

**Naturstoffe algenassoziierter Bakterien
&
Naturstoffe der Gattung *Pseudomonas*
und deren Bedeutung für die Braunalge
*Saccharina latissima***

Dissertation

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

vorgelegt von
Dipl. Ing. (FH) Kerstin Nagel

Kiel 2013

Erster Gutachter: Prof. Dr. Johannes F. Imhoff

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Florian Weinberger

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2013

Zum Druck genehmigt: Kiel, 18.12.2013

gez. Prof Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan

Die praktischen Arbeiten wurden am Kieler Wirkstoff-Zentrum am Helmholtz-Zentrum für Ozeanforschung Kiel GEOMAR an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel von Januar 2008 bis März 2011 unter der Anleitung von Prof. Dr. Johannes F. Imhoff durchgeführt.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgesellschaft verfasst habe, und dass sie nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist. Außer den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln wurden keine weiteren verwendet. Sie wurde keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Dies ist mein erstes und bisher einziges Promotionsverfahren.

(Kerstin Nagel)

Ein Teil der während der Doktorarbeit erzielten Ergebnisse wurde in den folgenden Artikeln bzw. Tagungsbeiträgen veröffentlicht:

Publikationen:

Wiese, J., Thiel V., Nagel K., Staufenberg T., and Imhoff J. F. (2009). Diversity of antibiotic-active bacteria associated with the brown alga *Laminaria saccharina* from the Baltic Sea. *Mar Biotechnol* 11:287–300.

Nagel, K., Schneemann, I., Kajahn, I., Labes, A., Wiese, J. und Imhoff, J. F. (2012). Beneficial effects of 2,4-diacetylphloroglucinolproducing *Pseudomonads* on the marine alga *Saccharina latissima*. *Aquat Microb Ecol*, 67 (3). pp. 239-249.

Ohlendorf, B., Schulz, D., Erhard, A., Nagel, K. und Imhoff, J. F. (2012). Geranylphenazinediol, an acetylcholinesterase inhibitor produced by a *Streptomyces* species. *J Nat Prod*, 75 (7). pp. 1400-1404.

Tagungsbeiträge:

Wiese, J., Gärtner, A., Heindl, H., Kajahn, I., Krämer, M., Labes, A., Lang, G., Mitova, M., Nagel, K., Schmaljohann, R., Schneemann, I., Stöhr, R., Thiel, V., Yu, Z. und Imhoff, J. F. (2008) Marine microbial resources [Poster] In: 2. Bi-Annual Symposium "The Future Ocean", 06.-09.10, Kiel.

Nagel, K., Schneemann, I., Wiese, J., Kajahn, I., Labes, A. und Imhoff, J. F. (2009) Ecological impact of biologically active metabolites produced by *Laminaria saccharina* associated *Pseudomonas* sp. strains [Poster] In: 6th European Conference on Marine Natural Products, 19.-23.07, Porto, Portugal.

Baumann, H. I., Wiese, J., Gärtner, A., Goecke, F. R., Heindl, H., Kajahn, I., Kleinschmidt, K., Labes, A., Nagel, K., Neulinger, S., Ohlendorf, B., Schneemann, I., Schulz, D., Staufenberg, T., Thiel, V., Zinecker, H. und Imhoff, J. F. (2009) Biological role of secondary metabolites from marine microorganisms [Vortrag] In: VAAM-Symposium "Symbiotische Interaktionen", 19.-20.11, München.

Nagel, K., Schneemann, I., Kajahn, I., Wiese, J., Labes, , Lang, G., Goecke, F. R., Thiel, V. und Imhoff, J. F. (2009). Ecological impact of biologi-

cally active metabolites produced by *Laminaria saccharina* associated *Pseudomonas* sp. strains [Poster] In: VAAM Jahrestagung, 08.-11.03, Bochum.

Nagel, K., Schneemann, I., Kajahn, I., Wiese, J., Labes, A. und Imhoff, J. F. (2010) Pseudomonads in association with *Saccharina latissima* – evidence of a beneficial interaction in marine environments? [Poster] In: International VAAM-Workshop "Biology of bacteria producing natural products", 26.-28.09., Tübingen.

Labes, A., Nagel, K., Schneemann, I., Wiese, J. und Imhoff, J. F. (2011) From marine ecology to marine biotechnology – Small bioactive molecules in biological interactions and biotechnological applications [Poster] In: Cluster retreat Future Ocean, 28.-29.03., Schleswig.

Wiese, J., Schulz, D., Stöhr, R., Nagel, K., Labes, A., Schneemann, I., Heindl, H., Jansen, N., Silber, J., Kramer, A., Goecke, F. R., Schmaljohann, R., Staufenberger, T., Gärtner, A., Baumann, H. I., Kleinschmidt, K. und Imhoff, J. F. (2011). Biologically active compounds from microorganisms derived from marine macroorganisms and marine sediments [Poster] In: NatPharma: Nature Aided Drug Discovery, NADD, 05.-09.06., Napoli, Italy.

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Entwicklung von Naturstoffen am Beispiel von Antibiotika	2
1.2	Marine Naturstoffe	5
1.3	Assoziationen mariner Mikroorganismen	8
1.4	Algen	10
1.5	Pseudomonaden	14
1.6	Pflanzen-assoziierte Pseudomonaden	15
1.7	Fragestellung dieser Arbeit	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Nährmedien und Puffer.....	19
2.2	Chemikalien	23
2.3	Kits.....	24
2.4	Geräte	24
2.5	Probenahme	26
2.6	Isolierung und Identifizierung der Bakterienstämme	27
2.7	Konservierung der Bakterienstämme.....	29
2.8	Molekularbiologische Methoden	30
2.8.1	DNA-Extraktion.....	30
2.8.2	Polymerase Kettenreaktion.....	30
2.8.3	Sequenzierung.....	31
2.9	Phylogenetischer Stammbaum von <i>Pseudomonas</i> -Stämmen	32
2.10	Untersuchungen zu <i>Pseudomonas</i> sp. LD120.....	33
2.10.1	BIOLOG GN2	33
2.10.2	Substratverwertung.....	34
2.10.3	Fluoreszenznachweis	34
2.11	Anzucht und Extraktion der Bakterienkulturen.....	34
2.11.1	Anzucht auf Agarplatten.....	34
2.11.2	Anzucht in Flüssigkultur	35
2.11.3	Extraktion der Agarplatten	35
2.11.4	Extraktion der Kulturen im 25/100 mL Maßstab	35
2.11.5	Extraktion der Kulturen im 1 L Maßstab und Großansatz	36
2.12	Chromatographie.....	36
2.12.1	Analytische Chromatographie	37

2.12.2	Präparative Chromatographie	37
2.12.3	Semi-Präparative Chromatographie	38
2.13	Dereplikation	39
2.14	NMR-Spektroskopie	39
2.15	Bioassays	39
2.15.1	Antibiotische Bioassays	40
2.15.2	Enzyminhibitionsassays	41
2.15.3	Zellkulturbasierte Assays	42
2.15.4	Bakterien aus der KiWiZ-Sammlung	43
3	Ergebnisse.....	44
3.1	Isolierung biologisch aktiver Bakterien	44
3.2	Sind diese Bakterien mit <i>S. latissima</i> assoziiert?	57
3.3	Physiologisches Profil von <i>Pseudomonas</i> sp. LD120	60
3.4	Charakterisierung von <i>Pseudomonas</i> sp. LD120.....	61
3.5	Antimikrobielle Metabolite von <i>Pseudomonas</i> sp. LD120	62
3.6	Screening der Naturstoffproduktion Algen-assoziiertes Bakterien	62
3.6.1	Naturstoffproduktion von <i>Bacillus</i> sp. (Stamm LB084)	64
3.6.2	Naturstoffproduktion von <i>Kiloniella laminariae</i> (Stamm LD81)	66
3.6.3	Stimulationsexperiment mit <i>Kiloniella laminariae</i> (Stamm LD81)....	67
3.6.4	Naturstoffproduktion von <i>Pseudoalteromonas</i> sp. (Stamm LB034)..	69
3.6.5	Naturstoffproduktion von <i>Streptomyces</i> sp. (Stamm LB058).....	70
3.6.6	Naturstoffproduktion von <i>Streptomyces</i> sp. (Stamm LB114).....	72
3.6.7	Kultivierungsexperimente von <i>Streptomyces</i> sp. (Stamm LB114)...	74
3.6.8	Naturstoffproduktion von <i>Streptomyces</i> sp. (Stamm LB129).....	76
3.6.9	Naturstoffproduktion von <i>Streptomyces</i> sp. (Stamm LB173).....	78
3.6.10	Naturstoffproduktion von <i>Amycolatopsis</i> sp. (Stamm LB152)	79
3.6.11	Naturstoffproduktion von <i>Pseudomonas</i> sp. (Stamm LB012).....	80
3.6.12	Naturstoffproduktion von <i>Pseudomonas</i> sp. (Stamm LD120)	83
3.6.13	Kultivierungsexperimente von <i>Pseudomonas</i> sp. (Stamm LD120)...	85
3.6.14	Kultivierungsexperimente von <i>Pseudomonas</i> sp. (Stamm LB042) ...	91
3.6.15	Kultivierungsexperimente von <i>Pseudomonas</i> sp. (Stamm LB061) ...	93
3.6.16	Extraktion von <i>Pseudomonas</i> -Agarkulturen	99
3.7	Bioaktivitätsscreening isolierter Naturstoffe.....	102
3.7.1	Biologische Aktivität der Substanzen von <i>Pseudomonas</i> sp. (Stamm LB012)	103

3.7.2	Biologische Aktivität der Substanzen von <i>Pseudomonas</i> sp. (Stamm LD120).....	104
3.7.3	Biologische Aktivität der Substanzen von <i>Streptomyces</i> sp. (Stamm LB058).....	106
3.7.4	Biologische Aktivität der Substanzen von <i>Streptomyces</i> sp. (Stamm LB114).....	109
4	Diskussion.....	111
4.1	Stimulationsexperimente.....	111
4.2	Ökologische Bedeutung von <i>Pseudomonas</i> sp. LD120.....	114
4.2.1	Einfluss der Stoffwechselphysiologie auf <i>S. latissima</i>	114
4.2.2	Einfluss bakterieller Sekundärmetabolite auf <i>S. latissima</i>	116
4.3	Potential bakterieller Naturstoffproduzenten.....	119
4.3.1	<i>Bacillus</i> sp. (Stamm LB084).....	119
4.3.2	<i>Kiloniella laminariae</i> (Stamm LD81 ^T).....	120
4.3.3	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (Stamm LB034).....	120
4.3.4	Actinomyceten.....	122
4.3.5	Pseudomonaden.....	123
4.3.5.1	<i>Pseudomonas</i> -Stamm LB012.....	123
4.3.5.2	<i>Pseudomonas</i> -Stamm LD120.....	125
4.4	Untersuchungen zur Veränderung des Metabolitprofils.....	126
4.4.1	Kultivierungsexperimente mit <i>Streptomyces</i> sp. LB114.....	126
4.4.2	Kultivierungsexperimente mit <i>Pseudomonas</i> sp. (LB042, LB061, LD120).....	127
4.4.3	Agarplatten-Screening.....	128
4.5	<i>S. latissima</i> assoziierte Bakterien.....	129
4.6	Isolierung von Pseudomonaden.....	131
4.7	Abschließende Diskussion und Ausblick.....	133
5	Zusammenfassung.....	136
6	Summary.....	137
7	Danksagung.....	138
8	Literatur.....	140
9	Anhang.....	167
10	Abkürzungen.....	174
11	Lebenslauf.....	177

1 Einleitung

Der Mensch nutzt bereits seit Jahrtausenden mikrobielle Stoffwechsellösungen. In Ägypten und Babylon wurden schon vor 5000 Jahren Mikroorganismen zur Herstellung alkoholischer Getränke, bei der Sauerteigzubereitung und der Essigsäuregewinnung verwendet (Syldatk 2006). Im 14. Jahrhundert erfolgte die Essigherstellung bereits in größerem Maßstab (Orleans-Verfahren).

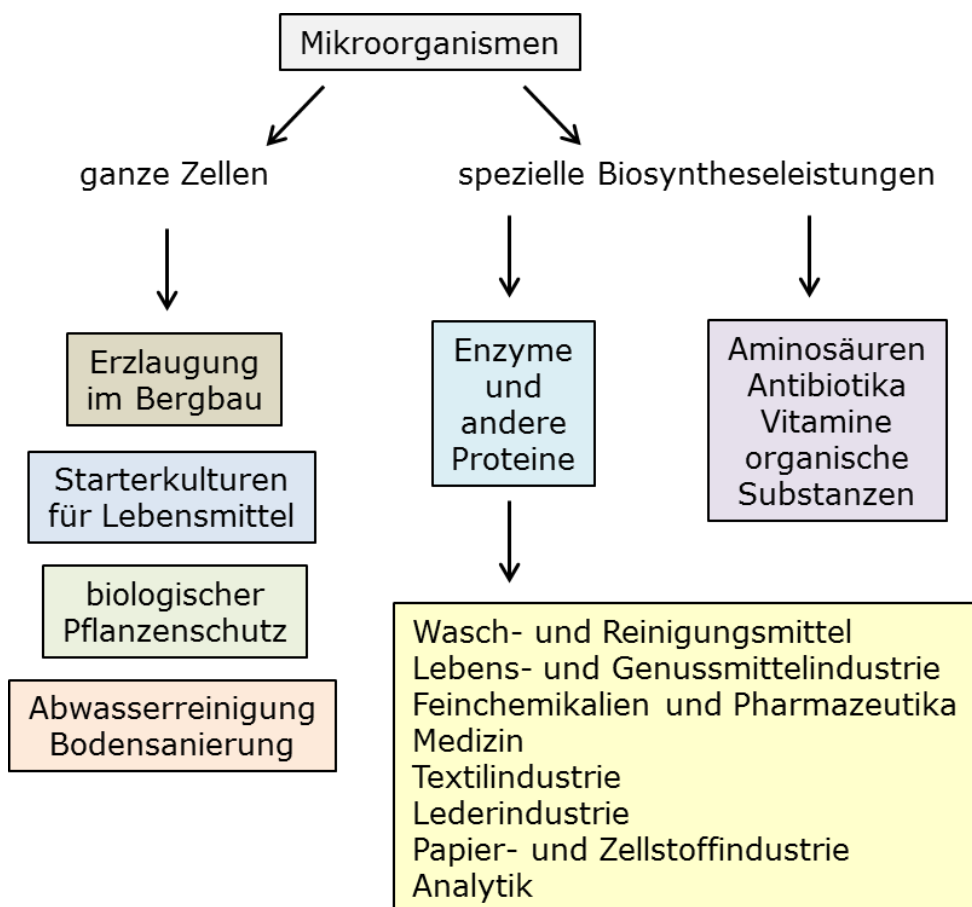


Abbildung 1: Einsatz von Mikroorganismen und deren Stoffwechsellösungen im Dienst des Menschen (Modifiziert nach Munk 2008).

Die Biotechnologie hat sich seit dem stetig weiter entwickelt und hat so zur gesellschaftlichen Entwicklung des Menschen beigetragen. Besonders rasant fand die Entwicklung neuer Prozesse in Zeiten materieller Engpässe statt, wie z.B. die Entwicklung der Antibiotika während des zweiten Weltkrieges (Ulber & Soyez 2004). Heute ist die Biotechnologie ein zukunfts-trächtiger Industriezweig mit vielen Anwendungsmöglichkeiten (siehe Ab-

bildung 1). Mikroorganismen und deren Enzyme finden Eingang in die Lebensmittelherstellung, Gesundheit, Pharma, Chemie und im Pflanzen- und Umweltschutz (Gavrilescu & Chisti 2005).

1.1 Entwicklung von Naturstoffen am Beispiel von Antibiotika

Eine der wichtigsten Entdeckungen in der Geschichte der Medizin war die Entdeckung der Antibiotika (Davies & Davies 2010). Durch diese Art der Therapie konnten sehr viele Leben gerettet (Aminov 2009) (Davies & Davies 2010) und die durchschnittliche Lebenserwartung verlängert werden (Lederberg 2000). Trotzdem sind Infektionskrankheiten weltweit immer noch die häufigste Todesursache, wobei die Letalität durch Infektionskrankheiten in Entwicklungsländern deutlich höher ausfällt als z.B. Westeuropa (Sonntag 2012). Zu den 3 häufigsten Todesursachen in den Ländern mit geringem Einkommen gehören Infektionen der unteren Atemwege (11,3 %) gefolgt von Durchfallerkrankungen (8,2 %) und HIV/AIDS (7,8 %) (World Health Organization, 2011). In Ländern mit hohem Einkommen gehören zu den 3 häufigsten Todesursachen ischämische Herzerkrankungen (15,6 %), Schlaganfall und andere Hirngefäßerkrankungen (8,7 %) sowie Krebserkrankungen von Lunge, Tracheen und Bronchien (5,9 %) (World Health Organization 2011). Die moderne Antibiotikatherapie begann mit der Entdeckung des Penicillins (**1**, Abbildung 2) aus *Penicillium notatum* (Fleming 1929) durch Alexander Fleming 1929 (Brakhage et al. 2005).

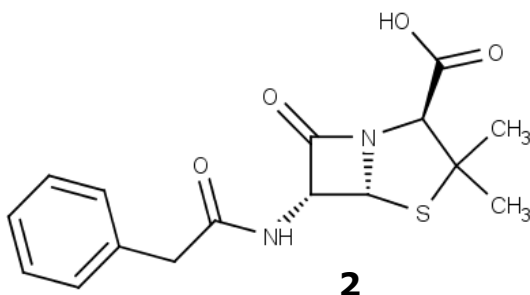


Abbildung 2: Struktur des antibiotischen Naturstoffs Penicillin G (**2**).

Der erste Patient wurde 1941 mit Penicillin behandelt (Ligon 2004). Da es Schwierigkeiten gab, den Stoff entsprechender Menge zu isolieren, erfolgte die Großproduktion für therapeutische Zwecke erst 1942 (Henderson 1997). Die Großproduktion stellt ein Problem dar, dass die Verwendung von Naturstoffen auch heute noch erschwert.

Die strukturelle Komplexität vieler Naturstoffe ist jedoch oftmals ein Ausschlusskriterium für die Entwicklung einer kommerziell realisierbaren Synthese (Kelecom 2002).

Die Suche und Entdeckung vieler weiterer Antibiotika ist auf die Erfolge des Penicillins zurückzuführen (von Nussbaum et al. 2006). Die Erkenntnis, dass Mikroorganismen eine gute Quelle für potentielle Antibiotika sind, hat die Suche nach neuen Arzneistoffen in diesen Organismengruppen angekurbelt, nachdem klar wurde, dass synthetische Substanzbibliotheken nicht den gewünschten Erfolg brachten (Roemer et al. 2012).

In High-Throughput-Screenings hat sich gezeigt, dass Naturstoff-Bibliotheken eine höhere Trefferquote erzielen als kombinatorische Bibliotheken (Spížek et al. 2010). Die höhere Trefferquote von Naturstoffen, im Gegensatz zu synthetischen Substanzen, könnte daran liegen, dass Naturstoffe statistisch gesehen mehr Sauerstoffatome, Stereozentren und polyzyklische Kohlenstoffskelette besitzen, welche Auswirkungen auf die biologische Wirkung haben können (Feher & Schmidt 2003). Dies könnte erklären, warum sich zurzeit die meisten bekannten Antibiotika von Naturstoffen ableiten bzw. Naturstoffe sind (Clardy & Walsh 2004).

Der Erfolg von Naturstoffen in der medizinischen Chemie könnte allerdings auch auf der Tatsache beruhen, dass jeder einzelne Sekundärmetabolit im Verlauf der Evolution in einem Netzwerk komplexer biologischer Abhängigkeiten entstanden ist (von Nussbaum et al. 2006). In den letzten 30 Jahren (1981-2010) waren 64 % der neu zugelassenen Substanzen („small-molecules“) Naturstoffe oder sind von Naturstoffen abgeleitete Substanzen (Newman & Cragg 2007, Newman 2008, Newman & Cragg 2012).

Trotz der früheren Erfolge des Penicillins haben viele Pharmaunternehmen ihre Forschung und Entwicklung auf die Behandlung chronischer Erkrankungen umgestellt. Dieser Markt ist zum einen profitabler und zum anderen ist das wirtschaftliche Risiko geringer bzw. besser kalkulierbar (von Nussbaum et al. 2006).

In Bezug auf das wirtschaftliche Risiko im Allgemeinen ist zu sagen, dass es durchschnittlich 9-12 Jahre dauert, aber auch zwischen 10-20 Jahre dauern kann (Dickson & Gagnon 2004) und ca. 800 Mio. \$ (für das Jahr 2000) kosten kann (DiMasi et al. 2003), ein neues Medikament auf den Markt zu bringen. Dabei sind ca. 65 % der Kosten auf die klinischen Studien (I – III) zurückzuführen (Paul et al. 2010, DiMasi & Grabowski 2007). Des Weiteren erlangt nur eine von ca. 5000 Substanzen die Marktreife (Gambardella 1995).

Der steigende Anteil älterer Menschen und immunsupprimierter Patienten sowie die Zunahme resistenter Krankheitserreger sprechen jedoch dafür, die Suche nach neuen Antibiotika nicht einschlafen zu lassen (Spížek et al. 2010), da man sonst von einem Rückfall in die „Prä-Antibiotika-Ära“ sprechen könnte (Davies 2011). Trotzdem sind die Arzneimittelneuzulassungen von antibiotisch wirksamen Substanzen im Zeitraum von 1981–2010 weiterhin rückläufig (Newman & Cragg 2012).

Es wird jedoch wieder verstärkt nach neuen antibakteriellen Wirkstoffen geforscht (Gram et al. 2010).

Neue Antibiotika werden zum einen aus der Erforschung von Actinomyceeten erwartet (Baltz 2008) und zum anderen setzt man große Erwartungen in den Einsatz mariner Naturstoffe zur Arzneistoffentwicklung (Glaser & Mayer 2009). Eine alternative Strategie zur Entwicklung neuer Antibiotika ist es, eine Inventur bereits bekannter Antibiotika vorzunehmen. Pulcini et al. (2012) haben gezeigt, dass ca. die Hälfte von ausgewählten „altbekanntem“ Antibiotika, welche jedoch nur in wenigen Ländern vermarktet wurden, entweder gegen resistente Gram-positive oder Gram-negative Bakterien wirksam sein können. Da nur wenige neue Antibiotika in der Entwicklungspipeline stecken (Baltz 2006), könnten diese in Vergessenheit

geratenen Antibiotika daher eine wichtige Übergangslösung im Wettlauf gegen multiresistente Erreger darstellen (Pulcini et al. 2012).

Die meisten Antibiotika-Gruppen wurden nach dem zweiten Weltkrieg gefunden (Holzgrabe 2004). Vor 50 Jahren führte einfaches Screenen der Kulturüberstände von Actinomyceten und Pilzen zur Entdeckung neuer Antibiotika (Baltz 2008). Heute ist das Auffinden neuer Substanzen immer schwieriger und teurer geworden (Holzgrabe 2004). Mit den Methoden jedoch, die heute zur Verfügung stehen, wie z.B. Hochdurchsatz-Fermentation, Isolation mariner Actinomyceten, Durchsuchung des Genoms nach kryptischen Biosynthesewegen und der kombinatorischen Biochemie, könnten neue Arzneistoffe entwickelt werden (Baltz 2008). Studien an Genomen von Actinomyceten zeigten das Vorhandensein von 20 oder mehr Biosynthesewegen pro Stamm, die zur Entwicklung potentieller neuer Antibiotika genutzt werden könnten (Davies 2011). Die Variation der Kultivierungsbedingungen von Mikroorganismen, die das genetische Potential zur Produktion vieler Sekundärmetabolite haben, gilt als der wahrscheinlich einfachste Weg, neue Substanzen zu erhalten (Bode & Müller 2005). Des Weiteren kann aber auch der Zusatz von „Autoinduktoren“ wie z.B. γ -Butyrolactonen zu Veränderungen (Steigerung) der Sekundärmetabolitproduktion führen (Ohnishi et al. 2005).

1.2 Marine Naturstoffe

Naturstoffe von terrestrischen Pflanzen und Mikroorganismen sind schon lange eine traditionelle Quelle für Arzneistoffe, wie z.B. Morphin aus Mohn oder Penicillin aus Pilzen (Jensen & Fenical 2000, Capon 2001, Cragg et al. 2009). Die Entdeckung der beiden ersten biologisch aktiven marinen Naturstoffe, dem Spongothymidin (**2**, Abbildung 3) und dem Spongouridin (**3**, Abbildung 3) aus dem Schwamm *Tethya crypta*, geschah in den 1950er Jahren durch Bergmann (Bergmann & Feeney 1951, Bergmann & Burke 1955). Die beiden Substanzen Spongouridin und Spongothymidin stellen die Leitstrukturen für die Entwicklung der Virustatika Vidarabin (**4**,

Abbildung 4), Cytarabin (**5**, Abbildung 4) und Acyclovir (**6**, Abbildung 4), (Proksch et al. 2002, Mayer et al. 2010).

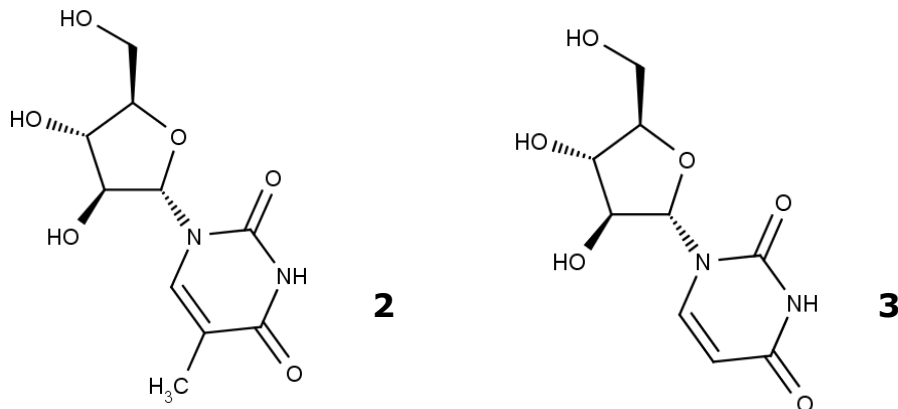


Abbildung 3: Struktur der beiden ersten biologisch aktiven marinen Naturstoffe Spongthymidin (**2**) und Spongouridin (**3**).

Diese Beispiele zeigen, dass vor allem auch marine Naturstoffe eine bedeutende Quelle für neue Leitstrukturen sind (Gulder & Moore 2009). Die Entdeckung, dass marine Organismen eine ergiebige Quelle von zuvor unbeschriebenen Sekundärmetaboliten sind, ist jedoch nicht gänzlich überraschend, wenn man berücksichtigt, dass viele Algen- und Invertebraten-Stämme ausschließlich im Meer vorkommen (Jensen & Fenical 1994).

Das Interesse an marinen Naturstoffen erforderte eine Weiterentwicklung der bisher angewandten Methoden (Molinski et al. 2009). Die Erfindung des technischen Tauchens vor ca. 60 Jahren machte die Probenahme mariner sessiler Organismen erst möglich (Molinski et al. 2009).

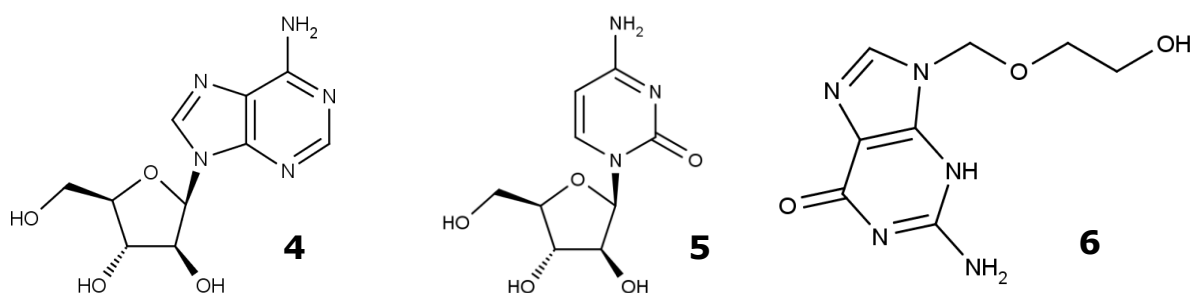


Abbildung 4: Strukturen der Virustatika Vidarabin (**4**), Cytarabin (**5**) und Acyclovir(**6**).

Die Pionierarbeit bezüglich chemischer und pharmakologischer Grundlagenforschung sowie gezielte Bestrebungen in Richtung Arzneistoffentwicklung aus marinen Naturstoffen begannen in den 1970er Jahren (Capon

2001). Die Zulassung eines weiteren Wirkstoffes aus dem Meer, dem Ziconotide (ω -Conotoxins MVIIA) (**7**, Abbildung 5), erfolgte erst 2004 unter dem Handelsnamen Prialt (Molinski et al. 2009). Das Peptid besteht aus 25 Aminosäuren und wurde aus dem Gift der Kegelschnecke *Conus magus* isoliert (Oliva et al. 2001).

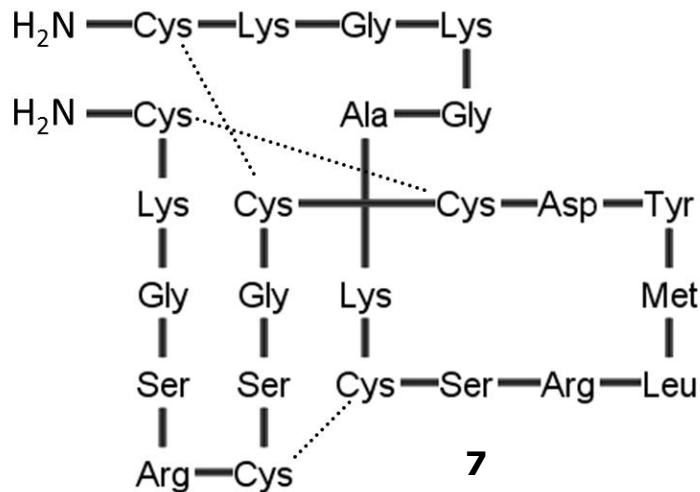


Abbildung 5: ω -Conotoxin MVIIA (**7**). Die Aminosäuren sind über drei Schwefelbrücken quervernetzt.

Es hat sich oft gezeigt, dass es sehr schwierig, manchmal auch unmöglich ist, ausreichend Substanzmenge von Invertebraten oder Makroalgen zu beschaffen. Entweder, weil die produzierte Menge im Organismus zu gering ist oder weil der Organismus selbst in zu geringer Anzahl vorhanden ist (Kelecom 2002). Fortschritte in der Molekularbiologie, Genomforschung und Bioinformatik haben aber dazu geführt, das Potential der marinen Naturstoffe besser ausnutzen zu können und die nachhaltige Verfügbarkeit von marinen Substanzen zu verbessern (Gulder & Moore 2009).

Auf Grund struktureller Ähnlichkeiten von biologisch aktiven Naturstoffen aus Eukaryoten mit denen von Bakterien wird vermutet, dass die wahren Produzenten häufig bakterielle Symbionten sind und nicht die marinen Invertebraten, von denen die Substanzen isoliert wurden (Piel 2004). Mittlerweile untermauern zahlreiche Beispiele die Hypothese, dass Bakterien häufig die eigentlichen Produzenten der Sekundärmetabolite sind (Unson et al. 1994, Davidson 1995, Partida-Martinez & Hertweck 2005, Piel 2004,

Piel 2009) und somit eine aussichtsreiche Quelle für bioaktive Substanzen (Burgess et al. 1999, Debnath et al. 2007). Die Symbionten-Hypothese hat viel Interesse auf sich gezogen, da sie impliziert, dass man mittels bakterieller Fermentation wirtsunabhängige Produktionssysteme erstellen kann (Piel 2006).

Da Bakterien die Naturstoffproduzenten sind, konnten auch mehrere „genomics-inspired“ Strategien entwickelt werden, die dazu geführt haben neue Metabolite zu entdecken, die unter Standardfermentationen und den üblichen Detektionsbedingungen oft übersehen wurden (Winter et al. 2011). Die meisten Bakterien produzieren durch die Nutzung verschiedener Stoffwechselwege sehr unterschiedliche Substanzklassen von Naturstoffen (Kelecom 2002).

Für lange Zeit entstammte unser Wissen über Bakterien nur von kultivierbaren Organismen (Piel 2011). Doch ca. 50 % aller identifizierten Phyla von Bakterien beinhalten auch bisher unkultivierte Vertreter (Rappé & Giovannoni 2003).

Durch die Genomforschung hat sich gezeigt, dass sich bisher wenig erforschte Organismen auch als potentielle Produzenten von Sekundärmetaboliten erweisen (Berti et al. 2007) und das metabolische Potential vieler Mikroorganismen weit unterschätzt wird (Winter et al. 2011).

Die ersten marinen Arzneistoffe haben sich erfolgreich auf dem Pharmamarkt etabliert, wie z.B. Prialt (Ziconotide,) und es stecken weitere Kandidaten in der Pipeline (PharmaMar 2013). In den Jahren 2008, 2009 und 2010 wurden jeweils 1065, 1011 und 1003 neue marine Naturstoffe veröffentlicht (Blunt et al. 2010, 2011, 2012). Somit stellt das immer noch wenig erforschte Meer eine viel versprechende Nische für die Entdeckung neuer bioaktiver Substanzen dar (Gulder & Moore 2009).

1.3 Assoziationen mariner Mikroorganismen

Die Suche nach neuen Naturstoffen aus marinen Organismen führte auch vor 60 Jahren schon zur Frage, wie sich diese Organismen gegen Fraßfeinde, Konkurrenten und Krankheiten verteidigen (Newman et al.

2009), da marine Makroalgen und andere sessile Organismen permanent Mikroorganismen, wie z.B. Viren, Bakterien und Pilzen, ausgesetzt sind (Potin et al. 2002). Demzufolge war neben der biotechnologischen Anwendung auch die ökologische Bedeutung bereits von Interesse. Rückblickend scheint die Entdeckung, dass marine Organismen eine gute Quelle für neue Naturstoffe sind, nur logisch, da z.B. viele marine Weichtiere offenbar über keine strukturellen Verteidigungsmechanismen verfügen und sie toxische Sekundärmetabolite als chemische Verteidigung produzieren (Jensen & Fenical 1994). Auf Grund einer fehlenden zellbasierten immunologischen Abwehrreaktion könnte die Produktion von bioaktiven Sekundärmetaboliten auch bei Makroalgen ein wesentlicher Mechanismus zur Abwehr mikrobieller Angriffe sein (Thomas et al. 2008).

Mittlerweile weiß man jedoch, dass in vielen Fällen Mikroorganismen die eigentlichen Naturstoffproduzenten sind und nicht ausschließlich die Invertebraten oder Algen (Schmidt 2005, Egan et al. 2008, König et al. 2006, Lane & Kubanek 2008, Imhoff et al. 2011). Infolge vielfältiger biologischer Interaktionen haben sich auch auf den Oberflächen mariner Makroorganismen veränderliche und komplexe mikrobielle Gemeinschaften entwickelt (Goecke et al. 2010). Die Interaktionen zwischen Wirt und besiedelnden Mikroorganismen, welche durch chemische Moleküle vermittelt werden, sowie Interaktionen zwischen den Mikroorganismen in einer Biofilmgemeinschaft und oberflächenspezifische physikalische und chemische Bedingungen wirken sich unterschiedlich auf die Diversität und Funktion von oberflächenassoziierten Mikroorganismenverbänden aus (Egan et al. 2008).

Es gibt Untersuchungen, die belegen, dass sich die Mikroorganismenpopulation z.B. von Schwämmen, gegenüber denen von unbelebten Oberflächen in direkter Umgebung unterscheiden (Hentschel et al. 2003, Thoms et al. 2003, Lee & Qian 2004, Taylor et al. 2004, Thiel et al. 2007), was zu der Annahme führt, dass es eine spezifische Mikroorganismen-Makroorganismus-Assoziation gibt (Dobretsov & Dahms 2005, Thiel et al. 2007).

Im Gegensatz zu freilebenden planktonischen Mikroorganismen, welche häufig sich verändernden Umweltbedingungen ausgesetzt sind und sich daher kurzfristig neu anpassen müssen, haben sich oberflächenassoziierte Mikroorganismen vermutlich spezialisierter und stabiler an ein durch den Wirt gebildetes Mikrohabitat angepasst (Penesyan et al. 2010). Das Ansiedeln von Organismen auf Oberflächen von lebenden Individuen (Epibiose) kann sowohl von Vorteil als auch von Nachteil für den Wirt sein (Dobretsov & Dahms 2005). Vorteile wären die Produktion von Antifouling-Substanzen durch Epibionten (Walls et al. 1993, Harder & Lau 2003, Piel 2004) und die Versorgung mit Nährstoffen (Mercado et al. 1998). Nachteile dagegen beinhalten die Möglichkeit der Wachstums hemmung, Nekrose oder Tod des Wirtsorganismus (Wahl & Mark 1999). Über die komplexen Umstände von Mikroben-Makroorganismen-Interaktionen ist bisher wenig bekannt, im Besonderen was die *in-situ* Situation anbelangt (Goecke et al. 2012, Nagel et al. 2012, Wahl et al. 2012).

Das Verständnis bezüglich der Diversität und Ökologie von oberflächenassoziierten mikrobiellen Gemeinschaften wird auch entscheidend zur Entdeckung neuer bioaktiver Substanzen beitragen (Egan et al. 2008).

1.4 Algen

Marine Makroalgen sind Pflanzen, welche sich hauptsächlich an Gestein oder andere feste Substrate in der Küstenregion anheften (Rorrer & Cheney 2004). Der Vegetationskörper ist relativ undifferenziert und es gibt keine echten Wurzeln oder Blätter (Kück & Wolff 2009). Makroalgen gehören drei unterschiedlichen Gruppen an. Diese wurden auf der Basis der Farbe des Thallus in Rotalgen (Rhodophyta), Braunalgen (Phaeophyta) und Grünalgen (Chlorophyta) unterschieden (Abbildung 6a-c)(Ali et al. 2001). Die Unterschiede entstammen den verschiedenen Evolutionsprozessen, primäre Endosymbiose bei Grün- und Rotalgen und sekundäre Endosymbiose bei Braunalgen (Lecointre & Guyader 2006).

Zu den braunen Meeresalgen gehören auch die beiden Gattungen *Laminaria* und *Saccharina*, die gemeinhin Tang oder auch Kelp genannt werden (Bolton 2010).

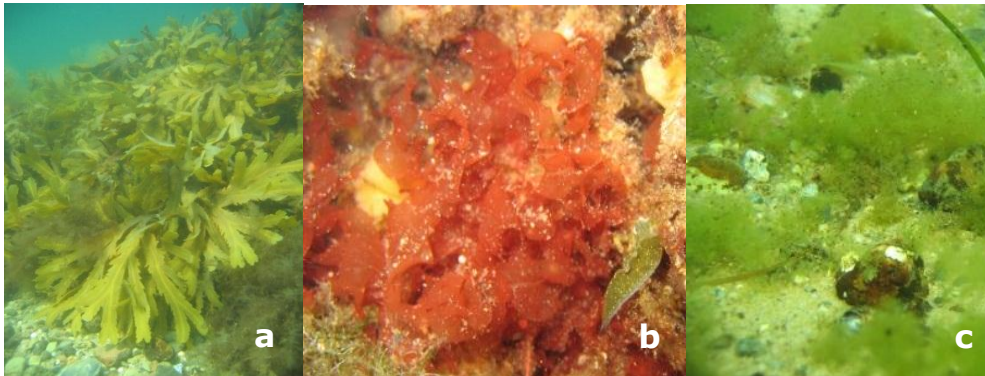


Abbildung 6: Einteilung der Algen illustriert am Beispiel von Algen der Ostsee: a. Braunalge *Fucus serratus*, b. Rotalge *Chondrus crispus*, c. Grünalge *Spongomorpha aeruginosa* (Fotos, T. Staufenberger).

Laminaria und *Saccharina* zeigen einen heteromorphen Generationswechsel (Abbildung 7): Die Sporophyten sind recht große, thallöse Algen (Tange), während die Gametophyten aus mikroskopisch kleinen, verzweigten Zellfäden bestehen (Oltmanns 1922).

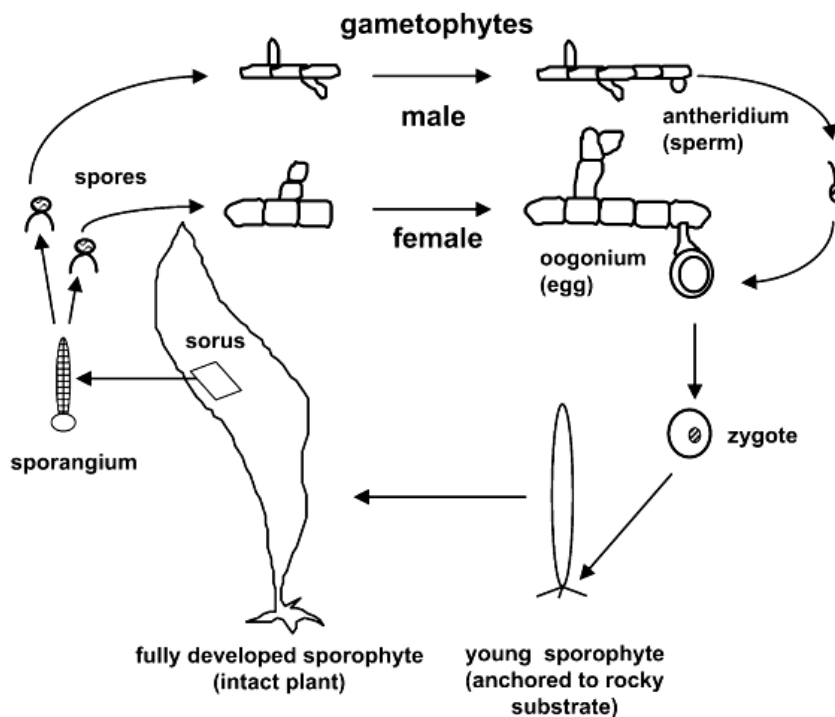


Abbildung 7: Lebenszyklus der Braunalge *Saccharina latissima*. Die Darstellung ist nicht maßstabsgetreu gezeichnet. Der junge Sporophyt ist anfänglich mikroskopisch klein (Rorrer & Cheney 2004).

Der große Sporophyt der Laminariales (Makrothallus) hat eine thallose Struktur und wird unterteilt in das Haftorgan (Rhizoid), den Stiel (Cauloid) und den Thallus (Phylloid) (Lee 1999) (Abbildung 8). Das Rhizoid kann mit der Wurzel einer Pflanze verglichen werden. Bei den Laminariales besteht er aus sogenannten Hapteren (Krallen), mit deren Hilfe der Sporophyt sich an Steinen anheftet (Lane 2005). Das Cauloid (bei Pflanzen die Sprossachse) bildet einen Stiel von dem ein oder mehrere blattähnlichen Wedel (Phylloide) ausgehen (Raven et al. 2006).

Saccharina latissima (Linnaeus) J.V. Lamouroux ist auch bekannt als *Laminaria saccharina* (Zuckertang, Abbildung 8, 9 a, b) (Lane et al. 2006). Der blattartige Thallus von *S. latissima* hat eine gelbbraune Farbe und kann bis zu 4 m lang werden. Der Thallus ist bandförmig und am Rand stark gewellt (Fish & Fish 2011).

Das Verbreitungsgebiet des Zuckertangs umfasst die felsigen Meeresküsten der kühl-gemäßigten Zonen von Europa, Asien und Amerika. In Europa kommt er vom Nordatlantik bis zur Ostsee und dem westlichen Mittelmeer vor (Oltmanns 1922).

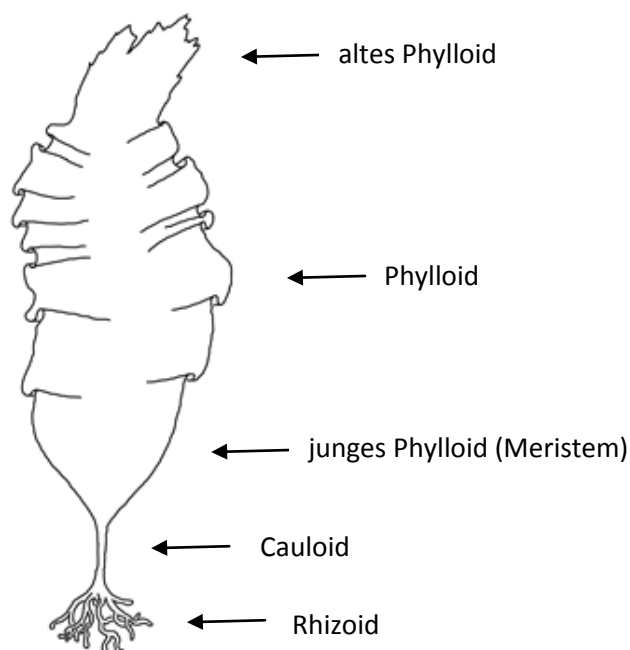


Abbildung 8: Schematische Darstellung von *Saccharina latissima* (T. Staufenberger).

Er bildet zusammen mit *Laminaria*-Arten Tangwälder im Sublitoral unterhalb der Niedrigwasserlinie (Kornmann & Sahling 1977). In der Kieler Förde wächst der Zuckertang in einer Meerestiefe von 4 bis 10 Metern (Schaffelke et al. 1996). Der Zuckertang ist essbar. Er enthält Zucker, die ihn leicht süß schmecken lassen (Behrmann 1976).

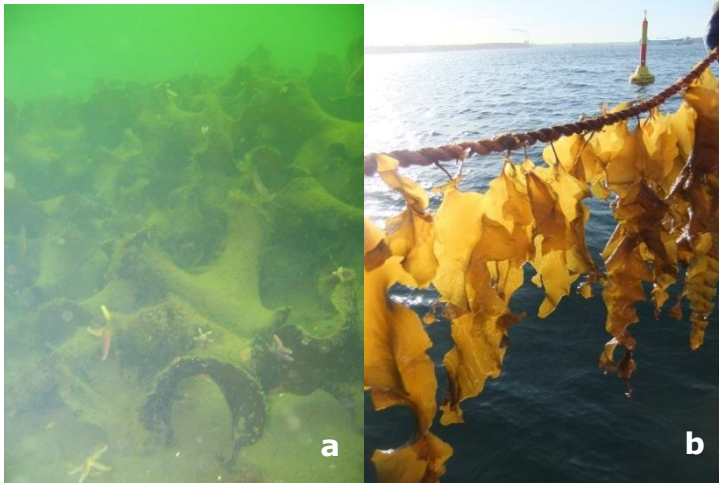


Abbildung 9: a. *Saccharina latissima* in der Kieler Förde (T. Staufenberger), b. *S. latissima* (CRM - Coastal Research and Management GbR, Kiel).

Terrestrische Pflanzen haben Strategien entwickelt, bestimmte Gruppen von antagonistischen Mikroorganismen zu stimulieren und zu fördern, welche in der Rhizosphäre mittels ihrer Sekundärmetabolite als Verteidigung gegen bodenbürtige Pflanzenpathogene fungieren (Weller et al. 2007).

Auch im marinen Habitat sind Assoziationen zwischen Bakterien und Makroalgen weit verbreitet (Goecke et al. 2010). Studien die die Resistenz mariner Pflanzen gegenüber Krankheiten erforschen, deuten darauf hin, dass auch hier Sekundärmetabolite eine besondere Bedeutung in der Abwehr schädlicher mariner Mikroorganismen spielen (Engel et al. 2006). Auch für die Makroalge *S. latissima* konnte nachgewiesen werden, dass die Alge mit einer Vielzahl von antimikrobiell aktiven Bakterien besiedelt ist (Wiese et al. 2009b). Weiterhin wurde gezeigt, dass sich die Bakteriengemeinschaften der verschiedenen Algenabschnitte unterscheiden (Staufenberger et al. 2008).

Die Forschung über bakterielle Krankheitserreger von Makroalgen steht allerdings immer noch am Anfang (Egan et al. 2013). Des Weiteren basieren

die meisten Studien auf kultivierungsabhängigen Methoden und sind daher nur bedingt aussagekräftig, zumindest was die natürliche Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft anbelangt (Goecke et al. 2010).

Zu den mit *S. latissima* assoziierten Bakterien gehören auch Pseudomonaden. Es wird vermutet, dass die Pseudomonaden auf Grund ihrer Sekundärmetabolitproduktion einen positiven Einfluss auf die Braunalge *S. latissima* haben (Nagel et al. 2012).

1.5 Pseudomonaden

Bakterien der Gattung *Pseudomonas* sind gerade oder leicht gebogene Stäbchen mit einem Durchmesser von 0,5–1,0 µm und einer Länge von 1,5–4,0 µm (Palleroni & Doudoroff 1972). Pseudomonaden sind Gram-negativ, Oxidase-positiv oder -negativ und Katalase-positiv (Stanier et al. 1966). Die Beweglichkeit der meisten Pseudomonaden gründet sich auf das Vorhandensein von einer oder mehreren polaren Flagellen (Stanier et al. 1966). Die Beweglichkeit ermöglicht den chemoorganotrophen Zellen, auf chemische Stimulation (Chemotaxis) zu reagieren und unterstützt die Fähigkeit der Bakterien, organische Substanzen in geringen Konzentrationen zu lokalisieren (Moore & Tindall 2006). Bakterien der Gattung *Pseudomonas* sind ubiquitär vorkommende Organismen (Cornelis 2010). Ihr Habitat erstreckt sich vom marinen Milieu und der terrestrischen Umgebung bis hin zu pflanzlichem und tierischem Gewebe (Spiers et al. 2000, Peix et al. 2009). Im Grunde stellen alle Bereiche mit einem Temperaturbereich zwischen 4 und 42 °C, einem pH zwischen 4 und 8 sowie dem Vorhandensein einfacher oder komplexer organischer Substanzen ein potentiell Habitat dar (Moore & Tindall 2006). Der anspruchslose Nährstoffbedarf, der Umfang verwertbarer C-Quellen sowie die genetische und metabolische Anpassungsfähigkeit könnten Grund für das weit verbreitete Vorkommen dieser Organismen sein. Die Gattung *Pseudomonas* beinhaltet Arten, die eine große Auswahl an organischen und anorganischen Substanzen verstoffwechseln können, inklusive toxischer organischer Chemikalien, wie aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe (Moore &

Tindall 2006). *Pseudomonas*-Arten sind generell schnell wachsende, aerobe Bakterien. *Pseudomonas*-Stämme sind oft resistent gegenüber Antibiotika, Desinfektionsmittel, Reinigungsmittel, Schwermetallen und organischen Lösungsmitteln (Palleroni 1993).

Die Gattung *Pseudomonas* ist bekannt für ihre genetische Diversität und Plastizität (Spiers et al. 2000). Viele Arten, die zuvor als *Pseudomonas* beschrieben wurden, sind heute in andere Gattungen neu eingeordnet (Anzai et al. 2000). Die Anerkennung der phylogenetischen Heterogenität von Bakterien, die zuvor als *Pseudomonas* klassifiziert wurden, hat Anlass zu einer Neubewertung der phänotypischen Charakteristika, metabolischer Aktivitäten, Genetik, Ökologie und anderer Charakteristika gegeben (Moore & Tindall 2006).

Gen-Cluster für Sekundärmetabolite von Pseudomonaden sind in Zahl und Mannigfaltigkeit mit denen von den produktiven Actinomyceten vergleichbar (Gross & Loper 2009). Durch die *in silico* Analyse des Genoms von *P. protegens* Pf-5 konnte ein Gencluster identifiziert werden, das wahrscheinlich für ein zyklisches Lipodecapeptid (CLP) codiert (Paulsen et al. 2005). Auch wenn die Struktur des CLP noch durch chemische Analysen bestätigt werden muss, zeigt dieser Ansatz, dass die Genomsequenzierung zur Entdeckung bisher unbekannter Gene führen kann, die relevant für die biologische Aktivität von Pseudomonaden sein könnten (de Bruijn et al. 2007). Die Suche nach neuen Gen-Clustern in Pseudomonaden wird somit das schon bemerkenswerte Spektrum an bekannten Sekundärmetaboliten noch erweitern (Gross & Loper 2009).

1.6 Pflanzen-assoziierte Pseudomonaden

Auf Grund der Sekretion von organischen Säuren und Aminosäuren durch die Pflanzen ist die Zone im Bereich der Wurzeln der Pflanzen stark mikrobiell besiedelt (Ottow 2011a). Auch *Pseudomonas*-Arten zählen mit zu den effektiven Besiedlern der Rhizosphäre (Lugtenberg et al. 2001), wobei fluoreszierende Pseudomonaden zu den sogenannten „plant growth-promoting rhizobacteria“ (PGPR) gehören (Kloepper et al. 1980).

Die für eine erfolgreiche Besiedlung der Rhizosphäre nötigen Eigenschaften sind Beweglichkeit, Chemotaxis, spezielle Pili zum Anheften an Oberflächen, eine äußere Membran, welche so beschaffen ist, dass eine unkomplizierte Aufnahme von Nährstoffen gewährleistet ist, die Fähigkeit Bestandteile von Exsudaten aufnehmen zu können, Resistenz gegenüber Toxinen und anderer Pflanzenabwehrmechanismen (Lugtenberg & Bloemberg 2004). Da Pseudomonaden mit all diesen Eigenschaften ausgestattet sind, besitzen sie einen selektiven Vorteil, die Ressourcen, die in der Rhizosphäre vorhanden sind, ausnutzen zu können (Moore & Tindall 2006).

