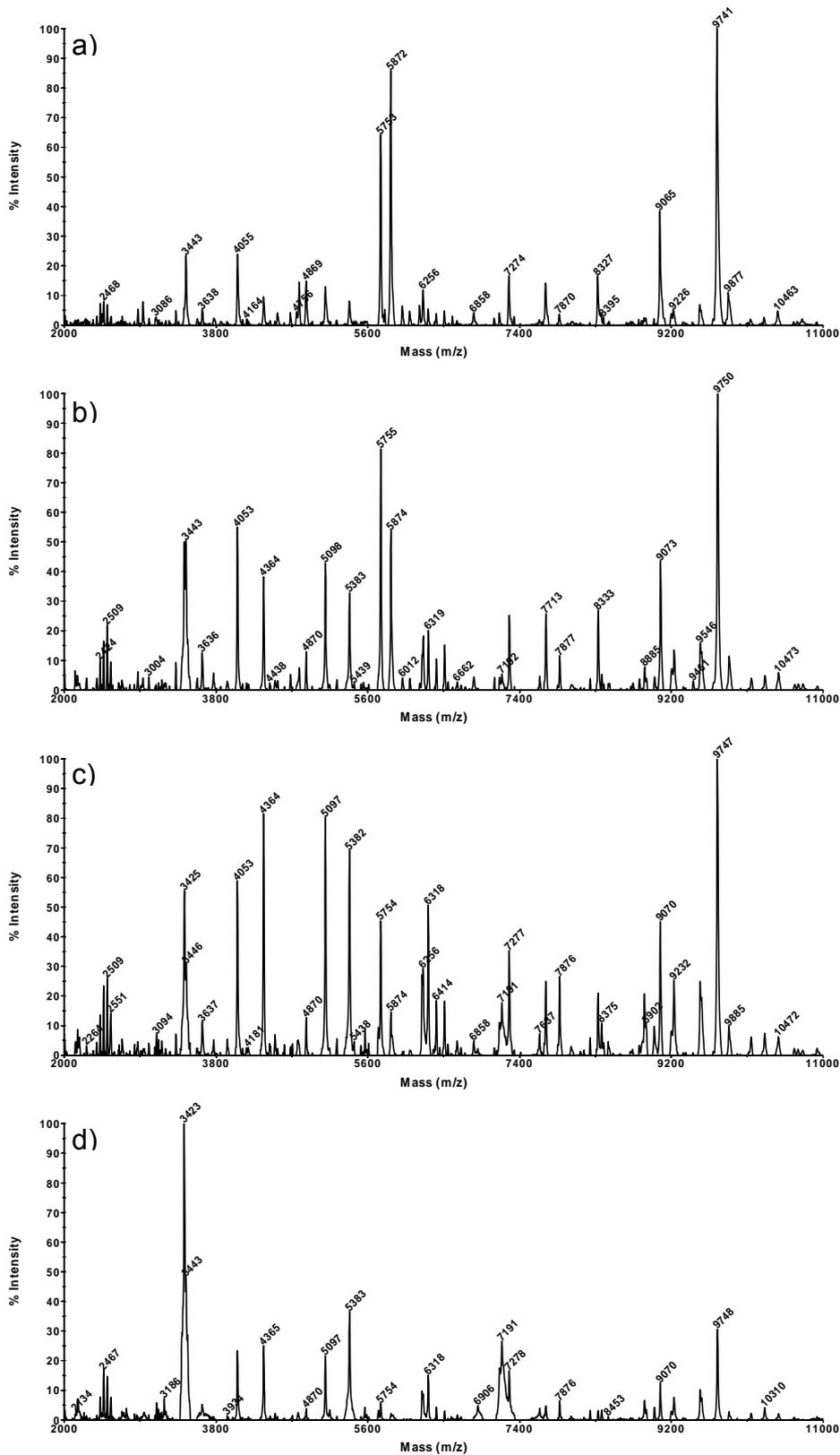


Abb. 58: Fingerprint MALDI-TOF MS Spektren der Bakterien aus dem Reaktor, a) nach 6 Tagen, b) nach 31 Tagen, c) nach 50 Tagen, d) nach 62 Tagen Fermentationszeit (dargestellt im Massenbereich m/z 2.000 – 11.000)

Batch-Ansatz

Bei den Zellen des Batch-Ansatzes ist vor allem der Peak bei m/z 3095 auffällig, der bei den Reaktorzellen nicht auftrat, kontinuierlich zunahm und am 51. sowie am 61. Tag den Peak mit der höchsten Intensität ausmachte (Abb. 59). Wohingegen der Peak bei m/z 5755, der am 5. Tag die höchste Intensität zeigte, mit der Zeit abnimmt und nach 51 Tagen nur noch eine Intensität von 30 % aufwies, um am 61. Tag wieder auf 70 % anzusteigen. Diesen beiden Signalen konnte kein Protein aus der Swiss-Prot und TrEMBL Datenbank zugeordnet werden (Tab. 27).

Tab. 27: Molekulargewicht ausgewählter Peaks der MALDI-TOF MS Spektren der Bakterien aus dem Batch-Ansatz, Tendenz der Expressionsstärke im Laufe der Fermentationszeit am 5., 30., 51. und 61. Tag und die aufgrund des Datenbankvergleichs (Swiss-Prot und TrEMBL) ermittelten zuordenbaren Proteine (↗ : nimmt zu, ↘ : nimmt ab, → : bleibt gleich, n. z.: nicht zuzuordnen, MW = Molekulargewicht)

Molekulargewicht [Da]	Expressionsintensität im zeitlichen Verlauf	Zuordenbares Protein (Primary accession number)	Literatur
3095	↗	n. z.	
3427	↗	n. z.	
4054	→	n. z.	
5098	→	RS22 ECOLI (P68191) 30S ribosomales Protein S22 MW: 5095,82 Da Stationärphase induziertes, ribosomenassoziiertes Protein (SRA) (Protein D)	(Arnold und Reilly 1999)
5383	→	RL34 ECOLI (P0A7P5) 50S ribosomales Protein L34 MW: 5380,39 Da	(Arnold und Reilly 1999)
5754	↘	n. z.	
5874	↘	n. z.	
7270	→	RL29 ECOLI (P0A7M6) 50S ribosomales Protein L29 MW: 7273,45 Da	(Arnold und Reilly 1999)
8329	→	n. z.	
9070	→	HDEB ECOLI (P0AET2) Protein hdeB precursor MW: 9065,24 Da	(Reid et al. 2002)
9540	→	RS20 ECOLI (P0A7U7) 30S ribosomales Protein S20 MW: 9553,20 Da Bindet direkt an die 16S rRNA	(Arnold und Reilly 1999)
9741	→	HDEA ECOLI (P0AES9) Protein HdeA precursor MW: 9740,41 Da	(Gajiwala und Burley 2000; Reid et al. 2002)
10465	→	YJDJ ECOLI (P39274) Hypothetical protein yjdJ MW: 10468,06 Da	(Blattner et al. 1997; Hayashi et al. 2006)

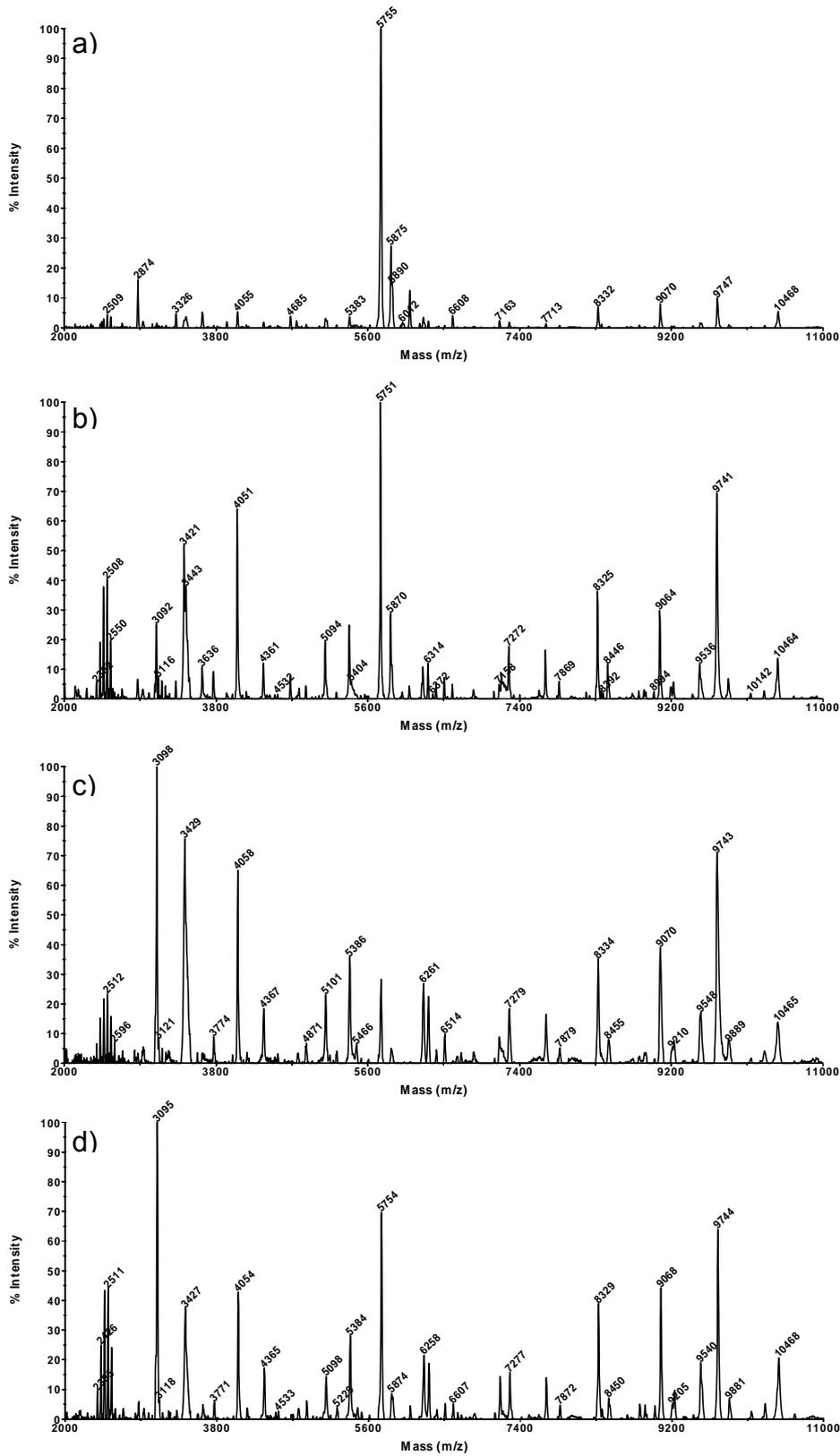


Abb. 59: Fingerprint MALDI-TOF MS Spektren der Bakterien aus dem Batch-Ansatz, a) nach 5 Tagen, b) nach 30 Tagen, c) nach 51 Tagen, d) nach 61 Tagen Fermentationszeit (dargestellt im Massenbereich m/z 2.000 – 11.000)

Wie bei den Bakterien aus dem Reaktor konnten auch bei den Bakterien aus dem Batch-Ansatz einige Peaks unter anderem ribosomalen Proteinen zugerechnet werden, die in ihrer Expressionsintensitäten jedoch ebenso keinen großen Schwankungen unterliegen.

4 Diskussion

Heterotrophe Bakterien sind sowohl in natürlichen wie in technischen Systemen vielfach oligotrophen Bedingungen ausgesetzt, auf die sie speziesspezifisch mit unterschiedlichen Überlebensstrategien reagieren (Kapitel 1.2). Eine mögliche Reaktion auf nährstofflimitierende Bedingungen ist das Einstellen des Zellwachstums, so dass die zur Verfügung stehenden Substrate hauptsächlich für den Erhalt der Zelle genutzt werden (Erhaltungsstoffwechsel). Da bisher nur sehr wenig über nicht-wachsenden Zellen bekannt ist, war es Ziel dieser Arbeit, die Physiologie, die Aktivität und die Verwertbarkeit der Zellen als Beuteorganismen für Protozoen sowie das Muster der Chromosomenanzahl und die exprimierten Proteine der Zellen im Erhaltungsstoffwechsel zu untersuchen. Bisherige Studien beschränkten sich auf die kurzzeitige Anpassung von Zellen an eine Nährstofflimitierung, so z. B. auf die Untersuchung der generellen Stressantwort zu Beginn der stationären Phase (Hunger) bzw. auf „starvation“ Experimente, in denen die Zellen nach Erreichen der stationären Phase in nährstoffreies Kulturmedium überführt wurden. Mit Hilfe von Chemostaten sind Experimente mit nährstofflimitierten Bakterien durchgeführt worden, die jedoch per Definition eines Chemostaten immer ein gewisses Wachstum zeigen. In diesen Versuchsansätzen ist es jedoch nicht möglich, die Bakterien kontinuierlich mit gering konzentrierten Substraten zu versorgen, um die Situation von Mikroorganismen in der Natur oder in technischen Systemen wie der Abwasserreinigung nachzuahmen und deren physiologische Anpassung zu analysieren. Hierfür sind vielmehr Membranbioreaktor-Systeme geeignet, in denen die Zellmasse im Reaktor mit Hilfe eines Membranmoduls zurückgehalten wird, während die Mikroorganismen kontinuierlich mit einer limitierenden Substratkonzentration versorgt werden können. Zur Untersuchung von Erhaltungsstoffwechsel betreibenden, nicht-wachsenden Bakterien wurde ein MBR-System zur Anreicherung von marinen, pelagischen Mikroorganismen entwickelt und einem MBR-Laborsystem mit einer *Escherichia coli* Reinkultur gegenübergestellt.

4.1 Anreicherung von marinem Bakterioplankton

Zur Untersuchung der physiologischen Anpassungen von marinen Bakterien an nährstofflimitierende Bedingungen wurden die Mikroorganismen aus 70 l Meerwasser nach Passage eines 10 µm Vorfilters in einem Membranbioreaktor (MBR) über 44 Tage angereichert. Dabei zeigte das Wasser aus der Seewasserleitung (Zufluss des MBR) ähnlich hohe Individuendichten wie das Meerwasser in situ. Allerdings blieb die Anreicherung der Bakterien im MBR eine Größenordnung hinter den rechnerisch zu erwartenden Werten zurück. Diese reduzierte Akkumulation der Mikroorganismen kann zum einen auf den

Fraßdruck der Proto- und Metazoen zurückgeführt werden (Kjelleberg et al. 1993), die vermehrt im Reaktor mikroskopisch nachgewiesen wurden. Dazu zählten neben Ciliaten auch heterotrophe Nanoflagellaten (HNF) sowie Amöben und Fadenwürmer (Nematoden). Die Quantifizierung der HNF deutete darauf hin, dass diese Fraßfeinde den Vorfilter passierten und über den Vorlagebehälter in den Reaktor gelangen konnten, wo sie wie alle Mikroorganismen angereichert wurden. Andererseits ist auch der Eintrag von Viren und die Ausbreitung von viralen Infektionen nicht als Grund für die verminderte Akkumulation der Bakterien auszuschließen (Kjelleberg et al. 1993). Interessanterweise kam es in diesem System nicht zu der in mit Abwasser betriebenen MBR beobachteten Abnahme der Protozoen (Rosenberger et al. 2000; Witzig et al. 2002). Es schien sich vielmehr ein Räuber-Beute-System zu etablieren, das eine weitere Anreicherung der Bakterien verhinderte. Ein möglicher Grund für diese Bifurkation der MBR-Systeme könnte in dem Nährstoffgehalt der zulaufenden Medien bzw. der Raumbelastung in den Systemen liegen. Der Kohlenstoffgehalt (DOC) in oligotrophen aquatischen Systemen beträgt 2 – 3 mg l⁻¹ (Röske und Uhlmann 2005), im oberflächlichen marinen Gewässern des Pazifiks, des Golfs von Mexiko bzw. der Nordsee 0,9 – 1,1 mg l⁻¹ (McCarthy et al. 1998), im Oberflächen- Meerwasser vor Helgoland sowie im Permeat der MBR um 2 mg l⁻¹ (eigene Untersuchungen), in eutrophen Gewässern um 10 mg l⁻¹ (Röske und Uhlmann 2005) und im Zulauf von kommunalen Kläranlagen dagegen bis zu 20 - 70 mg l⁻¹ (Koppe und Stozek 1999).

Tab. 28: Betriebsparameter verschiedener MBR-Systeme, ^{a)}Mittelwert für kommunales Abwasser (Koppe und Stozek 1999), ^{b)}aus dieser Arbeit, ^{c)}(Rosenberger et al. 2000), ^{d)}Trockengewicht des Klärschlammes

	MBR mit Meerwasser ^b	MBR mit Abwasser ^c	MBR mit <i>E. coli</i> ^b
Reaktorvolumen [l]	0,5	2.600 – 3.900	4,07
DOC Konzentration Zulauf [mg l ⁻¹]	2	45 ^a	0,8
Verweilzeit [h]	7,6	10 – 16	40,7
DOC-Raumbelastung [mg l ⁻¹ h ⁻¹]	0,3	4,5	19,7
Trockengewicht Biomasse [g l ⁻¹]	< 0,002	15 – 23 ^d	6,6

Dies bedeutet, dass es in den mit Abwasser beschickten MBR eventuell unter anderem aufgrund der um eine Größenordnung höheren DOC-Raumbelastung und einer eventuell besseren Verwertbarkeit des Kohlenstoffs zu weitaus höheren Bakterienkonzentrationen kam. So wurde in dem mit Abwasser betriebenen MBR eine Biomassekonzentration von 19 g l⁻¹ erreicht, wohingegen im Meerwasser-MBR eine Zellzahl von 3 × 10⁶ Zellen ml⁻¹ auf eine Biomassekonzentration von maximal 0,002 g l⁻¹ schließen lässt. Eine niedrige DOC-Raumbelastung, wie bei den marinen Anreicherungen beobachtet, scheint also die

Ausbildung von Räuber-Beute-Systemen zu forcieren, die wiederum eine höhere Anreicherung der Bakterien verhindert. Dagegen trägt eventuell eine höhere DOC-Raumbelastung zu einer höheren Konzentration von nicht-wachsenden Bakterien im Erhaltungsstoffwechsel und zu einem Rückgang der bakterivoren Räuber in einem MBR bei. Eine mögliche Ursache für den Rückgang der Räuber liegt darin begründet, dass die Bakterien bei einer hohen DOC-Raumbelastung sehr viel schneller wachsen als die Bakterien in einem MBR mit geringerer DOC-Raumbelastung bzw. als ihre eukaryotischen Fraßfeinde. Die Bakterien, die relativ schnell in hohen Zelldichten und unter der sich einstellenden Substratlimitierung im Erhaltungsstoffwechsel vorliegen, könnten zum einen dichteabhängige Signalstoffe ins Medium abgeben, die die Protozoen hemmen. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist der physiologische Zustand der Bakterien im Erhaltungsstoffwechsel, in dem die Zellen aufgrund von z. B. eventuellen Modifikationen der Zellwand schlechter für die Räuber zu verwerten sind. Da in mit Abwasser betriebenen MBR die Protozoen erneut in größerer Zahl auftraten, wenn die Betriebsweise des Systems geändert wurde (Rosenberger et al. 2000), scheint hier die schlechtere Verwertbarkeit der Bakterien eine größere Rolle gespielt zu haben. Die Bakterien, die weiterhin in hohen Zelldichten vorliegen, nehmen bei z. B. höherer Substratzufuhr erneutes Wachstum auf und liegen damit nicht mehr im Erhaltungsstoffwechsel vor. Die bessere Verwertbarkeit der wachsenden Bakterien für die Räuber kann daher für das erneute Auftreten von eukaryotischen Einzellern verantwortlich gemacht werden.

Weiterhin spielt sicherlich die Verwertbarkeit der zugeführten Substrate eine Rolle. Während die Kohlenstoffverbindungen im MBR mit *E. coli* zu mindestens 99,98 % abgebaut wurden und TOC in mit Abwasser betriebenen MBR ebenfalls zu 99 % abgebaut wird (Sun et al. 2007), konnten sowohl im Zulauf des mit Meerwasser betriebenen MBR als auch im Permeat dieses Reaktors eine DOC-Konzentration von 2 mg l^{-1} nachgewiesen werden. Dies kann darauf hindeuten, dass es sich bei den organischen Kohlenstoffverbindungen im Meerwasser um sehr schlecht abbaubare Substanzen gehandelt hat, die kein schnelles Wachstum der Bakterien im MBR ermöglichten. Andererseits lässt sich auch nicht ausschließen, dass die Bakterien einen Teil des einströmenden Kohlenstoffs metabolisierten, wuchsen, von den Protozoen gefressen wurden und deren Ausscheidungsprodukte für den DOC Gehalt im Permeat verantwortlich waren. Im Gegensatz zu den MBR Systemen, die mit Abwasser bzw. mit *E. coli* betrieben wurden, waren die Bakterien in dem mit Meerwasser betriebenen MBR nicht in der Lage, dem Fraßdruck ihrer Räuber durch sehr schnelles Wachstum zu entgehen und in einen Erhaltungsstoffwechsel überzugehen. Die Beobachtung, dass pelagische Flagellaten und Ciliaten größere, sich aktiv in Teilung befindliche Bakterien als Beuteorganismen bevorzugen (Hahn und Höfle

1999; Sherr et al. 1992; Šimek und Chrzanowski 1992), spricht neben der Verwertbarkeit der organischen Substrate ebenfalls für den Erklärungsansatz, dass die Bakterien im MBR nicht in der Lage waren, schnell zu wachsen und hohe Zelldichten auszubilden, um so die Räuberpopulation zu überwachen und im Anschluss aufgrund der eintretenden Nährstofflimitierung in einen nicht-wachsenden Zustand überzugehen. In einer Studie reagierten marine Bakterien, die ursprünglich eine Generationszeit von 1-100 Tagen aufwiesen, in oligotrophen Mikrokosmen auf eine künstliche Substratzufuhr (Hefeextrakt) sofort mit einer Erhöhung ihrer Zellgröße sowie schnellem Wachstum. Schon nach 24 Stunden hatten die Bakterien die stationäre Phase erreicht und wiesen eine zehnfach höhere Zellkonzentration als vor der Substratzugabe auf. Die Abundanz der HNF zeigte danach eine längere lag-Phase von 4 Tagen und die Räuber hatten nach 6 - 7 Tagen die Bakterien auf die ursprünglichen Zellkonzentrationen reduziert (Jürgens et al. 2000). Da die Bakterien in dem MBR in der vorliegenden Arbeit kontinuierlich mit Meerwasser mit einem DOC Gehalt von 2 mg l^{-1} versorgt wurden, ist davon auszugehen, dass sie auch kontinuierlich, und wahrscheinlich langsamer als in der oben aufgeführten Studie, wuchsen und damit von den Räufern bevorzugt phagozytiert wurden, was eine Anreicherung der Bakterien im MBR verhinderte.

Da aufgrund des Fraßdruckes während der Langzeitkultivierung nicht davon auszugehen war, dass sich die Mehrzahl der Bakterien in einem nicht-wachsenden Zustand befanden, wurden in einer kurzzeitigen Aufkonzentrierung die Mikroorganismen von 910 l Meerwasser in 48 h angereichert, um die Räuber in einem zweiten Schritt mittels Colchicin und Cycloheximid zu eliminieren, bevor der Erhaltungsstoffwechsel der marinen Bakterien in einem dritten Schritt im MBR untersucht werden sollte. Jedoch gelang es nicht die eukaryotischen Fraßfeinde mit den Zellgiften längerfristig abzutöten, so wurden selbst nach der höchsten Dosis von jeweils 2 g l^{-1} nach einer 14tägigen Inkubationszeit erneut Protozoen beobachtet. Die für Medien traditionell eingesetzte Konzentration zur Unterdrückung der Protozoen liegt bei $0,075 \text{ g l}^{-1}$ (Bomo et al. 2004). Dabei gehen die Meinungen über die Wirksamkeit dieser Zellgifte auseinander: einige Veröffentlichungen propagieren den Einsatz von Cycloheximid zur Inhibierung von planktischen Protozoen (Bomo et al. 2004; Hondeveld et al. 1999; Newell et al. 1983) und andere weisen auf Probleme hin, die von der gleichzeitigen Unterdrückung der Bakterien bis zur nicht einheitlichen Inhibierung der gesamten Einzeller im System reichen (Sherr et al. 1986; Tremaine und Mills 1987). Eine kontinuierliche Abtrennung der kleinen eukaryotischen Räuberorganismen im Zulauf stellte aufgrund der geringen Größe dieser Pico- bzw. Nanoplanktonorganismen von $0,2 - 5 \mu\text{m}$ (Díez et al. 2001) und des damit geringen Größenunterschieds zu den Bakterien eine Schwierigkeit dar. Selbst eine zweifache Filtration mittels eines Filters mit $0,8 \mu\text{m}$

Porengröße erlaubte keine vollständige Abtrennung von HNF und Bakterien im Meerwasser vor Helgoland (Beardsley et al. 2003).

Zusammenfassend ist das hier erstmals etablierte MBR-System zur Anreicherung von marinen Bakterien mit einem DOC-Zufluss von circa 2 mg l^{-1} dazu geeignet, Fraßbeziehungen zwischen Planktonorganismen zu untersuchen, da es hierbei nicht zu einer Eliminierung der bakterivoren Protozoen und Metazoen in ähnlichem Maße wie bei Systemen mit höheren DOC-Raumbelastungen kommt.

4.2 Stammcharakterisierung von *E. coli* A3

Zur Untersuchung der Physiologie und Proteinexpression von nicht-wachsenden Bakterien in einem MBR wurde daraufhin ein MBR-System im Labormaßstab etabliert, welches die Langzeitkultivierung einer Reinkultur mit höheren DOC-Zuflüssen erlaubte. Durch den Einsatz einer Reinkultur war der Vergleich der Proteinexpressionsmuster von Zellen in verschiedenen Langzeitkulturen möglich. Da *E. coli* zu den genetisch am besten untersuchten Mikroorganismen zählt (Blattner et al. 1997; Han und Lee 2006), liegen eine Vielzahl von Expressionsdaten für vergleichende Untersuchungen in Datenbanken vor. Auch sollte *E. coli* aufgrund seines sekundären Habitats in natürlichen Gewässern und im Boden die genetische Ausstattung besitzen, sich an langfristige Nährstofflimitierungen anzupassen. Vor allem das in den Langzeitkultivierungen eingesetzte Umweltisolat *E. coli* A3 erwies sich in vorherigen Experimenten als ein äußerst robuster Stamm mit einer hohen Überlebensfähigkeit in situ. Daher wurde dieser Stamm zu Beginn näher charakterisiert und seine Überlebensfähigkeit mit dem des Laborstammes *E. coli* K12 verglichen.

