

LS

Z 802



**BERICHTE**

aus dem

**I N S T I T U T F Ü R M E E R E S K U N D E**

an der

**CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT · K I E L**

DOI.3289/IFM-BER - 269

**Nr. 269**

**Der Einfluß von Umweltfaktoren auf die  
Bildung von exopolymerer Substanz (EP) durch  
ein marines Bakterium**

---

**1995**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
vorgelegt von Susanne Heise, 1995

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Gerlach und Herrn Prof. Chapman für die Bereitstellung von Räumlichkeiten und für die finanzielle Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Prof. Kjelleberg ermöglichte mir den Arbeitsaufenthalt in der Abteilung Allgemeine Mikrobiologie in Göteborg. Ihm und den Mitgliedern der Interface-Gruppe, insbesondere Jürgen Östling, danke ich für die Einführung in die Methode der Transposoninsertionsmutagenese.

Rolf Schmaljohann und Hermann Sich danke ich für ihre tatkräftige Kooperation bei den REM-Aufnahmen, Uwe Rabsch und Petra Krischker für ein angenehmes Arbeiten im Isotopenlabor, dem ruhigsten Raum des Instituts in den letzten zwei Jahren.

Mein Dank geht auch an Frau Domeyer vom GEOMAR, die mir den Zugang zum dortigen AAS kurzfristig ermöglichte, und an Herrn Lippke von der Hydrogeologie, der viele der Metallmessungen betreute.

Wolfgang Ahlf und Wolfgang Calmano von der TUHH liehen mir die säulenchromatographischen Geräte und eine solide Anaerobenkammer, die mir vermutlich noch lange erhalten bleiben wird. Jochen Gruber von der TUHH bin ich sehr dankbar für seine wissenschaftliche und moralische Unterstützung, wo es um Metallspeziationen ging.

Peter Fritsche ist mit seiner außergewöhnlichen Hilfsbereitschaft häufig die letzte Rettung gewesen, ebenso wie Volker Martens, dessen Befähigung zum "Trouble shooter" ein Technik-bedingtes, experimentelles Chaos mehr als einmal verhinderte.

Mein besonderer Dank gilt jedoch Herrn Priv.-Doz. Dr. Reichardt, dessen internationale Betreuung einmalig war. Ich danke ihm für seine Anregungen, seine konstruktive Kritik und für sein Engagement für die Arbeitsgruppe Marine Sedimentmikrobiologie, das selbst extremsten Umweltfaktoren und Entfernungen standhielt.

Erst durch die anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe Ingeborg Bussmann und Levent Piker wurde das Arbeiten in einem Bunker angenehm, überraschend und innovativ. Ihnen sowie Peter Krost und Nils Rix möchte ich für das Korrekturlesen der Arbeit und zahlreiche wichtige Hinweise danken.

Vielen Dank möchte ich schließlich denen sagen, die für mich durch ihre Anwesenheit in den letzten Jahren ein Lichtblick waren.

.....die Faszination der Schleime .....



**Bakterielle Exopolymere, aus der Nähe betrachtet!**

(Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer FL2-Kultur, eingebettet in exopolymere Matrix. Vergrößerung 20000, — 500 nm; Exopolymere durch die Präparation teilweise dehydriert)

## Verzeichnis der Abkürzungen

3M	Marines Minimal Medium
3M/G	Marines Minimal Medium ohne Glukose-Zusatz
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
BATH	"Bacterial Adhesion to Hydrocarbons" - Methode zur Bestimmung der Hydrophobizität von Zelloberflächen
Corg	organischer Kohlenstoff
EP	Extrazelluläre Polymere
EPS	Extrazelluläre Polysaccharide
FL2	Bakterienisolat aus einer Ostseemuschel, bei dem es sich vermutlich um <i>Vibrio anguillarum</i> Typ 1 handelt. Es wurde in der vorliegenden Arbeit als Modellorganismus verwendet.
HIC	"Hydrophobic Interaction Chromatography" - Methode zur Bestimmung der Hydrophobizität von Zelloberflächen
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
NSS	"Nine Salt Solution" - Mineralmedium
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PHM	Phosphat-Harnstoff-Magnesium-Puffer
SAT	"Salt Aggregation Test" - Methode zur Bestimmung der Hydrophobizität von Zelloberflächen
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat

## **Summary**

A bacterium isolated from the Baltic Sea was used to determine the influence of growth-limiting factors like carbon and/or oxygen starvation on the production of exopolymeric substances (EP). The isolate "FL2" was classified to be a "*Vibrio anguillarum*" which was suitable to be taken as a model organism because of the abundance and significant role Vibrios play in the marine environment.

Of high interest in this study was the importance of exopolymers, that were produced under various conditions, for adhesion and detoxification of heavy metals.

## **Results**

1. The qualitative and quantitative composition of bacterial extracellular polymers that were produced by the test organism "FL2" changed depending on the nutrient supply.

The highest amount of exopolymers was excreted during late logarithmic phase, 90 % of which were polysaccharides. Under carbon starvation the protein content of the exopolymers increased to more than 50 %.

2. Long lasting oxygen deprivation increased the amount of proteins in the exopolymers.

This increase was steeper under anaerobic than under aerobic conditions. After 30 hrs of incubation in a medium limited by oxygen and carbon, proteins amounted for 98 % of exopolymers while aerobic, starving conditions led to only 50 % protein in exopolymeric substance after 50 hrs.

The different composition may lead to conformational changes of the exopolymers and therewith influence diffusion qualities or the exposure of specific proteinaceous oxygen-binding components.

## **Function of polymers**

### **3. The exopolymeric proteins partly showed enzymatic activity.**

Evidence was given for haemo-, chitino- and proteolytic activity. Proteolytic enzymes were more active under aerobic conditions while chitinolytic enzyme activity was higher in the absence of oxygen due to a longer persistence of chitinolytic enzymes which has been described before. This keeps the energy-demanding *de novo* synthesis under carbon and oxygen starvation on a low level.

### **4. The components of investigated polymers had different metal binding capacities.**

Copper ions were strongly bound by proteins, cadmium ions by polysaccharides.

### **5. The exopolymer-mediated, irreversible adhesion increased under anaerobic conditions.**

Due to steric effects exopolymers may play an important role in adhesion. Cells, which were nonmotile under carbon and oxygen starvation, showed an increased tendency to adhere to glass surfaces. For that repulsive electrostatic forces had to be overcome by hydrophobic interactions, e.g. by the presence of anaerobically induced exopolymeric proteins.

Generally the adhesion to surfaces enables bacterial cells to come into contact with e.g. oxygen enriched water masses, while they usually are bound to the water body they are floating in.

## **Formation of detoxifying exopolymers before exposure to heavy metals**

### **6. The exopolymer-components had a preadaptive detoxifying capability.**

The toxicity of the heavy metal ions  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  depended under aerobic and anaerobic conditions on the concentration of binding EP-components. Toxicity of copper as shown by the inhibition of glucose mineralization and thymidin-incorporation was higher under aerobic low EP-protein conditions and reduced under anaerobic high EP-protein conditions.

### **7. Copper- and perhaps cadmium-ions function as uncoupler of the respiratory chain.**

Added copper concentrations of  $3.1 \mu\text{M}$  to aerobic cultures stimulated respiratory activity. Incubation with  $\text{Cu}^{2+}$  or  $\text{Cd}^{2+}$  for several days and ongoing inhibition of *de novo* -synthesis of proteins resulted in slightly increased respiration and reduced incorporation. This points to an uncoupling effect on respiration and ATP-synthesis and therefore on anabolic and catabolic reactions.

## **Metal-induced changes of the exopolymers**

**8. The adaptation to increased heavy metal concentrations was characterized by a change in exopolymer structure.**

Increased metal concentrations of 19 ( $\text{Cd}^{2+}$ ), 21 ( $\text{Co}^{2+}$ ) and 31 ( $\text{Cu}^{2+}$ ), respectively, led to enhanced exopolymer production. The amount of utilizable energy determined whether proteins or polysaccharides were synthesized: The more energy-demanding protein synthesis was restricted to aerobic conditions. Here the protein-content of exopolymers increased by one order of magnitude. Under anaerobic conditions the synthesis of polysaccharides increased by factor ten, while the protein content did not change significantly.

**9. Newly synthesized proteins served as heavy metal detoxifying molecules.**

Incorporation of glucose and release of  $\text{CO}_2$  was strongly reduced in the presence of heavy metals, if a *de novo* synthesis of proteins was inhibited.

Heavy metal induced proteins had a molecular weight of 32000 and 19000 or 23000, respectively. This supports the findings of other authors who found similar molecular weights for copper binding proteins of *Vibrio*.

Also high molecular weight molecules with 200000 in aerobic cultures, and 112000 and 231000 in anaerobic experiments were isolated in this study. Protein finger prints of exopolymers, produced in the presence of different heavy metals, didn't differ in aerobic experiments. Under anaerobic conditions, however, several proteins were detected that were induced only by copper (MW: 112000, 133000 and several from 168000 to 231000) and could not be seen with cadmium- or cobalt- ions.

**10. Metall ions in the medium had an influence on adhesion of "FL2" to surfaces.**

Added cobalt ions increased adhesion of the test bacterium, probably because 18 % of the ions were not complexed and positioned themselves between the negative surfaces of the bacterial cells and the glass surfaces.

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
2. Material und Methoden .....	5
2.1. Beschreibung und Identifizierung des Testorganismus FL2 .....	5
2.2. Kultivierung des Testorganismus und beschreibende Untersuchungen.....	7
2.2.1. Minimal-Medien zur Kultivierung von FL2.....	7
2.2.2. Aerobe Inkubation.....	7
2.2.3. Anaerobe Inkubation.....	7
2.2.4. Ansatz von Hungerkulturen.....	8
2.2.5. Eingesetzte Metallsalzlösungen: .....	9
2.2.6. Metalladaptierung von Kulturen .....	9
2.2.7. Zellzählungen und Biomassebestimmungen.....	9
2.2.8. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen .....	10
2.3. Analytische Methoden.....	10
2.3.1. Extraktion von Exopolymeren.....	10
2.3.2. Biochemische Analysen.....	11
2.3.3. Säulenchromatographie.....	12
2.3.4. Bestimmung der Metallspeziationen im Medium .....	12
2.3.5. Messung von Metallkonzentrationen mit Atom-Absorptions-Spektrometrie.....	13
2.3.6. Thymidin-Inkorporationsmethode.....	15
2.3.7. Umsatz von <sup>14</sup> C-Glucose .....	16
2.3.8. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	17
2.3.9. Polychromatische Silberfärbung .....	18
2.3.10. Bestimmung extrazellulärer Enzymaktivitäten.....	19
2.3.11. Messung der Hydrophobizität von Zellen und Exopolymeren .....	20
3. Ergebnisse .....	21
3.1. Methodische Untersuchungen.....	21
3.1.1. Exopolymeranalyse.....	21
3.1.2. Berechnung von Metallspeziationen in Bakterienkulturen mit Hilfe des MacuQL-Programms.....	22
3.1.3. Eignung des Mediums.....	23
3.1.4. Abtrennung der EP aus Zellsuspensionen.....	24
3.1.5. Zelluläre Proteinkonzentrationen bei unterschiedlich langen Inkubationen unter Substrat-Mangelbedingungen.....	25

3.2. Produktion von extrazellulären Polymeren.....	28
3.2.1. EP-Produktion bei Entzug der C <sub>Org</sub> -Quelle .....	28
3.2.2. Einfluß von Anaerobiose auf die EP-Produktion unter C <sub>Org</sub> -Mangel.....	31
3.2.3. Vergleich der Exopolymerausscheidung bei aerober und anaerober Inkubation.....	32
3.2.4. Zusammenfassung der Ergebnisse Kapitel 3.2. ....	35
3.3. Einfluß von Schwermetallen.....	36
3.3.1. Bestimmung der Konzentration von Metallspezies im "Marine Minimal Medium".....	36
3.3.2. Die Wirkung kurzzeitiger Schwermetallexposition (30 min) auf den Zellmetabolismus.....	38
3.3.3. Die Wirkung anhaltender Schwermetall-Exposition (> 20 Stunden) auf die Zellphysiologie und EP-Zusammensetzung.....	44
3.3.4. Die Metallbindungskapazität der EP-Komponenten .....	51
3.3.5. Entgiftende Funktion der Proteine bei Metallstreß .....	56
3.3.6. Veränderung der EP-Protein-Fingerprints durch Inkubation mit Metallen.....	57
3.3.7. Einfluß von Metallionen auf extrazelluläre Protease-Aktivitäten hungernder Bakterien .....	59
3.4. Adhäsion von Bakterien.....	61
3.4.1. Hydrophobizität der Zellen .....	61
3.4.2. Adhäsionstendenz hungernder Bakterien .....	63
3.4.3. Rasterelektronenmikroskopische Beobachtungen.....	66
3.4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse Kapitel 3.4.....	66
4. Diskussion.....	68
4.1. EP-Produktion durch marine Bakterien: Vibrios als Modellfall .....	68
4.1.1. Bakterielle Exopolymere - Funktion, Struktur und Bildung .....	69
4.1.2. Anpassung copiotropher Bakterien an das oligotrophe Milieu.....	70
4.1.3. Die Ökologie von <i>Vibrio anguillarum</i> .....	71
4.2. Veränderung der Bildung und Funktion von Exopolymeren in Abhängigkeit von der Sauerstoffverfügbarkeit.....	73
4.2.1. EP-Produktion während der Wachstumsphase.....	73
4.2.2. EP-Produktion unter C <sub>Org</sub> -Mangelbedingungen.....	73
4.2.3. Exopolymere Proteine mit enzymatischer Aktivität .....	74

4.2.4. Entgiftung von Metallionen.....	76
4.2.5. Adhäsion unter Hungerbedingungen und Hydrophobizität.....	77
4.3. Der Einfluß von Schwermetallen auf die Exopolymersekretion .....	83
4.3.1. Ökochemie und Ökotoxizität von Schwermetallen unter besonderer Berücksichtigung von Kupfer, Kadmium und Kobalt.....	83
4.3.2. Wirkung von kurzzeitiger Schwermetallexposition auf DNA-Replikation und Mineralisierungsleistung von FL2.....	86
4.3.3. Adaptive Effekte: die Reaktion von FL2 auf längerfristige Metallexposition.....	88
4.3.4. Schutzfunktion der induzierten Proteine.....	91
4.3.5. Einfluß der Metalle auf das Adhäsionsverhalten.....	92
5. Zusammenfassung .....	94
6. Literatur.....	97
7. Anhang	

# 1. Einleitung

Bakterien spielen im Meer eine bedeutende Rolle bei der Remineralisierung von Detritus. In der Detritus-Nahrungskette von Primärproduzenten über freigesetzte gelöste organische Substanz (DOM) zu Aggregaten und durch deren Aufnahme zu den Metazoen (Mann 1988), sind es die Aggregate u.a. in Form von "Marine Snow" (Herndl 1988) (Riebesell 1992) und "Lake Snow" (Grossart und Simon 1993) oder "Transparent Exopolymer Particles" (TEP) (Alldredge, et al. 1993), die in den letzten Jahren als Ort konzentrierter bakterieller Umsetzungen Gegenstand intensiver Forschungstätigkeit waren. Nach Alber und Valiella (1994) kann bis zu einem Drittel des von Makrophyten und Phytoplankton freigesetzten gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) potentiell abiotisch oder biotisch in Aggregate transformiert werden. Diese sind jedoch immer in großer Dichte von Bakterien besiedelt und von extrazellulären Polymeren bedeckt.

Bei der Besiedlung von Oberflächen kann die Assoziation von Bakterien mit exopolymerer Substanz zur Ausbildung sogenannter Biofilme von mehreren  $\mu\text{m}$  Dicke führen. Sie bilden ein Consortium meist vieler verschiedener Bakterienarten, das aufgrund der auf kleinstem Raum vereinigten physiologischen Kapazitäten und der multifunktionellen Exopolymer-schicht Eigenschaften hat, die denen der freilebenden Mikrobenpopulation nicht vergleichbar sind (Bryers 1992): Mit der stark hydratisierten Schleimschicht (Glykokalyx) in Biofilmen oder Aggregaten besitzen die Bakterien einen Reaktionsraum, in dem sie die physikalischen Bedingungen (z.B. osmotischer Wert, pH) konstant halten und extrazelluläre Enzyme wirken lassen können. Die Schleimschicht bietet den Bakterien Schutz gegen toxische Substanzen wie Schwermetalle, gegen UV-Strahlung, Austrocknung und Fraß (Decho 1990). Während mehrere Autoren davon ausgehen, daß 90% der Mikroorganismen mit Oberflächen assoziiert sind (Harvey und Young 1980, Lappin-Scott und Costerton 1989), kommen Azam und Hodson (1977) sowie Cho und Azam (1988) zu dem Schluß, daß mehr als 95% der mesopelagischen Bakterien freilebend sind, bzw. 90 % der mikrobiellen heterotrophen Aktivität im Meer auf nicht-adsorbierte Bakterien zurückzuführen sind. Demgegenüber schätzt Herndl (1988), daß 70% der Mineralisierungsaktivität der nördlichen Adria im Sommer auf Partikel-assoziierte Bakterien zurückgeht.

Derartige Einschätzungen werden dadurch erschwert, daß die Erfassung von Mikroorganismen, die an pelagische Aggregate adsorbiert sind, durch deren Fragilität problematisch ist.

Bei allen Interaktionsprozessen der Bakterien mit ihrer Umwelt und insbesondere bei der Adhäsion an Grenzflächen und der Adsorption von gelöster organischer Substanz scheinen extrazelluläre Polymere eine vermittelnde Rolle zu spielen: Aufgrund sterischer Effekte kann es je nach ihrer Konzentration und Verteilung zu einer Abstoßung oder Anziehung der Oberflächen kommen (Neu und Marshall 1990). Eine wichtige Rolle spielen sie jedoch auch nach erfolgter Adhäsion: Nach der Kolonisierung einer Oberfläche kommt es zur Produktion einer Exopolymermatrix und damit zur Ausbildung des Biofilms (Marshall 1992).