Des Weiteren ist bekannt, dass Pseudomonaden wirksam die Besiedelung von Pflanzen durch andere Mikroorganismen verhindern (Bianciotto et al. 1996). Fluoreszierende Pseudomonaden wurden bereits jahrzehntelang im Hinblick auf deren stimulierende Effekte auf das Pflanzenwachstum durch das Unterdrücken bodenbürtiger Pflanzenkrankheiten untersucht (Nowak-Thompson et al. 1994, Bakker et al. 2007). Zu den Wirkmechanismen, die eine Rolle in diesem Prozess spielen, gehören der Konkurrenzkampf um Eisen mittels Siderophoren, die Produktion lytischer Enzyme, die induzierte systemische Resistenz und die Antibiose (Bakker et al. 2007). Wurzelbesiedelnde „plant beneficial“ Pseudomonaden setzen eine bemerkenswerte Vielfalt an Substanzen mit antibiotischer Aktivität frei, wie z.B. die Polyketide 2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG **8**, Abbildung 10) und Pyoluteorin (PLT **9**, Abbildung 10) (Brodhagen et al. 2004, Dubuis et al. 2007).

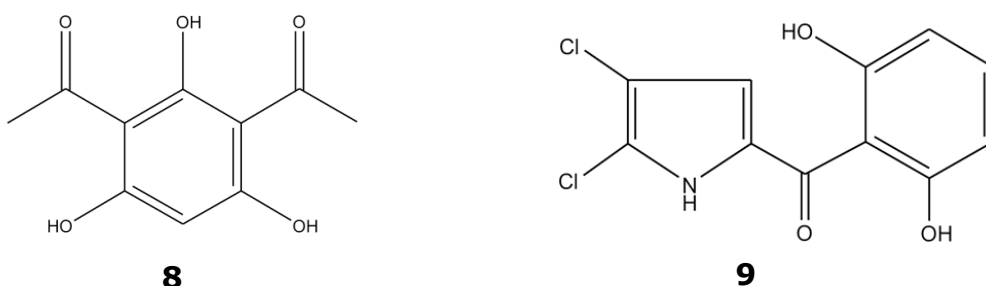


Abbildung 10: Biologisch aktive Polyketide 2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG, **8**) und Pyoluteorin (PLT, **9**).

Allerdings sind bisher nur wenige marine Pseudomonaden beschrieben, welche neue bioaktive Substanzen produzieren (Isnansetyo & Kamei 2009).

Die Bildung und Regulation mutualistischer Interaktionen zwischen Mikroben und deren marinen Wirtsorganismen sind nahezu unbekannt (Harder et al. 2012). Dies trifft auch auf die Interaktion zwischen *Pseudomonas* Arten und marinen Algen zu.

1.7 Fragestellung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, marine Bakterien der Alge *Saccharina latissima* auf ihr Potential zur Produktion von Sekundärmetaboliten zu untersuchen, deren Bioaktivität dazu führt, dass diese Substanzen Anwendung in der biotechnologischen Nutzung (Pharmazie, Kosmetik, oder Pflanzenschutz) finden könnten. Hierzu wurden zum einen Isolate von *Saccharina latissima* aus der Stammsammlung des KiWiZ ausgewählt und zum anderen Bakterien von dieser Alge neu isoliert.

Zur Stammauswahl aus der KiWiZ-Sammlung dienten folgende Kriterien:

- Gibt es DNA-Fragmente von Biosynthese-Genclustern (PKSI/II, NRPS)?
- Was ergaben erste chemische Analysen?
- Um welche Art/Gattung handelt es sich? Ist diese neu und/oder gibt es andere Gründe dessen Potential zur Sekundärmetabolitproduktion zu erforschen?
- Können Aussagen aufgrund vorhergehender Versuche und/oder Bioaktivitätstests getroffen werden?

Auf Grund der Assoziation der untersuchten Bakterien mit der Braunalge *S. latissima* sollte nicht nur der biotechnologische Aspekt analysiert werden, sondern auch die ökologische Bedeutung der Sekundärmetabolite für die Alge erörtert werden. Dazu wurde besonders die ökologische Rolle der von *Pseudomonas*-Stämmen produzierten Sekundärmetabolite untersucht. In dieser Arbeit sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Gibt es biologisch aktive Bakterien auf *S. latissima* aus der Kieler Förde und um welche Gattungen/Arten von Bakterien handelt es sich? Sind die Bakterien stets mit *S. latissima* assoziiert und ist daher eine wiederkehrende Isolation über mehrere Jahre möglich?
2. Welchen Einfluss können Bakterien bzw. deren Naturstoffe auf *S. latissima* haben? Ist die mutualistische Assoziation von Pseudomonaden mit Landpflanzen auch für Algen zu zeigen?
3. Welche Naturstoffe werden von den bakteriellen Isolaten von *S. latissima* produziert?
4. Welche biologische Aktivität besitzen die isolierten Naturstoffe?
5. Lässt sich das Sekundärmetabolitprofil von Bakterien durch Kultivierungs- oder Stimulationsexperimente verändern?

2 Material und Methoden

2.1 Nährmedien und Puffer

Alle Nährmedien wurden mit voll entsalztem Wasser (VE-Wasser) angesetzt. Für die Herstellung von Agarplatten wurden jeweils 15,0 g/L Bacto™ Agar hinzu gegeben, wenn nicht anders angegeben. Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl bzw. 1 M NaOH eingestellt. Alle Medien wurden bei feuchter Hitze, 120 °C, 1 bar und 20 Minuten autoklaviert. Folgende Medien und Lösungen wurden verwendet:

Marine Broth 2216 (MB) Fertigmedium (in Anlehnung an ZoBell 1941)

1,0 g/L	Bacto-Hefeextrakt
5,0 g/L	Bacto-Pepton
19,45 g/L	NaCl
0,16 g/L	NaHCO ₃
4 mg/L	Natriumsilikat
2,4 mg/L	Natriumfluorid
1,8 g/L	CaCl ₂
0,55 g/L	KCl
80 mg/L	KBr
3,24 g/L	MgSO ₄
5,9 g/L	MgCl ₂
0,1 g/L	FeCitrat
1,6 mg/L	NH ₄ NO ₃
8,0 mg/L	Na ₂ HPO ₄
34,0 mg/L	SrCl ₂
22,0 mg/L	HBO ₃
pH 7,6 ± 0,2	

Modifiziertes GYM Streptomyces Medium (GYM)

4,0 g/L	Bacto-Hefeextrakt
10,0 g/L	Bacto-Malzextrakt
4,0 g/L	D-Glucose-Monohydrat

2,0 g/L	CaCO ₃
pH 7,2 ± 0,2	

Modifiziertes GYM Streptomyces Medium (GYM4)

4,0 g/L	Bacto-Hefeextrakt
4,0 g/L	Bacto-Malzextrakt
4,0 g/L	D-Glucose-Monohydrat
2,0 g/L	CaCO ₃
pH 7,2 ± 0,2	

Modifiziertes Pseudoalteromonas-Medium nach Kalinovskaya et al. (2004)(Pseudomonas-Agar (P))

2,0 g/L	Pepton aus Sojamehl
2,0 g/L	Bacto-Hefeextrakt
1,0 g/L	D-Glucose-Monohydrat
0,2 g/L	KH ₂ PO ₄
50 mg/L	MgSO ₄ -Heptahydrat
1,0 g/L	CaCl ₂ -Dihydrat
0,1 g/L	KBr
15,0 g/L	Tropic Marine Salt

Pseudomonas-Aeromonas-Selektivagar nach Kielwein (GSP)

10,0 g/L	Natriumglutamat
20,0 g/L	Stärke, löslich
2,0 g/L	KH ₂ PO ₄
0,5 g/L	MgSO ₄
0,36 g/L	Phenolrot
12,0 g/L	Agar
0,01 g/L	Penicillin G
pH 7,2 ± 0,2	

Pseudomonas Selektivagar Basis mit CFC (Cetrimid-Fucidin-Cephaloridin)Selektiv-Supplement (CFC) Fertigmedium

16,0 g/L	Pepton aus Gelatine
10,0 g/L	Caseinhydrolysat
10,0 g/L	Kaliumsulfat
1,4 g/L	Magnesiumchlorid
11,0 g/L	Agar
pH 7,1±0,2	
10 mL/L	Glycerin
10 mg/L	Cetrimid
10 mg/L	Fucidin
50 mg/L	Cephaloridin

Sojapepton (SGG SP)

2,0 g/L	Bacto-Hefeextrakt
5,0 g/L	Pepton aus Sojamehl
10,0 g/L	Stärke, löslich
2,5 g/L	Bestandteile aus Maisquellwasser
10,0 g/L	D-Glucose-Monohydrat
10,0 g/L	Glycerin
1,0 g/L	NaCl
3,0 g/L	CaCO ₃
pH 7,0 ± 0,2	

Tropic Marine Medium (TM), modifiziert nach ZoBell (ZoBell 1941)

1,0 g/L	Bacto-Hefeextrakt
5,0 g/L	Bacto-Pepton
19,45 g/L	Tropic Marine Salt
pH 7,0 – 7,2	

Tryptic Soy Broth (TSB) Fertigmedium, Difco 0370-17, (modifiziert)

0,3 g/L	Pepton aus Sojamehl
1,7 g/L	Caseinpepton
0,25 g/L	D-Glucose-Monohydrat
10,0 g/L	NaCl
0,25 g/L	K ₂ HPO ₄
pH 7,3 ± 0,2	

TBE (Tris Borat EDTA) Puffer

100 mM	Tris
80 mM	Borsäure (pH 8,0)
1 mM	EDTA

Auftragspuffer für die Gelelektrophorese

50 %	Saccharose
20 %	Glycerin
50 mM	EDTA
0,1 %	Bromphenolblau

In TBE-Puffer lösen.

PBS-Puffer (1 L)

8,0 g	NaCl
0,2 g	KCl
1,15 g	Na ₂ HPO ₄
0,24 g	KH ₂ PO ₄
pH 8,3	

Für eine möglichst spezifische Isolierung von Pseudomonaden wurden bei der Probenahme im Januar 2010 Pseudomonas Selektivagar Basis mit CFC (Cetrimid-Fucidin-Cephaloridin) Selektiv-Supplement (CFC), Pseudomonas-Aeromonas-Selektivagar nach Kielwein (1971) (GSP) und modifizierter Pseudoalteromonas-Agar nach Kalinovskaya et al. (2004) (*Pseudomo-*

nas-Agar) verwendet. Das CFC Selektiv-Supplement ist ein antibiotisch wirkendes Supplement zur selektiven Isolierung von *Pseudomonas*-Arten. Während Ceftrimid, Fucidin und Cephaloridin die Gram-positive und die Gram-negative Begleitflora hemmen, gewährleistet die Pepton-Zusammensetzung einem breiten Spektrum an Pseudomonaden das Wachstum. Die verwendete Menge an Kaliumsulfat und Magnesiumchlorid unterstützt die Pigmentproduktion. Auch beim *Pseudomonas*-Agar gewährleistet die Pepton-Zusammensetzung einem breiten Spektrum an Pseudomonaden das Wachstum. Beim *Pseudomonas-Aeromonas*-Selektivagar nach Kielwein (1971) (GSP) sind Glutamat und Stärke die beiden einzigen Nährstoffquellen. Aeromonaden können die Stärke abbauen. Die dabei produzierte Säureproduktion führt beim Indikator Phenolrot zum Farbumschlag nach gelb, was diese von Pseudomonaden unterscheidet, da diese nicht die Stärke abbauen können, sondern nur das Glutamat. Beim GSP-Agar hemmt Penicillin G das Wachstum der Gram-positiven Begleitflora.

2.2 Chemikalien

Acetonitril, HPLC Gradient Grade	VWR Prolabo
Agar	Bacto™, VWR
Ameisensäure, p.a.	Fluka
Bromphenolblau	Merck
CaCl ₂	Carl Roth
CaCO ₃	Carl Roth
cAMP-Mono-Natriumsalz)	Sigma-Aldrich
Caseinpepton	Difco, VWR
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich
Cornsteep solids	Sigma-Aldrich
D(+)-Glucose-Monohydrat	Merck
Dimethylsulfoxid- <i>d</i> 6, 99.8 Atom % D	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid für Zellkultur	AppliChem
DNA-freies Wasser	Sigma-Aldrich
DNA Molecular Weight Marker X	Roche
EDTA	Merck
Ethanol 99 %, vergällt	Walter CMP
Ethidiumbromid	Fluka Biochemika

Ethylacetat, rein	Walter CMP
Fötales Rinderserum	Promocell
Hefeextrakt	Bacto™, VWR
Isopropanol	Baker
L-Homoserinlacton Hydrochlorid	Sigma-Aldrich
Malzextrakt	Bacto™, VWR
Marine Broth	Difco™, VWR
Mc Coys 5A Fertigmedium inkubiert	Invitrogen
Methanol- <i>d</i> 4, 99.8 Atom % D	Carl Roth
Methanol, HPLC Gradient Grade	J.T. Baker
NaOH	Carl Roth
Natriumchlorid, p.a.	Merck
Natriumhydroxid, p.a.	Carl Roth
Penicillin G	Invitrogen
Pepton	Bacto™, VWR
Pepton aus Sojabohnenmehl	Merck
Putrescin	Sigma-Aldrich
Resazurin Redoxindikator	Riedel-de Häen
RPMI 1640 Fertigmedium	Invitrogen
Saccharose	Merck
Salzsäure, 32 %, reinst	Carl Roth
SYBR® Safe DNA gel strain	Invitrogen
Tropic Marine Salt	Knutzen
Trypticase Soy Broth	Difco, VWR
Trypton	Difco, VWR

2.3 Kits

DNeasy® Blood & Tissue Kit	Qiagen
puReTaq™Ready-To-Go™ PCR Beads	GE Healthcare
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche
Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
PDE Light HTS cAMP phosphodiesterase Kit	Rockland
Biomol Green™ PTP1B tyrosin phosphatase drug discovery Kit	Enzy Life Science GmbH
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	Promega

2.4 Geräte

ABI PRISMA 3730 DNA Analyzer	Applied Biosystems
Analysenwaage CPA	Sartorius

Gel-Jet-Imager Dokumentationsanlage	Intas
GeneQuant Pro	Amersham Pharmacia Biotech
Precellys® 24	Peqlab
Precellys® 24 Kit VK05	Peqlab
Mikrotiterplatten Readers Infinite® M200	Tecan
MJ Research PTC-200 Thermo Cycler	Biozym
Multifuge 1 L-R, Heraeus	Thermo Scientific
NanoVue Spectrophotometer	GE Healthcare
Schüttler Multitron	Inforce
Thermocycler	Biometra
Ultra-Turrax T25 basic	IKA®-Werke GmbH & Co. KG

HPLC-Anlage (analytisch):

LaChrom Elite VWR-Hitachi:

Organizer

Diode Array Detector L-2450

Column Oven L-2300

Autosampler L-2200

Pump L-2130

Fraktionssammler Foxy Jr. ISCO

Steuer- und Auswertesoftware: Hystar und Hystar Post Processing, Bruker

Säule (Standard): Onyx monolithic C18, 100 x 3.0 mm Phenomenex

Säule (Fraktionierung): Luna C18(2), 4,6 x 250 mm, 5 µm Phenomenex

Massenspektrometer (analytisch):

esquire4000, Bruker

Steuer- und Auswertesoftware: esquireControl und DataAnalysis, Bruker

Nitrogen Gas Generator LCMS 30-0, Domnick Hunter

Kompressor DK50 2x2V/110, Ekom Air

Vakuumpumpe DS402, Varian

Fraktionssammler Foxy Jr., ISCO

LC-Anlage (präparativ 1):

LaPrep, VWR International:

Pumpe: P311

UV/VIS-Detektor: P110

Smartline Autosampler 3900, Knauer

Dynamic Mixing Chamber, Knauer

Fraktionssammler: Labocol Vario2000, Labomatic

Steuer- und Auswertesoftware: EZChrom Elite, VWR International

Säule: Gemini 10u C18, 100A, Axia, 100 x 50,00 mm Phenomenex

HPLC-Anlage (semipräparativ 2):

LaChrom Elite, Merck-Hitachi:

Organizer

Diode Array Detector L-2450

Autosampler L-2200

externe Pumpe L-7150, VWR-Hitachi

Steuer- und Auswertesoftware: EZChrom Elite, VWR International

Säule: Gemini 5u C18, 110A, Axia, 100 x 21,20 mm, 5 micron Phenomenex

NMR-Spektrometer:

- a. DRX500 (500 MHz und 125 MHz), Bruker
- b. Avance 600 (600 MHz und 150 MHz) mit Cryoprobenkopf, Bruker

2.5 Probenahme

Das Probenmaterial (lebende Exemplare der Braunalge *Saccharina latissima*) für die Isolierung der bearbeiteten Bakterien wurde während mehrerer Tauchgänge aus ca. 6 m Tiefe aus der Kieler Förde (Nähe Tonnenhof, 54°22' N; 10°09' O) gesammelt. Die Probenahmen erfolgten im November 2002, April 2003 und Januar 2010. Im Januar 2010 wurden zusätzlich zu den Algenproben auch Sediment- und Wasserproben aus demselben Habitat entnommen. Die Probenahmen der Jahre 2002-2003 und auch die anschließende Bakterienisolation erfolgte nach Wiese et al. (2009b). Die in dieser Arbeit verwendeten Reinkulturen aus den Probenahmen der Jahre 2002-2003 wurden mir freundlicherweise von Frau Dr. J. Wiese zur Verfügung gestellt.

Im Januar 2010 wurden je fünf sterile Duranflaschen à 1 L Volumen mit Umgebungswasser vom Ort der Probenahme befüllt. Anschließend wurden fünf komplette Individuen der Braunalge *S. latissima* mit Hilfe eines Messers vom Substrat entnommen und in sterile Autoklavierbeutel gefüllt. Aus der unmittelbaren Umgebung der Algenproben wurden mit Hilfe eines sterilen Löffels fünf Sedimentproben in jeweils sterile Plastikröhrchen überführt. Die Proben wurden gekühlt und innerhalb von zwei Stunden ins Labor transportiert. Bis zur vollständigen Verarbeitung wurden die Proben bei 4 °C gelagert. Um Unterschiede in den bakteriellen Gemeinschaften, die mit verschiedenen Algenabschnitten assoziiert sind, überprüfen zu können, wurden die Algenindividuen in jeweils fünf Abschnitte unterteilt (Rhi-

zoid, Cauloid, junges Phylloid (Meristem), Phylloid und altes Phylloid) (Abbildung 8). Hierzu wurden der Algenhallus mit sterilen Seziernessern und sterilen Pinzetten in kleinere (ca. 1 cm²) Algenteile zerschnitten und auch das Rhizoid und das Cauloid wurden nach dieser Methodik in kleinere Probenstücke zerteilt. Die Algenstücke wurden unverzüglich nach dem Zerteilen 3 x in sterilem Seewasser gewaschen und in die vorbereiteten Gefäße überführt.

2.6 Isolierung und Identifizierung der Bakterienstämme

Die Algenstücke und die Sedimentproben wurden in Plastikröhrchen mit sterilem Fördewasser, welche zuvor gewogen wurden, überführt und anschließend rückgewogen, um die Einwaage feststellen zu können (siehe Tabelle 1). Anschließend wurden mittels Ultra-Turrax-T25 basic Homogenisate hergestellt. Aus den Sedimenten wurden Suspensionen hergestellt.

Die Proben wurden mit jeweils 200 µL auf Agarplatten ausgespatelt. Zur Isolierung der Pseudomonaden wurden zwei Selektivmedien (Pseudomonaden Aeromonaden-Selektivagar nach Kielwein (GSP), *Pseudomonas* CFC Selektivagar (CFC) und ein Komplexmedium *Pseudomonas*-Medium (P) verwendet.

Für Sedimentproben wurden vier Verdünnungsstufen (10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³) und für Algenproben drei Verdünnungsstufen (10⁰, 10⁻¹, 10⁻²) angelegt.

Die Kultivierung der Mikroorganismen (Algenproben) auf Agarplatten erfolgte bei 28 °C für mindestens vier Tage. Die Kultivierung der Mikroorganismen (Sedimentproben) auf Agarplatten erfolgte ebenfalls für mindestens vier Tage. Dabei wurden die Agarplatten für 36 Stunden bei 28 °C inkubiert und für die restliche Zeit bei 20 °C.

Kolonien wurden zuerst nach optischen Kriterien als potentielle Pseudomonaden identifiziert. Hierzu wurde die für fluoreszierende Pseudomonaden charakteristische Pigmentproduktion von Pyoverdin (Fluorescein) mittels UV-Lampe (366 nm) überprüft (siehe Abbildung 43 a im Anhang).

Tabelle 1: Einwaagen der Algen- und der Sedimentproben der mit 14 mL sterilem Fördewasser gefüllten Plastikröhrchen.

Probenmaterial	Kennzeichnung der Probe	Probeneinwaage (g/14 mL)	Einwaage berechnet auf (mg/200 µL)
Alge 1	1a	3,022	43,17
Alge 1	1b	1,485	21,21
Alge 1	1c	3,672	52,46
Alge 1	1d	0,243	3,47
Alge 1	1e	0,86	12,29
Alge 2	2a	2,467	35,24
Alge 2	2b	2,266	32,37
Alge 2	2c	1,383	19,76
Alge 2	2d	> 0,10	> 0,10*
Alge 2	2e	0,182	2,60
Alge 3	3a	4,829	68,99
Alge 3	3b	4,474	63,91
Alge 3	3c	2,249	32,13
Alge 3	3d	0,147	2,10
Alge 3	3e	2,403	34,33
Alge 4	4a	1,445	20,64
Alge 4	4b	1,988	28,40
Alge 4	4c	1,046	14,94
Alge 4	4d	0,196	2,80
Alge 4	4e	0,47	6,71
Alge 5	5a	0,717	10,24
Alge 5	5b	1,291	18,44
Alge 5	5c	0,943	13,47
Sediment 1	S1	8,689	124,13
Sediment 2	S2	6,35	90,71
Sediment 3	S3	7,293	104,19
Sediment 4	S4	6,487	92,67
Sediment 5	S5	10,678	152,54

a: altes Phylloid, b: Phylloid, c: junges Phylloid, d: Cauloid, e: Rhizoid, * zu Berechnungszwecken als 0,10 mg angenommen.

Abbildung 43 b im Anhang zeigt eine makroskopische Aufnahme einer Agarplatte mit gewachsenen Kolonien auf *Pseudomonas*-Medium.

Die Kolonien wurden anschließend mehrmals auf MB- oder GYM-Agarplatten überimpft und bei 28 °C kultiviert. Auch andere Kolonien wurden mehrmals auf MB- oder GYM-Agarplatten überimpft und bei 28 °C kultiviert, um Reinkulturen zu erhalten. Die einzelnen Kolonien wurden optisch und mikroskopisch überprüft. Von den Reinkulturen wurde eine DNA-Extraktion durchgeführt. Mit dem DNA-Extrakt wurde eine PCR der 16S rDNA durchgeführt und anschließend erfolgte die Sequenzierung.

Die Ergebnisse der Sequenzierung dienten zum einen der molekularbiologischen Überprüfung des Vorhandenseins von Reinkulturen, welche auch konserviert werden können und zum anderen wurden die 16S rRNA-Gensequenzen mittels blastn (Altschul et al. 1990) auf den nächsten verwandten Typstamm hin untersucht. Das Umgebungswasser wurde in den Volumina 100 µL, 1 mL, 10 mL, 100 mL und 1 L auf drei verschiedenen Medien (CFC, GSP und P) untersucht. Die Volumina 100 µL und 1 mL wurden jeweils auf einer bzw. drei Agarplatten ausgespatelt. Die größeren Volumina wurden unter sterilen Bedingungen filtriert und die Membranfilter anschließend auf die Agarplatten aufgelegt und für mind. zwei Tage bei 28 °C kultiviert.

2.7 Konservierung der Bakterienstämme

30 Isolate wurden in zwei Parallelen mit dem MAST Cryobank™ System von MAST Diagnostica bei -100 °C eingefroren und in der Stammdatenbank des Kieler Wirkstoff-Zentrums hinterlegt. Des Weiteren wurden diese Stämme jeweils in zwei Parallelen in MB- (Pseudomonaden) bzw. GYM-Medium (Streptomyceten, *Bacillus*-Arten) mit DMSO 10 % (v/v) konserviert und in flüssigem Stickstoff bei -185 °C gelagert. Für die Konservierung wurde mittels Impföse Zellmaterial der Reinkulturen von gut gewachsenen Agarplatten entnommen und in den Röhrcchen mit dem entsprechenden Medium suspendiert.

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 DNA-Extraktion

Der Zellaufschluss für die DNA Extraktion der Reinkulturen erfolgte mit dem Precellys-Glas-Kit VK05 (0,5 mm, 2 mL) und der Zelmühle Precellys 24. In das Precelly Vial wurden jeweils 400 µL DNA-freies Wasser vorgelegt und anschließend mittels Impföse das Zellmaterial dazugegeben. Der mechanische Zellaufschluss erfolgte für zweimal 45 Sekunden bei einer Schüttelfrequenz 6.500 und einer Pause von 20 Sekunden zwischen den Schüttelintervallen. Anschließend wurde die Vials für 10 Minuten bei 8.000 g zentrifugiert. Der Überstand, in welchem sich die DNA befand, wurde in sterile Eppendorfgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Bei Isolaten, deren Zellen durch das Precellys-Glas-Kit nicht aufgeschlossen werden konnten, wurde das DNeasy® Blood&Tissue Kit verwendet. Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA erfolgte photometrisch mittels NanoVue Spektrophotometer nach (Sambrook & Russell 2001).

2.8.2 Polymerase Kettenreaktion

Die spezifische Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgt mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR) (Mullis et al. 1986). In dieser Arbeit diente die PCR zur Amplifizierung der 16S rDNA. Die PCR wurde in 25 µL Reaktionsansätzen in einem Thermocycler durchgeführt. Für die Reaktionsansätze wurden puReTaq™Ready-To-Go™PCR Beads verwendet und die universellen eubakteriellen Primer 27f (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3') und 1492r (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') bzw. 1387r (5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3') eingesetzt. Das amplifizierte 16S rRNA-Genfragment hat eine erwartete Länge von ca. 1500 bzw. 1400 bp. Die PCR- und Cycler-Parameter sind in den Tabellen 2 und 3 zusammengefasst.

Tabelle 2: PCR-Reaktionsansätze zur Amplifikation der 16S rDNA.

Reaktionsansatz	Volumen (μL)	Konzentration
Primer 27f	1	10 pmol/ μL
Primer 1492r*	1	10 pmol/ μL
DNA-Template	1	
DNA-freies Wasser	22	

* oder Primer 1387r

Tabelle 3: Thermocyclerparameter für die PCR zur Amplifikation der 16S rDNA.

Funktion	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Dauer (s)	Zyklen
Denaturierung	94	120	1
Amplifikation			
Denaturierung	92	40	} 30
Annealing	55	40	
Elongation	72	60	
Terminale Elongation	72	300	1
Kühlung	10	∞	

Zur Überprüfung der Amplifikate wurde mit allen PCR-Produkten eine Agarose-Gelelektrophorese in 1x TBE-Puffer durchgeführt. Zur Größenbestimmung der Amplifikate wurde neben den PCR-Produkten auch ein Längenstandard (DNA Molecular Weight Marker X) in eine Tasche eines 1,0 %iges Agarosegels pipettiert. Die Auftrennung erfolgte für 25 Minuten bei 150 mV. Das Anfärben der DNA-Moleküle erfolgte mit dem Farbstoff SYBR[®] Safe DNA gel stain. Die Auswertung und Dokumentation der Gele wurde mit einer UV-Dokumentationsanlage durchgeführt.

2.8.3 Sequenzierung

Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte mit der Methode von Sanger (Sanger et al. 1977) am Institut für Klinische Molekularbiologie des Universitätsklinikums Kiel. Für die Sequenzierung wurden folgende 16S rDNA-

spezifische Primer verwendet: 342f (Lane 1991), 534r (Muyzer et al. 1993) und 790f (5'-GAT ACC CTG GTA GTC C-3'). Die Sequenzen wurden mittels ChromasPro (Version 1.33c; 2005) bearbeitet. Anschließend erfolgte der Abgleich mit der Datenbank EMBL Nucleotid Datenbank und dem Tool blastn (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), um den nächsten verwandten Typstamm zu ermitteln. Mit der „List of Prokaryotes“ wurde dieser dann als Typstamm bestätigt (<http://www.bacterio.cict.fr/>).

2.9 Phylogenetischer Stammbaum von *Pseudomonas*-Stämmen

Zur Ermittlung der nächsten verwandten Typstämme wurde die Datenbank Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu>; Cole et al. (2009) verwendet. Zur Bestimmung der Sequenzähnlichkeiten wurde die Datenbank „bl2seq“ des National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>; Tatusova & Madden (1999) benutzt. Das Alignment der 16S rRNA Gensequenzen der Stämme LB042, LB043, LB044, LB045, LB046, LB047, LB048, LB051, LB062a, LB061, LB063, LD120, LB081, LB183, LB184 und LB185 und der Typstämme *Pseudomonas fluorescens* und *Azotobacter vinelandii*, wurde mittels Clustal X (Larkin et al. 2007) erstellt und manuell überarbeitet. *A. vinelandii* diente als Außen-Gruppe. Alle Sequenzen wurden auf eine einheitliche Länge von 1401 bp gekürzt. Zur phylogenetischen Analyse wurden LD120, LB183 und LB184 stellvertretend für die algenassoziierten Stämme ausgewählt. Der phylogenetische Stammbaum wurde mittels Neighbour-Joining-Algorithmus (Saitou & Nei 1987) und Maximum-Likelihood method (Felsenstein 1981) unter Verwendung von MEGA Version 3.1 (Kumar et al. 2004) und PhyML Online (Guindon et al. 2005) berechnet. Die Neighbour-Joining-Analyse wurde mit 1000 Bootstrap-Replikaten berechnet und die Maximum-Likelihood-Analyse mit 500 Bootstrap-Replikaten. Der Maximum-Likelihood-Stammbaum wurde nach dem GTR Model berechnet. Zur Darstellung des phylogenetischen Stammbaums wurde NJplot

(<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/njplot.html>; Perriere & Gouy (1996) verwendet.

2.10 Untersuchungen zu *Pseudomonas* sp. LD120

Der Stamm *Pseudomonas* sp. LD120 wurde für eine nähere Charakterisierung für weitere Untersuchungen ausgewählt, da zu Beginn des Screenings nur dieser Stamm neben MAPG, DAPG und PLT auch Rhizoxine produzierte und somit das umfangreichste Metabolitspektrum aufwies. Zur Ermittlung der physiologischen Eigenschaften wurde der Test BIOLOG GN2 auf Mikrotiterplatten und die Substratverwertung mittels Agarplattentest eingesetzt. Mit Hilfe des Tests auf Mikrotiterplatten konnte die Verstoffwechslung von 95 verschiedenen Kohlenstoffquellen untersucht werden (siehe Tabelle 39 im Anhang). Zur Überprüfung welche Substrate das Wachstum von Stamm LD120 ermöglichen wurden 11 Substrate ausgewählt, die u. a. auch im Habitat (*S. latissima*) vorkommen könnten. Des Weiteren wurde überprüft, ob Stamm LD120 zu den fluoreszierenden Pseudomonaden zählt.

2.10.1 BIOLOG GN2

Pseudomonas sp. LD120 wurde nicht nur mittels 16S rRNA Gensequenzanalyse identifiziert, sondern auch physiologisch mittels BIOLOG GN2 MicroPlate™ nach Anleitung des Herstellers. Hierzu wurde Stamm LD120 24 Stunden bei 28 °C auf LB-Agarplatten inkubiert. Mittels sterilem Wattestäbchen wurden die Zellen von der Agarplatte entnommen und in steriler 0,85 %iger NaCl-Lösung suspendiert. Die Zellsuspension wurde auf eine OD₆₂₀ von 0,28 eingestellt und anschließend wurden jeweils 150 µL in jedes Well pipettiert. Die Inkubation wurde in einem Plastikbehälter durchgeführt, welcher zusätzlich an angefeuchtetes Papiertuch enthielt und mit Alufolie abgedeckt wurde. Die visuelle Auswertung der zwei Parallelen erfolgte nach 24 Stunden.

2.10.2 Substratverwertung

Der Stamm *Pseudomonas* sp. LD120 wurde auf Minimalmedien kultiviert, welche verschiedene Substrate enthielten. Zur Herstellung von Agarplatten enthielt jedes Medium 1,5 % (w/v) Agar. Folgende Substrate wurden in einer Konzentration von 1 % (w/v) verwendet: Na-Alginat, Cellulose, Mannitol, Glucose, gefriergetrocknetes Pulver von *S. latissima*, Agar, Agarose, DL-Na-Malat, Na-Succinat, Na-Fumarat und L-Na-Glutamat. Alle Substrate wurden in Standortwasser gelöst. Mittels Impföse wurde eine fünf Tage alte Vorkultur (auf MB-Agar) des Stammes LD120 auf den verschiedenen Agarplatten ausgestrichen und für 12 Tage bei 28 °C inkubiert. Zur Kontrolle wurde der Stamm in gleicher Weise auf MB-Agarplatten kultiviert.

2.10.3 Fluoreszenznachweis

Für den Fluoreszenznachweis wurde Stamm LD120 drei Tage bei 28 °C auf Agarplatten kultiviert, welche Medium P enthielten. Die für fluoreszierende Pseudomonaden charakteristische Pigmentproduktion von Pyoverdin (Fluorescein) wurde mittels UV-Lampe (366 nm) überprüft.

2.11 Anzucht und Extraktion der Bakterienkulturen

In diesem Abschnitt sind die Bedingungen zur Anzucht und Extraktion für die Screening-Ansätze und für die Großansätze beschrieben. Für die Screening-Ansätze wurden 100 und 300 mL Erlenmeyerkolben verwendet die jeweils 25 bzw. 100 mL Medium enthielten. Für die Großansätze wurden 2 L Erlenmeyerkolben verwendet, die jeweils 1 L Medium enthielten.

2.11.1 Anzucht auf Agarplatten

Die Agarplatten mit dem jeweiligen Anzuchtmedium wurden mit einem Kügelchen aus der Kryokonservierung angeimpft und anschließend bei 28 °C oder bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Kultivierungsdauer und -temperatur für die jeweiligen Experimente sind in Tabelle 38 im Anhang ersichtlich.

2.11.2 Anzucht in Flüssigkultur

Zur Anzucht von Flüssigkulturen wurden Erlenmeyerkolben entweder mit je einem Kügelchen aus der Kryokonservierung angeimpft (nur 25 bzw. 100 mL-Maßstab) oder mit Stücken einer gut bewachsenen Agarplatte. Screening-Ansätze im 100 bzw. 300 mL Erlenmeyerkolben wurden mit ca. 1 cm² großen Stücken der gut bewachsenen Agarplatten beimpft, Großansätze wurden pro 2 L Erlenmeyerkolben mit etwa 2 cm² großen Stücken oder einer Flüssigvorkultur angeimpft (siehe Tabelle 38 im Anhang). Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Inkubation bei 28 °C oder bei Raumtemperatur im Dunkeln bei 120 rpm.

2.11.3 Extraktion der Agarplatten

Die Agarplatten-Kulturen wurden nach der jeweiligen Inkubation mittels Spatel in ein 300 mL-Erlenmeyerkolben überführt. Nach Zugabe von 100 mL EtOAc erfolgte die Homogenisation mittels Ultra-Turrax-T25 basic bei 16.000 rpm für ca. 30 Sekunden. Zur Abtrennung der organischen Phase wurde das Homogenisat über einen Phasentrennfilter (1 PS, 185 mm, Whatman Schleicher & Schuell, Dassel) gegeben. Der aufgefangene Ethylacetatextrakt wurde mittels SpeedVac vakuumgetrocknet und in 200 µL MeOH resuspendiert. Nach der Filtration durch einen 0,2 µm PTFE-Filter wurden 15 µL zur HPLC-Analyse verwendet.

2.11.4 Extraktion der Kulturen im 25/100 mL Maßstab

Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Extraktion der Zellen und des Kulturüberstandes zusammen. Nach der jeweiligen Inkubation der Kulturen (siehe Tabelle 38 im Anhang) erfolgte die Zugabe von EtOAc (1:1, v/v) zur Kultur. Anschließend wurden die Flüssigkulturen bei 13.000 rpm für ca. 30 Sekunden mittels Ultra-Turrax-T25 basic homogenisiert. Das homogene Gemisch aus Kultur und organischem Lösungsmittel wurde beim 25 mL-Maßstab in ein Zentrifugenglas überführt und zur Phasentrennung für 10 Minuten bei 4.700 rpm zentrifugiert. Das EtOAc wurde mit einer Pipette in ein neues Zentrifugenglas überführt und in einer SpeedVac

bei 40 °C und ca. 100 mbar bis zur Trockene eingengt. Der Niederschlag wurde mit 200 µL MeOH resuspendiert und durch einen 0,2 µm PTFE-Filter in ein HPLC-Vial filtriert. Für die HPLC-Analyse wurde ein Aliquot von 15 µl verwendet. Der Rest wurde für Bioaktivitätstests verwendet bzw. bei 4 °C gelagert. Zur Extraktion des 100 mL-Maßstabs wurde das Homogenisat in einen Scheidetrichter überführt und gut durchgemischt. Die wässrige Phase wurde verworfen. Die Ethylacetat-Phase wurde mit 50 mL Milli-Q Wasser gewaschen. Die Ethylacetat-Phase wurde anschließend in einen Rundkolben überführt und mittels Rotationsverdampfer getrocknet. Der Niederschlag wurde mit 1 mL MeOH resuspendiert und ansonsten wurde ebenso verfahren, wie im 25 mL-Maßstab.

2.11.5 Extraktion der Kulturen im 1 L Maßstab und Großansatz

Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Extraktion der Zellen und des Kulturüberstandes zusammen. Ein Großansatz definiert sich in dieser Arbeit als die parallele Kultivierung von 10 bis 12 1 L-Kulturen eines Stammes. Nach der jeweiligen Inkubation der Kulturen (siehe Tabelle 38 im Anhang) wurden die 1 L-Kulturen mittels Ultra-Turrax homogenisiert. Anschließend wurden jeweils 500 mL Kulturhomogenisat mit 500 mL EtOAc in einem Scheidetrichter ausgeschüttelt. Des Weiteren wurde ebenso verfahren, wie mit dem 100 mL-Maßstab. Der Waschschrift wurde mit ca. 300 mL durchgeführt. Der Niederschlag wurde mit 1 mL MeOH resuspendiert. Die Extraktion der Großansätze erfolgte ebenso wie in den 1 L-Screening-Ansätzen. Der Niederschlag des Großansatzes wurde mit 10 mL MeOH resuspendiert.

2.12 Chromatographie

Das für die Chromatographie verwendete Wasser wurde über eine Milli-Q-Anlage (Millipore) gereinigt und entionisiert. Das für die Chromatographie verwendete Acetonitril (ACN) und Methanol (MeOH) hatten die Reinheitsstufe HPLC Gradient Grade. Durch Verwendung einer mechanischen Online-Entgaser-Einheit wurden alle Lösungsmittel entgast.

2.12.1 Analytische Chromatographie

Um die Produktion von Naturstoffen der ausgewählten Stämme zu analysieren und erste Informationen über die Substanzcharakteristika zu erhalten, wurden die Rohextrakte zur Feststellung von Reinheitsgrad, UV/VIS-Absorption und Molekülmasse mit einem gekoppelten System bestehend aus HPLC mit Diodenarray-Detektor und Masse gemessen. Bevor die Proben eingespritzt wurden, wurden diese in MeOH gelöst und durch einen 0,2 µm PTFE-Spritzenfilter filtriert. 15 µL der Probe wurden zur Analyse in die HPLC-DAD/MS injiziert. Die chromatographische Auftrennung der Extrakte erfolgte per monolithischer Umkehrphase, reverse phase (RP) genannt. Die stationäre Phase war unpolar und trug als lipophile Alkylreste Octadecylgruppen (Phenomenex, Onyx monolithic C18, 100 x 3,0 mm, endcapped). Als mobile Phase wurde ein Zweikomponenten-Gradient verwendet, der aus Milli-Q-Wasser (A) und ACN (B), jeweils versetzt mit Ameisensäure (0,1 %), bestand. Gradient: 0 min 5 % B, 4 min 60 % B, 6 min 100 % B; Fluss 2,0 mL/min. Der Säulenofen war stets auf 40 °C temperiert.

Die Molekülmassen wurden mit einem ESI-Ionenfallen-Detektor gemessen. Die Messung erfolgte im Positiv-Modus, so dass es primär zur Bildung von Monomer-Ionen ($[M+H]^+$, $[M+Na]^+$) kam und seltener zur Bildung von Dimer-Ionen ($[2M+H]^+$, $[2M+Na]^+$) und Kalium-Addukten ($[M+K]^+$). Während der Messung lag eine Spannung von 3500 V an. Als Verneblergas wurde Stickstoff mit einem Druck von 2,7 bar eingesprüht. Das Trockengas wurde mit 9 L/min und 350 °C in die Verneblerkammer eingeleitet.

2.12.2 Präparative Chromatographie

Ausgewählte Extrakte wurden mit der präparativen LC (Liquid Chromatography)-UV/VIS chromatographisch aufgetrennt. Bevor die Proben eingespritzt wurden, wurden diese in MeOH gelöst und durch einen 0,2 µm PTFE-Spritzenfilter filtriert. Als mobile Phase wurde ein Zweikomponenten-Gradient (Milli-Q-Wasser und ACN, jeweils angesäuert auf 0,1 % Ameisensäure) verwendet. Der Gradient wurde je nach Extrakt variiert. Die Tren-

nung erfolgte mittel Umkehrphasenchromatographie. Die Säule (Gemini-NX 10u C18, 100 Å, Axia-packed, 100 x 50,00 mm, Phenomenex) wurde bei Raumtemperatur verwendet. Am Detektor wurde die Wellenlänge so gewählt, dass möglichst viele Substanzen detektiert werden konnten. Die produkthaltigen Fraktionen wurden vereinigt und der Acetonitrilanteil im Vakuum abgedampft/eingeengt. Die Substanzen wurden mit MeOH suspendiert und in Braunglasgefäße überführt. Die Proben wurden durch einen Stickstoffbegaser bei 40 °C getrocknet und anschließend bei 4 °C oder -20 °C gelagert. Zur Abtrennung der Ameisensäure aus dem HPLC-Eluenten wurde die Lösung gegebenenfalls anschließend durch eine mit Methanol und Wasser vorkonditionierte RP-18-Kartusche (Merck, mit 500 mg RP-18-Material) gesaugt. Nach dem Waschen mit etwas Wasser wurden die am Adsorbens gebundenen Substanzen anschließend mit MeOH eluiert.

2.12.3 Semi-Präparative Chromatographie

Zur Gewinnung von Reinsubstanzen wurden ausgewählte Extrakte und ausgewählte Fraktionen von der präparativen LC-UV/VIS an der semi-präparativen HPLC-DAD chromatographisch aufgetrennt. Bevor die Proben eingespritzt wurden, wurden diese in MeOH gelöst und durch einen 0,2 µm PTFE-Spritzenfilter filtriert. Als mobile Phase wurde ein Zweikomponenten-Gradient verwendet, der aus Milli-Q-Wasser (A) und ACN (B) bestand und jeweils 0,1 % Ameisensäure enthielt. Der Gradient wurde je nach Extrakt variiert. Die Trennung erfolgte bei Raumtemperatur entweder mittels RP-Chromatographie (Säule: Gemini-NX 5u C18 (100 Å, Axia-packed, 100 x 21,20 mm, Phenomenex) oder mittels Normalphasenchromatographie (Säule: Luna Silica 5u, 100 Å, 250 x 10,00 mm, Phenomenex). Das Lösungsmittel aller produkthaltigen Fraktionen wurde im Vakuum entfernt. Die Substanzen wurden mit MeOH suspendiert und in Braunglasgefäße überführt. Das Lösungsmittel wurde durch einen Stickstoffbegaser bei 40 °C getrocknet. Die Proben wurden bei 4 °C oder -20 °C gelagert.

2.13 Dereplikation

Die Auswertung der erhaltenen UV/VIS- und Massen-Daten erfolgte mit den Programmen Data Analysis und Hystar (Bruker Daltonics, Bremen). Um möglichst frühzeitig viele Substanzen dereplizieren zu können, wurden die Daten im Anschluss mit zwei Datenbanken (Antibase (Laatsch 2007), Dictionary of Natural Products (Buckingham 2011)) abgeglichen.

2.14 NMR-Spektroskopie

Die isolierten Substanzen wurden als erstes einer ^1H NMR-Messung unterzogen. Alle NMR-Messungen wurden in der spektroskopischen Abteilung des Otto-Diels-Institut an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel bei Prof. Dr. Frank Sönnichsen gemessen. Die NMR-Spektren wurden entweder mit einem Bruker Avance 600 Spektrometer mit Cryoprobenkopf oder mit einem Bruker DRX500 mit Probenwechsler aufgenommen. Als Referenz wurden die Restprotonen- bzw. Restkohlenstoffsignale des jeweiligen deuterierten Lösungsmittels verwendet.

2.15 Bioassays

Die Rohextrakte wurden auf ihre antimikrobielle Aktivität hin untersucht. Dargestellt werden die Ergebnisse der Reinsubstanzen für die zellkulturbasierten Assays, die Enzyminhibitionsassays und die antibiotischen Assays. Die Reinsubstanzen wurden in Dimethylsulfoxid gelöst und auf eine Konzentration von 10 mM eingestellt. Anschließend wurden die Reinsubstanzen in eine 96-well Mikrotiterplatte pipettiert und das Lösungsmittel im Vakuum verdampft.

Die Ergebnisse der Bioassays werden wie folgt definiert:

- ≥ 80 % Inhibition: sehr gute Aktivität
- < 80 % und ≥ 60 % Inhibition: moderate Aktivität
- < 60 % und > 30 % Inhibition: geringe Aktivität
- ≤ 30 % Inhibition: keine Aktivität

2.15.1 Antibiotische Bioassays

Zur Ermittlung der antimikrobiellen Aktivität wurden die Reinsubstanzen gegen folgende in Tabelle 4 aufgelisteten Mikroorganismen getestet.

Tabelle 4: Antibiotische Bioassays. Aufgelistet sind die für die Bioaktivitätstests verwendeten Mikroorganismen mit der entsprechenden Abkürzung, deren Stammmnummer bzw. Herkunft und deren Pathogenität.

Organismus	Stamm Nr./ Herkunft	Abkürzung	Pathogenität
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	DSM 347	<i>B.s.</i>	n
<i>Escherichia coli</i> K12	DSM 498	<i>E.c.</i>	n
<i>Staphylococcus lentus</i>	DSM 6672	<i>S.l.</i>	n
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 50071 ^T	<i>Ps.a.</i>	h
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i>	DSM 50252	<i>Ps.s.</i>	p
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NCIMB 10586	<i>Ps.fl.</i>	h
<i>Propionibacterium acnes</i>	DSM 1897 ^T	<i>P.a.</i>	h
<i>Xanthomonas campestris</i>	DSM 2405	<i>X.c.</i>	p
<i>Ralstonia solanacearum</i>	DSM 9544 ^T	<i>R.s.</i>	p
<i>Candida glabrata</i>	DSM 6425	<i>C.g.</i>	h
<i>Erwinia amylovora</i>	DSM 50901	<i>E.a.</i>	p
<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>	CIP 105338 ^T	<i>P.e.</i>	a
<i>Algicola bacteriolytica</i>	CIP 105725 ^T	<i>A.b.</i>	a
<i>Botrytis cinerea</i>	BASF	<i>B.c.</i>	p
<i>Phytophthora infestans</i>	BASF	<i>P.i.</i>	p
<i>Septoria tritici</i>	BASF	<i>S.tr.</i>	p
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	UK-SH Kiel*	<i>T.m.</i>	h
<i>Trichophyton rubrum</i>	UK-SH Kiel*	<i>T.r.</i>	h
<i>Microsporium canis</i>	UK-SH Kiel*	<i>M.c.</i>	h
<i>Candida albicans</i>	DSM 1386	<i>C.a.</i>	h
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	DSM 20044 ^T	<i>S.e.</i>	h

a: potentiell algenpathogen, h: humanpathogen, n: nicht pathogen, p: pflanzenpathogen

* Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie am UK-SH Kiel.

Die Bioassays mit *Septoria tritici*, *Trichophyton rubrum* (*Trichophyton mentagrophytes* analog) und *Phytophthora infestans* wurden durchgeführt

wie bei Jansen (2012) beschrieben. Die Bioassays mit *Propionibacterium acnes* und *Staphylococcus epidermidis* wurden durchgeführt wie bei Schneemann et al. (2010) beschrieben. Die Bioassays mit *Candida albicans* und *Microsporium canis* wurden durchgeführt wie bei Schulz et al. (2011) beschrieben.

Die Bioassays mit den übrigen Testorganismen wurde wie bei Nagel et al. (2012) beschrieben durchgeführt.

2.15.2 Enzyminhibitionsassays

Die Reinsubstanzen wurden zudem auf die Hemmung bestimmter klinisch relevanter Enzyme hin untersucht. Die Reinsubstanzen wurden in einer Konzentration von 10 μ M getestet. Folgende Enzyme wurden für die Testung verwendet:

Acetylcholinesterase (AChE):

Die Acetylcholinesterase ist ein Enzym zur Spaltung des Neurotransmitters Acetylcholin. Sie gilt z.B. als Target zur Behandlung von Morbus Alzheimer (Bolognesi et al. 2008).

Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B (PTB1B):

Protein-Tyrosin-Phosphatasen entfernen Phosphatgruppen an Tyrosinphosphorylierten Proteinen, welche für die Signaltransduktion wichtig sind. Das Enzym gilt z.B. als Target zur Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2, Fettleibigkeit und Krebs (Zhang 2001).

Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK-3 β):

Das Enzym ist ein Schlüsselregulator vieler Signalübertragungswege. Der therapeutische Nutzen von Glykogensynthase-Kinase-Inhibitoren besteht in der Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2, neurologischen und Krebserkrankungen (Martinez et al 2002).

Phosphodiesterase IV (PDE4):

Phosphodiesterase IV baut sekundäre Botenstoffe wie cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP)

ab. Anwendungsgebiete von PDE4-Inhibitoren sind u.a. Erkrankungen der Lunge, Depressionen und Alzheimer (Houslay et al. 2005).

HIV-1 Reverse Transkriptase (HIV-1-RT):

Die reverse Transkriptase ist ein Enzym, das die Umschreibung von RNA in DNA katalysiert. Inhibitoren dieses Enzyms sollen bei der Behandlung u.a. von AIDS eingesetzt werden (Sarafianos et al. 2008).

Die Enzyminhibitionsassays mit Phosphodiesterase 4 (PDE4) und Acetylcholinesterase (AChE) wurden durchgeführt wie bei Schulz et al. (2011) und Ohlendorf et al. (2012) beschrieben.

Der Enzyminhibitionsassay zur Bestimmung von Inhibitoren der HIV-1 Reverse Transkriptase wurde mit Hilfe des kolorimetrischen Reverse Transkriptase ELISA Kits (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Untersuchung der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B wurde das Biomol Green™ PTP1B Tyrosin Phosphatase Drug Discovery Kit (Enzy Life Science GmbH, Lörrach) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Der Enzyminhibitionsassay zur Bestimmung der Aktivität der Glykogensynthase-Kinase 3 β wurde wie bei Baki et al. (2007) beschrieben durchgeführt. Für den Nachweis des ATPs wurde das Kinase-Glo Luminescent Kinase Assay Kit (Promega (V3772)) verwendet.

2.15.3 Zellkulturbasierte Assays

Zur Bestimmung der zytotoxischen Wirkung der Reinsubstanzen gegen eukaryotische Zelllinien wurde der CellTiterBlue® Cell Viability Assay verwendet. Die Zahl der metabolisch aktiven Zellen wird in diesem Assay anhand des Umsatzes von Resazurin in Resorufin bestimmt. Die Durchführung für die Zelllinien NIH-3T3 (Abteilung Lebensmittelwissenschaften der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der CAU Kiel), HT-29 (DSMZ, Braunschweig (ACC 299)) und HepG2 (DSMZ, Braunschweig (ACC 180)) erfolgte wie bei Schneemann et al. (2010) beschrieben. Die zu testende Reinsubstanz wurde in Konzentrationen von 10 μ M und/oder 50 μ M eingesetzt.

2.15.4 Bakterien aus der KiWiZ-Sammlung

Folgende Bakterienstämme gehören zur Stammsammlung des KiWiZ, so dass es über diese Stämme bereits vor dieser Arbeit Informationen bezüglich des Vorhandenseins von Biosynthesegenclustern und Ergebnissen aus Bioaktivitätstests gab (siehe Tabelle 9 in Kapitel 3.6): LB084, LD81, LB034, LB058, LB114, LB129, LB152, LB012, LD120, LB042 und LB061.

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung biologisch aktiver Bakterien

An der Braunalge *Saccharina latissima* wird in der Arbeitsgruppe Marine Mikrobiologie bereits seit einigen Jahre geforscht. Mittels DGGE wurden auf *S. latissima* verschiedene Phylotypen von assoziierten Bakterien gefunden. Aus der Klasse der *Alpha-* und *Gammaproteobakterien* wurden je neun Phylotypen und aus der Klasse der *Bacteroidetes* wurden vier Phylotypen identifiziert (Staufenberger et al. 2008). Des Weiteren wurden mittels 16S rRNA-Gensequenzanalyse 210 Isolate identifiziert, von denen 103 Isolate eine biologische Aktivität aufwiesen (Wiese et al. 2009b). Die Abbildung 11 zeigt die Verteilung der biologisch aktiven Isolate von *S. latissima* auf verschiedene Gattungen.