Da die Sequenzdaten des 16S rDNA Abschnitts bei nahe verwandten Bakterienstämmen nicht ausreichen, diese voneinander zu diskriminieren, wird das Ribotyping immer mehr dazu genutzt verschiedene *E. coli* Stämme voneinander zu unterscheiden. So werden z. B. die Quellen verschiedener aber nahe verwandter Enterobakterien in der Umwelt mit Hilfe des Riboprinting identifiziert (Anderson et al. 2006; Carson et al. 2001). Bevor das Umweltisolat *E. coli* A3 zur Untersuchung der physiologischen Anpassungen während des Erhaltungsstoffwechsels im MBR zum Einsatz kam, wurde der Stamm aufgrund der 16S rDNA Sequenzdaten und einer RiboPrint Analyse phylogenetisch eingeordnet.

Das Umweltisolat *E. coli* A3 zeigte die größte Ähnlichkeit zu einem *E. coli* Kontroll-Stamm DSM5923 (ATCC No. 35218), der ursprünglich aus einem Hund isoliert wurde. Dieser Stamm wird aufgrund seiner Fähigkeit β -Lactamase zu produzieren unter anderem zur Qualitätskontrolle in der medizinischen Mikrobiologie nach DIN 58959-7 eingesetzt. Die Ähnlichkeit ist mit 0,82 (similarity) jedoch nicht so groß, als dass die beiden Stämme als

identisch anzusehen sind. Damit gehört das Umweltisolat *E. coli* A3 zu einer eigenen, neuen RiboGruppe. Die Ähnlichkeit der beiden DSM-Stämme der EHEC Gruppe ist hingegen mit 0,98 (similarity) so hoch, dass sie der gemeinsamen RiboGruppe RIBO1 198-291-S-3 zugeordnet wurden und deshalb im Sinne der RiboPrint-Analyse als identisch anzusehen sind.

4.3 Vergleichende Untersuchungen von *E. coli* A3 und *E. coli* K12

Zum Vergleich der Fähigkeit eines Umweltisolates und eines Laborstammes von *E. coli* länger andauernde Hungerperioden zu überleben, wurden die beiden Stämme zunächst in Batch-Ansätzen kultiviert. Die optische Dichte während der 120 Tage andauernden Batch-Kultivierung des Umweltisolates *E. coli* A3 und des Laborstammes *E. coli* K12 stieg während der Lag- und Log-Phase an, um nach 10 Tagen relativ konstant zu bleiben. Die relative Abnahme des Anstiegs der optischen Dichte oberhalb einer $OD_{578\text{ nm}}$ von 0,5 liegt an der Messweise, bei der die Proben vor der Messung nicht verdünnt wurden. Daher ist ab einer OD von 0,5 eine lineare Korrelation zwischen Extinktion und Zellzahl aufgrund des Lambert-Beerschen Gesetzes nicht mehr gegeben. Beim Vergleich der beiden Stämme wurde deutlich, dass das Umweltisolat *E. coli* A3 zu fast jedem Zeitpunkt eine höhere optische Dichte und damit Biomasse aufwies als *E. coli* K12. Da bei den mikroskopischen Observationen der Proben keine gravierenden Unterschiede in der Zellmorphologie auszumachen waren, scheint der Unterschied in der optischen Dichte nicht auf eine Veränderung der Zellgröße zu beruhen. Bei keinem der beiden Stämme nahm innerhalb von 120 Tagen die Zellkonzentration ab. Dies deutet darauf hin, dass es trotz des hohen Anteils von 90 % vermeintlich toter Zellen nach einer Kultivierungsdauer der *E. coli* K12 Zellen von über 150 Tagen scheinbar zu keinen über die optische Dichte detektierbaren Lysevorgängen der Zellen gekommen ist. Der leichte Anstieg der optischen Dichte im Verlauf des Experimentes ist wahrscheinlich auf Verdunstungseffekte der Nährbrühe zurückzuführen. Allerdings könnte auch ein zellbezogenes Wachstum durch Speicherstoffbildung oder Nebenstoffwechselprodukte die leichte Erhöhung der optischen Dichte bedingt haben.

Die Anzahl der kultivierbaren Zellen sank bei beiden Stämmen ab dem 40. Tag sehr stark ab. Zum Ende der Kultivierung konnte bei dem Umweltisolat jedoch ein etwas größerer Anteil an kultivierbaren Zellen von 0,24 % (statt 0,08 % wie bei *E. coli* K12) des Durchschnittswertes der ersten 26 Tage ermittelt werden. Bei der zur Bestimmung der KBE eingesetzten Drop Plate-Methode (Herigstad et al. 2001; Hoben und Somasegaran 1982; Reed und Reed 1948) liegt die Hauptfehlerquelle in den Verdünnungsreihen der Zellsuspensionen (Pipettierfehler, Adsorption der Zellen an Oberflächen). Dieser ist bei höheren Zelldichten stärker ausgeprägt, da sich der Fehler aufsummiert (Bast 1999). Da für alle

Verdünnungsreihen derselbe Pipettensatz zur Anwendung kam, ist dieser Fehler jedoch in Bezug auf eventuelle Unterschiede zwischen den beiden Bakterienstämmen vernachlässigbar.

Der Anteil an hybridisierbaren Zellen (FISH) sowie an metabolisch aktiven Zellen (CTC) nahm bei beiden Stämme in etwa dem gleichen Umfang ab, während der Anteil vermeintlich lebender Zellen (LIVE/DEAD BacLight) am Ende des Experimentes beim Umweltisolat etwa zehn mal höher war als bei dem Laborstamm.

Beim Vergleich der maximalen Wachstumsraten zeigte der Stamm *E. coli* K12 bei 37 °C eine um 16 % längere Generationszeit als das Umweltisolat *E. coli* A3. Bei einer Kultivierungstemperatur von 25 °C war der Unterschied noch ausgeprägter, hier wies der Laborstamm K12 eine um 77 % längere Generationszeit als das Umweltisolat A3 auf. Damit ist das Umweltisolat *E. coli* A3 in der Lage, günstige Substrat-Bedingungen vor allem bei suboptimalen Temperaturen durch ein schnelleres Wachstum zu nutzen als der Laborstamm *E. coli* K12.

Zusammenfassend scheint das Umweltisolat sowohl zu schnellem Wachstum fähig zu sein als auch unter limitierenden Bedingungen ein höheres Überlebenspotential als der Laborstamm zu besitzen. Ähnliches wurde für zwei *E. coli* Trinkwasserisolate beschrieben, die eine schnellere Anpassung an geringe Glucosekonzentrationen in einem Chemostaten als ein *E. coli* K12 Laborstamm zeigten, was auf einen Wettbewerbsvorteil unter oligotrophen Bedingungen schließen lässt (Franchini 2006). Allerdings spiegelten sich diese Vorteile nicht in einem veränderten Katabolom der Umweltisolate und des Laborstammes *E. coli* K12 wieder (Ihssen und Egli 2005).

4.4 Langzeitkultivierungen von *E. coli* A3 in einem MBR und Batch-Ansatz

4.4.1 MBR-Kultivierungen

Die Membranbioreaktor-Systeme ermöglichten eine Langzeitkultivierung von nicht-wachsenden oder nur sehr langsam wachsenden Bakterien. Eine Porengröße der Membran von 0,2 µm wurde für die Kultivierung von *E. coli* Zellen als ausreichend beschrieben (Reeve et al. 1984). Bei der Auslegung der Systeme war davon auszugehen, dass die Permeatrate von Bakteriensuspensionen auf maximal 10 % der vom Hersteller angegebenen Permeatrate mit Reinstwasser absinkt und diesen Wert bei langfristigem Einsatz auch unterschreitet. Eine regelmäßige Rückspülung der Membran ist daher zur Erhaltung des Transmembranflusses zu empfehlen, war in den Reaktorläufen dieser Arbeit allerdings nicht notwendig. Eine Überströmrate von 1,9 l min⁻¹ erwies sich als ausreichend, um

die 0,09 m² große Membranfläche über einen Zeitraum von über 70 Tagen vor einem Verblocken zu schützen. Diese Überströmrates lag dabei am unteren Limit der für Perfusionenkulturen vom Hersteller empfohlenen Betriebsweise, so dass die eventuell empfindlicheren nicht-wachsenden Bakterien sehr geringen Scherraten ausgesetzt waren. Die Permeatabgabe wurde über den Füllstand geregelt, so dass die Substratzufuhr kontinuierlich erfolgen konnte. Trotz der kontinuierlichen Substratzufuhr kann eine selektive Beeinflussung der Zellen aufgrund des tropfenweise eingeführten frischen Mediums nicht vollständig ausgeschlossen werden (siehe 4.4.5). Die Möglichkeit, die Membran gemeinsam mit dem Reaktorsystem zu autoklavieren erwies sich für die Kultivierung einer Reinkultur als unabdingbar.

4.4.2 Sterilität der Systeme

Um Aussagen über die Physiologie einer Reinkultur treffen zu können, muss ein möglicher Einfluss von Kontaminanten ausgeschlossen werden. Gerade bei Langzeitkultivierungen stellt die Sicherstellung der Reinheit einer Kultur eine Herausforderung dar. Zur Überprüfung wurde sowohl das zulaufende und ablaufende Medium wie auch die Fermentationsbrühe selbst regelmäßig mikroskopisch auf das Vorhandensein von *E. coli* untypischen Zellmorphologien hin untersucht und Proben auf LB Medium ausplattiert. In keiner dieser Untersuchungen wurde ein Hinweis auf eine Kontamination mit einem Fremdkeim entdeckt. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass in den Kultur-Systemen keine kultivierbaren Kontaminanten vorhanden waren, die eine *E. coli* atypische Zell- bzw. Kolonimorphologie ausbildeten.

Die Reaktor- und Batch-Proben wurden außerdem mit Hilfe der ARDRA Methode auf das Vorhandensein von Kontaminanten untersucht. Auch hier gab es keinen Hinweis auf Fremdkeime in den Kultur-Systemen. Diese Methode beruht auf einem PCR-Schritt, mit dem die 16S rDNA amplifiziert wird. Abgesehen von den Problemen, die mit der PCR-Technik verbunden sind, wie der unterschiedliche Erfolg der Zellyse und der DNA-Extraktion von verschiedenen Zellen bis hin zur unterschiedlichen Amplifizierung der DNA verschiedener Bakterien durch das unterschiedliche Anheftungsvermögen der Primer (von Wintzingerode et al. 1997), hat natürlich die Abundanz der Kontaminante in der Probe besonderen Einfluss. Aufgrund der exponentiellen Amplifikation der DNA-Fragmente könnten Abschnitte, die nur in sehr geringer Ausgangskonzentration vorhanden sind einen in Relation zur Gesamtmenge noch geringeren Anteil des DNA-Gemisches nach Beendigung der PCR ausmachen (von Wintzingerode et al. 1997). So besteht die Möglichkeit, dass eine Kontaminante bei Ausschluss aller übrigen Fehlerquellen bei nur sehr geringer Abundanz im Elektrophoresegel nicht als Bande zu erkennen ist. Darüber hinaus besteht

auch eine allerdings geringe Möglichkeit, dass der amplifizierte DNA-Abschnitt einer vermeintlichen Kontaminanten durch das Enzym *EcoRI* in dieselben zwei Teilstücke gespalten wird wie die 16S rDNA von *E. coli* und damit auf dem Gel nicht sichtbar wäre.

Es gibt jedoch zusammenfassend keinen Hinweis auf Kontaminationen der Langzeitkultivierungsansätze.

4.4.3 Wachstum und Biomasseentwicklung der Bakterien

In einem System wie dem MBR mit Reinkulturen, in dem Fraßdruck und Abzug von Biomasse keine Rolle spielen, hängt die Netto-Biomasseproduktion von drei Faktoren ab: von der Menge der zugeführten Energie, von dem Energiebedarf des Erhaltungsstoffwechsels und von einem eventuellen Absterbeprozess der Zellen (Low und Chase 1999; van Loosdrecht und Henze 1999). Die anfänglich wachsenden Mikroorganismen verbrauchen einen immer größer werdenden Anteil des verfügbaren Substrats. Die mit der Zeit abnehmende Substratkonzentration bedingt schließlich einen Rückgang der Wachstumsrate der Bakterien. Dabei lässt sich die Biomasseentwicklung in einem MBR, wie in Abb. 60 dargestellt und in der Literatur beschrieben, in vier Wachstumsphasen einteilen (Müller und Babel 1996; Tros et al. 1996; van Verseveld et al. 1984).

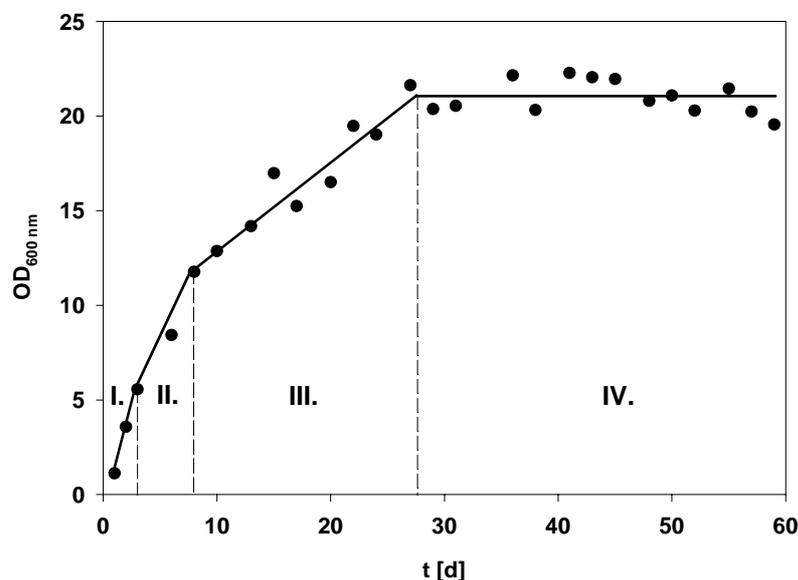


Abb. 60: Wachstumsphasen der Biomasse im MBR während der Fermentation von *E. coli* A3

Die Wachstumsrate der Bakterien nimmt mit jeder Phase ab (Abb. 60, Tab. 29), bis in der IV. Phase kein Netto-Wachstum mehr zu beobachten ist. In dieser Phase dient die mit dem Medium eingetragene Energie allein für die Deckung des Erhaltungsstoffwechselbedarfs der vorhandenen Bakterien. Diese Periode des Nullwachstums kann auch als quasi

Steady State bezeichnet werden, da sich der Biomassegehalt im System nicht ändert (Tros et al. 1996).

Tab. 29: Wachstumsraten und Generationszeiten der Bakterien während der Wachstumsphasen im MBR

	I. Phase	II. Phase	III. Phase	IV. Phase
Wachstumsrate [h^{-1}]	0,09	0,05	0,02	0
Generationszeit [h]	7,5	13,6	36,2	∞

Ein Netto-Nullwachstum der Bakterien in einem MBR kann auf zwei verschiedenen physiologischen Konzepten basieren. Nach dem Ansatz des kryptischen Wachstums (cryptic growth) kann die Nährstofflimitierung dazu führen, dass ein kleinerer Teil der Zellen wächst und ein anderer Teil - programmiert oder zufällig - stirbt und damit unter Umständen zusätzlich zu den zugeführten Substraten den wachsenden Teil der Zellen durch die Bereitstellung von Zellyseprodukten unterstützt (Mason et al. 1986; Ryan 1959). In diesem Zusammenhang können Wachstumsraten und Absterberaten der Bakterien miteinander korrelieren (Kurland und Mikkola 1993), so dass langsames Wachstum auch zu niedrigen Absterberaten führen würde. Allerdings gab es bei hungernden *E. coli* K12 Zellen in einem Batch-Ansatz mit 0,4 % Glucose-supplementiertem Minimalmedium M9 sowie in einem MBR keinen Hinweis auf Zellyse (Reeve et al. 1984). Dabei waren weder Lyseprodukte noch in Lyse befindliche Zellen im Elektronenmikroskop bzw. Fluoreszenzmikroskop erkennbar. Darüber hinaus wurde nur 1 % der von den hungernden Zellen ins Medium abgegebenen ^{14}C -markierten Substanzen von den nährstofflimitierten Bakterien aufgenommen, was die Autoren zu der Schlussfolgerung kommen ließ, dass die 25 % des ins Medium abgegebenen ^{14}C -markierten Materials scheinbar nutzlos für die hungernden Zellen war und ihnen nicht zu einem erneuten Wachstum verholfen haben kann (Reeve et al. 1984). So waren auch in den Experimenten der vorliegenden Arbeit so gut wie keine Lyseprodukte in den unverdünnten *E. coli* Proben aus dem MBR und Batch-Ansatz mikroskopisch zu erkennen, was auf keine bzw. sehr geringe Absterbeprozesse im MBR schließen lässt. Darüber hinaus schienen die vermeintlich toten Zellen, zumindest in den Batch-Ansätzen der vergleichenden Untersuchungen von *E. coli* A3 und K12 (Kapitel 3.3), noch relativ lange erhalten zu bleiben und nicht zu lysieren. So hätten bei relativ hohen Absterberaten im MBR die vermeintlich toten Zellen akkumulieren müssen. Der Anteil der vermeintlich toten Zellen blieb jedoch während des kontinuierlichen Betriebes stabil bei maximal 10 %, was für geringe Absterberaten im MBR spricht.

Das Konzept des Erhaltungsstoffwechsels hingegen postuliert, dass die Mikroorganismen die durch das Medium eingebrachten Nährstoffe und die daraus gewonnene Energie aus-

schließlich für ihren Grundstoffwechsel und nicht für Wachstumsprozesse nutzen. Die Bakterien sind nur solange in der Lage zu wachsen, wie zusätzlich zu ihrem Erhaltungsstoffwechsel-Energiebedarf genügend Energie in Form von Nährstoffen zugeführt wird. Ist die für eine bestimmte Betriebsweise des Reaktorsystems maximale Zelldichte erreicht, genügt die zugeführte Energie gerade, um nur noch den Erhaltungsstoffwechsel der Bakterien zu ermöglichen (Witzig et al. 2002), ein Wachstum der Biomasse findet nicht mehr statt.

Die meisten bisherigen Untersuchungen unterstützen das Konzept des Erhaltungsstoffwechsels (Konopka 2000) und auch die Ergebnisse dieser Arbeit liefern Hinweise auf das Zugrundeliegen dieses physiologische Konzepts bei Nährstofflimitierung in einem MBR: Die Schwankungen in der Biomassekonzentration ab dem 30. Tag scheinen zunächst eher auf ein kryptisches Wachstum hinzudeuten. Das Schwanken der mittels DEFT und Durchflusszytometer ermittelten Gesamtzellzahlen sowie der optischen Dichte während dieser IV. Phase lässt sich allerdings mit einer erhöhten Fehlerrate aufgrund der stärkeren Verdünnung erklären, vor allem, da die Oszillationen der unterschiedlichen Methoden nicht einheitlich waren. Bei der Bestimmung der Trockenmasse hingegen, die ohne Verdünnungsreihen durchgeführt wurde, waren solche Schwankungen in diesem Ausmaß nicht zu beobachten. Die Abnahme der mikroskopisch detektierbaren Teilungsstadien ab dem 49. Tag kann weiterhin als Hinweis auf ein nur sehr geringes bzw. ein Nullwachstum gesehen werden, da bei durchschnittlich 0,5 Teilungsstadien von 1.000 gezählten Zellen der Anteil der sich zum Probenahmezeitpunkt in Teilung befindlichen Bakterien im Durchschnitt 0,05 % nicht überstieg. Überträgt man die von Hagström publizierte lineare Korrelation vom Anteil der Teilungsstadien und der Wachstumsrate bei marinen Bakterien, die bei einem Anteil von 5 % Teilungsstadien eine Wachstumsrate von $0,01 - 0,06 \text{ h}^{-1}$ aufwiesen, so lässt sich für den bei *E. coli* A3 beobachteten Anteil an Teilungsstadien von 0,05 % eine Wachstumsrate von circa $0,005 \text{ h}^{-1}$ und damit eine Generationszeit von 139 h prognostizieren (Hagström et al. 1979). Dies entspricht 0,4 % der maximalen Wachstumsrate von *E. coli* A3. Eine mögliche Ursache dieser geringen Wachstumsprozesse liegt in dem Volumen- und Zellverlust des MBR aufgrund der Probenahme und des Schaumaustrittes. Dieser tägliche Volumenverlust betrug im Mittel 0,25 % und maximal 0,6 % des Reaktorvolumens. Das nachfolgende Auffüllen des Reaktorvolumens mit fructosehaltigem Medium kann allerdings auch nur für einen kleinen Teil der Wachstumsprozesse in dieser sowieso schon geringen Größenordnung verantwortlich gemacht werden, da für einen Ausgleich des durchschnittlichen Volumenverlustes eine Wachstumsrate von $0,0001 \text{ h}^{-1}$ bzw. eine Generationszeit von 290 Tagen notwendig gewesen wäre. Diese berechneten Wachstumsraten liegen weit unterhalb der Grenze von 10 % der maximalen Wachstums-

rate von $0,14 \text{ h}^{-1}$ für *E. coli* A3, unterhalb derer eine Änderung des Stoffwechsels für in MBR kultivierte Mikroorganismen beschrieben wurde (Drews und Kraume 2007; Tros et al. 1996; van Verseveld et al. 1984) und werden daher vernachlässigt.

Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass die Bakterien im MBR während der IV. Phase vom 30. bis 60. Tag der Fermentation die mit dem Medium einströmende Fructose hauptsächlich für ihren Erhaltungsstoffwechsel verbraucht und so gut wie gar nicht für Wachstumsprozesse genutzt haben.

4.4.4 Physiologie der Gesamtpopulationen

Bei der Gesamtpopulation der Zellen aus dem MBR ergab sich folgendes Bild: Obwohl die Zellen aus dem MBR mit ihrer ATP-Produktion stärker auf eine Aktivierung mittels LB Medium zu reagieren schienen als die Bakterien aus dem Batch-Ansatz, zeigten sie bei der Untersuchung eines erneuten Zellwachstums eine längere lag-Phase als die Zellen aus dem Batch-Ansatz. Dies lässt auf eine etwas schnellere Reaktionsfähigkeit der Zellen aus dem MBR gegenüber erneuter Substratverfügbarkeit schließen, die sich aber nicht sofort in einem Zellwachstum zeigt. Insgesamt war das Wachstum der Bakterien aus dem MBR und aus dem Batch-Ansatz im Vergleich zu den Zellen aus der Übernachtskultur um zwei bzw. eine Stunde verzögert. Für die nur kurze Verzögerung sprechen auch die starken FISH-Signale der Zellen, die auf eine relativ hohe Ribosomenzahl pro Zelle deuten. Die hohe Ribosomenkonzentration der Zellen aus dem MBR und dem Batch-Ansatz erlaubte den Bakterien eine schnelle Antwort der Proteinsynthese auf erneute Nährstoffzufuhr, und damit eine relativ schnelle Wiederaufnahme des Zellwachstums (Konopka 2000). Die Zellen aus dem Reaktor reagierten etwas langsamer, was auf eine längere Umstellungsphase vom Erhaltungsstoffwechsel auf Teilungsaktivität schließen lässt als sie die Zellen aus dem Batch-Ansatz zeigten, die aus einem Hunger-Stadium kommend schneller erneutes Zellwachstum aufnahmen.

4.4.5 Subpopulationen mit unterschiedlicher Aktivität

Mit der Bestimmung verschiedener physiologischer Zellparameter konnte sowohl im MBR als auch im Batch-Ansatz eine heterogene Bakterienpopulation beobachtet werden. Grundsätzlich kann eine Reinkultur homogenen oder inhomogenen Bedingungen ausgesetzt sein, die auf verschiedene Weise zu einer Heterogenität und der Ausbildung von Subpopulationen beitragen können.

Die Heterogenität einer Reinkultur unter homogenen Bedingungen kann verschiedene Gründe haben: zum einen kann sie auf den Unterschieden der einzelnen Individuen beru-

hen, die sich in verschiedenen Stadien ihres Zellzyklusses befinden. Viele der erhaltenen Daten, solange sie sich nicht auf einer Einzel-Zell-Analyse beziehen, stellen dann nur einen gemittelten Wert über der Verdopplungszeit dar. Eine zweite Quelle der Heterogenität innerhalb einer Reinkultur können oszillatorische intrazelluläre Phänomene darstellen, die vor allem bei niederen Eukaryoten beobachtet wurden. Eine weitere Form der Heterogenität in einer genetisch gleichförmigen Population kann sich entwickeln, wenn die Mikroorganismen aufgrund von äußeren Stressfaktoren Subpopulationen ausbilden (Lloyd 1993; Müller 2007). Ein möglicher Stressfaktor stellt dabei eine Nährstofflimitierung dar, wie sie unter anderem in Batch-Kulturen aber auch im MBR-Systemen auftritt. Im Gegensatz zu Bakterien in einem Chemostaten, die aufgrund der konstanten Umweltbedingungen homogenere Populationen mit besser reproduzierbaren Eigenschaften ausbilden (Hoskisson und Hobbs 2005), resultiert eine Batch-Kultur in einer eher heterogenen Population mit unterschiedlichen Subpopulationen (Makinoshima et al. 2002). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass in einer wachsenden Batch-Kultur die Wachstumsrate kontinuierlich abnimmt (Franchini 2006). Da die spezifische Wachstumsrate einen dramatischen Effekt auf die Regulation der Genexpression haben kann (Hua et al. 2004; Ter Linde et al. 1999), kommt es zu kontinuierlichen Veränderungen des physiologischen Zustandes der *E. coli* Zellen während des Wachstums in einem Batch-Ansatz (Franchini 2006). Diese Unterschiede auf Ebene des DNA-Gehaltes, der Zellgröße und der Proteinexpression werden unter anderem auf die Geschichte der einzelnen Zellen zurückgeführt, da die Bakterien noch Zellbestandteile beinhalten können, die zu früheren Zeitpunkten der Wachstumskurve gebraucht und synthetisiert worden sind (Franchini 2006). Welchen Unterschied die beiden Kultivierungsverfahren Batch-Ansatz und Chemostat bedingen, zeigte eine Studie, in der *E. coli* Zellen mit derselben Wachstumsrate in einer Batch-Kultur und einem Chemostaten ein unterschiedliches Proteinmuster sowie Veränderungen im Katabolismus aufwiesen (Franchini 2006).

