Verhalten von gentechnisch veränderten Mikroorganismen in Trink- und Flußwasserbiofilmen

Frauke Rena Hangen

Verhalten von gentechnisch veränderten Mikroorganismen in Trink- und Flußwasserbiofilmen

vorgelegt von
Diplom-Ingenieurin
Frauke R. Hangen

Von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Ingenieurwissenschaften
- Dr. – Ing. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Helmut Görisch
Berichter: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Szewzyk
Berichter: Prof. Dipl.-Ing. Dr. Ulf Stahl

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 08. 03. 2001

Berlin 2001
D 83

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1996 bis Herbst 2000 im Fachgebiet Ökologie der Mikroorganismen der Technischen Universität Berlin durchgeführt. Verschiedene Menschen hatten Anteil an ihrer Entstehung, ihnen möchte ich an dieser Stelle danken.

Mein erster und herzlicher Dank gilt **Herrn Prof. Dr. U. Szewzyk** für die Bereitstellung des Themas und die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut. Sein großes Interesse an den aktuellen Ergebnissen und die stete Diskussionsbereitschaft waren für die Arbeit sehr förderlich.

Herr Prof. Dr. U. Stahl, Fachgebiet Mikrobiologie und Genetik der TU Berlin, hat sich gerne als Zweitgutachter bereit erklärt und in den gelegentlichen Treffen immer Interesse für die Thematik der Arbeit gezeigt. Dafür danke ich ihm sehr.

Herrn Dr. W. Manz gilt mein Dank für die produktive Betreuung, die konstruktiven Diskussionen und die entscheidenden Hinweise zur thematischen Gestaltung der Arbeit. Vielen Dank auch für die Korrektur dieser Arbeit.

Frau Dr. E. Grohmann hat mir mit engagierter Betreuung bei den Experimenten im genetischen Teil der Arbeit sehr geholfen und mich bei der Arbeit im Labor enthusiastisch unterstützt. Ganz herzlichen Dank auch für die Korrektur dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt **Herrn Prof. Dr. Søren Molin** und seinen Mitarbeitern für die freundliche Aufnahme in Kopenhagen, die Möglichkeit im Department of microbiology, Technical University of Denmark, Lyngby zu arbeiten, die Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft, die Bereitstellung von Material und Stämmen und nicht zuletzt die Finanzierung des Aufenthaltes in Kopenhagen.

Herr Dr. M. Strätz, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig, ermöglichte durch die Bereitstellung des als Wildtyp verwendeten *P. putida* KT2442 die Parallelexperimente in der vorliegenden Arbeit.

Vielen Dank auch an **Hans von Döhren** für die Möglichkeit, das S1-Labor des Fachgebietes Biochemie der TU Berlin für einen Teil der Experimente zu nutzen.

Robert Witzig und **Joanna Olszewska** unterstützten dieses Projekt als studentische Hilfskräfte, Robert hatte entscheidenden Anteil an den Kreuzungsexperimente, Joanna an der Durchführung und Auswertung der Biofilmexperimente in Landwehrkanal-Wasser. Meine Kolleginnen und Büronachbarn **Dr.-Ing. Karen Bade** und **Dipl.-Biol. Uta Böckelmann** haben durch ihre Diskussionsbereitschaft diese Arbeit vorwärtsgebracht. Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich sehr für die freundliche Atmosphäre und Unterstützung.

Mein herzlicher Dank gilt schließlich auch meinen Eltern **Christine und Prof. Ludwig Hangen** für das stete Interesse an meinem Werdegang und an dieser Arbeit. Mein Vater hat leider ihre Fertigstellung nicht mehr miterleben können. **Herrn Prof. Dr. Volkert Hansen**, Universität Wuppertal, und **Jürgen Ortlam** danke ich sehr für die energische Unterstützung in der Zeit der Fertigstellung der Promotion.
Die Arbeit entstand im Rahmen des Projektes „Biofilme als Modellsysteme für das Verhalten von in der Gentechnologie relevanten Organismen in komplexen Biozönosen“. Ich danke dem **BMBF** für die finanzielle Förderung (Förderkennzeichen des BMBF: 0311228).

Essen, im Juli 2001.

Inhalt

Danksagung 1

Inhalt 3

Abkürzungsverzeichnis 6

1 Einleitung 9
Zielsetzung dieser Arbeit 12
2 Material und Methoden 13
2.1 Chemikalien 13
2.1.1 Puffer und Lösungen 13
2.2 Organismen 13
2.2.1 P. putida FH1 14
2.2.2 P. putida KT2442 14
2.2.3 Helfer und Donorstämme in der Triparentalen Kreuzung 14
2.2.4 Rifampicin-resistente Trinkwasserisolate 15
2.2.5 GFP-markierte Trinkwasserisolate 15
2.2.6 Transkonjuganten 15
2.3 Stammhaltung und Kultivierung 16
2.3.1 Kulturmedien 16
2.3.2 Stammhaltung und Herstellen des Inokulums 18
2.3.3 Selektive Kultivierung und Kultivierung 19
2.4 Bestimmung der Gesamtzellzahl 20
2.5 In Situ Hybridisierung 21
2.5.1 Fixieren der Zellen 21
2.5.2 In situ Hybridisierung 21
2.5.3 Sonden 22
2.6 Biofilmreaktoren und Versuchsdurchführung 24
2.6.1 Biofilmreaktoren 24
2.6.2 Trägermaterial 27
2.6.3 Zugabe des Inokulums 27
2.6.4 Probenahme und Auswertung 27
2.7 Flüssigkulturen 29

2.7.1 Probenahme und Auswertung 29
2.8 Substratverwertung 29
2.9 Trinkwasser als Substrat und Inokulum....30
2.9.1 Das Berliner Trinkwasser: physikalisch, chemisch, mikrobiologisch....30
2.9.2 Flüssigkulturen in Trinkwasser 30
2.9.3 Trinkwasserbiofilme 30
2.10 LW-Wasser als Substrat und Inokulum....31
2.10.1 Flüssigkulturen in LW-Wasser 32
2.10.2 Adhäsion von *P. putida* FH1 an Flocken....33
2.10.3 Landwehrkanal-Biofilme 33
2.11 Transfer des Plasmids pJB20 in Trinkwasserisolate 34
2.11.1 Selektion Rifampicin-resistenter Mutanten: 34
2.11.2 Triparentale Kreuzung, Konjugation und Filter-Kreuzung: 34
2.12 Detektion authochthoner Rezipienten....35
2.13 Nachweis des Gentransfers....36
2.13.1 Überprüfung der Antibiotikaresistenzen....36
2.13.2 Immunologischer Nachweis des GFP....36
2.13.3 Spezifische Amplifikation pJB20-Plasmid kodierter Gene 38
2.13.4 Sequenzieren der 16 S rDNS 39
2.13.5 Einordnen der Stämme in den phylogenetischen Stammbaum 40

3 Ergebnisse....41
3.1 Laborsysteme 41
3.1.1 Biofilmbildung ausgewählter Organismen....41
3.1.2 Wahl der Sonde PPU646 für den spezifischen Nachweis von *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442....41
3.1.3 Biofilmbildung der Trinkwasserisolate 42
3.1.4 Substratverwertung....42
3.2 Trinkwasser als Habitat 44
3.2.1 Trinkwasser-Flüssigkulturen....44
3.2.2 Trinkwasserbiofilme 45
3.2.3 P. putida FH1 in Trinkwasserbiofilmen....49
3.3 Der Landwehrkanal als Habitat – Flüssigkulturen 51
3.3.1 Überleben der Modellorganismen in LW-Wasser 51

3.3.2 Adaption der Modellorganismen an das Medium.....52
3.3.3 Einfluß von Gefrieren auf die Zahl kultivierbarer Zellen einer Kultur.....60
3.4 Der Landwehrkanal als Habitat - Biofilme.....61
3.4.1 Charakteristik der LW-Biofilme und der Flüssigphase.....62
3.4.2 Art der Besiedelung von Oberflächen durch die Modellorganismen.....63
3.4.3 P. putida FH1 *und P. putida* KT2442 in LW-Biofilmen – *Experiment über 200 Tage* 69
3.5 Gentransfer in authochthone Rezipienten 84
3.5.1 Konjugation der Trinkwasserisolate.....84
3.5.2 Detektion des Gentransfers in authochthone Spezies des LW-Wassers.85
3.5.3 Nachweis des Gentransfers 86
3.6 Phylogenetische Identifikation der Transkonjuganten.....89

4 Diskussion.....93
4.1 Laborsysteme.....93
4.2 Trinkwasser als Habitat 95
4.3 Flüssigkulturen in Landwehrkanal-Wasser 99
4.4 Das Überleben in LW-Biofilmen.....104
4.5 P. putida KT2442 und *P. putida* FH1 im Vergleich.....108
4.6 Gentransfer 110
4.7 Nachweis des Gentransfers.....113
4.8 Ausblick 116

5 Zusammenfassung.....117

6 Abstract : Survival of genetically engineered micro-organisms in drinking and river water biofilms.....119

7 Literaturverzeichnis 121

Anhang.....129

Erklärungen an Eides Statt 131
Lebenslauf.....132

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AOX	aromatische organische Halogenverbindungen
BFP	Blau Fluoreszierendes Protein
bp	Basenpaar
C	Cytosin
Cy3	5,5‘-disulfo-1,1‘di(γ-carbopentenyl)-3,3,3‘,3‘-tetramethyl-inolocarbocyanin (cyanin Cy3.18)
d	Tag
Da	Dalton
DAPI	4‘,6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
deion. Wasser	deionisiertes, sterilfiltriertes Wasser
DOC	gelöster organischer Kohlenstoff
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DSM	Bezeichnung der Mikroorganismen-Stämme der DSMZ
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
Fluos	5(6)-Carboxyfluorescein-*N*-hydroxysuccinimid-Ester
G	Guanin
g	Gramm, Gravitationskonstante (9,81 m/s^2)
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GKZ	Gesamtkeimzahl
GVO	gentechnisch veränderter Organismus
h	Stunde
IPTG	Isopropylthiogalactosid
KBE	Koloniebildende Einheit
l	Liter
λ	Lambda, Wellenlänge
LW	Landwehrkanal
LW-Wasser	Wasser aus dem Landwehrkanal, filtriert duch ein Planktonnetz der Maschenweite 0,28 µm

M	molare Konzentration
m	Meter
min	Minute oder mindestens
NB	Nähragar (engl. Nutrient Broth)
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PE	Polyethylen
PPU646	16 S rRNS Sonde PPU646, spezifisch für *P. putida*
PP986	16 S rRNS Sonde PP986, spezifisch für *P. putida*
RNS	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
r^2	Korrelationskoeffizient
R2A*	R2A*-Medium
rRNS	ribosomale RNS
RT	Raumtemperatur (= 20 °C)
R2A*+Kan(30/50)	R2A*-Medium mit Zusatz von 30 bzw. 50 µg/ml Kanamycin
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
t	Zeit
T	Thymin
TBE	Tris-borat-EDTA-Puffer
TOC	Gesamtmenge organischer Kohlenstoff
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 80	Polyoxyethylensorbitan Monooleat
U	Einheit
UV	ultraviolett
V	Volt
VBNC	lebendig aber nicht kultivierbar (engl. viable but nonculturable)
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen

1 Einleitung

Gleichzeitig mit den ersten erfolgreichen gentechnischen Experimenten Anfang der siebziger Jahre begann die öffentliche Diskussion über die Chancen und Risiken der Gentechnik. Es war gelungen, das Genom des Simian Virus 40 mit einem Vektor in das Bakterium *Escherichia coli* einzuführen. Befürchtet wurde nun, daß der gentechnisch veränderte Organismus (GVO) sich nach unbeabsichtigter Freisetzung z. B. in den menschlichen Darm einnisten und sein durch das Virus vermittelte onkogene Potential an die Darmbakterien weitergeben könnte. In der weiteren Folge wurden 1978 in der Bundesrepublik Deutschland erstmals Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch *in vitro* neukombinierte Nukleinsäuren und 1990 schließlich das Gentechnikgesetz verabschiedet. Mit dem steigenden Interesse für die Biotechnologie nahm der Einsatz von Mikroorganismen in der industriellen Produktion von z. B. Enzymen und Biochemikalien stark zu, während sich die Verwendung gentechnisch veränderter Mikroorganismen überhaupt in Deutschland auf die Produktion von Human-Insulin durch *Escherichia coli* beschränkte. Zum Einsatz von GVOs für die biologische Reinigung kontaminierter Böden wurden bislang lediglich Feldstudien durchgeführt, eine darüberhinausgehende Freisetzung erfolgte noch nicht. Molin und Kjelleberg (1993) forderten angesichts der noch weitgehend unbekannten Ökologie der Mikroorganismen ein vorsichtiges Vorgehen beim Einsatz von GVOs in die Umwelt, während sich Cook *et al.* (1996) für eine Ausweitung des Einsatzes von Bakterien zur Schädlingsbekämpfung und zum Pflanzenschutz in der Landwirtschaft aussprachen.

In Studien wurden GVOs direkt in die Umwelt eingebracht, um ihr *in situ* Verhalten zu beobachten. Das damit verbundene unbekannte Risiko führte zur restriktiven Beschränkung auch der Freisetzungen aus wissenschaftlichem Interesse. In den wenigen Untersuchungen in aquatischen Habitaten wurde die Ausbreitung der GVOs im Gewässer begrenzt, indem die Bakterien entweder in Diffusionskammern exponiert (Awong *et al.*, 1990, Fulthorpe und Wyndham, 1991) oder an eine Oberfläche fixiert wurden (Williams *et al.*, 1996). Weitaus häufiger als tatsächliche Freisetzungen werden die aquatischen Habitate mit geeigneten Reaktoren im Labor nachempfunden.

In den meisten natürlichen aquatischen Habitaten lebt die Mehrzahl der Bakterien im

Biofilm: angeheftet an eine Oberfläche, in einem Konsortium aus Zellen und eingebettet in eine autogene hoch-hydratisierte Polymermatrix, die durch die Bakterien gebildet wird (Costerton *et al.*, 1987, Leff *et al.*, 1992, Neu, 1996). Das Leben an der Oberfläche bietet für die Prokaryonten den Vorteil, daß die Nährstoffe des Mediums an- und die Stoffwechsel-Endprodukte abtransportiert werden. Die Anheftung der Zellen erfolgt in aquatischen Habitaten überwiegend aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen und kann sich dauerhaft oder vorübergehend ausbilden (Busscher *et al.*, 1990, Fletcher, 1996) oder Teil des Lebenszyklus der Bakterien sein (Szewzyk und Schink, 1988). Im Verlauf der Anheftung verändert sich das Genmuster in den Zellen (Harakeh und Matin, 1989). Die Adhäsion bewirkt die Expression spezifischer Gene, z. B. zur Bildung von oberflächenaktiven Stoffen. Zusätzlich beeinfußt der physiologische Zustand der Organismen die Zusammensetzung und Menge der bakteriellen Oberflächen-Polymere und damit die Anheftungseigenschaften (Wardell *et al*., 1980, Molin *et al.*, 1982, McEldowney und Fletcher, 1986). Sich verschlechternde Bedingungen und Konkurrenzdruck bewirken, daß einzelne Zellen die Oberfläche (wieder) verlassen (Beveridge *et al.*, 1997).
Freigesetzte Bakterien, darunter gentechnisch veränderte Organismen, können sich in die vorhandene Biofilm-Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) einlagern und sind dort vor schädlichen Umwelteinflüssen weitaus besser geschützt als planktonische Zellen (Buswell *et al.*, 1998, Neu, 1996). Ihr Kolonisationsverhalten und Transportprozesse bestimmen das Überleben und Schicksal der habitatsfremden Bakterien in aquatischen Habitaten (Leff *et al.*, 1992).

Bereits im ersten erfolgreichen gentechnischen Experiment mit dem Simian Virus 40 wurde die Frage nach einem möglichen Gentransfer auf die authochthone Mikroflora gestellt. Bisherige Untersuchungen zur Freisetzung gentechnisch veränderter Organismen in aquatischen Habitaten betrachteten Abläufe in der Flüssigphase. Dabei zeigte sich, daß die Hungerbedingungen, unter denen insbesondere die planktonischen Zellen leben, die Adaption der Bakterien an ihre Umgebung durch eine verbesserte Aufnahme fremder Gene (Schäfer *et al*., 1994) oder eine gesteigerte Rate von Mutationen (Zambrano *et al.*, 1993) begünstigten. Es wurden jedoch keine vergleichenden Studien zum Überleben der GVOs und zum Gentransfer im Biofilm eines Systems durchgeführt.

In marinen Systemen, Boden oder Belebtschlamm konnte unter Umweltbedingungen die Übertragung genetischer Information beobachtet werden (Übersicht: Davison, 1999). Frühe Studien setzten entweder Umweltisolate aus den zu untersuchenden Habitaten als Rezipienten ein (z. B. Genthner *et al.*, 1988) oder verwendeten bekannte Donor- und Rezipientenstämme in dem zu untersuchenden Habitat oder seiner Laborform (O'Morchoe *et al.*, 1988, Muela *et al.*, 1994). Die Übertragung auf unbekannte Rezipienten wurde durch Fulthorpe und Wyndham (1991) sowie Nakatsu *et al.* (1995) in xenobiotisch verschmutztem Süßwasser gezeigt, andere Autoren untersuchten andere Habitate. Keine Studie hatte Trinkwasser als Ökosystem gewählt. Der Nachweis des Transfers erfolgte u. a. durch katabolische Gene (Fulthorpe und Wyndham, 1991, Zhou und Tiedje, 1995, Ravatn *et al.*, 1998), molekulare Marker (Übersicht: Prosser, 1994 und Lindow, 1995, Winstanley und Morgan, 1997), spezifische Hybridisierung der übertragenen Gene (z. B. Daane *et al.*, 1997) oder die spezifische Amplifikation von Plasmidgenen (Götz *et al.*, 1996). Die Transkonjuganten wurden anhand der Substratverwertung identifiziert (DiGiovanni *et al.*, 1996) oder mit Hilfe von rRNS-Sonden klassifiziert (Geisenberger *et al.*, 1999). Einzelne Untersuchungen gaben nur die Transferrate an.

Mit der Verwendung von *P. putida* FH1 als Modellorganismus in der vorliegenden Arbeit konnte das Markermolekül „Grün Fluoreszierendes Protein" (GFP) zur Detektion des Gentransfers verwendet werden. Zusätzlich ermöglichte das GFP die Detektion von *P. putida* FH1 im nativen System. Das Grün Fluoreszierende Protein wurde ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert, wo es als zweites Protein einer Fluoreszenzkaskade fungiert. Seit der ersten Klonierung des Proteins in *E. coli* (Prasher *et al.*, 1992, Chalfie *et al.*, 1994) wird das Markerprotein in einer immer noch steigenden Zahl von Applikationen in der gesamten Biologie eingesetzt (Winstanley und Morgan, 1997). Seine besondere Stärke ist die substratunabhängige Fluoreszenz. Das originale *gfp*-Gen wurde vielfach mutiert, um die Fluoreszensintensität des Proteins zu erhöhen und so auch Einzelzellen sichtbar zu machen (z. B. Eberl *et al.*, 1997, Suarez *et al.*, 1997), um das Emissionsspektrum des Proteins zu verändern, um das Protein für die Durchflußzytometrie anwendbar zu machen (z. B. Tombolino *et al.*, 1997) und um weniger stabile Protein-Varianten zu erhalten (Andersen *et al.*, 1998). Möglichkeiten zur Anwendung des Grün Fluoreszierenden Proteins in ökologischen Studien wurden kürzlich durch Errampalli *et al.* (1999) zusammengefaßt, darunter sind die Untersuchungen zur Strukturbildung

und Interaktionen in Biofilmen (Møller *et al.*, 1998, Christensen *et al.*, 1998) und zum horizontalen Gentransfer in Belebtschlamm (Geisenberger *et al.*, 1999) besonders erwähnenswert. Anhand von *gfp*-markierten *Campylobacter jejunii* und *E. coli* konnte der Übergang der Zellen in die Nicht-Kultivierbarkeit (Leff und Leff, 1996) und von Protozoen als Ursache für den Rückgang von *P. putida* in Belebtschamm (Eberl *et al.*, 1997) gezeigt werden. Neben der grünen Fluoreszenz konnten anhand der bekannten *gfp*-Sequenz GFP-markierte Zellen auch mit traditionellen Methoden wie durch „gene probing“, DNS-Hybridisierung und PCR nachgewiesen werden.

Zielsetzung dieser Arbeit

Ausgehend von den Ergebnissen eines vorangegangenen Projektes zur Entstehung und mikrobiellen Zusammensetzung von Trinkwasserbiofilmen sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Funktion dieser Habitate als Schutzraum für in der Gentechnik verwendete Organismen untersucht werden. Ziel ist es, das Überleben von gentechnisch veränderten Mikroorganismen (GVO) in der autochthonen Mikroorganismengemeinschaft zu untersuchen und Einflußfaktoren zu ermitteln. Als erste Nachweismethode sollte die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung eingesetzt werden, bei der mit Hilfe von 16 S und 23 S rDNA-Sonden unterschiedlicher Spezifität die ausgewählten Mikroorganismen und die autochthone Flora in ihrem jeweiligen Anteil und in unveränderter räumlicher Anordnung in den Biofilmen detektiert werden können. Stoffwechselketten zwischen den GVOs und den Biofilmbakterien sowie die Substratkonkurrenz und der Fraßdruck durch die autochthone Flora werden als wichtige Einflußgrößen auf das Überleben angesehen und sollten durch entsprechende Experimente überprüft werden. In der Frage der Technikfolgenabschätzung sollte die Übertragung genetischen Materials von einem freigesetzten GVO auf autochthone Bakterien mit Hilfe des Markermoleküls Grün Fluoreszierendes Protein detektiert werden. Dabei wird im Biofilm aufgrund der im Vergleich zur planktonischen Phase höheren Organismendichte und –nähe eine hohe Transferrate erwartet. Um die unterschiedliche Nährstoff- und Organismendichte in natürlichen bzw. naturnahen Habitaten zu berücksichtigen, sollte eutrophes Flußwasser dem oligotrophen Trinkwasser als Substrat und Inokulum gegenübergestellt werden. In Parallelexperimenten, in denen GVO und Wildtyp gleichen Bedingungen ausgesetzt werden, soll der Einfluß der genetischen Veränderung auf das Überleben untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, waren die Chemikalien von p.a. bzw. reinst Qualität und wurden von Merck (Darmstadt), Sigma (Diesenhofen), Aldrich (Steinheim) oder Fluka (Buchs, Schweiz) bezogen. Alle Lösungen, Puffer und Medien wurden mit deionisiertem, sterilfiltriertem Wasser (*deion. Wasser*, Millipore, Eschborn) zubereitet.

2.1.1 Puffer und Lösungen

Phosphatpuffer (*PBS*): 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na_2HPO_4, 0,24 g/l KH_2PO_4, pH 7,2.

TBE-Puffer: 10,8 g Tris, 2,75 g Borsäure, 2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0). Der Puffer wurde als zehnfach konzentrierte Stammlösung hergestellt.

DAPI: 1 – 10 µg/ml 4',6-Diamidino-2-phenylindol in deion. Wasser.

SDS: Natriumdodecylsulfat 10 %ig (w/v) in deion. Wasser.

Formaldehyd: 3,7 % Formaldehyd in PBS.

2.2 Organismen

In dieser Arbeit wurden die Trinkwasserisolate der Stammsammlung des Fachgebietes Ökologie der Mikroorganismen der Technischen Universität Berlin *Aquabacterium citratiphilum* DSM 11900, *Aquabacterium parvum* DSM 11968, *Aquabacterium commune* DSM 11901 und B3 (Kalmbach *et al.*, 1997b, Kalmbach *et al.*, 1999) verwendet.

Ralstonia eutropha DSM 591, *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP2) DSM 4058, *Bacillus subtilis* DSM 347, *Bacillus mycoides* DSM 299, *Escherichia coli* (*E. coli*) K12 (DSM 448), *E. coli* JM109 DSM 3423, *Pseudomonas fluorescens* DSM 50090, *Pseudomonas putida* (*P. putida*) DSM 291 und *Oceanospirillum minutulum* DSM 6287 wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig bezogen.

P. putida FH1 wurde durch die Gruppe Prof. Dr. S. Molin, Department of Microbiology, The Technical University of Denmark, DK-2800 Lyngby, zur Verfügung gestellt.

P. putida KT2442 wurde durch Herrn Dr. M. Strätz (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, *GBF*, Braunschweig) zur Verfügung gestellt.

2.2.1 *P. putida* FH1

P. putida FH1 entstand durch Konjugation aus *P. putida* BBC23A (pJB20) (Donor) x *P. putida* SM1464 (Rezipient). *P. putida* SM1464 ist eine natürliche Nalidixin-resistente Mutante von *P. putida* KT2440 (*P. putida* KT2440 siehe 2.2.2). Durch die Konjugation wurde das Plasmid pJB20 übertragen. Um das Plasmid pJB20 zu erhalten, wurde zunächst das PCR-Fragment mit *gfp*mut3 und nachfolgend das PCR-Fragment des *lacUV*5-Promotors einschließlich der Restriktionsstellen *Kpn*I und *Xba*I in pJB23 (Andersen *et al.*, 1998) insertiert. Das resultierende Plasmid wurde danach mit *Not*I verdaut und in die *Not*I Restriktionsstellen des Plasmids pUT-miniTn*5*-Km (Herrero *et al.*, 1990, Lorenzo *et al.*, 1990) insertiert. Zur Überführung der Kassette aus *LacUV5::Gfpmut*3 und dem Kanamycin-Resistenzgen in das RP4-Wildtyp-Plasmid (Pansegrau *et al.*, 1994) wurde ein triparentales Mating durchgeführt. Das resultierende Plasmid wurde pJB20 genannt.
P. putida FH1 wurde als Donorstamm für das selbsttransferierende Plasmid pJB20 und Beispiel eines gentechnisch veränderten Organismus (GVO) eingesetzt. Der Stamm ist chromosomal-kodiert gegen Nalidixin resistent. Das Plasmid pJB20 trägt die Kassette mit dem Gen des Grün Fluoreszierenden Proteins und dem Kanamycin-Resistenz-Gen (siehe oben) sowie die Resistenzgene für Ampicillin und Tetracyclin.

2.2.2 *P. putida* KT2442

P. putida KT2440 ist der Tol-Plasmid freie Abkömmling von *P. putida* mt-2 (Bagdasarian *et al.*, 1981). *P. putida* mt-2 wurde erstmals 1974 durch Williams und Murray beschrieben. *P. putida* KT2442 ist eine Rifampicin-resistente Mutante von *P. putida* KT2440 (Bagdasarian *et al.*, 1981). Der Stamm wurde als nicht gentechnisch veränderter Organismus in den Experimenten parallel zu *P. putida* FH1 eingesetzt. Die Sequenzanalyse und phylogenetische Einordnung von *P. putida* KT2442 erfolgte durch Dr. E. Moore (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig).

2.2.3 Helfer und Donorstämme in der Triparentalen Kreuzung

E. coli SM1279 bzw. *E. coli* JB315 und *E. coli* JB122 wurden als Helfer bzw. Donorstämme in der triparentalen Kreuzung mit den Trinkwasserisolaten eingesetzt. Die Stämme wurden durch die Gruppe Prof. Dr. S. Molin, DTU Lyngby (s. o.) zur

Verfügung gestellt. *E. coli* JB315 bzw. *E. coli* JB122 enthielten auf dem Plasmid pJBA77 bzw. pJBA29 je ein Transposon mit dem *gfp*mut3-Gen bzw. dem das BFP (Blau Fluoreszierendes Protein) kodierende Gen sowie zusätzlich das Kanamycin-Resistenz-Gen. Der Plasmidtransfer in die Rezipienten wurde durch den Helfer *E. coli* SM1279 vermittelt.

2.2.4 Rifampicin-resistente Trinkwasserisolate

Rifampicin-resistente Mutanten der Trinkwasserisolate *A. citratiphilum*, *A. parvum* und *A. commune* wurden im Verlauf der Arbeit durch ein Screening isoliert. Die entsprechenden Stämme erhielten den Zusatz „^{Rif}“.

2.2.5 GFP-markierte Trinkwasserisolate

Durch Konjugation mit dem Plasmid pJB20 entstandene GFP-exprimierende Trinkwasserstämme wurden mit dem Zusatz „-GFP“ bezeichnet.

2.2.6 Transkonjuganten

Im Verlauf der Arbeit konnten Rezipienten des Plasmids pJB20 isoliert werden, sie wurden „Trako“ und „Transkonjugant 11.1“ genannt.

2.3 Stammhaltung und Kultivierung

2.3.1 Kulturmedien

Cetrimid-Agar

20,0 g/l	Pepton aus Gelatine
1,4 g/l	Magnesiumchlorid
10,0 g/l	Kaliumsulfat
0,3 g/l	N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid (*Cetrimid*)
10,0 ml/l	Glycerin
13,0 g/l	Agar-Agar

Pseudomonas-AgarF

10,0 g/l	Pepton aus Casein
10,0 g/l	Pepton aus Fleisch
1,5 g/l	Magnesiumsulfat
1,5 g/l	di-Kaliumhydrogenphosphat
10,0 ml/l	Glycerin
12,0 g/l	Agar-Agar

R2A*-Agar (nach Reasoner und Geldreich, 1985; modifiziert durch Kalmbach *et al.*, 1997a)

0,5 g/l	Hefeextrakt (Difco)
0,5 g/l	Casaminosäuren (Difco)
0,5 g/l	Protease Pepton (Difco)
0,5 g/l	Glucose
0,3 g/l	Kaliumpyruvat
0,05 g/l	$MgSO_4 x 7H_2O$
1,0 ml/l	Tween 80
15,0 g/l	Agar-Agar

Mineralmedium

0,66 g/l $(NH_4)_2SO_4$
0,123 g/l $MgSO_4x7H_2O$
0,017 g/l $CaSO_4x2H_2O$
0,006 g/l $FeSO_4x7H_2O$
1,36 g/l $KH_2PO_4x7H_2O$ wird als Lösung zugegeben.

Den pH-Wert auf 7,2 einstellen.

Nährbouillon (*NB*, Difco)

3,0 g/l Fleischextrakt
5,0 g/l Pepton

Marine Agar (Difco)

In sonst gleicher Zusammensetzung, ohne den Zusatz von Agar-Agar wurden Cetrimid-Medium, Pseudomonas-F-Medium und R2A*-Medium (*R2A**) als Flüssigmedium hergestellt. Durch den Zusatz von 16,0 g/l Agar-Agar zu NB wurde NB-Agar erhalten. Wenn nicht anders angegeben, wurde der pH-Wert 7,0 eingestellt.

Tabelle 1: Antibiotika

Hemmstoff	Stammlösung	Konzentration im Medium
Ampicillin	50 mg/ml in Wasser	50 – 100 µg/ml
Chloramphenicol	8 mg/ml in Wasser	8 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in Wasser	30 – 50 µg/ml
Nalidixinsäure	10 mg/ml in 0,05 M NaOH	50 µg/ml
Rifampicin	50 mg/ml in DMSO	10 – 100 µg/ml
Tetracyclin	12,5 mg/ml in 50 % Ethanol	10 – 20 µg/ml

Vitaminlösung

0,04 g/l 4-Aminobenzoesäure, 0,01 g/l D(+)-Biotin, 0,1 g/l Nicotinsäure, 0,05 g/l Ca-D(+)- Panthotenat, 0,1 g/l Thiaminchlorid-di-Hydrochlorid

B12-Lösung

0,05 g/l Cyanocobalamin

Alle Medien wurden, soweit nicht anders angegeben, durch Autoklavieren sterilisiert (20 min., 121 °C, Varioklav H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim). Die Stammlösungen der Antibiotika wurden entsprechend den Angaben in Tabelle 1 dargestellt, sterilfiltriert (0,2 µm) und dem sterilen, auf mindestens 50 °C abgekühlten, Medium zugegeben.

2.3.2 Stammhaltung und Herstellen des Inokulums

Die Kultivierungsbedingungen für die verwendeten Stämme sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt. Sämtliche Arbeitsschritte der Stammhaltung sowie der Vor- und Hauptkultur wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Bakterienstämme wurden auf Schrägagarröhrchen oder Agarplatten bei 11 °C, als Glycerinkultur bei -80 °C bzw. als Cryokultur bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2: Stämme und Kultivierungsbedingungen

Name des Stammes	Medium	Inkubations-temperatur [°C]
B3 (Kalmbach et al. 1997b)	R2A*	20
A. citratiphilum DSM 11900 (^{Rif})	R2A* (mit 50 µg/ml Rifampicin)	20
A. parvum DSM 11968 (^{Rif})	R2A* (mit 50 µg/ml Rifampicin)	20
A. commune DSM 11901 (^{Rif})	R2A* (mit 50 µg/ml Rifampicin)	20
R. eutropha DSM 591	NB	30
R. eutropha JMP 134 DSM 4058	NB	30
B. subtilis DSM 347	NB	30
B. mycoides DSM 299	NB	30
E. coli K12 DSM 448	R2A* oder NB	37
E. coli JM 109 DSM 3423	R2A* oder NB	37
E. coli (pRK 600) SM1279	R2A* m. 8 µg/mlChloramphenicol	37
E. coli MW 1190 λPIR (pJBA77) JB315	R2A* mit 50 µg/ml Kanamycin, bzw. 100 µg/ml Ampicillin	37
E. coli MW 1190 λPIR (pJBA29) JB122	R2A* mit 50 µg/ml Kanamycin, bzw. 100 µg/ml Ampicillin	37
P. fluorescens DSM 50090	NB	30
P. putida DSM 291	NB	30
Oceanospirillum minutulum DSM 6287	Marine Agar	30
P. putida FH1	R2A* oder NB, je mit 50 µg/ml Kanamycin	30
P. putida KT2442	R2A* oder NB	30
Trako	R2A* mit 30 µg/ml Kanamycin	20 – 30
Transkonjugant11.1	R2A* mit 30 µg/ml Kanamycin	20 – 30

Zur Herstellung des Inokulums wurde mit einer sterilen Impföse eine Kolonie vom Agar abgehoben bzw. ein Aliquot der gefrorenen Kultur entnommen und das dem

Stamm entsprechende Medium inokuliert. Die Inkubation erfolgte auf dem Schüttler bei 120 rpm. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Kulturen in der spät-logarithmischen Wachstumsphase durch Zentrifugation für 10 – 30 min. bei 9000 - 13000 rpm. geerntet, in dem folgenden Medium gewaschen, in der gewünschten Konzentration resuspendiert und dem Kulturgefäß zugegeben. Je nach Volumen der Kultur wurden Eppendorf-Reaktionsgefäße, SS34 und GSA-Zentrifugengefäße in den entsprechenden Rotoren bzw. Zentrifugen verwendet (Eppendorf Centrifuge 5403, Sorvall RC 5B Refrigerated Superspeed Centrifuge).

Erstellen von Glycerinkulturen

Kulturen der frühen exponentiellen Phase mit einer optischen Dichte (OD) von 0,3 – 0,4 bei einer Wellenlänge (λ) von 580 nm wurden in sterile Röhrchen mit Schraubverschluß (Nunc, Roskilde, Dänemark) überführt, 10 min. mit 10 – 15 % sterilem Glycerin inkubiert, in flüssigem Stickstoff oder Trockeneis eingefroren und bei –80 °C gelagert.

Cryokulturen

Flüssigkulturen der spät-logarithmischen Phase wurden entsprechend dem Protokoll zur Stammhaltung bakterieller Kulturen eingefroren (Microbank^{TM}) und bei -20 °C gelagert.

2.3.3 Selektive Kultivierung und Kultivierung

Um *P. putida* KT2442, *P. putida* FH1 und Rezipienten des Plasmids pJB20 in den Proben selektiv zu kultivieren oder nachzuweisen, wurden die entsprechenden Proben auf Pseudomonas-AgarF, Cetrimid-Agar bzw. R2A*+Kan(50)-Agar ausplattiert. Die Agarplatten wurden 1 d bei 30 °C und weitere 6 d bei RT inkubiert. Während sich die Kolonien von *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442 in der Regel nach 1 d gebildet hatten, wuchsen die meisten authochthonen Bakterien langsamer. Nach 7 d änderte sich die Zahl der KBE/ml in den meisten Fällen nicht mehr. Ggf. wurde die Inkubationszeit bei RT weiter verlängert. Die Agarplatten wurden daher mindestens 2 mal, nach 1 d und 6 d ausgewertet und die jeweils höchste Zahl der fraglichen Kolonien gewertet. Pseudomonas-AgarF-Platten wurden mit Hilfe einer Standard-UV-Lampe (λ = 312 nm; Fröbel Labor-Technik, Wasserburg) ausgewertet. *P. putida* Kolonien waren durch das auf Pseudomonas-AgarF verstärkt gebildete

Fluorescein von der Begleitflora zu unterscheiden. Auf Cetrimid-Agar wurde das Wachstum der *P. putida* Begleitflora durch das enthaltene N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid (Cetrimid) unterdrückt. Auf R2A*+Kan(50)-Agar konnten authochthone Mikroorganismen mit natürlicher Kanamycin-Resistenz sowie *P. putida* FH1 und Rezipienten des Plasmids pJB20 wachsen. *P. putida* FH1 und Rezipienten des Plasmids pJB20 konnten durch die Expression des GFP mit Hilfe des Epifluoreszenzmikroskops auf Kolonieebene detektiert werden.
In allen Experimenten wurde ein Teil der Proben auf dem nicht-selektiven Medium R2A* ausplattiert, um die Gesamtzahl kultivierbarer Bakterien zu bestimmen. Das Protokoll war bis auf das andere Medium gleich der selektiven Kultivierung. Die Platten wurden ausschließlich bei RT inkubiert, um den Lebensbedingungen der authochthonen Bakterien eher zu entsprechen. Die Zahl der *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442 Kolonien wurde dadurch nicht beeinflußt. Die Auswertung erfolgte nach 2 und 7 d.

2.4 Bestimmung der Gesamtzellzahl

Durch Hicks *et al.* (1992) wurde die gleichzeitige *in situ* Hybridisierung mit Fluoreszenz markierten Sonden und Färbung der Probe mit 4‘,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) erstmals beschrieben. In dieser Arbeit wurde DAPI sowohl im Anschluß an die Hybridisierung als auch einzeln zur Bestimmung der Gesamtzellzahl eingesetzt.

Biofilme: Biofilme wurden entsprechend ihrer Fläche und Dicke mit 5 bis 50 µl DAPI-Lösung (1 – 10 µg/ml in deion. Wasser) bedeckt. Die Lösung wurde 10 min im Dunklen inkubiert und dann vorsichtig mit Wasser abgespült. Nach dem Trocknen wurden die Zellen in Citifluor (Citifluor Ltd. London, GB) eingebettet, um das schnelle Ausbleichen der Fluoreszenz zu vermeiden.

Planktonische Zellen: Zellsuspensionen wurden durch Mikrofiltration (Filtriereinheit: Sartorius, Göttingen) auf Filter aus Polycarbonat (Porendurchmesser 0,2 µm, Schleicher&Schüll; Stützfilter, Sartorius) konzentriert. Die Filter wurden dann auf Objektträger gegeben, mit 20 µl DAPI-Lösung (siehe oben) bedeckt, in Citifluor eingebettet und 10 min im Dunklen inkubiert.

Die Zellzahl von mindestens 10 Zählfeldern, gleichmäßig über den Biofilm oder den Filter verteilt, wurde bestimmt. Dabei wurden mindestens 1000 Zellen ausgewertet, um die Zellzahl auf der Oberfläche oder in der Suspension zu ermitteln.

2.5 *In Situ* Hybridisierung

2.5.1 Fixieren der Zellen

Biofilme: Glas-, PE- und Polycarbonatträger wurden aus dem jeweiligen Reaktor entnommen und die anheftenden Zellen in 3,7 %iger Formaldehydlösung (v/v) 1 h bei 4 °C fixiert. Die Formaldehydlösung wurde dann vorsichtig mit PBS abgespült und die Biofilme an der Luft getrocknet.

Planktonische Zellen: Die planktonischen Zellen wurden wie zur Bestimmung der Gesamtzellzahl durch Mikrofiltration auf Polycarbonatfilter konzentriert (siehe 2.4). Die Fixierung der Zellen wurde entweder in der Filtriereinheit oder in Petrischalen durchgeführt. Die entsprechenden Lösungen wurden auf den Filter gegeben und nach der Inkubationszeit mit Unterdruck abgezogen bzw. abgespült. Aufeinander folgten 1 h Inkubation in 3,7 %iger Formaldehydlösung bei 4 °C, spülen mit PBS und Dehydrieren der Zellen in 50, 80 und 96 %igem Ethanol je 3 min.

Zellsuspensionen: Zellsuspensionen wurden für 2 min bei 13000 rpm. abzentrifugiert. Das Pellet von 1 bis 2 ml Kultur wurde in 1 ml 3,7 %iger Formaldehydlösung resuspendiert und 1 bis 4 h bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, in PBS:absolutem Ethanol (1:1) resuspendiert und bei - 20 °C gelagert.

2.5.2 *In situ* Hybridisierung

Die Hybridisierungen wurden bei 46 °C für 1,5 bis 4 h in einer Feuchtekammer (Manz *et al.*, 1992) durchgeführt. Die Oligonucleotid-Sonden (Metabion, Martinsried; Interactiva, Ulm; Biometra, Göttingen und Tib Molbiol, Berlin) wurden in einer Endkonzentration von 5 ng/µl eingesetzt. Die Hybridisierungslösung enthielt außerdem 0,9 M NaCl, 20 mM Tris/HCl (pH 8,0), 0,01 % SDS und 20, 35, 40 oder 50 % Formamid (Roth). Der Anteil an Formamid bestimmte die Stringenz der Hybridisierungslösung. Anschließend an die Hybridisierung wurden Objektträger, Biofilme oder Filter 15 min bei 46 °C in der Waschlösung gewaschen. Die

Waschlösung bestand aus 20 mM Tris/HCl, 0,01 % SDS und 250, 88, 62,4 bzw. 31,4 mM NaCl, entsprechend 20, 35, 40 und 50 % Formamidstringenz. Die Stringenz von Hybridisierungs- und Waschlösung war jeweils gleich. Die Waschlösung wurde mit deion. Wasser abgespült, die Hybridisierungen im Dunklen getrocknet, ggf. zur Bestimmung der Gesamtzellzahl mit DAPI gefärbt (siehe 2.4) und vor dem Betrachten in Citifluor eingebettet.

Biofilme: Die Biofilme wurden vor der *in situ* Hybridisierung je 3 min in 50, 80 und 96 %igem Ethanol inkubiert, um die Zellen zu dehydrieren. Die Biofilme wurden dann mit Klebeband oder Hybridisierungslösung auf einem Glasobjekträger fixiert, mit Hybridisierungslösung bedeckt und inkubiert. Zum Waschen wurden die Biofilme in auf 46 °C vorgewärmte Petrischalen mit Waschlösung gegeben.

Planktonische Zellen: Filter und Filtersegmente wurden mit Hybridisierungslösung auf einem Glasobjektträger fixiert, mit Hybridisierungslösung überschichtet und wie beschrieben inkubiert. Zum Waschen wurden die Filter in auf 46 °C vorgewärmte Petrischalen mit Waschlösung gegeben.

Zellsuspensionen: Je 10 µl fixierte Zellsuspension wurde auf eine Aussparung des Hybridisierungsobjektträgers (Marienfeld, Bad Mergentheim) gegeben und bei 46 °C getrocknet. Die Zellen wurden dann in 50, 80 und 96 %igem Ethanol je 3 min dehydriert. 10 µl Hybridisierungslösung wurde je Aussparung aufgetragen und die Hybridisierung wie beschrieben durchgeführt. Bis zu acht Hybridisierungen gleicher Stringenz waren parallel auf einem Objektträger möglich.

2.5.3 Sonden

Die in den *in situ* Hybridisierungen verwendeten Sonden sind in der Tabelle 3 mit der Nomenklatur nach Alm *et al.* (1996), Zielgruppe und Stringenz aufgelistet.
Die Sonde PPU646 wurde durch Herrn Dr. W. Manz, Technische Universität Berlin, für diese Arbeit entwickelt. Ihre Sequenz lautet 5‘-CTA CCG TAC TCT AGC TTG-3‘.

Tabelle 3: Liste der eingesetzten rRNA-Sonden

Standardisierter Sondenname	Abkürzung	Zielorganismen	Formamid (%)	Referenz
S-D-Bact-0338-a-A-18	EUB 338	Domäne Bacteria	20%	Amann 1990
S-Sc-aProt-0019-a-A-17	Alf1b	α-*Proteobacteriaceae*	35	Manz 1992
L-Sc-bProt-1027-a-A-17	Beta42a	β-*Proteobacteriaceae*	35	Manz 1992
S-St-IsoB4-0633-a-A-19	beta 4	*A. citratiphilum*	30/40	Kalmbach 1997b
S-St-IsoB6-0633-a-A-22	Beta6	*A. parvum*	30/40	
S-St-IsoB8-0069-a-A-19	Beta8b	*A. commune*	30/40	
L-Sc-gProt-1027-a-A-17	Gam42	γ-*Proteobacteriaceae*	35	Manz 1992
S-P-CyFla-0319-a-A-18	CF319a	Cytophaga-Flavobacter-Gruppe	35	Manz 1996
S-P-HGC-1901-a-A-18	HGC69a	Gram-positive mit hohem GC-Gehalt	35	Roller 1994
S-G-Dsv-0689-a-A-20	DSV689	*Des. salexigens*	35	Manz 1998
S-G-Dsv-1292-a-A-18	DSV1292	*Des. desulfuricans*	35	
S-D-Arch-0915-a-A-20	ARCH915	Domäne *Archae*	20	Stahl 1991
S-Ss-P.puA-0986-a-A-19	PP986	*P. putida*, *P. stutzeri*	30	Møller 1996
S-Ss-P.puA-0646-a-A-18	PPU646	*P. putida*	30	Manz, unveröff.

2.6 Biofilmreaktoren und Versuchsdurchführung

2.6.1 Biofilmreaktoren

Das Material für alle Biofilmreaktoren wurde, wenn nicht anders angegeben, über die Firma Ochs, Bovenden-Lenglern, bezogen.