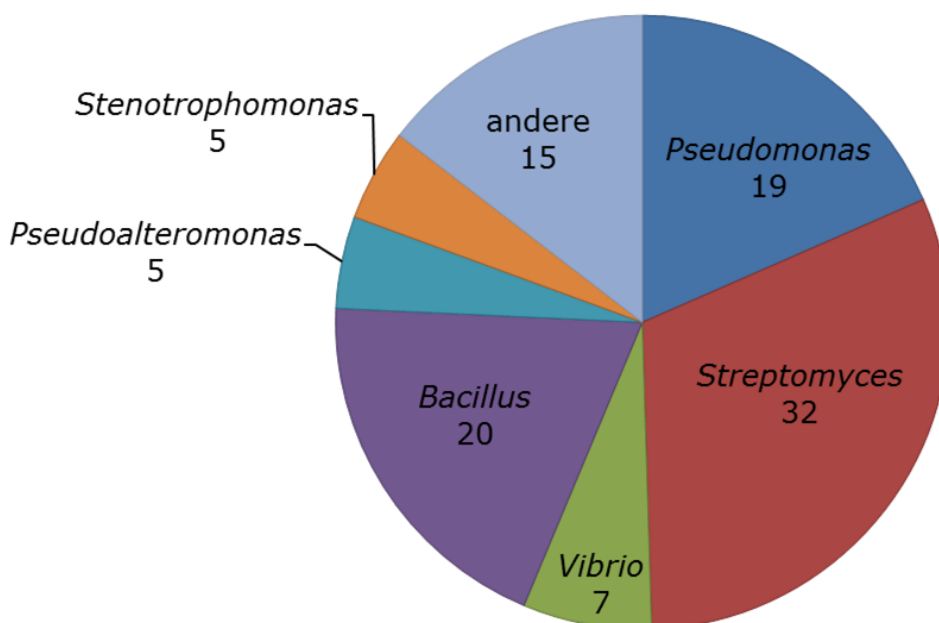


Abbildung 11: Verteilung der Gattungen biologisch aktiver Isolate, die von der Braunalge *Saccharina latissima* isoliert wurden nach (Wiese et al. 2009).

Unter den biologisch aktiven Bakterien befinden sich am häufigsten Vertreter der Gattungen *Streptomyces*, *Bacillus* und *Pseudomonas*, gefolgt von Vertretern der Gattungen *Vibrio*, *Pseudoalteromonas* und *Stenotrophomonas*. Unter den sogenannten „andere“ befinden sich vier Isolate aus der Klasse der *Alphaproteobakterien*, zwei aus der Klasse der *Bacteroidetes*.

tes und nur ein Isolat aus der Klasse der *Betaproteobakterien*. Die restlichen Isolate verteilen sich auf die Stämme der Actinobacteria und der Proteobakterien.

Durch die Untersuchungen von Wiese et al. (2009b) konnte gezeigt werden, dass Pseudomonaden einen bedeutenden Anteil der biologisch aktiven Bakterien darstellen, die von *S. latissima* isoliert werden konnten.

Daher sollte in einer erneuten Probenahme zum einen nach weiteren potentiell biologisch aktiven Pseudomonaden gesucht werden und auf der anderen Seite sollte ein Nachweis erfolgen, dass Pseudomonaden mit *S. latissima* auch langfristig assoziiert sind.

Dieser Nachweis sollte durch eine erneute Isolation bereits bekannter, isolierter Stämme erfolgen. Als Probenmaterial dienten Alge und Sediment. Zur Isolierung der Pseudomonaden wurden drei Selektivmedien (GSP-, CFC- und *Pseudomonas*-Agar) verwendet. Zur Berechnung der Gesamtkeimzahl wurden die kolonienbildenden Einheiten (KBE) der Agarplatten aller drei Medien herangezogen. Nicht in die Berechnung mit einbezogen wurden Pilzkolonien. Ebenso sind, soweit auszählbar, drei Verdünnungsstufen (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} für Sedimentproben und 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} für Algenproben) in die Berechnung mit einbezogen worden. Für alle Proben wurde die Anzahl der KBE auf 1 g Ausgangsmaterial normiert.

Für die fünf parallelen Sedimentproben ergab die Auszählung der KBE, nach vier Tagen Inkubation, folgende Verteilung. Die Auszählung der Sedimentprobe 1 **S1** ergab ca. $3,4 \times 10^4$ KBE. Die Auswertung der Sedimentprobe 2 **S2** ergab knapp $7,3 \times 10^4$ KBE. Die Auszählung der Sedimentprobe 3 **S3** ergab knapp $2,4 \times 10^4$ KBE. Die Sedimentprobe 4 **S4** wies vier Tagen etwa $5,5 \times 10^4$ KBE auf. Die Auswertung der Sedimentprobe 5 **S5** ergab nach vier Tagen ca. $2,2 \times 10^4$ KBE (Abbildung 12). Damit lagen die KBE aller fünf Sedimentproben in einer ähnlichen Größenordnung. Die relative Standardabweichung beträgt 53 %, was einer großen Streuung der Ergebnisse entspricht.

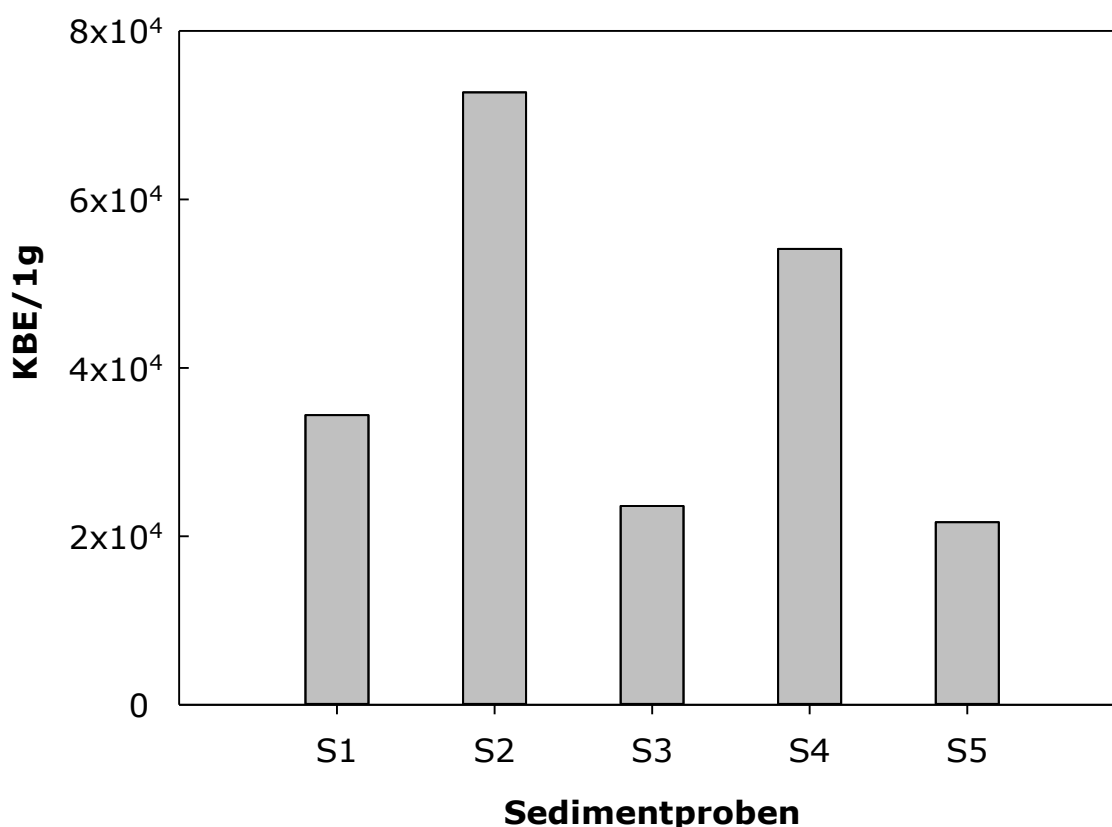


Abbildung 12: Anzahl der Koloniebildenden Einheiten (KBE) berechnet auf 1 g Probenmaterial. Dargestellt sind die fünf parallelen Sedimentproben S1 bis S5. Die Kultivierung der Mikroorganismen auf Agarplatten erfolgte für mindestens vier Tage. Für 36 Stunden wurden die Agarplatten bei 28 °C inkubiert, für die restliche Zeit wurde bei 20 °C inkubiert. Dargestellt sind die Ergebnisse der Auszählung nach vier Tagen.

Für die Bestimmung der Gesamtkeimzahl der fünf parallelen Algenproben **1** bis **5** mit den jeweiligen Abschnitten **a** altes Phylloid, **b** Phylloid, **c** junges Phylloid (Meristem), **d** Cauloid und **e** Rhizoid wurde ebenso verfahren wie für die Sedimentproben. Auf Grund des geringen Alters und damit einhergehend der geringen Größe von Alge **5** konnten weder Teile des Cauloids noch Teile des Rhizoids beprobt werden, somit flossen keine Daten der Alge **5** in die Auswertung mit ein. Aus der Abbildung 13 wird deutlich, dass die Gesamtkeimzahl des Rhizoid-Algenabschnitts **e** mit ca. $7,3 \times 10^4$ am höchsten ist. Die Gesamtkeimzahl des alten Phylloids **a** liegt mit ca. 5×10^3 schon deutlich darunter. Auf dem Abschnitt des Cauloids **d** konnten knapp 2×10^3 KBE gezählt werden. Die Auszählung des jungen Phylloids **c** und des Phylloids **b** ergaben mit jeweils ca. 680 und 250 KBE die geringsten Werte. Die relative Standardabweichung (RSD) für das alte

Phylloid **a** und das junge Phylloid **c** ergaben mit jeweils 139 % und 136 % die größte Streuung. Die relative Standardabweichung für das Rhizoid **e** lag bei 53 %. Die geringste Streuung ergaben das Phylloid **b** (RSD 39 %) und das Cauloid **d** (RSD 35 %).

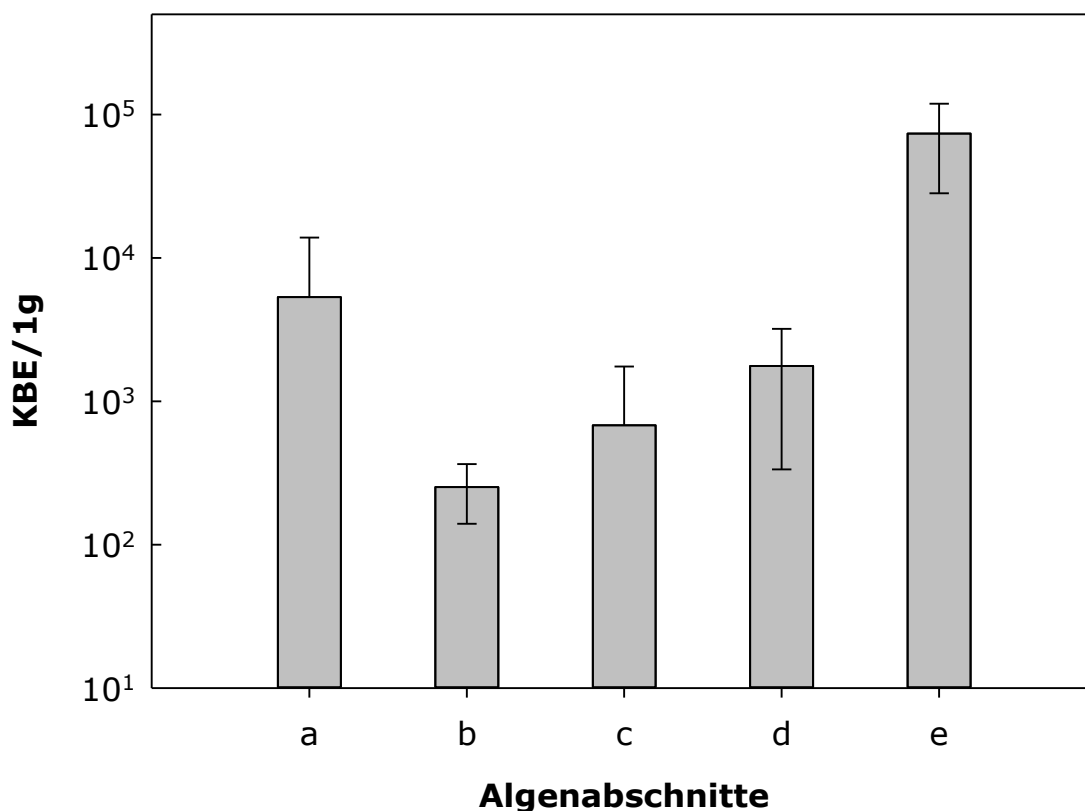


Abbildung 13: Anzahl der Koloniebildenden Einheiten (KBE) berechnet auf 1 g Probenmaterial. Dargestellt sind die vier parallelen Algenproben 1 bis 4. a altes Phylloid, b Phylloid, c junges Phylloid (Meristem), d Cauloid, e Rhizoid. Die Kultivierung der Mikroorganismen auf Agarplatten erfolgte bei 28 °C für mindestens vier Tage. Dargestellt sind die Ergebnisse der Auszählungen nach vier Tagen Inkubation.

Die Umgebungswasserproben konnten auf Grund zu weniger bzw. zu vieler Kolonien, im Hinblick auf die Gesamtkeimzahl, nicht ausgewertet werden. Infolgedessen wurden auch keine Kolonien zur Isolierung und Identifizierung ausgewählt. Es soll aber nicht unerwähnt bleiben, dass die fluoreszierenden Kolonien, die auf den Agarplatten der Umgebungswasserproben gewachsen sind, auf das Vorhandensein einer Vielzahl von Pseudomonaden hindeuten.

Da eine Probenahme zeit- und materialaufwendig ist, wurden im Januar 2010 neben Pseudomonaden auch weitere potentielle Naturstoffproduzen-

ten, wie z.B. Streptomyceten isoliert, um die Probe effektiv zu nutzen. Insgesamt wurden 82 Bakterien isoliert. Mittels 16S rRNA-Gensequenzanalyse und Datenbankrecherche wurden 74 Stämme identifiziert (Tabelle 5 und Tabelle 6). Bei acht Stämmen war die Qualität der Sequenzen so schlecht, dass keine Identifizierung stattfinden konnte (KN12, KN44, KN46, KN74, KN75, KN76, KN78, KN80). In Tabelle 7 sind die Ähnlichkeit der bearbeiteten Stämme zu den jeweils nächsten verwandten Typstämmen inklusive deren 16S rRNA Gene Acc.-No. sowie die Sequenzlänge der Stämme und deren „accession number“ angegeben.

Tabelle 5: Dargestellt sind die nächsten verwandten Typstämme inklusive deren 16S rRNA Gene Acc.-No. der identifizierten Isolate von 2010. Des Weiteren sind das Agarmedium und das Ausgangsmaterial (Sediment oder Algenabschnitt) aufgeführt aus welchem die Stämme isoliert wurden.

Ausgangsmaterial	Medium	Isolat	Nächster verwandter Typstamm	16S rRNA Gene Acc.-No.
Sediment	G	KN4	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12633 ^T	D84020
Sediment	C	KN5	<i>Pseudomonas kilonensis</i> 520-20 ^T	AJ292426
Sediment	C	KN6	<i>Pseudomonas lini</i> DLE411J ^T	AY035996
Sediment	P	KN7	<i>Exiguobacterium oxidotolerans</i> T-2-2 ^T	AB105164
Sediment	P	KN8	<i>Exiguobacterium oxidotolerans</i> T-2-2 ^T	AB105164
Sediment	G	KN13	<i>Pseudomonas jessenii</i> CIP 105274 ^T	AF068259
Sediment	P	KN14	<i>Arthrobacter arilaitensis</i> RE117 ^T	AJ609628
Rhizoid	G	KN15	<i>Pseudomonas graminis</i> DSM 11363 ^T	Y11150
Sediment	G	KN16	<i>Pseudomonas lurida</i> DSM 15835 ^T	AJ581999
altes Phylloid	P	KN20	<i>Pseudomonas taiwanensis</i> BCRC 17751 ^T	EU103629
Sediment	C	KN21	<i>Pseudomonas migulae</i> CIP 105470 ^T	AF074383
Rhizoid	C	KN23	<i>Pseudomonas panacis</i> CG20106 ^T	AY787208
Sediment	G	KN24	<i>Pseudomonas psychrophila</i> E-3 ^T	AB041885
Sediment	C	KN25	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12633 ^T	D84020
altes Phylloid	P	KN26	<i>Pseudomonas jessenii</i> CIP 105274 ^T	AF068259
Sediment	P	KN29	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> JAJ28 ^T	AJ249382
Rhizoid	C	KN30	<i>Pseudomonas lurida</i> DSM 15835 ^T	AJ581999
Rhizoid	C	KN31	<i>Pseudomonas lurida</i> DSM 15835 ^T	AJ581999
Rhizoid	C	KN32	<i>Pseudomonas lurida</i> DSM 15835 ^T	AJ581999
altes Phylloid	C	KN33	<i>Pseudomonas lini</i> DLE411J ^T	AY035996

Ausgangsmaterial	Medium	Isolat	Nächster verwandter Typstamm	16S rRNA Gene Acc.-No.
altes Phylloid	P	KN35	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> L-1 ^T	D84004
Sediment	G	KN37	<i>Pseudomonas lurida</i> DSM 15835 ^T	AJ581999
Sediment	C	KN39	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aureofaciens</i> DSM 6698 ^T	AY509898
Phylloid	G	KN40	<i>Pseudomonas psychrophila</i> E-3 ^T	AB041885
Sediment	C	KN49	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> JAJ28 ^T	AJ249382
Rhizoid	C	KN52	<i>Pseudomonas trivialis</i> DSM 14937 ^T	AJ492831
Rhizoid	C	KN53	<i>Pseudomonas graminis</i> DSM 11363 ^T	Y11150
Sediment	G	KN55	<i>Pseudomonas veronii</i> CIP 104663 ^T	AF064460
Sediment	P	KN56	<i>Pseudomonas graminis</i> DSM 11363 ^T	Y11150
Sediment	C	KN57	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> JAJ28 ^T	AJ249382
Sediment	G	KN58	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12633 ^T	D84020
Sediment	P	KN60	<i>Pseudomonas cannabina</i> CFBP 2341 ^T	AJ492827
Sediment	P	KN61	<i>Pseudomonas cedrina</i> subsp. <i>fulgida</i> DSM 14938 ^T	AJ492830
Sediment	P	KN62	<i>Streptomyces luridiscabiei</i> S63 ^T	AF361784
Cauloid	P	KN64	<i>Streptomyces luridiscabiei</i> S63 ^T	AF361784
altes Phylloid	P	KN65	<i>Streptomyces luridiscabiei</i> S63 ^T	AF361784
altes Phylloid	P	KN66	<i>Streptomyces luridiscabiei</i> S63 ^T	AF361784
Sediment	P	KN67	<i>Streptomyces sampsonii</i> ATCC 25495 ^T	D63871
Sediment	G	KN68	<i>Streptomyces luridiscabiei</i> S63 ^T	AF361784
Rhizoid	P	KN69	<i>Streptomyces luridiscabiei</i> S63 ^T	AF361784
Sediment	P	KN70	<i>Streptomyces luridiscabiei</i> S63 ^T	AF361784
Sediment	P	KN71	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i> ATCC 3338 ^T	AB184738
Phylloid	P	KN72	<i>Streptomyces sampsonii</i> ATCC 25495 ^T	D63871

Ausgangsmaterial	Medium	Isolat	Nächster verwandter Typstamm	16S rRNA Gene Acc.- No.
altes Phylloid	P	KN73	<i>Streptomyces sampsonii</i> ATCC 25495 ^T	D63871

C: CFC-Agarplatte, G: GSP-Agarplatte, P: *Pseudomonas*-Agarplatte.

Tabelle 6: Dargestellt ist die Ähnlichkeit der identifizierten und auch konservierten Stämme von 2010 zu den jeweils nächsten verwandten Typstämmen inklusive deren 16S rRNA Gene Acc.-No. Des Weiteren sind die Sequenzlänge der Isolate und deren Ausgangsmaterial angegeben, sowie das Isolationsmedium.

Stamm	Ausgangsmaterial	Sequenzlänge in bp*	Nächster verwandter Typstamm	16S rRNA Gene Acc.-No.	Ähnlichkeit zum Typstamm
LB170 ^P	Sediment	1484	<i>Streptomyces mirabilis</i> NBRC 13450 ^T	AB184412	99,7 %
LB171 ^P	Sediment	1481	<i>Streptomyces luridiscabiei</i> S63 ^T	AF361784	99,9 %
LB173 ^P	Sediment	1199	<i>Streptomyces luridiscabiei</i> S63 ^T	AF361784	99,5 %
LB174 ^P	Sediment	1490	<i>Streptomyces luridiscabiei</i> S63 ^T	AF361784	99,7 %
LB176 ^P	Sediment	1431	<i>Streptomyces drozdowiczii</i> NRRL B-24297 ^T	AB249957	99,6 %
LB177 ^P	Phylloid	1483	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i> ATCC 3338 ^T	AB184738	100 %
LB179 ^P	altes Phylloid	1382	<i>Streptomyces clavifer</i> NRRL B-2557 ^T	DQ026670	99,9 %
LB181 ^P	Sediment	1489	<i>Streptomyces coelestis</i> AS 4.1594 ^T	AF503496	99,9 %
LB182 ^P	Phylloid	1371	<i>Streptomyces mirabilis</i> ATCC 27447 ^T	AB184412	99,3 %
LB183 ^C	altes Phylloid	1483	<i>Pseudomonas kilonensis</i> DSM 13647 ^T	AJ292426	99,7 %
LB184 ^G	Sediment	1483	<i>Pseudomonas kilonensis</i> DSM 13647 ^T	AJ292426	99,6 %
LB185 ^C	Sediment	1483	<i>Pseudomonas protegens</i> DSM 19095 ^T	AJ278812	99,7 %
LB186 ^G	Sediment	414	<i>Pseudomonas lurida</i> DSM 15835 ^T	AJ581999	100 %
			<i>Pseudomonas trivialis</i> DSM 14937 ^T	AJ492831	100 %
			<i>Pseudomonas poae</i> DSM 14936 ^T	AJ492829	100 %
LB187 ^C	Sediment	451	<i>Pseudomonas trivialis</i> DSM 14937 ^T	AJ492831	99,8 %
LB188 ^C	Rhizoid	465	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> DSM11821 ^T	AB021199	99,8 %
LB189 ^P	altes Phylloid	411	<i>Pseudomonas graminis</i> DSM 11363 ^T	Y11150	95,1 %
LB190 ^G	Sediment	411	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525 ^T	D84013	94,9 %
LB191 ^C	Rhizoid	492	<i>Pseudomonas lurida</i> DSM 15835 ^T	AJ581999	99,4 %

Stamm	Ausgangsmaterial	Sequenzlänge in bp*	Nächster verwandter Typstamm	16S rRNA Gene Acc.-No.	Ähnlichkeit zum Typstamm
LB192 ^C	Sediment	480	<i>Pseudomonas migulae</i> CIP 105470 ^T	AF074383	99,8 %
LB193 ^C	Rhizoid	463	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> DSM11821 ^T	AB021199	100 %
LB194 ^C	Sediment	412	<i>Pseudomonas jessenii</i> CIP 105274 ^T	AF068259	100 %
LB195 ^C	Sediment	454	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> JAJ28 ^T	AJ249382	100 %
LB196 ^C	Sediment	451	<i>Pseudomonas panacis</i> CG20106 ^T	AY787208	99,8 %
LB197 ^G	Sediment	498	<i>Pseudomonas marincola</i> KMM 3042 ^T	AB301071	98,9 %
LB198 ^P	Rhizoid	447	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061 ^T	AY876289	98,8 %
LB199 ^G	Sediment	492	<i>Pseudomonas cedrina</i> subsp. <i>fulgida</i> DSM 14938 ^T	AJ492830	99,8 %
LB200 ^P	Sediment	492	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525 ^T	D84013	99,4 %
LB201 ^P	Rhizoid	1138	<i>Micromonospora aurantiaca</i> ATCC 27029 ^T	CP002162	99,3 %
LB202 ^P	altes Phylloloid	1355	<i>Nocardia cummidelens</i> DSM 44490 ^T	AF430052	100 %
			<i>Nocardia soli</i> DSM 44488 ^T	AF430051	100 %
LB203 ^C	Sediment	500	<i>Bacillus stratosphericus</i> 41KF2a ^T	AJ831841	100 %
			<i>Bacillus aerophilus</i> 28K ^T	AJ831844	100 %

*: Anzahl der Basenpaare, ^C: CFC-Agarplatte, ^G: GSP-Agarplatte, ^P: *Pseudomonas*-Agarplatte.

Tabelle 7: Dargestellt ist die Ähnlichkeit der bearbeiteten Stämme zu den jeweils nächsten verwandten Typstämmen inklusive deren 16S rRNA Gene Acc.-No. Des Weiteren sind die Sequenzlänge der Stämme und deren Accession number angegeben.

Stamm	16S rRNA Gene Acc.-No.	Sequenzlänge in bp*	Nächster verwandter Typstamm	16S rRNA Gene Acc.-No.	Ähnlichkeit zum Typstamm
LB012 ^a	AM913885	1421	<i>Pseudomonas gessardii</i> CIP 105469 ^T	AF074384	99,6 %
LB034 ^a	AM913890	1385	<i>Pseudoalteromonas tunicata</i> CIP 105928 ^T	Z25522	97,6 %
LB042 ^a	AM913891	1443	<i>Pseudomonas protegens</i> DSM 19095 ^T	AJ278812	99,6 %
LB043 ^a	AM913892	1412	<i>Pseudomonas protegens</i> DSM 19095 ^T	AJ278812	99,6 %
LB044 ^a	AM913893	1501	<i>Pseudomonas protegens</i> DSM 19095 ^T	AJ278812	99,6 %
LB045 ^a	AM913894	1501	<i>Pseudomonas protegens</i> DSM 19095 ^T	AJ278812	99,6 %
LB046 ^a	AM913895	1477	<i>Pseudomonas protegens</i> DSM 19095 ^T	AJ278812	99,6 %
LB047 ^a	AM913896	1210	<i>Pseudomonas protegens</i> DSM 19095 ^T	AJ278812	99,6 %
LB048 ^a	AM913897	1478	<i>Pseudomonas protegens</i> DSM 19095 ^T	AJ278812	99,6 %
LB051 ^a	AM913898	1478	<i>Pseudomonas protegens</i> DSM 19095 ^T	AJ278812	99,6 %
LB054 ^a	AM913900	1501	<i>Pseudomonas protegens</i> DSM 19095 ^T	AJ278812	99,5 %
LB058 ^a	AM913901	1376	<i>Streptomyces flavofuscus</i> DSM 41426 ^T	AB249935	99,6 %
LB061 ^a	AM913903	1479	<i>Pseudomonas protegens</i> DSM 19095 ^T	AJ278812	99,7 %
LB062 ^a	FR686532	1485	<i>Pseudomonas protegens</i> DSM 19095 ^T	AJ278812	99,7 %
LB063 ^a	AM913943	1380	<i>Pseudomonas protegens</i> DSM 19095 ^T	AJ278812	99,6 %
LD120 ^a	AM913905	1441	<i>Pseudomonas protegens</i> DSM 19095 ^T	AJ278812	99,6 %
LB066 ^b	AM749667	1450	<i>Kiloniella laminariae</i> NCIMB 14374 ^T	AM749667	100 %
LB084 ^b	AM913918	1504	<i>Bacillus aerophilus</i> JCM 13347 ^T	AJ831844	99,9 %
LB114 ^a	AM913982	1368	<i>Streptomyces flavogriseus</i> DSM 40323 ^T	AJ494864	99,7 %

Stamm	16S rRNA Gene Acc.-No.	Sequenzlänge in bp [*]	Nächster verwandter Typstamm	16S rRNA Gene Acc.-No.	Ähnlichkeit zum Typstamm
LB129 ^b	AM913952	1363	<i>Streptomyces fimicarius</i> DSM 40322 ^T	AY999784	100 %
LB152 ^b	AM913972	1410	<i>Amycolatopsis palatopharyngis</i> JCM 12460 ^T	AF479268	100 %
LB183 ^c	FR675975	1483	<i>Pseudomonas kilonensis</i> DSM 13647 ^T	AJ292426	99,7 %
LB184 ^c	FR675976	1483	<i>Pseudomonas kilonensis</i> DSM 13647 ^T	AJ292426	99,6 %
LB185 ^c	FR675977	1483	<i>Pseudomonas protegens</i> DSM 19095 ^T	AJ278812	99,7 %

^{*}: Anzahl der Basenpaare, ^a: Probenahme 2002, ^b: Probenahme 2003, ^c: Probenahme 2010.

Die Verteilung der Bakterienisolate aus der Probenahme im Januar 2010 auf verschiedene Gattungen ist in Abbildung 14 dargestellt.

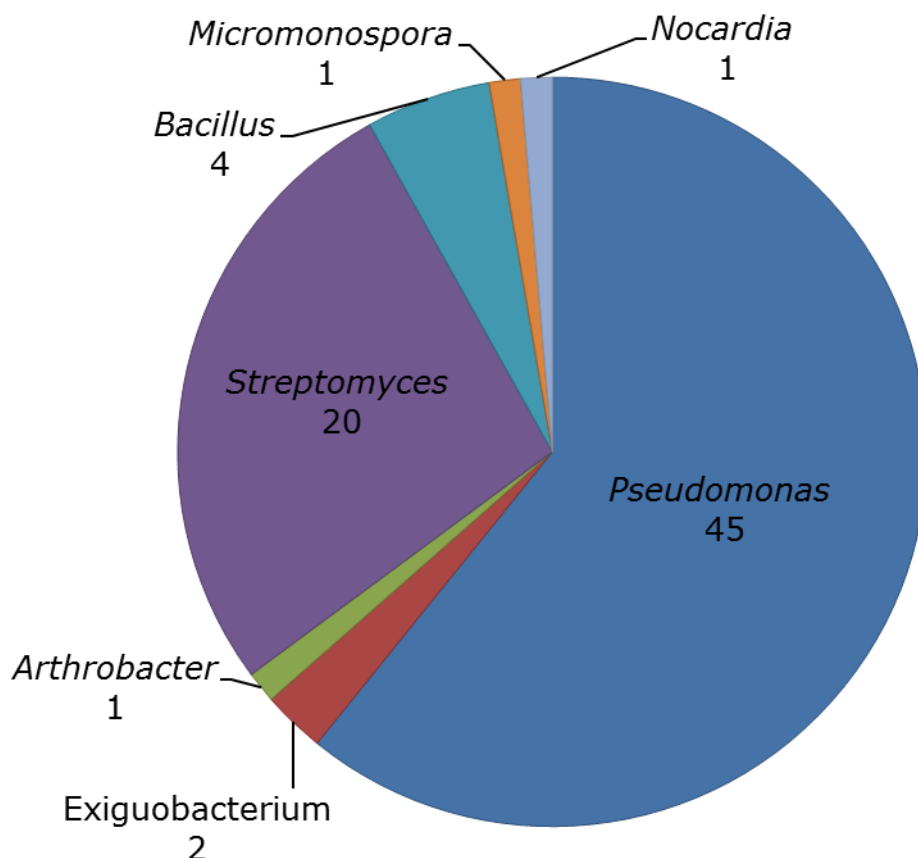


Abbildung 14: Verteilung der Gattungen der isolierten Bakterien-Stämme von *Saccharina latissima* aus dem Jahr 2010.

Mit 45 Stämmen stellen die Pseudomonaden den größten Anteil der isolierten Bakterien dar, gefolgt von den *Streptomyces*-Stämmen mit 20 Vertretern. Vier Bakterien konnten der Gattung *Bacillus* und zwei der Gattung *Exiguobacterium* zugeordnet werden. Weiterhin wurde jeweils ein Bakterium der Gattung *Arthrobacter*, *Micromonospora* und *Nocardia* isoliert werden.

Die Verwendung der GSP- und CFC-Agarplatten ermöglichte vorallem die Isolierung von Pseudomonaden. Aber auch einige Bakterien der Gattung *Bacillus* und *Streptomyces* wurden isoliert. Mit sieben verschiedenen Gattungen wurde auf den *Pseudomonas*-Agarplatten die höchste bakterielle Diversität aller drei Medien erhalten (siehe Abbildung 15).

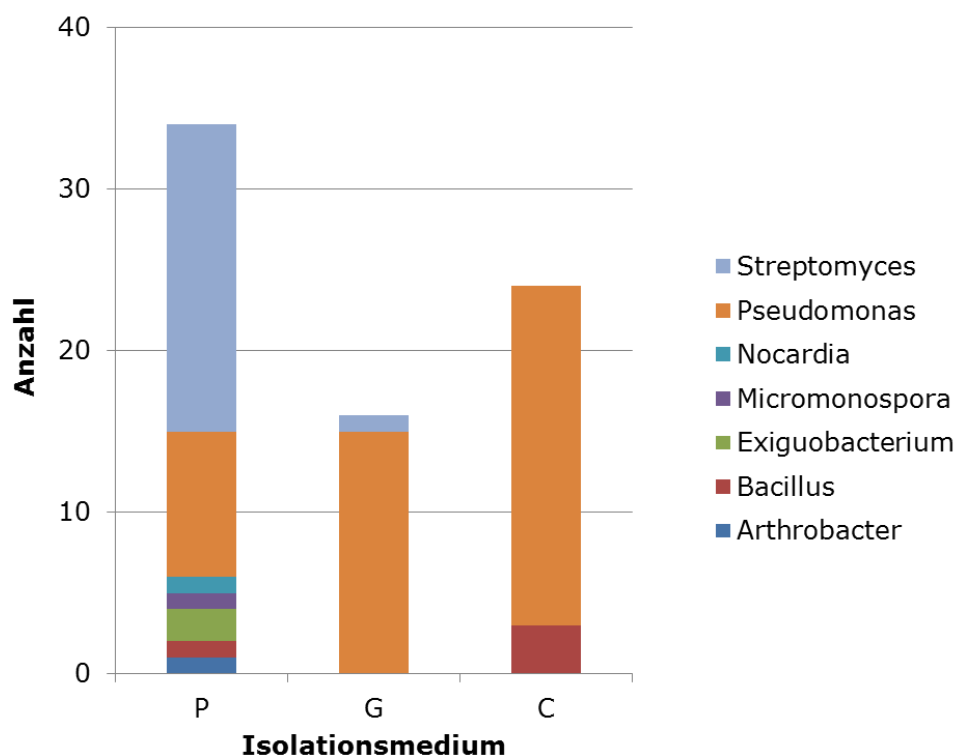


Abbildung 15: Verteilung der Gattungen der isolierten Bakterien-Stämme nach Agar-Medien. Die Bakterien wurden aus *S. latissima* im Jahr 2010 isoliert. P: *Pseudomonas*-Agar, G: GSP-Agar, C: CFC-Agar.

Auf den Agarplatten mit *Pseudomonas*-Medium war auch die größte Anzahl an Kolonien zu verzeichnen (Daten nicht gezeigt).

3.2 Sind diese Bakterien mit *S. latissima* assoziiert?

S. latissima wurde am Standort Kieler Förde (Tonnenhof) im Oktober 2002, April 2003 und Januar 2010 beprobt. Im Januar 2010 wurde die Probenahme durch die Auswahl entsprechender Medien speziell zur Isolierung von Pseudomonaden ausgelegt. Des Weiteren wurden einige Kolonien gepickt, die auf Grund ihrer Morphologie auf die Klasse der Actinobacteria hinwiesen oder deren Koloniemorphologie sich von der Mehrzahl der weiteren Kolonien unterschied.

Neben einer größeren Anzahl von Bakterien, die von der Phyllosphäre und Rhizosphäre von *S. latissima* aus den verschiedenen Probenahmen isoliert wurden, konnten auf Grund von 16S rRNA Gensequenzanalysen 16 Isolate der Gattung *Pseudomonas* zugeordnet werden. Im November 2002 wur-

den neun *Pseudomonas*-Stämme von der Phyllosphäre der Alge isoliert: LB042 (AM913891), LB043 (AM913892), LB044 (AM913893), LB045 (AM913894), LB046 (AM913895), LB047 (AM913896) und LB048 (AM913897), LB051 (AM913898) und LB054 (AM913900) Weitere vier Stämme wurden von Phyllosphäre der Alge im April 2003 isoliert: LB062a (FR686532), LB061 (AM913903), LB063 (AM913943) und LD120 (AM913905). Im Januar 2010 wurden ein Stamm LB183 (FR675975) von der Phyllosphäre und zwei Stämme LB184 (FR675976) und LB185 (FR675977) von der Rhizosphäre der Algen isoliert. Zur phylogenetischen Einordnung der Isolate wurde ein Stammbaum mittels Neighbour-Joining-Algorithmus berechnet (Abbildung 16).

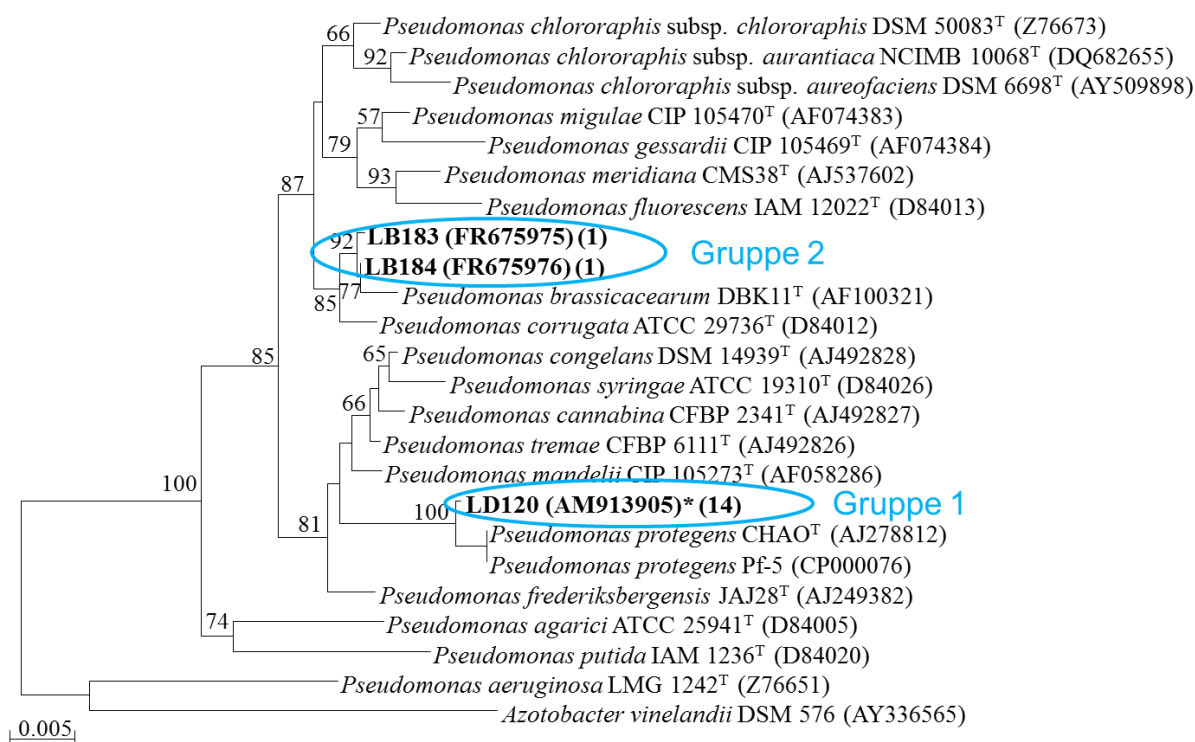


Abbildung 16: Phylogenetischer Stammbaum der mit *Saccharina latissima* assoziierten *Pseudomonas*-Stämme. Der Stammbaum wurde mittels Neighbour-Joining-Algorithmus berechnet. Bootstrap-Werte sind in % angegeben (es sind nur Werte über 50% angegeben). Die Maßstabskala gibt die Anzahl der Substitutionen pro Nukleotidposition an. Die in dieser Arbeit bearbeiteten Stämme sind fettgedruckt und die Anzahl der Stämme steht in Klammern dahinter. Gruppe 1 bzw. LD120-Gruppe beinhaltet die Sequenzen der Isolate LB042, LB043, LB044, LB045, LB046, LB047, LB048, LB051, LB062a, LB061, LB063, LB081 und LB185.

Die Berechnung des Stammbaums mittels Maximum-Likelihood-Algorithmus führte zu den gleichen Ergebnissen. Die Isolate konnten in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die meisten *Pseudomonas*-Stämme, die mit *S. latissima* assoziiert sind, haben mit einer Sequenzähnlichkeit von mindestens 99,5 % eine nahe Verwandtschaft zu *Pseudomonas protegens* CHA0^T, wozu auch Stämme gehören, die zuvor als *Pseudomonas fluorescens* falsch klassifiziert wurden, wie z.B. Stamm Pf-5 (Ramette et al. 2011).

Stämme, deren nächster verwandter Typstamm *Pseudomonas protegens* CHA0^T ist, werden hier als LD120-Gruppe zusammengefasst, da ihre 16S rRNA-Gensequenz eine Ähnlichkeit von 100 % zu einander hat (Gruppe 1). Der nächste verwandte Typstamm der zweiten Gruppe mit den Stämmen LB183 und LB184 war *Pseudomonas brassicacearum* DBK11^T. Die zweite Gruppe bildet mit Ähnlichkeiten von 97,5 bis 97,8 % zur LD120-Gruppe ein separates Cluster.

In den verschiedenen Probenahmen konnten neben *Pseudomonas* auch Vertreter der Gattungen *Bacillus* und *Streptomyces*, mit einer hohen Ähnlichkeit zu bereits zuvor isolierten Stämmen, wiederkehrend isoliert werden (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Dargestellt sind die Ähnlichkeiten der isolierten Bakterien aus dem Jahr 2010 mit den isolierten Bakterien aus den vorhergehenden Probenahmen. Die Ähnlichkeit zum nächsten verwandten Stamm aus der Stammsammlung ist in % angegeben. Des Weiteren sind die 16S rRNA Gene Acc.-No. und die Sequenzlänge in Basenpaaren angegeben.

Stamm	Sequenzlänge in bp*	Nächster verwandter Stamm aus Stammsammlung	16S rRNA Gene Acc.-No.	Ähnlichkeit zum Stamm
LB185	1480	LB045 ^a	AM913894	100 %
KN13	411	LB025 ^a	AM913888	99,0 %
KN26	411	LB025 ^a	AM913888	99,0 %
LB194	412	LB025 ^a	AM913888	99,0 %
KN39	413	LB012 ^a	AM913885	100 %
LB171	1480	LB144 ^b	AM913964	99,9 %
LB174	1488	LB145 ^b	AM913965	99,8 %
LB173	1203	LB144 ^b	AM913964	99,6 %
LB203	500	LB087 ^c	AM913919	100 %
LB198	449	LB067 ^c	AM913908	99,3 %
LB199	490	LB012 ^a	AM913885	99,8 %
KN61	490	LB012 ^a	AM913885	100 %
LB179	1382	LB144 ^b	AM913964	99,5 %
KN70	1487	LB145 ^b	AM913965	99,9 %
KN69	1382	LB144 ^b	AM913964	100 %
KN68	1375	LB145 ^b	AM913965	99,9 %
KN66	1488	LB145 ^b	AM913965	99,8 %
KN64	1433	LB145 ^b	AM913965	99,8 %
KN65	1464	LB144 ^b	AM913964	99,9 %
KN62	1383	LB144 ^b	AM913964	99,9 %

* Anzahl der Basenpaare, ^a *Pseudomonas* sp., ^b *Streptomyces* sp., ^c *Bacillus* sp..

3.3 Physiologisches Profil von *Pseudomonas* sp. LD120

Um zu überprüfen, ob Stamm *Pseudomonas* sp. LD120 in der Lage ist, Algenbestandteile als Nährstoff zu verwerten, wurden Minimalmedien mit entsprechenden Zusätzen hergestellt. Auf folgenden Medien konnte kein

Wachstum von Stamm LD120 nachgewiesen werden: Na-Alginat, Cellulose, Agarose, Agar, Mannitol und gefriergetrocknetes Pulver von *S. latissima*. Dies deutet darauf hin, dass Stamm LD120 keine von Algen stammenden Polysaccharide verwerten kann. Auf Minimalmedien, die als Substrat Natriumsalze organischer Säuren wie DL-Malat, Succinat, Fumarat und Citronensäure enthielten, sowie auf Glucose und L-Glutamat konnte Wachstum nachgewiesen werden. Stamm LD120 konnte auch auf der Kontrolle (Marine Broth Agar) wachsen. Die Analyse mittels BIOLOG GN2 Mikrotiterplatten zeigte, dass Stamm LD120 ein weites Spektrum an Kohlenstoffquellen inklusive verschiedener Zucker (z.B. D-Fruktose, D-Glukose, D-Mannose, Saccharose, D-Gluconsäure) und Aminosäuren (z.B. L-Asparagin, L-Asparaginsäure, L-Glutaminsäure, L-Prolin, D- und L-Alanin, L-Leucin, L-Ornithin, L-Threonin, L-Alanyl-glycin) verwerten kann. Zusammenfassend läßt sich sagen, dass Stamm LD120 besondere Präferenzen für Dicarbonsäuren, die im Citratzyklus vorkommen, und für komplexe Medien (Marine Broth), welche Proteine enthalten, zeigte.

3.4 Charakterisierung von *Pseudomonas* sp. LD120

Zur Validierung der Ergebnisse der 16S rRNA-Gensequenzanalyse von Stamm LD120 wurde dieser zusätzlich mittels BIOLOG GN2 Mikrotiterplatten physiologisch charakterisiert (Tabelle 39 im Anhang). Die Untersuchungsergebnisse wurden mit den Ergebnissen von (Rico & Preston 2008) verglichen. Daraus folgt, dass die Substratverwertung von Stamm LD120 zu 89 % mit der von *P. protegens* Pf-5 überein stimmt und zu 86 bzw. 76 % mit der von *P. putida* KT2440 und *P. syringae* pathovar tomato DC3000.

Die für fluoreszierende Pseudomonaden typische Bildung eines in den Agar diffundierenden gelblich-grün fluoreszierenden Pigmentes konnte ebenfalls nachgewiesen werden.

Auch die für *P. protegens* Pf-5 charakteristische Produktion der Sekundärmetabolite Monoacetylphloroglucinol (MAPG), 2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG) und Pyoluteorin (PLT) konnte bei Stamm LD120 nachge-

wiesen werden. Somit konnte Stamm LD120 auf Grund chemischer und biochemischer Eigenschaften sowie der phylogenetischen Analyse als *P. protegens* identifiziert werden. Das Gleiche gilt für die weiteren *Pseudomonas*-Stämme, die zur LD120-Gruppe gehören.

3.5 Antimikrobielle Metabolite von *Pseudomonas* sp. LD120

Alle Metabolite (Tabelle 32 in Kapitel 3.7.2) waren aktiv gegen die zwei getesteten Gram-positiven Bakterien, aber nur PLT zeigte auch eine Aktivität gegen mehrere Gram-negative Bakterien. Zusätzlich zu der antibakteriellen Aktivität hemmten MAPG und DAPG Pilze, wie die pflanzenpathogenen Organismen *Septoria tritici* und *Phytophthora infestans*, sowie die zwei Dermatophyten *Trichophyton mentagrophytes* und *Trichophyton rubrum*. PLT zeigte eine hohe Aktivität gegen die pflanzenpathogenen *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora*, *Ralstonia solanacearum* und *Xanthomonas campestris* sowie gegen die algenpathogenen *Algicola bacteriolytica* und *Pseudoalteromonas elyakovii*. DAPG zeigte eine Wachstumsinhibition von *E. amylovora* und *A. bacteriolytica*. Die bisher unaufgeklärten Metabolite Peak 15 und Peak 17 zeigten eine starke Hemmung des klinisch relevanten Keimes *Candida albicans* und, wie auch DAPG und PLT, eine starke Aktivität gegen *Propionibacterium acnes*.

3.6 Screening der Naturstoffproduktion Algen-assoziiierter Bakterien

Aus einer Vielzahl konservierter Bakterien (Stammsammlung des KiWiZ) wurden 24 Stämme ausgewählt, die von der Braunalge *S. latissima* isoliert wurden, um deren Naturstoffproduktion zur Auffindung neuer biologisch aktiver Substanzen näher zu untersuchen. Die zur Stammsammlung aufgestellten Kriterien, wurden in Kapitel 1.7 beschrieben. Die ausgewählten Stämme und der Status der aufgestellten Kriterien sind in Tabelle 9 aufgelistet. Außerdem wurde der Einfluss von Kultivierungsdauer bzw. -form und/ oder Medium auf die Sekundärmetabolit-Produktion für folgende Stämme untersucht: LB042, LB061, LD120, LD81, LB114 .

Tabelle 9: Auflistung der untersuchten Bakterien-Stämme von *S. latissima* sowie der vier Kriterien zur Stammauswahl.

Stamm	PKS I/II	NRPS	Chemie	Art/Gattung	Bioaktivitätstests
LB084	-	-	inter.	<i>Bacillus</i>	<i>B.s.</i> ; <i>S.l.</i>
LD81	-	-	vorh.	<i>Kiloniella laminariae</i> *	<i>B.s.</i>
LB034	k.I.	k.I.	k.I.	<i>Pseudoalteromonas tunicata</i>	k.I.
LB058	+/-	+	vorh.	<i>Streptomyces</i>	<i>B.s.</i> ; <i>S.l.</i> ; <i>C.g.</i>
LB114	+/+	+	vorh.	<i>Streptomyces</i>	<i>C.g.</i>
LB129	+/+	+	vorh.	<i>Streptomyces</i>	<i>C.g.</i>
LB152	-/+	+	vorh.	<i>Amycolatopsis</i>	<i>B.s.</i> ; <i>S.l.</i>
LB012	+/+	+	k.I.	<i>Pseudomonas</i>	k.I.
LD120	-	+	inter.	<i>Pseudomonas</i>	<i>B.s.</i> ; <i>S.l.</i>
LB042	-	+	vorh.	<i>Pseudomonas</i>	<i>B.s.</i> ; <i>S.l.</i>
LB061	+	+	vorh.	<i>Pseudomonas</i>	<i>B.s.</i> ; <i>S.l.</i>
LB043	-	k.I.	k.I.	<i>Pseudomonas</i>	k.I.
LB044	k.I.	+	k.I.	<i>Pseudomonas</i>	k.I.
LB045	-	k.I.	k.I.	<i>Pseudomonas</i>	k.I.
LB046	-	k.I.	k.I.	<i>Pseudomonas</i>	k.I.
LB047	-	k.I.	k.I.	<i>Pseudomonas</i>	k.I.
LB048	-	k.I.	k.I.	<i>Pseudomonas</i>	k.I.
LB051	-	k.I.	k.I.	<i>Pseudomonas</i>	k.I.
LB054	k.I.	k.I.	k.I.	<i>Pseudomonas</i>	k.I.
LB062	-	+	k.I.	<i>Pseudomonas</i>	k.I.
LB063	k.I.	k.I.	vorh.	<i>Pseudomonas</i>	<i>B.s.</i> ; <i>S.l.</i>
LB183	k.I.	k.I.	k.I.	<i>Pseudomonas</i>	k.I.
LB184	k.I.	k.I.	k.I.	<i>Pseudomonas</i>	k.I.
LB185	k.I.	k.I.	k.I.	<i>Pseudomonas</i>	k.I.

Inter.: interessant, k.I.: keine Information, vorh.: vorhanden, +: Genfragment nachgewiesen, -: kein Genfragment nachgewiesen, *B.s.*: Aktivität gegen *Bacillus subtilis* nachgewiesen, *S.l.*: Aktivität gegen *Staphylococcus lentus* nachgewiesen, *C.g.*: Aktivität gegen *Candida glabrata* nachgewiesen, *: neue Art.

3.6.1 Naturstoffproduktion von *Bacillus* sp. (Stamm LB084)

Bei Stamm LB084 war die Analyse der Biosynthese-Gencluster negativ. Aufgrund einer vorherigen chemischen Untersuchung und anschließenden Bioaktivitätstests konnte eine Aktivität des Rohextrakts gegen *B. subtilis* und *S. lentus* nachgewiesen werden. Da dieser Stamm als chemisch interessant eingestuft wurde, erfolgte eine Kultivierung wie in Tabelle 38 im Anhang aufgeführt und mit anschließender Extraktion zu drei verschiedenen Kultivierungszeitpunkten. Die Extraktion erfolgte wie in Kapitel 2.11.4 beschrieben.

