



UFZ-Bericht

UFZ-Bericht • UFZ-Bericht • UFZ-Bericht • UFZ-Bericht

UFZ - Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH

Nr. 16/1998

Dissertation

**Durchflußzytometrische
Charakterisierung
der Populationsdynamik
von *Acinetobacter calcoaceticus*
und *Ralstonia eutropha***

Carsten Herrmann

ISSN 0948-9452

**Durchflußzytometrische Charakterisierung der Populationsdynamik von
Acinetobacter calcoaceticus und *Ralstonia eutropha***

Der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie
der Universität Leipzig
eingereichte

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

von Dipl.-Biologe Carsten Herrmann

geboren am 01.02.1967 in Hemer

Leipzig, den 20. April 1998

Archiv

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	8
2.1 Mikroorganismen	8
2.1.1 <i>batch</i> -Kultivierungen mit Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle	8
2.1.2 Kultivierungen mit Phenol als Kohlenstoff- und Energiequelle	8
2.1.2.1 <i>batch</i> -Kultivierung	9
2.1.2.2 <i>transient-state</i> -Kultivierung im Chemostaten	9
2.1.2.3 Zusatz einer zweiten Energiequelle: Formiat-Gradient	10
2.1.2.4 Substrathemmung mit Nutristat-Experimenten	10
2.1.3 Bestimmung der Biomassekonzentration und Zellfixierung	12
2.2 Fluoreszenzfarbstoffe und Fluoreszenzfärbung	12
2.2.1 rRNS-Färbung	13
2.2.1.1 Verwendete Oligonukleotidsonden	13
2.2.1.2 <i>In situ</i> -Hybridisierung auf Objektträgern	14
2.2.1.3 <i>In situ</i> -Hybridisierung in Suspension	15
2.2.2 DNS-Färbung	15
2.3 Fluoreszenzmikroskopie und -spektroskopie	16
2.4 Durchflußzytometrie	16
2.4.1 Auswertung der zytometrischen Daten	19
2.4.2 Populationsmodelle	21
3. Ergebnisse	22
3.1 <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 69-V	22
3.1.1 Versuche mit Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle	22
3.1.1.1 Amplifikation des Fluoreszenzsignals	23
3.1.1.2 rRNS-Gehalt bei einer <i>batch</i> -Kultivierung	26
3.1.2 Versuche mit Phenol als Kohlenstoff- und Energiequelle	27
3.1.2.1 Ergebnisse aus <i>batch</i> -Kultivierung	27
3.1.2.2 Ergebnisse der <i>transient-state</i> -Experimente im Chemostaten	30
3.2 <i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	34
3.2.1 Versuche mit Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle	34
3.2.2 Versuche mit Phenol als Kohlenstoff- und Energiequelle	35
3.2.2.1 Ergebnisse aus <i>batch</i> -Kultivierung	35
3.2.2.2 Ergebnisse der <i>transient-state</i> -Experimente im Chemostaten	37
3.2.2.3 Zusatz einer zweiten Energiequelle: Formiat-Gradient	42
3.2.2.4 Substrathemmung mit Nutristat-Experimenten	43
3.3 Mischkultur aus <i>A. calcoaceticus</i> 69-V und <i>R. eutropha</i> JMP134	46
3.3.1 Versuche mit Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle	46
3.3.1.1 <i>In situ</i> -Hybridisierung mit unterschiedlich markierten Oligonukleotidsonden	46
3.3.1.2 Trennung der Mischpopulation durch DNS-Färbung	51
3.3.2 Versuche mit Phenol als Kohlenstoff- und Energiequelle	54
3.3.2.1 Experimente im Chemostaten	54
3.3.2.2 Modellierung	58

4.	Diskussion	63
4.1	Populationsdynamik bei <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 69-V	63
4.1.1	Charakterisierung einzelner Zellen bei <i>batch</i> -Versuchen mit dem Substrat Acetat	63
4.1.1.1	Quantifizierung der sondenvermittelten Fluoreszenz	64
4.1.1.2	Signalverstärkung	65
4.1.2	rRNS- und DNS-Gehalt beim Wachstum auf Phenol	67
4.2	Populationsdynamik bei <i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	69
4.2.1	Kinetik bei <i>batch</i> -Versuchen mit dem Substrat Acetat	69
4.2.2	rRNS- und DNS- Gehalt beim Wachstum auf Phenol	70
4.2.2.1	Situation bei der <i>batch</i> -Kultivierung	70
4.2.2.2	Einfluß der Durchflußrate auf den DNS- und rRNS-Gehalt	72
4.2.2.3	Einfluß eines Formiat-Gradienten auf den DNS- und rRNS-Gehalt	73
4.2.2.4	Einfluß der Substrathemmung auf den DNS- und rRNS-Gehalt	74
4.3	Charakterisierung der Populationsdynamik einer Mischkultur	75
4.3.1	Populationsdynamik der Mischkultur mit Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle	75
4.3.2	Populationsdynamik der Mischkultur mit Phenol als Kohlenstoff- und Energiequelle	77
4.4	Ausblick	79
5.	Zusammenfassung	81
6.	Literatur	83

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
BTM	Biotrockenmasse
C	Cytosin
CV	Variationskoeffizient (<i>coefficient of variation</i>)
CY3	Derivat eines Indocarbocyanins
D	Durchflußrate
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
Fluos	5(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimidester
FL.	Fluoreszenz
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
G	Guanin
h	Stunde
hPa	Hektopascal
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (<i>high-pressure-liquid-chromatography</i>)
K_s	Halbsättigungskonstante
min	Minute
μ	Wachstumsrate
μ_{max}	maximale Wachstumsrate
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PHB	Polyhydroxybuttersäure
S_0	Substratkonzentration im Zulauf
S	Svendberg; Substratkonzentration
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp.	Spezies
T	Thymidin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
UTP	Uridintriphosphat
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
X	Biomassekonzentration
$Y_{x/s}$	Ertragskoeffizient

1. Einleitung

Mikroorganismen sind ubiquitär in allen Räumen der Natur in einer sehr großen taxonomischen Diversität vorhanden (10^5 - 10^6 Arten: Hammond, 1992, 1995; Tiedje, 1995). Mikrobielles Leben ist in diesen Räumen in Lebensgemeinschaften organisiert, wobei die mikrobiellen Biozönosen sowohl mit der biotischen als auch mit der abiotischen, physikochemischen Umwelt interagieren. Generell vermögen Mikroorganismen auf Veränderungen der Lebensbedingungen zu reagieren. Sie können in Grenzen Veränderungen tolerieren und sich anpassen. Durch das Adaptionsvermögen ist eine Besiedlung kleinster und vielfältigster sowie extremer Lebensräume möglich (Mikroökologie).

Mikroorganismen sind hauptsächlich Destruenten, also Endkonsumenten von Nahrungsketten, die anorganische Substanzen, biogene und abiogene Organika attackieren, transformieren und/oder mineralisieren. Sie werden dadurch zu wesentlichen "Motoren" von Stoffkreisläufen. Nach Oxidation von organisch aufgebauten Substanzen nutzen heterotrophe Mikroorganismen den Kohlenstoff und die Energie zum Aufbau und zur Erhaltung eigener Zellsubstanz. Bei dieser programmierten Selbsterhaltung mit dem Lebensziel der Vermehrung (Zuwachs der Zellzahl) werden auch organische Problemstoffe (Xenobiotika), die anthropogen produziert und freigesetzt worden sind, aufgenommen, transformiert und teilweise vollständig oxidiert, somit entgiftet. Die meisten Xenobiotika werden mit geringeren Geschwindigkeiten konvertiert als biogene Verbindungen, u. a. weil die einzelnen Spezies nicht für den Abbau xenobiotischer Organika optimiert sind. Als Reinkulturen haben die meisten Mikroorganismen nur ein geringes eigenes Abbaupotential. In Kombination als Mischungen werden wesentlich größere Abbauleistungen erbracht, in der Regel zeigen sich neue Qualitäten bei den einzelnen Abbaupotentialen von Stämmen. Aus diesem Grund ist es wichtig, nach der Struktur und Dynamik von Mischkulturen zu fragen. Ein weiterer Grund ergibt sich daraus, daß die vorhandenen Ökosysteme nicht mit xenobiotischen Reinstoffen kontaminiert sind, sondern mit Stoffgemischen. Entsprechende Stoffgemische werden oft nicht von einer definierten Spezies verändert oder vollständig oxidiert. Auch hier sind Mischkulturen gefragt. In jedem Fall ist eine bestimmte Zusammensetzung erforderlich, um den Abbau nach Quantität und Qualität zu optimieren, was für Sanierungsvorhaben von großer Bedeutung ist. An Prozessen, die Synthesen, Transformation oder Konservierungen zum Ziel haben, sind ebenfalls Mischkulturen beteiligt. Anwendungen finden sich bei allen biotechnologischen Verfahren, in denen Starterkulturen bei Prozeßbeginn eingesetzt werden. Für proportionskonstante Vermehrungen und optimierte Prozeßsteuerung in Misch-

kultursystemen sind Informationen über Zellzustände und Zellverteilung der Populationen in der Mischung notwendig und wünschenswert.

Experimentell gewonnene Daten zur Populationsdynamik von Mischkulturen existieren von zwei konkurrierenden *Pseudomonaden*-Stämmen (Dikshitulu et al., 1993), von einer Mischung aus *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* (Hansen und Hubbell, 1980) sowie von einer Population aus *Escherichia coli*, *Azotobacter vinelandii* und *Tetrahymena pyriformis* (Jost et al., 1973). Koexistenz beim Abbau von Nitratestem sind für die beiden Bakterienarten *Arthrobacter ilicis* und *Agrobacterium radiobacter* beschrieben worden (Ramos et al., 1996). Bei Mischungen aus zwei Bakterienarten wurde mutualistisches Verhalten beim Abbau von verschiedenen Aminobenzolsulfonaten gezeigt (Nörtemann et al., 1986; Feigel und Knackmuss, 1993; Dangmann et al., 1996). Die meisten publizierten Daten beruhen auf simulierten Systemen. Mit kinetischen Modellen wurde die Konkurrenz von zwei Arten in einer Mischkultur für *fed-batch* und für kontinuierliche Experimente berechnet (Yang und Humphrey, 1975; Aris und Humphrey, 1977; Hansen und Hubbell, 1980; Pavlou et al., 1990).

Das Wissen über die Entstehung, Stabilität und Auflösung dieser Biozönosen ist nicht nur bei biotechnologischen Systemen begrenzt. Zum einen ist die enorme Arten-Diversität bei Bakterien erst zu Bruchteilen aufgeklärt (ca. 4000 beschriebene Arten bei 6000 hinterlegten prokaryontischen 16S-rRNS-Sequenzen in Datenbanken: Maidak et al., 1996; Van de Perr et al., 1996). Zum anderen existiert ein unzureichendes Wissen und Verständnis über die Dynamik und Leistung einzelner Arten in einer Gemeinschaft. Ökosozioologische Verhaltensweisen wie Konkurrenz, Kooperation, Neutralismus oder Kommensalismus von Bakterien mit anderen Mikroorganismen sind wenig erforscht und in ihrer Vernetzung kaum beschrieben. Daher sind Studien der Populationsdynamik von Mischkultursystemen in Abhängigkeit von definierten Versuchsbedingungen (im Bioreaktor wie beispielsweise im Chemostaten) hilfreich, um Informationen über das ökologische Bestehen und Vergehen von Mikroorganismen zu erhalten. Voraussetzung dafür sind einerseits Methoden zur eindeutigen Identifizierung der Mikroorganismen in entsprechende Taxa und andererseits Methoden, die eine quantitative Bestimmung der Häufigkeitsverteilung entsprechender Mikroorganismen einer Mischkultur zulassen.

Bei den Identifizierungsmethoden von Mikroorganismen haben molekulare Methoden, die Makromoleküle wie DNS bzw. RNS als Zielmoleküle nutzen, eine neue Qualität gegenüber den klassisch biochemischen Bestimmungsmethoden hervorgebracht. Ein Vorteil der molekularen Identifizierungstechniken besteht darin, daß der Anreicherungs-schritt zur

Kolonie bzw. Biomassebildung bei mikrobiellen Biozönosen durch eine Vervielfältigung von DNS- bzw. RNS-Sequenzen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) ersetzt wird. Parallel dazu kann auch direkt eine amplifizierte Struktur wie die rRNS-Moleküle benutzt werden. Dadurch wird die mehrfach beschriebene Populationsverschiebung innerhalb der Biozönose durch Kultivierung auf Komplex- oder Selektivmedien minimiert (Wagner et al., 1993, 1994; Amann, 1995; Kämpfer et al., 1996). Auf der Ebene der Ribonukleinsäuren wird das Ribotyping (Swaminathan und Matar, 1993), die *in situ*-PCR mit mRNA-Molekülen (Hodson et al., 1995) und die *in situ*-Hybridisierung gegen 16S rRNS und 23S rRNS mit markierten Oligonukleotidsonden zur Identifikation von Bakterien eingesetzt (Olson et al., 1986; Pace et al., 1986; Giovannoni et al., 1988; Stahl et al., 1988; Ward et al., 1992; Amann et al., 1995). Die Entwicklung von Identifizierungsmethoden, die als Nachweis eine Bindung an komplementäre Sequenzbereiche der rRNS nutzen, begann, nachdem der Wert der RNS-Sequenz für die Evolutionsforschung entdeckt worden war. Nach vergleichender Sequenzanalyse von Proteinen und Nukleinsäuren, insbesondere der ribosomalen Ribonukleinsäuren (speziell der 16S rRNS), wurde in den achtziger Jahren erstmals ein umfassendes natürliches System für die Klassifizierung von Mikroorganismen erstellt (Fox et al., 1977; Woese und Fox, 1977; Woese, 1987).

Bei den Prokaryonten sind die drei vorkommenden rRNS-Größen (5S, 16S und 23S rRNS) Struktur moleküle der Ribosomen, wobei jedes der drei rRNS-Makromoleküle nur einmal pro Ribosom vorkommt. Die Synthese der rRNS erfolgt mit der Transkription der rDNS-Regionen, die in unterschiedlich hoher Kopiezahl im Genom der Bakterien (Amikam et al., 1984; Jarvis et al., 1988) vorhanden sind. Eine Sequenzheterogenität innerhalb dieser rDNS-Sequenzen wurde bisher bei dem Actinomyceten *Thermobispora bispora* (Wang et al., 1997), bei der Gattung *Paenibacillus* (Nübel et al., 1996) und bei prokaryontischen Phytoplasmen beschrieben (Pettersson et al., 1994; Liefing et al., 1996). Die Sequenz der rRNS-Moleküle besteht aus alternierenden Bereichen von stark konservierten Sequenzabschnitten und variablen Regionen. Das erlaubt phylogenetische Zuordnungen auf unterschiedlichen taxonomischen Ebenen (Woese, 1987) und ermöglicht die Konstruktion unterschiedlicher Oligonukleotidsonden für den Nachweis (Übersicht: Amann et al., 1995). Die rRNS-Sequenzdatensätze sind in entsprechenden Datenbanken (Maidek et al., 1996; De Rijk et al., 1996; Van de Perr et al., 1996; Ludwig, persönliche Mitteilung) zugänglich.

Bei der Identifizierung einer Bakterienart durch die *in situ*-Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden wird das Fluoreszenzsignal in den Bakterien nachgewiesen, das nach spezifischer Bindung des Oligonukleotids an die komplementäre Zielsequenz der rRNS entsteht. Diese Technik kann bei der zu untersuchenden Probe

sofort eingesetzt werden, ohne daß eine vorherige Kultivierung erfolgen muß. Damit ist der Nachweis von Bakterien möglich, die als nicht-kultivierbar beschrieben sind, das heißt die auf den bisher genutzten Medien nicht oder nur mit geringer Geschwindigkeit wachsen (Brock, 1987; Torsvik et al., 1990). Ein weiterer Vorteil bei der *in situ*-Hybridisierung besteht darin, daß die rRNS-Moleküle als Strukturelemente der Ribosomen natürlicherweise amplifiziert in der bakteriellen Zelle vorliegen. Die Identifizierung von Mikroorganismen durch *in situ*-Hybridisierung ist für vielfältigste Habitate beschrieben worden (Übersicht bei: Ward et al., 1992; Amann et al., 1995; Stahl, 1995; Head et al., 1998). In fast allen Studien erfolgte die Detektion durch Epi- oder konfokale Fluoreszenzmikroskopie. Eine automatisierte Technik zur Detektion und segregierten Analyse von mikrobiellen Populationen nach der Fluorochromierung stellt die Durchflußzytometrie dar.

Die Durchflußzytometrie ist eine Meßmethode, bei der Fluoreszenz- und Streulichtsignale von einzelnen Zellen detektiert werden, während sie durch den Fokus einer Lichtquelle treten. Zellen einer Suspension werden in einer Hüllstromkammer hydrodynamisch fokussiert, so daß sie sich, ähnlich wie Perlen auf einer Kette, in einem Flüssigkeitsstrahl anordnen. An dem Schnittpunkt von Lichtstrahl und Flüssigkeitsstrahl sind Detektorsysteme installiert, die Fluoreszenz- und Streulichtsignale von jeder Zelle messen. Während das Vorwärtsstreulicht (FSC) mit der Größe der Partikel, das Seitwärtsstreulicht mit der granulären Struktur der gemessenen Zelle korreliert, kann durch die Fluoreszenz-emissionen der Gehalt an fluoreszierendem Farbstoff in oder an der Zelle gemessen werden. Dabei sind zelleigene Pigmente (z.B. Chlorophylle, Carotinoide, Phycobiline), die eine meßbare Eigenfluoreszenz der Zelle verursachen können, bei Bakterien selten vorhanden. Vielmehr sind die geringen Signalstärken, die durch die minimale Größe und Menge an Zellinhaltsstoff entstehen, ein meßtechnisches Problem. Bei stöchiometrischer Bindung von zugesetztem Farbstoff an Zellbestandteile wie DNS, RNS, Proteine, Speicherstoffe und Membranen ist eine Quantifizierung der Fluoreszenz und somit auch der Zellbestandteile pro Zelle möglich. Der Vorteil der Methode gegenüber integralen Meßverfahren besteht darin, daß verschiedene Zellzustände detektiert werden können, so daß eine Population in Subpopulationen differenziert werden kann.

Die ersten Durchflußzytometer wurden für eukaryontische Zellen in der Tumorbilogie entwickelt. Seit den achtziger Jahren, mit Verbesserung der Geräte und Technik, wird diese Methode in allen Feldern der Mikrobiologie verstärkt eingesetzt (Hadley et al., 1985; Shapiro, 1990; Edward et al., 1992; Fouchet et al., 1993). Erste Messung an bzw. Anwendungen auf Bakterien (Paau et al., 1977; Hutter und Eipel, 1978; Fazel-Madjlessi und Baily, 1979; Steen und Boye, 1980) und Hefen (Hutter und Eipel, 1979) gelangen am

Ende der 70er Jahre. Die meisten Studien bei der durchflußzytometrischen Analyse von Bakterien liegen zum Zellzyklus vor. Neben den zytoplasmatischen Zellkomponenten stellt das bakterielle Genom das wichtigste Zellkompartiment zum Monitoring der Vermehrungsdynamik dar. Bakterien besitzen ein zirkulär geschlossenes DNS-Molekül, das als Chromosomenäquivalent bezeichnet wird, sowie teilweise kleinere extrachromosomale DNS-Moleküle (Plasmide). Durch die Fluorochromierung der DNS mit spezifischen Farbstoffen kann der DNS-Gehalt jeder Zelle quantifiziert werden. Zelldifferenzierung sowie Zellzyklus einer wachsenden Population und somit die Proliferationsaktivität der Zellen können analysiert werden. Beim Wachstum einer Bakterienreinkultur ist eine Differenzierung in unterschiedliche Subpopulationen mit verschiedenen DNS-Gehalten möglich. Die meisten der Zellzyklusanalysen sowie die Reaktion der Kultur auf Zusatz von antimikrobiellen Wirkstoffen liegen für *Escherichia coli* (Steen und Boye, 1980; Steen et al., 1981; Skarstad et al., 1983; Skarstad und Boye, 1993; Christensen et al., 1993; Monfort und Baleux, 1996), für rekombinante Zellen von *Escherichia coli* (Fouchet et al., 1994), für Zellen von *Acinetobacter sp.* sowie *Pseudomonas sp.* (Christensen et al., 1993) und marine Prokaryonten (Robertson und Button, 1989; Marie et al., 1996) vor.

Bisher wurden 20 meist klinisch relevante Bakterienarten mit Hilfe der Antikörpertechnik und durchflußzytometrischer Detektion identifiziert (Übersicht: Fouchet et al., 1993; Shapiro, 1995). In jüngerer Zeit werden bei Identifizierungsexperimenten die Kombination von Durchflußzytometrie nach *in situ*-Hybridisierung von Bakterien mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden genutzt, wodurch die aufwendige Herstellung der spezifischen Antikörper entfällt. Außerdem muß bei Bakterien in nativen Biozöosen infolge der sich stetig ändernden Mikroumweltbedingungen von einer instabilen bzw. dynamischen Antigenexpression ausgegangen werden (Porter et al., 1995), was die Wahl der antigenen Determinate erschwert (Porter et al., 1996, 1997). Durchflußzytometrische Analysen von Biozöosen nach *in situ*-Hybridisierungen ermöglichen eine differenzierte Populationsanalyse von Bakterien (Amann et al., 1990a; Edwards et al., 1994; Wallner et al., 1995, 1996; Porter et al., 1996; Thomas et al., 1997), Hefen (Bertin et al., 1990) und Phytoplankton (Simon et al., 1995), zumal die taxonomische Ebene des Nachweises durch den Experimentator bestimmt werden kann. Die relative Quantifizierung der Sonden-Fluoreszenz (rRNS-Gehalt) kann außerdem zur Charakterisierung der Populationsdynamik genutzt werden (Wallner et al., 1993; Fouchet et al., 1994).

Ziel dieser Arbeit ist es, das Verhalten von Mono- und insbesondere von Mischkulturen während des Abbaus von Schadstoffen zu charakterisieren. Dabei soll die Wachstums- und Vermehrungsdynamik von Reinkulturen während der Detoxifikation von Xenobiotika beschrieben werden. Bei Abbauprozessen von Schadstoffen mit Mischungen aus den Reinkulturen soll nach populationsdynamischen Beeinflussungen und Veränderungen gefragt werden.

Dazu ist in dieser Arbeit ein Modellsystem aus zwei Mikroorganismen und zwei Substraten gewählt worden, wobei die Einschränkung der Freiheitsgrade auf ein zweiteiliges System als sinnvolle Voraussetzung für die Erkennung von mikrobiellen Verhaltensmustern angesehen wurde. Als Mikroorganismen wurden zwei Stämme ausgewählt, *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V und *Ralstonia eutropha* JMP134, die in den Ökosystemen Wasser und Boden eine große Verbreitung haben. Ein weiterer Grund für diese Auswahl war die metabolische Versatilität der beiden Stämme für Alkane, Aromaten und andere Xenobiotika (Kleber et al., 1973; Pemberton et al., 1979; Don und Pemberton, 1981, 1985; Borneleit et al., 1988; Pieper et al., 1988, 1989; Towner et al., 1991; Clément et al., 1995; Müller und Babel, 1995). Beide Stämme sind auf ein sich überschneidendes Substratspektrum spezialisiert, daneben existieren aber auch spezifische Substrate, die nur von jeweils einem der beiden Stämme produktiv verwertet werden können.

Für die Experimente wurden zwei Substrate gewählt, Acetat und Phenol, die als Modellsubstanzen für Alkane und Aromaten stehen sollen. Acetat ist eines der Produkte, die bei der β -Oxidation von Fettsäuren bzw. n-Alkanen entstehen, während Phenol nach Hydroxylierung eine Vorstufe zu Brenzcatechin darstellt, einer zentralen Substanz in konvergenten mikrobiellen Abbauwegen von Aromaten. Sowohl *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V als auch *Ralstonia eutropha* JMP134 können Acetat und Phenol zur Vermehrung und zum Wachstum nutzen, was in Monokulturexperimenten und in Mischkulturexperimenten beschrieben wird.

Genotypische Unterschiede beim Wachstum von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V und auch von *Ralstonia eutropha* JMP134, die durch modifizierte Abbauwege und unterschiedliche Geschwindigkeiten bei der Substratkonvertierung bedingt sind, sollen durch Fluoreszenzmarkierungen einzelner Zellkompartimente und Detektion veränderter Biosignale während des Wachstums erfaßt werden. Dazu wurden mit den Monokulturen *batch*-Kultivierungen mit Acetat und Phenol durchgeführt. Für differenzierte Populationsanalysen wurden definiertere Kultivierungsbedingungen mit dem Substrat Phenol durch unterschiedliche kontinuierliche Verfahren im Chemostaten getestet.

Zur Beschreibung der Vermehrungsdynamik bei den unterschiedlichen Kultivierungen wurde die Dynamik der genomischen Komponente durch spezifische Fluorochromierung mit einem DNS-Farbstoff und anschließender durchflußzytometrischer Quantifizierung untersucht. Zur Identifizierung der beiden Arten bei den Kultivierungen wurde die *in situ*-Hybridisierung mit spezifischen Oligonukleotidsonden eingesetzt. Die durchflußzytometrische Messung wurde neben der Identifizierung auch zur Quantifizierung des Ribosomengehaltes eingesetzt, da die Dynamik der Ribosomenanzahl als Maß für eine Proteinbiosynthesekapazität bei der Detoxifikation von Phenol bei unterschiedlichen Wachstumsraten charakterisiert werden sollte. Für den Stamm *Ralstonia eutropha* JMP134 ist mit Hilfe dieser Techniken nach dem Einfluß steigender Konzentrationen von Phenol auf den rRNS-Gehalt und das Proliferationsverhalten der Zellen zu fragen. Außerdem soll der Einfluß einer zusätzlichen zweiten Energiequelle bei einer Kultivierung mit Phenol auf die genannten zellulären Parameter beschrieben werden.

Neben diesen Experimenten mit Monokulturen soll nach der gegenseitigen Beeinflussung beider Stämme in Mischkulturen gefragt werden. Das ökosozioökologische Verhalten der beiden Mikroorganismen im Chemostaten soll mit Hilfe durchflußzytometrischer Fluoreszenzmessung charakterisiert werden. Dabei steht die Identifizierung und Bestimmung von Häufigkeitsverteilungen der beiden Populationen während der Detoxifikation von Phenol im Vordergrund, während nach Auswirkungen auf die zellulären Dynamik - am Beispiel des DNS- und rRNS-Gehaltes - gefragt wird. Parallel zu den durchflußzytometrisch ermittelten Häufigkeitsverteilungen wird das Populationsverhalten im Chemostaten mit mathematischen Simulationen verglichen. Eine Eignung der angewandten Techniken für ein Monitoring von bakteriellen Lebensstrategien bei biotechnologischer Fragestellung wird anhand der Ergebnisse dargestellt und diskutiert.

2. Material und Methoden

2.1 Mikroorganismen

Für die modellhaften Untersuchungen wurden *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V (Kleber et al., 1973) und *Ralstonia eutropha* JMP134 (Pemberton et al., 1979; Yabuuchi et al., 1995) für verschiedene Kultivierungsexperimente ausgewählt. Beide Spezies können Acetat und Phenol als Kohlenstoff- und Energiequelle zum Wachstum und zur Vermehrung nutzen. Neben der unterschiedlichen taxonomischen Gruppenzugehörigkeit, *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V gehört zur γ -Gruppe, *Ralstonia eutropha* JMP134 zur β -Gruppe der Proteobakterien, unterscheiden sich die beiden Stämme im Metabolismus und der Verwertungsgeschwindigkeit von aromatischen und nicht-aromatischen Substraten. Weitere Unterschiede finden sich im Substratspektrum.

Alle mikrobiologischen Arbeiten fanden unter sterilen Bedingung statt, das heißt alle Geräte zur Kultivierung inklusive Zubehör und Nährmedien wurden vor dem Animpfen 20 min bei 121 °C und 1013 hPa Überdruck autoklaviert.

2.1.1 *batch*-Kultivierungen mit Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle

Beide Stämme wurden in Mono- und Mischkultur in 150 ml Kulturflüssigkeit mit Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle in 500 ml Erlenmeyerkolben bei 30 °C kultiviert (Inkubationsschüttler SM/TH25, BÜHLER). Ein Standardsalznährmedium (Müller und Babel, 1986) mit 310 mg/l Phosphatpuffer (pH 7,0) und 0,1 % Hefeextrakt wurde eingesetzt. Der Kultur wurden 0,5 % Natriumacetat als Kohlenstoff- und Energiequelle zugesetzt. Das Animpfen der Hauptkulturen wurde mit 5-10 ml Kulturflüssigkeit (Inokulum) aus einer Vorkultur unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.1.2 Kultivierungen mit Phenol als Kohlenstoff- und Energiequelle

Weitere Experimente mit Phenol als Kohlenstoff- und Energiequelle wurden in diskontinuierlichen und kontinuierlichen Kultivierungen durchgeführt. Die Phenolkonzentration wurde mittels HPLC-Analytik (Säule: Nucleosil RP18; SPD-6AV, SHIMADZU) bestimmt (Müller und Babel, 1996).

2.1.2.1 *batch*-Kultivierung

Mit Reinkulturen aus *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V und *Ralstonia eutropha* JMP134 wurden *batch*-Versuche mit 400 ml Kulturflüssigkeit in 1 l Erlenmeyerkolben bei 30 °C durchgeführt. Ein Standardnährsalzmedium mit 310 mg/l Phosphatpuffer (pH 7,0), 0,01 % Hefeextrakt und 150 mg/l Phenol als Kohlenstoff- und Energiequelle wurde eingesetzt. Angeimpft wurde aus einer Vorkultur mit 30 ml Inokulum.

2.1.2.2 *transient-state*-Kultivierung im Chemostaten

In einem Laborfermenter der Firma BRAUN (Biostat ED, ER2), der als Chemostat benutzt wurde, wurden die Stämme *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V und *Ralstonia eutropha* JMP134 in einem Arbeitsvolumen von 1,0 l bzw. 1,5 l kontinuierlich in Rein- und Mischkultur kultiviert. Die Temperatur wurde konstant auf 30 °C gehalten, der pH-Wert wurde auf 7,0 geregelt (automatische Säuren- und Basentitration mit 1 M HCl oder 1 M NaOH; pH-Meßsonde: INGOLD). Der in der Kulturflüssigkeit gelöste Sauerstoffanteil wurde auf 60 % Sättigung gehalten, wobei die Regelung über die Drehzahlgeschwindigkeit des Rührers und den externen Sauerstoffeintrag erfolgte. Die Substratkonzentration im Zuflußgefäß S_0 betrug 1 g/l Phenol (Standardnährsalzlösung mit 310 mg/l Phosphat, pH 7,0). Aus einer Vorkultur (*batch*-Kultivierung mit 100 mg/l Phenol) wurde der Chemostat beimpft. Nach einer Anwuchsphase unter *batch*-Bedingungen mit einer initialen Phenolkonzentration von 100 mg/l konnte ein kontinuierlicher Substratzufluß mit einer Durchflußrate von $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$ etabliert werden. Ein Fließgleichgewicht (*steady state*) stellte sich ein. Die Durchflußrate entspricht in diesem Zustand der spezifischen Wachstumsrate (μ) der kultivierten Bakterien. Für beide Bakterienarten besonders aber für *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V traten Probleme bei der Kultivierung durch vermehrte Schaumbildung auf. Durch den Zusatz von Antifoam 289 (SIGMA) zum Zuflußgefäß (Verdünnung 1:4000 bei 20 l Gefäßvolumen) konnten die Probleme bezüglich der Schaumbildung minimiert werden.

Nach Erreichen des stationären Zustandes (*steady state*) wurde für die Reinkulturen ein Geschwindigkeitsgradient angelegt. In bestimmten zeitlichen Intervallen ($\Delta t = 1\text{-}2 \text{ h}$) wurde die Durchflußrate in kleinen Schritten ($\Delta D = 0,01\text{-}0,025 \text{ h}^{-1}$) erhöht. Bei dieser *transient-state*-Technik bildet sich für jedes Intervall ein quasi-stationärer Zustand aus, der nur minimale Abweichung von den entsprechenden *steady state* Bedingungen zeigt (Müller et al., 1995). Das *transient-state*-Regime wurde bis zum Auswaschprozeß der Bakterienkultur benutzt. Für jeden quasi-stationären Zustand kann die Durchflußrate mit der spezifischen

Wachstumsrate der Bakterien gleichgesetzt werden. Jeder dieser Zustände wurde beprobt. Bei den Versuchen mit Mischkulturen aus beiden Bakterienarten wurde ein Teil des Kulturvolumens aus den Chemostaten abgelassen und unter Beibehaltung des ursprünglichen Volumens mit der Kulturflüssigkeit einer Vorkultur (*batch*-Kultivierung mit 100 mg/l Phenol) des anderen Stammes angeimpft.

2.1.2.3 Zusatz einer zweiten Energiequelle: Formiat-Gradient

In einem Fermentations-Kalorimeter (BERGHOF) wurde *Ralstonia eutropha* JMP134 kontinuierlich mit Phenol als Kohlenstoff- und Energiequelle ($S_0 = 1 \text{ g/l}$; $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$) kultiviert. Als zusätzliche zweite Energiequelle wurde Natrium-Formiat graduell dem System appliziert. Bei einem Arbeitsvolumen von 1,8 l und den beschriebenen Kultivierungsbedingungen (2.1.2.2) wurde ein Formiat-Gradient (Zulauf: 0,2 g/l bis 7 g/l) über eine Pumpen- und Waagensteuerung etabliert (Zulaufgefäß Formiat: $S_0 = 15,3 \text{ g/l}$; weitere Versuchsdetails bei Maskow und Babel, 1997). Verschiedene Zustände wurden beprobt. Bei dem Experiment wurde die Wärmetönung der Bakterienkultur im Chemostaten detektiert. Gemessen wurde die bakteriell produziert Wärme im System während der gesamten Kultivierungsdauer von 60 Stunden in Kelvin (K). Bei der Substratverwertung entsteht chemisch nutzbare Energie, wovon ein gewisser Teil als Wärme für die Bakterien verloren geht. Sie ist ein summarisches Maß für den Stoffwechsel bei der Substratverwertung, der zum Wachstum und zur Vermehrung der Kultur führt.

2.1.2.4 Substrathemmung mit Nutristat-Experimenten

Bei den Nutristat-Experimenten handelt es sich um eine kontinuierliche Kultivierungsmethode zur Konzentrationsregelung des Substrates, mit der die Kinetik einer Substrathemmung untersucht werden kann. Eine hemmende, konstante Konzentration der Kohlenstoff- und Energiequelle wird im Kultivierungsgefäß reguliert, zu der sich eine spezifische Wachstumsrate der Bakterien einstellen kann.

Die Substrathemmung durch Phenol wurde bei *Ralstonia eutropha* JMP134 getestet, indem eine bestimmte Konzentration von Phenol im Kulturgefäß des Nutristaten als Überschusskonzentration konstant gehalten wurde. Der Einfluß steigender Phenolkonzentrationen von 0 mg/l bis maximal 560 mg/l auf die spezifische Wachstumsrate von *Ralstonia eutropha* JMP134 wurde untersucht.

Die Kultivierungen wurden in einem 1,8 l Bioreaktor (LF2, CSAV, Tschechische Republik) mit Steuereinheit durchgeführt. Die Wachstumsbedingungen von 30 °C und pH 6,8 sowie mindestens 30 %ige Sauerstoffsättigung wurden konstant gehalten. Die Anzucht des Stammes erfolgte in dem Kulturgefäß mit 0,5 % Pyruvat (Standardnährsalzmedium, 155 mg/l Phosphat, pH 7,0) als Kohlenstoff- und Energiequelle unter *batch*-Bedingungen, bevor kontinuierliche Kultivierungsbedingungen mit Phenol als Kohlenstoff- und Energiequelle etabliert wurden ($S_0 = 3 \text{ g/l}$, pH 6,8). Mit einem Geschwindigkeitsgradienten (*transient state*) wurde die Durchflußrate auf $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$ und somit die Wachstumsrate der Bakterien erhöht, bevor das Nutristat-Experiment gestartet wurde.

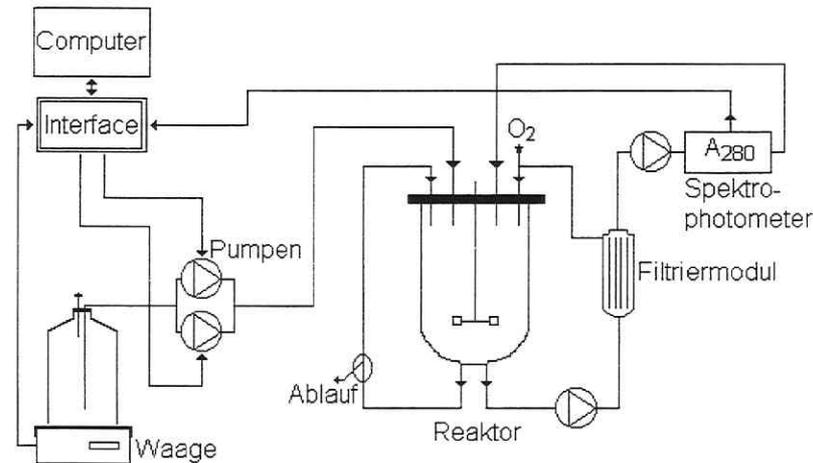


Abb. 1: Schema des experimentellen Aufbaus (detailliertere Beschreibung bei Müller et al., 1997).