Aufgrund der lang andauernden Wachstumsphasen mit unterschiedlichen und sich verändernden Aktivitäten der Zellen in Membranbioreaktoren, ist bei diesem kontinuierlichen Kultivierungsverfahren während der Wachstumsphase ebenso von einer heterogenen, sich im Laufe der Zeit verändernden Population auszugehen. Die Geschichte der Zellen scheint dabei auch noch in der Phase des Nicht-Wachstums eine Rolle zu spielen, da auch hier eine Heterogenität der Bakterienpopulation zu beobachten war.

Eine Erklärungsmöglichkeit für die sich im Laufe der Langzeitkultivierungen verändernde Heterogenität der *E. coli* Population stellt die aufgrund der niedrigen Wachstumsrate langsame Zunahme von mutierten Zellen dar. In der Literatur beschriebene Mutationen, die oftmals unter anderem bei *E. coli* in der stationären Phase beobachtet wurden und die zu

einem Phänotypen mit einem Wachstumsvorteil (growth advantage in stationary phase, GASP) führen, basieren auf einer abgeschwächten *rpoS*-Aktivität (Finkel und Kolter 1999; Zinser und Kolter 1999). Interessanterweise ist eine Abschwächung des *rpoS*-Gens ein weit verbreitetes Phänomen in *E. coli* Umweltisolaten (Finkel und Kolter 1999), was auf einen beachtenswerten Selektionsdruck auf globale Regulatorgene in der Umwelt hindeutet (Zinser und Kolter 2004). Sogar bei der kompetitiven Kolonisation des Darmtraktes der Maus stellt die Funktion des *rpoS*-Gens einen Nachteil für *E. coli* Zellen dar (Krogfelt et al. 2000). Des Weiteren wurde ein starker selektiver Druck auf *E. coli* Zellen in Glucose-limitierten Chemostaten beobachtet, der zu einem Verlust der RpoS-Funktion führte (Ferenci 2001). Eine Herunterregulierung des RpoS konnte auch für ein limitiertes Wachstum von *E. coli* auf anderen Zuckern nachgewiesen werden (Franchini 2006). Diese Beobachtungen könnten eine Konsequenz aus der Rolle des RpoS in der Genregulation sein, in der RpoS für die Expression von über 140 Genen der Stressantwort und für die Überlebensfunktionen in der stationären Phase verantwortlich ist (Hengge-Aronis 2002b; Weber et al. 2005). Die Expression von RpoS erschien dabei umgekehrt proportional zur Wachstumsrate (Ihssen und Egli 2004) und war für die Herunterregulierung von Genen des zentralen Metabolismus verantwortlich (Patten et al. 2004). Darüber hinaus zeigten Stämme mit geringen RpoS-Konzentrationen zwei wesentliche Vorteile gegenüber Stämmen mit hohem RpoS-Gehalt. Zum einen wurde über ihre Fähigkeit berichtet, verschiedene Kohlenstoffquellen gleichzeitig metabolisieren zu können und zum anderen zeigten sie eine bessere kompetitive Durchsetzungsfähigkeit als Stämme mit hohem RpoS-Gehalt in Umgebungen mit geringem Nährstoffgehalt (Ferenci 2005; King et al. 2004; Wick und Egli 2004). Andererseits zeigten diese *rpoS* Mutanten eine geringere Resistenz gegenüber externen Stressfaktoren wie extremen pH-Werten (King et al. 2004). Verantwortlich für das vermehrte Auftreten solche Mutationen könnte ein vorübergehender hypermutierbarer Zustand als Quelle einer durch Anpassung entstandenen Mutation (adaptive mutation) der Zellen sein, die über Rekombinationen von Genabschnitten selbst bei sich nicht teilenden Zellen erfolgen kann (Rosenberg et al. 1998). Selektions-induzierte bzw. adaptive oder gerichtete Mutationen sind nicht zufällig auftretende Mutationen, die direkt als eine Antwort auf einen Umweltstimulus auftreten (Bridges 1997; Hall 1991). Die Existenz von gerichteten Mutationen, die teilweise an die Theorien von Lamarck erinnern, wird noch immer kontrovers diskutiert (Cairns et al. 1988; Rosenberg et al. 1998). Allerdings barg dieser Zustand nur für eine kurzzeitige Anpassung Vorteile, für den einen Antibiotika-behandelten Mäusedarm besiedelnden *E. coli*, wirkte er sich auf lange Sicht eher nachteilig aus (Giraud et al. 2001).

Darüber hinaus wurde von Polymorphismen im *rpoS*-Gen berichtet, die bei zahlreichen in der Natur vorkommenden *E. coli* Populationen beobachtet wurden und diesen eine hohe Flexibilität der Genexpression ermöglichen (Ferenci 2003). Dieser Polymorphismus wurde mit dem Selektionsdruck der Umwelt auf die jeweiligen Zellen erklärt und als SPANC (self preservation and nutritional competence) bezeichnet (Ferenci 2005). In ihren Studien wiesen Stämme mit unterschiedlichen RpoS-Phänotypen verschiedene katabolische Flexibilität auf, wobei eine hohe katabolische Flexibilität mit einer niedrigen RpoS-Konzentration korrelierte (King et al. 2004). Es wird davon ausgegangen, dass der Vorteil, der aus der Herunterregulierung des *rpoS*-Gens resultiert, aus dem Wettbewerb zwischen den Sigma Faktoren σ^s und σ^{70} resultiert (Farewell et al. 1998) und keinen direkten Effekt von RpoS selbst darstellt (King et al. 2006).

Ein weiteres Phänomen, welches die Heterogenität einer genetisch identischen Population unter denselben Umweltbedingungen beschreibt, ist die Bistabilität (bistability) (Dubnau und Losick 2006). Unter Bistabilität wird die Bifurkation (Aufspaltung) einer homogenen Population aus genetisch identischen Individuen in bestimmte Subpopulationen verstanden, die sich aufgrund ihrer Genexpression unterscheiden. Die Heterogenität der Population ist also nicht durch eine Neuordnung des Genoms oder durch Mutationen bedingt und die Zellen können (scheinbar zufällig) zwischen diesen physiologischen Stadien reversibel wechseln (Graumann 2006). Ein Beispiel für Bistabilität ist die Ausbildung von persistierenden Zellen (persister cells) bei *E. coli* nach einer Antibiotikabehandlung. Experimente ergaben, dass vor dem Antibiotikaeinsatz in der mittleren exponentiellen Phase ein kleiner Anteil der Population spontan in ein Stadium des geringen oder Null-Wachstums übergeht und damit dem Einfluss des Ampicillins entgeht, welches die Zellwandsynthese bei wachsenden Zellen blockiert (Balaban et al. 2004; Keren et al. 2004). Die Investition der Population in nicht- bzw. langsam wachsende Individuen kann sich letzten Endes durch eine erhöhte Fitness der Gesamtpopulation auszahlen (Kussell et al. 2006).

Mit Hilfe dieser Mechanismen sind die Bakterien in der Lage, sich im Vorfeld oder nach dem Eintritt von veränderten Umweltbedingungen an die neuen Gegebenheiten anzupassen. Es ist also anzunehmen, dass die sich im MBR aufgrund der langen, vierwöchigen Wachstumsphase ausbildenden Subpopulationen besser an die herrschende Nährstofflimitierung angepasst waren.

Eine weitere Ursache für die Heterogenität der Population im MBR kann die Tatsache darstellen, dass im MBR keine absolut homogenen Umweltbedingungen für die Bakterien gewährleistet waren. Vielmehr könnte das zutropfende Medium, von dem circa 1.000

Tropfen pro Stunde zur Fermenterbrühe hinzu gegeben wurden, ein langsames Wachstum von wenigen Zellen ermöglicht haben. Es ist anzunehmen, dass die Bakterien, die sich in der Nähe des eintropfenden Mediums befanden, die Fructose relativ schnell aufnahmen und metabolisierten, während andere, weiter entferntere Zellen, nichts von der Kohlenstoffquelle erhielten. Aufgrund der Rührertätigkeit sollte die Häufigkeit dieser selektiven Beeinflussung theoretisch über die Zeit auf alle Zellen gleich verteilt sein. Die Ergebnisse liefern also nur eine Momentaufnahme der Zellaktivitäten zu einem bestimmten Zeitpunkt, die aufgrund des langsam durchlaufenen Zellzyklus der nicht synchronisierten Bakterien nicht bei allen Zellen identisch ist.

Um die Frage nach einer sich bei den nicht-wachsenden Bakterien eventuell ausbildenden Heterogenität genauer zu beantworten, wurde die Lebensfähigkeit der Zellen (LIVE/DEAD BacLight), die potentielle (DVC) und reale Kultivierbarkeit (KBE), die metabolische Aktivität (CTC) sowie die Hybridisierbarkeit der Bakterien (FISH) im zeitlichen Verlauf der MBR- und Batch-Langzeitkultivierung analysiert.

4.4.5.1 Lebensfähigkeit der Zellen

Die Untersuchung der Membranintegrität mittels des LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Kits (Molecular Probes, Leiden, NL) basiert auf den Eigenschaften bestimmter Fluoreszenzfarbstoffe, intakte Zellmembranen nicht überwinden zu können. Mit Hilfe der beiden Nukleinsäure-Farbstoffe SYTO9 und Propidiumiodid, die sich in ihren Fluoreszenzspektren sowie ihrer Fähigkeit intakte bakterielle Zellmembranen zu überwinden, unterscheiden, lassen sich, gemeinsam angewandt, vermeintlich tote Zellen von vermeintlich lebenden Zellen unterscheiden. Dabei färbt SYTO9 alle Zellen grün, wohingegen Propidiumiodid nur in Zellen mit geschädigter Membran eindringen soll und sie rot fluoreszieren lässt. Ein Verlust der Membranintegrität stellt aufgrund der vielfältigen Funktionen der Plasmamembran wie Permeabilitätsgrenze, Transport, Respirationsaktivität etc. eine signifikante Schädigung der Zelle dar (Joux und Lebaron 2000).

Die BacLight Methode wurde in zahlreichen Publikationen als Nachweis von lebenden Zellen sowohl bei *E. coli* Reinkulturen (Arana et al. 2004; Caruso et al. 2003; Ericsson et al. 2000; Grey und Steck 2001; Suller und Lloyd 1999) als auch bei Mischkulturen angewandt (Gunasekera et al. 2003). Dabei wurde von einigen Autoren angemerkt, dass die bestehende Membranintegrität nicht als alleiniger Indikator für eine Lebensfähigkeit von Zellen genutzt werden kann, sondern nur als Hinweis auf eine vorhandene Zellintegrität gesehen werden sollte (Joux und Lebaron 2000). Allerdings wurde in einer Studie beobachtet, dass alle mittels der BacLight Methode als vermeintlich tot eingestuften *E. coli* AF1000 Zellen nicht mehr in der Lage waren sich im Medium zu teilen, wohingegen auch

7 % der vermeintlich lebenden Zellen sich nicht geteilt haben (Ericsson et al. 2000). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Anteil der vermeintlich toten bzw. stark geschädigten Zellen keinesfalls unterschätzt wird und eine Zellfraktion existiert, deren Membranintegrität ausreichend ist, um als vermeintlich lebend bezeichnet zu werden, die aber nicht mehr kultiviert werden kann, also als lebend aber nicht kultivierbar (viable but nonculturable, VBNC) einzustufen ist.

Der sowohl im MBR als auch im Batch-Ansatz gleich bleibend hohe Anteil von mindestens 90 bzw. 95 % vermeintlich lebender Zellen mit einer ausreichenden Membranintegrität weist darauf hin, dass es in beiden Ansätzen zu keinen gravierenden Absterbevorgängen der Zellen innerhalb des Versuchszeitraumes kam und dass ein Großteil der inaktiven Zellen in Bezug auf metabolische Aktivität, Hybridisierbarkeit, potentielle Teilungsfähigkeit etc. mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht als tot anzusehen ist. Ähnliche Ergebnisse lieferten Untersuchungen an einem relativ robusten *E. coli* O157:H7 unter Hungerbedingungen in einem Mikrokosmos, in dem zumindest über einen Zeitraum von 14 Tagen keine signifikante Abnahme der vermeintlich lebenden Zellen zu beobachten war (Lisle et al. 1998).

Die Zunahme der vermeintlich toten Zellen im MBR nach Beendigung des kontinuierlichen Betriebes auf 25 % zeigt, dass der physiologische Zustand der Zellen im MBR nicht dem der Zellen aus dem Batch-Ansatz entspricht, da die Bakterien aus dem MBR bei vollständiger Einstellung der Nährstoffzufuhr mit einem höheren Anteil von vermeintlich toten Zellen reagierten als sie bei den Zellen der Batch-Kultur je beobachtet wurde. Diese Zunahme an vermeintlich toten Zellen im MBR nach Beendigung der kontinuierlichen Betriebsweise kann mit zwei unterschiedlichen Ansätzen erklärt werden. Entweder sind die nährstofflimitierten Bakterien aus dem MBR so ausgelaugt, dass sie eine Umstellung ihres Stoffwechsels auf einen Hungerzustand ohne zusätzliche Substratzufuhr nicht realisieren können und sterben. Oder die Bakterien reagieren auf die Beendigung der Substratzufuhr im MBR mit der Fähigkeit Propidiumiodid in die lebende Zelle aufzunehmen, leben weiter und erscheinen aufgrund der roten Färbung nur vermeintlich tot. Einen Hinweis auf die Fähigkeit lebender Zellen Propidiumiodid aufzunehmen, lieferte eine Studie, in der immerhin 4 % der Propidiumiodid-gefärbten *E. coli* Zellen und 60 % bzw. 10 % der mit Propidiumiodid gefärbten Zellen zweier exponentiell wachsender Bodenisolat kultivierbar waren, also als lebend anzusehen sind (Shi et al. 2007). Auch scheint Propidiumiodid vermehrt von wachsenden Zellen aufgenommen zu werden, da die Kultivierbarkeit der Propidiumiodid gefärbten Zellen der beiden Bodenisolat während der stationären Phase auf 34 % bzw. 3 % sank. Daneben wurden vereinzelt motile, offensichtlich lebende Bakterien beobachtet, die nach einer BacLight Färbung ein rotes Signal aufwiesen und damit als vermeintlich tot einzustufen gewesen wären (Dr. Böckelmann, persönliche Mit-

teilung). Es ist also nicht auszuschließen, dass selbst lebende *E. coli* Zellen unter bisher nicht getesteten Bedingungen in der Lage sind, Propidiumiodid aufzunehmen.

Insgesamt ist von einem wiederholten Einfrieren der aufgetauten Farbstoffe des LIVE/DEAD® BacLight™ Kits abzuraten, da dies zu einer gravierenden Unterschätzung der vermeintlich lebenden Zellen führte (Daten nicht aufgeführt).

4.4.5.2 VBNC Stadien sowie potentielle und reale Kultivierbarkeit der Zellen

Reaktor

Seit den ersten Beobachtungen von Rita Colwell (Xu et al. 1982), dass Bakterien, die sich auf routinemäßig eingesetzten Medien nicht mehr teilen und Kolonien bilden, nicht zwangsläufig tot sein müssen, haben sich über 400 Veröffentlichungen mit verschiedenen Aspekten des Phänomens der „lebendigen aber nicht kultivierbaren Zellen“ (VBNC) beschäftigt (Colwell und Grimes 2000; Kell et al. 1998; McDougald et al. 1998; Oliver 2005). Diese Art von Dormanz, die bisher bei über 60 gram-positiven wie gram-negativen Bakterienspezies beobachtet wurde, unterscheidet sich von einem allgemeinen Hungerzustand, in dem es ebenfalls zu einer drastischen Absenkung des Metabolismus kommen kann, darin, dass die hungernden Zellen zumeist kultivierbar bleiben. Nach einer Induktion des VBNC Zustandes durch Stressoren wie Hunger, Kälteschock oder osmotischem Stress können die betroffenen Bakterien jedoch ohne einen spezifischen Stimulus nicht mit Routinemethoden kultiviert werden. Zudem zeigten sie zum Teil weitere Auffälligkeiten wie eine Verkleinerung ihres Zellvolumens, eine Reduktion des Nährstofftransportes, der Respirationsraten und der Synthese von Makromolekülen sowie Veränderungen in der Fettsäurezusammensetzung der Zytoplasmamembran und biochemische Veränderungen der Zellwand (Porter et al. 1995; Signoretto et al. 2002). Eine Genexpression hingegen blieb bei den VBNC Zellen weiterhin nachweisbar (Mar Lleo et al. 2000). Eine große Relevanz hat dieser physiologische Zustand vor allem bei Indikator- bzw. pathogenen Organismen, die mit bisher eingesetzten meist auf Kultivierung beruhenden Standardmethoden in der Umwelt nicht nachgewiesen werden, aber dennoch vorhanden sind, Infektionen hervorrufen können und damit ein nicht zu unterschätzendes gesundheitliches Risiko darstellen (Huq et al. 2000; Oliver 2005). Anfängliche kritische Betrachtungen des VBNC Zustandes bezogen sich meist auf die Terminologie, da einige Autoren für die Eigenschaft „viable“ nicht nur Lebensfähigkeit sondern auch Teilungsfähigkeit und Kultivierbarkeit voraussetzten und die Bezeichnung „lebendig aber nicht kultivierbar“ für sie einen Widerspruch darstellte (Barer et al. 1998; Barer und Harwood 1999; Kell et al. 1998). Auch für *E. coli* ist ein Übergang in VBNC Stadien beschrieben (Arana et al. 2004; Bjergbaek und Roslev

2005; Garcia-Armisen und Servais 2004; Grey und Steck 2001; Na et al. 2006; Ohtomo und Saito 2001; Xu et al. 1982), obwohl in der Vergangenheit die Existenz von VBNC Stadien als Anpassungsstrategie bei Enterobakterien von einzelnen Autoren auch bestritten wurde (Bogosian et al. 1998; Bogosian und Bourneuf 2001; Desnues et al. 2003). Vor allem wurden jene Studien kritisiert, die keinen eindeutigen Nachweis einer Reaktivierung der VBNC Zellen lieferten. Ohtomo und andere erbrachten dann aber den Beweis, dass auch Enterobakterien in einem VBNC Zustand vorliegen können, indem sie die Reaktivierung von VBNC Zellen nachwiesen (Bjergbaek und Roslev 2005; Na et al. 2006; Ohtomo und Saito 2001)

Im MBR lässt der gleich bleibend hohe Anteil an lebendigen Zellen zusammen mit einer kontinuierlichen Abnahme der mittels der Drop Plate-Methode kultivierbaren Bakterien auf einen stetig wachsenden Anteil von anfangs 10 % auf über 60 % nach 70 Tagen schließen. Die abnehmende Kultivierbarkeit könnte auf das relativ hoch konzentrierte Kultivierungsmedium (LB Medium) zurückzuführen sein, da erhöhte Nährstoffkonzentrationen toxisch auf VBNC Zellen wirken können (Whitesides und Oliver 1997). So wird angenommen, dass nicht-wachsende Zellen freie Radikale (ROS = reactive oxygen species) produzieren, die eine Kultivierung verhindern (Bloomfield et al. 1998). Weitere Hinweise dafür lieferten nicht-wachsende *E. coli* Zellen, die auf dem gleichen Medium kultiviert werden konnten, wenn dies unter anderem Katalase enthielt (Mizunoe et al. 1999). Ein Aspekt des VBNC Stadiums scheint daher das in den Zellen produzierte oder im Medium vorhandene Wasserstoffperoxid zu sein, welches die VBNC Zellen nicht unter anderem durch Katalase entgiften können (Oliver 2005). Allerdings zeigten in einem MBR kultivierte *E. coli* A3 Zellen in Vorversuchen kein anderes Kultivierungsverhalten, wenn sie auf Agarplatten mit geringerer Nährstoffkonzentration (10 % LB Medium, AB Mineralmedium mit 2 g l⁻¹ Fructose) ausplattiert wurden (Daten nicht aufgeführt). Daher ist nicht von einer Unterdrückung der Kultivierbarkeit aufgrund eines sehr hohen Nährstoffgehaltes im Kulturmedium auszugehen. Der mittels der DVC Methode ermittelte Anteil potentiell teilungsfähiger Bakterien aus dem MBR lag meist 10 – 20 % über dem kultivierbaren Anteil der Zellen, was zum einen darauf zurückzuführen sein dürfte, dass die Zellen in einem Flüssigmedium verblieben und nicht dem Stress des Oberflächenwachstums an einer Grenzfläche (Agar/Luft) ausgesetzt waren. Zum anderen wurden die Zellen aus dem MBR zu Beginn 1:100 mit sterilem PBS Puffer verdünnt und letztlich in 5 % LB Medium inkubiert. Auch diese geringere Nährstoffkonzentration kann aufgrund des eventuell geringeren oxidativen Stresses eine Erklärung für den höheren Anteil an potentiell teilungsfähigen Bakterien im MBR liefern. Des Weiteren werden mittels der DVC Methode diejenigen Bakterien ermittelt, die sich zumindest einmal hätten teilen können. Diese potentiell teilungsfähigen Bakterien

müssen aber nicht zwangsläufig in der Lage gewesen sein, sich noch genügend oft zu teilen, um eine sichtbare Kolonie auf einer Agarplatte zu bilden. Daher erscheint ein höherer Anteil an potentiell teilungsfähigen Zellen als an Koloniebildenden Einheiten logisch.

Batch

Die Bakterien im Batch-Ansatz zeigten analog zu den Reaktor-Bakterien eine Zunahme der nKBE Zellen sowie der VBNC Stadien im zeitlichen Verlauf des Experimentes von 10 % auf 60 % am 70. Tag. Auch hier überstieg der Anteil der vermeintlich toten Zellen 5 % der Gesamtzellzahl nicht. Auffallend ist allerdings, dass im Gegensatz zu den Beobachtungen bei den Reaktor-Bakterien, die Werte der KBE Bestimmung einheitlich deutlich über denen der DVC Methode lagen. Ein mögliche Begründung könnte darin liegen, dass die Bakterien aus dem Batch-Ansatz zur Vorbereitung auf die DVC Methode nur 1:10 anstatt 1:100 wie die Zellen aus dem MBR mit sterilem PBS Puffer verdünnt wurden, was zu einer eventuell nur ungenügenden Verdünnung der noch in der Kulturbrühe vorhandenen wachstumshemmenden Metabolite führte.

4.4.5.3 Metabolische Aktivität der Zellen

Mit Hilfe von 5-Cyano-2,3-Ditolyltetrazoliumchlorid (CTC) wurde in zahlreichen Publikationen eine metabolische Aktivität bzw. eine Lebensfähigkeit von Bakterien sowohl aus Reinkulturen (Arana et al. 2004; Barer et al. 1999; Caro et al. 1999; Creach et al. 2003; Lisle et al. 1999; Ogawa et al. 2005) als auch aus diversen Habitaten nachgewiesen (del Giorgio und Scarborough 1995; Gunasekera et al. 2003; Karner und Fuhrman 1997; Nielsen et al. 2003; Rodriguez et al. 1992). Dabei wirkt in metabolisch aktiven Zellen das wasserlösliche CTC als künstlicher Elektronenakzeptor und wird intrazellulär von Komponenten der Elektronentransportkette bzw. von verschiedenen Dehydrogenaseenzymen zu unlöslichem, rot fluoreszierendem Formazan reduziert. Da der Energiestoffwechsel einer Zelle direkt mit dem Elektronentransport zusammenhängt, weist die Fähigkeit einer Zelle, CTC zu reduzieren, auf deren metabolische Aktivität hin (Joux und Lebaron 2000) und zwar sowohl unter aeroben als auch unter verschiedenen anaeroben Bedingungen (Bhupathiraju et al. 1999; Smith und McFeters 1997). Da *E. coli* Zellen selbst dann noch CTC reduzierten, als sie kein CO₂ mehr produzierten, wurde diese Methode nicht nur als Indikator für die Atmungsaktivität, sondern für die Lebensfähigkeit einer Zelle insgesamt propagiert (Creach et al. 2003). Allerdings muss eine gewisse Menge an Formazan gebildet werden, damit es im Fluoreszenzmikroskop sichtbar ist; so wurde beobachtet, dass Zellen mit einer geringen metabolischen Aktivität kein positives CTC Signal unter dem Fluoreszenzmikroskop gaben und nur die Zellen mit einer sehr starken metabolischen

Aktivität nachgewiesen werden konnten (del Giorgio und Scarborough 1995; Nielsen et al. 2003). Darüber hinaus wurden auch toxische Wirkungen von CTC gegenüber Bakterien beobachtet (Ullrich et al. 1996). Andererseits wurde eine Toxizität erst ab einer Konzentration von 6 mM nachgewiesen (Rodriguez et al. 1992), bzw. eine Konzentration von 5 mM als nicht toxisch betrachtet (Caruso et al. 2003). In dieser Arbeit kam CTC in einer Konzentration von 4,6 mM zum Einsatz, so dass von keiner toxischen Wirkung der Chemikalie auszugehen ist. Insgesamt lässt sich aufgrund der geringen Sensitivität der Methode davon ausgehen, dass die ermittelten Werte den Anteil der metabolisch aktiven Bakterien eher unterschätzen.