Für die Mikroorganismen bietet die Existenz in Biofilmen eine Möglichkeit, auch unter nährstoffarmen Bedingungen zu existieren. Der Gehalt an organischem Kohlenstoff im Ozean liegt zwischen 0.3 und 1.2 mg/l (Morita 1982, Morita 1984). Pakulski und Benner (1994) bestimmten den Anteil an Kohlenhydraten am DOC in den Ozeanen als  $21 \pm 7\%$ , wovon ca. 12% biologisch verfügbar sind (Gocke, et al. 1981). Für "copiotrophe" (Poindexter 1981) Bakterien, die an ein hohes Nährstoffangebot adaptiert sind, aber dennoch einen hohen Prozentsatz der marinen Bakterienpopulation bilden (Carlucci, et al. 1986), reicht die verfügbare Energiemenge nicht aus, um zu wachsen und zu reproduzieren. Sie befinden sich in einem "starvation survival"-Zustand mit verringerter metabolischer Aktivität, da sie den "oligotrophen" (Poindexter 1981) Bakterien mit hoher Substrataffinität aber geringer Umsatzgeschwindigkeit unterlegen sind.

Im wässrigen Milieu erfolgt jedoch selbst, wenn der absolute Gehalt an organischen Molekülen gering ist, ein Konzentrationsprozeß an Grenzflächen, der rein physikalischer Art ist (Baier 1984). Dabei adsorbieren als erstes geladene Substrate wie Aminosäuren und Zucker, aber auch Substanzen mit hydrophoben Anteilen wie Fettsäuren und Glycoproteine (Marshall 1980). Dieser organische Film kann die Anlagerung von Mikroorganismen erleichtern (Kefford und Marshall 1984), und Dawson et al. (1981) diskutieren die Adhäsion von hungrigen Bakterien als "Taktik", dem Substrat-Mangel zu entgehen, indem sie an die Oberfläche gebundene Moleküle nutzen.

Dennoch: Die physiologische Reaktion auf Adhäsion ist sehr unterschiedlich, wie Experimente mit Bakterienkulturen zeigen: Es werden an Oberflächen erhöhte Wachstumsraten (Fletcher 1986), erhöhte Respiration (Stotzky und Rem 1966) und höhere Aktivität (Hermansson und Marshall 1985, Kefford, et al. 1982) gemessen, aber auch entgegengesetzte Beobachtungen können gemacht werden (Gordon, et al. 1983, Gordon und Millero 1985, Stucki und Alexander 1987).

Neben der Adhäsion ist auch die Desorption an die Produktion von Polymeren gekoppelt: Es werden neben bestimmten Enzymen Moleküle, z.B. Polysaccharide oder amphiphile Polymere, exkretiert, die auf der Oberfläche verbleiben und als "Detachment footprints" - Desorptions-Fußabdrücke - bezeichnet werden (Neu 1992).

Dieses läßt die Hypothese zu, daß Bakterien über die Fähigkeit verfügen, die sie umgebende Exopolymer-Schicht in Abhängigkeit umgebungsspezifischer oder physiologischer Parameter funktionell zu modifizieren. Abe et al. (1984) stellten fest, daß sich die während der logarithmischen und der stationären Phase vom gleichen Stamm produzierten Exopolymere in ihrer Zusammensetzung unterscheiden können. Auch die Zusammensetzung des Mediums und physikalische Faktoren der Umgebung wie Temperatur (Fletcher und Floodgate 1973) und osmotischer Druck (Deretic, et al. 1989) wurden als beeinflussende Faktoren erwähnt. Meist werden jedoch - insbesondere im Hinblick auf technologische Nutzungen - Veränderung der Exopolymer-Produktion in quantitativer Hinsicht gewünscht und die Ausbeute durch das Angebot spezieller Zucker oder auf gentechnologischem Wege für die pharmazeutische und Nahrungsmittelindustrie gesteigert (Weiner, et al. 1985). Qualitative Veränderungen sind nicht gewünscht und treten wohl auch kaum auf, da die Kulturen meist im exponentiellen Wachstum gehalten werden.

Im marinen Milieu dagegen macht der "starvation survival"-Zustand Effektivität der Stoffwechselleistungen zur Überlebensgrundlage, zumal diese "häufigste" Streßsituation von weiteren Faktoren begleitet werden kann wie z.B. Sauerstoffmangel in Arealen mit geringem Wasseraustausch oder auch eine Belastung des Wassers mit Schwermetallen, deren Anreicherung in und Diffusion aus dem Sediment eine beständige Exposition gewährleisten können.

Wie und ob überhaupt solche äußeren Faktoren die Exopolymer-Bildung beeinflussen, ist kaum erforscht. Erfüllen ihre Komponenten z. B. unterschiedliche Funktionen, und ändert sich ihre Zusammensetzung als Reaktion auf äußere Reize, wie z.B. erhöhte Schwermetallkonzentrationen? Kann die Exopolymersynthese quantitativ gesteuert werden: Wird sie z.B. unter Sauerstoff-reduzierten Bedingungen verringert, da die geringere Diffusivität von Sauerstoff<sup>1</sup> in der Schleimschicht eine Versorgung der Zellen zusätzlich erschweren würde? Wird durch die Exopolymerbildung das Adhäsionsverhalten der Bakterien derart beeinflusst, daß durch den Übergang in eine pelagische Lebensweise ungünstige Umweltbedingungen vermieden werden können?

---

<sup>1</sup>Quotient der Diffusionskoeffizienten Sauerstoff/Wasser = 0.7 (Characklis, et al. 1990)

Derartige Kausalzusammenhänge zwischen Umweltfaktoren und bakterieller Physiologie lassen sich nur im Rahmen eines reduktionistischen Ansatzes erfassen, in dem durch gezielte Änderung einzelner Faktoren deren Auswirkung auf den Teststamm untersucht wird. Stellvertretend für die Vielzahl der heterotrophen, fakultativ anaeroben Bakterien im marinen System wurde hierfür ein Vertreter der häufigen Gattung *Vibrio* untersucht, der aus der Ostsee isoliert worden war (Heise 1990, Heise und Reichardt 1991).

An diesem Stamm wurden einzeln und additiv die Auswirkungen verschiedener Umweltfaktoren auf die Exopolymerproduktion getestet. Es stand zur Diskussion, inwieweit die exopolymeren Schichten funktionell mitverantwortlich sind für die Aufrechterhaltung einer bakteriellen Aktivität bei sich ändernden Umweltverhältnissen. Weiterführend stellte sich die Frage, ob in der Konsequenz eine energetisch aufwendige Modifizierung der Exopolymere als Reaktion auf sich ändernde abiotische Faktoren von Bakterien initiiert werden kann.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Beschreibung und Identifizierung des Testorganismus FL2

Bei FL2 handelt es sich um einen Gram-negativen, copiotrophen *Vibrio* mit einem Zellvolumen von 1.1 bis 1.4  $\mu\text{m}^3$  in der exponentiellen Wachstumsphase. Es wurde aus der Leibeshöhlenflüssigkeit von *Arctica islandica* aus der Ostsee isoliert und ist in der Lage, aufgrund physiologischer Veränderungen, die zu einem "starvation survival" führen, über die Zeit von Langzeitversuchen hinaus (8 Wochen) ohne organische Kohlenstoffquellen zu überleben. Dabei wird das Zellvolumen auf weniger als 0.1  $\mu\text{m}^3$  reduziert, gleichzeitig die Proteinkonzentration in der Zelle erhöht, was auf die Bildung spezifischer "starvation survival"-Proteine hindeutet (Heise 1990). Als fakultativ anaerobes Bakterium überlebt FL2 auch Kohlenstoff-limitierte Bedingungen unter Sauerstoff-Mangel, allerdings mit einer erheblich verringerten Lebensfähigkeit: Die Lebendzellzahlen nehmen anfänglich um 3 Größenordnungen innerhalb von 8 Tagen auf anschließend konstante Werte bis zum Ende des Versuches ab (Heise und Reichardt 1991).

Positive Oxidase-Reaktion und fermentativer Glukose-Abbau im O/F-Test wiesen auf die Zugehörigkeit zur Familie *Vibrionaceae* hin (nach (West und Colwell 1984)). Weitere Untersuchungen auf Mobilität (mikroskopisch), Wachstum auf TCBS-Agar und Sensitivität gegenüber 10  $\mu\text{g}$  -Disks mit O/129-Vibriostatikum (Spira 1984), kein Wachstum in Medien mit weniger als 5 g/l NaCl und die Produktion von Arginin-Dihydrolase im Gegensatz zu Lysin-Dekarboxylase und Ornithin-Decarboxylase (West und Colwell 1984) ließen vermuten, daß es sich um *Vibrio anguillarum* Typ I handelte (Heise 1990). Zur weiteren Analyse wurden API 20E -Analysestreifen (BIOMÉRIEUX), die von Kent (1982) und Maugeri et al. (1983) zur Identifizierung fischpathogener Bakterien vorgeschlagen wurden, eingesetzt.

Zellsuspensionen in NaCl-Lösung (20 ‰) ergaben auf API 20E-Teststreifen ein Profil (Tab. 1), das dem von Maugeri et al. (1983) für *Vibrio anguillarum* publizierten entsprach und damit die früher aufgrund von Analyseergebnissen getroffene Hypothese, daß es sich um dieses fischpathogene Bakterium handele, unterstützte.

Tab. 1: Durchgeführte Tests zur Identifizierung von FL2 und ihre Ergebnisse

eingesetztes Substrat	Reaktion/Enzyme	Testergebnis
Ortho-Nitro-Phenyl-Galactosid	$\beta$ -Galactosidase	+
Arginin	Arginindihydrolase	+
Lysin	Lysindecaboxylase	-
Ornithin	Ornithindecaboxylase	-
Natriumcitrat	Citratabbau	-
Natriumthiosulfat	H <sub>2</sub> S-Produktion	-
Harnstoff	Urease	-
Tryptophan	Tryptophandesaminase	-
Tryptophan	Indolproduktion	-
Natriumpyruvat	Acetoinproduktion	v
Kohngelatine	Gelatinase	+
Glucose	Fermentation/Oxidation	+
Mannit	Fermentation/Oxidation	+
Inosit	Fermentation/Oxidation	-
Sorbit	Fermentation/Oxidation	-
Rhamnose	Fermentation/Oxidation	-
Saccharose	Fermentation/Oxidation	+
Melibiose	Fermentation/Oxidation	-
Amygdalin	Fermentation/Oxidation	+
Arabinose	Fermentation/Oxidation	-
Filterpapier	Cytochromoxidase	+

(+: positive Reaktion; -: keine Reaktion; V: Variabel)

## 2.2. Kultivierung des Testorganismus und beschreibende Untersuchungen

### 2.2.1.. Minimal-Medien zur Kultivierung von FL2

#### 2.2.1.1. *Marines Minimal Medium ("3M") nach Östling, et al. (1991)* (siehe Anhang)

Das "3M" besteht aus einer Salzlösung aus 9 Komponenten ("Nine salt solution"), versetzt mit MOPS<sup>1</sup>-Puffer, Tricin<sup>2</sup>-Eisen-Lösung, Phosphat-, Ammoniumchlorid- und Glukoselösung. Der pH liegt bei 7.8.

#### 2.2.1.2. *Hungermedium*

Als "Hungermedium" wurde das "Marine Minimal Medium" (2.2.1.1.) ohne Glukose-Zusatz verwendet ("3M/GLU")

#### 2.2.1.3. *Hungermedium für die Untersuchung der Schwermetallwirkung*

Auch hier wurde das "Marine Minimal Medium" verwendet, jedoch neben dem Glukose-Zusatz auch auf die Tricin-Eisenlösung verzichtet, da Tricin als Chelatbildner die Konzentration freier Metallionen herabgesetzt hätte.

### 2.2.2. Aerobe Inkubation

Sauerstoffreiche Bedingungen wurden durch eine große Flüssigkeitsoberfläche (geringes Flüssigkeitsvolumen in großem Gefäß) und der Inkubation auf einem Schütteltisch gewährleistet.

### 2.2.3. Anaerobe Inkubation

Für anaerobe Inkubationen wurde ebenfalls das Marine Mineral Medium verwendet, das aber nach dem Autoklavieren unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre abgekühlt und bei ständiger Begasung mit den zuzusetzenden Lösungen (M bis G bzw. M bis N, siehe Anhang) versehen wurde. Auf eine Zugabe von Reduktionsmitteln wie Dithionit wurde verzichtet, um mögliche Beeinflussungen des bakteriellen Metabolismus auszuschließen.

Vergleichsmessungen, die mit einem O<sub>2</sub>-Pikoampèremeter nach der Methode von Revsbech (1986) durchgeführt wurden (Bau des Pikoampèremeters : Volker Martens,

---

<sup>1</sup> 3-Morpholinopropansulfonsäure (MERCK)

<sup>2</sup> N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-glycine (MERCK)

Institut für Meereskunde Kiel; O<sub>2</sub>-Elektrode: DIAMOND ELEKTRONICS) zeigten, daß der Sauerstoffgehalt in dem begasten Medium auf 19% im Vergleich zu 31% unter aeroben Bedingungen abgesunken war.

Für die Kulturen wurden säuregespülte Gefäße aus Glas oder Polypropylen mit geringer Sauerstoffdurchlässigkeit verwendet. Sie waren entweder mit gasdicht schließenden Aluminiumschraubdeckeln (OCHS) versehen oder unter N<sub>2</sub>-Begasung mit Viton- oder Silikonstopfen (OCHS) verschlossen.

Arbeiten unter anaeroben Bedingungen und Inkubationen von mehreren Wochen wurden in einer Anaerobenkammer oder - bei kleineren Volumina - in einem GasPak<sup>®</sup> System (BBL, Division of Becton, Dickinson und Company) durchgeführt.

Die Anaerobenkammer (Anfertigung der TU Hamburg Harburg, Umbau: Volker Martens, IFM Kiel) wurde mit Formiergas (N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>-Gasgemisch im Verhältnis 90:10) begast und durch die am Katalysator ("Katalysator-Ergänzungs-pack von BBL: Aluminium-Pellets mit 0.5 % Palladium) stattfindende Reduktion von O<sub>2</sub> mit H<sub>2</sub> zu Wasser eine sauerstofffreie Atmosphäre geschaffen.

In dem 3-stufigen Reduktor (Bau: Volker Martens, IFM Kiel) waren zum Schutz des eigentlichen Katalysators eine Schicht Aktivkohle, um entstehenden Schwefelwasserstoff abzufangen, und CaCl<sub>2</sub> als hygroskopisches Mittel hintereinandergeschaltet.

In dem kommerziellen GasPak<sup>®</sup>System verläuft die Reduzierung der Atmosphäre nach dem gleichen Prinzip, nur wird hier zusätzlich eine CO<sub>2</sub>-Atmosphäre erzeugt.

Zur Kontrolle der anaeroben Verhältnisse dienten Flüssigstreifenindikatoren (BBL GasPak<sup>®</sup>System).

#### 2.2.4. Ansatz von Hungerkulturen

Vor dem Entzug der organischen C-Quelle durchliefen die Kulturen jeweils 2 exponentielle Wachstumsphasen (aerob bzw. anaerob) im "Marine Mineral Medium", in denen sich die Zellen an die neue Zusammensetzung des Mediums und evtl. Anoxie anpassen konnten.

In der exponentiellen Phase wurde die Kultur bei 7000 g 20 min abzentrifugiert und in dem entsprechenden Hungermedium (aerob oder anaerob angesetztes 3M/GLU) resuspendiert.

### 2.2.5. Eingesetzte Metallsalzlösungen:

Es wurden folgende Metallstandards angesetzt und durch Autoklavieren sterilisiert:

Kadmium (MERCK):	$3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	5 g/l, entspricht 19 mM $\text{Cd}^{2+}$
Kupfer (MERCK):	$\text{CuSO}_4$	5 g/l, entspricht 31 mM $\text{Cu}^{2+}$
Kobalt (MERCK):	$\text{CoCl}_2$	5 g/l, entspricht 21 mM $\text{Co}^{2+}$ .

Die Arbeitskonzentrationen lagen im Bereich von  $10^{-2}$  bis  $10^2$  mM.

### 2.2.6. Metalladaptierung von Kulturen

Zunächst wurden Kulturen auf 3M-Agarplatten mit einem Gehalt von 0.05 bis 50 mg/l des jeweiligen Metallsalzes aerob und anaerob ausplattiert, um die natürliche Resistenz zu prüfen.

Zur Adaptation an erhöhte Metallkonzentrationen wurden Kulturen jeweils am Ende der exponentiellen Phase in 3M-Flüssigmedien mit stufenweise ansteigenden Metallgehalten überimpft und das Wachstum über die optische Dichte verfolgt.

### 2.2.7. Zellzählungen und Biomassebestimmungen

Die Zellzählung und Biomassebestimmung erfolgte mit Hilfe der Epifluoreszenzmikroskopie nach Anfärbung mit Akridinorange (Zimmermann und Meyer-Reil 1974), verändert nach (Heise 1990). Hierzu wurden die Zellen über einem vorgefärbten Polycarbonatfilter (Nuclepore<sup>®</sup>) mit 0.2  $\mu\text{m}$  Porendurchmesser abfiltriert und anschließend mit 0.01%iger wässriger Akridinorange-Lösung und 0.2% Formaldehyd gefärbt. Der Filter wurde auf Objektträger in Cargille-Ölimmersion (CARGILLE LABORATORIES, USA, Immersionsöl Typ A, kat.Nr. 16482) übertragen. Ausgezählt und ausgemessen wurde unter 1250facher Vergrößerung (Mikroskop LEITZ DIALUX 20, Objektiv NPL FLUOTAR 100) unter Verwendung des Okularnetzes NEW PORTON G12 (GRATICULES LTD.). Zur Auswertung der Zähldaten bzgl. Biomassebestimmung und Größenverteilung wurde ein im Rahmen des mikrobiologischen Ostseemonitorings (Dr. K. O. Kirstein, Abtlg. Marine Mikrobiologie) erstelltes Programm in modifizierter Form<sup>3</sup> benutzt.