2.6.1.1 Batch System

Minireaktor: Autoklavierbare 50 ml Kunststoffreaktionsgefäße (TPP, Schweiz) wurden mit sterilen Objektträgern aus Glas bestückt und mit 50 ml Medium befüllt. In den zylinderförmigen Reaktoren waren die Trägeroberflächen senkrecht angeordnet; die Reaktoren wurden in Längsrichtung bei 120 rpm. geschüttelt. Die Minireaktoren wurden für die Auswahl der Modellorganismen und einige weitere Experimente zu Beginn der Arbeit verwendet.

2.6.1.2 Kontinuierliche Systeme

15 ml Reaktionsgefäße: 15 ml Reaktionsgefäße (TPP, Schweiz) wurden mit einer Kanüle (0,9x20 mm) als Zulauf und einem Silikonschlauch (Innendurchmesser 1 mm) als Ablauf versehen und autoklaviert. Sterile Objektträger aus Glas wurden in Stücke gleicher Größe zerteilt und als Substratum in den Reaktor eingebracht. Der Reaktor wurde mit Medium befüllt und inokuliert. Nach 1 h wurde das Inokulum ausgespült und der Reaktor mit einer Flußrate von 5 ml/h betrieben. Die Biofilme wurden zur Auswertung mit einer sterilen Pinzette entnommen. Diese Biofilmreaktoren wurden für die Entwicklung künstlicher Trinkwasserbiofilme eingesetzt.

Robbins Device: Die Robbins Device (siehe Abbildung 1, Mitte), entwickelt durch McCoy *et al.* (1981), wurde in der durch Kalmbach *et al.* modifizierten Form (1997a) verwendet. Der Biofilmreaktor mit einem Volumen von 3,18 l war über die Hausinstallation direkt an das Berliner Trinkwassernetz angeschlossen und wurde mit einem Durchfluß von 1,8 l/h als kontinuierliches System betrieben. Siebbleche vor und hinter dem Reaktorraum sorgten für eine gleichmäßige Durchströmung des Reaktors. 10 Aufwuchsflächen aus Polyethylen-Folie (PE), (neolab, Heidelberg) à 10x50 mm^2 wurden, gestützt durch jeweils einen Glasträger gleicher Größe, mittels Schrauben (Gewinde M20) in den Reaktorraum eingebracht und konnten unabhängig voneinander entnommen werden. Die Aufwuchsflächen waren mit Hilfe je einer kleinen Schraube und einem 10x10 mm^2 großen Metallplättchen an der

Spitze der Reaktorschrauben befestigt. Durch die mechanische Befestigung des Trägermaterials im Reaktor wurde das Austreten potentieller Nähr- oder Schadstoffe aus Klebern vermieden.

1l Biofilmreaktor: Der 1l Biofilmreaktor wurde in allen semi-batch Biofilmexperimenten eingesetzt und ist dort ausführlich beschrieben. Für die Trinkwasserexperimente mit *P. putida* FH1 wurden die Aufwuchsflächen aus Polyethylen-Folie zunächst in der Robbins Device exponiert, nach 14 d in den mit Trinkwasser gefüllten Biofilmreaktor überführt und dieser an die Trinkwasserleitung angeschlossen (Durchfluß 0,1 l/h). Während in der Robbins Device der Durchfluß gleichzeitig die Durchmischung des Systems bewirkte, war im Biofilmreaktor die Durchmischung unabhängig von der Durchströmung.

2.6.1.3 Semibatch System

1l Biofilmreaktor: Der Biofilmreaktor (Abbildung 1, rechts), bestehend aus Glasgefäß und Edelstahldeckel, mit einem Volumen von 1,18 l, wurde in semi-batch Verfahrensweise betrieben. Das Glasgefäß (Höhe 75 mm, lichte Weite 150 mm) hatte einen Planflansch als oberen Abschluß, in den eine Nut für den Dichtungsring (Durchmesser 160 mm) gefräst war (Fertigung durch die Firma Ochs). Der Deckel aus VA-Stahl (Dicke 8 mm, fein ausgebrannt) wurde mit Hilfe einer Spange auf den Reaktor geklemmt. Zu- und Ablauf waren in der Mitte des Deckels angeordnet. Auf einem Radius, in gleichem Abstand zueinander, konnten 7 Schrauben, in denen die Trägeroberflächen befestigt waren, unabhängig voneinander eingebracht und ausgetauscht werden (Fertigung des Deckels durch die Werkstatt des Instituts für Verfahrenstechnik, Technische Universität Berlin). Für die Robbins Device und den Biofilmreaktor wurden dieselben Schrauben verwendet. Je zwei Biofilmreaktoren waren mit einem Vorratsgefäß (Inhalt 10 l) verbunden. Das Reaktorsystem wurde mit Aluminiumfolie gegen Licht abgedichtet. Das Medium wurde mit einer Rate von 0,1 l/h durch das System gepumpt (Schlauchpumpe IPC-8V2.00, Ismatec, Friedrichsdorf) und in den Reaktoren durch Magnetrührer zusätzlich durchmischt. Der Aufbau von Reaktoren und Vorratsgefäß ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt.

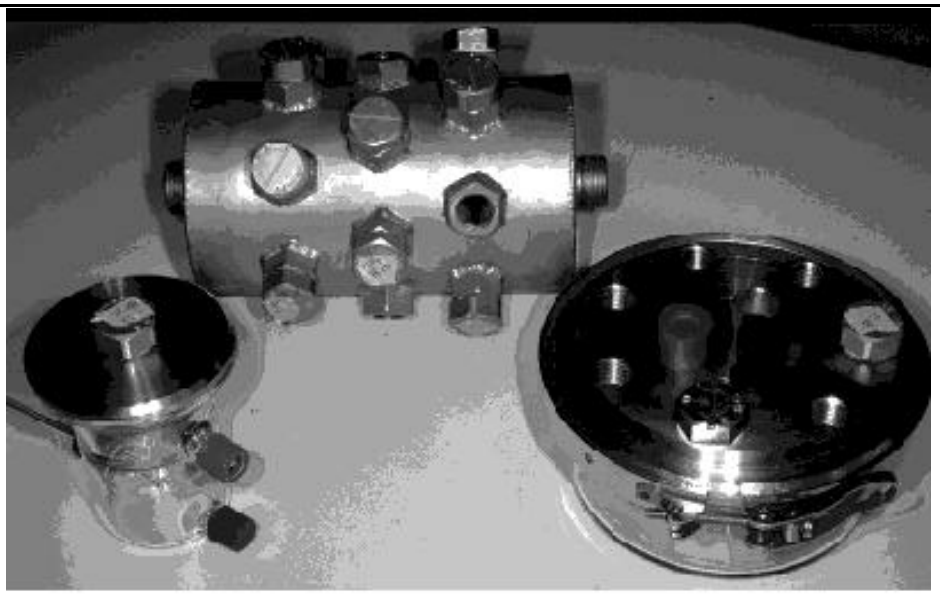


Abbildung 1: In der Mitte ist die Robbins Device, rechts der 1l Biofilmreaktor abgebildet.

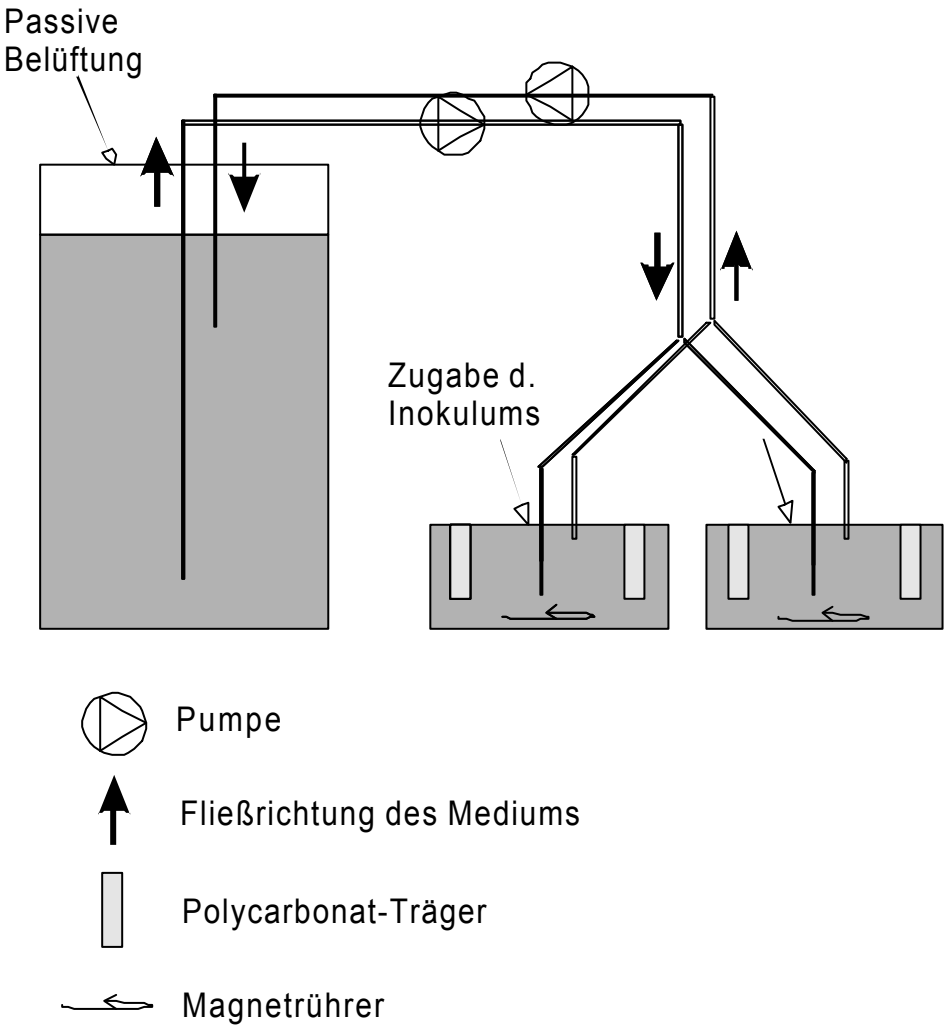


Abbildung 2: Dargestellt ist der Aufbau einer Biofilmreaktoranlage, wie sie für die Experimente mit Landwehrkanalwasser als Substrat verwendet wurde. Je eine entsprechende Anlage wurde mit *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442 inokuliert, nachdem sich die Biofilme der authochthonen Flora auf den Polycarbonat-Trägern ausgebildet hatten.

2.6.2 Trägermaterial

Als Trägermaterial wurde transparentes Glas, Polyethylen und Polycarbonat eingesetzt. Das Polycarbonat stellte Herr Dr. T. Neu, Umwelt Forschungszentrum Magdeburg, zur Verfügung. Die Oberflächen wurden mit 70 %igem Ethanol desinfiziert und zusätzlich durch 10 minütige Bestrahlung mit UV-Licht (Handlampe) sterilisiert.

2.6.3 Zugabe des Inokulums

Die Zugabe des Inokulums in die Biofilmreaktoren erfolgte in steriles Medium oder nachdem sich ein authochthoner Biofilm ausgebildet hatte. Die Vorkulturen wurden mit dem neuen Medium gewaschen, in der gewünschten Konzentration aufgenommen und zu dem jeweiligen Biofilmreaktor zugegeben. Um eine gleichmäßige Verteilung der Vorkulturen in den Reaktoren zu gewährleisten, wurde der 50 ml Biofilmreaktor nach der Zugabe geschwenkt bzw. die Robbins Device halbstündlich gewendet. Im Biofilmreaktor wurde das Inokulum durch den Magnetrührer gleichmäßig verteilt.

2.6.4 Probenahme und Auswertung

In allen Systemen wurde der Durchfluß durch den jeweiligen Reaktor vor der Entnahme der Biofilme gestoppt. Die Biofilme wurden mit der Pinzette aus den 15- und 50 ml Biofilmreaktoren bzw. nach dem Lösen der Schraube mit dieser aus der Robbins Device und dem 1l Biofilmreaktor entnommen. Die entnommenen Stücke wurden ganz oder nach dem Abtrennen mit Hilfe einer Schere oder einem Skalpell wie im folgenden beschrieben ausgewertet.

Struktur und GFP-Expression: Die Biofilme wurden entnommen und direkt mikroskopiert. Für jegliche mikroskopische Auswertung in der vorliegenden Arbeit wurden die Epifluoreszenzmikroskope Axioplan bzw. Axioskop (Zeiss, Oberkochen) verwendet. Das Phasenkontrast-Linsensystem ermöglichte die Detektion einzelner Bakterienzellen in den nativen Biofilmen, indem es die Dichteunterschiede zwischen Mikroorganismus und Umgebung verstärkte. Mikroskopisch sichtbare Charakteristika der nativen Biofilme waren die Art der Oberflächenbedeckung und besondere Zell- bzw. Wuchsformen. Die Mikroskope waren mit einer 50 W Quecksilberhöchstdrucklampe ausgestattet, um die Fluoreszenz der Oligonucleotidsonden, des DAPI und des GFP anregen zu können und damit die entsprechend gefärbten bzw. markierten Zellen sichtbar zu machen. Die für die

Fluoreszenzmikroskopie genutzten Filter und ihre Eigenschaften sind in der Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4: Kenndaten der zur Epifluoreszenzmikroskopie verwendeten Filtersysteme

Name	Verwendung	Anregungs- bzw. Bandpassfilter	Farbteiler	Emissions-Filter	Hersteller
01	DAPI	365 nm	395 nm	520 nm	Zeiss
09	Fluos, GFP	450-490 nm	510 nm	520 nm	Zeiss
15	Cy3, CTC	546 nm	580 nm	590 nm	Zeiss
41007 HQ-LichtFilter	CY3, Nilblau	535-550 nm	565 nm	610-675 nm	AF Analys.-technik

Zum Zählen und Messen der Zellen wurden Zählokulare verwendet. Die eingeschliffenen Zählkreuze hatten 100 Felder auf einer Größe von 0,01 mm^2 bzw. 0,015625 mm^2. Die Skalierung wurde mit einem entsprechend markierten Objektträger abgeglichen. Für Farbaufnahmen wurden Kodak Panther 1600 Diafilme, für Schwarz-Weiß-Fotos Ilford 400 ASA-Filmen verwendet. Wie aus der Tabelle 4 ersichtlich, wurden die GFP-Moleküle bei 450 – 490 nm angeregt. Die Zahl der GFP exprimierenden Zellen pro Fläche war die Zählgröße im nativen Biofilm.

Phylogenetische Zusammensetzung: Die Biofilme wurden mit spezifischen 16 S rRNA Sonden hybridisiert, um die Anteile bestimmter phylogenetischer Gruppen und Spezies an der Biofilmgemeinschaft zu ermitteln. Die Übereinstimmung von GFP-Expression und PPU646-Sondensignal wurde für die entsprechenden Zellen überprüft.

Kultivierbarung der Biofilmzellen: Die Biofilmzellen wurden mit Hilfe eines sterilen Kunststoffspatels von der Oberfläche abgelöst und in R2A* resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden für 1 min auf höchster Stufe gevortext, dekadisch verdünnt und ausplattiert (siehe 2.3.3). Die Gesamtzellzahl in der Suspension wurde bestimmt (siehe 2.4). Als Wiederfindungsrate wurde der Quotient aus der Gesamtzellzahl in der Abkratzsuspension und der Gesamtzellzahl im Biofilm bezeichnet.

Aktivierung von Biofilmzellen: Um die Nachweisbarkeit von *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1 zu verbessern, wurden Biofilme bis zu 14 Stunden in 0,1 % Nährmedium

inkubiert. Einzelne Biofilme wurden nach der Entnahme aus dem Reaktor 1-18 Stunden in Cetrimid-Medium oder R2A*+Kan(50) inkubiert, um *Pseudomonas* sp. bzw. spezifisch *P. putida* FH1 und Rezipienten des Plasmids pJB20 anzureichern. Die Biofilme wurden nach der Inkubation nativ sowie nach *in situ* Hybridisierung ausgewertet.

Flüssigphase: Die korrespondierende Flüssigphase wurde parallel zu den Biofilmen, wie für die Flüssigkulturen beschrieben (siehe 2.7), beprobt.

2.7 Flüssigkulturen

In batch Verfahrensweise in Erlenmeyerkolben geschüttelte Kulturen (120 rpm., Schüttler: Braun, Melsungen) wurden als Flüssigkulturen bezeichnet. Es wurden Kolben in der Größe von 250 – 1000 ml mit Flüssigkeitsvolumina von 100 – 500 ml verwendet. Die Kolben wurden mit Aluminiumfolie oder gasdurchlässigen, sterilisierbaren Silikonstopfen (Ochs) verschlossen, sterilisiert und steril mit Medium befüllt. Die Zugabe des Inokulums sowie die Probenahme erfolgte unter sterilen Bedingungen.

2.7.1 Probenahme und Auswertung

Gesamtzellzahl und phylogenetische Zusammensetzung: Die Bestimmung der Gesamtzellzahl und die *in situ* Hybridisierung zur Ermittlung der phylogenetischen Zusammensetzung wurde wie unter 2.4 bzw. 2.5 beschrieben, durchgeführt.
Kultivierung: Die jeweilige Probe wurde mit dem Vortex auf höchster Stufe homogenisiert, dekadisch verdünnt, ausplattiert (siehe 2.3.3) und ausgewertet.

GFP-Expression: Die Probe wurde, wie unter 2.4 beschrieben, auf einen Filter konzentriert und die GFP-Expression der planktonischen Zellen, wie für die Biofilmzellen beschrieben (siehe 2.6.4), überprüft.

2.8 Substratverwertung

Je 3 ml Mineralmedium wurde in ein steriles Glasröhrchen gegeben, mit Substrat zu einer Endkonzentration von 5 mM versetzt und mindestens 24 Stunden ohne Inokulum inkubiert, um die Sterilität des Ansatzes zu überprüfen. Das Inokulum als

Rein- oder Mischkultur wurde dann 0,1 bis 0,33 %ig zugegeben. Das Substrat wurde als verwertbar beurteilt, wenn mindestens 2 von 3 Parallelen nach einer Inkubationszeit von 1 bis 7 Tagen durch das Wachstum der inokulierten Bakterien getrübt waren. Die Ergebnisse wurden mikroskopisch und durch *in situ* Hybridisierung überprüft.

2.9 Trinkwasser als Substrat und Inokulum

2.9.1 Das Berliner Trinkwasser: physikalisch, chemisch, mikrobiologisch

Für das Berliner Trinkwasser wurde im Jahresmittel 1996 eine Temperatur von 12 °C, ein pH-Wert von 7,4 sowie ein DOC-Wert von 3,5 mg/l gemessen. Es wurden 194,8 mg/l Kationen (Kalzium, Natrium, Magnesium, Kalium) sowie 270,0 mg/l Anionen (Sulfat, Nitrat, Phosphat, Nitrit, Chlorid, Fluor) bestimmt (Berliner Wasser Betriebe). Die mikrobiologischen Parameter im Berliner Trinkwassersystem wurden durch Kalmbach (1998) in ihrer Dissertation im Fachgebiet Ökologie der Mikroorganismen untersucht: Die Gesamtzellzahl in der planktonischen Phase wurde mit $1{,}3 \times 10^5$ – $2{,}8 \times 10^5$ Zellen/ml bestimmt. Auf Polyethylen siedelten sich $7{,}5 \times 10^3$ – $4{,}2 \times 10^4$ Zellen/mm^2 an. Die planktonische Phase setzte sich aus 23 % *Eubacteria*, 15 % beta-*Proteobacteria*, 4 % alpha-*Proteobacteria* sowie 1 % gamma-*Proteobacteria* zusammen. Die phylogenetische Zusammensetzung der Biofilme war abhängig von der Oberfläche und dem Alter: Auf transparenter Polyethylenfolie sank nach der initialen Anheftung bis zum 28. Tag die Zahl der *Eubacteria* von 90 auf 75 %, die Zahl der beta-*Proteobacteria* lag wenige Prozentpunkte darunter. Nach ca. 50 Tagen wurden die Minimalwerte von 50 % (*Eubacteria*) bzw. ca. 40 % (beta-*Proteobacteria*) bestimmt. Im gesamten Zeitraum war der Anteil der gamma-*Proteobacteria* kleiner als 5 % (Kalmbach, 1998).

2.9.2 Flüssigkulturen in Trinkwasser

Vor der Verwendung in Flüssigkulturen wurden die authochthonen Trinkwasserbakterien durch Filtration mit Filtern der Porengröße 0,2 µm weitgehend abgetrennt oder durch Autoklavieren abgetötet.

2.9.3 Trinkwasserbiofilme

Die Robbins Device wurde an die Trinkwasserleitung angeschlossen. Auf den Polyethylen-Oberflächen bildeten sich Biofilme aus. Nach 4 bis 28 Tagen wurde *P.*

putida KT2442 inokuliert. *P. putida* FH1 wurde wie unter 2.6.1.2 beschrieben im 1l Biofilmreaktor untersucht.

2.10 LW-Wasser als Substrat und Inokulum

Der Landwehrkanal in Berlin ist ein mit Binnenschiffen befahrener innerstädtischer Seitenarm der Spree. Chemische, physikalische und biologische Daten des Gewässers werden monatlich durch den Berliner Senat für Umweltschutz aufgenommen. Die Tabelle 5 zeigt die Mittelwerte sowie Minimal- und Maximalwerte ausgewählter Meßgrößen für den Zeitraum von Dezember 1998 bis September 1999. Der Meßpunkt Dovebrücke liegt in unmittelbarer Nähe der Entnahmestelle des Landwehrkanalwassers für diese Arbeit. Vor der Entnahme wurden die Kanister mit Landwehrkanalwasser gespült. Vor der Verwendung in den Experimenten wurde das Landwehrkanalwasser durch ein Planktonnetz (28 µm Porengröße) filtriert, um Schwebstoffe und grobe Verunreinungen zu entfernen („frisches LW-Wasser“).

Tabelle 5: Physikalische, chemische und biologische Parameter des Landwehrkanalwassers, gemessen am Meßpunkt Dovebrücke, Berlin

Parameter (Einheit)	Mittelwerte und Minimal-Maximalwerte für 12/1998-9/1999
Wassertemperatur (°C)	11,3 (0,9/20,7)
Sichttiefe (cm)	83 (100/60)
Sauerstoffgehalt (mg/l)	8,8 (3,0/14,9)
pH-Wert	7,7 (7,3/8,3)
TOC (mg/l)	8,1 (6,4/10,6)
DOC (mg/l)	7,6 (6/10,0)
Chrom, Cadmium, Blei, Arsen	unterhalb der Nachweisgrenze
Sulfat (mg/l)	157 (151/165)
Chlorid (mg/l)	69 (50/106)
Nitrat (mg/l)	2,4 (1,1/4,6)
Ammonium (mg/l)	0,41 (0,02/0,79)
Phosphat (mg/l)	0,082 (0,015/0,16)
Nitrit (mg/l)	0,06 (0,03/0,14)
AOX (µg/l)	16 (11/22)
Calcium (mg/l)	91,2 (82/102)
Natrium (mg/l)	49,8 (89/33,6)
Kalium (mg/l)	13,1 (6,8/29,0)
Magnesium (mg/l)	11,0 (9,87/12,0)
E.coli–Titer (Keime/ml)	0,03 (0,005/0,01)
Coliforme-Titer (Keime/ml)	0,04 (0,005/0,01)

2.10.1 Flüssigkulturen in LW-Wasser

Vor der Verwendung in Flüssigkulturen wurde das LW-Wasser durch Filter der Porengröße 0,45 µm filtriert, um Protozoen abzutrennen. Wenn nicht anders angegeben, wurde ein Kulturvolumen von 250 – 300 ml LW-Wasser mit 10^6 Zellen/ml *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442 inokuliert.

Nach 28 Tagen hatten sich die Kulturen an das LW-Wasser adaptiert und die Zellzahlen veränderten sich nur noch langsam (siehe auch Abbildung 10 im Ergebnisteil). Der Zeitraum von 28 Tagen wurde als Kompromiß zwischen ausreichender Adaption der Zellen und Praktikabilität betrachtet. Kulturen mit einer Inkubationszeit von 28 Tagen in LW-Wasser wurden als *stationär* bezeichnet und als solche in Folgeexperimenten eingesetzt.

Wechselseitiger Streßschutz: Für *P. putida* KT2442 war die Fragmentierung in kokkoide Teilzellen als Reaktion auf eine streßauslösende Umgebung, wie z. B.

Kohlenstoff-Mangel, beschrieben worden (Givskov *et al.*, 1994). Das gleiche Phänomen wurde für *P. putida* FH1- bzw. *P. putida* KT2442-Kulturen nach der Zugabe in LW-Wasser beobachtet, sodaß angenommen wurde, daß das Medium streßauslösend sein könnte. Es konnte nachgewiesen werden, daß gestreßte Kulturen sich gegenüber einem zweiten Streßfaktor resistenter verhielten (Givskov *et al.*, 1994). Durch den Nachweis der erhöhten Resistenz gegenüber einem zweiten Streßfaktor sollte gezeigt werden, daß LW-Wasser für die Modellorganismen als erster Streßfaktor wirkte. In LW-Wasser inkubierte Kulturen von *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1 wurden zusätzlich eingefroren und ihre Kultivierbarkeit vor dem Einfrieren sowie nach dem Auftauen verglichen. Je 5 ml der jeweiligen Kulturlösung wurde zu jedem Probezeitpunkt direkt analysiert bzw. bei – 20°C für 24 h eingefroren und nach dem Auftauen analysiert. Die Analyse umfaßte die Bestimmung der Gesamtzellzahl, der Zahl spezifischer PPU646-Signale und die selektive Kultivierung (siehe 2.4, 2.5 und 2.3.3).

2.10.2 Adhäsion von *P. putida* FH1 an Flocken

LW-Wasser wurde 200 fach aufkonzentriert (Zentrifugation bei 13000 rpm.) und *P. putida* FH1 mit 10^7 Zellen/ml zugegeben. Nachdem die 1 ml-Adhäsionsansätze 5, 15 bzw. 30 min auf höchster Stufe mit dem Vortex durchmischt worden und die Flocken nach weiteren 15 min sedimentiert waren, wurde der Überstand abgenommen und zu gleichen Teilen mit Glyzerin versetzt. Die Konzentration GFP-exprimierender Zellen im Überstand sowie die Anlagerung der Zellen an die Flocken wurde mikroskopisch bestimmt bzw. ausgewertet.

2.10.3 Landwehrkanal-Biofilme

Autoklavierte 1 l Biofilmreaktoren wurden mit sterilen Polycarbonatoberflächen bestückt, mit LW-Wasser befüllt und an das Vorratsgefäß angeschlossen, dessen Inhalt zweimal wöchentlich durch frisches LW-Wasser ersetzt wurde. Nach 4 bis 14 Tagen wurden die inzwischen entstandenen Biofilme durch die Zugabe der Vorkulturen in die Reaktoren mit *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442 inokuliert. Dazu wurden die Inokula vor der Zugabe 1000fach konzentriert, um mit einem kleinen Inokulumvolumen die gewünschte Endkonzentration in den Reaktoren zu erhalten. Die Zugabe erfolgte durch eine der zusätzlichen Bohrungen im Reaktordeckel. Nach dem Ausspülen des Inokulums wurde das Medium erneuert. Die Biofilmreaktoren wurden über eine Zeit von bis zu 200 Tagen betrieben.

Bestimmt wurden nach mikroskopischer Auswertung die Zahl der GFP-exprimierenden Zellen im Biofilm und die phylogenetische Zusammensetzung der Biofilme, die Zahl der kultivierbaren Biofilmzellen und der Gentransfer im Biofilm. Die Flüssigphase wurde beprobt, um die Gesamtzahl der *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1-Zellen in den Reaktorsystemen zu bestimmen.

2.11 Transfer des Plasmids pJB20 in Trinkwasserisolate

2.11.1 Selektion Rifampicin-resistenter Mutanten:

Vor Beginn der Konjugationsexperimente war die Wahl einer geeigneten Selektionsbedingung für die Transkonjuganten erforderlich. Nachdem Versuche, ein geeignetes Substrat zu finden, erfolglos verliefen, wurden *A. commune* und *A. citratiphilum* Kulturen auf Rifampicin-resistente Mutanten selektiert: Übernachtkulturen der beiden Spezies wurden auf R2A*-Platten, denen Rifampicin in den Konzentrationen 0, 10, 25, 50, 75 und 100 µg/ml zugesetzt war, ausplattiert und bei RT 7 Tage inkubiert. Rifampicin-resistente Mutanten wurden zweifach auf R2A*+50 µg/ml Rifampicin passagiert und durch stammspezifische Hybridisierung (Kalmbach *et al.*, 1997a) überprüft, bevor sie in den Konjugationen eingesetzt wurden. Die physiologische Aktivität der Mutanten im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp wurde anhand der Wachstumsgeschwindigkeit, Koloniegröße, -form und –farbe auf R2A*-Agar bestimmt.

2.11.2 Triparentale Kreuzung, Konjugation und Filter-Kreuzung:

Um das *gfp*- bzw. *bfp*-Gen in das Chromosom der Trinkwasserbakterien zu integrieren, wurde eine triparentale Konjugation mit *E. coli* JB 315 bzw. *E. coli* JB 122 als Donor und *E. coli* SM 1279 als Helfer durchgeführt. Mit *P. putida* FH1 als Donorstamm sollten die Trinkwasserstämme einen weiterhin transferierbaren Marker erhalten.

Die Versuchsdurchführung war für das triparentale Mating und die biparentale Kreuzung im Prinzip gleich. Übernachtkulturen von Donor, Helfer und Rezipienten wurden 4 min bei 7000 rpm. abzentrifugiert. Die Pellets wurden zweimal mit 0,9 %iger NaCl bzw. R2A* gewaschen und anschließend in 0,9 %iger NaCl bzw. R2A* aufgenommen. Die Zellsuspensionen von Donor und Helfer wurden bis 10^{-6} verdünnt, die Zellsuspensionen der Rezipienten wurden unverdünnt eingesetzt. Die

Zellsuspensionen wurden gemischt, wobei sich die Zellzahlen von Donor und Rezipient wie 1:3 – $1:10^6$ verhielten. Donor und Helfer wurden im Verhältnis 1:1 eingesetzt. Die Konjugationsansätze wurden direkt als Tropfen auf eine R2A*-Platte ohne Antibiotika-Zusätze gegeben und 12 – 48 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die auf den Konjugationsplatten gewachsenen Kolonien wurden mit Hilfe einer sterilen Glaspipette auf den Selektivplatten R2A*+Kan(50)+50 µg/ml Rifampicin ausgestrichen. Die GFP-Expression der Kolonien und der Einzelzellen wurde mit dem Epifluoreszensmikroskop überprüft und potentielle Transkonjuganten mehrfach passagiert. Die Identität der Transkonjuganten wurde durch spezifische Hybridisierung überprüft.

Im Fall der Kreuzung auf dem Filter wurden die Konjugationsansätze auf einen sterilen Filter pipettiert, der zuvor auf eine R2A*-Platte gelegt worden war und so inkubiert. Die Kolonien der potentiellen Transkonjuganten wurden dann mit dem Filter in 0,9 %ige NaCl übertragen und durch Vortexen von der Matrix abgelöst. Die Zellsuspensionen wurden dekadisch verdünnt, selektiv ausplattiert, inkubiert und ausgewertet.

Induktion des β-Galactosidase-Promotors: Die Transkonjuganten *A. citratiphilum*-GFP zeigten nur schwache GFP-Expression. Zur Aktivierung des *Lac*Z-Promotors wurden die Transkonjuganten in R2A* mit 1 mM Isopropylthiogalactosid (IPTG) inkubiert.

2.12 Detektion authochthoner Rezipienten

P. putida FH1 wurde als Donor des Plasmids pJB20 in den Experimenten im Trink- und LW-Wasser eingesetzt. Um authochthone Rezipienten des Plasmids zu detektieren, wurden die Proben der Flüssigkulturen und Biofilme mikroskopisch sowie nach Kultivierung untersucht. Die Zellmorphologie GFP-exprimierende Zellen wurde mikroskopisch mit *P. putida* FH1 verglichen. Zellen mit abweichender Form galten als potentielle Transkonjuganten.

Nach spezifischer *in situ* Hybridisierung mit der Sonde PPU646 wurde die Übereinstimmung mit der GFP-Expression in einer Zelle überprüft und abweichende Zellen als mögliche Rezipienten des Plasmids pJB20 betrachtet.

Alle Proben aus dem LW-Wasser bzw. den zugehörigen Biofilmen wurden auf R2A*+Kan(50)-Agar selektiv kultiviert, die GFP exprimierenden Kolonien selektiert

und ihre Morphologie und die ihrer Zellen mit der Kolonie- bzw. Zellmorphologie von *P. putida* FH1 verglichen. Zellen, die eine abweichende Kolonie- und Zellmorphologie zeigten und nach spezifischer *in situ* Hybridisierung nicht mit der Sonde PPU646, aber mit der allgemeinen Sonde EUB338 hybridisierten, wurden als potentielle Transkonjuganten angenommen.

2.13 Nachweis des Gentransfers

2.13.1 Überprüfung der Antibiotikaresistenzen

Die potentiellen Transkonjuganten wurden auf R2A*-Platten, supplementiert mit 100 µg/ml Ampicillin bzw. 10 µg/ml Tetracyclin, ausgestrichen und wie für die selektive Kultivierung beschrieben (siehe 2.3.3), inkubiert.

2.13.2 Immunologischer Nachweis des GFP

Enzymatisch-chemische Zelllyse: Zellen der spät-logarithmischen Wachstumsphase wurden gewaschen und in 0,05 M Phosphatpuffer, pH 8,0 (0,1 M Phosphatpuffer, pH 8,0: 94,0 ml 1 M K_2HPO_4, 6,0 ml 1 M KH_2PO_4, mit deion. Wasser auf 1 l auffüllen) aufkonzentriert. Alle folgenden Schritte wurden bei 37 °C durchgeführt. Lysozym (50 mg/ml in deion. Wasser) wurde zu einer Endkonzentration von 300 µg/ml zugegeben und 15 min inkubiert. DNase I, Rnase und $MgSO_4$ wurden zu Endkonzentrationen von 10 µg/ml, 10 µg/ml bzw. 10 mM zugegeben und 30 min inkubiert. EDTA (pH 8,0) wurde zu 15 mM Endkonzentration zugegeben und 15 min inkubiert. Die $MgSO_4$-Konzentration wurde auf 20 mM erhöht. Nach 15 min Inkubation wurde NaCl zu 1 M Endkonzentration zugegeben. Der Zentrifugationsschritt zum Schluß (12000 g, 10 min bei RT) diente dazu, nicht lysierte Zellen abzutrennen. Der Überstand wurde bis zur Verwendung bei – 20 °C gelagert.

Mechanischer Zellaufschluß: Der mechanische Zellaufschluß wurde mit dem FastProtein™ Blue-Kit (Bio101, Vista, USA) durchgeführt. 1 – 100 ml Zellsuspension wurden aufkonzentriert (9000 rpm) und die Pellets in 1 – 1,5 ml eisgekühltem PBS bzw. Lysepuffer (Anderson und McKay, 1983) resuspendiert. Die ersten Zellsuspensionen wurden nach dem Standardprotokoll aufgeschlossen. Abweichend wurden für die späteren Aufschlüsse die konzentrierten Zellsuspensionen mit den Aufschlußkörpern versetzt und für 5 min bei höchster Stufe in Eis gevortext. Pellet

und Überstand wurden getrennt und bis zur Verwendung bei – 20 °C gelagert.

Protein-Gelelektrophorese: Alle Schritte der Proteinauftrennung und –übertragung wurden in der Gelkammer Bio-Rad Mini Protean II™ (Bio-Rad) durchgeführt. Die Proteine der enzymatisch-chemischen Zelllyse bzw. der Gesamtextrakt wurden entsprechend dem ProSieve-Protokoll (FMC Corporation, USA) auf einem 12 %igen Trenngel bei 180 V aufgetrennt. Die Elektrophorese dauerte 40 – 90 min. Als Standard wurde der SDS-Page Standard Low Range (Bio-Rad, Kat.-Nr. 161-0304) verwendet. In der Tabelle 6 sind die Proteine des Standards mit ihren Molgewichten aufgelistet.

Tabelle 6: Der SDS-PAGE Standard, Low Range

Molgewicht [Da]	Protein
76.000	Hen egg white conalbumin
66.200	Bovine serum albumin
43.000	Bovine muscle actin
36.000	Rabbit muscle GAPDH
31.000	Bovine carbonic anhydrase
21.500	Soybean trypsin inhibitor
17.500	Equine myoglobin

Nach der Gelelektrophorese wurde eines der beiden identischen Gele in Coomassie-Blau-Färbelösung bis zum Sichtbarwerden der Proteinbanden gefärbt und dann in Entfärbelösung wieder entfärbt (Färbe- und Entfärbelösung siehe Sambrook *et al.*, 1989). Dieses Gel wurde zur Auswertung des Immuno-Blots verwendet und zur Dokumentation fotografiert.

Western Blot und Immuno-Blot: Das zweite Gel wurde parallel für den immunologischen Nachweis des GFPs verwendet. Die Übertragung der Proteine auf die Membran (Immun-Blot™ PVDF-Membran, BioRad) im Western Blot, die spezifische Bindung des GFP-Antiserums (Invitrogen, Leek, Niederlande) an die Proteine und die Bindung des 2. Antikörpers an den 1. Antikörper folgten dem Protokoll des GFP-Antiserums. Die Proteine wurden bei 100V, 150mA (Endwert 100V, 240mA) im „Sandwich“ vom Gel auf die Membran transferiert.

Alle Schritte des Immuno-Blots wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Membran wurde nacheinander 1 Stunde in Blockingpuffer, 2 Stunden in GFP-

Antikörper-Lösung (Verdünnung 1:5000, 2 µl GFP-Antiserum in 10 ml Verdünnungspuffer) und 1 Stunde in Anti-Rabbit-HRP (2. Antikörper, 1:5000 in TTBS) inkubiert. Nach der Inkubation in Blockingpuffer und GFP-Antiserum wurde die Membran 2x10 min in TTBS gewaschen, nach der Inkubation in Anti-Rabbit-HRP 3x10 min. Alle Puffer wurden dem genannten Produktprotokoll entnommen.

Nachweis des 2. Antikörpers: Die Nachweisreaktion der an den 2. Antikörper gekoppelten Meerettich-Peroxidase wurde mit dem ECL Western Blotting Analysis System entsprechend dem Produktprotokoll unmittelbar im Anschluß an den Immunoblot durchgeführt (Amersham Life Science Ltd., Großbritannien). Die für 1-60 min belichteten Röntgenfilme (Rôche Diagnostics) wurden gemäß dem Standardprotokoll (Grohmann, p. c.) mit Röntgen-Rapid-Entwickler und –Fixierlösung (Roentogen liquid, Roentogen superfix) je 5 min entwickelt und fixiert, nach gründlichem Abspülen mit Wasser getrocknet und ausgewertet.
Agarose- und Acrylamidgele wurden durch Polaroidaufnahmen (Polaplan100) oder Digitalaufnahmen dokumentiert.

2.13.3 Spezifische Amplifikation pJB20-Plasmid kodierter Gene

Entsprechend dem Protokoll von Götz *et al.* (1996) wurde die Gesamt-DNS der potentiellen Transkonjuganten und von *P. putida* FH1 mit den Primern *trf*A21/2 bzw. IncP*ori*T1/2 amplifiziert. Die Sequenzen der Primer sind im Anhang zu finden.

Zellaufschluß: Für die PCR wurden die Bakterienzellen durch heiße alkalische Lyse aufgeschlossen. Dazu wurde das Pellet von 1 ml Zellsuspension in 20 µl Lysispuffer (0,25 % SDS, 50 mM NaOH) resuspendiert und die Suspension 15 min bei 95 °C gekocht. Die Gesamt-DNS wurde dann 1:10 in AE-Puffer (QiAMP DNA MiniKit, Qiagen) verdünnt, 30 min bei 37 °C mit RNase (0,2 mg/ml) inkubiert, und entweder sofort in die PCR eingesetzt oder bei - 20°C bis zur Verwendung gelagert.

Protokoll der PCR: Ein PCR-Ansatz enthielt 1xPCR-Puffer, 3,75 - 8 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTPs (alle Boehringer), 1 - 10 nM Primer (Metabion), 1U Taq DNA Polymerase (Boehringer) und 1 - 3 µl DNA-Templett in einem Gesamtvolumen von 50 µl, aufgefüllt mit deion. Wasser. Die PCR war entsprechend Götz *et al.* (1996) programmiert (siehe Tabelle 7). Um die Amplifikation von *P. putida* FH1 spezifischer zu machen, wurde die Annealingtemperatur in den letzten PCR Läufen erhöht. Die

PCR-Produkte wurden mit Probenpuffer (Sambrook *et al.*, 1989) versetzt, auf ein 3 %iges Agarosegel (Agarose: Amresco, Ohio) aufgetragen und bei 35 - 50 V aufgetrennt. TBE diente als Gel- und Laufpuffer. Als Standard wurde der 100 δp ladder (Biozym) verwendet. Nach der Auftrennung wurden die Gele in Ethidiumbromidlösung (Sambrook *et al.*, 1989) gefärbt und unter dem UV-Schirm ausgewertet.

Tabelle 7: PCR zur spezifischen Amplifikation von pJB20

35 Zyklen	
1 min 94 °C 1 min 57 °C 1 min 72 °C	Denaturieren der doppelsträngigen DNS Binden der Primer an die DNS Elongieren durch die Polymerase
1 Zyklus	
1 min 94 °C 1 min 57 °C 10 min 72 °C	Denaturieren der doppelsträngigen DNS Binden der Primer an die DNS Elongieren durch die Polymerase
Abkühlen auf 4 °C	

2.13.4 Sequenzieren der 16 S rDNS

Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang zu finden. Für die Sequenzierung wurden die Zellen mit heißer alkalische Lyse (siehe 2.13.3) aufgeschlossen und die Gesamt-DNS mit je 0,1 nmol der universellen Primer 616V und 1492R in einem Ansatz mit 2,5 U *Taq*DNA-Polymerase, 200 µM Desoyxnukleotiden, 1xPCR-Puffer und 0,9 mM $MgCl_2$ in 100 µl Gesamtvolumen amplifiziert. Tabelle 8 zeigt das PCR-Protokoll.

Tabelle 8: PCR zur Amplifikation der GesamtDNS

1 min 94°C	Denaturieren der doppelsträngigen DNS
35 Zyklen	
30 sec 94°C 2 min 57°C 2 min 72°C	Denaturieren der doppelsträngigen DNS Binden der Primer an die DNS Elongieren durch die Polymerase
10 min 72°C	Elongieren durch die Polymerase
abkühlen auf 4°C	

Je 8 µl PCR-Produkt wurden mit 2 µl Probenpuffer (Invitrogen) und 10 µl deion. Wasser versetzt, auf ein kommerzielles 1,2 %iges Agarosegel (E-Gel™, Invitrogen)

aufgetragen und bei 70 V getrennt. Als Standard wurde MixedLadder (Invitrogen) aufgetragen. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid machte die DNS unter dem UV-Schirm sichtbar. PCR-Produkte, die auf dem Gel eine deutliche Bande zeigten, wurden mit dem QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden) entsprechend dem Produkt-Protokoll aufgereinigt. Die gereinigte DNS wurde mit den Primern 616V, 610R, nEUBV, 610V, 699R, 609V, 699V, 1492R im Thermocycler (Gene Amp PCR System 9700, PE Applied Biosciences) sequenziert. Die Cyclesequenz-Reaktion und die Aufreinigung der Produkte wurde entsprechend dem Produktprotokoll (Perkin Elmer) durchgeführt. Die Sequenzen wurden mit Hilfe des ABI Prism 310 Genetic Analyzer (PE applied Biosciences) generiert und mit Hilfe der zugehörigen Software überprüft und verknüpft.

2.13.5 Einordnen der Stämme in den phylogenetischen Stammbaum

Die phylogenetische Analyse der Sequenzen wurde mit Hilfe der ARB Software (Strunck *et al.*, über das Internet zugängig, http://isar.mpi-bremen.de) durchgeführt. Zur Absicherung der Ergebnisse wurden zusätzlich 45 Sequenzen berücksichtigt, die mit der GenBank Datenbank als nächste Verwandte von Transkonjugant11.1 bzw. Trako berechnet wurden. Die Alignment der 16S rDNS Sequenzen wurde mit der Aligner Funktion (ARB Software) durchgeführt und anhand der Übereinstimmungen der Primärstrukturen manuell korrigiert. Auf der Basis der neuen Sequenzen wurden Distanzmatrixen erstellt und diese nach Jukes und Cantor (1969) korrigiert. Die phylogenetischen Stammbäume wurden mit der Neighbour-joining Methode von Saitou und Nei berechnet (1987).

3 Ergebnisse

3.1 Laborsysteme

3.1.1 Biofilmbildung ausgewählter Organismen

Mit Nährbouillon (NB) gefüllte 50 ml Reaktionsgefäße wurden mit je 10^5 Zellen/ml *P. fluorescens* DSM 50090, *P. putida* DSM 291, *P. putida* FH1, *Ralstonia eutropha* DSM 591, *R. eutropha* JMP134 DSM 4058, *Bacillus mycoides* DSM 299 und *B. subtilis* DSM 347 inokuliert und die Biofilmbildung mit dem Phasenkontrastmikroskop und nach Färbung der Biofilme mit DAPI über 4 Tage beobachtet. *P. fluorescens*, *P. putida* DSM 291 sowie *P. putida* FH1 bildeten innerhalb von zwei Tagen einen mehrschichtigen, strukturierten Biofilm aus. Gleichzeitig lagen die planktonischen Zellen einzeln oder als Zweierketten vor. *R. eutropha* und *R. eutropha* JMP134 wuchsen unter den gewählten Bedingungen als einschichtige Biofilme, die sich voneinander nicht erkennbar unterschieden. Die planktonischen Zellen waren überwiegend einzeln. *B. mycoides* und *B. subtilis* siedelten sich im Beobachtungszeitraum auf den Trägeroberflächen aus Glas nicht an, in der Flüssigphase wurden Zellketten beobachtet.