Die Kulturflüssigkeit wurde in einer Außenschleife (Pumpe: INFORS) filtriert (Faserschläuche, 0,2 µm Polysulfon SPS 9002-4; FRESSENIUS). Von dem zellfreien Filtrat wurde die Phenolkonzentration durch ein photometrisches Modul (Extinktionsmessung bei 280 nm, Uvichord II, PHARMACIA) parallel zum laufenden Prozeß (*on line*, mit einer Zeitverzögerung von 3 min) kontrolliert. Die Steuerung der Dosierpumpe für das Substrat erfolgte über einen Computer, der mit einer Waage verbunden war, auf der das Vorratsgefäß mit $S_0 = 3 \text{ g/l}$ Phenol stand. Aus dem Substratverbrauch der letzten 15-20 min wurde ein künftiger Verbrauch berechnet, der dem System zudosiert wurde. Eine konstante Phenolkonzentration konnte im Nutristaten etabliert werden. 48 Stunden nach Etablierung eines stabilen Zustandes für jede vorgegebene Phenolkonzentration (0, 90, 200, 430 und 560 mg/l) im Kulturgefäß wurde das System beprobt.

2.1.3 Bestimmung der Biomassekonzentration und Zellfixierung

Die Biomassekonzentration der Bakterien wurde durch die Messung der optischen Dichte bei 700 nm (Glasküvette, 10 mm Schichtdicke) im Photometer (Ultraspec III, PHARMACIA und U-2000, HITACHI) bestimmt.

Für die *batch*-Experimente mit Phenol als Kohlenstoff- und Energiequelle wurde zusätzlich die Biotrockenmasse bestimmt. Die Massendifferenz aus dem Zellpellet von 3 ml Kulturflüssigkeit (dreiminütige Zentrifugation bei 5000 g) vor und nach einer vierstündigen Trocknung bei 110 °C wurde für jede Probe ermittelt (Waage: RC 210 S-OD1, SATORIUS). Bei den Proben aus den Experimenten mit dem Substrat Phenol wurde die Kulturflüssigkeit entfernt (dreiminütige Zentrifugation: 8000xg) und das Zellpellet in 1 ml 10 %iger NaN₃-Lösung konserviert. Die konservierte Probe konnte mindestens sechs Monate bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Bei den Experimenten mit Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle wurde das Fixierungsprotokoll von Amann et al. (1990b) benutzt. 10⁸ Zellen/ml wurden nach einer 30 minütigen Inkubation mit 3 %igem Paraformaldehyd in Natriumphosphatpuffer (PBS: 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ [pH 7,0], 130 mM NaCl) bei 4 °C in einer 50 % Ethanol/PBS-Lösung bei -20 °C gelagert. Die fixierten Proben konnten über ein Jahr gelagert werden, ohne daß Veränderungen der Zellen festgestellt wurden. Für beide Bakterienstämme ergaben sich trotz der unterschiedlichen Fixierungsarten keine Unterschiede nach der Färbung und anschließender zytometrischer Messung.

2.2 Fluoreszenzfarbstoffe und Fluoreszenzfärbung

Die Zellen aus den Kultivierungsexperimenten wurden vor der durchflußzytometrischen Messung mit spezifischen Färbeprotokollen fluorochromiert. Zur DNS-Färbung wurde DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) benutzt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff bildet mit doppelsträngiger DNS fluoreszierende Komplexe und besitzt eine hohe Bindungsaffinität zu AT-reichen Regionen (Williamson und Fennell, 1975). Fluorescein (Fluos), CY3 und CY3.5 markierte Oligonukleotidsonden (gekoppelt über eine Aminobrücke am 5'-Ende) wurden zur Darstellung der rRNS eingesetzt.

In der Tab. 1 sind die benutzten Farbstoffe mit den spektralen Daten der maximalen Excitation und Emission sowie die benutzten Laserlinien zur Anregung der gefärbten Zellen aufgeführt.

Tab. 1: Spektrale Daten der Fluoreszenzfarbstoffe.

Farbstoff	max. Excitation [nm]	max. Emission [nm]	Anregungslinie des Lasers [nm]
DAPI ¹	345	455	333,6-363,8
Fluorescein ²	494	518	488
CY3 ³	552	565	514/528
CY3.5 ³	581	596	528

¹ SERVA, ² CARL ROTH GmbH, ³ AMERSHAM INTERNATIONAL PLC.

Fluoreszenzfarbstoffe sind in der Regel aromatische Verbindungen mit delokalisierten π -Elektronen. Durch Absorption von Photonen werden die Elektronen in ein höheres Energieniveau überführt. Auf verschiedene Weise kann das Molekül aus diesem angeregten Zustand wieder in den Grundzustand zurückkehren. Eine der möglichen Energieübergänge ist die Fluoreszenz. Da diese in vielen Stufen mit fluoreszenzlosen Übergängen erfolgt, ist das emittierte Fluoreszenzlicht energieärmer (langwelliger) als die absorbierte Strahlung. Diese Zunahme in der Wellenlänge wird als Stokesche Verschiebung bezeichnet. Durch geeignete optische Filter ist es möglich, das Anregungslicht von dem emittierten Licht zu trennen und ungestört vom Hintergrund zu detektieren. Eine umfassende Übersicht über Fluoreszenzfarbstoffe sowie deren Eigenschaften und Anwendungen bietet Haugland (1996).

2.2.1 rRNS-Färbung

Zur Fluorochromierung der bakteriellen rRNS wurden *in situ*-Hybridisierungen mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden benutzt, die gegen Sequenzen der 16S bzw. 23S rRNS gerichtet sind.

2.2.1.1 Verwendete Oligonukleotidsonden

Tab. 2 zeigt die benutzten Oligonukleotidsonden, die zur Detektion der Bakterien eingesetzt wurden. Die beschriebene Spezifität der Sondensequenzen wurde mit spezieller Software

der Datenbank für ribosomale Sequenzen in Illinois (Ribosomales Daten Projekt RDP; Maidak et al., 1996) regelmäßig kontrolliert.

Tab. 2: Oligonukleotidsonden.

Sonde ¹	Sequenz 5'-3'	Spezifität	% FA ²	Literatur
EUB₃₃₈ : S-D-Bact-0338-a-A-18	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	<i>Bacteria</i>	0	Amann et al., 1990a
EUB₉₂₇ : S-D-Bact-0927-a-A-18	CACCGCTTGTGCGGGCCC	<i>Bacteria</i>	0	Giovannoni et al., 1990
NON : S-D-NBact-0338-a-S-18	ACTCCTACGGGAGGCAGC	Negativ-Kontrolle	0	Wallner et al., 1993
BETA : L-Sc-bProt-1227-a-A-17	GCCTTCCCACTTCGTTT	β - <i>Proteobakterien</i>	35	Manz et al., 1992
GAM : L-Sc-gProt-1027-a-A-17	GCCTTCCACATCGTTT	γ - <i>Proteobakterien</i>	35	Manz et al., 1992
ACA : S-G-Acin-0652-a-A-18	ATCCTCTCCCATACTCTA	Gattung <i>Acinetobacter</i>	35	Wagner et al., 1994
REU : S-Ss-Alc-0647-a-A-18	CTGACACTCTAGCCTT	<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	10	Manz, 1994 ³

¹ benutzter Sondenname und Standardisierung (Alm et al., 1997)

² Prozent (v/v) Formamid (FA) im Hybridisierungspuffer

³ Weitere Beschreibung bei Rothemund et al., (1996)

Markierung der Oligonukleotidsonden am 5'-Ende mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fluorescein (Fluos), CY3 und CY3.5 (CARL ROTH GmbH und MWG-BIOTECH).

Die stammspezifische Sonde REU, die für *Ralstonia eutropha* JMP134 entworfen wurde, hybridisiert und detektiert auch einen von Gerner-Schmidt et al. (1994) beschriebenen Stamm als Nicht-Zielzelle. Die kommerziell erworbenen Oligonukleotidsonden wurden in 50 ng/ μ l Aliquots aufgeteilt und bei einer Temperatur von -20 °C gelagert.

2.2.1.2 *In situ*-Hybridisierung auf Objektträgern

Ein Aliquot von 1-3 μ l (ca. 10^6 Bakterien) der konservierten Zellen wurde auf eines der sechs Felder eines beschichteten Objektträgers (PAUL MARIENFELDER KG) zur Trocknung aufgetragen. Nach der Auftrocknung der Zellen wurde der Objektträger in einer aufsteigenden Ethanolreihe von 50 %, 80 %, und 96 % für jeweils drei Minuten dehydratisiert. Nach der Trocknung erfolgte pro Feld die Zugabe von 8 μ l vortemperiertem Hybridisierungspuffer (10 mM Tris/HCl [pH 7,4], 0,9 M NaCl, 0,1 % SDS) und 1 μ l Oligonukleotidsonde (aus 50 ng/ μ l Sondenstammlösung). Zur Erhöhung der Bindungsstringenz für entsprechende Oligonukleotidsonden wurde Formamid zum Hybridisierungspuffer (Tab. 2) zugesetzt. Eine unmarkierte Kompetitorsonde (BETA⁻ bzw. GAM) wurde zusätzlich benutzt, um eine bessere Diskriminierung bei den gruppenspezifischen Sonden zu

erreichen (Wallner et al., 1993). Der Objektträger wurde in einer Inkubationskammer (50 ml Reaktionsgefäß, GREINER) mit gesättigter Atmosphäre des Hybridisierungspuffers (getränktes Zellstoffblatt) verschlossen. Im Hybridisierungssofen (Hybaid Mini10, MWG-BIOTECH) erfolgte die Inkubation bei 48 °C für 1,5 h. Nach der Hybridisierung schloß sich ein 15 minütiger Waschschrift des Objektträgers mit einem Waschpuffer (10 mM Tris/HCl [pH 7,4], 0,9 M NaCl, 0,1 % SDS) bei gleicher Temperatur an. Nach Hybridisierungen mit erhöhter Stringenz, d. h. Zusatz bis zu 35 % Formamid im Hybridisierungspuffer, wurde die NaCl-Konzentration im Waschpuffer auf 0,04 M gesenkt. Nach der Trocknung des Präparats erfolgte die Einbettung mit CitiFluor (CITIFLUOR LDT.), einem Ausbleichschutz für die Fluoreszenzfarbstoffe sowie die fluoreszenzmikroskopische Analyse.

2.2.1.3 *In situ*-Hybridisierung in Suspension

Ein Aliquot von 2-4 µl (ca. 10^6 Bakterien) der konservierten Zellen wurde in 50 µl Hybridisierungspuffer (10 mM Tris/HCl [pH 7,4], 0,9 M NaCl, 0,1 % SDS) unter Zusatz von 1,5 ng/µl fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden für 2 h bei 48 °C hybridisiert. Zur Erhöhung der Stringenz wurde Formamid zum Hybridisierungspuffer (Tab. 2) zugesetzt. Unmarkierte Kompetitorsonden wurden zusätzlich eingesetzt, um falsch-positive Signale bei der Anwendung der gruppenspezifischen Sonden (BETA und GAM) zu minimieren (Wallner et al., 1993). Nach 2 h wurde der Hybridisierungspuffer entfernt (dreiminütige Zentrifugation bei 8000 g). Die Zellen für die durchfußzytometrische Messung wurden in 1 ml gekühlter PBS-Lösung (10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ [pH 8,4], 130 mM NaCl) resuspendiert und bis zur Messung bei 4 °C gelagert.

2.2.2 DNS-Färbung

Zur DNS-Färbung der fixierten Bakterien wurden $3 \cdot 10^8$ Zellen/ml mit einer Detergenzlösung aus 0,1 M Citrat und 0,5 % Tween 20 für 10 Minuten vorbehandelt. Danach folgte die Färbung mit 0,23 µM DAPI-Lösung (0,23 µM 4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid in 0,4 M Di-Natriumhydrogen-Phosphat [pH 7,2], nach Otto (1994) modifiziertes Protokoll für diese beiden Bakterienstämme).

2.3 Fluoreszenzmikroskopie und -spektroskopie

Fluoreszenz- und Phasenkontrastbilder von gefärbten bakteriellen Objekten wurden mit einem Epi-Fluoreszenzmikroskop bei 1000facher Vergrößerung kontrolliert (BH-2, OLYMPUS).

Tab. 3: Filtersätze für die Fluoreszenzmikroskopie.

Anregungsfilter	Farbteiler	Emissionsfilter
UG1	FT400	LP420
BP490	FT505	LP515
BP545	FT570	LP590

UG: Ultraviolettglas FT: Farbteiler BP: Bandpaßfilter LP: Langpaßfilter

In der Tab. 3 sind die benutzten Filtersätze zur Fluoreszenzanregung und -detektion dargestellt. Zur Dokumentation wurden Fotografien (OM4Ti, OLYMPUS) von den Phasenkontrast- und Fluoreszenzbildern gemacht (Diapositiv, Gold 200-5 KODAK). Videoausdrucke (MITSUBISHI) wurden nach Fluoreszenzmikroskopie (Axioplan, Filterset 09, ZEISS) mit CCD-Kamera (DXC930P, SONY) und Bildauswertung (Optimas 4.2) angefertigt.

Fluoreszenzspektroskopische Analysen von Fluorescein und CY3 markierten Oligonukleotidsonden (5 µl Sonde in PBS-Puffer, pH 8,4) wurden mit einem Fluoreszenzspektrometer (F-4500, HITACHI) aufgenommen. Für den Farbstoff CY3 wurde das Emissionsspektrum im Bereich von 490-600 nm bei Excitationswellenlängen von 488, 514, 528 und 550 nm aufgenommen.

2.4 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie stellt ein Meßverfahren dar, das die mehrparametrische Analyse einer großen Anzahl von Einzelzellen in kurzer Zeit ermöglicht. Das Prinzip der Messung beruht auf der hydrodynamischen Fokussierung der zu messenden Zellen durch einen Hüllstrom in einer Durchflußkammer. In dem fokussierten Probenstrom liegen die Zellen vereinzelt vor und durchfließen perlenkettenartig den Fokus einer Lichtquelle. Dabei können Streulicht- und Fluoreszenzsignale von jeder Zelle detektiert werden.

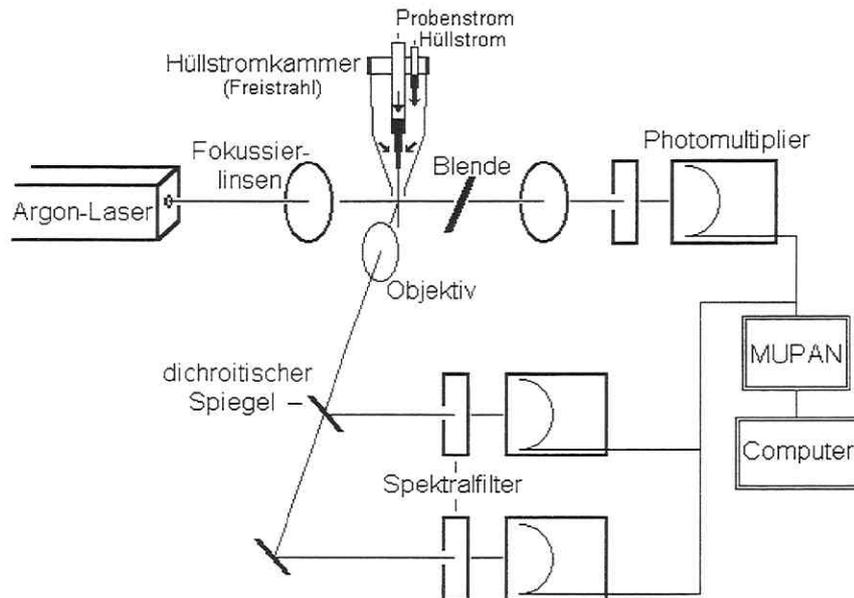


Abb. 2: Schematischer Aufbau eines Durchflußzytometers.

Ein modulares Durchflußzytometer, ausgestattet mit einer Freistrahlkammer und einem Argon-Ionen-Laser (Innova 304, COHERENT) als Lichtquelle, wurde für die zytometrischen Messungen benutzt (Aufbau wie in Abb. 2). Der Argon-Ionen-Laserstrahl wird durch zwei gekreuzte Zylinderlinsen (Brennweiten $f = 45 \text{ mm}$ und 100 mm) elliptisch fokussiert ($21 \mu\text{m} \times 48 \mu\text{m}$). Durch diesen Fokus fließen die Zellen mit einer Geschwindigkeit von 10 m/s , nachdem sie aus der Freistrahlkammer mit einem Kapillardurchmesser von $100 \mu\text{m}$ austreten. In dem Hüllstrom wird der Probenstrom auf einen Durchmesser von $< 10 \mu\text{m}$ fokussiert.

Für Versuche mit unterschiedlichen Farbstoffen wurden die verschiedenen Linien des Argon-Ionen-Lasers (Tab. 1) benutzt. Vorwärtstreulicht (FSC) wurde im Winkel von $3,5\text{-}9,6^\circ$ detektiert. Zusätzlich konnten maximal zwei Fluoreszenzen (FL.1, 2) im 90° Winkel detektiert werden. Dies zeigt Tab. 4 mit den unterschiedlichen Konfigurationen des Systems. Die Lichtimpulse wurden mit einem Objektiv (40fache Vergrößerung, numerische Apertur: $0,4$; ZEISS) und Photomultipliern (Sekundärelektronenvervielfacher, SEV; R1923; HAMAMATSU) detektiert und signalproportional in eine elektrische Spannung (max. 5 V) gewandelt.

Tab. 4: Optische und elektrische Parameter des Zytometers.

Laserlinie [nm]	Leistung [mW]	Detektion	Filter ¹	Transmission ² [nm]
a) zweiparametrische Messung: Vorwärtsstreulicht (FSC) und Fluoreszenz (FL.)				
333,6-363,8	400	FSC	UG1	320-410
		blaue FL.	GG430	> 430
488	650	FSC	Neutralfilter	
		grüne FL.	OG510	> 500
514/528	1000/550	FSC	Neutralfilter	
		orange FL.	OG550	> 550
b) zweiparametrische Messung: zwei Fluoreszenzen (FL.1, 2)				
488	650	grüne FL.1	OG510, TK580	510-580
		orange-rote FL.2	TK580, OG590	> 590
514	650	grüne FL.1	OG550, TK580	550-580
		orange-rote FL.2	TK580, OG590	> 590
528	550	orange FL.1	OG550, TK580	550-580
		rote FL.2	TK580, RG610	> 610
c) dreiparametrische Messung: FSC und zwei Fluoreszenzen (FL.1, 2)				
UV+488	500	FSC	UG1	320-410
		blaue FL.1	GG430, TK460	430-460
		grüne FL.2	TK460, OG530	> 530

¹ benutzte Detektionsfilter vor den Photomultipliern: Grünglas (GG), Orangglas (OG), Rotglas (RG), ZEISS; Neutralfilter, Ultraviolettglas (UG) und dichroitische Spiegel (TK: Teilerkante; SPINDLER & HOYER)

² Transmissionsbereich der Filter

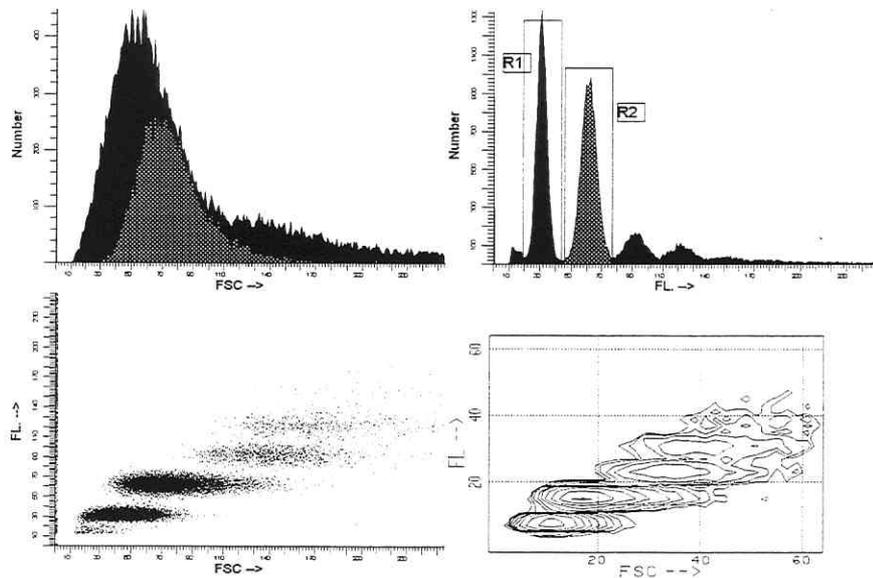
Hochspannungsbereich für die SEVs: FSC 4-6 V, FL. 8- 9,8 V

Bei linearer Verstärkung der Photomultiplier wurden 32.000 Zellen bei einer Durchflußmeßrate von 250-300 Zellen/s analysiert. Die in eine Spannung transformierten Signale wurden über einen Spitzenwertsignalhalter registriert. Wenn eine vorher definierte Signalthöhe eines Kanales (FSC, FL.1 oder FL.2) überschritten wurde (Triggerschwelle), kam es zum Auslesen der restlichen Signalkanäle. Dadurch wurde eine erste Selektion der Daten in Rauschen und positiven Signale (Bakterien) möglich. Die detektierten Signale

wurden im Listmode dargestellt (12 Bit A/D-Wandler: Klassifikation der Signalstärke in 4096 Kanäle) und gespeichert (Hardware: MUPAN). Eine Eichung und Standardisierung des Durchflußzytometers wurde mit 0,75 µm YellowGreen, 1,0 µm YellowOrange und 1,0 µm BrightBlue Fluoresbrite Microspheres (POLYSCIENCE) vorgenommen.

2.4.1 Auswertung der zytometrischen Daten

Für die Auswertung der Daten wurden die Software-Programme WinList 2.01 und IsoContour 3.2 (VERITY SOFTWARE HOUSE) benutzt. Mehrere Darstellungsarten einer Messung mit DAPI gefärbten Zellen von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V werden in Abb. 3 gezeigt.



	gemessene Zellen	in der Region markierte Zellen	prozentualer Anteil an allen Zellen	Mittelwert als Kanalzahl	Stdabw.	CV
R1	32.000	10.761	33,63	30,98	3,6	11,62
R2	32.000	12.346	38,56	61,66	5,17	8,39

Abb. 3: Verschiedene Darstellungsarten einer zweiparametrischen Messung (Fluoreszenz und FSC): DNS-Färbung von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V (stationäre Phase aus einer *batch*-Kultivierung). In der oberen Reihe sind die beiden gemessenen Parameter als Anzahl der Zellen gegenüber dem gemessenen Parameter dargestellt. In der unteren Reihe sind in zweiparametrischer Darstellung der *Dot-Plot* und *Contour-Plot* (Höhenliniendarstellung) gezeigt. Darunter ist die Statistik der Regionen R1 und R2 aufgeführt.

32.000 gemessene Ereignisse wurden in der zweiparametrischen Messung (FSC und blaue Fluoreszenz) abgespeichert. Grunddarstellung bei der Messung sind die einparametrischen Bilder von Fluoreszenz- und Streulichtsignalen, bei denen die Signalintensität (Kanalzahl) in Abhängigkeit von der Anzahl der gemessenen Bakterien dargestellt wird. Bei der zweiparametrischen Messung der *Acinetobacter*-Kultur erkennt man vier Subpopulationen der Zellprobe (Abb. 3).

In der Abbildung wird auch die Möglichkeit einer statistischen Auswertung gezeigt. Über jedes entstandene Signal (in der Regel Normalverteilungen) kann ein Fenster bzw. Region (R1 und R2) gesetzt werden. Die ausgewählten Regionen können farblich markiert werden, wobei die Markierung in jede Darstellungsart projiziert werden kann. Gleichzeitig ist eine statistische Auswertung der markierten Fläche möglich: Der absolute und der prozentuale Anteil der Zellen kann bestimmt werden (grau markierte Zellen: 38,56 % der *Acinetobacter*-Zellen besitzen einen doppelten DNS-Gehalt [Kanalmittelwerte: $\frac{1}{2} \cdot R2 = R1$] und sind etwas größer [FSC] als Zellen mit dem einfachen DNS-Gehalt). Die Signalstärke kann über den Kanalmittelwert klassifiziert werden. Bei der benutzten Software standen für Auflösung der detektierten Signale lineare Skalen von 64 bis 4096 Kanälen zur Verfügung. Für die durchgeführten Versuche wurde die Standardeinstellung von 256 Kanälen benutzt. Bei den ersten zytometrischen Messungen (*batch*-Versuche mit dem Substrat Acetat) war bedingt durch eine ältere Software (Consort 30, BECTON DICKINSON) nur eine Auflösungsbreite der Signale in 64 Kanälen möglich.

Da Proben eines Experimentes ohne Veränderung der Zytometereinstellungen gemessen wurden, resultierten relative Quantifizierungen der einzelnen Zellsignale. Gleichzeitig kann der Variationskoeffizient einer Messung (CV) berechnet werden. Bei den Eichungen des Gerätes mit den fluoreszierenden Eichpartikel ergaben sich Werte von 1-2 %. Bei den DNS-Färbungen lag der Variationskoeffizienten bei 8-15 %, bei den rRNS-Färbungen resultierten CV-Werte von 30-40 %.

Zur weiteren Visualisierung sind auch 3-dimensionale Darstellungen der gemessenen Daten möglich. In Abb. 4 entspricht die Höhe der Signalberge der Anzahl der gemessenen Zellen. Auch hier erkennt man die vier Subpopulationen der Zellen mit diskret verteilten Chromosomenäquivalenten.

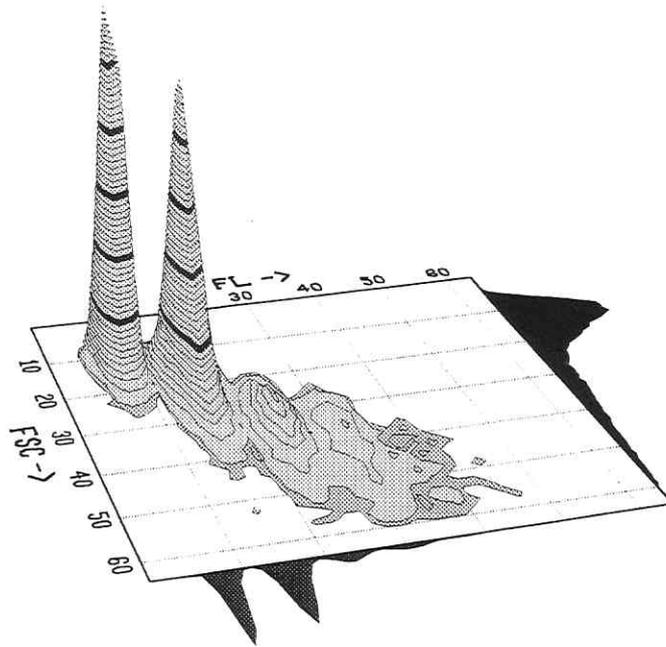


Abb. 4: 3-D-Darstellung der Messung aus Abb. 3; X-Achse: FSC, Y-Achse: FL. Die Anzahl der Bakterien ist als Z-Achse dargestellt.

2.4.2 Populationsmodelle

Zur Modellierung der Populationsdynamik der Mischkulturversuche wurde das Programm ISIM 2.06 (Snape et al., 1995) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V

3.1.1 Versuche mit Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle

Zellen von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V wurden während eines *batch*-Versuches mit 0,5 % Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle stündlich beprobt. Jede Probe wurde nach *in situ*-Hybridisierung mit einer fluorescein-markierten genusspezifischen Oligonukleotid-sonde (ACA-Fluos) durchflußzytometrisch gemessen.

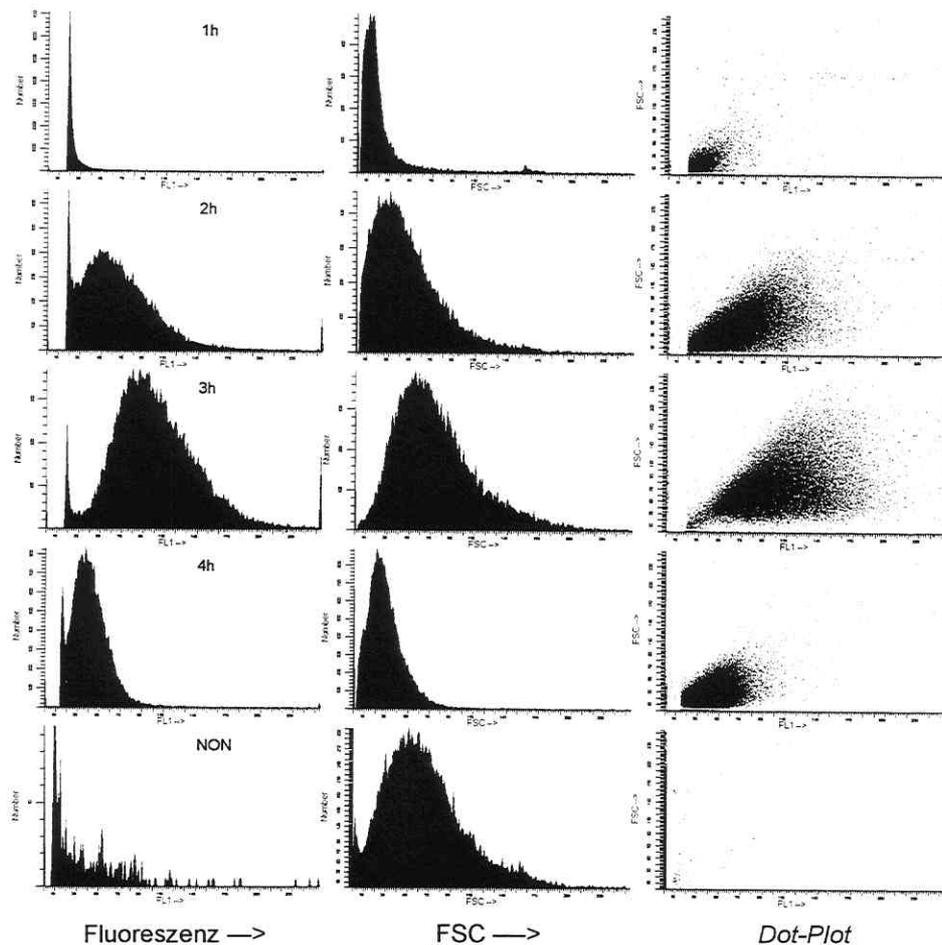


Abb. 5: Fluoreszenz-, FSC-Signal und *Dot-Plot* Bild (Abszisse: FL., Ordinate: FSC) der *Acinetobacter*-Proben (1-4h) aus einer *batch*-Kultivierung. *In situ*-Hybridisierungen der Kultur mit ACA-Fluos, Negativ-Kontrolle: Hybridisierung von Probe 3h mit NON-Fluos; Anregung: 488 nm bei 650 mW Leistung.

Abb. 5 zeigt, daß bei der Hybridisierung mit der genusspezifischen fluorescein-markierten Oligonukleotidsonde (ACA-Fluos) nur die Zellen der Proben 2h, 3h und 4h ein detektierbares Fluoreszenzsignal ergaben. Diese Proben spiegeln die exponentielle Wachstumsphase wider. Bei der Größenverteilung der Zellen (FSC-Signal) ergab sich das gleiche Bild. Die Zellen der 1h-Probe besaßen kein detektierbares Fluoreszenz-Signal, aber ein geringes, auflösbares FSC-Signal, das in der Nähe des elektronischen Rauschanteils lag und sich mit ihm überlagerte. Bei der Negativ-Kontrolle der Probe 3h, die mit der NON-Fluos Sonde hybridisiert wurde und für die keine Bindestelle in der rRNS existiert, zeigten 1,1 % der *Acinetobacter*-Zellen eine geringe unspezifische Fluoreszenz. Bei der Kontrollmessung (Negativ-Kontrolle) entsprach das FSC-Signal der Zellen dem Signal der gefärbten 3h-Probe. Die Variationskoeffizienten (CV-Werte) der Fluoreszenzsignale lagen bei 30-35 %, die der FSC-Signale bei 35-45 %.

3.1.1.1 Amplifikation des Fluoreszenzsignals

Bei der Verstärkung des detektierbaren Fluoreszenzsignals nach den Hybridisierungsexperimenten ergeben sich drei grundlegende Methoden. Zum einen können die Oligonukleotidsonden mit besseren Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden, die nach Lichtanregung eine höhere Fluoreszenz-Emission aufweisen. Zweitens kann die Markierungsdichte einer Sonde erhöht werden. Drittens können mehrere einfach markierte Sonden mit gleicher Spezifität eingesetzt werden.

Zur Mehrfach-Markierung von Oligonukleotidsonden mit Fluoreszenzfarbstoffen wurden keine Experimente gemacht. Wallner et al. (1993) beschreiben detailliert Versuche zur Erhöhung der Markierungsdichte einer Oligonukleotidsonde, die alle eine Erniedrigung der Bindungsspezifität der benutzten Sonden zur Folge hatten.

Die Fluoreszenzintensität eines Farbstoffes setzt sich aus dem Produkt von Quantenausbeute und dem molaren Extinktionskoeffizienten zusammen. Fluoreszenzfarbstoffe wie die Indocarbocyanine CY3 und CY3.5 besitzen eine höhere Quantenausbeute als Fluorescein (Wessendorf und Brelje, 1992; Produktinformation: AMERSHAM). Aus diesem Grund wurden CY3-markierte Sonden zur Signalamplifikation neben den fluorescein-markierten Sonden benutzt.

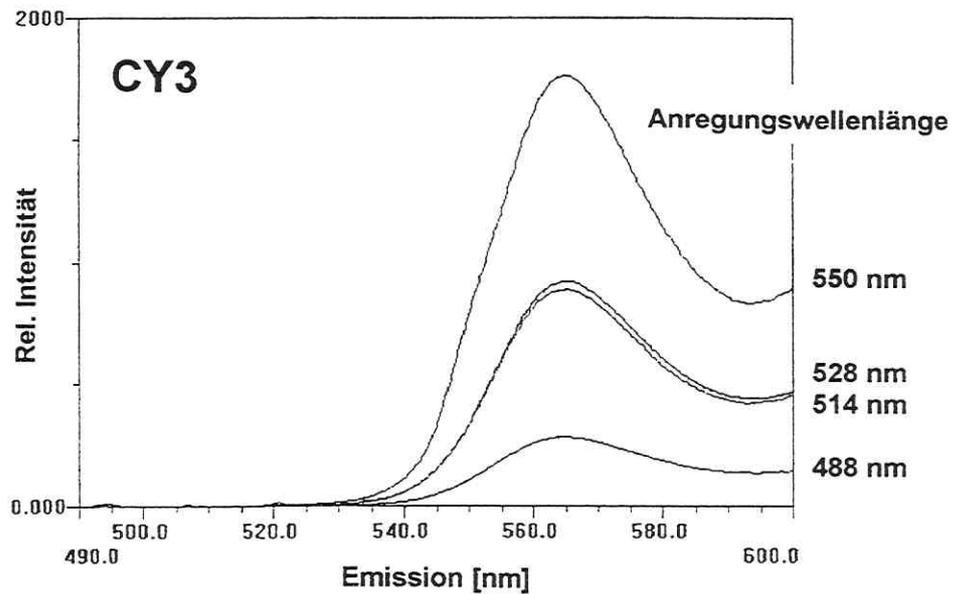


Abb. 6: Emissionsspektrums einer CY3-markierten Sonde (5 μ l EUB₃₃₈-CY3 in 1 ml PBS, pH 8,4) in Abhängigkeit von den Anregungswellenlängen 488, 514, 528 und 550 nm.

Das höchste Signal der Fluoreszenz-Emission entstand bei der Excitationswellenlänge von 550 nm, dem Absorptionsmaximum des Farbstoffes (Abb. 6). Bei dem Wechsel von 488 nm (Anregungslinie des Argon-Ionen-Lasers für Fluorescein) auf die Wellenlängen von 514 bzw. 528 nm zeigte sich eine Verstärkung der CY3-Fluoreszenz um den Faktor vier.

Durchflußzytometrische Messungen mit den Laserlinien 488 und 514 nm wurden mit *Acinetobacter*-Zellen nach Hybridisierungsexperimenten mit einer CY3-markierten Oligonukleotidsonde (ACA-CY3) durchgeführt. Gemessen wurden die Zellen aus der zuvor beschriebenen *batch*-Kultivierung mit Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle (3.1.1).