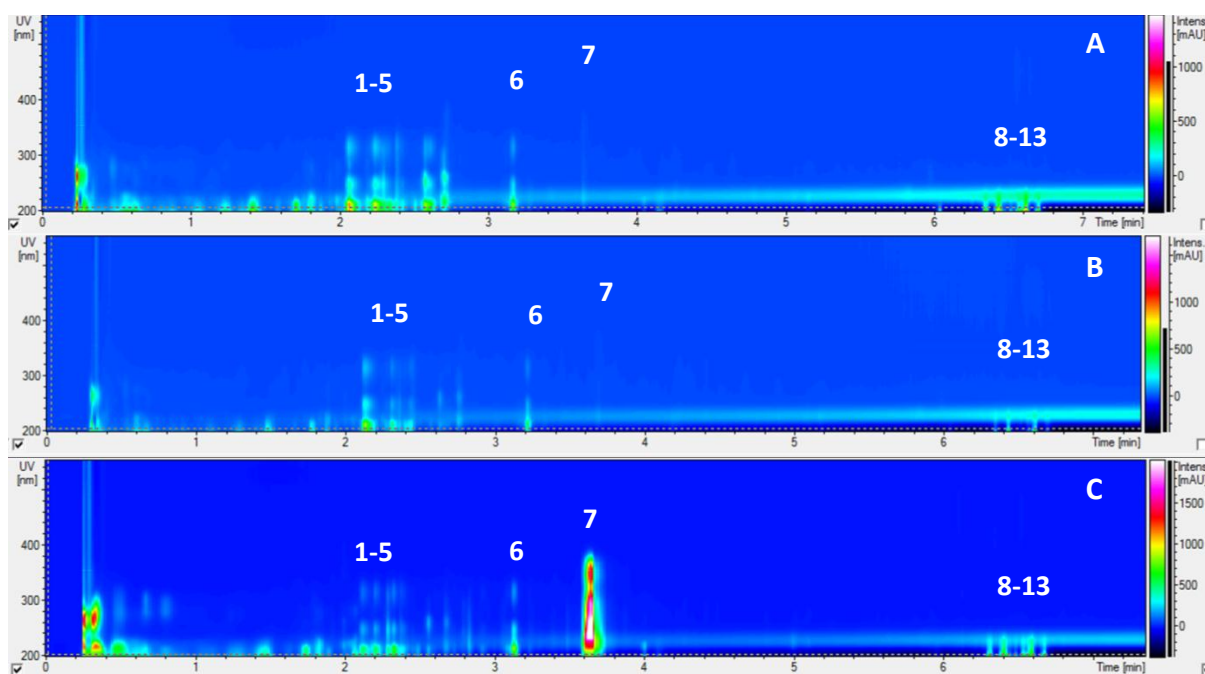


Abbildung 17: DAD-Chromatogramme der Extrakte von 100 mL Kulturen des Stammes LB084 in SP Medium. Die Kultivierungsdauer betrug A: 2 Tage, B: 3 Tage, C: 7 Tage. Peak 1-13 siehe Tabelle 10.

Mit den vorhandenen Daten der UV/VIS-Absorption und der Molekülmasse konnten folgende mögliche Substanzen aus dem Rohextrakt identifiziert werden (siehe Tabelle 10).

Die in Tabelle 10 aufgelisteten Substanzen wie Amicoumacine, Bacilosarcin und Pumilacidin sind bereits bekannt dafür, von *Bacillus*-Arten produziert zu werden (Pinchuk et al. 2001, Azumi et al. 2008, Naruse et al.

1990). Bei zwei Peaks konnte mit den vorhandenen Daten keine Dereplikation durchgeführt werden.

Tabelle 10: Auflistung der Peaks aus dem Chromatogramm C des Stammes LB084, sowie deren Retentionszeiten, UV/VIS-Absorptionen, Molekülmassen und mögliche Dereplikation.

Bezeichnung	Retentionszeit (min)	UV-Absorption (nm)	Masse m/z [M] ⁺	Dereplikation der Substanzen/Peaks
Peak 1	2,12	247, 314	423	Amicoumacin A
Peak 2	2,20	247, 314	424	Amicoumacin B (AI 77-B)
Peak 3	2,29	247, 308	406	Amicoumacin C (AI 77-Ba)
Peak 4	2,33	247, 314	491	Bacilosarcin A
Peak 5	2,38	247, 314	438	k.D.
Peak 6	3,14	246, 314	389	Antibiotic AI 77-F *
Peak 7	3,64	231, 350	572	k.D. *, eventuell neu
Peak 8	6,31	224	1036	Daitocidin A ₁ ^a
Peak 9	6,41	207, 224	1050	Daitocidin B ₁ /Pumilacidin F/Pumilacidin G ^a
Peak 10	6,48	228	1064	Daitocidin A ₂ /B ₂ ^a
Peak 11	6,54	226	1064	Daitocidin A ₂ /B ₂ ^a
Peak 12	6,59	208, 224	1064	Daitocidin A ₂ /B ₂ ^a
Peak 13	6,68	226	1078	Daitocidin B ₃ ^a

^a oder andere Peptide, k.D.: keine Dereplikation, * Dereplikation durch ¹H-NMR bestätigt.

Die Dereplikation von Peak 6 und 7 erfolgte zusätzlich durch eine NMR-Analyse der in einem Großansatz isolierten Substanzen. Möglicherweise handelt es sich bei Peak 7 um eine bisher noch unbekannte Substanz, die im Rahmen anderer Arbeiten aufgeklärt wird. Die Produktion von Antibiotic AI 77-F wurde bereits in einem marinen *Bacillus*-Isolat nachgewiesen (Gerard 1997).

3.6.2 Naturstoffproduktion von *Kiloniella laminariae* (Stamm LD81)

Bei Stamm LD81 war die Analyse der Biosynthese-Gencluster negativ. Aufgrund einer vorherigen chemischen Untersuchung und anschließenden Bioaktivitätstests konnte eine Aktivität des Rohextrakts gegen *Bacillus subtilis* nachgewiesen werden. Dieser Stamm wurde als neue Gattung beschrieben (Wiese et al. 2009a). Die Kultivierung erfolgte wie in Tabelle 38 im Anhang aufgeführt. Im Screening-Ansatz wurde zuvor festgestellt, dass die Produktion von Peak 1 in MB-Medium am Besten realisiert werden kann. Die anschließende Extraktion erfolgte zu vier verschiedenen Kultivierungszeitpunkten. Die Extraktion erfolgte wie in Kapitel 2.11.5 beschrieben.

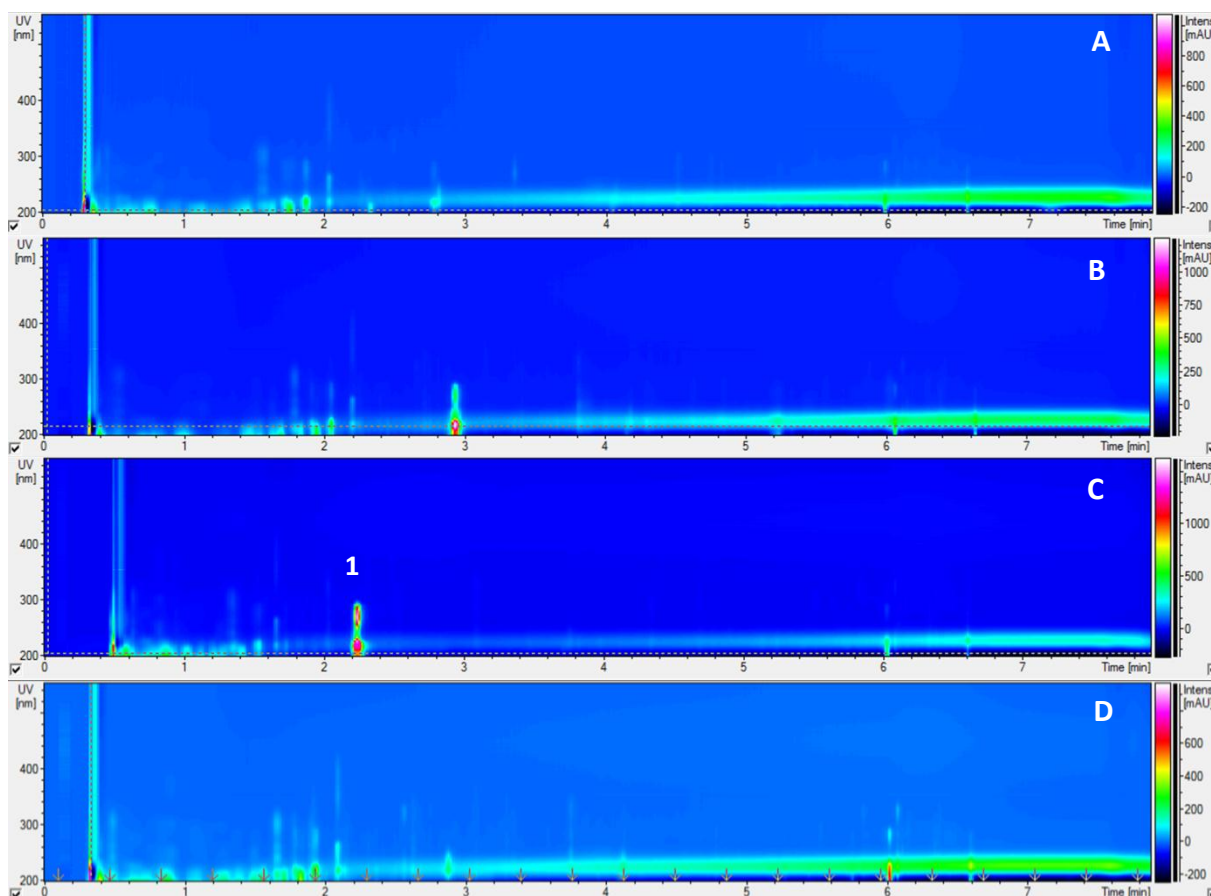


Abbildung 18: DAD-Chromatogramme von Extrakten von Stamm LD81 nach einer Kultivierung in 1 L MB Medium. Die Kultivierungsdauer betrug A: 2 Tage, B: 6 Tage, C: 7 Tage und D: 8 Tage. Peak 1 siehe Tabelle 11.

Die Produktion von Peak 1 konnte nur in Versuch C nach siebentägiger Kultivierung beobachtet werden.

Tabelle 11: Auflistung der Peaks aus dem Chromatogramm C des Stammes LD81, sowie deren Retentionszeiten, UV/VIS-Absorptionen, Molekülmassen und mögliche Dereplikation.

Bezeichnung	Retentionszeit (min)	UV-Absorption (nm)	Masse m/z [M] ⁺	Dereplikation der Substanzen/Peaks
Peak 1	2,24	214, 225, 270	212	k.D.

k.D.: keine Dereplikation.

Mit den vorhandenen Daten aus UV/VIS-Absorption und der Molekülmasse konnte keine Dereplikation von Peak 1 erfolgen. Zur Produktion von ausreichend Substanzmenge wurden Großansätze (12 L) durchgeführt, in denen weitere Substanzen in geringer Konzentration detektiert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Die anschließende NMR-Analyse von Peak 1 führte bisher zu keinem Ergebnis.

3.6.3 Stimulationsexperiment mit *Kiloniella laminariae* (Stamm LD81)

In Abbildung 19 sind die Chromatogramme der Extrakte aus der Kultivierung von *Kiloniella laminariae* Stamm LD81 in MB-Medium unter Zugabe verschiedener Substanzen, die als sekundäre Botenstoffe oder als Quorum-Sensing-Mediatoren beschrieben wurden, zur Stimulation der Sekundärmetabolit-Produktion dargestellt.

Während Peak 1 bereits in einer vorhergehenden Untersuchung nachgewiesen wurde (siehe Abbildung 18 C), erfolgte die Produktion der Peaks 2 bis 7 erstmalig in diesem Experiment.

Peak 1 trat in den Kultivierungen auf die 10 μ M Putrescin, 20 nM Homoserinlacton, 10 μ M cAMP und 20 nM cAMP enthielten. Die Peaks 2-7 wurden nur in den Kultivierungen beobachtet, die jeweils 10 μ M und 20 nM Putrescin enthielten.

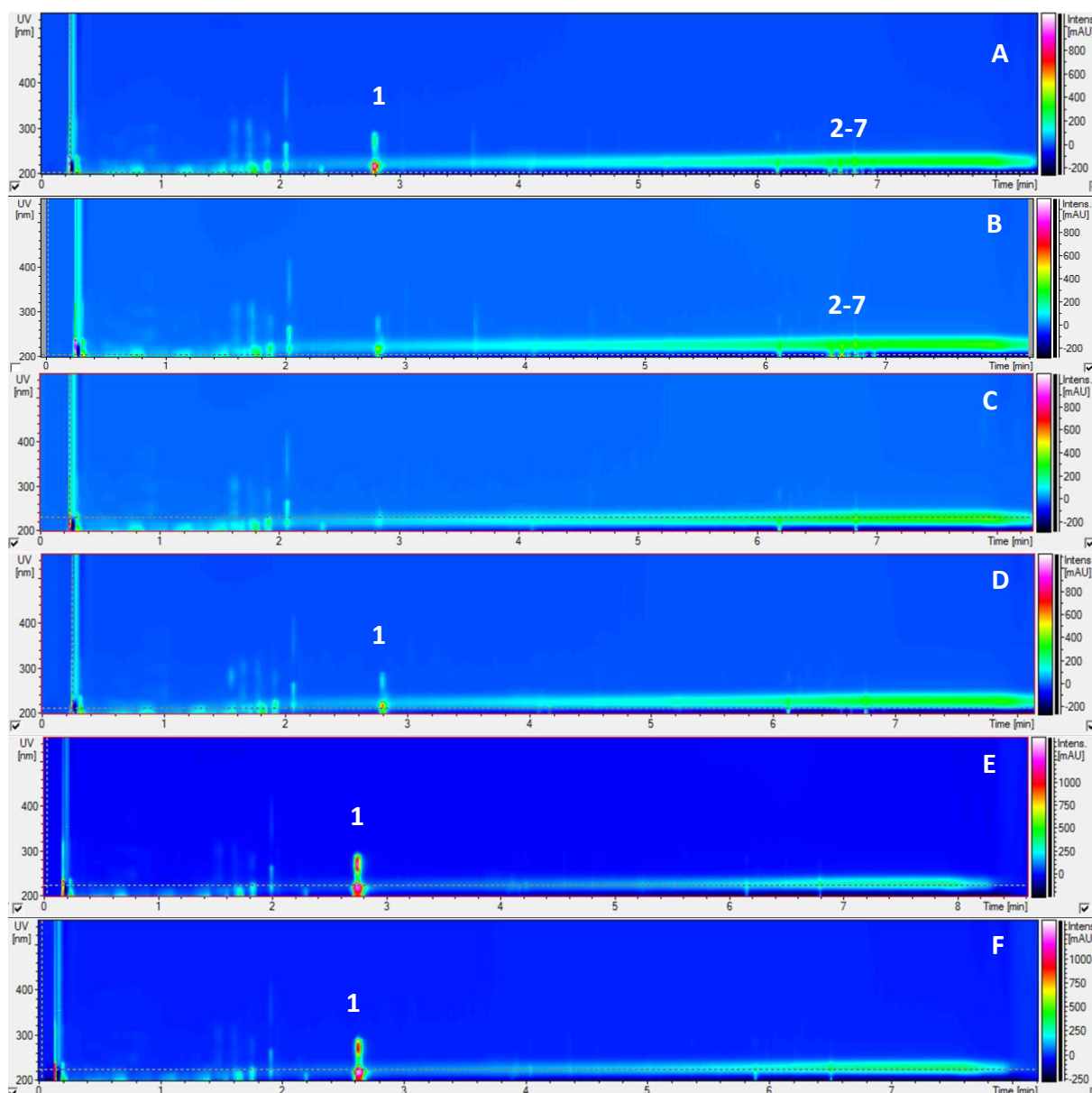


Abbildung 19: DAD-Chromatogramme von Extrakten von Stamm LD81. Die Kultivierung erfolgte für sieben Tage bei 28 °C in MB Medium mit A: 10 µM Putrescin, B: 20 nM Putrescin, C: 10 µM Homoserinlacton, D: 20 nM Homoserinlacton, E: 10 µM cAMP, F: 20 nM cAMP. Peak 1-7 siehe Tabelle 12.

Es konnten weder die Masse, noch das UV-Spektrum der jeweiligen Metabolite von Peak 2-7 ermittelt werden, so dass keine Dereplikation erfolgen konnte (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Auflistung der Peaks des Stammes LD81 aus der Extraktion der 25 mL Kultur mit (Putrescin 10µM), sowie deren Retentionszeiten, UV/VIS-Absorptionen, Molekülmassen und mögliche Dereplikation.

Bezeichnung	Retentionszeit (min)	UV-Absorption (nm)	Masse m/z [M] ⁺	Dereplikation der Substanzen/Peaks
Peak 1	2,80	214, 225, 270	212	k.D.
Peak 2	6,56	ü	n.i.	k.D.
Peak 3	6,64	ü	n.i.	k.D.
Peak 4	6,69	ü	n.i.	k.D.
Peak 5	6,75	ü	n.i.	k.D.
Peak 6	6,83	ü	n.i.	k.D.
Peak 7	6,91	ü	n.i.	k.D.

n.i.: Unbekannte Substanz, die im UV/VIS absorbiert, aber in der ESI-MS nicht ionisiert und detektiert werden kann, k.D.: keine Dereplikation ü: UV-Spektrum überlagert.

3.6.4 Naturstoffproduktion von *Pseudoalteromonas* sp. (Stamm LB034)

Stamm LB034 wurde aufgrund seiner nahen Verwandtschaft zu *Pseudoalteromonas tunicata* ausgewählt. *P. tunicata* ist ein erfolgreicher Besiedler mariner Oberflächen, was in erster Linie auf die Produktion einer Vielzahl biologisch aktiver Substanzen zurückzuführen ist (Thomas et al. 2008). Dem Großansatz vorausgehend konnte im Screeningansatz gezeigt werden, dass eine Extraktion nach sieben Tagen zur Substanzisolation geeignet ist. Die Kultivierung erfolgte wie in Tabelle 38 im Anhang beschrieben und die Extraktion erfolgte wie in Kapitel 2.11.5 beschrieben.

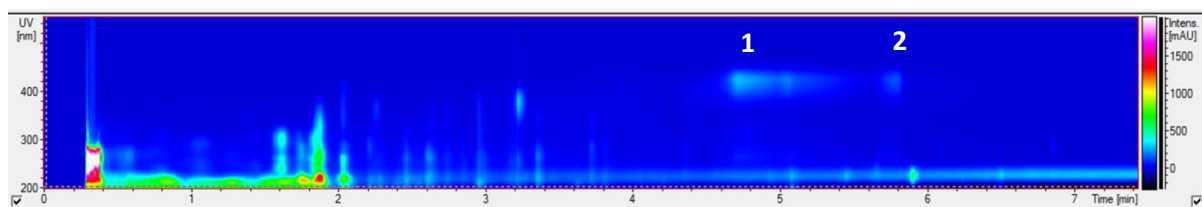


Abbildung 20: DAD-Chromatogramm eines Extraktes einer 11 L Kultur des *Pseudoalteromonas* Isolates LB034 nach einer Kultivierungsdauer von sieben Tagen in MB Medium. Peak 1 und 2 siehe Tabelle 13.

Bei Stamm LB034 traten mehrere Peaks im Chromatogramm auf. Zwei Substanzen konnten isoliert werden (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Auflistung der Peaks des Stammes LB034, sowie deren Retentionszeiten, UV/VIS-Absorptionen, Molekülmassen und mögliche Dereplikation.

Bezeichnung	Retentionszeit (min)	UV-Absorption (nm)	Masse m/z [M] ⁺	Dereplikation der Substanzen/Peaks
Peak 1	4,61-5,5,41	262, 316, 421	355	Tambjamin A Derivat 1''-N-(3Z-Dodecenylyl) *
Peak 2	5,70-5,82	262, 316, 421	353	Derivat von Tambjamin A Derivat 1''-N-(3Z-Dodecenylyl)

*: Dereplikation durch ¹H-NMR bestätigt.

Die Dereplikation von Peak 1 und Peak 2 beruht neben der Daten bestehen aus UV/VIS-Absorption und Molekülmasse auch auf Daten der jeweiligen ¹H-NMR-Spektren. Das Derivat 1''-N-(3Z-Dodecenylyl) von Tambjamin A wurde bereits zuvor von *P. tunicata* isoliert (Franks et al. 2005). Aufgrund der gleichen UV-Absorption und sehr ähnlichen Molekülmasse handelt es sich bei Peak 2 möglicherweise um ein Derivat von dem Tambjamin A Derivat. Peak 2 könnte eine zusätzliche Doppelbindung aufweisen, was die Molekülmasse von 353 erklären könnte.

3.6.5 Naturstoffproduktion von *Streptomyces* sp. (Stamm LB058)

Bei Stamm LB058 war die Analyse der Biosynthese-Gencluster jeweils positiv. Aufgrund einer vorherigen chemischen Untersuchung und anschließenden Bioaktivitätstests konnte eine Aktivität des Rohextrakts gegen *B. subtilis*, *S. lentus* und *C. glabrata* nachgewiesen werden. Dem Großansatz vorausgehend konnte im Screeningansatz gezeigt werden, dass eine Extraktion nach drei Tagen zur Substanzisolation geeignet ist. Die Kultivierung erfolgte wie in Tabelle 38 im Anhang aufgeführt und mit anschließender Extraktion zu drei verschiedenen Kultivierungszeitpunkten. Die Extraktion erfolgte wie in Kapitel 2.11.5 beschrieben.

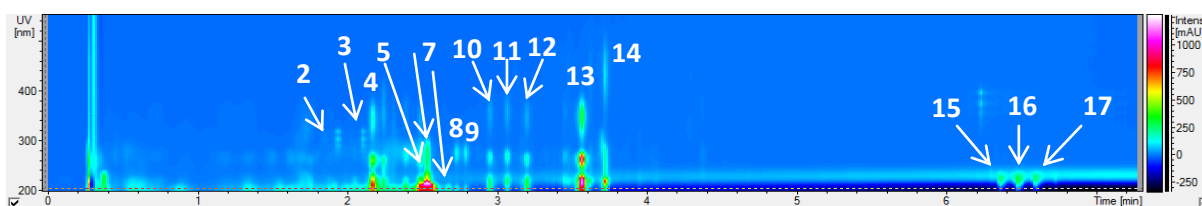


Abbildung 21: DAD-Chromatogramm eines Extraktes einer 1 L Kultur (aus Großansatz) des Isolates LB058 nach einer Kultivierungsdauer von drei Tagen in GYM4 Medium. Peak 1-17 siehe Tabelle 14.

Stamm LB058 produziert eine Vielzahl an Substanzen. Zehn Substanzen konnten mittels UV/VIS-Absorption, Molekülmasse und ¹H-NMR-Spektrum identifiziert werden (siehe Tabelle 14). Da bei drei Substanzen (Peak 15, 16 und 17) keine Ionisierung stattfand, konnten diese nicht derepliziert werden.

Tabelle 14: Auflistung der Peaks des Stammes LB058, sowie deren Retentionszeiten, UV/VIS-Absorptionen, Molekülmassen und mögliche Dereplikation.

Bezeichnung	Retentionszeit (min)	UV-Absorption (nm)	Masse m/z [M] ⁺	Dereplikation der Substanzen/Peaks
Substanz [‡]		242, 212	263	Anhydrocycloheximid *
Substanz [‡]		242, 207	263	ähnlich Anhydrocycloheximid *, Epianhydrocycloheximid
Peak 2	1,94	sh276, 290, 303, 318	244?	k.D.
Peak 3	2,11	sh276, 290, 303, 318	279?	k.D.
Peak 4	2,17	344, 261, 211	291	Actiphenol-Derivat (1''Hydroxy)
Peak 5	2,54	281, sh255, sh228, 216	281	Cycloheximid (Isocycloheximid, Naramycin B)
Peak 6	2,62	sh227, 210	281	Cycloheximid *
Peak 7	2,67	227	562? (281?)	ähnlich Cycloheximid, Masse? *(Streptomycin A, Isocycloheximid)

Bezeichnung	Retentionszeit (min)	UV-Absorption (nm)	Masse m/z [M] ⁺	Dereplikation der Substanzen/Peaks
Peak 8	2,73	200, 275	277	k.D.
Peak 9	2,80	200, 275	277	k.D.
Peak 10	2,95	354, sh275, 261, 232, sh219	291	Actiphenol-Derivat (1''Hydroxy)
Peak 11	3,07	356, 268, 221	291	Actiphenol-Derivat (1' Hydroxy)
Peak 12	3,20	347, 263, 212	291	Actiphenol-Derivat (3-Hydroxy(3,4-trans-))
Peak 13	3,57	347, 261, 225, 218	275	Actiphenol
Peak 14	3,72	435, 350, 262, 220	544	k.D. *, eventuell neu
Peak 15	6,36	223	n.i.	k.D.
Peak 16	6,47	222	n.i.	k.D.
Peak 17	6,59	224	n.i.	k.D.

n.i. Unbekannte Substanz, die im UV/VIS absorbiert, aber in der ESI-MS nicht ionisiert und detektiert werden kann, k.D.: keine Dereplikation, † Substanz im Rohextrakt nicht identifizierbar, konnte aber isoliert werden, * Dereplikation durch ¹H-NMR bestätigt, ? Masse nicht eindeutig.

Trotz vorhandener Daten aus UV/VIS-Absorption und Molekülmasse konnten 4 Peaks (2, 3, 8, 9) nicht identifiziert werden. Peak 14 konnte ebenfalls trotz zusätzlicher NMR-Analyse nicht identifiziert werden, hierbei könnte es sich um eine neue Verbindung handeln.

3.6.6 Naturstoffproduktion von *Streptomyces* sp. (Stamm LB114)

Bei Stamm LB114 war die Analyse der Biosynthese-Gencluster jeweils positiv. In einer vorhergehenden Untersuchung konnte eine Aktivität gegen *C. glabrata* festgestellt werden. Die Kultivierung erfolgte wie in Tabelle 38

im Anhang aufgeführt. Die Extraktion erfolgte wie in Kapitel 2.11.4 beschrieben.

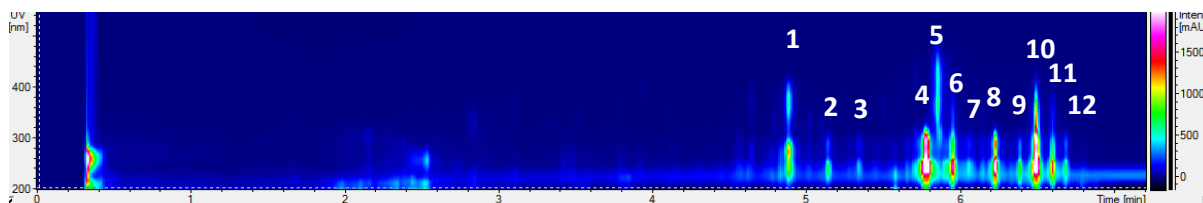


Abbildung 22: DAD-Chromatogramm eines Extraktes von einer 100 mL Kultur des Stammes LB114. Die Kultivierung erfolgte für neun Tage bei 28 °C in GYM4. Peak 1-12 siehe Tabelle 15.

Mittels HPLC-Analyse konnten mehrere Peaks des Extraktes von Stamm LB114 detektiert werden (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Auflistung der Peaks des Stammes LB114, sowie deren Retentionszeiten, UV/VIS-Absorptionen, Molekülmassen und mögliche Dereplikation.

Bezeichnung	Retentionszeit (min)	UV-Absorption (nm)	Masse m/z [M] ⁺	Dereplikation der Substanzen/Peaks
Peak 1	4,88	240, 273, 371	494	k.D.
Peak 2	5,14	240, 286	642 (620+Na)	Bafilomycin J
Peak 3	5,34	241, 285	642 (620+Na)	Bafilomycin J
Peak 4	5,78	242, 286	626 (604+Na)	Bafilomycin D [*]
Peak 5	5,86	363, 422 ^ü	n.i.	k.D.
Peak 6	5,95	244, 285, 350	837 (815+Na)	Bafilomycin B ₁ /E
Peak 7	6,05	240, 286	853	Bafilomycin A ₁ Derivat
Peak 8	6,23	244, 287	742 (720+Na)	Bafilomycin Derivat
Peak 9	6,39	244, 283	k.Z.	Bafilomycin Derivat
Peak 10	6,50	244, 287, 350	837 (815+Na)	Bafilomycin B ₁ /E
Peak 11	6,61	244, 286, 348	k.Z.	k.D.
Peak 12	6,69	244, 287	k.Z.	k.D.

n.i.: Unbekannte Substanz, die im UV/VIS absorbiert, aber in der ESI-MS nicht ionisiert und detektiert werden kann, k.D.: keine Dereplikation, k.Z.: keine Zuordnung möglich, ^ü: Substanz von einer weiteren Substanz überlagert, daher keine vollständigen UV/VIS-Daten möglich, *: NMR-Analyse: ¹H, ¹³C, HSQC, HMBC, COSY.

Peak 5 konnte nicht identifiziert werden, da dieser im ESI-MS nicht ionisiert hat. Auch Peak 1 konnte mit den Daten aus UV/VIS-Absorption und Molekülmasse nicht zugeordnet werden. Aus einem Großansatz konnte Peak 4 isoliert werden. Mit den zusätzlichen Daten der NMR-Spektroskopie konnte die Substanz als Bafilomycin D identifiziert werden. Das Bafilomycin D, und auch weitere Bafilomycine, lag als Na-Addukt vor. Das eigentliche Molekül-Ion kam, wenn überhaupt, nur in sehr geringem Maße vor. Sowohl die Bafilomycine A1 und Derivate, A2 und Derivat, B1, B2, C1, C2 (Werner et al. 1984), als auch Bafilomycin D und E (Kretchmer et al. 1985) wurden bereits zuvor von *Streptomyces*-Arten isoliert. Die folgenden Peaks (2, 3, 6, 7, 8, 9, 10) wurden auf Grund der Daten aus UV/VIS-Absorption und Molekülmasse ebenfalls als Bafilomycine identifiziert. Den Peaks 11 und 12 konnte keine eindeutige Masse zugeordnet werden und somit konnte keine Dereplikation erfolgen. Aufgrund der UV-Daten wird jedoch vermutet, dass auch diese beiden Substanzen zu den Bafilomycinen bzw. strukturell ähnlichen Verbindungen gehören. Es kürzlich wurden von Yu et al. (2011) 2 neue Bafilomycin D Derivate isoliert, welche von dem Endophyten *Streptomyces sp.* YIM56209 produziert wurden.

3.6.7 Kultivierungsexperimente von *Streptomyces sp.* (Stamm LB114)

Das Vorscreening von Stamm LB114 aus der KiWiZ-Sammlung erfolgte zunächst mit einer Kultivierung in drei verschiedenen Medien (siehe Abbildung 23) und einer Extraktion nach sieben Tagen.

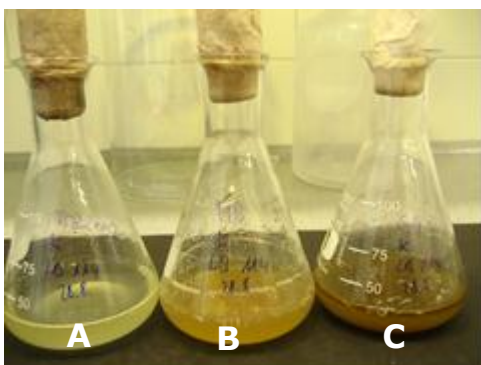


Abbildung 23: Kultivierung von Stamm LB114 für sieben Tage bei 28 °C und in drei verschiedenen Medien A: TSB, B: MB, C: GYM4.

In Abbildung 24 sind die DAD-Chromatogramme aus der HPLC-Analyse dargestellt, anhand derer der Einfluss des Mediums auf die Sekundärmetabolit-Produktion von Stamm LB114 deutlich wird.

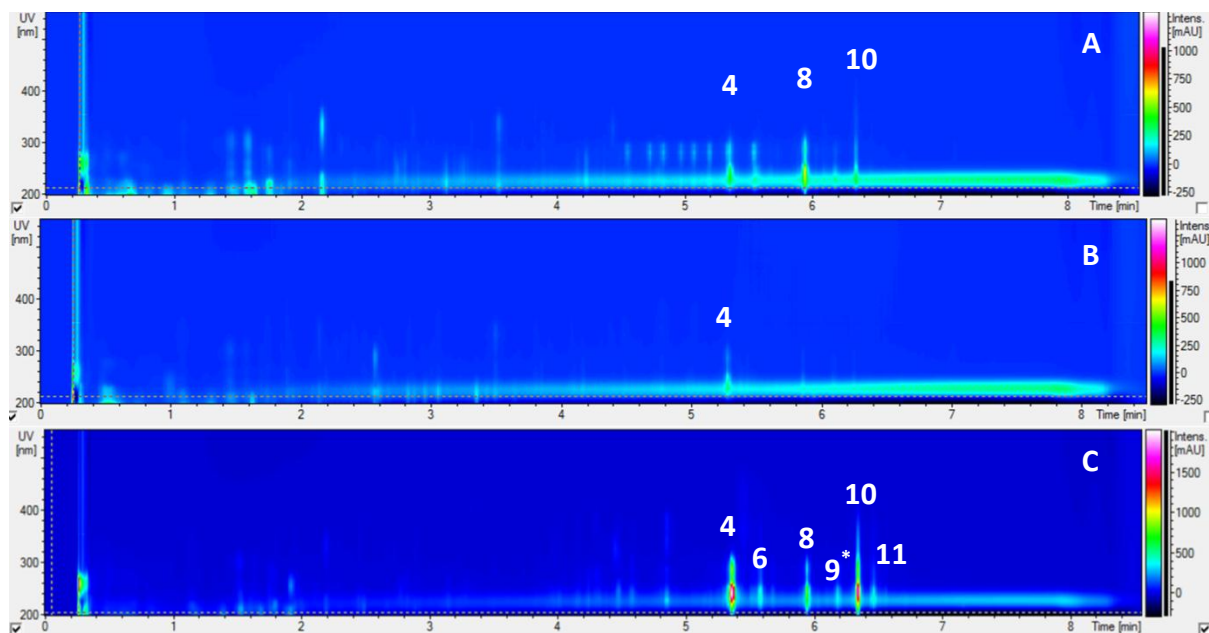


Abbildung 24: DAD-Chromatogramme von Extrakten von 25 mL Kulturen des Stammes LB114. Die Kultivierung erfolgte für sieben Tage bei 28 °C in verschiedenen Medien A: MB, B: TSB, C: GYM4. Peak 1-11 siehe Tabelle 16.

Das Sekundärmetabolitprofil aller drei Kultivierungen ist sehr unterschiedlich. In der Kultur mit TSB-Medium erfolgte die geringste Metabolitproduktion. Die Kultur mit MB-Medium enthielt viele Metabolite in geringer Konzentration, welchen keine eindeutige Masse zugeordnet werden konnte und damit keine Dereplikation durchgeführt werden konnte. Drei der produzierten Metabolite konnten auch im GYM4-Ansatz nachgewiesen werden. In der Kultur mit GYM4-Medium wurden einige Metabolite auch in größerer Konzentration nachgewiesen.

Bafilomycin D wurde in allen drei Medien produziert. Die Produktion von Peak 8 erfolgte in MB- und in GYM-Medium, ebenso wie die Produktion von Bafilomycin B₁ oder E. Die Peaks 6, 9* und 11 wurden in GYM-Medium produziert.

Tabelle 16: Auflistung der Peaks des Stammes LB114 aus der Extraktion der 25 mL Kulturen, sowie deren Retentionszeiten, UV/VIS-Absorptionen, Molekülmassen und mögliche Dereplikation.

Bezeichnung	Retentionszeit (min)	UV-Absorption (nm)	Masse m/z [M] ⁺	Dereplikation der Substanzen/Peaks
Peak 4	5,36	242, 286	626 (604+Na)	Bafilomycin D
Peak 6	5,58	244, 285, 350	837 (815+Na)	Bafilomycin B ₁ /E
Peak 8	5,95	244, 287	742 (720+Na)	Bafilomycin Derivat
Peak 9*	6,19	228, sh249, 282	k.Z.	Bafilomycin Derivat
Peak 10	6,34	244, 287, 350	837 (815+Na)	Bafilomycin B ₁ /E
Peak 11	6,47	230, sh250, 286, 348	k.Z.	k.D.

n.i.: Unbekannte Substanz, die im UV/VIS absorbiert, aber in der ESI-MS nicht ionisiert und detektiert werden kann, k.D.: keine Dereplikation, k.Z.: keine Zuordnung möglich.

3.6.8 Naturstoffproduktion von *Streptomyces* sp. (Stamm LB129)

Bei Stamm LB129 war die Analyse der Biosynthese-Gencluster jeweils positiv und es konnte eine Aktivität des Extraktes gegen *C. glabrata* festgestellt werden. Die Kultivierung erfolgte wie in Tabelle 38 im Anhang aufgeführt. Die Extraktion erfolgte wie in Kapitel 2.11.5 beschrieben.

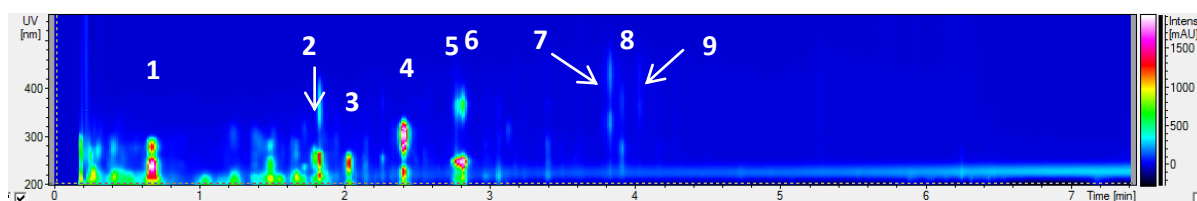


Abbildung 25: DAD-Chromatogramm eines Extraktes von einer 12 L Kultur des Stammes LB129. Die Kultivierung erfolgte für vier Tage bei 28 °C in GYM4. Peak 1-9 siehe Tabelle 17.

Bei Stamm LB129 konnten verschiedene Peaks detektiert werden (siehe Tabelle 15).

Peak 3 konnte nicht identifiziert werden, da dieser im ESI-MS nicht ionisiert hat und Peak 1 und 2 konnten keine eindeutigen Massen zugeordnet

werden. Auch Peak 4, 7, 8 und 9 konnten mit den Daten aus UV/VIS-Absorption und Molekülmasse nicht zugeordnet werden (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Auflistung der Peaks des Stammes LB129, sowie deren Retentionszeiten, UV/VIS-Absorptionen, Molekülmassen und mögliche Dereplikation.

Bezeichnung	Retentionszeit (min)	UV-Absorption (nm)	Masse m/z [M] ⁺	Dereplikation der Substanzen/Peaks
Peak 1	0,67	238, 279	k.Z.	k.D.
Peak 2	1,79	212, 256	529?	k.D.
Peak 3	2,03	206, 244	n.i.	k.D.
Peak 4	2,41	225, 305	165	k.D.
Peak 5	2,77	212, 249, 364	238	Phenazin-1-Carbonsäuremethylester
Peak 6	2,81	216, 248, 365	296	Phenazin-1,6-Dicarbonsäure-dimethylester
Peak 7	3,83	226, sh 309, 325, 338, 427	508	k.D.
Peak 8	3,91	228, 275, 371	510	k.D.
Peak 9	4,03	225, 276, 363, 427	506	k.D.

n.i.: Unbekannte Substanz, die im UV/VIS absorbiert, aber in der ESI-MS nicht ionisiert und detektiert werden kann, k.D.: keine Dereplikation, k.Z.: keine Zuordnung möglich.

Bei Peak 5 und 6 handelt es sich um Phenazin-Derivate. Neben Pseudomonaden produzieren auch *Streptomyces*-Stämme einfache hydroxyl- und carboxyl-substituierte Phenazine, sowie auch Methoxy- und Methylester Derivate (Laursen & Nielsen 2004). Zu den Produzenten dieser einfachen Phenazin-Derivate gehören z.B. *S. tanshiensis*, *S. luteoreticuli*, *S. thioluteus* und *S. lomodensis*. Die komplexeren Phenazin-Derivate, wie z.B. Aldehyde, Thioester, Ester und Amide werden von *S. griseus*, *S. gri-seoluteus*, *S. prunicolor*, *S. antibioticus*, *S. luteogriseus* und anderen produziert (Mavrodi et al. 2006).

3.6.9 Naturstoffproduktion von *Streptomyces* sp. (Stamm LB173)

Der Stamm LB173 wurde im Rahmen dieser Studie von *S. latissima* isoliert. Die Kultivierung erfolgte zu nächst als Zeitreihe (3 bis 14 Tage) in 1 L GYM4-Medium in einem 2 L-Erlenmeyerkolben mit einer Schikane bei 120 rpm.

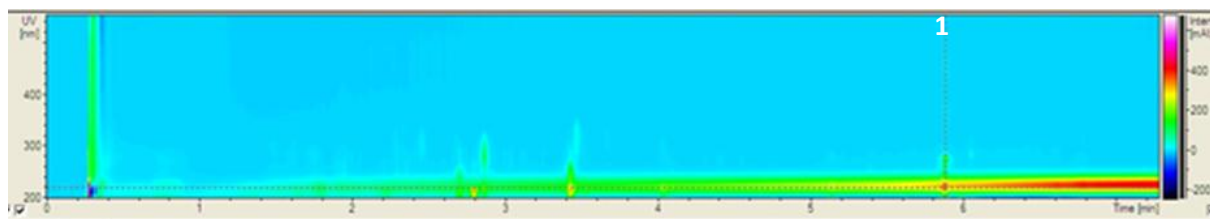
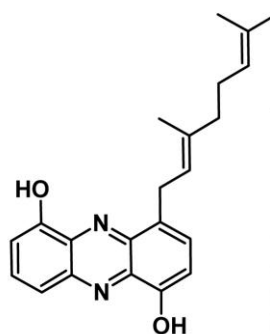


Abbildung 26: DAD-Chromatogramm eines Extraktes von einer 1 L Kultur von LB173. Die Kultivierung erfolgte für sieben Tage bei 28 °C in GYM4.

Der Extrakt von Stamm LB173 enthielt nur wenige Substanzen (siehe Abbildung 21). Ein Peak (1) zeigte allerdings ein charakteristisches UV-Spektrum (204, 273, 354, 374, und 458 nm) mit einer Masse von 348 Da. Mittels Großansatz (10 L) in einem Stärke-Pepton-Medium konnten Ohlendorf et al. (2012) 6 mg der Substanz isolieren. Mittels NMR-Analysen gelang es Ohlendorf et al. (2012) die Struktur aufzuklären und eine neue Verbindung, das Geranylphenazindiol (**10**, Abbildung 27), zu entdecken.



10

Abbildung 27: Struktur des Acetylcholinesterase-Hemmers Geranylphenazindiol (**10**).

Geranylphenazindiol hemmt mit einem IC_{50} -Wert von 2,62 μ M die Aktivität der Acetylcholinesterase (Ohlendorf et al. 2012).

3.6.10 Naturstoffproduktion von *Amycolatopsis* sp. (Stamm LB152)

Stamm LB152 war unter allen Isolaten das einzige Isolat, dessen nächster Verwandter ein *Amycolatopsis*-Stamm ist. Die Analyse der Biosynthesegencluster für war NRPS positiv und für PKS I/II negativ. In einer vorhergehenden Untersuchung konnte eine Aktivität gegen *B. subtilis* und *S. lentus* festgestellt werden. Die Kultivierung erfolgte wie in Tabelle 38 im Anhang aufgeführt. Die Extraktion erfolgte wie in Kapitel 2.11.5 beschrieben.

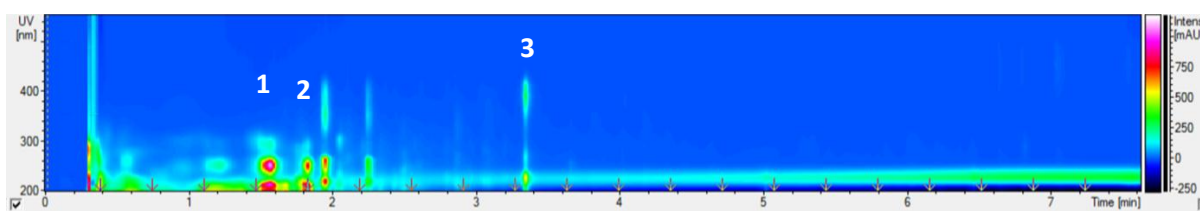


Abbildung 28: DAD-Chromatogramm eines Extraktes von einer 12 L Kultur von LB152. Die Kultivierung erfolgte für elf Tage bei 28 °C in GYM4. Peak 1-3 siehe Tabelle 18.

Der Extrakt von Stamm LB152 enthielt nur wenige Substanzen (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18: Auflistung der Peaks des Stammes LB152, sowie deren Retentionszeiten, UV/VIS-Absorptionen, Molekülmassen und mögliche Dereplikation.

Bezeichnung	Retentionszeit (min)	UV-Absorption (nm)	Masse m/z [M] ⁺	Dereplikation der Substanzen/Peaks
Peak 1	1,57	212, 250, 292	184 (464)	k.D.
Peak 2	1,83	212, 250, 289	184 (464)	k.D.
Peak 3	3,35	226, 267, 369, 388, 406	423	k.D.

k.D.: keine Dereplikation.

Peak 1, 2, und 3 konnten mit den Daten aus UV/VIS-Absorption und Molekülmasse nicht zugeordnet werden. Die isolierten Mengen aus dem Großansatz waren für eine NMR-Analyse nicht ausreichend.

3.6.11 Naturstoffproduktion von *Pseudomonas* sp. (Stamm LB012)

Bei Stamm LB012 war die Analyse der Biosynthese-Gencluster jeweils positiv. Die Kultivierung erfolgte wie in Tabelle 38 im Anhang aufgeführt. Die Extraktion erfolgte wie in Kapitel 2.11.5 beschrieben.

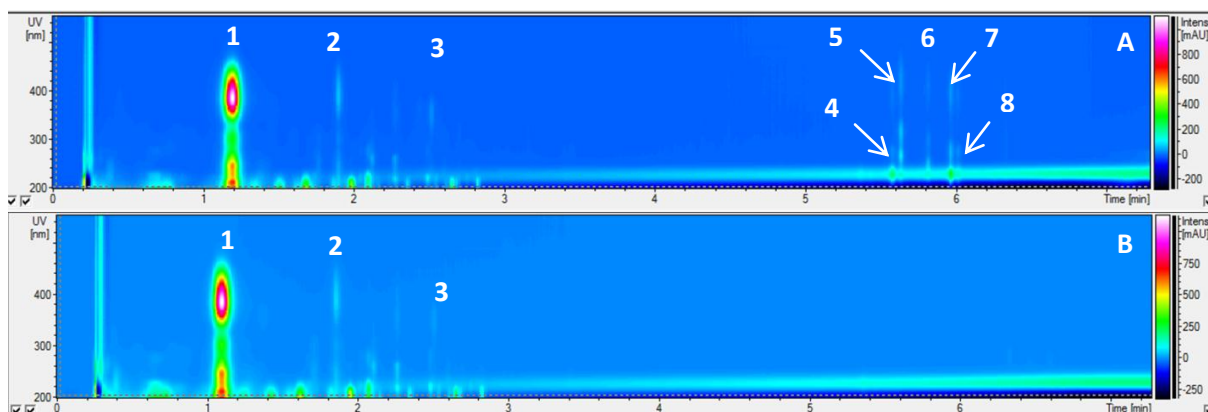


Abbildung 29: DAD-Chromatogramm eines Extraktes von einer 1L Kultur des Stammes LB012. Die Kultivierungsdauer betrug A: 2 Tage, B: 3 Tage bei 28 °C in TM Medium. Peak 1-8 siehe Tabelle 19.

Bei einer zweitägigen Kultivierung wurden bei Stamm LB012 mehr Peaks detektiert, als bei der dreitägigen Kultivierung. So wurde die Kultivierungsdauer für einen Großansatz zur Substanzisolation auf zwei Tage festgelegt.

Im Screening-Ansatz nach zweitägiger Kultivierung in TM-Medium konnten bei einer Retentionszeit zwischen 5 und 6 min 5 Peaks (Peak 4, 5, 6, 7, 8) detektiert werden, die im darauffolgenden Großansatz nicht reproduziert wurden (siehe Abbildung 30). Somit stand für eine NMR-Analyse kein Substanzmaterial zur Verfügung.

Von Peak 1 konnte genügend Substanzmenge isoliert werden, so dass eine NMR-Analyse erfolgte. Mittels ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, COSY konnte die Substanz als Holomycin identifiziert werden (siehe Tabelle 19). Peak 2, das *N*-Propionylholothin wurde nicht mittels NMR-Analyse bestätigt, da die Substanzmenge nicht ausreichend war.

Tabelle 19: Auflistung der Peaks aus dem Chromatogramm A des Stammes LB012, sowie deren Retentionszeiten, UV/VIS-Absorptionen, Molekülmassen und mögliche Dereplikation.

Bezeichnung	Retentionszeit (min)	UV-Absorption (nm)	Masse m/z [M] ⁺	Dereplikation der Substanzen/Peaks
Peak 1	1,13	245, 300, 388	214	Holomycin*
Peak 2	1,77	246, 300, 387	228	<i>N</i> -Propionylholothin
Peak 3	2,55	353	299	k.D.
Peak 4	5,56	230, 274, 388	n.i.	k.D.
Peak 5	5,62	230, 267, 315, 418	n.i.	k.D.
Peak 6	5,79	230, sh253, 295, 407	n.i.	k.D.
Peak 7	5,94	230, 274, 395	n.i.	k.D.
Peak 8	5,99	230, 275, 388	n.i.	k.D.

n.i.: Unbekannte Substanz, die im UV/VIS absorbiert, aber in der ESI-MS nicht ionisiert und detektiert werden kann, k.D.: keine Dereplikation, *: Mittels NMR (¹H, COSY, ¹³C, HSQC, HMBC) bestätigt.

Die Daten aus UV/VIS-Absorption und Molekülmasse lassen die Dereplikation allerdings als sehr wahrscheinlich anzunehmen, da *N*-Propionylholothin bereits zuvor neben Holomycin nachgewiesen werden konnte (Okamura 1977).

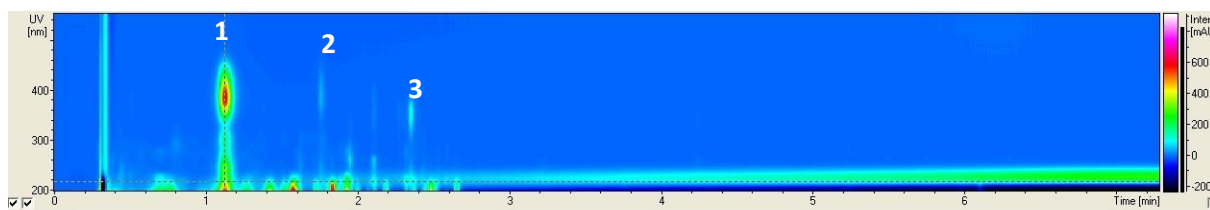


Abbildung 30: DAD-Chromatogramm eines Extraktes von einer 12 L Kultur des Stammes LB012. Die Kultivierung erfolgte für zwei Tage bei 28 °C in TM Medium. Peak 1-3 siehe Tabelle 19.

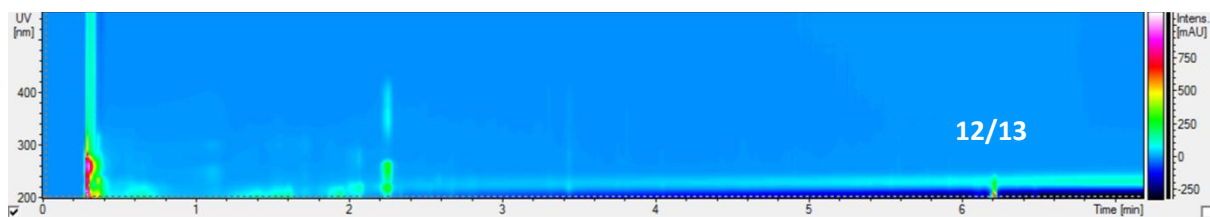


Abbildung 31: DAD-Chromatogramm eines Extraktes von einer 1 L Kultur des Stammes LB012. Die Kultivierung erfolgte für zwei Tage bei 28 °C in GYM4. Peak 12/13 siehe Tabelle 20.

Die HPLC-Analyse des Extraktes von Stamm LB012 zeigte nur wenige Peaks im DAD-Chromatogramm (siehe Abbildung 31). Im Base Peak Chromatogramm (nicht dargestellt) ließen die detektierten Massen jedoch das Vorhandensein von Peptiden vermuten (siehe Tabelle 20).

Mit Hilfe der Daten der Molekülmasse und dem Abgleich in der Datenbank wurden die Peaks als Massetolide identifiziert.

Tabelle 20: Auflistung der Peaks aus dem Chromatogramm D des Stammes LB012, sowie deren Retentionszeiten, UV/VIS-Absorptionen, Molekülmassen und mögliche Dereplikation.

Bezeichnung	Retentionszeit (min)	UV-Absorption (nm)	Masse m/z [M] ⁺	Dereplikation der Substanzen/Peaks
Peak 9	5,94	k.Z.	1112	Massetolide E/J
Peak 10, 11	6,03, 6,08	k.Z.	1126	Massetolide F/Viscosin
Peak 12, 13	6,11, 6,21	k.Z.	1140	Massetolide A/D/G/ Pseudophomin A
Peak 14, 15	6,32, 6,36	k.Z.	1154	Massetolide B/H
Peak 16	6,43	k.Z.	1124	Massetolide K
Peak 17	6,48	k.Z.	1168	Massetolide C/ Pseudo- dophomin B

k.Z.: keine Zuordnung möglich.

In der MS-Analyse treten noch weitere Massen auf, die vermutlich ebenfalls den Massetoliden zu geordnet werden können. Die chromatografische Auftrennung (Standardverfahren wie in Kapitel 2.12.1 beschrieben) war dazu aber nicht ausreichend.