3.1.2 Wahl der Sonde PPU646 für den spezifischen Nachweis von *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442

Die Sonden PP986 (Møller *et al.*, 1996) und PPU646 (Manz, p. c.) wurden mit den Sequenzen des Datensatzes 1998 in der ARB Datenbank mit der Probe-Match Funktion überprüft. 19 unterschiedliche *P. putida*-Sequenzen und gleichzeitig 47 weitere Sequenzen, die aus 12 verschiedenen Nicht-Zielspezies hervorgingen, wurden durch PP986 ohne Fehlpaarung detektiert. Die größte Gruppe der Nicht-Zielorganismen war *P. stutzeri* mit allein 29 Sequenzen. Die Sonde PPU646 detektierte 16 verschiedene *P. putida* Sequenzen derselben Datenbank ohne Fehlpaarung. Gleichzeitig wurden 7 weitere Sequenzen erfaßt, die aus 6 verschiedenen Nicht-Zielorganismen hervorgingen. Unter den Nicht-Zielorganismen war zweimal *Acinetobacter* sp.. Beide Sonden erfaßten theoretisch die mit *P. putida* KT2442 benachbarten Subspezies *P. putida* R1 und *P. putida* DSM291. Beide Sonden konnten praktisch für die Detektion von *P. putida* KT2442 und *P. putida* FH1

eingesetzt werden.

In Ganzzellhybridisierungen, entsprechend dem Protokoll zur Hybridisierung von Zellsuspensionen, wurde die mit dem Farbstoff Cy3-markierte Sonde PPU646 mit fixierten Zellen des Zielorganismus *P. putida* FH1 und des Referenzstammes *Oceanospirillum minutulum* DSM 6287 hybridisiert und das Bindungsverhalten bei 10 bis 50 % Formamidstringenz bestimmt. Bei einer Stringenz von 30 % Formamid konnten der Zielorganismus und der Referenzstamm, bei gleichzeitig sehr gutem Sondensignal des Zielorganismus, diskriminiert werden.

3.1.3 Biofilmbildung der Trinkwasserisolate

50 ml Reaktionsgefäße wurden mit R2A* gefüllt und mit *A. commune* DSM 11901, *A. parvum* DSM 11968, *A. citratiphilum* DSM 11900 bzw. *P. putida* DSM 291 inokuliert. Die *A. parvum* Zellen lagerten sich innerhalb von 4 Stunden auf den als Oberfläche eingebrachten Glasobjektträgern an. Die Einzelzellen hatten sich nach 21 Stunden zu Aggregaten (10 bis 100 Zellen) vergrößert, die sich im weiteren Verlauf zu einem mehrschichtigen, strukturierten Biofilm verdichteten. Nach 6 Tagen hatte sich der Biofilm zu einem Monolayer zurückgebildet. In Mischkulturen aus *A. citratiphilum* und *A. parvum*, die im Zellzahl-Verhältnis von 1:2, 1:1 und 2:1 inokuliert worden waren, wuchs der Biofilm langsamer und dünner, wenn *A. parvum* den größeren Anteil hatte, sowie schneller und dichter, wenn *A. citratiphilum* in doppelter oder gleicher Konzentration zugegeben worden war. Wurden *A. citratiphilum* und *A. parvum* in gleicher Dichte inokuliert, bildeten die Biofilmbakterien verstärkt extrazelluläre Schleime, die, wie die Zellen durch DAPI mitangefärbt und so sichtbar wurden. *A. parvum* und *A. commune* wurden gemeinsam mit *P. putida* DSM 291 inokuliert. Es bildete sich ein Biofilm der Trinkwasserisolate, in den *P. putida* DSM 291 nicht integriert war.

15 ml Biofilmreaktoren wurden mit hundertfach verdünntem R2A* befüllt und mit *A. commune* DSM 11901, *A. parvum* DSM 11968, *A. citratiphilum* DSM 11900 und B3 entsprechend den Anteilen im nativen Trinkwasserbiofilm im Verhältnis 40:20:10:1 inokuliert. Nach 3 Tagen dominierten B3 und *A. citratiphilum* den Biofilm.

3.1.4 Substratverwertung

Mineralmedium wurde mit 5 mM Substrat versetzt und mit *A. commune* DSM 11901, *P. putida* FH1 und *P. putida* KT2442 als Rein- und Mischkulturen inokuliert. Es wurden Substrate gewählt, von denen bekannt war, daß sie durch *A. commune*

verwertet werden konnten (Kalmbach *et al.*, 1999). Das Wachstum der Bakterien wurde durch Trübung, mikroskopisch und nach *in situ* Hybridisierung beurteilt. In der Tabelle 9 ist das Ergebnis zusammengefaßt.

Tabelle 9: Substratverwertung durch *A. commune* DSM 11901, *P. putida* FH1 und *P. putida* KT2442

	A. commune	*P. putida* FH1	*P. putida* KT2442	*A. commune, P. putida* FH1	*A. commune*, *P. putida* KT2442
Succinat	+, 3 d	+, 3 d	+, 3 d	+, 3 d	+, 3 d
Adipat	+, 7 d	-	-	+, 7 d	+, 7 d
Azelat	+, 5 d	-	-	+, 5 d	+, 5 d
Pimelat	+, 7 d	-	-	+, 7 d	+, 7 d
Sebacat	+, 5 d	-	-	+, 5 d	+, 5 d
γ-Hydroxy-butyrat	+, 3 d	+, 3 d	-	+, 3 d	+, 3 d

Angegeben sind Wachstum „+“, nicht Wachstum „-“ und der Beginn der Trübung in Tagen.

Mit Ausnahme von Succinat konnte *P. putida* KT2442 die Substrate nicht verwerten. Die Zellen waren mikroskopisch nicht oder nur noch als Kokken sichtbar. *P. putida* FH1 hatte das gleiche Substratspektrum, konnte aber zusätzlich γ-Hydroxybutyrat verwerten. In den Mischkulturen dominierte *A. commune*. In Azelat, Pimelat und Sebacat wuchsen *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442 als Zellaggregate in Flocken aus *A. commune* und Schleim. Zellen, die nicht mit *A. commune* assoziiert waren, lagen ausschließlich als Einzelzellen vor.

3.2 Trinkwasser als Habitat

3.2.1 Trinkwasser-Flüssigkulturen

P. putida FH1 bzw. *P. putida* DSM 291 wurde 1 %ig in je 200 ml sterilfiltriertem Trinkwasser inkubiert und die Entwicklung der Gesamtzellzahlen bzw. der Zahl kultivierbarer Zellen beobachtet.

Die Gesamtzellzahl von $1x10^7$ Zellen/ml im Ansatz mit *P. putida* FH1 veränderte sich innerhalb von 5 Tagen nicht. Die Zahl kultivierbarer Zellen nahm nach der Zugabe von anfangs $4,7x10^6$ KBE/ml auf R2A*-Agar bzw. $3,6x10^6$ KBE/ml auf NB-Agar auf minimal $1,4x10^3$ KBE/ml bzw. $1,2x10^2$ KBE/ml nach 7 Stunden ab. Bei Abschluß des Experimentes nach fünf Tagen war der Anfangswert nahezu wieder erreicht. Die Zahl kultivierbarer Zellen war im Mittel auf R2A*-Agar ca. 25 % größer als auf NB-Agar (Abbildung 3). *P. putida* DSM291 zeigte einen stärkeren Rückgang der Kultivierbarkeit als *P. putida* FH1. Übereinstimmend mit Ergebnissen in autoklaviertem Trinkwasser war *P. putida* DSM 291 in der Probe nach 7 Stunden auf NB-Agar nicht kultivierbar.

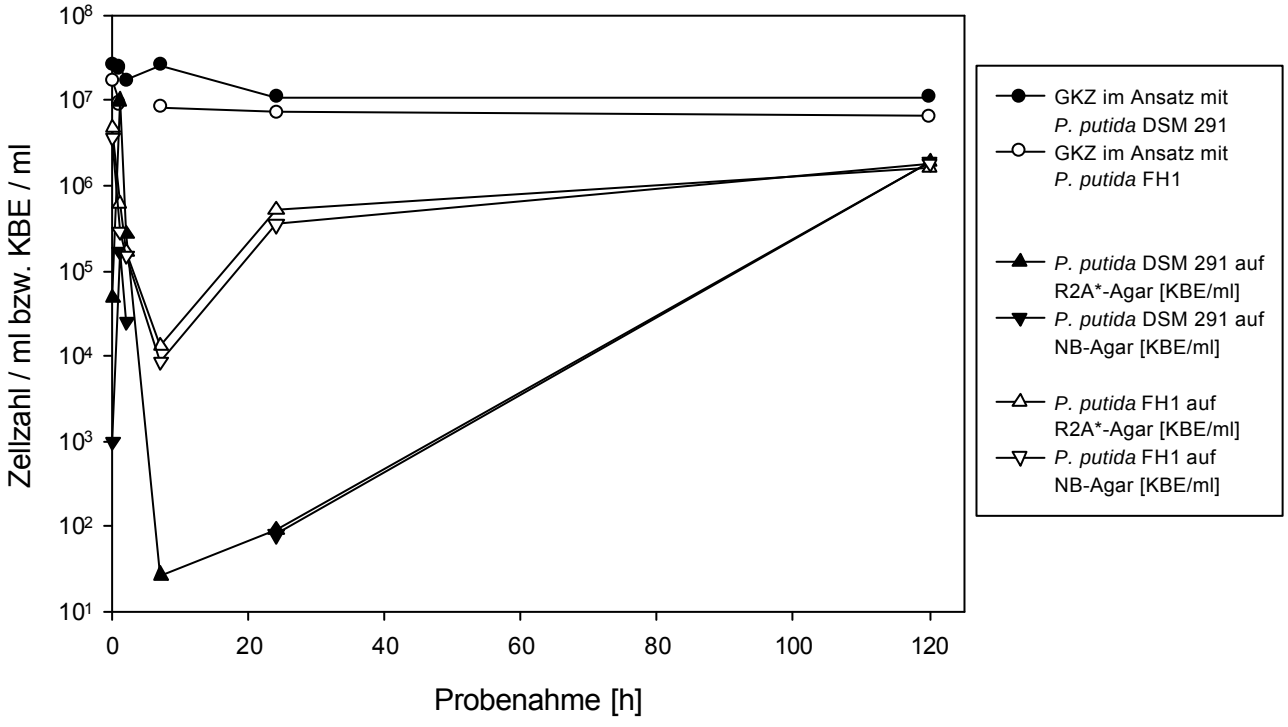
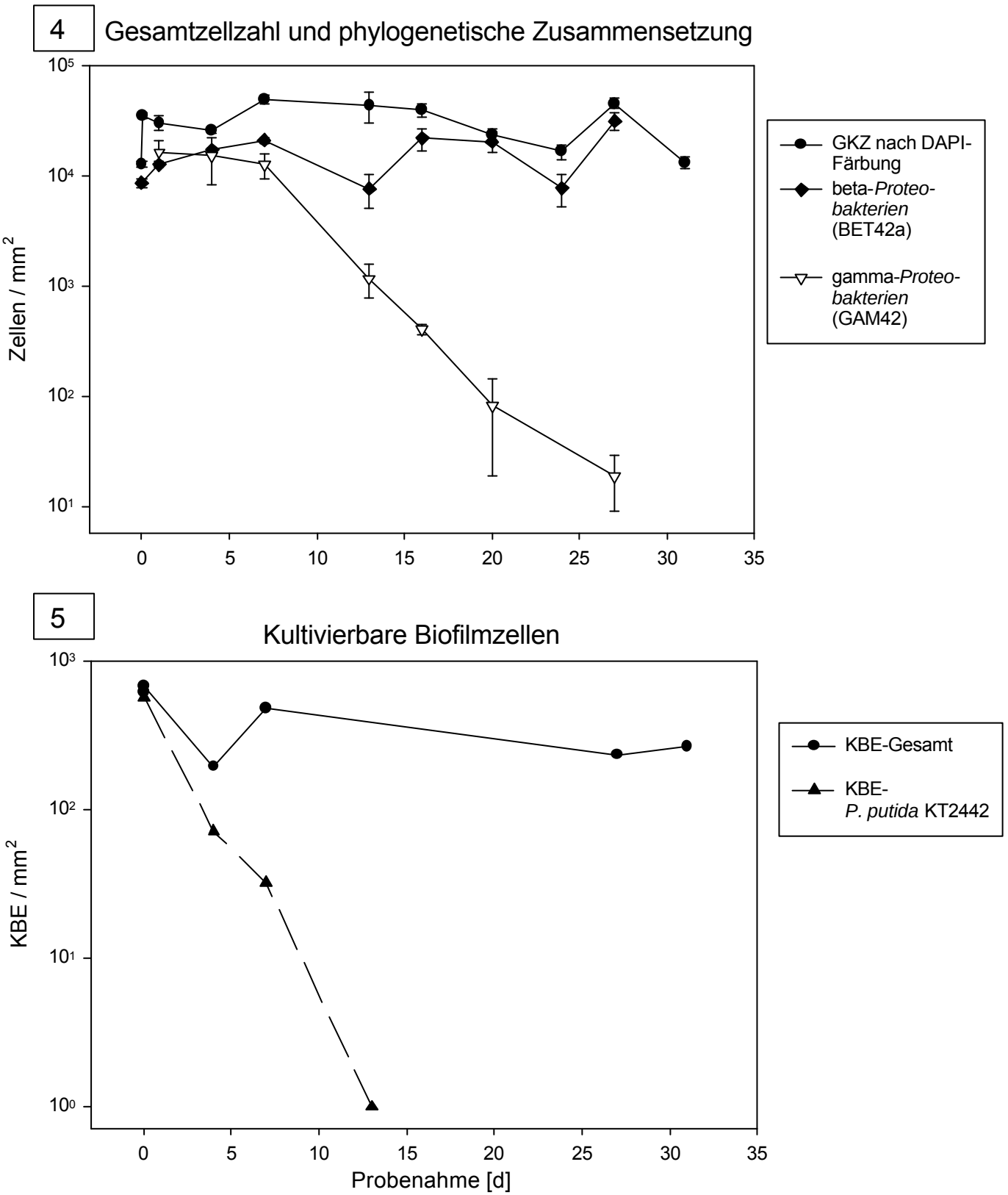


Abbildung 3: *P. putida* FH1 und *P. putida* DSM 291 wurden in sterilfiltriertes Trinkwasser inokuliert. Dargestellt sind die Gesamtzellzahlen sowie die Kultivierbarkeit auf R2A*- bzw. NB-Agar.

3.2.2 Trinkwasserbiofilme

Das Überleben der Modellorganismen in Trinkwasserbiofilmen wurde mit *P. putida* KT2442 in der kontinuierlich durchflossenen Robbins Device bzw. mit *P. putida* FH1 im 1l-Biofilmreaktor untersucht. Parallel zu *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1 wurden das Verhalten der beta-*Proteobakterien* als phylogenetisch dominierende Gruppe im Trinkwasserbiofilm (Kalmbach *et al.*, 1997a) mit Hilfe der Sonde BET42a dokumentiert.

14 Tage alte Trinkwasserbiofilme wurden mit *P. putida* KT2442 in einer Konzentration von 10^8 Zellen/ml inokuliert, von denen sich nach dem Ausspülen des Inokulums 10^3 Zellen/mm^2 angelagert hatten (Abbildung 4). Innerhalb eines Tages verzehnfachte sich die Zahl der *P. putida* Zellen in den Biofilmen auf $1{,}7 \times 10^4$/mm^2 und nahm dann kontinuierlich ab. *P. putida* KT2442 war 27 Tage nach der Zugabe des Inokulums im Biofilm nicht mehr detektierbar. Die Gesamtzellzahl und die Zahl der beta-*Proteobakterien* im Biofilm nahmen nach der Zugabe von *P. putida* KT2442 vorübergehend geringfügig ab. Im weiteren Verlauf des Experimentes wurden konstant $3{,}3 \times 10^4 \pm 4 \times 10^3$ Zellen/mm^2 (Gesamtzellzahl) und $1{,}9 \times 10^4 \pm 3 \times 10^3$ Zellen/mm^2 (beta-*Proteobakterien*) bestimmt. Nach der Zugabe von *P. putida* KT2442 war in der folgenden Probe die Zahl kultivierbarer Biofilmzellen gesunken, alle späteren Proben ergaben konstant etwa 3×10^2 KBE/mm^2 (Abbildungen 4 und 5) *P. putida* KT2442 machte unmittelbar nach der Zugabe 85 % aller Kolonien aus; der Anteil nahm mit zunehmender Dauer des Experiments ab. *P. putida* KT2442 konnte 14 Tage lang durch Kultivierung nachgewiesen werden. In der Flüssigphase wurde eine konstante Gesamtzellzahl von $5{,}5 \times 10^5$ Zellen/ml bestimmt. 6 Tage nach der Zugabe des Inokulums wurden $2{,}0 \times 10^3$ *P. putida* KT2442/ml im Effluent detektiert.
Vor der Zugabe des *P. putida* KT2442-Inokulums konnten weder durch spezifische *in situ* Hybridisierung noch nach Kultivierung authochthone *P. putida*-Zellen in den Biofilmen nachgewiesen werden.



Abbildungen 4 und 5: 14 Tage alte Trinkwasserbiofilme wurden mit *P. putida* KT2442 inokuliert. Die Zusammensetzung der Biofilme wurde mikroskopisch (4) und durch Kultivierung (5) ausgewertet.

Im Vergleich wurden 28 Tage alte Trinkwasserbiofilmen mit *P. putida* KT2442 angeimpft. Vor der Zugabe des Inokulums wurde eine Gesamtzellzahl von $2{,}3 \times 10^4$ Zellen/mm^2 bestimmt; mit den Sonden EUB338, BET42a und GAM42a konnten 82, 69 bzw. 0,1 % der Bakterien hybridisiert werden. Die Kultivierbarkeit der Biofilmbakterien betrug 0,5 %. *P. putida* KT2442 wurde zugegeben und lagerte sich mit $3{,}0 \times 10^3$ Zellen/mm^2 an die Trinkwasserbiofilme an. Innerhalb eines Tages stieg die Konzentration auf 5×10^3 Zellen/mm^2. 8 Tage nach der Zugabe des Inokulums war die Konzentration auf 2×10^2 Zellen/mm^2 gesunken. Bei Abschluß des Experimentes nach 25 Tagen war *P. putida* KT2442 mit der Sonde PPU646 in den Biofilmen nicht mehr nachweisbar (siehe Abbildung 6).

Die Zahl der authochthonen Bakterien in den Biofilmen nahm nach der Zugabe von *P. putida* KT2442 vorübergehend reproduzierbar auf weniger als 10 % des Ausgangswertes ab (Abbildung 7). Der Minimalwert wurde nach 5 Tagen bestimmt. Die Zahl der beta-*Proteobakterien* nahm parallel zur Gesamtzellzahl innerhalb eines Tages nach der Zugabe von *P. putida* KT2442 auf 3 % des Ausgangswertes ab. Schneller als die Gesamtzellzahl nahm die Konzentration der beta-*Proteobakterien* in den Biofilmen bereits am zweiten Tag wieder zu. Der Ausgangswert wurde im Verlauf des Experimentes nicht wieder erreicht. Mit der Sonde EUB338 wurden bei Abschluß des Experimentes 70 % der Bakterien detektiert. Die Kultivierbarkeit der Biofilmbakterien von 0,8 % stieg nach der Zugabe des Inokulums vorübergehend auf 5 %. Die Gesamtzellzahl in der Flüssigphase varierte zwischen $5{,}1 \times 10^4$ und $9{,}1 \times 10^6$ Zellen/ml. Bis zum 5. Tag nach der Zugabe des Inokulums konnten *P. putida* KT2442-Zellen im Effluent detektiert werden.

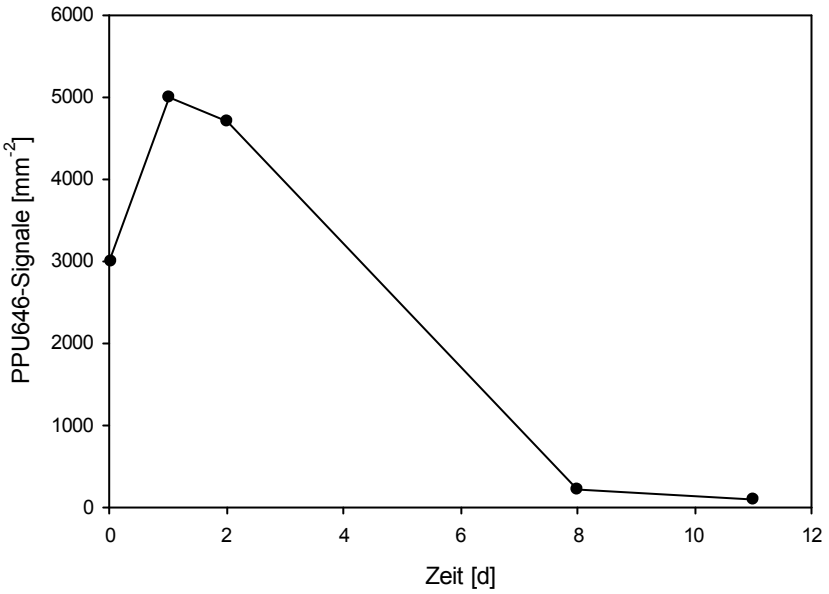


Abbildung 6: 28 Tage alte Trinkwasserbiofilme wurden mit *P. putida* KT2442 inokuliert und das Überleben des Modellorganismus mit der Sonde PPU646 detektiert.

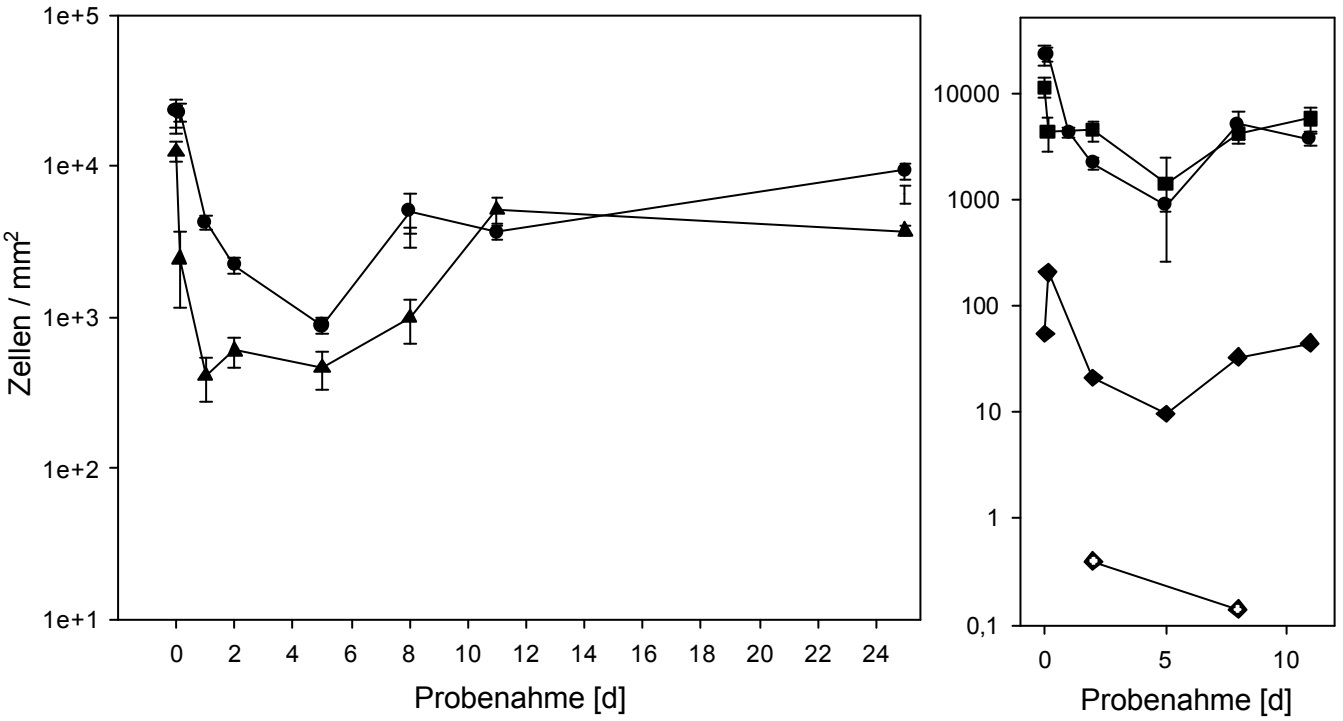


Abbildung 7: 4 Wochen alte Trinkwasserbiofilme wurden mit *P. putida* KT2442 inokuliert. Dargestellt sind (links) die Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung der fixierten Biofilme mit der Zahl der Zahl der beta-*Proteobakterien* (▲) und der Gesamtzellzahl nach der Färbung der Biofilme mit DAPI (●). Daneben (rechts) ist die Zahl kultivierbarer Biofilmbakterien (◆) sowie die Zahl kultivierbarer *P. putida* KT2442-Zellen (◊) für den gleichen Zeitraum dargestellt. Die gute Übereinstimmung zwischen der Gesamtzellzahl (●) und der Zahl von der Oberfläche abgelöster Zellen (■) ermöglichte quantitative Aussagen zur Kultivierbarkeit der Biofilmbakterien.

3.2.3 *P. putida* FH1 in Trinkwasserbiofilmen

Um die Einlagerung von *P. putida* FH1 in Trinkwasserbiofilme zu untersuchen, wurden 14 Tage alte Trinkwasserbiofilme aus der Robbins Device in den 1l-Biofilmreaktor überführt und dort mit *P. putida* FH1 in einer Konzentration von 10^9 Zellen/ml inokuliert. Der Reaktor wurde mit Trinkwasser durchflossen (Durchflußrate 0,1 l/h). Nach 1 Stunde hatten sich $3x10^3$ Zellen/mm^2 angesiedelt. Innerhalb eines Tages nahm die Zellzahl der *P. putida* Zellen weiter auf 10^4 Zellen/mm^2 zu. Bei Abschluß des Experimentes nach 6 Tagen wurden $2,5x10^3$ Zellen/mm^2 bestimmt. Die Gesamtzellzahl stieg bis auf 10^5 Zellen/mm^2 (siehe Abbildung 8).

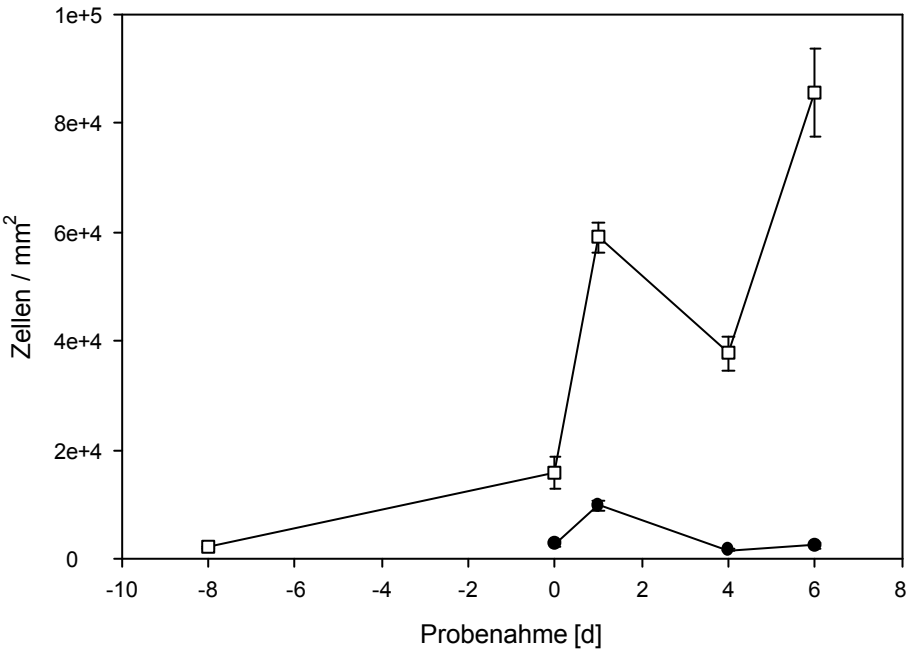
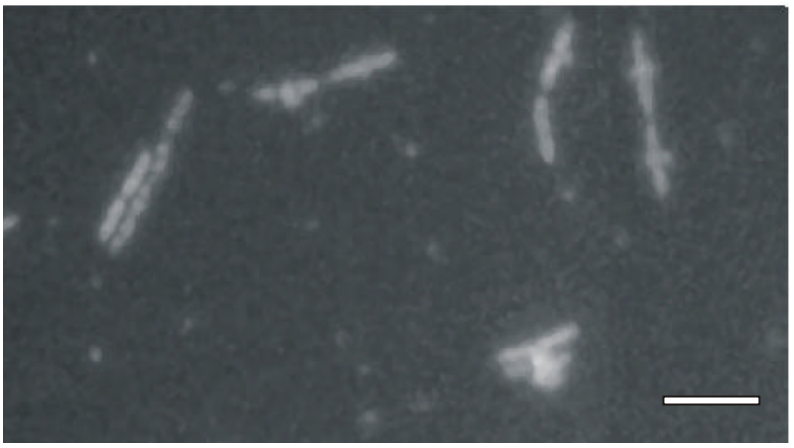
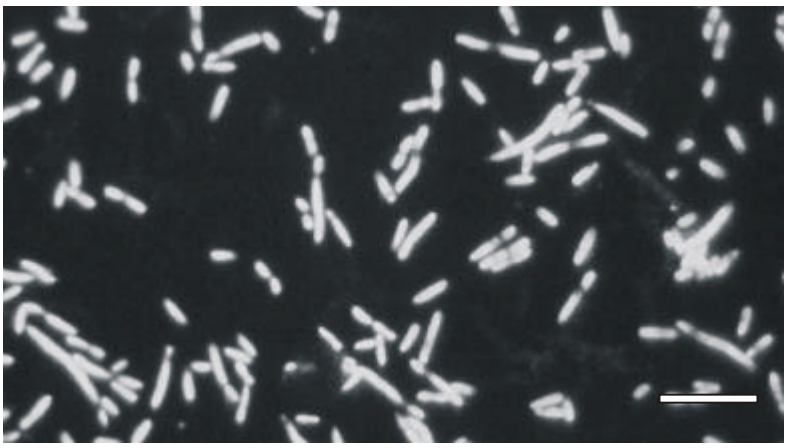


Abbildung 8: Trinkwasserbiofilme wurden von der Robbins Device in den 1l-Biofilmreaktor überführt und dort mit *P. putida* FH1 inkubiert. Trinkwasser diente weiterhin als Medium. Dargestellt sind die Gesamtzellzahl (□) und Signale mit der Sonde PP986 (●).

A



B



C

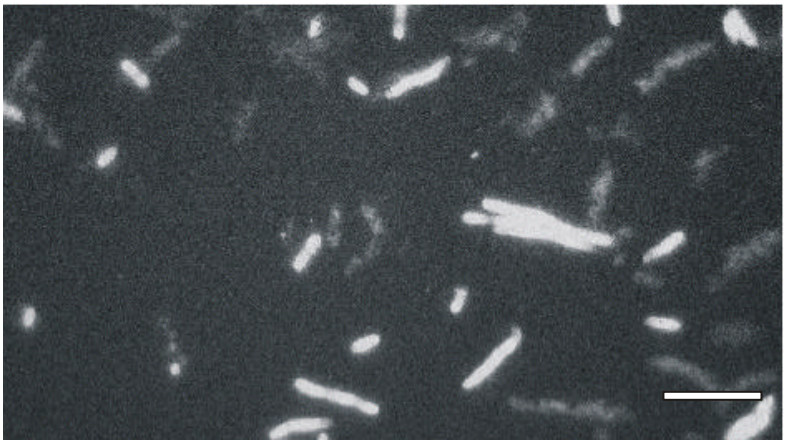


Abbildung 9A: *P. putida* KT2442 wurde in Trinkwasser inokuliert. Die Zellen sind mit DAPI gefärbt. In der Mitte jeder Zelle ist ein unscharfer Bereich zu erkennen.

Abbildung 9B: Trinkwasserbiofilme wurden mit *P. putida* KT2442 inokuliert. Nach dem Ausspülen des Inokulums hatten sich die Zellen als Stäbchen an die Oberfläche angesiedelt, detektiert mit der Sonde PP986.

Abbildung 9C: 24 Stunden später hatte sich die Zahl der anheftenden *P. putida* KT2442-Zellen bereits verkleinert. Die Aufnahme entstand nach der Hybridisierung der Biofilme mit der Sonde PP986.

3.3 Der Landwehrkanal als Habitat – Flüssigkulturen

Nach den Experimenten mit Trinkwasser als Substrat, zu denen auch die Konjugationen zwischen *P. putida* FH1 und Trinkwasserisolaten gehörten (s. 3.5.1), wurde der Landwehrkanal aufgrund der höheren Substratkonzentration (s. 2.9.1 und 2.10) und Organismendichte als Habitat gewählt.

3.3.1 Überleben der Modellorganismen in LW-Wasser

Das Überleben von *P. putida* FH1 und *P. putida* KT2442 in LW-Wasser wurde analog zum Trinkwasser zunächst in Flüssigkulturen untersucht. Die Detektion von *P. putida* FH1 und *P. putida* KT2442 erfolgte durch selektive Kultivierung und spezifische Hybridisierung. Das LW-Wasser wurde durch Filter der Größe 0,45 µm filtriert, um größere Mikroorganismen wie z. B. Protozoen zu entfernen und sofort anschließend mit *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1 inokuliert.

Im LW-Wasser nahm die Konzentration von $2{,}2 \times 10^6 \pm 1{,}0 \times 10^6$ Zellen/ml (*P. putida* KT2442) und $6{,}6 \times 10^5 \pm 3{,}4 \times 10^5$ Zellen/ml (*P. putida* FH1) nach der Zugabe innerhalb von 20 Tagen auf $5{,}4 \times 10^3 \pm 4{,}4 \times 10^3$ Zellen/ml (*P. putida* KT2442) bzw. $6{,}7 \times 10^3 \pm 4{,}4 \times 10^3$ Zellen/ml (*P. putida* FH1) ab (siehe Abbildung 10). Zum gleichen Zeitpunkt wurde die Zahl der kultivierbaren Zellen mit $1{,}0 \times 10^3$ KBE/ml (*P. putida* KT2442) bzw. $2{,}3 \times 10^3$ KBE/ml (*P. putida* FH1) bestimmt. Die Zahl der kultivierbaren *P. putida* KT2442-Zellen änderte sich bis zum Abschluß des Experimentes nicht mehr signifikant. Die Zahl der kultivierbaren *P. putida* FH1 nahm bis zum 54. Tag weiter ab ($1{,}3 \times 10^2$ KBE/ml). Nach 200 Tagen wurden noch 5 KBE/ml bestimmt. Bis zum 54. Tag konnten *P. putida* FH1-Kolonien mit GFP-Expression detektiert werden. Nach 200 Tagen wurden die *P. putida* FH1-Kolonien nur noch von nicht-selektivem Medium isoliert. Weder *P. putida* FH1 noch andere Kolonien zeigten grüne Fluoreszenz.

Die über den Beobachtungszeitraum gemittelte Gesamtzellzahl im LW-Wasser nach DAPI-Färbung war $2{,}9 \times 10^6 \pm 0{,}7 \times 10^6$ bzw. $2{,}0 \times 10^6 \pm 0{,}5 \times 10^6$ Zellen/ml in den Ansätzen mit *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1.

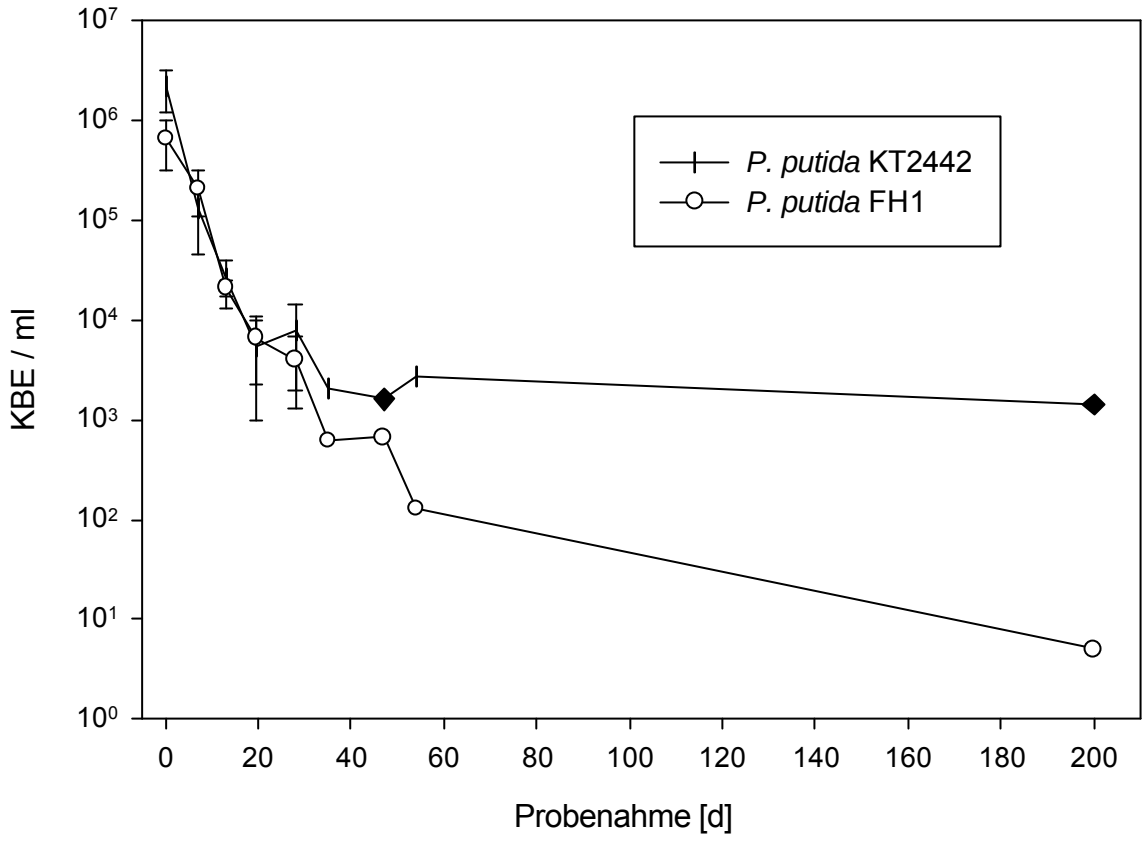


Abbildung 10: *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442 wurden in filtriertes LW-Wasser inokuliert und ihr Verhalten mit Hilfe spezifischer *in situ* Hybridisierung (bis zum 35. Tag) und nach Kultivierung auf Pseudomonas F-Agar beschrieben.

3.3.2 Adaption der Modellorganismen an das Medium

Das lange Überleben von *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1 in LW-Wasser war zunächst unerwartet. Insbesondere aufgrund der relativ hohen Zahl kultivierbarer *P. putida* KT2442-Zellen nach 200 Tagen sollte geklärt werden, ob sich die Modellorganismen an das LW-Wasser adaptiert hatten bzw. sich eine besser adaptierte Mutante durchsetzen konnte.

(i) Dazu wurden Kulturen nach 200 Tage dauernder Inkubation in LW-Wasser in frisches LW-Wasser überimpft

(ii) Stationäre Kulturen (siehe 2.10.1) wurden
   a) in verschiedenen Konzentrationen in frisches LW-Wasser inokuliert
   b) mit Kulturen der spätlogarithmischen Wachstumsphase verglichen

(iii) Nach einer 0 bis 7 Tage dauernden Inkubation in LW-Wasser eingefroren und die Zahl der kultivierbaren Zellen bestimmt, um eine durch die Inkubation entwickelte Streßresistenz zu zeigen

3.3.2.1 200 Tage alte Kulturen in frischem LW-Wasser

200 Tage in LW-Wasser inkubierte Zellen *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1 wurden in frisches, filtriertes (0,45 µm Porendurchmesser) LW-Wasser überimpft und die Entwicklung der Zahl kultivierbarer Zellen auf Pseudomonas F-Agar bestimmt. Als Inokulum wurden jeweils 10 ml der 200 Tage alten Kultur zu 75 ml LW-Wasser zugegeben. Auf einen Waschschritt wurde für beide Kulturen wegen der geringen Zelldichte von *P. putida* FH1 verzichtet. Für *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1 lagen ein bzw. zwei Kolben mit der über 200 Tage inkubierten Kultur vor. Von jedem dieser Kolben wurden drei parallele Ansätze erstellt und beprobt. In den Abbildung 11A und B sind die Ergebnisse dargestellt: In der *P. putida* KT2442-Kultur verzehnfachte sich die Zahl der kultivierbarer *P. putida* KT2442-Zellen innerhalb eines Tages von $4x10^2 \pm 3x10^2$ KBE/ml auf $4,1x10^3 \pm 1,3x10^3$ KBE/ml. Die Zahl kultivierbarer *P. putida* KT2442-Zellen nahm bis zum 6. Tag weiter zu auf maximal $7,4x10^4$ KBE/ml. Am 8. Tag wurden noch $2,3x10^4 \pm 1,0x10^3$ KBE/ml nachgewiesen. Für *P. putida* FH1 sind die beiden Ansätze, resultierend aus den ursprünglich zwei Kolben sowie deren Mittelwert dargestellt. Die Zahl kultivierbarer *P. putida* FH1-Zellen vervierfachte sich innerhalb eines Tages von 4 ± 3 KBE/ml auf 17 ± 7 KBE/ml; nach 8 Tagen wurden noch 7 ± 4 KBE/ml bestimmt. Im Beobachtungszeitraum lagen die Meßwerte von Ansatz 1 immer unter denen von Ansatz 2 (siehe Abbildung 11B).

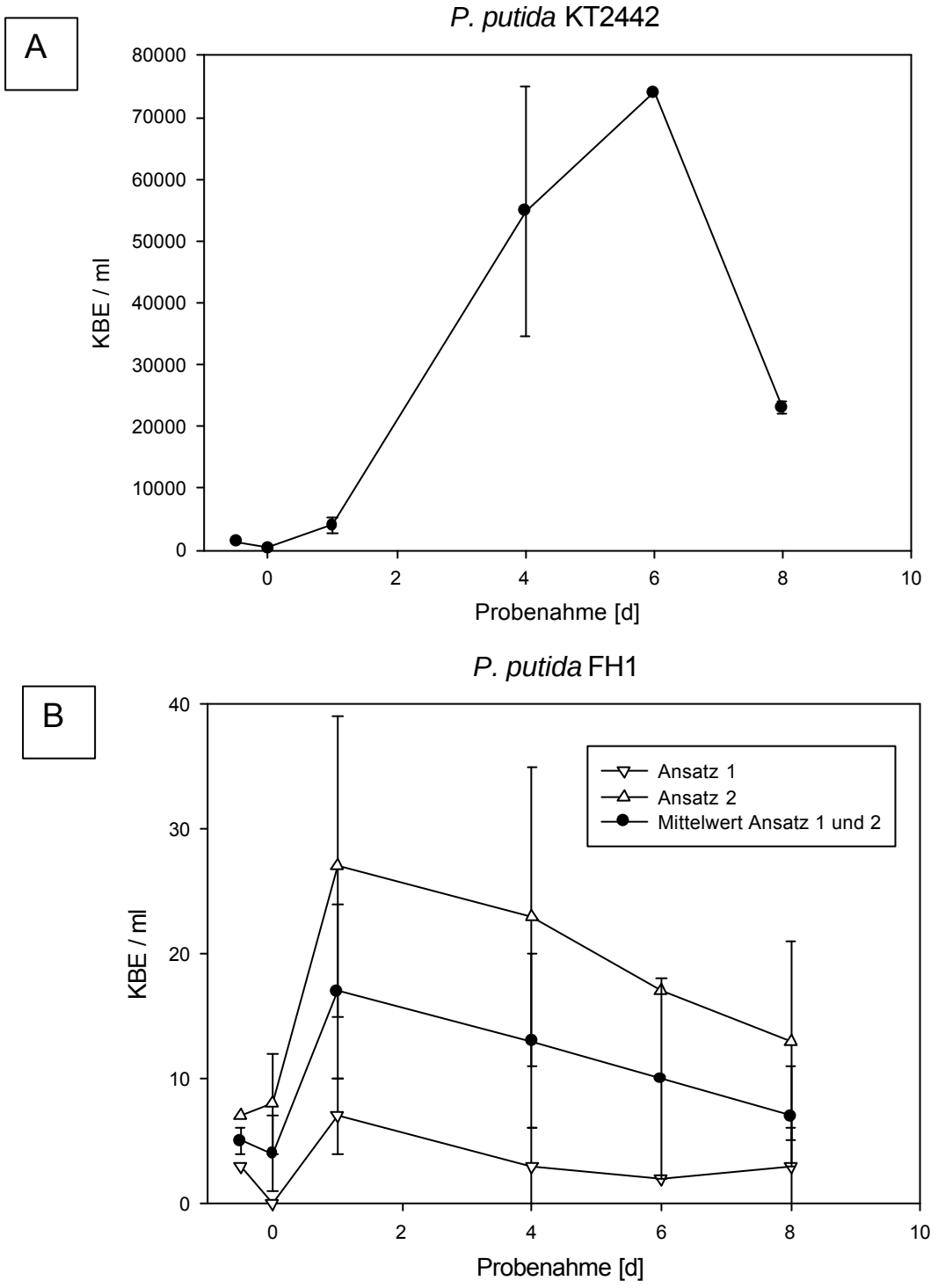


Abbildung 11: 200 Tage in LW-Wasser inkubierte *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1-Kulturen wurden in frisches LW-Wasser überimpft und die Zahl kultivierbarer Zellen auf Pseudomonas-Agar bestimmt. Abbildung 11A zeigt die Entwicklung für *P. putida* KT2442, 11B die Entwicklung *P. putida* FH1.