Zur Detektion der Fluoreszenz nach Anregung mit 514 nm wurden die Filter OG530 und OG550 getestet. Bei dem Einsatz eines OG530 konnten im Fluoreszenzdetektor deutliche Signale von ungefärbten Zellen detektiert werden. Das bedeutet, daß der OG530-Filter das gesamte Anregungslicht (Seitwärtsstreulicht der Zellen) nicht vollständig absorbierte. Dieser Effekt trat bei der Benutzung des OG550-Filters, der für die Experimente mit der Anregungslinie 514 nm eingesetzt wurde, nicht auf.

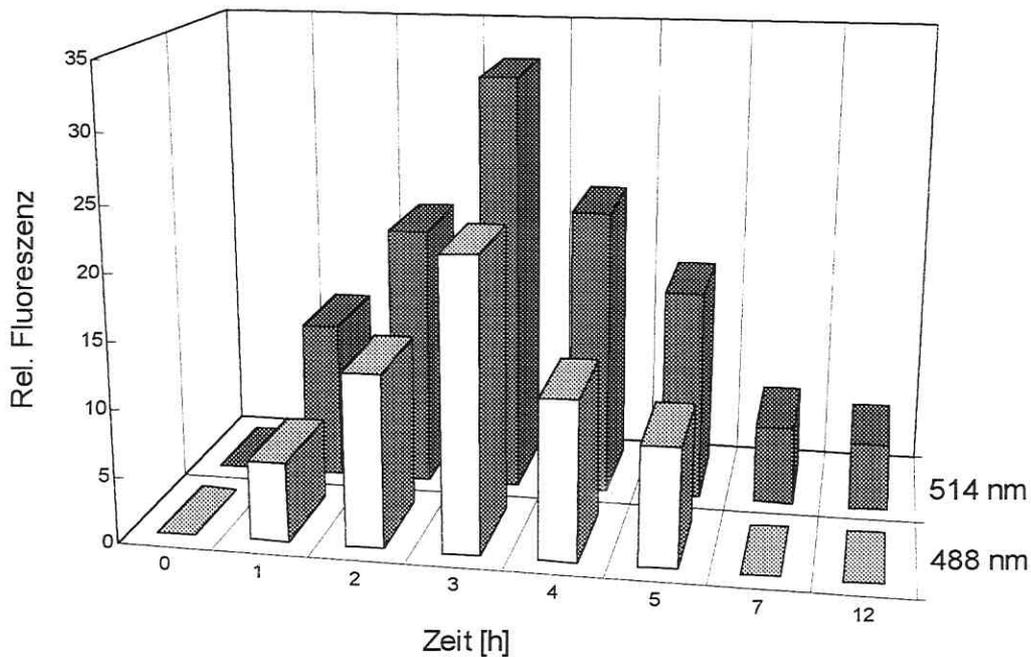


Abb. 7: Hybridisierungssignale bei einer *batch*-Kultivierung von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen des Argon-Ionen-Lasers. Nach Hybridisierungsexperimenten mit ACA-CY3 sind die Kanalmittelwerte der detektierten Fluoreszenz jeder Probe (Signalbreite: 64 Kanäle) aufgetragen worden. Benutzte Filter für die Detektion OG510 (488 nm Anregung) und OG550 (514 nm Anregung) bei einer Laser-Leistung von jeweils 650 mW pro Linie.

Abb. 7 zeigt, daß der Intensitätsgewinn bei der Änderung der Anregungswellenlänge von 488 auf 514 nm bei der durchflußzytometrischen Messung nur ca. 30 % ausmachte. Dies kann durch unterschiedliche Transmissionsraten der benutzten Filter und durch ein verändertes Signal-Rauschverhältnis erklärt werden. Nach Laseranregung mit 488 nm konnten die Proben 1-5h der *batch*-Kultur detektiert werden, während fast alle Proben (1h bis 12h) nach Anregung mit der 514 nm Linie ein detektierbares Fluoreszenzsignal zeigten.

Eine weitere Methode zur Amplifikation des Fluoreszenzsignals ist der Einsatz von mehreren Oligonukleotidsonden in einem Hybridisierungsansatz (Amann et al., 1995). Zur Verstärkung der Fluoreszenzsignalstärke bei den Reinkulturexperimenten von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V bzw. *Ralstonia eutropha* JMP134 wurden zu den spezifischen Sonden (ACA und REU) zusätzlich gruppenspezifische Sonden (GAM und BETA) und die beiden Eubakteriensonden (EUB₃₃₈ und EUB₉₂₇) eingesetzt.

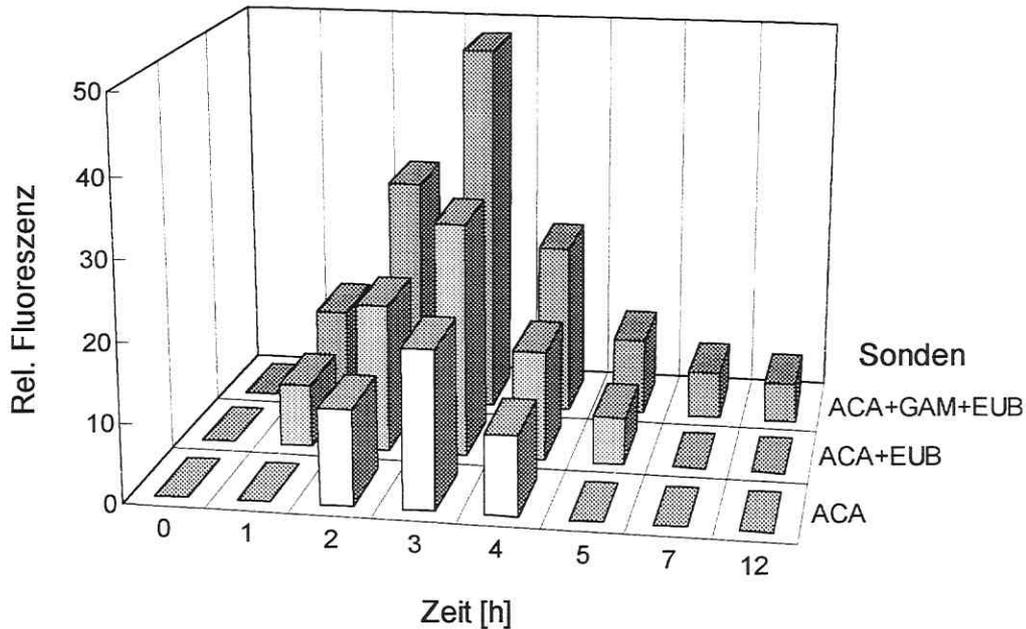


Abb. 8: Amplifikation des Hybridisierungssignals bei einer *batch*-Kultivierung von *Acinetobacter*-Zellen. Durchflußzytometrische Messung der Zellen nach Hybridisierungsexperimenten mit unterschiedlichen fluorescein-markierten Sonden (ACA-, GAM- und EUB₃₃₈-Fluos). Aufgetragen sind die Kanalmittlerwerte der detektierten Fluoreszenz bei jeder Probe. Anregung: 488 nm bei 650 mW Leistung.

Bei jeder Probe war mit der Erhöhung der Anzahl unterschiedlicher Oligonukleotidsonden eine Zunahme der detektierbaren Fluoreszenz zu verzeichnen (Abb. 8). Der Anstieg der Fluoreszenzintensität erfolgte nicht additiv mit Zusatz einer weiteren Sondenart. Das Intensitätsprofil aller fluoreszierender Zell-Proben wurde durch die Zugabe mehrerer Sondenarten jedoch nicht verändert. Es zeigte sich, daß mit drei verschiedenen Oligonukleotidsonden die Proben 1h bis 12h detektiert werden konnten. Bei der Benutzung CY3-markierter Oligonukleotidsonden wurden die gleichen Signalamplifikationen bei Erhöhung der Sondenart beobachtet. Differenzen aufgrund der unterschiedlichen Markierung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen wurden nicht festgestellt.

3.1.1.2 rRNS-Gehalt bei einer *batch*-Kultivierung

Mit Proben aus einer *batch*-Kultivierung von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V wurden Hybridisierungsexperimente mit fluorescein-markierten Sonden durchgeführt. Die gefärbten Proben wurden durchflußzytometrisch gemessen.

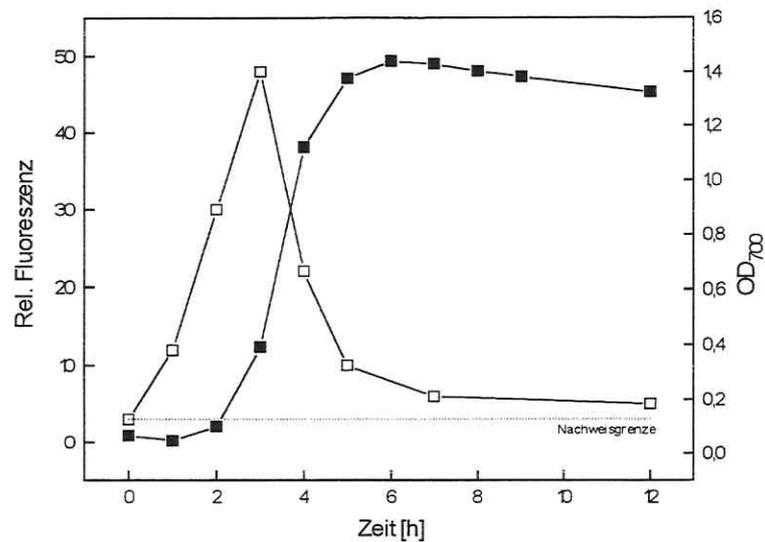


Abb. 9: Entwicklung der Biomasse (■) und des rRNS-Gehalt (□) von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V bei einer *batch*-Kultivierung (0,5 % Acetat). Durchflußzytometrische Messung der Zellen nach Hybridisierungsexperimente der Zellen mit ACA-, GAM- und EUB₃₃₈-Fluos Sonden. Die relativen Fluoreszenzintensitäten sind aus den Kanalmittelwerten der Messungen bestimmt worden. Die Probe 3h diente nach Hybridisierung mit NON-Fluos als Negativ-Kontrolle (gestrichelte Linie: Nachweisgrenze), Anregung: 488 nm bei 650 mW Leistung.

Neben den typischen Wachstumsphasen einer *batch*-Kultivierung zeigte sich, daß der höchste rRNS-Gehalt zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase (3h) vorlag (Abb. 9). Vier Stunden nach dem Animpfen der Kultur nahm der rRNS-Gehalt der Zellen stark ab, während die Biomassekonzentration (optische Dichte) der Kultur weiter anstieg. Die maximale Wachstumsrate (aus dem Intervall $\Delta t = 2-3$ h bestimmt) betrug $\mu_{\max} = 0,94 \text{ h}^{-1}$.

3.1.2 Versuche mit Phenol als Kohlenstoff- und Energiequelle

3.1.2.1 Ergebnisse aus *batch*-Kultivierung

Eine *batch*-Kultivierung mit *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V wurde stündlich beprobt. Als Kohlenstoff- und Energiequelle wurden 175 mg/l Phenol eingesetzt. Eine durchflußzytometrische Messung der einzelnen Proben erfolgte neben der Bestimmung der Biotrockenmasse (Abb. 10) und der Phenolkonzentration (Abb. 11).

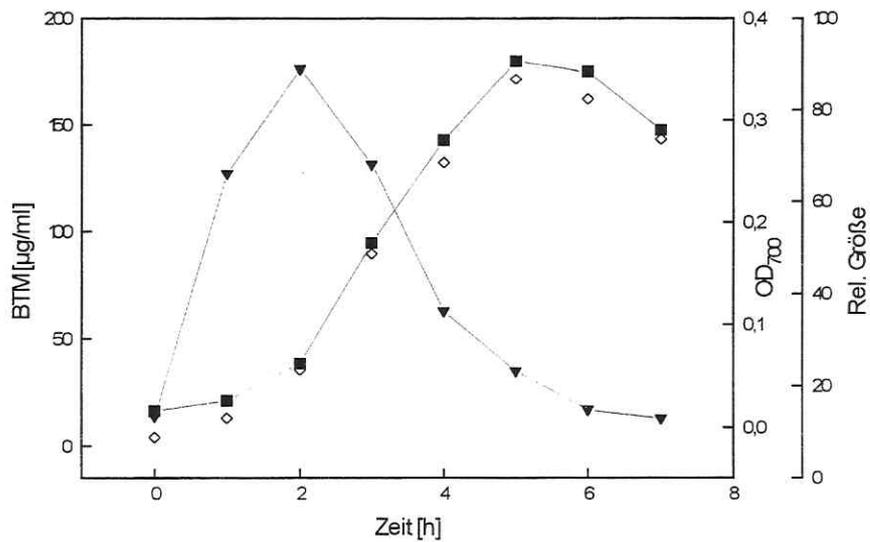


Abb. 10: Verlauf der optische Dichte (■), Biotrockenmasse (◇) und relative Größe (▼) bei einer *batch*-Kultivierung (175 mg/l Phenol) von *Acinetobacter*-Zellen. Die relative Größe der Bakterien wurde aus den Kanalmittelwerten des FSC-Signals bestimmt, das bei der DNS-Färbung und durchflußzytometrischer Messung der Zellen detektiert wurde (Abb. 12).

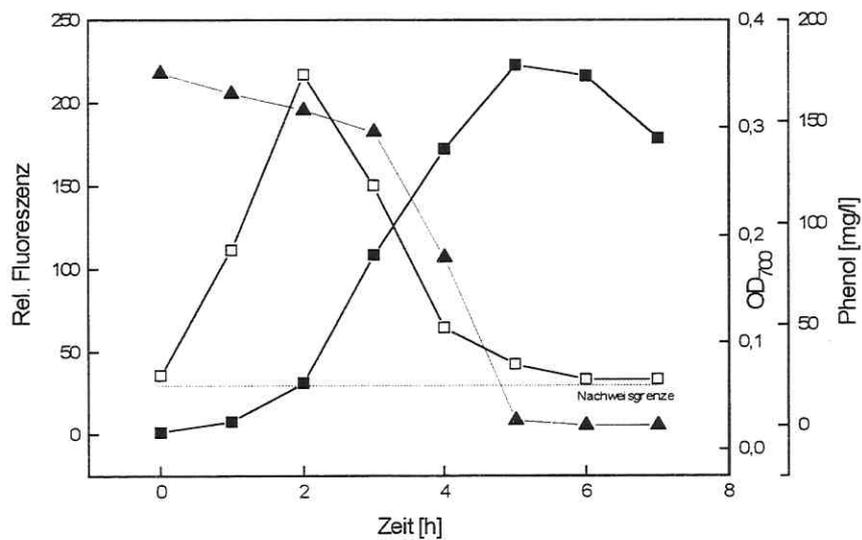


Abb. 11: Zeitlicher Verlauf von optischer Dichte (■), rRNS-Gehalt (□) und Phenolkonzentration (▲) bei der beschriebenen *batch*-Kultivierung (Abb. 10) von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V. Der rRNS-Gehalt wurde nach durchflußzytometrischer Messung hybridisierter Zellen mit ACA-, GAM- und EUB₃₃₈-CY3 bestimmt. Die gestrichelte Linie stellt die Nachweisgrenze dar (Fluoreszenz-Hintergrund; Fluoreszenzsignal der Negativ-Kontrolle: Probe 2h mit NON-CY3); Anregung: 528 nm bei 530 mW Leistung.

In Abb. 10 wird die Übereinstimmung zwischen dem Verlauf der Biotrockenmasse (BTM) und der optischen Dichte, die bei 700 nm bestimmt wurde, deutlich. Die optische Dichte wurde in weiteren Versuchen als Maß für die Biomassekonzentration eingesetzt. Die Proben der beginnenden exponentiellen Phase zeigten die größten FSC-Signale (Maß für die Größe der Bakterien). Das Maximum der Zellgröße wurde zwei Stunden nach dem Animpfen der Kultur erreicht, bei der Probe 6h war die Größe des initialen FSC-Signals wieder erreicht. Die stationäre Wachstumsphase wurde nach fünf Stunden erreicht, danach nahm die Biotrockenmasse und die optische Dichte der Kultur ab.

Aus Abb. 11 zeigte sich, daß fünf Stunden nach dem Animpfen ($t = 0$ h) die Kohlenstoff- und Energiequelle Phenol aufgebraucht war. Die Kultur trat in die stationäre Wachstumsphase ein. Die Biomassekonzentration stieg nicht mehr weiter an, der rRNS-Gehalt lag bei der Nachweisgrenze. Zellen der beginnenden exponentiellen Wachstumsphase besaßen den höchsten rRNS-Gehalt (Maximum bei Probe 2h). Die spezifische maximale Wachstumsrate, die aus dem Zeitintervall $\Delta t = 2-4$ h bestimmt wurde, betrug $\mu_{\max} = 0,75 \text{ h}^{-1}$. Aus dem Zeitintervall $\Delta t = 0-5$ h wurde für *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V ein Ertragskoeffizient von $Y_{X/S} = 0,9$ ($g_{\text{BTM}}/g_{\text{Phenol}}$) berechnet.

Durch Messungen des DNS-Gehaltes nach DAPI-Färbung der Zellen (Proben 0-7h) wurde die Proliferationsdynamik der Bakterien aufgenommen (Abb. 12).

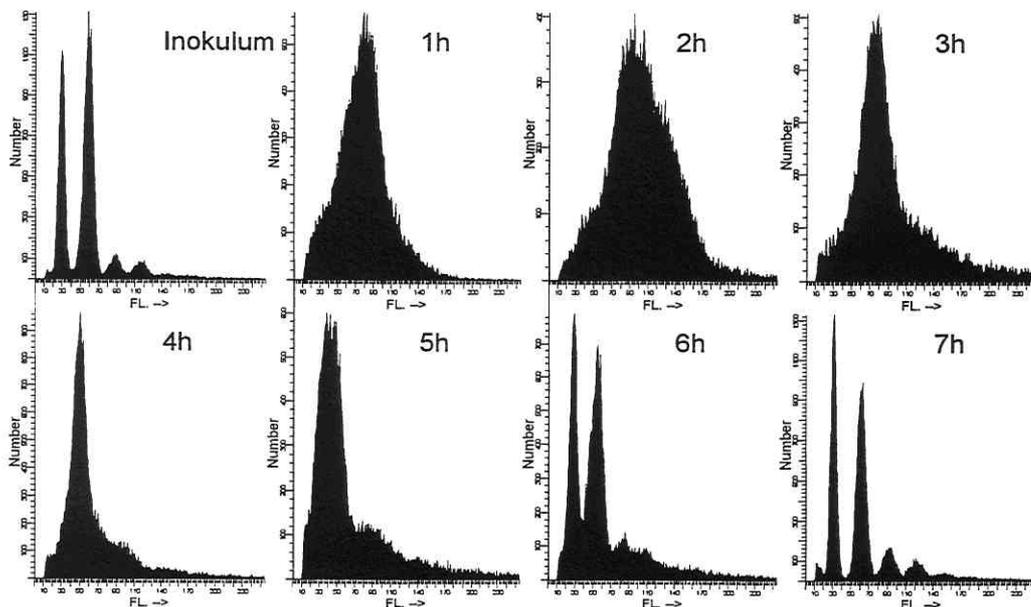


Abb. 12: Dynamik des DNS-Gehaltes von *Acinetobacter*-Zellen während einer *batch*-Kultivierung (Phenol). Quantifizierung anhand DAPI-Färbung und durchflußzytometrischer Messung der Kultur; UV-Multilinie bei einer Leistung von 400 mW.

Bei den gemessenen Zellen aus dem Inokulum und der Probe $t = 7$ h (stationärer Zustand) zeigten sich vier Subpopulationen der *Acinetobacter*-Kultur mit unterschiedlichen DNS-Gehalten. Bis zu vier Chromosomenäquivalente (c_1 - c_4) waren eindeutig quantifizierbar, der prozentuale Anteil von Zellen mit dem entsprechenden DNS-Gehalt wurde ermittelt (Tab. 5). Dazu wurden vier Regionen (Fenster) ähnlich wie in Abb. 3 (Region R1, R2) über die Signalfächen gesetzt und der Anteil der darin enthaltenen Zellen bestimmt.

Tab. 5: Prozentuale Häufigkeitsverteilung der Zellen mit unterschiedlichen DNS-Gehalten.

Probe	Anteil der Zellen mit Chromosomenäquivalenten					Σ
	c_1	c_2	c_3	c_4	$> c_4$	
	[%]					
0h	30,5	49,2	5,7	4,8	1,8	92,0
2h	3,3	11,3	27,7	22,3	17,3	81,9
4h	10,8	41,2	10,6	5,0	4,0	71,6
6h	26,8	31,7	8,2	5,4	4,2	76,3
7h	33,6	38,5	8,3	5,5	3,9	89,8

Die Zellen der Proben 1-6h zeigten bei den DNS-Verteilungen auch DNS-Gehalte, die zwischen den ganzzahligen Chromosomenäquivalenten lagen (Abb. 12). Diese Übergänge bei der DNS-Synthese spiegelten sich in geringeren Gesamtzahlen von Zellen mit ganzzahligen Chromosomenäquivalenten wider (Tab. 5). Die Zellen der Probe 2h hatten den höchsten Anteil (22,3 %) am vierfachen DNS-Gehalt, wobei 17,3 % der Zellen einen noch höheren DNS-Gehalt ($> c_4$) pro Zelle besaßen. Die Bakterien dieser Probe besaßen die höchste Proliferationsaktivität, da ein vielfacher Genomgehalt pro Zelle als ein Maß für mögliche Zellteilung angesehen werden kann. Dies korrelierte mit dem maximalen rRNS-Gehalt der Zellen (Abb. 11).

3.1.2.2 Ergebnisse der *transient-state*-Experimente im Chemostaten

Der Stamm *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V wurde chemostatisch vermehrt, wobei Phenol ($S_0 = 1\text{g/l}$) als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle eingesetzt wurde. Nach Etablierung eines Fließgleichgewichtes (*steady state*) wurde, beginnend mit einer Durchflußrate von $D = 0,05\text{ h}^{-1}$, ein Geschwindigkeitsgradient angelegt. In ersten Versuchen wurde die Durchflußrate in Intervallen von $\Delta t = 2\text{ h}$ in distinkt kleinen Schritten um $\Delta D = 0,02\text{ h}^{-1}$ erhöht. Für weitere Versuche wurde eine Erhöhung der Durchflußrate um $\Delta D = 0,025\text{ h}^{-1}$ in Intervallen von $\Delta t = 1\text{ h}$ gewählt, nachdem sich keine Unterschiede bei den verschiedenen Gradienten

zeigten. Für jede dieser *transient-state*-Stufen bildete sich ein quasi-stationärer Zustand aus, der vor jeder neuen Erhöhung der Durchflußrate beprobt wurde.

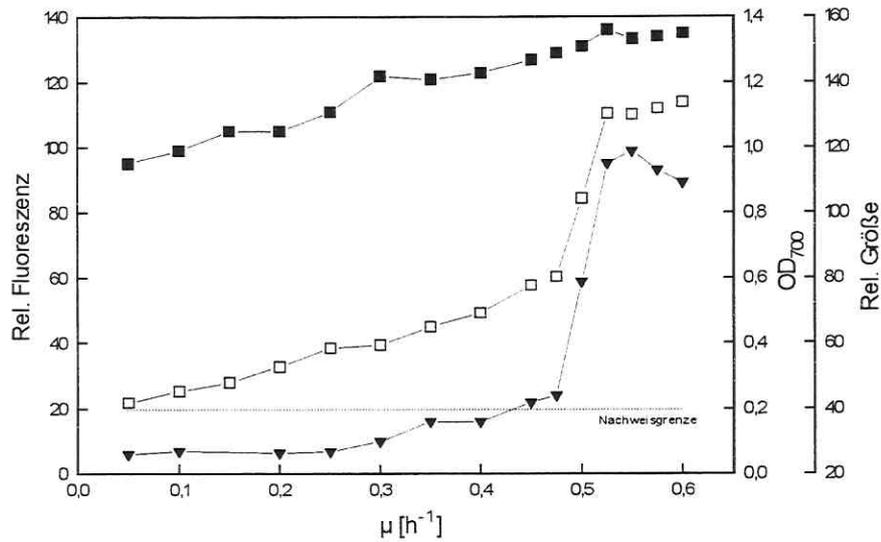


Abb. 13: Dynamik von Biomasse (■), rRNS-Gehalt (□) und relative Größe (▼) bei *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V in Abhängigkeit von der spezifischen Wachstumsrate μ . Der rRNS-Gehalt wurde nach Hybridisierungsexperimenten der Zellen mit ACA-, GAM-, EUB₃₃₈-CY3 bestimmt, die relative Größe aus dem FSC-Signal einer DNS-Messung mit diesen Proben. Die Nachweisgrenze bezieht sich auf die Fluoreszenzdetektion von CY3; Anregung: 514 nm, 700 mW Leistung.

Im Bereich der Wachstumsraten von $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ bis $0,48 \text{ h}^{-1}$ ergab sich eine lineare Korrelation der spezifischen Wachstumsrate der Bakterien zu der gemessenen Sondenfluoreszenz (rRNS-Gehalt, Abb. 13). Für höhere Wachstumsraten $\mu > 0,48 \text{ h}^{-1}$ zeigte sich eine Unterbrechung dieser linearen Korrelation. Eine sprunghafte Erhöhung des rRNS-Gehaltes um ca. 40 % resultierte bei der Erhöhung der spezifischen Wachstumsrate auf $\mu = 0,5 \text{ h}^{-1}$. Nach weiterer Geschwindigkeitszunahme erfolgte der Zuwachs des rRNS-Gehaltes mit einer ähnlicher Steigung wie für den Anfangsbereich. Wachstumsraten von $\mu > 0,6 \text{ h}^{-1}$ wurden nicht erreicht. Die Größenverteilung der Zellen bei diesem Experiment gleicht dem Verlauf des rRNS-Gehaltes der Bakterien. Die Steigung der relativen Größe war bis zu der Wachstumsrate von $\mu = 0,48 \text{ h}^{-1}$ geringer als beim Verlauf des rRNS-Gehaltes. Der sprunghafte Anstieg erfolgte parallel zum rRNS-Signal, das FSC-Signal nahm nach einem Maximum ($\mu = 0,55 \text{ h}^{-1}$) wieder gering ab. Die optische Dichte als Parameter für die Biomassekonzentration der Kultur nahm kontinuierlich mit geringer Steigung zu (OD₇₀₀: von 1,0 auf 1,3). Die Proben dieses Experimentes mit den Wachstumsraten $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1} - 0,6 \text{ h}^{-1}$ wurden mit dem DNS-Farbstoff DAPI gefärbt und durchflußzytometrisch gemessen.

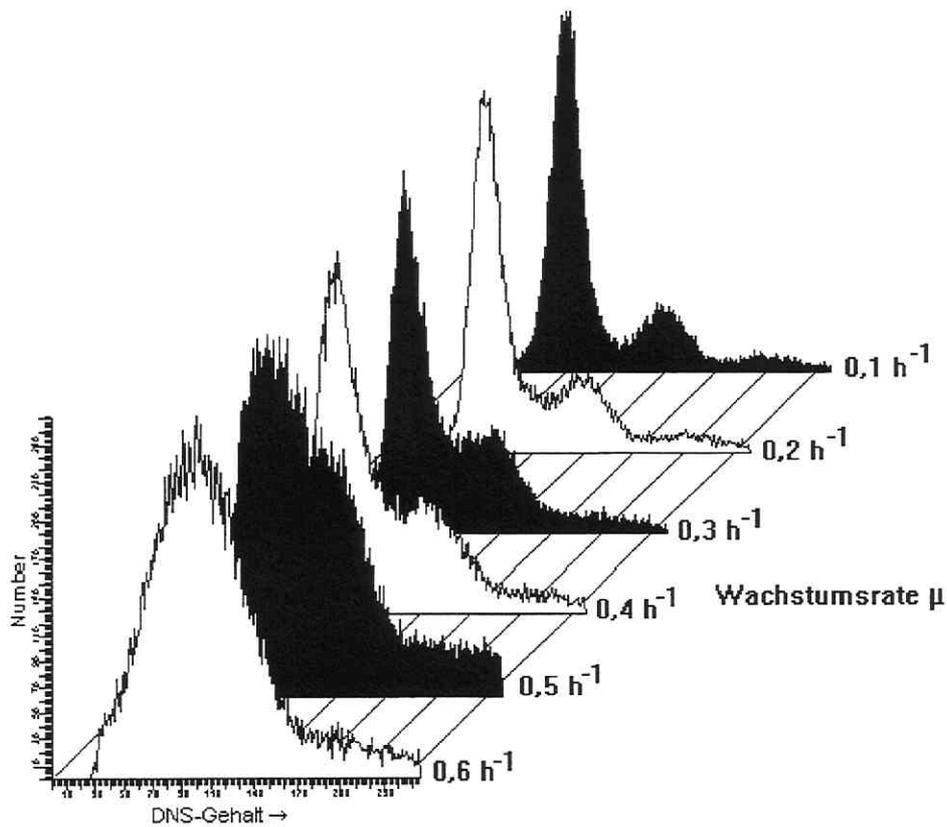


Abb. 14: Entwicklung des DNS-Gehaltes bei *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V in Abhängigkeit von der spezifischen Wachstumsrate μ .

Als Ergebnis zeigte sich, daß sich die Population von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V bei geringen Wachstumsraten ($\mu < 0,2 \text{ h}^{-1}$) hauptsächlich in zwei Subpopulationen mit einem und zwei Chromosomenäquivalenten aufspaltete (Abb. 14). Die Fluoreszenzsignale wurden mit der WinList-Software klassifiziert (insgesamt 256 Kanäle: c_1 Kanäle 30-80, Synthesephase 11-119, c_2 Kanäle 120-169 und $> c_2$ Kanäle 170-230; siehe auch 2.4.1), so daß die Häufigkeitsverteilung der Zellen mit den vier Klassen c_1 -Gehalt, Synthesephase, c_2 -Gehalt und $> c_2$ -Gehalt bestimmt werden konnte.

Mit steigender Wachstumsrate nahm der prozentuale Anteil der Zellen in der Synthese-Phase, die zwischen den beiden Zuständen c_1 und c_2 lagen, stetig zu. Aus der Tab. 6 erkennt man die Verdreifachung dieser Subpopulation von 10,4 auf 30,4 %.

Tab. 6: Prozentuale Häufigkeitsverteilung einer *Acinetobacter*-Kultur mit unterschiedlichen DNS-Gehalten.

Wachstumsrate	Anteil der Zellen			
	c_1	Synthese	c_2	$> c_2$
	[%]			
0,1 h ⁻¹	52,6	10,4	14,1	4,5
0,2 h ⁻¹	49,2	13,3	14,2	5,5
0,3 h ⁻¹	38,9	18,3	15,9	6,3
0,4 h ⁻¹	29,9	22,4	17,7	6,8
0,5 h ⁻¹	18,9	28,6	19,6	7,9
0,6 h ⁻¹	10,7	30,4	20,1	9,1

Der prozentuale Anteil der Zellen mit einfachem DNS-Gehalt halbierte sich mit steigender Wachstumsrate, während der Anteil der Zellen mit doppeltem DNS-Gehalt um 6 % auf einen Wert von 20,1 % stieg (Tab. 6). Ab einer spezifischen Wachstumsrate von $\mu = 0,5 \text{ h}^{-1}$ fand ein Übergang von zwei Subpopulationen zu einer Population mit einem mittleren DNS-Gehalt statt, der zwischen dem c_1 -Gehalt und dem c_2 -Gehalt vorheriger Proben lag. Dies zeigte sich auch bei der statistischen Häufigkeitsverteilung der Subpopulationen: Der prozentuale Anteil der Zellen der Synthese-Phase überwog in der Kultur (ab $\mu = 0,5 \text{ h}^{-1}$). Der Anteil der Zellen, die mehr als zwei Chromosomenäquivalente besaßen, stieg während des Experimentes leicht an.

3.2 *Ralstonia eutropha* JMP134

3.2.1 Versuche mit Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle

Versuche mit *Ralstonia eutropha* JMP134 wurden in *batch*-Kultivierungen mit 0,5 % Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle durchgeführt. Der Ansatz wurde stündlich beprobt und die einzelnen Proben nach Hybridisierung mit REU-, BETA-, EUB₃₃₈-CY3.5 durchflußzytometrisch gemessen.

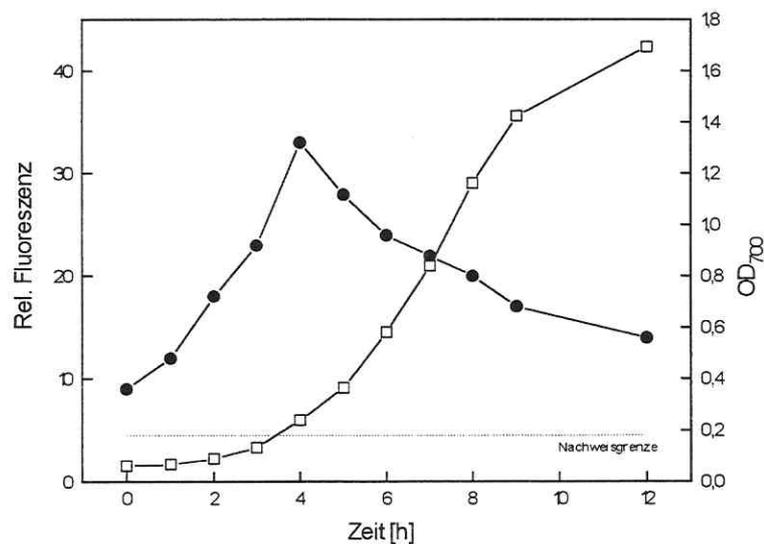


Abb. 15: Entwicklung von Biomasse (□) und rRNS-Gehalt (●) von *Ralstonia eutropha* JMP134 bei einer *batch*-Kultivierung (0,5 % Acetat).
In situ-Hybridisierungen der Kultur mit REU-, BETA-, EUB₃₃₈-CY3.5. Die relativen Fluoreszenzintensitäten wurden aus den Kanalmittelwerten der durchflußzytometrischen Messungen bestimmt. Die 4h-Probe diente nach Hybridisierung mit NON-CY3.5 als Negativ-Kontrolle (gestrichelte Linie: Nachweisgrenze), Anregung: 528 nm bei 550 mW Leistung.

Der höchste rRNS-Gehalt zeigte sich in der beginnenden Phase des exponentiellen Wachstums vier Stunden nach dem Animpfen (Abb. 15). Danach nahm der rRNS-Gehalt der Kultur stark ab, während das Wachstum der Kultur als Zunahme der Biomassekonzentration noch weitere vier Stunden anhielt (die stationäre Phase begann mit der Probe 9h). Die maximale Wachstumsrate der Kultur betrug $\mu = 0,44 \text{ h}^{-1}$.

3.2.2 Versuche mit Phenol als Kohlenstoff- und Energiequelle

3.2.2.1 Ergebnisse aus *batch*-Kultivierung

In einer *batch*-Kultivierung mit dem Stamm *Ralstonia eutropha* JMP134 wurden 160 mg/l Phenol als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle eingesetzt. Die durchflußzytometrische Messung der stündlich gezogenen Proben erfolgte neben der Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) und der Phenolkonzentration.

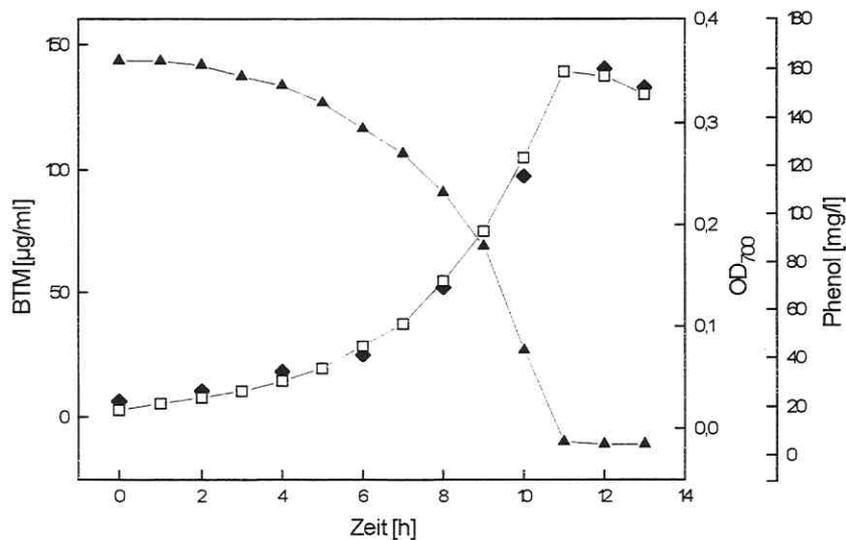


Abb. 16: Entwicklung der optische Dichte (□), Biotrockenmasse (◆) sowie der Phenolkonzentration (▲) bei einer *batch*-Kultivierung von *Ralstonia eutropha* JMP134.