3.6.12 Naturstoffproduktion von *Pseudomonas sp.* (Stamm LD120)

Die Analyse der Biosynthese-Gencluster für war NRPS positiv und für PKS I/II negativ. Ferner konnte eine Aktivität gegen *B. subtilis* und *S. lentus* festgestellt werden. Der Stamm wurde daher als chemisch interessant eingestuft. Die Kultivierung erfolgte wie in Tabelle 38 im Anhang aufgeführt. Die Extraktion erfolgte wie in Kapitel 2.11.5 beschrieben.

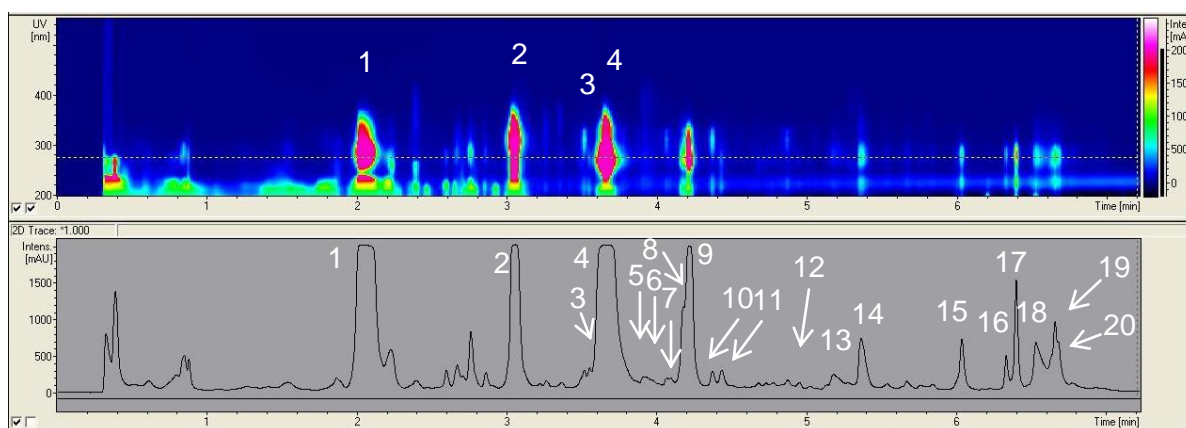


Abbildung 32: DAD-Chromatogramm eines Extraktes einer 10 L Kultur des Stammes LD120. Peak 1-20 siehe Tabelle 21.

Im Extrakt von Stamm LD120 konnte eine Vielzahl verschiedener Peaks nachgewiesen werden (siehe Tabelle 21).

Peak 1, 2 und 4 wurden in höherer Konzentration gebildet und konnten isoliert werden.

Tabelle 21: Auflistung der Peaks des Stammes LD120, sowie deren Retentionszeiten, UV/VIS-Absorptionen, Molekülmassen und mögliche Dereplikation.

Bezeichnung	Retentionszeit (min)	UV-Absorption (nm)	Masse m/z $[M]^+$	Dereplikation der Substanzen/Peaks
Peak 1	2,03	228, 286	168	Monoacetylphloroglucinol*
Peak 2	3,04	256, 310	271	Pyoluteorin*
Peak 3	3,51	215, 298, 311, 325	613	Rhizoxin S1
Peak 4	3,66	270, 327	210	2,4-Diacetylphloroglucinol*
Peak 5	3,77	ü	597	Rhizoxin D3

Bezeichnung	Retentionszeit (min)	UV-Absorption (nm)	Masse m/z [M] ⁺	Dereplikation der Substanzen/Peaks
Peak 6	3,86	ü	579	Rhizoxin D1 (WF 1360 C)
Peak 7	4,06	222, 298, 311, 325	595	WF 1360 B
Peak 8	4,18	ü	627	Rhizoxin M1
Peak 9	4,21	270, ü	224	DAPG-Derivat (1-Methylether)
Peak 10	4,21	ü	627	Rhizoxin S2
Peak 11	4,37	215, sh298, 311, sh328	627	Rhizoxin Z1
Peak 12	4,87	224, 298, 311, 325	609	WF 1360 F
Peak 13	5,18	223, 281	n.i.	k.D.
Peak 14	5,36	sh213, 228, 274, 332	n.i.	k.D.
Peak 15	6,03	228, 282	319	k.D.
Peak 16	6,33	228, 282	321	k.D.
Peak 17	6,39	sh218, 230, 282	347	k.D. *, eventuell neu
Peak 18	6,53	224, 277, sh336	361	k.D.
Peak 19	6,65	228, 279, sh334 ü	349	k.D.
Peak 20	6,68	228, 280, sh331 ü	375	k.D.

n.i.: Unbekannte Substanz, die im UV/VIS absorbiert, aber in der ESI-MS nicht ionisiert und detektiert werden kann, k.D.: keine Dereplikation, ü: Substanz von einer weiteren Substanz überlagert, daher keine vollständigen UV/VIS-Daten möglich, *: ¹H-NMR vorhanden.

Diese Substanzen wurden mittels ¹H-NMR identifiziert. Es handelt sich dabei um die Substanzen Monoacetylphloroglucinol (MAPG), Pyoluteorin und 2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG).

Wie bereits in Kapitel 3.6 erwähnt, handelt es sich um Substanzen mit antibiotischer Wirkung, die von Pseudomonaden produziert werden (Maurhofer et al. 1995, Isnansetyo et al. 2003). Die Rhizoxin-Analoga (Rhizoxin S1, Rhizoxin S2, Rhizoxin D1 (WF 1360 C), Rhizoxin D3, Rhizoxin M1, Rhizoxin Z1, WF 1360 B und WF 1360 F) wurden anhand ihres charakteristischen UV-VIS-Spektrums und der Molekülmasse mittels Abgleich der Datenbanken identifiziert.

3.6.13 Kultivierungsexperimente von *Pseudomonas* sp. (Stamm LD120)

Das Vorscreening von Stamm LD120 aus der KiWiZ-Sammlung erfolgte zunächst mit einer Kultivierung in drei verschiedenen Medien und einer Extraktion nach sieben Tagen. Die Farbe der drei Kulturen resultiert nicht nur aus den verwendeten Medien, sondern ist auch auf die Produktion von Sekundärmetaboliten zurückzuführen (siehe Abbildung 33).

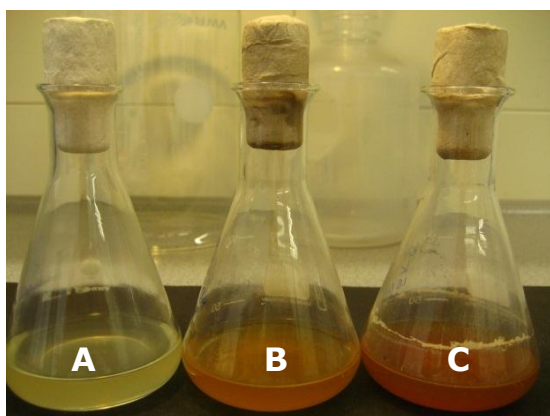


Abbildung 33: Kultivierung von Stamm LD120 für sieben Tage bei 28 °C und in drei verschiedenen Medien A: TSB, B: MB, C: GYM4.

In Abbildung 34 sind die DAD-Chromatogramme aus der HPLC-Analyse dargestellt, anhand derer der Einfluss des Mediums auf die Sekundärmetabolit-Produktion von Stamm LD120 deutlich wird.

Während sich das Sekundärmetabolitprofil von der Kultivierung in TSB- und der Kultivierung in GYM4-Medium ähneln, unterscheidet sich das Sekundärmetabolitprofil von der Kultivierung in MB-Medium stark. Die Konzentration der meisten Substanzen war in GYM4-Medium am höchsten.

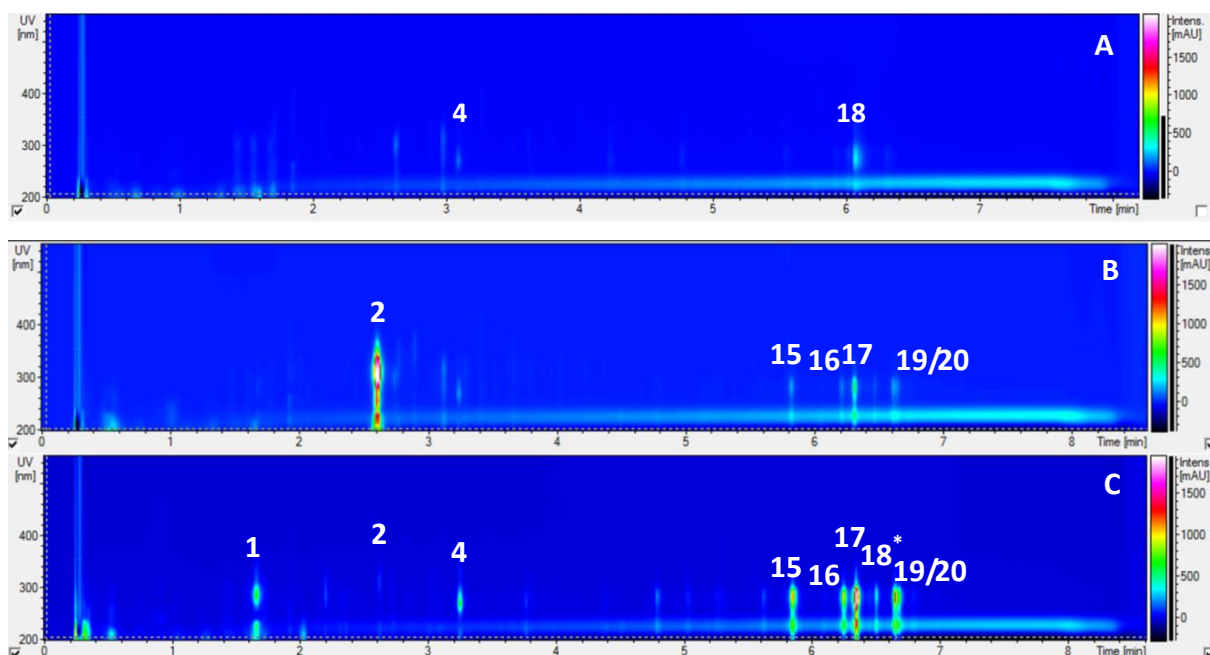


Abbildung 34: DAD-Chromatogramme von Extrakten von 25 mL Kulturen des Stammes LD120. Die Kultivierung erfolgte für sieben Tage bei 28 °C in verschiedenen Medien A: MB, B: TSB, C: GYM4. Peak 1-20 siehe Tabelle 22.

Tabelle 22: Auflistung der Peaks des Stammes LD120 aus der Extraktion der 25 mL Kulturen, sowie deren Retentionszeiten, UV/VIS-Absorptionen, Molekülmassen und mögliche Dereplikation.

Bezeichnung	Retentionszeit (min)	UV-Absorption (nm)	Masse m/z [M] ⁺	Dereplikation der Substanzen/Peaks
Peak 1	1,66	228, 286	168	Monoacetylphloroglucinol (MAPG)
Peak 2	2,61	256, 310	271	Pyoluteorin (PLT)
Peak 4	3,34	270, 327	210	2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG)
Peak 18	6,07	225, 275, sh336	n.i.	k.D.
Peak 15	5,85	sh216, 229, 282	n.i.	k.D.
Peak 16	6,25	229, 282	n.i.	k.D.
Peak 17	6,35	sh215, 231, 282	n.i.	k.D.
Peak 18*	6,50	227, 284	361	k.D.
Peak 19	6,65	229, 281	n.i.	k.D.
Peak 20	6,69	228, 282	n.i.	k.D.

n.i. Unbekannte Substanz, die im UV/VIS absorbiert, aber in der ESI-MS nicht ionisiert und detektiert werden kann, k.D.: keine Dereplikation.

Alle Substanzen sind auch aus anderen Experimenten (Stamm LB042 und LB061) dieser Dissertation bekannt.

Dass schon geringe Unterschiede in der Medienzusammensetzung einen Einfluss auf die Produktion von Sekundärmetaboliten haben, zeigen die Abbildungen 35 & 36.

Die Ausgangsfarbe der Medien vor der Kultivierung entspricht der Farbe in Kolben B. Daher deutet die unterschiedliche Färbung der Flüssigkulturen (siehe Abbildung 35) bereits auf ein divergentes Sekundärmetabolitprofil hin.



Abbildung 35: Kultivierung von Stamm LD120 nach einem Tag bei 30 °C. A: MB-Medium, B: TM-Medium.

Die DAD-Chromatogramme der jeweiligen Extrakte zeigen den Einfluss des Mediums auf die Sekundärmetabolit-Produktion von Stamm LD120 siehe Abbildung 36.

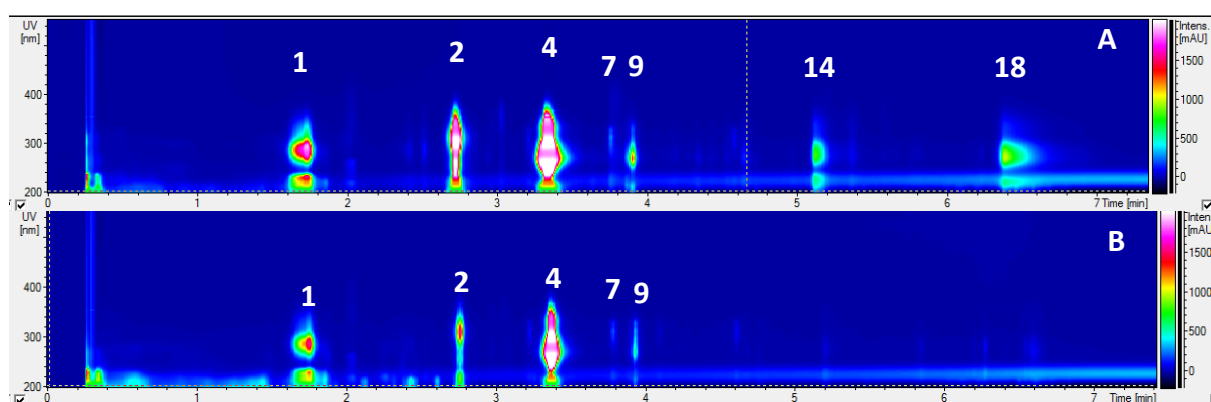


Abbildung 36: DAD-Chromatogramme von Extrakten von 100 mL Kulturen des Stammes LD120. Die Kultivierung erfolgte für einen Tag bei 30 °C in zwei verschiedenen Medien A. MB, B: TM. Peak 1-18 siehe Tabelle 23.

Das Sekundärmetabolitprofil der MB- und der TM-Kultur stimmt bis auf Peak 14 und Peak 18 überein, daher ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass eine oder beide Substanzen für die rötliche Färbung der MB-Kultur verantwortlich sein könnten.

Tabelle 23: Auflistung der Peaks des Stammes LD120 aus der Extraktion der 100 mL Kulturen, sowie deren Retentionszeiten, UV/VIS-Absorptionen, Molekülmassen und mögliche Dereplikation.

Bezeichnung	Retentionszeit (min)	UV-Absorption (nm)	Masse m/z [M] ⁺	Dereplikation der Substanzen/Peaks
Peak 1	1,74	228, 286	168	Monoacetylphloroglucinol (MAPG)
Peak 2	2,72	256, 310	271	Pyoluteorin (PLT)
Peak 4	3,33	270, 327	210	2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG)
Peak 7	3,76	222, 298, 311, 325	595	WF 1360 B
Peak 9	3,90	270, ^ü	224	DAPG-Derivat (1-Methylether)
Peak 14	5,13	sh213, 227, 276, 337	n.i.	k.D.
Peak 18	6,39	220, 272, 334	n.i.	k.D.

n.i.: Unbekannte Substanz, die im UV/VIS absorbiert, aber in der ESI-MS nicht ionisiert und detektiert werden kann, k.D.: keine Dereplikation, ^ü: UV-Spektrum überlagert.

Die gebildeten Sekundärmetabolite sind auch aus den anderen *Pseudomonas*-Extrakten bekannt (siehe Stamm LB042 und Stamm LB061).

In Abbildung 37 ist der Einfluss der Kultivierungsdauer auf die Sekundärmetabolit-Produktion von Stamm LD120 anhand der DAD-Chromatogramme der Extrakte dargestellt.

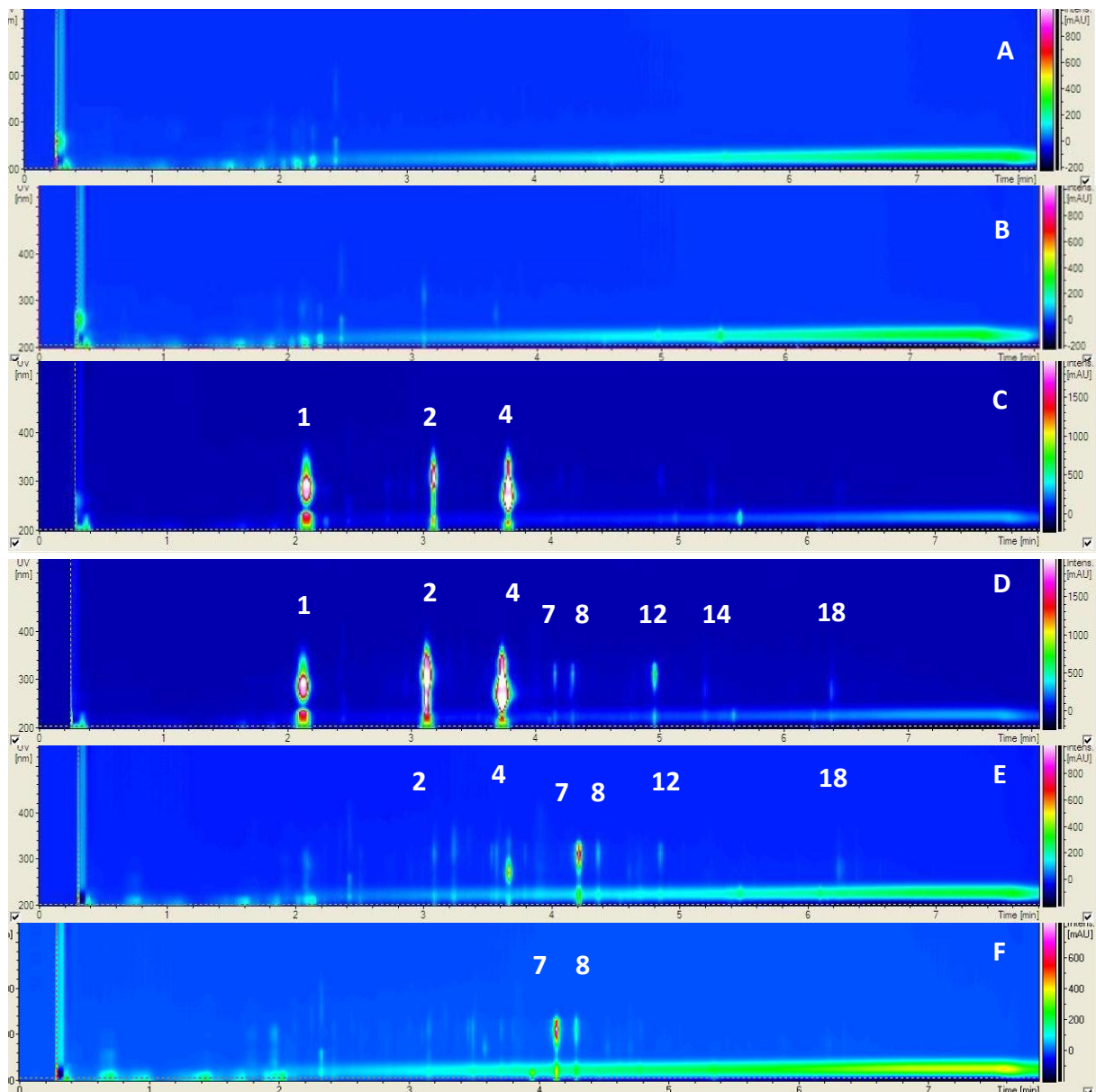


Abbildung 37: DAD-Chromatogramme von Extrakten einer 1 L MB-Kultur des Stammes LD120 zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Kultivierungsdauer betrug: A 6 Stunden, B 24 Stunden, C 30 Stunden, D 48 Stunden, E 168 Stunden, F 336 Stunden. Peak 1-18 siehe Tabelle 24.

Bei einer Temperatur von 16 °C konnten nach einer Kultivierungsdauer von sechs Stunden in MB-Medium keine Sekundärmetabolite im Kulturextrakt nachgewiesen werden. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden waren Sekundärmetabolite in sehr geringer Konzentration im Extrakt nachweisbar. Die Substanzen MAPG, PLT und DAPG konnten nach 30 stündiger Inkubationszeit in hoher Konzentration nachgewiesen werden. Die Produktion einiger Rhizoxin-Derivate konnte nach 48 stündiger Inkubation nachgewiesen werden.

Nach einer Inkubationszeit von 168 bzw. 336 Stunden waren die Metabolite PLT und DAPG nur noch in sehr geringer Konzentration vorhanden, während die Rhizoxin-Derivate WF 1360 B und Rhizoxin M1 noch in höherer Konzentration vorhanden waren.

Tabelle 24: Auflistung der Peaks des Stammes LD120 aus der Extraktion der 1 L-Zeitreihe, sowie deren Retentionszeiten, UV/VIS-Absorptionen, Molekülmassen und mögliche Dereplikation.

Bezeichnung	Retentionszeit (min)	UV-Absorption (nm)	Masse m/z [M] ⁺	Dereplikation der Substanzen/Peaks
Peak 1	2,09	228, 286	168	Monoacetylphloroglucinol (MAPG)
Peak 2	3,08	256, 310	271	Pyoluteorin (PLT)
Peak 4	3,66	270, 327	210	2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG)
Peak 7	4,16	222, 298, 311, 325	595	WF 1360 B
Peak 8	4,30	220, 298, 311, 325	627	Rhizoxin M1
Peak 12	4,96	224, 298, 311, 325	609	WF 1360 F
Peak 14	5,36	225, 275, 338	n.i.	k.D.
Peak 18	6,38	224, 275, 336	n.i.	k.D.

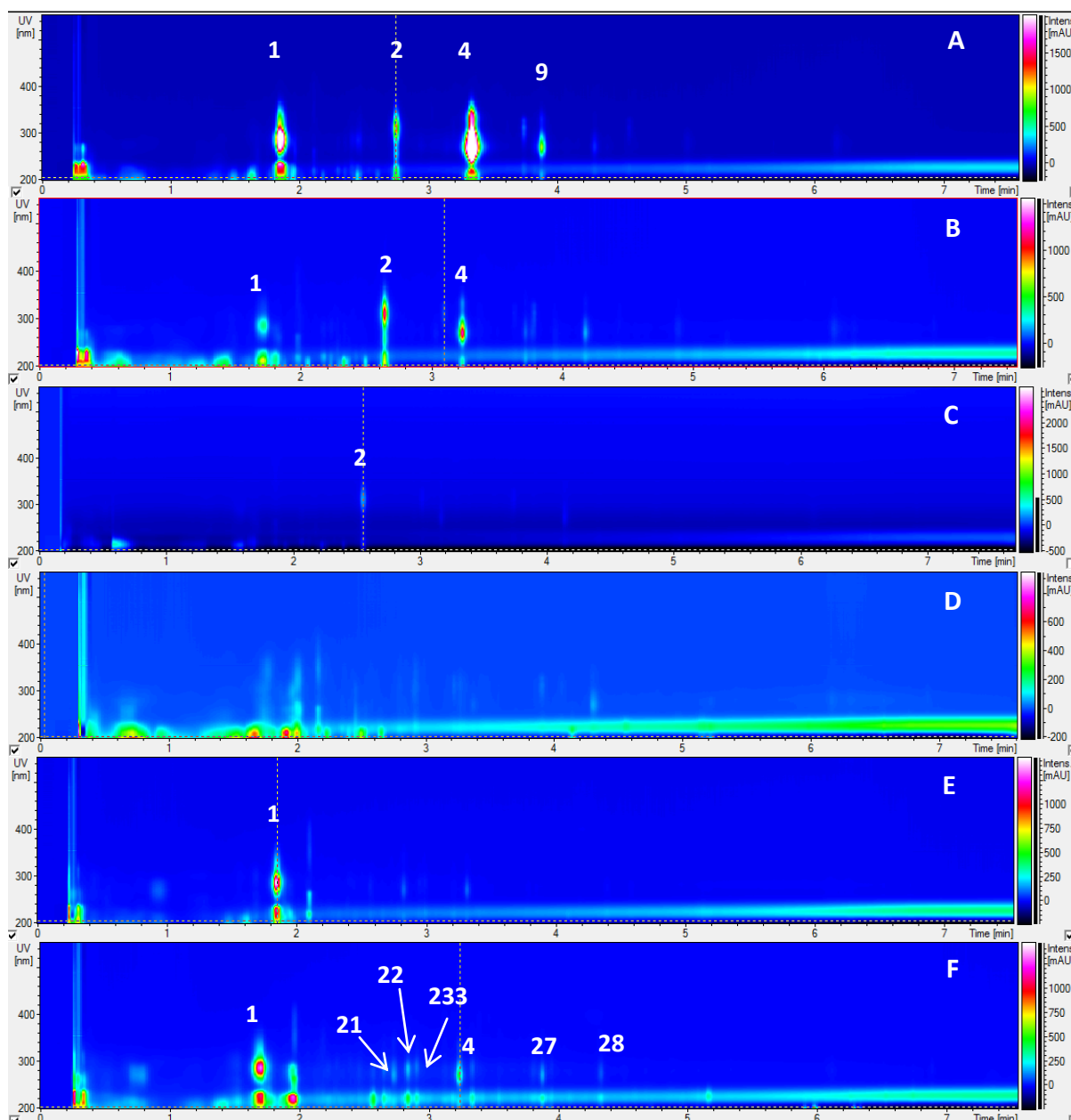
n.i. Unbekannte Substanz, die im UV/VIS absorbiert, aber in der ESI-MS nicht ionisiert und detektiert werden kann, k.D.: keine Dereplikation.

Die Untersuchung der Extrakte aus der Zeitreihe führte zu keinen bisher unbekanntem bzw. neuen Substanzen.

3.6.14 Kultivierungsexperimente von *Pseudomonas* sp. (Stamm LB042)

Die Analyse der Biosynthese-Gencluster für war NRPS positiv und für PKS I/II negativ. Des Weiteren konnte eine Aktivität gegen *B. subtilis* und *S. lentus* festgestellt werden.

Um das Sekundärmetabolitprofil von Stamm LB042 zu ermitteln, wurde eine Kultivierung in zwei verschiedenen Medien durchgeführt, welche zu unterschiedlichen Zeitpunkten extrahiert wurden. Die DAD-Chromatogramme der HPLC-Analyse sind in Abbildung 38 dargestellt.



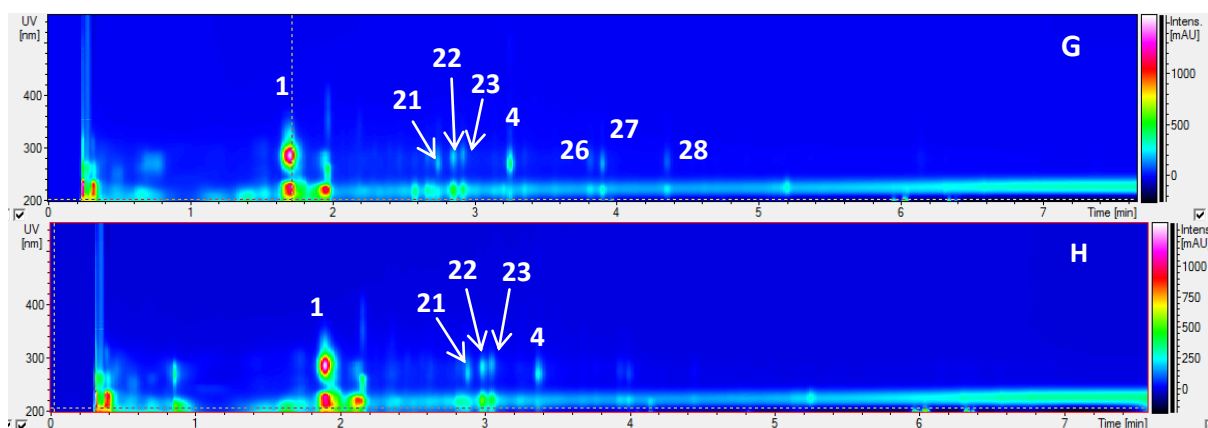


Abbildung 38: DAD-Chromatogramme von Extrakten aus 1 L Kulturen des Stammes LB042. Kultivierungsbedingungen: A: TM 1 Tag, B: TM 2 Tage, C: TM 3 Tage, D: TM 7 Tage, E: GYM 1 Tag, F: GYM 2 Tage, G: GYM 3 Tage, H: GYM 7 Tage. Peak 1-28 siehe Tabelle 25.

Bei der Kultivierung von Stamm LB042 in TM-Medium ist eine Kultivierungsdauer von einem Tag sinnvoll, um möglichst viele Substanzen in größtmöglicher Menge zu produzieren. Während die im TM-Medium gebildeten Substanzen nach drei Tagen bereits überwiegend abgebaut sind, sind im GYM-Medium viele Substanzen auch nach sieben Tagen Kultivierungsdauer noch in der anfänglichen Konzentration nachweisbar.

Bei einer Kultivierung von Stamm LB042 in GYM-Medium erscheint eine Extraktion nach zwei bis drei Tagen am sinnvollsten, da unter diesen Bedingungen die meisten Substanzen nachgewiesen wurden.

Tabelle 25: Auflistung der Peaks aus den Chromatogrammen A-H des Stammes LB042, sowie deren Retentionszeiten, UV/VIS-Absorptionen, Molekülmassen und mögliche Dereplikation.

Bezeichnung	Retentionszeit (min)	UV-Absorption (nm)	Masse m/z [M] ⁺	Dereplikation der Substanzen/Peaks
Peak 1	1,85	228, 286	168	Monoacetylphloroglucinol (MAPG)
Peak 2	2,75	256, 310	271	Pyoluteorin (PLT)
Peak 4	3,34	215, 270, 327	n.i.	2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG)
Peak 9	3,88	213, 270, 329	224	DAPG-Derivat (1-Methylether)

Bezeichnung	Retentionszeit (min)	UV-Absorption (nm)	Masse m/z [M] ⁺	Dereplikation der Substanzen/Peaks
Peak 21	2,75	216, 270, 337	n.i.	k.D.
Peak 22	2,85	221, 282	n.i.	k.D.
Peak 23	2,93	224, 288, sh339	n.i.	k.D.
Peak 26	3,82	222, 277, sh337	n.i.	k.D.
Peak 27	3,90	222, 270, 337	n.i.	k.D.
Peak 28	4,36	222, 273, 339	252	2,4,6-Triacetylphloroglucinol

n.i. Unbekannte Substanz, die im UV/VIS absorbiert, aber in der ESI-MS nicht ionisiert und detektiert werden kann, k.D.: keine Dereplikation.

Stamm LB042 produziert neben MAPG, DAPG und PLT, welche bereits von Stamm LD120 isoliert wurden, auch weitere Substanzen wie z.B. Peak 21-28 im GYM-Medium. Da die meisten Substanzen in der ESI-MS nicht ionisiert haben, konnten diese Substanzen nicht derepliziert werden. Bei Peak 28 handelt es sich wahrscheinlich um 2,4,6-Triacetylphloroglucinol, einem Phloroglucinol-Derivat. Auch bei einigen der anderen Substanzen könnte es sich um weitere Phloroglucinol-Derivate handeln.

3.6.15 Kultivierungsexperimente von *Pseudomonas* sp. (Stamm LB061)

Die Analyse der Biosynthese-Gencluster war für NRPS positiv und für PKS I/II positiv. Außerdem zeigte sich eine Aktivität gegen *B. subtilis* und *S. lentus*.

Das Vorscreening von Stamm LB061 erfolgte zunächst mit einer Kultivierung in drei verschiedenen Medien und einer Extraktion nach sieben Tagen (siehe Abbildung 39).

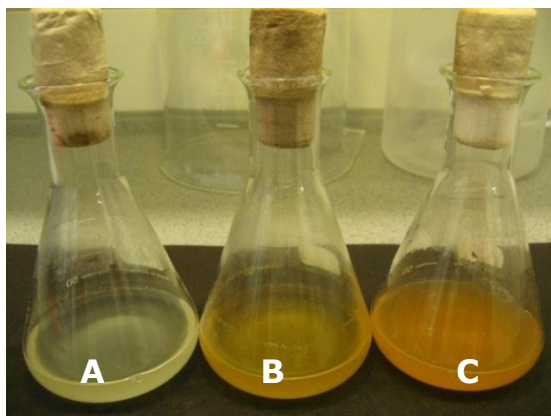


Abbildung 39: Kultivierung von Stamm LB061 für sieben Tage bei 28 °C und in drei verschiedenen Medien A: TSB, B: MB, C: GYM4.

In Abbildung 40 sind die DAD-Chromatogramme aus der HPLC-Analyse dargestellt. Anhand der Chromatogramme wird der Einfluss des Mediums auf die Sekundärmetabolit-Produktion von Stamm LB061 deutlich.

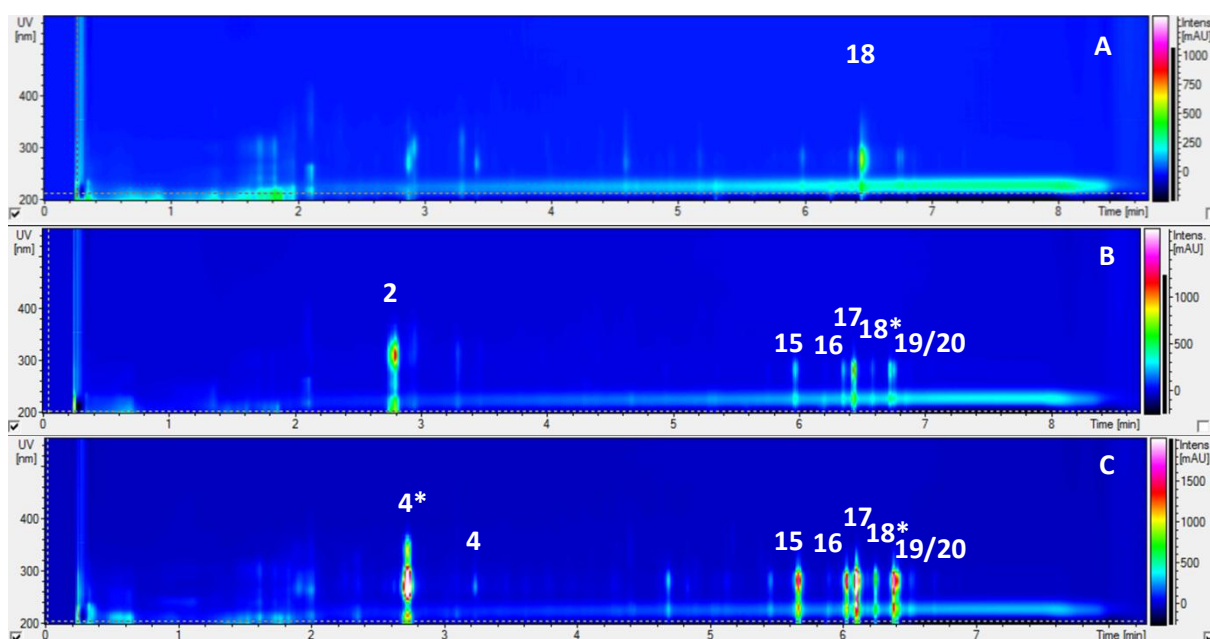


Abbildung 40: DAD-Chromatogramme von Extrakten von 25 mL Kulturen des Stammes LB061. Die Kultivierung erfolgte für sieben Tage bei 28 °C in verschiedenen Medien A: MB, B: TSB, C: GYM4. Peak 1-20 siehe Tabelle 26.

Während sich das Sekundärmetabolitprofil von der Kultivierung in TSB- und der Kultivierung in GYM4-Medium stark ähneln, unterscheidet sich das Sekundärmetabolitprofil von der Kultivierung in MB-Medium stark. Die Konzentration der produzierten Substanzen war in GYM4-Medium am höchsten.

Tabelle 26: Auflistung der Peaks des Stammes LB061 aus der Extraktion der 25 mL Kulturen, sowie deren Retentionszeiten, UV/VIS-Absorptionen, Molekülmassen und mögliche Dereplikation.

Bezeichnung	Retenti- onszeit (min)	UV-Absorption (nm)	Masse m/z [M] ⁺	Dereplikation der Sub- stanzen/Peaks
Peak 2	2,55	256, 310	271	Pyoluteorin (PLT)
Peak 4*	2,63	270, 337	154/ 222	ähnlich DAPG
Peak 4	3,15	270, 327	210	2,4-Diacetylphloro- glucinol (DAPG)
Peak 15	5,59	228, 282	319	k.D.
Peak 16	5,96	228, 282	321	k.D.
Peak 17	6,05	sh218, 230, 282	347	k.D.
Peak 18	6,12	226, 275, sh336	n.i.	k.D.
Peak 18*	6,20	228, 284	361	k.D.
Peak 19	6,34	228, 279, sh334	349	k.D.
Peak 20	6,37	228, 280, sh331	375	k.D.

n.i.: Unbekannte Substanz, die im UV/VIS absorbiert, aber in der ESI-MS nicht ionisiert und detektiert werden kann, k.D.: keine Dereplikation.

Die Peaks 15-20 und die Substanzen DAPG und PLT wurden zuvor im 10 L Großansatz des Stammes LD120 nachgewiesen.

Stamm LB061 wurde in zwei verschiedenen Medien kultiviert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten extrahiert. In Abbildung 41 sind der Einfluss von Kultivierungsdauer und Medium auf die Sekundärmetabolit-Produktion von Stamm LB061 dargestellt.

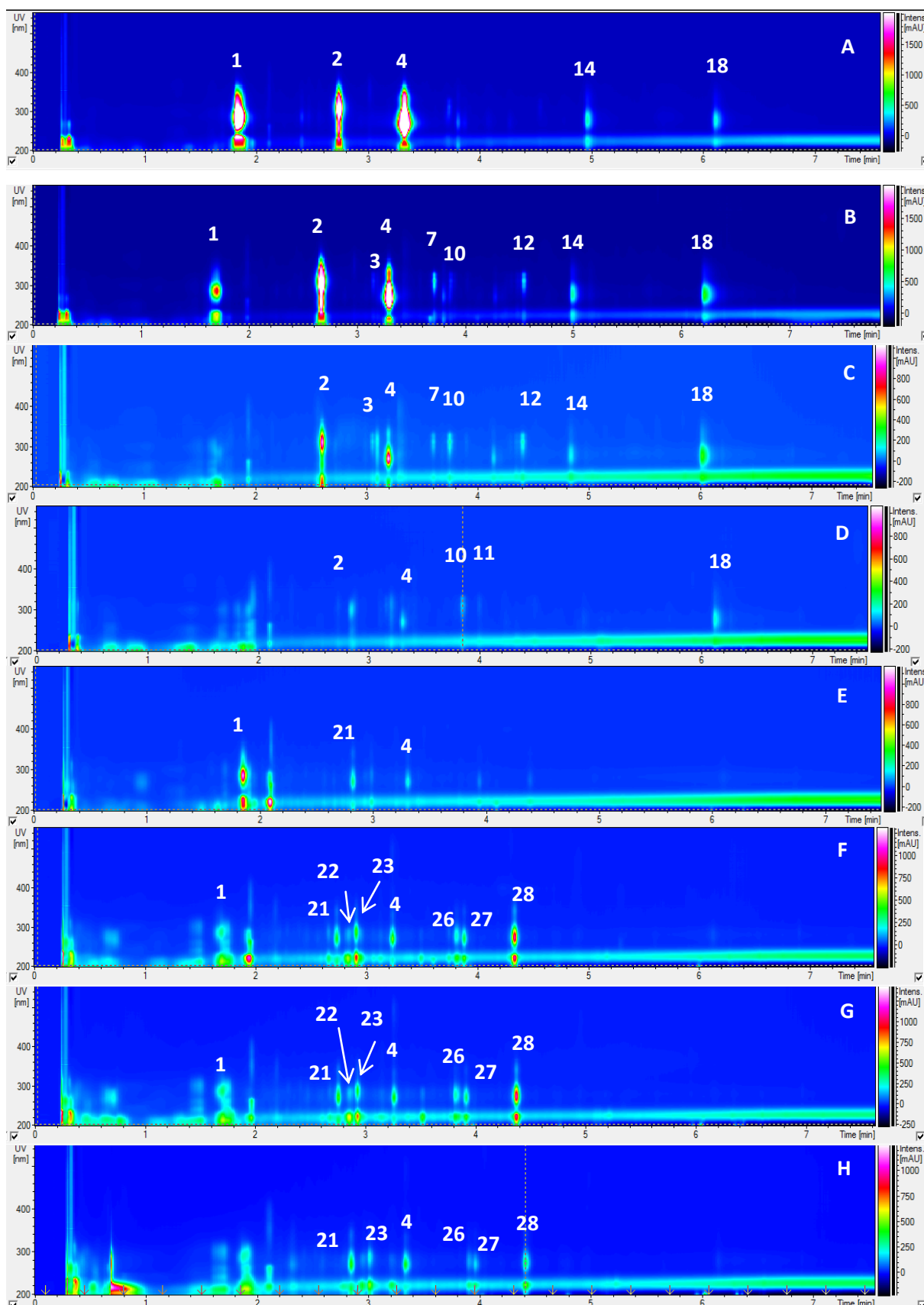


Abbildung 41: DAD-Chromatogramme von Extrakten von 1 L Kulturen des Stammes LB061. Kultivierungsbedingungen: A: MB 1 Tag, B: MB 2 Tage, C: MB 3 Tage, D: MB 7 Tage, E: GYM 1 Tag, F: GYM 2 Tage, G: GYM 3 Tage, H: GYM 7 Tage. Peak 1-28 siehe Tabelle 27.

In der Kultivierung mit MB-Medium war die Konzentration der Substanzen MAPG, PLT und DAPG nach einem Tag Kultivierungsdauer am größten. Nach zweitägiger Kultivierung wurden vermehrt Rhizoxine produziert und die Konzentration der Peaks 14 und 18 stieg an. In der Kultivierung mit GYM-Medium war die Konzentration der Substanz MAPG nach einem Tag Kultivierungsdauer am größten. Die Konzentration der Peaks 22, 23, 26, 27 und 28 war nach zwei- bzw. dreitägiger Kultivierung am größten.

Tabelle 27: Auflistung der Peaks des Stammes LB061 aus der Extraktion der 1 L Kulturen, sowie deren Retentionszeiten, UV/VIS-Absorptionen, Molekülmassen und mögliche Dereplikation.

Bezeichnung	Retentionszeit (min)	UV-Absorption (nm)	Masse m/z [M] ⁺	Dereplikation der Substanzen/Peaks
Peak 1	1,85	228, 286	168	Monoacetylphloroglucinol (MAPG)
Peak 2	2,75	256, 310	271	Pyoluteorin (PLT)
Peak 4	3,34	270, 327	210	2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG)
Peak 7	3,60	222, 298, 311, 325	595	WF 1360 B
Peak 8	3,75	222, 298, 311, 325	627	Rhizoxin M1
Peak 12	4,41	224, 298, 311, 325	609	WF 1360 F
Peak 14	4,99	sh213, 228, 274, 332	n.i.	k.D.
Peak 18	6,22	222, 275, sh336	n.i.	k.D.
Peak 21	2,73	214, 270, 337	n.i.	k.D.
Peak 22	2,83	221, 282	n.i.	k.D.
Peak 23	2,90	224, 289, sh338	n.i.	k.D.
Peak 25	3,49	222, 280	n.i.	k.D.
Peak 26	3,80	222, 277, sh337	n.i.	k.D.

Bezeichnung	Retentionszeit (min)	UV-Absorption (nm)	Masse m/z [M] ⁺	Dereplikation der Substanzen/Peaks
Peak 27	3,88	222, 270, 338	n.i.	k.D.
Peak 28	4,33	222, 273, 340	252	2,4,6-Triacetylphloroglucinol

n.i.: Unbekannte Substanz, die im UV/VIS absorbiert, aber in der ESI-MS nicht ionisiert und detektiert werden kann, k.D.: keine Dereplikation.

Das Sekundärmetabolitprofil der GYM-Kultur von Stamm LB061 stimmt vorwiegend mit dem der GYM-Kultur von Stamm LB042 überein. Es unterscheidet sich lediglich in der Konzentration der Substanzen zu den Extraktionszeitpunkten. Bis auf die Peaks 14 und 18 und die Rhizoxine gibt es auch bei den Sekundärmetabolitprofilen der MB-Kulturen von Stamm LB061 und Stamm LB042 mehrere Übereinstimmungen (Peak 1, 2, 4 und 9). Aber auch in den Extrakten der MB-Kulturen gibt es Divergenzen bezüglich der Substanzkonzentration zu den verschiedenen Extraktionszeitpunkten.

Fazit:

In dieser Arbeit hat sich gezeigt, dass sich die Produktion der Metabolite DAPG, MAPG und PLT mit den Stämmen LB061 und LD120 zuverlässig realisieren läßt. Die optimalen Bedingungen zur Metabolitproduktion sind eine Kultivierung bei 30 °C für ca. 24 bis 48 Stunden in MB-Medium.

3.6.16 Extraktion von *Pseudomonas*-Agarkulturen

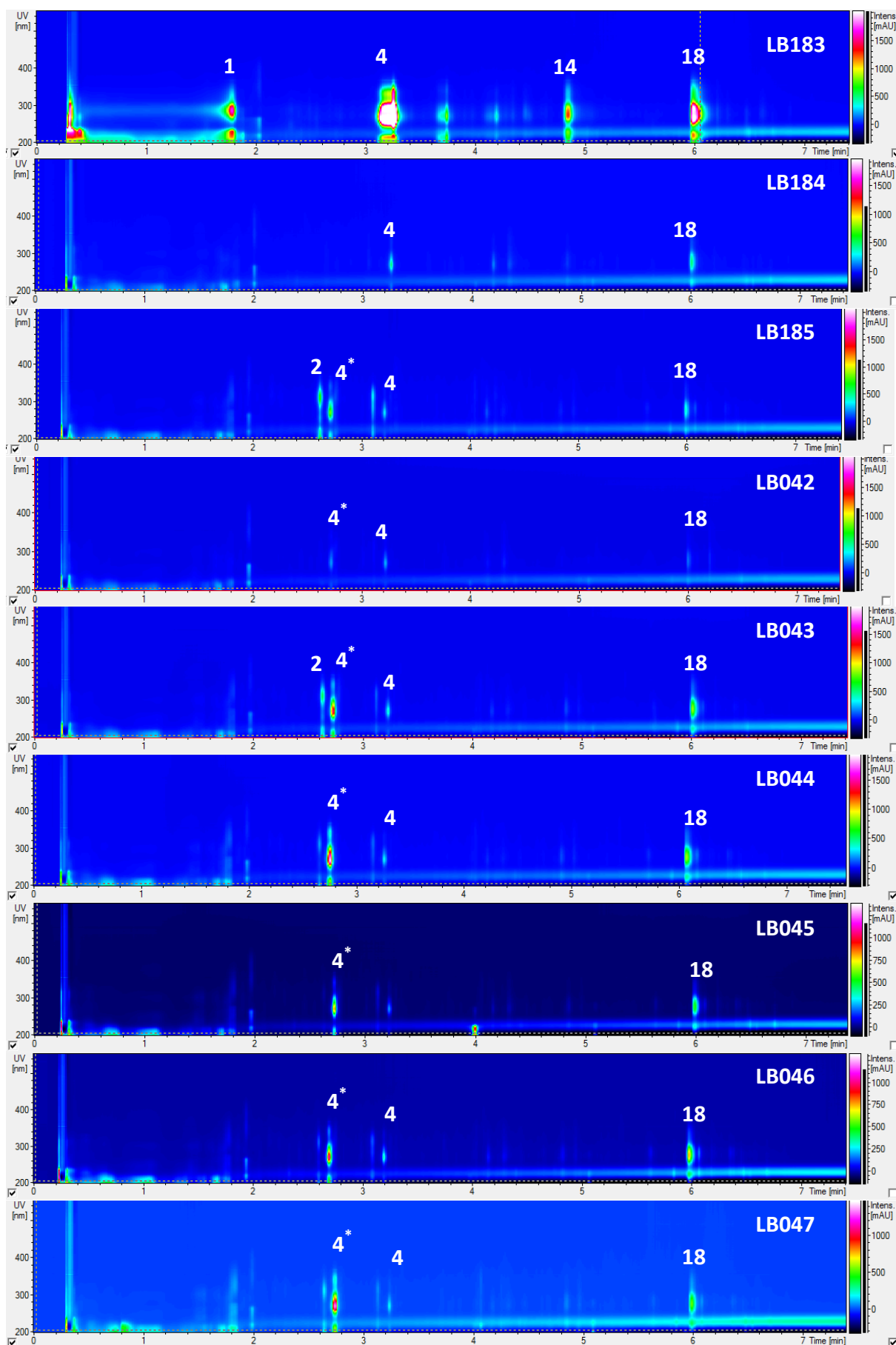
Die *Pseudomonas*-Stämme LB183, LB184 und LB185 wurden bei der Probenahme 2010 isoliert und in dieser Arbeit erstmalig untersucht. Die *Pseudomonas*-Stämme LB042, LB043, LB044, LB045, LB046, LB047, LB048, LB051, LB054, LB061, LB062 und LB063 entstammen der KiWiZ-Sammlung, so dass es über diese Stämme schon vor dieser Arbeit Informationen gab (siehe Tabelle 28).

Tabelle 28: Dargestellt sind die KiWiZ-Informationen bezüglich der Analyse der Biosynthese-Gencluster für NRPS und für PKS I/II und der antibiotischen Testung.

Stamm	PKS I/II	NRPS	Bioaktivitätstests	
LB042	-	+	<i>B.s.</i>	<i>S.l.</i>
LB043	-	k.I.	k.I.	k.I.
LB044	k.I.	+	k.I.	k.I.
LB045	-	k.I.	k.I.	k.I.
LB046	-	k.I.	k.I.	k.I.
LB047	-	k.I.	k.I.	k.I.
LB048	-	k.I.	k.I.	k.I.
LB051	-	k.I.	k.I.	k.I.
LB054	k.I.	k.I.	k.I.	k.I.
LB061	+	+	<i>B.s.</i>	<i>S.l.</i>
LB062	-	+	k.I.	k.I.
LB063	k.I.	k.I.	<i>B.s.</i>	<i>S.l.</i>

k.I.: keine Information, +: Genfragment nachgewiesen, -: kein Genfragment nachgewiesen, *B.s.*: Aktivität gegen *Bacillus subtilis* nachgewiesen, *S.l.*: Aktivität gegen *Staphylococcus lentus* nachgewiesen.

In Abbildung 42 dargestellt sind die Chromatogramme der Extrakte aus der Kultivierung der Stämme LB183, LB184, LB185, LB042, LB043, LB044, LB045, LB046, LB047, LB048, LB051, LB054, LB061, LB062 und LB063 für sieben Tage auf MB Agarplatten bei 28 °C.



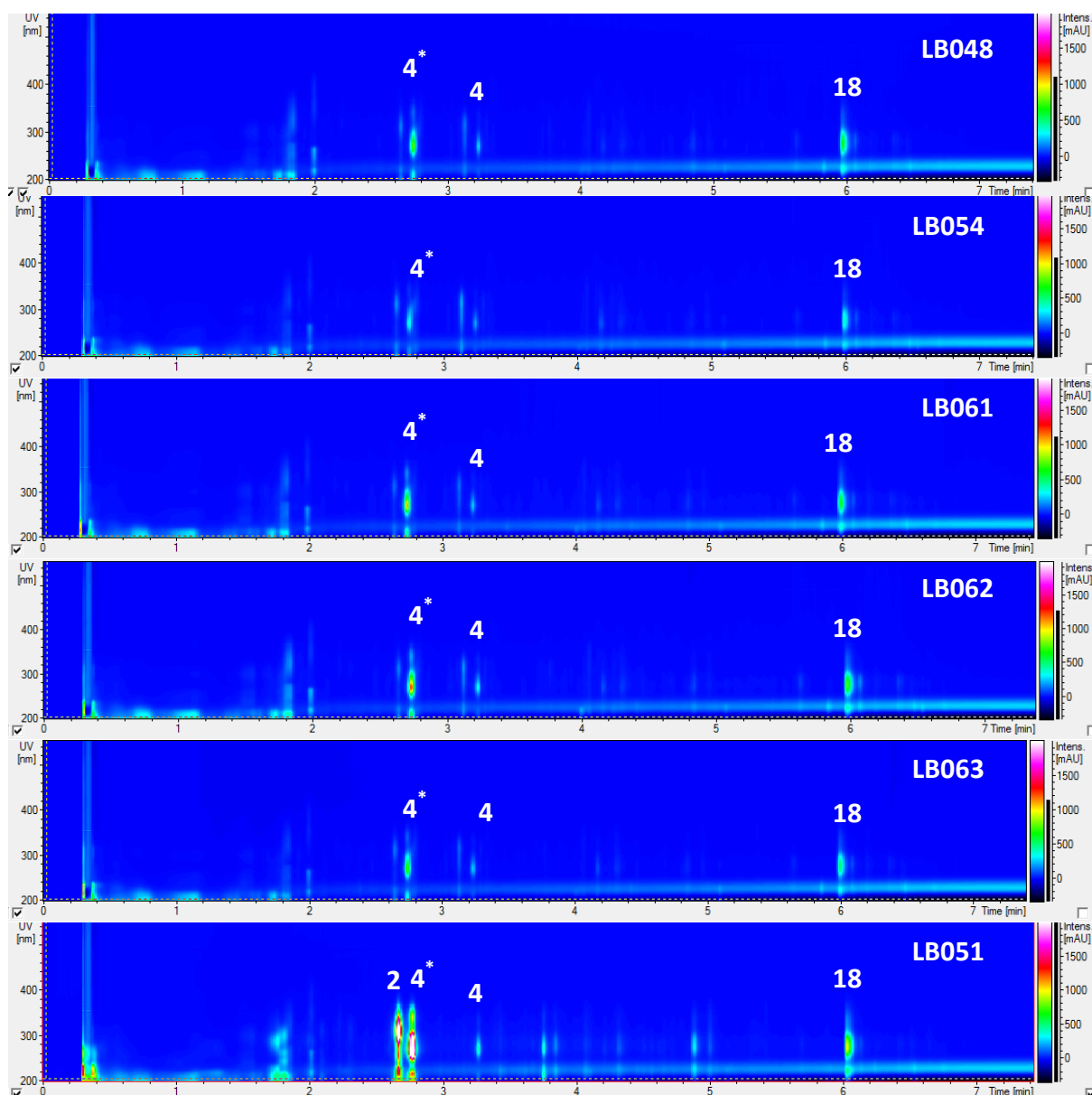


Abbildung 42: DAD-Chromatogramme von Extrakten von Platten verschiedener Stämme. Die Kultivierung erfolgte für sieben Tage auf MB Agarplatten bei 28 °C. Peak 1-18 siehe Tabelle 29.