3.3.2.2 Einfluß der Inokulumkonzentration stationärer Kulturen in frischem LW-Wasser auf ihr Verhalten

Es sollte festgestellt werden, welche Mindestkonzentrationen von *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1 erforderlich waren, damit sich diese in LW-Wasser vermehren konnten. Stationäre *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1-Kulturen wurden in je drei Verdünnungsstufen in frisches LW-Wasser überimpft (siehe Tabelle 10). Um die Konzentration in den stationären Kulturen zu bestimmen, wurden diese am Vortag ausplattiert.

Tabelle 10: Misch-Schema für die Verdünnungsstufen der stationären Kulturen

Verdünnungsstufe	Misch-Schema
1:10	10 ml Vorkultur in 90 ml frisches LW-Wasser
1:20	5 ml Vorkultur + 5 ml sterilfiltrierte 28 Tage-Kultur in 90 ml frisches LW-Wasser
1:200	0,5 ml Vorkultur + 9,5 ml sterilfiltrierte 28 Tage Kultur in 90 ml frisches LW-Wasser

In den *P. putida* KT2442-Kulturen (Abbildung 12A) nahm die Zahl kultivierbarer Zellen unabhängig von den Anfangskonzentrationen $7{,}0x10^2$, $2{,}7x10^2$ bzw. 2,4x10 KBE/ml innerhalb eines Tages auf die sehr ähnlichen Maximalwerte $4{,}5x10^4$, $3{,}6x10^4$ bzw. $5{,}0x10^4$ KBE/ml zu. Bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes nach 7 Tagen waren die Konzentrationen parallel auf $1{,}9x10^4$, $1{,}8x10^4$ bzw. $3{,}1x10^4$ KBE/ml gesunken. Die Meßpunkte der höchsten Verdünnungsstufe (1:200) verliefen oberhalb der 1:10 und 1:20 Verdünnungsstufen.

In den *P. putida* FH1-Kulturen verhielten sich die Verdünnungsstufen 1:10 und 1:20 ähnlich. Nach 24 Stunden waren die Konzentrationen der kultivierbaren *P. putida* FH1-Zellen auf Pseudomonas-AgarF von $2{,}0x10^2$ bzw. $6{,}0x10^2$ KBE/ml auf $9{,}3x10^3$ bzw. $6{,}7x10^3$ KBE/ml angestiegen (Abbildung 12B). Nach 7 Tagen waren noch $6{,}0x10^3$ bzw. $7{,}1x10^3$ *P. putida* FH1-Zellen auf Pseudomonas-AgarF kultivierbar. In der 1:200 Verdünnung mit einer Anfangskonzentration von 13 KBE/ml nahm die Dichte kultivierbarer Zellen langsamer von zu, und erreichte den Maximalwert von $5{,}8x10^4$ KBE/ml nach 4 Tagen.

Auf R2A*+Kan(50)-Agar verliefen die Kurven der verschiedenen Verdünnungsstufen weniger parallel als auf Pseudomonas-AgarF (Abbildung 12C). Nach 24 Stunden war die Zahl kultivierbarer *P. putida* FH1-Zellen von $3{,}5x10^2$ bzw. $5{,}5x10^2$ KBE/ml auf $6{,}1x10^3$ bzw. $2{,}3x10^4$ KBE/ml angestiegen, nach 7 Tagen wurden $5{,}5x10^3$ bzw.

$2{,}8x10^3$ KBE/ml bestimmt. Die höchste Verdünnung (1:200) war in der Nullprobe und nach 24 Stunden nicht kultivierbar. Innerhalb von 2 Tagen hatte sich die Zahl der kultivierbaren Zellen in diesem Ansatz auf $5{,}5x10^3$ KBE/ml vervielfältigt. Nach 7 Tagen war die Konzentration $3{,}4x10^3$ KBE/ml.

Unter der Annahme, dass jeder Organismus in jedem System eine spezies- und systemspezifische Konzentration besitzt, auf die sich die Kultur innerhalb weniger Tage einstellt (Szewzyk,U., unveröffentlicht), wurden aus den Meßwerten nach 7 Tagen die system- und speziesspezifischen Konzentrationen abgeleitet (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: System- und speziesspezifische Konzentrationen von *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1 in LW-Wasser

Organismus	Pseudomonas-AgarF	R2A*+Kan(50)-Agar
P. putida KT2442	$2{,}3x10^4 \pm 4{,}1x10^3$ KBE/ml	-------
P. putida FH1	$5{,}9x10^3 \pm 7{,}5x10^2$ KBE/ml	$3{,}9x10^3 \pm 8{,}2x10^2$ KBE/ml

3.3.2.3 Stationäre und Kulturen der spät-logarithmischen Phase im Vergleich

Parallel wurden stationäre *P. putida* KT2442-Kulturen und *P. putida* KT2442-Kulturen der spät-logarithmischen Wachstumsphase in frisches LW-Wasser und Cetrimid-Medium überimpft. Der Vergleich sollte zeigen, ob die stationäre Kultur der spät-logarithmischen in LW-Wasser sowie die spät-logarithmische der stationären Kultur in Cetrimid-Medium überlegen war. Cetrimid-Medium wurde gewählt, um gleichzeitig ein nährstoffreiches Medium zu haben und die Begleitflora von *P. putida* KT2442 zu unterdrücken. Die Kulturen wurden zu einer Anfangskonzentration von 10^3 KBE/ml inokuliert. Meßgrößen waren die Kultivierbarkeit auf Pseudomonas-AgarF (siehe Abbildung 13A) und die optische Dichte der Kulturen bei 580 nm (siehe Abbildung 13B).

Die stationäre Kultur war nach der Zugabe in Cetrimidmedium vorübergehend nicht kultivierbar. Nach 2 Stunden wurden 10 KBE/ml, nach 6,5 Stunden 23 KBE/ml und nach 29 Stunden $2{,}8x10^6$ KBE/ml bestimmt. Nach 45 Stunden wurden $6{,}3x10^8$ KBE/ml detektiert, danach veränderte sich die Zahl kultivierbarer Zellen in der stationären Kultur in Cetrimidmedium bis zum Abschluß des Experimentes nach 124 Stunden nicht mehr signifikant. In der spät-logarithmische Kultur waren in der Nullprobe und nach 2 Stunden $5x10^2$ KBE/ml, nach 6,5 Stunden $1{,}2x10^3$ KBE/ml und nach 29 Stunden $1{,}3x10^8$ KBE/ml Zellen kultivierbar. Die Zahl der kultivierbaren

Zellen nahm bis zum Abschluß des Experimentes nach 124 Stunden weiter zu bis auf $1,4x10^9$ KBE/ml. Für beide Kulturen wurde die maximale Wachstumsrate im Zeitraum von der 6,5. Stunde bis zur 29. Stunde bestimmt. Für beide Kulturen ergab sich μ_{max} = 0,5/h. Anhand der optischen Dichte konnten die Veränderungen Zelldichte beginnend mit einer Konzentration von ca. 10^6 KBE/ml detektiert werden. Die Werte der letzten Probe unterschieden sich von den Ergebnissen der Kultivierung, da für die stationäre Kultur eine höhere Dichte von *P. putida* KT2442-Zellen angezeigt wurde als für die spät-logarithmische Kultur. Die Ergebnisse der Kultivierung waren genau umgekehrt.

In LW-Wasser waren nach der Zugabe der stationären bzw. spät-logarithmischen Kultur $6,0x10^2$ bzw. $6,4x10^2$ *P. putida* KT2442-Zellen/ml kultivierbar. Innerhalb von 22 Stunden hatte sich die Zahl auf $2,2x10^3$ bzw. $7,3x10^4$ KBE/ml vergrößert. Bis zur letzten Probenahme nach 124 Stunden hatte sich die Zahl der kultivierbaren Zellen in der spät-logarithmischen Kultur geringfügig weiter vergrößert (Maximal $4,3x10^5$ KBE/ml), während sich in der stationären Kultur die Konzentration bis zum Abschluß wieder verringerte (minimal $8,6x10^2$ KBE/ml). Veränderungen der optischen Dichte waren aufgrund der geringen Zellzahlen für die LW-Wasser-Kulturen nicht feststellbar (Daten sind nicht aufgeführt).

Die Proben nach 71 Stunden (in Cetrimidmedium) wurden spezifisch *in situ* hybridisiert. Daraus ergab sich für beide Kulturen eine Kultivierbarkeit der *P. putida* KT2442 Zellen von 1,5 %. Die Gesamtzellzahl wurde in beiden Ansätzen zu diesem Zeitpunkt mit $1,4x10^{11}$ Zellen/ml bestimmt.

Die Begleitflora der stationären Kultur wuchs abhängig von dem Medium, in dem *P. putida* KT2442 inokuliert worden war, auf den Agarplatten unterschiedlich. In Cetrimid-Medium inkubierte *P. putida* KT2442 bildeten Hemmhöfe, in denen die Begleitflora nicht wachsen konnte. Auf den Platten des LW-Wassers wuchs die Begleitflora unmittelbar benachbart oder assoziiert mit den *P. putida* KT2442-Kolonien. Diese Unterschiede wurden für die spät-logarithmische Kultur nicht festgestellt.

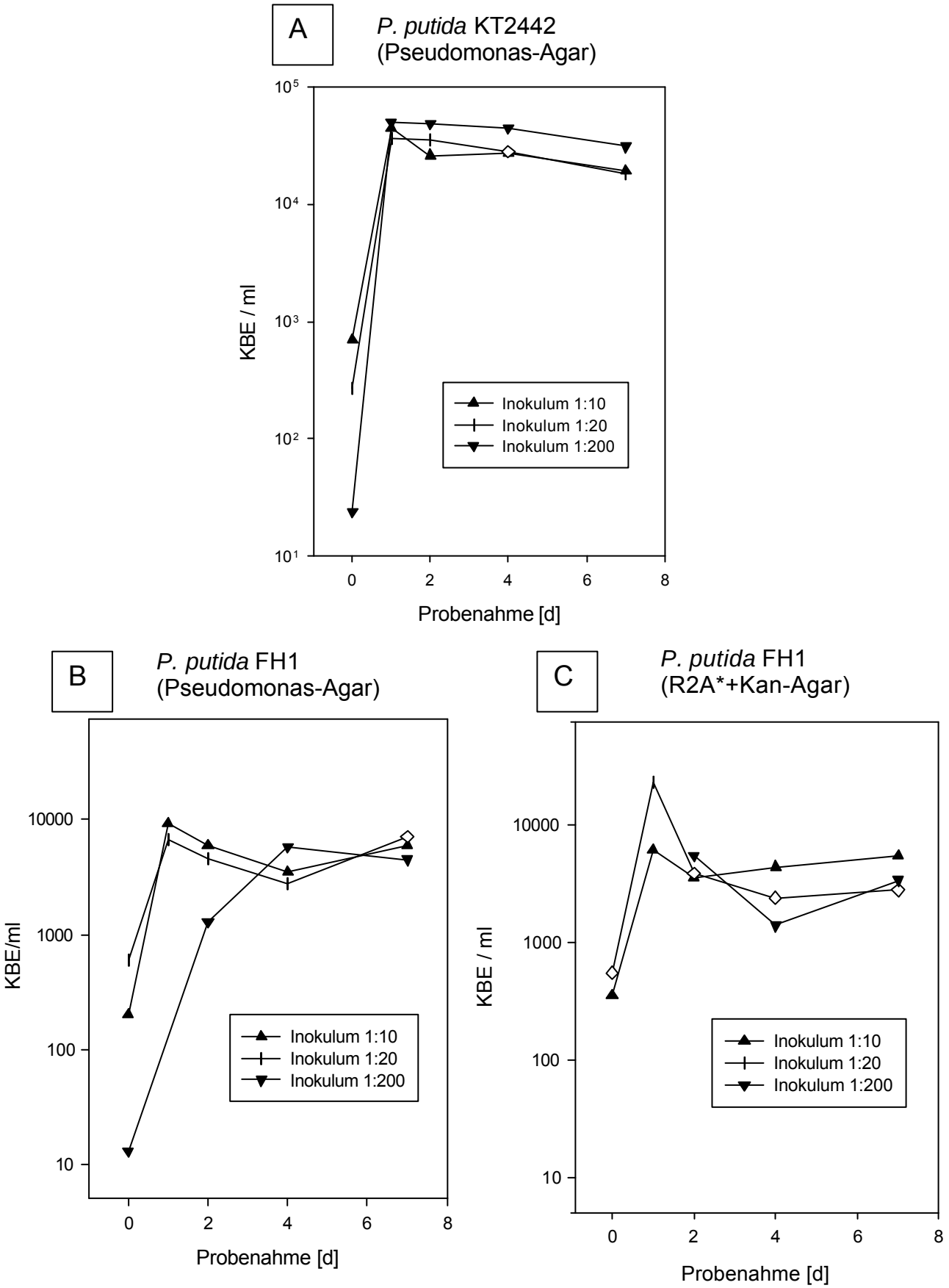


Abbildung 12: 28 Tage in LW-Wasser inkubierte *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442 - Kulturen wurden in drei Verdünnungsstufen in frisches LW-Wasser überimpft. Aliquots wurden auf Pseudomonas-Agar bzw. R2A*+Kan-Agar kultiviert. 12A zeigt *P. putida* KT2442 kultiviert auf Pseudomonas-AgarF, 12B zeigt *P. putida* FH1 kultiviert auf Pseudomonas-AgarF, 12C zeigt *P. putida* FH1 kultiviert auf R2A*+Kan(50)-Agar.

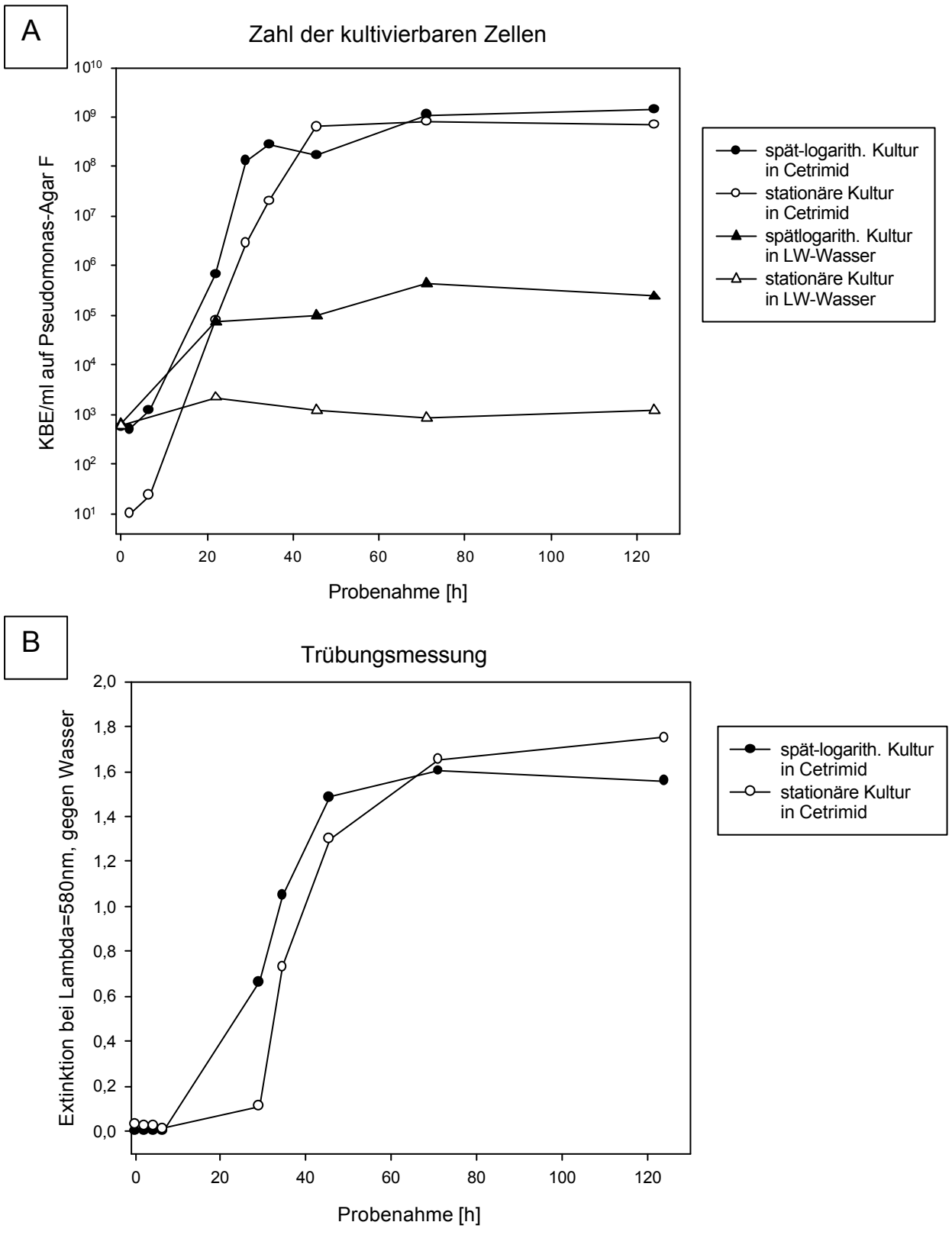


Abbildung 13: *P. putida* KT2442-Kulturen der spät-logarithmischen Wachstumsphase bzw. der stationären Phase wurden in frisches LW-Wasser bzw. Cetrimidmedium überimpft. 13A: Kultivierung, 13B: Optische Dichte-Messung bei 580 nm. In der Nullprobe war die in Cetrimid-Medium überführte, stationäre Kultur nicht kultivierbar. Aufgrund der geringen Zellzahl änderte sich die optische Dichte in den Kulturen in LW-Wasser nicht und ist daher nicht dargestellt.

3.3.3 Einfluß von Gefrieren auf die Zahl kultivierbarer Zellen einer Kultur

Givskov *et al.* (1994) zeigten, daß eine *P. putida* KT2442-Kultur, die einem Streßfaktor wie z. B. Kohlenstoffmangel ausgesetzt war, mit zunehmender Expositionsdauer resistenter gegen das Gefrieren als 2. Streßfaktor wurde. Das Kriterium war die Zahl kultivierbarer Zellen. Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob das LW-Wasser für die Modellorganismen streßauslösend war, wurden Kulturen der Modellorganismen analog den Experimenten von Givskov *et al.* untersucht. Je 5 ml der jeweiligen Kulturlösung wurde zu jedem Probezeitpunkt direkt beprobt bzw. bei –20°C für 24 Stunden eingefroren und nach dem Auftauen beprobt. Die Analyse umfaßte die selektive Kultivierung sowie die Bestimmung der Gesamtzellzahl und der Zahl spezifischer PPU646-Signale.

Die Zahl der kultivierbaren Zellen nahm in allen Proben durch das Gefrieren ab. In der Nullprobe waren noch 3 % der *P. putida* KT2442-Zellen bzw. 0,6 ‰ der *P. putida* FH1-Zellen, die vor dem Gefrieren kultiviert werden konnten, auch nach dem Auftauen kultivierbar. Mit zunehmender Inkubationszeit in LW-Wasser wurde dieser Unterschied geringer. Nach 24 Stunden in LW-Wasser waren 35 % der *P. putida* KT2442-Zellen und 9 % der *P. putida* FH1-Zellen, die vor dem Gefrieren kultiviert werden konnten, auch nach dem Auftauen kultivierbar. Nach 7 Tagen in LW-Wasser konnte zwischen *P. putida* KT2442 und *P. putida* FH1 kein Unterschied mehr festgestellt werden: ca. 20 % der Zellen, die vor dem Einfrieren kultivierbar gewesen waren, konnten auch nach dem Auftauen kultiviert werden.

In den Ansätzen mit *P. putida* FH1 nahm die mit DAPI bestimmte Gesamtzellzahl innerhalb der ersten vierundzwanzig Stunden von $4{,}5 \times 10^6$ auf $1{,}7 \times 10^7$ Zellen/ml zu und lag bei Abschluß des Experiments mit $1{,}1 \times 10^7$ Zellen/ml nur geringfügig darunter. Das Einfrieren verringerte die Gesamtzellzahl innerhalb der ersten drei Stunden um 40 %, bei Abschluß des Experimentes war die Gesamtzellzahl in den Parallelen gleich. Die Zellzahl von *P. putida* FH1 veränderte sich durch das Einfrieren nicht. In der Nullprobe und nach 24 h wurden mit der Sonde PPU646 $2{,}1 \times 10^6$ Zellen/ml detektiert, in der Abschlußprobe 3×10^5 Zellen/ml.

3.4 Der Landwehrkanal als Habitat - Biofilme

Der im Fachgebiet Ökologie der Mikroorganismen entwickelte 1l Biofilmreaktor wurde für die Experimente mit LW-Wasser erstmals für Versuchsreihen und Langzeitstudien eingesetzt. Alle LW-Biofilm-Experimente wurden in diesem Reaktor in semi-batch Verfahrensweise durchgeführt: Alle 3,5 Tage wurde das LW-Wasser in den Vorratsgefäßen erneuert. Als Aufwuchsträger wurde ausschließlich transparentes Polycarbonat verwendet. Um die Modellorganismen *P. putida* KT2442 und *P. putida* FH1 möglichst gleichen Bedingungen auszusetzen, wurden jeweils zwei Anlagen, bestehend aus zwei Biofilmreaktoren und einem Vorratsgefäß (s. Material und Methoden), parallel betrieben.

Meßparameter für die Biofilmen waren:

- die Gesamtzellzahl/Fläche nach DAPI-Färbung
- die Zahl der ablösbaren Zellen/Fläche
- die Zahl der kultivierbaren Biofilmzellen/Fläche, auf nicht-selektivem und selektivem Medium
- die phylogenetische Zusammensetzung
- der Anteil der Modellorganismen
  a) kultivierbare Zellen
  b) spezifisch hybridisierbare Zellen
  c) GFP-exprimierende Zellen
- Rezipienten des Plasmids pJB20

Meßparameter für die Flüssigphase waren:

- die Gesamtzellzahl/ml
- die Kultivierbarkeit auf nicht-selektiven und selektiven Medien
- der Anteil der Modellorganismen
  a) kultivierbare Zellen
  b) hybridisierbare Zellen
  c) GFP-exprimierende Zellen
- Rezipienten des Plasmids pJB20

Nicht alle Parameter wurden in allen Experimenten und in jeder Probe bestimmt.

3.4.1 Charakteristik der LW-Biofilme und der Flüssigphase

3.4.1.1 Entstehung der Biofilme

Das Substratum wurde im Reaktorsystem exponiert. Innerhalb eines Tages waren die Oberflächen durch planktonische Zellen, überwiegend als Einzelzellen, besiedelt. Vereinzelt waren Aggregate aus 20 bis 40 Zellen zu beobachten. Es folgte die Anlagerung von Schwebstoffen und Algen. Die Gesamtzellzahl auf der Oberfläche näherte sich mit fortdauerndem Reaktorbetrieb asymptotisch einem Grenzwert von ca. 10^6 Zellen/mm^2.

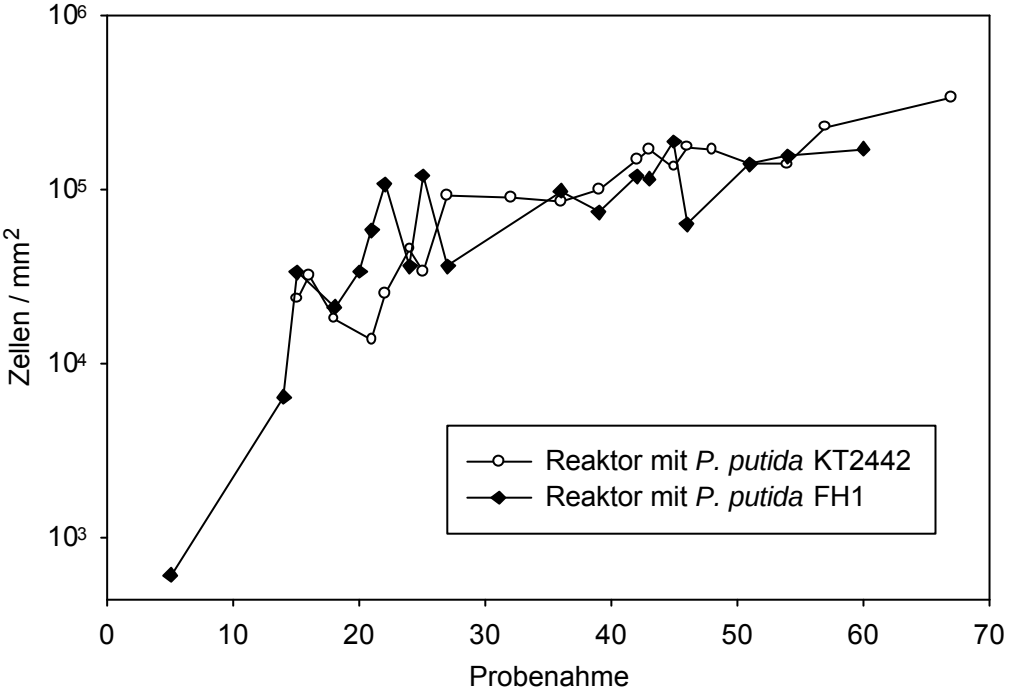


Abbildung 14: Nach 68 Tagen hatte die Gesamtzellzahl im Biofilm 2,8x10^5 Zellen/mm^2 erreicht und näherte sich asymptotisch einem Grenzwert von ca. 10^6 Zellen/mm^2.

3.4.1.2 Gesamtzellzahl in der LW-Flüssigphase

Die mittlere Gesamtzellzahl in frischem LW-Wasser betrug 1,7x10^7 ± 2,9x10^6 Zellen/ml. Innerhalb der Standzeit bis zum nächsten Medienwechsel von 3,5 Tagen nahm die Gesamtzellzahl in den Vorratsgefäßen ab auf im Mittel 6,2x10^6 ± 1,2x10^6 Zellen/ml. Die Gesamtzellzahl in den Biofilmreaktoren betrug 76 ± 5 % der Gesamtzellzahl im Vorratsgefäß.

3.4.2 Art der Besiedelung von Oberflächen durch die Modellorganismen

3.4.2.1 Anlagerung der Modellorganismen an Flocken aus dem LW-Wasser

Die in LW-Wasser enthaltenen Schwebstoffe wurden aufkonzentriert und die Anheftung von *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442 an die erhaltenen Flocken untersucht. Nach 5 min hatten sich die Zellen überwiegend am Rand der Flocken als Einzelzellen angesiedelt. Nach 15 min hatte sich die Zahl anheftender Zellen vergrößert und es wurden Aggregate aus bis zu 20 Zellen beobachtet. Nach 30 min nahm die Zelldichte auf der Oberfläche der Flocken und die Größe der *P. putida*-Aggregate bis auf 100 Zellen zu. Für *P. putida* KT2442 wurden in der Probe nach 30 min Inkubation im Vergleich zu *P. putida* KT2442 weniger Zellen/Flocke detektiert. Darüberhinaus verhielten sich beide Organismen nicht signifikant unterschiedlich. Die Zellzahl im Überstand nahm in den ersten fünfzehn Minuten auf $1{,}4 \times 10^7$ Zellen/ml ab und blieb dann konstant. In den Abbildung 15A und B ist die Anlagerung von *P. putida* FH1 an die Flocken nach 5 und 30 min Inkubation abgebildet

3.4.2.2 Anlagerung von *P. putida* FH1 an TW-Biofilme

Im Kontext der Trinkwasserexperimente wurde die Art der Anlagerung von *P. putida* FH1 über einen längeren Zeitraum ausgewertet. Unmittelbar nach der Zugabe des Inokulums zu den Biofilmen lagen die Zellen als Einzelzellen und überwiegend in Aggregaten von mehr als 20 Zellen vor. Parallel zur Zellzahlzunahme innerhalb von 24 h waren die meisten Zellen in großen (mehr als 20 Zellen) und mittelgroßen (5 bis 20 Zellen) Aggregaten gebunden. Deren Zahl nahm innerhalb von 4 Tagen signifikant ab. Mit der *P. putida* Zellzahl in den Biofilmen sank auch die Zahl der Aggregate insgesamt.

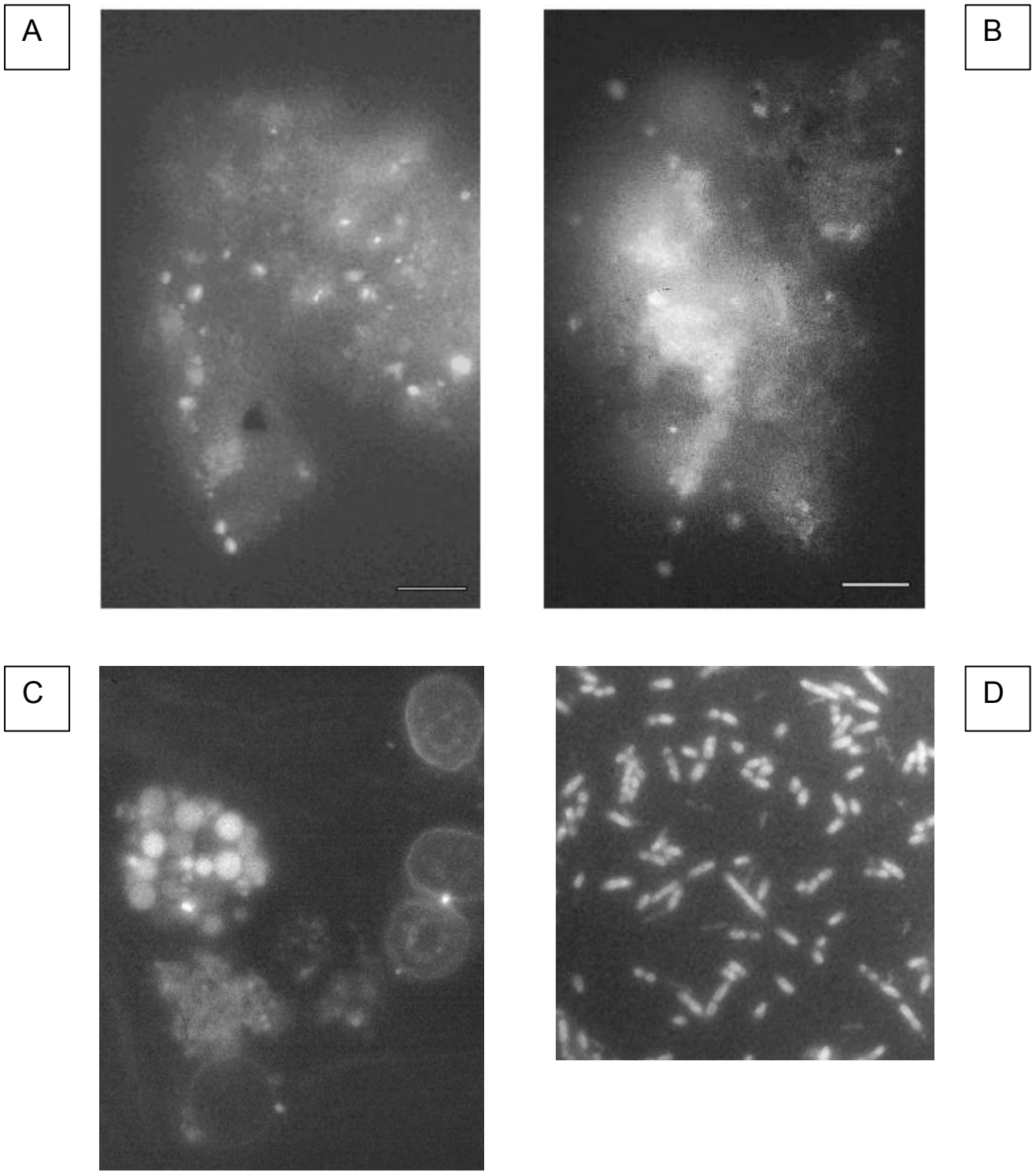


Abbildung 15A und B: *P. putida* FH1 Zellen wurden mit Flocken aus LW-Wasser 5 bis 30 Minuten inkubiert und die Anheftung der Zellen an die Oberfläche mit Hilfe der GFP-Expression beobachtet. In Abbildung 15A ist die Ansiedelung einzelner *P. putida* FH1 Zellen nach 5 Minuten zu sehen, die sich nach 30 Minuten zu Zellaggregaten ausgeweitet haben (Abbildung 15B). Der Maßstab stellt die Länge von 1 µm dar.
Abbildung 15C: Amöben (Acanthamoebae) wurde mit *P. putida* FH1 gefüttert. Es konnten grün fluoreszierende Vakuolen und Einzelzellen in den Amöben nativ beobachtet werden.
Abbildung 15D: Nach der Zugabe in LW-Wasser kam es zur Fragmentierung der *P. putida* FH1 Zellen, die mit Hilfe der GFP-Expression der Zellen sehr deutlich sichtbar wird.

3.4.2.3 Anlagerung der Modellorganismen an die LW-Biofilme

Nach der Zugabe in die Biofilmreaktoren lagerten sich die *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442-Zellen an die LW-Biofilme an. Nach 1 h lag der größte Teil der Zellen auf der Oberfläche in Aggregaten vor. Bereits angelagerte Zellen teilten sich in kokkoide Fragmente. Die Konzentration der anheftenden *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442-Zellen nahm mit zunehmender Versuchsdauer ab, indem sich die Zellaggregate, wie schon bei den Trinkwasserbiofilmen beobachtet, verkleinerten. Die zurückbleibenden Zellen veränderten ihre Anordnung scheinbar nicht. Die kokkoiden Fragmente einer „Mutterzelle“ waren über einen langen Zeitraum als Formation zu detektieren. Einzelzellen von *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442 wurden erst im fortgeschrittenen Experiment beobachtet. Die Anlagerung von *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442 an bestimmte Biofilmformationen wurde mit dem Epifluoreszenzmikroskop in nativen Biofilmen oder nach *in situ* Hybridisierung mit der spezifischen Sonde PPU646 in fixierten Biofilmen ausgewertet. Die initiale Anlagerung erschien jeweils zufällig; die Anlagerung der Organismen in dichten Schleim oder als Aggregate an den Rand von Biofilmflocken wurde mit zunehmender Dauer häufiger beobachtet. Verbleibende Einzelzellen lagerten sich häufig an organische Partikel an. Auf einer von Zellen oder größerem organischen Material unbedeckten Oberfläche konnten keine Einzelzellen von *P. putida* FH1 oder *P. putida* KT2442 detektiert werden. (Die Abbildung 16 zeigt die Entwicklung anhand der Signale mit der spezifischen Sonde PPU646, in den Abbildungen 17 und 18 sind die GFP exprimierenden *P. putida* FH1 Zellen in nativen Biofilme zu sehen).

Nach *in situ* Hybridisierung der Biofilme mit den spezifischen Sonden für die Gruppen der alpha-, beta- und gamma-*Proteobakterien*, Cytophaga-Flavobacter, Sulfatreduzierer sowie Eukaryonten und Pilze wurde keine Häufung bestimmter Nachbarschaften zwischen *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442 und ausgewählten authochthonen Organismen detektiert.

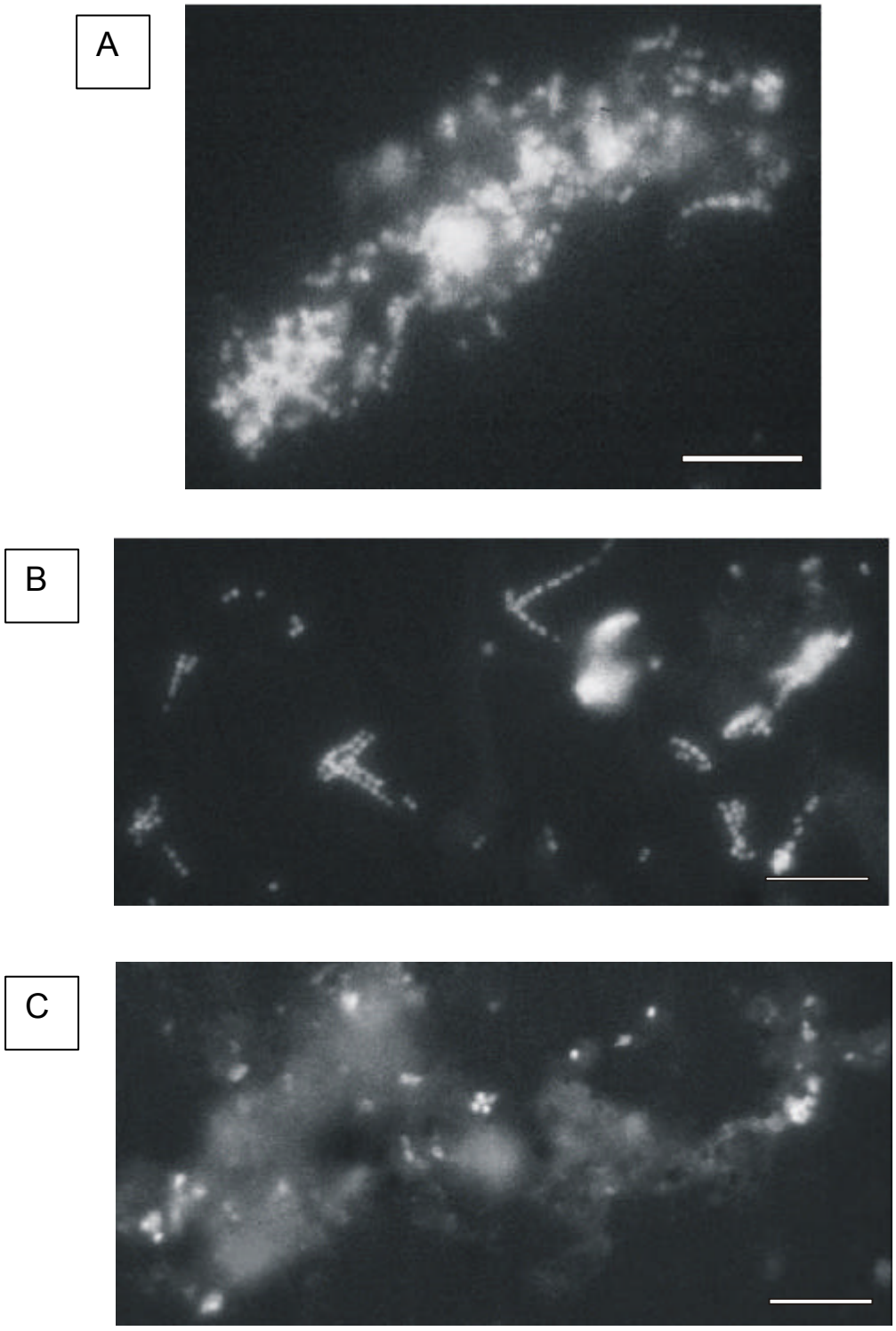
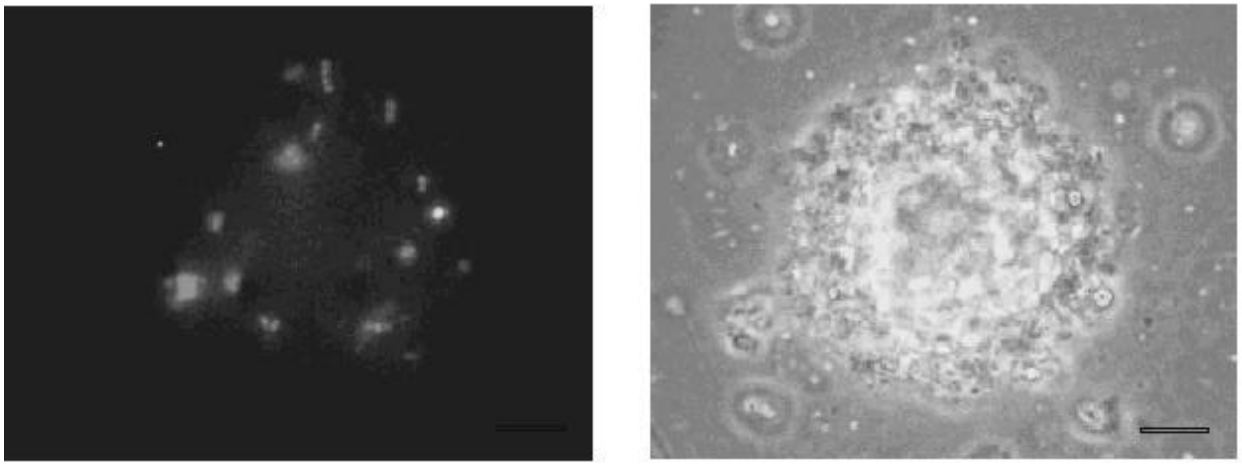
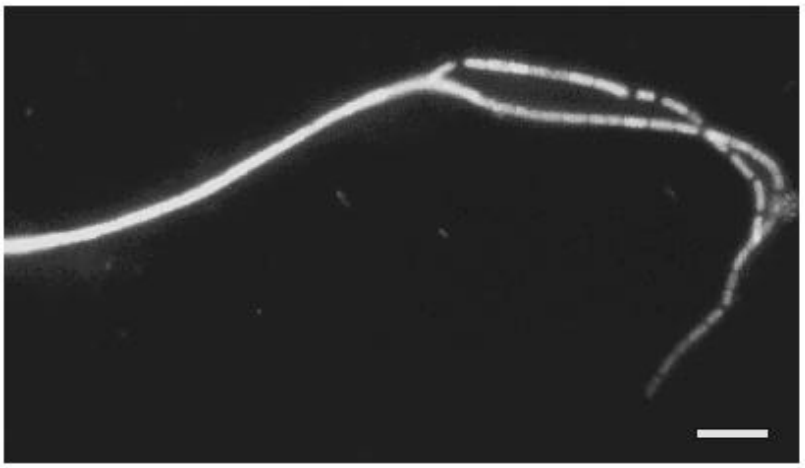


Abbildung 16: Nach der Zugabe in die Biofilmreaktoren lagerten sich die Modellorganismen an die vorhandene Matrix an. Die initiativ gebildeten Aggregate konnten nach 4 Tagen noch beobachtet werden (A), zur gleichen Zeit waren an anderen Stellen in den Biofilmen nur noch kleine Aggregate und Zellenketten detektierbar (B). 4 Tage später hatten sich die Zellagglomerate bereits weiter verkleinert (C). Die Modellorganismen wurden mit der Sonde PPU646 spezifisch nachgewiesen.



A

B

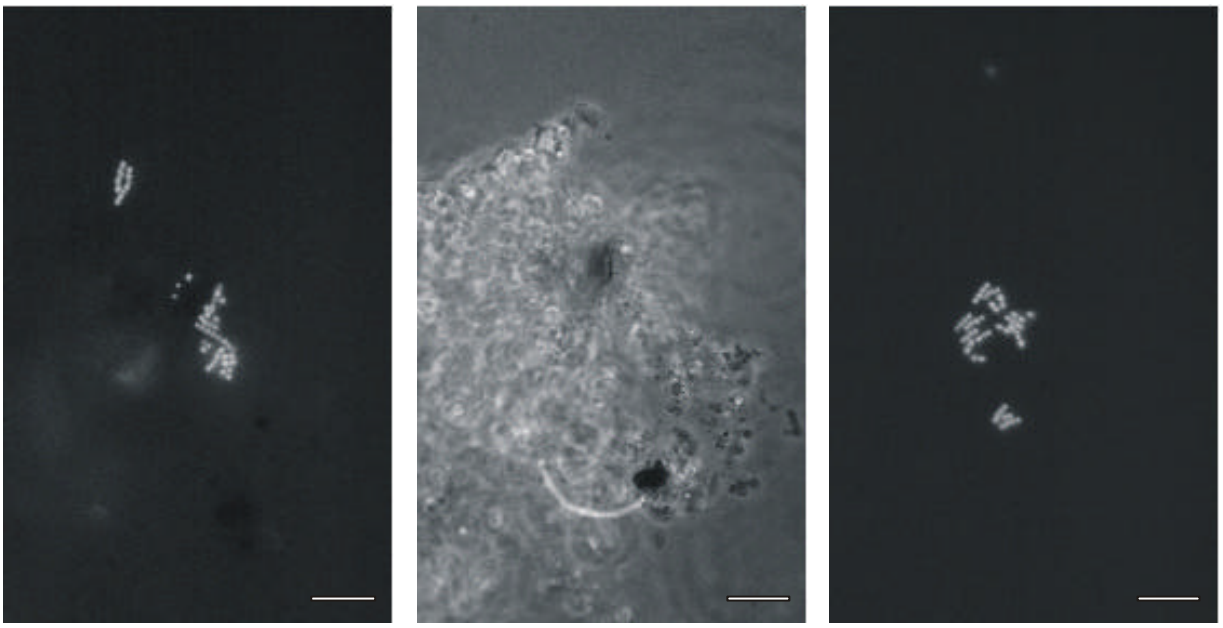


C

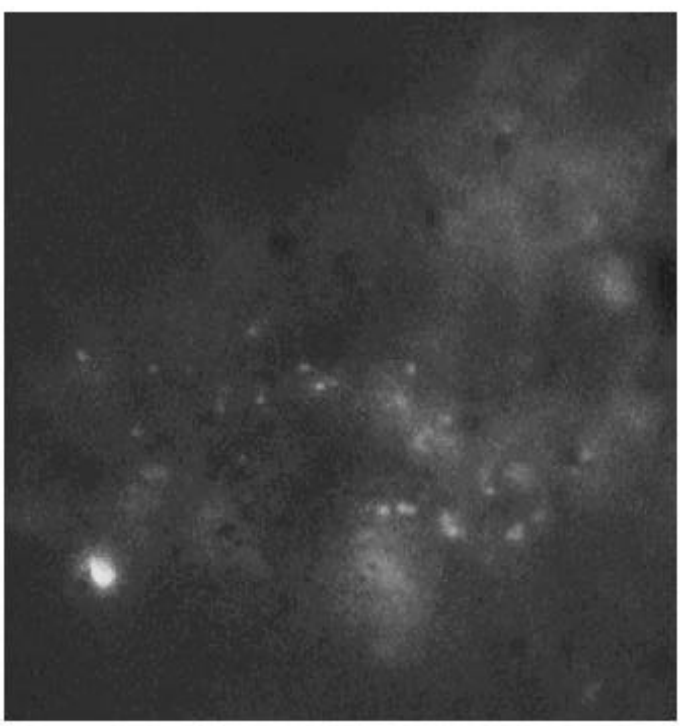
D

Abbildung 17A und B: Der gleiche Bildausschnitt wurde im Epifluoreszenzmikroskop (A) und im Hellfeld (B) aufgenommen. Auf der nicht von Wasserbakterien bedeckten Oberfläche waren keine Zellen von *P. putida* FH1 zu beobachten. *P. putida* FH1 siedelte bevorzugt an dichte Zellaggregate oder Schleim an.