Die Werte der Biotrockenmasse und der optischen Dichte entsprachen sich über den gesamten Versuchszeitraum von 12 Stunden (Abb. 16). Mit Zunahme der Biomasse verringerte sich die Phenolkonzentration im Kulturmedium. Eine maximale Wachstumsrate der Zellen von $\mu_{\max} = 0,33 \text{ h}^{-1}$ wurde aus dem Intervall $\Delta t = 2\text{-}6 \text{ h}$ bestimmt. Aus dem Zeitintervall $\Delta t = 0\text{-}11 \text{ h}$ wurde ein Ertragskoeffizient der Kultur von $Y_{x/s} = 0,82 \text{ (g}_{\text{BTM}}/\text{g}_{\text{Phenol}})$ berechnet.

Die Beschreibung des rRNS-Gehaltes der einzelnen Proben erfolgte nach einem Hybridisierungsexperiment mit vier verschiedenen CY3-markierten Oligonukleotidsonden und anschließender durchflußzytometrischer Messung.

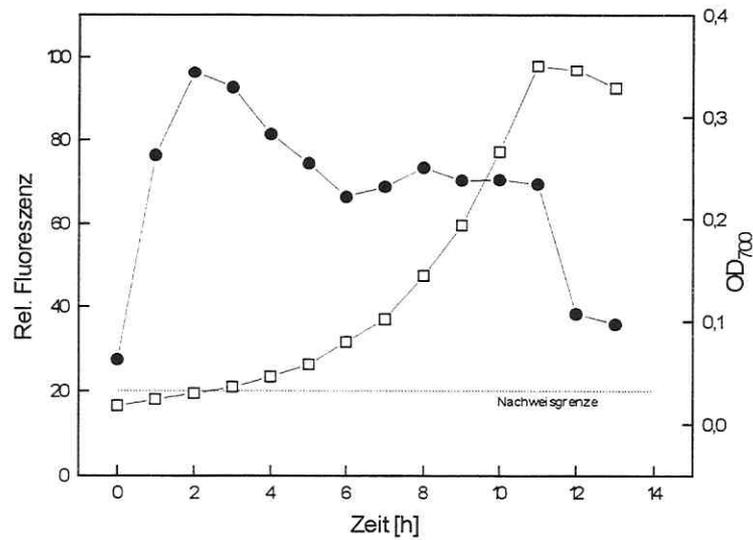


Abb. 17: Entwicklung der Biomasse (□) und des rRNS-Gehaltes (●) bei einer *batch*-Kultivierung von *Ralstonia eutropha* JMP134 mit dem Substrat Phenol. Die Oligonukleotidsonden REU-, BETA- und EUB₃₃₈- und EUB₉₂₇-CY3 wurden zur Darstellung des rRNS-Gehaltes eingesetzt. Die eingezeichnete Nachweisgrenze bezieht sich auf die Fluoreszenzdetektion von CY3, Anregung: 528 nm bei einer Leistung von 540 mW.

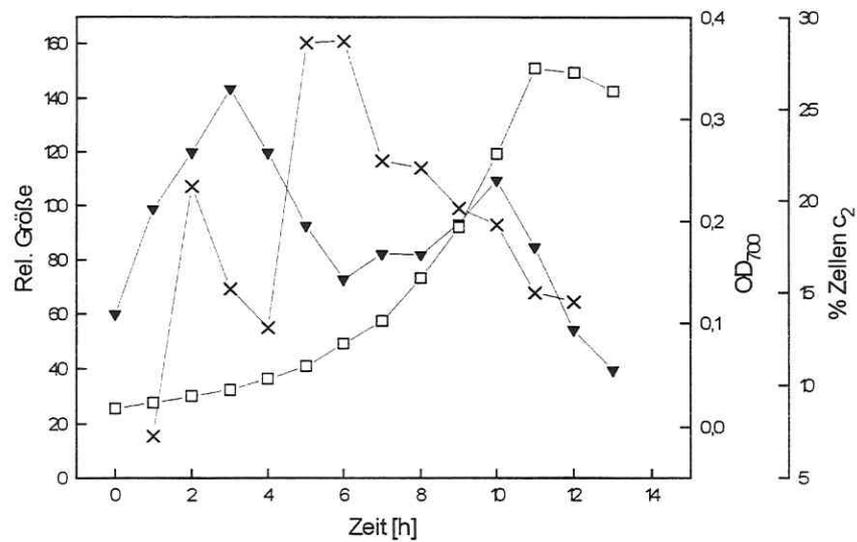


Abb. 18: Entwicklung von Biomasse (□), relativer Größe (▼) und prozentualen Anteil der Zellen mit einem c₂-Gehalt (X) bei *Ralstonia eutropha* JMP134 (gleicher Versuch wie in Abb. 16, 17). Das FSC-Signal (rel. Größe) sowie der Anteil der Zellen mit einem c₂-Gehalt wurden anhand von DNS-Färbung und zytometrischer Messung ermittelt, Anregung UV-Multilinie, 400 mW Leistung.

In der Abb. 17 zeigte sich bei der Biomassekonzentration (Vgl. auch Abb. 16) der typische Verlauf bei einer *batch*-Kultivierung. Der rRNS-Gehalt der Zellen stieg nach dem Animpfen der Kultur sofort an und zeigte bei der Probe 2h ein Maximum. Im weiteren Verlauf der Kultivierung verringerte sich der rRNS-Gehalt der Zellen auf einen halbmaximalen Wert, der als Plateau fünf Stunden lang vorlag (Proben: 6-11h). Ein Rückgang auf das Ausgangsniveau schloß sich an. Ferner sind in der Abb. 18 die Ergebnisse aus der DNS-Messung der Zellproben eingetragen.

Das FSC-Signal der Zellen nach DAPI-Färbung wurde als relatives Maß für die Größe der Zellen genutzt. Es zeigte sich in Abb. 17 und 18, daß mit dem Anstieg des rRNS-Gehaltes auch die Größe der Zellen wuchs. Die Zellgröße nahm nach dem ersten Maximum bei Probe 3h gering ab, bevor ein weiterer Anstieg bis zu einem zweiten Maximum bei Probe 10h folgte. Danach nahm die Größe der *Ralstonia*-Zellen stark ab. Bei der Auswertung der DNS-Fluoreszenzsignale der Kultur konnten zwei Populationen unterschieden werden: Zellen mit einem einfachen und Zellen mit einem doppelten DNS-Gehalt. Der prozentuale Anteil der Zellen mit zwei Chromosomenäquivalenten wurde mit der Software WinList bestimmt und aufgetragen. Ein Nebenmaximum wurde bei der Probe 2h (20 % der Zellen mit c_2) das Hauptmaximum bei den Proben 5-6h deutlich, bei dem 27 % der Zellen mit doppelten DNS-Gehalt vorlagen. Trotz steigender Größe der Zellen ($t = 8 - 10$ h) sank der Anteil der c_2 -Zellen in mehreren Stufen. Zellen der Proben 8-12h wurden mit Nilrot gefärbt, einem Neutrallipidfarbstoff zur Detektion von Polyhydroxybuttersäure PHB (Protokoll: Müller et al., 1993), und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Viele Zellen der Probe 8-10h zeigten drei bis vier fluoreszierende granuläre Strukturen (PHB) im Zellinnern. Der Anteil der fluoreszierenden Granula pro Zellen nahm bei den Proben 11h und 12h wieder ab.

3.2.2.2 Ergebnisse der *transient-state*-Experimente im Chemostaten

In *transient-state*-Experimenten wurde *Ralstonia eutropha* JMP134 chemostatisch vermehrt. Der Chemostat wurde aus einer *batch*-Vorkultur mit 100 mg/l Phenol angeimpft. Nach der Etablierung von *steady state* Bedingungen ($D = 0,05 \text{ h}^{-1}$) wurde in Intervallen von $\Delta t = 1$ h die Durchflußrate um $\Delta D = 0,025 \text{ h}^{-1}$ erhöht und jeder sich einstellende quasi-stationäre Zustand beprobt. Mit Proben aus jedem Stadium erfolgte die *in situ*-Hybridisierung mit den Oligonukleotidsonden EUB₃₃₈⁻, und EUB₉₂₇-CY3 und eine durchflußzytometrische Analyse.

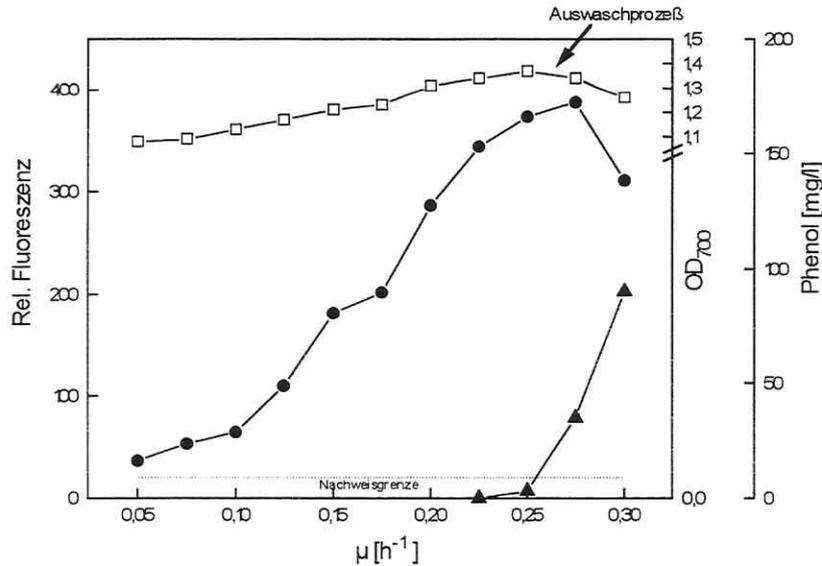


Abb. 19: Dynamik von Biomasse (□), Phenolkonzentration (▲) und rRNS-Gehalt (●) bei *Ralstonia eutropha* JMP134 in Abhängigkeit von der spezifischen Wachstumsrate μ bei einer *transient-state*-Kultivierung. Der Auswaschpunkt der Kultur aus dem Chemostat ist mit einem Pfeil markiert. CY3-markierte Eubakteriensonden wurden zur Hybridisierung eingesetzt, die Nachweisgrenze bezieht sich auf die Fluoreszenzdetektion, Anregung: 514 nm bei 1 W Leistung.

Bei diesem Experiment zeigte sich eine lineare Korrelation zwischen der gemessenen Fluoreszenz (rRNS-Gehalt) und der spezifischen Wachstumsrate im Bereich bis $\mu < 0,25 h^{-1}$ (Abb.19). Die Biomassekonzentration nahm bis zu dieser Wachstumsrate stetig zu. Nach weiterer Erhöhung der Durchflußrate ($D > 0,25 h^{-1}$) begann der Auswaschprozeß der Kultur. Die Phenolkonzentration im Chemostat stieg an und der rRNS-Gehalt verringerte sich. Das Auswaschen der Kultur wurde auch mit der Abnahme der Biomassekonzentration bei Wachstumsraten von $\mu > 0,25 h^{-1}$ deutlich. Bei einer Durchflußrate von $D = 0,3 h^{-1}$ existierte kein stationärer Zustand der Kultur. Somit entsprach die Durchflußrate nicht der spezifischen Wachstumsrate der Kultur. Höhere spezifische Wachstumsraten ($\mu > 0,28 h^{-1}$) wurden mit diesem Geschwindigkeitsgradienten nicht erreicht.

Die beiden Eubakteriensonden (EUB₃₃₈- und EUB₉₂₇-CY3) wurden bei diesem Experiment zur Quantifizierung des rRNS-Gehaltes gewählt. Ein Vergleich mit der rRNS-Dynamik des Stammes *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V, der unter gleichen Bedingungen wie *Ralstonia*

eutropha JMP134 kultiviert wurde, war so direkt möglich. Durch den Einsatz der gleichen Eubakteriensonden, wurden Fehler durch unterschiedliche Farbstoffmarkierungsdichten minimiert. Alle Proben, die in der Abb. 20 gezeigt sind, wurden in einer Meßreihe mit den gleichen Zytometerkonfigurationen gemessen.

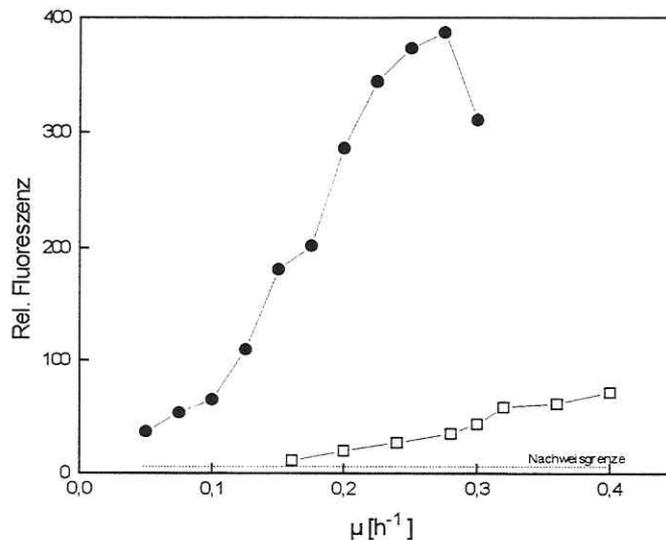


Abb. 20: Vergleich der rRNS-Dynamiken von *Ralstonia eutropha* JMP134 (●) und *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V (□) nach gleichen *transient-state*-Experimenten. Die Darstellung der rRNS-Gehalte erfolgte nach Hybridisierung mit zwei CY3-markierten Eubakteriensonden (EUB₃₃₈ und EUB₉₂₇), Anregung: 514 nm bei 1 W Leistung.

Nach Kultivierung unter gleichen Versuchsbedingungen besaßen die Zellen von *Ralstonia eutropha* JMP134 einen vielfach höheren rRNS-Gehalt als die Zellen von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V, die bis zu einer Wachstumsrate von $\mu = 0,4 \text{ h}^{-1}$ im Chemostat kultiviert wurden. *Acinetobacter*-Zellen mit geringen spezifischen Wachstumsraten von $\mu < 0,15 \text{ h}^{-1}$ besaßen keine detektierbare Fluoreszenz, ihre Signale wurden von unspezifischen oder ungefärbten Zellen und einem elektronischen Rauschanteil überlagert.

Die Proben aus dem *transient-state*-Experiment mit *Ralstonia eutropha* JMP134 wurden mit DAPI fluorochromiert und im Durchflußzytometer gemessen (Abb. 21).

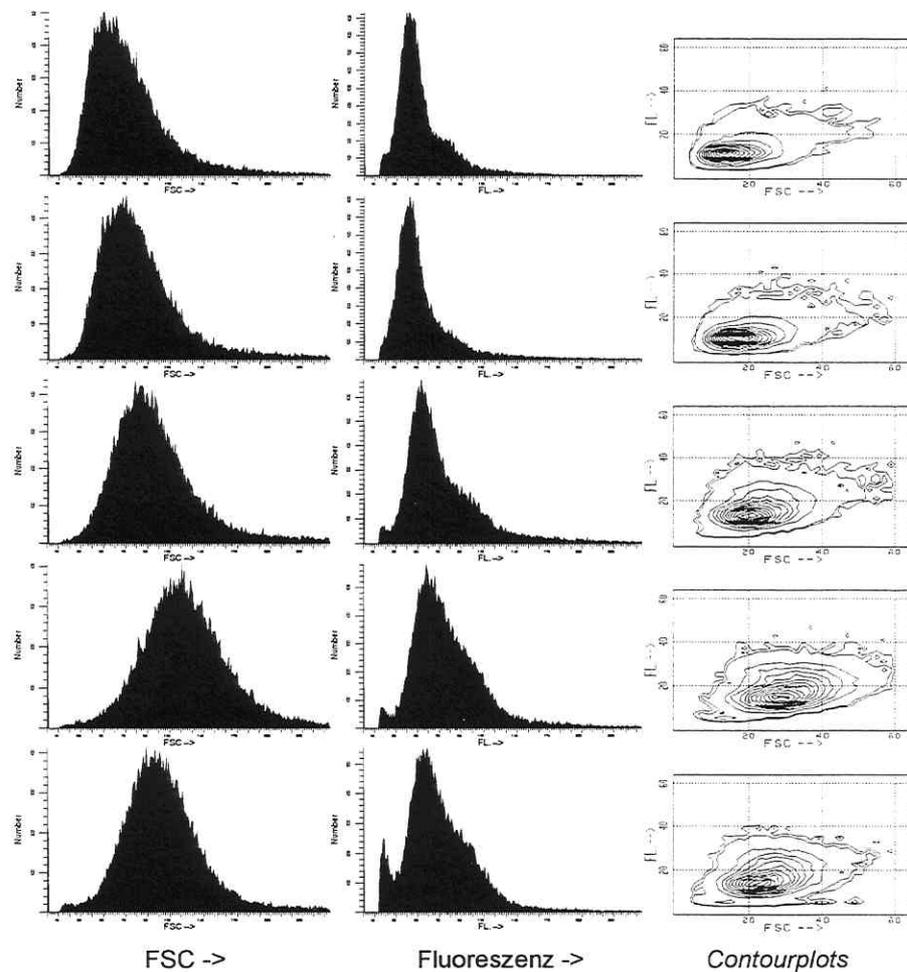


Abb. 21: Größe und DNS-Gehalt von *Ralstonia eutropha* JMP134 bei unterschiedlichen Wachstumsraten. Eindimensionale Darstellung der Parameter FSC und Fluoreszenz (*Number*: Anzahl der Bakterien) und *Contourplots* aus beiden Parametern (Abszisse FSC und Ordinate FL). Dargestellt sind Proben mit den Wachstumsraten $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$, $0,13 \text{ h}^{-1}$, $0,2 \text{ h}^{-1}$, $0,28 \text{ h}^{-1}$ und $0,3 \text{ h}^{-1}$ (von oben nach unten).

Bei den dargestellten Messungen der Zellen mit unterschiedlichen Wachstumsraten erkennt man mit steigender Wachstumsgeschwindigkeit eine Zunahme der Zellgröße (FSC) und des mittleren DNS-Gehaltes pro Zelle (Abb 21). Bei einer Wachstumsrate von $\mu = 0,3 \text{ h}^{-1}$ (beginnender Auswaschprozeß der Kultur) zeigte sich neben der Abnahme des FSC-Signals ein Rückgang der DNS-Syntheseleistung der Bakterien, der mittlere Gehalt an DNS pro Zelle nahm wieder ab.

Weitere Experimente mit der Kultur von *Ralstonia eutropha* JMP134 wurden in einem Fermentationskalorimeter der Firma BERGHOF durchgeführt, der als Chemostat betrieben wurde. Aus einer *batch*-Kultur (100 mg/l Phenol) wurde der Chemostat beimpft. Nach Erreichen von *steady state* Bedingungen bei einer Wachstumsrate von $\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$ wurde ein Geschwindigkeitsgradient von $\Delta D = 0,01 \text{ h}^{-1}$ ($\Delta t = 2 \text{ h}$) bis zum Erreichen der Wachstumsrate von $\mu = 0,24 \text{ h}^{-1}$ eingestellt. Jeder Geschwindigkeitszustand wurde beprobt. Der Durchflußgradient wurde auf $\Delta D = 0,002 \text{ h}^{-1}$ gesenkt und bis zu einer Wachstumsrate von $\mu = 0,27 \text{ h}^{-1}$ fortgeführt. Danach wurde der ursprüngliche Geschwindigkeitsgradient wieder eingestellt, der bis zu der maximalen erhaltenen Wachstumsrate $\mu_{\text{max}} = 0,32 \text{ h}^{-1}$ konstant gehalten wurde.

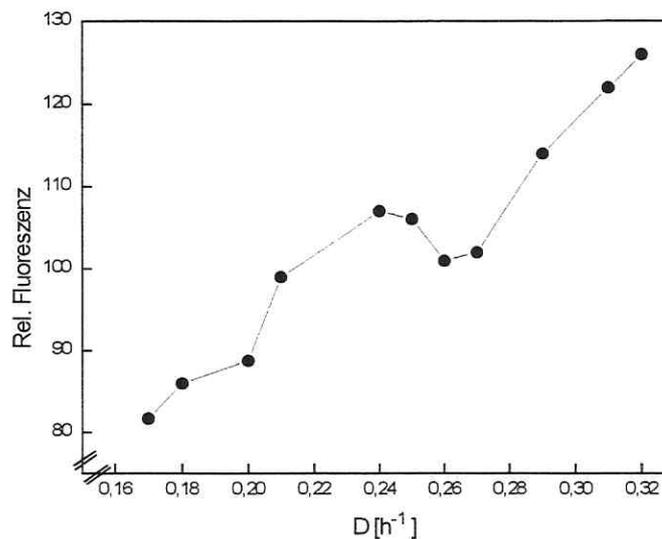


Abb. 22: rRNS-Gehalt von *Ralstonia eutropha* JMP134 in Abhängigkeit von der Durchflußrate. Der rRNS-Gehalt wurde nach durchflußzytometrischer Messung von hybridisierten Zellen mit EUB₃₃₈- und EUB₉₂₇-CY3 bestimmt. Anregung: 514 nm bei 1 W Leistung.

Neben der linearen Korrelation von rRNS-Gehalt und Durchflußrate (entspricht der spezifischen Wachstumsrate μ , bis auf den Bereich von $D = 0,24 \text{ h}^{-1} - 0,26 \text{ h}^{-1}$) zeigt Abb. 22 eine Unregelmäßigkeit in dieser Korrelation, die mit einem Rückgang des rRNS-Gehaltes pro Zelle verbunden war. In dieser Phase ($D = 0,24 - 0,26 \text{ h}^{-1}$) fand der Wechsel vom ortho- auf den meta-Weg des Phenolabbaus bei *Ralstonia eutropha* JMP134 statt (Müller und Babel, 1996). Kurzzeitig erhöhte sich die Phenolkonzentration im Chemostat

auf 15 mg/l, während das detektierte Wärmetönungssignal der gesamten Kultur sprunghaft auf ein höheres Niveau stieg (Daten veröffentlicht bei Maskow und Babel, 1997). Als Summenparameter der Abbauleistung war es bis auf den Bereich von $D = 0,24 \text{ h}^{-1} - 0,26 \text{ h}^{-1}$ linear mit der Wachstumsrate der Kultur korreliert.

3.2.2.3 Zusatz einer zweiten Energiequelle: Formiat-Gradient

Ralstonia eutropha JMP134 wurde in einem Chemostat (Fermentationskalorimeter, BERGDORF) kontinuierlich bei einer Durchflußrate von $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ mit der Kohlenstoff- und Energiequelle Phenol ($S_0 = 1 \text{ g/l}$) kultiviert. Als zusätzliche zweite Energiequelle wurde dem System graduell Na-Formiat (Vorratsgefäß Formiat: $S_0 = 15,3 \text{ g/l}$) zugefügt. Zu unterschiedlichen Zeiten wurden Proben gezogen, die durchflußzytometrisch in zwei Meßreihen (rRNS- und DNS-Gehalt) analysiert wurden (Abb. 23).

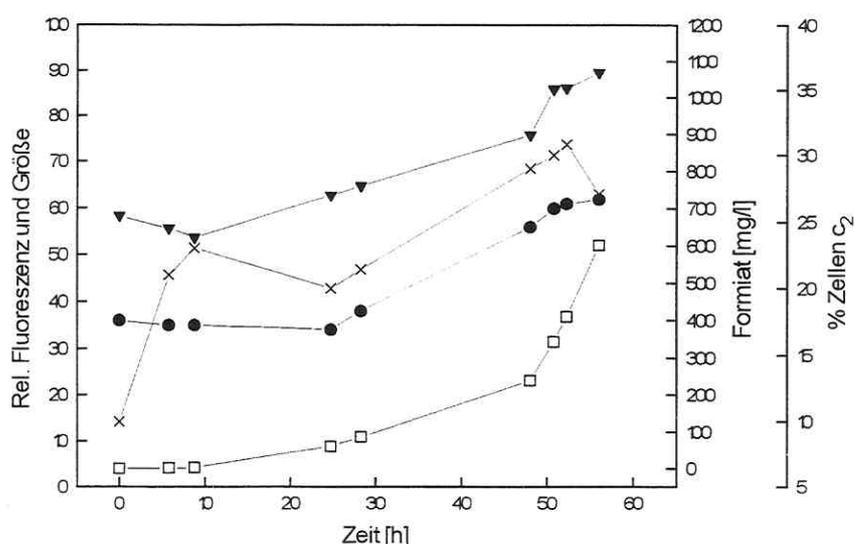


Abb. 23: Entwicklung des rRNS-Gehaltes (●) und der relativen Größe (▼) von *Ralstonia eutropha* JMP134 in Abhängigkeit von der Formiat-Konzentration im Chemostaten (□). Ein Formiat-Gradient (0,2 g/l bis 7 g/l im Zulauf; Δt 0-56 h) wurde dem Chemostaten als zweite Energiequelle neben einer kontinuierlichen Durchflußrate der phenolischen Substratlösung ($D_{\text{Phenol}} = 0,1 \text{ h}^{-1}$) zugefügt. Hybridisierung der Zellen mit CY3-markierten Sonden (EUB₃₃₈ und EUB₉₂₇), Anregung: 514 nm bei 1 W Leistung. Die Proliferationsaktivität der Zellen wurde als prozentualer Anteil der Zellen mit c_2 -Gehalt (x) anhand DAPI-Färbung durchflußzytometrisch bestimmt, Anregung: UV-Multilinie bei 380 mW Leistung.

Bei der kontinuierlichen Anreicherung der Na-Formiat-Konzentration im Chemostaten lassen sich vier Bereiche unterscheiden (Abb. 23). Für die erste Phase (Gradient: 0,2 - 1,3 g/l Na-Formiat im Zulauf; Intervall $\Delta t = 2-9$ h) zeigte sich eine Stagnation des rRNS-Gehaltes sowie eine geringe Größenabnahme der Zellen bei einer kaum nachweisbaren Akkumulation von Formiat im Chemostat. Der Anteil der Zellen mit zwei Chromosomen-äquivalenten stieg von 10 auf 25 %. In der zweiten Phase ($\Delta t = 10-24$ h, Anstieg der Formiat-Konzentration im Chemostaten auf 60 mg/l) erfolgte eine geringe Größenzunahme, der Anteil der proliferierenden *Ralstonia*-Zellen und der mittlere rRNS-Gehalt pro Zelle nahmen geringfügig ab.

Mit steigender Formiat-Konzentration im Zulauf (3,5 - 5,9 g/l; $\Delta t = 25-49$ h) nahm der rRNS-Gehalt, die Zellgröße und auch der Anteil der Zellen mit doppeltem DNS-Gehalt (c_2 -Zellen) deutlich zu, die Konzentration an Na-Formiat stieg im Chemostaten auf 200 mg/l an. In der letzten Phase ($\Delta t = 50-56$ h), nach weiterer Akkumulation der internen Formiat-Konzentration auf 600 mg/l, nahm die Größe der kultivierten Zellen noch einmal zu, während es nach weiterem Anstieg (bis $t = 52$ h) zu einer Abnahme bei den Zellen mit doppeltem DNS-Gehalt kam. Der rRNS-Gehalt der Zellen nahm kontinuierlich zu, bis sich bei den Zellen der letzten beiden Proben (52h und 56h) eine Stagnation einstellte.

3.2.2.4 Substrathemmung mit Nutristat-Experimenten

Die Wirkung jedes Substrates auf die Stoffwechselaktivität von Bakterien ist konzentrationsabhängig. Aus diesem Grund wurde die Wirkung von steigenden Phenolkonzentrationen auf die physiologische Leistung speziell der Wachstumsrate bei Zellen von *Ralstonia eutropha* JMP134 in Nutristat-Kultivierungen getestet. Der Stamm wurde mit fünf verschiedenen Phenolkonzentrationen (0, 90, 200, 430 und 560 mg/l), die als Überschuss im Kulturgefäß konstant vorlagen, kultiviert. Für einige Überschusskonzentrationen wurden Doppelbestimmungen vorgenommen. Die sich etablierenden Wachstumsraten, rRNS- und DNS-Gehalte sowie die Größe der Zellen wurden während der stationären Zustände (nach 48 Stunden) im Nutristat bestimmt.

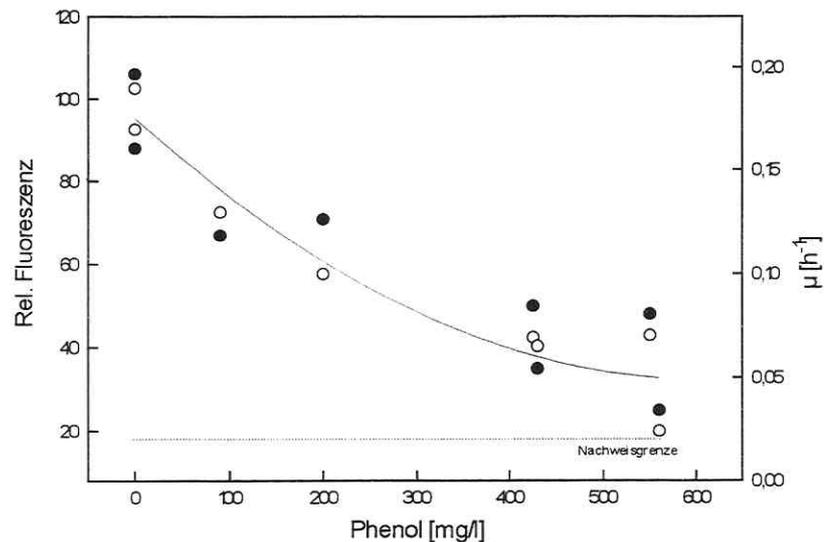


Abb. 24: Korrelation des rRNS-Gehaltes (●) mit der spezifischen Wachstumsrate (○) bei *Ralstonia eutropha* JMP134 in Abhängigkeit von einer steigenden Phenolkonzentration im Nutristat. Hybridisierung der Zellen mit CY3-markierten Sonden (REU, BETA, EUB₃₃₈ und EUB₉₂₇), Nachweisgrenze der Fluoreszenz: gestrichelte Linie; Anregung: 514 nm bei 1 W Leistung.

Mit steigender Phenolkonzentration nahm die spezifische Wachstumsrate der Bakterien, die aus der Substratkonzentration und der Durchflußrate errechnet wurde, ab (Abb. 24). Parallel dazu verlief die Abnahme des zellulären rRNS-Gehaltes. Auch bei der Substrathemmung mit Phenol zeigte sich die Kopplung von zellulärem rRNS-Gehalt mit der spezifischen Wachstumsrate. Die gleichen Proben wurden nach einer DAPI-Färbung im Durchflußzytometer gemessen.

Abb. 25 zeigt, daß der mittlere DNS-Gehalt der Zellen (Anteil der proliferierenden Zellen, die mehr als ein Chromosomäquivalent besaßen) mit steigender Phenolkonzentration im Nutristat abnahm. Die Abnahme der Zellgröße von *Ralstonia eutropha* JMP134 wurde mit steigender Überschußkonzentration des Phenols durch die Verschiebung des FSC-Signals zur Y-Achse deutlich.

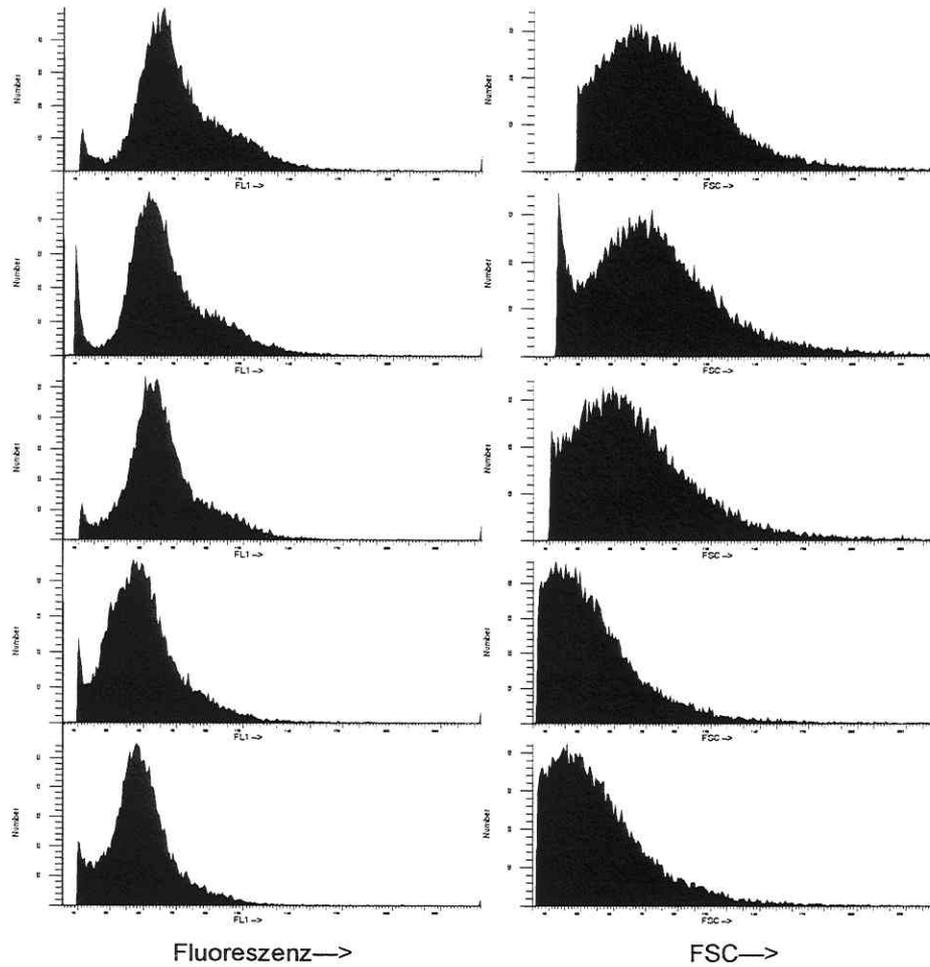


Abb. 25: DNS-Fluoreszenzsignale und FSC-Signale von *Ralstonia*-Proben aus dem Nutristat-Experiment. Dargestellt sind die Parameter Fluoreszenz und FCS bei Konzentrationen von 0, 90, 200, 430 und 560 mg/l Phenolüberschuß (von oben nach unten); Anregung: UV-Multilinie bei 380 mW Leistung.

3.3 Mischkultur aus *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V und *Ralstonia eutropha* JMP134

3.3.1 Versuche mit Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle

Mit einer Mischkultur aus *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V und *Ralstonia eutropha* JMP134 wurde unter gleichen Bedingungen wie bei den Reinkulturen (3.1.1 und 3.2.1) eine *batch*-Kultivierung mit 0,5 % Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle durchgeführt. Angeimpft wurde die *batch*-Mischkultur mit jeweils 3 ml aus zwei Vorkulturen der einzelnen Stämme. Die optischen Dichten der Inokula stimmten dabei nicht überein.

3.3.1.1 *In situ*-Hybridisierung mit unterschiedlich markierten Oligonukleotidsonden

Die *batch*-Kultivierung wurde stündlich beprobt. Die Proben wurden nach einer Hybridisierung auf einem Objektträger mit fluorescein-markierten (REU- und BETA-Fluos) und CY3-markierten Oligonukleotidsonden (ACA- und GAM-CY3) mit dem Epifluoreszenzmikroskop untersucht. Zur Verminderung von falsch-positiven Signalen bei den beiden gruppenspezifischen Sonden (BETA und GAM) wurden stringente Bedingungen durch den Zusatz von 35 % Formamid im Hybridisierungspuffer gewählt. Gleichzeitig wurden unmarkierte Oligonukleotidsonden als Kompetitoren (BETA⁻ und GAM) zugesetzt (Wallner et al., 1993).

Durch die Benutzung von verschieden markierten Oligonukleotidsonden war eine eindeutige Identifizierung beider Stämme in der Mischkultur möglich (Abb. 26). Während die Zellen von *Ralstonia eutropha* JMP134 kaum Unterschiede in Form und Fluoreszenzintensität bei den Proben 3h und 7h erkennen ließen, nahm die Größe und Fluoreszenzintensität der Zellen von *Acinetobacter* deutlich ab (Probe 7h im Vergleich zu 3h). Aus dem Phasenkontrastbild der 7h-Probe erkennt man außerdem die Bildung von Flocken bei der Population von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V.

Nach der Durchführung entsprechender Identifizierungsversuche in Suspensionen (Hybridisierung mit Fluorescein- und CY3-markierten Sonden) erfolgten durchflußzytometrische Analysen der Proben. Mit den Anregungswellenlängen von 488 und 514 nm wurde eine Differenzierung der Mischkultur durch zwei Fluoreszenzen (FL.1 und FL.2) getestet. Parallel dazu wurde mit der Anregungswellenlänge von 528 nm die Differenzierung der Fluoreszenzen einer Farbstoffkombination aus CY3- und CY3.5-markierten Sonden getestet (Abb. 27 und Tab. 7).