---

<sup>3</sup> Das Programm wurde für MacIntosh modifiziert

## 2.2.8. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

Nach einem Vergleich verschiedener Kombinationen von Trocknungs- und Fixierungsmethoden (Lufttrocknung, Kritisch-Punkt-Trocknung, Entwässerung in Ethanol, Formol-Fixierung) ergab sich für die Beobachtung von Exopolymeren das beste Ergebnis bei luftgetrockneten Proben, die anschließend durch einminütige Kathodenzerstäubung bei 20 bis 25 mV in einer Gasionenkammer ("Sputter", BALZERS, SCD 004) mit einer leitenden Schicht aus Gold-Palladium überzogen wurden. Als Rasterelektronenmikroskop wurde ein ZEISS DSM-940 verwendet, fotografiert wurde mit ILFORD FP4-Filmen.

## 2.3. Analytische Methoden

### 2.3.1. Extraktion von Exopolymeren

Um die Exopolymere von den Zellen zu trennen, wurden die Kulturen bei 25000 g, 4 °C, 30 min lang zentrifugiert, der Überstand mit den Polymeren abdekantiert. Zur Ausfällung und Anreicherung wurden 2 verschiedene Methoden verwendet:

a) für quantitative Bestimmungen wurde eine Acetonfällung nach Sutherland und Wilkinson (1971) durchgeführt:

Zum Überstand wurde -80 °C kaltes Aceton im Verhältnis 1:3 gegeben und über Nacht oder mindestens 8 h lang bei 0 °C inkubiert. Die Mischung wurde anschließend bei 7000 g 15 min lang zentrifugiert, das Pellet in superreinem Wasser (Milli-Q) resuspendiert und über Nacht bei 0 °C gegen 25 l demineralisiertes Wasser dialysiert. Die dialysierte Fraktion wurde bei -80 °C eingefroren oder lyophilisiert und bis zur Analyse im Exsikkator aufbewahrt.

b) für die Gelelektrophorese wurden die Proteine ausgesalzen (Hames 1990):

Aus dem Überstand wurden Proteine durch Aufsalzen der Lösung mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  bis auf 95 % und anschließendem, mehrstündigem Rühren ausgefällt. Die Salz-Lösung wurde anschließend bei 10000 g, 10 min, zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde in den Polypropylen-Zentrifugenröhrchen bis zur Verwendung in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese bei -80 °C eingefroren.

## 2.3.2. Biochemische Analysen

Sämtliche photometrischen Analysen wurden mit einem Spektrophotometer UV-160 (SHIMADZU) durchgeführt.

### 2.3.2.1. *Phenol-Schwefelsäure-Methode zur Bestimmung der Gesamtkohlenhydrate nach Dubois et al. (1956)*

In einem 1.5 ml Eppendorf-Cap wurden zu 0.2 ml Probe 0.2 ml einer 5%igen wässrigen Phenol-Lösung gegeben und direkt anschließend 1 ml konzentrierter Schwefelsäure hinzugegeben. Um den Wärmeaustausch zu verhindern, wurden die Caps während der ersten 10 min der folgenden Inkubationsphase in Styropor-Racks aufbewahrt, bevor sie für 15 min im Wasserbad auf 25 °C abgekühlt wurden.

Die Messung erfolgte in Polystyrol-Mikroküvetten bei 488 nm, um primär Hexosen zu erfassen.

### 2.3.2.2. *Bio-Rad Protein-Assay zur Bestimmung von gelösten Proteinkonzentrationen*

Der Bio-Rad Protein-Assay beruht auf der von Bradford (Bradford 1976) beschriebenen Reaktion zwischen Proteinen und dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 bei niedrigem pH-Wert, die eine Verschiebung des Absorptionsmaximums der Lösung von 465 zu 595 nm zur Folge hat.

Er wurde, je nach Bedarf, in zwei Konzentrationsbereichen eingesetzt:

a) als Standard-Assay-Prozedur (SAP): 200 - 1400 µg/ml

Das Farbreagenz (BIORAD), das 55 % Phosphorsäure und 15 % Methanol enthielt, wurde im Verhältnis 1:5 mit Milli-Q Wasser verdünnt und in 5 ml Aliquots zu 0.1 ml Probe gegeben.

b) Micro-Assay-Procedure (MAP): 1 - 25 µg/ml

Im Unterschied zur SAP wurde hier die Probe mit unverdünntem Farbreagenz im Verhältnis 1:5 versetzt.

Die Extinktionen wurden bei 595 nm innerhalb einer Stunde gemessen.

Als Standard wurde Rinderserumalbumin (SIGMA) eingesetzt.

### 2.3.2.3. *Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951)*

In der Variation von Herbert et al. (1971) wurde die Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951) zur Messung von Zellpellets eingesetzt. Um die Zellwände aufzubrechen,

wurde die Probe vor der eigentlichen Proteinbestimmung im Verhältnis 1:2 mit 1N NaOH versetzt und 5 min gekocht.

Für die Proteinbestimmung wurden die abgekühlten Proben mit 2.5 ml Mischreagenz versetzt, das unmittelbar vor Gebrauch aus 50 ml einer Stammlösung (50 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 0.4 g NaK-Tartrat pro 960 ml Aqua dest) und 1 ml einer 1%igen CuSO<sub>4</sub>-Lösung hergestellt wurde. Nach genau 10 min wurden 0.5 ml Folin-Ciocalteu-Reagenz (SIGMA), das 1:2 mit Aqua dest. zur Normalität von 1 verdünnt worden war, zugegeben. Die Extinktion wurde nach mindestens 30 min bei 750 nm gemessen.

Auch hier wurde als Standard Rinderserumalbumin eingesetzt.

#### 2.3.2.4. *Uronsäure-Bestimmung nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973)*

Zu 0.2 ml Probe eisgekühlter Probe wurden 1.2 ml einer H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Na-Tetraborat-Lösung (0.0125 Mol Tetraborat/l konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) gegeben. Nach 5 min im Eisbad wurde die Mischung kräftig gemischt und 5 min gekocht. Nach Abkühlung wurden 20 µl einer 15%igen Biphenyl-2-ol (MERCK) in 0.5%iger NaOH-Lösung zugegeben und die Extinktion nach mindestens 10 min bei 520 nm gemessen. Als Standard wurde Galacturonsäure (2.5 - 100 µg/ml) (MERCK) benutzt.

Da Kohlenhydrate durch Erhitzen mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ebenfalls eine pink/orange Färbung geben, war es notwendig, jeweils einen Blindwert mitzumessen, bei dem Biphenyl-ol durch 0.5%ige NaOH-Lösung ersetzt worden war.

### 2.3.3. Säulenchromatographie

Extrahierte, mit Metallen versetzte Exopolymere wurden zur chromatographischen Auftrennung auf eine Sephacryl-Säule (PHARMACIA), Durchmesser 1.6 cm, gegeben mit einem Gelvolumen von 140 ml Sephacryl S-400HR (PHARMACIA) zur Auftrennung von Molekulargewichten von 20.000 bis 80.000.000 Dalton. Die Eichung erfolgt mit Dextranstandards (73.500 bis 2.000.000 Da)(SIGMA). Das aufgetragene Probenvolumen betrug maximal 1.4 ml.

Eluiert wurde aufsteigend mit einer autoklavierten Lösung von 0.15 mol/l NaCl und 0.01 mol/l Phosphatpuffer (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (pH 7) bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 1 ml/min. Jeweils 3 ml Proben wurden gesammelt und auf Proteine und Kohlenhydrate analysiert.

#### 2.3.4. Bestimmung der Metallspeziationen im Medium

Die vorliegenden Speziationen von Metall-Ionen nach Zugabe von Metallsalzlösungen zum "Marine Minimal Medium" wurden mit Hilfe des Mac $\mu$ QL-Programms<sup>4</sup> (Müller 1993) bestimmt. Die zu der Kalkulation chemischer Gleichgewichte notwendigen Informationen bezüglich entsprechender Gleichgewichtskonstanten wurden aus Smith und Martell, (1990) gewonnen.

Die Berechnung der Ionenstärke erfolgte durch Multiplikation der einzelnen Ionen der Lösung mit dem Quadrat der entsprechenden Ladungszahl, anschließende Summenbildung und Division durch 2 (Andersson, et al. 1986).

#### 2.3.5. Messung von Metallkonzentrationen mit Atom-Absorptions-Spektrometrie

Metallkonzentrationen wurden mit der Graphitofentechnik bestimmt. Proben wurden mit Hilfe einer Mikropipette in ein Graphitrohr überführt (ca 20  $\mu$ l), dort getrocknet, dann thermisch vorbehandelt, um Begleitsubstanzen so weit wie möglich abzutrennen, und anschließend bei höheren Temperaturen (max. ca 3000 K) innerhalb von 1 bis 2 Sekunden in einer Argon-Atmosphäre atomisiert.

Die Genauigkeit der Methode liegt mit Dosiervolumina von 10 bis 50  $\mu$ l im Bereich von  $\mu$ g/ml bis ng/ml (Naumer 1990).

Die Messungen wurden mit einem PERKIN ELMER 4100 ZL durchgeführt.

##### Legende der folgend aufgeführten Temperaturprogramme:

*Step*: Meßschritt

*Temp*: maximal in diesem Meßschritt erreichte Temperatur

*Ramp*: Zeit (s) zum Hochfahren der Temperatur

*Hold*: Zeit (s), in der die maximale Temperatur konstant gehalten wird.

*Gas Flow*: Argon-Durchfluß in ml/min

*Read*: Messung der Absorption

Das eingesetzte Volumen betrug immer 20  $\mu$ l.

Die Kalibrierung erfolgte nach linearer Regression der Eichkurve.

---

<sup>4</sup> Das Programm wurde aus dem ursprünglich in Basic geschriebenen MICROQL von John Westall entwickelt (Westall 1980).

Es wurden folgende Temperaturprogramme benutzt:

*Kupfer:*

Step	Temp	Ramp	Hold	Gas Flow	Read
1	110	1	20	250	
2	130	5	50	250	
3	750	15	20	250	
4	1850	0	5	0	*
5	2400	1	2	250	

Wellenlänge (Peak): 324,8 nm

*Kadmium:*

Step	Temp	Ramp	Hold	Gas Flow	Read
1	110	5	30	250	
2	130	15	50	250	
3	200	10	20	250	
4	1400	0	5	0	*
5	2400	1	2	250	

Wellenlänge (Peak): 228,8

*Kobalt:*

Step	Temp	Ramp	Hold	Gas Flow	Read
1	110	1	20	250	
2	130	15	50	250	
3	1350	10	20	250	
4	2400	0	5	0	*
5	2400	1	2	250	

Wellenlänge (Peak): 242,5 nm

### 2.3.6. Thymidin-Inkorporationsmethode

Die Thymidin-Inkorporationsmethode erfüllt als Methode, bakterielle Replikationsraten zu bestimmen, folgende Kriterien (Moriarty 1986):

1. *Sie ist spezifisch für heterotrophe Bakterien:* Viele Organismen sind in der Lage, Thymidin aufzunehmen, aber erst durch das Enzym Thymidin-Kinase, das das Thymin-Desoxyribosenukleosid in das Thymidin-Monophosphat überführt, wird der sofortige Einbau in die DNA möglich. Da weder Cyanobakterien noch Algen oder Pilze die Kinase besitzen, wird bei kurzzeitiger (30 min)-Inkubation nur die bakterielle Produktivität erfaßt (Moriarty 1986). In diesem Zeitraum findet außerdem kein signifikanter Umbau von Thymidin z.B. zu Uracil statt (Grossart und Simon 1993).

2. *Thymidin-Inkorporation erfolgt auch bei hungernden Bakterien, da Replikationszyklen auch bei Nährstoffmangel initiiert werden* (Mården, et al. 1988).

3. *Sie ist unabhängig von "balanced growth"-Situationen, in denen die Mikroorganismen Zellinhaltsstoffe (z. B. Proteine, RNA, DNA) in gleichem Verhältnis produzieren und die Zellteilungsrate gleich bleibt* (Campbell 1957): Da der Einbau von Thymidin in die DNA fast ausschließlich bei der Replikation erfolgt, und die DNA-Synthese einen Teilungszyklus einleitet, ist die Inkorporationsrate auch unter unausgeglichene Wachstumsbedingungen ein Maß der Zellteilung.

Mit Hilfe der Tdr-Inkorporationsmethode sollte die DNA-Replikationsrate von Bakterien bei Nährstoffmangel unter aeroben und anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Metallen gemessen werden. Es wurden neben den unbehandelten Kontrollen jeweils vier verschiedene Konzentrationen von Kupfersulfat, Kadmiumchlorid und Kobaltchlorid eingesetzt: Endkonzentrationen lagen zwischen 50 µg/l und 500 mg/l.

Die 2 Tage im C<sub>org</sub>-freiem Medium inkubierten Zellen wurden einmal mit dem "Marine Minimal Medium" ohne Glukose- und Tricin-Eisen-Lösung gewaschen und anschließend in diesem Medium resuspendiert, so daß bei den Kulturen eine optische Dichte von ca. 0.2 erreicht wurde. Die Ansätze wurden mit jeweils 1 ml Probe bestückt. Nach der Zugabe der entsprechenden Metall- und, für die Blindwerte, Formolzusätze verstrich eine "Einwirkungszeit" von 30 min bis zum Versetzen mit radioaktivem Thymidin.

Pro Ansatz wurden 20 µl einer 1:10 mit kaltem Thymidin verdünnten [Methyl-<sup>3</sup>H]-Tdr-Lösung (Radioaktivität: 1 mCi/ml, spezifische Aktivität 83 Ci/mmol) in einer

Gesamtkonzentration von 100 nmol Tdr/l zugegeben, um die *de novo*-Synthese zu hemmen (Moriarty 1986). Das entsprach einer Zugabe von 2  $\mu\text{Ci/ml}$ .

Durchgeführt wurden die Inkorporationsmessungen in säuregespülten Polypropylen- bzw. Teflon-Röhrchen. Anaerobe Ansätze wurden mit Viton-Stopfen verschlossen und nach der "Hungate-Technik" (Widdel 1980) mit Stickstoff begast.

Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei 20 °C wurde die Reaktion durch Versetzen mit 100  $\mu\text{l}$  37%igem Formaldehyd (Endkonzentration: 4 %) gestoppt.

Durch 2 Waschvorgänge mit je 3 ml 4%igem Formol (Zentrifugation 15 min bei 3000 g) wurde das nicht inkorporierte Thymidin entfernt (Jürgens und Güde 1990).

Die Säure-Base-Hydrolyse wurde modifiziert nach Findlay et al. (1984) durchgeführt. Der Zellaufschluß wurde durch die Zugabe von je 1 ml (0.3 N) NaOH-(25 mM) EDTA-(0.1%) SDS-Lösung und einer Inkubation von 12 h bei 25 °C erreicht.

Die anschließend in ein Eisbad überführten Proben wurden mit 300  $\mu\text{l}$  1N HCl, 1 ml 10 %iger TCA und 50  $\mu\text{g}$  carrier-DNA versetzt. Nach 30 min, in denen die DNA/Proteinfraktion ausfiel, wurde das Pellet durch Zentrifugation bei 30000 g, 20 min, -10 °C abgetrennt. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit 5%iger TCA gewaschen.

Um die DNA zu extrahieren, wurden die Pellets mit 1 ml 5%iger TCA versetzt und bei 95 °C 30 min extrahiert. Der Überstand wurde nach Abzentrifugieren der proteinösen Bestandteile bei 3000 g, 15 min, in Szintillations-Röhrchen (PACKARD) überführt, mit Lumagel SB (BAKER) versetzt und im Flüssigkeits-Szintillationszähler (PACKARD 1900 CA Tri-Carb Liquid Scintillation Analyzer) gezählt.

### 2.3.7. Umsatz von $^{14}\text{C}$ -Glucose

Bei Messen des Umsatzes von  $^{14}\text{C}$ -markierten, leicht abbaubaren Zuckern dient die C-Quelle als Energiequelle und wird zu  $\text{CO}_2$  umgesetzt (Mineralisierung) oder aber in die Biomasse aufgenommen (Inkorporation, Assimilation). Das Verhältnis von Mineralisierung zu Inkorporation ist u. a. abhängig vom physiologischen Zustand der Zellen (Reichardt und Morita 1982).

Nach Zugabe der radioaktiven Glukose (Spezifische Aktivität und Konzentration in den jeweiligen Versuchen angegeben) zu einem Probenvolumen von 1 ml in Reagenzgläsern aus Glas oder Polypropylen wurden sie mit Septumstopfen verschlossen und 45 min bei 20 °C inkubiert. Die Stopfen waren mit einem Körbchen verbunden, in dem sich ein Filterpapier befand, das nach Ablauf der Inkubationszeit durch ein Septum mit 150  $\mu\text{l}$  Ethanolamin oder Phenyläthylamin versetzt wurde. Durch möglichst gleichzeitiges Ansäuern der Probenlösung mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  auf einen pH von 2 wurde zum einen die Reaktion

gestoppt, zum anderen gelöste Carbonate als CO<sub>2</sub> aus der Lösung ausgetrieben und im Adsorbens-getränkten Papier des Körbchens gebunden.

