

**Antimicrobially active microorganisms associated with
marine bryozoans**

Wirkstoffproduzierende Mikroorganismen assoziiert mit marinen Bryozoen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Herwig Heindl

Kiel, 2011

Referent/in: Prof. Dr. Johannes F. Imhoff
Koreferent/in: Prof. Dr. Peter Schönheit

Tag der mündlichen Prüfung: 13.05.2011

Zum Druck genehmigt: Kiel, 13.05.2011

gez. Prof. Dr. Lutz Kipp, Dekan

In Erinnerung an meine Oma

“I love deadlines. I like the whooshing sound they make as they fly by.”
Douglas Adams (1952 – 2001)

Table of contents

Summary	1
Zusammenfassung	2
General introduction.....	4
Bryozoans.....	4
Bryozoan-natural products	8
Bryozoan-microbe associations.....	11
The role of natural products in drug discovery - a focus on anti-infectives.....	14
Thesis outline	16
Chapter 1	
Phylogenetic diversity and antimicrobial activities of bryozoan-associated bacteria isolated from Mediterranean and Baltic Sea habitats	19
Abstract	20
Introduction	21
Material and methods	23
Results	26
Discussion	36
Chapter 2	
<i>Tenacibaculum adriaticum</i> sp. nov., from a bryozoan in the Adriatic Sea.....	42
Abstract	43
Description of <i>Tenacibaculum adriaticum</i> sp. nov.	49
Chapter 3	
<i>Membranipora membranacea</i> associated bacteria: impact of media on their isolation and antimicrobial activity.....	56
Abstract	57
Introduction	58
Materials and methods	60
Results	64
Discussion	78
Synthesis.....	84
Why are bryozoans underrepresented in natural products research?	84
Host-specific and opportunistic microorganisms are associated with bryozoans	85
Cultivation-based issues on assessing bacterial diversity	88
Antimicrobially active bacterial isolates	91
Significance and outlook.....	96
References	97
Danksagung	109
Scientific contribution to multiple-author publications	110
Erklärung.....	111

Summary

Bryozoans are sessile colonial animals that can be found in various aquatic and mainly in marine environments. Due to their sessile nature, bryozoans compete for surfaces they can colonize but, on the other hand, are confronted with microbial colonizers on their surfaces. Interactions of the bryozoan with its associates, as well as within the microbial community, are mediated chemically. Biofilm formation and composition is mainly influenced by the use of chemical compounds. Studies on the bryozoan-associated microbial diversity are scarce, and surveys on the antimicrobial potential of these associated bacteria are missing. The present study focused on isolating bryozoan-associated bacteria, assessing their antimicrobial properties and classifying them phylogenetically.

Various bryozoan specimens were collected in the Baltic (10 specimens) and the Mediterranean Sea (11 specimens). Bacteria were isolated using a variety of nutrient media and tested for their antimicrobial abilities against Gram-positive and Gram-negative indicator strains, as well as against the yeast *Candida glabrata*. 30% of all isolates displayed activity and were phylogenetically classified on the basis of 16S rDNA gene sequences. Whereas all isolates were active against Gram-positive indicators, four isolates exhibited additional anti-*Escherichia coli* activity, the phylogenetic analysis revealed affiliation to Gram-negative phyla (*Flavobacteria*, *Alpha-* and *Gammaproteobacteria*). One isolate belonged to the Gram-positive *Actinobacteria*. Both species- and strain-specific activity patterns were revealed. Furthermore, site-specific distribution patterns of associated bacteria were found.

Of these antibiotically active isolates, the strain B390 was described as type strain of the novel species *Tenacibaculum adriaticum*.