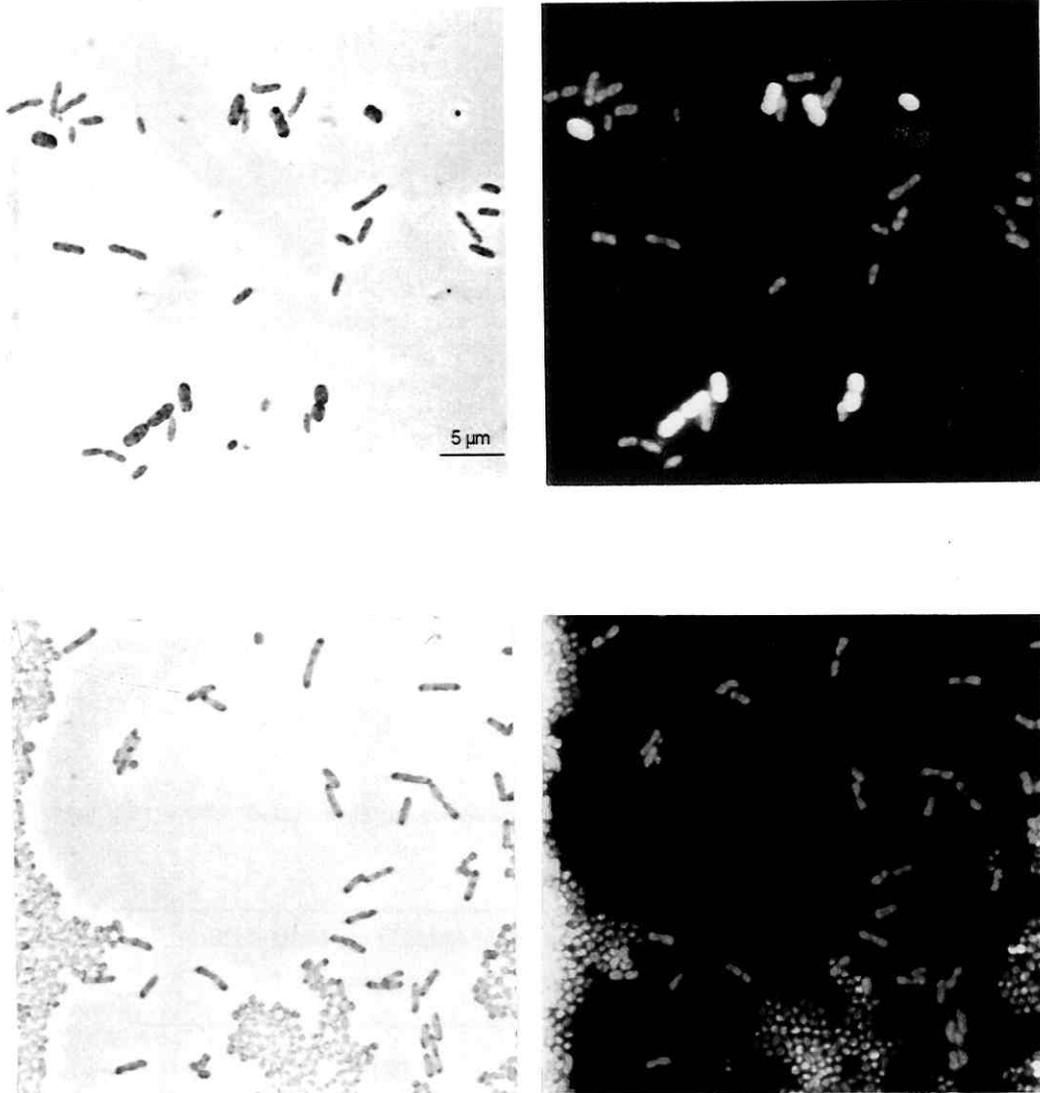


Abb. 26: Phasenkontrast- und Fluoreszenzlichtaufnahmen der Proben 3h (oben) und 7h (unten) nach einem Hybridisierungsexperiment mit REU-, BETA-Fluos und ACA-, GAM-CY3. *Ralstonia eutropha* JMP134 zeigt die grüne Fluoreszenz, die Zellen von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V eine gelb-orange Fluoreszenz. Die Anregung erfolgte mit Licht der Wellenlängen 490-500 nm (Filterset 09, ZEISS).

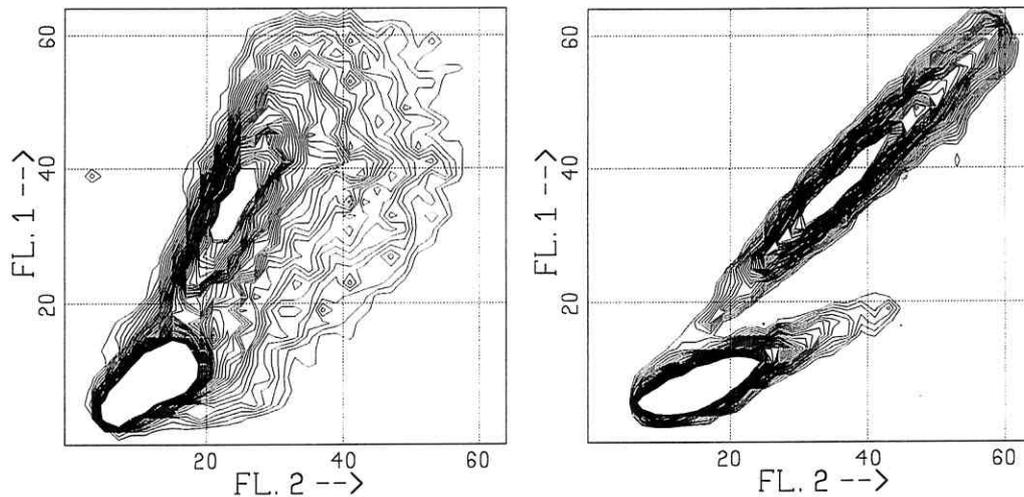


Abb. 27: Zweifarbige Fluoreszenzdifferentierung bei einer Mischkultur. *Contour-Plots* der Probe 3h (*batch-Experiment* mit 0,5 % Acetat) nach der Hybridisierung mit ACA-, GAM-CY3 und REU-, BETA-Fluos (linkes Bild) und ACA-, GAM-CY3 und REU-, BETA-CY3.5 (rechtes Bild). Detektiert (linkes Bild) wurden die orange (FL.1) und die grüne Fluoreszenz (FL.2). Der rechte *Contour-Plot* zeigt die zweiparametrische Differenzierung der Mischkultur nach Detektion der orangen Fluoreszenz: FL.1 und der roten Fluoreszenz: FL.2; Anregung: 514 nm bei 1 W Leistung bzw. 528 nm bei 550 mW Leistung.

Tab. 7: Prozentuale Häufigkeitsverteilung der Arten in einer Mischkultur nach unterschiedlichen Färbungen der Probe 3h.

Färbung	prozentualer Anteil in der Mischkultur		
	<i>Acinetobacter</i>	<i>Ralstonia</i>	Σ
	[%]		
CY3/Fluos	46,8%	35,3%	82,1%
CY3/CY3.5	43,6%	35,6%	79,2%

Die beiden Populationen in der Mischkultur (Abb. 27) wurden markiert und die prozentualen Anteile bestimmt. In beiden Hybridisierungsexperimenten konnten 80 % der durchflußzytometrisch gemessenen Ereignisse den Zellen der beiden Kulturen zugeordnet werden, die prozentuale Häufigkeitsverteilung der jeweiligen Populationen stimmte überein (Tab. 7).

In den *Contour-Plots* (Abb. 27) erkennt man das Übersprechen der ersten Fluoreszenz im zweiten Fluoreszenzkanal (FL. 2). Rechnerische Kompensationsmethoden, die das Übersprechen einer Fluoreszenz in einen fremden Fluoreszenzkanal für die optische Darstellung minimieren, wurden nicht angewandt. Im ersten Fall (Abb. 27, linkes Bild) zeigten die *Acinetobacter*-Zellen, nach Hybridisierung mit CY3-markierten Oligonukleotidsonden, eine größere Grünfluoreszenz als die Fluorescein colourierten *Ralstonia*-Zellen. Bei der zweiten Färbekombination (rechtes Bild) hatten die gelb-orange-gefärbten *Acinetobacter*-Zellen (CY3) einen größeren Rot-Anteil als die rot-gefärbten *Ralstonia*-Zellen (Sonden mit CY3.5 markiert). Dieses Übersprechen (*cross talk*) der orangen Fluoreszenz war bei den Proben 4h und 5h weniger stark ausgeprägt. Bei der Probe 7h lag die Fluoreszenz der *Acinetobacter*-Zellen im Rauschbereich der Signaldetektion (Abb. 28).

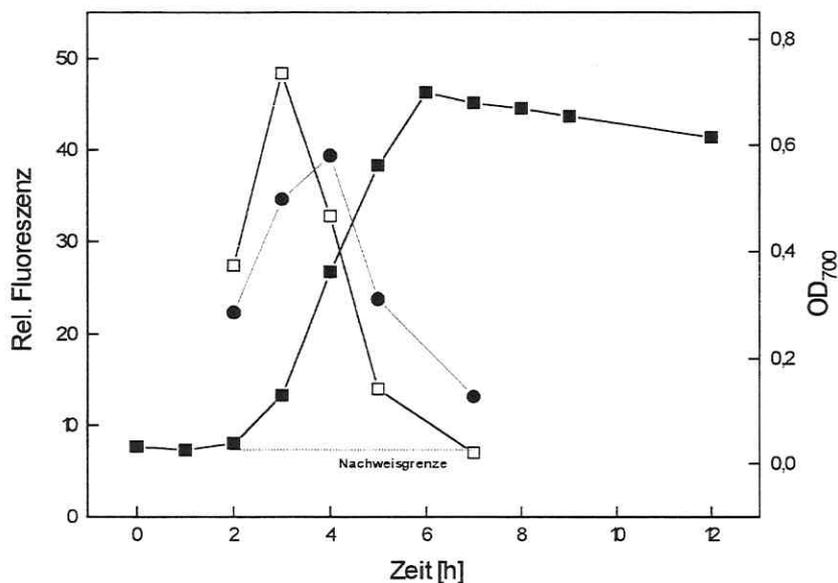


Abb. 28: Entwicklung von Biomasse (■) und rRNS-Gehalt bei *Acinetobacter*- (□) und *Ralstonia*-Zellen (●) während einer *batch*-Kultivierung (mit 0,5 % Acetat). Hybridisierungen mit ACA-, GAM-CY3 und REU-, BETA-CY3.5 Sonden bei zweifarbiger Fluoreszenzdetektion und Auswertung, Anregung: 528 nm bei 550 mW Leistung.

Aus den spektroskopischen Daten (Tab. 1) der Farbstoffe ist ersichtlich, daß mit der gewählten Anregungswellenlänge des Argon-Ionen-Lasers nur ein Fluoreszenzfarbstoff in

der gewählten Kombination optimal angeregt werden konnte. Eine Differenzierung der beiden Populationen unter diesen suboptimalen Bedingungen war für die Proben 2h bis 5h möglich. Für diese Proben konnte auch der rRNS-Gehalt der Zellen getrennt quantifiziert werden.

Abb. 28 stellt die exponentielle Zunahme der optische Dichte der Mischkultur aus beiden Stämmen dar. Aus dieser Zunahme wurde eine Wachstumsrate der Mischkultur von $\mu = 0,79 \text{ h}^{-1}$ ermittelt. Zellen von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V besaßen drei Stunden nach dem Animpfen einen maximalen rRNS-Gehalt; bei Zellen von *Ralstonia eutropha* JMP134 stellte sich dieses Maximum erst nach vier Stunden ein. Zum Vergleich der separat quantifizierten rRNS-Gehalte aus der dualen Fluoreszenzmessung wurden Kontroll-experimente mit den Mischproben 2h, 3h und 4h (Hybridisierung mit der Eubakteriensonde EUB₃₃₈-CY3) durchgeführt. Diese Experimente dienten zur gegenseitigen Skalierung der rRNS-Gehalte beider Stämme, die in der Abb. 28 berücksichtigt worden ist.

Versuche zur getrennten Anregung von zwei Farbstoffen mit einer Mehrfachwellenlängenoption des Argon-Ionen-Lasers (UV-Multilinie bei gleichzeitiger 488 nm Linie) wurden durchgeführt. Mit Reinkulturen gelangen dreiparametrische Messungen von DNS (blaue Fluoreszenz) und rRNS (grüne Fluoreszenz) und der Zellgröße (FSC). Die Fluoreszenzintensitäten nahmen bei den dualen Färbungen der Zellen mit DAPI und fluorescein-markierten Sonden gegenüber den zweiparametrischen Messungen (FL_{DAPI} bzw. FL_{Sonde} gegen FSC) deutlich ab. Für Mischkulturen reichten die detektierten Intensitäten (starke Überlagerung mit Rauschsignalen) zur Differenzierung der Bakterienarten nicht aus.

3.3.1.2 Trennung der Mischpopulation durch DNS-Färbung

Da durch die *in situ*-Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden eine durchflußzytometrische Identifizierung und Quantifizierung der Populationsanteile auf die exponentiellen Wachstumsstadien beschränkt war, wurde die Differenzierung der Stämme in Mischkulturen bei verschiedenen Wachstumsphasen anhand von DNS-Färbung untersucht.

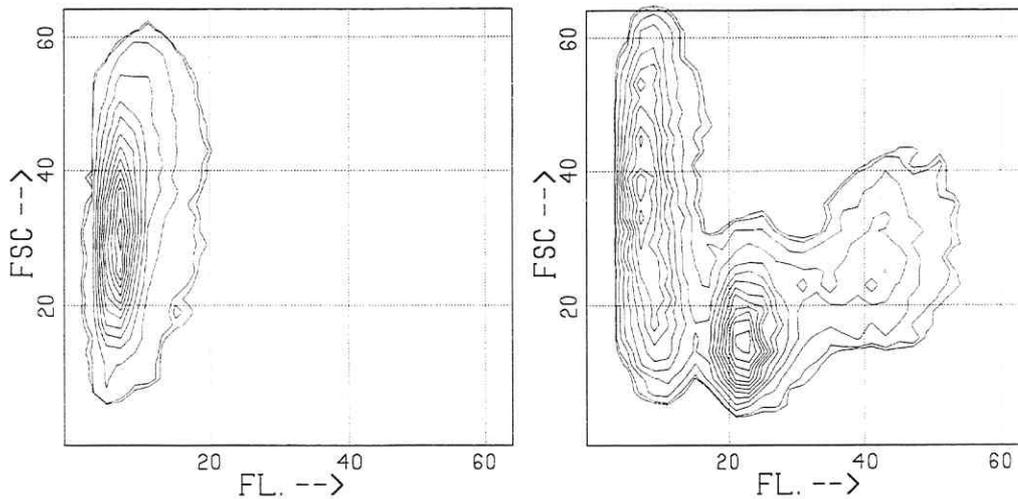


Abb. 29: Zweiparametrische Differenzierung einer Mischkultur durch Fluoreszenz- und Streulichtsignale. Contour-Plots von *Ralstonia eutropha* JMP134 (linkes Bild) und einer Mischkultur (rechtes Bild) nach DAPI-Färbung und durchflußzytometrischer Messung; Anregung: UV-Multilinie bei einer Leistung von 400 mW.

Durch die unterschiedlichen FSC- und Fluoreszenzsignale waren beide Stämme in der Mischkultur nach zweiparametrischer Messung zu differenzieren, wie es die Abb. 29 darstellt. Die Zellen von *Ralstonia eutropha* JMP134 hatten ein geringeres DNS-Fluoreszenzsignal und ein größeres FSC-Signal als *Acinetobacter*-Zellen. Bei der Population von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V sind in der zweiparametrischen Darstellung (Abb. 29, rechtes Bild) auch Zellen mit doppeltem DNS-Gehalt zu sehen. Unterschiedliche DNS-Gehalte (c_1 -, c_2 -Zustand) konnte bei der Population von *Ralstonia eutropha* JMP134 bei Mischkulturexperimenten nicht exakt aufgelöst werden.

Ergebnisse

Es wurde getestet, inwieweit eine Differenzierung der Populationen anhand der DNS-Färbung für alle Proben aus einem vollständigen Kultivierungsverlauf möglich ist. Dazu wurden Zellproben aus der *batch*-Kultivierung mit Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle mit dem DNS-Farbstoff DAPI gefärbt und anschließend durchflußzytometrisch gemessen.

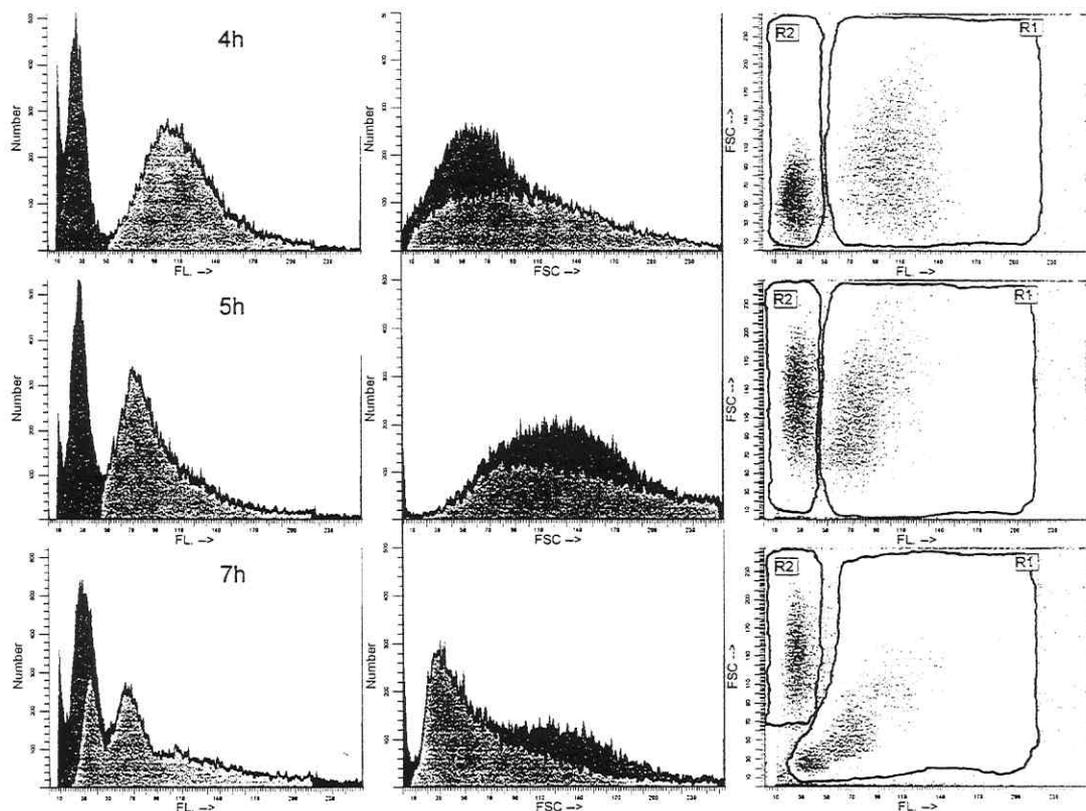


Abb. 30: FSC-, Fluoreszenzsignal- und *Dot-Plot*-Darstellung der Proben 4h, 5h und 7h (von oben nach unten) einer Mischkultur nach *batch*-Kultivierung mit dem Substrat Acetat. Die zytometrische Messung der Mischpopulation erfolgte nach DAPI-Färbung. In den *Dot-Plot*-Bildern wurde die Kultur von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V (jeweils in der Region R1) hellgrau, die Kultur von *Ralstonia eutropha* JMP134 (R2) dunkelgrau markiert, anschließend wurden die Markierungen auf die einparametrischen Darstellungen (FSC und FL) rückprojiziert. Anregung: UV-Multilinie bei 400 mW Leistung.

Neben den gezeigten Proben in der Abb. 30, konnten beide Populationen in allen Stadien der *batch*-Kultur differenziert werden, auch wenn sich die Signalfächen in der einparametrischen Darstellung überlappten (siehe FSC-Plot). Zellen von *Acinetobacter calcoaceticus*

69-V zeigten deutliche Unterschiede im Fluoreszenzsignal bei den einzelnen Wachstumsphasen. Das DNS-Fluoreszenzsignal war jedoch stets größer als das Signal der *Ralstonia*-Population. Aus den Regionen (R1,2) wurde die prozentuale Häufigkeitsverteilung der beiden Populationen in der Mischung ermittelt.

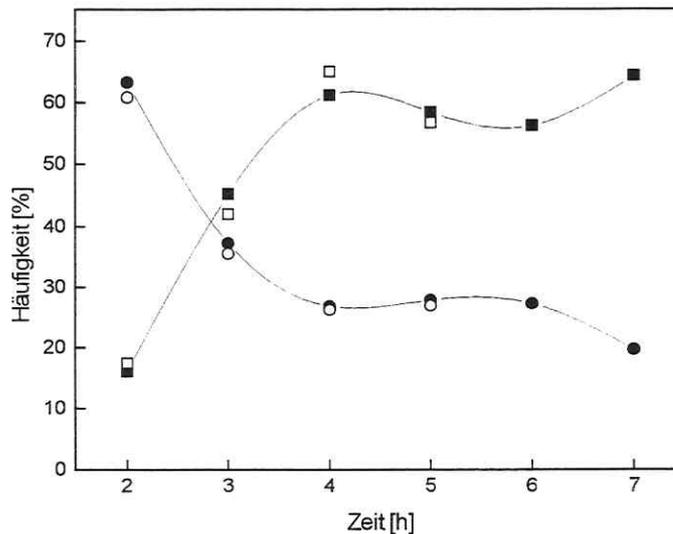


Abb. 31: Häufigkeitsverteilung von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V (■) und *Ralstonia eutropha* JMP134 (●) in einer *batch*-Kultur (0,5 % Acetat). Nach der DAPI-Färbung der Mischung erfolgte die durchflußzytometrischer Messung. Im Vergleich dazu Daten, die aus einem Hybridisierungsexperiment mit CY3/CY3.5-markierten Sonden (□,○) ermittelt wurden (siehe auch Abb. 28).

Abb. 31 zeigt die prozentualen Häufigkeiten der beiden Bakterienstämme, die aus Auswertungen der DNS-Messung (wie bei Abb. 30 gezeigt) gewonnen wurden. Bei 80-88 % der detektierten Signale in den Regionen (R1 und R2, Abb. 30) handelte es sich um bakterielle Zellen. Der fehlende Anteil setzte sich aus Rauschsignalen, Schmutzpartikeln und Zellaggregaten zusammen, die nicht in den Regionen um die bakteriellen Populationen erfaßt worden waren. Bei Häufigkeitsanalysen späterer Mischkulturexperimente wurde eine Standardisierung durch ein Grundfenster bzw. eine Region in der zweiparametrischen Darstellung eingeführt. Rausch- und andere Fehlsignalanteile (sehr große Signale durch

Zellaggregate) konnten somit von den echten Zellereignissen separiert werden. Aus der Standardisierung resultierten Signalereignisse in den beiden Regionen, die sich zu 100 % addierten (siehe Abb. 32 und 33).

Die prozentuale Häufigkeit von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V nahm mit dem Kultivierungsverlauf von anfänglich 16 % auf 60 % zu (Abb. 31). Im gleichen Maß verringerte sich prozentuale Häufigkeit des Substratkonkurrenten. Drei Stunden nach dem Animpfen des *batch*-Versuches hatte *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V das prozentuale Niveau von *Ralstonia eutropha* JMP134 erreicht, der zu Beginn des Versuches einen Anteil von 63 % an der gesamten Population hatte. Nach vier Stunden änderte sich die prozentuale Zusammensetzung der Mischpopulation nicht mehr. Die Häufigkeitsverteilung, die durch die DNS-Färbung und Differenzierung gewonnen wurde, zeigte eine deutliche Übereinstimmung mit Werten der Proben, die aus den Hybridisierungsexperimenten bestimmt wurden. Eine maximale Abweichung von 4,3% wurde berechnet.

3.3.2 Versuche mit Phenol als Kohlenstoff- und Energiequelle

3.3.2.1 Experimente im Chemostaten

Es wurden drei unterschiedliche Ansätze von Chemostat-Experimenten durchgeführt, in denen beide Stämme gemischt wurden. Phenol ($S_0 = 1\text{g/l}$) als Substrat diente als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle bei konstanten Durchflußraten von $D = 0,08 - 0,1\text{ h}^{-1}$. Die Unterschiede in den Kultivierungen ergaben sich durch den Wechsel des im Chemostat kultivierten Stammes mit der zugesetzten Population, die aus einer *batch*-Kultivierung mit 200 mg/l Phenol stammte, außerdem wurde die Menge des Inokulums variiert. Die Identifizierung und die Dynamik von Proben der Mischpopulation wurden durch Fluoreszenzmikroskopie nach *in situ*-Hybridisierung mit spezifischen Sonden (REU und ACA) sofort verfolgt. Eine durchflußzytometrische Messung zur Bestimmung der einzelnen Populationsanteile erfolgte nach der Färbung der bakteriellen DNS mit dem Farbstoff DAPI. Vorausgegangen waren Versuche zur Differenzierung der unterschiedlichen Signale (FL- und FSC), die bei der DNS-Analyse der beiden Bakterienstämme gemessen wurden. Die Populationsanteile der Mischkultur wurden mit Hilfe der Software WinList und IsoContour bestimmt.

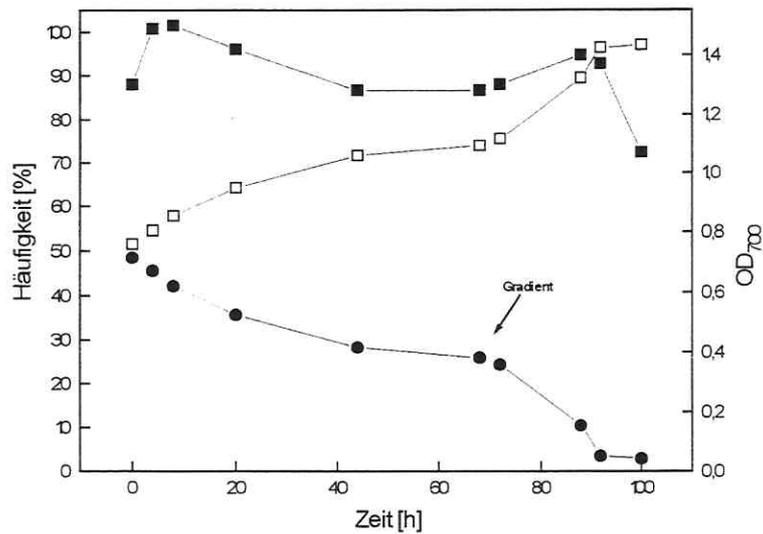


Abb. 32: Prozentuale Häufigkeitsverteilung einer Mischkultur im Chemostaten. Biomasse (■) und der Anteil von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V (□) und *Ralstonia eutropha* JMP134 (●), der durchfußzytometrisch bestimmt wurde. 500 ml Kulturflüssigkeit von *A. calcoaceticus* wurden aus dem Chemostat abgelassen und mit einer *batch*-Kultur von *Ralstonia eutropha* JMP134 auf das ursprüngliche Volumen von $V = 1$ l aufgefüllt ($t = 0$ h). Die Durchflußrate war bis zum Zeitpunkt $t = 72$ h konstant ($D = 0,1 \text{ h}^{-1}$). Im Zeitraum $\Delta t = 72\text{-}100$ h wurde ein Geschwindigkeitsgradient (Erhöhung der Durchflußrate um $\Delta D = 0,012 \text{ h}^{-1}$ in Intervallen von $\Delta t = 2$ h) angelegt (Pfeil).

Die zugesetzte Kultur von *Ralstonia eutropha* JMP134 wurde über einen Zeitraum von 100 Stunden aus dem Chemostaten ausgetragen (Abb. 32). Der initiale 50 %ige Anteil an der Mischkultur verringerte sich nach 72 Stunden auf 22,3 %, eine weitere Abnahme auf Werte unter 4 % folgte. Zum Zeitpunkt $t = 72$ h wurde die Durchflußrate graduell erhöht, als Folge nahm der Auswaschprozeß von *Ralstonia eutropha* JMP134 an Geschwindigkeit zu. Die Rausch- und Fehlsignalanteile bei dieser Messung betragen weniger als 8 %, somit konnten über 92 % der gemessenen Signale den Bakterien zugeordnet werden (vor der Standardisierung der Werte auf 100 %).

Bei einem zweiten Versuch wurde der Stamm *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V zu einer stationären Kultur ($D = 0,08 \text{ h}^{-1}$) von *Ralstonia eutropha* JMP134 zugesetzt.

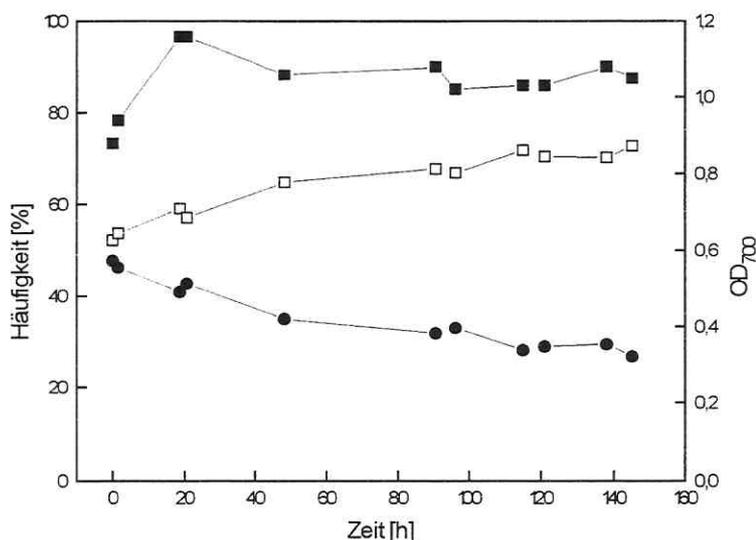


Abb. 33: Prozentuale Häufigkeitsverteilung einer Mischkultur bei kontinuierlicher Kultivierung. Biomasse (■) und Häufigkeitsverteilung von *Ralstonia eutropha* JMP134 (●) und *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V (□) nach zytometrischer Messung. Die Kultur von *A. calcoaceticus* wurde nach einer *batch*-Kultivierung dem Chemostat zugesetzt (Verhältnis 1:1). Das Arbeitsvolumen des Chemostaten betrug $V = 1$ l. Die Durchflußrate war über den Versuchszeitraum konstant ($D = 0,08 \text{ h}^{-1}$).

Nach zytometrischer Quantifizierung (Abb. 33) zeigte sich, daß sich der hinzugegebene Stamm *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V gegenüber *Ralstonia eutropha* JMP134 über einen Zeitraum von $\Delta t = 140$ h durchsetzte ($t_0 = 51$ %, $t_{140} = 72$ %). Die Biomasse nahm im Zeitraum $\Delta t = 0-15$ h gering zu und blieb über den weiteren Versuchsverlauf konstant.

In einem dritten Versuch wurde die Menge des Inokulums von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V, der zu einer stationären Kultur von *Ralstonia eutropha* JMP134 zugesetzt wurde, minimiert. Ca. 100 ml einer *batch*-Kultur von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V wurden zu 1000 ml Kulturflüssigkeit im Chemostaten zugesetzt. Abb. 33 zeigt, daß sich der Stamm *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V auch bei niedrigem Animpftiter gegenüber dem anderen Stamm durchsetzte. Fünfzig Stunden nach der Zugabe von *A. calcoaceticus* 69-V erfolgte die quantitative Umkehrung der Populationsverhältnisse im Chemostat. Die Biomasse der Mischkultur nahm während der kontinuierlichen Kultivierung gering ab. Phenol wurde durch das Animpfen mit einer nicht-stationären *batch*-Kultur von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V in das System eingetragen. Die Phenolkonzentration im Chemostat stieg kurzzeitig auf 80 mg/l an.

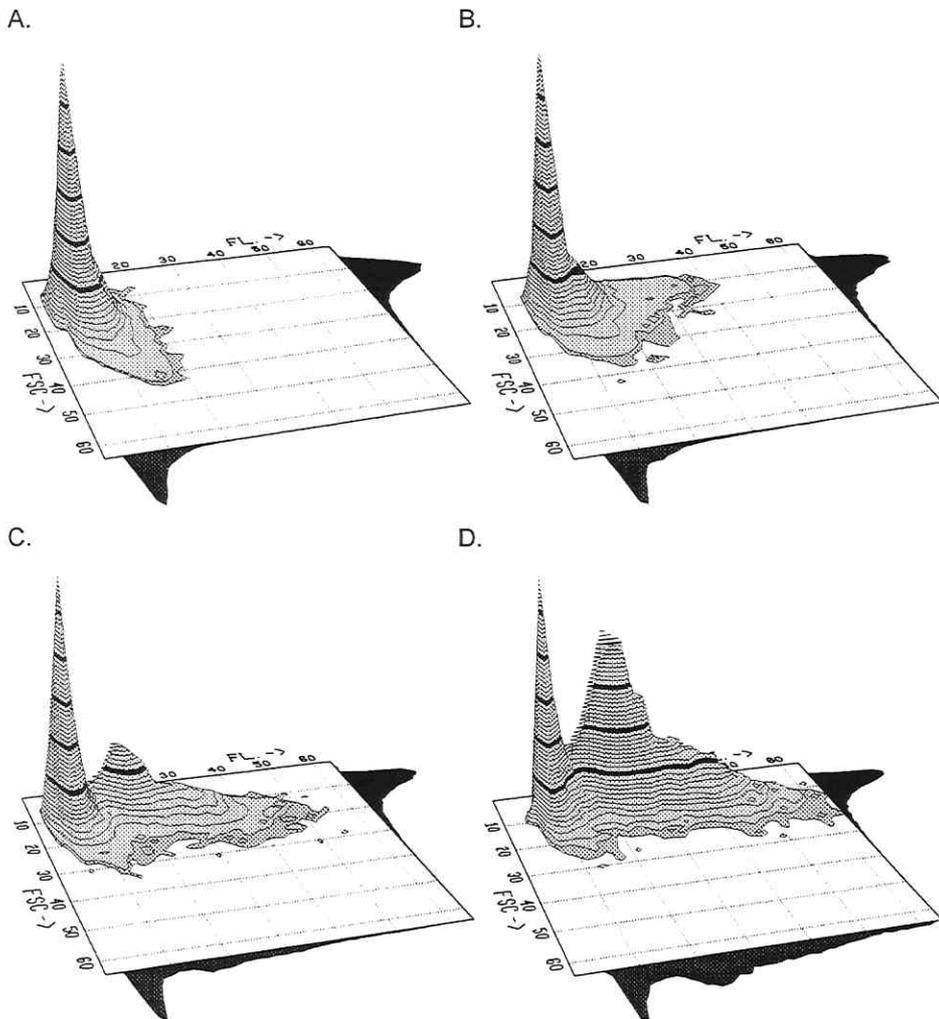


Abb. 34: 3-D-Darstellung (zweidimensionaler *Contour-Plot* mit DNS-Fluoreszenz [FL], Vorwärtsstreulicht [FSC] und zusätzlicher Z-Achse: Zellzahl) von verschiedenen Proben einer Mischkultur.
 A. DNS-Fluoreszenz- und Streulichtsignale von *Ralstonia eutropha* JMP134 (Kultivierung im Chemostat $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$, $V = 1 \text{ l}$), vor Zugabe von 100 ml einer Kultur von *A. calcoaceticus* 69-V (*batch*-Kultivierung). B. 23 Stunden nach dem Animpfen mit *A. calcoaceticus* 69-V. C. Situation nach 48 Stunden und D. nach 55 Stunden.

Abb. 34 zeigt, die Dynamik der Fluoreszenz- und Streulichtsignale von beiden Populationen während des Versuchszeitraums. Zellen von *Ralstonia eutropha* JMP134 zeigten 23 Stunden nach dem Animpfen mit *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V eine geringe Abnahme im FSC-Signal. Nach 48 Stunden sieht man die sich durchsetzende Kultur von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V deutlich als zweiten Signalberg in der 3-D-Darstellung. Der Anteil der *Ralstonia*-Population nahm stetig ab ($t_0 = 98 \%$ auf $t_{55} = 37 \%$), während der prozentuale Anteil der konkurrierenden Population anstieg.