Mindestens eine Stunde nach Ansäuerung, während der die Proben mehrfach stark geschüttelt worden waren, wurden die Filterpapiere mit Lumagel im Szintillationszähler gemessen. Die Anteile des nicht umgesetzten bzw. inkorporierten Glukoseanteils konnten durch Zentrifugation der Proben und Messung der Radioaktivität im Überstand bzw. in den in Milli-Q resuspendierten Pellets bestimmt werden.

### 2.3.8. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit Probenpuffer aus SDS (2%), 2-Mercaptoethanol (5%) und Harnstoff (8M) in 0.0625 M Tris-HCl (pH 6.8) versetzt, 3 min gekocht und anschließend bei 15000 g 5 min lang abzentrifugiert, anschließend direkt aufgetragen oder bei -80 °C eingefroren. Harnstoff zusammen mit SDS im Probenpuffer verhindert die Aggregation und Prezipitation von Proteinen. Große Mengen an Harnstoff haben aber den Nachteil, daß durch chemische Isomerisation Cyanat-Ionen angehäuft werden, die mit Aminosäuren Carbamylate bilden und damit die Ladung der Proteine verändern (Hames 1990). Um das zu verhindern, wurde der Probenpuffer jeweils frisch angesetzt.

Zur Auftrennung der extrazellulären Proteine wurde eine eindimensionale, diskontinuierliche SDS-Gradientengel-Polyacrylamid-Elektrophorese und das diskontinuierliche Puffer-System nach Laemmli (1970) verwendet (Anhang).

In Gegenwart von Natrium-Dodecyl-Sulfat dissoziieren die Proteine in ihre Untereinheiten, und gleichzeitig wird durch Umlagerung der positiven Gruppen durch SDS-Moleküle das gesamte Protein negativ geladen, so daß die Auftrennung im Gel nur nach dem Molekulargewicht erfolgt. Die Anwendung eines Gradientengels, in dem mit dem Migrationsweg der Moleküle der Polyacrylamid-Anteil im Gel zunimmt (und damit die Porengröße abnimmt), ermöglicht die Auftrennung über einen wesentlich erweiterten Molekulargewichtsbereich und führt gleichzeitig zu einer verstärkten Bandenschärfe. Damit ist dessen Einsatz insbesondere bei undefinierten und variablen Proteinproben, wie sie bei den Experimenten anfielen, von Vorteil. Die Polymerisation eines grobporigen Sammelgels mit pH 6.8 über dem Trenngel führt durch unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten zweier Pufferkomponenten zur Ausbildung eines konstant wandernden, schmalen Feldes hoher Spannung, in dem die Proteine konzentriert werden und als scharfe Banden in das Trenngel eintreten (Hames 1990).

Die Gelelektrophoresen wurden durchgeführt mit einer vertikalen Gelelektrophorese-Einheit (SE 600, HOEFER) bei einer konstanten Temperatur von 19 °C. Zur Auftrennung wurden 14 cm x 12 cm x 0.15 cm große Polyacrylamid-Gele mit vorgelagertem Sammelgel bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA, bzw. bei einem Lauf mit 2 Gelen von 60 mA, eingesetzt. Es wurde generell mit einem 5-20%igem Gradientengel (Anhang) gearbeitet, das mit Hilfe eines Gradienten-Mischers (SG-200, HOEFER) gegossen wurde.

### 2.3.9. Polychromatische Silberfärbung

Silberfärbungen von Proteinen zeichnen sich durch hohe Empfindlichkeit aus: Es können Proteinkonzentrationen von weniger als 1 ng/mm<sup>2</sup> nachgewiesen werden (Switzer, et al. 1979). Die polychromatische Silberfärbung hat zudem den Vorteil, daß die Unterscheidung und Zuordnung von Banden erleichtert wird, da z. B. Lipoproteine anders angefärbt werden als Glykoproteine (Goldman, et al. 1980).

Der genaue Mechanismus der Silberfärbung ist noch nicht genau bekannt (Hames 1990), er basiert jedoch auf der Reduktion von Silbernitrat zu metallischem Silber durch die Proteine. Dabei scheint basischen und Schwefel-enhaltenden Aminosäuren eine besondere Rolle zuzukommen (Merril 1986).

Die Fixierung des Gels erfolgte über Nacht im Fixierbad (Vol. Gel:Fixierer=1:5.5) aus 50 % Ethanol und 5 % Essigsäure in Wasser. Nach dreimaligem einstündigen Waschen in Milli-Q wurde das Gel zur Färbung in 0.19 %ige Silbernitratlösung (Vol. Gel: Farblösung=1:3) überführt. Anschließend wurde es für wenige Sekunden in Milli-Q gewaschen und dann zur reduzierenden Lösung aus 30 g/l NaOH (Verhältnis Gelvol.:Lösung von 1:5.5) gegeben. Diese war unmittelbar vor Gebrauch mit 7.5 ml Formalin versetzt worden. Je nach gewünschtem Entwicklungsgrad, jedoch nach maximal 10 min, wurde die Natronlauge durch eine 0.7 %ige Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung im gleichen Verhältnis ersetzt. Nach insgesamt 3 Waschgängen (zweimal eine Stunde und zum Schluß über Nacht) war das Gel ausgefärbt und wurde mit einem Diapositivfilm (Agfa-EXCL CT 100) abfotographiert.

## 2.3.10. Bestimmung extrazellulärer Enzymaktivitäten

### 2.3.10.1. Bestimmung der extrazellulären Protease-Aktivität mit "Hide Powder Azure" (HPA; SIGMA)

HPA ist eine in wässrigem Milieu unlösliche Verbindung (Albertson, et al. 1990) zwischen einem Farbstoff und einem Protease-Substrat. Es dient zum Nachweis von Skleroproteasen, die in der Lage sind, die den Abbau partikulären Proteins katalysieren. Der Nachweis erfolgte photometrisch durch Messung der Absorption löslicher Hydrolyse-Produkte bei 595 nm.

Die vorgelegte Substratkonzentration betrug 1 mg/ml.

### 2.3.10.2. Bestimmung der extrazellulären enzymatischen Aktivität mit RBV-/RBB-Substraten

Als Proteinase-Aktivität wurde der Abbau von Gelatin-Remazol Brilliant Blue (LOEWE) erfaßt. Um auf Chitinase-Aktivität zu prüfen, wurde Carboxymethylchitin-Remazol Brilliant Blue (LOEWE) eingesetzt. Zur quantitativen Bestimmung wurden zu MOPS-gepufferter Probe die jeweilige Substrat-Lösung im Verhältnis 3:1 gegeben. Innerhalb von 2 Stunden wurden 4 Proben entnommen, die jeweils mit 2N HCl-Lösung auf einen pH unter 3.0 eingestellt wurden. Dadurch wurde die Reaktion gestoppt und das nicht abgebaute Substrat ausgefällt. Nach 10 min Kühlung der Proben auf Eis wurden die Proben und jeweils ein Blindwert bei 10000 g 5 min lang abzentrifugiert und bei 550 nm (CM-Chintin-RBV) bzw. 600 nm (Gelatin-RBB) photometrisch gemessen (Anleitung der Firma Loewe Biochemica GmbH zu den vertriebenen farbstoffmarkierten Enzymsubstraten).

Vollständige Spaltung des Substrats wurde erreicht durch Zugabe von 10N NaOH-Lösung zur Substratlösung.

### 2.3.10.3. Bestimmung extrazellulärer Esterase-Aktivitäten

Zur Erfassung unspezifischer Esterase-Aktivität wurde eine 5 mM Lösung von pNP-Acetat in 0.2 M Tris-HCl-Puffer (pH 7) angesetzt. Zur Inkubation bei 20 °C wurden Probe und Substratlösung im Verhältnis 1:1 versetzt und im Zeitraum von 2 Stunden mehrmals die Extinktion bei 410 nm bestimmt.

Vollständige Spaltung des Enzymsubstrats zur Bestimmung des Umrechnungsfaktors von Extinktion auf Abbauleistung wurde durch Zugabe einer 10N NaOH-Lösung erreicht.

#### 2.3.10.4. Test auf hämolytische Aktivität

Zum qualitativen Test auf hämolytische Aktivität wurden 48 Stunden unter limitierten Substratbedingungen aerob und anaerob inkubierte FL2-Kulturen bei 25000 g abzentrifugiert und auf Blutplatten übertragen. Nach 1-2 tägiger Inkubation bei 28 °C wurden die Platten auf Entfärbung durch Hämolytine überprüft.

#### 2.3.11. Messung der Hydrophobizität von Zellen und Exopolymeren

In der Literatur sind viele Methoden diskutiert worden, um den "Grad der hydrophoben Abstoßung" (=Hydrophobizität) von Wassermolekülen durch Oberflächen oder Moleküle zu messen. Dillon et al. (1986) verglichen die Aussagekraft von verschiedenen Methoden, die Hydrophobizität von Zelloberflächen zu bestimmen, wie z.B. BATH (bacterial adhesion to hydrocarbons), Salz-Aggregation (SAT), und HIC (Hydrophobic interaction chromatography). Da SAT und HIC-Analysen häufig widersprüchliche Ergebnisse brachten (Dillon, et al. 1986), wurde hier die Hydrophobizität der Zellen über die Messung der bakteriellen Adhäsion an Kohlenwasserstoffe (BATH) (Rosenberg, et al. 1980) bestimmt.

Die Zellen wurden bei geringer Umdrehung abzentrifugiert (2000 g, 15 min), in PHM (Phosphate/Harnstoff/Magnesium)-Puffer ( 22.2 g  $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ , 7.26 g  $NaH_2PO_4$ , 1.8 g Harnstoff und 0.2 g  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , pH 7.1) resuspendiert und auf eine optische Dichte von  $OD_{500} = 0.3$  eingestellt.

Je 1.2 ml wurden mit 0.2 ml n-Hexadekan, n-Octan und p-Xylen überschichtet.

Während der nächsten 10 min wurden die Proben mehrmals kräftig geschüttelt, anschließend 15 min stehen gelassen. Die wässrige Phase wurde abgenommen und die Abnahme der optischen Dichte in Prozent bestimmt.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Methodische Untersuchungen

#### 3.1.1. Exopolymeranalyse:

Während Kapseln für die Oberflächeneigenschaften der einzelnen Zelle verantwortlich sind, haben Bakterien durch Schleime eine Möglichkeit, sich ihr eigenes Mikroklima zu schaffen. Die biochemische Zusammensetzung von "Kapseln" und "Schleimen" kann, muß aber nicht gleich sein, so daß eine chemische Unterscheidung über die Extraktionsmethode definiert ist (Whitfield 1988). Die mit der Zellwand fest assoziierten Kapseln können nur durch eine Kombination physikalischer Methoden (z.B. Ultraschallbehandlung, kochen, hochtouriges Zentrifugieren) abgetrennt werden (Gehr und Henry 1983), während für die Separation des von Kulturen ins Medium exkretierten Schleimes als beste Möglichkeit das hochtourige Abzentrifugieren angegeben (Brown und Lester 1980).

Die schleimbildenden extrazellulären Polymere und ihre Bedeutung für die Mikroben stehen im Mittelpunkt dieser Arbeit, so daß auf die Kapselpolysaccharide nicht weiter eingegangen werden wird.

Zur Abtrennung des Schleims von den Zellen sind etwa 10000 g notwendig (Sutherland und Wilkinson 1971). Aufgrund der durch hohe Schleimkonzentrationen möglicherweise erhöhten Viskosität des Mediums werden häufig höhere Zentrifugationsgeschwindigkeiten und eine längere Zentrifugationsdauer angewendet (Decho und Lopez 1993, Harwood-Sears und Gordon 1990, Ross, et al. 1991, Wachenheim und Patterson 1992). Für die untersuchten Kulturen erwies sich eine Zentrifugationsgeschwindigkeit von 25000g als ausreichend, um alle Zellen zu pelletieren (3.1.4.). Eine Verunreinigung des Überstandes mit intrazellulären Substanzen durch Zellzerstörung wurde mit Hilfe eines Tests auf Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, der negativ ausfiel, ausgeschlossen.

Um Exopolymere aus dem Überstand zu extrahieren, wurden die Polymere mit Aceton oder Ammoniumsulfat ausgefällt. Bei einem Vergleich zeigte sich quantitativ eine doppelt so hohe Effektivität der Acetonfällung, so daß nur für die qualitativen Bestimmungen auf die schonendere Aussalzung zurückgegriffen wurde.

Für die Dialyse wurden Membranen mit einem Porendurchmesser von 12000 Dalton verwendet, so daß nur höhermolekulare Polypeptide und Polysaccharide erfaßt wurden.

Bei den im folgenden diskutierten Exopolymeren handelt es sich also um die Acetonfällbare Fraktion der ins Medium exkretierten Polymere. Dabei muß erwähnt werden, daß Neu und Poralla (1988), sowie Christensen et al. (1985) Polysaccharide mit stark hydrophoben Eigenschaften entdeckten, die in wässrigen Phenol-, Methanol- und Ethanol-Lösungen löslich waren. Derartige Bestandteile hätten jedoch durch das Aussalzen erfaßt werden müssen, so daß mit erhöhten Konzentrationen an Makromolekülen im Aceton/Wasser-Überstand nicht gerechnet werden muß.

Um Verluste zu weit wie möglich zu vermeiden, wurde auf eine Reinigung der Polymere und Trennung von Exopolysacchariden und Proteinen verzichtet. Platt und Geesey (1985) hatten beim Versuch, Proteine mit verschiedenen Methoden von den Exopolysacchariden abzutrennen, Verluste in der EPS-Fraktion zwischen 13 und 55% zu verzeichnen. Daraus folgern sie, daß beide biochemischen Komponenten eng miteinander verbunden sind. Eine gegenseitige Beeinflussung ist auch in funktioneller Hinsicht wahrscheinlich, so daß bei allen auf die Charakterisierung ausgerichteten Versuche die räumliche Struktur so wenig wie möglich verändert werden sollte.

Um Acetonbestandteile, Salze und Phosphate vom Pellet zu trennen, wurde daher nur ein Dialyseschritt eingeschoben.

Es zeigte sich, daß eine Lyophilisierung ungeeignet war zur schonenden Aufbewahrung der Exopolymere. Eine Lösung der gefriergetrockneten Exopolymere im Wasser war erst ab einem pH von 4 möglich, so daß ein Einfrieren bei -80 °C vorgezogen wurde.

### 3.1.2. Berechnung von Metallspeziationen in Bakterienkulturen mit Hilfe des MacuQL-Programms

Das Computerprogramm MacuQL wurde zur Berechnung der Metallspeziationen von Kupfer, Kadmium und Kobalt in der "Nine salt solution", versetzt mit Phosphatpuffer (1.32 mM) und Ammoniumchlorid (9.52 mM) benutzt. Das Programm berechnet aus Gleichgewichtskonstanten für die Bildung anorganischer Komplexe die Konzentration einzelner Speziationen. Folgende Einschränkungen sind bei der Betrachtung der Ergebnisse zu berücksichtigen:

1. Nicht für alle Komplexe stehen Angaben der Gleichgewichtskonstanten zur Verfügung, so daß das Fehlen wichtiger Komplezierungen nicht ausgeschlossen werden kann.
2. Die Gleichgewichtskonstanten waren nicht immer bezogen auf die in den Versuchen verwendeten Ionenstärke (Ionenstärke NSS = 0.2). Aus der Auflistung von Smith und Martell (1990) wurden diejenigen ausgewählt, die auf einen möglichst ähnlichen Wert Bezug nahmen. Es kam aus diesem Grunde zu Ungenauigkeiten in der Berechnung der exakten Konzentration, wobei die Differenzen in den Gleichgewichtskonstanten

aufgrund unterschiedlicher Ionenstärken in der Liste von Smith und Martell selten größer als eine Einheit sind.

3. Versuchsbedingte Adsorptionerscheinungen wurden nicht berücksichtigt. Das MacμQL-Programm besitzt die Fähigkeit, die Adsorption an Grenzflächen und elektrostatische Interaktionen zu berechnen. Da es sich aber um belebte Systeme handelte, in denen die Oberflächen von verschiedenen, in ihrer Ladung nicht definierten Molekülen bedeckt waren und somit die Anzahl der aktiven Oberflächenplätze in mol/g nicht angegeben werden konnte, kam diese Funktion hier nicht zur Anwendung.

Auch Angaben für Gleichgewichtskonstante von Metallen mit dem Puffer MOPS waren nicht vorhanden, so daß hier ein zusätzlicher Unsicherheitsfaktor besteht.

Aus diesen Gründen wurde das MacμQL-Programm zwar angewendet, jedoch unterliegen die Ergebnisse den genannten Einschränkungen: Die erhaltenen Werte für die Metallspeziation beziehen sich auf eine Situation ohne den Einfluß polymerer, biogener Substanzen, besitzen also nur Tendenz-Charakter. Aus diesem Grunde wurde bei der Darstellung der Ergebnisse nicht auf die errechnete Konzentration freier Ionen Bezug genommen, sondern die bekannten Gesamtkonzentrationen angegeben. Der Effekt der Komplexbildung wird im Rahmen der Diskussion diskutiert werden.