Der Anteil der CTC positiven Zellen im Anschluss an die vierwöchige Wachstumsphase im MBR von 70 % – 80 % erscheint recht hoch, doch lassen sich diese Werte mit der kontinuierlichen Substratzufuhr und dem aktiveren metabolischen Status der Zellen erklären. In einer anderen Untersuchungen wurden in der stationären Phase schon nach 32 Stunden nur noch 41 % der *E. coli* K12 Zellen als metabolisch aktiv eingestuft (Creach et al. 2003), wohingegen im Batch-Ansatz in dieser Arbeit der Anteil der CTC positiven Zellen erst nach 61 Tagen auf unter 50 % sank. Eine weitere Veröffentlichung berichtet von einer Abnahme der CTC positiven *E. coli* 536 Zellen in Langzeit-Hunger-Experimenten schon nach 30tägiger Inkubation auf unter 50 % in sterilem künstlichem Seewasser (López-Amorós et al. 1997). In derselben Veröffentlichung sank der Anteil der CTC positiven Zellen nach 60 Tagen auf unter 10 %, wohingegen im Batch-Ansatz in dieser Arbeit der Anteil CTC positiver Zellen selbst bis zum 70. Tag nicht unter 35 % fiel. Die insgesamt höhere metabolische Aktivität der *E. coli* A3 Zellen in dieser Arbeit kann zum einen mit der besseren Überlebensfähigkeit des Umweltisolates erklärt werden. Zum anderen wurde nach Herstellerangaben Ende 2005 der Reinheitsgrad der Chemikalie erhöht, so dass direkte Vergleiche mit Studien, in denen ältere Chargen der Substanz Verwendung fanden, mit Vorsicht zu betrachten sind (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Gründe für die teilweise niedrigeren Anteile an CTC positiven Zellen der Bakterien aus dem Batch-Ansatz nach einer Aktivierung sind spekulativ. Zwar zeigten einige Studien eine erhöhte CTC Reduktion nach Substrataktivierungen (Gribbon und Barer 1995; Rodriguez et al. 1992), allerdings wurde von einer Zugabe von Phosphaten und Nährstoffen abgeraten, da sie zu einer Inhibierung der CTC Reduktion bzw. zu einer abiotischen Reduktion der Substrate führen kann (Smith und McFeters 1997). Daher wurde in dieser Arbeit als aktivierendes Substrat kein Vollmedium, sondern nur Fructose (10 mM) eingesetzt. Es bleibt jedoch offen, ob selbst diese Aktivierung bei den stark hungernden Zellen des Batch-Ansatzes zu einer teilweisen Hemmung der CTC Reduktion führte.

Da auch abiotische Medienbestandteile zur Reduktion von CTC führen können (Smith und McFeters 1997) und als ähnliche Signale wie die von CTC positiven Bakterien im Fluoreszenzmikroskop zu erkennen sind, war es wichtig, im ständigen Vergleich mit den DAPI angefärbten Zellen im Fluoreszenzmikroskop sicherzustellen, dass ein positives Signal auch mit dem Vorhandensein einer Zelle korreliert.

4.4.5.4 Hybridisierbarkeit der Zellen

Die Korrelation zwischen Zellaktivität und Hybridisierbarkeit von Bakterien mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) wird zur Zeit noch diskutiert (Bouvier und del Giorgio 2003). Grundsätzlich scheinen schnell wachsende oder sehr aktive Zellen einen höheren Ribosomengehalt zu besitzen und damit in der Lage zu sein, proportional mehr Sondenmoleküle zu binden, was zu einem stärkeren Fluoreszenzsignal führt. Dieser Zusammenhang wurde zumindest für Steady State Reinkulturen im Labor nachgewiesen (Ruimy et al. 1994) und zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt (Poulsen et al. 1993). Ein hoher Ribosomengehalt weist allerdings nur auf das Potential der Zelle hin, Proteine zu synthetisieren bzw. sich teilen zu können, er gibt aber keinen Aufschluss über die genauen metabolischen oder Teilungsaktivitäten des Bakteriums (Amann und Kuhl 1998; Karner und Fuhrman 1997). Allerdings konnte eine Korrelation zwischen dem hybridisierbaren und demjenigen Anteil aus marinen, pelagischen in situ Populationen nachgewiesen werden, die ^3H markierte Aminosäuren in ihre Zelle einbauten und mittels Autoradiographie als metabolisch aktiv eingestuft wurden (Karner und Fuhrman 1997).

Da ein Großteil der Ribosomen nicht für die Proteinbiosynthese gebraucht wird und die Ribosomen nicht den limitierenden Faktor für ein Wachstum der Bakterien darstellen, liegt die Annahme nahe, dass auch Zellen mit geringer Aktivität noch über eine ausreichende Konzentration von Ribosomen verfügen, um ein detektierbares Fluoreszenzsignal abzugeben (Bouvier und del Giorgio 2003). Für *Desulfobacter* und *Vibrio* Arten wurden ermittelt, dass hungernde Zellen noch zwischen 20 % und 30 % des maximalen intrazellulären rRNA Gehaltes aufwiesen und dass die untere Grenze der Detektierbarkeit der Zellen mit FISH erreicht war, wenn die Bakterien weniger als 8 % des rRNA Gehaltes von wachsenden Zellen enthielten (Fukui et al. 1996; Kramer und Singleton 1992).

Reaktor

Der gleich bleibend hohe Anteil an hybridisierbaren Zellen von 60 % bis 80 % im Reaktor während der Fermentation ist somit auf Zellen zurückzuführen, die über eine ausreichend hohe Ribosomenkonzentration von mindestens 8 % der von wachsenden Zellen verfügten. Eine hohe Ribosomenzahl pro Zelle muss jedoch nicht zwangsläufig mit einer hohen

Translationsaktivität einhergehen. So wurde bei *E. coli* während der stationären Phase die Bildung von 100S Ribosomen-Dimeren beobachtet, welche mit Hilfe eines Ribosomen-Modulationsfaktors (RMF) aus zwei 70S Ribosomen gebildet wurden. Die Autoren gehen davon aus, dass es sich bei den 100S Ribosomen um eine inaktive Form handelt, die zur Speicherung der zeitweise nicht genutzten Ribosomen dient (Ishihama 1999).

Umgekehrt ist von einer Subpopulation von 20 % – 40 % der Zellen im Reaktor auszugehen, die eine so geringe Ribosomenkonzentration besaß, dass sie kein detektierbares FISH Signal mehr lieferte. Aufgrund der geringen Ribosomenkonzentration kann davon ausgegangen werden, dass diese Zellen keine hohen Teilungsaktivitäten aufwiesen (Bouvier und del Giorgio 2003). Innerhalb dieser Subpopulation sind auch jene Zellen zu vermuten, die über die BacLight Methode als „tot“ angesehen werden und maximal 10 % der Reaktorpopulation ausmachten. Dafür spricht die Beobachtung, dass auch durch eine Aktivierung mit LB Medium der Anteil der hybridisierbaren Zellen nicht zunahm, also die nicht-hybridisierbaren Zellen innerhalb der Inkubationszeit von einer Stunde nicht wieder aktiviert werden konnten. Der fehlende Anstieg des Anteils an hybridisierbaren Zellen nach der Aktivierung weist ebenfalls darauf hin, dass die Zellen sich während der einstündigen Inkubation nicht in großem Maßstab geteilt haben können, da dann aufgrund der größeren Zahl von teilungsaktiven und damit hybridisierbaren Zellen mit einem höheren Anteil an detektierbaren positiven FISH Signalen zu rechnen gewesen wäre. Die Experimente zur Geschwindigkeit der Wiederaufnahme des Zellwachstums (Kapitel 3.4.5.6) zeigten ebenso, dass bei den Zellen aus dem Membranreaktor nach einer Stunde Inkubationszeit in LB Medium (geschüttelt) bei 37 °C noch kein bedeutendes Wachstum zu erkennen war.

Der Vergleich der Daten mit Literaturangaben zeigt, dass in einem mit kommunalem Abwasser betriebenen MBR der Anteil der mittels der bakterienspezifischen Sonde EUB338 ermittelten hybridisierbaren Zellen zwischen 40 % und 50 % lag (Rosenberger et al. 2000; Witzig et al. 2002). Allerdings ist dabei zu bedenken, dass der Anteil der hybridisierbaren Zellen in einer Probe sowohl von der FISH Sonde selbst, von dem verwendeten Fluorochrom, von der eingestellten Stringenz und der Probenherkunft als auch von dem physiologischen Zustand der Zellen abhängen (Bouvier und del Giorgio 2003) und die Daten bei einer Änderung auch nur eines Parameters nur schwer miteinander vergleichbar sind. So wurde in den Untersuchungen des Abwasser-MBR die Sonden EUB338 mit einer Stringenz von 35 % und demselben Fluorochrom CY3 verwendet, um eine Mischkultur zu untersuchen, wohingegen in dieser Arbeit eine Reinkultur mit der Sonde Probe D und einer Stringenz von 20 % analysiert wurde. Allein die Änderung dieser drei Parameter könnte die unterschiedlichen Ergebnisse bedingen. Denkbar wäre, dass in der Mischkultur des

Abwasser-MBR verschiedene Bakterienarten mit unterschiedlichen Überlebensstrategien vorkamen, die teilweise schlechtere und eventuell nicht detektierbare Fluoreszenzsignale lieferten.

Batch

Der Anteil der hybridisierbaren *E. coli* Zellen im Batch-Ansatz von 60 – 90 % über den gesamten Versuchszeitraum hinweg ist ebenfalls recht hoch im Vergleich zu anderen Untersuchungen des Hungerzustandes bei *E. coli*, in denen der Anteil der FISH Signale von einem Umweltisolat in Trinkwassermesokosmen nach 18 Tagen um eine und nach 28 Tagen um knapp drei Zehnerpotenzen abgenommen hatte (Bjergbaek und Roslev 2005). Allerdings fand bei dieser Untersuchung die Sonde EUB338 Verwendung, was gemeinsam mit dem Inkubationsmedium Trinkwasser für die unterschiedliche Datenlage verantwortlich sein kann.

4.4.6 Subpopulationen mit unterschiedlichem DNA-Gehalt

Mikrobielle Reinkulturen wurden traditionell als gleichförmige Populationen angesehen bis unter anderem der Einsatz von neueren Methoden wie der Durchflusszytometrie die Heterogenität einer Reinkultur deutlich machte (Müller und Babel 2003; Wiacek et al. 2006). Die bisher auf Basis der gesamten Zellen erhaltenen physiologischen Daten einer nicht synchronisierten, inhomogenen Kultur stellen eine Durchschnittsverteilung dar, da die Zellen ihren Zellzyklus durchlaufen und sich während dessen hinsichtlich ihrer Größe und ihres DNA-Gehaltes etc. verändern (Lloyd 1993). Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, den DNA-Gehalt sowie die Zellgröße der einzelnen *E. coli* Zellen mittels einer quantitativen DAPI Färbung zu analysieren. Diese Methode erlaubt die Untersuchung einer großen Anzahl von einzelnen Zellen und ist damit ideal um heterogene Populationen auf Basis der einzelnen Zellen zu analysieren (Davey und Winson 2003; Müller 2007; Wiacek et al. 2006). Dabei setzt sich eine asynchron wachsende Population aus Individuen mit unterschiedlichem Gehalt an Chromosomenäquivalenten zusammen. Diese Zellen lassen sich zu Subpopulationen mit verschiedenen Chromosomengehalten C_n und C_{2n} , bzw. C_{xn} bei entkoppelter DNA-Synthese, zusammenfassen. Die Anzahl dieser Subpopulationen und der sie jeweils ausmachende Anteil an Bakterien bildet ein charakteristisches Muster, das sowohl von der Spezies als auch vom metabolisierten Substrat und Umweltbedingungen der einzelnen Zelle abhängig ist (Müller 2007).

Die Zellen aus dem Batch-Ansatz zeigten nach Beendigung ihrer Wachstumsphase eine Aufteilung der Gesamtpopulation in C_2 und C_4 Zellen mit jeweils 2 bzw. 4 Chromosomenäquivalenten. Ähnliche Muster wurden auch für andere *E. coli* Stämme in Glucose-

Minimalmedium beschrieben (*E. coli* K12, MG1655), die in der stationären Phase ein bzw. zwei Chromosomenäquivalente besaßen (Åkerlund et al. 1995; Franchini 2006). Dabei ist allerdings zu bedenken, dass verschiedene Stämme je ein eigenes, stammspezifisches DNA-Muster unter limitierenden Bedingungen aufweisen (Müller und Babel 2003; Wiacek et al. 2006). Die Größenspektren der Zellen überschnitten sich stark, so dass die C4 Zellen tendenziell etwas größer waren als die C2 Zellen, ein kleinerer Teil der C4 Zellen entsprach in der Zellgröße aber auch den Zellen mit 2 Chromosomenäquivalenten. Der Anteil der C4 Zellen nahm im Laufe der Zeit ab, was auf eine einmalige Teilung der C4 Zellen hindeutet. Sie gingen vermutlich in den C2 Zustand über, der für sie unter den Hungerbedingungen günstiger zu sein schien. Aufgrund des tiefen Tals zwischen den C2 und C4 Zellen im Histogramm ist nicht von einer größeren Subpopulation auszugehen, die im C2 Stadium eine Replikation ihres genetischen Materials durchführte oder im C4 Stadium einen Teil ihrer Chromosomenäquivalente abbaute.

Im MBR kam es nach Beendigung der exponentiellen Wachstumsphase mit entkoppelter DNA-Synthese am ersten Tag ebenfalls zu einer Aufspaltung der Population in hauptsächlich C2 und C4 Zellen. Auch hier überschnitten sich die Größenspektren der Zellen stark. Nach Beendigung der linearen Wachstumsphase nach circa 28 Tagen erhöhte sich der Anteil der zwischen C2 und C4 befindlichen Zellen (das Tal zwischen den Verteilungen wurde flacher). Dies kann zum einen mit einem Abbau bzw. einer verminderten Anfärbbarkeit der DNA in den C4 Zellen erklärt werden, deren Anteil an der Gesamtpopulation gleichzeitig stark abnimmt, oder daran liegen, dass einige wenige C2 Zellen wieder mit der Replikation ihrer DNA begannen (Müller 2007; Skarstad et al. 1983).

Hinzu kommt das Auftreten von Zellen ab dem 41. Tag, deren DNA-Gehalt weniger als einem Chromosomenäquivalent entsprach. Bei diesen Zellen mit geringem DNA-Gehalt aus dem Reaktor handelte es sich entgegen ersten Vermutungen nicht um Minizellen, da diese Zellen nicht kleiner waren, sondern, wie aus der Größenverteilung der durchflusszytometrischen Untersuchung ersichtlich, in einem ähnlichen Größenspektrum wie die C2 und C4 Zellen lagen. Des Weiteren konnte zumindest ein Teil dieser Zellen mit Hilfe der BacLight Methode als „lebend“ eingestuft werden, da der Anteil der als „tot“ bezeichneten Bakterien maximal 10 % betrug. Unter Berücksichtigung der Beobachtungen, dass auch lebende Zellen Propidiumiodid aufnehmen können, liegt der Anteil der Zellen mit einer intakten Zellmembran sogar eher über 90 % (Shi et al. 2007). Somit ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass es sich bei den Zellen mit einem geringen DNA-Gehalt um Bakterien handelte, deren DNA im Abbau begriffen ist, da Zellen ohne intakte DNA vermutlich relativ schnell ihre Membranintegrität verlieren und dann aber noch über längere Zeit als vermeintlich „tote“ Zellen in der Suspension nachgewiesen werden könnten (Kapitel 3.3.3),

was im Reaktor aber nicht der Fall war. So stimmten in einer Studie mit marinen pelagischen Bakterien die Anteile der Zellen mit einem geringen DNA-Gehalt und der Anteil der Zellen, die Propidiumiodid aufgenommen hatten und als „tot“ angesehen wurden, überein. Darüber hinaus zeigten die mit BacLight als „lebend“ eingestuft Zellen die gleichen Anteile an der Gesamtpopulation wie die Zellen mit einem hohen DNA-Gehalt bzw. die Nucleoid-tragenden Zellen (Gasol et al. 1999). Die Ergebnisse dieser Studie sprechen dafür, dass Bakterien ohne eine ausreichende DNA-Ausstattung auch noch längere Zeit als BacLight „tote“ Zellen unter in situ Bedingung vorkommen können.

Die Abnahme der Fluoreszenzintensität der Zellen mit geringem DNA-Gehalt kann zum einen aus einem Verlust der DNA bei den C2 und C4 Zellen durch Ausschleusung aus der Zelle oder einem Abbau innerhalb der Zelle resultieren oder zum anderen auf eine Änderung der Anfärbbarkeit der weiterhin vorhandenen DNA mit DAPI zurückzuführen sein. Letzteres kann entweder an einer geringeren Permeabilität der Zellwand liegen oder auf eine Änderung der Bindungsstellen, z. B. aufgrund von verpackter oder hochspiralisierter DNA beruhen. Diese hochspiralisierte Form der DNA (DNA supercoiling) ist innerhalb von Minuten nach einem Stress-Stimulus wie beispielsweise einem osmotischen Schock zu beobachten (Hsieh et al. 1991). Insgesamt wird aber davon ausgegangen, dass eine hochspiralisierte Form der DNA in einem frühen Stadium der Hunger-bedingten Stressantwort ausgebildet wird, während in Zellen mit einer abnehmenden metabolischen Aktivität bzw. in der stationären Phase die entspannte Form auftritt, da die Topologie der DNA hauptsächlich von Enzymaktivitäten kontrolliert wird (Lebaron und Joux 1994; Travers und Muskhelishvili 2005). So ist eine verminderte Anfärbbarkeit der Zellen im Erhaltungsstoffwechsel eher nicht auf eine hochspiralisierte Form des DNA-Moleküls zurückzuführen.

Eine weitere Möglichkeit für die Änderung der DAPI Bindungsstellen stellt die Verpackung der DNA in Form von kristallinen Strukturen dar, wie sie durch das unspezifisch DNA-bindende, histonartige Protein Dps unter oxidativem und langfristigem Hunger-Stress beobachtet wurde (Ishihama 1999; Nair und Finkel 2004; Wolf et al. 1999). In der späten stationären Phase stellt Dps den Hauptbestandteil des bakteriellen Chromatins dar (Ali Azam et al. 1999). Dabei beschützt Dps die Zelle aufgrund seiner Fähigkeit DNA und Metalle zu binden, seiner Ferroxidase-Aktivität sowie seiner Fähigkeit in die Genregulation auf Ebene der Transkription einzugreifen beispielsweise vor UV- und Gamma-Strahlung, vor toxischen Eisen- und Kupferkonzentrationen und vor thermischem wie osmotischem Stress. Während der stationären Phase kondensiert Dps das DNA Molekül reversibel in eine stabile kristalline Form (Biokristall), so dass zum einen die Reaktivität der DNA herabgesetzt wird und sie damit weniger sensitiv gegenüber Hitzestress und UV-Strahlung ist und zum anderen die meisten Makromoleküle wie schädigende Peroxidasen die so stabi-

lisierte DNA erst gar nicht erreichen (Nair und Finkel 2004). Die Bildung der kristallinen DNA scheint dabei von der extrazellulären Konzentration an divalenten Kationen, vornehmlich Mg^{2+} , abzuhängen. Dabei soll der Dps-DNA-Komplex über Ionenbrücken gebildet werden, was nur in einem gewissen Mg^{2+} -Konzentrationsbereich geschieht. In Gegenwart höherer oder niedrigerer Mg^{2+} -Konzentrationen konnten die Biokristalle nicht beobachtet werden. Da dieser Kristallisationsprozess weder enzymatische Aktivität noch eine *de novo* Proteinsynthese voraussetzt und damit keine Energie benötigt, kann er effektiv auch bei längerfristiger Nährstofflimitierung stattfinden (Frenkiel-Krispin et al. 2001). Weiterhin impliziert das Vorkommen von homologen Dps Genen bei verschiedenen Bakterien, dass dieser physikalische Schutzmechanismus der DNA gegenüber Nährstofflimitierungen und oxidativem Stress einen unter Prokaryoten weit verbreiteten Ansatz darstellt (Chen und Helmann 1995; Martinez und Kolter 1997). Läge der vermeintlich geringe DNA-Gehalt bei der Subpopulation der Reaktorzellen an der schlechteren Anfärbbarkeit der DNA aufgrund von Kristallisationsvorgängen mit dem Dps Protein, dann wären ähnliche Beobachtungen auch bei den Zellen aus dem Batch-Ansatz zu erwarten, da sich auch diese in einer Nährstoffmangelsituation befinden. Andererseits scheint die Kristallisation der DNA hauptsächlich von der extrazellulären Mg^{2+} Konzentration abzuhängen, die im Reaktor aufgrund der mit der kontinuierlichen Medienzufuhr in Zusammenhang stehenden höheren metabolischen Aktivität der Bakterien und deren hoher Zelldichte geringer gewesen sein könnte als im Batch Ansatz.

In der Natur werden Bakterien mit sehr geringem oder nicht nachweisbarem DNA-Gehalt als Geisterzellen (ghosts) beschrieben, die kein mit einem DNA-Farbstoff anfärbares Kernäquivalent besitzen und scheinbar auch nicht in der Lage sind, erneut Wachstumstätigkeiten aufzunehmen (Zweifel und Hagström 1995). Sie werden einerseits als Zellreste angesehen, die nach der Lyse aufgrund einer Virusinfektion oder nach einem Fraßvorgang durch Protozoen zurück bleiben und in marinen Habitaten bis zu 80 % der Bakterienvolkpopulation ausmachen können (Karner und Fuhrman 1997; Zweifel und Hagström 1995). Andererseits konnte in marinen Sedimenten nach einer Substrataktivierung auch eine Erhöhung des Anteils an Kernäquivalent-tragenden Zellen nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass Zellen ohne erkennbares Kernäquivalent reaktiviert werden können (Luna et al. 2002). Auch von *E. coli* sind Geisterzellen (ghosts) bekannt, die aus der Expression des aus ϕ X174 klonierten Phagengens *E* resultieren und als Kandidaten zur Herstellung eines inaktivierten Impfstoffs weiter untersucht werden (Haidinger et al. 2003). Diese Zellhüllenfragmente sollten allerdings im Phasenkontrastbild einen hellen Zellinnenraum aufweisen, da sie kein Zytoplasma mehr beinhalten. Die *E. coli* Zellen mit einem geringen DNA-Gehalt aus dem Reaktor wiesen im Phasenkontrast dagegen einen

dunklen Zellinnenraum auf, was auf das Vorhandensein von Zytoplasma schließen lässt. Demnach sind diese Zellen aus dem MBR nicht als Geisterzellen zu bezeichnen.

Als Zellen mit geringem DNA-Gehalt, sog. „dims“ wurden marine und limnische Bakterien bezeichnet, die nach DAPI Färbung nur eine geringe Fluoreszenz aufzeigten, die einer DNA-Konzentration von circa $0,5 \text{ fg Zelle}^{-1}$ bzw. einem Drittel der Intensität der Zellen mit einem Chromosom entsprach. In den Histogrammen der Durchflusszytometer stellten sie eine separate Wolke dar (Button und Robertson 2001). Es wurde angenommen, dass es sich bei diesen Zellen um Geisterzellen ohne Zytoplasma handelt, die einen Großteil der bakterienähnlichen Partikel im Meer ausmachen können (Heissenberger et al. 1996). Diese Zellen mit geringem DNA-Gehalt können aus hungernden Zellen hervorgehen, kommen aber auch in aktiveren Systemen wie warmen Oberflächengewässern vor. Der geringe DNA-Gehalt wurde zum Teil auf einen stressbedingten DNA-Abbau zurückgeführt (Weichart et al. 1997; Wiacek et al. 2006).

Da in natürlichen Habitaten Nährstofflimitierung oft mit anderen Stressoren wie osmotischem oder pH Stress einhergeht, die eine Schädigung der DNA hervorrufen können, ist davon auszugehen, dass das meist nur in Einzahl vorhandene Bakterienchromosom während des Nicht-Wachstums durch mindestens einen der oben genannten molekularen Mechanismen geschützt wird und dieser eventuell die Anfärbbarkeit der DNA mit DAPI beeinflusst und zu den Zellen mit einem geringen DNA-Gehalt (low DNA cells) im Reaktor führte. Zumal schnell wachsende Zellen im Gegensatz zu langsam oder nicht-wachsenden Bakterien meist eine Vielzahl von Chromosomen besitzen und die Möglichkeit haben, den dort auftretenden Schädigungen der DNA mit homologen Rekombinationen effektiv zu begegnen (Frenkiel-Krispin et al. 2001).

4.4.7 Zellmorphologie

Die für hungernde Zellen beschriebene Ausbildung von kokkoiden Zell-Morphotypen, die zum Teil aus Reduktionsteilungen bei Eintritt in die stationäre Phase und einer Hungerinduzierten kontinuierlichen Verringerung des Zellvolumens hervorgehen (Morita 1997; Nyström 2004), konnte in dieser Arbeit weder für die Zellen aus dem MBR noch aus dem Batch-Ansatz beobachtet werden. Dabei ist eine Reduktion des Zellvolumens von beispielsweise $5,94 \mu\text{m}^3$ auf $0,05 \mu\text{m}^3$ bei *Vibrio* und von $2 \mu\text{m}^3$ auf $0,1 \mu\text{m}^3$ für *Pseudomonas sp.* S9 nach einer 24stündigen Hungerphase beschrieben (Kjelleberg et al. 1993). Bei den Zellen in dieser Arbeit kam es im Gegenteil nur zu leichten Schwankungen der Zelllänge und des Zellvolumens, wobei die Werte vom 24. Tag in beiden Kultivierungen recht hoch lagen und daher eventuell mit Messungenauigkeiten erklärt werden können. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wurde in der Literatur auch für den Laborstamm *E. coli*

K12 unter Hungerbedingungen keine Reduktion der äußeren Zelldimensionen beobachtet, sondern lediglich ein Schrumpfen der Cytoplasmamembran bei gleichzeitiger Verkleinerung des Protoplasten, was zu einer Vergrößerung des periplasmatischen Raumes führte (Reeve et al. 1984).