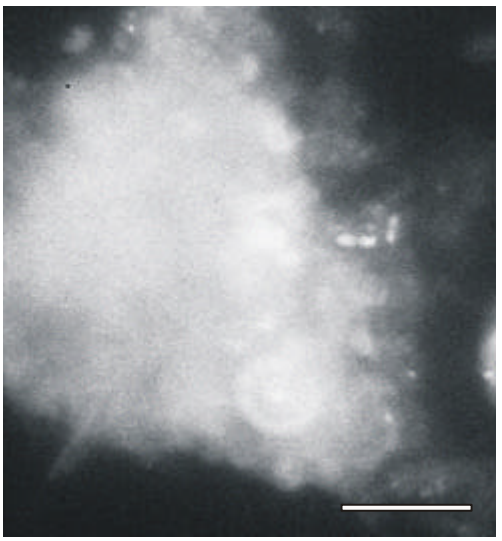
Abbildung 17 C und D: Der gleiche Bildausschnitt wurde nach *in situ* Hybridisierung mit der spezifischen Sonde für die beta-Proteobakterien (C) und die GFP-Expression (D) aufgenommen. Die *P. putida* FH1-Zellen haben sich in dichten Aggregaten entlang der Zellkette des beta-Proteobakteriums angesiedelt.



A B C



19



20

Abbildung 18A-C: 4 Tage nach der Zugabe von *P. putida* FH1 zu den LW-Biofilmen hatten sich die Zellen in den Biofilmen zu diesen charakteristischen Formationen angeordnet (A, C). A zeigt die GFP-exprimierenden Zellen und B die Hellfeldaufnahme desselben Bildausschnitts.

Abbildung 19: 18 Tage nach der Zugabe von *P. putida* FH1 zu den LW-Biofilmen sind die Zellen anhand ihrer grünen Fluoreszenz noch immer sehr gut von der Autofluoreszenz und Hintergrundfärbung des Biofilms zu unterscheiden.

Abbildung 20: Durch Frau U. Böckelmann präparierte Elbe-Flocken wurden mit der Sonde PPU646 *in situ* hybridisiert. Deutlich sind am rechten Rand 4 Zellen mit starkem Sondensignal erkennen.

3.4.3 *P. putida* FH1 *und P. putida* KT2442 in LW-Biofilmen – *Experiment über 200 Tage*

Die Abbildungen zu diesem Teil der Arbeit befinden auf den Seiten 69 bis 75.
Zwei Wochen lang wurde LW-Wasser durch die Biofilmreaktor-Anlagen gepumpt, sodass sich authochthone Biofilme ausbilden konnten. Dann wurden die Inokula, in die Reaktoren einer Anlage *P. putida* KT2442, in die Reaktoren der anderen, parallelen Anlage *P. putida* FH1 zugegeben. Nach 3 Stunden wurden die Verbindungen zwischen Vorratsgefäß und Reaktor wieder geöffnet und die Inokula mit dem Volumen des jeweiligen Vorratsgefäß verdünnt. Nach 5 Tagen sowie anschließend alle 3,5 Tage wurde das Medium gewechselt.

3.4.3.1 Detektion der Modellorganismen nach spezifischer *in situ* Hybridisierung

Die Sonde PPU646 wurde zum spezifischen Nachweis von *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1 in den LW-Biofilmen verwendet. 24 Stunden nach der Zugabe der Inokula zu den Reaktoren hatten sich $1{,}4 \times 10^4 \pm 2{,}3 \times 10^3$ *P. putida* KT2442-Zellen/mm^2 bzw. $1{,}9 \times 10^4 \pm 1{,}7 \times 10^3$ *P. putida* FH1-Zellen/mm^2 an die Biofilme angelagert. Die Zahl der mit der Sonde PPU646 hybridisierbaren Zellen auf der Oberfläche nahm innerhalb der folgenden 6 Tage für beide Organismen schnell auf ca. 6 - 8 % des Ausgangswertes ab (siehe Abbildung 21). Dann verlangsamte sich die Abnahmerate. In der letzten auswertbaren Probe nach 32 Tagen wurden noch 64 ± 40 Zellen/mm^2 im Ansatz mit *P. putida* KT2442 und 145 ± 34 Zellen/mm^2 im Ansatz mit *P. putida* FH1 mit Hilfe der Sonde PPU646 detektiert. Zu diesem Zeitpunkt waren die Sondensignale bereits sehr schwach.

Aktivierung der Biofilmzellen

Durch Kalmbach *et al.* (1997a) konnten die Hybridisierungssignale von Biofilmzellen durch Inkubation der Biofilme in Nährlösung verstärkt werden. Durch Zugabe von Gyrasehemmern wurde die Zellteilung verhindert (*probe active count*).
Ähnlich wurde, um die *P. putida* FH1- und *P. putida* KT2442-Zellen in den LW-Biofilmen zu aktivieren und den Nachweis per *in situ* Hybridisierung länger zu ermöglichen, ein selektives Nährmedium für die Modellorganismen in den Biofilmen gesucht. Nach der Entnahme aus den Reaktoren wurden die Biofilme 1 – 18 Stunden in R2A*+Kan(50), 0,1 % NB, Pseudomonas-F-Medium bzw. Cetrimid-Medium

inkubiert. Der Einfluß eines Gyrasehemmers wurde nicht untersucht.
Durch die Inkubation der Biofilme in R2A*+Kan(50) bzw. Pseudomonas-F-Medium konnten die Modellorganismen nicht selektiv angereichert werden, unabhängig von der Inkubationsdauer. Die authochthone Flora konnte die Substrate schneller oder besser verwerten und überwucherte die Modellorganismen.
0,1 % NB hatte keine aktivierende Wirkung auf die Biofilmzellen. Unabhängig von der Inkubationsdauer veränderte sich weder die Zahl noch die Intensität der PPU646-Signale in den Biofilmen oder die Begleitflora.
Cetrimid wurde erst sehr spät im Laufe des *Experiments über 200 Tage* getestet. Nach einer Inkubation über Nacht (18 Stunden) hatte eine deutliche Anreicherung der gamma-*Proteobakterien* stattgefunden. Das Ergebnis wurde zu spät erhalten, als daß es noch eingesetzt werden konnte.

Die Vorversuche

Die jeweils höchste Konzentration von PPU646-Signalen pro Fläche wurde in allen LW-Biofilm-Experimenten in der ersten Probe nach der Zugabe der Inokula bestimmt. Als initiale Konzentration wurden $8{,}0x10^2$ Zellen/mm^2 bzw. $1{,}2x10^3$ Zellen/mm^2 gemessen. In diesen Experimenten war das Inokulum der Modellorganismen 4 bzw. 14 Tage nach der Exposition der Polycarbonatflächen in das LW-Wasser zugegeben worden und die Inokula wurden bereits 1 Stunde nach der Zugabe wieder ausgespült. Im Experiment über 200 Tage wurde das Inokulum von ebenfalls 10^6 Zellen/ml$_{Reaktorvolumen}$ nach 14 Tagen zugegeben und verblieb 5 Tage im Reaktorsystem. In den Vorversuchen konnte *P. putida* FH1 nicht länger als 17 Tage sowie *P. putida* KT2442 nicht länger als 22 Tage mit Hilfe der Sonde PPU646 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 22).

3.4.3.2 GFP-Expression im Biofilm

Die GFP-Expression wurde parallel zur spezifischen Hybridisierung als Nachweismethode für *P. putida* FH1 sowie zur Detektion von Rezipienten des Plasmids pJB20 eingesetzt. Vor der Zugabe von *P. putida* FH1 wurde in den LW-Biofilmen und der Flüssigphase keine grüne Fluoreszenz detektiert. 24 Stunden nach der Zugabe der Inokula wurden in den Reaktoren mit *P. putida* FH1 $1{,}6x10^4 \pm 2{,}0x10^3$ GFP-exprimierende Zellen/mm^2 gezählt. Innerhalb von 7 Tagen hatte sich die Zahl auf $1{,}0x10^3 \pm 1{,}0x10^2$ Zellen/mm^2 reduziert (siehe Abbildung 23). Der weitere Verlauf glich einer 2. Stufe, die, mit einer kleineren Abnahmerate, vom 7. bis

zum 53. Tag dauerte. Nach 60 Tagen war die Detektionsgrenze von 50 ± 20 GFP-exprimierenden Zellen/mm^2 erreicht.

In den Biofilmen wurden keine Zellen mit GFP-Expression detektiert, die eine für *P. putida* FH1 untypische Morphologie zeigten, noch, die nicht mit PPU646 hybridisiert werden konnten, aber mit der allgemeinen *Bacteria*-Sonde EUB338.

3.4.3.3 Nachweis der Modellorganismen durch selektive Kultivierung

Für die selektive Kultivierung der Modellorganismen wurden die Medien Pseudomonas-AgarF und R2A*+Kan(50)-Agar verwendet. Nach der mikroskopischen Auswertung der Biofilme wurden die Biofilmzellen mit einem sterilen Kunststoffspatel vorsichtig abgeschabt, in sterilem Wasser oder R2A* resuspendiert, verdünnt und auf den Agarplatten ausplattiert. Die Auswertung erfolgte wie unter 2.3.3 (Selektive Kultivierung) beschrieben. Anhand von Kolonieform, -farbe und –fluoreszenz konnten auf den Selektivmedien *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1-Kolonien von der Begleitflora unterschieden werden. Regelmäßig wurden einzelne Kolonien spezifisch hybridisiert und ihre Identität mit der Sonde PPU646 überprüft. Es wurde keine Kolonie nach der Hybridisierung anders beurteilt als nach der selektiven Kultivierung.

In der ersten Probe nach der Zugabe der Inokula war die Zahl der kultivierbaren *P. putida* KT2442- bzw. *P. putida* FH1-Zellen am größten. Nach 24 Stunden waren 28 % bzw. 29 % der durch *in situ* Hybridisierung nachweisbaren *P. putida* KT2442- bzw. *P. putida* FH1-Zellen auch kultivierbar (siehe Abbildung 24). Bis zum 7. Tag nach der Zugabe waren es im Mittel 35 ± 10 % der *P. putida* KT2442-Zellen und 32 ± 12 % der *P. putida* FH1-Zellen. Die Zahl der kultivierbaren *P. putida* FH1- bzw. *P. putida* KT2442-Zellen in den Biofilmen nahm zu Beginn sehr schnell ab. Parallel zur zweiten Stufe der GFP-Expression nahm die Zahl kultivierbarer Zellen für *P. putida* FH1 in den folgenden Proben langsam ab. Für *P. putida* KT2442 wurde nach 18 Tagen ein Minimum der Zahl kultivierbarer Zellen gemessen (6,0x10^1 KBE/mm^2). Nach 60 Tagen war die Zahl der kultivierbaren Zellen auf 5,8x10^2 KBE/mm^2 angestiegen, und nahm dann wieder ab. Es konnte nicht falsifziert werden, dass die gemessenen Werte (18. bis 60. Tag) eine ansteigende Funktion darstellten. Die Beprobung erfolgte bis zum 60. Tag in regelmäßigen Abständen, danach unregelmäßig. Mit Hilfe der selektiven Kultivierung konnte *P. putida* KT2442 147 Tage und *P. putida* FH1 183 Tage in den LW-Biofilmen nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze der Kultivierung war ca. 1 Zelle / mm^2.

GFP-Expression der Kolonien

Auf R2A*+Kan(50)-Agar zeigten alle *P. putida* FH1-Kolonien GFP-Expression. Auf Pseudomonas-AgarF wurde nach 24 Stunden durch 80 % der *P. putida* FH1-Kolonien GFP exprimiert, der Anteil verringerte sich in den folgenden Proben auf weniger als 1 %. Die Identität der nicht grün fluoreszierenden *P. putida* FH1-Kolonien wurde durch *in situ* Hybridisierung bestätigt. Bis zur letzten positiven Probe wurden auf R2A*+Kan(50)-Agar GFP-exprimierende *P. putida* FH1-Kolonien detektiert.

Die Vorversuche

In den Vorversuchen konnten *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1 40 Tage nach der Zugabe zu den LW-Biofilmen noch nachgewiesen werden.

3.4.3.4 Die Detektionsmethoden im Vergleich: Spezifische *in situ* Hybridisierung, Kultivierung und GFP-Expression

In den Abbildung 25 und Abbildung 26 sind die Detektionsmethoden spezifische *in situ* Hybridisierung, Kultivierung und im Fall *P. putida* FH1 GFP-Expression anhand der Ergebnisse aus dem Langzeitexperiment gegenübergestellt.

P. putida FH1: In der Anfangsphase des *Experimentes über 200 Tage* ergaben die GFP-Expression und die spezifische *in situ* Hybridisierung einen übereinstimmenden Verlauf der *P. putida* FH1-Konzentration in den Biofilmen, während nur ein Teil der Zellen (s. o.) auch kultivierbar war. Nach 10 Tagen waren die Werte der spezifischen *in situ* Hybridisierung kleiner als die der beiden anderen Methoden und später als nach 30 Tagen waren die Hybridisierungen nicht mehr auswertbar (s. o.). Bereits in den Vorversuchen war entsprechend nach der Anfangsphase die Zahl der Zellen mit PPU646-Signal kleiner als die Zahl GFP-exprimierender Zellen gewesen. Die Zahl GFP-exprimierender Zellen verlief bis zum 40. Tag parallel zur Zahl kultivierbarer Zellen und war später als nach 60 Tagen nicht mehr auswertbar. Bis zum 183. Tag konnten *P. putida* FH1-Zellen aus dem Biofilm kultiviert werden (s. o.), wobei die Genauigkeit der Bestimmung mit der Zahl kultivierbarer Zellen abnahm.

P. putida KT2442: Für den Wildtyp wurden die *in situ* Hybridisierung und die Kultivierung als Detektionsmethoden eingesetzt. Wie für *P. putida* KT2442 lag die Zahl der kultivierbaren Zellen in der ersten Probe unterhalb der Zahl spezifisch hybridisierbarer Zellen. Bis zum 14. Tag ergaben die Methoden übereinstimmende Ergebnisse, danach nahm die Zahl der spezifisch hybridisierbaren Zellen ab, während die Zahl der kultivierbaren Zellen zunahm.

3.4.3.5 Die planktonische Phase in den Biofilmreaktoren

Im *Experiment über 200 Tage* wurden die Flüssigphasen in den Biofilmreaktoren parallel zu den Biofilmen beprobt, um mögliche Unterschiede bzgl. des Überlebens der Modellorganismen in den entsprechenden Bakteriengemeinschaften zu ermitteln sowie, um zum späten Zeitpunkt des Experimentes, die Herkunft der planktonischen *P. putida* FH1- bzw. *P. putida* KT2442-Zellen zu klären: Durch Wachstum in der Flüssigphase oder Ablösen anheftender Zellen.

Drei Zeitabschnitte, zu Beginn des Experiments, 5 Tage nach der Zugabe des Inokulums zu den Biofilmreaktoren sowie 146 Tage nach der Zugabe sind im Folgenden genauer dargestellt. Die Abbildung 27 und Abbildung 28 zeigen die Konzentrationsverläufe von *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442 in den jeweiligen Vorratsgefäßen bis zum 120. Tag nach der Zugabe der Inokula. Beim Vergleich dieser Kurven mit den Funktionen, die sich aus der spezifischen *in situ* Hybridisierung der LW-Biofilme für *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1 ergaben (Abbildung 21), verlaufen die Kurven mit gleicher Tendenz. Nach der Zugabe der Inokula wurden die jeweils höchsten Konzentrationen der Modellorganismen in den Füssigphasen bestimmt; im weiteren Verlauf des Experimentes nahmen die Konzentration kontinuierlich ab. In jeweils beiden Biofilmreaktoren eines Ansatzes wurden nach der Zugabe der Inokula nach spezifischer *in situ* Hybridisierung $6{,}9 \times 10^6$ Zellen/ml *P. putida* KT2442 und $2{,}7 \times 10^6$ Zellen/ml *P. putida* FH1 gezählt. Das Inokulum wurde mit dem Volumen der jeweiligen Vorratsgefäße auf theoretisch $1{,}4 \times 10^6$ Zellen/ml *P. putida* KT2442 bzw. $5{,}6 \times 10^5$ Zellen/ml verdünnt. Tatsächlich wurden 1 Tag nach der Zugabe der Inokula $1{,}5 \times 10^5$ und $1{,}3 \times 10^5$ Zellen/ml *P. putida* KT2442 in den Reaktoren und $5{,}4 \times 10^5$ Zellen/ml *P. putida* KT2442 im Vorratsgefäß sowie $2{,}1 \times 10^4$ und $3{,}6 \times 10^5$ Zellen/ml *P. putida* FH1 in den Reaktoren und $1{,}3 \times 10^5$ Zellen/ml *P. putida* FH1 im entsprechenden Vorratsgefäß bestimmt. Innerhalb von 4 Tagen nahmen die Konzentrationen in den Reaktoren auf $1{,}8 \times 10^4$ und $1{,}4 \times 10^4$ Zellen/ml *P. putida* KT2442 bzw. $2{,}0 \times 10^4$ und $1{,}4 \times 10^4$ Zellen/ml *P. putida* FH1 ab. In den entsprechenden Vorratsgefäßen wurden nach 5 Tagen $8{,}7 \times 10^3$ Zellen/ml *P. putida* KT2442 bzw. $8{,}7 \times 10^3$ Zellen/ml *P. putida* FH1 bestimmt.

Um die Zahl der planktonischen und anheftenden Zellen der Modellorganismen miteinander vergleichen zu können, wurden die Konzentrationen in Absolutwerte umgerechnet:

$$\text{Gesamtzahl}_{\textit{P. putida}\ \text{KT2442, in der Flüssigphase}} = c_{\textit{P. putida}\ \text{KT2442, in der Flüssigphase}} * V_{\text{Flüssigphase}}$$

$$\text{Gesamtzahl}_{\textit{P. putida}\ \text{KT2442, im Biofilm}} = c_{\textit{P. putida}\ \text{KT2442, im Biofilm}} * A_{\text{Biofilm}}$$

(entsprechend für *P. putida* FH1). c steht für die Konzentrationen [Zellen/ml] bzw. [Zellen/mm^2], V für das Volumen einer Biofilmreaktor-Anlage, incl. Vorratsgefäße und Schlauchverbindungen, A für die Flächen einer Biofilmreaktor-Anlage, incl. Vorratsgefäße und Schlauchverbindungen. Es wurde vereinfachend vorausgesetzt, daß die jeweiligen Proben repräsentativ für alle Oberflächen bzw. Volumina des Systems waren.

Aus den Konzentrationen in Biofilmen und Flüssigphasen, die zwischen dem 1. und 5. Tag nach der Zugabe der Inokula bestimmt wurden, wurden Abnahmeraten entsprechend der Formel $\mu=(\ln x-\ln x_0)/-t$ (μ: Abnahmerate, x: Zellzahl zum Zeitpunkt t, x_0: Zellzahl zum Zeitpunkt t_0) getrennt für anheftende und planktonische Zellen berechnet. Die Annahme, dass kein Austausch zwischen Biofilm und Flüssigphase stattfand, wurde willkürlich getroffen und vorausgesetzt. Tabelle 12 zeigt das Ergebnis: Die Zahl planktonischer *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442 nahm 1,7 bzw. 3 fach schneller ab als die Zahl der entsprechenden Biofilmzellen.

Tabelle 12: Anteile planktonischer versus anheftender *P. putida*-Zellen

System	Probe-nahme-stelle	Tag 1	Tag 5	Abnahme absolut	Abnahme in %	Absterberate μ
P. putida KT2442	Flüssig-phase	$6{,}69\times10^9$	$1{,}09\times10^8$	$6{,}58\times10^9$	90	$0{,}042h^{-1}$
	Biofilm	$3{,}15\times10^9$	$8{,}36\times10^8$	$2{,}31\times10^9$	73	$0{,}014h^{-1}$
P. putida FH1	Flüssig-phase	$1{,}51\times10^9$	$1{,}18\times10^8$	$1{,}39\times10^9$	92	$0{,}027h^{-1}$
	Biofilm	$3{,}90\times10^9$	$8{,}36\times10^8$	$3{,}06\times10^9$	78	$0{,}016h^{-1}$

Die ermittelten Abnahmeraten wurden eingesetzt, um den weiteren Verlauf der Kurven vorherzusagen. Die tatsächlichen Konzentrationen in den Biofilmen und Flüssigphasen waren dann aber immer höher als aufgrund der Abnahmerate

berechnet (Daten nicht aufgeführt).

Durch die Medienwechsel wurden jeweils 80 % der Flüssigphase durch frisches LW-Wasser ersetzt. Die daraus berechnete theoretische Auswaschung ergab signifikant schnellere Abnahmen der Konzentrationen von *P. putida* KT2442 und *P. putida* FH1 in der planktonischen Phase als tatsächlich bestimmt (Abbildung 29 für die Zeit vom 5. bis 25. Tag).

Um die Frage zu klären, ob sich die Modellorganismen in der Flüssigphase vermehrten oder die Biofilme Reservoire für die planktonischen Zellen darstellten, wurden die Flüssigphasen in den Biofilmreaktoren und den Vorratsgefäßen zu einem späten Zeitpunkt während des *Experiments über 200 Tage* noch einmal beprobt.
Vor dem Medienwechsel am 146. Tag wurden 3 bzw. 4 KBE/ml in den Reaktoren mit *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1 bestimmt, sowie 0 bzw. 2 KBE/ml in den entsprechenden Vorratsgefäßen. Nach dem Medienwechsel waren keine *P. putida* KT2442- bzw. *P. putida* FH1-Zellen kultivierbar. Bis zum 4. Tag nahmen die Konzentrationen in allen Flüssigphasen zu und blieben danach konstant (in den Reaktoren) bzw. nahmen ab (in den Vorratsgefäßen). Die höchsten Konzentrationen von 2 bis 14 KBE/ml wurden nach 4 Tagen bestimmt (Abbildung 30) und dabei die jeweils höheren Konzentrationen in den Biofilmreaktoren. Im Reaktorsystem mit *P. putida* FH1 zeigten 10 % der *P. putida* FH1 Kolonien GFP-Expression. Bei der Kultivierung der Biofilme stellte sich heraus, dass die Zahl der kultivierbaren *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442-Zellen bereits sehr gering war. Am 147. Tag wurden 3 bzw. 0 Zellen/mm^2 *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1 nachgewiesen. Eine Abnahme dieser Konzentrationen konnte nicht mehr dokumentiert werden.

3.4.3.6 Einfluß der Modellorganismen auf die Biofilmgemeinschaft

Der Einfluß der allochthonen *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442 auf die authochthonen Mikroorganismen, wie im Trinkwasserbiofilm gezeigt, sollte für die LW-Biofilme überprüft werden. Die gruppenspezifische Sonde BET42a und die Sonde der *Bacteria* EUB338 wurden in den *in situ* Hybridisierungen der Biofilme eingesetzt. Die Zusammensetzung der Biofilme wurde über 11 Tage verfolgt. Die Nullprobe wurde unmittelbar vor der Zugabe der Modellorganismen genommen. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 31 dargestellt.
Die Gesamtzellzahlen nahmen unmittelbar nach der Zugabe von *P. putida* KT2442

bzw. *P. putida* FH1 nicht oder nur geringfügig zu. Innerhalb des Probezeitraums vergrößerte sich die Gesamtzellzahl in den mit *P. putida* KT2442 inokulierten Biofilmen von $3x10^4$ auf $1,2x10^5$ Zellen/mm^2 sowie in den Reaktoren mit *P. putida* FH1 von $2x10^4$ auf $1,4x10^5$ Zellen/mm^2. Dabei nahm die Zellzahl nach 4 d signifikant zu, nach 6 d erfolgte keine weitere Zunahme. Die beiden Systeme unterschieden sich nicht signifikant.

Die Anteile der beta-*Proteobakterien* und die Hybridisierbarkeit der Biofilmzellen veränderten sich im Beobachtungszeitraum. Die jeweiligen Minima wurden 2 d nach der Zugabe von *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442 zu den Biofilmen bestimmt. Die statistische Auswertung der Anteile vor und nach der Zugabe von *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442 gaben jedoch keinen Hinweis auf eine Entwicklung oder Tendenz. In den Reaktoren mit *P. putida* KT2442 hybridisierten 49 ± 3 % der Biofilmbakterien mit der Sonde EUB338 und 13 ± 1 % mit der Sonde BET42a, in den Reaktoren mit *P. putida* FH1 waren es 50 ± 2 % mit den Sonde EUB338 bzw. 15 ± 2 % mit der Sonde BET42a. In der letzten Probe wurden mehr beta-*Proteobakterien* im System mit *P. putida* FH1 detektiert, nämlich 22 %, gegenüber 14 % im System mit *P. putida* KT2442. Im Probezeitraum wurde am 5. und 8. Tag das Medium gewechselt.

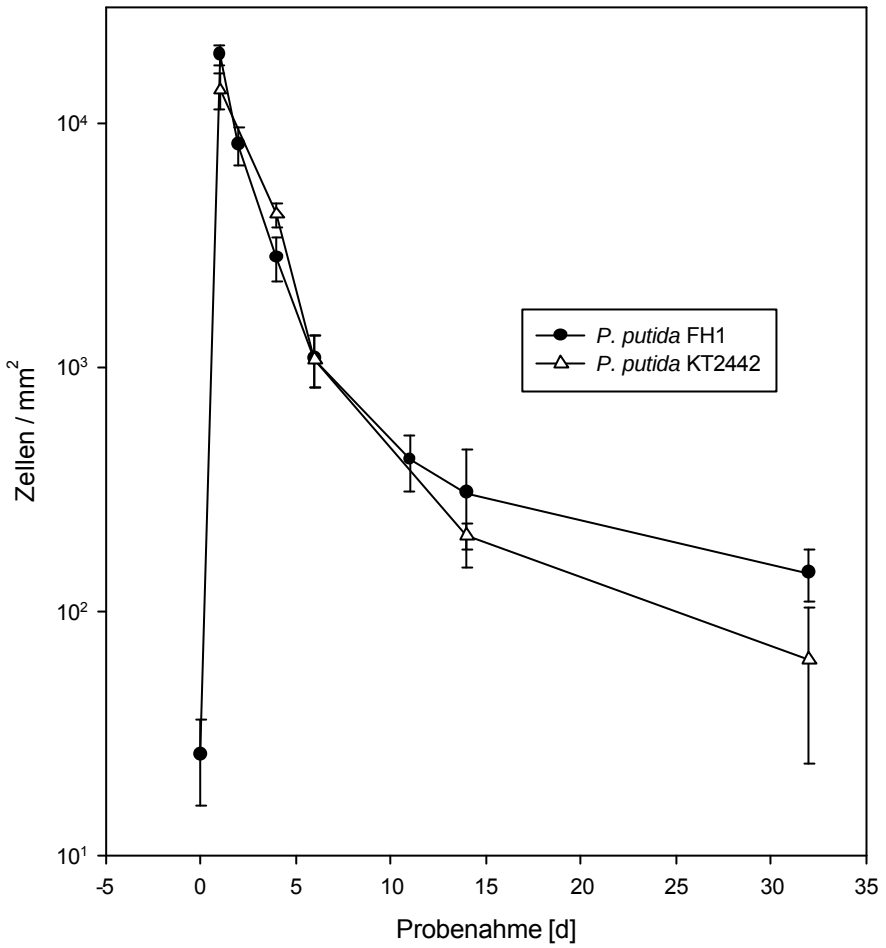


Abbildung 21: LW-Biofilme wurden mit *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1 inokuliert und der Verbleib der Organismen mit der Sonde PPU646 bestimmt.

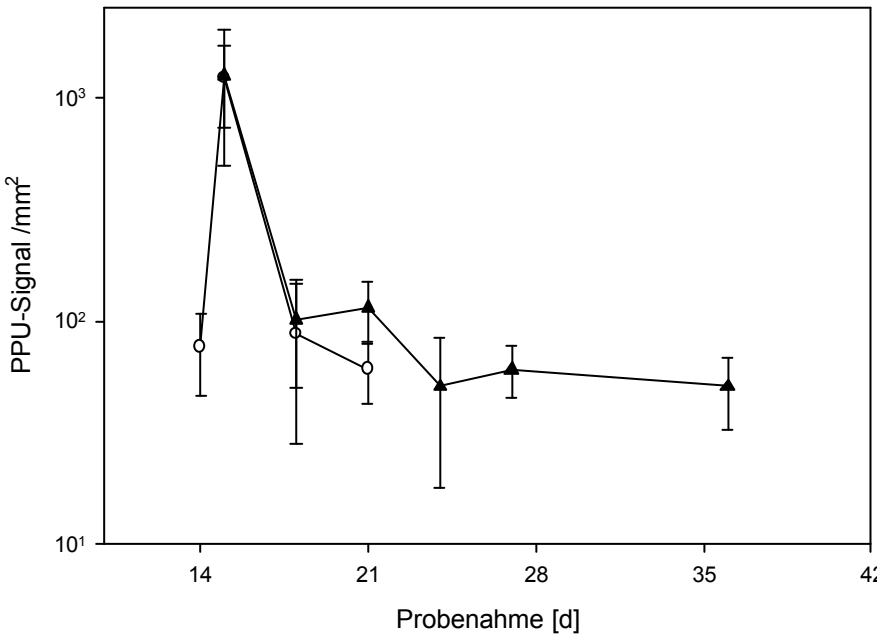


Abbildung 22: In diesem Vorversuch wurden LW-Biofilme an Tag 14 mit *P. putida* KT2442 und *P. putida* FH1 inokuliert und der Verbleib der Zellen mit der Sonde PPU646 bestimmt. Das Inokulum von 10^6 Zellen/$ml_{Reaktorvolumen}$ wurde nach 1 Stunde ausgespült, im Unterschied zu oben: dort Verbleib des Inokulums im Reaktorsystem für 5 Tage. *P. putida* KT2442: ▲, *P. putida* FH1: ❍.

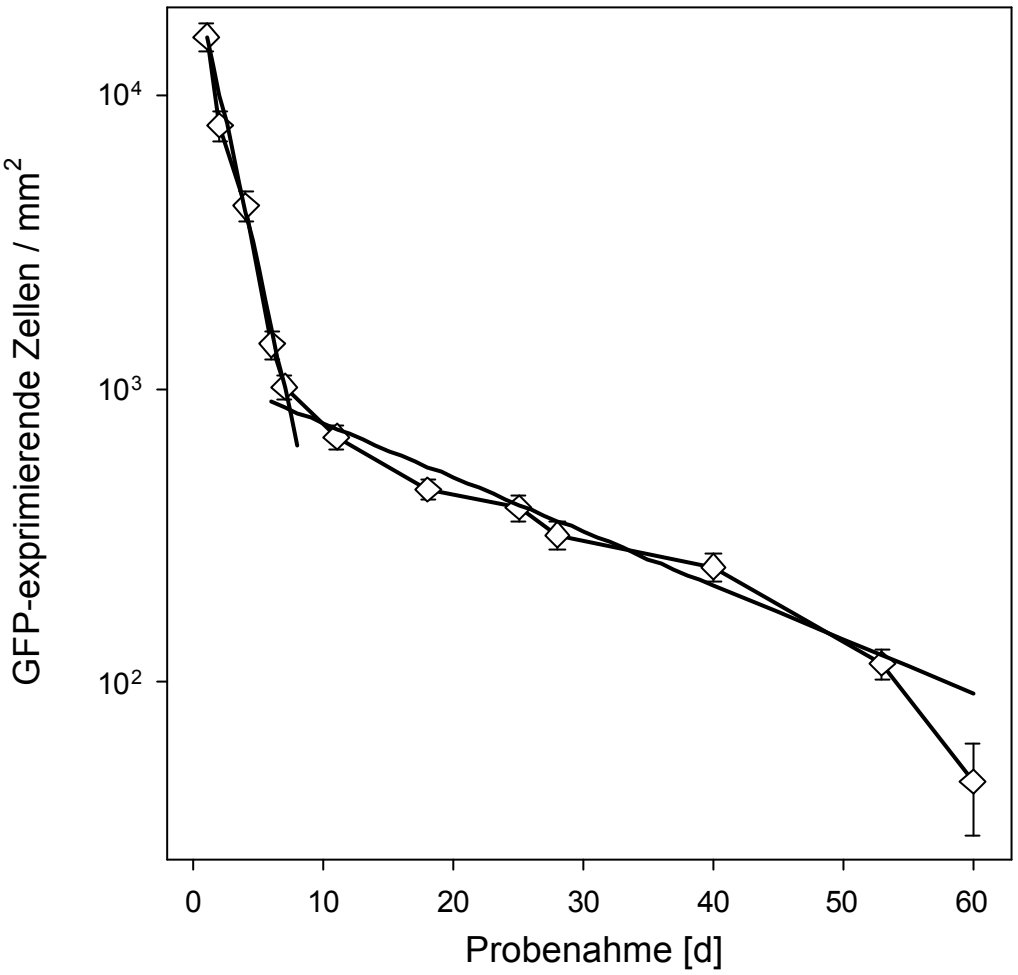


Abbildung 23: LW-Biofilme wurden nach der Zugabe von *P. putida* FH1 mikroskopisch, nativ ausgewertet. Dargestellt ist die Zahl der GFP-exprimierenden Zellen in den Biofilmen. Für jeden Meßpunkt wurden mindestens 100 Gesichtsfelder ausgewertet. Die schrittweise Abnahme konnte durch zwei logarithmische Funktionen der Formel $y = a * e^{-b\,x}$ mit einer Korrelation von $r^2 = 0{,}99$ (Tag 0 bis 7) bzw. $r^2 = 0{,}95$ (Tag 10 bis Ende) angepaßt werden.

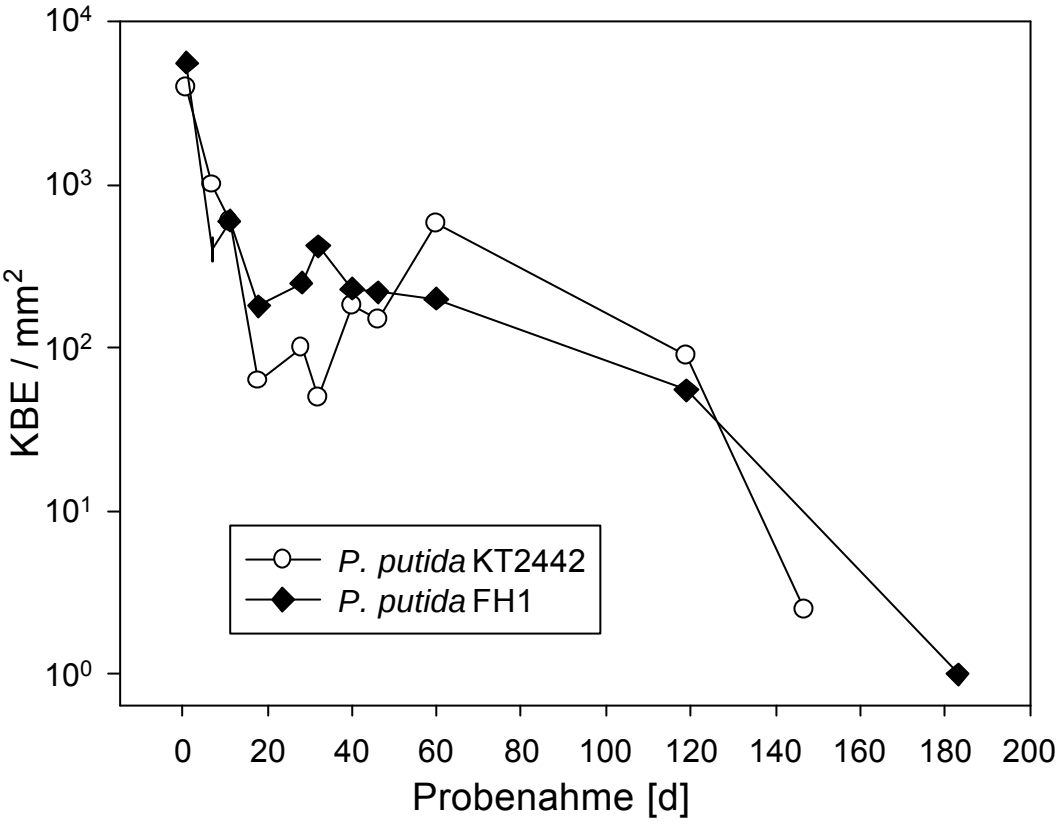


Abbildung 24: Das Überleben von *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1 in den LW-Biofilmen war durch die Kultivierung der Proben am längsten detektierbar. Die LW-Biofilme wurden auf Selektivmedium ausplattiert, um die Kultivierbarkeit der Modellorganismen in den Biofilmen zu bestimmen. Die Meßpunkte geben die Daten auf Pseudomonas-AgarF wieder. Die Werte auf R2A*+Kan(50)-Agar wurden nur für *P. putida* FH1 bestimmt und waren im Mittel geringfügig größer als die dargestellten Zahlen.

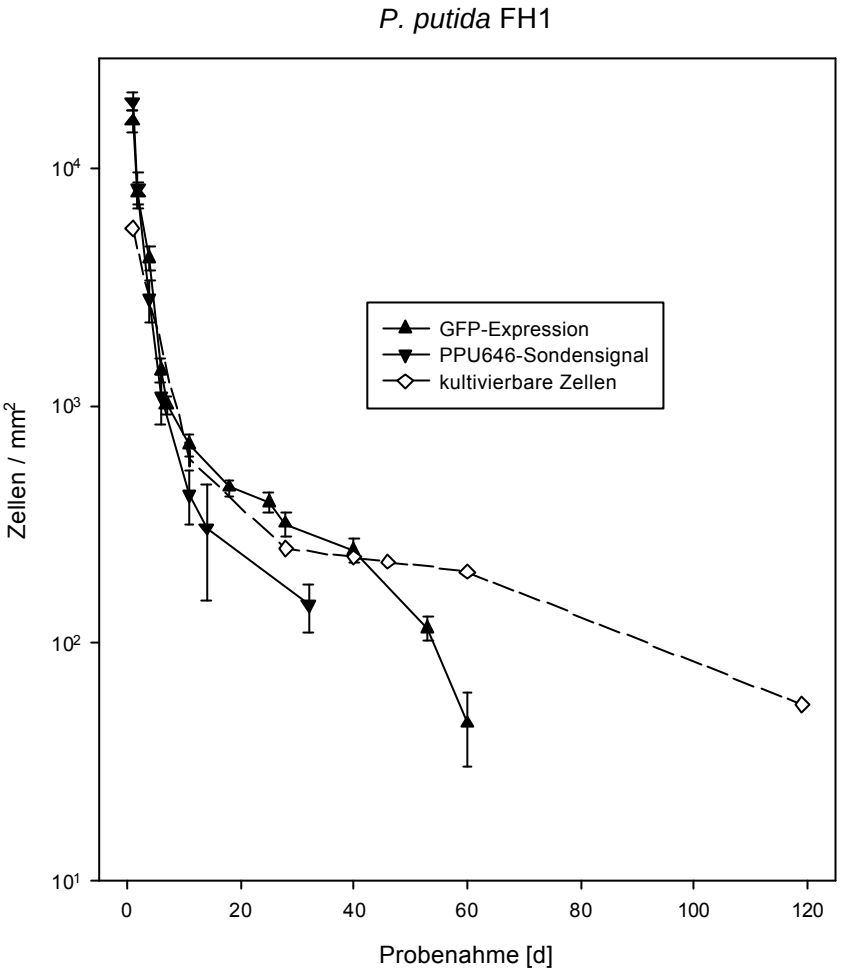


Abbildung 25: Im Vergleich sind die drei verwendeten Nachweismethoden für *P. putida* FH1 in den LW-Biofilmen dargestellt: Kultivierung, GFP-Expression und spezifische *in situ* Hybridisierung.

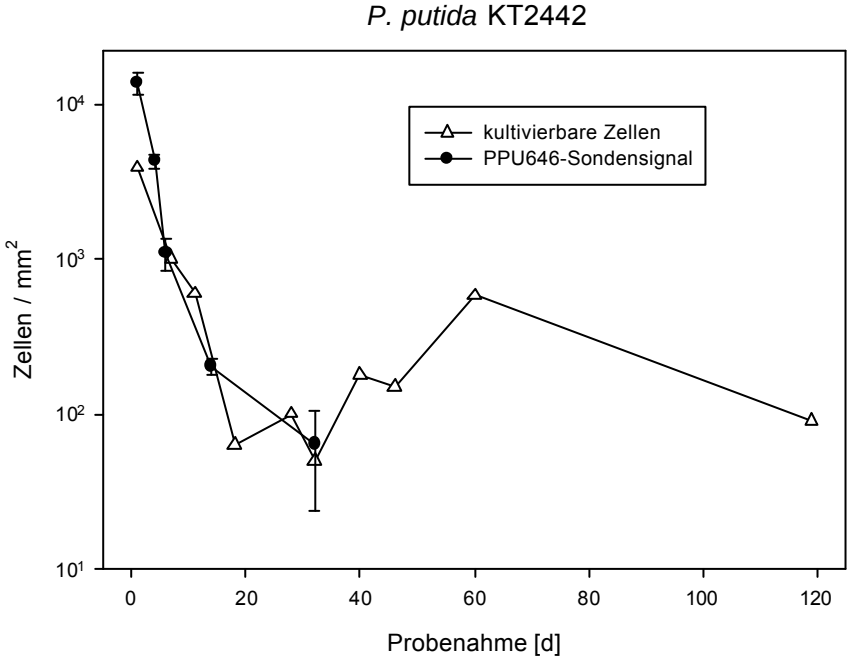


Abbildung 26: Im Vergleich sind die beiden verwendeten Nachweismethoden für *P. putida* KT2442 in den LW-Biofilmen dargestellt: Kultivierung und spezifische *in situ* Hybridisierung.

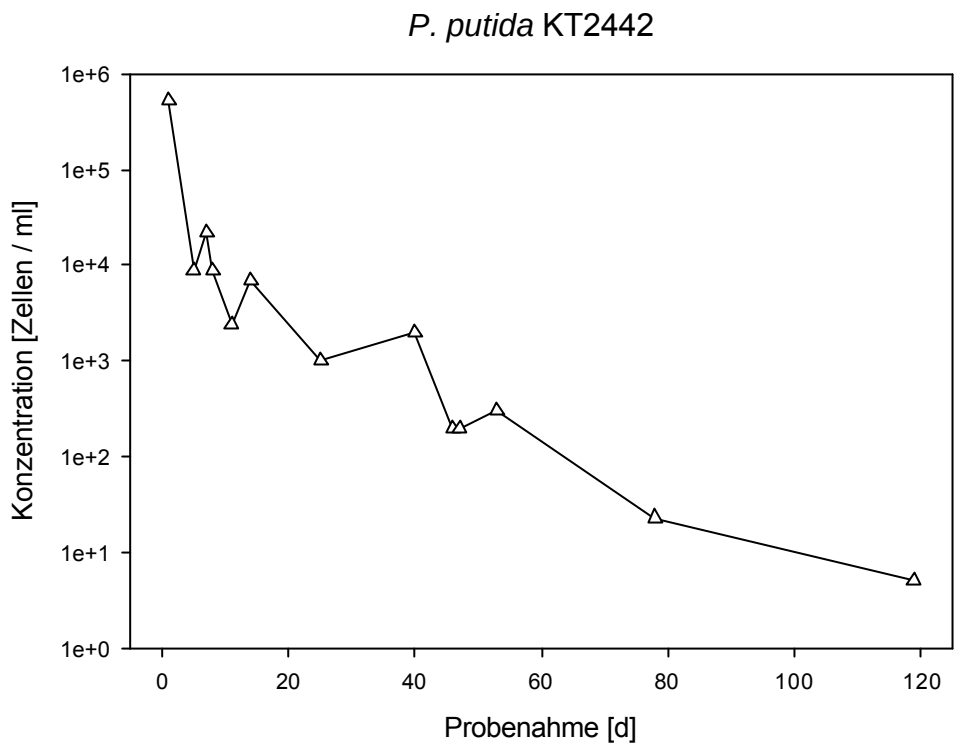


Abbildung 27: Die Flüssigphasen der LW-Biofilmreaktoren wurden beprobt und die Konzentration von *P. putida* KT2442 durch *in situ* Hybridisierung bzw. selektive Kultivierung (ab 60. Tag) bestimmt.

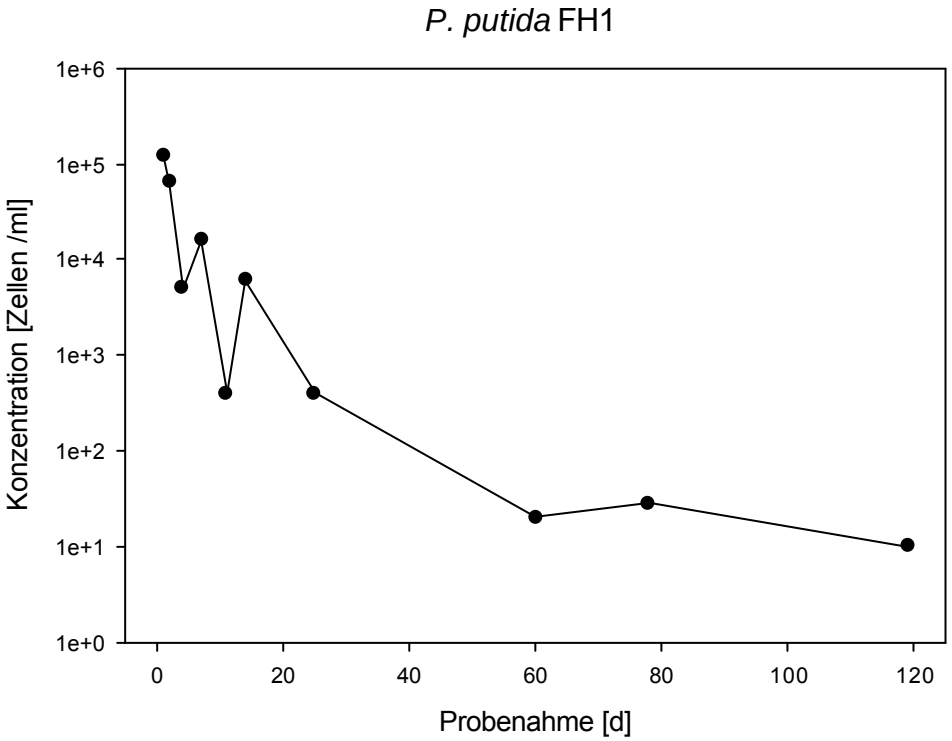


Abbildung 28: Die Flüssigphasen der LW-Biofilmreaktoren wurden beprobt und die Konzentration von *P. putida* FH1 durch *in situ* Hybridisierung bzw. selektive Kultivierung (ab 60. Tag) bestimmt.