3.3.2.2 Modellierung

Bei unabhängigem Wachstum von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V (A) und *Ralstonia eutropha* JMP134 (R) im Chemostaten gelten nach Monod (1949) folgende Gleichungen:

Für die Wachstumsraten

$$(1) \quad \mu_A = \mu_{\max A} * \frac{S}{K_{SA} + S}$$

$$(2) \quad \mu_R = \mu_{\max R} * \frac{S}{K_{SR} + S}$$

für die Biomasse

$$(3) \quad \frac{dX_A}{dt} = 0 - D X_A + \mu_A X_A$$

$$(4) \quad \frac{dX_R}{dt} = 0 - D X_R + \mu_R X_R$$

sowie für die Substratkonzentration

$$(5) \quad \frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{\mu_A X_A}{Y_A} - \frac{\mu_R X_R}{Y_R}$$

Mit Hilfe dieser Gleichungen läßt sich das Verhalten von zwei Arten im Chemostaten simulieren, wobei als Voraussetzung zwei charakteristische Größen für das Wachstum (maximale Wachstumsrate μ_{\max} sowie die halbmaximale Geschwindigkeitskonstante K_S) bekannt sein müssen. Für *Ralstonia eutropha* JMP 134 sind Werte von $\mu_{\max} = 0,4 \text{ h}^{-1}$ und $K_S = 60 \text{ }\mu\text{M}$ für den meta-Weg (einschließlich dem ortho-Weg) publiziert (Müller und Babel, 1995, 1996). Für *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V sollten diese Werte mit Hilfe einer Modellierung der Mischkulturexperimente abgeschätzt werden. Dabei wurden die Werte K_S und μ_{\max} für die Population von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V bei der Simulation variiert, bis es zu einer Übereinstimmung von Ergebnissen der Modellierung (Auswaschprozeß eines Mikroorganismus) mit den experimentell ermittelten Daten (Abb. 36) kam.

Zur Modellierung der Mischkulturexperimente im Chemostaten wurde die Software ISIM 2.06 (Snape et al., 1995) benutzt. Da sich aus den experimentellen Daten das Auswaschen eines Stammes zeigte, wobei Phenol als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle vollständig

assimiliert wurde und Zwischenprodukte im Kulturmedium nicht nachweisbar waren, wurde eine Konkurrenz der Mikroorganismen modelliert.

Nach den *batch*- und *transient-state*-Experimenten (3.1.2.1 und 3.1.2.2) wurde bei der ersten Simulation für die Kultur von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V eine maximale Wachstumsrate von $\mu_{\max} = 0,7 \text{ h}^{-1}$ sowie ein gleichgroßer K_S -Wert wie für *Ralstonia eutropha* JMP 134 ($K_S = 60 \text{ }\mu\text{M}$, Abb. 35) angenommen.

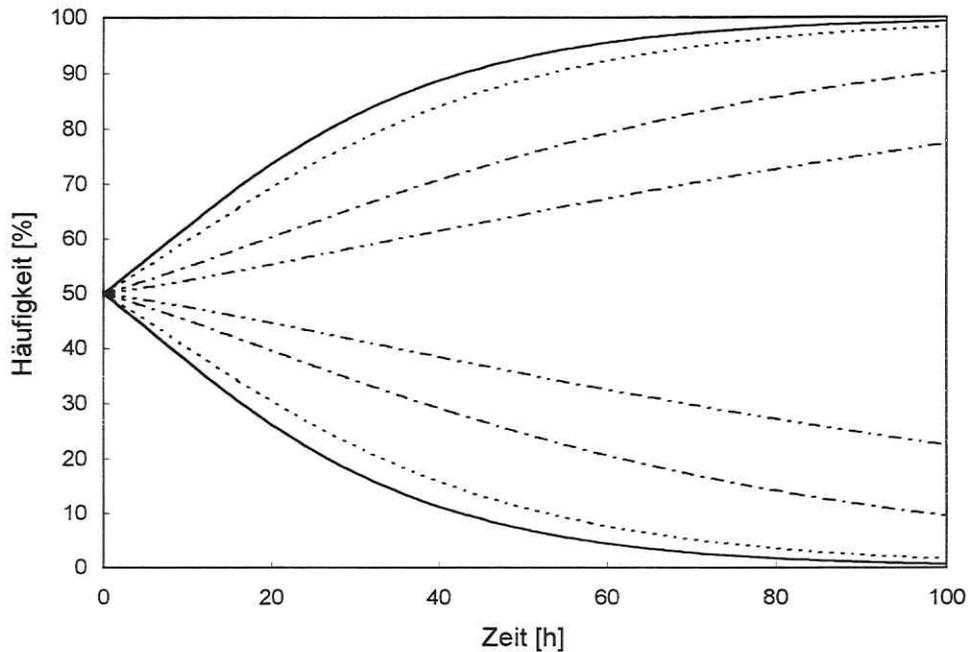


Abb. 35: Kompetitionen im Chemostaten bei unterschiedlichen Wachstumsparametern der *Acinetobacter*-Kultur. Als Parameter für die Kultur von *A. calcoaceticus* wurden eingesetzt: (—) $\mu_{\max} = 0,7 \text{ h}^{-1}$, $K_S = 60 \text{ }\mu\text{M}$; (- - -) $\mu_{\max} = 0,6 \text{ h}^{-1}$, $K_S = 60 \text{ }\mu\text{M}$; (— · —) $\mu_{\max} = 0,65 \text{ h}^{-1}$, $K_S = 70 \text{ }\mu\text{M}$; (· · ·) $\mu_{\max} = 0,67 \text{ h}^{-1}$, $K_S = 95 \text{ }\mu\text{M}$. Weitere Parameter: $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$; Volumen des Fermenters $V = 1 \text{ l}$, $S_0 = 1 \text{ g/l}$, Ertragskoeffizient für beide Arten $Y_{X/S} = 0,75$; *Ralstonia eutropha* JMP134: $\mu_{\max} = 0,4 \text{ h}^{-1}$, $K_S = 60 \text{ }\mu\text{M}$. Als initialer Wert ($t = 0 \text{ h}$) wurde eine Biomassekonzentration von $0,5 \text{ g/l}$ für beide Stämme angenommen.

Alle Kurven der Abb. 35 stellen das Durchsetzen eines Mikroorganismus über den Versuchszeitraum dar, während der Konkurrent aus dem System ausgetragen wird. Aus den Unterschieden bei den einzelnen Simulationen resultieren unterschiedliche Geschwindigkeiten, mit der sich eine Population gegenüber dem Konkurrenten durchsetzt. Bei Wachstumsparametern von $\mu_{\max} = 0,67 \text{ h}^{-1}$ und $K_S = 95 \text{ }\mu\text{M}$ für *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V zeigten sich die größten Übereinstimmungen mit den gemessenen Daten (Abb. 36).

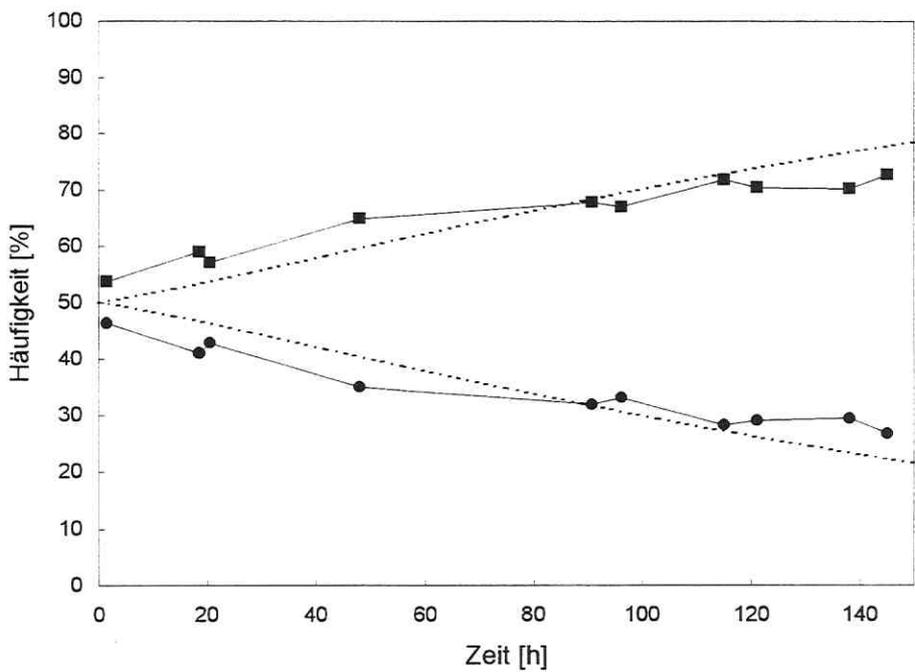
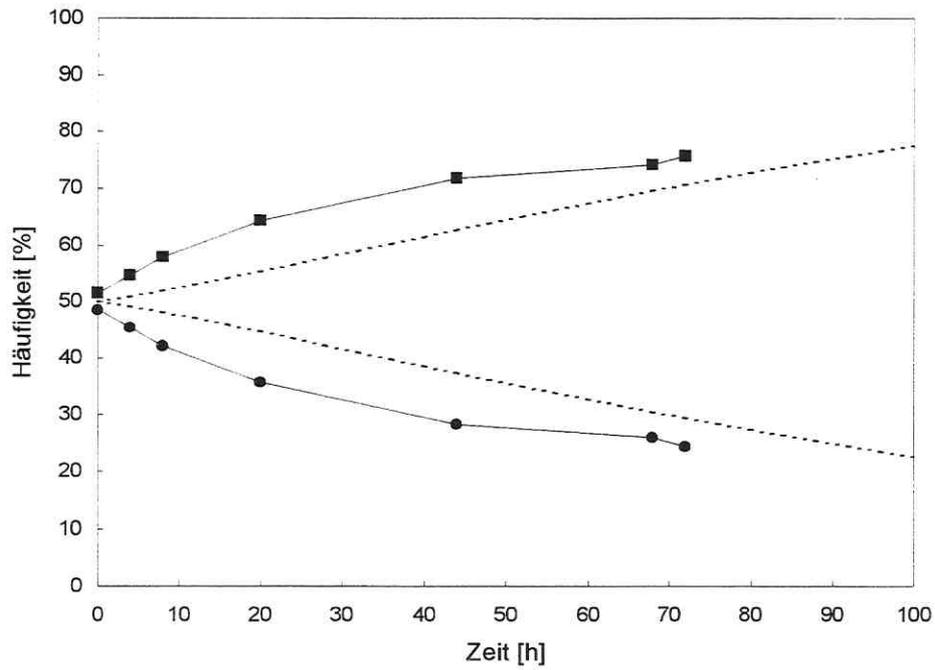


Abb. 36: Vergleich von gemessenen Daten mit der modellierten Konkurrenz beider Stämme. Oberes Bild kontinuierliche Kultivierung bei $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$, unteres Bild $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$, *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V (■) $\mu_{\text{max}} = 0,67 \text{ h}^{-1}$, $K_S = 95 \text{ }\mu\text{M}$; *Ralstonia eutropha* JMP134 (●) $\mu_{\text{max}} = 0,4 \text{ h}^{-1}$, $K_S = 60 \text{ }\mu\text{M}$ (siehe auch Abb. 32, 33).

Abb. 36 zeigt den Vergleich von modellierten zu den gemessenen Daten bei zwei kontinuierlichen Kultivierungen, die sich in den Durchflußraten unterschieden. Bei der zweiten Kultivierung mit einer Durchflußrate von $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$ sind die auftretenden Unterschiede nur minimal, während beim ersten Experiment im Chemostaten sich geringe Unterschiede im Anfangsbereich (bis $t = 50 \text{ h}$) ergeben. Zur Abschätzung der Wachstumsparameter für die sich durchsetzende Kultur von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V eignete sich die Modellierung trotz der auftretenden Differenzen. Generell waren minimale Schwankungen in den Durchflußraten über den Versuchszeitraum nicht vollständig auszuschließen. Außerdem zeigt die Modellierung den idealisierten Zustand einer Kinetik, die von einem vollständig unabhängigen Wachstum der beiden Mikroorganismen ausgeht, was unter den Versuchsbedingungen im Chemostaten nicht uneingeschränkt gelten muß.

Mit den ermittelten Parametern für *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V und den publizierten Werten von *Ralstonia eutropha* JMP 134 wurden Wachstumskinetiken nach Monod (1949) berechnet.

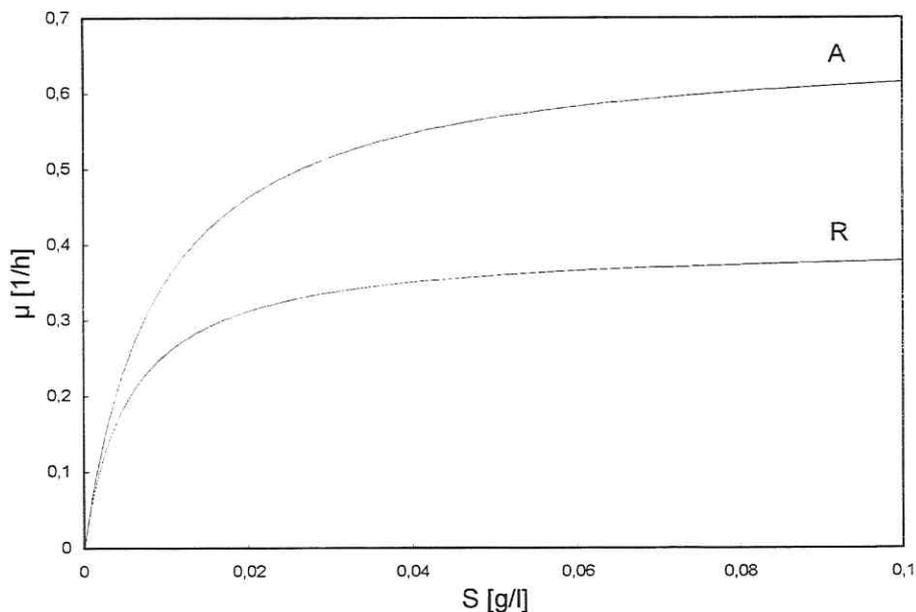


Abb. 37: Monod-Kinetik von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V (A) und *Ralstonia eutropha* JMP134 (R): Abhängigkeit der Wachstumsrate μ von der Substratkonzentration S im Chemostaten.

Obwohl *Ralstonia eutropha* JMP134 die größere Affinität zum Substrat (kleinerer K_S -Wert) bei einer geringeren maximalen Wachstumsrate im Vergleich zu den geschätzten Werten

Ergebnisse

von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V besitzt, zeigt sich bei den Wachstumskinetiken in Abb. 37, daß die Wachstumsrate von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V für jede interne Substratkonzentration im Chemostaten größer war als für *Ralstonia eutropha* JMP134 (auch für kleine Werte von μ , was eine veränderte Achsenskalierung zeigte). Das heißt, es existiert keine Situation bei durchführbaren Kultivierung im Chemostaten ($D > 0,02 \text{ h}^{-1}$), bei der die Kultur von *Ralstonia eutropha* JMP134 einen Wachstumsvorteil gegenüber dem Konkurrenten hätte.

4. Diskussion

4.1 Populationsdynamik bei *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V

4.1.1 Charakterisierung einzelner Zellen bei *batch*-Versuchen mit dem Substrat Acetat

Bei der durchflußzytometrischen Messung von *Acinetobacter*-Zellen aus *batch*-Experimenten wurden Streulicht- und Fluoreszenzsignale von einzelnen Zellen nach der *in situ*-Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden detektiert und quantifiziert. Da Änderung in der Signalstärke bei einer einzelnen Zelle sehr klein waren, wurde die Dynamik der Signale über der gesamten Population charakterisiert (Abb. 5). Die Ergebnisse aus Experimenten mit *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V zeigten die typische rRNS-Dynamik einer Population während der einzelnen Phasen bei der *batch*-Kultivierung (Abb. 9). Nach dem Animpfen des Mediums mit der Kultur nahm der rRNS-Gehalt der Zellen sofort zu, während der beginnenden exponentiellen Wachstumsphase wurde ein maximaler Wert ($t = 3\text{h}$) erreicht. Im weiteren Versuchsverlauf sank der rRNS-Gehalt der Zellen wieder auf das Ausgangsniveau. Während der beginnenden exponentiellen Wachstumsphase war die Wachstumsrate der *Acinetobacter*-Population maximal ($\mu_{\text{max}} = 0,94\text{ h}^{-1}$). Im rRNS-Gehalt spiegelt sich die Geschwindigkeit der Vermehrung wider. Die Dynamik des rRNS-Gehaltes einer Population ist daher für alle *batch*-Kultivierungen ähnlich, wobei die Amplitude (der maximal erreichbaren rRNS-Menge) variiert.

Bei Bakterien korreliert die Menge an zellulären Makromolekülen mit der spezifischen Wachstumsrate (Schaechter et al., 1958). Dies trifft sowohl für die Proteinmenge als auch für den RNS-Gehalt zu (Maaløe und Kjeldgaard, 1966). Die Linearität dieser Korrelation beruht darauf, daß mit steigender Proliferationsrate eine erhöhte Synthese-Rate von Zellsubstanz benötigt wird. Bei der Zunahme der zytoplasmatischen Substanz existiert mit ca. 20 Aminosäuren pro Sekunde eine natürliche Grenze bei der Elongation einer Polypeptid-Formation pro Ribosom (Engbaek et al., 1973). Daher muß in schnell wachsenden Zellen die Zahl der Ribosomen in Proportion mit der Zellmasse zunehmen (Kjeldgaard und Kurland, 1963; Gausing, 1977). Dies bedeutet, daß sich der bakterielle rRNS-Pool in zwei funktionelle Einheiten bei der Synthese von Zellsubstanz spaltet. Eine Fraktion sorgt für die Erhaltung (*turn-over*) sowie für die Zunahme des rRNS-Pools (Synthese von ribosomalen Proteinen, RNS-Polymerase und von Proteinen zur Transkription der rDNS-Sequenzen), die andere Fraktion ist für die Synthese der zur Vermehrung benötigten zellulären Proteine verantwortlich. Die Regulation dieses Prozesses

stellt ein komplexes Netzwerk mit vielen Parametern dar, bei dem die Synthese der RNS-Polymerase eine entscheidende Rolle für die Produktion der Ribosomen spielt (Bremer, 1975).

Die hier gezeigte Nutzung der *in situ*-Hybridisierung zur relativen Quantifizierung des rRNS-Gehaltes ist unter Anwendung von Fluoreszenzmikroskopie und Bildauswertung für zahlreiche Bakterienspezies publiziert worden (DeLong et al., 1989; Kemp et al., 1993; Poulson et al., 1993; Ruimy et al., 1994; Boye et al., 1995). Mit der Durchflußzytometrie sind bei hybridisierten Zellen von *Escherichia coli* und *Pseudomonas cepacia* (*batch*-Experimente) rRNS-Gehalte bestimmt und mit einem weiteren rRNS-spezifischen Farbstoff verifiziert worden (Wallner, et al., 1993).

4.1.1.1 Quantifizierung der sondenvermittelten Fluoreszenz

Unter der Voraussetzung der stöchiometrischen Bindung der markierten Oligonukleotidsonde an die rRNS-Zielsequenz ist die sondenvermittelte Fluoreszenz ein Maß für den rRNS-Gehalt einer Zelle. Für die stöchiometrische Bindung der markierten Sonden muß neben einer entsprechenden Sondenkonzentration eine ausreichende Permeabilität der bakteriellen Membran vorliegen. Bei dem hier benutzten Protokoll der *in situ*-Hybridisierung für gram-negative Bakterien kann wegen des geringen Molekulargewichts von ca. 6000 Da für einfach markierte Oligonukleotidsonden und des Einsatzes von SDS als Detergenz im Hybridisierungspuffer von einer ausreichenden Permeabilität der Membran ausgegangen werden (Wallner et al., 1993). Eine chemische Vorbehandlung der Zellwand wurde für die benutzten Spezies nicht benötigt.

Bei der durchflußzytometrischen Messung von *Acinetobacter*-Proben aus einer *batch*-Kultivierung und nach Hybridisierung mit der genus-spezifischen, fluorescein-markierten Oligonukleotidsonde (ACA-Fluos) zeigte sich, daß nur bei den Zellen der beginnenden exponentiellen Phase (2-4h) ein eindeutiges FSC- und Fluoreszenz-Signal detektiert werden konnte (Abb. 5). Bei den Proben $t > 4$ h wurden die Zellsignale vom Rauschen überlagert, so daß in den einparametrischen Darstellungen von FSC und Fluoreszenz exponentiell abfallende Kurven (summierte Rauschsignale) resultierten (ähnlich wie bei den Fluoreszenzsignalen der Proben 1h und NON, Abb. 5). Das Rauschen ist dabei aus verschiedenen Komponenten zusammengesetzt, die insgesamt das Verhältnis vom echten Signal zum Hintergrund verschlechtern. Dazu tragen minimale Ströme der Photomultiplier bei, die als elektronisches Rauschen bezeichnet werden. Eine weitere Störgröße entsteht

durch Restlicht aus der räumlichen Umgebung des Meßsystems. Es stammt nicht von den zu vermessenden Zellen, ist aber trotz Verdunklung des Raums für Photo- bzw. Streulicht-Impulse im Photomultiplier verantwortlich. Letzlich kommen partikelvermittelte Fluoreszenz- und Streulicht-Signale hinzu, die sich aus zellulären Signalen wie unspezifischer Farbstoffbindung, Eigenfluoreszenz, Zelltrümmern und Aggregaten sowie aus Schmutzpartikeln ergeben. Alle diese Störgrößen summieren sich zu einem Hintergrund, der geringe Signalstärken durch kleine und/oder minimal fluoreszierende Bakterien überdecken kann. Das Signal-Rausch-Verhältnis wird einerseits durch viele Geräteparameter, andererseits aber auch durch den Markierungsgrad der benutzten Oligonukleotidsonden, durch die Wahl der Farbstoffe sowie deren Excitationen beeinflusst (siehe auch 4.1.1.2 und 4.2.1). Bei den meisten aufgeführten durchflußzytometrischen Messungen ergab sich ein maximales Signal-Rausch-Verhältnis von ca. 1:10, das heißt, die Nachweisgrenze bei einer Meßreihe lag bei ca. 10 % der maximal detektierten Fluoreszenz einer Probe. Für die Messungen der *batch*-Versuche mit der Kohlenstoff- und Energiequelle Acetat, die mit dem älteren System Consort 30 durchgeführt wurden, resultierte eine maximales Verhältnis von 1:12. Dabei wurden fluorescein-markierte Sonden, die mit Licht der Wellenlänge von 488 nm angeregt wurden, benutzt. Teilweise konnte auch ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis erreicht werden (1:15 in Abb. 9).

Neben einem optimalen Signal-Rausch-Verhältnis wäre eine absolute Quantifizierung der Fluoreszenzmoleküle pro Zelle wünschenswert, um verschiedene durchflußzytometrische Meßreihen direkt miteinander vergleichen zu können. Der Zusatz von kommerziell erhältlichen Eichpartikeln eignet sich nicht, da ihr standardisiertes Fluoreszenzsignal ein vielfaches über dem der Bakterien liegt (Signalstärke ist für eukaryontische Zellen entwickelt worden). Neue Techniken zur Einzelmoleküldetektion ermöglichen zwar die exakte Quantifizierung des Markierungsgrades einer Sonde (Rigler, 1995), aber die Quantifizierung gebundener Oligonukleotidsonden innerhalb einer bakteriellen Zelle (in der Größe einer *E. coli* Zelle) gelang noch nicht (Rigler, persönliche Mitteilung).

4.1.1.2 Signalverstärkung

Eine Verstärkung des detektierbaren Fluoreszenzsignals konnte sowohl durch den Einsatz des Farbstoffes CY3 als auch durch die Zugabe von bis zu drei weiteren Oligonukleotidsonden zu dem Hybridisierungsansatz erreicht werden.

Bei der Amplifikation der Fluoreszenz durch den Einsatz alternativer Farbstoffe ist man durch die Benutzung des Argon-Ionen-Lasers als Lichtquelle auf Chromophore beschränkt,

die mit den Laserlinien 488, 514 und 528 nm anregbar sind. Der Indocarbocyaninfarbstoff CY3 besitzt im Vergleich zu Fluorescein eine höhere Fluoreszenzintensität und Photostabilität sowie eine geringere Sensitivität gegenüber dem pH-Wert des Lösungsmittels (Wessendorf und Brelje, 1992; AMERSHAM, Produktinformation). CY3 kann bei einem Excitationsmaximum von 552 nm nicht optimal mit dem Argon-Ionen-Laser angeregt werden. Bei einer Anregung mit 488 nm zeigten sich bei Zellen eines *batch*-Versuches nach Hybridisierung mit ACA-Fluos im Vergleich zu Zellen mit ACA-CY3 nur geringe Unterschiede in den detektierten Intensitäten. Eine Signalamplifikation von 30 % resultierte nach Änderung der Laser-Wellenlänge auf 514 bzw. 528 nm bei den Zellen, die mit einer CY3-markierten Sonde hybridisiert wurden. Obwohl die detektierbare Intensität zunahm und auch Zellen aus der stationären Phase der Kultivierung detektierbar wurden (Abb. 7), verschlechterte sich das Verhältnis vom Rauschen zur maximal detektierten Signalstärke auf 1:9 (Abb. 11). Die aus den spektroskopischen Messungen theoretisch mögliche vierfache Verstärkung der Intensität (Abb. 6) konnte mit dem durchflußzytometrischem System nicht erreicht werden.

Durch den zusätzlichen Einsatz der Eubakteriensonden (EUB₃₃₈) sowie der gruppenspezifischen Sonde (GAM) konnten fast alle Zellen der Proben 1-12h einer *batch*-Kultivierung detektiert werden. Es erfolgte keine vollständig additive Zunahme der Fluoreszenz (Differenz von 18-25 %) nach Zugabe einer weiteren Sondenart (Herrmann et al., 1997), was auch von Lee et al. (1993) und Wallner et al. (1993) beschrieben ist. Dieser Effekt zeigte sich unabhängig von der Markierung der Oligonukleotidsonden für jeden der benutzten Farbstoffe und wird durch Quench-Effekte und durch ein verschlechtertes Signal-Rausch-Verhältnis infolge steigender Sondenkonzentrationen (höhere unspezifische Bindung) verursacht (Wallner et al., 1993). Außerdem wird diese Methode der Signalamplifikation dadurch begrenzt, daß nur limitierte Zielsequenzen auf der rRNS existieren, für die Sonden mit vergleichbarem Hybridisierungsprotokoll benutzt werden können (Amann et al., 1995).

Trotzdem müssen beim Einsatz verschiedener Oligonukleotidsonden die Ergebnisse einer Quantifizierung sorgfältig überprüft werden, da Sonden gleicher Spezifität ein unterschiedliches Bindungsverhalten haben können (Frischer et al., 1996). Dies konnte für die hier benutzten Sonden, insbesondere den Eubakteriensonden und den gruppenspezifischen Sonden, ausgeschlossen werden. Bei den Quantifizierungen der rRNS-Gehalte von Zellen aus einer Versuchsreihe wurden außerdem immer die gleichen Sonden benutzt.

Auf den Einsatz von digoxigenin-markierten Sonden mit anschließendem Antikörpernachweis (Zarda et al., 1991) und auf Polynukleotidsonden, die sich durch Mehrfachmarkierung (markiertes UTP-Derivat) und somit vielfache Amplifikation des Fluoreszenzsignals auszeichnen (Trebesius et al., 1994), wurde verzichtet. Neuere Verstärkungs-

mechanismen, bei denen fluorogene Substrate wie Fluorescein-Tyramid durch enzym-markierte Oligonukleotidsonden aktiviert werden (Lebaron et al., 1997; Schönhuber et al., 1997), wurden ebenfalls nicht benutzt. Durch diese zum Teil indirekten Nachweisverfahren in Verbindung mit der nötigen Vorbehandlung der Zellen (Permeabilisierung) wird eine exakte Quantifizierung des zellulären rRNS-Gehaltes unmöglich.

4.1.2 rRNS- und DNS-Gehalt beim Wachstum auf Phenol

rRNS-Gehalt

Bei den *batch*-Experimenten mit dem Stamm *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V zeigte sich der höchste rRNS-Gehalt in der beginnenden exponentiellen Wachstumsphase zu einem Zeitpunkt ($t = 2$ h), bei dem die Kultur erst 12 % der Kohlenstoff- und Energiequelle verbraucht hatte. Während dieser Phase wuchsen die Zellen mit maximal ermittelbarer Geschwindigkeit, auch die Größe der Zellen (FSC-Signale) war maximal. Hybridisierte *Acinetobacter*-Zellen zeigten nach der Inkubation im Hybridisierungssofen bei 48 °C einen Verlust in der FSC-Signalstärke (Größenreduktion) im Vergleich zu unbehandelten Zellen oder auch DAPI-gefärbten Zellen. Daher wurden für alle weiteren Messungen die FSC-Signale DNS-gefärbter Zellen als Maß für die relative Zellgröße benutzt. In der mittleren exponentiellen Wachstumsphase nahmen die Zellgröße und der rRNS-Gehalt wieder ab. Das gleiche Verhalten ist für *batch*-Kulturen von *E. coli* sowohl bei der Größenverteilung als auch beim rRNS-Gehalt beschrieben und zur Abschätzung der Zellaktivität benutzt worden (Fouchet et al., 1994; Ruimy et al., 1994).

Der bei dem Experiment (Abb. 10 und 11) ermittelte Ertragskoeffizient ist mit $Y_{X/S} = 0,9$ ($g_{\text{BTM}}/g_{\text{Phenol}}$) höher als Werte, die aus den *transient-state*-Versuchen ($Y_{X/S} = 0,75$) ermittelt wurden. Der Zusatz von 0,01 % Hefeextrakt zum Kulturmedium für die *batch*-Versuche, der als zusätzliche Kohlenstoff- und Energiequellen genutzt werden konnte, kann diese Abweichung bei den ermittelten Werten erklären. Dazu tragen auch die nicht exakt definierbaren Wachstumsbedingungen während der *batch*-Kultivierung bei (siehe auch 4.2.2.1).

Bei der kontinuierlichen Kultur zeigte sich für den Stamm *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V die mehrfach beschriebene lineare Korrelation zwischen Wachstumsrate und Ribosomen-gehalt (DeLong et al., 1989; Kemp et al., 1993; Kerkhof und Ward, 1993; Poulson et al., 1993; Wallner et al., 1993; Boye et al., 1995; Übersicht bei Kemp, 1995). Sie war in dem Bereich der spezifischen Wachstumsrate von $\mu = 0,05 - 0,48 \text{ h}^{-1}$ offensichtlich und wurde durch eine sprunghafte Verdopplung des rRNS-Gehaltes im Bereich der Wachstumsrate

von $\mu = 0,5 \text{ h}^{-1}$ durchbrochen. Diese sprunghafte Zunahme zeigte sich auch in der Zellgröße. Die Zellen dieses Versuches wurden mehrmals durchflußzytometrisch analysiert; auch bei der Fermentation traten keine Unregelmäßigkeiten auf, die diese Ergebnisse erklären können. Wahrscheinlich wurde durch den sehr steilen Geschwindigkeitsgradienten, der nur eine einstündige Anpassung an den neuen Zustand zuließ, die starke Zunahme des rRNS-Gehaltes verursacht. Während die oben genannten Autoren meist nährstoffreiche Medien und Substrate benutzten, ist in dieser Versuchsreihe mit einem Minimalmedium und einem einzigen Substrat experimentiert worden, welches energiedefizient ist (Müller und Babel, 1994). Diese Beobachtungen sind nicht ohne weitere biochemische bzw. molekulare Untersuchungen zum Metabolismus von Phenol zu klären.

DNS-Gehalt

Bei der durchflußzytometrischen DNS-Messung der Zellen aus einer *batch*-Kultivierung fallen das Inokulum und Proben aus stationären Wachstumszuständen durch vier diskret verteilte Subpopulationen mit unterschiedlichen Chromosomensätzen (c_1 - c_4) auf. In ca. 5 % aller *Acinetobacter*-Zellen werden bis zu vier Chromosomenäquivalente angelegt. Bei den Verteilungen der Zellen mit mehrfachen DNS-Gehalten (c_3 und c_4) könnte es sich auch um doppelte, nicht getrennte Zellen (Doubletten) mit einfachem und doppeltem DNS-Gehalt handeln. Bei der gezeigten Verteilung aller Proben des *batch*-Ansatzes, die alle Zwischenstufen bei den DNS-Gehalten einschloß (Probe 1h und 2h), ist dieses aber unwahrscheinlich. Die Zellpopulation mit den drei Chromosomenäquivalenten lag außerdem eindeutig in dem FSC-Signalberg, der die einfachen Zellen repräsentiert (in Abb. 3 für die c_2 -Zellen gezeigt).

Durch Experimente mit *E. coli* ist belegt, daß die Replikationszeit des Genoms relativ unabhängig von ihrer Wachstumsrate ist (Cooper und Helmstetter, 1968). Für schnell wachsende Zellen (Generationszeit $\tau < 1 \text{ h}$) bedeutet dies, daß sie mehrere Startpunkte der Replikation (*origins*) öffnen, wenn die Summe aus Replikationszeit (C-Zeit) und Postreplikationszeit (Zeit nach der vollendeten Replikation bis zur Zellteilung: D-Zeit) größer wird als die Generationszeit τ (Skarstad et al., 1983, 1985). Eine von der Zellteilung entkoppelte DNS-Synthese mit den charakteristischen multiplen Replikationsgabeln resultiert, der mittlere DNS-Gehalt pro Zelle nimmt zu. Dies trifft für die Zellen von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V zu, die sich im frühen exponentiellen Wachstum befinden ($t = 2 \text{ h}$; $\tau = 55,4 \text{ min}$). Während der späten exponentiellen Phase bei beginnender Limitation der Nährstoffe werden die initiierten Replikationszyklen beendet, die anschließende Zellteilung erfolgt wegen Substratmangel nicht mehr. Es entstehen Sub-

populationen, die das Vielfache des einfachen DNS-Gehaltes pro Zelle aufweisen. Entsprechende DNS-Gehalte lassen sich auch durch den Einsatz von Antibiotika, die die Proteinbiosynthese und letztlich die Zellteilung hemmen, hervorrufen (Steen und Boye, 1980; Steen et al., 1981; Skarstad und Boye, 1993).

Bei der kontinuierlichen Kultivierung der Zellen im Chemostaten zeigte sich eine andere Verteilung der Population. Mit steigender Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit entsteht aus zwei bzw. drei Subpopulationen (Zellen mit c_1 -, c_2 - und c_3 -Gehalten) der *Acinetobacter*-Kultur eine Population, deren Gehalt zwischen c_1 und c_2 liegt. Dies bedeutet, daß sich bei der Mehrheit der Zellen die DNS ab einer Wachstumsrate von $\mu = 0,5 \text{ h}^{-1}$ ständig repliziert und sich die Kultur in einem Stadium hoher Wachstumsaktivität befindet. Bei dieser Kultivierungsart der Zellen mit Limitation der Kohlenstoff- und Energiequelle prägt sich durch die langsame Steigerung der Wachstumsrate keine vollständig entkoppelte DNS-Synthese aus. Vielmehr zeigt sich die Tendenz zu einer einheitlichen *Acinetobacter*-Populationen bei höheren Wachstumsraten ($\mu > 0,5 \text{ h}^{-1}$). Dazu korrespondiert der gemessene Anstieg des rRNS-Gehaltes pro Zelle.

Insgesamt wird durch die Anwendung der Durchflußzytometrie und anhand spezifischer DNS-Färbung der Zellen die Differenzierung einer wachsenden Kultur in Subpopulationen möglich. Jeder Subpopulation kann ein unterschiedlicher Zustand im Zellzyklus zugeordnet werden. Bei definierten Wachstumsbedingungen werden unterschiedliche Wachstumsaktivitäten der einzelnen Populationen erkennbar. Dieser Informationsgehalt geht bei einem integralen Meßverfahren verloren, das jeder Zelle einen über die gesamte Population gemittelten Wert zuweist.

4.2 Populationsdynamik bei *Ralstonia eutropha* JMP134

4.2.1 Kinetik bei *batch*-Versuchen mit dem Substrat Acetat

Der Verlauf des rRNS-Gehaltes bei den Zellen von *Ralstonia eutropha* JMP134 während einer *batch*-Kultivierung gleicht den Ergebnissen, die mit dem Stamm *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V gewonnen wurden. Den maximalen Gehalt an rRNS besaßen Zellen von *Ralstonia eutropha* JMP134 während des beginnenden exponentiellen Wachstums ($t = 4 \text{ h}$; Abb. 15). Sowohl der Anstieg bis zu diesem maximalen Wert als auch der Abfall des rRNS-Gehaltes erfolgte mit geringerer Steigung als bei den Zellen von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V. Die Dynamik des rRNS-Gehaltes war kleiner, was sich auch in der um

50 % geringeren maximalen Wachstumsrate des Stammes im Vergleich zu den *Acinetobacter*-Zellen ausdrückt.

Der Verlauf des rRNS-Gehaltes wurde durchflußzytometrisch auch nach Hybridisierungsexperimenten mit fluorescein-markierten Oligonukleotidsonden gemessen. Es traten keine signifikanten Unterschiede durch die verschiedenen Farbstoffmarkierungen auf. Aus der Detektion der Fluoreszenz nach Hybridisierung mit den CY3.5 markierten Sonden resultierte das schlechteste Signal-Rausch-Verhältnis von 1:6 (Rauschen zu max. detektiertem Signal) im Vergleich zu ähnlichen Messungen (Fluos- und CY3-markierte Sonden), was primär durch die nicht optimale Anregung des gekoppelten Farbstoffes CY3.5 erklärt werden kann (Tab. 1).