Unter Nährstofflimitierung in autoklaviertem und sterilfiltriertem Seewasser zeigte *E. coli* ML30 eine signifikante Reduktion der Zellgröße nur während einer Inkubation bei 37 °C. Bei einer Inkubation bei 4 °C war dies nicht der Fall und auch die Kultivierbarkeit nahm im Gegensatz zu der Kultivierung bei 37 °C sehr langsam ab (Özkanca und Flint 1997). Obwohl teilweise statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Werten der Zelldimensionen bei den Zellen aus dem MBR und dem Batch-Ansatz dieser Arbeit zu verzeichnen waren, ist dies nicht mit einer biologisch relevanten Änderung der Zelldimension (in der Größenordnung von ein bis zwei Zehnerpotenzen wie oben beschrieben) gleichzusetzen.

4.4.8 Fraßversuche

Die Aufnahme von partikulärer Nahrung erfolgt bei Einzellern mit Hilfe der Phagocytose. Dabei sind Protozoen in der Lage zwischen verschiedenen Arten von Nahrungspartikeln zu unterscheiden, können aber normalerweise nicht erkennen, ob es sich um verdauliche oder unverdauliche Nahrung handelt. Bisher ist noch nicht geklärt, welche Faktoren die Phagocytose auslösen, es konnte aber nachgewiesen werden, dass die chemischen und physikalischen Oberflächeneigenschaften der Beute dabei von Bedeutung sind. Diese Oberflächeneigenschaften werden sehr wahrscheinlich von Rezeptoren auf der Oberfläche der Protozoen erkannt. Die Phagocytose beginnt mit der Invagination der Plasmamembran, die den Nahrungspartikel umgibt und sich nach innen zu einer Nahrungsvakuole abschnürt. Im Laufe der Verdauung sinkt der pH in der Nahrungsvakuole, Vesikel mit Verdauungsenzymen (Lysosomen) fusionieren mit ihr und geben ihren Inhalt an sie ab. Für den Einzeller brauchbare Substanzen werden aus der Nahrungsvakuole in die Zelle transportiert und unverdauliches Material durch eine Defäkation (Exocytose) an der Cytophyge aus der Zelle ausgeschleust (Hausmann et al. 2003; Radek und Hausmann 1996). Diese Verdauungsvorgänge dauern bei *Tetrahymena* ungefähr 2 Stunden (Nilsson 1979). Daher wurden für die Fraßversuche zur Untersuchung der Verwertbarkeit anhand von Verdauungsstadien der Bakterien in den Nahrungsvakuolen jeweils 45, 90, 120 und 150 Minuten nach Beginn der Fütterung Aliquote der Einzellersuspension fixiert und mittels des Transmissionselektronenmikroskops ausgewertet. Es zeigte sich, dass die Bakterien aus allen 3 Kultivierungsansätzen (MBR, Batch-Ansatz, Übernachtskultur) von den Protozoen aufgenommen und verdaut wurden. Allerdings waren pro Nahrungsvakuole in den Einzellern eher weniger *E. coli* Zellen aus dem MBR zu finden (1 – 2 Zellen je Vakuole)

als aus den anderen beiden Kultivierungsansätzen (bis zu 17 Zellen je Vakuole). Insgesamt konnte ein tendenziell langsamerer Abbau der Zellwand bei den Zellen aus dem Batch-Ansatz und dem MBR als aus der Übernachtskultur durch die Protozoen beobachtet werden. Für eine eindeutige Beurteilung dieser Phänomene bedarf es allerdings weiterer Experimente.

Zur Untersuchung der Verwertbarkeit der Bakterien aus den unterschiedlichen Kultivierungsansätzen wurde das Wachstum der Protozoen anhand ihrer Zellkonzentration vor und nach einer Inkubationszeit von 24 h bestimmt. Da die Negativkontrollen sowohl kein Wachstum der inaktivierten *E. coli* Zellen als auch kein Wachstum der ohne *E. coli* inkubierten *T. thermophila* zeigten, ist davon auszugehen, dass das beobachtete Wachstum der Protozoen in den anderen Proben allein auf den zu Beginn vorhandenen inaktivierten Bakterienzellen beruhte. Die Zellkonzentration der Protozoen war nach der Inkubationszeit bei den Inokula, die mit den *E. coli* Zellen aus dem Batch-Ansatz und aus der Übernachtskultur angesetzt wurden, doppelt so hoch als bei denen mit den Reaktor-Zellen. Dies bedeutet, dass die *T. thermophila* auf den Zellen aus dem MBR nur halb so gut wachsen konnten, wie auf den Zellen aus der Batch-Kultur bzw. aus der Übernachtskultur.

Zusammenfassend scheinen die *E. coli* Zellen im Erhaltungsstoffwechsel aus dem MBR in geringerer Zahl von den Protozoen aufgenommen zu werden und auch nur ein halb so gutes Wachstum der Einzeller zu ermöglichen. Ähnliche Ergebnisse lieferten Studien an marinen Flagellaten, die mit hungernden und wachsenden Bakterien inkubiert wurden (González et al. 1993). Dort zeigten die Protozoen bei hungernden Bakterien eine verminderte Aufnahmerate, einen verlangsamten Vakuolenaufbau und längere Verdauungszeiten als bei wachsenden Bakterien. Andererseits konnte für die nicht-wachsenden Bakterienzellen ein sehr viel effizienterer Transport der Biomasse in höhere trophische Ebenen nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen wurden mit dem verminderten Zellvolumen bei gleichzeitig höherem N und C Gehalt der hungernden Bakterien in Verbindung gebracht, da schon von mehreren Autoren höhere Fraßraten bei größeren Beuteorganismen beschreiben wurden (González et al. 1990). Insgesamt schienen die hungernden marinen Bakterien langsamer aufgenommen und verdaut zu werden, wobei es aber im Gegensatz zu den wachsenden Zellen zu einer vollständigen Digestion kam.

Ob das schlechtere Wachstum der *T. thermophila* in dieser Arbeit auf der verminderten Aufnahme oder der schlechteren Verwertbarkeit der *E. coli* Zellen beruht, bleibt zu untersuchen. Eine Größenabhängigkeit scheint hier aufgrund der gleichbleibenden Zellvolumina der *E. coli* Zellen keine Rolle zu spielen. Zumindest scheint die längerfristige Nährstofflimitierung bei den *E. coli* Zellen der Batch-Kultur und des MBR eine

verdauungsresistentere Zellwand zu bedingen als bei den *E. coli* Zellen aus der Übernachtskultur. Ähnliches wurde bei mit Erythromycin behandelten *Staphylococcus aureus* Zellen beschrieben, deren durch das Antibiotikum verdickte Zellwände eine verlangsamte Digestion in den Paramecien bewirkten (Mehlis et al. 1990).

Das geringere Wachstum der Protozoen auf den nicht-wachsenden *E. coli* Zellen aus dem MBR und die scheinbar schlechtere Verwertbarkeit dieser Bakterien liefert einen möglichen Erklärungsansatz für die beobachtete Abnahme der Protozoen in einem mit Abwasser betriebenen MBR (Witzig et al. 2002).

4.4.9 Proteinexpression

4.4.9.1 2D-Gelelektrophorese

Obwohl die 2D-Gelelektrophorese-Technik ein globales Bild der Proteinexpression einer Zelle unter verschiedenen Umweltbedingungen erlaubt, werden doch nur maximal 50 % der gesamten exprimierten Proteine mit dieser Methode detektiert (Wick et al. 2001). Es ist daher eher unwahrscheinlich, dass alle Proteine eines Regulons oder Signalwegs sichtbar werden. Die detektierten Unterschiede in der Proteinexpression können also als Hinweise auf hoch- bzw. herunterregulierte Regulons angesehen werden und unterschätzen die realen Unterschiede womöglich bei weitem.

Änderungen der Gen- und Proteinexpression von substratlimitierten Bakterien wurden bisher zum einen an Zellen festgestellt, die sich im Übergang zur stationären Phase befanden. Diese Zellen stellen aufgrund der aufgebrauchten Nährstoffe ihr Wachstum ein und befinden sich in einem Hungerzustand, da sie kein weiteres Substrat erhalten. Bei der Anpassung der Bakterien an diese Bedingungen spielt die RpoS-Untereinheit (σ^S) der RNA Polymerase eine entscheidende Rolle, da sie auf über 140 Gene Einfluss nimmt, die für die Überlebensfähigkeit der Zellen während der stationären Phase und unter anderen Stressbedingungen mit verantwortlich sind (Typas et al. 2007; Weber et al. 2005). So reguliert die RpoS-Untereinheit Gene, die eine Zelle gegen oxidativen Stress schützen, z. B. die Gene der Superoxid-Dismutase (*sodC*) und Katalase (*katE* und *katG*). RpoS reguliert weiterhin die Expression von DNA-Reparatur-Enzymen und dem nicht spezifischen DNA-bindenden Protein Dps. Das RpoS Protein ist ebenso verantwortlich für die Expression der Säureresistenzgene *gadA* und *gadB* sowie für weitere Zellantworten auf osmotischen Stress oder Temperaturänderungen und für Gene, die für die Zellmorphologie verantwortlich sind (*bolA*) (Loewen et al. 1998). Später identifizierte RpoS-abhängige Gene sind unter anderem in die Aufnahme und den Metabolismus von Aminosäuren, Zuckern und Eisen involviert (Lacour und Landini 2004).

Veränderungen der Proteinmuster von substratlimitierten *E. coli* K12 MG1655 Zellen wurden zum anderen auch bei Bakterien festgestellt, die mit einer suboptimalen Wachstumsrate in einem kontinuierlichen System kultiviert wurden. Dabei zeigten die substratlimitierten Bakterien, die aus einem nicht Glucose-limitierten Batch-Ansatz in ein Glucose-limitiertes kontinuierliches System verbracht wurden und dort eine Wachstumsrate von $0,3 \text{ h}^{-1}$ aufwiesen, eine zeitnahe sowie eine längerfristige physiologische Anpassung. Die zeitnahe Anpassung bezog sich auf die Hochregulierung von 12 Proteinen, die vor allem für eine Chemotaxis und den Transport verschiedener Zucker bekannt sind. Nur zwei der stärker exprimierten Proteine, MalE und MglB, wurde als Teil eines Glucose-Aufnahmesystems nach einer längerfristigen Kultivierung von 500 h identifiziert (Wick et al. 2001). In einer weiteren Studie konnten bei langsam wachsenden *E. coli* K12 W3110 Zellen in einem Fed-Batch-Ansatz 49 Proteine identifiziert werden, deren Expression sich um mehr als den Faktor zwei von exponentiell wachsenden Zellen unterschieden. Dabei konnten während der substratlimitierten Fed-Batch-Phase eine erhöhte Expression von Proteinen nachgewiesen werden, die zum einen bei der Glucoseaufnahme eine Rolle spielen aber auch von Proteinen, die für den Transport und den Abbau von alternativen Kohlenstoffquellen notwendig sind (Raman et al. 2005).

Neben den vielfältigen, in der Literatur beschriebenen Untersuchungen der Proteinmuster von hungernden Bakterien in einem Batch-Ansatz (RpoS-abhängige stationäre Phase Antwort) und von langsam wachsenden Bakterien in kontinuierlichen Systemen, ist das Proteom von substratlimitierten, nicht-wachsenden Zellen, die mittels eines MBR kontinuierlich mit limitierenden Substratkonzentrationen versorgt werden, bisher noch nicht analysiert worden. Zur Untersuchung der Protein-Expressionsmuster solcher Zellen wurden daher Proben aus dem MBR vom 3., 35. und 63. Tag mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt. Wie zu erwarten, sind deutliche Unterschiede zwischen den wachsenden Zellen am 3. Tag und den über lange Zeit nicht mehr wachsenden Zellen am 63. Tag festzustellen (77 zusätzliche Proteine am 3. Tag im Vergleich zum 63. Tag und 69 zusätzliche Proteine am 63. Tag im Vergleich zum 3. Tag). Die Unterschiede zwischen den zeitlich näher beieinander liegenden Proben fallen dagegen geringer aus. So weisen die Zellen zum Ende der Wachstumsphase im MBR 30 zusätzlich exprimierte Proteine im Vergleich zu den wachsenden Zellen am 3. Fermentationstag auf. Dies entspricht in etwa den Ergebnissen der oben genannten Studie, in der langsam wachsende Bakterien 49 Proteine zeigten, deren Expressionsintensität um mehr als den Faktor zwei vom Proteinmuster exponentiell wachsender Zellen abwichen (Raman et al. 2005). Weiterhin zeigte das Expressionsmuster der Zellen aus dem Langzeit-Erhaltungsstoffwechsel nach 63 Tagen immerhin 54 neu exprimierte Proteine im Gegensatz zum Beginn dieser Phase am

35. Tag. Dies deutet darauf hin, dass sich ein längerfristiger Zustand des geringen oder Null-Wachstums in der Proteinexpression von einer kurzzeitiger stationären Phase grundlegend unterscheidet.

4.4.9.2 MALDI-TOF MS

Zur Analyse des Fingerprint-Proteinmusters (m/z 2.000 – 20.000) der *E. coli* Zellen aus dem MBR und dem Batch-Ansatz wurden Proben mit der sogenannten Intakt-Zellen-Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight Massenspektrometrie untersucht. Mit dieser Methode werden vornehmlich basische und in hohen Konzentrationen vorliegende Proteine in einem Spektrum erfasst (Pineda et al. 2003). Einzelne Proteine konnten aufgrund ihres Molekulargewichtes Einträgen der Swiss-Prot und TrEMBL Datenbank (www.expasy.org) mittels des TagIdent tools zugeordnet werden. Ausgewertet wurden Proben der Zellen aus dem MBR (6., 31., 50. und 62. Tag) sowie dem Batch-Ansatz (5., 30., 51. und 61. Tag).

Reaktor

Die Expression der ribosomalen Proteine lässt sich im *E. coli* Fingerprint grundsätzlich gut erkennen, da diese Proteine typischerweise bis zu 20 % der Proteingehalts einer Zelle ausmachen (Arnold und Reilly 1999; Neidhardt et al. 1996; Pineda et al. 2003). Diese ribosomalen Proteine unterlagen in den Zellen aus dem MBR keinen größeren Schwankungen, was auch mit dem relativ konstant hohen Anteil an hybridisierbaren Zellen mittels der FISH Methode korreliert. Genauso schienen die histonartigen, DNA-bindenden Proteine HU- α und HU- β über den Probenahmezeitraum konstant exprimiert zu werden. Diese können die DNA zur Stabilisierung verpacken und verhindern damit eine Denaturierung unter extremen Umweltbedingungen (Pettijohn 1988; Swinger und Rice 2004). Ebenfalls über den Versuchszeitraum konstant exprimiert wurden die periplasmatischen Chaperone HdeA und HdeB, die zur Säureresistenz von *E. coli* Zellen beitragen (Gajiwala und Burley 2000; Kern et al. 2007). Diese Säurestress-Chaperone verhindern die säureinduzierte Aggregation von Proteinen im periplasmatischen Raum der Bakterien und sind so vor allem im primären Habitat der *E. coli* Zellen, dem Gastrointestinaltrakt von Warmblütern, von Bedeutung.

Der Peak m/z 5098 nimmt mit Erreichen der Phase des Erhaltungsstoffwechsels ab dem 31. Tag stark zu. Dieser Peak stellt das ribosomale und stationärphase-induzierte Protein SRA (Protein D) dar, das ausschließlich in der 30S Untereinheit der Ribosomen vorkommt (Izutsu et al. 2001). Es scheint teilweise vom Sigma Faktor σ^S reguliert zu werden und spielt vermutlich eine Rolle beim Überleben der Bakterien unter ungünstigen Umweltbe-

dingungen (Izutsu et al. 2001). Da die erste Probe am 6. Tag genommen wurde und dort schon lineares Wachstum zu verzeichnen war, beziehen sich die Ergebnisse der MALDI-TOF MS Analyse nur auf die linear-wachsenden bzw. nicht mehr wachsenden Zellen im MBR. Auffallend ist der ausschließlich in den Zellen des MBR vorkommende Peak bei m/z 3425, der ab dem 50. Tag erscheint und bis zum 62. Tag weiter zunimmt. Ob der Peak mit dem Auftreten der VBNC Stadien oder der Zellen mit geringem DNA-Gehalt korreliert, muss in weiteren Experimenten, z. B. mit einer Sortierung der Zellen im Durchflusszytometer und anschließender MALDI-TOF MS Analyse ermittelt werden.

Batch

Bei den Zellen aus dem Batch-Ansatz ist vor allem der Peak bei m/z 3095 auffällig, der bei den Bakterien aus dem MBR nicht auftritt, kontinuierlich zunimmt und am 51. sowie 61. Tag den Peak mit der höchsten Intensität ausmacht. Leider konnte diesem genau wie dem kontinuierlich abnehmenden Peak bei m/z 5754 kein Protein aus der SwissProt und TrEMBL Datenbank zugeordnet werden. Wie bei den Bakterien aus dem MBR konnten auch bei den Zellen des Batch-Ansatzes einige Peaks ribosomalen Proteinen (Arnold und Reilly 1999) sowie den periplasmatischen Chaperonen HdeA und HdeB (Gajiwala und Burley 2000; Kern et al. 2007) zugeordnet werden, die in ihren Expressionsintensitäten ebenfalls keine großen Schwankungen zeigten.

Eine eindeutige Identifizierung der Substanzen ist über diese Vorgehensweise allerdings nicht gegeben, vielmehr bedarf es der Anwendung weiterer Methoden der Proteinbiochemie (wie z. B. chromatographische Auftrennung der einzelnen Proteine mit anschließendem tryptischen Verdau und MALDI-TOF MS-Analyse der Fragmente zur Bestimmung des Proteins). Für diejenigen Proteine, die in der Datenbank nicht zuordenbar waren, bestehen mehrere Möglichkeiten: zum einen kann es sich dabei um Eiweiße handeln, die von dem der Datenbank zugrunde liegenden sequenzierten *E. coli* K12 nicht exprimiert werden. Zum anderen können posttranslationale Modifikationen der Proteine wie z. B. Phosphorylierung, Methylierung, Carboxylierung oder Glycosylierung zu einer Erhöhung bzw. eine Abspaltung von Signalpeptiden zu einer Verminderung des Molekulargewichtes führen (Arnold und Reilly 1999).

Zusammenfassend zeigen die beiden Spektren der Zellen aus dem MBR und dem Batch-Ansatz sowohl Gemeinsamkeiten als auch einige Unterschiede, was auf zwei verschiedene physiologische Zustände der Zellen in den beiden Kultivierungsansätzen weist.

4.5 Zusammenfassung der Diskussion

Heterotrophe Bakterien sind in der Lage, sich an oligotrophe Bedingungen in der Natur sowie in technischen Systemen anzupassen. Ziel dieser Arbeit war es, Kultivierungssysteme (Membranbioreaktoren, MBR) zu etablieren, die es ermöglichen, Bakterien unter nährstofflimitierenden Bedingungen in einem nicht-wachsenden Zustand zu untersuchen. Darüber hinaus sollten die Auswirkungen dieses Zustandes auf das Ökosystem analysiert werden, indem die Aktivitäten der Bakterien und die Verwertbarkeit derselben für Fraßfeinde näher beleuchtet wurden.

MBR-Systeme, in denen marine Mikroorganismen angereichert wurden, zeigten bei einem sehr geringen DOC Wert von circa 2 mg l^{-1} im Zulauf und damit einer DOC-Raumbelastung von $0,3 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ weder die unter Einbeziehung der Probenvolumina rechnerisch zu erwartende Akkumulation von Bakterien, noch eine Abnahme der Protozoen, wie sie für mit kommunalem Abwasser betriebene MBR beschrieben wurden (Rosenberger et al. 2002; Witzig et al. 2002). Ein Fraßdruck der eukaryotischen Einzeller auf die Bakterien steht dem Nicht-Wachstum der Prokaryoten entgegen, da dieser theoretisch erneutes Wachstum der Bakterien zur Folge hat, indem sich unter anderem durch den Fraßvorgang und die Ausscheidung der unverdaulichen Anteile der Nährstoffgehalt in der Kulturbrühe ändert. Auch der Einsatz von eukaryotischen Zellgiften wie Cycloheximid und Colchicin konnte die Protozoen nicht längerfristig inaktivieren. Da die mit kommunalem Abwasser betriebenen MBR mit circa $4,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ eine um eine Größenordnung höhere DOC-Raumbelastung als die mit Meerwasser betriebenen MBR aufweisen (Koppe und Stozek 1999; Rosenberger et al. 2000) und die Protozoen in einem mit kommunalem Abwasser betriebenen MBR verschwanden, wurde die Physiologie von nicht bzw. langsam wachsenden Bakterien im Erhaltungsstoffwechsel untersucht, die kontinuierlich mit einer ebenfalls hohen DOC-Raumbelastung von $20 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ betrieben wurden.

Zur Analyse verschiedener Zellaktivitäten, des DNA-Gehalts sowie der Proteinexpression von Zellen im Erhaltungsstoffwechsel wurde ein MBR-System etabliert, in dem eine Reinkultur des Umweltisolates *E. coli* A3 im Verlauf einer Langzeitkultivierung unter limitierenden Bedingungen eingehend charakterisiert werden konnte. Parallel durchgeführte Batch-Experimente erlaubten einen Vergleich der physiologischen Zustände der Bakterien im MBR-System (Erhaltungsstoffwechsel) und Batch-System (Langzeit-Hungerzustand).

Das in den MBR Fermentationen eingesetzte Umweltisolat *E. coli* A3 zeichnete sich durch sein hohes Überlebenspotential aus, da es in der Lage war, sich an limitierte Substratverfügbarkeit in der Umwelt sowie in einem Batch-Ansatz anzupassen, wie dies auch schon für andere z. T. pathogene Stämme beschrieben wurde (Lisle et al. 1998).

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf keine gravierenden Wachstumsprozesse im MBR hin, nachdem die maximale Zellzahl im Anschluss an eine vierwöchige Wachstumsphase erreicht worden war. Ein relativ geringer Gehalt an vermeintlich toten Zellen, ein geringer Anteil von mikroskopisch detektierbaren Teilungsstadien und relativ distinkte C2 und C4 DNA-Verteilungen sowie eine gleichbleibende Biomassekonzentration und das Fehlen von mikroskopisch sichtbaren Lyseprodukten deuten auf ein sehr langsames bzw. auf ein Nicht-Wachstum der Zellen im MBR hin.

Die einzelnen Methoden zur Aktivitätsbestimmung der Bakterien im MBR ergaben recht unterschiedliche Ergebnisse, was auf eine starke Heterogenität der Population schließen lässt. Zusätzlich kam es im Laufe der Versuchsdauer zu Änderungen der Subpopulationen. Insgesamt nahmen die Anteile der potentiell teilungsfähigen (DVC) und real kultivierbaren Zellen (KBE) sowie der hybridisierbaren (FISH) und metabolisch aktiven Bakterien (CTC) über den Versuchszeitraum ab, wohingegen der Anteil der vermeintlich lebensfähigen Zellen (BacLight lebend) nur schwach sank. Demgegenüber stieg der Anteil der lebensfähigen aber nicht kultivierbaren Zellen (VBNC) bis auf 60 % an und auch die Fraktion der Zellen mit einem geringen DNA-Gehalt nahm bis auf 45 % zu (Abb. 61).

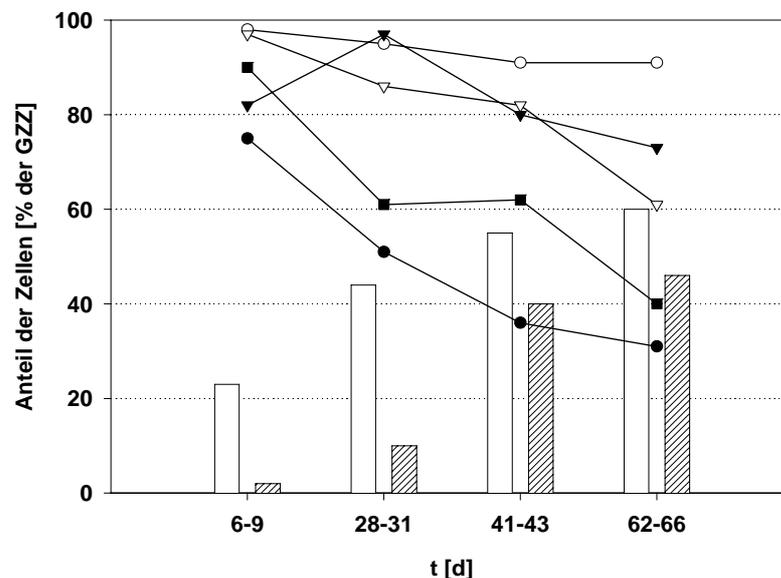


Abb. 61: Zusammenfassung der Populationsanteile im MBR mit unterschiedlicher Zell-Aktivität, Symbole: (○) BacLight lebend, (●) KBE, (■) DVC, (▼) CTC, (▽) FISH, heller Balken: Anteil der VBNC Zellen, schraffierter Balken: Anteil der Zellen mit geringem DNA-Gehalt (Zusammenfassung der Ergebnisse)

Obwohl die Bakterien im MBR und im Batch-Ansatz einige Gemeinsamkeiten wie einen relativ hohen Anteil von vermeintlich lebenden und hybridisierbaren Zellen aufwiesen, gab es doch grundlegende Unterschiede, die auf einen anderen physiologischen Zustand der Zellen im MBR hinweisen (Abb. 62). So war im Vergleich zum MBR nur noch gut die Hälfte

te des Anteils an Zellen im Batch-Ansatz metabolisch aktiv, wohingegen im Batch-Ansatz der Anteil der kultivierbaren Zellen am Ende des Experimentes um knapp ein Drittel höher lag als im MBR. Auch zeigten die Bakterien aus den MBR eine Population mit reduziertem DNA-Gehalt, die im Batch-Ansatz nicht beobachtet werden konnte.