DAPG und Peak 18 waren in allen Extrakten in unterschiedlicher Konzentration nachweisbar. MAPG ließ sich nur in dem Extrakt von Stamm LB183 eindeutig nachweisen. PLT wurde nicht bzw. nicht in ausreichender Konzentration von Stamm LB183, LB184 und LB042 produziert. Die Extrakte der Stämme LB183 und LB051 zeigten jeweils ein unterschiedliches Metabolitprofil zu denen der anderen untersuchten Stämme. Die Metabolitprofile der Extrakte der Stämme LB185, LB043, LB044, LB045, LB046, LB047,

LB048, LB054, LB061, LB062 und LB063 wiesen eine starke Ähnlichkeit zueinander auf.

Tabelle 29: Auflistung der Peaks der Stämme LB183, LB184, LB185, LB042, LB043, LB044, LB045, LB046, LB047, LB048, LB051, LB054, LB061, LB062 und LB063, sowie deren Retentionszeiten, UV/VIS-Absorptionen, Molekülmassen und mögliche Dereplikation.

Bezeichnung	Retentionszeit (min)	UV-Absorption (nm)	Masse m/z [M] ⁺	Dereplikation der Substanzen/Peaks
Peak 1	1,78	228, 286	168	Monoacetylphloroglucinol [*]
Peak 2	2,67	256, 310	271	Pyoluteorin [*]
Peak 4 [*]	2,76	270, 337	154/ 222	Ähnlich DAPG
Peak 4	3,27	270, 327	210	2,4-Diacetylphloroglucinol [*]
Peak 14	4,85	sh213, 228, 274, 332	n.i.	k.D.
Peak 18	6,03	224, 277, sh336	361	k.D.

n.i.: Unbekannte Substanz, die im UV/VIS absorbiert, aber in der ESI-MS nicht ionisiert und detektiert werden kann, k.D.: keine Dereplikation, *: Dereplikation mittels ¹H-NMR bestätigt.

Die produzierten Metabolite sind bereits aus anderen Experimenten (Kapitel 3.6.12 bis 3.6.15) bekannt. Peak 4^{*} wurde zuvor nur in der Flüssigkultivierung von Stamm LB061 in GYM-Medium nachgewiesen. Bei der Kultivierung auf Agarplatten produzierten bis auf LB183 und LB184 alle Stämme Peak 4^{*} in unterschiedlicher Konzentration.

3.7 Bioaktivitätsscreening isolierter Naturstoffe

Die isolierten Reinsubstanzen wurden gegen eine Vielzahl verschiedener Teststämme bezüglich ihrer antimikrobiellen Aktivität, sowie gegen verschiedene Zelllinien bezüglich ihrer cytotoxischen Aktivität untersucht. Des Weiteren wurden mit den Reinsubstanzen einige Enzymtests durchgeführt.

3.7.1 Biologische Aktivität der Substanzen von *Pseudomonas* sp. (Stamm LB012)

Holomycin inhibiert das Wachstum von Gram-positiven Bakterien (*S. lentus*, *B. subtilis*, *P. acnes*), Gram-negativen Bakterien (*X. campestris*) und moderat das Wachstum von Pilzen (*T. rubrum*, *P. infestans*). Gegen die Hefe *Candida glabrata* konnte keine Aktivität nachgewiesen werden (siehe Tabelle 30).

Tabelle 30: Antimikrobielle Aktivitäten der isolierten Substanzen aus Stamm LB012 angegeben als % Inhibition. Abkürzungen der Mikroorganismen: *S.l.* *Staphylococcus lentus*, *B.s.:* *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, *X.c.:* *Xanthomonas campestris*, *T.r.:* *Trichophyton rubrum*, *P.i.:* *Phytophthora infestans*, *S.tr.:* *Septoria tritici*, *P.a.:* *Propionibacterium acnes*, *C.a.:* *Candida albicans*.

Substanz	Teststamm							
	<i>S.l.</i>	<i>B.s.</i>	<i>X.c.</i>	<i>T.r.</i>	<i>P.i.</i>	<i>S.tr.</i>	<i>P.a.</i>	<i>C.a.</i>
Holomycin	99	97	100	62	62	0	84	0

Aktivitäten ≥ 80 % Inhibition sind **Fett** hervorgehoben, Aktivitäten < 80 % und ≥ 60 % Inhibition sind grau hinterlegt.

Das Holomycin wies eine starke zytotoxische Aktivität gegen die Fibroblastenzellen NIH 3T3, aber nur eine moderate Aktivität gegen die Leberkarzinomzellen HepG2 auf (siehe Tabelle 31). Holomycin zeigte keine Aktivität gegenüber den getesteten Enzyminhibitionsassays (Acetylcholinesterase, Phosphodiesterase 4, Protein-Tyrosinphosphatase 1B).

Tabelle 31: Zelllinien- und Enzymtests der isolierten Substanzen aus LB012 angegeben als % Inhibition, sowie die getesteten Konzentrationen. Abkürzungen der Assays: NIH 3T3: NIH 3T3-Zellen, HepG2: HepG2-Zellen, AChE: Acetylcholinesterase, PDE4: Phosphodiesterase 4, PTP1B: Protein-Tyrosinphosphatase 1B.

Substanz	Zellkulturassay		Enzymassay		
	NIH 3T3*	HepG2*	AChE*	PDE4*	PTP1B*
Holomycin	100	73	0	20	0

*: Konzentration der Substanz im Assay 10 µM, Aktivitäten ≥ 80 % Inhibition sind **Fett** hervorgehoben, Aktivitäten < 80 % und ≥ 60 % Inhibition sind grau hinterlegt.

3.7.2 Biologische Aktivität der Substanzen von *Pseudomonas* sp. (Stamm LD120)

Während alle fünf Substanzen (MAPG, DAPG, PLT, Peak 15 und 17) das Wachstum von *S. lentus* und *B. subtilis* hemmen, zeigte keine der Substanzen eine Aktivität gegenüber *P. aeruginosa*, *C. glabrata* und *S. epidermidis* (siehe Tabelle 32). Gegen *C. albicans* zeigten nur Peak 15 und 17 eine starke Aktivität. Eine geringe Hemmwirkung hat DAPG auf *E. coli*, *X. campestris* und *B. cinera*. Während PLT wie DAPG eine geringe Aktivität gegenüber *B. cinera* aufweist, zeigte PLT eine starke Wachstumsinhibition von *E. coli* und *X. campestris*. Für PLT konnte eine schwache Aktivität gegenüber *P. fluorescens* ermittelt werden und eine starke Aktivität gegenüber *P. syringe*, *E. amylovora*, *R. solanacearum* und *P. elyakovii*. Das Wachstum von *E. amylovora* konnte durch DAPG ebenfalls moderat inhibiert werden. Bis auf MAPG zeigten alle Substanzen eine starke Aktivität gegen *P. acnes*. Eine moderate Wachstumshemmung von *A. bacteriolytica* konnte bei MAPG nachgewiesen werden, DAPG und PLT führten dagegen zu einer starken Inhibition. Gegenüber *T. rubrum* zeigten MAPG, DAPG, Peak 15 und 17 eine starke Aktivität, während PLT das Wachstum nur gering hemmt. Gegenüber *T. mentagrophytes* konnte nur für MAPG und DAPG eine starke Wachstumsinhibition nachgewiesen werden, während gegen *S. tritici* zusätzlich Peak 15 eine starke Aktivität aufwies. Das Wachstum von *P. infestans* wird durch MAPG, DAPG, PLT und Peak 17 stark gehemmt, aber nicht durch Peak 15.

Tabelle 32: Antimikrobielle Aktivitäten der isolierten Substanzen aus Stamm LD120 (LB053). Die Inhibition ist in % angegeben. Abkürzungen der Substanzen: MAPG: Monoacetylphloroglucinol, DAPG: 2,4-Diacetylphloroglucinol, PLT: Pyoluteorin, Abkürzungen der Mikroorganismen: *S.l.*: *Staphylococcus lentus*, *B.s.*: *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, *E.c.*: *Escherichia coli* K12, *Ps.fl.*: *Pseudomonas fluorescens*, *Ps.a.*: *Pseudomonas aeruginosa*, *C.g.*: *Candida glabrata*, *Ps.s.*: *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*, *X.c.*: *Xanthomonas campestris*, *E.a.*: *Erwinia amylovora*, *R.s.*: *Ralstonia solanacearum*, *T.r.*: *Trichophyton rubrum*, *T.m.*: *Trichophyton mentagrophytes*, *P.i.*: *Phytophthora infestans*, *S.tr.*: *Septoria tritici*, *B.c.*: *Botrytis cinerea*, *P.a.*: *Propionibacterium acnes*, *C.a.*: *Candida albicans*, *S.e.*: *Staphylococcus epidermidis*, *A.b.*: *Algicola bacteriolytica*, *P.e.*: *Pseudoalteromonas elyakovii*.

Teststamm	Substanz				
	MAPG	DAPG	PLT	Peak 15	Peak 17
<i>S.l.</i>	97	98	100	93	96
<i>B.s.</i>	100	100	100	94	93
<i>E.c.</i>	31	39	93	n.b.	n.b.
<i>Ps.fl.</i>	0	0	37	n.b.	n.b.
<i>Ps.a.</i>	0	0	0	n.b.	n.b.
<i>C.g.</i>	30	29	0	n.b.	n.b.
<i>Ps.s.</i>	0	0	97	n.b.	n.b.
<i>X.c.</i>	0	46	99	0	0
<i>E.a.</i>	0	75	93	n.b.	n.b.
<i>R.s.</i>	0	0	100	n.b.	n.b.
<i>T.r.</i>	98	98	34	100	97
<i>T.m.</i>	94	93	20	n.b.	n.b.
<i>P.i.</i>	86	86	89	n.b.	97
<i>S.tr.</i>	100	100	0	100	n.b.
<i>B.c.</i>	26	40	42	n.b.	0
<i>P.a.</i>	0	99	92	100	93
<i>C.a.</i>	n.b.	n.b.	n.b.	92	89
<i>S.e.</i>	0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
<i>A.b.</i>	59	80	94	n.b.	n.b.
<i>P.e.</i>	0	0	94	n.b.	n.b.

n.b.: nicht bestimmt, Aktivitäten ≥ 80 % Inhibition sind **Fett** hervorgehoben, Aktivitäten < 80 % und ≥ 60 % Inhibition sind grau hinterlegt.

Die Substanz MAPG wirkt in sehr geringem Maße zytotoxisch gegen die Leberkarzinomzellen HepG2, aber ebenso gegen die humane Fibroblastenzelllinie NIH 3T3 (siehe Tabelle 33). Die Substanz PLT zeigt eine stärkere zytotoxische Aktivität gegen die humane Fibroblastenzelllinie NIH 3T3 als gegen die kolorektalen Adenokarzinomzelllinie HT-29. Auch Peak 17 wirkt nur in geringem Maße zytotoxisch gegen die humane Fibroblastenzelllinie NIH 3T3, aber nicht gegen eine der Krebszelllinien.

In den Enzymassays zeigte lediglich Peak 17 eine moderate Aktivität als Acetylcholinesterase-Hemmer und eine geringe Aktivität als Inhibitor des Enzyms Phosphodiesterase 4.

Tabelle 33: Zelllinien- und Enzymtests der isolierten Substanzen aus Stamm LD120 (LB053) angegeben als % Inhibition, sowie die getesteten Konzentrationen. Abkürzungen der Assays: NIH 3T3: NIH 3T3 murine Fibroblasten, HepG2: HepG2 humane Leberkrebszellen, HT-29: HT-29-Zellen, AChE: Acetylcholinesterase, PDE4: Phosphodiesterase 4, PTP1B: Protein-Tyrosinphosphatase 1B, RT Reverse Transkriptase, GSK: Glykogensynthase-Kinase-3β.

Substanz	Zellkulturassay			Enzymassay				
	NIH 3T3 [†]	HepG2 [†]	HT-29 [*]	AChE [*]	PDE4 [*]	PTP1B [*]	RT [*]	GSK [*]
MAPG	34	32	n.b.	0	0	0	n.b.	0
DAPG	0	0	n.b.	0	0	n.b.	0	0
PLT	65	n.b.	45	0	0	n.b.	0	n.b.
Peak 17	51	0	n.b.	75	53	0	0	0
Peak 15	28	0	0	n.b.	0	0	0	n.b.

n.b.: nicht bestimmt, *: Konzentration der Substanz im Assay 10 µM, †: Konzentration der Substanz im Assay 50 µM, Aktivitäten < 80 % und ≥ 60 % Inhibition sind grau hinterlegt.

3.7.3 Biologische Aktivität der Substanzen von *Streptomyces* sp. (Stamm LB058)

Eine moderate bzw. starke antimikrobielle Aktivität gegen *S. tritici* konnte jeweils bei Peak 5 und 6 nachgewiesen werden (siehe Tabelle 34). Peak 6 zeigte zusätzlich eine moderate Aktivität gegen *C. glabrata*. Das Wachstum von *B. cinera* konnten Peak 5 und 6, bei einer eingesetzten Sub-

stanzmenge von 28,1 µg, inhibieren. Peak 10 zeigte eine geringe antimikrobielle Aktivität gegen *P. infestans*.

Tabelle 34: Antimikrobielle Aktivitäten der isolierten Substanzen aus Stamm LB058 angegeben als % Inhibition. Abkürzungen der Mikroorganismen und Methoden siehe Kapitel 2.15.1: *S.l.*: *Staphylococcus lentus*, *B.s.*: *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, *E.c.*: *Escherichia coli* K12, *Ps.fl.*: *Pseudomonas fluorescens*, *Ps.a.*: *Pseudomonas aeruginosa*, *C.g.*: *Candida glabrata*, *Ps.s.*: *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*, *X.c.*: *Xanthomonas campestris*, *E.a.*: *Erwinia amylovora*, *R.s.*: *Ralstonia solanacearum*, *P.i.*: *Phytophthora infestans*, *S.tr.*: *Septoria tritici*, *B.c.*: *Botrytis cinerea*, *P.a.*: *Propionibacterium acnes*, *S.e.*: *Staphylococcus epidermidis*.

Teststamm	Substanz									
	Anhydrocycloheximid	Peak 4	Peak 5	Peak 6	Peak 7	Peak 10	Peak 11	Peak 12	Peak 13	Peak 14
<i>S.l.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B.s.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21
<i>E.c.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ps.fl.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ps.a.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C.g.</i>	0	0	0	79	0	0	0	0	0	0
<i>Ps.s.</i>	0	0	n.b.	0	0	0	0	0	0	0
<i>X.c.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E.a.</i>	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>R.s.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S.tr.</i>	0	0	73	100	0	0	0	0	0	0
<i>P.a.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S.e.</i>	0	0	0	0	0	0	n.b.	0	0	0
<i>P.i.</i>	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	56 *	n.b.	n.b.	n.b.	Nein ^b
<i>B.c.</i>	n.b.	n.b.	Ja ^a	Ja ^a	Nein ^c	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	Nein ^b

n.b.: nicht bestimmt, [†]: Konzentration der Substanz im Assay 50 µM, ^a: Testmenge 28,1 µg, ^b: Testmenge 21,8 µg, ^c: Testmenge 56,4 µg, Ja: Hemmhoff-Bildung, Nein: keine Hemmhoff-Bildung, Aktivitäten ≥ 80 % Inhibition sind Fett hervorgehoben, Aktivitäten < 80 % und ≥ 60 % Inhibition sind grau hinterlegt, Peak 4: Actiphenol-Derivat, Peak 5: Cycloheximid, Peak 6: Cycloheximid, Peak 7: ähnlich Cycloheximid, Peak 10: Actiphenol-Derivat (1''Hydroxy), Peak 11: Actiphenol-Derivat (1'Hydroxy), Peak 12: Actiphenol-Derivat (3-Hydroxy(3,4 trans-)), Peak 13: Actiphenol, Peak 14: unbekannt.

Von den getesteten Substanzen zeigt nur Peak 14 eine moderate zytotoxische Aktivität gegen die Leberkarzinomzellen HepG2 und eine geringe zytotoxische Aktivität gegen die kolorektalen Adenokarzinomzelllinie HT-29, sowie auch gegen die humanen Fibroblasten NIH 3T3 (siehe Tabelle 35). Die Substanzen Peak 5 und Peak 6, bei denen es sich wahrscheinlich um Cycloheximid handelt, wirken zwar nur in geringem Maße zytotoxisch gegen die humanen Fibroblasten NIH 3T3, aber die Zytotoxizität gegenüber den getesteten Krebszelllinien ist noch geringer. Anhydrocycloheximid, Peak 7 und Peak 10 zeigen ebenfalls eine geringe zytotoxische Wirkung gegen die Zelllinie NIH 3T3, aber keine zytotoxische Aktivität gegen die Krebszelllinien.

Keine der getesteten Substanzen zeigte eine Aktivität in den Enzymassays.

Tabelle 35: Zelllinien- und Enzymtests der isolierten Substanzen aus Stamm LB058 angegeben als % Inhibition, sowie die getesteten Konzentrationen. Abkürzungen der Assays: NIH 3T3: NIH 3T3-Zellen, HepG2: HepG2-Zellen, HT-29: HT-29-Zellen, AChE: Acetylcholinesterase, PDE4: Phosphodiesterase 4, PTP1B: Protein-Tyrosinphosphatase 1B, RT: Reverse Transkriptase, GSK: Glykogensynthase-Kinase-3β.

Substanz	Zellkulturassay			Enzymassay				
	NIH 3T3*	HepG2*	HT-29*	AChE*	PDE4*	PTP1B*	RT*	GSK*
Anhydrocycloheximid	51	24	n.b.	0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Peak4 ^a	0	17,5	0	0	0	0	0	n.b.
Peak 5 ^b	61	35	n.b.	0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Peak 6 ^c	67	39	n.b.	0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Peak 7 ^d	47	16	n.b.	0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Peak 10 ^e	44	20	n.b.	0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Peak 11 ^f	27	17,5	n.b.	31	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Peak 12 ^g	24	17,5	n.b.	0	n.b.	n.b.	n.b.	0
Peak 13 ^h	n.b.	n.b.	n.b.	27	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Substanz	Zellkulturassay				Enzymassay			
	NIH 3T3*	HepG2*	HT-29*	AChE*	PDE4*	PTP1B*	RT*	GSK*
Peak 14 ⁱ	55	79	55	0	n.b.	0	0	n.b.

n.b.: nicht bestimmt, *: Konzentration der Substanz im Assay 10 µM, Aktivitäten < 80 % und ≥ 60 % Inhibition sind grau hinterlegt, ^a Actiphenol-Derivat, ^b Cycloheximid, ^c Cycloheximid, ^d ähnlich Cycloheximid ^e Actiphenol-Derivat (1''Hydroxy), ^f Actiphenol-Derivat (1'Hydroxy), ^g Actiphenol-Derivat (3-Hydroxy(3,4 trans-)), ^h Actiphenol, ⁱ unbekannt.

3.7.4 Biologische Aktivität der Substanzen von *Streptomyces* sp. (Stamm LB114)

Das Wachstum der Teststämme *P. infestans* und *S. tritici* konnte durch Bafilomycin D stark gehemmt werden (siehe Tabelle 36). Gegenüber *S. lentus* zeigte Bafilomycin D nur eine geringe Aktivität.

Tabelle 36: Antimikrobielle Aktivitäten der isolierten Substanzen aus Stamm LB114 angegeben als % Inhibition. Abkürzungen der Mikroorganismen und Methoden siehe Kapitel 2.15.1: *S.l.*: *Staphylococcus lentus*, *B.s.*: *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, *C.g.*: *Candida glabrata*, *X.c.*: *Xanthomonas campestris*, *T.r.*: *Trichophyton rubrum*, *T.m.*: *Trichophyton mentagrophytes*, *P.i.*: *Phytophthora infestans*, *S.tr.*: *Septoria tritici*, *M.c.*: *Microsporium canis*, *P.a.*: *Propionibacterium acnes*.

Substanz	Teststamm									
	<i>S.l.</i>	<i>B.s.</i>	<i>C.g.</i>	<i>X.c.</i>	<i>T.r.</i>	<i>T.m.</i>	<i>M.c.</i>	<i>Ph.i.</i>	<i>S.tr.</i>	<i>P.a.</i>
Bafilomycin D	44	0	0	0	0	0	0	91	100	30

Aktivitäten ≥ 80 % Inhibition sind **Fett** hervorgehoben.

Bafilomycin D zeigte eine starke zytotoxische Aktivität gegen die humane Leberkrebszelllinie HepG2, allerdings trat ebenfalls eine starke zytotoxische Aktivität gegen die murine Fibroblastenzelllinie NIH 3T3 auf (siehe Tabelle 37). In den Enzymassays konnte keine Aktivität von Bafilomycin D nachgewiesen werden (siehe Tabelle 37).

Tabelle 37: Zelllinien- und Enzymtests der isolierten Substanzen aus LB114 angegeben als % Inhibition, sowie die getesteten Konzentrationen. Abkürzungen der Assays: NIH 3T3: NIH 3T3-Zellen, HepG2: HepG2-Zellen, AChE: Acetylcholinesterase, PDE4: Phosphodiesterase 4, GSK: Glykogensynthase-Kinase-3 β .

Substanz	Zellkulturassay		Enzymassay		
	NIH 3T3 [†]	HepG2 [†]	AChE*	PDE4*	GSK*
Bafilomycin D	94	99	0	0	29

*: Konzentration der Substanz im Assay 10 μ M, [†]: Konzentration der Substanz im Assay 50 μ M, Aktivitäten \geq 80 % Inhibition sind **Fett** hervorgehoben.

4 Diskussion

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse dieser Arbeit unter folgenden Gesichtspunkten diskutiert:

- Kann die Produktion neuer Sekundärmetabolite durch Veränderungen der Kultivierungsbedingungen des Stammes *Kiloniella laminiariae* LD81^T stimuliert werden?
- Welchen Einfluss haben *Pseudomonas*-Stämme auf *S. latissima*? Diskutiert wird die ökologische Rolle der Sekundärmetabolite und die Stoffwechselphysiologie des *Pseudomonas*-Stammes LD120.
- Welches Potential besitzen die ausgewählten Bakterien-Stämme im Hinblick auf die Produktion biologisch aktiver Sekundärmetabolite? Lässt sich das Sekundärmetabolitprofil durch Veränderungen der Kultivierungsbedingungen beeinflussen?
- Welche Informationen gibt es zur bakteriellen Gemeinschaft von *S. latissima*?
- Methoden zur Isolierung von Pseudomonaden

Das Ende dieses Kapitels bildet eine abschließende Diskussion mit Ausblick.

4.1 Stimulationsexperimente

In der Regel sind nur wenige der Biosynthesecluster eines Bakteriums oder Pilzes zur gleichen Zeit aktiv. Von Genomanalysen einzelner Wirkstoffproduzenten wissen wir, dass diese Organismen weit mehr Gene aufweisen, die für Enzyme des Sekundärstoffwechsels codieren, als bislang angenommen wurde (Bode & Müller 2005). Um das Potential der Mikroorganismen zur Produktion von Sekundärmetaboliten auszunutzen wird auch versucht, die Expression stiller oder kryptischer Biosynthesecluster zu induzieren. Vermutlich werden diese Biosynthesecluster in der natürlichen Umgebung nur unter bestimmten Bedingungen exprimiert und entsprechend reguliert (Pettit 2009), da Mikroorganismen in der Natur nicht allein vorkommen, sondern Teil winziger Ökosysteme sind (Knight et al.

2003). Um diese Gene auch unter Laborbedingungen anschalten zu können, werden jedoch oft spezifische Induktoren benötigt (Knight et al. 2003), wie z.B. Signalmoleküle oder Stressfaktoren (Imhoff et al. 2011). Es wurde gezeigt, dass die Zugabe von Anthranilsäure das Sekundärmetabolit-Spektrum eines marinen *Halomonas* Stammes verändern konnte, so dass die Produktion von neuen Metaboliten (Aminophenoxazinone) nachgewiesen wurde (Bitzer et al. 2006). Auch die Zugabe von zellfreien Kulturüberständen kann die Produktion antimikrobieller Substanzen steigern (Burgess et al. 1999).

Ein weiterer Ansatz, die Wirkstoffsynthese zu induzieren oder zu stimulieren ist der Versuch, das natürliche Habitat der Mikroorganismen nachzuahmen und die Kultivierungsbedingungen zu verändern. Dies kann auch die Kultivierung mit Umgebungswasser oder den Zusatz verschiedener Extrakte, wie z.B. von Schwämmen (Abdelmohsen et al. 2010) oder Algen (Goecke et al. 2010, Okazaki et al. 1975) oder die Zugabe von Nährstoffen aus der marinen Umwelt, wie Chitin oder Alginat (Rigali et al. 2008).

Für *Kiloniella laminariae* LD81^T wurden Putrescin, Homoserinlacton und cAMP als mögliche Induktoren ausgewählt.

In Bakterien ist cAMP als Signalsubstanz bekannt (Camilli und Bassler 2006). Besonders gut untersucht ist die Rolle von cAMP, welches über das Enzym Adenylatcyclase synthetisiert wird, im Zusammenhang mit der Kohlenstoff-Katabolit-Repression in *Escherichia coli* (Kolb et al. 1993). Darüber hinaus ist cAMP an der Kontrolle vieler regulatorischer und metabolischer Prozesse in Prokaryoten und Eukaryoten beteiligt (Lory et al. 2004). Die Zugabe von cAMP konnte die Produktion neuer Substanzen zwar nicht induzieren, aber es konnte nachgewiesen werden, dass die Produktion von Peak 1 (siehe Tabelle 12) unter Zugabe von cAMP deutlich höher ausfällt (siehe Abbildung 19 E, F), als bei den Ansätzen, die Putrescin oder Homoserinlacton enthielten (siehe Abbildung 19 A-D). Auch bei *Streptomyces fradiae* könnte die Zugabe von cAMP in ein nährstoffarmes Medium für die erhöhte Produktion des Antibiotikums Tylosin verantwortlich sein (Tata & Menawat 1994).

Acylierte Homoserinlactone (AHL) gehören zu den Signalmolekülen, welche meist in Gram-negativen Bakterien vorkommen (Fuqua et al. 2001, Waters & Bassler 2005). Dadurch, dass sich die AHLs sowohl in der Länge und der Sättigung der *N*-Acyl-Seitenkette als auch durch eventuelle Substitutionen am C₃-Atom (3-Oxo oder 3-Hydroxygruppe) unterscheiden, besitzen diese eine große strukturelle Vielfalt (Chhabra et al. 1993, Geisenberger 2000). Dass eine Kommunikation zwischen Bakterien stattfindet, wurde zu erst bei *Vibrio fischeri* entdeckt (Nealson et al. 1970). Für diese Art der Kommunikation wurde später der Begriff Quorum sensing eingeführt (Fuqua et al. 1994). Der Begriff Quorum sensing beschreibt die Fähigkeit von Bakterien, mittels chemischer Signalmoleküle die Zelldichte der Population messen zu können und so in Abhängigkeit von der Zelldichte bestimmte Gene zu aktivieren (Miller & Bassler 2001). Sowohl Gram-negative als auch Gram-positive Bakterien nutzen Quorum sensing zur Regulation verschiedener physiologischer Prozesse wie z.B. Virulenz, Sporulation, Beweglichkeit, Biofilmbildung und auch Antibiotikaproduktion (Eberl 1999). Die externe Zugabe von *N*-acyl-L-Homoserinlacton konnte unter den in dieser Arbeit angewandten Bedingungen keine Veränderung des Sekundärmetabolitprofils bewirken. Ursächlich hierfür könnte das Fehlen einer Seitenkette des Homoserinlactons sein. Je nach Bakterien-Art werden AHLs mit unterschiedlichen Seitenketten synthetisiert (Fuqua et al. 2001). Diese strukturellen Unterschiede können verschiedene Wirkungen auf die jeweiligen regulatorischen Proteine in Bakterien bewirken (Winson et al. 1998). So berichteten Chhabra et al. (1993), dass Homoserinlacton (ohne Acyl-Seitenkette) die Biosynthese von Carbapenem in *E. carotovora* nicht induzieren konnte. Durch weitere Homoserinlacton-Derivate könnte aber die Produktion weiterer Metabolite möglicherweise stimuliert werden.

Die dritte Substanz, die zur Stimulation weiterer Sekundärmetabolite führen sollte, war das zu den Polyaminen gehörende Putrescin. Putrescin zählt neben Jasmonsäure, Salicylsäure und weiteren Substanzen zu den Phytohormonen (Ottow 2011b), die von Pflanzenwurzeln in die Umgebung

abgegeben werden (Lugtenberg & Kamilova 2009) und auch als Osmolyt in Algen bekannt ist (Kalhoefer et al. 2011). In dieser Arbeit konnte die Produktion sechs neuer Metabolite durch die Zugabe von Putrescin zum Kulturmedium (Endkonzentration: 10 μ M bzw. 20 nM) bei *Kiloniella laminariae* LD81^T stimuliert werden.

4.2 Ökologische Bedeutung von *Pseudomonas* sp. LD120

Für terrestrische Pseudomonaden und Landpflanzen wird seit Jahren über eine mögliche mutualistische Assoziation berichtet (Weller 2007, Bakker et al. 2007). In den nächsten zwei Abschnitten wird dieses Phänomen auch für die Alge *S. latissima* und das marine Isolat *Pseudomonas* sp. LD120 diskutiert. In die Diskussion sind die Daten zur Stoffwechselphysiologie und der Sekundärmetabolite (DAPG, MAPG, PLT und den Rhizoxinen) des *Pseudomonas*-Stammes mit eingebunden.

4.2.1 Einfluss der Stoffwechselphysiologie auf *S. latissima*

Die Analyse von Stamm LD120 bezüglich der Fähigkeit, bestimmte Kohlenstoffquellen bzw. mögliche Algenbestandteile abzubauen ergab, dass Wachstum weder auf Minimalmedien stattfand, denen pulverisiertes und gefriergetrocknetes Algenmaterial zugesetzt wurde, noch auf Minimalmedien, die Alginat, ein Polysaccharid von *S. latissima* dessen Trockenanteil ca. 30-36 % beträgt (Obluchinskaya 2008), enthielten.

Auch der Speicherstoff Mannitol, der von *S. latissima* akkumuliert wird und dessen Anteil am Trockengewicht bis zu 15 % betragen kann (Obluchinskaya 2008), wurde von *Pseudomonas* sp. LD120 nicht als Substrat für das Wachstum genutzt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass intakte Zellwände der Alge nicht von diesem Bakterium angegriffen werden. Daher stehen auch Assimilationsprodukte der Alge, wie Succinat oder Glutamat (Kremer & Markham 1979), dem Bakterium nicht auf Grund bakteriellen Abbaus durch *Pseudomonas* sp. LD120 zur Verfügung. Folglich scheint *Pseudomonas* sp. LD120 keine schädliche Wirkung auf die gesunde Alge zu haben.

Man weiß allerdings, dass Makroalgen große Mengen von Aminosäuren, Zuckern und organischem Kohlenstoff in die Umgebung abgeben und somit Mikroorganismen mit Nährstoffen versorgen (Goecke et al. 2010). Diese Bestandteile werden natürlich auch auf Grund von mechanischen oder bakteriellen Zersetzungsprozessen der Algen freigesetzt (Cole 1982) und können *Pseudomonas* sp. LD120 somit als Substrat zur Verfügung stehen. Diese Theorie wird von den Ergebnissen der BIOLOG-Analyse unterstützt, aus der hervorgeht, dass *Pseudomonas* sp. LD120 eine Reihe an organischen Säuren (z.B. Bestandteile des Citratzyklus), Zucker und Aminosäuren verwerten kann. Diese Substanzen gehören auch zu den Wurzelexudaten, die von Landpflanzen sekretiert werden (Lugtenberg & Bloemberg 2004). Die Zusammensetzung und Menge der Wurzelexudate könnte die unterschiedliche mikrobielle Gemeinschaft verschiedener Pflanzen bedingen (Haas & Défago 2005). Die verschiedenen Bestandteile der Wurzelexudate wirken als chemische Lockstoffe und üben einen unterschiedlichen Einfluss auf die Chemotaxis der Bakterien aus (Lugtenberg & Kamilova 2009). Möglicherweise hat *S. latissima* ebenfalls einen Einfluss auf die Chemotaxis von *Pseudomonas* sp. LD120. Braunalgen akkumulieren eine Vielzahl von Polyphenolen mit unterschiedlichem Molekulargewicht und Phloroglucinol als Grundbaustein (Pal Singh & Bharate 2006). Diese Substanzen können bis zu 25 % des Trockengewichtes ausmachen und kommen in löslicher Form in Zellkompartimenten vor (Amsler & Fairhead 2005), in unlöslicher Form vernetzt mit der Zellwand (Koivikko et al. 2005). Polyphenole können auch sekretiert werden (Shibata et al. 2006). Zu den verschiedenen Polyphenolen gehören beispielsweise die Phlorotannine. Auf Grund ihrer antioxidativen Wirkung wird vermutet, dass die Phlorotannine Sporen und Gametophyten von Braunalgen vor UV-Schäden schützen (Steinhoff 2010). Besonders erwähnenswert ist, dass ähnlich wie bei dem bakteriellen Enzym Phloroglucinosynthase (PhID) (Achkar et al. 2005, Zha et al. 2006) auch in der Synthese des Phlorotannin Grundbausteins Phloroglucinol eine Polyketidsynthase vom Typ III in-

volviert ist und Malonyl-CoA als Starter-Substrat dient (Meslet-Cladière et al. 2013).

4.2.2 Einfluss bakterieller Sekundärmetabolite auf *S. latissima*

Um die biologische Aktivität der isolierten Naturstoffe zu ermitteln, wurde eine umfangreiche Auswahl an Teststämmen verwendet. Die Auswahl an Mikroorganismen beinhaltete zum einen Bakterien, die auf Makroalgen aus der Ostsee vorkommen (Wiese et al. 2009b), sowie algen- und pflanzenpathogene Mikroorganismen und zum anderen medizinisch relevante Stämme. Die umfassende Auswahl an Mikroorganismen sollte Hinweise für eine mögliche ökologische Funktion der Substanzen und außerdem für eventuelle biotechnologische Anwendungen geben. Die isolierten Substanzen von dem *Pseudomonas*-Isolat LD120 wiesen diverse antimikrobielle Aktivitäten gegen verschiedene Testorganismen auf (siehe Tabelle 32).

Von den Metaboliten DAPG, MAPG, PLT und den Rhizoxinen, die von *Pseudomonas*-Stämmen produziert wurden, die mit der Braunalge *S. latissima* assoziiert sind, wurde bereits gezeigt, dass diese Substanzen auch von *Pseudomonas*-Stämmen terrestrischer Pflanzen produziert werden (Brodhagen et al. 2004, Weller 2007, Loper et al. 2008).

Wurzelbesiedelnde, „plant-beneficial“ Pseudomonaden sekretieren eine Vielzahl unterschiedlicher antimikrobieller Metabolite, wie die Polyketide DAPG und PLT (Brodhagen et al. 2004, Dubuis et al. 2007). Die von den mit *S. latissima* assoziierten *Pseudomonas*-Stämmen produzierten Metabolite DAPG, MAPG, PLT und Rhizoxine, könnten ebenso chemische Mediatoren der antimikrobiellen, antimykotischen, cytotoxischen und anti-protozischen Effekte sein, die dem Schutz der Alge dienen, wie es bereits für Assoziationen terrestrischer Pseudomonaden mit ihren Wirtspflanzen gezeigt wurde (Iwasaki et al. 1984, Kiyoto et al. 1986, de Souza et al. 2003, Isnansetyo et al. 2003, Jousset et al. 2006).

Die Metabolite DAPG und PLT, die von den in dieser Arbeit untersuchten *Pseudomonas*-Stämmen produziert werden, konnten beide das Wachstum der algenpathogenen Bakterien *Algicola bacteriolytica* und *Pseudoaltero-*

monas elyakovii hemmen. Dass Epibionten in der marinen Umwelt einen Schutzmechanismus durch Ausscheiden chemischer Stoffe in das umgebende Meerwasser darstellen und somit gegen andere Mikroorganismen, möglicherweise sowohl gegen Konkurrenten, als auch gegen Krankheitserreger wirken, wurde bereits von Armstrong et al. (2001) berichtet.

Andere Untersuchungen deuten darauf hin, dass die von epiphytischen Bakterien produzierten Substanzen die Fitness ihres Algenwirtes steigern (Rao et al. 2007). Die Metabolite DAPG, MAPG, PLT und Rhizoxine könnten gegen Konkurrenten und abbauende oder andere schädliche Mikroorganismen, wie bakterielle und pilzliche Krankheitserreger von *S. latissima* wirken. Die Rhizoxine gehören zu den stark antibiotisch und antimitotisch wirksamen Substanzen und sind bekannte Verbindungen des Pilz-assoziierten Bakteriums *Burkholderia rhizoxinica* und auch von *Pseudomonas protegens* Pf-5 (Partida-Martinez & Hertweck 2005, Scherlach et al. 2006, Loper et al. 2008). Von Rhizoxinen und deren Derivaten wurde berichtet, dass sie erheblich das Wachstum des pflanzenpathogenen Pilzes *Fusarium oxysporum* hemmen. Allerdings ist Rhizoxin S2 auch die Ursache für „rice seedling blight“, daher könnte die ökologische Rolle der Rhizoxine kontext- bzw. konzentrationsabhängig sein (Brendel et al. 2007).

Aus der antimikrobiellen Testung, die in dieser Arbeit verwendet wurde, geht hervor, dass DAPG, MAPG und PLT ein breites Spektrum antimikrobieller Aktivität aufweisen. Besonders erwähnenswert ist, dass es eine starke Bioaktivität, sowohl gegen pflanzenpathogene Bakterien und Pilze, als auch gegen spezifisch algenpathogene Bakterien gab. Insbesondere PLT war sehr wirksam gegen die beiden algenpathogenen *Algicola bacteriolytica* und *Pseudoalteromonas elyakovii*. *A. bacteriolytica* ist ein marines Bakterium, welches als ursächlich für die „red spot disease“ von *Saccharina japonica* (synonym *Laminaria japonica*) gilt (Sawabe et al. 1998) und zum Ablösen der Sporophyten von deren Haftuntergrund führen kann (Yumoto et al. 1989). *P. elyakovii*, ein Alginat abbauendes Bakterium, wurde von „spot wounded“ Thalli von *S. japonica* isoliert (Sawabe et al. 2000). Beide Bakterien stehen im Verdacht, diverse Schäden an *Saccharina*-Kulturen zu

verursachen (Sawabe et al. 2000). Dazu gehört z.B. der vollständige Thallus-Abbau von Kombu (Sawabe et al. 1992). Daher wäre ein Zusammenwirken der drei Metabolite (DAPG, MAPG und PLT), als Schutzmaßnahme gegen diese pathogenen Mikroorganismen, förderlich.

Die inhibitorischen Wirksamkeiten gegen andere epiphytische Bakterien, sind von großer Bedeutung in den Mikrohabitaten auf Algenoberflächen, wo häufig eine starke Konkurrenz um einen Platz zum Besiedeln herrscht (Wahl et al. 2012). Der Wettbewerb um Lebensraum zwischen den epibiotischen Bakterien könnte, basierend auf der Produktion bioaktiver Substanzen, dem Basibionten (Wahl 1989), in diesem Fall der Alge, einen Antifoulingschutz verschaffen. Anhand der biologischen Aktivität der von den *Pseudomonas*-Stämmen produzierten Metabolite MAPG, DAPG und PLT, sowie der physiologischen Eigenschaften von Stamm LD120, läßt sich für die Alge *S. latissima* ein eher vorteilhafter Einfluss dieser assoziierten *Pseudomonas*-Stämme vermuten.

Es ist zu bedenken, dass die meisten Studien nicht mit den *in situ*-Konzentrationen durchgeführt wurden, da es sich entweder um pharmakologisch motivierte Studien handelte (Wahl et al. 2012), oder weil die Antibiotika-Konzentrationen in der natürlichen Umwelt, d.h. im Erdreich und in den Meeren größtenteils immer noch unbekannt ist (Davies 2006, Aminov 2009). Daher ist das Extrapolieren der *in vitro*-Ergebnisse auf die *in vivo*-Funktion problematisch (Clare 1996). Die im Labor ermittelten biologischen Aktivitäten können zwar Aufschlüsse liefern, müssen aber nicht zwangsläufig auch die Wirkung in der Natur widerspiegeln (Davies & Ryan 2012).

In Labortests zeigen mikrobielle Metabolite verschiedene Wirkungen. Seit dargelegt wurde, dass subinhibitorische Antibiotika-Konzentrationen subtilere Reaktionen wie z.B. die Beweglichkeit von Bakterien steigern und die Bildung eines Biofilms hervorrufen können, stellt sich die Frage, ob ihre ökologische Bedeutung darin liegt, nicht als „Waffe“ sondern eher als Signalsubstanz zu dienen (Linares et al. 2006). Dieser Aspekt sollte auch bei der Interpretation der biologischen Bedeutung der Antibiotika-Produktion,

von für Pflanzen nützlichen oder schädlichen Bakterien, berücksichtigt werden (Raaijmakers and Mazzola 2012). Da bioaktive Metabolite diese Vielzahl konzentrationsabhängiger biologischer Funktionen besitzen, könnte es entscheidend sein, die natürlich vorkommende Konzentration zu kennen, um somit auch die biologische Wirkung zu verstehen (Davies & Ryan 2012). Aufschlußreich wäre ebenso die Kenntnis über das Wechselspiel verschiedener Substanzen an einem Standort, d.h. können Wirkungen sich aufheben bzw. verstärkt werden.

4.3 Potential bakterieller Naturstoffproduzenten

Es wurde bereits wiederholt gezeigt, dass oberflächenassoziierte Bakterien an der Produktion antimikrobieller Substanzen in größerem Maße beteiligt sind, als planktonisch lebende (Burgess et al., 1999, Lemos et al., 1985, Long & Azam, 2001). Diese Einschätzung wird auf den Konkurrenzkampf um Lebensraum und Nährstoffe zwischen den besiedelnden Bakterien zurückgeführt, der wiederum zur Evolution verschiedener effektiver Strategien zur Besiedlung von Oberflächen geführt hat (Burgess et al. 1999). Im Folgenden wird das Potential zur Naturstoffproduktion der untersuchten Algen-assoziierten Bakterien erörtert.

4.3.1 *Bacillus* sp. (Stamm LB084)

Innerhalb der *Firmicutes*-Gruppe produzieren Stämme der Gattung *Bacillus* die größte Anzahl an Naturstoffen in der marinen Umwelt (Månsson 2011). Viele *Bacillus*-Arten die aus marinen Proben isoliert wurden, hat man bereits in der terrestrischen Umwelt gefunden (Gontang et al. 2007). Unter den vielen *Bacillus*-Arten wurden bisher nur Vertreter von *B.adius*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. firmus*, *B. pumilus*, *B. mycoides*, und *B. lentus* aus marinen Proben entdeckt (Ivanova et al. 1999).

Marine *Bacillus*-Arten produzieren strukturell vielfältige Sekundärmetabolite wie Lipopeptide, Polypeptide, Macrolactone, Polyketide und Isocoumarine die verschiedene biologische Aktivitäten aufweisen (Mondol et al. 2013). Das Potential zur Produktion verschiedener Naturstoffe wurde in dieser

Arbeit für Stamm LB084 untersucht, der auch eine bislang unbekannte Substanz produziert.

4.3.2 *Kiloniella laminariae* (Stamm LD81^T)

Stamm LD81 ist ein Alphaproteobakterium und wurde erstmalig aus der Braunalge *S. latissima* isoliert (Wiese et al. 2009a). Durch die geringe Ähnlichkeit seiner 16S rRNA Gensequenz zu bisher bekannten Bakterien wurde es nicht nur einer neuen Gattung *Kiloniella* zugeordnet, sondern auch eine neue Familie und Ordnung innerhalb der Alphaproteobakterien definiert (Wiese et al. 2009a).

Das Screening neuer Arten ist zwar keine Garantie für das Auffinden neuer Substanzen (Fischbach & Walsh 2009), aber die Aussicht auf Erfolg besteht. Daher wurden viele Anstrengungen unternommen, bisher unkultivierte Bakterien in Kultur zu bekommen (Clardy et al. 2006).

Unter den in dieser Arbeit verwendeten Kultivierungsbedingungen produzierte Stamm LD81 nur wenige Substanzen (Peak 2-7 siehe Tabelle 12) und bis auf Peak 1 (siehe Tabelle 11 & 12), in meist geringer Konzentration (siehe Abbildung 18 & 19).

Die Entdeckung neuer Wirkstoffe wird oft dadurch erschwert, dass Extrakte strukturell ähnliche Substanzen und Substanzen in geringer Konzentration enthalten (Li & Vederas 2009). Die Untersuchungen in Kapitel 3.6.3 zeigen, dass Stamm LD81 noch weitere Metabolite produzieren kann. Um die von Stamm LD81 produzierten Naturstoffe zu analysieren und zu charakterisieren, muss ein größeres Kulturvolumen (ca. 100 L) dieses Stammes extrahiert werden, damit genügend Substanzmenge zur weiteren Aufarbeitung zur Verfügung stünde.

4.3.3 *Pseudoalteromonas* sp. (Stamm LB034)

Die Gattung *Pseudoalteromonas* hat im letzten Jahrzehnt zunehmend an Bedeutung in der Naturstoffforschung und in der mikrobiellen Ökologie gewonnen (Bowman 2007). Die Gattung läßt sich in zwei Gruppen einteilen, die pigmentierten Arten und die nichtpigmentierten (Vynne et al.

2011). Bei pigmentierten Arten, zu denen auch Stamm LB034 mit seiner grünlichen Färbung gehört, wurden bereits eine große Anzahl an hoch- und niedermolekularen Verbindungen mit antimikrobieller Aktivität nachgewiesen (Bowman 2007). *Pseudoalteromonas tunicata* CIP 105928^T ist der nächste verwandte Typstamm zu *Pseudoalteromonas* sp. LB034. *P. tunicata* ist ein marines Bakterium, welches von verschiedenen Orten isoliert wurde, einschließlich der Oberfläche von Manteltieren (Holmström et al. 1998) und Algen (Egan et al. 2000).

P. tunicata produziert eine Reihe an Metaboliten, die antimikrobiell gegen Bakterien (James et al. 1996) und Pilze (Egan et al. 2002) wirksam sind sowie Aktivitäten gegen Algensporen (Egan et al. 2001) und Larven von marinen Wirbellosen (Holmström et al. 1992) aufweisen. Die antifungale Wirksamkeit wurde auf die Produktion eines gelben Pigmentes zurückgeführt (Egan et al. 2002), welches zur Klasse der Tambjamine-Alkaloide gehört (Franks et al. 2005). Tambjamine-Alkaloide wurden aus marinen Wirbellosen wie Seescheiden, Nacktkiemerschnecken und Bryozoen isoliert (Lindquist and Fenical 1991, Blackman & Li 1994). *P. tunicata* war die erste marine bakterielle Quelle für ein Tambjamine-Alkaloid (Burke et al. 2007).

Es wird vermutet, dass die Anwesenheit von *Pseudoalteromonas* im Gewebe oder auf der Oberfläche höherer Organismen zur Bildung von Tambjamine-Alkaloiden geführt hat (Franks et al. 2005). Bisher ist die Tambjamine-Produktion nur von einem weiteren Bakterium bekannt (Burke et al. 2007) und zwar von dem terrestrischen *Streptomyces* Stamm BE18591 (Kojiri et al. 1993). In dieser Arbeit konnte die Produktion eines Tambjamine-Alkaloids durch *Pseudoalteromonas* sp. LB034 gezeigt werden.

Stamm LB034 produziert noch weitere Substanzen (siehe Abbildung 20), die auf Grund der geringen Konzentration in dieser Arbeit nicht derepliziert oder isoliert werden konnten. Auch von diesem Stamm sollte ein größeres Kulturvolumen extrahiert werden, um genügend Substanzmenge zur Charakterisierung weiterer Substanzen zu erhalten.

4.3.4 Actinomyceten

Actinomyceten (Vertreter der Ordnung *Actinomycetales*) wurden schon in den 60er Jahren aus marinen Proben isoliert (Weyland 1969). Diese weit verbreiteten Bodenbakterien galten früher als terrestrische Kontaminanten die als Sporen vom Land ins Meer gelangten (Jensen & Fenical 1994).

Die Verbesserung der Probenahme- und Kultivierungsmethoden (Bull et al. 2000, Bull & Stach 2007) hat allerdings deutlich gemacht, dass eine Vielzahl von Actinomyceten in Meeressedimenten (Maldonado et al. 2005) und marinen Makroorganismen (Montalvo et al. 2005) existieren (Lam 2006). Im Vergleich zu den vielen verschiedenen terrestrischen Vertretern ist momentan relativ wenig über die Diversität von *Actinobacteria* in der marinen Umwelt bekannt (Menezes et al. 2010). Trotzdem ist bereits klar, dass Vertreter der *Actinobacteria* aus dem Meer eine vielfältige Diversität (strukturell und biosynthetisch) von Naturstoffen bildet (Jensen & Fenical 1994, Bull & Stach 2007). So haben beispielsweise Ohlendorf et al. 2012 mit dem Geranylphenazindiol einen von Phenazinen abgeleiteten neuen Naturstoff entdeckt.

Die meisten antimikrobiellen Substanzen wurden bislang von Vertretern der Gattung *Streptomyces* produziert (Watve et al. 2001, Bérdy 2012). Sogar von dieser als gut untersucht geltenden Gattung wurden neue marine Arten entdeckt (Fenical und Jensen 2006, Antony-Babu et al. 2008). Obwohl nur 1-3 % der von Streptomyceten produzierten Antibiotika entdeckt wurden, bedarf es zukünftig einer Kombination aus High-Throughput-Screening mit moderner Technologie (10^8 - 10^9 Stämme pro Jahr), einer Vorselektion seltener und langsam wachsender Actinomyceten, sowie einer umfangreichen mikrobiellen Sammlung und Bemühungen diese zu kultivieren, um die verbleibenden 97-99 % zu finden (Clardy et al. 2006). Das Auffinden neuer Antibiotika wird außerdem dadurch erschwert, dass gewöhnliche Antibiotika wie z.B. Streptomycin in ca. 1 % der im Boden lebenden Actinomyceten vorkommen und deren Aktivität in Screenings die der neuen antimikrobiellen Substanzen verschleiert (Li & Vederas 2009).

Die in dieser Arbeit untersuchten Actinomyceten (LB058, LB114, LB129 und LB152) besitzen wahrscheinlich das Potential zur Produktion neuer Naturstoffe bzw. neuer Derivate. In den Extrakten konnten Substanzen detektiert werden, die teils bereits bekannten Verbindungen zugeordnet werden konnten, teils aber bisher nicht derepliziert werden konnten. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist eine der Substanzen aus Stamm LB058 zu der auch $^1\text{H-NMR}$ Spektren analysiert wurden, eine neue Verbindung (Peak 14, siehe Abbildung 21 und Tabelle 14). Erfolgreich war die Suche nach neuen bioaktiven Substanzen bei dem Isolat LB173. Der im Jahr 2010 isolierte *Streptomyces*-Stamm LB173 produziert die Substanz Geranylphenazindiol, welche das Enzym Acetylcholinesterase hemmt.

4.3.5 Pseudomonaden

Pseudomonaden gelten als gute Naturstoffproduzenten (Bérdy 2005). Sie verfügen über enorm viele Stoffwechsellmöglichkeiten und eine vielfältige Biochemie, was sich in der Produktion strukturell unterschiedlicher bioaktiver chemischer Strukturen widerspiegelt (Gross & Loper 2009). Dies wird auch deutlich durch die ca. 900 Substanzen, die im Dictionary of Natural Products (Buckingham 2011) als von Pseudomonaden produziert verzeichnet sind. Das große Interesse an Pseudomonaden ist auf die Produktion einer Vielzahl von verschiedenen Metaboliten, inklusive Enzymen, flüchtigen Substanzen, Bakteriocinen, Toxinen, Antibiotika und zyklischen Lipopeptiden zurückzuführen (Haas & Défago 2005, Raaijmakers et al. 2002).