Also, specimens of the bryozoan *Membranipora membranacea* were sampled in the Baltic Sea for the first more detailed analysis on antimicrobially active isolates. Low-nutrient media featuring “artificial” or “natural” ingredients were used for isolation of bacteria. Additionally, the antibiotic test panel was extended to six different production media. The impact of these media on the phylogenetic diversity, as well as on activity patterns was determined. Although bacteria were affiliated with same phyla (*Alpha-* and *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*, additionally *Bacilli*), the isolates of this sampling were more diverse as far as genus or phylotype affiliation was concerned. Especially within the *Alphaproteobacteria*, several probably novel bacterial species were found. Furthermore, the use of six different media for activity testing resulted in a more than twofold higher hit rate of active isolates in comparison to only one single medium.

Zusammenfassung

Bryozoen sind sessile, koloniebildende Tiere, die in vielen aquatischen, und vor allem in marinen Lebensräumen anzutreffen sind. Wegen dieser sessilen Lebensweise konkurrieren Bryozoen um besiedelbare Oberflächen, sind aber andererseits mikrobieller Besiedelung ihrer eigenen Oberflächen ausgesetzt. Interaktionen zwischen Bryozoe und ihrem Bewuchs, als auch innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft werden auf chemischen Weg vermittelt. Biofilmbildung und –zusammensetzung wird hauptsächlich durch die Verwendung chemischer Verbindungen beeinflusst. Studien zur Bryozoen-assoziierten mikrobiellen Diversität sind rar, und Untersuchungen zum antimikrobiellen Potential der assoziierten Bakterien fehlen. Die vorliegende Arbeit richtete sich auf die Isolierung Bryozoen-assoziiierter Bakterien, deren antimikrobiellen Eigenschaften und phylogenetische Klassifizierung.

Verschiedene Bryozoenexemplare wurden in der Ostsee (10 Proben) und im Mittelmeer (11 Proben) gesammelt. Bakterien wurden mit Hilfe unterschiedlicher Nährmedien isoliert und auf antibiotische Aktivität gegen Gram-positive und Gram-negative Indikatorstämme sowie gegen die Hefe *Candida glabrata* getestet. 30% aller Isolate zeigten Aktivität und wurden auf Basis von 16S rDNA Gensequenzen phylogenetisch eingeordnet. Während die Aktivitäten aller Isolate gegen Gram-positive Stämme gerichtet war, vier Isolate waren zusätzlich gegen *Escherichia coli* aktiv, zeigte die phylogenetische Analyse eine Zuordnung zu Gram-negativen Phyla (*Flavobacteria*, *Alpha-* und *Gammaproteobacteria*). Ein Isolat gehörte den Gram-positiven *Actinobacteria* an. Sowohl spezies-, als auch stammspezifische Aktivitätsmuster wurden aufgezeigt. Darüber hinaus wurde eine probennahmestandortspezifische Verteilung der assoziierten Bakterien gefunden.

Eines dieser antibiotisch aktiven Isolate, der Stamm B390, wurde als Typstamm der neuen Spezies *Tenacibaculum adriaticum* beschrieben.

Ferner wurden Proben der Bryozoe *Membranipora membranacea* für die erste detailliertere Analyse antibiotisch aktiver Bakterien aus der Ostsee genommen. Medien mit geringem Nährstoffgehalt, mit „natürlichen“ oder „künstlichen“ Bestandteilen, wurden für die Isolierung verwendet. Weiters wurde die Nährmedienanzahl der antibiotischen Tests auf sechs erweitert. Der Einfluss der Medien auf die phylogenetische Diversität und auf die Aktivitätsmuster wurde bestimmt. Obwohl die Bakterien denselben Phyla zugeordnet wurden (*Alpha-* und *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*, zusätzlich *Bacilli*), war die Diversität dieser Isolate höher. Insbesondere innerhalb der *Alphaproteobacteria* wurden einige möglicherweise neue Bakterienarten gefunden. Außerdem führte die Verwendung von sechs

verschiedenen Nährmedien für die Aktivitätstests zu einer mehr als doppelt so hohen Ausbeute an antibiotisch aktiven Isolaten im Vergleich zu einem einzigen Medium.