### 3.1.3. Eignung des Mediums

Vor Beginn der unter  $C_{org}$ -freien Bedingungen durchgeführten Versuche mußte sichergestellt werden, daß nur die zugesetzten Lösungen (P bis G) die jeweiligen Nährstoffe lieferten:  $NH_4Cl$  als anorganische Stickstoffquelle,  $K_2HPO_4$  als Phosphatquelle,  $Na_2SO_4$  als Schwefel-Lieferant und Glukose als C-Quelle. Um ausschließen zu können, daß MOPS ( $C_7H_{15}NO_4S$ ) bzw. Tricin ( $C_6H_{13}NO_5$ ) von den Organismen als Nährstoffe genutzt werden konnten, wurden folgende Medien mit einer logarithmisch wachsenden Kultur versetzt, und das Wachstum über die optische Dichte verfolgt (Abb.1):

## Limitierungsversuche

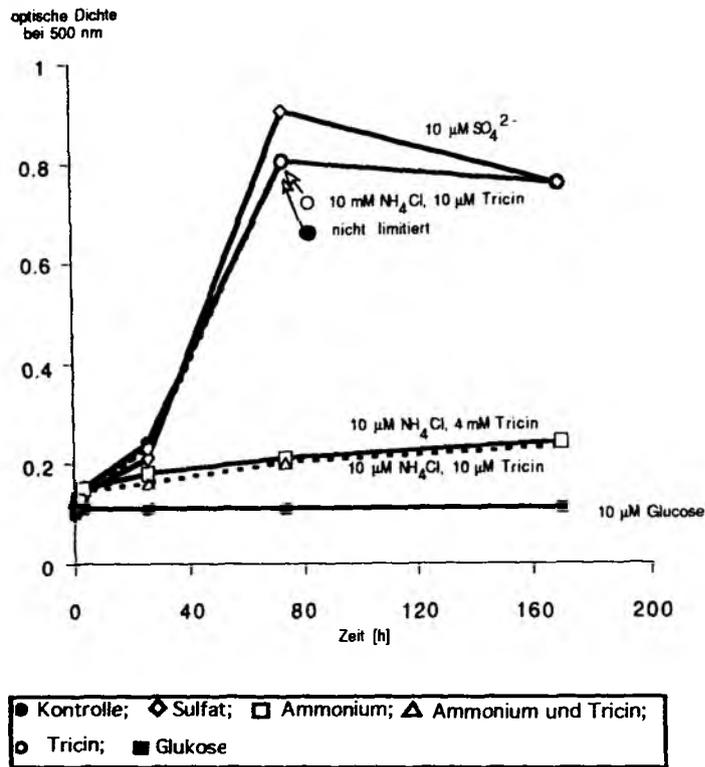


Abb. 1: Versuch zur Verwertbarkeit von Tricin und MOPS-Puffer unter Nährstoffmangel-Bedingungen. Dargestellt ist der Verlauf der optischen Dichte bei 500 nm nach Animpfung von "Marine Minimal Media" mit einer logarithmisch wachsenden Kultur. In den verschiedenen Ansätzen war im Medium jeweils die Konzentration einer Nährlösung verringert (Die Kurven der Kontrolle (●) und des Ansatzes mit verringerter Tricin-Konzentration (○) liegen direkt übereinander)

Es zeigte sich, daß der MOPS-Puffer als Sulfat-Quelle von den Bakterien genutzt werden konnte. Sulfatlimitierungsversuche mit dem Bakterium FL2 sind somit mit diesem Medium nicht möglich. Eine Verwertung von Tricin dagegen war nicht festzustellen. Ein Versuch, MOPS durch Boratpuffer zu ersetzen, zeigte eine unzureichende Pufferwirkung des Borats und eine Wachstumshemmung ab 20 mM.

### 3.1.4. Abtrennung der EP aus Zellsuspensionen

Nach Brown und Lester (1980) ist die beste Methode zur Abtrennung von EPS von Kulturen eine Hochgeschwindigkeitszentrifugation bei 33000 g, 10 min, 4 °C . Für die Vibrionkultur wurde dies überprüft, um die höchste Zentrifugationsgeschwindigkeit zu finden, bei der noch keine Schädigung der Zellen und damit Freisetzung der Zellinhaltsstoffe auftrat. Es wurden bei verschiedenen Zentrifugationsstufen Proteine in Überstand und Pellet gemessen, sowie die Aktivität der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, eines membrangebundenen Enzyms, und die Anzahl von Bakterien im Überstand untersucht.

*Tab. 2:  
Effektivität verschiedener Zentrifugationsgeschwindigkeiten für die Peilettierung von FL2-Zellen aus dem "Marine Minimal Medium" (Zentrifugationsdauer 20 min.)*

Zentrifugationsgeschwindigkeit [g]	Proteingehalt im Pellet [µg]
2000	17.1 ± 3.3
2700	40.5 ± 1.1
3800	39.4 ± 0.2
6000	39.0 ± 0
10600	42.2 ± 3.8
40000	33.7 ± 0.6

Die höchsten Proteingehalte im Pellet wurden durch eine Zentrifugationsgeschwindigkeit von 10600 g erzielt (Tab. 2). Bei 40 000 g verringerte sich der Proteingehalt im Pellet, was auf Zellzerstörung hindeutet. Um einen Kompromiß zwischen möglichst umfangreicher Pelletierung und minimaler Zellzerstörung zu erreichen, wurden nach Zentrifugationen zwischen 10600 und 40000 g die Überstände auf Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität getestet. Bei 25000 g erfolgte eine umfangreiche Pelletierung, ohne daß eine Zellzerstörung nachgewiesen werden konnte, weshalb diese Geschwindigkeit zur Abtrennung der Polymere gewählt wurde.

### 3.1.5. Zelluläre Proteinkonzentrationen bei unterschiedlich langen Inkubationen unter Substrat-Mangelbedingungen

Die Proteingehalte von Zellen ändern sich bei Inkubation in an C<sub>org</sub>-verringertem Medium (Heise 1990). Um die Zellzahl einer Kultur durch die Proteinbestimmung der Zellen zu ermitteln, wurde eine Eichung vorgenommen, in deren Rahmen die Zellzahlen

für gemessene Zellproteinwerte unter aeroben und anaeroben Bedingungen für die Hungerzeiträume 1, 25 und 76 Stunden bestimmt wurden.

Die Proteinwerte pro Zelldichte waren zu Beginn der Inkubation am höchsten mit 1.245 (aerob) bzw. 2.4 (anaerob) pg/Zelle (Abb. 2). Starke Veränderungen traten innerhalb der ersten 25 Stunden auf, anschließend blieben die Zellprotein-Werte unabhängig von der Sauerstoffverfügbarkeit unterhalb von 1pg/Zelle.

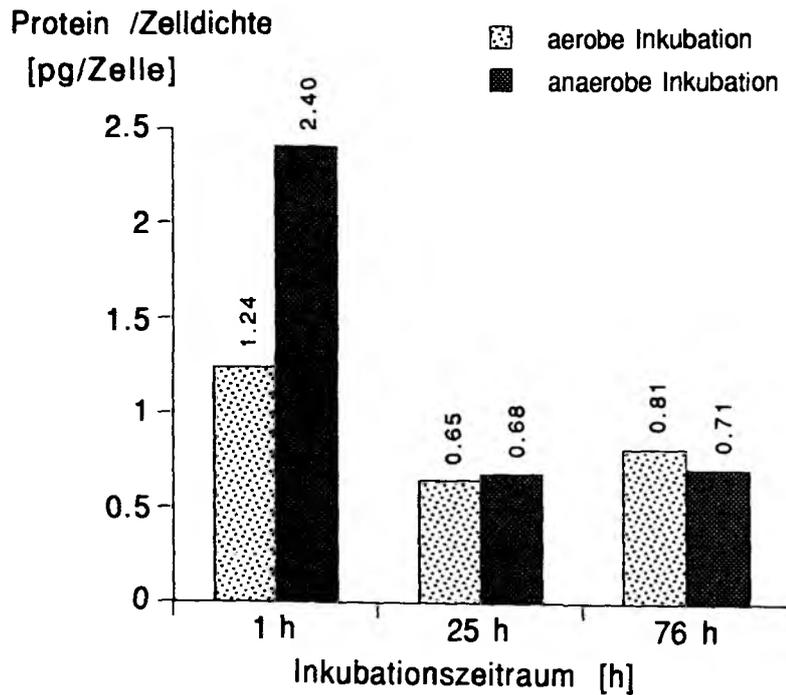
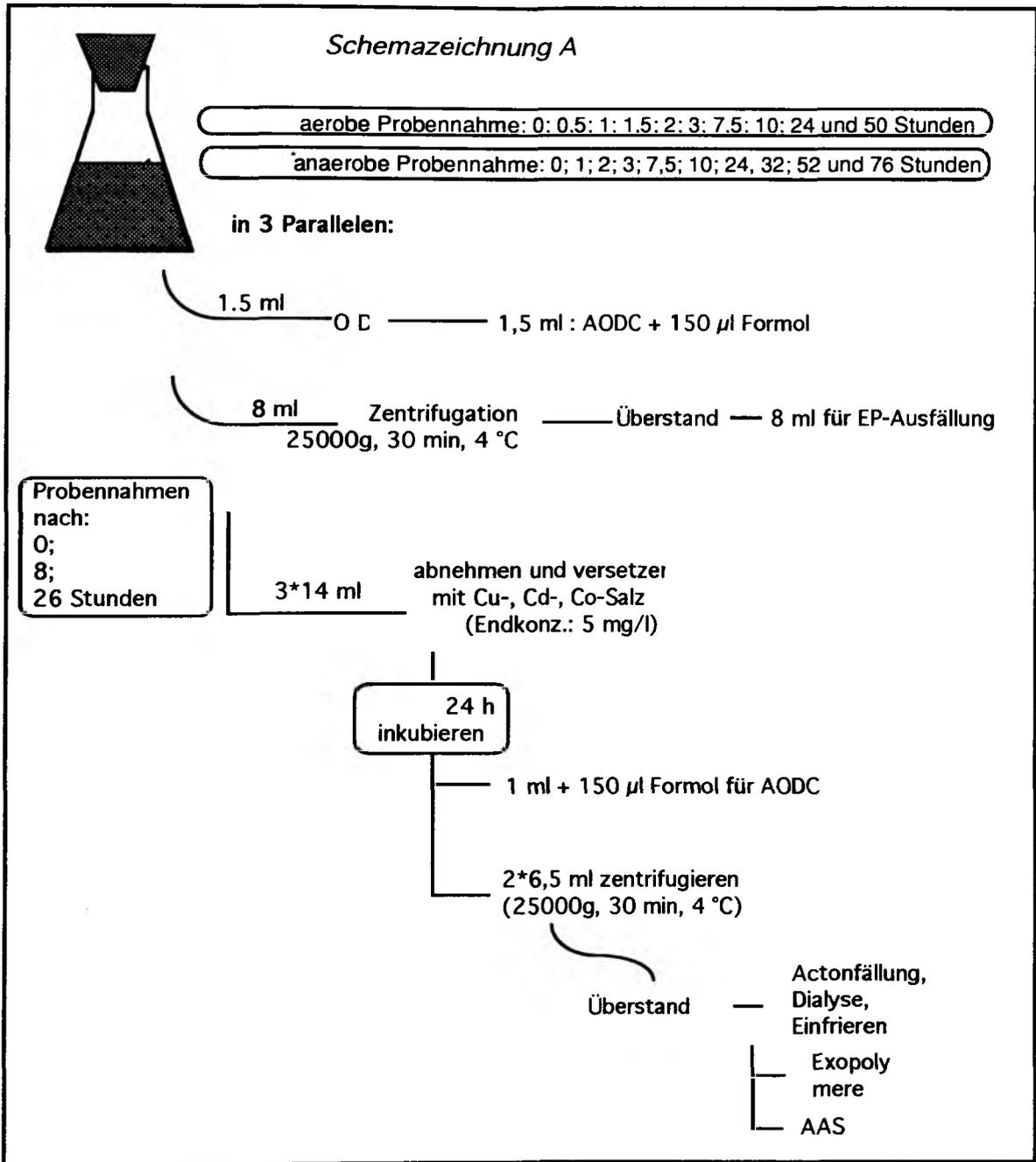


Abb. 2: Veränderung der zellulären Proteine in pg/Zelle bei unterschiedlich langer Inkubation von FL2-Kulturen in an C<sub>org</sub>-verringertem Medium (3M/G) unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen.



**Abb. 3: Zusammenfassendes Schema der Versuche zur Analyse von Exopolymeren des Bakteriums FL2.**

## **3.2. Die Produktion von extrazellulären Polymeren**

Die qualitative und quantitative Zusammensetzung der extrazellulären Polymere im Hinblick auf Polysaccharide und Proteine wurde untersucht, um Veränderungen in Abhängigkeit von Wachstumsbedingungen wie Nährstoffangebot und Sauerstoffverfügbarkeit zu erfassen.

### **3.2.1. EP-Produktion bei Entzug der C<sub>org</sub>-Quelle**

Um zu klären, ob sich die Exopolymersekretion in Abhängigkeit der angebotenen Substratkonzentration und der Dauer des Nährstoffmangels qualitativ und quantitativ verändert, sollten die in einer wachsenden und einer hungernden Kultur produzierten Exopolymere bezüglich ihrer Komponenten untersucht werden.

#### **3.2.1.1. *Zusammensetzung der Exopolymere***

##### *Zusammensetzung bei wachsenden Kulturen (Abb. 4)*

Die chemische Analyse der extrahierten Exopolymere im nährstoffreichen 3M-Medium während eines aeroben Wachstumszyklus' von FI2 zeigte eine maximale Konzentration von 73 µg Polysaccharide pro ml in der spät-logarithmischen Phase. Einem steilen Anstieg während des Wachstums folgte beim Übergang in die stationäre Phase eine Verringerung der EPS auf 2 µg/ml innerhalb von 75 Stunden. Danach stiegen die Konzentrationen sowohl an Kohlenhydraten als auch an extrazellulären Proteinen an. Die Proteine erreichten dabei ihre während des bisherigen Zyklus' höchsten Werte von 14 µg/ml.

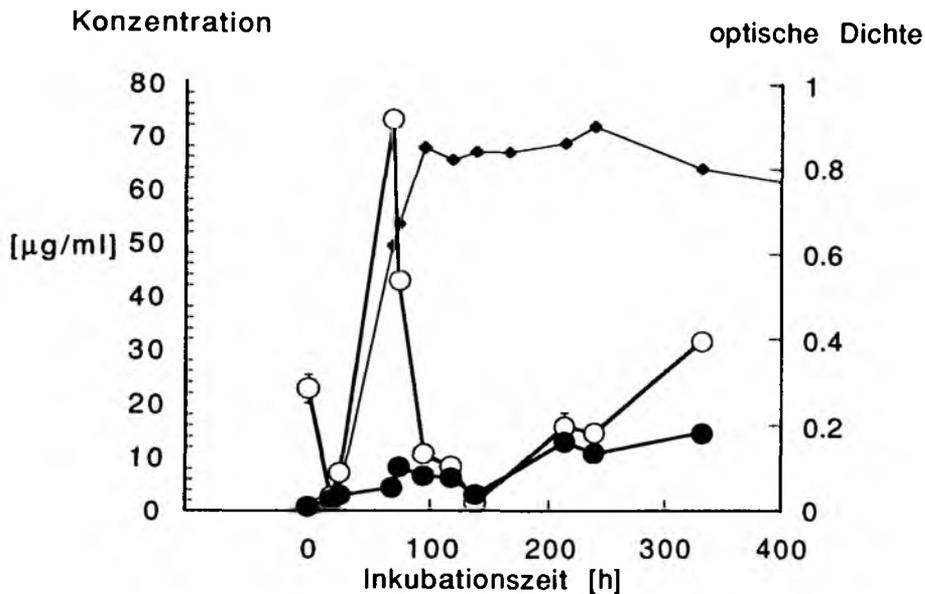


Abb. 4: Konzentration von Exopolymer-gebundenen Kohlenhydraten (—○—) und Proteinen (—●—) während unterschiedlicher Wachstumsphasen von *Vibrio anguillarum*.

#### Zusammensetzung in Hungerkulturen (Abb. 5)

Die Kulturen wurden während der Wachstumsphase ( $OD_{500} = 0.3$ ) abzentrifugiert, in NSS resuspendiert und zu gleichen Teilen auf drei 1 l-Erlenmeyerkolben<sup>1</sup> aufgeteilt, die mit 400 ml Hungermedium (3M ohne Glukose) bestückt waren. Es ergab sich eine  $OD_{500}$  von etwa 0.14. Der Versuchszeitraum betrug 50 Stunden.

Probennahmen erfolgten nach 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 8, 10, 24 und 50 h.

Pro Probennahme wurde aus jedem Kolben einmal 8 ml abgenommen, die bei 25000 g, 4 °C, 30 Minuten lang zentrifugiert wurden. Anschließend wurden die Exopolymere durch Acetonfällung extrahiert und dialysiert. Parallel dazu wurde bei jeder Probennahme die optische Dichte gemessen. 1.5 ml Kultursuspension wurden abgenommen zur Direktzählung und Bestimmung der Biomasse.

Die Protein-, Uronsäure und Kohlenhydratgehalte in den Exopolymeren wurden biochemisch bestimmt. Da die Titer der Ansätze nicht genau gleich waren, wurden die Daten auf die Zellzahl pro ml bezogen.