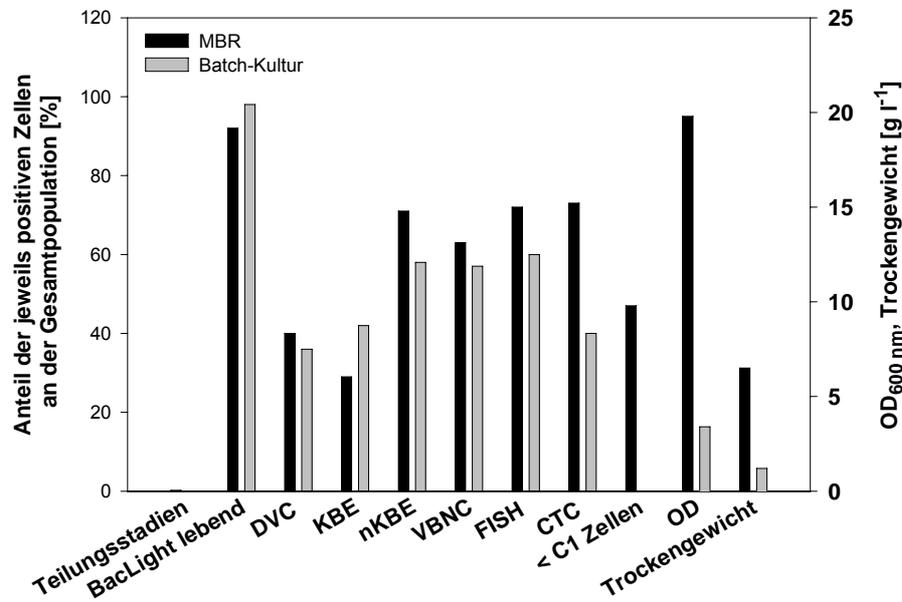


Abb. 62: Gegenüberstellung der unterschiedlichen Subpopulationen und aktiven Zellfraktionen im MBR und Batch-Ansatz nach 58 – 63 Tagen Kultivierungsdauer

Die Verwertbarkeit der Bakterien aus dem MBR für den Einzeller *T. thermophila* war vermindert, da sie auf diesen Zellen nach 24 h weitaus geringere Populationsdichten erreichten als auf den Bakterien aus dem Batch-Ansatz oder der Übernachtskultur. Die Zellgröße der Bakterien aus dem MBR und dem Batch-Ansatz unterschied sich zu diesem Zeitpunkt zwar statistisch signifikant, allerdings nur um 0,2 µm, so dass eine unterschiedliche Größe der Beuteorganismen zur Erklärung der unterschiedlichen Verwertbarkeit unwahrscheinlich ist. Ein weiterer Hinweis auf eine veränderte Zellphysiologie von Bakterien im Langzeit-Erhaltungsstoffwechsel im MBR lieferten die Muster der exprimierten Proteine. Dort zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen wachsenden, kurzzeitig und langfristig sehr langsam bzw. nicht-wachsenden Zellen des MBR anhand der mittels der 2D-Gelelektrophorese visualisierten exprimierten Proteine. Der größte Unterschied ergab sich erwartungsgemäß beim Vergleich der wachsenden und der langfristig nicht mehr wachsenden Zellen, hier wurden insgesamt 146 Proteine unterschiedlich exprimiert. Aber auch zwischen den kurzzeitig und langfristig nicht mehr wachsenden Zellen zeigte sich eine Differenz von 73 verschieden exprimierten Proteinen. Und auch im MALDI-TOF MS Fingerprint waren neben einigen ribosomalen Proteinen, die sowohl in den Zellen aus dem

MBR als auch in denen des Batch-Ansatzes vorkamen, einige Peaks zu erkennen, die jeweils ausschließlich in den Zellen des MBR bzw. des Batch-Ansatzes auftraten.

5 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben einen ersten Einblick in die Physiologie von sehr langsam bzw. nicht-wachsenden Zellen in einem MBR gewährt. Das etablierte MBR-System bietet zudem eine Grundlage für die Untersuchung bakterieller Subpopulationen, die sich während Langzeitkultivierungen unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen ausbilden. Als nächster Schritt wäre es erforderlich, Zellen mit einem geringen DNA-Gehalt mit Hilfe eines Durchflusszytometers zu sortieren und auf ihre Lebensfähigkeit, ihre Kultivierbarkeit bzw. potentielle Teilungsfähigkeit (DVC) hin zu untersuchen, um festzustellen, ob ein geringer DNA-Gehalt mit einer hohen oder geringen Zellaktivität korreliert. Des Weiteren wären detaillierte Proteomik-Studien dieser Fraktion im Vergleich zu C2 bzw. C4 Zellen höchst interessant. Auch ließe der Nachweis von bestimmter Genaktivität mittels Real-time PCR, beispielsweise des *rpoS*-Gens Rückschlüsse auf die Genregulation der Bakterien im Erhaltungsstoffwechsel zu. Eingehende vergleichende Untersuchungen des Transkriptoms, Proteoms und Metaboloms von Zellen im Erhaltungsstoffwechsel unter verschiedenen Bedingungen können mit Hilfe dieser Technologie angeschlossen werden und zu einem umfassenderen Verständnis der Anpassungsstrategien von Bakterien an limitierende Nährstoffbedingungen führen. Die Untersuchung geeigneter Promotoren, die während des Erhaltungsstoffwechsels aktiv sind, wäre auch für biotechnologische Produktionsprozesse interessant, da mit einem MBR und gentechnisch veränderten *E. coli* in relativ hohen Zellkonzentrationen eine langfristige, kontinuierliche Produktion zu realisieren wäre. Zur genaueren Aufklärung der Gründe für die schlechtere Verwertbarkeit von nicht-wachsenden Bakterien für Protozoen sind weitere Experimente anzuschließen, in denen auch genauer auf eventuell veränderte Zellwandstrukturen der Bakterien mittels Transmissionselektronenmikroskopie eingegangen werden kann. Das in dieser Arbeit entwickelte mobile MBR-System bietet zudem die Möglichkeit, (marine) Mikroorganismen direkt aus ihrem Habitat anzureichern und zum Beispiel Fraßbeziehungen zwischen Protozoen und Bakterien unter quasi in situ Bedingungen zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

Heterotrophe Bakterien sind sowohl in natürlichen wie in technischen Systemen vielfach oligotrophen Bedingungen ausgesetzt, auf die sie speziesspezifisch mit unterschiedlichen Überlebensstrategien reagieren. Eine mögliche Reaktion auf nährstofflimitierende Bedingungen ist das Einstellen der Zellteilung, so dass die zur Verfügung stehenden Substrate hauptsächlich für den Erhalt der Zelle genutzt werden (Erhaltungsstoffwechsel). Unser derzeitiges Verständnis der Anpassungsstrategien entstammt zumeist Untersuchungen an relativ kurzzeitigen Kultivierungen in Batch- oder Chemostatkulturen. Diese eignen sich für die Analyse kurzfristiger Stressantworten und deren Regulation, spiegeln jedoch nicht die langfristig nährstofflimitierenden Bedingungen wider, denen Bakterien in ihren natürlichen Habitaten und artifiziellen Systemen wie in der Abwasserreinigung ausgesetzt sind. In dieser Arbeit wurden die verfahrenstechnischen Voraussetzungen zur langfristigen Untersuchung von substratlimitierten, nicht-wachsenden Bakterien im Erhaltungsstoffwechsel geschaffen und das Wachstumsverhalten einer Reinkultur eines *Escherichia coli* Umweltisolates erstmals unter diesen Bedingungen detailliert beschrieben und dem von langfristig hungernden Zellen in Batch-Kulturen gegenübergestellt. Dazu wurde ein Membranbioreaktorsystem (MBR) etabliert, das die langfristige Kultivierung der Bakterien bei kontinuierlicher Versorgung mit gering konzentrierten Nährstoffen unter vollständigem Bakterienrückhalt ermöglichte. Die Bakterienpopulation im MBR zeigte nach einer vierwöchigen Wachstumsphase eine gleich bleibende Biomassekonzentration von $1,1 \times 10^{10}$ Zellen ml^{-1} bzw. 6,6 g Trockengewicht l^{-1} während die Wachstumsphase der Batch-Kultur bereits nach wenigen Tagen bei einer um 90 % geringeren Zellzahl abgeschlossen war. Ein gleich bleibend geringer Anteil an toten Zellen (10 %), ein geringer Gehalt an mikroskopisch detektierbaren Teilungsstadien sowie distinkte C2 und C4 Verteilungen der DNA und das Fehlen von mikroskopisch sichtbaren Lyseprodukten deuten auf ein Nicht-Wachstum der Zellen im MBR ab der fünften Woche hin. Im weiteren Verlauf der zehnwöchigen Kultivierung wurde die Ausbildung von Subpopulationen der nicht-wachsenden Zellen mit unterschiedlicher Aktivität observiert, deren Anteile mit Hilfe verschiedenen (Fluoreszenz-) mikroskopischer Techniken wie DVC, CTC, BacLight, FISH auf Zellniveau ermittelt und dem Anteil der kultivierbaren Bakterien gegenübergestellt wurde. Während der Anteil vermeintlich lebender Zellen (BacLight) im MBR über den Versuchszeitraum bei 90 % annähernd konstant blieb, nahmen die Anteile potentiell teilungsfähiger Zellen (DVC), der hybridisierbaren Zellen (FISH) und der metabolisch aktiven Zellen (CTC) sowie der kultivierbaren Zellen (KBE) ab. Demgegenüber stieg der Anteil der lebensfähigen, aber nicht kultivierbaren Zellen (VBNC) bis auf 60 % an. Der Batch-Ansatz

zeigte einen im Vergleich zum MBR um gut 50 % verminderten Anteil an metabolisch aktiven Zellen (CTC), wohingegen der Anteil an kultivierbaren Zellen am Ende des Experimentes im Batch-Ansatz um gut ein Drittel höher war als im MBR. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde im MBR neben den auch im Batch-Ansatz auftretenden C2 und C4 Verteilungen der DNA, eine Subpopulation von Zellen (47 %) mit reduziertem DNA-Gehalt detektiert, die im Batch-Ansatz nicht auftrat. Weitere Hinweise auf eine veränderte Zellphysiologie der Bakterien im Langzeit-Erhaltungsstoffwechsel lieferte der Vergleich der mittels 2D-Gelelektrophorese bzw. mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie visualisierten Proteinmuster von wachsenden sowie kurzzeitig und langfristig nicht-wachsenden Zellen im MBR. Insgesamt wurden beim Vergleich von wachsenden und nicht-wachsenden Zellen circa 146 Proteine und beim Vergleich von kurzzeitig und langfristig nicht-wachsenden Zellen circa 73 Proteine unterschiedlich exprimiert. Weiterhin konnten MBR- bzw. Batch-spezifische Proteine im niedermolekularen Bereich mit MALDI-TOF MS nachgewiesen werden. Die in Fraßversuchen ermittelte Verwertbarkeit der Bakterien aus dem MBR für den bakterivoren Ciliaten *Tetrahymena thermophila* war im Gegensatz zur Verwertbarkeit von Bakterien aus dem Batch-Ansatz und aus einer Übernachtkultur zudem vermindert. Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass nicht-wachsende aber kontinuierlich mit geringen Substratkonzentrationen versorgte Bakterien im MBR komplexe Adaptionstrategien unter Ausbildung von heterogenen Populationen verfolgen, die sich von hungernen Zellen in Batch-Kulturen unterscheiden. Die in dieser Arbeit an Reinkulturen durchgeführten Untersuchungen verdeutlichen die Vielschichtigkeit der bakteriellen Anpassungsmöglichkeiten und bilden die Grundlage für weitere Untersuchungen und das Verständnis der Vorgänge in komplexen Systemen wie in technischen MBR-Anlagen zur Abwasserreinigung.

7 Summary

In many habitats as well as in technical systems heterotrophic bacteria face oligotrophic conditions to which they are able to respond in a species-specific manner. As one possible adaptation to nutrient limitation bacteria stop proliferating and start using substrates just for maintenance purposes. Our current knowledge of bacterial adaptation to nutrient-limiting conditions is mainly based on short-term experiments in batch cultures or chemostats. These systems are suitable to study short-termed stress-responses and their regulation, but do not reflect the long-term nutrient-limited conditions, which bacteria face in their natural habitats or in artificial systems like wastewater treatment MBRs. In this study, the procedural requirements for the long-termed examination of substrate-limited, non-growing bacteria displaying maintenance metabolism were established. A membrane bioreactor system (MBR) was set up, that allowed the cultivation of bacteria under continuous supply of low-concentrated nutrients and complete biomass retention over extended time periods. The growth characteristics of an environmental *Escherichia coli* A3 strain were for the first time investigated under these conditions over a period of 10 weeks and compared to long-term starving cells of the same strain in a batch system. After four weeks of growth, the biomass of the bacterial population in the membrane bioreactor remained constant at 1.1×10^{10} cells ml^{-1} and $6.6 \text{ g dry weight l}^{-1}$, while the growth period of the batch culture lasted for only a few days with a 90 % lower cell density. Dead cells comprised only a minor fraction of 10 % at most in the MBR population as indicated by the LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Kit. Only few dividing cells as well as no products of cell lysis were observed. Together with the observation of distinct C2 and C4 subpopulations examined by flow cytometry these findings point to very slow or even no growth of the bacteria in the MBR from the 5th week on. During the following six weeks subpopulations of non-growing cells displaying different cell activities were observed, which were monitored using different kinds of (fluorescence-) microscopy techniques such as DVC, CTC, BacLight, FISH and compared to the fraction of culturable cells (CFU). While the fraction of living cells (BacLight) remained constant at a high value of over 90 %, the fraction of cells potentially able to divide (DVC) and being culturable (CFU) as well as the fraction of cells showing metabolic activity (CTC) and the fraction of cells giving a positive signal after fluorescence in situ hybridisation (FISH) declined during the experiment. In contrast the fraction of viable but non-culturable cells (VBNC) increased up to 60 % during the continuous cultivation. Although bacteria in the MBR system and in batch culture showed similarities as a high fraction of living and hybridisable cells, some fundamental differences could be observed pointing to different physiological states of substrate-limited, non-growing cells in

Summary

the MBR system and starving cells in batch culture. Compared to the MBR only half of the bacteria in batch culture showed metabolic activity (CTC) whereas the fraction of cells forming colonies on agar plates (CFU) was one third higher than in the MBR system. Flow cytometric analyses revealed, beside the two subpopulations C2 and C4 emerging in both MBR and batch culture, a fraction of cells displaying a low DNA content of less than the DNA content of C1 cells. This fraction of < C1 cells was only apparent in MBR and increased to a proportion of 47 % at the end of the continuous culture period. Proteomic studies revealed additional arguments for different physiological states in growing and non-growing substrate-limited *E. coli* cells in MBR and starved *E. coli* cells from batch culture. 2D-gel electrophoresis showed a high number of 146 differentially expressed proteins when growing and long-term non-growing *E. coli* cells in the MBR were compared. But even between bacteria that just had passed into the non-growing state and cells being in that state for about 30 days 73 differentially expressed proteins were observable. Moreover different MBR- and batch-specific proteins in the low molecular range could be observed by means of MALDI-TOF MS. Grazing experiments with the protist *Tetrahymena thermophila* were performed to examine the quality of *E. coli* cells in different metabolic states as prey organisms. Growth of *T. thermophila* was reduced when fed with non-growing *E. coli* cells from the MBR compared to cells from batch culture or overnight culture. Generally the results of this work indicate that long-term non-growing cells in MBR provided with limiting amounts of nutrients display a different physiological mode than long-term starving cells in batch cultures. These findings illustrate the complexity of bacterial adaptations to nutrient limitation and create the basis for further investigations of more complex systems e. g. MBR-units for wastewater treatment.

8 Danksagung

Prof. Dr. Ulrich Szewzyk gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, die vielen wertvollen Anregungen, seine stete Diskussionsbereitschaft und das Interesse, dass er allen Ergebnissen und Problemen dieser Arbeit entgegenbrachte.

PD Dr. habil. Susann Müller danke ich für die Möglichkeit am UFZ Leipzig die durchflusszytometrischen Messungen dieser Arbeit durchzuführen zu können, für die sehr freundlichen, konstruktiv-kritischen Auseinandersetzungen mit dieser Arbeit sowie für die Bereitschaft als Gutachterin zur Verfügung zu stehen.

Prof. Dr. Klaus Hausmann und Dr. Renate Radek von der Freien Universität Berlin gilt mein Dank für die Möglichkeit, die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu erstellen. Frau Rosemarie Hahmann danke ich für die praktische Unterstützung bei der Probenaufbereitung für die TEM-Analysen. Bei Dr. Wilfried Pauli von der Freien Universität Berlin möchte ich mich für die Überlassung der *Tetrahymena thermophila* Kultur bedanken.

Dr. Rainer Cramm von der Humboldt Universität Berlin danke ich für die Möglichkeit, die 2D-Gelelektrophorese in der Arbeitsgruppe von Prof. Hecker an der Ernst Moritz Arndt Universität in Greifswald durchführen zu können.

Bei Dr. Gunnar Gerdts und Dr. Antje Wichels von der Biologischen Anstalt Helgoland (Alfred-Wegener Institut für Polar- und Meeresforschung, Helmholtz-Insitut) möchte ich mich für die Ermöglichung zweier Forschungsaufenthalte in ihrer Arbeitsgruppe bedanken.

Bei meinen Diplomanden und Studienarbeitern Daniel Stumpf, Nico Pastewski, Alexander Samai, Jonas Schmidt, Felix Brehmer, Birgit Lerahn, Johanna Bartling und Alain Steinmann möchte ich mich für ihren Einsatz, ihre sorgfältige Arbeitsweise und für die unterhaltsamen Zeiten in und außerhalb des Labors bedanken.

Allen Mitarbeitern der Fachgruppe Umweltmikrobiologie der Technischen Universität Berlin möchte ich für das angenehme Arbeitsklima, für die wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Diskussionen sowie für die vielfältigen Formen der Unterstützung danken.

Bei Dr. Anja Drews bedanke ich mich für die Möglichkeit auf ihre technische Ausstattung zurückgreifen zu können, für die fachlichen Diskussionen, die abwechslungsreiche Gestaltung der verfahrenstechnischen Kongresse und für ihre Anregungen zu dieser Arbeit.

Dr. Wolfgang Wenzel, Dr. Christiane Baschien, Dr. Anja Drews und Dipl.-Ing. Ute Bracklow danke ich für das Lesen bzw. Diskutieren der Arbeit und den daraus entstandenen Anregungen aus vielfältigen Sichtweisen.

Danksagung

Dr. Ralf Dieckmann möchte ich für die versierten Diskussion zu jedweder Tages- und Nachtzeit danken, für sein unermüdliches Korrekturlesen, für seinen Blick „für’s Wesentliche“, für’s Windeln wechseln, Wäsche waschen..., für seine unerschrockene Ehrlichkeit, dafür, dass wir dieselbe Welt teilen sowie für seine Geduld und sein Verständnis während der letzten Jahre.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die verlässliche Unterstützung in der letzten Zeit, allen meinen kleinen Sohn betreuenden Menschen, wie Oma Karin, Oma Inge, Monika, Christine und Tanja für ihre stete Hilfsbereitschaft und ihren liebevollen Umgang, der mir es ermöglicht hat auch weiterhin viel Zeit und Kraft in diese Arbeit zu investieren.

9 Literaturverzeichnis

Åkerlund, T., K. Nordstrom und R. Bernander (1995):

Analysis of cell size and DNA content in exponentially growing and stationary-phase batch cultures of *Escherichia coli*.

The Journal of Bacteriology **177**:6791-6797.

Ali Azam, T., A. Iwata, A. Nishimura, S. Ueda und A. Ishihama (1999):

Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid.

The Journal of Bacteriology **181**:6361-6370.

Amann, R. und M. Kuhl (1998):

In situ methods for assessment of microorganisms and their activities.

Current Opinion in Microbiology **1**:352-358.

Amann, R., W. Ludwig und K. H. Schleifer (1995):

Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation.

Microbiological Reviews **59**:143-169.

Amel, B. K.-N., B. Amine und B. Amina (2007):

Survival of *Vibrio fluvialis* in seawater under starvation conditions.

Microbiological Research **In Press, Corrected Proof**.

Andersen, J. B., C. Sternberg, L. K. Poulsen, S. P. Bjørn, M. Givskov und S. Molin (1998):

New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria.

Applied and Environmental Microbiology **64**:2240-2246.

Anderson, A. A., J. E. Whitlock und V. J. Harwood (2006):

Diversity and distribution of *Escherichia coli* genotypes and antibiotic resistant phenotypes in feces of humans, cattle and horses.

Applied and Environmental Microbiology **72**:6914-6922.

Arana, I., C. Seco, K. Epelde, A. Muela, A. Fernandez-Astorga und I. Barcina (2004):

Relationships between *Escherichia coli* cells and the surrounding medium during survival processes.

Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology **86**:189-199.

Arbige, M. und W. R. Chesbro (1982):

RelA and related loci are growth-rate determinants for *Escherichia coli* in a recycling fermenter.

Journal of General Microbiology **128**:693-703.

Arnold, R. J. und J. P. Reilly (1999):

Observation of *Escherichia coli* ribosomal proteins and their posttranslational modifications by mass spectrometry.

Analytical Biochemistry **269**:105-112.

Arnot, T. and J. Howell (2001):

Manipulation of cell physiology in membrane bioreactors, S. 44-55. MBR 3. Cranfield University, Cranfield.

Balaban, N. Q., J. Merrin, R. Chait, L. Kowalik und S. Leibler (2004):

Bacterial persistence as a phenotypic switch.
Science **305**:1622-1625.

Barer, M. R. und G. Bogosian (2004):

The viable but nonculturable concept, bacteria in urine samples, and Occam's razor.
Journal of Clinical Microbiology **42**:5434-5435.

Barer, M. R., L. T. Gribbon, A. S. Whiteley, R. Smith, A. Newton, and A. G. O'Donnell (1999):

Relationships between cellular activity and culturability *In* C. R. Bell, M. Brylinsky, and P. Johnson-Green (eds.), Microbial Biosystems: New Frontiers. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.

Barer, M. R. und C. Harwood (1999):

Bacterial viability and culturability.
Advances in Microbial Physiology **41**:93-137.

Barer, M. R., A. S. Kaprelyants, D. H. Weichart, C. R. Harwood und D. B. Kell (1998):

Microbial stress and culturability: conceptual and operational domains.
Microbiology-Uk **144**:2009-2010.

Bast, E. (1999):

Mikrobiologische Methoden. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.

Beardsley, C., J. Pernthaler, W. Wosniok und R. Amann (2003):

Are readily culturable bacteria in coastal north sea waters suppressed by selective grazing mortality?
Applied and Environmental Microbiology **69**:2624.

Beyeler, W., P. L. Rogers und A. Fiechter (1984):

A simple technique for the direct determination of maintenance energy coefficient: An example with *Zymomonas mobilis*.
Applied Microbiology and Biotechnology **19**:277-280.

Bhupathiraju, V. K., M. Hernandez, D. Landfear und L. Alvarez-Cohen (1999):

Application of a tetrazolium dye as an indicator of viability in anaerobic bacteria.
Journal of Microbiological Methods **37**:231-243.

Binder, M., S. Baumgarten, F.-W. Wolle, T. Buer, K. Meuser, J. Schunicht, and K. Voßenkaul (2003):

Abwasserreinigung mit Membrantechnik. Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen, Düsseldorf.

Bjergbaek, L. A. und P. Roslev (2005):

Formation of nonculturable *Escherichia coli* in drinking water.
Journal of Applied Microbiology **99**:1090-1098.

Blattner, F. R., G. Plunkett III, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, R. Mau und Y. Shao (1997):

The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12.
Science **277**:1453-1462.

Bloomfield, S. F., G. S. A. B. Stewart, C. E. R. Dodd, I. R. Booth und E. G. M. Power (1998):

The viable but non-culturable phenomenon explained?
Microbiology-Uk **144**:1-3.

Bogosian, G., P. J. L. Morris und J. P. O'Neil (1998):

A mixed culture recovery method indicates that enteric bacteria do not enter the viable but nonculturable state.
Applied and Environmental Microbiology **64**:1736-1742.

Bogosian, G. und E. V. Bourneuf (2001):

A matter of bacterial life and death.
EMBO reports **2**:770-774.

Bomo, A.-M., T. K. Stevik, I. Hovi und J. F. Hanssen (2004):

Bacterial removal and protozoan grazing in biological sand filters.
Journal of Environmental Quality **33**:1041-1047.

Bouillot, P., A. Canales, A. Pareilleux, A. Huyard und G. Goma (1990):

Membrane bioreactors for the evaluation of maintenance phenomena in wastewater treatment.
J. Ferment. Bioengin. **69**:178-183.

Bouvier, T. und P. A. del Giorgio (2003):

Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): a quantitative review of published reports.
FEMS Microbiology Ecology **44**:3-15.

Bremer, H. and P. P. Dennis (1996):

Modulation of chemical composition and other parameters of cell growth rate, S. 1527-1542. In F. C. Neidhardt, Curtis, Ingraham, Lin, Magasanik, Reznikoff, Riley, Schaechter, and Umberger (eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington D.C.

Bridges, B. A. (1997):

Hypermutation under stress.
Nature **387**:557-558.

Bruce, J. L. (1996):

Automated system rapidly identifies and characterizes microorganisms in food.
Food Technology **50**:77-81.

Bruce, J. L., R. J. Hubner, E. M. Cole, C. I. McDowell und J. A. Webster (1995):

Sets of EcoRI fragments containing ribosomal RNA sequences are conserved among different strains of *Listeria monocytogenes*.
Proceedings of the National Academy of Sciences **92**:5229-5233.

Burfeind, J. und K. Schügerl (1999):

Reaktiv-Membran-Extraktion von Ethanol.
Chemie Ingenieur Technik **71**:93-96.

Burton, G. A., D. Gunnison und G. R. Lanza (1987):

Survival of pathogenic bacteria in various fresh-water sediments.
Applied and Environmental Microbiology **53**:633-638.

Burzlauff, A. (1995):

Qualitative und quantitative Aspekte des Abbaus von humanpathogenen Bakterien durch Paramecien.
Dissertation, Freie Universität Berlin.

Button, D. K. und B. R. Robertson (2001):

Determination of DNA content of aquatic bacteria by flow cytometry.
Applied and Environmental Microbiology **67**:1636-1645.

Byappanahalli, M., M. Fowler, D. Shively und R. Whitman (2003):

Ubiquity and persistence of *Escherichia coli* in a midwestern coastal stream.
Applied and Environmental Microbiology **69**:4549-4555.

Cairns, J., J. Overbaugh und S. Miller (1988):

The origin of mutants.
Nature **335**:142-145.