4.3.5.1 *Pseudomonas*-Stamm LB012

Zu den erfolgreich dereplizierten Substanzen aus Stamm LB012 gehören die Massetolide (zyklische Lipopetide), welche mittels einer nichtribosomalen Peptidsynthetase (NRPS) synthetisiert werden (de Bruijn et al. 2008). Die Massetolide A-H wurden bereits zuvor von zwei verschiedenen marinen *Pseudomonas*-Stämmen isoliert. Isolat MK90E85 wurde von einer Rotalge und Isolat MK91CC8 von einem Röhrenwurm isoliert (Gerard 1997).

Auch Viscosin wurde zusammen mit den Massetoliden E, F, G und H von Isolat MK91CC8 isoliert (Gerard et al. 1997). Massetolide sind Tenside, die biologische Aktivität gegenüber Mykobakterien und Pilzen zeigen, sowie eine schädliche Wirkung auf Zoosporen und diverse pflanzenpathogene Oomyceten haben (Tran et al. 2007).

Die in dieser Arbeit von einem *Pseudomonas*-Stamm isolierte Substanz Holomycin dagegen wurde erstmalig aus einem *Streptomyces*-Stamm isoliert (Ettliger et al. 1959). Die Produktion von Holomycin ist auch von weiteren Streptomycceten, wie z.B. *Streptomyces clavuligerus* bekannt (de la Fuente et al. 2002). In diesem Stamm wurde auch das Biosynthese-Gencluster identifiziert (Li & Walsh 2010). Aber auch in anderen Bakterien, wie z.B. *Photobacterium halotolerans* (Wietz et al. 2010) und *Yersinia ruckeri* (Qin et al. 2013) konnte Holomycin nachgewiesen werden.

Die Produktion von Holomycin ist auch ein Beispiel dafür, dass Sekundärmetabolite von Mikroorganismen über die Art- und Gattungsgrenzen hinweg gebildet werden können, wie es z.B. auch für die Cephalosporine nachgewiesen wurde, welche sogar von verschiedenen Phyla (Actinomycceten, Gammaproteobakterien und Pilzen) produziert wurden (Liras & Martín 2006).

Aus der Literatur ist bekannt, dass Holomycin auch antibakterielle Aktivität gegen pathogene Stämme wie *L. monocytogenes*, *S. marcescens*, *S. enteritidis*, *B. cereus*, *Y. enterocolitica*, *Y. ruckeri*, *V. harveyi*, *V. vulnificus* und *V. parahaemolyticus*, sowie gegen mehrere marine Stämme der *Roseobacter*- und *Pseudoalteromonas*-Gruppe zeigte (Wietz et al. 2010). Der exakte Wirkmechanismus, der der antibakteriellen Aktivität zu Grunde liegt, konnte *in vitro* bisher noch nicht nachgewiesen werden, aber es wird vermutet, dass es sich um die Inhibition der bakteriellen RNA-Polymerase handelt (Qin et al. 2013).

Neben dem bekannten Holomycin konnten im Extrakt von Stamm LB012 Substanzen (Peak 3-8, siehe Abbildung 29 A und Tabelle 19) detektiert werden, die mit den vorhandenen Daten nicht derepliziert werden konnten. Allerdings wurden diese Substanzen (Peak 4-8) in einem darauffol-

genden Großansatz (siehe Abbildung 30) nicht gebildet, so dass weitere Untersuchungen nötig sind, um die Bedingungen für die Produktion zu ermitteln. Unter Umständen waren die Substanzen im Großansatz zum Zeitpunkt der Extraktion bereits wieder abgebaut, da im Extrakt aus einer um ca. 24 Stunden verlängerten Kultivierung diese Substanzen auch nicht nachgewiesen werden konnten. Falls es sich bei diesen Peaks um unbekannte Substanzen handeln sollte, wäre ein Großansatz mit kürzerer Kultivierungsdauer nötig, um die Substanzen zu isolieren und mittels NMR-Analyse zu identifizieren.

4.3.5.2 *Pseudomonas*-Stamm LD120

Stamm LD120 produzierte eine Vielzahl unterschiedlicher Metabolite. Während MAPG und DAPG durch eine Typ III Polyketidsynthase gebildet werden (Achkar et al. 2005, Zha et al. 2006), handelt es sich bei PLT und den Rhizoxinen um eine durch ein hybrides PKS-NRPS-System gebildete Verbindung (Dorrestein et al. 2005, Brendel et al. 2007, Loper et al. 2008).

Das 16-gliedrige Makrolid Rhizoxin wurde erstmalig aus dem pflanzenpathogenen Pilz *Rhizopus microsporus* isoliert und gilt als Auslöser der Reisfäule (Iwasaki et al. 1984). Partida-Martinez & Hertweck (2005) konnten durch ihre Untersuchungen allerdings zeigen, dass die Rhizoxine durch einen bakteriellen Endosymbionten der Gattung *Burkholderia* produziert werden. Mit Hilfe eines genomischen Ansatzes inklusive Mutagenese und anschließendem Metabolitnachweis konnte die Produktion von Rhizoxin und dessen Derivaten auch in *Pseudomonas protegens* Pf-5 nachgewiesen werden (Loper et al. 2008).

Rhizoxin zeigt als Tubulinhemmer (Takahashi et al. 1987) eine starke anti-tumorale Aktivität (Kiyoto et al. 1986). Rhizoxin wurde bis zur Phase II klinisch untersucht, zeigte dort jedoch keine therapierelevante Wirkung (McLeod et al. 1996, Hanauske et al. 1996). Für Rhizoxine wurden diverse Totalsynthesen entwickelt (Neuhaus et al. 2013).

Daneben wurden zwei Substanzen, Peak 15 und 17 (siehe Abbildung 32 und Tabelle 21), isoliert, die bisher nicht derepliziert werden konnten. Während beide Substanzen eine antimikrobielle Aktivität zeigten, konnte für Peak 17 zusätzlich die Hemmung des Enzyms Acetylcholinesterase nachgewiesen werden. Möglicherweise handelt sich hier um neue Substanzen eines algenassoziierten *Pseudomonas*-Bakteriums, die Anwendung in der biotechnologischen Nutzung finden könnten.

4.4 Untersuchungen zur Veränderung des Metabolitprofils

Sich ändernde Wachstumsbedingungen haben gleichermaßen Einfluss auf den Stoffwechsel und daher auch auf die Metabolit-Produktion (Gram et al. 2010). Die optimalen Bedingungen zur Produktion von Sekundärmetaboliten sind nicht zwangsläufig die gleichen, wie die für das Wachstum und variieren von Mikroorganismus zu Mikroorganismus (Knight et al. 2003). Zur Auffindung neuer Substanzen werden Mikroorganismen häufig nach dem OSMAC- (one strain many compounds) Prinzip kultiviert, um das Spektrum an Metaboliten, die durch einen Mikroorganismus produziert werden, zu erweitern (Bode et al. 2002). Eine weitere Möglichkeit das Metabolit-Spektrum (Wietz et al. 2013) und damit auch entsprechende Antagonismen (Gram et al. 2010) zu beeinflussen, könnte das Nachahmen der Standortbedingungen sein.

In den folgenden Kapiteln werden die Untersuchungen zur Veränderung des Sekundärmetabolitprofils durch Variation der Kultivierungsbedingungen des *Streptomyces*-Stammes LB114 und der *Pseudomonas*-Stämme LB042, LB061, LD120, sowie das Agarplatten-Screening diskutiert.

4.4.1 Kultivierungsexperimente mit *Streptomyces* sp. LB114

Die Kultivierung von Stamm LB114 in drei verschiedenen Medien führte zur Produktion von drei unterschiedlichen Metabolitprofilen (siehe Abbildung 24 A-C). Während Vorkultur, Kulturgefäß und Kultivierung unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurden, bestand in der Medienzusammensetzung der einzige Unterschied. Daher wird die jeweilige Produk-

tion der Sekundärmetabolite auf das Vorhandensein von Unterschieden im Nährstoffangebot zurückgeführt (Schimana et al. 2001).

Die beste Produktion fand in GYM4-Medium statt. Hier wurden die meisten Substanzen produziert und dass auch in höherer Konzentration als bei den anderen Medien. Im GYM4-Medium befindet sich die höchste Glucose-Konzentration, während das MB- und das TSB-Medium keine bzw. nur eine geringe Menge an Glucose enthalten.

Die Inhibition der Antibiotika-Produktion in verschiedenen Bakterien erfolgt je nach Antibiotikum durch unterschiedlich hohe Glucosekonzentrationen (Knight et al. 2003). Weiterhin enthält nur GYM4 Malzextrakt, welches vorrangig die Kohlenhydrate Maltose und Maltodextrine enthält und die höchste Konzentration an Hefeextrakt zur Bereitstellung von Peptiden und Aminosäuren. Auch der Salzgehalt der Medien könnte einen Einfluss auf die Metabolitproduktion haben (Singh et al. 2009).

4.4.2 Kultivierungsexperimente mit *Pseudomonas* sp. (LB042, LB061, LD120)

Auch für die untersuchten *Pseudomonas*-Stämme konnte nachgewiesen werden, dass die Zusammensetzung des Kulturmediums einen erheblichen Einfluss auf das Sekundärmetabolitprofil hat. Durch die Veränderung der Medienzusammensetzung konnte die Produktion der Substanz 2,4,6-Triacetylphloroglucinol in beiden *Pseudomonas*-Stämmen (LB042 und LB061) induziert werden. Die Produktion dieser Substanz wurde nur in GYM-Medium nachgewiesen. Ob die Änderung des Sekundärmetabolitprofils von der NaCl-Konzentration abhängig ist, oder das Verhältnis bzw. die Zusammensetzung der Kohlenstoff- und Stickstoffquellen ursächlich ist, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden.

Für Stamm LB042 und LB061 konnte ebenfalls der Einfluss der Kultivierungsdauer auf die Metabolitproduktion gezeigt werden. Während bei der Kultivierung in MB-Medium eine Extraktion nach ein bis zwei Tagen geeignet ist, um möglichst viele Substanzen in relativ hoher Konzentration zu

erhalten, sollte die Extraktion der Kultur mit GYM-Medium nach zwei bis drei Tagen erfolgen.

Kidarsa et al. (2011) berichteten, dass Phloroglucinol (PG), ein Zwischenprodukt zur Biosynthese von DAPG, in nanomolaren Konzentrationen für die Biosynthese von PLT benötigt wird, aber in höheren Konzentration die PLT-Produktion wieder inhibiert. Die Inhibition der PLT-Produktion wurde zuvor dem DAPG zugeschrieben (Brodhagen et al. 2004). Weiterhin wird vermutet, dass DAPG zu MAPG (Bottiglieri und Keel 2006) und weiter zu PG abgebaut wird und die PG-Produktion durch die Autoinduktion von DAPG (Schnider-Keel et al. 2000) stimuliert wird. Jedoch sind die Mechanismen zur Ausscheidung von Phloroglucinol aus der Zelle sowie zur Aufnahme von DAPG aus der Umgebung nicht bekannt (Kidarsa et al. 2011).

4.4.3 Agarplatten-Screening

Bakterien, inklusive *Pseudomonas*-Arten wurden herkömmlich in der planktonischen Lebensweise in Flüssigkulturen untersucht. Mittlerweile weiß man jedoch, dass Bakterien aus verschiedenen Ökosystemen in Biofilmen leben (Tolker-Nielsen & Molin 2004). Bei der Entstehung von Biofilmen scheint Quorum-sensing oft eine wichtige Rolle zu spielen (de Kievit 2009, Goldstone et al. 2012).

Die in dieser Arbeit auf Agarplatten kultivierten *Pseudomonas*-Stämme zeigten größtenteils ein ähnliches Metabolitspektrum. Einander ähnliche Stämme wurden untersucht, da Stämme derselben Art in vielen Fällen unterschiedliche Substanzen produzieren können (Knight et al. 2003).

Eine der von den *Pseudomonas*-Stämmen produzierte Substanz, der bisher nicht dereplizierte Peak 18 (siehe Tabelle 21, 22, 23, 24, 26, 27 und Abbildung 32, 40 A, 41 A-D, 34 A, 36 A, 37 D, E), wurde in allen Extrakten von MB-Agarplatten (siehe Abbildung 42 und Tabelle 29) nachgewiesen, und in den Flüssigkulturen die ebenfalls MB-Medium enthielten. In den Extrakten aus den Kulturen mit TM-Medium, welches als Analogon zum MB-Medium eingesetzt wurde, konnte diese Substanz nicht detektiert werden (siehe Abbildung 36).

Es gibt einige Beispiele, die zeigen, dass die Oberflächenassoziation vieler mariner Mikroorganismen die Produktion antibakterieller Substanzen ermöglicht (Bruhn et al. 2005, Yan et al. 2003). In Biofilmen erreichen Bakterien hohe Zelldichten (Matz et al. 2008), so dass es in Abhängigkeit von der Zelldichte zur Bildung von Signalmolekülen und damit auch zur Aktivierung bestimmter Gene kommen kann (De Kievit et al. 2001, Davies 1998). Ein weiterer Hinweis dafür, dass die Produktion von Peak 18 abhängig von der Bildung eines Biofilms sein könnte, liefern die Extrakte aus der Zeitreihe von Stamm LD120 (siehe Abbildung 37). Die Produktion von Peak 18 konnte nach 48 stündiger Kultivierung in Flüssigkultur nachgewiesen werden (siehe Abbildung 37 D). Nach einer 36 stündigen Kultivierung konnte die Bildung eines Biofilms an der Wand des Kulturgefäßes beobachtet werden (siehe Abbildung 44 im Anhang). Auch Allison et al. (1998) konnten die Bildung eines Biofilms nach maximal 20 bis 50 Stunden nach der Inokulation von *P. fluorescens* nachweisen. In der vorliegenden Arbeit konnte die Produktion einer neuen Substanz zwar nicht induziert werden, aber die Bildung eines Biofilmes scheint für die Steigerung der Ausbeute von Peak 18 förderlich zu sein.

4.5 *S. latissima* assoziierte Bakterien

Bisher gibt es nur wenige Studien zu bakteriellen Gemeinschaften, die mit *S. latissima* assoziiert sind, sowie ihrer ökologischen Bedeutung und ihrer Interaktionen mit der Alge oder anderen Organismen und bezüglich ihres biotechnologischen Potentials (Wiese et al. 2009b).

Für *Laminaria digitata* wurde durch mikroskopische Untersuchungen gezeigt, dass je nach Jahreszeit unterschiedlich viele Bakterien auf der Alge vorkommen, wobei die Anzahl im Winter (10^6 Bakterien pro cm^2) geringer und im Frühjahr (bis zu 6×10^7 Bakterien pro cm^2) höher ausfällt (Corre & Prieur 1990). Die jahreszeitlichen Unterschiede wurden auch mittels kultivierungsabhängiger Methoden ermittelt (Laycock 1974, Mazure & Field 1980). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass der kultivierbare Anteil der bakteriellen Gemeinschaft variiert, wobei im Winter psychrophile Bak-

terien häufiger vorkommen und im Sommer mesophile Bakterien (Laycock 1974). Die jahreszeitlichen Unterschiede in der bakteriellen Gemeinschaft könnten darin begründet liegen, dass das mikrobielle Wachstum in der Natur abhängig von den jeweiligen Standortparametern, der Vegetation, der Jahreszeit und dem Wetter ist (Davies & Ryan 2012).

Mittels molekularbiologischer Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass sich die mit *S. latissima* assoziierte bakterielle Gemeinschaft je nach Algenabschnitt (Rhizoid, Cauloid, Meristem und altes Phylloid) deutlich unterscheidet. Die DGGE-Analyse zeigte, dass das Rhizoid im Durchschnitt mit fünf Banden die geringste Diversität und das Phylloid mit ca. 16 Banden die größte Diversität aufwies. Außerdem wurde nachgewiesen, dass sich das Bandenmuster der DGGE-Analyse der Algenproben von denen der Wasserproben unterscheidet. Dass die bakterielle Gemeinschaft spezifisch mit *S. latissima* assoziiert ist und sich vom Umgebungswasser unterscheidet, wurde außerdem durch Ergebnisse aus der 16S rRNA-Genbibliothek unterstützt (Staufenberger et al. 2008).

Für diese Selektivität könnten artspezifische Eigenschaften der Algenoberflächen und/oder bestimmte Interaktionen zwischen Algen und Bakterien verantwortlich sein (Lachnit et al. 2009). Braune Makroalgen haben sich an ihre marine Umgebung angepasst und Phylum-spezifische Charakteristika entwickelt, wie z.B. einen umgebungsspezifischen molekularen Abwehrmechanismus, der zu einer aktiven Abwehr gegenüber pathogenen Organismen führt (Cosse et al. 2009). Im Detail weiß man jedoch nur wenig über diese Interaktionen (Sneed & Pohnert 2011), da im Gegensatz zu terrestrischen Pflanzen und Tieren die molekularen Abwehrmechanismen in Seegräsern weitgehend unbekannt sind (Cosse et al. 2007).

In dieser Arbeit wurden Vertreter der Gattung *Bacillus* aus dem Rhizoid und dem Sediment isoliert. Pseudomonaden und Streptomyceten konnten zusätzlich aus dem alten Phylloid isoliert werden. Aus dem terrestrischen Erdreich wird über eine Assoziation zwischen diesen beiden Gattungen berichtet, wobei die Streptomyceten (bekannt für den Abbau komplexer or-

ganischer Stoffe) die Pseudomonaden mit monomeren Kohlenstoffquellen für das Wachstum versorgen (Moore & Tindall 2006).

Gestärkt wird das Indiz für eine beständige Assoziation zwischen Pseudomonaden, Streptomyceten und auch *Bacillus*-Stämmen mit *S. latissima* durch die über Jahre wiederholte Isolierung (siehe Tabelle 8). Des Weiteren ist die Ähnlichkeit der 16S rRNA-Gensequenzen der LD120-Gruppe (Pseudomonaden) untereinander größer als die Ähnlichkeit zum nächsten verwandten Typstamm, was ein Hinweis auf eine spezifische Anpassung einer Bakteriengemeinschaft an ihr Habitat sein könnte.

4.6 Isolierung von Pseudomonaden

Ziel dieser Arbeit war es, spezifisch Pseudomonaden von *S. latissima* zu isolieren und nicht die gesamte Bakteriengemeinschaft abzubilden. Daher wurden Kultivierungsmedien zur selektiven Anreicherung bzw. zur Differenzierung von *Pseudomonas*-Arten ausgewählt. Sowohl die Wahl des Mediums als auch die Inkubationstemperatur beeinflussen dabei den Erfolg der Kultivierung und auch die Diversität (Bernard et al. 2000).

Im Allgemeinen konnte bei Pseudomonaden gutes Wachstum in Medien beobachtet werden, die als Kohlenstoff- und Energiequelle organische Substanzen in einer Konzentration zwischen 0,1-1,0 % (w/v) enthalten (Moore & Tindall 2006).

Mit Hilfe der CFC- und der GSP-Nährmedien konnten viele Pseudomonaden anhand ihrer Koloniemorphologie und mittels Fluoreszenznachweis isoliert werden. Auch das *Pseudomonas*-Medium führte zur Isolierung von Pseudomonaden. Allerdings war in diesem Medium die Nährstoffzusammensetzung auch für viele weitere Bakterien gut geeignet, so dass es zur Bildung vieler unterschiedlicher Kolonien kam. Das Wachstum unterschiedlicher Bakterien auf dem *Pseudomonas*-Medium könnte darin begründet liegen, dass Zusätze wie Antibiotika (z.B. Penicillin G, Novobiocin und Cycloheximid), welche die fluoreszierenden *Pseudomonas*-Arten nicht inhibieren (Sands & Rovira 1970) und in anderen Medien enthalten sind, hier nicht zugesetzt wurden.

Mit der kultivierungsabhängigen Methode können nur Aussagen über Bakterien, die unter den gewählten Bedingungen wachsen, gemacht werden. Pseudomonaden können sich allerdings, wie auch andere Bakterien, in einer Art Ruhezustand befinden, der auch „viable but nonculturable state“ (VBNC) genannt wird, in welchem die Zellen auf den üblicherweise verwendeten bakteriologischen Medien eigentlich wachsen und eine Kolonie bilden würden (Oliver 2000). Dieser Ruhezustand ist definiert als reversibles Stadium geringer metabolischer Aktivität wobei die Lebensfähigkeit erhalten bleibt (Overmann 2013). Bunker et al. (2004) haben gezeigt, dass *P. fluorescens* für länger als ein Jahr in dem VBNC-Stadium verweilen kann, was allerdings nur eine geeignete Überlebensstrategie sein kann, wenn die Zellen ihre metabolische Aktivität wieder zurückgewinnen können (Oliver 2005). Daher könnte die tatsächliche Zahl von Pseudomonaden und anderen Bakterien noch höher ausfallen.

Zur Isolation von *Pseudomonas*-Arten können Komplex- oder Selektivmedien verwendet werden. Die Wahl ist abhängig von den zu analysierenden Proben (Schroth et al. 2006), da die *Pseudomonas*-Arten auf stark selektiven Medien in geringerer Anzahl und Diversität wachsen (Gilardi 1985).

Zwei oft genutzte Selektivmedien zur Detektion und Isolation fluoreszierender *Pseudomonas*-Arten sind die Medien King A und King B (King et al. 1954), welche Kalium- und Magnesiumsalze zur Steigerung der Pyocyanin und Pyoverdin Pigmentproduktion enthalten. Auch sollten die zur Detektion von fluoreszierenden *Pseudomonas*-Arten verwendeten Kultivierungsmedien einen Mangel an Eisen aufweisen, da die Fluoreszenz auf die erhöhte Produktion von Siderophoren zurückzuführen ist, die in das Medium abgegeben werden (Moore & Tindall 2006).

Mittels UV-Lampe (366 nm) konnten fluoreszierende Pseudomonaden auf allen drei Medien detektiert werden. Dies erleichterte die Auswahl der Kolonien besonders beim *Pseudomonas*-Medium sehr deutlich (siehe Abbildung 43 a im Anhang).

Trotzdem stellt sich die Frage nach der tatsächlichen Häufigkeit mit der die bakteriellen Taxa in den jeweiligen Ökosystemen vorkommen. Wahrscheinlich konnten mit den verwendeten Medien viele weitere Pseudomonaden, die nicht, oder nicht unter diesen Bedingungen fluoreszierten, der Detektion entgehen. Auch Ward et al. (1990) vermuten, dass die natürliche bakterielle Gemeinschaft mittels kultivierungsabhängiger Methoden meist nicht richtig dargestellt wird, weil gängige Kultivierungsmethoden nicht die realen Umweltbedingungen imitieren, welchen die Gemeinschaft ausgesetzt ist.

Das Ziel der Pseudomonaden-Isolierung konnte mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden erreicht werden.

4.7 Abschließende Diskussion und Ausblick

Viele marine Bakterienarten konnten bislang noch nicht kultiviert werden, da man die Wachstumsbedingungen noch nicht kennt (Schut et al. 1997), oder die Bakterien keine Kolonien an der Luft/Feststoff-Grenzfläche bilden können (Eilers et al. 2000). Daher stellen marine Bakterien auch zukünftig eine aussichtsreiche Quelle für neue Naturstoffe dar.

Um dieses Potential verfügbar zu machen, wurde vorgeschlagen, mehrere Medien verschiedener Zusammensetzung zu verwenden, um so auch neue Arten isolieren zu können (Martin & MacLeod 1984, Gonzalez & Moran 1997). Auch wurden Verdünnungstechniken zur Kultivierung oligotropher Arten entwickelt, welche nicht auf nährstoffreichen Medien wachsen (Button et al. 1993).

Die Untersuchungen dieser Arbeit haben nachgewiesen, dass es für das zukünftige Naturstoffscreening von Bakterien sinnvoll ist, mindestens zwei verschiedene Medien für die Kultivierung auszuwählen. Außerdem sollten während der Kultivierung, unabhängig von der Bakterien-Art, mehrere Probenahmezeitpunkte für die Extraktion erfolgen, da Wirkstoffe zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des Wachstums gebildet werden können. Bei langsam wachsenden Gattungen wie *Streptomyces*, kann der geeignete Zeitpunkt für die Extraktion daher bereits nach drei- bis viertägi-

ger Kultivierung erreicht sein oder aber erst nach neun- oder elftägiger Kultivierung. Ebenso verhält es sich mit den Vertretern der schnell wachsenden Gattungen wie *Bacillus* oder *Pseudomonas*. Auch hier kann der geeignete Zeitpunkt bereits nach zwei- oder dreitägiger Kultivierung erfolgen, oder aber auch erst nach siebentägiger Kultivierung.

Da die traditionelle Naturstoffforschung labor- und kostenintensiv ist (Wagenaar 2008), muss für ein sinnvolles Screening eine Balance zwischen Aufwand und Nutzen gefunden werden. Daher erscheint es nur für ausgewählte Bakterien-Stämme als sinnvoll weitere Kultivierungsexperimente nach dem OSMAC-Verfahren, der Ko-Kultivierung und der Zugabe von Induktoren durchzuführen, um so Zugang zu Metaboliten zu erhalten, die nicht konstitutiv exprimiert werden. Die nahezu grenzenlose Möglichkeit zur Variation der Wachstumsparameter führt zu einer Erhöhung von Aufwand und Kosten und ist daher für das Standardscreening weniger geeignet.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl das Screening unbekannter bzw. wenig erforschter Arten, als auch das Screening gut untersuchter Arten der Gattungen *Streptomyces* oder *Bacillus* eine geeignete Strategie zur Entdeckung neuer Metabolite sein kann.

Für die Naturstoffforschung sind Innovationen der Methoden essentiell. Da viele Naturstoffe oft nur in geringen Mengen zur Verfügung stehen (Li & Vederas 2009), ermöglicht die Verbesserung der NMR-Technologie, durch eine höhere Empfindlichkeit, auch die Erforschung seltener neuer Naturstoffe (Molinski 2010). Auch die wachsende Zahl von Genomsequenzierungen von Mikroorganismen wird zur Entdeckung neuer Naturstoffe beitragen (Bode & Müller 2005).

Für weiterführende Untersuchungen zur bakteriellen Gemeinschaft der Braunalge *S. latissima* in der Ostsee wäre die Anwendung kultivierungsunabhängiger Methoden sinnvoll. Die mittels kultivierungsabhängiger Methoden erhaltenen Ergebnisse könnten so bestätigt und ergänzt werden. Für *in situ*-Studien von der Alge könnte die RING-FISH- (recognition of individual genes) Methode sinnvoll sein. Mit dieser Methode können gezielt

einzelne Gene in Kombination mit High-Throughput-Methoden, wie z.B. Durchflusszytometrie, untersucht werden, was ein schnelles und effizientes Instrument für die Untersuchung einer großen Anzahl von Bakterienzellen in der natürlichen Umgebung darstellt (Grossart 2010).

5 Zusammenfassung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Assoziation von *Bacillus*-, *Pseudomonas*- und *Streptomyces*-Arten mit der Braunalge *Saccharina latissima* in der Ostsee besteht. Im speziellen kann für den *Pseudomonas*-Stamm LD120 auf Grund des Sekundärmetabolitprofils sowie der stoffwechselphysiologischen Eigenschaften des Bakteriums eine mutualistische Interaktion mit *S. latissima* als wahrscheinlich angenommen werden.

Zu den Bakterien, die biologisch aktive Substanzen produzieren und die von der Alge *S. latissima* isoliert wurden, gehören Vertreter der Gattungen *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas* und *Streptomyces*. Änderungen der Kultivierungsbedingungen konnten das Sekundärmetabolitprofil dieser Bakterien verändern. Besonders erwähnenswert ist die Bildung von sechs weiteren Substanzen durch Stamm LD81 nach Zugabe des biogenen Amins Putrescin zum Kulturmedium.

Die biologische Aktivität der isolierten bakteriellen Naturstoffe umfasst sowohl antimikrobielle Wirksamkeiten gegen über Bakterien und Pilzen als auch Hemmung humaner Krebszelllinien und die Inhibition von Acetylcholinesterase. Etwa die Hälfte der 134 identifizierten Substanzen konnte derepliziert und so literaturbekannten Substanzen zugeordnet werden. Zwei Substanzen (Holomycin und N-Propionyl-holothin) konnten erstmals aus der Gattung *Pseudomonas* isoliert werden. Es konnten mehrfach potentiell neue Substanzen mit biologischer Aktivität identifiziert werden und zwar aus Vertretern der Gattungen *Bacillus* (LB084, m/z 572), *Pseudomonas* (LD120, m/z 347) und *Streptomyces* (LB058, m/z 544). Zusätzlich wurden in mindestens zwei Stämmen neue Derivate bekannter Naturstoffe identifiziert.

6 Summary

An association between strains of *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Streptomyces* with the brown alga *Saccharina latissima* from the Baltic Sea was shown by the results of this thesis. In particular, a mutualistic symbiosis is assumed for *Pseudomonas* strain LD120 and *S. latissima*, due to metabolic characteristics and the secondary metabolite profile.

Members of the genera *Bacillus*, *Kiloniella*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas* and *Streptomyces*, all isolated from *S. latissima*, produced bioactive compounds. Variations of cultivation conditions lead to different secondary metabolite profiles of these bacteria. Particularly noteworthy is the production of six new compounds by strain LD81 after addition of the biogenic amine putrescine to the culture medium. Bioactivity of the isolated bacterial natural products comprises antibacterial and antifungal activity, as well as inhibition of human cancer cell lines and acetylcholinesterase.

Approximately half of the 134 identified compounds was dereplicated and assigned to compounds already known from literature. However, two compounds (holomycin and N-propionylholothin) were isolated for the first time from the genus *Pseudomonas*. Potentially novel bioactive compounds were identified from members of the genera *Bacillus* (LB084, m/z 572), *Pseudomonas* (LD120, m/z 347) and *Streptomyces* (LB058, m/z 544). In addition, derivatives of known compounds were identified in at least two strains.

7 Danksagung

Mein Dank gilt:

Prof. Dr. Johannes F. Imhoff für die Übernahme meiner Betreuung, die Überlassung des Themas, die Ermöglichung zur Teilnahme an interessanten Tagungen und Konferenzen, sowie die Freiheit über den Tellerrand meiner Arbeit hinaus forschen zu dürfen.

Dr. Antje Labes für Deine Hilfe und Unterstützung in einfach allem.

Dr. Jutta Wiese für Dein Interesse, Deine Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen.

Imke für das „High-Throughput-Arbeiten“.

Dr. Inga Knopf-Kajahn & Dr. Birgit Ohlendorf für die Auswertung der NMR-Spektren.

Katrin für die Hilfe bei vielen Extraktionen, Spaziergänge und Massagen zwischendurch.

Arlette & Dr. Heidi Zinecker für die Durchführung der vielen Bioassays.

Susann für die Hilfe bei der präparativen Chromatographie.

Herwig & Tim für die IT- und Technik-Hilfe, für ein offenes Ohr und die Korrekturen vorallem meiner englischsprachigen Schriftversuche und beiden für das Tauchen und die Hilfe bei der Probenahme.

Franz, Herwig, Nils & Tim für das super Doktorandenbüroklima, mit den interessanten fachlichen Diskussionen und den noch schöneren fachfremden Gesprächen.

Allen **KiWiZ-lern** und **Mikros** danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre, die mir entgegengebrachte Hilfe und die erheiternden Mittagspausen. Vor allem werden mir die gemeinsam verbrachten Stunden nach Feierabend unvergessen bleiben.

Marion Höftmann und **Gitta Kohlmeyer-Yilmaz** aus der spektroskopischen Abteilung des Otto Diels-Institut für organische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel danke ich für die Durchführung der NMR-Experimente.

Ganz besonders Bedanken möchte ich mich bei meinen **Eltern** für die liebevolle Unterstützung in wirklich jeglicher Hinsicht. Ohne Euch wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin.

Zum Schluss bedanke ich mich bei meinem Freund **Michael** dafür, dass er mir die Freiheit gelassen hat meinen Weg zu gehen. Du hast immer zu mir gestanden und mir die Zeit gegeben, die ich gebraucht habe. Danke für so vieles.

Diese Arbeit wurde unterstützt durch das Ministerium für Wissenschaft, Wirtschaft und Verkehr Schleswig Holstein innerhalb des "Kieler Wirkstoff-Zentrum KiWiZ" Projekts, welches durch die Europäische Union (EFRE) mitfinanziert wurde.

8 Literatur

- Abdelmohsen, U. R., S. M. Pimentel-Elardo, A. Hanora, M. Radwan, S. H. Abou-El-Ela, S. Ahmed, and U. Hentschel. 2010. Isolation, phylogenetic analysis and anti-infective activity screening of marine sponge-associated actinomycetes. *Mar Drugs* 8:399–412.
- Achkar, J., M. Xian, H. Zhao, and J. W. Frost. 2005. Biosynthesis of phloroglucinol. *JACS* 127:5332–5333.
- Ali, A. B., R. De Baere, G. Van der Auwera, R. De Wachter, and Y. Van de Peer. 2001. Phylogenetic relationships among algae based on complete large-subunit rRNA sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:737–749.
- Allison, D. G., B. Ruiz, C. SanJose, A. Jaspe, and P. Gilbert. 1998. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiol Lett* 167:179–184.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410.
- Aminov, R. I. 2009. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ Microbiol* 11:2970–2988.
- Amsler, C. D., and V. A. Fairhead. 2005. Defensive and sensory chemical ecology of brown algae. *Adv Bot Res* 43:1–91.
- Antony-Babu, S., J. E. M. Stach, and M. Goodfellow. 2008. Genetic and phenotypic evidence for *Streptomyces griseus* ecovars isolated from a beach and dune sand system. *Antonie van Leeuwenhoek* 94:63–74.
- Anzai, Y., H. Kim, J.-Y. Park, H. Wakabayashi, and H. Oyaizu. 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:1563–1589.
- Armstrong, E., L. Yan, K. Boyd, P. Wright, and J. Burgess. 2001. The symbiotic role of marine microbes on living surfaces. *Hydrobiologia* 461:37–40.
- Azumi, M., K. Ogawa, T. Fujita, M. Takeshita, R. Yoshida, T. Furumai, and Y. Igarashi. 2008. Bacilosarcins A and B, novel bioactive isocoumarins with unusual heterocyclic cores from the marine-derived bacterium *Bacillus subtilis*. *Tetrahedron* 64:6420–6425.

- Baki, A., Bielik, A., Molnár, L., Szendrei, G., and Keserü, G. M. 2007. A high throughput luminescent assay for glycogen synthase kinase-3 β inhibitors. *Assay Drug Dev Technol*, 5:75-84.
- Bakker, P. A. H. M., C. M. J. Pieterse, and L. C. van Loon. 2007. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 97:239-243.
- Baltz, R. H. 2006. Marcel Faber Roundtable: is our antibiotic pipeline unproductive because of starvation, constipation or lack of inspiration? *J Ind Microbiol Biot* 33:507-513.
- Baltz, R. H. 2008. Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Curr Opin Pharmacol* 8:557-563.
- Behrmann, G. 1976. Algen in unserem Leben. *Kosmos* 10:303-304.
- Bérdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot (Tokyo)* 58:1-26.
- Bérdy, J. 2012. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *J Antibiot* 65:385-395.
- Bergmann, W., and D. C. Burke. 1955. Contribution to the study of marine products. XXXIX. The nucleosides of sponges. III. Spongothymidine and Spongouridine 2. *J Org Chem* 20:1501-1507.
- Bergmann, W., and R. J. Feeney. 1951. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. I. *J Org Chem* 16:981-987.
- Bernard, L., H. Schäfer, F. Joux, C. Courties, G. Muyzer, and P. Lebaron. 2000. Genetic diversity of total, active and culturable marine bacteria in coastal seawater. *Aquat Microb Ecol* 23:1-11.
- Berti, A. D., N. J. Greve, Q. H. Christensen, and M. G. Thomas. 2007. Identification of a biosynthetic gene cluster and the six associated lipopeptides involved in swarming motility of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *J Bacteriol* 189:6312-6323.
- Bianciotto, V., D. Minerdi, S. Perotto, and P. Bonfante. 1996. Cellular interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizosphere bacteria. *Protoplasma* 193:123-131.
- Bitzer, J., T. Grosse, L. Wang, S. Lang, W. Beil, and A. Zeeck. 2006. New aminophenoxazinones from a marine *Halomonas* sp.: fermentation, structure elucidation, and biological activity. *J Antibiot* 59:86-92.

- Blackman, A. J., and C. P. Li. 1994. New tambjamine alkaloids from the marine bryozoan *Bugula dentata*. *Aust J Chem* 47:1625–1629.
- Blunt, J. W., B. R. Copp, M. H. G. Munro, P. T. Northcote, and M. R. Prinsep. 2010. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 27:165–237.
- Blunt J. W., Copp B. R., Munro M. H. G., Northcote P. T. and Prinsep M. R. 2011. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 28:196-268.
- Blunt J.W., Copp B.R., Keyzers R.A., Munro M.H.G. and Prinsep M.R. 2012. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 29:44-222.
- Bode, H. B., B. Bethe, R. Höfs, and A. Zeeck. 2002. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem* 3:619–627.
- Bode, H. B., and R. Müller. 2005. Der Einfluss bakterieller Genomik auf die Naturstoff-Forschung. *Angew Chem* 117:6988–7007.
- Bolognesi, M. L., Minarini, A., Rosini, M., Tumiatti, V., and Melchiorre, C. 2008. From dual binding site acetylcholinesterase inhibitors to multi-target-directed ligands (MTDLs): A step forward in the treatment of alzheimers disease. *Mini Rev Med Chem* 8:960-967.
- Bolton, J. J. 2010. The biogeography of kelps (*Laminariales*, *Phaeophyceae*): a global analysis with new insights from recent advances in molecular phylogenetics. *Helgoland Mar Res* 64:263–279.
- Bottiglieri, M., and C. Keel. 2006. Characterization of PhIG, a hydrolase that specifically degrades the antifungal compound 2,4-diacetylphloroglucinol in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Appl Environ Microbiol* 72:418–427.
- Bowman, J. P. 2007. Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. *Mar Drugs* 5:220–241.
- Brakhage, A. A., Q. Al-Abdallah, A. Tüncher, and P. Spröte. 2005. Evolution of beta-lactam biosynthesis genes and recruitment of trans-acting factors. *Phytochemistry* 66:1200–1210.
- Brendel, N., L. P. Partida-Martinez, K. Scherlach, and C. Hertweck. 2007. A cryptic PKS-NRPS gene locus in the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 codes for the biosynthesis of an antimetabolic rhizoxin complex. *Org Biomol Chem* 5:2211–2213.
- Brodhagen, M., M. D. Henkels, and J. E. Loper. 2004. Positive autoregulation and signaling properties of pyoluteorin, an antibiotic

-
- produced by the biological control organism *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Appl Environ Microbiol* 70:1758–1766.
- Bruhn, J. B., K. F. Nielsen, M. Hjelm, M. Hansen, J. Bresciani, S. Schulz, and L. Gram. 2005. Ecology, inhibitory activity, and morphogenesis of a marine antagonistic bacterium belonging to the *Roseobacter* clade. *Appl Environ Microbiol* 71:7263–7270.
- De Bruijn, I., M. J. D. de Kock, P. de Waard, T. A. van Beek, and J. M. Raaijmakers. 2008. Massetolide A biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* 190:2777–2789.
- De Bruijn, I., M. J. D. de Kock, M. Yang, P. de Waard, T. A. van Beek, and J. M. Raaijmakers. 2007. Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species. *Mol Microbiol* 63:417–428.
- Buckingham, J. B. 2011. Dictionary of natural products on DVD. Chapman & Hall/CRC, London.
- Bull, A. T., and J. E. M. Stach. 2007. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends Microbiol* 15:491–499.
- Bull, A. T., A. C. Ward, and M. Goodfellow. 2000. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:573–606.
- Bunker, S. T., T. C. Bates, and J. D. Oliver. 2004. Effects of temperature on detection of plasmid or chromosomally encoded gfp-and lux-labeled *Pseudomonas fluorescens* in soil. *Environ Biosafety Res* 3:83–90.
- Burgess, J. G., E. M. Jordan, M. Bregu, A. Mearns-Spragg, and K. G. Boyd. 1999. Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. *J Biotechnol* 70:27–32.
- Burke, C., T. Thomas, S. Egan, and S. Kjelleberg. 2007. The use of functional genomics for the identification of a gene cluster encoding for the biosynthesis of an antifungal tambjamine in the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Environ Microbiol* 9:814–818.
- Button, D. K., F. Schut, P. Quang, R. Martin, and B. R. Robertson. 1993. Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: theory, procedures, and initial results. *Appl Environ Microbiol* 59:881–891.
- Camilli, A., and B. L. Bassler. 2006. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* 311:1113–1116.

- Capon, R. J. 2001. Marine Bioprospecting - trawling for treasure and pleasure. *Eur J Org Chem* 2001:633–645.
- Chhabra, S. R., P. Stead, N. J. Bainton, G. P. Salmond, G. S. Stewart, P. Williams, and B. W. Bycroft. 1993. Autoregulation of carbapenem biosynthesis in *Erwinia carotovora* by analogues of *N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone. *J Antibiot* 46:441–454.
- Clardy, J., M. A. Fischbach, and C. T. Walsh. 2006. New antibiotics from bacterial natural products. *Nat Biotechnol* 24:1541–1550.
- Clardy, J., and C. Walsh. 2004. Lessons from natural molecules. *Nature* 432:829–837.
- Clare, A. S. 1996. Marine natural product antifoulants: status and potential. *Biofouling* 9:211–229.
- Cole, J. J. 1982. Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Annu Rev Ecol Sys* 13:291–314.
- Cole, J. R., Q. Wang, E. Cardenas, J. Fish, B. Chai, R. J. Farris, a S. Kulam-Syed-Mohideen, D. M. McGarrell, T. Marsh, G. M. Garrity, and J. M. Tiedje. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 37:D141–D145.
- Cornelis, P. 2010. Iron uptake and metabolism in Pseudomonads. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:1637–1645.
- Corre, S., and D. Prieur. 1990. Density and morphology of epiphytic bacteria on the kelp *Laminaria digitata*. *Bot Mar* 33:515–524.
- Cosse, A., C. Leblanc, and P. Potin. 2007. Dynamic defense of marine macroalgae against pathogens: From early activated to gene-regulated responses. *Adv Bot Res* 46:221–266.
- Cosse, A., Potin, P., and Leblanc, C. 2009. Patterns of gene expression induced by oligoguluronates reveal conserved and environment-specific molecular defense responses in the brown alga *Laminaria digitata*. *New Phytol*, 182:239–250.
- Cragg, G. M., P. G. Grothaus, and D. J. Newman. 2009. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem Rev* 109:3012–3043.
- Davidson, B. 1995. New dimensions in natural products research: cultured marine microorganisms. *Curr Opin Biotechnol* 6:284–291.

- Davies, D. G. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280:295–298.
- Davies, J. 2006. Are antibiotics naturally antibiotics? *J Ind Microbiol Biot* 33:496–499.
- Davies, J. 2011. How to discover new antibiotics: harvesting the parvome. *Curr Opin Chem Biol* 15:5–10.
- Davies, J., and D. Davies. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 74:417–433.
- Davies, J., and K. S. Ryan. 2012. Introducing the parvome: bioactive compounds in the microbial world. *ACS Chem Biol* 7:252–259.
- Debnath, M., A. K. Paul, and P. S. Bisen. 2007. Natural bioactive compounds and biotechnological potential of marine bacteria. *Curr Pharm Biotechnol* 8:253–260.
- Dickson, M., and J. P. Gagnon. 2004. Key factors in the rising cost of new drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 3:417–429.
- DiMasi, J. A., and H. G. Grabowski. 2007. The cost of biopharmaceutical R&D: is biotech different? *Manag Decis Econ* 28:469–479.
- DiMasi, J. A., R. W. Hansen, and H. G. Grabowski. 2003. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ* 22:151–185.
- Dobretsov, S., and H. Dahms. 2005. Chemical control of epibiosis by Hong Kong sponges: the effect of sponge extracts on micro- and macrofouling communities. *Mar Ecol Prog Ser* 297:119–129.
- Dorrestein, P. C., E. Yeh, S. Garneau-Tsodikova, N. L. Kelleher, and C. T. Walsh. 2005. Dichlorination of a pyrrolyl-S-carrier protein by FADH₂-dependent halogenase PltA during pyoluteorin biosynthesis. *PNAS* 102:13843–13848.
- Dubuis, C., C. Keel, and D. Haas. 2007. Dialogues of root-colonizing biocontrol Pseudomonads. *Eur J Plant Pathol* 119:311–328.
- Eberl, L. 1999. *N*-acyl homoserinelactone-mediated gene regulation in gram-negative bacteria. *Syst Appl Microbiol* 22:493–506.
- Egan, S., T. Harder, C. Burke, P. Steinberg, S. Kjelleberg, and T. Thomas. 2013. The seaweed holobiont: understanding seaweed-bacteria interactions. *FEMS Microbiol Rev* 37:462–476.

- Egan, S., S. James, C. Holmström, and S. Kjelleberg. 2001. Inhibition of algal spore germination by the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *FEMS Microbiol Ecol* 35:67–73.
- Egan, S., S. James, C. Holmström, and S. Kjelleberg. 2002. Correlation between pigmentation and antifouling compounds produced by *Pseudoalteromonas tunicata*. *Environ Microbiol* 4:433–442.
- Egan, S., T. Thomas, C. Holmstrom, and S. Kjelleberg. 2000. Phylogenetic relationship and antifouling activity of bacterial epiphytes from the marine alga *Ulva lactuca*. *Environ Microbiol* 2:343–347.
- Egan, S., T. Thomas, and S. Kjelleberg. 2008. Unlocking the diversity and biotechnological potential of marine surface associated microbial communities. *Curr Opin Microbiol* 11:219–225.
- Eilers, H., J. Pernthaler, F. O. Glöckner, and R. Amann. 2000. Culturability and *in situ* abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Appl Environ Microbiol* 66:3044–3051.
- Engel, S., M. P. Puglisi, P. R. Jensen, and W. Fenical. 2006. Antimicrobial activities of extracts from tropical Atlantic marine plants against marine pathogens and saprophytes. *Mar Biol* 149:991–1002.
- Ettlinger, L., E. Gäumann, R. Hütter, W. Keller-Schierlein, F. Kradolfer, L. Neipp, V. Prelog, and H. Zähler. 1959. Stoffwechselprodukte von Actinomyceten 17. Mitteilung Holomycin. *Helvetica Chimica Acta* 42:563–569.
- Feher, M., and J. M. Schmidt. 2003. Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. *J Chem Inf Comput Sci* 43:218–227.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17:368–376.
- Fenical, W., and P. R. Jensen. 2006. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nat Chem Biol* 2:666–673.
- Fischbach, M. A., and C. T. Walsh. 2009. Antibiotics for emerging pathogens. *Science* 325:1089–1093.
- Fish, J. D., and S. Fish. 2011. A student's guide to the seashore. Cambridge University Press.
- Fleming, A. 1929. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol* 10:226–236.

- Franks, A., P. Haywood, C. Holmström, S. Egan, S. Kjelleberg, and N. Kumar. 2005. Isolation and structure elucidation of a novel yellow pigment from the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Molecules* 10:1286–1291.
- De la Fuente, A., L. M. Lorenzana, J. F. Martín, and P. Liras. 2002. Mutants of *Streptomyces clavuligerus* with disruptions in different genes for clavulanic acid biosynthesis produce large amounts of holomycin: possible cross-regulation of two unrelated secondary metabolic pathways. *J Bacteriol* 184:6559–6565.
- Fuqua, C., M. R. Parsek, and E. P. Greenberg. 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet* 35:439–468.
- Fuqua, W. C., S. C. Winans, and E. P. Greenberg. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 176:269–275.
- Gambardella, A. 1995. Science and innovation: The US pharmaceutical industry during the 1980s. Cambridge University Press.
- Gavrilescu, M., and Y. Chisti. 2005. Biotechnology - a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol Adv* 23:471–499.
- Geisenberger, O. 2000. Nachweis, Verbreitung und Bedeutung von *N*-Acyl-L-homoserinlactonen bei Gram-negativen Bakterien. Technische Universität München, Universitätsbibliothek.
- Gerard, J., R. Lloyd, T. Barsby, P. Haden, M. T. Kelly, and R. J. Andersen. 1997. Massetolides A-H, antimycobacterial cyclic depsipeptides produced by two pseudomonads isolated from marine habitats. *J Nat Prod* 60:223–229.
- Gerard, J. M. 1997. Antibiotic secondary metabolites of bacteria isolated from the marine environment.
- Gilardi, G. 1985. Pseudomonas. Pages 350–372 *In* E. Lennette, A. Balows, W. Hausler Jr., and H. Shadomy, editors. *Manual of Clinical Microbiology*, 4th ed. ASM Press. Washington, DC.
- Glaser, K. B., and A. M. S. Mayer. 2009. A renaissance in marine pharmacology: from preclinical curiosity to clinical reality. *Biochemical pharmacology* 78:440–448.

- Goecke, F., A. Labes, J. Wiese, and J. Imhoff. 2010. Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria. *Mar Ecol Prog Ser* 409:267–299.
- Goecke, F., J. Wiese, A. Núñez, A. Labes, J. F. Imhoff, and S. Neuhauser. 2012. A novel phytomyxean parasite associated with galls on the bull-kelp *Durvillaea antarctica* (Chamisso) Hariot. *PLoS one* 7:e45358.
- Goldstone, R. J., R. Popat, M. P. Fletcher, S. A. Crusz, and S. P. Diggle. 2012. Quorum sensing and social interactions in microbial biofilms. Pages 1–24 *In* G. Lear and G. Lewis, editors. *Microbial Biofilms: Current Research and Applications*. Caister Academic Press.
- Gontang, E. A., W. Fenical, and P. R. Jensen. 2007. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 73:3272–3282.
- Gonzalez, J., and M. Moran. 1997. Numerical dominance of a group of marine bacteria in the alpha-subclass of the class Proteobacteria in coastal seawater. *Appl Environ Microbiol* 63:4237–4242.
- Gram, L., J. Melchiorson, and J. B. Bruhn. 2010. Antibacterial activity of marine culturable bacteria collected from a global sampling of ocean surface waters and surface swabs of marine organisms. *Mar Biotechnol* 12:439–451.
- Gross, H., and J. E. Loper. 2009. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Nat Prod Rep* 26:1408–1446.
- Grossart, H. 2010. Ecological consequences of bacterioplankton lifestyles: changes in concepts are needed. *Environ Microbiol Rep* 2:706–714.
- Guindon, S., F. Lethiec, P. Duroux, and O. Gascuel. 2005. PHYML Online—a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res* 33:W557–W559.
- Gulder, T. A. M., and B. S. Moore. 2009. Chasing the treasures of the sea - bacterial marine natural products. *Curr Opin Microbiol* 12:252–260.
- Haas, D., and G. Défago. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonads*. *Nat Rev Microbiol* 3:307–319.
- Hanauske, A. R., G. Catimel, S. Aamdal, W. ten Bokkel Huinink, R. Paridaens, N. Pavlidis, S. B. Kaye, A. Te Velde, J. Wanders, and J. Verweij. 1996. Phase II clinical trials with rhizoxin in breast cancer and melanoma. The EORTC early clinical trials group. *Br J Cancer* 73:397–399.