<sup>1</sup>mit Säure gewaschen, anschließend mit MQ gespült

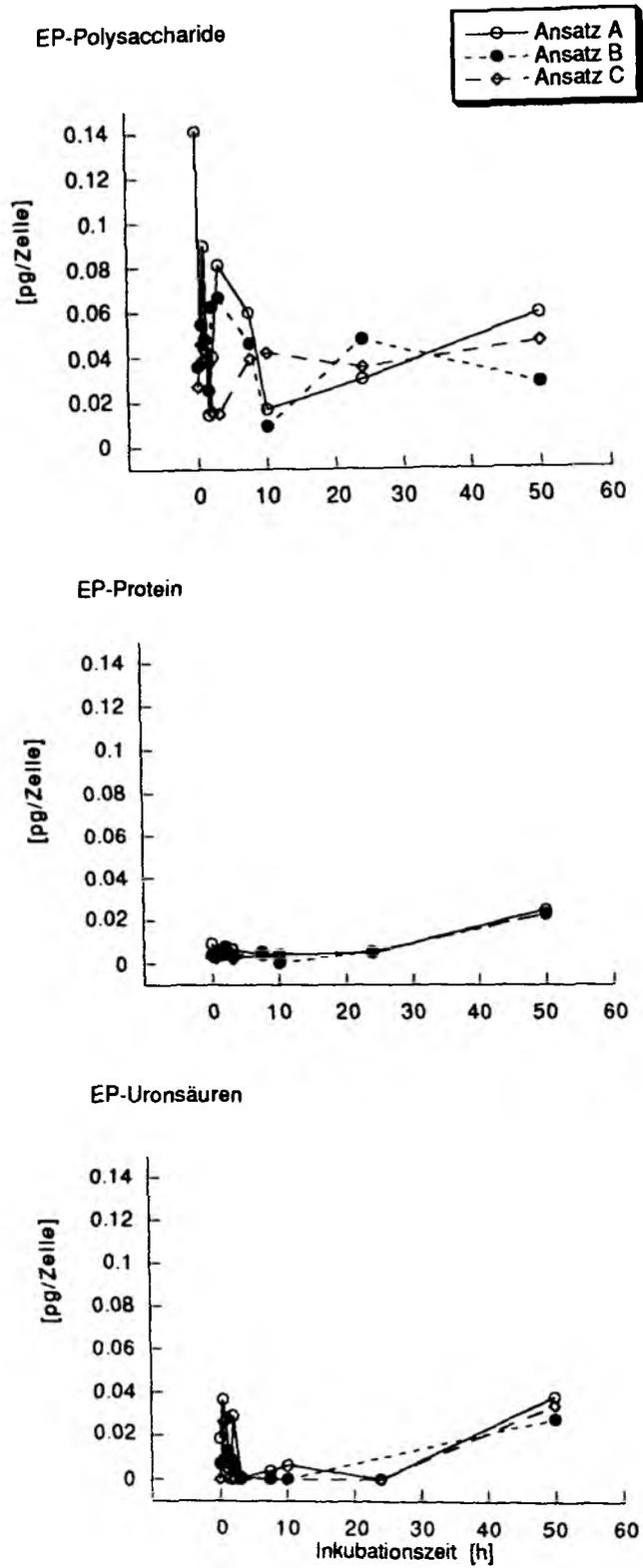


Abb. 5: Verlauf der Konzentration der EP-Komponenten pro Zellzahl im aeroben Hunger-Medium, gemessen als pg/Zelle

Alle nachgewiesenen Komponenten der Exopolymere zeigten nach anfänglich starken Schwankungen einen Anstieg mit steigender Hungerzeit. Diese Tendenz war in allen Ansätzen zu erkennen (Abb. 5): Unter aeroben Bedingungen stiegen sowohl die in der Zellzahl-bezogenen Exopolymerfraktion bestimmten Proteingehalte, als auch die Kohlenhydrat- und Uronsäuregehalte nach 10 bis 24 Stunden an.

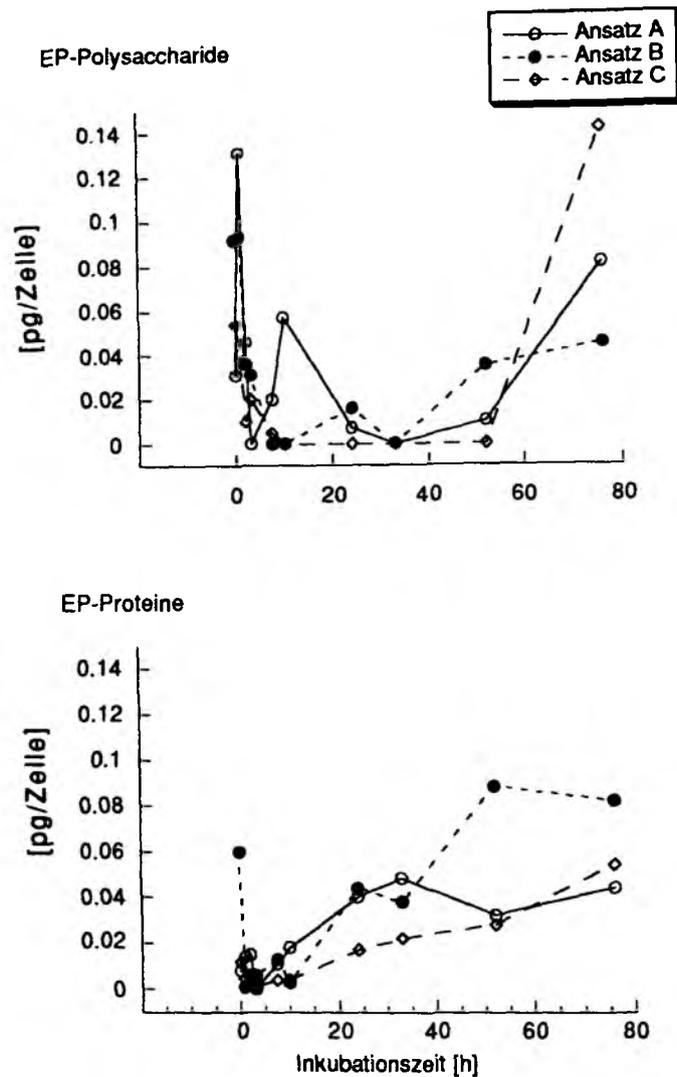
### 3.2.2. Einfluß von Anaerobiose auf die EP-Produktion unter Corg-mangel

Da die Diffusivität von Sauerstoff in Exopolymeren herabgesetzt ist und die Umstellung auf Anaerobiose ebenfalls Veränderungen des bakteriellen Metabolismus nach sich zieht, wurde untersucht, ob anaerobe Verhältnisse die Bildung der Exopolymere in Abhängigkeit von der Expositionszeit beeinflussen.

#### 3.2.2.1. *Zusammensetzung der Polymere (Abb. 6)*

Der gleiche Versuch, wie unter 3.2.1.1. beschrieben, wurde unter Sauerstoff-limitierten Bedingungen durchgeführt. Eine anaerob gewachsene Kultur wurde abzentrifugiert und die Zellen in drei Ansätze mit reduziertem, C-freiem Medium überführt (OD<sub>500</sub> von etwa 0.14). Der Versuchszeitraum betrug 76 Stunden, während dem 10 Mal beprobt wurde (siehe Schemazeichnung A)

Nach Extraktion der Exopolymere aus je 8 ml der hungernden Kultur wurden diese dialysiert und Proteine und Kohlenhydratwerte bestimmt. Dabei zeigte sich ein Anstieg der Kohlenhydrat- und Proteinwerte mit zunehmender Hungerzeit (Abb. 6), beginnend nach 8 Stunden. Nach 24 Stunden überstieg der Proteingehalt in den Exopolymeren die noch sinkende Kohlenhydratfraktion, die erst nach 76 Stunden wieder den dominierenden Anteil an den Exopolymeren bildete.



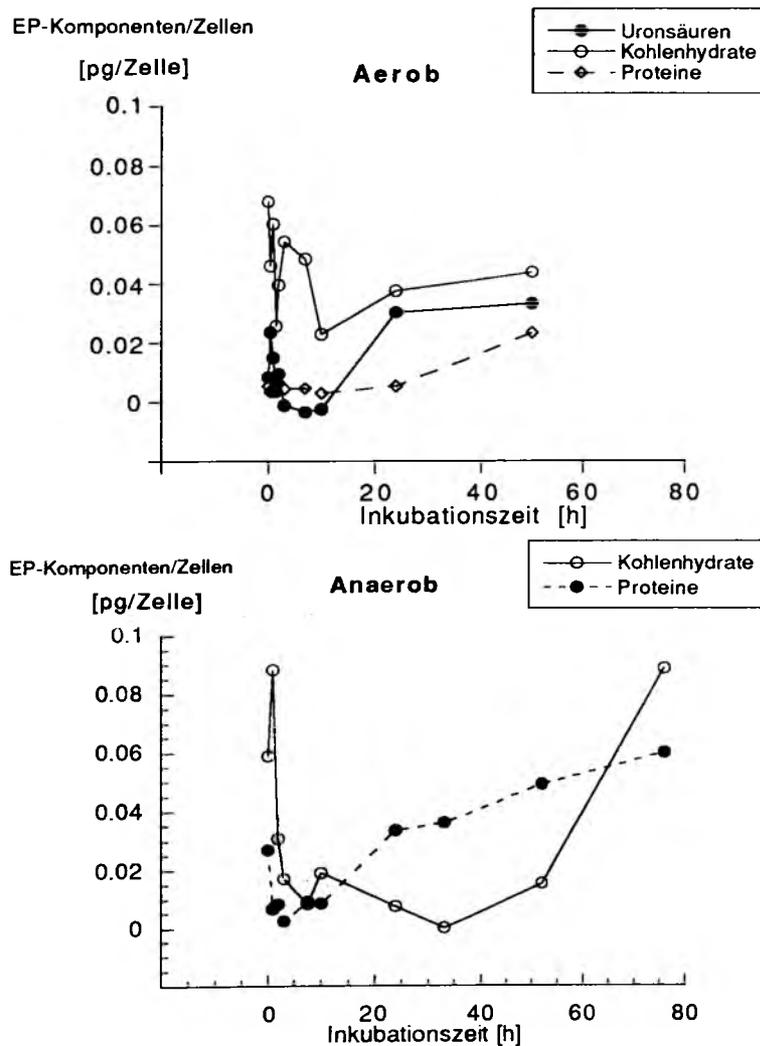
**Abb.6:** Verlauf der Konzentration der EP-Komponenten pro Zellzahl im anaeroben Medium, gemessen als pg/Zelle

### 3.2.3. Vergleich der Exopolymerausscheidung bei aerober und anaerober Inkubation

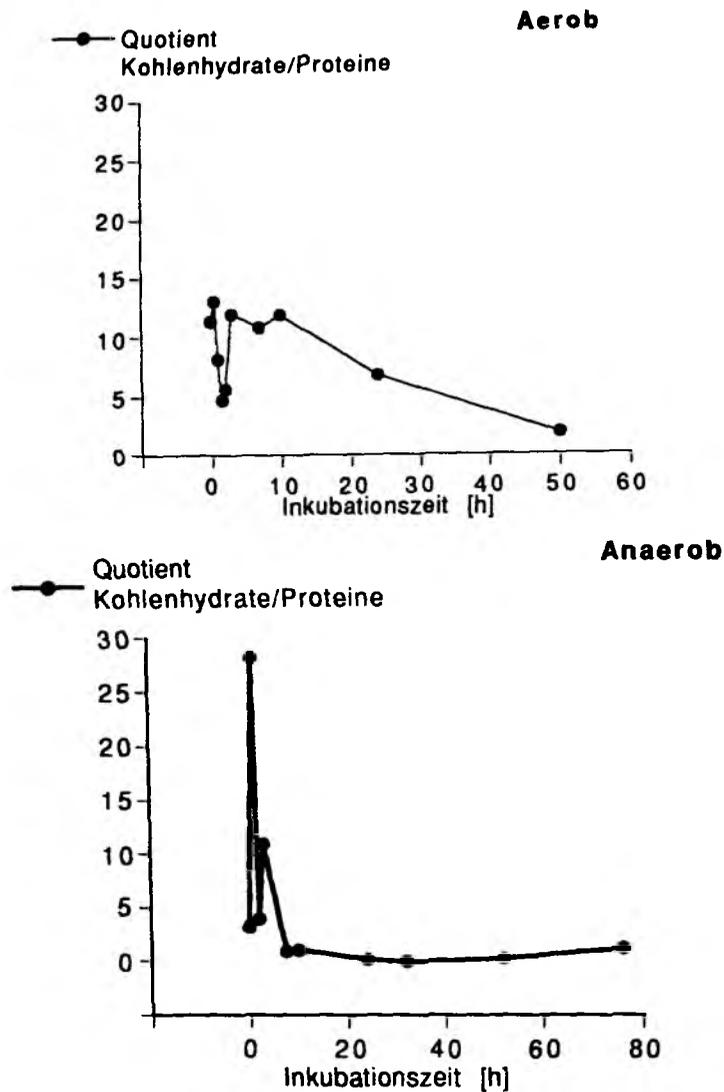
#### 3.2.3.1. Vergleich der Zusammensetzung (Abb. 7, 8)

Im Vergleich zeigten sich Unterschiede in der Produktion sowohl im zeitlichen Ablauf als auch im relativen Verhältnis der Komponenten zueinander. Der Anstieg des Proteingehalts im aeroben Ansatz blieb deutlich unter dem im anaeroben, die Kohlenhydrate bildeten durchgehend die größte Fraktion im Exopolymer (Abb. 7).

Im reduzierten Milieu dagegen überstiegen die EP-Proteinwerte die EP-Kohlenhydratkonzentrationen im Zeitraum von 24 bis 52 Stunden. Der EP-Kohlenhydratanstieg erfolgte hier erst nach 32 Stunden des Hungerns. Die nach 52 Stunden in beiden Ansätzen erreichten Konzentrationswerte pro Zellzahl lagen alle im Konzentrationsbereich von 0.01 bis 0.05 pg/Zelle.



**Abb. 7:** Zellzahl-bezogene mittlere Gehalte der Komponenten an den Exopolymeren bei aerober und anaerober Inkubation von FL2 unter C<sub>org</sub>-freien Bedingungen



**Abb.8:** Quotienten aus Polysaccharid- und Proteingehalten (gemessen als  $\mu\text{g}$ ) in den Exopolymeren in Abhängigkeit von der Inkubationszeit unter aeroben bzw. anaeroben Hungerbedingungen

Die Verhältnisse der gemessenen Kohlenhydrat- und Protein-Massen in den Exopolymeren fielen im aeroben Ansatz nach einem Wert von 11 bis 12 nach 10 Stunden Hungerzeit auf ca. 2 am Ende der Inkubationsphase ab. Anaerobe Bedingungen führten ab 7.5 Stunden des Hungers zu einem für den Versuchszeitraum fast konstanten Verhältnis von 0.1 bis 2 bei einem leichten Anstieg nach 76 Stunden (Abb. 8)

### 3.2.3.2. Extrazelluläre Enzymaktivitäten (Tab.3)

Ein Enzymspektrum von 170 Stunden lang gehungerten Kulturen wurde ermittelt und die Frage untersucht, ob es sich in Abhängigkeit vom verfügbaren Sauerstoff änderte.

#### *Esterasen, Proteasen, Chitinasen:*

Extrazelluläre Enzymaktivitäten wurden in aeroben und anaeroben  $C_{Org}$ -freien Ansätzen gemessen. Esterase-Aktivität, gemessen als Spaltung des pNP-Acetats, betrug im aeroben Ansatz  $22.4 \text{ nmol h}^{-1}\text{ml}^{-1}$ , im anaeroben nur  $8.9 \text{ nmol h}^{-1}\text{ml}^{-1}$ . Der Abbau von RBB-Gelatin als Indikator für Proteinase-Aktivität zeigte ebenfalls höhere Werte bei aerober Inkubation im Vergleich zu anaerober:  $172 \text{ } \mu\text{g h}^{-1}\text{ml}^{-1}$  bzw.  $106 \text{ } \mu\text{g h}^{-1}\text{ml}^{-1}$ . Die Chitinase-Aktivität dagegen war mit  $29 \text{ } \mu\text{g h}^{-1}\text{ml}^{-1}$  bei Ausschluß von Sauerstoff mehr als doppelt so hoch wie in der belüfteten Kultur ( $13.06 \text{ } \mu\text{g h}^{-1}\text{ml}^{-1}$ ).

Tab. 3: Extrazelluläre Enzymaktivitäten von Esterasen, Proteinase und Chitinasen, gemessen als Umsatzrate der Substrate in Ansätzen von FL2, die 170 Stunden lang unter aeroben und anaeroben Bedingungen in Substrat-freiem Medium inkubiert worden waren.

Inkubationsart	pNP-Acetat [ $\text{nmol h}^{-1}\text{ml}^{-1}$ ]	RBB-Gelatine [ $\mu\text{g h}^{-1}\text{ml}^{-1}$ ]	RBV-Chitin [ $\mu\text{g h}^{-1}\text{ml}^{-1}$ ]
aerob	22.4	172.0	13.1
anaerob	8.9	106.6	29.7

#### *Hämolytische Aktivität:*

Hämolytische Aktivität konnte durch Übertragen von Überständen nach Zentrifugation bei  $25000g$  auf Blutplatten sowohl nach aerober als auch nach anaerober 48stündiger Inkubation von FL2 in  $C_{Org}$ -freiem Medium nachgewiesen werden. Die Hämolyse-Erscheinungen unter anaeroben Bedingungen waren dabei weniger stark ausgeprägt.

### 3.2.4. Zusammenfassung der Ergebnisse Kapitel 3.2.

- Die Zusammensetzung der Exopolymere aus Polysacchariden und Proteinen veränderte sich sowohl in Abhängigkeit der Nährstoffkonzentration als auch in Abhängigkeit vom Redoxpotential: Exponentiell wachsende Zellen sekretierten hauptsächlich

Polysaccharide, während bei Einsetzen des Nährstoffmangels der Massenanteil an Proteinen generell zunahm (Abb. 4).

- Der Anstieg des Proteinanteils war unter anaeroben Bedingungen am größten, zeitweise bildeten Proteine die größte Fraktion der Exopolymere (Abb. 7, 8).
- Als Bestandteile der EP-Proteine bei Nährstoffmangel ließen sich Esterasen, Proteasen, Chitinasen und hämolytische Enzyme nachweisen, wobei nur die Konzentration von Chitinasen unter anaeroben Bedingungen erhöht war.

### 3.3. Einfluß von Schwermetallen

Es wurde untersucht, welche Wirkung spontane Schwermetall-Exposition unter unterschiedlichen Bedingungen auf den bakteriellen Metabolismus hatten und ob ein Zusammenhang zwischen auftretenden Effekten und der jeweiligen Exopolymer-Schicht bestanden.