Caro, A., P. Got und B. Baleux (1999):

Physiological changes of *Salmonella typhimurium* cells under osmotic and starvation conditions by image analysis.
FEMS Microbiology Letters **179**:265-273.

Carson, C. A., B. L. Shear, M. R. Ellersieck und A. Asfaw (2001):

Identification of fecal *Escherichia coli* from humans and animals by ribotyping.
Applied and Environmental Microbiology **67**:1503-1507.

Caruso, G., M. Mancuso und E. Crisafi (2003):

Combined fluorescent antibody assay and viability staining for the assessment of the physiological states of *Escherichia coli* in seawaters.
Journal of Applied Microbiology **95**:225-233.

Chaize, S. und A. Huyard (1991):

Membrane bioreactor on domestic waste-water treatment sludge production and modeling approach.
Water Science and Technology **23**:1591-1600.

Chen, G. H., H. K. Mo und Y. Liu (2002):

Utilization of a metabolic uncoupler 3,3',4',5-tetrachlorosalicylanilide (TCS) to reduce sludge growth in activated sludge culture.
Water Research **36**:2077-2083.

Chen, L. und J. D. Helmann (1995):

Bacillus subtilis mrgA is a Dps(PexB) homologue: evidence for metalloregulation of an oxidative-stress gene.

Molecular Microbiology **18**:295-300.

Chen, R. und T. LaPara (2006):

Aerobic biological treatment of low-strength synthetic wastewater in membrane-coupled bioreactors: the structure and function of bacterial enrichment cultures as the net growth rate approaches zero.

Microbial Ecology **51**:99-108.

Chesbro, W., M. Arbige und R. Eifert (1990):

When nutrient limitation places bacteria in the domains of slow growth - metabolic, morphological and cell-cycle behavior.

FEMS Microbiology Ecology **74**:103-119.

Chesbro, W., T. Evans und R. Eifert (1979):

Very slow growth of *Escherichia coli*.

Journal of Bacteriology **139**:625-638.

Cicek, N., J. Macomber, J. Davel, M. T. Suidan, J. Audic und P. Genestet (2001):

Effect of solids retention time on the performance and biological characteristics of a membrane bioreactor.

Water Science and Technology **43**:43-50.

Clark, D. J. und O. Maaloe (1967):

DNA replication and division cycle in *Escherichia coli*.

Journal of Molecular Biology **23**:99-112.

Coello Oviedo, M. D., J. A. Lopez-Ramirez, D. Sales und J. M. Quiroga (2003):

Evolution of an activated sludge system under starvation conditions.

Chemical Engineering Journal **94**:139-146.

Colwell, R. R. and D. J. Grimes (2000):

Nonculturable microorganisms in the environment. American Society for Microbiology, Washington.

Craig, D. L., H. J. Fallowfield und N. J. Cromar (2004):

Use of microcosms to determine persistence of *Escherichia coli* in recreational coastal water and sediment and validation with *in situ* measurements.

Journal of Applied Microbiology **96**:922-930.

Creach, V., A. C. Baudoux, G. Bertru und B. Le Rouzic (2003):

Direct estimate of active bacteria: CTC use and limitations.

Journal of Microbiological Methods **52**:19-28.

Cypionka, H. (1999):

Grundlagen der Mikrobiologie. Springer, Berlin.

Dai, Y., L. Li, D. C. Roser und S. R. Long (1999):

Detection and identification of low-mass peptides and proteins from solvent suspensions of *Escherichia coli* by high performance liquid chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry.

Rapid Communications in Mass Spectrometry **13**:73-78.

Davey, H. M. und D. B. Kell (1996):

Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: The importance of single-cell analyses.

Microbiological Reviews **60**:641-&.

Davey, H. M. und M. K. Winson (2003):

Using flow cytometry to quantify microbial heterogeneity.

Current Issues in Molecular Biology **5**:9-15.

Dawson, M. P., B. A. Humphrey und K. C. Marshall (1981):

Adhesion: a tactic in the survival strategy of a marine *Vibrio* during starvation.

Current Microbiology **6**:195-199.

del Giorgio, P. A. und J. J. Cole (1998):

Bacterial growth efficiency in natural aquatic systems.

Annual Review of Ecology and Systematics **29**:503-541.

del Giorgio, P. A. und G. Scarborough (1995):

Increase in the proportion of metabolically active bacteria along gradients of enrichment in freshwater marine plankton: implications for estimates of bacterial growth and production rates.

Journal of Plankton Research **17**:1905-1924.

Desnues, B., C. Cuny, G. Grégori, S. Dukan, H. Aguilaniu und T. Nyström (2003):

Differential oxidative damage and expression of stress defence regulons in culturable and non-culturable *Escherichia coli* cells.

EMBO reports **4**:400-404.

Diaper, J. P. und C. Edwards (1994):

The use of fluorogenic esters to detect viable bacteria by flowcytometry.

Journal of Applied Bacteriology **77**:221-228.

Díez, B., C. Pedrós-Alió, T. L. Marsh und R. Massana (2001):

Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques.

Applied and Environmental Microbiology **67**:2942-2951.

Dostálek, M. und M. Häggström (1982):

A filter fermenter - apparatus and control equipment.

Biotechnology and Bioengineering **24**:2077-2086.

Drews, A. und M. Kraume (2007):

On maintenance models in severely and long-term limited membrane bioreactor cultivations.

Biotechnology and Bioengineering **96**:892-903.

Drews, A. und M. Kraume (2005):

Process improvement by application of membrane bioreactors.
Chemical Engineering Research & Design **83**:276-284.

Dubnau, D. und R. Losick (2006):

Bistability in bacteria.
Molecular Microbiology **61**:564-572.

Duclaux, E. (1898):

Traité de Microbiology. Masson et Cie, Paris.

Egli, T. (1995):

The ecological and physiological significance of the growth of heterotrophic microorganisms with mixtures of substrates.
Adv. Microb. Ecol. **14**:305-386.

Ericsson, M., D. Hanstorp, P. Hagberg, J. Enger und T. Nyström (2000):

Sorting out bacterial viability with optical tweezers.
The Journal of Bacteriology **182**:5551.

Farewell, A., K. Kvint und T. Nyström (1998):

Negative regulation by *RpoS*: a case of sigma factor competition.
Molecular Microbiology **29**:1039-1051.

Ferenci, T. (1999b):

Regulation by nutrient limitation.
Current Opinion in Microbiology **2**:208-213.

Ferenci, T. (2003):

What is driving the acquisition of *mutS* and *rpoS* polymorphisms in *Escherichia coli*?
Trends in Microbiology **11**:457-461.

Ferenci, T. (2001):

Hungry bacteria - definition and properties of a nutritional state.
Environmental Microbiology **3**:605-611.

Ferenci, T. (1999a):

"Growth of bacterial cultures" 50 years on: towards an uncertainty principle instead of constants in bacterial growth kinetics.
Research in Microbiology **150**:431-438.

Ferenci, T. (2005):

Maintaining a healthy SPANC balance through regulatory and mutational adaptation.
Molecular Microbiology **57**:1-8.

Finkel, S. E. und R. Kolter (1999):

Evolution of microbial diversity during prolonged starvation.
Proc. Natl. Acad. Sci. **96**:4023-4027.

Franchini, A. G. (2006):

Physiology and fitness of *Escherichia coli* during growth in carbon-excess and carbon-limited environments.

Dissertation, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich.

Franchini, A. G. und T. Egli (2006):

Global gene expression in *Escherichia coli* K-12 during short-term and long-term adaptation to glucose-limited continuous culture conditions.

Microbiology **152**:2111-2127.

Freeman, C. und M. A. Lock (1995):

The biofilm polysaccharide matrix: a buffer against changing organic substrate supply?

Limnology and Oceanography **40**:273-278.

Frenkel-Krispin, D., S. Levin-Zaidman, E. Shimoni, S. G. Wolf, E. J. Wachtel, T. Arad, S. E. Finkel, R. Kolter und A. Minsky (2001):

Regulated phase transitions of bacterial chromatin: a non-enzymatic pathway for generic DNA protection.

The EMBO Journal **20**:1184-1191.

Fukui, M., Y. SUWA und Y. URUSHIGAWA (1996):

High survival efficiency and ribosomal RNA decaying pattern of *Desulfobacter latus*, a highly specific acetate-utilizing organism, during starvation.

FEMS Microbiology Ecology **19**:17-25.

Gajiwala, K. S. und S. K. Burley (2000):

HDEA, a periplasmic protein that supports acid resistance in pathogenic enteric bacteria.

Journal of Molecular Biology **295**:605-612.

Gant, V. A., G. Warnes, I. Phillips und G. F. Savidge (1993):

The application of flow cytometry to the study of bacterial responses to antibiotics.

Journal of Medical Microbiology **39**:147-154.

Garcia-Armisen, T. und P. Servais (2004):

Enumeration of viable *E. coli* in rivers and wastewaters by fluorescent in situ hybridization.

Journal of Microbiological Methods **58**:269-279.

Gasol, J. M., U. L. Zweifel, F. Peters, J. A. Fuhrman und Å. Hagström (1999):

Significance of size and nucleic acid content heterogeneity as measured by flow cytometry in natural planktonic bacteria.

Applied and Environmental Microbiology **65**:4475-4483.

Giraud, A., I. Matic, O. Tenaillon, A. Clara, M. Radman, M. Fons und F. Taddei (2001):

Costs and benefits of high mutation rates: adaptive evolution of bacteria in the mouse gut.

Science **291**:2606-2608.

González, J. M., E. Sherr und B. Sherr (1993):

Differential feeding by marine flagellates on growing versus starving, and on motile versus nonmotile, bacterial prey.

Marine Ecology Progress Series **102**:257-267.

González, J. M., E. B. Sherr und B. F. Sherr (1990):

Size-selective grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. *Applied and Environmental Microbiology* **56**:583-589.

Goshima, N., K. Kohno, F. Imamoto und Y. Kano (1990):

HU-1 mutants of *Escherichia coli* deficient in DNA binding. *Gene* **96**:141-145.

Goss, W. A., W. H. Deitz und T. M. Cook (1964):

Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **88**:1112-1118.

Graumann, P. L. (2006):

Different genetic programmes within identical bacteria under identical conditions: the phenomenon of bistability greatly modifies our view on bacterial populations. *Molecular Microbiology* **61**:560-563.

Grey, B. und T. R. Steck (2001):

Concentrations of copper thought to be toxic to *Escherichia coli* can induce the viable but nonculturable condition. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:5325.

Gribbon, L. T. und M. R. Barer (1995):

Oxidative metabolism in nonculturable *Helicobacter pylori* and *Vibrio vulnificus* cells studied by substrate-enhanced tetrazolium reduction and digital image processing. *Applied and Environmental Microbiology* **61**:3379.

Griffith, R. P. und R. D. Haight (1973):

Reversible heat-injury in the marine psychrophilic bacterium *Vibrio marinus* MP1. *Canadian Journal of Microbiology* **19**:557-561.

Gunasekera, T. S., D. A. Veal und P. V. Attfield (2003):

Potential for broad applications of flow cytometry and fluorescence techniques in microbiological and somatic cell analyses of milk. *International Journal of Food Microbiology* **85**:269-279.

Hagstrom, A., U. Larsson, P. Horstedt und S. Normark (1979):

Frequency of dividing cells, a new approach to the determination of bacterial growth rates in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**:805-812.

Hagström, Å., U. Larsson, P. Horstedt und S. Normark (1979):

Frequency of dividing cells, a new approach to the determination of bacterial growth rates in aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology* **37**:805-812.

Hahn, M. W. und M. G. Höfle (1999):

Flagellate predation on a bacterial model community: interplay of size-selective grazing, specific bacterial cell size, and bacterial community composition. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:4863-4872.

Haichar, F. Z., W. Achouak, R. Christen, T. Heulin, C. Marol, M.-F. Marais, C. Mougel, L. Ranzard, J. Balesdent und O. Berge (2007):

Identification of cellulolytic bacteria in soil by stable isotope probing.
Environmental Microbiology **9**:625.

Haidinger, W., M. P. Szostak, W. Jechlinger und W. Lubitz (2003):

Online monitoring of *Escherichia coli* ghost production.
Applied and Environmental Microbiology **69**:468-474.

Hall, B. G. (1991):

Adaptive evolution that requires multiple spontaneous mutations: mutation involving base substitutions.
Proceedings of the National Academy of Sciences **88**:5882-5886.

Han, M. J. und S. Y. Lee (2006):

The *Escherichia coli* proteome: past, present, and future prospects.
Microbiology and Molecular Biology Reviews **70**:362-439.

Haugland, R. P. (1996):

Assay kits for diverse cell types, S. 372-373. In M. T. Z. Spence (ed.), Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. Molecular Probes, Leiden.

Hausmann, K., N. Hülsmann, and R. Radek (2003):

Protistology. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.

Hayashi, K., N. Morooka, Y. Yamamoto, K. Fujita, K. Isono, S. Choi, E. Ohtsubo, T. Baba, B. L. Wanner, H. Mori und T. Horiuchi (2006):

Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110.
Mol Syst Biol **2**.

Heissenberger, A., G. G. Leppard und G. J. Herndl (1996):

Relationship between the intracellular integrity and the morphology of the capsular envelope in attached and free-living marine bacteria.
Applied and Environmental Microbiology **62**:4521-4528.

Hengge-Aronis, R. (2002a):

Recent insights into the general stress response regulatory network in *Escherichia coli*.
Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology **4**:341-346.

Hengge-Aronis, R. (2002b):

Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the σ^S (RpoS) subunit of RNA polymerase.
Microbiology and Molecular Biology Reviews **66**:373-395.

Henzler, H.-J. und Konstantinov, K.

Kontinuierliche Fermentation bei Zellkulturprozessen. 23-27. 2003. Tagungsband GVC/DECHEMA-Fachausschusssitzung Bioverfahrenstechnik/Technik biologischer Prozesse.

Herigstad, B., M. Hamilton und J. Heersink (2001):

How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria.
Journal of Microbiological Methods **44**:121-129.

Hobbie, J. E., R. J. Daley und S. Jasper (1977):

Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy.
Applied and Environmental Microbiology **33**:1225-1228.

Hoben, H. J. und P. Somasegaran (1982):

Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumerations of *Rhizobium spp.* in inoculants made from pre-sterilized peat.
Applied and Environmental Microbiology **44**:1246-1247.

Hondeveld, B. J. M., R. P. M. Bak, W. Van Raaphorst und F. C. Van Duyl (1999):

Impact of grazing by benthic eukaryotic organisms on the nitrogen sediment-water exchange in the North Sea.
Journal of Sea Research **41**:255-268.

Hoskisson, P. A. und G. Hobbs (2005):

Continuous culture - making a comeback?
Microbiology **151**:3153-3159.

Houten, E. und Eikelboom, D.

High performance membrane bioreactors: a physiological approach. 1-7. 1997. Cranfield University, Cranfield, UK. MBR1-Proc. 1st Intl. Mtg. on membrane bioreactors for wastewater treatment.

Hsieh, L., J. Rouviere-Yaniv und K. Drlica (1991):

Bacterial DNA supercoiling and [ATP]/[ADP] ratio: changes associated with salt shock.
Journal of Bacteriology **173**:3914-3917.

Hua, Q., C. Yang, T. Oshima, H. Mori und K. Shimizu (2004):

Analysis of gene expression in *Escherichia coli* in response to changes of growth-limiting nutrient in chemostat cultures.
Applied and Environmental Microbiology **70**:2354-2366.

Huq, A., I. N. G. Rivera, and R. R. Colwell (2000):

Epidemiological significance of viable but nonculturable microorganisms, S. 301-323. In R. R. Colwell and D. J. Grimes (eds.), Nonculturable Microorganisms in the Environment. ASM Press, Washington DC.

Ihssen, J. und T. Egli (2004):

Specific growth rate and not cell density controls the general stress response in *Escherichia coli*.
Microbiology **150**:1637-1648.

Ihssen, J. und T. Egli (2005):

Global physiological analysis of carbon- and energy-limited growing *Escherichia coli* confirms a high degree of catabolic flexibility and preparedness for mixed substrate utilization.
Environmental Microbiology **7**:1568-1581.

Ireland, M. M. E., J. A. Karty, E. M. Quardokus, J. P. Reilly und Y. V. Brun (2002):

Proteomic analysis of the *Caulobacter crescentus* stalk indicates competence for nutrient uptake.
Molecular Microbiology **45**:1029-1041.

Ishihama, A. (1999):

Modulation of the nucleoid, the transcription apparatus, and the translation machinery in bacteria for stationary phase survival.

Genes to Cells **4**:135-143.

Ishii, S., W. B. Ksolil, R. E. Hicks und M. J. Sadowsky (2006):

Presence and growth of naturalized *Escherichia coli* in temperate soils from lake Superior watersheds.

Applied and Environmental Microbiology **72**:612-621.

Izutsu, K., C. Wada, Y. Komine, T. Sako, C. Ueguchi, S. Nakura und A. Wada (2001):

Escherichia coli ribosome-associated protein SRA, whose copy number increases during stationary phase.

The Journal of Bacteriology **183**:2765-2773.

Jepras, R. I., J. Carter, S. C. Pearson, F. E. Paul und M. J. Wilkinson (1995):

Development of a robust flow cytometric assay for determining numbers of viable bacteria.

Applied and Environmental Microbiology **61**:2696-2701.

Jiménez, L., I. Muniz, G. A. Toranzos und T. C. Hazen (1989):

Survival and activity of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in tropical freshwater.

Journal of Applied Bacteriology **67**:61-69.

Joux, F. und P. Lebaron (2000):

Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level.

Microbes and Infection **2**:1523-1535.

Joux, F., P. Lebaron und M. Troussellier (1997):

Succession of cellular states in a *Salmonella typhimurium* population during starvation in artificial seawater microcosms.

FEMS Microbiology Ecology **22**:65-76.

Jürgens, K., J. M. Gasol und D. Vaquer (2000):

Bacteria-flagellate coupling in microcosm experiments in the Central Atlantic Ocean.

Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **245**:127-147.

Kabir, M., T. Sagara, T. Oshima, Y. Kawagoe, H. Mori, R. Tsunedomi und M. Yamada (2004):

Effects of mutations in the *rpoS* gene on cell viability and global gene expression under nitrogen starvation in *Escherichia coli*.

Microbiology **150**:2543-2553.

Kaneshiro, E. S., M. A. Wyder, Y. P. Wu und M. T. Cushion (1993):

Reliability of calcein acetoxymethyl-ester and ethidium homodimer or propidium iodide for viability assessment of microbes.

Journal of Microbiological Methods **17**:1-16.

Kantor, G. J. und R. A. Deering (1968):

Effect of nalidixic acid and hydroxyurea on division ability of *Escherichia coli* *fil*⁺ and *lon*⁻ strains.

Journal of Bacteriology **95**:520-530.

Kaprelyants, A. S. und D. B. Kell (1992):

Rapid assessment of bacterial viability and vitality by Rhodamine 123 and flow-cytometry.
Journal of Applied Bacteriology **72**:410-422.

Karner, M. und J. A. Fuhrman (1997):

Determination of active marine bacterioplankton: a comparison of universal 16S rRNA probes, autoradiography, and nucleoid staining.
Applied and Environmental Microbiology **63**:1208-1213.

Kell, D. B., A. S. Kaprelyants, D. H. Weichart, C. R. Harwood und M. R. Barer (1998):

Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues.
Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology **73**:169-187.

Kepner, R. L. und J. R. Pratt (1994):

Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present.
Microbiological Reviews **58**:603-615.

Keren, I., N. Kaldalu, A. Spoering, W. Yipeng und K. Lewis (2004):

Persister cells and tolerance to antimicrobials.
FEMS Microbiology Letters **230**:13-18.

Kern, R., A. Malki, J. Abdallah, J. Tagourti und G. Richarme (2007):

Escherichia coli HdeB is an acid stress chaperone.
Journal of Bacteriology **189**:603-610.

King, T., A. Ishihama, A. Kori und T. Ferenci (2004):

A regulatory trade-off as a source of strain variation in the species *Escherichia coli*.
The Journal of Bacteriology **186**:5614-5620.

King, T., S. Seeto und T. Ferenci (2006):

Genotype-by-Environment Interactions Influencing the Emergence of rpoS Mutations in *Escherichia coli* Populations.
Genetics **172**:2071-2079.

Kjelleberg, S., K. B. G. Flärdh, T. Nyström, and D. J. Moriarty (1993):

Growth limitation and starvation of bacteria, S. 289-320. In T. E. Ford (ed.), Aquatic microbiology - an ecological approach. Blackwell Scientific Publication, Boston.

Koch, A. L. (1971):

The adaptive responses of *Escherichia coli* to a feast and famine existence.
Advances in Microbial Physiology **6**:147-217.

Koch, K. (2005):

Charakterisierung der bakteriellen Biofilmgesellschaften in einem Langsandsandfilter.
Diplomarbeit, Technische Universität Berlin.

Kogure, K., U. Simidu und N. Taga (1979):

A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria.
Canadian Journal of Microbiology **25**:415-420.

Kolter, R., D. A. Siegele und A. Tormo (1993):

The stationary phase of the bacterial life cycle.
Annual Review of Microbiology **47**:855-874.

Kolter, R. (1999):

Growth in studying the cessation of growth.
Journal of Bacteriology **181**:697-699.

Konopka, A. (2000):

Microbial physiological state at low growth rate in natural and, engineered ecosystems.
Current Opinion in Microbiology **3**:244-247.

Koppe, P. and A. Stozek (1999):

Kommunales Abwasser: seine Inhaltsstoffe nach Herkunft, Zusammensetzung und Reaktionen im Reinigungsprozess einschließlich Klärschlämme. Vulkan-Verlag, Essen.

Korhonen, L. K. und P. J. Martikainen (1991):

Survival of *Escherichia coli* and *Campylobacter jejuni* in untreated and filtered lake water.
Journal of Applied Bacteriology **71**:379-382.

Kramer, J. G. und F. L. Singleton (1992):

Variations in rRNA content of marine *Vibrio* spp. during starvation-survival and recovery.
Applied and Environmental Microbiology **58**:201-207.

Krogfelt, K. A., M. Hjulgaard, K. Soerensen, P. S. Cohen und M. Givskov (2000):

rpoS gene function is a disadvantage for *Escherichia coli* BJ4 during competitive colonization of the mouse large intestine.
Infect. Immun. **68**:2518-2524.

Kula, M.-R. (2003):

Biokatalyse - industrielle Anwendungen und Herausforderungen.
elements degussa Science Newsletter **05**:20-27.

Kurland, C. G. and R. Mikkola (1993):

The impact of nutritional state on the microevaluation of ribosomes, S. 225-237. In S. Kjelleberg (ed.), Starvation in bacteria. Plenum Press, New York.

Kussell, E., R. Kishony, N. Q. Balaban und S. Leibler (2006):

Bacterial persistence: a model of survival in changing environments.
Genetics **169**:1807-1814.

Lacour, S. und P. Landini (2004):

σ^S -dependent gene expression at the onset of stationary phase in *Escherichia coli*: function of σ^S -dependent genes and identification of their promoter sequences.
The Journal of Bacteriology **186**:7186-7195.

Laera, G., A. Pollice, D. Saturno, C. Giordano und A. Lopez (2005):

Zero net growth in a membrane bioreactor with complete sludge retention.
Water Research **39**:5241-5249.

Laguerre, G., M. R. Allard, F. Revoy und N. Amarger (1994):

Rapid identification of *Rhizobia* by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes.

Applied and Environmental Microbiology **60**:56-63.

LaLiberte, P. und D. J. Grimes (1982):

Survival of *Escherichia coli* in lake bottom sediment.

Applied and Environmental Microbiology **43**:623-628.

Lanoil, B. D. und S. J. Giovannoni (1997):

Identification of bacterial cells by chromosomal painting.

Applied and Environmental Microbiology **63**:1118-1123.

Lebaron, P., P. Catala und N. Parthuisot (1998):

Effectiveness of SYTOX Green stain for bacterial viability assessment.

Applied and Environmental Microbiology **64**:2697-2700.

Lebaron, P. und F. Joux (1994):

Flow cytometric analysis of the cellular DNA content of *Salmonella typhimurium* and *Alteromonas haloplanktis* during starvation and recovery in seawater.

Applied and Environmental Microbiology **60**:4345-4350.

Lebaron, P., M. Troussellier und P. Got (1994):

Accuracy of epifluorescence microscopy counts for direct estimates of bacterial numbers.

Journal of Microbiological Methods **19**:89-94.

Lee, C. W. und H. N. Chang (1987):

Kinetics of ethanol fermentations in membrane cell recycle fermentors.

Biotechnology and Bioengineering **29**:1105-1112.

Lipnizki, F., S. Hausmanns, G. Laufenberg, R. Field und B. Kunz (2000):

Use of pervaporation-bioreactor hybrid processes in biotechnology.

Chemical Engineering and Technology **23**:569-577.

Lipski, A., U. Friedrich und K. Altendorf (2001):

Application of rRNA-targeted oligonucleotide probes in biotechnology.

Applied Microbiology and Biotechnology **56**:40-57.

Lisle, J. T., M. A. Hamilton, A. R. Willse und G. A. McFeters (2004):

Comparison of fluorescence microscopy and solid-phase cytometry methods for counting bacteria in water.

Applied and Environmental Microbiology **70**:5343-5348.

Lisle, J. T., B. H. Pyle und G. A. McFeters (1999):

The use of multiple indices of physiological activity to assess viability in chlorine disinfected *Escherichia coli* O157:H7.

Letters in Applied Microbiology **29**:42-47.

Lisle, J. T., S. C. Broadaway, A. M. Prescott, B. H. Pyle, C. Fricker und G. A. McFeters (1998):
Effects of starvation on physiological activity and chlorine disinfection resistance in *Escherichia coli* O157:H7.

Applied and Environmental Microbiology **64**:4658-4662.

Liu, W. T., T. L. Marsh, H. Cheng und L. J. Forney (1997):

Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA.

Applied and Environmental Microbiology **63**:4516-4522.

Liu, X. M., H. Liu, B. C. Wu, S. C. Li, L. L. Ye, Q. W. Wang, P. T. Huang und Z. L. Chen (2006):

Suspended aggregates as an immobilization mode for high-density perfusion culture of HEK 293 cells in a stirred tank bioreactor.