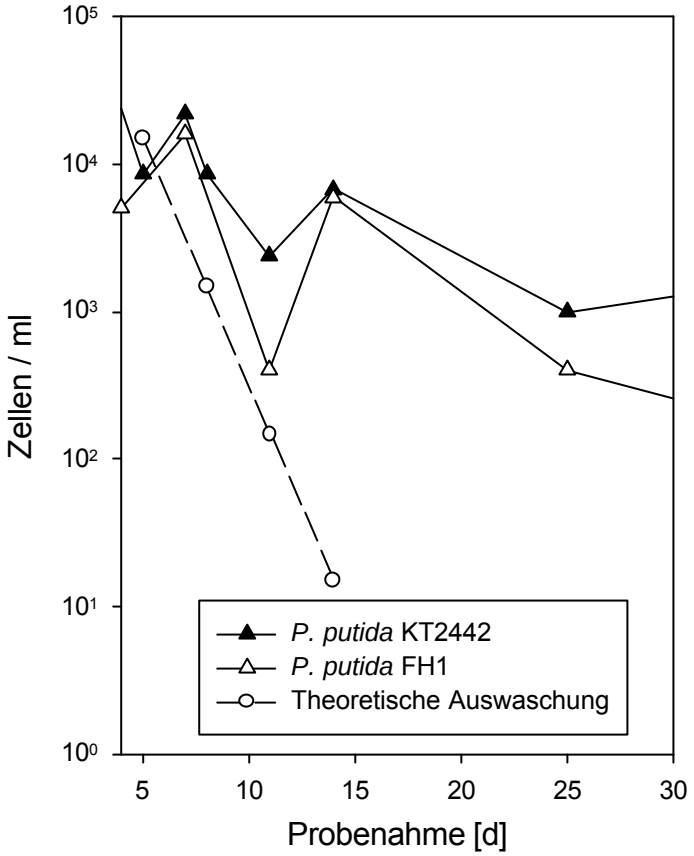


Abbildung 29: In die Grafik ist neben den tatsächlich bestimmten Konzentrationen von *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1 in den Flüssigphasen der LW-Biofilmreaktoren der theoretische Konzentrationsverlauf eingetragen, der sich ergeben würde, wenn weder Wachstum der Zellen in der Flüssigphase noch Rücklösung von Zellen aus den Biofilmen in die Flüssigphasen stattfinden würde.

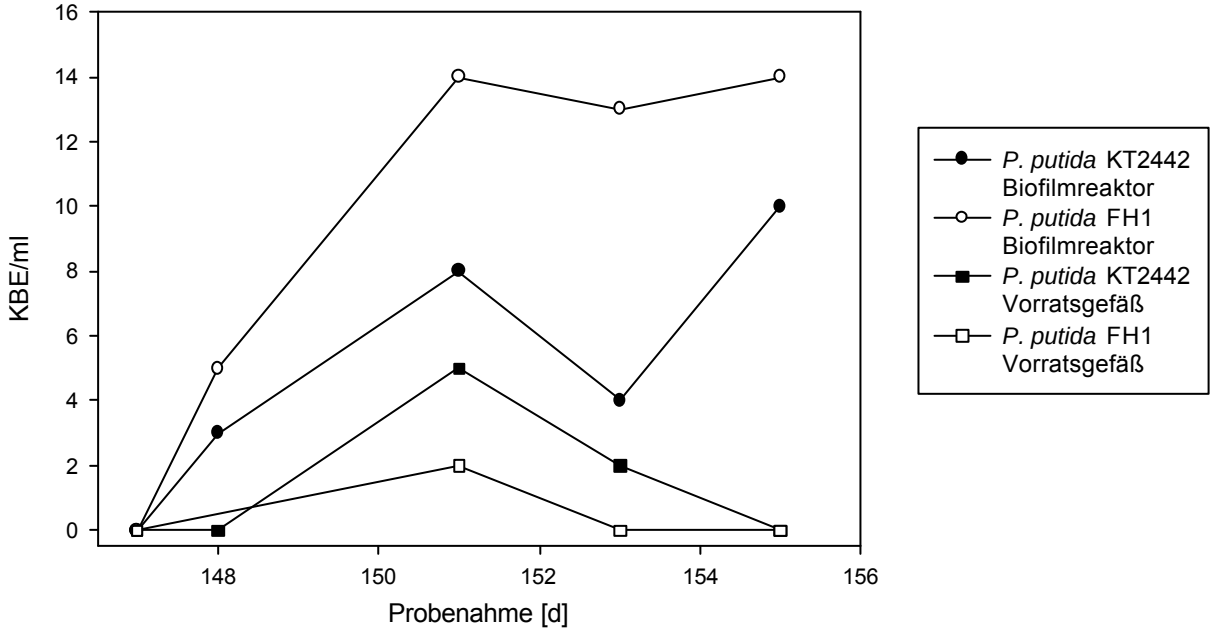


Abbildung 30: Die Zahl der planktonischen *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442 nahm nach dem Medienwechsel nach 147 Tagen in den LW-Biofilmreaktoren und zugehörigen Vorratsgefäßen zu, eine gleichzeitige Abnahme der Zellzahl in den Biofilmen konnte nicht festgestellt werden.

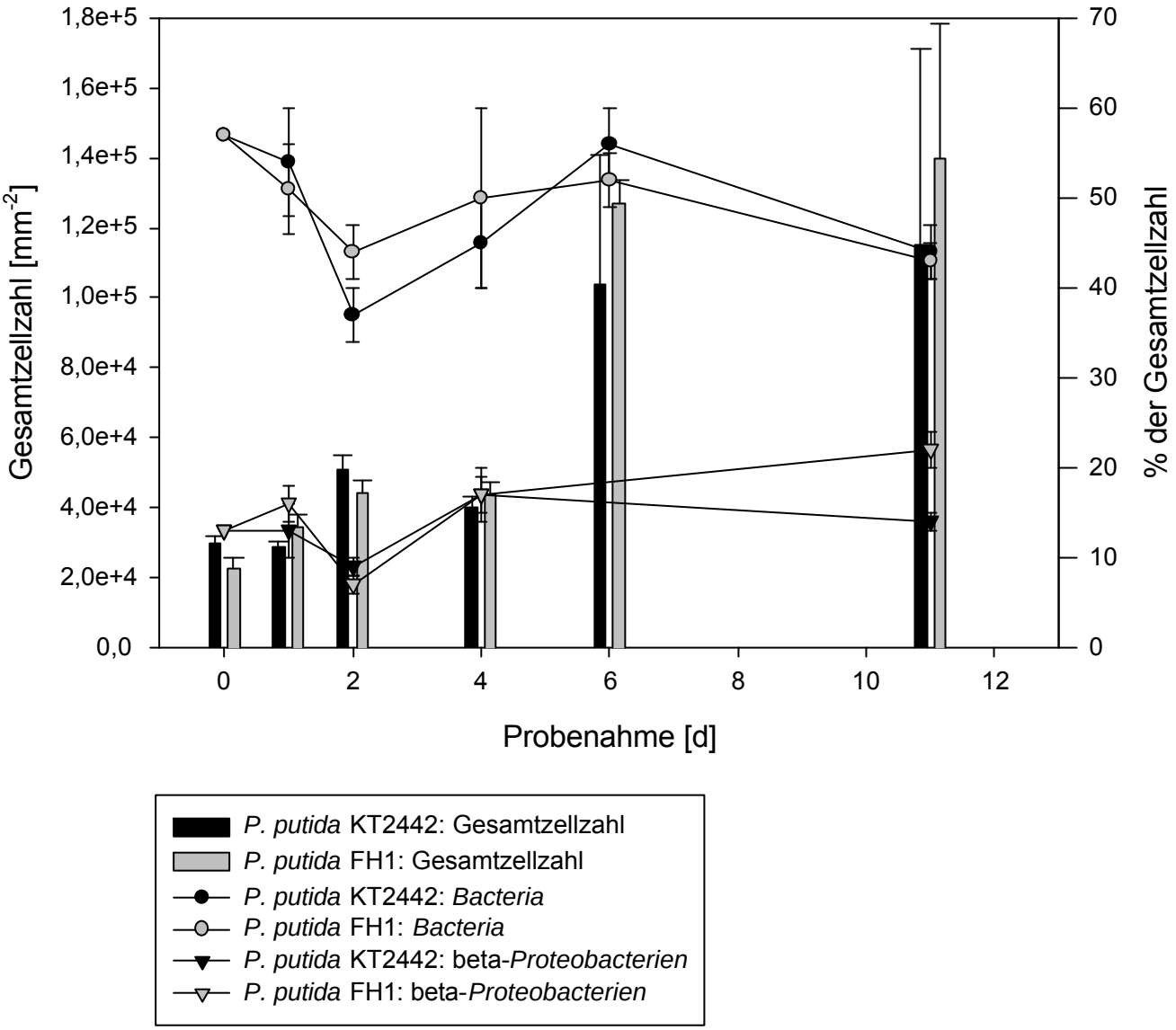


Abbildung 31: Die Anteile der beta-*Proteobakterien* und die Anteile der *Eubakterien* in den LW-Biofilmen nach der Zugabe von *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1 wurde nach spezifischer *in situ* Hybridisierung bestimmt. Dargestellt sind außerdem die Gesamtzellzahlen. LW-Biofilme wurden mit *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1 14 d inokuliert. Die Anteile der beta-*Proteobakterien* (▼, ▽) und der *Eubakterien* (●, ○) ist für beide Reaktorsysteme dargestellt: *P. putida* KT2442 (▼, ●) bzw. *P. putida* FH1 (▽, ○). Die Gesamtzellzahlen sind als Balken eingetragen, *P. putida* KT2442 (schwarz), *P. putida* FH1 (grau).

3.5 Gentransfer in authochthone Rezipienten

3.5.1 Konjugation der Trinkwasserisolate

In den Trinkwasserbiofilmen, die mit *P. putida* FH1 inokuliert worden waren, wurden keine Transkonjuganten detektiert. Unter Laborbedingungen wurden Kreuzungen zwischen *P. putida* FH1 und Rifampicin-resistenten Mutanten der Trinkwasserisolate *A. commune* bzw. *A. citratiphilum* durchgeführt, um das Potential für einen Gentransfer zu bestimmen und die Stämme mit dem Gen für das Grün Fluoreszierende Protein zu markieren.

3.5.1.1 Screening auf Rifampicin-resistente Mutanten

A. commune- und. *A. citratiphilum*-Flüssigkulturen in R2A* wurden auf R2A*-Agar, supplementiert mit 25, 50, 75 bzw. 100 µg/ml Rifampicin, ausplattiert. Nach 3 tägiger Inkubation bei Raumtemperatur hatten sich im Mittel aus ca. 10^7 Zellen 10 ± 2 Rifampicin-resistente Mutanten von *A. citratiphilum* bzw. 3 ± 1 Rifampicin-resistente Mutanten von *A. commune* ausgebildet. Die Mutationsrate betrug ca. 10^{-6}. Für je fünf Kolonien der höchsten Konzentrationsstufe wurde die Stabilität der Mutation durch mehrfaches Überimpfen auf R2A*+Rifampicin(50)-Agar bestätigt. Die Identität der Mutanten wurde durch spezifische *in situ* Hybridisierung mit den Sonden B4 bzw. B8b überprüft. Im Vergleich von Wachstumsgeschwindigkeit und Koloniemorphologie unterschieden sich die Mutanten nicht vom entsprechenden Wildtyp. Die Mutanten wurden mit „^{rif}“ bezeichnet.

3.5.1.2 Konjugationen

Die Konjugationen auf der Platte wurden mit *A. commune*^{rif} und *A. citratiphilum*^{rif} durchgeführt. Vorkulturen von insgesamt fünf verschiedenen Rifampicin-resistenten Mutanten von *A. citratiphilum*^{rif} wurden mit 10^7 Zellen/Ansatz im Verhältnis zum Donorstamm *P. putida* FH1 von 50:1 und 100:1 eingesetzt. Auf den Selektivplatten wuchsen über alle Ansätze gemittelt 100 ± 20 Kolonien pro Platte, entsprechend einer Konjugationsrate von 10^{-5}. Je drei Kolonien jeder Platte wurden auf Selektivmedium (R2A*+Kan+Rifampicin(50)) sowie auf NB mit bzw. ohne Zusatz von Nalidixinsäure (50 µg/ml) weitergeführt. Alle potentiellen Transkonjuganten konnten auf allen Platten wachsen. *A. citratiphilum*^{rif} konnte weder auf NB mit bzw. ohne Nalidixinsäure noch auf dem Selektivmedium wachsen. *P. putida* FH1 wuchs auf NB

mit bzw. ohne Nalidixinsäure, sowie spontane *P. putida* FH1^{rif} Mutanten ebenfalls auf dem Selektivmedium. Sieben der Transkonjuganten zeigten grüne Fluoreszenz (siehe Abbildung 35). Die Identität der Transkonjuganten mit der stärksten Fluoreszenz wurde mit der Sonde B4 überprüft und bestätigt. Mit dem gleichen Protokoll wurden keine *A. commune* –Transkonjuganten erhalten.

Die Konjugationen mit Filter wurden entsprechend dem beschriebenen Protokoll mit *A. commune*^{rif} und *A. citratiphilum*^{rif} als Rezipienten durchgeführt (siehe Material und Methoden). Aus den Kreuzungen resultierten keine Transkonjuganten. Aus den triparentalen Kreuzungen zur chromosomalen Markierung von *A. commune* bzw. *A. citratiphilum* mit den Genen des GFP bzw. des Blau Fluoreszierenden Proteins resultierten keine Transkonjuganten.

3.5.1.3 Induktion der grünen Fluoreszenz

Durch die Zugabe von Isopropylthiogalactosid (IPTG) als Induktor des *LacZ*-Promotors sollte die Fluoreszenzintensität der Transkonjuganten verstärkt werden. Die Zugabe von 1 mM IPTG in das Medium bewirkte jedoch keine Zunahme der GFP-Expression der Transkonjuganten im Vergleich zu den Kontrollen ohne IPTG.

3.5.2 Detektion des Gentransfers in authochthone Spezies des LW-Wassers

P. putida FH1 konnte maximal 183 d in LW-Biofilmen nachgewiesen werden. Bis zuletzt exprimierte ein Teil der kultivierten *P. putida* FH1-Zellen grüne Fluoreszenz. Die selektive Kultivierung der Biofilmzellen ergab ausschließlich GFP exprimierende Kolonien, deren Zellen mit der Sonde PPU646 ein gutes Signal gaben und so als *P. putida* identifiziert wurden. In den nativen und fixierten Biofilmen wurden keine Zellen mit GFP-Expression beobachtet, deren Morphologie von *P. putida* FH1 verschiedenen war bzw. die kein Sondensignal mit der für *P. putida* spezifischen Sonde PPU646 zeigten.

In den Flüssigkulturen wurden bis zu 54 d nach der Zugabe der Inokula *P. putida* FH1-Zellen mit GFP-Expression beobachtet und isoliert. Auf den Filtern zur Bestimmung der Zusammensetzung der Flüssigkulturen und ihrer Gesamtzellzahl wurden zu keiner Zeit Zellen mit GFP-Expression detektiert, deren Morphologie von *P. putida* FH1 verschieden war bzw. die mit anderen Sonden als der PPU646 hybridisierten. Nach selektiver Kultivierung der Flüssigkulturen wurden in einem Ansatz 14 bzw. 34 d nach der Zugabe des Inokulums GFP-exprimierende Kolonien

auf R2A*+Kan(50)-Agarplatten detektiert, deren Morphologie sich von *P. putida* FH1 unterschied. Die Überprüfung der Zellmorphologie zeigte zwei Bakterienarten, deren Morphologie voneinander und von *P. putida* FH1 verschieden war (siehe Abbildung 35). Das spirillenförmige Bakterium wurde „Trako“, das Stäbchen „Transkonjugant11.1“ genannt. Auf den Selektivplatten, von denen Trako bzw. Transkonjugant11.1 isoliert wurden, war keine *P. putida* FH1-Kolonie gewachsen bzw. die Donor-Kolonie hatte keinen Kontakt zur Kolonie des Rezipienten, sodaß die Konjugation auf der Agarplatte ausgeschlossen werden konnte.

3.5.2.1 Morphologische Charakterisierung der Transkonjuganten

Die Transkonjuganten bildeten kleine weiße (Trako) bzw. farblose (Transkonjugant11.1) Kolonien mit glatter Oberfläche aus. Die maximal gemessene Zelldichte in R2A* war OD (580 nm) = 0.02 (Trako) und 0.3 (Transkonjugant11.1). Die Zugabe von Vitaminlösung, Glaskugeln als Aufwuchsträger oder 1% Agar in das Medium verstärkte oder beschleunigte das Wachstum von Trako nicht.

3.5.3 Nachweis des Gentransfers

3.5.3.1 Antibiotika-Resistenz-Test

Trako und Transkonjugant11.1 konnten auf Agarplatten kultiviert werden, denen Ampicillin bzw. Tetracyclin zugesetzt war. Die Kolonien von Transkonjugant11.1 bzw. Trako bildeten sich innerhalb von 1 d bzw. nach 2 d. Alle Kolonien zeigten grüne Fluoreszenz. Die höchste Fluoreszenzintensität wurde auf den Kontrollplatten, denen kein Antibiotikum zugesetzt war, beobachtet.

3.5.3.2 Immuno-spezifischer GFP Nachweis

In den Kontrollansätzen der Flüssigkulturen und Biofilme, in denen *P. putida* KT2442 inokuliert worden war, konnten grün fluoreszierende Partikel in der Größe von Bakterienzellen beobachtet werden, die sich von einer GFP-exprimierenden Zelle nur durch die zusätzliche Fluoreszenz in den anderen Fluoreszenzfiltern unterschieden. Um eine fehlerhafte Interpretation und artifizielle Fluoreszenz auszuschließen, sollte das GFP in den Zellen der Transkonjuganten bestätigt werden. Für den immunologischen Nachweis wurden spezifische polyklonale Antikörper eingesetzt. Der Nachweis der Antibiotika-Resistenzen wurde nur als erstes Indiz gewertet.

Bevor das intrazelluläre GFP nachgewiesen werden konnte, mußten die Zellen der Transkonjuganten sowie von *P. putida* FH1 als Positivkontrolle bzw. *P. putida*

KT2442 als Negativkontrolle aufgeschlossen werden. Der Aufschluß des Transkonjuganten Trako gestaltete sich schwierig. Um eine ausreichende Proteinmenge zu erhalten, wurden 1,5 l Kulturlösung aufkonzentriert. Der Zellaufschluß war jedoch mit dem zu Beginn eingesetzten enzymatisch-chemischen Protokoll nicht möglich: Die Proteine wurden durch die Elektrophorese nicht aufgetrennt.

Mit dem kommerziellen mechanischen Aufschlußverfahrens FastProteinBlue in Kombination mit Lysepuffer wurden Gesamtextrakte beider Transkonjuganten und der Kontrollstämme erhalten. Wiederum wurde ein relatives großes Kulturvolumen von 100 ml eingesetzt, um eine ausreichende Proteinmenge für den immunologischen Nachweis in Trako zu erhalten. Um die Fragmentierung der Proteine zu vermeiden, wurde der Aufschluß in Eis wiederholt. Nach der Auftrennung der Proteine, spezifischer Antikörperreaktion mit dem ersten und zweiten Antikörper sowie der Detektion des 2. Antikörpers durch eine durch die gekoppelte Meerettich-Peroxidase vermittelte licht-emittierende Reaktion, konnte in beiden Transkonjuganten und dem Donorstamm *P. putida* FH1 die Existenz des Grün Fluoreszierenden Proteins nachgewiesen werden. Für den Kontrollstamm *P. putida* KT2442 gab es keine entsprechenden Wechselwirkungen. Im ersten Aufschluß durch FastProteinBlue wurde die Fragmentierung der Proteine aufgrund zusätzlicher Proteinbanden kleinerer Größe vermutet. Diese Banden waren nach dem Aufschluß in Eis nicht mehr sichtbar. Zusätzlich zu den spezifischen Bindungen wurden in den Zellextrakten von Transkonjugant11.1, *P. putida* FH1 und *P. putida* KT2442 unspezifische Bindungen der polyklonalen Antikörper detektiert. Das Ergebnis ist in der Abbildung 32 dargestellt.

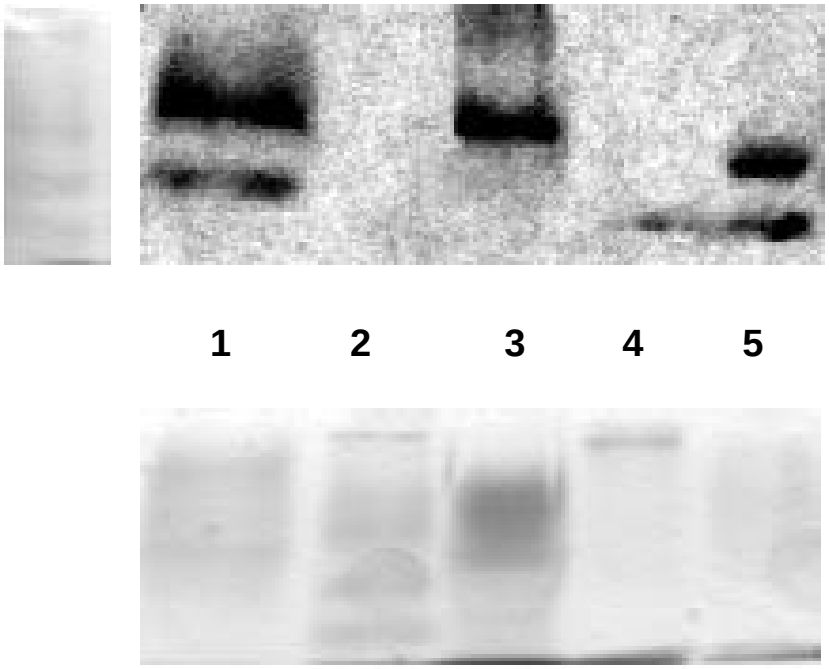


Abbildung 32: Der erfolgreiche immunologische Nachweis von GFP in den Transkonjuganten Trako und Transkonjugant11.1 (Spur 4 bzw. 5), als Positivkontrolle diente *P. putida* FH1 (Spur 1), Negativkontrolle war *P. putida* KT2442 (Spur 3). Der Standard lief in Spur 2. Dem Immunoblot ist das entsprechende Proteingel gegenübergestellt (unten), der Standard ist als Ausschnitt zusätzlich neben dem Blot abgebildet.

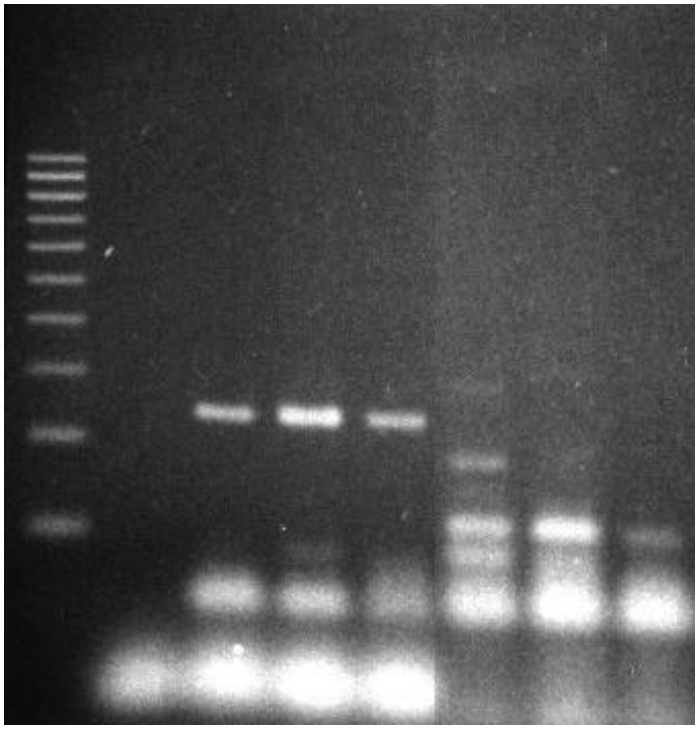


Abbildung 33: (Text siehe nächste Seite). Gesamt-DNS-Extrakte von *P. putida* FH1, *Trako* und *Transkonjugant* 11.1 wurden mit den Primerpaaren IncP*ori*T und IncP*trf*A2 unter Standardbedingungen amplifiziert. Spur 1: Standard, Spur 2: Wasser, Spur 3 bis 5 PCR mit IncP*trf*A2, Spur 6 bis 8 PCR mit IncP*ori*T. Spur 3 und 6: *P. putida* FH1, Spur 4 und 7: *Transkonjugant* 11.1, Spur 5 und 8: *Trako*.

3.5.3.3 Nachweis des Plasmids pJB20 durch spezifische PCR

Götz *et al.* (1996) konnten einige der zur IncP (RP4) Inkompatibilitätsgruppe gehörenden Plasmide durch die Amplifikation charakteristischer Sequenzen in Umweltproben spezifisch nachweisen. Die Primerpaare IncP*ori*T und IncP*trf*A2 zielten auf distinkte Bereiche des Transferursprungs bzw. des Replikations-Initiations-Gens der Plasmide der Inkompatibilitätsgruppe IncP. Für die entstehenden Fragmente war eine Größe von 110 bzw. 241 bp beschrieben. In beiden Transkonjuganten entstanden nach der Amplifikation mit den spezifischen Primern PCR-Produkte dieser Größen (siehe Abbildung 33). In dem als Positivkontrolle eingesetzten *P. putida* FH1 konnte nur IncP*trf*A2 spezifisch amplifiziert werden, während die PCR mit dem Primerpaar IncP*ori*T zusätzliche, nicht spezifische Produkte erzeugte. Um die Stringenz der Reaktion zu erhöhen, wurde die Annealing-Temperatur auf 59°C gesetzt. Die $MgCl_2$-Konzentration wurde von 3,75 - 8 mM variiert. Die Primer-Konzentration wurde von 10 nmol auf 1 nmol gesenkt. Der Anteil unspezifischer Reaktionen von IncP*ori*T mit *P. putida* FH1 konnte jedoch nur reduziert aber nicht aufgehoben werden.

3.6 Phylogenetische Identifikation der Transkonjuganten

Die Morphologie der Zellen und Kolonien und die fehlenden Signale mit der Sonde PPU646 waren deutliche Hinweise darauf, daß die Transkonjuganten sich von *P. putida* FH1 unterschieden. Nach der *in situ* Hybridisierung mit den gruppenspezifischen Sonden ALF1b, BET42a und GAM42a zeigten *Trako* und *Transkonjugant*11.1 nur mit der für die beta-*Proteobakterien* spezifischen Sonde BET42a sehr gute Signale und wurden daher phylogenetisch dieser Gruppe zugeordnet. Die Sonden ALF1b und GAM42a zum Nachweis der alpha- und gamma-*Proteobakterien* gaben mit beiden Stämmen keine Signale.

Die phylogenetische Analyse der Sequenzen in der ARB Datenbank bestätigte das Ergebnis der *in situ* Hybridisierung und klassifizierte die Transkonjuganten als beta-*Proteobakterien*. Für die Berechnung der Distanzmatrixen wurden die 45 nächsten Verwandten der Transkonjuganten aus der Genbank in die ARB Datenbank geladen. Die resultierenden Distanzmatrixen ergaben für *Trako* 3,1 bzw. 4,0 % Abstand zu den nächsten Verwandten *Herbaspirillum seropodicae* bzw. *Pseudomonas lemoignei*. Für *Transkonjugant*11.1 wurde ein Mindestabstand von 7,5, 7,9 bzw. 7,9 % zu den nächsten Verwandten *Trako*, *Ralstonia eutropha* bzw. *Rubrivivax*

gelatinosus berechnet. Die Berechnung der Distanzmatrixen nach Felsenstein oder Similarity veränderte die Ergebnisse nicht. Aus der Matrix nach Jukes und Cantor wurde der phylogenetische Stammbaum berechnet (Abbildung 34).

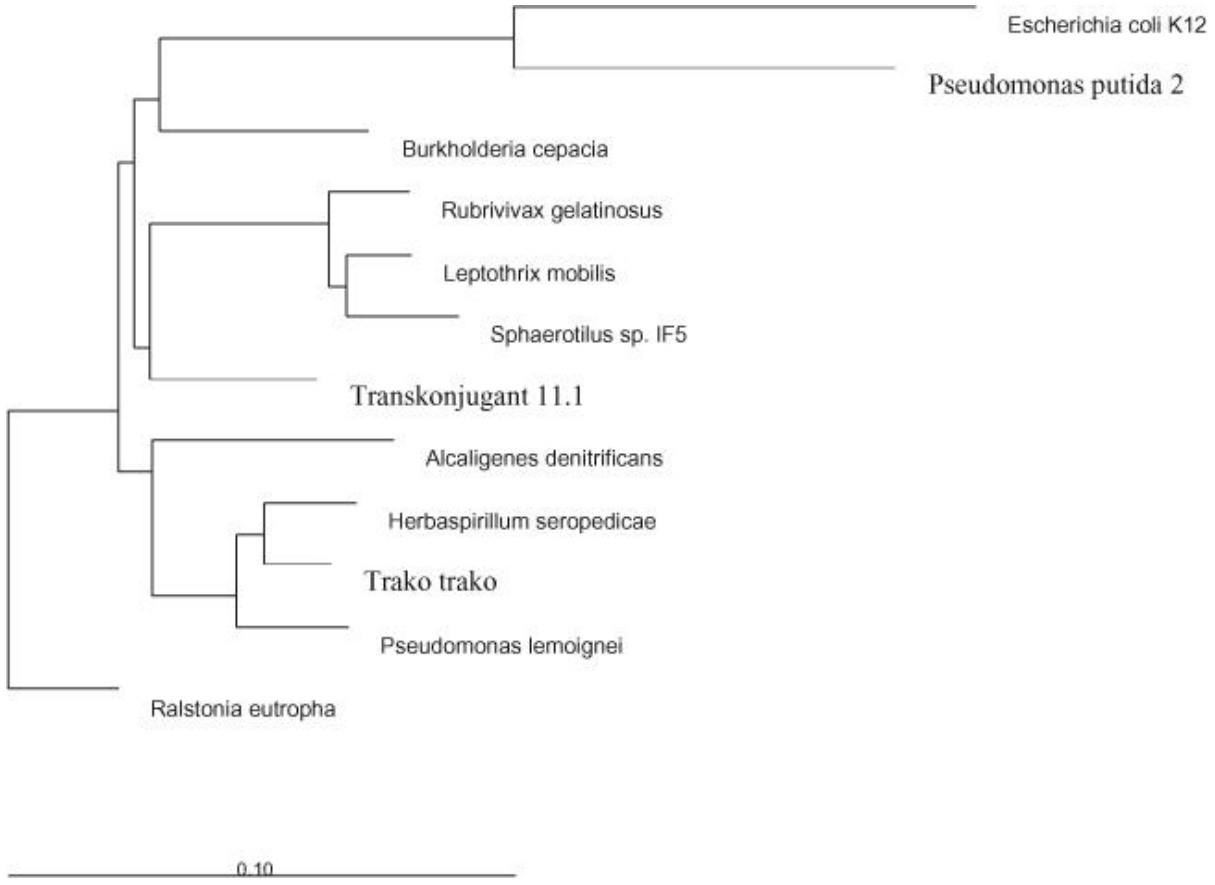


Abbildung 34: Der phylogenetische Stammbaum der Transkonjuganten Trako und Transkonjugant11.1 mit ihren nächsten Verwandten sowie dem pJB20-Donor *P. putida* FH1 („Pseudomonas putida 2“) und *Escherichia coli* als Bezugsgrößen.

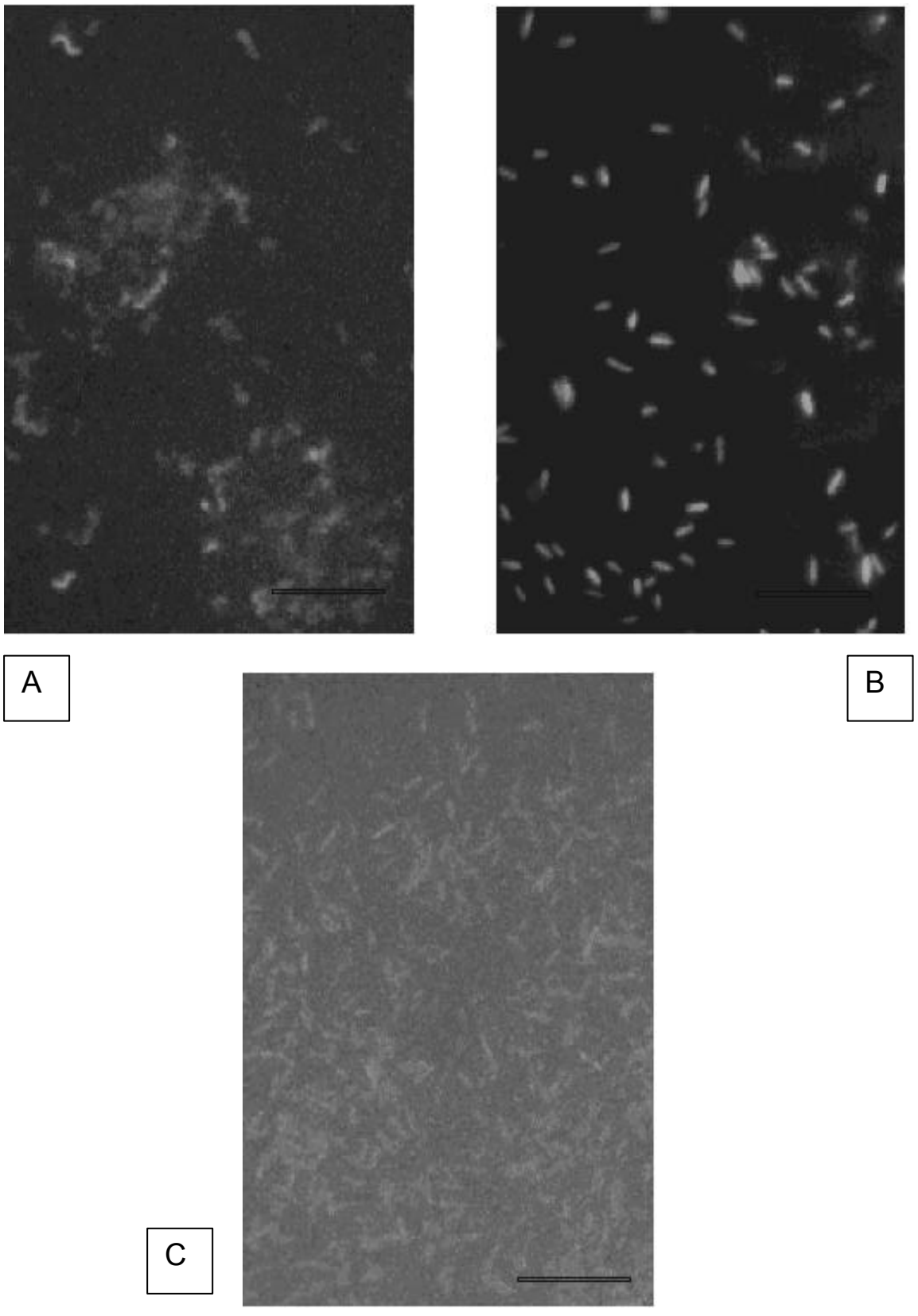
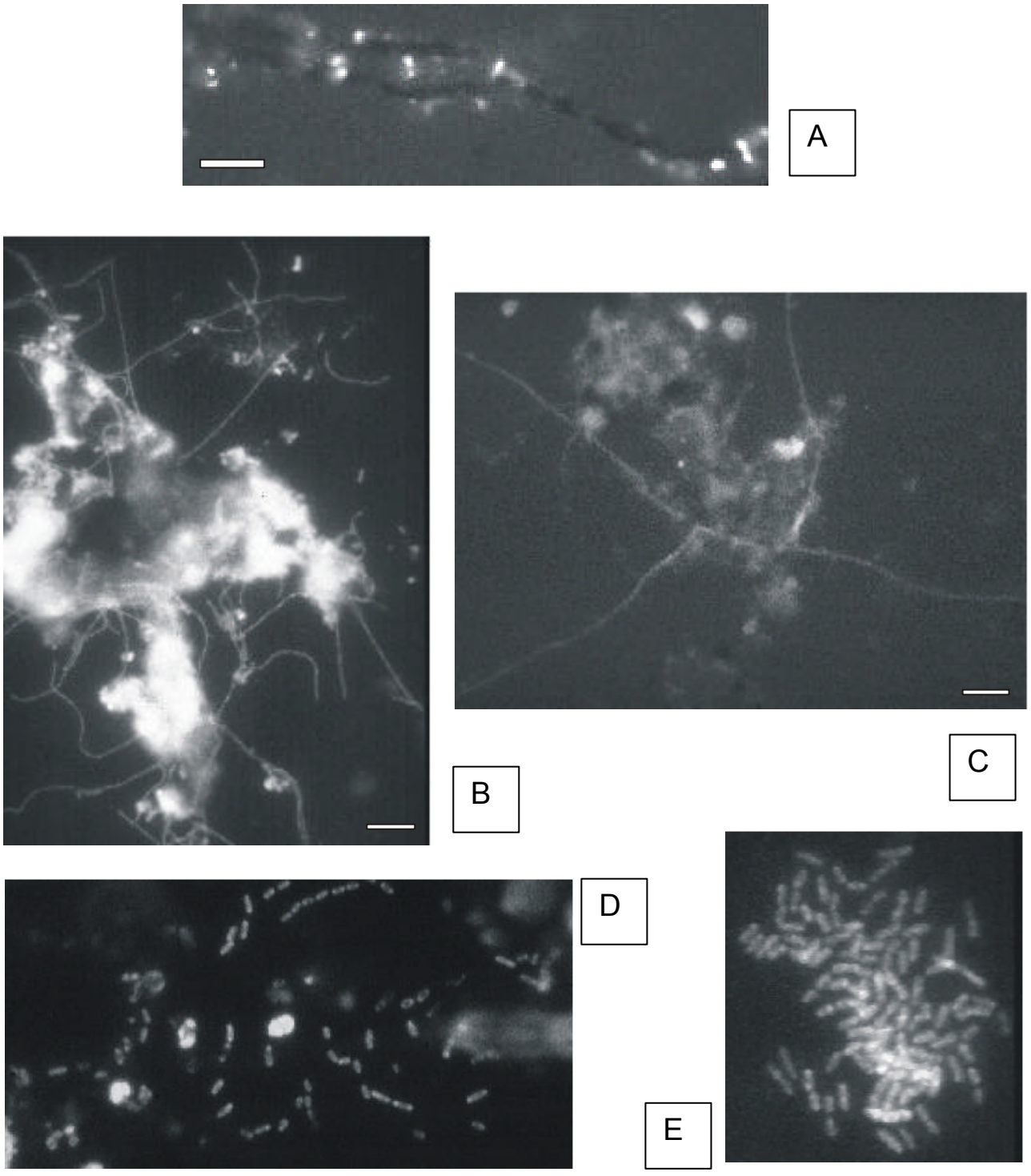


Abbildung 35: Dargestellt sind die in dieser Arbeit neu entstandenen GFP-exprimierenden Bakterien. Plasmidtransfer von *P. putida* FH1 in authochthone Bakterien des Landwehrkanals führte zu Trako (35A) und Transkonjugant 11.1 (35B). Unter Laborbedingungen konnte das Trinkwasserisolat *A. citratiphilum* durch Konjugation markiert werden (35C). Bei der Bildbearbeitung wurde die unterschiedliche GFP-Intensität nicht verfremdet. Der Balken zeigt die Länge von 1 µm an.



Abbildungen 36 A-E: Landwehrkanalbiofilme wurden mit spezifischen Sonden *in situ* hybridsiert, um die Form der Besiedelung zu zeigen und die Anteile der einzelnen Gruppen zu bestimmen. Die Fotos zeigen charakteristische Formen der jeweiligen Gruppierung.
A) SRB338 – Sulfatreduzierer; B) CF319a – Cytophaga-Flavobacter-Gruppe; C) FUN – Fungi (Christiane Baschien, p.c.); D und E) BET42a – beta-*Proteobacteria*

4 Diskussion

Das Überleben von gentechnisch veränderten Mikroorganismen in aquatischen Habitaten und die Auswirkungen der Bakterien auf die autochthone Mikroorganismengemeinschaft waren Thema dieser Arbeit. Mit Hilfe von spezifischer *in situ* Hybridisierung, selektiver Kultivierung und dem Markermolekül GFP wurden die Modellorganismen detektiert und ihre Konzentration und Aktivität in Biofilmen und der planktonischen Phase von Trink- und Flußwasser bestimmt. Parallel zu dem gentechnisch veränderten Organismus (GVO) *P. putida* FH1 wurde der nah verwandte Wildtyp *P. putida* KT2442 in den Experimenten eingesetzt, um mögliche Einflüsse der gentechnischen Veränderung auf das Verhalten der Bakterien zu ermitteln.

4.1 Laborsysteme

Das dieser Arbeit zugrundeliegende Projekt war auf die Untersuchung von gentechnisch veränderten Mikroorganismen in Biofilmen ausgerichtet. In den Vorversuchen zur Auswahl geeigneter Modellorganismen bildeten *P. fluorescens* DSM 50090, *P. putida* DSM 291, *P. putida* FH1, *Ralstonia eutropha* DSM 591 und *R. eutropha* JMP 134 DSM 4058 auf einem Glasobjektträger ein- bis mehrschichtige Biofilme, während *B. subtilis* DSM 347 und *B. mycoides* DSM 299 sich nicht an die Oberfläche anhefteten. Die Einflußgrößen auf die Biofilmbildung werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Verbreitet galt die initiale mikrobiologische Anheftung als Folge der gemeinsamen Wirkung der physiko-chemischen Eigenschaften der beteiligten Oberflächen (Buscher und Weerkamp, 1987, van Loosdrecht *et al.*, 1987 a, b, Costerton *et al.*, 1987). Zita und Hermansson (1997a, b) sowie Olofsson *et al.* (1998) betonten jedoch vor allem die Bedeutung der Zellhydrophobizität und der Begeißelung und räumten der Substrat-Oberfläche nur geringe Bedeutung ein. Diese Ergebnisse erklärten das Verhalten der getesteten Bakterien mit unterschiedlichen Eigenschaften und verschiedener Beschaffenheit der jeweiligen Zellwand. Unter den Biofilm bildenden Bakterien stellten *R. eutropha* DSM 591 und *R. eutropha* JMP 134 DSM 4058 sowie *P. putida* FH1 und *P. putida* KT2442 je ein Paar aus gentechnisch verändertem Organismus und Wildtyp dar. Die Unterscheidung von *R. eutropha* DSM 591 und *R. eutropha* JMP 134 DSM 4058 war durch spezifische 16 S rRNA

Sonden möglich. Letztendlich wurden *P. putida* FH1 und *P. putida* KT2442 als Modellorganismen gewählt, da das Plasmid pJB20 mit dem Gen des Markermoleküls GFP neben der Unterscheidung von *P. putida* KT2442 die native Detektion von *P. putida* FH1 und die Untersuchung des Gentransfers in autochthone Bakterien ermöglichte.

P. putida FH1 konnte in den Habitaten Trinkwasser und Landwehrkanalwasser mit Hilfe der GFP-Expression detektiert werden. Für den spezifischen Nachweis von *P. putida* KT2442 und um *P. putida* FH1 von möglichen Rezipienten des Plasmids pJB20 zu unterscheiden, war eine hochspezifische Sonde erforderlich. Die Sonde PPU646 (Manz, p c.) zeigte bei der Überprüfung mit bekannten Sequenzen der ARB-Datenbank lediglich 7 Sequenzen von Nichtzielorganismen an, während die Sonde PP986 (Møller *et al.*, 1996) 47 Sequenzen von Nichtzielorganismen erfaßte. Die Signalintensität beider Sonden unterschied sich nicht.

Um die Biofilmbildung von im Trinkwasser dominanten Bakterien und die Vergesellschaftung mit *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442 zu beobachten, wurden die Trinkwasserisolate *A. commune* DSM 11901, *A. citratiphilum* DSM 11900, *A. parvum* DSM 11968 und B3 (Kalmbach *et al.,* 1997b) in R2A*-Medium mit Glasobjektträgern als Oberflächen kultiviert. Von *A. parvum* dominierte Mischkulturbiofilme mit *A. citratiphilum* wuchsen langsamer als von *A. citratiphilum* dominierte Mischkulturbiofilme mit *A. parvum*. Dies war übereinstimmend mit Ergebnissen von Kalmbach *et al.* (1997b), nach denen in der Zell- und Koloniegröße sowie der Wachstumsgeschwindigkeit *A. parvum A. citratiphilum* unterlegen war. In Mischkulturbiofilmen, deren Inokulum der Verteilung in den Trinkwasserbiofilmen nach Kalmbach *et al.* (1997b) entsprach, nämlich *A. commune*, *A. parvum*, *A. citratiphilum*, B3 im Verhältnis 40:20:10:1, hatten sich nach 3 Tagen in 100fach verdünntem R2A* bei kontinuierlicher Betriebsweise *A. citratiphilum* DSM 11900 und B3 (Kalmbach *et al.,* 1997b) durchgesetzt. Die ursprüngliche Idee, definierte Biofilme im Trinkwasser einzusetzen, wurde aufgrund der gezeigten Populationsverschiebung aufgegeben. Einzelne Mischkulturbiofilme wurden nachträglich mit *P. putida* FH1 infiziert. In Mischkulturen aus *A. parvum* und *A. commune* zeigte *P. putida* FH1 keine bevorzugte Anlagerung an ein bestimmtes Trinkwasserisolat und integrierte sich nicht in die Biofilme der Trinkwasserbakterien.