4.2.2 rRNS- und DNS-Gehalt bei Wachstum auf Phenol

Eine Vielzahl von Mikroorganismen können aromatische Substrate metabolisieren. Eine Voraussetzung für die Verbreitung dieser Fähigkeit ist die Lokalisation der entsprechenden Enzyme auf austauschbaren genetischen Strukturen, den Plasmiden (Pemberton et al., 1979).

Ralstonia eutropha JMP134 zeichnet sich dadurch aus, daß es über zwei komplette Enzymsysteme verfügt, die die Substanz Phenol oxidieren und den aromatischen Ring spalten können. Diese liegen chromosomal codiert vor, außerdem sind Enzyme eines modifizierten ortho-Abbauweges für chlorierte Aromaten auf dem Plasmid pJP4 codiert (Don und Pemberton, 1981, 1985; Streber et al., 1987). Die Populationsdynamik des Stammes wurde in unterschiedlichen Kultivierungsarten charakterisiert.

4.2.2.1 Situation bei der *batch*-Kultivierung

Bei dem durchgeführten *batch*-Versuch (Abb.16) wurde eine maximale Wachstumsrate von $\mu = 0,33 \text{ h}^{-1}$ ermittelt und ein Ertragskoeffizient von $Y_{X/S} = 0,82 \text{ (g}_{\text{BTM}}/\text{g}_{\text{Phenol}})$ bestimmt. Dieser lag etwas höher als die für diesen Stamm publizierten Werte von $Y_{X/S} = 0,7 - 0,75$ (Müller und Babel, 1994, 1996). Die Differenz kann aber durch den Zusatz von 0,01 % Hefeextrakt als zusätzliche Energiequelle bei dieser Kultivierung erklärt werden. Außerdem kann aus *batch*-Experimenten infolge der sich stetig ändernden Wachstumsbedingungen nur eine Abschätzung sowohl der Wachstumsrate als auch des Ertragskoeffizienten vorgenommen werden.

Bei der Dynamik des zellulären rRNS-Gehaltes zeigten sich in der beginnenden exponentiellen Phase (Maximum des rRNS-Gehaltes bei $t = 2$ h, Abb. 17) ähnliche Ergebnisse wie beim Stamm *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V – für die weiteren Wachstumsphasen ergaben sich deutliche Differenzen. In dem Intervall von $\Delta t = 6-11$ h (sogenannte mittlere und späte exponentielle Phase, obwohl hier kein exponentielles Wachstum der Bakterien mehr vorliegt) bildete sich bei der Population von *Ralstonia eutropha* ein einheitliches Niveau im rRNS-Gehalt aus. Während dieser Phase kam es zu einem zweiten Anstieg der Zellgröße (Abb. 18). Dieses zweite Maximum der Zellgröße war aber kleiner als das erste Maximum (bei $t = 3$ h) während der beginnenden exponentiellen Wachstumsphase. Die nochmalige Zunahme der Zellgröße konnte nach Nilrotfärbung der Zellen und fluoreszenzmikroskopischer Analyse durch das Auftreten von drei bis vier Granula PHB (Polyhydroxybuttersäure, ein bakterieller Speicherstoff) pro Zelle bei den Proben 8-10h bestätigt werden.

Die unerwartete Größenzunahme der Zellen bei beginnender Limitation des Substrates ($\Delta t = 8-10$ h) kann mit der Bildung von einem Speicherstoff wie PHB erklärt werden. Die Produktion und auch der Abbau von PHB setzen das Vorhandensein sowie die vorherige Expression von spezifischen Enzymen voraus, wozu ein bestimmter Gehalt an rRNS benötigt wird. Der detektierte konstante zelluläre rRNS-Gehalt (Proben 6-11h) ließe sich so erklären. Ein derartiges rRNS-Plateau für die mittlere exponentielle Wachstumsphase ist auch bei *batch*-Kulturen von *E. coli* mit Vollmedien beschrieben worden (Ruimy et al., 1994), wobei die Autoren dies mit einer konstanten Wachstums- und rRNS-Syntheserate erklären. Aus logarithmischen Auftragungen der hier gewonnenen experimentellen Daten zeigte sich jedoch eindeutig, daß während der sogenannten mittleren exponentiellen Phase die Wachstumsrate abnahm und kein exponentielles, schon gar kein balanciertes Wachstum der Kultur vorlag.

Bei der Messung der Proliferationsaktivität der Zellen (DNS-Messung) zeigten sich zwei unterschiedliche Maxima. Das erste Maximum von Zellen mit doppeltem DNS-Gehalt korrelierte mit einem maximalen rRNS-Gehalt. Das zweite Maximum (ca. 25 % der Zellen mit doppeltem DNS-Gehalt) lag noch in der Phase der maximalen Wachstumsrate der Kultur ($\mu_{\max} = 0,33 \text{ h}^{-1}$ im Intervall $\Delta t = 2-6$ h). Es folgte dem ersten Proliferationsmaximum im Abstand der Generationszeit ($\tau = 2,1$ h) der Kultur, deren Biomassekonzentration sich zu diesem Zeitpunkt fast verdoppelt hatte. Da für eine *batch*-Kultivierung synchronisiertes Wachstum der Zellen ausgeschlossen werden kann, war das erste Proliferationsmaximum durch einen Eintrag von nicht-stationären Zellen aus dem Inokulum vermittelt.

Die zweite Größenzunahme der Zellen trat mit der beginnenden Limitation des Substrates auf. Mit steigender Zellgröße verringerte sich der Anteil der c_2 -Zellen, das heißt, mit der PHB-Synthese nahm die Proliferationsaktivität der Zellen ab. Durch einen Überfluß-Metabolismus (*overflow metabolism*; Babel, 1990, 1992) werden Produkte wie PHB gebildet. Dieser Prozeß ist an einen bestimmten Zellzykluszustand gebunden (Bley und Bogner, 1981; Ackermann et al., 1995). Die beobachtete Produktsynthese bei *Ralstonia eutropha* JMP134 dürfte im Zustand mit einfachem DNS-Gehalt stattfinden.

4.2.2.2 Einfluß der Durchflußrate auf den DNS- und rRNS-Gehalt

Zur Beschreibung des Einflusses der Durchflußrate auf den Gehalt von DNS und rRNS bei *Ralstonia eutropha* JMP134 wurden *transient-state*-Experimente im Chemostaten durchgeführt. Bei diesen Experimenten wurden quasi-stationäre Zustände bei treppenförmig steigenden Durchflußgradienten beprobt, wobei die Wachstumsrate der Kultur der eingestellten Durchflußrate entsprach (Müller et al., 1995). Zwei Versuche wurden gezeigt, die sich durch die Steilheit der Gradienten und dem gewählten Bereich ($0,05 - 0,28 \text{ h}^{-1}$ bzw. $0,17 - 0,32 \text{ h}^{-1}$) unterschieden.

Für den benutzten Stamm ist eine wachstumsabhängige Expression der beiden unterschiedlichen Enzymsysteme für die metabolische Verwertung von Phenol beschrieben: Bei niedrigen Wachstumsraten (bis $\mu < 0,25 \text{ h}^{-1}$) werden die Enzyme des ortho-Weges, bei höheren Wachstumsraten die Proteine des meta-Weges exprimiert, so daß eine maximale Wachstumsrate von $\mu = 0,4 \text{ h}^{-1}$ erreicht werden kann (Müller und Babel, 1995, 1996).

In dem ersten gezeigten Experiment (Abb.19) konnte eine maximale Wachstumsrate von $\mu = 0,28 \text{ h}^{-1}$ erreicht werden, bevor es zum Auswaschprozeß aus dem Reaktor kam, indem die Kultur chemostatisch vermehrt wurde (ab $\mu > 0,28 \text{ h}^{-1}$ lag kein stationärer Zustand mehr vor). Der Bereich spiegelt die maximal erreichbare Wachstumsrate des ortho-Weges wider, der meta-Weg konnte infolge des sehr steilen Gradienten nicht induziert werden. Bis zu der Wachstumsrate von $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$ zeigte sich eine lineare Korrelation von Wachstumsrate und rRNS-Gehalt. Mit steigender Wachstumsrate nahmen die Zellgröße und der mittlere DNS-Gehalt pro Zelle zu, der sich zwischen dem einfachen und doppelten Gehalt bewegte (Abb. 21). Der beginnende Auswaschprozeß zeigte sich durch die Abnahme des DNS-Gehaltes, der Zellgröße und des rRNS-Gehaltes noch deutlicher als im Verlauf der optischen Dichte. Im Chemostaten kam es zu einem Anstieg der Phenolkonzentration.

Bei der zweiten kontinuierlichen Kultivierung (Abb. 22) wurde während des Wechsels der Phenolabbauwege ein sehr kleiner Geschwindigkeitsgradient benutzt. Infolge der Expression von Enzymen des meta-Weges kam es zu einer beobachtbaren Gelbfärbung des

Mediums (verursacht durch Hydroxy-muconat-semialdehyd). Der Wechsel wurde ebenfalls durch die Detektion der Leitenzyme der beiden Abbauewege dokumentiert (Müller und Babel, 1995; Maskow und Babel, 1997). Im chemostatisch genutzten Reaktionsgefäß kam es während der Umschaltphase zu einem kurzzeitigen Anstieg der Phenolkonzentration, so daß dieser Zustand nur bedingt als stationär eingestuft werden kann. Das detektierte Wärmetönungssignal, das während des ortho-Weges linear mit der Wachstumsrate der Kultur korrelierte, stieg mit dem Wechsel der Abbauewege deutlich auf ein neues Niveau (Maskow und Babel, 1997). Dies deutet auf eine ineffizientere Nutzung des Substrates beim meta-Weg hin. Der Schaltprozeß wurde auch im Verlauf des zellulären rRNS-Gehaltes sichtbar, es resultierte aber keine sprunghafte Erhöhung des rRNS-Gehaltes. Bei Durchflußraten von $0,24 - 0,26 \text{ h}^{-1}$ zeigte sich mit der geringen Abnahme des zellulären rRNS-Gehaltes eine Unregelmäßigkeit in der linearen Korrelation zur Wachstumsrate.

4.2.2.3 Einfluß eines Formiat-Gradienten auf den DNS- und rRNS-Gehalt

Die Versuchskonzeption beim Zusatz einer zweiten Energiequelle zu einer laufenden kontinuierlichen Kultivierung mit konstanter Durchflußrate entspricht dem *Auxiliar*-Substrat-Konzept (Übersichtsartikel bei Babel et al., 1993). Phenol ist als chemoorgano-heterotrophes Substrat für mikrobielles Wachstum energiedefizient (Müller und Babel, 1994). Der Mangel an nutzbarer Energie kann durch ein weiteres Substrat ausgeglichen werden. Durch den Zusatz von Na-Formiat ist bei *Ralstonia eutropha* JMP134 eine Steigerung der maximalen Wachstumsrate (beim ortho-Weg bis $\mu = 0,42 \text{ h}^{-1}$) sowie des Ertragskoeffizienten (Y_{XS}) für Phenol von 67 % möglich (Müller und Babel, 1996).

Bei dem durchgeführten Versuch (Abb. 23) mit *Ralstonia eutropha* JMP134 ergab sich eine Steigerung des Ertragskoeffizienten von 54 % bei Formiat-Zugabe (Maskow und Babel, 1997). Parallel zeigte sich eine Zunahme der untersuchten zellulären Parameter Größe, DNS- und rRNS-Gehalt während der Kultivierung mit konstanter Durchflußrate von $D_{\text{Phenol}} = 0,1 \text{ h}^{-1}$. Im Kulturgefäß des Chemostaten ließ sich bei gradueller Formiat-Zuführung zur Kultivierung die stetige Erhöhung der Formiat-Konzentration beobachten. Vier verschiedene Phasen ließen sich unterscheiden. Unmittelbar nach dem Start des Gradienten nahm die Proliferationsaktivität (ausgedrückt als Anteil der Zellen mit doppeltem DNS-Gehalt) zu. Bei der weiteren Erhöhung des Gradienten und beim Anstieg der internen Formiat-Konzentration wurde eine Größenzunahme der Zellen detektiert. Als letztes zeigte sich die Zunahme des rRNS-Gehaltes (dritte Phase im Intervall $\Delta t = 25-49 \text{ h}$), die mit einer weiteren Steigerung der Proliferationsaktivität korrelierte. Verschiedene Phasen wurden auch beim Signalverlauf der Wärmetönung detektiert. Mit steigender Formiat-Konzentration nahm die

produzierte Wärmemenge der Kultur (drei Steigungsbereiche) zu, bevor die bakterielle Wärmeproduktion nach 60 Stunden zusammenbrach (Maskow und Babel, 1997). Die beginnende Hemmung der Kultur infolge der hohen Formiat-Konzentration zeigte sich auf zellulärer Ebene nach 56 Stunden im Rückgang des Anteils von c_2 -Zellen (Abnahme: 6 %). Gleichzeitig wurde nur noch eine minimale Zunahme im rRNS-Gehalt pro Zelle detektiert. Die Reihenfolge, in der die zellulären Änderungen detektiert wurden, weist auf unterschiedliche genomisch determinierte Hierarchieebenen hin.

4.2.2.4 Einfluß der Substrathemmung auf den DNS- und rRNS-Gehalt

Bei den Experimenten, bei denen der kontinuierliche Rührkessel als Nutristat gefahren wurde, konnte der Einfluß mehrerer konstanter Phenolkonzentrationen im Versuchsgefäß auf das stationäre Wachstumsverhalten einer Kultur getestet werden. Mit steigender Phenol-Konzentration nahm die toxische Wirkung der Substanz auf Mikroorganismen zu. Im Experiment zeigte sich, daß als Folge der steigenden Toxizität des Substrates die Wachstumsrate der *Ralstonia*-Kultur nicht-linear abnahm (Müller et al., 1997). Die verminderte Wachstumsrate der Bakterien zeigte sich sowohl in der Abnahme des Anteils proliferierender Zellen (Zellen mit doppeltem DNS-Gehalt bzw. mit einem Gehalt der zwischen c_1 und c_2 liegt) als auch in der Abnahme des FSC-Signals der Kultur (Abb. 25). Mit der Abnahme der Wachstumsrate korreliert die Verringerung des zellulären rRNS-Gehaltes. Das heißt, die lineare Korrelation von Wachstumsrate und rRNS-Gehalt (DeLong et al., 1989; Kemp et al., 1993; Kerkhof und Ward, 1993; Poulson et al., 1993; Wallner et al., 1993; Boye et al., 1995; Übersicht bei Kemp, 1995) existiert nicht nur für den Bereich des substrat-limitierten Wachstums, sondern auch für den Bereich der Substratinhibition.

Generell zeigen alle hier aufgeführten Ergebnisse, daß sich beim Monitoring von mikrobiellen Kultivierungen durch das strukturierte und segregierte Meßkonzept der Durchflußzytometrie ein sehr hoher Informationswert ergibt (Bley, 1990; Sonnleitner, 1991). Dabei können einzelne Phasen des mikrobiellen Wachstums, des Metabolismus und auch der Abbauleistung definierten differenzierbaren Zellzuständen zugeordnet werden (Bley und Bogner, 1981). Zusammen mit zusätzlich integral gemessenen Parametern (Substratverbrauch und Biomassekonzentration) ergibt sich ein umfassendes Monitoring für einen Prozeß.

4.3 Charakterisierung der Populationsdynamik einer Mischkultur

4.3.1 Populationsdynamik einer Mischkultur mit Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle

Bei den Versuchen zur Populationsdynamik mit dem Substrat Acetat standen methodische Aspekte zur Anwendung bzw. zu den Nachweisgrenzen der benutzten Techniken im Vordergrund. Bei fluoreszenzmikroskopischen Analysen einer Mischpopulation aus *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V und *Ralstonia eutrophus* JMP134 konnten die beiden Stämme nach *in situ*-Hybridisierung mit verschieden-markierten Oligonukleotidsonden eindeutig identifiziert werden (Abb. 26). Die Identifizierung aufgrund von zwei Fluoreszenzen war in den durchflußzytometrischen Experimenten bei Anregung mit einer Laserlinie nur bedingt erreichbar. Mit Hilfe von unterschiedlichen Fluoreszenzen konnten die Proben der exponentiellen Wachstumsphase einer *batch*-Kultivierung in zwei Populationen differenziert werden. Mehrere Probleme bei den Messungen konnten mit dieser Konfiguration des Systems nicht gelöst werden. Bei den benutzten Farbstoffkombinationen (Fluos/CY3 und CY3/CY3.5) traten spektrale Überlappungen der Emissionen besonders bei der Kombination von Fluorescein und CY3 auf, so daß eine der Fluoreszenzen in beiden Fluoreszenzkanälen (FL. 1 und 2) detektiert wurde. Das Übersprechen einer Fluoreszenz in den benachbarten Fluoreszenzkanal (*cross talk*) war für den Farbstoff, der optimal angeregt wurde, am höchsten (Abb. 27). Der zweite Farbstoff, der nur suboptimal angeregt werden konnte, zeigte eine viel geringere Fluoreszenzintensität, die teilweise sehr nahe am Rauschen lag (Herrmann et al., 1997). Da die Signalintensitäten bei Bakterien im Vergleich zu eukaryotischen Systemen sehr gering sind, konnten nur Proben mit einem hohen rRNS-Gehalt voneinander differenziert werden (Abb. 28). Für die Probe 3h ist die prozentuale Häufigkeitsverteilung nach zwei Hybridisierungsexperimenten mit unterschiedlichen Farbstoffkombinationen angegeben (Tab. 7). Dabei zeigten sich keine signifikanten Differenzen; ca. 80 % der detektierten Signale konnten den beiden Spezies zugeordnet werden.

Da die Detektion der sondenvermittelten Fluoreszenz bei geringen rRNS-Gehalten schwierig war und auch das FSC-Signal infolge der Hybridisierungsbehandlung abnahm, wurde eine mögliche Differenzierung der Population nach DNS-Färbung mit dem AT-spezifischen Farbstoff DAPI getestet. Generell zeigte *Ralstonia eutropha* JMP134 eine geringere blaue Fluoreszenz nach DAPI-Färbung als der Substratkonkurrent. Grund dafür können unterschiedliche Genomgrößen sein; auch der signifikante Unterschied des GC-Gehaltes von 25 % bei beiden Stämmen (Bergey, 1984) trägt zur unterschiedlichen

Quantität beim Bindungsverhalten des Farbstoffes bei (Williamson und Fennell, 1975, 1979; Kapuscinski und Skoczylas, 1978; Cavatorta et al., 1985).

In zweiparametrischen Messungen war eine Differenzierung der beiden Stämme in der Mischpopulation über alle Wachstumsstadien möglich (Abb. 29 und 30). Überlappende Signalfächen beider Stämme konnten differenziert werden (FSC-Signale), so daß die beobachtete Abnahme in der Zellgröße bei der *Acinetobacter*-Kultur (Abb. 26) nachvollzogen werden konnte. Zellzyklusstadien von *Acinetobacter* zeigten sich in der Dynamik der Fluoreszenzsignale, bei *Ralstonia eutropha* JMP134 konnten die verschiedenen Phasen des Zellzyklus nicht vollständig den gemessenen Signalen zugeordnet werden. Beim Vergleich der Häufigkeitsverteilung der Populationen bei einer *batch*-Kultivierung (Abb. 31) ergaben sich maximale Unterschiede von 4,3 % zu den Daten, die mit *in situ*-Hybridisierung gewonnen wurden. *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V, der mit geringerer Dichte angeimpft wurde, hatte nach drei Stunden den gleichen Anteil an der Mischung wie sein Substratkonkurrent. Nach vier Stunden hatten sich die anfänglichen Proportionen umgekehrt. In der Häufigkeitsverteilung zeigte sich, was durch die unterschiedlichen maximalen Wachstumsraten beider Stämme (*batch*-Experiment mit den Reinkulturen) verursacht wird: *Acinetobacter* kann das Substrat wesentlich schneller zur Vermehrung und Biomassebildung nutzen.

Die Differenzierung der beiden Populationen mittels DNS-Färbung wurde hier als unterstützendes Mittel zur Populationsanalyse genutzt. Die Funktionalität beschränkt sich aber auf diese Mischkultur, deren Signale durch die Reinkulturexperimente bekannt waren. Generell empfehlen sich für die Populationsanalyse von unbekanntem Mikroorganismen durchflußzytometrische Messungen mit einem dualen Lasersystem, das eine optimale Anregung für beide Farbstoffe zuläßt. Die Separation von bis zu drei Arten nach gleichzeitiger Verwendung eines GC- und eines AT-spezifischen Farbstoffes ist beschrieben (Van Dilla et al., 1983; Sanders et al., 1990). Am erfolgreichsten ist die Kombination von DNS- und rRNS-Färbung durch *in situ*-Hybridisierung, die Wallner et al. (1995, 1996) beschreiben. Entsprechende Versuche wurden durchgeführt. Bei der gegebenen Gerätekonfiguration mit der Mehrfachwellenlängenoption (UV+488 nm) des benutzten Argon-Ionen-Lasers reichten die Intensitäten, speziell der detektierten DNS-Fluoreszenz, nicht aus. Das Leistungsverhältnis der 488 nm Linie zu den UV-Linien ließ sich bei dem benutzten Laser nicht variieren.

4.3.2 Populationsdynamik der Mischkultur mit Phenol als Kohlenstoff- und Energiequelle

Insgesamt wurden drei Fermentationen mit den beiden Stämmen in einer Mischung durchgeführt. Variiert wurde dabei die Reihenfolge, welcher Stamm als zweite Kultur zu einer laufenden kontinuierlichen Kultivierung des anderen Stammes zugesetzt wurde, sowie der Animpftiter. Unabhängig sowohl von der Reihenfolge des Animpfens als auch von der Zugabe einer geringen Kulturmenge (Verhältnis 1:10) zeigte es sich in allen Versuchen, daß sich *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V während der Versuchszeit im Chemostaten bei konstanter Durchflußrate durchsetzte. Sein Substratkonkurrent wurde über die Versuchszeit aus dem System kontinuierlich ausgewaschen. Durch Unterschiede in den Durchflußraten dauerte der Auswaschprozeß während der zweiten Fermentation (Abb. 33) länger als bei dem ersten Prozeß. Bei der ersten Kultivierung wurde nach 72 Stunden eine graduelle Erhöhung der Durchflußrate etabliert, die zur Folge hatte, daß sich der Auswaschprozeß von *Ralstonia eutropha* JMP134 noch beschleunigte. Bei der dritten gezeigten kontinuierlichen Kultivierung sank der Anteil der *Ralstonia*-Population innerhalb von 55 Stunden um 61 %. Diese schnelle Veränderung in der Populationszusammensetzung konnte durch den Eintrag von mindestens 80 mg/l Phenol beim Animpfen von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V aus einer nicht-stationären *batch*-Kultur erklärt werden.

Das Animpfen einer laufenden kontinuierlichen Kultivierung mit einer *batch*-Kultur (zweiter Stamm) stellte keine optimale Situation für die anfängliche Mischkultivierung der beiden Arten dar. Als Folge der unterschiedlichen Vorkultivierung kam es zu einer Mischung von unterschiedlichen Wachstumszuständen, wobei der zugesetzte Stamm sich sofort an die Bedingungen im Chemostaten adaptieren mußte. Eine Mischung aus zwei kontinuierlichen Kultivierungen in einem dritten Reaktor unter Beibehaltung von konstanten Wachstumsbedingungen für jeden Stamm war aus technischen Gründen nicht durchführbar.

Die Ergebnisse der Häufigkeitsverteilung der Populationen wurden zur Abschätzung der halbmaximalen Geschwindigkeitskonstante K_S und der maximalen Wachstumsrate μ_{\max} für *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V benutzt. Dazu wurde eine Konkurrenz beider Stämme um die einzige Kohlenstoff- und Energiequelle Phenol modelliert. Die für die Simulation nötigen Wachstumsparameter von *Ralstonia eutropha* JMP134 waren bekannt. Die Parameter für *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V wurden variiert, bis es zu einer Übereinstimmung von modellierten Daten mit den gemessenen Daten kam. Maximale Übereinstimmung ergab sich bei Werten von $\mu_{\max} = 0,67 \text{ h}^{-1}$ und einem K_S -Wert von 95 μM . Für *Ralstonia eutropha* JMP134 wurden die publizierte Werte für den meta-Weg (einschließlich dem ortho-Weg, Müller und Babel, 1995) eingesetzt, ohne die Unterschiede in den Werten von K_S und μ_{\max}

während der Expression der beiden Abbau-Wege zu berücksichtigen. Trotz dieser Vereinfachung fand sich eine gute Übereinstimmung von dem gemessenen zu dem simulierten Auswaschprozeß von *Ralstonia eutropha* JMP134. Der erhaltene Wert für die maximale Wachstumsrate von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V steht in keinem Widerspruch zu den experimentell erreichten Wachstumsraten bei den *transient-state*-Versuchen. Mit den geschätzten und publizierten Wachstumsparametern beider Kulturen wurden Monod-Kinetiken (Abhängigkeit der Wachstumsrate von der Substratkonzentration im Chemostat) berechnet, die den experimentellen Befund der Mischkulturergebnisse widerspiegeln. Bei durchführbaren Kultivierungen mit Durchflußraten von $D > 0,02 \text{ h}^{-1}$ existiert keine Situation, in der *Ralstonia eutropha* JMP134 einen Wachstumsvorteil gegenüber seinem Konkurrenten hätte.

Der Vergleich der rRNS-Gehalte, die beide Stämme bei gleichen Kultivierungsbedingungen im Chemostaten etablieren (Abb. 20), zeigte den vielfach höheren rRNS-Gehalt von *Ralstonia eutropha* JMP134 im Gegensatz zur *Acinetobacter*-Kultur bei gleichen Durchfluß- bzw. Wachstumsraten. Dieses Ergebnis konnte durch Hybridisierungsexperimente mit der Eubakteriensonde auch für Proben aus den Mischkulturexperimenten bestätigt werden. Da *Ralstonia eutropha* JMP134 (R) bei den Mischkulturexperimenten aus dem Chemostaten ausgetragen wurde, muß dessen Wachstumsrate kleiner gewesen sein im Vergleich zu dem konkurrierenden Stamm ($\mu_R < \mu_A$). Gleichzeitig hatten die *Ralstonia*-Zellen einen vielfach höheren rRNS-Gehalt als Zellen von *Acinetobacter* ($[\text{rRNS}]_R \gg [\text{rRNS}]_A$). Dies zeigt, daß aus der Quantifizierung von rRNS-Gehalten mit der *in situ*-Hybridisierung nach durchflußzytometrischer Messung keine Abschätzung der physiologischen Aktivität des Stammes bezüglich der Geschwindigkeit der Phenolverwertung erfolgen kann. Ein detektierter hoher Ribosomengehalt muß an keine hohe metabolische Leistung eines Mikroorganismus gekoppelt sein. Die Ergebnisse zeigen, daß der rRNS-Gehalt auch vom Genotyp abhängig ist.

Genotypische Einflüsse auf den Ribosomenhaushalt sind für zwei marine Bakterienarten beschrieben worden (Kramer und Singleton, 1992). Bakterien, die sich mit geringen Wachstumsraten vermehren, können einen hohen rRNS-Gehalt besitzen, was für *E. coli* in Trinkwasser-Biofilmen (Manz et al., 1993), für marine *Vibrio*-Spezies (Flärdh et al., 1992) und auch für einige Ammonium-Oxidierer (Wagner et al., 1995) beschrieben ist. Außerdem werden verschiedene Ribosomengehalte in Abhängigkeit vom Substrat gebildet, was sich aus einem Vergleich der Experimente mit den unterschiedlichen Kohlenstoff- und Energiequellen Acetat und Phenol ergibt.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Kopplung von bestimmten rRNS-Quantitäten an eine Abbauleistung insbesondere für Mischkulturproben überprüft werden muß. Für Monokultur-experimente kann eine Einschätzung der Abbauleistung nach einer spezies-spezifischen DNS-Färbung und Fluoreszenzdetektion erfolgen, da bei einer produktiven Verwertung der Kohlenstoff- und Energiequelle (metabolische Aktivität) die Zellproliferation mit der Abbaugeschwindigkeit korreliert ist. Das Proliferationsverhalten einer Population kann mit Hilfe der Durchflußzytometrie lokal charakterisiert werden. Subpopulationen mit verschiedenen DNS-Gehalten können quantifiziert und den unterschiedlichen Zuständen im Zellzyklus zugeordnet werden. Bei Mischkulturen kann eine gemeinsame und spezifische Fluorochromierung der DNS wie für *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V und *Ralstonia eutropha* JMP134 erfolgreich sein. Generell ist der Einsatz dieser Methode für weitere Bakterienarten durch unterschiedliche speziesspezifische Färbeprotokolle (unterschiedliche Stöchiometrie bei der Markierung der bakteriellen Genome) begrenzt.

4.4 Ausblick

Die hier in der Kombination benutzten Techniken der *in situ*-Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten rRNS-gerichteten Oligonukletidsonden und der durchflußzytometrischen Einzelzelldetektion eignen sich gut für die Charakterisierung von Mischpopulationen. Unabhängig von den benutzten Bakterienstämmen in dieser Arbeit ist für ein Monitoring von Mischpopulationen die Markierung von Zellen bzw. Zellkomponenten mit zusätzlichen Fluoreszenzfarbstoffen (zweite oder dritte Fluoreszenz) und deren Detektion dringend notwendig. Dazu ist ein duales Anregungssystem bestehend aus zwei Lasern von Vorteil, weil eine getrennte, somit spezifische Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen möglich wird. Wallner et al. (1995, 1996) beschreiben ein solches System unter Verwendung eines UV- und eines Argon-Ionen-Lasers, mit dem sie Klärschlammproben mit einer Kombination aus zwei Fluoreszenzfarbstoffen (DAPI und Fluorescein) und eine synthetische Mischung mit einer Kombination aus DAPI, Fluorescein (Oligonukleotidsonde) und Phycoerythrin (Antikörper) charakterisiert haben.

Die Erweiterung des detektierbaren Farbspektrums mit einem tiefroten Fluoreszenzfarbstoff (z.B.: CY5, Excitationsmaximum: 649 nm, Emissionsmaximum: 670 nm; angeregt durch einen Helium-Neon-Laser) wäre eine sinnvolle Ergänzung des Systems, da mit dieser Option spektrale Überlappungen zu blauen und grünen Fluoreszenzfarbstoffen ausgeschlossen werden können.

Zur Beurteilung der Detoxifikationsleistung einzelner Populationen in einer Mischung sollte neben der lokalen Identifizierung ein Vitalitätsparameter der Zellen detektiert werden. Erste Erfahrungen zur Korrelation von Abbaugeschwindigkeiten einzelner Monokulturen zur Fluoreszenzsignalstärke nach unterschiedlichen Markierungen der Zellmembran liegen vor (AG Biosignale). Durch den Einsatz von multiparametrischen durchflußzytometrischen Messungen mehrfachgefärbter Zellen kann der Informationsgehalt über ökosozioologische Verhaltensweisen spezifischer Population in einer Mischung wesentlich gesteigert werden.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Populationsdynamik von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V und *Ralstonia eutropha* JMP134, Modellorganismen für die Detoxifikation von Xenobiotika, in Mono- und Mischkulturrexperimenten mit den Kohlenstoff- und Energiequellen Acetat und Phenol durchflußzytometrisch charakterisiert.

Durch den Einsatz der *in situ*-Hybridisierung mit rRNS-gerichteten Oligonukleotidsonden und anschließender Fluoreszenzdetektion konnten *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V auf genusspezifischer Ebene und *Ralstonia eutropha* JMP134 auf speziesspezifischer Ebene eindeutig identifiziert werden. Die Stärke der detektierten Fluoreszenz korrelierte mit dem Gehalt an zellulärer rRNS. Bei geringen rRNS-Gehalten wurden Unterschiede im Streulicht- und Fluoreszenzsignal der Bakterien nach DNS-Fluorochromierung mit einem AT-spezifischen Farbstoff und durchflußzytometrischer Messung zur Differenzierung beider Populationen in einer Mischkultur benutzt.

In *batch*-Kultivierungen mit den Substraten Acetat und Phenol zeigte sich bei beiden Spezies die lineare Korrelation von spezifischer Wachstumsrate zum rRNS-Gehalt. Während der beginnenden exponentiellen Wachstumsphase war der rRNS-Gehalt maximal, und die Zellen zeigten ein unlimitiertes Wachstum.

Bei Geschwindigkeitsgradienten im Chemostaten mit Phenol als Kohlenstoff- und Energiequelle wurden bei beiden Stämmen Unregelmäßigkeiten in den linearen Korrelationen von Wachstumsraten zu rRNS-Gehalten detektiert. Bei *transient-state*-Experimenten mit *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V im Chemostaten zeigte sich eine sprunghafte Verdopplung des rRNS-Gehaltes im Wachstumsintervall $0,48 \text{ h}^{-1} < \mu < 0,53 \text{ h}^{-1}$. Bei *Ralstonia eutropha* JMP134 wurde im Durchflußintervall von $0,24 \text{ h}^{-1} < D < 0,27 \text{ h}^{-1}$ eine Stagnation in der rRNS-Dynamik beobachtet, die durch einen Übergangszustand während des Wechsels vom ortho- auf den meta-Abbauweg erklärt werden konnte.

Ralstonia eutropha JMP134 besitzt bei gleichen Wachstumsraten (Durchflußraten) und bei vergleichbaren Kultivierungsbedingungen einen mehrfach höheren rRNS-Gehalt als *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V beim Wachstum auf Phenol. Die Ausbildung einer bestimmten rRNS-Quantität ist auch vom Genotyp abhängig.

Bei *Ralstonia eutropha* JMP134 zeigte sich eine 40 %ige Zunahme des rRNS-Gehaltes bei einer kontinuierlichen Kultivierung ($D_{\text{Phenol}} = 0,1 \text{ h}^{-1}$), nachdem ein Formiat-Gradienten als zusätzliche Energiequelle neben Phenol zugesetzt wurde. Bei Nutristat-Experimenten zur Substrathemmung nahmen die Wachstumsrate und parallel der rRNS-Gehalt pro Zelle mit steigender Phenolkonzentration im Kulturgefäß nicht-linear ab.

Acinetobacter calcoaceticus 69-V hatte bei der Vermehrung in *batch*-Experimenten mit dem Substrat Phenol eine entkoppelte DNS-Synthese. Vier Subpopulationen mit entsprechenden Chromosomenäquivalenten (c_1 - c_4) wurden detektiert. Bei *transient-state*-Experimenten ergab sich mit steigender Wachstumsrate ($\mu > 0,48 \text{ h}^{-1}$) die Tendenz zu einer Subpopulation mit einem DNS-Gehalt, der dem einer Synthese-Phase entsprach. Bei den Zellzyklusanalysen von *Ralstonia eutropha* JMP134 ließen sich in keinem Versuch mehr als zwei Chromosomenäquivalente detektieren.

Bei den Mischkulturexperimenten im Chemostaten konkurrierten beide Stämme um die einzige Kohlenstoffquelle Phenol. *Ralstonia eutropha* JMP134, mit wesentlich höherem rRNS-Gehalt als sein Konkurrent, wurde aus dem Chemostaten ausgewaschen, während sich die Population von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V auch bei Variation von Reihenfolge und Titer des Animpfens immer durchsetzte. Einer maximalen Wachstumsrate von $\mu_{\max} = 0,67 \text{ h}^{-1}$ und einer Halbsättigungskonstanten von $K_s = 95 \text{ }\mu\text{M}$ wurden für *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V aus den experimentellen Daten nach Modellierung einer Konkurrenz abgeschätzt. Aus einem Vergleich mit Literaturwerten ergibt sich für *Ralstonia eutropha* JMP134 keine Situation bei einer durchführbaren Kultivierung im Chemostaten, für die dieser Stamm einen Wachstumsvorteil hätte.

In Abhängigkeit vom zellulären rRNS-Gehalt ist die eindeutige Identifizierung von Spezies in einer Mischkultur sowie die Quantifizierung der Zielstruktur rRNS mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung und durchflußzytometrischer Messung möglich. Eine Aussage über die Verwertungsaktivität einer Population in einer Mischkultur beim Abbau von Phenol kann nicht ausschließlich nach Quantifizierung des Ribosomengehaltes getroffen werden. Die Messung der Proliferationsaktivität über Zellzyklusanalyse nach spezifischer DNS-Färbung erlaubt eine sichere Aussage zur Aktivität einer Population bei der produktiven Verwertung von Phenol.