Weitergehend wurde die Hypothese überprüft, ob es bei längerer Inkubation mit erhöhten Schwermetallgehalten zur Optimierung des Schutzeffektes durch Induktion bestimmter EP-Komponenten käme.

#### 3.3.1. Bestimmung der Konzentration von Metallspezies im "Marine Minimal Medium"

Bei der Berechnung der Metallspeziationen im Medium mußte berücksichtigt werden, daß bei den Ansätzen folgende Unterschiede bezüglich des CO<sub>2</sub>-Austausches mit dem gasförmigem CO<sub>2</sub> bestanden:

a) aerobe Ansätze: Es erfolgte ein Austausch mit dem CO<sub>2</sub>-Gehalt der Luft.

b) anaerobe Ansätze, mit Stickstoff begast. Hier war mit einer Diffusion von CO<sub>2</sub> aus dem Medium in die Gasphase bis zum Erreichen eines Gleichgewichtszustandes zu rechnen, wodurch es zu einer Verringerung der "totalen Carbonat-Konzentration" im Medium käme.

Bei einem über dem Medium stehenden N<sub>2</sub>-Volumen von 500 ml, das maximal nach Beprobung der Ansätze erreicht wurde, läßt sich abschätzen, daß  $7.37 \times 10^6$  Mol CO<sub>2</sub> aus dem Medium in die Gasphase diffundierten, um einen atmosphärischen Anteil von 0.033 % zu erreichen. Dieser Wert entsprach einer Verringerung der totalen [CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>]-Konzentration von ca. 1 % (7.37 µmol im Vergleich zu ca 500 µmol in 500 ml Medium). Damit liegt dieser Wert innerhalb der Abwiegeungenauigkeit des NaHCO<sub>3</sub> beim Ansetzen

des Mediums ( $\pm 0.1$  mg). Deshalb wurde dieser Fall bei der Berechnung der Metallspeziationen bezüglich des  $\text{CO}_2$ -Austausches wie ein aerobes System behandelt.

c) anaerobe Ansätze, die keine Gasphase besaßen. Hier wurde ein  $\text{CO}_2$ -Austausch nicht mit einberechnet.

Wie aus Tabelle 4 zu ersehen, ergaben sich bei Berechnung der Metallspeziationen für die unterschiedlichen Szenarien keine Unterschiede von mehr als 0.5 %<sup>2</sup>.

*Tab. 4: Mit MacuQL berechnete Metallspeziationen von zweiwertigen Kupfer-, Kadmium- und Kobalt-Ionen in "Nine Salt Solution", versetzt mit 1.32 mM Phosphat( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )- und 9.52 mM Ammoniumchlorid-Lösung in Prozent der Gesamtionenkonzentration des jeweiligen Metalls. Die Werte wurden berechnet für einen "offenen" Ansatz, in dem ein  $\text{CO}_2$ -Austausch mit der Luft- bzw. Gasschicht erfolgt, und für einen abgeschlossenen Ansatz ohne Gasvolumen.*

Metall-Spezies	Kupfer		Kadmium		Kobalt	
	CO <sub>2</sub> -Austausch	geschl. System	CO <sub>2</sub> -Austausch	geschl. System	CO <sub>2</sub> -Austausch	geschl. System
Me <sup>2+</sup>	0.15	0.15	9.91	9.90	17.77	17.68
Me(OH) <sup>+</sup>	0.19	0.19	0.05	0.05	0.18	0.18
Me(OH) <sub>2</sub>	0.37	0.37				
MeCO <sub>3</sub>	4.66	4.95	1.24	1.32	8.04	8.52
Me(CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.04	0.04				
MePO <sub>4</sub>			3.57	3.55		
MeHPO <sub>4</sub>	93.87	93.83			47.52	47.27
MeH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.07	0.07				
MeSO <sub>4</sub>	0.32	0.37	1.13	1.13	26.49	26.36
Me(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>			0.09	0.09		
MeCl <sup>+</sup>	0.08	0.08	46.12	46.09		
MeCl <sub>2</sub>			34.04	34.01		
MeCl <sub>3</sub> <sup>-</sup>			2.82	2.82		
MeCl <sub>4</sub> <sup>2-</sup>			0.93	0.93		
MeBr <sup>+</sup>			0.11	0.11		

<sup>2</sup> Die den Berechnungen der Metallspeziationen zugrundeliegenden Matrizen sind im Anhang beigefügt.

Die berechneten Konzentrationen für freie Ionen waren mit 0.15% für Kupfer-, 9.9 % für Kadmium- und 17.7 (geschlossenes System) bzw. 17.8 (offenes System) % für Kobaltionen in Abhängigkeit von den Stabilitätskonstanten ihrer Komplexe und der Konzentration der entsprechenden Anionen in der Lösung sehr unterschiedlich. Sowohl Kupfer- als auch Kobalt-Ionen lagen hauptsächlich als ungeladene Hydrogenphosphate vor, während Kadmium-Ionen eine starke Tendenz zeigten, Chloride zu bilden. Zur Hydroxidbildung kam es nur bei Kupfer- und Kobaltionen, wobei Kupfer neben einwertigen, positiv geladenen auch ungeladene zweiwertige Komplexe bildete. Kobalt-Ionen sind weiterhin zu 26 % mit Sulfat-Ionen und zu 8 % mit Carbonaten komplexiert (Tab. 4).

### 3.3.2. Die Wirkung kurzzeitiger Schwermetallexposition (ca. 30 min) auf den Zellmetabolismus

Im Mittelpunkt dieser Untersuchung stand die Frage, welche Wirkung Schwermetallkonzentrationen verschiedener Metall-Ionen auf Bakterien-Kulturen innerhalb einer kurzen Zeit haben, in der die Bakterien nicht oder nur unvollständig in der Lage sind, sich durch physiologische oder metabolische Veränderungen anzupassen.

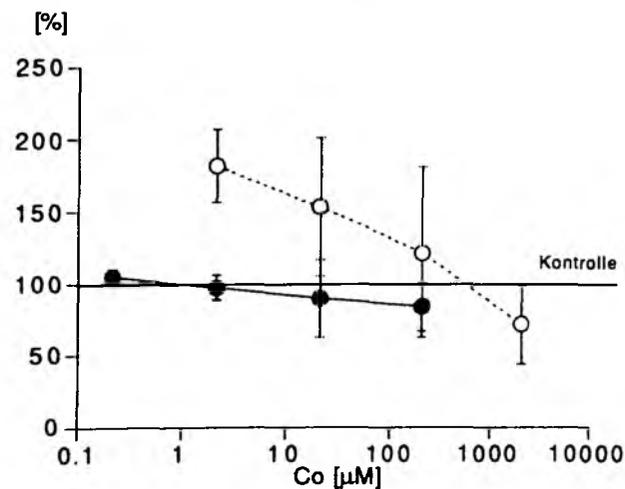
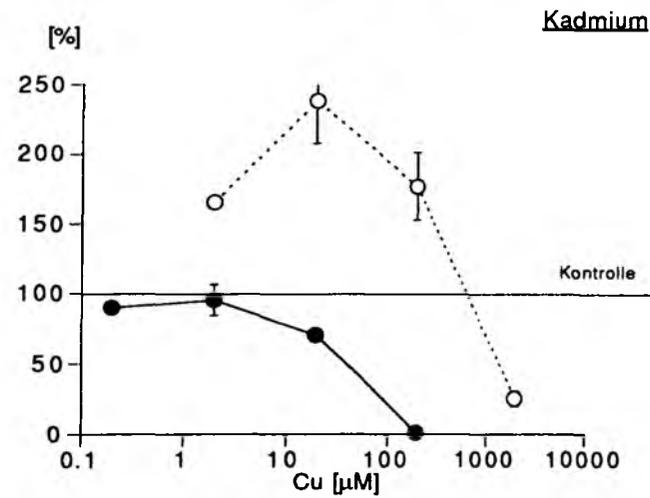
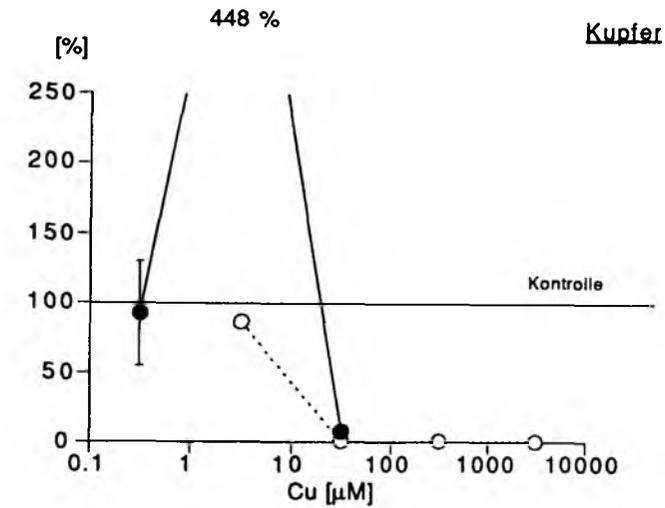
Als Einwirkungszeitraum der Metalle wurden 30 Minuten gewählt. Untersucht wurde die Wirkung auf die Replikationsrate in Form der Thymidin-Inkorporation und auf die Mineralisierung von Glukose zu CO<sub>2</sub>.

#### 3.3.2.1. *Einfluß der Metalle auf die Thymidin-Inkorporationsrate (Abb. 9)*

Die Auswirkung erhöhter Schwermetallkonzentrationen im Medium auf die Replikationsrate von hungernden FI2-Kulturen wurde untersucht. Dabei sollte der Einsatz verschiedener Metallkonzentrationen zeigen, wo Schwellenwerte lagen, und Hinweise auf Unterschiede zwischen den Metallwirkungen geben.

Hierzu wurde die Veränderung der [<sup>3</sup>H-Methyl-]Thymidin-Inkorporationsrate von aerob und anaerob inkubierten, substratfreien Bakterien in Gegenwart unterschiedlicher Metallkonzentrationen gemessen. Es wurden ca 2 Tage lang gehungerte Kulturen verwendet, denen 30 min vor Beginn der Thymidin-Zugabe sterile Metallsalz-Lösungen von Kupfer-, Kadmium- und Kobalt- zugesetzt worden waren, um Konzentrationen von 0.5 bis 500 mg/l (aerob) bzw. 0.05 bis 50 mg/l (anaerob) zu erreichen.

Für die Auswertung wurden die Thymidin-Inkorporationswerte als Prozentwerte der Kontrolle ohne Metalle ausgedrückt. Damit wurde eine Vergleichbarkeit der vom Titer und von der Zerfallszahl her unterschiedlichen Ansätzen erreicht (Abb. 9).



**Abb. 9:** Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen an Kupfer-, Kadmium- bzw. Kobalt-Ionen auf Thymidin-Inkorporation als Prozentanteil der unbehandelten Kontrolle in  $C_{org}$ -limitierten Kulturen unter aeroben (○) und anaeroben (●) Bedingungen.

### Kupfer:

Schon die geringste Kupferkonzentration von 3.1  $\mu\text{M}$  bewirkte unter aeroben Bedingungen eine Verringerung der Thymidininkorporationsrate bei hungrigen Bakterien auf 86%. Höhere Konzentrationen führten zu Inkorporationsraten, die unter  $\text{C}_{\text{Org}}$ -freien Bedingungen unter 1% lagen.

Unter anaeroben Bedingungen zeigten sich bei der niedrigsten Konzentration von 0.31  $\mu\text{M}$  keine Wirkungen auf die Kulturen. Eine zehnfache Steigerung, die unter oxidischen Verhältnissen einen deutlich negativen Einfluß auf die Inkorporationsrate zeigte, bewirkte hier einen Anstieg bei der hungrigen Kultur auf 448% der Kontrolle.  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentrationen von 31  $\mu\text{M}$  reduzierten die Inkorporationswerte auf 7% ( $\text{C}_{\text{Org}}$ -freier Ansatz).

### Kadmium:

Kadmium zeigte einen geringeren Effekt auf die Kulturen als Kupfer. Unter aeroben Bedingungen war eine Verringerung der Thymidininkorporation erst bei einer Konzentration von 1.95 mM feststellbar. Bei geringeren Kadmium-Zugaben wurden erhöhte Meßwerte erzielt, wobei die Substrat-freien Ansätze ein Maximum von 240% der Kontrolle bei 19  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  erreichten. Unter anaeroben Bedingungen wurden nie mehr als 100% erreicht.

$\text{Cd}$  führte also unter aeroben Verhältnissen bis zu einer Konzentration von einschließlich 195  $\mu\text{M}$  zu einer Erhöhung der Inkorporationsrate. Höhere Metallgehalte führten zu einer verringerten Inkorporation. Unter anaeroben Bedingungen bewirkten 100fach ( $\text{C}_{\text{Org}}$ -frei) geringere  $\text{Cd}$ -Konzentrationen eine Verringerung der Inkorporation.

### Kobalt:

Auch bei Kobalt zeigte sich ein weniger stark ausgeprägter Effekt als bei Kupfer. Maximale Inkorporationsraten von 180% im Vergleich mit Kontrollwerten resultierten im aeroben Ansatz aus minimalen Konzentrationen von 2.1  $\mu\text{M}$ , während die Abnahme der Inkorporation erst bei mehr als 2 mM auftrat.

Zusammengefaßt waren im Kadmium- und Kobaltansatz die Thymidin(Tdr)-Inkorporationswerte unter aeroben Bedingungen bis zu Konzentrationen von mehreren Hundert  $\mu\text{M}$  über die Kontrollwerte hinaus erhöht, erst danach sanken sie unter 100% ab. Unter anaeroben Bedingungen dagegen kam es nicht zu einer Steigerung der Inkorporation, vielmehr ähnelten die Werte der Kontrolle bzw. sanken bei Kadmiumkonzentrationen von mehr als 19  $\mu\text{M}$  deutlich ab. Kupferionen dagegen führten unter anaeroben Bedingungen zu stark erhöhten Inkorporationswerten, wobei die starke Verringerung des Thymidin-Einbaus unabhängig von der Verfügbarkeit des Sauerstoffs bei 31  $\mu\text{M}$  einsetzte.

### 3.3.2.2. *Einfluß von Schwermetallen auf die Mineralisierung (Abb. 10)*

Mit einem Versuch, in dem die Mineralisierung der Kulturen unter unterschiedlichen Bedingungen gemessen wurde, sollte der Einfluß verschiedener Metallkonzentrationen im Medium untersucht werden.

Es wurden 4 Konzentrationen von Cu, Cd, Co-Salzlösungen eingesetzt und die Mineralisierung bei aerob und anaerob unter Substrat-Mangel inkubierten Zellen gemessen.

Die Zugabe der Metall-Salzlösungen für die End-Konzentrationen von 50 µg bis 50 mg Salz/l sowie des Formalins für die Blindwerte (Endkonzentration 4%) erfolgte 30 min. vor dem Versetzen mit radioaktiver Glukose (Spezifische Aktivität: 1.85 MBq/0.035 mg, Zugabe: 0.1 µCi/ml Probe). Die Werte wurden dargestellt als Prozentwerte in Relation zur Metall-freien Kontrolle. Die Standardabweichungen wurden ermittelt aus 3 Parallelen (Abb. 10).

#### Kupfer:

Sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen zeigte sich bei der Inkubation von hungernden Kulturen mit verschiedenen Kupfer-Konzentrationen eine positive Wirkung auf die Mineralisierung im Bereich von 0.31 bis 3.13 µM, die unter Sauerstoff-reduzierten Bedingungen noch bis zum höchsten eingesetzten Wert von 31.33 µM Cu<sup>2+</sup> anhielt. In Gegenwart von Sauerstoff führten Cu-Konzentrationen von 31.3 µM zu einer Verringerung der Mineralisierungswerte auf weniger als 0.2% der Kontrolle, während unter Sauerstoff-reduzierten Bedingungen noch Werte von 127% erreicht wurden.

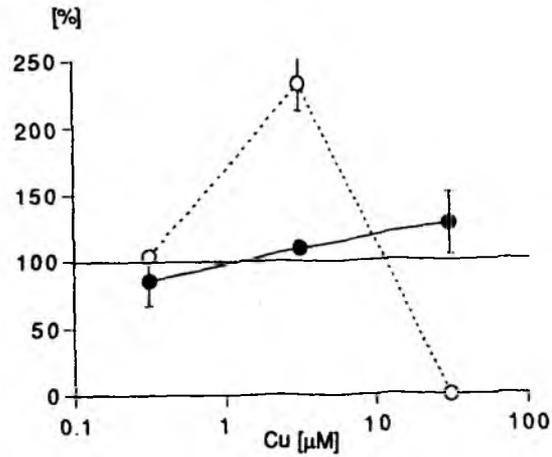
#### Kadmium:

Kadmium-Konzentrationen im Bereich von 0.195 bis 194.9 µM hatten unter aeroben Bedingungen entweder keinen oder einen steigernden Effekt (bei 194.9 µM) auf die Mineralisierungsrate. Bei anaerober Inkubation traten Effekte bei Konzentrationen von mehr als 1.95 µM auf: Es kam zu einer verstärkten Mineralisierung bei den Substrat-freien Zellen. Eine Konzentration von 194.9 µM im Medium führte jedoch zu geringen Werten im Vergleich zur Kontrolle (15%).

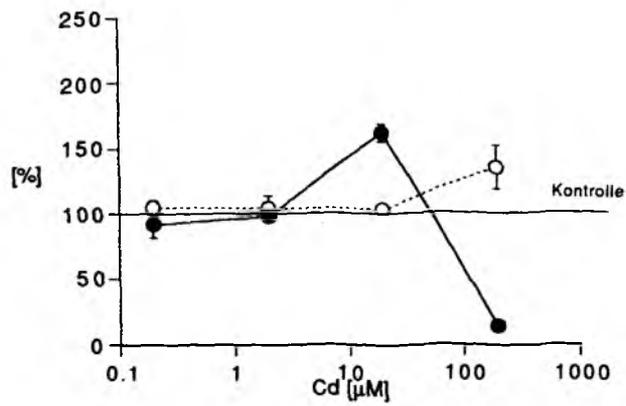
#### Kobalt:

Kobalt hatte bei keiner der eingesetzten Konzentrationen einen Effekt.