- Harder, T., A. H. Campbell, S. Egan, and P. D. Steinberg. 2012. Chemical mediation of ternary interactions between marine holobionts and their environment as exemplified by the red alga *Delisea pulchra*. *J Chem Ecol* 38:442–450.
- Harder, T., and S. Lau. 2003. A distinctive epibiotic bacterial community on the soft coral *Dendronephthya* sp. and antibacterial activity of coral tissue extracts suggest a chemical mechanism. *FEMS Microbiol Ecol* 43:337–347.
- Henderson, J. W. 1997. The yellow brick road to penicillin: a story of serendipity. *Mayo Clinic Proceedings* 72:683–687.
- Hentschel, U., L. Fieseler, M. Wehrl, C. Gernert, M. Steinert, J. Hacker, and M. Horn. 2003. Microbial diversity of marine sponges. Pages 59–88 (W. E. G. Müller, Ed.) *Sponges (Porifera)*. Springer-Verlag GmbH & Co. KG, Berlin.
- Holmström, C., S. James, B. A. Neilan, D. C. White, and S. Kjelleberg. 1998. *Pseudoalteromonas tunicata* sp. nov., a bacterium that produces antifouling agents. *Int J Syst Bacteriol* 48:1205–1212.
- Holmström, C., D. Rittschof, and S. Kjelleberg. 1992. Inhibition of settlement by larvae of *Balanus amphitrite* and *Ciona intestinalis* by a surface-colonizing marine bacterium. *Appl Environ Microbiol* 58:2111–2115.
- Holzgrabe, U. 2004. Antibiotika-Entwicklung gestern und heute. *Chemotherapie Journal* 13:142–147.
- Houslay, M. D., Schafer, P., and Zhang, K. Y. 2005. Keynote review: phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. *Drug Discov Today* 10:1503–1519.
- Imhoff, J. F., A. Labes, and J. Wiese. 2011. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: new natural products. *Biotechnol Adv* 29:468–482.
- Isnansetyo, A., L. Cui, K. Hiramatsu, and Y. Kamei. 2003. Antibacterial activity of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by *Pseudomonas* sp. AMSN isolated from a marine alga, against vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 22:545–547.
- Isnansetyo, A., and Y. Kamei. 2009. Bioactive substances produced by marine isolates of *Pseudomonas*. *J Ind Microbiol Biot* 36:1239–1248.
- Ivanova, E. P., M. V Vysotskii, V. I. Svetashev, O. I. Nedashkovskaya, N. M. Gorshkova, V. V Mikhailov, N. Yumoto, Y. Shigeri, T. Taguchi, and

- S. Yoshikawa. 1999. Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. *Int Microbiol* 2:267–271.
- Iwasaki, S., H. Kobayashi, J. Furukawa, M. Namikoshi, S. Okuda, Z. Sato, I. Matsuda, and T. Noda. 1984. Studies on macrocyclic lactone antibiotics. VII. Structure of a phytotoxin "rhizoxin" produced by *Rhizopus chinensis*. *J Antibiot (Tokyo)* 37:354–362.
- James, S. G., C. Holmström, and S. Kjelleberg. 1996. Purification and characterization of a novel antibacterial protein from the marine bacterium D2. *Appl Environ Microbiol* 62:2783–2788.
- Jansen, N. 2012. Isolierung und Charakterisierung von neuen Naturstoffen aus marinen Pilzen. Kiel, Christian-Albrechts-Universität, Diss., 2012.
- Jensen, P. R., and W. Fenical. 1994. Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: ecological perspectives. *Annu Rev Microbiol* 48:559–584.
- Jensen, P. R., and W. Fenical. 2000. Marine microorganisms and drug discovery: current status and future potential. Pages 6–29 *In* N. Fusetani, editor. *Drugs from the Sea*. Karger, Basel.
- Jousset, A., E. Lara, L. G. Wall, and C. Valverde. 2006. Secondary metabolites help biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 to escape protozoan grazing. *Appl Environ Microbiol* 72:7083–7090.
- Kalhoefer, D., S. Thole, S. Voget, R. Lehmann, H. Liesegang, A. Wollher, R. Daniel, M. Simon, and T. Brinkhoff. 2011. Comparative genome analysis and genome-guided physiological analysis of *Roseobacter litoralis*. *BMC genomics* 12:324.
- Kalinovskaya, N. I., E. P. Ivanova, Y. V Alexeeva, N. M. Gorshkova, T. A. Kuznetsova, A. S. Dmitrenok, and D. V Nicolau. 2004. Low-molecular-weight, biologically active compounds from marine *Pseudoalteromonas* species. *Curr Microbiol* 48:441–446.
- Kelecom, A. 2002. Secondary metabolites from marine microorganisms. *An Acad Bras Cienc* 74:151–170.
- Kidarsa, T. A., N. C. Goebel, T. M. Zabriskie, and J. E. Loper. 2011. Phloroglucinol mediates cross-talk between the pyoluteorin and 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic pathways in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Mol Microbiol* 81:395–414.
- Kielwein, G. 1971. Die Isolierung und Differenzierung von Pseudomonaden aus Lebensmitteln. *Arch. f. Lebensmittelhyg.* 22:29–37.

- De Kievit, T. R. 2009. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ Microbiol* 11:279–288.
- De Kievit, T. R., R. Gillis, S. Marx, C. Brown, and B. H. Iglewski. 2001. Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Appl Envir Microbiol* 67:1865–1873.
- King, E. O., M. K. Ward, and D. E. Raney. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J Lab Clin Med* 44:301–307.
- Kiyoto, S., Y. Kawai, T. Kawakita, E. Kino, M. Okuhara, U. I, H. Tanaka, M. Hashimoto, H. Terano, and et al. Kohsaka M. 1986. A new antitumor complex, WF-1360, WF-1360A, B, C, D, E and F. *J Antibiot (Tokyo)* 39:762–772.
- Kloepper, J. W., J. Leong, M. Teintze, and M. N. Schroth. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286:885–886.
- Knight, V., J.-J. Sanglier, D. DiTullio, S. Braccili, P. Bonner, J. Waters, D. Hughes, and L. Zhang. 2003. Diversifying microbial natural products for drug discovery. *Appl Microbiol Biotechnol* 62:446–458.
- Koivikko, R., J. Loponen, T. Honkanen, and V. Jormalainen. 2005. Contents of soluble, cell-wall-bound and exuded phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*, with implications on their ecological functions. *J Chem Ecol* 31:195–212.
- Kojiri, K., S. Nakajima, H. Suzuki, A. Okura, and H. Suda. 1993. A new antitumor substance, BE-18591, produced by a streptomycete. I. Fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot* 46:1799–1803.
- Kolb, A., S. Busby, I. I. Buc, S. Garges, and S. Adhya. 1993. Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu Rev Biochem* 62:749–797.
- König, G. M., S. Kehraus, S. F. Seibert, A. Abdel-Lateff, and D. Müller. 2006. Natural products from marine organisms and their associated microbes. *ChemBioChem* 7:229–238.
- Kornmann, P., and P.-H. Sahling. 1977. Meeresalgen von Helgoland. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* 29:1–289.
- Kremer, B. P., and J. W. Markham. 1979. Carbon assimilation by different developmental stages of *Laminaria saccharina*. *Planta* 144:497–501.

- Kretchmer, A., M. Dorgerloh, M. Deeg, and H. Hagenmaier. 1985. The structures of novel insecticidal macrolides: Bafilomycins D and E, and oxohydroolidin. *Agric. Biol. Chem.* 49:2509–2511.
- Kück, U., and G. Wolff. 2009. *Botanisches Grundpraktikum*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5:150–163.
- Laatsch, H. 2007. *Antibase 2007 SciDex - the natural products identifier*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Lachnit, T., M. Blümel, J. Imhoff, and M. Wahl. 2009. Specific epibacterial communities on macroalgae: phylogeny matters more than habitat. *Aquat Biol* 5:181–186.
- Lam, K. S. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Curr Opin Microbiol* 9:245–251.
- Lane, A. L., and J. Kubanek. 2008. Secondary metabolite defenses against pathogens and biofoulers. Pages 229–243 *In* C.D. Amsler, editor. *Algal Chemical Ecology*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Lane, C. 2005. *Molecular investigations in the brown algal order Laminariales*. University of New Brunswick, Canada.
- Lane, C. E., C. Mayes, L. D. Druehl, and G. W. Saunders. 2006. A multi-gene molecular investigation of the kelp (*Laminariales, Phaeophyceae*) supports substantial taxonomic re-organization. *J Phycol* 42:493–512.
- Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. Pages 115–175 *In* E. Stackebrandt and M. Goodfellow, editors. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, New York.
- Larkin, M. a, G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. a McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, and D. G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics (Oxford, England)* 23:2947–2948.
- Laursen, J. B., and J. Nielsen. 2004. Phenazine natural products: biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity. *Chem Rev* 104:1663–1686.
- Laycock, R. a. 1974. The detrital food chain based on seaweeds. I. Bacteria associated with the surface of *Laminaria* fronds. *Mar Biol* 25:223–231.

- Lecointre, G., and H. Guyader. 2006. Eucarya. Pages 100–162 *In* Biosystematik. Springer, Berlin Heidelberg.
- Lederberg, J. 2000. Infectious history. *Science* 288:287–293.
- Lee, O., and P. Qian. 2004. Potential control of bacterial epibiosis on the surface of the sponge *Mycale adhaerens*. *Aquat Microb Ecol* 34:11–21.
- Lee, R. E. 1999. Heterokontophyta, *Phaeophyceae*. Pages 481–557 *In* Phycology, 3rd edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- Lemos, M. L., Toranzo, A. E., and Barja, J. L. 1985. Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal seaweeds. *Microb Ecol* 11:149–163.
- Li, B., and C. T. Walsh. 2010. Identification of the gene cluster for the dithiolopyrrolone antibiotic holomycin in *Streptomyces clavuligerus*. *PNAS* 107:19731–19735.
- Li, J. W.-H., and J. C. Vederas. 2009. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science* 325:161–165.
- Ligon, B. L. 2004. Penicillin: its discovery and early development. *Semin Pediatr Infect Dis* 15:52–57.
- Linares, J. F., I. Gustafsson, F. Baquero, and J. L. Martinez. 2006. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *PNAS* 103:19484–19489.
- Lindquist, N., and W. Fenical. 1991. New tamjamine class alkaloids from the marine ascidian *Atapozoa* sp. and its nudibranch predators. Origin of the tambjamines in *Atapozoa*. *Experientia* 47:504–506.
- Liras, P., and J. F. Martín. 2006. Gene clusters for beta-lactam antibiotics and control of their expression: why have clusters evolved, and from where did they originate? *Int Microbiol* 9:9–19.
- Long, R. A., & Azam, F. 2001. Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 67:4975–4983.
- Loper, J. E., M. D. Henkels, B. T. Shaffer, F. A. Valeriote, and H. Gross. 2008. Isolation and identification of rhizoxin analogs from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 by using a genomic mining strategy. *Appl Environ Microbiol* 74:3085–3093.
- Lory, S., M. Wolfgang, V. Lee, and R. Smith. 2004. The multi-talented bacterial adenylate cyclases. *Int J Med Microbiol* 293:479–482.

- Lugtenberg, B. J., and G. Bloemberg. 2004. Life in the rhizosphere. Pages 403–430 in J.-L. Ramos, editor. *Pseudomonas* Vol. 1. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Lugtenberg, B. J. J., L. Dekkers, and G. V Bloemberg. 2001. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annu Rev Phytopathol* 39:461–490.
- Lugtenberg, B., and F. Kamilova. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63:541–556.
- Maldonado, L. A., J. E. M. Stach, W. Pathom-aree, A. C. Ward, A. T. Bull, and M. Goodfellow. 2005. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie van Leeuwenhoek* 87:11–18.
- Månsson, M. 2011. Discovery of bioactive natural products from marine bacteria. Technical University of Denmark, Kgs. Lyngby, Denmark.
- Martin, P., and R. A. MacLeod. 1984. Observations on the distinction between oligotrophic and eutrophic marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* 47:1017–1022.
- Martinez, A., Castro, A., Dorronsoro, I., and Alonso, M. 2002. Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) inhibitors as new promising drugs for diabetes, neurodegeneration, cancer, and inflammation. *Med Res Rev*, 22:373–384.
- Matz, C., J. S. Webb, P. J. Schupp, S. Y. Phang, A. Penesyan, S. Egan, P. Steinberg, and S. Kjelleberg. 2008. Marine biofilm bacteria evade eukaryotic predation by targeted chemical defense. *PloS one* 3:e2744.
- Maurhofer, M., C. Keel, D. Haas, and G. Défago. 1995. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO with enhanced antibiotic production. *Plant Pathology* 44:40–50.
- Mavrodi, D. V, W. Blankenfeldt, and L. S. Thomashow. 2006. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. *Annu Rev Phytopathol* 44:417–445.
- Mayer, A. M. S., K. B. Glaser, C. Cuevas, R. S. Jacobs, W. Kem, R. D. Little, J. M. McIntosh, D. J. Newman, B. C. Potts, and D. E. Shuster. 2010. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends Pharmacol Sci* 31:255–265.
- Mazure, H. G. F., and J. G. Field. 1980. Density and ecological importance of bacteria on kelp fronds in an upwelling region. *J Exp Mar Biol Ecol* 43:173–182.

- McLeod, H. L., L. S. Murray, J. Wanders, A. Setanoians, M. A. Graham, N. Pavlidis, B. Heinrich, W. W. ten Bokkel Huinink, D. J. Wagener, and S. Aamdal. 1996. Multicentre phase II pharmacological evaluation of rhizoxin. Eortc early clinical studies (ECSG)/pharmacology and molecular mechanisms (PAMM) groups. *Br J Cancer* 74:1944–1948.
- Menezes, C. B. A., R. C. Bonugli-Santos, P. B. Miqueletto, M. R. Z. Passarini, C. H. D. Silva, M. R. Justo, R. R. Leal, F. Fantinatti-Garboggini, V. M. Oliveira, R. G. S. Berlinck, and L. D. Sette. 2010. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. *Microbiol Res* 165:466–482.
- Mercado, J. M., R. Carmona, and F. X. Niell. 1998. *Bryozoans* increase available CO₂ for photosynthesis in *Gelidium sesquipedale* (Rhodophyceae). *J Phycol* 34:925–927.
- Meslet-Cladière, L., L. Delage, C. J-J Leroux, S. Goulitquer, C. Leblanc, E. Creis, E. A. Gall, V. Stiger-Pouvreau, M. Czjzek, and P. Potin. 2013. Structure/function analysis of a type III polyketide synthase in the brown alga *Ectocarpus siliculosus* reveals a biochemical pathway in phlorotannin monomer biosynthesis. *Plant Cell* 25:3089–3103.
- Miller, M. B., and B. L. Bassler. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55:165–199.
- Molinski, T. F. 2010. NMR of natural products at the “nanomole-scale”. *Nat Prod Rep* 27:321–329.
- Molinski, T. F., D. S. Dalisay, S. L. Lievens, and J. P. Saludes. 2009. Drug development from marine natural products. *Nat Rev Drug Discov* 8:69–85.
- Mondol, M. A. M., H. J. Shin, and M. T. Islam. 2013. Diversity of secondary metabolites from marine *Bacillus* species: chemistry and biological activity. *Mar Drugs* 11:2846–2872.
- Montalvo, N. F., N. M. Mohamed, J. J. Enticknap, and R. T. Hill. 2005. Novel actinobacteria from marine sponges. *Antonie van Leeuwenhoek* 87:29–36.
- Moore, E., and B. Tindall. 2006. Nonmedical: *Pseudomonas*. Pages 646–703 *In* M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt, editors. *The Prokaryotes*. Springer New York.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb* 51:263–273.

- Muyzer, G., E. C. De Waal, and A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59:695–700.
- Nagel, K., I. Schneemann, I. Kajahn, A. Labes, J. Wiese, and J. Imhoff. 2012. Beneficial effects of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing pseudomonads on the marine alga *Saccharina latissima*. *Aquat Microb Ecol* 67:239–249.
- Naruse, N., O. Tenmyo, S. Kobaru, H. Kamei, T. Miyaki, M. Konishi, and T. Oki. 1990. Pumilacidin, a complex of new antiviral antibiotics. Production, isolation, chemical properties, structure and biological activity. *J Antibiot (Tokyo)* 43:267–280.
- Nealson, K. H., T. Platt, and J. W. Hastings. 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* 104:313–322.
- Neuhaus, C. M., M. Liniger, M. Stieger, and K.-H. Altmann. 2013. Totalsynthese des Tubulinhemmers WF-1360F über eine durch Ringschluss-Alkinmetathese vermittelte Makrocyclisierung. *Angew Chem* 125:5978–5983.
- Newman, D., G. Cragg, and C. Battershill. 2009. Therapeutic agents from the sea: biodiversity, chemo-evolutionary insight and advances to the end of Darwin's 200th year. *Diving Hyperb Med* 39:216–225.
- Newman, D. J. 2008. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? *J Med Chem* 51:2589–2599.
- Newman, D. J., and G. M. Cragg. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* 70:461–477.
- Newman, D. J., and G. M. Cragg. 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* 75:311–335.
- Nowak-Thompson, B., S. J. Gould, J. Kraus, and J. E. Loper. 1994. Production of 2,4-diacetylphloroglucinol by the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Can J Microbiol* 40:1064–1066.
- Von Nussbaum, F., M. Brands, B. Hinzen, S. Weigand, and D. Häbich. 2006. Antibakterielle Naturstoffe in der medizinischen Chemie – Exodus oder Renaissance? *Angewandte Chemie* 118:5194–5254.
- Obluchinskaya, E. D. 2008. Comparative chemical composition of the Barents Sea brown algae. *Appl Biochem Microbiol* 44:305–309.

- Ohlendorf, B., D. Schulz, A. Erhard, K. Nagel, and J. F. Imhoff. 2012. Geranylphenazinediol, an acetylcholinesterase inhibitor produced by a *Streptomyces* species. *J Nat Prod* 75:1400–1404.
- Ohnishi, Y., H. Yamazaki, J.-Y. Kato, A. Tomono, and S. Horinouchi. 2005. AdpA, a central transcriptional regulator in the A-factor regulatory cascade that leads to morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 69:431–439.
- Okamura, K. 1977. Holomycin and *N*-propionylholothin, antibiotics produced by a cephamycin C producer (Notes). *J Antibiot* 30:334–336.
- Okazaki, T., T. Kitahara, and Y. Okami. 1975. Studies on marine microorganisms. IV. A new antibiotic SS-228 Y produced by *Chainia* isolated from shallow sea mud. *J Antibiot* 28:176–184.
- Oliva, B., A. O'Neill, J. M. Wilson, P. J. O'Hanlon, and I. Chopra. 2001. Antimicrobial properties and mode of action of the pyrrothine holomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 45:532–539.
- Oliver, J. 2000. The public health significance of viable but nonculturable bacteria. Pages 277–300 *In* R. Colwell and D. J. Grimes, editors. *Nonculturable Microorganisms in the Environment*. Springer US.
- Oliver, J. D. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* 43:93–100.
- Oltmanns, F. 1922. *Morphologie und Biologie der Algen*, II. Band. Pages 450. G. Fischer, Jena.
- Ottow, J. C. G. 2011a. Physiko-Chemie und Mikrobiologie der Rhizosphäre. Pages 431–454 *Mikrobiologie von Böden*. Springer Berlin Heidelberg.
- Ottow, J. C. G. 2011b. *Mikrobiologie von Böden: Biodiversität, Ökophysiologie und Metagenomik*. Springer Berlin Heidelberg.
- Overmann, J. 2013. Principles of enrichment, isolation, cultivation, and preservation of prokaryotes. Pages 149–207 *In* *The Prokaryotes*. Springer Berlin Heidelberg.
- Pal Singh, I., and S. B. Bharate. 2006. Phloroglucinol compounds of natural origin. *Nat Prod Rep* 23:558–591.
- Palleroni, N. 1993. *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of gram-negative bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 64:231–251.

- Palleroni, N., and M. Doudoroff. 1972. Some properties and taxonomic sub-divisions of the genus *Pseudomonas*. *Annu Rev of Phytopathol* 10:73–100.
- Partida-Martinez, L. P., and C. Hertweck. 2005. Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. *Nature* 437:884–888.
- Paul, S. M., D. S. Mytelka, C. T. Dunwiddie, C. C. Persinger, B. H. Munos, S. R. Lindborg, and A. L. Schacht. 2010. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat Rev Drug Discov* 9:203–214.
- Paulsen, I. T., C. M. Press, J. Ravel, D. Y. Kobayashi, G. S. a Myers, D. V Mavrodi, R. T. DeBoy, R. Seshadri, Q. Ren, R. Madupu, R. J. Dodson, a S. Durkin, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, S. a Sullivan, M. J. Rosovitz, M. L. Gwinn, L. Zhou, D. J. Schneider, S. W. Cartinhour, W. C. Nelson, J. Weidman, K. Watkins, K. Tran, H. Khouri, E. a Pierson, L. S. Pierson, L. S. Thomashow, and J. E. Loper. 2005. Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nat Biotechnol* 23:873–878.
- Peix, A., M.-H. Ramírez-Bahena, and E. Velázquez. 2009. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect Genet Evol* 9:1132–1147.
- Penesyan, A., S. Kjelleberg, and S. Egan. 2010. Development of novel drugs from marine surface associated microorganisms. *Mar Drugs* 8:438–459.
- Perriere, G., and M. Gouy. 1996. WWW-query: an on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie* 78:364–369.
- Pettit, R. K. 2009. Mixed fermentation for natural product drug discovery. *Appl Microbiol Biotechnol* 83:19–25.
- PharmaMar. 2013. Five compounds under clinical development, Abgerufen: Oktober 2013. <http://www.pharmamar.com/products-professionals.aspx>.
- Piel, J. 2004. Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat Prod Rep* 21:519–538.
- Piel, J. 2006. Bacterial symbionts: prospects for the sustainable production of invertebrate-derived pharmaceuticals. *Curr Med Chem* 13:39–50.
- Piel, J. 2009. Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat Prod Rep* 26:338–362.

- Piel, J. 2011. Approaches to capturing and designing biologically active small molecules produced by uncultured microbes. *Annu Rev Microbiol* 65:431–453.
- Pinchuk, I. V., P. Bressollier, B. Verneuil, B. Fenet, I. B. Sorokulova, F. Mégraud, and M. C. Urdaci. 2001. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 is due to secretion of antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 45:3156–3161.
- Potin, P., K. Bouarab, J.-P. Salaün, G. Pohnert, and B. Kloareg. 2002. Biotic interactions of marine algae. *Curr Opin Plant Biol* 5:308–317.
- Proksch, P., R. A. Edrada, and R. Ebel. 2002. Drugs from the seas - current status and microbiological implications. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:125–134.
- Pulcini, C., K. Bush, W. A. Craig, N. Frimodt-Møller, M. L. Grayson, J. W. Mouton, J. Turnidge, S. Harbarth, and I. C. Gyssens. 2012. Forgotten antibiotics: an inventory in Europe, the United States, Canada, and Australia. *Clin Infect Dis* 54:268–274.
- Qin, Z., A. T. Baker, A. Raab, S. Huang, T. Wang, Y. Yu, M. Jaspars, C. J. Secombes, and H. Deng. 2013. The fish pathogen *Yersinia ruckeri* produces holomycin and uses an RNA methyltransferase for self-resistance. *J Biol Chem* 288:14688–97.
- Raaijmakers, J. M., and M. Mazzola. 2012. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 50:403–424.
- Raaijmakers, J. M., M. Vlami, D. Souza, and J. T. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* 81:537–547.
- Ramette, A., M. Frapolli, M. Fischer-Le Saux, C. Gruffaz, J.-M. Meyer, G. Défago, L. Sutra, and Y. Moënne-Loccoz. 2011. *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Syst Appl Microbiol* 34:180–188.
- Rao, D., J. S. Webb, C. Holmström, R. Case, A. Low, P. Steinberg, and S. Kjelleberg. 2007. Low densities of epiphytic bacteria from the marine alga *Ulva australis* inhibit settlement of fouling organisms. *Appl Environ Microbiol* 73:7844–7852.
- Rappé, M. S., and S. J. Giovannoni. 2003. The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol* 57:369–394.

- Raven, P. H., R. F. Evert, and S. E. Eichhorn. 2006. *Biologie der Pflanzen*. Pages 942 (T. Friedl, Ed.). De Gruyter, Berlin, Boston.
- Rico, A., and G. M. Preston. 2008. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 uses constitutive and apoplast-induced nutrient assimilation pathways to catabolize nutrients that are abundant in the tomato apoplast. *APS* 21:269–282.
- Rigali, S., F. Titgemeyer, S. Barends, S. Mulder, A. W. Thomae, D. A. Hopwood, and G. P. van Wezel. 2008. Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO reports* 9:670–675.
- Roemer, T., J. Davies, G. Giaever, and C. Nislow. 2012. Bugs, drugs and chemical genomics. *Nat Chem Biol* 8:46–56.
- Rorrer, G. L., and D. P. Cheney. 2004. Bioprocess engineering of cell and tissue cultures for marine seaweeds. *Aquac Eng* 32:11–41.
- Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425.
- Sambrook J., Fritsch E. F. , Maniatis T., Russell R. W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sands, D. C., and A. D. Rovira. 1970. Isolation of fluorescent pseudomonads with a selective medium. *Appl Microbiol* 20:513–514.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* 74:5463–5467.
- Sarafianos, S. G., Marchand, B., Das, K., Himmel, D. M., Parniak, M. A., Hughes, S. H., and Arnold, E. 2009. Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition. *J Mol Biol* 385:693–713.
- Sawabe, T., Y. Ezura, and T. Kimura. 1992. Characterization of an alginolytic marine bacterium from decaying Rishiri-kombu *Laminaria japonica* var. *ochotensis*. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 58:141–145.
- Sawabe, T., H. Makino, M. Tatsumi, K. Nakano, K. Tajima, M. M. Iqbal, I. Yumoto, Y. Ezura, and R. Christen. 1998. *Pseudoalteromonas bacteriolytica* sp. nov., a marine bacterium that is the causative agent of red spot disease of *Laminaria japonica*. *Int J Syst Bacteriol* 48:769–774.
- Sawabe, T., R. Tanaka, M. M. Iqbal, K. Tajima, Y. Ezura, E. P. Ivanova, and R. Christen. 2000. Assignment of *Alteromonas elyakovii* KMM

- 162T and five strains isolated from spot-wounded fronds of *Laminaria japonica* to *Pseudoalteromonas elyakovii* comb. nov. and the extended description of the species. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:265–271.
- Schaffelke, B., A. F. Peters, and T. B. H. Reusch. 1996. Factors influencing depth distribution of soft bottom inhabiting *Laminaria saccharina* (L.) Lamour. in Kiel Bay, Western Baltic. Pages 117–123 *In* Fifteenth International Seaweed Symposium. Springer Netherlands.
- Scherlach, K., L. P. Partida-Martinez, H. Dahse, and C. Hertweck. 2006. Antimitotic rhizoxin derivatives from a cultured bacterial endosymbiont of the rice pathogenic fungus *Rhizopus microsporus*. *JACS* 128:11529–11536.
- Schimana, J., M. Walker, A. Zeeck, and H. P. Fiedler. 2001. Simocyclinones: diversity of metabolites is dependent on fermentation conditions. *J Ind Microbiol Biotechnol* 27:144–148.
- Schmidt, E. W. 2005. From chemical structure to environmental biosynthetic pathways: navigating marine invertebrate-bacteria associations. *Trends Biotechnol* 23:437–440.
- Schneemann, I., I. Kajahn, B. Ohlendorf, H. Zinecker, A. Erhard, K. Nagel, J. Wiese, and J. F. Imhoff. 2010. Mayamycin, a cytotoxic polyketide from a *Streptomyces* strain isolated from the marine sponge *Halichondria panicea*. *J Nat Prod* 73:1309–1312.
- Schnider-Keel, U., A. Seematter, M. Maurhofer, C. Blumer, B. Duffy, G. Bonnefoy, R. C., N. C., D. R., and H. G. 2000. Autoinduction of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and repression by the bacterial metabolites salicylate and pyoluteorin. *J Bacteriol* 182:1215–1225.
- Schroth, M., D. Hildebrand, and N. Panopoulos. 2006. Phytopathogenic pseudomonads and related plant-associated pseudomonads. Pages 714–740 *in* M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt, editors. *The Prokaryotes*. Springer New York.
- Schulz, D., P. Beese, B. Ohlendorf, A. Erhard, H. Zinecker, C. Dorador, and J. F. Imhoff. 2011. Abenquines A-D: aminoquinone derivatives produced by *Streptomyces* sp. strain DB634. *J Antibiot* 64:763–768.
- Schut, F., R. A. Prins, and J. C. Gottschal. 1997. Oligotrophy and pelagic marine bacteria: facts and fiction. *Aquat Microb Ecol* 12:177–202.
- Shibata, T., Y. Hama, T. Miyasaki, M. Ito, and T. Nakamura. 2006. Extracellular secretion of phenolic substances from living brown algae. *J Appl Phycol* 18:787–794.

- Singh, L. S., S. Mazumder, and T. C. Bora. 2009. Optimisation of process parameters for growth and bioactive metabolite produced by a salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete, *Streptomyces tanashiensis* strain A2D. *J Mycol Med* 19:225–233.
- Sneed, J. M., & Pohnert, G. 2011. The green macroalga *Dictyosphaeria ocellata* influences the structure of the bacterioplankton community through differential effects on individual bacterial phylotypes. *FEMS Microbiol Ecol* 75:242-254.
- Sonntag, Hans-Günther. 2012. Infektionskrankheiten weltweit: Epidemiologie, Erfassung, Surveillance. In: Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen Pages 433-447. Springer Berlin Heidelberg.
- De Souza, J. T., C. Arnould, C. Deulvot, P. Lemanceau, V. Gianinazzi-Pearson, and J. M. Raaijmakers. 2003. Effect of 2,4-diacetylphloroglucinol on *Pythium*: cellular responses and variation in sensitivity among propagules and species. *Phytopathology* 93:966–975.
- Spiers, A., A. Buckling, and P. Rainey. 2000. The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology* 146:2345–2350.
- Spížek, J., J. Novotná, T. Rezanka, and A. L. Demain. 2010. Do we need new antibiotics? The search for new targets and new compounds. *J Ind Microbiol Biot* 37:1241–1248.
- Stanier, R. Y., N. J. Palleroni, and M. Doudoroff. 1966. The aerobic pseudomonads a taxonomic study. *Microbiology* 43:159–271.
- Staufenberger, T., V. Thiel, J. Wiese, and J. F. Imhoff. 2008. Phylogenetic analysis of bacteria associated with *Laminaria saccharina*. *FEMS Microbiol Ecol* 64:65–77.
- Steinhoff, F. S. 2010. Phlorotannins as UV-protective substances in early developmental stages of brown algae. Bremen, Univ., Diss., 2010.
- Syldatk, C. 2006. Mikrobielle Stoffproduktion. Pages 305–313 *In* Angewandte Mikrobiologie. Springer Berlin Heidelberg.
- Takahashi, M., S. Iwasaki, H. Kobayashi, S. Okuda, T. Murai, Y. Sato, T. Haraguchi-Hiraoka, and H. Nagano. 1987. Studies on macrocyclic lactone antibiotics. XI. Antimitotic and antitubulin activity of new antitumor antibiotics, rhizoxin and its homologues. *J Antibiot* 40:66–72.

- Tata, M., and A. S. Menawat. 1994. Cyclic AMP regulation of tylosin biosynthesis and secondary metabolism in *Streptomyces fradiae*. *Biotechnol Bioeng* 44:283–290.
- Tatusova, T. A., and T. L. Madden. 1999. BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett* 174:247–250.
- Taylor, M. W., P. J. Schupp, I. Dahllöf, S. Kjelleberg, and P. D. Steinberg. 2004. Host specificity in marine sponge-associated bacteria, and potential implications for marine microbial diversity. *Environ Microbiol* 6:121–130.
- Thiel, V., S. C. Neulinger, T. Staufenger, R. Schmaljohann, and J. F. Imhoff. 2007. Spatial distribution of sponge-associated bacteria in the Mediterranean sponge *Tethya aurantium*. *FEMS Microbiol Ecol* 59:47–63.
- Thomas, T., F. F. Evans, D. Schleheck, A. Mai-Prochnow, C. Burke, A. Penesyan, D. S. Dalisay, S. Stelzer-Braid, N. Saunders, J. Johnson, S. Ferreira, S. Kjelleberg, and S. Egan. 2008. Analysis of the *Pseudoalteromonas tunicata* genome reveals properties of a surface-associated life style in the marine environment. *PLoS One* 3:e3252.
- Thoms, C., M. Horn, M. Wagner, U. Hentschel, and P. Proksch. 2003. Monitoring microbial diversity and natural product profiles of the sponge *Aplysina cavernicola* following transplantation. *Mar Biol* 142:685–692.
- Tolker-Nielsen, T., and S. Molin. 2004. The biofilm lifestyle of pseudomonads. Pages 547–571 in J.-L. Ramos, editor. *Pseudomonas*. Springer US.
- Tran, H., A. Ficke, T. Asiimwe, M. Höfte, and J. M. Raaijmakers. 2007. Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. *New Phytol* 175:731–742.
- Ulber, R., and K. Soyez. 2004. 5000 Jahre Biotechnologie: Vom Wein zum Penicillin. *Chemie in unserer Zeit* 38:172–180.
- Unson, M., N. Holland, and D. Faulkner. 1994. A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue. *Mar Biol* 119:1–11.
- Vynne, N. G., M. Månsson, K. F. Nielsen, and L. Gram. 2011. Bioactivity, chemical profiling, and 16S rRNA-based phylogeny of

- Pseudoalteromonas* strains collected on a global research cruise. *Mar Biotechnol* 13:1062–1073.
- Wagenaar, M. M. 2008. Pre-fractionated microbial samples – the second generation natural products library at Wyeth. *Molecules* 13:1406–1426.
- Wahl, M. 1989. Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. *Mar Ecol Prog Ser* 58:175–189.
- Wahl, M., F. Goecke, A. Labes, S. Dobretsov, and F. Weinberger. 2012. The second skin: ecological role of epibiotic biofilms on marine organisms. *Front Microbiol* 3:292.
- Wahl, M., and O. Mark. 1999. The predominantly facultative nature of epibiosis: experimental and observational evidence. *Mar Ecol Prog Ser* 187:59–66.
- Walls, J., D. Ritz, and A. Blackman. 1993. Fouling, surface bacteria and antibacterial agents of four bryozoan species found in Tasmania, Australia. *J Exp Mar Biol Ecol* 169:1–13.
- Ward, D. M., Weller, R., and Bateson, M. M. 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* 345:63–65.
- Waters, C. M., and B. L. Bassler. 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:319–346.
- Watve, M. G., R. Tickoo, M. M. Jog, and B. D. Bhole. 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch Microbiol* 176:386–390.
- Weller, D. M. 2007. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology* 97:250–256.
- Weller, D. M., B. B. Landa, O. V Mavrodi, K. L. Schroeder, L. De La Fuente, S. Blouin Bankhead, R. Allende Molar, R. F. Bonsall, D. V Mavrodi, and L. S. Thomashow. 2007. Role of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots. *Plant Biology* 9:4–20.
- Werner, G., H. Hagenmaier, H. Drautz, A. Baumgartner, and H. Zähler. 1984. Metabolic products of microorganisms. 224. Bafilomycins, a new group of macrolide antibiotics. Production, isolation, chemical structure and biological activity. *J Antibiot (Tokyo)* 37:110–117.
- Weyland, H. 1969. Actinomycetes in North Sea and Atlantic Ocean sediments. *Nature* 223:858.

- Wiese, J., V. Thiel, A. Gärtner, R. Schmaljohann, and J. F. Imhoff. 2009a. *Kiloniella laminariae* gen. nov., sp. nov., an alphaproteobacterium from the marine macroalga *Laminaria saccharina*. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:350–356.
- Wiese, J., V. Thiel, K. Nagel, T. Staufenberger, and J. F. Imhoff. 2009b. Diversity of antibiotic-active bacteria associated with the brown alga *Laminaria saccharina* from the Baltic Sea. *Mar Biotechnol* 11:287–300.
- Wietz, M., M. Mansson, C. H. Gotfredsen, T. O. Larsen, and L. Gram. 2010. Antibacterial compounds from marine *Vibrionaceae* isolated on a global expedition. *Mar Drugs* 8:2946–2960.
- Wietz, M., M. Mansson, N. G. Vynne, and L. Gram. 2013. Small-molecule antibiotics from marine bacteria and strategies to prevent rediscovery of known compounds. Pages 127–143 *In* K. Se-Kwon, editor. *Marine Microbiology: Bioactive compounds and biotechnological applications* First Edit. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Winson, M. K., S. Swift, L. Fish, J. P. Throup, F. Jørgensen, S. R. Chhabra, B. W. Bycroft, P. Williams, and G. S. A. B. Stewart. 1998. Construction and analysis of *luxCDABE*-based plasmid sensors for investigating *N*-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS Microbiol Lett* 163:185–192.
- Winter, J. M., S. Behnken, and C. Hertweck. 2011. Genomics-inspired discovery of natural products. *Curr Opin Chem Biol* 15:22–31.
- World Health Organization. 2011. "Fact sheet No. 310: the top 10 causes of death. October 2008."
- Yan, L., K. G. Boyd, D. R. Adams, and J. G. Burgess. 2003. Biofilm-specific cross-species induction of antimicrobial compounds in Bacilli. *Appl Environ Microbiol* 69:3719–3727.
- Yu, Z., Zhao, L. X., Jiang, C. L., Duan, Y., Wong, L., Carver, K. C., Schuler, L. A. and Shen, B. 2011. Bafilomycins produced by an endophytic actinomycete *Streptomyces* sp. YIM56209. *J Antibiot*, 64:159-162.
- Yumoto, I., Y. Ezura, and T. Kimura. 1989. Distribution of the *Alteromonas* sp., the causative agent of red-spots on the culture bed of makonbu *Laminaria japonica*, in the coastal area of Funaka Bay [Japan]. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 55:453–462.
- Zha, W., S. B. Rubin-Pitel, and H. Zhao. 2006. Characterization of the substrate specificity of PhID, a type III polyketide synthase from *Pseudomonas fluorescens*. *J Biol Chem* 281:32036–32047.

Zhang, Z. Y. 2001. Protein tyrosine phosphatases: prospects for therapeutics. *Curr Opin Chem Biol* 5:416-423.

ZoBell, C. E. 1941. Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. *J Mar Res* 4:42-75.

9 Anhang

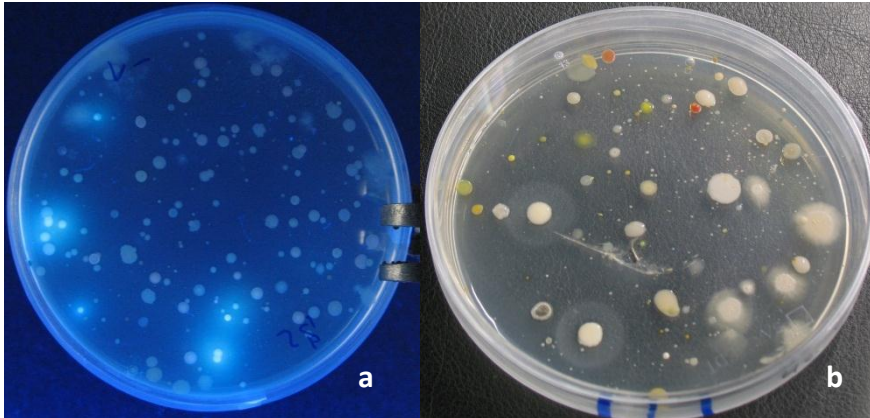


Abbildung 43: Makroskopische Aufnahme von zwei Petrischalen. a: Sedimentprobe Nr. 2 auf *Pseudomonas*-Medium ausplattiert und für 34 Stunden bei 28 °C kultiviert; Verdünnungsstufe 10^{-1} . b: Rhizoid der Alge Nr. 4 auf *Pseudomonas*-Medium ausplattiert; Verdünnungsstufe 10^0 , die Kultivierung erfolgte für 34 Stunden bei 28 °C und anschließend für fünf Tage bei 18 °C.

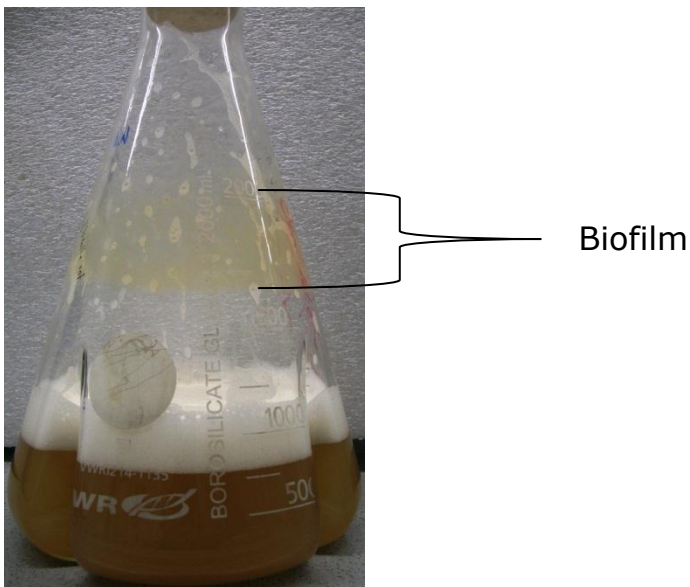


Abbildung 44: Makroskopische Aufnahme von Stamm LD120 in einem 2 L-Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen. Die Kultivierung erfolgte für 36 Stunden bei 16 °C in MB-Medium.

Tabelle 38: Kultivierungsbedingungen der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Experimente in Erlenmeyerkolben durchgeführt.

Stamm	Volumen (mL)	Gefäß (mL)	Schüttlergeschwindigkeit (rpm)	Temperatur (°C)	Medium	Dauer (d)	Vorkultur
LB084	100	300	130	28	SP	2/3/7	Agarplatte 10 d bei RT ~ 1 cm ²
LD81	1000	2000	120	28	MB	2/6/7/8	MB-Agarplatte 7 d bei RT ~ 2 cm ²
LB034	11x1000	2000	120	28	MB	7	MB-Agarplatte 2 d bei 28 °C ~ 2 cm ²
LB058	12x1000	2000 [†]	120	28	GYM4	3	^a
LB114	100	300	120	28	GYM4	9	1 Kryokugel
LB129	11x1000	2000	120	28	GYM4	4	^a
LB152	12x1000	2000 [†]	120	28	GYM4	11	GYM4-Agarplatte 14 d bei RT ~ 2 cm ²
LB012	1000	2000	120	28	TM	2/3	^c
LB012	12x1000	2000	120	28	TM	2	^b
LB012	1000	2000	120	28	GYM4	2	^c
LD120	10x1000	2000	120	28	TM	2	MB-Agarplatte 30 d bei RT ~ 2 cm ²
LB042	1000	2000 [‡]	120	28	TM/GYM	1/2/3/7	GYM-Agarplatte 3 d bei RT ~ 2 cm ²
LB061	25	100	120	28	TSB/MB/GYM4	7	^e
LB061	1000	2000 [‡]	120	28	TSB/MB/GYM	1/2/3/7	MB-Agarplatte 3 d bei 28 °C ~ 2 cm ²
LD120	25	100	120	28	TSB/MB/GYM4	7	^e

Stamm	Volumen (mL)	Gefäß (mL)	Schüttlergeschwindigkeit (rpm)	Temperatur (°C)	Medium	Dauer (d)	Vorkultur
LD120	100	300	120	30	MB/TM	1	MB-Agarplatte 7 d bei 30 °C ~ 1 cm ²
LD120	1000	2000	120	16	MB	6-336 h	MB-Agarplatte 10 d bei RT ~ 2 cm ²
LD81	25	100	120	28	TSB/MB/GYM4	7	e
LB114	25	100	120	28	TSB/MB/GYM4	7	f
LD81	25	100	120	28	MB*	7	gut gewachsene MB-Agarplatte
LB183		Agarplatte	Stand	28	MB	7	1 Kryokugel
LB184		Agarplatte	Stand	28	MB	7	1 Kryokugel
LB185		Agarplatte	Stand	28	MB	7	1 Kryokugel
LB042		Agarplatte	Stand	28	MB	7	1 Kryokugel
LB043		Agarplatte	Stand	28	MB	7	1 Kryokugel
LB044		Agarplatte	Stand	28	MB	7	1 Kryokugel
LB045		Agarplatte	Stand	28	MB	7	1 Kryokugel
LB046		Agarplatte	Stand	28	MB	7	1 Kryokugel
LB047		Agarplatte	Stand	28	MB	7	1 Kryokugel
LB048		Agarplatte	Stand	28	MB	7	1 Kryokugel
LB051		Agarplatte	Stand	28	MB	7	1 Kryokugel
LB054		Agarplatte	Stand	28	MB	7	1 Kryokugel

Stamm	Volumen (mL)	Gefäß (mL)	Schüttlergeschwindigkeit (rpm)	Temperatur (°C)	Medium	Dauer (d)	Vorkultur
LB061		Agarplatte	Stand	28	MB	7	1 Kryokugel
LB062		Agarplatte	Stand	28	MB	7	1 Kryokugel
LB063		Agarplatte	Stand	28	MB	7	1 Kryokugel

^a VK: 1 Kryokugel in 100 mL GYM4 in 300 mL-Erlenmeyerkolben 3 Tage bei 28 °C und 120 rpm -> 1 %

^b VK: 1 Kryokugel in 100 mL TM in 300 mL-Erlenmeyerkolben 1 Tage bei 28 °C und 120 rpm -> 5 %

^c VK: 1 Kryokugel in 100 mL TM/GYM4 in 300 mL-Erlenmeyerkolben 1Tage bei 28 °C und 120 rpm -> 5 %

^e VK: Von MB-Agarplatte mittels Impföse in 25 mL MB-Medium (100 mL Erlenmeyerkolben) 1 Tag bei 28 °C und 120 rpm. Daraus 200 µL.

^f VK: Von MB-Agarplatte mittels Impföse in 25 mL MB-Medium (100 mL Erlenmeyerkolben) 5 Tage bei 28 °C und 120 rpm. Daraus 200 µL.

[†] Kolben mit einer Schikane, [‡] Kolben mit vier Schikanen

* MB-Medium mit verschiedenen Zusätzen. A: 10 µM Putrescin, B: 20 nM Putrescin, C: 10 µM Homoserinlacton, D: 20 nM Homoserinlacton, E: 10 µM cAMP, F: 20 nM cAMP

Tabelle 39: Vergleich der Substratverwertung von *Pseudomonas* sp. LD120 und *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 mittels BIOLOG GN2 Mikrotiterplatten^a.

Substrat	Pf-5	LD120
D-fructose	+	+
α -D-glucose	+	+
D-mannose	w	+
pyruvic acid methyl ester	w	+
acetic acid	+	+
cis-aconitic acid	+	+
citric acid	+	+
D-gluconic acid	+	+
β -hydroxybutyric acid	+	+
α -ketoglutaric acid	+	+
D,L-lactic acid	+	+
succinic acid	w ^c	+
bromosuccinic acid	+	+
L-asparagine	+	+
L-aspartic acid	+	+
L-glutamic acid	+	+
L-proline	+	+
γ -aminobutyric acid	+	+
glycerol	+	+
L-arabinose	w ^y	w
D-galactose	-	w
sucrose	+	+
succinic acid mono-methyl ester	-	+
formic acid	+	w
D-galactonic acid lactone	-	-
malonic acid	+	+
quinic acid	w ^c	+
succinamic acid	+ ^c	-
inosine	+	+
uridine	-	w
tween 40	+	+
D-arabitol	-	-
m-inositol	- ^{c,d}	+
D-mannitol	+ ^y	-
D-sorbitol	-	-
D-psicose	w	w

Substrat	Pf-5	LD120
D-galacturonic acid	-	-
glucosaminic acid	-	-
D-glucuronic acid	-	-
D-saccharic acid	-	-
glycogen	W	W
glucuronamide	-	-
L-alaninamide	W	+
D-alanine	W	+
L-alanine	W	+
L-alanyl-glycine	W	+
glycyl-L-glutamic acid	-	+
L-histidine	+	+
L-leucine	+	+
L-ornithine	-	+
D-serine	-	W
L-serine	W	W
L-threonine	-	+
dextrin	-	-
tween 80	W	+
i-erythritol	_{-c,d}	-
D-raffinose	-	-
D-trehalose	+	+
turanose	-	-
γ -hydroxybutyric acid	-	+ ^y
α -ketobutyric acid	-	W
α -ketovaleric acid	_{-c,d}	+
propionic acid	+	+
L-pyroglutamic acid	+ ^y	W
D,L-carnitine	-	+
urocanic acid	+	+
D,L- α -glycerol phosphate	W	+
adonitol	-	-
xylitol	-	-
2-aminoethanol	+	+
2,3-butanediol	-	-
D-cellobiose	-	_{-c}
maltose	-	-
α -hydroxybutyric acid	+	+

Substrat	Pf-5	LD120
p-hydroxy-phenylacetic acid	+ ^y	+
itaconic acid	+	-
sebacic acid	w	+
N-acetyl-D-glucosamine	w	+
glycyl-L-aspartic acid	-	-
hydroxy-L-proline	+	+
phenylethylamine	-	-
L-phenylalanine	-	w
putrescine	+	+
D-glucose-6-phosphate	w	+
α -cyclodextrin	-	-
L-fucose	-	-
gentiobiose	-	w
α -D-lactose	- ^{c,d}	-
lactulose	-	-
D-melibiose	-	w
β -methyl-D-glucoside	-	-
L-rhamnose	-	-
N-acetyl-D-galactosamine	-	-
thymidine	-	-
α -D-glucose-1-phosphate	-	-

^a Stamm LD120 wurde 24 h bei 28 °C auf LB-Agarplatten inkubiert und anschließend in steriler 0,85 %iger NaCl-Lösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf eine OD₆₂₀ von 0,28 vor dem Beimpfen der BIOLOG GN2 Mikrotiterplatten eingestellt. Der Umsatz bzw. die Oxidation des Substrats wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 620 nm mittels Farbumschlag im Medium gemessen, welcher durch die Reduktion des Tetrazoliumviolets hervorgerufen wird. Es wurden mindestens 2 Parallelen durchgeführt. +: Wachstum war positiv (OD₆₂₀ > 0,2), -: Wachstum war negativ (OD₆₂₀ < 0,05), w: Wachstum schwach positiv (0,2 > OD₆₂₀ < 0,05), ^c Der Mittelwert ist (w oder -), aber die einzelnen Parallelen ergaben unterschiedliche Ergebnisse (w/-), ^d Eine Parallele ergab eine OD₆₂₀ > 0,05, aber es gab keinen Farbumschlag, ^y Aufgrund der hohen Siderophorproduktion war der Farbumschlag nicht deutlich sichtbar.

10 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
<i>A.b.</i>	<i>Algicola bacteriolytica</i>
Acc.-No.	Accession-Number
AchE	Acetylcholinesterase
ACN	Acetonitril
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B.c.</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
blast	Basic Local Alignment Search Tool
blastn	Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
<i>B.s.</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
<i>C.a.</i>	<i>Candida albicans</i>
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaCO ₃	Calciumcarbonat
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
<i>C.g.</i>	<i>Candida glabrata</i>
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COSY	correlated spectroscopy
DAD	Photodioden-Array-Detektor
DAPG	Diacetylphloroglucinol
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E.a.</i>	<i>Erwinia amylovora</i>
<i>E.c.</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraaceticacid
ELISA	Enzym-linked immunosorbent assay
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ESI	Elektrospray-Ionisation
et al.	et alteri
EtOAc	Ethylacetat
FeCitrat	Eisencitrat
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
°C	Grad Celsius
GSK-3β	Glykogensynthase-Kinase 3 beta
GYM	Glucose Yeast Malt
h	hour = Stunde
H ₂ O	Wasser
HBO ₃	Perborsäure
HCL	Salzsäure
HIV-1-RT	Humane Immundefizienz-Virus-1 Reverse Transkriptase
HMBC	heteronuclear multiple bond coherence
HPLC	high performance liquid chromatography = Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

HSQC	heteronuclear single quantum coherence
Hz	Hertz
KBE	Kolonienbildende Einheit
KBr	Kaliumbromid
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KiWiZ	Kieler Wirkstoff-Zentrum
LB	Lysogeny Broth
MAPG	Monoacetylphloroglucinol
MB	Marine Broth
<i>M.c.</i>	<i>Microsporium canis</i>
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MHz	Megahertz
min	Minute(n)
mL	Milliliter
µL	Mikroliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
µM	mikromolar
MS	Masse
mV	Millivolt
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
N	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxyd
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NH ₄ NO ₃	Ammoniumnitrat
n.i.	hat nicht ionisiert
nm	Nanometer
NMR	nuclear magnetic resonance = Kernspinresonanzspektroskopie
NOESY	nuclear overhauser enhancement spectroscopy
NRPS	nicht-ribosomale Peptid-Synthetase
OD ₆₂₀	Optische Dichte bei 620 nm
<i>P.a.</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
PBS	phosphate buffered saline = Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion
PDE4	Phosphodiesterase 4
<i>P.e.</i>	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>
pH	potentia hydrogenii
<i>P.i.</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
PKS	Polyketid-Synthase
PLT	Pyoluteorin
<i>Ps.a.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Ps.fl.</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Ps.s.</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i>
PTFE	Polytetrafluorethylen
PTP1B	Protein Tyrosin Phosphatase 1B

RP-18	Octadecylgruppen
RP-HPLC	reverse phase high performance liquid chromatography
rpm	rounds per minute = Umdrehung pro Minute
rDNA	ribosomal desoxyribonucleic acid = ribosomale Desoxyribonukleinsäure
rRNA	ribosomal ribonucleic acid = ribosomale Ribonukleinsäure
RSD	relative Standardabweichung
<i>R.s.</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>
s	Sekunde
<i>S.e.</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
sh	bezeichnet das Auftreten einer Schulter bei angegebener Wellenlänge
<i>S.l.</i>	<i>Staphylococcus lentus</i>
sp.	species
<i>S.tr.</i>	<i>Septoria tritici</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
<i>T.m.</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
<i>T.r.</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
TSB	tryptic soy broth
UV	Ultraviolett
VIS	visible = sichtbar
w/v	weight per volume
<i>X.c.</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>
z.B.	zum Beispiel

11 Lebenslauf

Kerstin Nagel
geb. am 01.03.1979
Staatsangehörigkeit: deutsch
Wohnort: Fleckeby

Schulbildung

1989-1995 Realschule Kappeln
1995-1998 Berufsbildende Schule „BBZ Schleswig“ in Schleswig
Juni 1998 Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung

1998-2001 Milchwirtschaftliche Laborantin bei der Cremilk in
Kappeln

Studium

September 2001 - Februar 2006 Studium der Biotechnologie-
Verfahrenstechnik an der Fachhochschule Flensburg

März 2005 – November 2005 Experimentelle Diplomarbeit am
Leibniz-Institut für Meereswissenschaften bei Prof. Dr. Johannes
F. Imhoff in der Forschungseinheit Marine Mikrobiologie mit dem
Thema: „Produktionsoptimierung eines von *Penicillium*
chrysogenum gebildeten biologisch aktiven Wirkstoffes“

Januar 2006 fächerübergreifendes Kolloquium

Beruflicher Werdegang

März 2006 – Dezember 2007 Technische Angestellte am Kieler
Wirkstoff-Zentrum in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Johannes F.
Imhoff am Leibniz-Institut für Meereswissenschaften in Kiel

Studium

Januar 2008 - April 2011 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der
Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Johannes F. Imhoff in der For-
schungseinheit Marine Mikrobiologie am Leibniz-Institut für Mee-
reswissenschaften in Kiel