6. Literatur

- ACKERMANN, J.-U., MÜLLER, S., LÖSCHE, A., BLEY, T., BABEL, W.: *Methylobacterium rhodesianum* cells tend to double the DNA content under growth limitations and accumulate PHB. *J. Biotechnol.* **39** (1995), 9-20.
- ALM, W. E., OERTHER, B. D., LARSEN, N., STAHL, D. A., RASKIN, L.: The oligonucleotide probe database. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** (1996), 3557-3559.
- AMANN, R. I., BINDER, B.J., OLSON, J. R., CHRISHOLM S. W., DEVEREUX, R., STAHL, D. A.: Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56** (1990a), 1919-1925.
- AMANN, R. I., KRUMHOLZ, L., STAHL, D. A.: Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* **172** (1990b), 762-770.
- AMANN, R. I.: Fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes in the study of microbial ecology. *Molecular Ecology* **4** (1995), 543-554.
- AMANN, R. I., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K.-H.: Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59** (1995), 134-169.
- AMIKAM, D., GLASER, G., RAZIN, S.: Mycoplasmas (*Mollicutes*) have a low number of rRNA genes. *J. Bacteriol.* **158** (1984), 376-378.
- ARIS, R., HUMPHREY, A. E.: Dynamics of a chemostat in which two organisms compete for a common substrate. *Biotechnol. Bioeng.* **19** (1977), 1375-1386.
- BABEL, W.: The mixed substrate concept, applied for microbial synthesis of metabolites. *Biotech. Adv.* **8** (1990), 261-275.
- BABEL, W.: Peculiarities of methylotrophs concerning overflow metabolism, especially the synthesis of polyhydroxyalkanoates. *FEMS Microbiol. Rev.* **103** (1992), 141-148.
- BABEL, W., BRINKMANN, U., MÜLLER, R. H.: The auxiliary substrate concept - an approach for overcoming limits of microbial performances. *Act Biotechnol.* **13** (1993), 211-242.
- BERTIN, B., BROUX, O., VAN HOEGARDEN, M.: Flow cytometric detection of yeast by in situ hybridization with a fluorescent ribosomal RNA probe. *J. Microbiol. Methodes* **12** (1990), 1-12.
- BERGEY'S Manual of Systematic Bacteriology Vol.1. HOLT, J., KRIEG, N. R. et al. (eds). Williams and Wilkins, Baltimore (1984).
- BLEY, T., BOGNER, H.: Optimal control of a structured growth model. *Stud. Biophys.* **83** (1981), 217-224.
- BLEY, T.: State structure models - a base for efficient control of fermentation processes. *Biotechnol. Adv.* **8** (1990), 233-259.
- BORNELEIT, P., HERMSDORF, T., CLAUS, R., WALTHER, P., KLEBER, H.-P.: Effect of hexadecane-induced vesiculation on the outer membrane of *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Gen. Microbiol.* **134** (1988), 1983-1992.
- BOYE, M., AHL, TH., MOLIN, S.: Application of a strain-specific rRNA oligonucleotide probe targeting *Pseudomonas fluorescens* Ag1 in a mesocosm study of bacterial release into the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** (1995), 1384-1390.

Literatur

- BREMER, H.: Parameters affecting the rate of synthesis of ribosomes and RNA polymerase in bacteria. *J. Theor. Biol.* **53** (1975), 115-124.
- BROCK, T. D.: The study of microorganisms in situ: progress and problems. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* **41** (1987), 1-41.
- CAVATORTA, P., MASOTTI, L., SZABO, A. G.: A time-resolved fluorescence study of 4'6'-diamidine-2-phenylindole dihydrochloride binding to polynucleotides. *Biophys. Chem.* **22** (1985), 11-16.
- CHRISTENSEN, H., OLSON, R. A., BAKKEN, L. R.: Soil bacterial DNA and biovolume profiles measured by flow-cytometry. *FEMS Microbiol. Ecol.* **102** (1993), 129-140.
- CLÉMENT, P., MATUS, V., CÁRDENAS, L., GONZÁLEZ, B.: Degradation of trichlorophenols by *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *FEMS Microbiol. Lett.* **127** (1995), 51-55.
- COOPER, S., HELMSTETTER, C. E.: Chromosome replication and division cycle of *Escherichia coli* B/r. *J. Mol. Biol.* **31** (1968), 519-540.
- DE LONG, E. F., WICKHAM, G. S., PACE, N. R.: Phylogenetic strains: ribosomal RNA-based probes for identification of single cells. *Science* **243** (1989), 1360-1363.
- DE RIJK, P., VAN DE PEER, Y., DE WACHTER, R.: Database on the structure of large ribosomal subunit RNA. *Nucl. Acids Res.* **24** (1996), 92-97.
- DANGEMANN, E., STOLZ, A., KUHM, A. E., HAMMER, A., FEIGEL, B., NOISOMMIT-RIZZI, N., RIZZI, M., REUB, M., KNACKMUSS, H.-J.: Degradation of 4-aminobenzenesulfonate by a two-species bacterial coculture. *Biodegradation* **7** (1996), 223-229.
- DIKSHITULU, S., BALZIS, B. C., LEWANDDOWSKI, G. A., PAVLOU, S.: Competition between two microbial populations in a sequencing fed-batch reactor: Theory, experimental verification, and implications for waste treatment applications. *Biotechnol. Bioeng.* **42** (1993), 643-656.
- DON, R. H., PEMBERTON, J. M.: Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **145** (1981), 681-686.
- DON, R. H., PEMBERTON, J. M.: Genetic and physical map of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmid pJP4. *J. Bacteriol.* **161** (1985), 466-468.
- EDWARDS, C., PORTER, J., SAUNDERS, J. R., DIAPER, J., MORGAN, J. A. W., PICKUP, R. W.: Flow cytometry and microbiology. *SGM Quarterly* (1992), 105-108.
- EDWARDS, C., DIAPER, J., PORTER, J., DEERE, D., PICKUP, R.: Analysis of microbial communities by flow cytometry and molecular probes: identification, culturability and viability. In: *Beyond the biomass*. RITZ, K. et al. (eds). British Society of Soil Science, Wiley and Sons, Chichester (1994), 57-65.
- ENGBAÆK, F., KJELDGAARD, N. O., MALLØE, O.: Chain growth rate of β -galactosidase during exponential growth and aminoacid starvation. *J. Mol. Biol.* **75** (1973), 109-118.
- FAZEL-MADJLESSI, J., BAILEY, J. E.: Analysis of fermentation processes using flow microfluorometry: single parameters observation of batch bacterial growth. *Biotech. Bioeng.* **21** (1979), 1995-2010.
- FEIGEL, B. J., KNACKMUSS, H.-J.: Syntrophic interactions during degradation of 4-amino-benzenesulfonic acid by a two species bacterial culture. *Arch. Microbiol.* **159** (1993), 124-130.
- FLÅDH, K., COHEN, P. S., KJELLEBERG, S.: Ribosomes exist in a large excess over the apparent demand for protein synthesis during carbon starvation in marine *Vibrio sp.* strain CCUG 15956. *J. Bacteriol.* **174** (1992), 6780-6788.

- FOUCHET, P., JAYAT, C., HÉCHARD, Y., RATINAUD, M.-H., FRELAT, G.: Recent advances of flow cytometry in fundamental and applied microbiology. *Biol. Cell* **78** (1993), 95-109.
- FOUCHET, P., MANIN, C., RICHARD, H., FRELAT, G., BARBOTIN, J. N.: Flow cytometry studies of recombinant *Escherichia coli* in batch and continuous cultures: DNA and RNA contents; light-scatter parameters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41** (1994), 584-590.
- FOX, G. E., PECKMANN, K. J., WOESE, C. R.: Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to prokaryotic systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **27** (1977), 44-57.
- FRISCHER, M. E., FLORIANI, P. J., NIERZWICKI-BAUER, S. A.: Differential sensitivity of 16S rRNA targeted oligonucleotide probes used for fluorescence in situ hybridization is a result of ribosomal higher order structure. *Can. J. Microbiol.* **42** (1996), 1061-1071.
- GAUSING, K.: Regulation of ribosome production in *Escherichia coli*: synthesis and stability of ribosomal RNA and of ribosomal protein messenger RNA at different growth rates. *J. Mol. Biol.* **115** (1977), 335-354.
- GERNER-SCHMIT, P., KEISER-NIELSEN, H., DORSCH, M., BLOM, J., HOLTEN-ANDERSON, W., YING, Y. T. URSING, J.: *Lautropia mirabilis* gen. nov., sp. nov., a gram-negative motile coccus with unusual morphology isolated from the human mouth. *Microbiology* **140** (1994), 1787-1797.
- GIOVANNONI, S. J., DELONG, E. F., OLSEN, G. J., PACE, N. R.: Phylogenetic group-specific oligonucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.* **170** (1988), 720-726.
- GIOVANNONI, S. J., BRITSCHGI, T. B., MOYER, C. L., FIELD, K. G.: Genetic diversity in Saragasso Sea bacterioplankton. *Nature* **345** (1990), 60-63.
- HADLEY, W. K., WALDMAN, F., FULWYLER, M.: Rapid microbiological analysis by flow cytometry. In: Instrumental methods for rapid microbiological analysis. NELSON, H. N. (eds). VCH Publishers (1985), 67-89.
- HAMMOND, P. M.: Species inventory. In: Biodiversity, status of the earth's living resources. GROOMBRIDGE, B. (eds). Chapman & Hall, London (1992), 17-39.
- HAMMOND, P. M.: Described and estimated species numbers: an objective assessment of current knowledge. In: Microbial diversity and ecosystem function. ALLSOPP, D. et al. (eds). CAB International, University Press, Cambridge (1995), 29-72.
- HANSEN, S. R., HUBBELL, S. P.: Single-nutrient microbial competition: qualitative agreement between experimental and theoretically forecast outcomes. *Science* **207** (1980), 1491-1493.
- HAUGLAND, R. P.: Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. Molecular Probes Inc., Eugene (1996).
- HEAD, I. M., SAUNDERS, J. R., PICKUP, R. W.: Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb. Ecol.* **35** (1998), 1-21.
- HERRMANN, C., LÖSCHE, A., MÜLLER, S., BLEY, T., BABEL, W.: Flow cytometric discrimination between *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V and *Alcaligenes eutrophus* JMP134 by fluorescently labelled rRNA-targeted oligonucleotide probes and DNA staining. *Acta Biotechnol.* **17** (1997), 19-38.
- HODSON, R. E., DUSTMAN, W. A., GARG, R. P., MORGAN, M. A.: In situ-PCR for visualisation of microscale distribution of specific gene and gene products in prokaryotic communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** (1995), 4074-4082.
- HUTTER, K.-J., EIPEL, H. E.: Flow cytometric determination of cellular substances in algae, bacteria, moulds and yeasts. *Antonie von Leeuwenhoek* **44** (1978), 269-282.
- HUTTER, K.-J., EIPEL, H. E.: Simultaneous measurements of DNA and protein content of microorganisms by flow cytometry. *Eur. J. Appl. Microbiol.* **6** (1979), 223-231.

Literatur

- JARVIS, E. D., WIDOM, R. L., LAFAUCI, G., SETOGUCHI, Y., RICHTER, I. R., RUDNER, R.: Chromosomal organization of rRNA operons in *Bacillus subtilis*. *Genetics* **120** (1988), 625-635.
- JOST, J. L., DRAKE, J. F., FREDRICKSON, A. G., TSUCHIYA, H. M.: Interactions of *Tetrahymena pyriformis*, *Escherichia coli*, *Azotobacter vinelandii*, and glucose in a minimal medium. *J. Bacteriol.* **113** (1973), 834-840.
- KÄMPFER, P., ERHART, R., BEIMFOHR, C., BÖHRINGER, J., WAGNER, M., AMANN, R.: Characterization of bacterial communities from activated sludge: culture-dependent numerical identification versus in situ identification using group- and genus-specific rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Microb. Ecol.* **32** (1996), 101-121.
- KAPUSCINSKI, J., SKOCZYLA, B.: Fluorescent complexes of DNA with DAPI (4',6-diamidine-2-phenylindole dihydrochloride) or DCI (4',6-dicarboxyamido-2-phenylindole). *Nucleic Acids Res.* **5** (1978), 3775-3799.
- KEMP, P. F., LEE, S., LAROCHE, J.: Estimating the growth rate of slowly growing marine bacteria from RNA content. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** (1993), 2594-2601.
- KEMP, P. F.: Can we estimate bacterial growth rates from ribosomal RNA content? In: *Molecular Ecology of Aquatic Microbes*. JOINT, I. (eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, NATO ASI Series Vol. **G 38** (1995).
- KERKHOF, L., WARD, B. B.: Comparison of nucleic acid hybridization and fluorometry for measurement of the relationship between RNA/DNA ratio and growth rate in a marine bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** (1993), 1303-1309.
- KJELDGAARD, N. O., KURLAND, C. G.: The distribution of soluble and ribosomal RNA as a function of growth rate. *J. Mol. Biol.* **6** (1963), 341-348.
- KLEBER, H.-P., SCHÖPP, W., AURICH, H.: Verwertung von n-Alkanen durch einen Stamm von *Acinetobacter calco-aceticus*. *Zeitschr. Allg. Mikrobiologie* **13** (1973), 445-447.
- KRAMER, J. G., SINGLETON, F. L.: Variations in rRNA content of marine *Vibrio* spp. during starvation-survival and recovery. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** (1992), 201-207.
- LEBARON, P., CATALA, P., FAJON, C., JOUX, F., BAUDART, J., BERNARD, L.: A new sensitive, whole-cell hybridization technique for detection of bacteria involving a biotinylated oligonucleotide probe targeting rRNA and tyramide signal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** (1997), 3274-3278.
- LEE, S., MALONE, C., KEMP, P. F.: Use of multiple 16S rRNA-targeted fluorescent probes to increase signal strength and measure cellular RNA from natural planktonic bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **101** (1993), 193-201.
- LIEFTING, L. W., ANDERSEN, M. T., BEEVER, R. E., GARDNER, R. C., FORSTER, R. L. S.: Sequence heterogeneity in two 16S rRNA genes of *Phormium* yellow leaf phytoplasma. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** (1996), 3133-3139.
- LUDWIG, W.: persönliche Mitteilung: ARB-Datenbank, TU München.
- MAALØE, O., KJELDGAARD, N.: Control of macromolecular synthesis. A study of DNA, RNA and protein synthesis in bacteria. W. A. Benjamin, Inc, New York (1966).
- MAIDAK, B. L., OLSEN, G. J., LARSEN, N., OVERBEEK, R., MCCAUGHEY, M. J., WOESE, C. R.: The ribosomal database project (RDP). *Nucl. Acids Res.* **24** (1996), 82-85.
- MANZ, W., AMANN, R., LUDWIG, W., WAGNER, M., SCHLEIFER, K.-H.: Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *System. Appl. Microbiol.* **15** (1992), 593-600.

- MANZ, W., SZEWZYK, U., ERIKSSON, P., W., AMANN, R., SCHLEIFER, K. H., STENSTRÖM, T.-A.: In situ identification of bacteria in drinking water and adjoining biofilms by hybridization with 16S and 23S rRNA-directed fluorescent oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** (1993), 2293-2298.
- MANZ, W.: Entwicklung gruppenspezifischer, rRNS-gerichteter Oligonukleotidsonden und deren Anwendung. Dissertation. Lehrstuhl für Mikrobiologie, TU München (1994).
- MARIE, D., VALOUT, D., PARTENSKY, F.: Application of the novel nucleic acid dyes YOYO-1, YO-PRO-1, and PicoGreen for flow cytometric analysis of marine prokaryotes. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** (1996), 1649-1655.
- MASKOW, T., BABEL, W.: Calorimetric investigations of bacterial growth on phenol - efficiency and velocity of growth as a function of the assimilation pathways. *Thermochimica Acta* **309** (1997), 97-103.
- MONFORT, P., BALEUX, B.: Cell cycle characteristics and changes in membrane potential during growth of *Escherichia coli* as determined by a cyanine fluorescent dye and flow cytometry. *J. Microbiol. Methods* **25** (1996), 79-86.
- MONOD, J.: The growth of bacterial cultures. *Ann. Rev. Microbiol.* **3** (1949), 371-394.
- MÜLLER, R. H., BABEL, W.: Glucose as an energy donor in acetate growing *Acinetobacter calcoaceticus*. *Arch. Microbiol.* **144** (1986), 62-66.
- MÜLLER, R. H., BABEL, W.: Phenol and its derivatives as heterotrophic substrates for microbial growth - an energetic comparison. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42** (1994), 446-451.
- MÜLLER, R. H., BABEL, W.: Determination of the K_s value during the growth of *Alcaligenes eutrophus* on phenol, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and fructose. *Acta Biotechnol.* **15** (1995), 347-353.
- MÜLLER, R. H., BLEY, T., BABEL, W.: Transient state cultivation as a means for determining maximum growth rates of microorganisms in inhibition kinetics. *J. Microbiol. Methods* **22** (1995), 209-219.
- MÜLLER, R. H., BABEL, W.: Growth rate-dependent expression of phenol-assimilation pathways in *Alcaligenes eutrophus* JMP 134 - the influence of formate as an auxiliary energy source on phenol conversion characteristics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46** (1996), 156-162.
- MÜLLER, R. H., SIMON, D., GROBE, H. J., BABEL, W.: Substrate inhibition under stationary growth conditions - nutrient experiments with *Ralstonia eutropha* JMP134 during growth on phenol and 2,4-dichlorophenoxyacetate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48** (1997), 648-655.
- MÜLLER, S., LÖSCHE, A., BLEY, T.: Staining procedures for flow cytometric monitoring of bacterial populations. *Acta Biotechnol.* **13** (1993), 289-297.
- NÖRTEMANN, B., BAUMGARTEN, J., RAST, H. G., KNACKMUSS, H.-J.: Bacterial communities degrading amino- and hydroxynaphthalene-2-sulfonates. *Appl. Environ. Microbiol.* **52** (1986), 1195-1202.
- NÜBEL, U., ENGELEN, B., FELSKE, A., SNAIDR, J., WEISHUBER, A., AMANN, R. I., LUDWIG, W., BACKHAUS, H.: Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **178** (1996), 5636-5643.
- OLSON, G. J., LANE, D. J., GIOVANNONI, S. J., PACE, N. R.: Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Ann. Rev. Microbiol.* **40** (1986), 337-365.
- OTTO, F. J.: High-resolution analysis of nuclear DNA employing the fluorochrome DAPI. In: *Methods in Cell Biology*. DARZYNKIEWICZ, Z., ROBINSON, J. P., CRISSMAN, H. A. (eds). Flow cytometry. Academic Press San Diego. Vol. **41** (1994), 211-217.

Literatur

- PAAU, A. S., COWLES, J. R., ORO, J.: Flow-microfluorometric analysis of *Escherichia coli*, *Rhizobium meliloti*, and *Rhizobium japonicum* at different stages of the growth cycle. *Can. J. Microbiol.* **9** (1977), 1165-1169.
- PACE, N. R., STAHL, D. A., LANE, D. J., OLSON G. J.: The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microb. Ecol.* **9** (1986), 1-55
- PAVLOU, S., KEVREKIDIS, I. G., LYBERATOS, G.: On the coexistence of competing microbial species in a chemostat under cycling. *Biotechnol. Bioeng.* **35** (1990), 224-232.
- PEMBERTON, J. M., CORNEY, B., DON, R. H.: Evolution and spread of spesticide ability among soil micro-organisms. In: Plasmids of medical, environmental and commercial importance. TIMMIS, K. N. PÜHLER, A. (eds). Elsevier/North-Holland Press (1979), 287-299.
- PETTERSSON, B., JOHANSSON, K.-E., UHLEN, M.: Sequence analysis of 16S rRNA from Mycoplasmas by direct solid-phase DNA sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* **60** (1994), 2456-2461.
- PIEPER, D. H., REINIKÉ, W., ENGESEER, K.-H., KNACKMUS, H.-J.: Metabolisms of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid and 2-methylphenoxyacetic acid by *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *Arch. Microbiol.* **150** (1988), 95-102.
- PIEPER, D. H., ENGESEER, K.-H., KNACKMUS, H.-J.: Regulation of catabolic pathways of phenoxyacetic acids and phenols in *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *Arch. Microbiol.* **151** (1989), 365-371.
- PORTER, J., M., ROBINSON, J., PICKUP, R., EDWARDS, C.: Recovery of bacterial sub-population from sewage using immunofluorescent flow cytometry and cell sorting. *FEMS Microbiol. Lett.* **133** (1995), 195-199.
- PORTER, J., DEERE, D., PICKUP, R., EDWARDS, C.: Fluorescent probes and flow cytometry: new insights into environmental bacteriology. *Cytometry* **23** (1996), 91-96.
- PORTER, J., DEERE, D., HARDMAN, M., EDWARDS, C., PICKUP, R.: Go with the flow - use of flow cytometry in environmental microbiology. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24** (1997), 93-101.
- POULSON, L. K., BALLARD, G., STAHL, D. A.: Use of rRNA fluorescence in situ hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** (1993), 1354-1360.
- RAMOS, J. L., HAÏDOUR, A., DUQUE, E., PIÑAR, G., CALVO, V., OLIVIA, J.-M.: Metabolism of nitrate esters by a consortium of two bacteria. *Nature Biotechnol.* **14** (1996), 320-322.
- RIGLER, R.: persönliche Mitteilung.
- RIGLER, R.: Fluorescence correlations, single molecule detection and large number screening. Applications in biotechnology. *J. Biotechnol.* **41** (1995), 177-186.
- ROBERTSON, B. R., BUTTON D. K.: Characterizing aquatic bacteria according to population, cell size, and apparent DNA content by flow cytometry. *Cytometry* **10** (1989), 70-76.
- ROTHEMUND, C., AMANN, R., KLUGBAUER, S., MANZ, W., BIEBER, C., SCHLEIFER, K.-H., WILDERER, P.: Microflora of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degrading biofilms on gas permeable membranes. *System. Appl. Microbiol.* **19** (1996), 608-615.
- RUIMY, R., BREITMAYER, V., BOVIN, V., CHRISTEN, R.: Assessment of the state of activity of individual bacterial cells by hybridization with a ribosomal RNA targeted fluorescently labelled oligonucleotidic probe. *FEMS Microbiol. Ecol.* **15** (1994), 207-214.
- SANDERS, C. A., YAJKO, D. M., HYUN, W., LANGLOIS, R. G., NASSOS, P. S., FULWYLER, M. J., HADLEY, W. K.: Determination of guanine-plus-cytosine content of bacterial DNA by dual-laser flow cytometry. *J. Gen. Microbiol.* **136** (1990), 359-365.

- SCHAECHTER, E., MAALØE, O., KJELDGAARD, N. O.: Dependence on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced growth of *Salmonella typhimurium*. J. Gen. Microbiol. **19** (1958), 592-606.
- SCHÖNHUBER, W., FUCHS, B., JURETSCHENKO, S., AMANN, R.: Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. Appl. Environ. Microbiol. **63** (1997), 3268-3273.
- SIMON, N., LEBOT, N., MARIE, D., PARTENSKY, F., VAULOT, D.: Fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes to identify small phytoplankton by flow cytometry. Appl. Environ. Microbiol. **61** (1995), 2506-2513.
- SHAPIRO, H. M.: Flow cytometry in laboratory microbiology: new directions. ASM News **56** (1990), 584-588.
- SHAPIRO, H. M.: Practical Flow Cytometry. 3rd ed. Wiley-Liss, New York (1995).
- SKARSTAD, K., STEEN, H. B., BOYE, E.: Cell cycle parameters of slowly growing *Escherichia coli* B/r studied by flow cytometry. J. Bacteriol. **154** (1983), 656-662.
- SKARSTAD, K., STEEN, H. B., BOYE, E.: *Escherichia coli* DNA distribution measured by flow cytometry and compared with theoretical computer simulations. J. Bacteriol. **163** (1985), 661-668.
- SKARSTAD, K., BOYE, E.: Degradation of individual chromosomes in *recA* mutants of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **175** (1993), 5505-5509.
- SNAPE, J. B., DUNN, I. J., INGHAM, J., PRENSIL, J. E.: Dynamics of environmental bioprocesses - modelling and simulation. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1995).
- SONNLEITNER, B.: Quantitation of microbial metabolism. Antonie von Leeuwenhoek **60** (1991), 133-141.
- STAHL, D. A., FLESHER, B., MANSFIELD, H. R., MONTGOMERY, L.: The use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. Appl. Environ. Microbiol. **54** (1988), 1079-1084.
- STAHL, D. A.: Application of phylogenetically based hybridization probes to microbial ecology. Molecular Ecology **4** (1995), 535-542.
- STEEN, H. B., BOYE, E.: Bacterial growth studied by flow cytometry. Cytometry **1** (1980), 32-36.
- STEEN, H. B., BOYE, E., SKARSTAD, K., BLOOM, B., GODAL, T., MUSTAFA, S.: Applications of flow cytometry on bacteria: cell cycle kinetics, drug effects, and quantitation of antibody binding. Cytometry **2** (1981), 249-257.
- STREBER, W. R., TIMMIS, K. N., ZENK, M. H.: Analysis, cloning and high-level expression of 2,4-dichlorophenoxyacetate monooxygenase gene *tda* of *Alcaligenes eutrophus* JMP134. J. Bacteriol. **169** (1987), 2950-2955.
- SWAMINATHAN, B., MATAR, G. M.: Molecular typing methods. In: Diagnostics molecular microbiology PERSING, D. H. et al. (eds). American Society for Microbiology, Washington (1993), 26-50.
- TIEDJE, J. M.: Approaches to the comprehensive evaluation of prokaryote diversity of a habitat. In: Microbial diversity and ecosystem function. ALLSOPP, D. et al. (eds). Cab International, University Press, Cambridge (1995), 73-100.
- THOMAS, J.-C., DESROSIERES, M., ST-PIERRE, Y., LIRETTE, P., BISAILLON, J.-G., BEAUDET, R., VILLMUR, R.: Quantitative flow cytometric detection of specific microorganisms in soil samples using rRNA targeted fluorescent probes and ethidium bromide. Cytometry **27** (1997), 224-232.

Literatur

- TORSVIK, V., GOKOSOYR, J., DAAE, F. L.: High diversity of DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56** (1990), 782-787.
- TOWNER, K. J., BERGOGNE-BÉRÉZIN, E., FEWSON, C. A. (editors): *The biology of Acinetobacter: taxonomy, clinical importance, molecular biology, physiology, industrial relevance*. Plenum Press, New York (1991).
- TREBESIU, K., AMANN, R., LUDWIG, W., MÜHLEGGGER, K., SCHLEIFER, K.-H.: Identification of whole fixed bacterial cells with nonradioactive 23S rRNA-targeted polynucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **60** (1994), 3228-3235.
- VAN DE PEER, Y., NICHOLAÏ, S., DE RIJK, P., DE WACHTER, R.: Database on the structure of small ribosomal subunit RNA. *Nucl. Acids Res.* **24** (1996), 92-97.
- VAN DILLA, M. A., LANGLOIS, R. G., PINKEL, D., YAJKO, D., HADLEY, W. K.: Bacterial characterization by flow cytometry. *Science* **220** (1983), 620-622.
- WAGNER, M., AMANN, R., LEMMER, H., SCHLEIFER, K. H.: Probing activated sludge with proteobacteria-specific oligonucleotides: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** (1993), 1520-1525.
- WAGNER, M., ERHART, R., MANZ, W., AMANN, R., LEMMER, H., WEDI, D., SCHLEIFER, K.-H.: Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **60** (1994), 792-800.
- WAGNER, M., RATH, G., AMANN, R., KOOPS, H.-P., SCHLEIFER, K.-H.: In situ identification of ammonia-oxidizing bacteria. *System. Appl. Microbiol.* **18** (1995), 251-264.
- WALLNER, G., AMANN, R., BEISKER, W.: Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* **14** (1993), 136-143.
- WALLNER, G., ERHART, R., AMANN, R.: Flow cytometric analysis of activated sludge with rRNA-targeted probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** (1995), 1859-1866.
- WALLNER, G., STEINMETZ, I., BITTER-SUERMANN, D., AMANN, R.: Combination of rRNA-targeted hybridization probes and immuno-probes for identification of bacteria by flow cytometry. *System. Appl. Microbiol.* **19** (1996), 569-576.
- WANG, Y., ZHANG, Z., RAMANAN, N.: The actinomycete *Thermobispora bispora* contains two distinct types of transcriptionally active 16S rRNA genes. *J. Bacteriol.* **179** (1997), 3270-3276.
- WARD, D. M., BATESON, M. M., WELLER, R., RUFF-ROBERTS, A. L.: Ribosomal RNA analysis of microorganisms in a natural as they occur in nature. *Adv. Microb. Ecol.* **12** (1992), 219-286.
- WESSENDORF, M. W., BRELJE, T.C.: Which fluorophor is brightest? A comparison of staining obtained using fluorescein, tetramethylrhodamine, lissamine rhodamine, texas red, cyanine 3.18. *Histochemistry* **98** (1992), 81-85.
- WILLIAMSON, D. H., FENNELL, D. J.: The use of fluorescent DNA-binding agent for detecting and separating yeast mitochondrial DNA. *Methodes Cell Biol.* **12** (1975), 335-351.
- WILLIAMSON, D. H., FENNELL, D. J.: Visualization of yeast mitochondrial DNA with the fluorescent stain "DAPI". *Methods Enzymol.* **56** (1979), 728-733.
- WOESE, C. R., FOX, G. E.: Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** (1977), 5088-5090.
- WOESE, C.R.: Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51** (1987) 221-271.

- YABUUCHI, E., KOSAKO, Y., YANO, I., HOTTA, H., NISHIUCHI, Y.: Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (RALSTON, PALLERONII and DOUDOROFF 1973) comb. nov., *Ralstonia solnacearum* (SMITH 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (DAVIES 1969) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* **39** (1995), 897-904.
- YANG, R. D., HUMPHREY, A. E.: Dynamic and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **17** (1975), 1211-1235.
- ZARDA, B., AMANN, R., WALLNER, G., SCHLEIFER, K.-H.: Identification of single bacterial cells using digoxigenin-labelled, rRNA-targeted oligonucleotides. *J. Gen. Microbiol.* **137** (1991), 2823-2830.

Bibliographische Beschreibung

Herrmann, Carsten

Durchflußzytometrische Charakterisierung der Populationsdynamik von *Acinetobacter calcoaceticus* und *Ralstonia eutropha*

Universität Leipzig, Dissertation

91 S., 143 Lit., 37 Abb., 7 Tab.

Referat

In dieser Arbeit wurde die Populationsdynamik von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V und *Ralstonia eutropha* JMP134 anhand von DNS-Fluorochromierung und *in situ*-Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten rRNS-gerichteten Oligonukleotidsonden durchflußzytometrisch charakterisiert. Als Modellorganismen für die Detoxifikation von Xenobiotika wurden beide Stämme in Mono- und Mischkulturexperimenten mit den Kohlenstoff- und Energiequellen Acetat und Phenol eingesetzt. Mit diesen Techniken sollte die Frage beantwortet werden, ob ein hoher rRNS-Gehalt bei Bakterien bei produktivem Abbau von Schadstoffen mit einer hohen spezifischen Abbaugeschwindigkeit korreliert. Eine lineare Kopplung des rRNS-Gehaltes zur Vermehrungsrate war für Monokulturen bisher beschrieben worden.

Durch die *in situ*-Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten rRNS-gerichteten Oligonukleotidsonden konnten die benutzten Stämme nach durchflußzytometrischer Messung identifiziert werden. Gleichzeitig konnte die Dynamik des rRNS-Gehaltes quantifiziert werden. Aus Monokulturexperimenten mit Acetat und Phenol als Kohlenstoff- und Energiequellen zeigte sich sowohl für *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V als auch für *Ralstonia eutropha* JMP134 die Abhängigkeit der rRNS-Gehalte von den spezifischen Wachstumsraten. Die Quantitäten der rRNS-Gehalte differierten bei den eingesetzten Substraten Acetat und Phenol.

Bei Versuchen mit chemostatischer Vermehrung auf der Kohlenstoff- und Energiequelle Phenol wurden Unregelmäßigkeiten bei beiden Stämmen in der linearen Korrelation von Ribosomengehalt zur Wachstumsrate gefunden. Bei diesen Kultivierungen zeigte sich auch, daß *Ralstonia eutropha* JMP134 einen wesentlich höheren rRNS-Gehalt bei gleichen Durchfluß- bzw. Wachstumsraten im Vergleich zu *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V hatte. Dies konnte bei Mischkulturexperimenten mit beiden Stämmen im Chemostaten bestätigt werden. Bei den kontinuierlichen Kultivierungen zeigten die durchflußzytometrisch ermittelten Häufigkeitsverteilungen, daß sich *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V, der Stamm mit dem geringeren rRNS-Gehalt, gegenüber dem Konkurrenten durchsetzte. Bei den untersuchten Arten, die unter konstanten Bedingungen (Durchflußrate) gemeinsam kultiviert wurden, zeigte sich die genotypische Abhängigkeit der rRNS-Quantität.

Aus den Mischkulturexperimenten folgt nach durchflußzytometrischer Messung, daß anhand der rRNS-Menge bei einer Population nicht auf eine bestimmte Vermehrungsrate bzw. auf eine entsprechende Substrat-Verwertungsaktivität geschlossen werden kann.

Lebenslauf

Carsten Herrmann
Gerberstr. 14
04105 Leipzig

Persönliche Daten

geboren am: 01.02.1967
in: Hemer
Familienstand: ledig
Eltern: Günter Herrmann
Christel Herrmann geb. Spieckermann

Schulbildung

1973 - 1977 Grundschole, Deilinghofen
1977 - 1987 Friedrich-Leopold-Woeste-Gymnasium, Hemer
Abitur: 26.05.1987

Wehrdienst

1987 - 1988 Wetterdienstsoldat in Stade

Studium

10/88 - 05/94 Studiengang Diplom-Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
09/90 Diplomvorprüfung in Biologie
03/93 Diplomhauptprüfungen in Mikrobiologie, Biochemie und Biophysik und Humangenetik (Nebenfach)
05/93 - 05/94 Diplomarbeit: Mikrobieller Abbau von stickstoffhaltigen Aromaten
Kinetik der Chinolinverwertung und Abbaubarkeit von Chinoxalin am Lehrstuhl Biologie der Mikroorganismen, Fakultät für Biologie unter Anleitung von Prof. Dr. W. Rürger

Promotion

09/94 - 12/96 wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung Biotechnologie, Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie, Universität Leipzig
Bearbeitung des Projektes „Flow-cytometrische Charakterisierung der Dynamik von Problemstoffe abbauenden bakteriellen Mischpopulationen“ unter Anleitung von Prof. Dr. T. Bley in Kooperation mit der Sektion Umweltmikrobiologie (Prof. Dr. W. Babel), Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH (UFZ)
01/97 - 12/97 Doktorand in der Sektion Umweltmikrobiologie, UFZ, Fortführung des Projektes unter Anleitung von Prof. Dr. W. Babel

Berufliche Tätigkeiten

01/91 - 03/91 wissenschaftliche Hilfskraft, Lehrstuhl für Zellphysiologie, Bochum
07/92 - 12/93 wissenschaftliche Hilfskraft, Lehrstuhl Biologie d. Mikroorganismen, Bochum
09/94 - 12/96 wissenschaftlicher Mitarbeiter, Abt. Biotechnologie, Leipzig
01/97 - 12/97 wissenschaftliche Hilfskraft, Umweltmikrobiologie, Leipzig

Herzlich bedanken möchte ich mich

bei Prof. Dr. W. Babel (UFZ, Umweltmikrobiologie) für die wissenschaftliche Anleitung und Unterstützung, für die Diskussionen und für das Interesse an dieser Arbeit

und bei Prof. Dr. T. Bley (TU Dresden, Bioverfahrenstechnik) für die vielfältige Betreuung der Arbeit, für die Hilfen und Anregungen sowie für das Vertrauen und die Möglichkeit, sehr selbständig arbeiten zu können.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Susann Müller (Universität Leipzig, Biowissenschaften), Dr. Andreas Lösche (Sächsisches Institut für Angewandte Biotechnologie, SIAB) und Dr. Simon Lange (TU Dresden, Bioverfahrenstechnik), die mich als Team in jeder Hinsicht biochemisch, physikalisch und elektrotechnisch unterstützt und die die durchflußzytometrischen Messungen in einem sehr netten Miteinander ermöglicht haben. Spezieller Dank an Frau Ingrid Konarski und an Dipl.-Ing. Ronny Große-Uhlmann (TU Dresden, Bioverfahrenstechnik) sowie an die restliche Crew der Biosignalisten.

Bedanken möchte ich mich ferner bei Dr. R. Müller, Dr. D. Simon und Frau Neytshev (alle UFZ, Umweltmikrobiologie) für die Proben bei den Nutristat-Experimenten, für die Anleitung zum Fermentieren und für weitere Unterstützung. Dank auch an Dr. T. Maskow für die Möglichkeit, die kalorimetrischen Experimente zu beproben sowie an Dipl.-Biol. H. Lorbeer für die Hilfen bei den Fluoreszenzaufnahmen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Dipl.-Ing. Uta Kunze (TU Dresden, Bioverfahrenstechnik), die einen ganz wesentlichen Anteil an die erfolgreiche Durchführung der Chemostat-Experimente hatte.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Dr. G. Wallner und der AG Durchflußzytometrie an der GSF in Neuherberg für die geleistete Unterstützung zu Beginn der Arbeit bedanken.

UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH
Sektion Umweltmikrobiologie
Permoserstraße 15
D-04318 Leipzig
Telefon 0341/235-2225
Telefax 0341/235-2247