Applied Microbiology and Biotechnology **72**:1144-1151.

Liu, X. Q. und T. Ferenci (1998):

Regulation of porin-mediated outer membrane permeability by nutrient limitation in *Escherichia coli*.
Journal of Bacteriology **180**:3917-3922.

Lleo, M. M., B. Bonato, M. C. Tafi, C. Signoretto, C. Pruzzo und P. Canepari (2005):

Molecular vs culture methods for the detection of bacterial indicators in groundwater for human use.

Letters in Applied Microbiology **40**:289-294.

Lloyd, D. (1993):

Flow cytometry: a technique waiting for microbiologists, S. 1-9. In D. Lloyd (ed.), Flow cytometry in microbiology. Springer-Verlag, London.

Lobos, J., C. Wisniewski, M. Heran und A. Grasmick (2005):

Effects of starvation conditions on biomass behaviour for minimization of sludge production in membrane bioreactors.

Water Science and Technology **51**:35-44.

Loewen, P. C., B. Hu, J. Strutinsky und R. Sparling (1998):

Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*.

Can. J. Microbiol. **44**:707-717.

López-Amorós, R., S. Castel, J. Comas-Riu und J. Vives-Rego (1997):

Assessment of *E. coli* and *Salmonella* viability and starvation by confocal laser microscopy and flow cytometry using rhodamine 123, DiBAC4(3), propidium iodide, and CTC.

Cytometry **29**:298-305.

López-Amorós, R., D. J. MASON und D. Lloyd (1995):

Use of two oxonols and a fluorescent tetrazolium dye to monitor starvation of *Escherichia coli* in seawater by flow cytometry.

Journal of Microbiological Methods **22**:1635-176.

Low, E. W. und H. A. Chase (1999):

The effect of maintenance energy requirements on biomass production during wastewater treatment.

Wat. Res. **33**:847-853.

Lowder, M. und J. D. Oliver (2001):

The use of modified GFP as a reporter for metabolic activity in *Pseudomonas putida*.
Microbial Ecology **41**:310-313.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr und R. J. Randall (1951):

Protein measurement with the folin phenol.
Journal of Biological Chemistry **193**:265-275.

Luna, G. M., E. Manini und R. Danovaro (2002):

Large fraction of dead and inactive bacteria in coastal marine sediments: comparison of protocols for determination and ecological significance.
Applied and Environmental Microbiology **68**:3509-3513.

Makinoshima, H., A. Nishimura und A. Ishihama (2002):

Fractionation of *Escherichia coli* cell populations at different stages during growth transition to stationary phase.
Molecular Microbiology **43**:269-279.

Mar Lleo, M., S. Pierobon, M. C. Tafi, C. Signoretto und P. Canepari (2000):

mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in laboratory microcosm.
Applied and Environmental Microbiology **66**:4564-4567.

Martinez, A. und R. Kolter (1997):

Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps.
Journal of Bacteriology **179**:5188-5194.

Mason, C. A., G. Hamer und J. D. Bryers (1986):

The death and lysis of microorganisms in environmental processes.
FEMS Microbiology Reviews **39**:373-401.

McCarthy, M. D., J. I. Hedges und R. Benner (1998):

Major bacterial contribution to marine dissolved organic nitrogen.
Science **281**:231-234.

McDougald, D., S. A. Rice, D. Weichart und S. Kjelleberg (1998):

Nonculturability: adaptation or debilitation?
FEMS Microbiology Ecology **25**:1-9.

Mehlis, I., K. Hausmann und J. Wecke (1990):

Rapid digestion of *Staphylococcus aureus* by *Paramecium*: an evaluation of the role of bacterial autolytic enzymes.
European Journal of Protistology **26**:103-109.

Meistrich, M. L., W. Göhde und R. A. White (1978):

Resolution of X and Y spermatids by pulse cytophotometry.
Nature **274**:821-823.

MicroBio Tests Inc.

ProttoxKit FTM, Standard Operational Procedure. 1998.

Mizunoe, Y., S. N. Wai, A. Takade und S.-I. Yoshida (1999):

Restoration of culturability of starvation-stressed and low-temperature-stressed *Escherichia coli* O157 cells by using H₂O₂ degrading compounds.

Archives of Microbiology **172**:63-67.

Molin, S. und M. Givskov (1999):

Application of molecular tools for in situ monitoring of bacterial growth activity.

Environmental Microbiology **1**:383-391.

Monod, J. (1950):

La technique de culture continue, theorie et applications.

Annales de l'Institut Pasteur **79**:390-410.

Moreau, P. L. (2004):

Diversion of the metabolic flux from pyruvate dehydrogenase to pyruvate oxidase decreases oxidative stress during glucose metabolism in nongrowing *Escherichia coli* cells incubated under aerobic, phosphate starvation conditions.

Journal of Bacteriology **186**:7364-7368.

Morita, R. Y. (1997):

Bacteria in oligotrophic environments: starvation-survival lifestyle. Chapman & Hall, New York.

Morita, R. Y. (1986):

Starvation-survival: The normal mode of most bacteria in the ocean, S. 243-248. In F. Megusar and M. Gantar (eds.), Perspectives in microbial ecology. Slovene Society for Microbiology, Ljubljana.

Moyer, C. L., F. C. Dobbs und D. M. Karl (1994):

Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii.

Applied and Environmental Microbiology **60**:871-879.

Muller, E. B., A. H. Stouthamer, H. W. van Verseveld und D. H. Eikelboom (1995):

Aerobic domestic waste water treatment in a pilot plant with complete sludge retention by cross-flow filtration.

Water Research **29**:1179-1189.

Müller, R. H. und W. Babel (1996):

Measurement of growth at very low rates ($\mu \geq 0$), an approach to study the energy requirement for the survival of *Alcaligenes eutrophus* JMP 134.

Applied and Environmental Microbiology **62**:147-151.

Müller, S. (2007):

Modes of cytometric DNA pattern - a tool for pursuing growth.

Cell Proliferation **Akzeptiert**.

Müller, S. und W. Babel (2003):

Analysis of bacterial DNA patterns - an approach for controlling biotechnological processes.

Journal of Microbiological Methods **55**:851-858.

Na, S., K. Miyanaga, H. Unno und Y. Tanji (2006):

The survival response of *Escherichia coli* K12 in a natural environment.
Applied Microbiology and Biotechnology **72**:386-392.

Nair, S. und S. E. Finkel (2004):

Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase.
The Journal of Bacteriology **186**:4192-4198.

Naumann, E. (1919):

Några synpunkter angående limnoplanktons ökologi med särskild hänsyn till fytoplankton.
Svensk Botanisk Tidskrift **13**:129-163.

Nayak, B. B., E. Kamiya, T. Nishino, M. Wada, M. Nishimura und K. Kogure (2005):

Separation of active and inactive fractions from starved culture of *Vibrio parahaemolyticus* by density dependent cell sorting.
FEMS Microbiology Ecology **51**:179-186.

Neidhardt, F. C., R. Curtiss, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (1996):

Escherichia coli and *Salmonella typhimurium*, cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Neitzel, Y. (2002):

Erfassung mikrobiologischer Parameter in einem rechnergesteuerten Membranbioreaktor.
Diplomarbeit, Technische Universität Berlin.

Newell, S. Y., B. F. Sherr, E. B. Sherr und R. D. Fallon (1983):

Bacterial response to presence of eukaryote inhibitors in water from a coastal marine environment.
Marine Environmental Research **10**:147-157.

Nielsen, J. L., M. Aquino de Muro und P. H. Nielsen (2003):

Evaluation of the redox dye 5-cyano-2,3-tolyl-tetrazolium chloride for activity studies by simultaneous use of microautoradiography and fluorescence in situ hybridization.
Applied and Environmental Microbiology **69**:641.

Nilsson, J. (1979):

Phagotrophy in Tetrahymena, S. 339-379. In M. Levandowsky and S. H. Hutner (eds.), Biochemistry and physiology of protozoa. Academic Press, New York.

Novitsky, J. A. und R. Y. Morita (1978):

Possible strategy for the survival of marine bacteria under starvation conditions.
Marine Biology **48**:289-295.

Nwoguh, C. E., C. R. Harwood und M. R. Barer (1995):

Detection of induced beta-galactosidase activity in individual non-culturable cells of pathogenic bacteria by quantitative cytological assay.
Molecular Microbiology **17**:545-554.

Nyström, T. (2004):

Stationary-phase physiology.
Annual Review of Microbiology **58**:161-181.

Ogawa, M., K. Tani, A. Ochiai, N. Yamaguchi und M. Nasu (2005):

Multicolour digital image analysis system for identification of bacteria and concurrent assessment of their respiratory activity.

Journal of Applied Microbiology **98**:1101-1106.

Ohtomo, R. und M. Saito (2001):

Increase in the culturable cell number of *Escherichia coli* during recovery from saline stress: Possible implication for resuscitation from the VBNC state.

Microbial Ecology **42**:208-214.

Oliver, J. D. (2005):

The viable but nonculturable state in bacteria.

Journal of Microbiology **43**:93-100.

Ootsubo, M., T. Shimizu, R. Tanaka, T. Sawabe, K. Tajima, M. Yoshimizu, Y. Ezura, T. Ezaki und H. Oyaizu (2002):

Oligonucleotide probe for detecting *Enterobacteriaceae* by in situ hybridization.

Journal of Applied Microbiology **93**:60-68.

Özkanca, R. und K. P. Flint (1997):

Relationship between respiratory enzymes and survival of *Escherichia coli* under starvation stress in lake water.

Journal of Applied Microbiology **82**:301-309.

Patten, C. L., M. G. Kirchhof, M. R. Schertzberg, R. A. Morton und H. E. Schellhorn (2004):

Microarray analysis of RpoS-mediated gene expression in *Escherichia coli* K-12.

Molecular Genetics and Genomics **272**:580-591.

Peterson, G. L. (1977):

A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable.

Analytical Biochemistry **83**:346-356.

Pettijohn, D. E. (1988):

Histone-like proteins and bacterial chromosome structure.

Journal of Biological Chemistry **263**:12793-12796.

Pfennig, N. und S. Wagener (1986):

An improved method of preparing wet mounts for photomicrographs of microorganisms.

Journal of Microbiological Methods **4**:303-306.

Pineda, J. P., M. D. Antoine, P. A. Demirev, A. B. Feldmann, J. Jackman, M. Longenecker und J. S. Lin (2003):

Microorganism Identification by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and model-derived ribosomal protein biomarkers.

Analytical Chemistry **75**:3817-3822.

Pirt, S. J. (1965):

The maintenance energy of bacteria in growing cultures.

Proc. Roy. Soc. B **163**:224-231.

Pollice, A., G. Laera und M. Blonda (2004):

Biomass growth and activity in a membrane bioreactor with complete sludge retention.
Water Research **38**:1799-1808.

Polysciences Inc.

Technical Data Sheet 486 CTC. 1999.

Porter, J., C. Edwards und R. W. Pickup (1995):

Rapid assessment of physiological status in *Escherichia coli* using fluorescent probes.
Journal of Applied Bacteriology **4**:399-408.

Posch, T., J. Pernthaler, A. Alfreider und R. Psenner (1997):

Cell-specific respiratory activity of aquatic bacteria studied with the tetrazolium reduction method, cyto-clear slides, and image analysis.
Applied and Environmental Microbiology **63**:867-873.

Poulsen, L. K., G. Ballard und D. A. Stahl (1993):

Use of ribosomal-RNA fluorescence insitu hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms.
Applied and Environmental Microbiology **59**:1354-1360.

Power, M. L., J. Littlefield-Wyer, D. M. Gordon, A. V. Duncan und M. B. Slade (2005):

Phenotypic and genotypic characterization of encapsulated *Escherichia coli* isolated from blooms in two Australian lakes.
Environmental Microbiology **7**:631-640.

Radek, R. and K. Hausmann (1996):

Phagotrophy of ciliates, S. 197-219. In P. C. Bradbury and K. Hausmann (eds.), Ciliates: cells as organisms. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Raman, B., M. P. Nandakumar, V. Muthuvijayan und M. R. Marten (2005):

Proteome analysis to assess physiological changes in *Escherichia coli* grown under glucose-limited fed-batch conditions.
Biotechnology and Bioengineering **92**:384-392.

Reed, R. W. und G. B. Reed (1948):

Drop plate method of counting viable bacteria.
Canadian Journal of Research Section E-Medical Sciences **26**:317-326.

Reeve, C. A., P. S. Amy und A. Matin (1984):

Role of protein synthesis in the survival of carbon-starved *Escherichia coli* K-12.
Journal of Bacteriology **160**:1041-1046.

Reid, G. E., H. Shang, J. M. Hogan, G. U. Lee und S. A. McLuckey (2002):

Gas-phase concentration, purification, and identification of whole proteins from complex mixtures.
Journal of the American Chemical Society **124**:7353-7362.

Repoila, F., N. Majdalani und S. Gottesman (2003):

Small non-coding RNAs, co-ordinators of adaptation processes in *Escherichia coli*: the RpoS paradigm.
Molecular Microbiology **48**:855-861.

Reynolds, E. S. (1963):

The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy.
Journal of Cell Biology **17**:208-212.

Rigsbee, W., L. M. Simpson und J. D. Oliver (1997):

Detection of the viable but nonculturable state in *Escherichia coli* O157:H7.
Journal of Food Safety **16**:255-262.

Riva, A., M. O. Delorme, T. Chevalier, N. Guilhot, C. Henaut und A. Henaut (2004):

Characterization of the GATC regulatory network in *E. coli*.
BMC Genomics **5**:48.

Rivera, S. C., T. C. Hazen und G. A. Toranzos (1988):

Isolation of fecal coliforms from pristine sites in a tropical rain forest.
Applied and Environmental Microbiology **54**:513-517.

Rodriguez, G. G., D. Phipps, K. Ishiguro und H. F. Ridgway (1992):

Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria.
Applied and Environmental Microbiology **58**:1801-1808.

Rollins, D. M. und R. R. Colwell (1986):

Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment.
Applied and Environmental Microbiology **52**:531-538.

Rosenberg, S., C. Thulin und S. H. Reuben (1998):

Transient and heritable mutators in adaptive evolution in the lab and in nature.
Genetics **148**:1559-1566.

Rosenberger, S. (2003):

Charakterisierung von belebtem Schlamm in Membranbelebungsreaktoren zur Abwasserreinigung.
Dissertation, Technische Universität Berlin.

Rosenberger, S., U. Kruger, R. Witzig, W. Manz, U. Szewzyk und M. Kraume (2002):

Performance of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal wastewater.
Water Research **36**:413-420.

Rosenberger, S., R. Witzig, W. Manz, U. Szewzyk und M. Kraume (2000):

Operation of different membrane bioreactors: experimental results and physiological state of the microorganisms.
Water Science and Technology **41**:269-277.

Röske, I. and D. Uhlmann (2005):

Biologie der Wasser- und Abwasserbehandlung. Eugen Ulmer KG, Stuttgart.

Roszak, D. B. und R. R. Colwell (1987):

Survival strategies of bacteria in the natural environment.
Microbiological Reviews **51**:365-379.

Roth, B. L., M. Poot, S. T. Yue und P. J. Millard (1997):

Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX Green nucleic acid stain. Applied and Environmental Microbiology **63**:2421-2431.

Ruimy, R., V. Breitmayer, V. Boivin und R. Christen (1994):

Assessment of the state of activity of individual bacterial cells by hybridization with a ribosomal RNA targeted fluorescently labelled oligonucleotidic probe. FEMS Microbiology Ecology **15**:207-214.

Ryan, F. J. (1959):

Bacterial mutation in a stationary phase and the question of cell turnover. Journal of General Microbiology **21**:530-549.

Sambrook, J. and D. W. Russel (2001):

Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Schweder, T. und M. Hecker (2004):

Monitoring of stress responses. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology **89**:47-71.

Sherr, B. F., E. B. Sherr, T. L. Andrew, R. D. Fallon und S. Y. Newell (1986):

Trophic interactions between heterotrophic protozoa and bacterioplankton in estuarine water analyzed with selective metabolic inhibitors. Marine Ecology Progress Series **32**:169-179.

Sherr, B. F., E. B. Sherr und J. McDaniel (1992):

Effect of protistan grazing on the frequency of dividing cells in bacterioplankton assemblages. Applied and Environmental Microbiology **58**:2381-2385.

Shi, L., S. Günther, T. Hübschmann, L. Y. Wick, H. Harms und S. Müller (2007):

Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria. Cytometry Part A **Online publiziert**.

Siegele, D. A. und R. Kolter (1992):

Life after log. Journal of Bacteriology **174**:345-348.

Sieracki, M. E. und C. L. Viles (1992):

Distributions and fluorochrome-staining properties of submicrometer particles and bacteria in the North-Atlantic. Deep Sea Research **39**:1919-1929.

Signoretto, C., M. D. Lleo und P. Canepari (2002):

Modification of the peptidoglycan of *Escherichia coli* in the viable but nonculturable state. Current Microbiology **44**:125-131.

Šimek, K. und T. H. Chrzanowski (1992):

Direct and indirect evidence of size-selective grazing on pelagic bacteria by freshwater nanoflagellates. Applied and Environmental Microbiology **58**:3715-3720.

Singh, A., F. P. YU und G. A. McFeters (1990):

Rapid detection of chlorine-induced bacterial injury by the direct viable count method using image-analysis.

Applied and Environmental Microbiology **56**:389-394.

Skarstad, K., H. B. Steen und E. Boye (1983):

Cell cycle parameters of slowly growing *Escherichia coli* B/r studied by flow cytometry.

Journal of Bacteriology **154**:656-662.

Smith, J. J. und G. A. McFeters (1997):

Mechanisms of INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride), and CTC (5-cyano-2,3-ditoyl tetrazolium chloride) reduction in *Escherichia coli* K-12.

Journal of Microbiological Methods **29**:161-175.

Solo-Gabriele, H. M., M. A. Wolfert, T. R. Desmarais und C. J. Palmer (2000):

Sources of *Escherichia coli* in a coastal subtropical environment.

Applied and Environmental Microbiology **66**:230-237.

Suller, M. T. E. und D. Lloyd (1999):

Fluorescence monitoring of antibiotic-induced bacterial damage using flow cytometry.

Cytometry **35**:235-241.

Sun, D. D., S. L. Khor, C. T. Hay und J. O. Leckie (2007):

Impact of prolonged sludge retention time on the performance of a submerged membrane reactor.

Desalination **208**:101-112.

Swinger, K. K. und P. A. Rice (2004):

IHF and HU: flexible architects of bent DNA.

Current Opinion in Structural Biology **14**:28-35.

Tappe, W., A. Laverman, M. Bohland, M. Braster, S. Rittershaus, J. Groeneweg und H. W. van Verseveld (1999):

Maintenance energy demand and starvation recovery dynamics of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* cultivated in a retentostat with complete biomass retention.

Applied and Environmental Microbiology **65**:2471-2477.

Tappe, W., C. Tomaschewski, S. Rittershaus und J. Groeneweg (1996):

Cultivation of nitrifying bacteria in the retentostat, a simple fermenter with internal biomass retention.

FEMS Microbiology Ecology **19**:47-52.

Ter Linde, J. J., H. Liang, R. W. Davis, H. Y. Steensma, J. P. van Dijken und J. T. Pronk (1999):

Genome-wide transcriptional analysis of aerobic and anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*.

Journal of Bacteriology **181**:7409-7413.

Torrella, F. und R. Y. Morita (1981):

Microcultural study of bacterial size changes and microcolony and ultramicrocolony formation by heterotrophic bacteria in seawater.

Applied and Environmental Microbiology **41**:518-527.

Travers, A. und G. Muskhelishvili (2005):

DNA supercoiling - a global transcriptional regulator for enterobacterial growth?
Nature Reviews Microbiology **3**:157-169.

Tremaine, S. C. und A. L. Mills (1987):

Inadequacy of the eucaryote inhibitor cycloheximide in studies of protozoan grazing on bacteria at the freshwater-sediment interface.
Applied and Environmental Microbiology **53**:1969-1972.

Tros, M. E., T. N. Bosma, G. Schraa und A. J. Zehnder (1996):

Measurement of minimum substrate concentration (S_{min}) in a recycling fermentor and its prediction from the kinetic parameters of *Pseudomonas* strain B13 from batch and chemostat cultures.
Applied and Environmental Microbiology **62**:3655-3661.

Typas, A., G. Becker und R. Hengge (2007):

The molecular basis of selective promoter activation by the σ^S subunit of RNA polymerase.
Molecular Microbiology **63**:1296-1306.

Ullrich, S., B. Karrasch, H.-G. Hoppe, K. Jeskulke und M. Mehrens (1996):

Toxic effects on bacterial metabolism of the redox dye 5-cyano-2,3-ditoyl tetrazolium chloride.
Applied and Environmental Microbiology **62**:4587-4593.

van Loosdrecht, M. C. und M. Henze (1999):

Maintenance, endogeneous respiration, lysis, decay and predation.
Water Science and Technology **39**:107-117.

van Verseveld, H. W., W. R. Chesbro, M. Braster und A. H. Stouthamer (1984):

Eubacteria have 3 growth modes keyed to nutrient flow - consequences for the concept of maintenance and maximal growth yield.
Archives of Microbiology **137**:176-184.

Voigt, B., T. Schweder, D. Becher und A. Ehrenreich (2004):

A proteomic view of cell physiology of *Bacillus licheniformis*.
Proteomics **4**:1465-1490.

von Wintzingerode, F., U. B. Göbel und E. Stackebrand (1997):

Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR based rRNA analysis.
FEMS Microbiology Reviews **21**:213-229.

Wagner, J. und K. H. Rosenwinkel (2000):

Sludge production in membrane bioreactors under different conditions.
Water Science and Technology **42**:251-258.

Wagner, J. K. und Y. V. Brun (2007):

Out on a limb: how the *Caulobacter* stalk can boost the study of bacterial cell shape.
Molecular Microbiology **64**:28-33.

Wanner, U. und T. Egli (1990):

Dynamics of microbial growth and cell composition in batch culture.
FEMS Microbiol. Rev. **75**:19-44.

Weber, C. A. (1907):

Aufbau und Vegetation der Moore Norddeutschlands.
Beiblatt zu den Botanischen Jahrbüchern **90**:19-34.

Weber, H., T. Polen, J. Heuveling, V. F. Wendisch und R. Hengge (2005):

Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: σ^S -dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity.
The Journal of Bacteriology **187**:1591-1603.

Webster, J. A., T. L. Bannermann, R. J. Hubner, D. N. Ballard, E. M. Cole, J. L. Bruce, F. Fiedler, K. Schubert und W. E. Kloos (1994):

Identification of the *Staphylococcus sciuri* species group with EcoRI fragments containing rRNA sequences and description of *Staphylococcus vitulus* sp. nov.
International Journal of Systematic Bacteriology **44**:454-460.

Wei, Y., R. T. Van Houten, A. R. Borger, D. H. Eikelboom und Y. Fan (2003):

Minimization of excess sludge production for biological wastewater treatment.
Water Research **37**:4453-4467.

Weichart, D., D. McDougald, D. Jacobs und S. Kjelleberg (1997):

In situ analysis of nucleic acids in cold-induced nonculturable *Vibrio vulnificus*.
Applied and Environmental Microbiology **63**:2754-2758.

Wetterdienst Helgoland (2002):

Wassertemperaturen.
www.dwd.de.

Whitesides, M. D. und J. D. Oliver (1997):

Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state.
Applied and Environmental Microbiology **63**:1002-1005.

Whitman, R. L. und M. B. Nevers (2003):

Foreshore sand as a source of *Escherichia coli* in nearshore water of a Lake Michigan beach.
Applied and Environmental Microbiology **69**:5555-5562.

Whitman, R. L., D. A. Shively, H. Pawlik, M. B. Nevers und M. N. Byappanahalli (2003):

Occurrence of *Escherichia coli* and *Enterococci* in *Cladophora* (Chlorophyta) in nearshore water and beach sand of Lake Michigan.
Applied and Environmental Microbiology **69**:4714-4719.

WHO (1996):

Guideline for the drinking water quality. Vol.2: Health criteria and other supporting information.
World Health Organisation, Geneva.

Wiacek, C., S. Müller und D. Benndorf (2006):

A cytomic approach reveals population heterogeneity of *Cupriavidus necator* in response to harmful phenol concentrations.
Proteomics **6**:5983-5994.

Wick, L. M. und T. Egli (2004):

Molecular components of physiological stress responses in *Escherichia coli*.
Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology **89**:1-45.

Wick, L. M., M. Quadroni und T. Egli (2001):

Short- and long-term changes in proteome composition and kinetic properties in a culture of *Escherichia coli* during transition from glucose-excess to glucose-limited growth conditions in continuous culture and vice versa.
Environmental Microbiology **3**:588-599.

Winfield, M. D. und E. A. Groisman (2003):

Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*.
Applied and Environmental Microbiology **69**:3687.

Witzig, R., W. Manz, Rosenberger.S., U. Krüger, M. Kraume und U. Szewzyk (2002):

Microbiological aspects of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal wastewater.
Water Research **36**:394-402.

Wolf, S. G., D. Frenkiel, T. Arad, S. E. Finkel, R. Kolter und A. Minsky (1999):

DNA protection by stress-induced biocrystallization.
Nature **400**:83-85.

Xu, H. S., S. Roberts, F. L. Singleton, R. W. Atwell, D. J. Grimes und R. R. Colwell (1982):

Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment.
Microbial Ecology **8**:313-323.

Zimmermann, R., R. Iturriaga und J. Becker-Birck (1978):

Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration.
Applied and Environmental Microbiology **36**:926-935.

Zinser, E. R. und R. Kolter (2004):

Escherichia coli evolution during stationary phase.
Research in Microbiology **155**:328-336.

Zinser, E. R. und R. Kolter (1999):

Mutations enhancing amino acid catabolism confer a growth advantage in stationary phase.
The Journal of Bacteriology **181**:5800-5807.

Zweifel, U. L. und Å. Hagström (1995):

Total counts of marine bacteria include a large fraction of non-nucleoid-containing bacteria (ghosts).
Applied and Environmental Microbiology **61**:2180-2185.