Durch die Wahl eines geeigneten Substrates sollten Stoffflüsse von den Trinkwasserisolaten zu *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442 provoziert werden, gleichzeitig mit einer Vergesellschaftung der Bakterien und einem möglichen Gentransfer. In den Substratexperimenten zeigten *P. putida* KT2442 und *P. putida* FH1 im Vergleich mit *A. commune* DSM 11901 (*A. parvum* DSM 11968 und *A. citratiphilum* DSM 11900) grundsätzlich schnelleres und dichteres Wachstum auf dem Großteil der getesteten Substrate, darunter Tween 80, das durch die Trinkwasserisolate, wie wenige andere Substrate, leicht zu verstoffwechseln ist (Kalmbach *et al.,* 1999). In der Mischkultur mit *A. commune* DSM 11901 konnten *P. putida* FH1 und *P. putida* KT2442 mit den Substraten Adipat, Azelat, Pimelat und Sebacat wachsen. γ-Hydroxybutyrat konnte von *P. putida* FH1 verwertet werden. *P. putida* KT2442 konnte γ-Hydroxybutyrat nur in einer Mischkultur mit *A. commune* DSM 11901 verwerten. Eine Vergesellschaftung von Bakterien zur sukzessiven Verwertung eines Substrates wurde durch Szewzyk *et al.* (1994) beschrieben, wobei *E. coli*, ohne selbst Natriumbenzoat zu verwerten, in Gegenwart eines Natriumbenzoat verwertenden Bakteriums wachsen konnte. Møller *et al.* (1998) zeigten die vollständige gemeinsame Verwertung eines Benzyl-Alkohol durch *P. putida* R1 und *Acinetobacter* C6; die Organismen trugen jeweils die Gene für einen aufeinanderfolgenden Abschnitt des Abbauweges. Die gefundenen Substratketten wurden nicht weiter untersucht.

4.2 Trinkwasser als Habitat

Die Trinkwasser-Flüssigkulturen sollten das Verhalten von *P. putida* im oligotrophen System zeigen. *P. putida* DSM 291 wurde anstelle von *P. putida* KT2442 als Wildtyp eingesetzt, bis dieser zur Verfügung stand. Nachdem *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* DSM 291 in Trinkwasser inokuliert wurden, ging die Kultivierbarkeit vorübergehend signifikant zurück, unabhängig vom Stamm und sowohl in autoklaviertem als auch in sterilfiltriertem Trinkwasser. Bei Versuchsende nach 5 bzw. 11 Tagen lag die Kultivierbarkeit über dem Anfangswert. Der Rückgang der Kultivierbarkeit wurde als Adaptionsphase angenommen, da er in Experimenten, bei denen bereits die Vorkulturen in Trinkwasser inkubiert worden waren (Kooij, 1991), nicht nachgewiesen wurde. Die Zahl der Zellen von *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* DSM 291 blieb im gleichen Zeitraum konstant. Nach der Exposition in oligotrophem Trinkwasser waren beide Stämme besser auf dem vergleichsweise nährstoffärmeren R2A*-Agar als auf

dem substratreichen Nähragar kultivierbar. Dies wurde als Hinweis auf eine Anpassung der Organismen an die oligotrophe Umgebung interpretiert.

Zu Beginn der Biofilmexperimente wurde die Bildung der autochthonen Trink- bzw. Flußwasserbiofilme mikroskopisch beobachtet. Die Entstehung und weitere Entwicklung von Trinkwasserbiofilmen umfaßte nacheinander die homogene Anlagerung von Einzelzellen, die Ausbildung von Zellketten und –aggregaten und die Umbildung in eine heterogene Struktur. Dieser Verlauf konnte in Übereinstimmung mit der Beschreibung durch Kalmbach *et al.* (1997a) beobachtet werden.
Die Einflußfaktoren auf die Einlagerung und das Überleben von *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442 in Trinkwasserbiofilmen waren zu Beginn dieser Arbeit nicht klar. In den wenigen Studien zu diesem Thema ermöglichte bzw. verlängerte die Präsenz der Trinkwasserorganismen die Einlagerung und das Überleben von *E. coli* (Robinson *et al.,* 1995, Szewzyk *et al.,* 1994) und Sulfatreduzierern (Bade *et al.,* 2000, in Vorbereitung) als habitatsfremden Organismen im Vergleich zu Parallelen ohne autochthone Matrix. Im direkten Vergleich zweier *E. coli* Stämme in Trinkwasserbiofilmen konnten Fass *et al.* (1996) kein stammspezifisches Verhalten nachweisen. Kalmbach *et al.* (1997a) zeigten, daß sich neben der Struktur mit dem Alter des Trinkwasserbiofilms auch die physiologische Aktivität der anheftenden Zellen veränderte (siehe unten). Aus beiden Gründen wurde die Expositionszeit einer frischen Oberfläche („das Alter des Biofilms“) vor der Zugabe der habitatsfremden Organismen als Einflußgröße angenommen und in den folgenden Experimenten variiert. *Kalmbach et al. (1997a) konnten zeigen, daß der Anteil der Zellen mit Dehydrogenase-Aktivität von 50 % bei der initialen Anheftung auf 8 % nach 14 Tagen und 5 % nach 28 Tagen abnahm, sowie daß die in situ Hybridisierbarkeit in der gleichen Zeit von anfangs 90 % auf 84 % bzw. 72 % sank. Bakterien aus 14 Tage alten Biofilmen reagierten homogen auf die Zugabe von Substrat, während die Zellen älterer Biofilme durch die Zugabe von Substrat individuell unterschiedlich aktiviert wurden.*
14 und 28 Tage alte Trinkwasserbiofilme wurden mit *P. putida* KT2442 in einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml inokuliert. In den 14 Tage alten Biofilmen wurden 24 Stunden nach der Zugabe des Inokulums $1{,}7 \times 10^4$ *P. putida* KT2442-Zellen/mm^2 mit der Sonde PP986 detektiert. Die Zellzahl blieb eine Woche nahezu konstant und nahm dann bis zur letzten Probe nach 27 Tagen, in der *P. putida* KT2442 noch durch

in situ Hybridisierung nachgewiesen werden konnte, stetig ab. 14 Tage lang konnte *P. putida* KT2442 auch nach Kultivierung der Biofilmzellen nachgewiesen werden. In den 28 Tage alten Biofilmen wurden nach 24 Stunden $5x10^3$ Zellen/mm^2 bestimmt; 11 Tage konnte *P. putida* KT2442 durch *in situ* Hybridisierung, 8 Tage nach Kultivierung nachgewiesen werden. Die Unterschiede zwischen den Konzentrationsverläufen und der Überlebensdauer von *P. putida* KT2442-Zellen in den 14- bzw. 28 Tage alten Trinkwasserbiofilmen wurden auf die verschiedene Struktur und physiologische Aktivität der Biofilme und ihrer Zellen zurückgeführt.

In keinem Experiment mit Trinkwasserbiofilmen konnte sich *P. putida* KT2442 dauerhaft etablieren und bestätigte damit veröffentlichte Ergebnisse für allochthone Organismen in natürlichen Habitaten. Als mögliche Ursachen wurden in der Literatur die Gleichgewichtseinstellung zwischen Flüssigphase und Biofilm in einem kontinuierlichen System (Van der Wende *et al.*, 1989), die aktive Ablösung der allochthonen Bakterien (Wrangstadh *et al.,* 1990), der Fraßdruck durch Protozoen (Sibille *et al.,* 1998) sowie Zelllyse (Bryers, 1993) diskutiert. Keiner dieser Gründe konnte für das bestehende System ausgeschlossen werden: (i) Innerhalb von mindestens 5 Tagen nach der Zugabe von *P. putida* KT2442 in die Robbins Device waren durch *in situ* Hybridisierung Zellen in der Flüssigphase nachweisbar. Es wurde als wahrscheinlich angenommen, daß diese aus den Biofilmen stammten, da *P. putida* KT2442 nur in sterilem Trinkwasser wachsen konnte und das Inokulum durch die hohe Fließrate im System theoretisch vorher ausgeschwemmt worden war. (ii) Es war nicht bekannt, ob *P. putida* KT2442 in Abhängigkeit von der Umweltbedingungen unterschiedliche Adhäsionseigenschaften, z. B. entsprechend den Polymeren des *Pseudomonas* sp. S9 (Wrangstadh *et al.*, 1990) besitzt, sodaß im Umfang der durchgeführten Experimente nicht differenziert werden konnte, ob der Übergang der Zellen vom Biofilm in die Flüssigphase aktiv (z. B. durch veränderte Polymere) oder passiv (als Folge eines Gleichgewichts zwischen Flüssigphase und Biofilm) verlief. (iii) In Trinkwasserbiofilmen des in dieser Arbeit genutzten Systems konnten Protozoen nachgewiesen werden (Kalmbach, 1998). Allerdings wurde der Fraß von *P. putida* KT2442-Zellen in dieser Arbeit in keiner Probe beobachtet. (iv) Die Zelllyse der *P. putida* KT2442 Zellen in dem oligotrophen Trinkwasser war ein Grund für die abnehmende Konzentration im Biofilm. (v) Unabhängig vom Alter der Biofilme konnte *P. putida* KT2442 länger im Biofilm als in der Flüssigphase und länger mittels *in situ* Hybridisierung als mittels Kultivierbarkeit nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis

zeigten übereinstimmend Buswell *et al.* (1998) für in Trinkwasser inokulierte *Campylobacter*-Zellen.

Die Zugabe von *P. putida* KT2442 zu 28 Tage alten Biofilmen bewirkte eine deutliche Veränderung der autochthonen Flora. Die Gesamtzahl der Zellen, darunter die beta-*Proteobakterien*, nahm innerhalb von 1 bis 4 Tagen auf weniger als 10 % des Ausgangwertes ab. Bei Abschluß des Experimentes nach 25 Tagen hatten sich die Ausgangswerte noch nicht wieder eingestellt. Die Zahl der kultivierbaren Biofilmzellen war unmittelbar nach der Zugabe des Inokulums erhöht, und zeigte in den folgenden Tagen parallel zur Gesamtzellzahl eine deutliche, vorübergehende Abnahme. Die Entwicklung der Begleitflora nach der Zugabe eines allochthonen Organismus zu Trinkwasserbiofilmen wurde bisher nicht beschrieben, sodaß keine Vergleichsmöglichkeiten bestanden. Als mögliche Erklärungsansätze wurden die folgenden angenommen: 1. Die mit den *P. putida* KT2442-Zellen eingebrachten Nährstoffe hatten die Trinkwasserbakterien aktiviert, sodaß die Zahl kultivierbarer Zellen zunahm. Der folgende Rückgang war eine Reaktion auf die verstärkt auftretende Konkurrenz. 2. Die Trinkwasserbakterien wurden durch die mit dem Inokulum eingebrachten Nährstoffe aktiviert und waren dann bevorzugte Opfer von Protozoen. Laut Szewzyk (p. c.) adaptierten sich Protozoen in einer Weise an ihr Habitat, daß autochthone Bakterien und darunter stoffwechselaktive Zellen bevorzugte Fraßopfer darstellten. Allerdings zeigten Sibille *et al.* (1998), daß Protozoen die zugegebenen Bakterien als Fraß bevorzugten und so das durch die Zugabe gestörte Gleichgewicht in Trinkwasserbiofilmen regulierten.

Um das Verhalten von *P. putida* FH1 in Trinkwasserbiofilmen zu zeigen, wurden 14 Tage alte Biofilme aus der Robbins Device in den 1l-Biofilmreaktor überführt, mit *P. putida* FH1 inokuliert und der Reaktor mit einer Durchflußrate von 0,1 l/h betrieben. Nach der Anheftung nahm innerhalb von 24 Stunden die Zellzahl von *P. putida* FH1 vorübergehend zu ($9{,}9 \times 10^3$ Zellen/mm^2), entsprechend *P. putida* KT2442 in den Biofilmen der Robbins Device. In den folgenden Tagen wurden Konzentrationen von $1{,}7 \times 10^3$ und $2{,}8 \times 10^3$ *P. putida* FH1-Zellen/mm^2 bestimmt. Diese Werte waren kleiner als die für *P. putida* KT2442 bestimmten Konzentrationen in den Trinkwasserbiofilmen der Robbins Device. Möglicherweise war durch die geringere Fließrate im Biofilmreaktor die Nährstoffversorgung für *P. putida* FH1 vergleichsweise schlechter. Die Gesamtzellzahl im Biofilmreaktor stieg im Beprobungszeitraum von 6 Tagen signifikant an. Ggf. konnten die

Trinkwasserbakterien die durch absterbende *P. putida* FH1-Zellen freiwerdenden Nährstoffe verwerten und die Nährstoffe sowie evt. abgelöste *P. putida* FH1-Zellen waren auf Grund der geringeren Durchflußrate länger verfügbar. Unterschiedliche Einflüsse der Strömung und durch Protozoenfraß waren darüber hinaus möglich. *P. putida* FH1 konnte über 6 Tage in den Trinkwasserbiofilmen detektiert werden.

4.3 Flüssigkulturen in Landwehrkanal-Wasser

P. putida KT2442 konnte sich nur vorübergehend in den natürlichen Trinkwasserbiofilmen ansiedeln, es konnten keine spezifischen Anlagerungen an die Biofilme beobachtet werden. Unter naturnahen Bedingungen fand kein Gentransfer in autochthone Bakterien statt. Für die folgenden Experimente wurde Wasser aus dem Landwehrkanal (LW-Wasser) gewählt, das im Vergleich zu Trinkwasser eutropher war. Es wurde sowohl ein besseres Überleben der Modellorganismen erwartet als auch durch die höhere Dichte und Vielfalt autochthoner Mikroorganismen mehr potentielle Rezipienten für das Plasmid pJB20.

In den Flüssigkulturen mit LW-Wasser als Medium konnten *P. putida* KT2442 und *P. putida* FH1 ausgehend von Inokulumkonzentrationen von 10^6 Zellen/ml in Gegenwart der autochthonen LW-Mikroflora über 200 Tage überleben. Innerhalb der ersten 20 Tage nahm die Zahl kultivierbarer Zellen beider Stämme parallel und reproduzierbar auf 10^3 KBE/ml ab. Cruz-Cruz *et al.* (1988) untersuchten das Verhalten plasmidtragender und plasmidloser *P. aeruginosa* Stämme in Flußwasser über 72 Stunden und stellten über diesen sehr kurzen Zeitraum ebenfalls keinen Unterschied zwischen den Stämmen fest. Für *P. putida* KT2442 verlief die Konzentration kultivierbarer Zellen danach konstant, für *P. putida* FH1 nahm die Konzentration bis auf 10^1 KBE/ml in der letzten Probe ab. Der stärkere Rückgang des GVOs *P. putida* FH1 könnte die Ergebnisse von Sobecky *et al.* (1992) bestätigen, nach denen eine Kultur plasmidloser *P. putida* in Süßwasser (DOC: 5 mg/l) in zwei von drei Experimenten signifikant besser überlebte als die parallel eingesetzte Kultur des Plasmid (NAH7)-tragenden *P. putida*. Nach 200 Tagen konnten nur noch von Pseudomonas-AgarF *P. putida* FH1-Kolonien isoliert werden. Weil diese Kolonien keine GFP-Expression zeigten und auf dem Selektivmedium R2A*+Kan(50)-Agar keine *P. putida* FH1 Kolonien kultiviert werden konnten, wurde vermutet, daß das

Plasmid pJB20 während der langen Inkubation verloren worden war, in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Lowcock und Edwards (1994), nach denen ein nicht-katabolisches Plasmid in *Aeromonas hydrophila* unter Hungerbedingungen nicht stabil war. Es wurde jedoch nicht ausgeschlossen, daß das Plasmid erst beim Übergang auf den nicht-selektiven Pseudomonas-AgarF nicht mehr exprimiert wurde und *P. putida* FH1 aus einem unbekannten Grund nicht auf R2A*+Kan(50)-Agar kultivierbar war. Ein der vorliegenden Arbeit vergleichbar langer Zeitraum wurde durch Genthner *et al.* (1992) beprobt. 170 Tage lang konnten die gentechnisch veränderten Stämme *P. putida* RC-4(pKT240) bzw. *P. putida* RC-4(pSI30) in unfiltriertem Flußwasser überleben. Der konstante Endwert von ca. 10^2 KBE/ml auf Pseudomonas-AgarF hatte sich nach 50 Tagen eingestellt. Diese Konzentration wurde auch für *P. putida* FH1 in LW-Wasser nach 50 Tagen bestimmt. Zwischen dem 50. und 200. Tag wurden die Konzentrationen in der vorliegenden Arbeit nicht gemessen.

Nach der langen Überlebenszeit wurde überprüft, ob sich die Modellorganismen an das Medium adaptiert hatten bzw. ggf. eine besser adaptierte Mutante sich in den Kulturen durchsetzen konnte. Zambrano *et al.* (1993) hatten die reproduzierbare Mutation des Gens *rpoS* in dem Wildtyp-Stamm *E. coli* ZK126 beobachtet. Das Gen kodierte einen Sigma-Faktor spezifisch für Gene, die in der stationäre Phase transkribiert werden. In den Kulturen setzte sich stets die entsprechende Mutante durch. Nach dem Überimpfen der 200 Tage alten Kulturen in frisches LW-Wasser verzehnfachte sich in den *P. putida* KT2442-Kulturen innerhalb eines Tages die Zahl kultivierbarer Zellen, ausgehend von $4x10^2$ KBE/ml und stieg bis zum 6. Tag weiter an. Die maximale Wachstumsrate μ_{max}=0,1/h wurde für den 0. bis 1. Tag berechnet. Die Zahl kultivierbarer Zellen in der *P. putida* FH1-Kultur nahm innerhalb von 24 Stunden von 4 auf 17 KBE/ml zu (μ_{max}=0,06/h), um danach wieder abzusinken. Die unterschiedlichen Wachstumskurven und Wachstumsraten wurden mehr auf die verschiedenen Ausgangskonzentrationen der Modellorganismen als auf die Unterschiede zwischen Wildtyp und GVO zurückgeführt. Eine Adaption von *P. putida* KT2442 an das Medium wurde weiter als Möglichkeit in Betracht gezogen.

In der vorliegenden Arbeit stellte sich in den LW-Flüssigkulturen nach ca. 20 Tagen eine konstante Konzentration kultivierbarer *P. putida* KT2442-Zellen ein bzw. die Konzentration kultivierbarer *P. putida* FH1-Zellen änderte sich nur noch langsam (s.

o.). Es wurde angenommen, daß sich nach dieser Zeit ein Gleichgewicht in den Kulturen eingestellt hatte und eine Sicherheit von weiteren 8 Tagen hinzugefügt. 28 Tage alte Kulturen wurden als *stationäre Kulturen* bezeichnet und eingesetzt.

Die stationären *P. putida* KT2442-Kulturen wurden mit Anfangskonzentrationen von minimal 10^1 KBE/ml im Medium in LW-Wasser inokuliert. Auf Pseudomonas-AgarF nahm die Zahl kultivierbarer *P. putida* KT2442-Zellen innerhalb eines Tages unabhängig von der Inokulumkonzentration auf 4-5x10^4 KBE/ml zu. In den folgenden Tagen nahm in allen Proben die Zahl der kultivierbaren *P. putida* KT2442-Zellen mit gleicher Rate ab. Wie für *P. putida* KT2442 nahm die Zahl der kultivierbaren *P. putida* FH1-Zellen innerhalb eines Tages auf den Maximalwert von 6,1x10^3 –2,3x10^4 KBE/ml auf R2A*+Kan(50)-Agar bzw. 6,7-9,3x10^3 KBE/ml auf Pseudomonas-AgarF zu. Die kleinste Inokulumkonzentration von 1x10^0 KBE/ml konnte in der Nullprobe auf R2A*+Kan(50)-Agar nicht detektiert werden. Diese Kultur wuchs langsamer und erreichte annähernd dasselbe Maximum kultivierbarer Zellen nach 2 Tagen (R2A*+Kan(50)-Agar) bzw. 4 Tagen (Pseudomonas-AgarF). Die Nicht-Kultivierbarkeit der Nullprobe auf R2A*+Kan(50)-Agar wurde als mögliche Übereinstimmung mit den Ergebnissen der 200 Tage alten Kultur interpretiert, letztere konnte nur auf Pseudomonas-AgarF aber nicht auf R2A*+Kan(50)-Agar kultiviert werden (s. o.). Aufgrund der kleinen Konzentration war es jedoch auch möglich, das mit der Probe keine kultivierbaren *P. putida* FH1-Zellen entnommen worden waren. Im Unterschied zu der 200 Tage alten Kultur nahm die Zahl kultivierbarer Zellen auch in der höchsten Verdünnungsstufe bis auf 10^4 KBE/ml zu. Möglicherweise war das Alter der Kulturen die Ursache für den Unterschied. Die durch Zambrano *et al.* (1993) beschriebene adaptierende Mutation wurde allerdings in einem Zeitraum von weniger als 4 Wochen beobachtet. Aus den Daten wurden die System- und Speziesspezifischen Konzentrationen berechnet. Diese Konzentrationen stellten sich nach Szewzyk *et al.* (unveröffentlicht) unabhängig von den Inokulumkonzentrationen für jeden Organismus in jedem System nach wenigen Tagen spezifisch ein. Szewzyk *et al.* untersuchten *Serratia marcescens* K202, B4, *Escherichia coli* und *Pseudomonas fluorescens* P17. Die Konzentrationen von 2,3x10^4 KBE/ml für *P. putida* KT2442 auf Pseudomonas-AgarF, 5,9x10^3 KBE/ml für *P. putida* FH1 auf Pseudomonas-AgarF und 3,9x10^3 KBE/ml für *P. putida* FH1 auf R2A*+Kan(50)-Agar wurden als Mittelwerte aus den Daten nach 7 Tagen berechnet. Betrachtet man die Kurven zum Überleben in LW-Wasser für diese Organismen (s. o.), ist anzunehmen,

daß diese Werte nur als Anhaltspunkt gelten können, und die Kulturen wenigstens 20, wenn nicht 50 Tage hätten beobachtet werden müssen. Genthner *et al.* (1992) führten zu dieser Arbeit analoge Experimente mit *P. putida* RC-4 (pSI39) bzw. *P. putida* RC-4 (pKT240) in Flußwasser durch. Aus kleinen Inokulumkonzentrationen stationärer Kulturen wuchsen die Kulturen nach dem Überführen in frisches Medium übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und dem bereits genannten Zitat auf eine stammabhängige Endkonzentration, die bei 10^2 bzw. 10^3 KBE/ml lag. Die selektive Anreicherung der zugegebenen Zellen mit 3-Chlorobenzoat hatte keinen prinzipiellen Einfluß auf den Verlauf.

Aus den verschiedenen Experimenten verstärkte sich der Eindruck, daß sich die Organismen in einer Weise an das Medium LW-Wasser gewöhnten, daß sie weniger gut als direkt nach der Überführung in LW-Wasser auf Pseudomonas-AgarF und R2A*+Kan(50)-Agar kultiviert werden konnten. Um diesen Verdacht zu erhärten, wurden stationäre Kulturen von *P. putida* KT2442 und Kulturen der spät-logarithmischen Phase von *P. putida* KT2442 parallel mit 10^3 KBE/ml in frisches LW-Wasser bzw. Cetrimidmedium überimpft. Die stationäre Kultur war direkt nach der Zugabe in Cetrimidmedium nicht kultivierbar. Es folgte ein schnelle Adaptionsphase der inokulierten oder ein schnelles Wachsen einer adaptierten Subkultur. Die maximale Wachstumsrate wurde zwischen der 6,5. und 22. Stunde mit μ_{max}=0,5/h bestimmt. Dieselbe Wachstumsrate ergab sich für die spät-logarithmische Kultur im gleichen Zeitraum. Die Übereinstimmung in der Wachstumsrate der stationären mit der spät-logarithmischen Kultur wurde auf den sich unter Hungerbedingungen nur langsam reduzierenden Ribosomengehalt (Givskov *et al.*, 1994) zurückgeführt. Givskov *et al.* sahen darin die Fähigkeit der Zellen, auf die Zugabe von Substrat schnell in Form von Proteinsynthese zu reagieren. In LW-Wasser verhundertfachte sich die Zahl der kultivierbaren Zellen innerhalb von 22 Stunden in der spät-logarithmischen Kultur und verdreifachte sich in der stationären Kultur im gleichen Zeitraum. Aus diesen und den Ergebnissen der vorangegangenen Versuche wurde gefolgert, daß die Begleitflora möglicherweise eine entscheidende Rolle für den Verlauf der Wachstumskurven hatte. Um die gleiche Inokulumkonzentration zu erhalten, mußte die stationäre Kultur aufkonzentriert werden, die spät-logarithmische Kultur jedoch nicht. Gleichzeitig mit der stationären Kultur nahm die Konzentration der Begleitflora zu und damit die Zahl der um das vorhandene Substrat

konkurrierenden Organismen. Im Cetrimidmedium wurden die konkurrierenden Organismen durch den Wirkstoff Cetrimid unterdrückt.

Immer nach der Zugabe in das Landwehrkanal-Wasser veränderten sich die *P. putida* KT2442- bzw. *P. putida* FH1-Zellen durch reduktive Zellteilung („Fragmentierung"). Innerhalb eines Tages teilten sich die Stäbchen in kokkoide Teilzellen (siehe Abbildung 15D). Der Anteil stäbchenförmiger Zellen blieb in den folgenden Proben verschwindend klein. Givskov *et al.* (1994) zeigten für *P. putida* KT2442 unter Kohlenstoffmangel eine gleichartig verlaufende Fragmentierung. Durch dieselbe Arbeit war bekannt, daß sich *P. putida* KT2442 gegen mehrfachen Streß schützen konnte. Ein Streßfaktor machte den Organismus gegen einen weiteren resistenter („Wechselseitiger Streßschutz"). Die Fragmentierung der *P. putida* KT2442-Zellen in LW-Wasser wurde als Indiz dafür betrachtet, daß das Medium für das Bakterium eine streßauslösende Umgebung darstellte. In den Experimenten zeigte sich, das beide Modellorganismen mit zunehmend längerer Inkubation in LW-Wasser resistenter gegen das Einfrieren bei –20°C für 24 Stunden wurden. Unmittelbar nach der Zugabe in LW-Wasser bewirkte das Einfrieren einen signifikanten Rückgang der Kultivierbarkeit auf 3 % für *P. putida* KT2442 bzw. 0,6 ‰ für *P. putida* FH1. Bereits nach 24-stündiger Inkubation hatte sich die Streßresistenz mehr als verzehnfacht. Mit zunehmender Inkubationszeit von *P. putida* KT2442 und *P. putida* FH1 in LW-Wasser stellte sich bei beiden Organismen ein Rückgang der Kultivierbarkeit durch das Einfrieren von ca. 20 % ein. Dieser Wert wurde übereinstimmend von Givskov *et al.* (1994) für unter Kohlenstoff-Mangel inkubierte *P. putida* KT2442-Zellen berichtet. *P. putida* FH1 wurde durch das LW-Wasser und das Einfrieren stärker gestreßt als *P. putida* KT2442.

4.4 Das Überleben in LW-Biofilmen

Analog zu den Experimenten mit Trinkwasser wurde in Landwehrkanal-Wasser das Überleben der Modellorganismen in den autochthonen Biofilmen untersucht. Nach der Zugabe von LW-Wasser in die Biofilmreaktoren entwickelten sich schnell Biofilme mit hoher Dichte. Die Konzentration auf der Oberfläche näherte sich asymptotisch einem Grenzwert maximaler Dichte von ca. 10^6 Zellen/mm^2, der auch nach 200 Tagen noch nicht erreicht war. Die Biofilme enthielten mit fortschreitendem Alter sehr viel Schleim, in den sich Zellen einlagerten, und der für die z. T. sehr lose Struktur der Biofilme verantwortlich gemacht wurde.

P. putida FH1 und *P. putida* KT2442-Inokula wurden in die Biofilmreaktoren zugegeben, und die Zellen lagerten sich an die bereits gebildeten Biofilme zunächst als Einzelzellen an. Innerhalb von einer Stunde hatten sich Aggregate der Modellorganismen von mehr als 100 Zellen gebildet (siehe Abbildung 16A). Diese Aggregatbildung wurde auch beobachtet, wenn *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1 mit Flocken inkubiert bzw. zu Trinkwasserbiofilmen zugegeben wurden. Givskov *et al.* (1994) beobachteten die Anlagerung von *P. putida* KT2442-Zellen an Oberflächen unter Streß- bzw. Hungerbedingungen. Unter Kohlenstoffmangel bildeten die Zellen nach 3 bis 24 Stunden verstärkt Aggregate. Nach mehr als 24 Stunden ging die Zahl der anheftenden *P. putida* KT2442-Zellen signifikant zurück. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde die Biofilmbildung von *P. putida* FH1 als Reinkultur und in Vollmedium untersucht (s. o.). Unter jenen Bedingungen war die Anheftung einzelner Zellen von der Ausbildung strukturierter Biofilme gefolgt. Die Aggregate in den LW-Biofilmen erschienen weder ähnlich noch in irgendeiner Form strukturiert

Die LW-Biofilme wurden mit gruppenspezifischen Sonden hybridisiert, um charakteristische Nachbarschaften mit *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1 zu überprüfen. Diese konnten nicht festgestellt werden mit den alpha-, beta- und gamma-*Proteobakterien*, Cytophaga-Flavobacter, Sulfatreduzierern sowie Eukaryonten. Es ergab sich auch keine Häufung bestimmter Biofilmstrukturen, an die sich die Modellorganismen bevorzugt anlagerten, abgesehen davon, daß einzelne Zellen nie auf einer von Zellen oder organischen Strukturen nicht-bedeckten Oberfläche beobachtet wurden (siehe Abbildungen 17A-D, 18 A-C). Selbst in Biofilmen, in denen ein *P. putida*-Stamm als Partner einer Substratkette fungierte,

kam es nicht zu einer engen Nachbarschaft mit dem Endproduktverwerter (Møller *et al.*, 1998); ein Hinweis, das die Wechselwirkungen innerhalb der Biofilmgemeinschaft nicht auf den engsten Nachbarn beschränkt sein mußten, und eine mögliche Erklärung für die unspezifische Anlagerung der Modellorganismen. Eine weitere Möglichkeit war, das die Hybridisierungen die richtigen Nachbarn der Modellorganismen nicht erfaßten.

Das Überleben von *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1 in den LW-Biofilmen wurde mit Hilfe von spezifischer *in situ* Hybridisierung, Kultivierung der Proben und anhand der GFP-Expression der *P. putida* FH1-Zellen detektiert. Stellvertretend für alle mit Landwehrkanal-Wasser durchgeführten Experimente ist in der vorliegenden Arbeit das Experiment über 200 Tage dargestellt, dessen Name den Beprobungszeitraum wiedergibt. Mit allen Methoden wurde in der ersten Probe nach der Zugabe der Inokula die jeweils größte Konzentration der Modellorganismen gemessen.
Mit der Sonde PPU646 wurden in der ersten Probe $1{,}4 \times 10^4$ Zellen/mm^2 in den Reaktoren mit *P. putida* KT2442 bzw. $1{,}9 \times 10^4$ Zellen/mm^2 in den Reaktoren mit *P. putida* FH1 detektiert. Auf die maximale Konzentration von *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442 in den Biofilmen folgte eine 5 bis 7 Tage dauernde schnelle Abnahme der entsprechenden Zellzahlen auf weniger als 10 % des Ausgangswertes. Daran anschließend nahm die Konzentration der allochthonen Bakterien in den Biofilmen in der etwa zehnfachen Zeitspanne wiederum um etwa 90 % ab. Dieser Verlauf wurde übereinstimmend für Wildtyp und GVO detektiert. Im Vergleich mit den Vorversuchen zeigte sich eine größere Übereinstimmung bzgl. des Überlebens zwischen beiden Stämmen innerhalb eines Experimentes als für den gleichen Stamm zwischen Wiederholungsexperimenten. Mögliche Ursachen dafür waren Schwankungen in der Zusammensetzung der mikrobiellen Population des LW-Wassers und anderen Wassercharakteristika sowie in der praktischen Durchführung. Die Hybridisierungssignale der Sonde PPU646 konnten bis zu 32 Tage nach der Zugabe der Inokula ausgewertet werden. Es wurden Versuche durchgeführt, um *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1 möglichst selektiv zu aktivieren, um einen längeren Nachweis mit Hilfe der Sonden zu erreichen. Die Aktivierung von Biofilmzellen wurde durch Kalmbach *et al.* (1997a) beschrieben, die Trinkwasserbiofilme in Nährmedium und in Gegenwart eines Gyrasehemmers inkubiert hatten. Es wurde kein Gyrasehemmer eingesetzt, da bereits die selektive Anreicherung von *P. putida* FH1

bzw. *P. putida* KT2442 ein Erfolg gewesen wäre. Unter den ausgewählten Medien (R2A*+Kan(50), 0,1% Nährbouillon, PseudomonasF-Medium und Cetrimidmedium zeigte das Cetrimidmedium die beste selektive Wirkung. Cetrimid unterdrückt die Begleitflora verschiedener Pseudomonas-Spezies, darunter *P. putida*. Mit der Sonde GAM42a wurde eine signifikante Anreicherung der gamma-*Proteobakterien* nachgewiesen.

Die GFP-Expression ergab in der Anfangsphase der Experimente den gleichen Verlauf wie die *in situ* Hybridisierung. Aus den nativen Biofilmen wurde der Konzentrationsverlauf der GFP-exprimierenden Zellen bestimmt. Unter Berücksichtigung zweier Reaktoren sowie von rund 70 Biofilmen resultierte eine Kurve mit sehr kleinen Standardabweichungen. Mit Hilfe der GFP-Expression konnten die *P. putida* FH1-Zellen 60 Tage lang detektiert werden. Die Zahl der GFP-Signale in den LW-Biofilmen waren fast von Anfang an größer als die der spezifischen Sondensignale. Mögliche Erklärungen waren 1. die extreme Stabilität des GFP-Moleküls von mehreren Wochen (Andersen *et al.*, 1998). Zusätzlich waren im Vergleich zu den *in situ* Hybridisierungen die Signale klarer vom Hintergrund zu differenzieren. 2. Das Plasmid pJB20 wurde übertragen und damit die Zahl der GFP-Signale erhöht. 3. Die Präparation der LW-Biofilme für die *in situ* Hybridisierung scherte lose mit den Biofilmen assoziierte Flocken und die daran anheftenden Zellen ab, die in den nativen Biofilmen als GFP-Signale noch mitgezählt worden waren.

Die Zahl kultivierbarer Zellen zeigte ebenfalls einen zweistufigen Verlauf. Die gemessenen Konzentrationen waren zunächst kleiner als durch die *in situ* Hybridisierung und GFP-Expression bestimmt. Im weiteren Verlauf, beginnend nach 14 Tagen, unterschieden sich *P. putida* KT2442 und *P. putida* FH1 voneinander, da die *P. putida* FH1-Kurve stetig abnahm, während die *P. putida* KT2442-Kurve nach ca. 20 Tagen (bis zum 60. Tag) wieder ansteigende Werte anzeigte. Diese Zunahme wurde auf ein Wachstum der Zellen in den LW-Biofilmen zurückgeführt. Durch selektive Kultivierung konnten *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1 über 147 bzw. 183 Tage in den LW-Biofilmen nachgewiesen werden. Der Unterschied zwischen den Modellorganismen wurde aufgrund der kleinen Meßwerte als nicht signifikant betrachtet.

Um das Überleben von *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442 in den Biofilmen zu erklären, wurde zusätzlich die planktonische Phase der Biofilmreaktoren beprobt. Der

schnelle Rückgang der Zellzahlen nach der Zugabe der Inokula wurde auch in den Flüssigphasen beobachtet. Für die Flüssigphasen wurde eine 1,5- bis 3-fach schnellere Abnahme der *P. putida* KT2442- bzw. *P. putida* FH1-Zellen als in den Biofilmen berechnet. Eine einfache Rücklösung der initiativ angehefteten Zellen nach 24 Stunden (Givskov *et al.*, 1994) war daher keine ausreichende Erklärung. Der Fraßdruck durch Protozoen auf die hinzukommenden Bakterien schien der entscheidende Faktor für die Abnahme der Konzentrationen zu sein (Genthner *et al.*, 1992, Sibille *et al.*, 1998). Das bessere Überleben von *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442 in den Protozoen-freien Flüssigkulturen unterstützten die These. In den LW-Biofilmen wurden regelmäßig Protozoen beobachtet, allerdings keine, die das GFP bereits eingelagert hatten oder dabei waren, ein *P. putida* FH1-Bakterium zu verdauen. Eine Lyse der Zellen konnte nicht beobachtet werden. Im fortschreitenden Experiment zeigte der Vergleich der tatsächlichen Konzentrationen in der Flüssigphase mit der Auswaschkurve, das es zwischen den Biofilmen und den Flüssigphasen zu einem Gleichgewicht oder zum Wachstum der Modellorganismen kommen mußte, da die gemessenen Werte über den berechneten lagen.

Für die langsamer abnehmenden Konzentrationen von *P. putida* KT2442 und *P. putida* FH1 in der zweiten Stufe wurde ebenfalls eine Erklärung gesucht. Es wurde angenommen, daß es nach dem Ablösen und „Grazing“ der meisten anheftenden *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442-Zellen zu einer Einlagerung der Modellorganismen in die Biofilme und Vergesellschaftung mit den autochthonen Bakterien gekommen war. Über den gesamten Verlauf des Experimentes ergab die Summe aller *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442 in dem jeweiligen System eine stetig abnehmende Kurve (nicht gezeigt). Die Wachstumsrate der anheftenden Modellorganismen war unter den gegebenen Bedingungen kleiner als die Verdünnung der Zellzahlen durch den Medienwechsel, der Fraßdruck durch Protozoen und die Absterberate, sodaß sich weder *P. putida* KT2442 noch *P. putida* FH1 dauerhaft etablieren konnten. Die Möglichkeit, daß die Aktivität der Modellorganismen bis unter die Nachweisgrenze abnahm, und somit die Daten ein sehr falsches Bild wiedergaben, wurde für unwahrscheinlich erachtet, da zumindest in der ersten Phase alle eingesetzten Detektionsmethoden das gleiche Verhalten von *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1 in den LW-Biofilmen wiedergaben. Darüber hinaus wurde bislang weder für *P. putida* KT2442 noch *P. putida* FH1 ein Zustand der Nicht-Kultivierbarkeit nachgewiesen werden (Eberl *et al.*, 1996).

Wie in den Experimenten mit Trinkwasser sollte gezeigt werden, ob die Zugabe der Modellorganismen das vorhandene System, in diesem Fall die LW-Biofilme, störte. Die Konzentration der Inokula entsprach der Konzentration autochthoner planktonischer Bakterien, die Zugabe bewirkte also unmittelbar eine Verdoppelung der Zellzahl in der Flüssigphase. In den Biofilmen lagerten sich *P. putida* FH1 und *P. putida* KT2442 in Aggregaten an die vorhandenen Oberflächen an (s. o.). Dennoch nahm die Gesamtzellzahl auf der Oberfläche nach der Zugabe der Inokula nicht signifikant zu. In der Wiederholung blieb dieses Ergebnis unverändert. Die phylogenetische Zusammensetzung der Biofilmgemeinschaft wurde über 11 Tage beobachtet. Die Zugabe und Präsenz von *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1 veränderte die Zusammensetzung hinsichtlich der prozentualen Anteile von beta-*Proteobakterien* und *Eubakterien* über den gesamten Beobachtungszeitraum nicht signifikant, jedoch wurde ein Rückgang beider Anteile 2 Tage nach der Zugabe der Inokula parallel zu einem geringfügig erhöhten Wert der Gesamtzellzahl, bestimmt. Nach dem Medienwechsel nach 5 Tagen nahmen die Gesamtzellzahlen signifikant zu. Im gleichen Maße wie sich *P. putida* FH1 und *P. putida* KT2442 zu Beginn an die Biofilme anlagerten, mußten sich autochthone Bakterien von den Oberflächen ablösen oder durch Protozoen dezimiert werden. Die beiden Organismen *P. putida* FH1 und *P. putida* KT2442 unterschieden sich in ihrer Wirkung auf die autochthone Flora nicht signifikant.

4.5 *P. putida* KT2442 und *P. putida* FH1 im Vergleich

Der Vergleich der Modellorganismen beschränkt sich auf die Reinkulturen bzw. den Landwehrkanal als Habitat.

P. putida KT2442 ist eine Rifampicin-resistente Mutante von *P. putida* KT2440 während *P. putida* FH1 1 aus einer Nalidixin-resistenten Mutanten desselben Stamms hervorging. Zusätzlich zu den eindeutig plasmidkodierten Eigenschaften wie GFP-Expression und Antibiotika-Resistenzen konnte *P. putida* FH1 im Unterschied zu *P. putida* KT2442 γ-Hydroxybutyrat verwerten.

In den batch-Kulturen nahm die Zahl der kultivierbaren GVO-Zellen im Zeitraum von 50 Tagen stärker ab als die Zahl der kultivierbaren *P. putida* KT2442-Zellen. Die systemspezifische Konzentration von *P. putida* FH1 lag geringfügig unterhalb der entsprechenden von *P. putida* KT2442.

In den Experimenten mit kleiner Inokulumkonzentration bzw. aufkonzentrierter Begleitflora zeigte sich, daß beide Stämme mit der autochthonen Flora um das vorhandene Substrat konkurrierten. Die Begleitflora verhinderte in zu hoher Dichte das Wachstum von *P. putida* FH1 bzw. *P. putida* KT2442.

Bei den Untersuchungen zum wechselseitigen Streßschutz reagierte *P. putida* FH1 innerhalb der ersten 24 Stunden der Exposition stärker auf den doppelten Streß als der Wildtyp *P. putida* KT2442.

Keine signifikanten Unterschiede in der Wirkung der Modellorganismen auf die autochthone Mikroflora ergaben sich aus den LW-Biofilmen. Die spezifische *in situ* Hybridisierung zeigte ein übereinstimmendes Überlebensprofil der beiden Organismen. Der Verlauf der Zahl kultivierbarer Zellen war für *P. putida* KT2442 im Vergleich mit *P. putida* FH1 weder eindeutig gleich noch verschieden. Das Plasmid pJB20 wurde als Ballast in den Flüssigkulturen abgeworfen, blieb in den *P. putida* FH1-Biofilmzellen jedoch erhalten und nachweisbar. Der Transfer des Plasmids pJB20 auf autochthone Trinkwasserbakterien bzw. die autochthone Flora des LW-Wassers wird im folgenden Kapitel diskutiert.

Die Ergebnisse der Flüssigkulturen wurden als Hinweis gewertet, daß der GVO empfindlicher auf Veränderungen der Umweltbedingungen reagierte und das zusätzliche Plasmid möglicherweise eine Belastung darstellte.

4.6 Gentransfer

Die Freisetzung eines gentechnisch veränderten Organismus birgt die Möglichkeit und die Gefahr, daß sich seine genetische Information im Habitat verbreitet (siehe Einleitung). GVOs für die biologische Sanierung kontaminierter Böden werden zusätzlich mit sogenannten Selbstmordmechanismen versehen, um ihre Ausbreitung zu beschränken (z. B. Szafranski *et al.*, 1997), während Stämme für die biotechnologische Produktion so modifiziert werden, daß sie nur unter selektiven Bedingungen und abhängig von spezifischen Wuchsstoffen überleben können (Smalla *et al.*, 1989). Der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte GVO *P. putida* FH1 war weder in der einen noch anderen Richtung gentechnisch verändert. Er enthielt stattdessen das Plasmid pJB20, ein Derivat des in ein breites Wirtsspektrum selbsttransferierenden Plasmids RP4 (Black und Girdwood, 1969). Die Ausbreitung des Plasmids in den gewählten aquatischen Habitaten war nicht durch genetische Modifikationen beschränkt.

Die Experimente zum Gentransfer begannen mit den Biofilmen, da hier eine höhere Transferrate erwartet wurde, aufgrund der im Vergleich zur planktonischen Phase höheren Zelldichte (Levin *et al.*, 1979, Normander *et al.*, 1998) und längeren Kontaktzeit zwischen Donor und Rezipientenzellen (Hausner und Wuertz, 1999). Nach Muela *et al.* (1994) hatte der physiologische Zustand der Rezipienten keinen Einfluß auf die Transferrate, sodaß die unterschiedliche Aktivität anheftender und planktonischer Bakterien innerhalb eines Systems (van Loosdrecht *et al.*, 1990) keinen Unterschied machen sollte, während der physiologische Zustand des Donors eine wichtige Einflußgröße für den Gentransfer war und die kleinsten Transferraten in der exponentiellen Wachstumsphase beobachtet wurden. Strätz *et al.* (1996) konnten selbst Plasmidtransfer in nicht-kultivierbare Rezipienten detektieren. Spezifisch für die Übertragung des Plasmids pJB20 war die Ausbildung starrer Pili, sodaß die Transferrate maßgeblich von den im System auftretenden Scherkräften abhängig war und ein Gentransfer in der laminaren Strömung an der Biofilmoberfläche wahrscheinlicher schien als in den geschüttelten Flüssigkulturen.
Etablierte Trinkwasser- bzw. LW-Biofilme wurden mit *P. putida* FH1 in Konzentrationen von 10^9 bzw. 10^6 Zellen/ml inokuliert. Die maximal bestimmte Konzentration auf der Oberfläche nach der Zugabe des Inokulums war jeweils ca.