Danksagung

Am Gelingen dieser Arbeit waren sowohl Rat und Tat innerhalb der Arbeitsgruppe, als auch die Unterstützung „fachfremder“ Menschen beteiligt. An dieser Stelle möchte ich mich bei diesen bedanken:

Zunächst danke ich Prof. Dr. Johannes F. Imhoff für die Möglichkeit, dass ich in seiner Abteilung an der Verknüpfung der beiden Themen ‚marine Mikrobiologie‘ und ‚Wirkstoffsuche‘ forschen durfte.

Mein besonderer Dank geht an Jutta Wiese für die moralische Unterstützung, die tolle Betreuung, das langwierige Korrekturlesen und ihren Optimismus.

Ich danke meinen Doktorandenbüro-Mitbewohnern für die schönen Diskussionen auch abseits vom Fach, für die Probennahmen- und Nicht-Probennahmen-Tauchgänge, die Kinobesuche und einfach dafür, dass ihr gute Freunde seid: Danke Kerstin, Franz, Nils und Tim.

Ich danke Vera Thiel für ihre unkomplizierte Mithilfe in erweiterten Phylogenieberechnungen.

Rolf Schmaljohann danke ich für die Auffrischung meiner verrosteten SEM Kenntnisse.

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die schöne Atmosphäre, in der ich gerne gearbeitet habe: ich danke denen, die während meiner Zeit da waren, gegangen (leider auch von uns) und neu dazugekommen sind.
Danke fürs Fegen.

Frau Arpe danke ich für die unbürokratische (Wieder-)Aufnahme in das Studentenheim, ohne sie hätte ich so kurzfristig keine Unterkunft bekommen.

Ich danke den Mitbewohnern im Kieler Kloster für die erneute herzliche Aufnahme und für das schöne Wohngefühl im Kloster.

Meine Eltern, meine und Deetjes Familie haben mich immer unterstützt und immer an mich geglaubt. Vielen Dank!

Zuletzt danke ich Deetje dafür, dass sie für mich da war und mich moralisch und emotional unterstützt hat.

Diese Dissertation ist meiner Oma gewidmet, die den Abschluss dieser Arbeit leider nicht mehr erleben konnte.

Scientific contribution to multiple-author publications

Chapter 1

“Phylogenetic diversity and antimicrobial activities of bryozoan-associated bacteria isolated from Mediterranean and Baltic Sea habitats”

Sampling of bryozoans at the Lysegrund site, as well as isolation of their bacteria was done by Jutta Wiese. Sampling at the remaining sites and isolation of the respective bacteria was done by Herwig Heindl. Experimental work (16S rDNA library, antimicrobial activity testing) was done by Herwig Heindl under supervision of Johannes F. Imhoff. Phylogenetic calculations were done by Vera Thiel. Evaluation of data and preparation of the manuscript was done by Herwig Heindl. The co-authors contributed to the manuscript by critical revision.

Chapter 2

“*Tenacibaculum adriaticum* sp. nov., from a bryozoan in the Adriatic Sea”

Experimental work, phylogenetic analysis and preparation of the manuscript was done by Herwig Heindl under supervision of Jutta Wiese. Johannes F. Imhoff contributed to the manuscript by critical revision.

Chapter 3

“*Membranipora membranacea* associated bacteria: impact of media on their isolation and antimicrobial activity”

Sampling of *M. membranacea* was done by Vera Thiel. Isolation of bacteria and experimental work was done by Herwig Heindl under supervision of Jutta Wiese. Phylogenetic trees were calculated by Vera Thiel. Evaluation of data and preparation of the manuscript was done by Herwig Heindl under critical revision by Johannes F. Imhoff and Jutta Wiese.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis verfasst habe, und dass sie nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist. Sie wurde keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Das mein einziges und bisher erstes Promotionsverfahren.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder zur Publikation eingereicht.

Kiel, den

Herwig Heindl