10^4 Zellen/mm^2 (s. o.). In den meisten Arbeiten, darunter Studien mit artifiziellen Biofilmen und Biofilmen auf der Oberfläche von Pflanzenblättern bzw. –wurzeln, wurden die ersten Transkonjuganten innerhalb von 24 Stunden nach dem Kontakt von Donor- und Rezipientenzellen detektiert (Übersicht: Normander *et al.,* 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte in keinem der Biofilmexperimente die Übertragung des Plasmids pJB20 von *P. putida* FH1 auf ein autochthones Bakterium detektiert werden. Als Nachweis bzw. zur Isolierung der Transkonjuganten wurden die GFP-Expression mit einem Vergleich der Zellmorphologien sowie spezifischer *in situ* Hybridisierung kombiniert bzw. die selektive Kultivierung der Proben eingesetzt. Beide Methoden (GFP-Expression und FISH) erwiesen sich bereits in anderen Arbeiten als funktionierender Nachweis: Mit dem Markermolekül GFP in Verbindung mit *in situ* Hybridisierung konnten Christensen *et al.* (1996) bzw. Geisenberger *et al.* (1999) Transkonjuganten in Belebtschlamm bzw. Biofilmen erfolgreich detektieren. Die selektive Kultivierung in Gegenwart von auf pJB20 kodierten Antibiotika wurde in den Flüssigkulturen in der vorliegenden Arbeit erfolgreich zur Isolierung von Rezipienten des Plasmids pJB20 eingesetzt.

Als Positivkontrolle für den Transfer des Plasmids pJB20 von *P. putida* FH1 in ein Trinkwasserbakterium wurden Experimente unter Laborbedingungen durchgeführt. Die Trinkwasserisolate *A. commune* DSM 11901 und *A. citratiphilum* DSM 11900 wurden auf Rifampicin-resistente Mutanten selektiert, und diese als Rezipienten in den Kreuzungen eingesetzt. Die Rifampicin-Resistenz ermöglichte nach der Kreuzung zusammen mit der auf dem Plasmid kodierten Kanamycin-Resistenz die Selektion der Transkonjuganten. 7 Transkonjuganten von *A. citratiphilum*^{rif} zeigten grüne Fluoreszenz und waren gegen Kanamycin resistent. Die Identität der Isolate wurde mit der spezifischen Sonde B4-Cy3 bestätigt. Um die Fluoreszenz zu verstärken, wurden die Transkonjuganten in Gegenwart von Isopropylthiogalactosid (IPTG) inkubiert. Der Induktor des Lactose-Operons und damit des *lac*Z-Promotors vor dem *gfp*-Gen sollte die Transkription des *gfp*-Gens verstärken. Für keinen der Transkonjuganten konnte nach der Inkubation in IPTG eine gesteigerte GFP-Expression detektiert werden. Zwei mögliche Erklärungen waren ein unterschiedlicher Regulationsmechanismus in *P. putida* FH1 und *A. citratiphilum*, bzw. aufgrund des Substratspektrums von *A. citratiphilum* (Kalmbach *et al.* 1999) ein fehlender Zuckertransportmechanismus in den Trinkwasserbakterien. Diese Arbeit stellt die erste Studie dar, in der charakteristische Trinkwasserisolate als Rezipienten

in einer Konjugation eingesetzt wurden. In bisherigen Arbeiten wurden allochthone Donor- und Rezipientenstämme in das Trinkwassersystem eingebracht und die Konjugation beobachtet (Sandt und Herson, 1991), oder *E. coli*, Fäkalstreptokokken und pathogene Stämme dienten als vorher bekannte Rezipienten. Die geplante Verwendung der Isolate in weiterführenden Experimenten war aufgrund der schwachen Fluoreszenz nicht möglich.

Aus den LW-Flüssigkulturen konnten autochthone Rezipienten des Plasmids pJB20 isoliert und detektiert werden. Die Transkonjuganten Trako und Transkonjugant11.1 wurden durch selektive Kultivierung isoliert und auf den entsprechenden Agarplatten durch ihre abweichende Kolonie- und Zellmorphologie detektiert. Es konnte ausgeschlossen werden, daß die Konjugation auf der Platte stattgefunden hatte, da die Kolonien der Transkonjuganten mit denen des Donors keinen Kontakt hatten. Trako bzw. Transkonjugant11.1 wurden aus den Proben 14 bzw. 34 Tage nach Zugabe des Inokulums von 10^6 Zellen/ml zu den Flüssigkulturen isoliert. Wahrscheinlich hatte der Plasmidtransfer zu einem früheren Zeitpunkt stattgefunden, da in den meisten Arbeiten zu diesem Thema der überwiegende Teil aller Konjugationen innerhalb von 24 Stunden nach der Zugabe des Donors beobachtet wurde (Übersicht: Normander *et al.* 1998). Zusätzlich machten die Donorkonzentrationen von $4x10^4$ bzw. $2x10^3$ KBE/ml in den Proben, aus denen die Transkonjuganten isoliert wurden, einen früheren Zeitpunkt wahrscheinlich. Bei Donorkonzentrationen unter 10^3 KBE/ml verhinderte die autochthone Flora den Transfer der Plasmide R68.45 bzw. FP5 zwischen *P. aeruginosa*-Stämmen in Flußwasser (O'Morchoe *et al.*, 1988).
In einem der vorliegenden Arbeit ähnlichen System konnte kein Transfer eines Plasmids der Inkompatibilitätsgruppe IncP1 von *P. putida* KT2442 auf autochthone Flußwasserbakterien detektiert werden (Barkay *et al.*, 1995). Als Donorkonzentration wurden 10^6 Zellen/ml eingesetzt. Neben den Unterschieden in der Zusammensetzung der autochthonen Flora und in den chemisch-physikalischen Parametern war ein möglicherweise signifikanter Unterschied das geringere Flüssigkeitsvolumen von 10 ml im Vergleich zu 250 bis 300 ml in der vorliegenden Arbeit. Mit dem kleineren Flüssigkeitsvolumen war sehr wahrscheinlich eine andere Durchmischung und Belüftung des Mediums verbunden, die eine mögliche Erklärung

dafür sein könnten, warum in den Biofilmreaktoren kein Plasmidtransfer beobachtet werden konnte.

Es konnten zwei Transkonjuganten isoliert werden. Angesichts dieser kleinen Zahl wurde die Berechnung einer Transferrate oder der Wahrscheinlichkeit für den Transfer in eine bestimmte Bakteriengruppe nicht für sinnvoll gehalten. Übereinstimmend damit forderten Ravatin *et al.* (1998), bei der Untersuchung von Gentransfer in unbekannten mikrobiellen Gemeinschaften den qualitativen statt des quantitativen Nachweis der Transkonjuganten zu fokussieren.

4.7 Nachweis des Gentransfers

Das Plasmid pJB20 wurde von *P. putida* FH1 auf autochthone Bakterien des LW-Wassers übertragen. Die Rezipienten konnten durch ihre Kanamycin-Resistenz und die Expression des Grün Fluoreszierenden Proteins detektiert werden. Letzteres wird seit 1996 als Markermolekül unter anderem zur Detektion von Gentransfer eingesetzt (Übersicht: Errampalli *et al.*, 1999). Geisenberger *et al.* (1999) nahmen die grüne Fluoreszenz als ausreichenden Nachweis für den erfolgten Gentransfer in einem Belebtschlammsystem an. In der vorliegenden Arbeit wurde die GFP-Expression nach den Ergebnissen der Trinkwasserisolate als alleiniger Nachweis als zu unspezifisch betrachtet. Der phenotypische Nachweis der Konjugation durch die GFP-Expression und die Kanamycin-Resistenz wurde mit dem immunologischen Nachweis des GFP, zwei weiteren auf dem Plasmid pJB20 kodierten Antibiotika-Resistenzen und der Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte des Plasmids in den Transkonjuganten abgesichert.

Trako und Transkonjugant11.1 konnten auf Agarplatten, denen Tetracyclin bzw. Ampicillin zugesetzt worden war, wachsen. Die zugehörigen Resistenzgene lagen außerhalb der *gfp*-Kassette auf dem Plasmid pJB20 (Pansegrau *et al.,* 1994).

Durch Aoki *et al.* (1996) wurde das Grün Fluoreszierende Protein in *E. coli* erstmals immunologisch nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit konnte die nicht kommerzielle GFP-Mutante (*gfp*mut3-Produkt) mit dem kommerziellen polyklonalen Antikörper 8369-1 (Clontech) detektiert werden. Als Positivkontrolle diente der Donorstamm *P. putida* FH1. Die Zellen beider Transkonjuganten, sowie von *P. putida*

FH1 und *P. putida* KT2442 als Negativkontrolle konnten durch das optimierte FastProteinBlue-Verfahren (Bio 101) aufgeschlossen werden, während der zunächst eingesetzte enzymatisch-chemische Aufschluß (siehe Material und Methoden, 2.13.2) für den Transkonjuganten Trako nicht ausreichend war. Die Schwierigkeiten beim Aufschluß von Trako stimmten mit früheren Erfahrungen überein, als derselbe Organismus zur Plasmidextraktion durch ein Standardverfahren nicht aufgeschlossen werden konnte (Daten nicht aufgeführt). Die Resistenz gegen den Aufschluß wurde auf eine möglicherweise sehr rigide oder stark vernetzte Zellwandbeschaffenheit zurückgeführt. Nachdem bei der Trennung der Zellextrakte auf dem SDS-Gel und der darauffolgenden immunologischen GFP-Detektion zusätzliche Banden für potentielle GFP-Abbauprodukte sichtbar wurden, die auf die mechanische Belastung und mögliche Fragmentierung des GF-Proteins zurückgeführt wurden, wurde das FastProteinBlue Standardverfahren verändert und schonender durchgeführt. Der immunologische Nachweis des Grün Fluoreszierenden Proteins in den Transkonjuganten war eindeutig. In allen Spuren außer für Trako wurden zusätzlich unspezifische Bindungen der polyklonalen anti-GFP Antikörper an Wirtsproteine detektiert.

DiGiovanni *et al.* (1996) konnten den Transfer eines katabolischen Plasmids in ein Bodenbakterium durch spezifische Amplifikation erfolgreich bestätigen. Abschließend wurde das Plasmid pJB20 in den Transkonjuganten mit Hilfe spezifischer PCR nach dem Protokoll von Götz *et al.* (1996), zur Detektion von Plasmiden der Inkompatibilitätsgruppe IncP in Umweltproben, nachgewiesen. Durch die Primerpaare IncP*oriT* und *trf*A2 wurden Abschnitte des Transferursprungs bzw. des Replikationsinitiationsgens amplifiziert. Fragmente von 110 bzw. 241 bp Länge wiesen in beiden Transkonjuganten die DNA-Abschnitte spezifisch nach.
Die Amplifikation von *trf*A2 war für *P. putida* FH1 (Positivkontrolle) hochspezifisch, die Amplifikation des IncP*oriT* ergab zusätzliche Banden auf dem Agarosegel, als deren Ursache chromosomale Abschnitte mit einer großen Ähnlichkeit zu den Zielsequenzen der Primer angenommen wurden. Die Durchsicht der Datenbank ergab für *P. putida* eine nur teilweise bekannte DNA-Sequenz, sodaß die zusätzlich amplifizierten DNA-Abschnitte nicht identifiziert werden konnten. Die Amplifikation des *oriT*-Abschnittes konnte weder durch eine Erhöhung der Annealing-Temperatur,

Senken der Primerkonzentration noch ohne weitere Veränderungen des PCR-Programms spezifischer gestaltet werden.

In Untersuchungen zum Gentransfer unter Umweltbedingungen wurden die Rezipienten in der Regel nicht bis auf die Speziesebene charakterisiert: Durch *in situ* Hybridisierung wurden die Rezipienten katabolischer Plasmide z. B. in Belebtschlamm (Geisenberger *et al.*, 1999) oder Sediment (Zhou und Tiedje, 1995) bis auf Gruppen-Ebene klassifiziert. Eine Ausnahme war die Arbeit von DiGiovanni *et al.* (1996), in der drei autochthone Bodenbakterien, Rezipienten im Gentransfer, anhand der Substratmuster stammspezifisch eingeordnet wurden. Durch die Klassifizierung und Identifizierung der Transkonjuganten in der vorliegenden Arbeit konnte der Gentransfer in neue Spezies gezeigt werden. Durch die *in situ* Hybridisierung wurden beide Transkonjuganten phylogenetisch den beta-*Proteobakterien* zugeordnet. Die Sequenzierung der 16 S rDNA der Transkonjuganten diente zur Einordnung der Stämme in den phylogenetischen Stammbaum. Die Absicherung der Sequenzdaten erfolgte durch die Überprüfung aller Basen in den einzelnen Abschnitten der Rohsequenz, die Einordnung der Gesamtsequenz in die Datenbank und die nochmalige Überprüfung aller Basen im Vergleich zu den als Nachbarn angegebenen Organismen. Die beiden Datenbanken ARBDatabase und GenBank sowie die Berechnung der Matrix nach Jukes-Cantor, Similarity und Felsenstein ergaben dasselbe Ergebnis: Trako wurde als Nachbar des wurzelassoziiert lebenden Bakteriums *Herbaspirillum seropodicae* eingeordnet. Transkonjugant11.1 stand phylogenetisch isoliert mit einem Abstand von 7,5 % zu dem nächsten Nachbarn Trako, gefolgt von *Ralstonia eutropha* und *Rubrivivax gelatinosus*, die zu den (Ab)- Wasserkeimen gehören.

Die Detektion der Transkonjuganten erfolgte zu einem späten Zeitpunkt im Verlauf der Experimente. Die Agarplatten wurden während des gesamten Verlaufs der Experimente auf GFP-exprimierende Kolonien überprüft. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß nicht-kultivierbare Transkonjuganten, wie von Arana *et al.* (1997) beschrieben, nicht detektiert wurden.

4.8 Ausblick

Durch die Kombination von *in situ* Hybridisierung, GFP-Expression und Kultivierung konnten *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1 in aquatischen Habitaten sensitiv und spezifisch beobachtet werden. Für weitere Langzeitstudien sollte überprüft werden, ob die Amplifikation spezifischer DNS-Abschnitte länger als die *in situ* Hybridisierung und die GFP-Expression die Detektion allochthoner Bakterien ermöglicht.

Studien in komplexen natürlichen oder naturnahen Habitaten berücksichtigen Organismen, die in definierten Systemen wahrscheinlich in der Mehrzahl nicht eingeschlossen sind. Ihre Funktion als Rezipienten weiterer Plasmide oder genetischer Elemente wie Transposons sollte untersucht werden.

Sowohl im Trinkwasser als auch im LW-Wasser sollten Untersuchungen mit weiteren Organismen durchgeführt werden, die sich in ihrem Überlebenspotential von *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1 unterscheiden. Zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit und einem umfangreichen Vergleich zwischen den Labor- und den Naturbedingungen wäre dann idealerweise bereits nach einer kurzen Analyse eine Einschätzung zum Verhalten der entsprechenden Organismen in natürlichen Habitaten möglich.

Der Nachweis des Gentransfers in die autochthonen Rezipienten des LW-Wassers ist beispielhaft für die Verifizierung einer Konjugation. Ob der Gentransfer zu den beiden identifizierten Rezipienten als konkreter Hinweis auf die Genaustauschvorgänge innerhalb der LW-Population angesehen werden soll oder ob bislang unbekannte Ähnlichkeiten des Donors mit den Rezipientenstämmen den Transfer begünstigten, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

5 Zusammenfassung

Der gentechnisch veränderte Organismus (GVO) *P. putida* FH1 wurde aufgrund seiner Eigenschaft, Biofilme zu bilden und in Biofilmen zu wachsen, als Modellorganismus gewählt. Der Stamm enthielt das selbst-transferierende, mit dem Gen des Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP) markierte Plasmid pJB20. In Parallelexperimenten wurde der Wildtyp *P. putida* KT2442 eingesetzt. Beide Stämme konnten mit der neu-entwickelten 16S rRNA Sonde PPU646 spezifisch hybridisiert werden.

In künstliche Biofilme aus Trinkwasserbakterien konnte sich *P. putida* FH1 nicht einlagern, während in ausgewählten Substraten eine enge Vergesellschaftung auch von *P. putida* KT2442 mit dem Trinkwasserisolat *A. commune* beobachtet wurde. In der mit Trinkwasser kontinuierlich durchströmten Robbins Device wurde *P. putida* KT2442 14 bzw. 28 Tage nach der Exposition frischer Polyethylen-Oberflächen inokuliert und konnte 27 bzw. 8 Tage in den Biofilmen detektiert werden. Die phylogenetische Zusammensetzung und Dichte der Biofilme veränderte sich in den 28 Tage alten Biofilmen signifikant.

Als Medium mit höherer Substratkonzentration und Organismendichte wurde Wasser aus dem Landwehrkanal (LW-Wasser) verwendet. In nicht-sterilen Flüssigkulturen blieben *P. putida* KT2442 und *P. putida* FH1 über 200 Tage kultivierbar. Im Vergleich von stationären mit spät-logarithmischen Kulturen zeigten erstere keine Adaption an das LW-Wasser. Die Inkubation in LW-Wasser machte beide Organismen resistenter gegen Streß in Form von niedrigen Temperaturen (Einfrieren).

Die Biofilmexperimente mit Landwehrkanal-Wasser wurden in 1l-Biofilmreaktoren im semi-batch Betrieb durchgeführt. *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1 konnte durch spezifische *in situ* Hybridisierung mit der neuen Sonde PPU646 32 Tage, durch GFP-Expression 60 Tage und durch selektive Kultivierung 147 bzw. 183 Tage nachgewiesen werden. In bereits entwickelten Biofilmen lagerten sich *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1 mit hoher Zellzahl an, gefolgt von einer zweistufigen Abnahme. Der Verlauf wurde übereinstimmend mit allen Detektionsmethoden gezeigt und weitgehend übereinstimmend für beide Organismen. Die Zugabe von *P. putida* KT2442 bzw. *P. putida* FH1 veränderte die LW-Biofilme nicht signifikant.

Die Kreuzung Rifampicin-resistenter Mutanten des Trinkwasserisolates *A. citratiphilum* mit *P. putida* FH1 unter Laborbedingungen ergab GFP-markierte Transkonjuganten.

In den Flüssigkulturen mit LW-Wasser kam es zum Transfer des Plasmids pJB20 von *P. putida* FH1 auf autochthone, vorher unbekannte Spezies. Die Konjugationen wurden durch einen Antibiotika-Test, den immunologischen Nachweis des GFPs und die spezifische Amplifikation von auf dem Plasmid kodierten Genabschnitten bestätigt. Die Transkonjuganten wurden durch gruppenspezifische *in situ* Hybridisierung als *beta*-Proteobakterien klassifiziert und nach der Sequenzierung der jeweiligen 16 S rDNA als neue Spezies identifiziert.

6 Abstract

Survival of genetically engineered micro-organisms in drinking and river water biofilms

The genetically engineered micro-organism (GEM) *P. putida* FH1 was chosen as model organism because of its ability to build and grow in biofilms. The strain contains the self-transmissible plasmid pJB20, which was tagged with the gene coding for the green fluorescent protein (GFP). The wild type strain *P. putida* KT2442 was used in parallel experiments. Both strains could be specifically hybridised with the newly constructed 16 S rRNA probe PPU646.

P. putida FH1 could not integrate into artificial biofilms from drinking water bacteria, but in selected media a close association with the drinking water isolate *A. commune* was observed. *P. putida* KT2442 was added to a Robbins Device, which was fed with drinking water continuously, 14 and 28 days after fresh polyethylene surfaces were exposed, and could be monitored in the biofilms 27 and 8 days, respectively. The phylogenetic composition and the density of the 28 days old biofilms changed significantly due to the inoculation of *P. putida* KT2442.

River water from the Landwehrkanal (LW-water) was then used as medium with higher concentrations of substrate and organisms. In non-sterile batch-cultures both, *P. putida* KT2442 and *P. putida* FH1, remained culturable over 200 days. No adaptation to the medium was found in stationary cultures compared to cultures from the late log-phase. Both organisms became more resistant against freezing by prolonged incubation in LW-water.

The biofilm experiments with LW-water were carried out semi-batch processed. *P. putida* KT2442 and *P. putida* FH1, respectively, could be monitored by specific *in situ* hybridization with the new probe PPU646 32 days, by expression of the *gfp*-gene for 60 days as well as by selective cultivation 147 and 183 days, respectively. Both, *P. putida* KT2442 and *P. putida* FH1, attached to established biofilms in high numbers, followed by a two-stage decrease of cell numbers. The curves corresponded for all detection methods and were mostly concurrent for the two strains. The biofilms from LW-water were not changed significantly by the addition of *P. putida* KT2442 or *P. putida* FH1.

The mating of rifampicin resistant mutants of the drinking water isolate *A. citratiphilum* with *P. putida* FH1 under lab conditions resulted in GFP-tagged transconjugants. In batch cultures with LW-water as medium the plasmid pJB20 was transferred from *P. putida* FH1 to indigenous, formerly unknown river water bacteria. The gene transfer events were proven by antibiotic resistance testing, immunological proof of GFP and the specific amplification of gene sequences encoded by plasmid pJB20. Transconjugants were classified by 23 S rRNA directed group specific *in situ* hybridization as β–proteobacteria and identified as new species after sequencing of the 16 S rDNA.

7 Literaturverzeichnis

Alm, E. W., D. B. Oerther, N. Larsen, D. A. Stahl, and L. Raskin. 1996. The oligonucleotide probe database. Appl. Environ. Microbiol. **62:** 3557-9.

Amann, R., L. Krumholz, and D. A. Stahl. 1990. Fluorescent-olinucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. J. Bacteriol. **172:** 762-770.

Andersen, J. B., C. Sternberg, L. K. Poulsen, S. P. Bjørn, M. Givskov, and S. Molin. 1998. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **64:** 2240-2246.

Anderson, D. G., and L. L. McKay. 1983. Isolation of a recombination-deficient mutant of Streptococcus lactis ML3. J. Bacteriol. **155:** 930-2.

Aoki, T., Y. Takahashi, K. S. Koch, H. L. Leffert, and H. Watabe. 1996. Construction of a fusion protein between protein A and green fluorescent protein and its application to Western blotting. FEBS Letters. **384:** 193-197.

Arana, I., M. Pocino, A. Muela, A. Fernández-Astorga, and I. Barcina. 1997. Detection and enumeration of viable but non-culturable transconjugants of *Escherichia coli* during the survival of recipient cells in river water. Journal of Applied Microbiology. **83:** 340-346.

Awong, J., G. Bitton, and G. R. Chaudhry. 1990. Microcosm for Assessing Survival of Genetically Engineered Microorganisms in Aquatic Environments. Appl. Environ. Microbiol. **56:** 977-983.

Bade, K. 2000. In Vorbereitung.

Bagdasarian, M. B., B Lurz, F. C. Ruchert, M. M. Bagdasarian, J. Frey, and K. N. Timmis. 1981. Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF 1010-derived vectors for gene cloning in *Pseudomonas*. Gene. **16:** 237-247.

Barkay, T., N. Kroer, L. D. Rasmussen, and S. J. Sørensen. 1995. Conjugal transfer at natural population densities in a microcosm simulating an estuarine environment. FEMS Microbiology Ecology. **16:** 43-54.

Beveridge, T. J., S. A. Makin,J. L. Kadurugamuwa, and Z. Li. 1997. Interactions between biofilms and the enviroment. FEMS Microbiology Reviews. **20:** 291-303.

Black, W. A., and R. W. A. Girdwood. 1969. Carbenicillin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Br. Med. J. **4:** 234

Bryers, J. D. 1993. Bacterial Biofilms. Current Opinion in Biotechnology. **4:** 197-204.

Busscher, H. J., and A. H. Weerkamp. 1987. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. FEMS Microbiol. Rev. **46:** 165-73.

Busscher, H. J., J. Sjollema, and H. C. van der Mei. 1990. Relative importance of surface free energy as a measure of hydrophobicity in bacterial adhesion to solid surfaces. In Doyle, R. J., and M. Rosenberg (eds): Microbial cell surface hydrophobicity. Washington, DC: American Society for Microbiology. pp 335-359.

Buswell, C. M., Y. M. Herlihy, L. M. Lawrence, J. T. M. McGuiggan, P. D. Marsh, C. W. Keevil, and S. A. Leach. 1998. Extended survival and persistence of *Campylobacter* spp. in water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescent-antibody and –rRNA staining. Appl. Environ. Microbiol. **64:** 733-741.

Chalfie, M. Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, and D. C. Prasher. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science. **263:** 802-805.

Christensen, B. B., C. Sternberg, and S. Molin. 1996. Bacterial plasmid conjugation on semi-solid surfaces monitored with the green fluorescent protein (GFP) from *Aequorea victoria* as a marker. Gene. **173:** 59-65.

Christensen, B. B., C. Sternberg, J. B. Andersen, L. Eberl, S. Møller, M. Givskov, and S. Molin. 1998. Establishment of new genetic traits in a microbial biofilm community. Appl. Environ. Microbiol. **64:** 2247-2255.

Cruz-Cruz, N. E., G.A. Toranzos, D. G. Ahearn, and T.C. Hazen. 1988. *In situ* survival of plasmid-bearing and plasmidless *P.aeruginosa* in pristine tropical water. Appl. Environ. Microbiol. **54:** 2574-77.

Cook, R. J., W. L. Bruckart, J. R. Coulson, M. S. Goettel, R. A. Humber, R. D. Lumsden, J. V. Maddox, M. L. McManus, L. Moore, S. F. Meyer, P. C. Quimby, jr., J. P. Stack, and J. L. Vaughin. 1996. Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: a framework for scientific evaluation. Biological Control. **7:** 333-351.

Costerton, J. W., K.-J. Cheng, G. G. Geesey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Dasgupta, and T. J. Marrie. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. Ann. Rev. Microbiol. **41:** 435-64.

Daane, L. L., J. A. E. Molina, M. J. Sadowsky. 1997. Plasmid transfer between spatially seperated donor recipient bacteria in earthworm-containing soil microcosms. Appl. Environ. Microbiol. **63:** 679-86.

Davison, J. 1999. Genetic exchange between bacteria in the environment. Plasmid. **42:** 73-91.

DiGiovanni, G. D., J. W. Neilson, I. L. Pepper, and N. A. Sinclair. 1996. Gene transfer of *Alcaligenes eutrophus* JMP134 plasmid pJP4 to indigenous soil recipients. Appl. Environ. Microbiol. **62:** 2521-2526.

Eberl, L., M. Givskov, C. Sternberg, S. Møller, G. Christensen, and S. Molin. 1996. Physiological responses of *Pseudomonas putida* KT2442 to phosphate starvation. Microbiology. **142:** 155-163.

Eberl, L., R. Schulze, A. Ammendola, O. Geisenberger, R. Erhart, C. Sternberg, S. Molin, and R. Amann. 1997. Use of the green fluorescent protein as a marker for ecological studies of activated sludge communities. FEMS Microbiology Letters. **149:** 77-83.

Errampalli, D., K. Leung, M. B. Cassidy, M. Kostrzynska, M. Blears, H. Lee, and J. T. Trevors. 1999. Applications of the green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms. Journal of Microbiological Methods. **35:** 187-199.

Fass, S., M. L. Dincher, D. J. Reasoner, D. Gatel, and J.-C. Block. 1996. Fate of *Escherichia coli* experimentally injected in a drinking water distribution pilot system. Wat. Res. **30:** 2215-2221.

Fletcher, M. 1996. Bacterial attachment in aquatic environments: a diversity of surfaces and adhesion strategies. *In:* Bacterial adhesion: Molecular and ecological diversity. Wiley-Liss, Inc. pp. 1-24.

Flint, K. P. 1987. The long-term survival of *Escherichia coli* in river water. Journal of applied Bacteriology. **63:** 261-270.

Fulthorpe, R. R., and R. C. Wyndham. 1991. Transfer and expression of the catabolic plasmid pBRC60 in wild bacterial recipients in a freshwater ecosystem. Appl. Environ. Microbiol. **57:** 1546-1553.

Geisenberger, O., A. Ammendola, B. B. Christensen, S. Molin, K.-H. Schleifer, and L. Eberl. 1999. Monitoring the conjugal transfer of plasmid RP4 in activated sludge and in situ identification of the transconjugants. FEMS Microbiology Letters. **174:** 9-17.

Genthner, F. J., P. Chatterjee, T. Barkay, and A. W. Bourquin. 1988. Capacity of aquatic bacteria to act as recipients of plasmid DNA. Appl. Environ. Microbiol. **54:** 115-117.

Genthner, F. J., R. P. Campbell, and P. H. Pritchard. 1992. Use of a novel plasmid to monitor the fate of a genetically engineered *Pseudomonas putida* strain. Molecular Ecology. **1:** 137-143.

Givskov, M., L. Eberl, S. Møller, L. K. Poulsen, and S. Molin. 1994. Responses to nutrient starvation in *Pseudomonas putida* KT2442: Analysis of general cross-protection, cell shape and macromolecular content. Journal of Bacteriology. **176:** 7-14.

Götz, A., R. Pukall, E. Smit, E. Tietze, R. Prager, H. Tschäpe, J. D: van Elsas, and K. Smalla. 1996. Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR. Appl. Environ. Microbiol. **62:** 2621-2628.

Harakeh, S., and A. Matin. 1989. Influence of nutrient-limited growth of pathogenesis-associated outer membrane proteins of *Yersinia enterocolitica*. J. Appl. Bacteriol. **67:** 209-212.

Hausner, M., and S. Wuertz. 1999. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative *in situ* analysis. Appl. Environ. Microbiol. **65:** 3710-3713.

Herrero, M. V. de Lorenzo, and K. N. Timmis. 1990. Transposon Vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. J. Bacteriol. **172:** 6557-6567.

Hicks, R. E., R. I. Amann, and D. A. Stahl. 1992. Dual staining of natural bacterioplancton with 4',6-diamidino-2-phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdom-level 16 S rRNA sequences. Appl. Environ. Microbiol. **58:** 2158-2163.

Jukes, T. H., and C. R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules. *In* H. N. Munro (ed.), Mammalian protein metabolism. Academic Press, New York, N. Y. p. 21-132.

Kalmbach, S., W. Manz, and U. Szewzyk. 1997a. Dynamics of biofilm formation in drinking water: phylogenetic affiliation and metabolic potential of single cells assessed by formazan reduction and *in situ* hybridization. FEMS Microbiol. Ecol. **22:** 265-280.

Kalmbach, S., W. Manz, and U. Szewzyk. 1997b. Isolation of new bacterial species from drinking water biofilms and proof of their in situ dominance with highly specific 16S rRNA probes. Appl. Environ. Microbiol. **63:** 4164-4170.

Kalmbach, S. 1998. Polyphasic characterization of the microbial population of drinking water biofilms. Dissertation. Technische Universität Berlin.

Kalmbach, S., W. Manz, J. Wecke, and U. Szewzyk. 1999. *Aquabacterium* gen. nov., with description of *Aquabacterium citratiphilum* sp. nov., *Aquabacterium parvum* sp. nov. and *Aquabacterium commune* sp. nov., three *in situ* dominant bacterial species from the Berlin drinking water system. Internat. J. Systemat. Bacteriol. **49:** 769-777.

Kooij, D. v. d. 1991. Nutritional requirements of aeromonads and their multiplication in drinking water. Experientia. **47:** 444-446.

Leff, L. G., J. V. McArthur, and L. J. Shimkets. 1992. Information spiraling: Movement of bacteria and their genes in streams. Microb. Ecol. **24:** 11-24.

Leff, L., and A. A. Leff. 1996. Use of Green Fluorescent Protein to monitor survival of genetically engineered bacteria in aquatic environments. Appl. Environ. Microbiol. **62:** 3486-3488.

Levin, B. R., F. M. Stewart, and V. A. Rice. 1979. The kinetics of conjugative plasmid transmission: fit of a simple mass active model. Plasmid. **2:** 247-260.

Lindow, S. E. 1995. The use of reporter genes in the study of microbial ecology. Molecul. Ecol. **4:** 555-66.

Lorenzo, V. de, M. Herrero, U. Jakubzik, and K. N. Timmis. 1990. Mini-Tn5 Transposon derivatives for insertion mutagenesis, promotor probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. **177:** 6568-6572.

Lowcock, D. and C. Edwards. 1994. Survival of genetically-*marked Aeromonas hydrophila* in water. Lett. Appl. Microbiol. **19:** 121-123.

Manz, W., R. I. Amann, W. Ludwig, M. Wagner, and K.-H. Schleifer. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. Syst. Appl. Microbiol. **15:** 593-600.

Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Vancanneyt, and K.-H. Schleifer. 1996. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. Microbiology. **142:** 1097-1106.

Manz, W., M. Eisenbrecher, T. R. Neu, and U. Szewzyk. 1998. Abundance and spatial organization of Gram-negative sulfate reducing bacteria in activated sludge investigated by *in situ* probing with specific 16S rRNA targeted oligonucleotides. FEMS Microbiol. Ecol. **25:** 43-61.

Manz, W. Unveröffentlicht. Die Sequenz der PPU646-Sonde.

McCoy, W. F., and J. W. Costerton. 1981. Dev. Ind. Microbiol.. **23:** 551-558.

McEldowney, S., and M. Fletcher. 1986. Effect of growth conditions and surface characteristics of aquatic bacteria on their attachment to solid surfaces. J. Gen. Microbiol. **132:** 513-523.

Miettinen, I. T., T. Vartiainen, and P. Martikainen. 1997. Phosphorus and bacterial growth in drinking water. Appl. Environ. Microbiol. **63:** 3242-3245.

Møller, S, A. Pedersen, L. K. Poulsen, E. Arvin, and S. Molin. 1996. Activity and three-dimensional distribution of toluene-degrading *Pseudomonas putida* in a multispecies biofilm assessed by quantitative in situ hybridization and scanning confocal laser microscopy. Appl. Environ. Microbiol. **62:** 4632-4640.

Møller, S., C. Sternberg, J. B. Andersen, B. B. Christensen, J. L. Ramos, M. Givskov, and S. Molin. 1998. In situ gene expression in mixed-culture biofilms: evidence of metabolic interactions between community members. Appl. Environ. Microbiol. **64:** 721-732.

Molin, G., I. Nilsson, and L. Stenson-Holst. 1982. Biofilm build-up of *Pseudomonas putida* in a chemostat at different dilution rates. Eur. J. Appl. Biotechnolog. **15:** 218-222.

Molin, S., and S. Kjelleberg. 1993. Release of engineered microorganisms: biological containment and improved predictability for risk assessment. AMBIO. **22:** 242-245.

Muela, A., M. Pocino, I. Arana, J. I. Justo, J. Iriberri, and I. Barcina. 1994. Effect of growth phase and parental cell survival in river water on plasmid transfer between *Escherichia coli* strains. Appl. Environ. Microbiol. **60:** 4273-4278.

Nakatsu, C. H., R. R. Fulthorpe, B. A. Holland, M. C. Peel, and R. C. Wyndham. 1995. The phylogenetic distribution of a transposable dioxygenase from the Niagara River watershed. Mol. Ecol. **4:** 593-603.

Neu, T. R. 1996. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. Microbiological Reviews. **60:** 151-166.

Normander, B., B. B. Christensen, S. Molin, and N. Kroer. 1998. Effect of bacterial distribution and activity on conjugal gene transfer on the phylloplane of the bush bean (*Phaseolus vulgaris*). Appl. Environ. Microbiol. **64:** 1902-1909.

Olofsson, A.-C., A. Zita, and M. Hermansson. 1998. Floc stability and adhesion of green-fluorecent-protein-marked bacteria to flocs in activated sludge. Microbiol. **144:** 519-28.

O'Morchoe, S. B., O. Ogunseitan, G. S. Sayler, and R. V. Miller. 1988. Conjugal transfer of R68.45 and FP5 between Pseudomonas aeruginosa strains in a freshwater environment. Appl. Environ. Microbiol. **54:** 1923-1929.

Pansegrau, W., E. Lanka, P. T. Barth, D. H Figurski, D. G. Guiney, D. Haas, D. R. Helinski, H. Schwab, V. A. Stanisich, and C. M. Thomas. 1994. Complete nucleotide sequence of Birmingham IncPα plasmids. J. Mol. Biol. **239:** 623-663.

Prasher, D. C., V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast, and M. J. Cormier. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. Gene. **111:** 229-233.

Prosser, J. I. 1994. Molecular marker systems for detection of genetically engineered micro-organisms in the environment. Microbiol. **140:** 5-17.

Ravatn, R., A. J. B. Zehnder, and J. R. van der Meer. 1998. Low-frequency horizontal transfer of an element containing the chlorocatechol degradation genes from *Pseudomonas* sp. strain B13 to *Pseudomonas putida* F1 and to indigenous bacteria in laboratory-scale activated-sludge microcosms. 1998. Appl. Environ. Microbiol. **64:** 2126-2132.

Reasoner, D. J., and Geldreich, E. E. 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Appl. Environ. Microbiol. **49:** 1-7.

Robinson, P. J., J. T. Walker, C. W. Keevil, and J. Cole. 1995. Reporter genes and fluorescent probes for studying the colonisation of biofilms in a drinking water supply line by enteric bacteria. FEMS Microbiology Letters. **129:** 183-188.

Roller, C., M. Wagner, R. Amann, W. Ludwig, and K.-H. Schleifer. 1994. *In situ* probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23 S rRNA-targeted oligonucleotides. Microbiology. **140:** 2849-2858.

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schäfer, A., J. Kalinowski, and A. Pühler. 1994. Increased fertility of *Corynebacterium glutamicum* recipients in intergeneric matings with *Escherichia coli* after stress exposure. Appl. Environ. Microbiol. **60:** 756-759.

Sibille, I. T., Sime-Ngando, L. Mathieu, and J. C. Block. 1998. Protozoan bacterivory and *Escherichia coli* survival in drinking water distribution systems. Appl. Environ. Microbiol. **64:** 197-202.

Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. **4:** 406-425.

Sandt, C. H., and D. S. Herson. 1991. Mobilization of the genetically engineered plasmid pHSV106 from *Escherichia coli* HB101(pHSV106) to *Enterobacter cloacae* in drinking water. Appl. Environ. Microbiol. **57:** 194-200.

Smella, K., M. Isemann. R. Levy, and B. Thriene. 1989. Risikoabschätzung der industriellen Nutzung gentechnisch veränderter Mikroorganismen. Z. gesamte Hyg. **35:** 475-477.

Sobecky, P. A., M. A. Schell, M. A. Moran, and R. E. Hodson. 1992. Adaptation of modell genetically engineered microorganisms to lake water: growth rate enhancement and plasmid loss. Appl. Environ. Microbiol. **58:** 3630-7.

Stahl, D. A., and R. I. Amann. 1991. Development and application of nucleic acid probes in bacterial systematics. *In* E. Stackebrandt, M. Goodfellow (ed.). Sequencing and hybridization techniques in bacterial systematics. John Wiley, Chichester. p. 205-248.

Strätz, M., M. Mau, and K. Timmis. 1996. System to study horizontal gene exchange among microorganisms without cultivation of recipients. Molecular Microbiology. **22:** 207-215.

Strunck. Unveröffentlicht. ARB-Software.

Suarez, A., A. Güttler, M. Strätz, L. H. Staendner, K. N. Timmis, and C. A. Guzmán. 1997. Green fluorescent protein-based reporter systems for genetic analysis of bacteria including monocopy applications. Gene. **196:** 69-74.

Szafranski, P., C. M. Mello, T. SanoC. L. Smith, D. L. Kaplan, and C. R. Cantor. 1997. A new approach for containment of microorganisms: Dual control of streptavidin expression by antisense RNA and the T7 transcription system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **94:** 1059-1063.

Szewzyk, U., and B. Schink. 1988. Surface colonization by and life cycle of *Pelobacter acidigallici* studied in a continuous-flow microchamber. Journal of General Microbiology. **134:** 183-190.

Szewzyk, U., W. Manz, R. Amann, K.-H. Schleifer, and T.-A. Stenström. 1994. Growth and in situ detection of a pathogenic *Escherichia coli* in biofilms of a heterotrophic water-bacterium by use of 16S- and 23S-rRNA-directed fluorescent oligonucleotide probes. FEMS Microbiology Ecology. **13:** 169-176.

Tombolini, R. A. Unge, M. E. Davey, F. J. de Bruijn, and J. K. Jansson. 1997. Flow cytometric and microscopic analysis of GFP-tagged *Pseudomonas fluorescens* bacteria. FEMS Microbiology Ecology. **22:** 17-28.

Van der Wende, E., W. G. Characklis, and D. B. Smith. 1989. Biofilms and bacterial drinking water quality. Wat. Res. **23:** 1313-1322.

Van Loosdrecht, M. C. M, J. Lyklema, W. Norde, G. Schraa, and A. J. B. Zehnder. 1987a. The role of bacterial cell wall hydrophibicity in adhesion. Appl. Environ. Microbiol. **53:** 1893-7.

Van Loosdrecht, M. C. M., J. Lyklema, W. Norde, G. Schraa, and A. J. B. Zehnder. 1987b. Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial step of bacterial adhesion. Appl. Environ. Microbiol. **53:** 1898-1901.

Van Loosdrecht, M. C. M., J. Lyklema. W. Norde, and A. J. B. Zehnder. 1990. Influence of interfaces on microbial activity. Microbiological Reviews. **54:** 75-87.

Wardell, J. N., C. M. Brown, and D. C. Ellwood. 1980. A continuous culture study of the attachment of bacteria to surfaces. *In* Berkeley R. C. W., J. M. Lynch, J. Melling, P. R. Rutter, and B. Vincent (eds): Microbial adhesion to surfaces. Chichester, England: Ellis Horwood. pp 221-230.

Williams, H. G., M. J. Day, J. C. Fry, and G. J. Stewart. 1996. Natural transformation in river epilithon. Appl. Environ. Microbiol. **62:** 2994-2998.

Winstanley, C., and J. A. W. Morgan. 1997. The bacterial flagellin gene as a biomarker for detection, population genetics and epidemiological analysis. Microbiology. **143:** 3071-3084.

Wrangstadh, M., U. Szewzyk, J. Östling, and S. Kjelleberg. 1990. Starvation-specific formation of a peripheral exopolysaccharide by a marine *Pseudomonas* sp., strain S9. Appl. Environ. Microbiol. **62:** 100-104.

Zambrano, M. M., D. A. Siegele, M. Almirón, A. Tormo, and R. Kolter. 1993. Microbial competition: *Escherichia coli* mutants that take over stationary phase cultures. Science. **259:** 1757-1759.

Zita, A., and M. Hermansson. 1997a. Effects of bacterial cell surface structures and hydrophobicity on attachment to activated sludge flocs. Appl. Environ. Microbiol. **63:** 1168-70.

Zita, A., and M. Hermansson. 1997b. Determination of bacterial cell surface hydrophobicity of single cells in cultures and in wastewater *in situ*. FEMS Microbiol. Lett. **152:** 299-306.

Zhou, J.-Z., and M. Tiedje. 1995. Gene transfer from a bacterium injected into an aquifer to an indigenous bacterium. Molecular Ecology. **4:** 613-618.

Anhang

Primer für die spezifische Amplifikation nach Götz

Primer	Sequenz
*trf*A21	5‘-CGA AAT TCR TRT GGG AGA AGT A-3‘
*trf*A22	5‘-CGY TTG CAA TGC ACC AGG TC-3‘
IncP*ori*T1	5‘-CAG CCG GGC AGG ATA GGT GAA GT-3‘
IncP*ori*T2	5‘-CAG CCT CGC AGA GCA GGA T-3‘

R steht für Adenin oder Guanin, Y steht für Cytosin oder Thymin.

Primer für die Sequenzierung der 16 S rDNA

Primer	Sequenz
616V	5‘-AGAGTTTGATC/TA/CTGGCTCAG-3‘
1492R	5‘-CGGC/TTACCTTGTTACGAC-3‘
610R	5´-ACCGCGGCTGCTGGCAC-3´
NEUBV	5´-ACTCCTACGGGAGGCAGC-3´
610V	5´-GTGCCAGCAGCCGCGGT-3´
699R	5´-RGGGTTGCGCTCGTT-3´
609V	5´-GGMTTAGATACCCBRGTAGT-3´
699V	5´-AACGAGCGCAACCCY-Wobbles-3´

B steht für Guanin, Thymin oder Cytosin, M steht für Adenin oder Cytosin, R und Y siehe oben.

Erklärungen an Eides Statt

Ich erkläre an Eides Statt, daß die vorliegende Dissertation in allen Teilen von mir selbstständig angefertigt wurde und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben worden sind.

Vorveröffentlichungen von irgendwelchen Teilen der vorliegenden Dissertation sind von mir nicht vorgenommen worden.

Weiter erkläre ich, daß ich nicht schon anderweitig einmal die Promotionsabsicht angemeldet oder ein Promotionseröffnungsverfahren beantragt habe.

Essen, 21. 1. 2001 Frauke Hangen

Lebenslauf

Zur Person

geboren am	3. 12. 1968 in Darmstadt
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	ledig

Beruflicher Werdegang

Seit 7/00	Produktspezialistin für mikrobiologische Schnelltestsysteme bei der Celsis GmbH, Landgraaf, Niederlande
11/96-11/99	wissenschaftliche Mitarbeiterin im Projekt: Biofilme als Modellsysteme für das Verhalten gentechnisch veränderter Mikroorganismen, Fachgebiet Ökologie der Mikroorganismen, Technische Universität Berlin
5/97 – 6/97	Gastaufenthalt an der Technischen Universität Dänemark, Lyngby, Dänemark

Studium

10/88 – 2/96	Biotechnologie an der TU Berlin, Abschluß als Dipl.-Ingenieurin Biotechnologie, Note 2,3
4/95 – 2/96	Diplomarbeit: Einfluß geometrischer Parameter auf das Regenerieren von Adsorbentien durch Ozon im Fachgebiet Bioverfahrenstechnik, TU Berlin
4/92 – 10/92	Studienarbeit: Promoteranalyse in Aspergillus niger im Institut für Molekulargenetik der Landbouwuniversiteit Wageningen, Niederlande

Schulausbildung

8/75 – 5/88	Pestalozzischule I und II, Geschwister-Scholl-Schule: Grundschule, Gymnasium und gymnasiale Oberstufe in Bremerhaven, mit Abschluß Abitur, Note 1,6

Essen, 21. 1. 2001 Frauke Hangen