### Kupfer



### Kadmium



### Kobalt

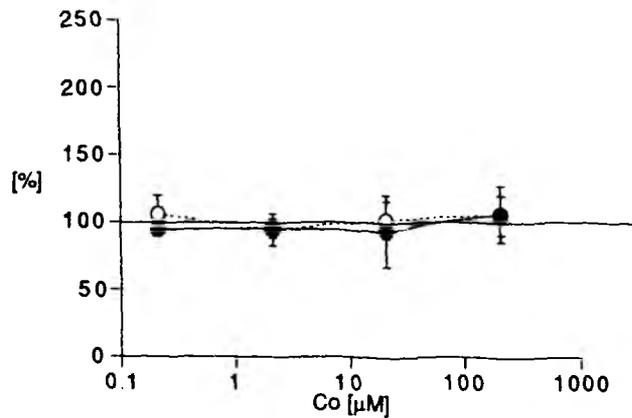


Abb.10: Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen an Kupfer-, Kadmium- bzw. Kobalt-Ionen auf die Mineralisierung als Prozentanteil der unbehandelten Kontrolle in  $C_{org}$ -limitierten Kulturen unter aeroben (○) und anaeroben (●) Bedingungen.

Zusammengefaßt zeigte sich bei den verwendeten Kobalt-Konzentrationen bis 210  $\mu\text{M}$  kein Effekt auf die Mineralisierung aerob oder anaerob inkubierter Kulturen. Auch die aerobe Inkubation mit Kadmium- bzw. die anaerobe mit Kupfer-Ionen führte bei keiner der eingesetzten Konzentrationen zu einer Abnahme. Eine Verringerung der Mineralisierung trat beim Kadmium ausschließlich im anoxischen bei 190  $\mu\text{M}$  auf, beim Kupfer dagegen bei Sauerstoffverfügbarkeit schon bei 31  $\mu\text{M}$ .

3.3.2.3. *Vergleich der Effekte verschiedener Metallsalze bei einer Endkonzentration von 5 mg/l auf die Thymidin-Inkorporation und Mineralisierung (Tab. 5)*

Häufig wurden in den bisherigen Versuchen Metallsalze bis zu einer Endkonzentration von 5 mg/l zugesetzt. Bei dieser Konzentration zeigten sich unterschiedliche Tendenzen zwischen den Metallen. Daher wurden in Tabelle 5 die entsprechenden Prozentdaten für Thymidin-Inkorporation und Mineralisierung zum Vergleich zusammengestellt.

Die Reduktion der Stoffwechselaktivitäten erfolgte bei diesen Konzentrationen am stärksten durch Kupfer-Ionen mit Ausnahme der Mineralisierung des anaeroben Ansatzes (Erhöhung auf 127%). Kupferionen hatten jedoch immer einen stärker hemmenden Effekt in Gegenwart von Sauerstoff (Reduktion der Tdr-Inkorporation auf 0.85% unter aeroben, auf 7.71 unter anaeroben Bedingungen). Bei Kadmium- und Kobalt-Ionen dagegen war die Abnahme bei der Inkorporation unter anaeroben Bedingungen stärker (Abnahme auf 70 bzw. 90 %), während die Mineralisierung gleich blieb oder im Falle des Kadmioms auf 160 % zunahm.

Tab. 5: Prozentwerte von Tdr-Inkorporations- und Mineralisierungsraten der Metall-Ansätze an den Metall-freien Kontrollansätzen. Die Einwirkungszeit der Metalle vor Zugabe der Reagenzien betrug 30 min. (Gesamt-Konzentrationen: 19 ( $\text{Cd}^{2+}$ ), 21 ( $\text{Co}^{2+}$ ) bzw. 31 ( $\text{Cu}^{2+}$ )  $\mu\text{M}$ )

zugegebene Metall-Ionen	Tdr-Inkorporation [%]		Mineralisierung [%]	
	aerob	anaerob	aerob	anaerob
Kupfer	0.85	7.71	0.10	127.43
Kadmium	238.93	70.34	103.00	161.00
Kobalt	153.01	89.78	102.00	106.52

#### 3.3.2.4. Zusammenfassung der Ergebnisse Kapitel 3.3.2.

- Spontan toxische Effekte von Kupfer traten in Form einer starken Verringerung der Thymidin-Inkorporation und der Glukose-Mineralisierung (aerob) schon bei Konzentrationen von 31  $\mu\text{M}$  auf, während die Toxizität von Kadmium als Verringerung der Stoffwechselraten um 50 % erst beim Zehnfachen dieser Menge auftrat. Durch Kobalt dagegen wurde ein derartiger Effekt bei keiner Konzentration beobachtet.
- Es wurden Stimulierungen sowohl der Thymidin-Inkorporation als auch der Mineralisierung gemessen, die entweder im anaeroben oder im aeroben auftraten. Derartige Tendenzen waren bei Kadmium und Kobalt ähnlich, bei Kupfer gegenläufig zu messen: Hier war die Thymidin-Inkorporation unter anaeroben Bedingungen erhöht (auf 450 % der Kontrolle), die von Kadmium und Kobalt unter aeroben. Bei der Mineralisierung wurden der aerobe Kupfer-Ansatz und der anaerobe Kadmium-Ansatz stimuliert (Abb. 9, 10).
- Bezogen auf die in dieser Arbeit häufig eingesetzte Konzentration von 5 mg/l zeigten sich stimulierende Effekte auf die aerobe Tdr-Inkorporation bei Kadmium und Kobalt, und auf die anaerobe Mineralisierung bei Kupfer und Kadmium (Tab. 5)

#### 3.3.3. Die Wirkung anhaltender Schwermetall-Exposition (> 20 Stunden) auf die Zellphysiologie und EP-Zusammensetzung.

Im Rahmen dieser Untersuchungen sollte herausgefunden werden, inwieweit der Teststamm in der Lage war, auf erhöhte Schwermetallkonzentrationen innerhalb eines Zeitraums von ein bis mehreren Tagen mit Reaktionen, die zur Detoxifizierung führten, zu antworten.

##### 3.3.3.1. Veränderung des Zellproteinpools bei C-freier Inkubation mit Schwermetallen (Tab. 6)

Erhöhte Metallkonzentrationen im Medium können direkt - durch Beeinflussung der Zellintegrität - oder indirekt - durch erhöhten Energieumsatz im Rahmen einer Abwehrreaktion - die intrazelluläre Zusammensetzung beeinflussen. Als biochemischer Parameter wurde daher die Veränderung der Zellproteingehalte von hungernden Zellen bei Inkubation mit erhöhten Konzentrationen von Kupfer-, Kadmium- und Kobalt-Ionen bestimmt.

Hierzu wurden Kulturen gleicher Zelldichte, die 1 Stunde lang aerob oder anaerob gehungert hatten, mit Schwermetallsalzen versetzt, so daß folgende Gesamt-

Ionenkonzentrationen bestanden: 1.9 (Cd<sup>2+</sup>), 2.1 (Co<sup>2+</sup>) bzw. 3.1 µM (Cu<sup>2+</sup>). Die folgende 24stündige Inkubation erfolgte weiterhin mit bzw. ohne verfügbaren Sauerstoff. Zum Vergleich diente jeweils eine Metall-freie Kultur. Nach der insgesamt 25stündigen Inkubation wurden die Ansätze bei 6500 g zentrifugiert und die Proteinkonzentration in den Pellets bestimmt.

Für die Proteinkonzentrationen in den Zellen ergaben sich ohne Einwirkung von Metallen Werte von 212 (aerob) bzw. 153 (anaerob) µg/ml Kultur. In Gegenwart von Metallen kam es zur Abnahme, wobei dieser Effekt unter aeroben Bedingungen stärker ausgeprägt war als unter anaeroben. Lag die Abnahme unter aeroben Bedingungen zwischen 22 und 27 % der Kontrolle, so sank der Proteingehalt pro ml Kultur um 6 bis 12 %, wenn kein Sauerstoff verfügbar war (Tab. 6).

Tab. 6: Veränderung des zellulären Proteinpools von FL2 in µg/ml Kultur und die Abnahme in Prozent der Kontrolle nach 24-stündiger Inkubation in C<sub>org</sub>-freiem Medium mit Gesamt-Schwermetallkonzentrationen von 1.9 (Cd<sup>2+</sup>), 2.1 (Co<sup>2+</sup>) bzw. 3.1 µM (Cu<sup>2+</sup>) unter aeroben und anaeroben Bedingungen und im Metall-freien Medium (Kontrolle).

Ansatz	aerob	anaerob
K(25h)	212.22 ± 1.34	153.16 ± 5.34
Cu	163.65 ± 7.97	134.64 ± 8.08
Cd	156.62 ± 3.47	142.86 ± 3.13
Co	156.06 ± 5.09	136.22 ± 2.69
Abnahme in %	0.00 ± 0.63	0.00 ± 3.49
Cu	22.89 ± 4.87	12.09 ± 6.00
Cd	26.20 ± 2.22	6.72 ± 2.19
Co	26.46 ± 3.26	11.06 ± 1.97

### 3.3.3.2. Kulturen ohne vorherige Metallexposition (Abb. 11, 12)

Es sollte hier die Frage untersucht werden, ob sich erhöhte Schwermetallkonzentrationen auf die Exopolymerssekretion C<sub>org</sub>-freier Kulturen auswirkten und ob dabei der Zeitraum, während dessen es den Bakterien vor der Metallzugabe an Substrat mangelte, bei der Reaktion eine Rolle spielte.

## Aerob

## Anaerob

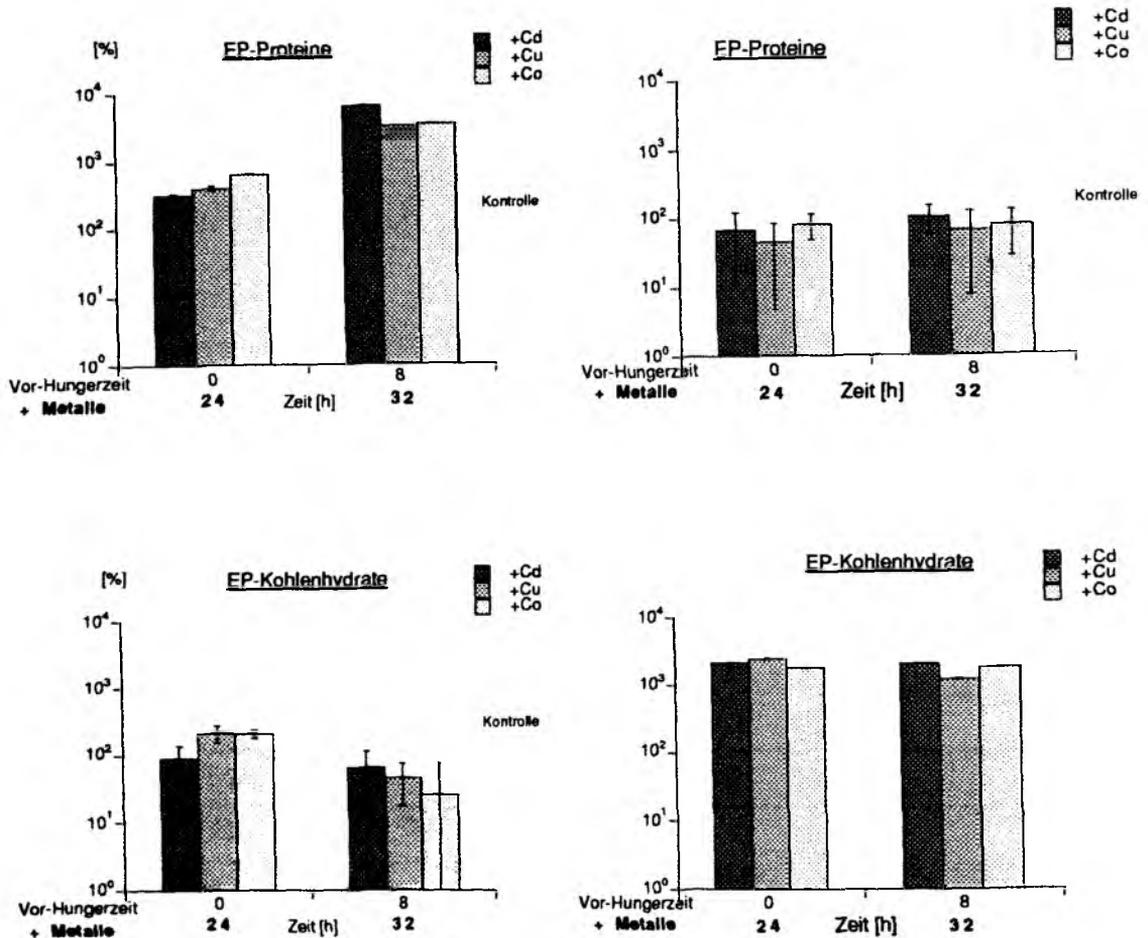


Abb. 11: Durch die Inkubation mit erhöhten Metallkonzentrationen (5 mg/l) veränderte EP-Kohlenhydrat und -Proteinwerte pro Zellzahl im Vergleich zu metallfreien Kontrollen. Es wurden jeweils aerobe und anaerobe Inkubationen durchgeführt.

Aus je 3 C<sub>org</sub>-freien, aerob und anaerob inkubierten Kulturen wurden nach 0 und 8 h pro Kolben 3 x 14 ml entnommen und mit 5 mg/l Cd-, Cu- bzw Co-Salzen für 24 h inkubiert. Gleichzeitig erfolgte am Ende dieser Inkubation wieder eine Probennahme aus der Ausgangskultur als Kontrolle.

Am Ende der Inkubation wurden 1 ml der Suspension abgenommen und für eine Gesamt-Zellzahlbestimmung mit Formol versetzt.

Aus den restlichen 13 ml wurden die Exopolymere extrahiert, dialysiert und biochemisch analysiert (siehe Versuchsschema A). Wieder wurde eine Umrechnung der biochemischen

Daten auf Zelldichte vorgenommen, um unterschiedlichen Zellkonzentrationen in den Ansätzen gerecht zu werden.

Erhöhte Metallgehalte führten unter aeroben und anaeroben Bedingungen zu entgegengesetzten Ergebnissen: In Relation zur Kontrollprobe als 100% zeigte sich eine Zunahme der exopolymeren Proteinwerte pro Zellzahl unter aeroben Bedingungen um den Faktor 5 bis 50 bei vorhergehendem  $C_{ORG}$ -Mangel von 0 bzw. 8 Stunden. Die EP-Kohlenhydratwerte dagegen änderten sich in Gegenwart von Sauerstoff nicht, während sie unter anaeroben Bedingungen um den Faktor 10 in Gegenwart der Metallionen gegenüber der Kontrolle zunahmen. Ein Unterschied bei den Proteingehalten der Exopolymere wurde nicht deutlich.

Eine Vorhungerzeit von 8 Stunden hatte bei den jeweils stark angestiegenen Parametern einen erhöhten Effekt. Ein metallspezifischer Unterschied in der Reaktion der Bakterien ließ sich nicht feststellen (Abb. 11)

Bei einem Vergleich der Kohlenhydrat:Protein-Verhältnisse miteinander lagen die Quotienten der 24 Stunden lang mit Metallen inkubierten Ansätze bei den aeroben Inkubationen, der Abb. 11 entsprechend, weit unter denen der Kontrollansätze. Unter anaeroben Bedingungen dagegen überschritten sie die Kontrollwerte um das 2.5 (52 Stunden Vorhungerzeit) bis maximal das 45fache (Kadmium bei 0 Stunden Vorhungerzeit) (Abb. 12).

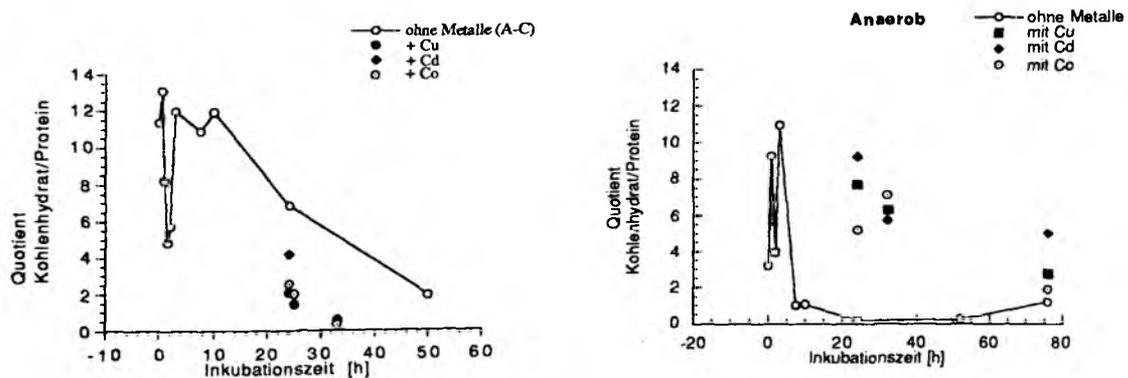


Abb. 12 : Kohlenhydrat:Protein-Verhältnisse unter aeroben und anaeroben Bedingungen nach 24-stündiger Inkubation der Kulturen mit jeweils 5 mg/l Metallsalz im Medium. Zum Vergleich sind die Quotienten<sup>1</sup> der nicht mit Metall versetzten Kulturen gezeigt.

<sup>1</sup>Gehalte der EP-Komponenten bestimmt als Massen (=μg)

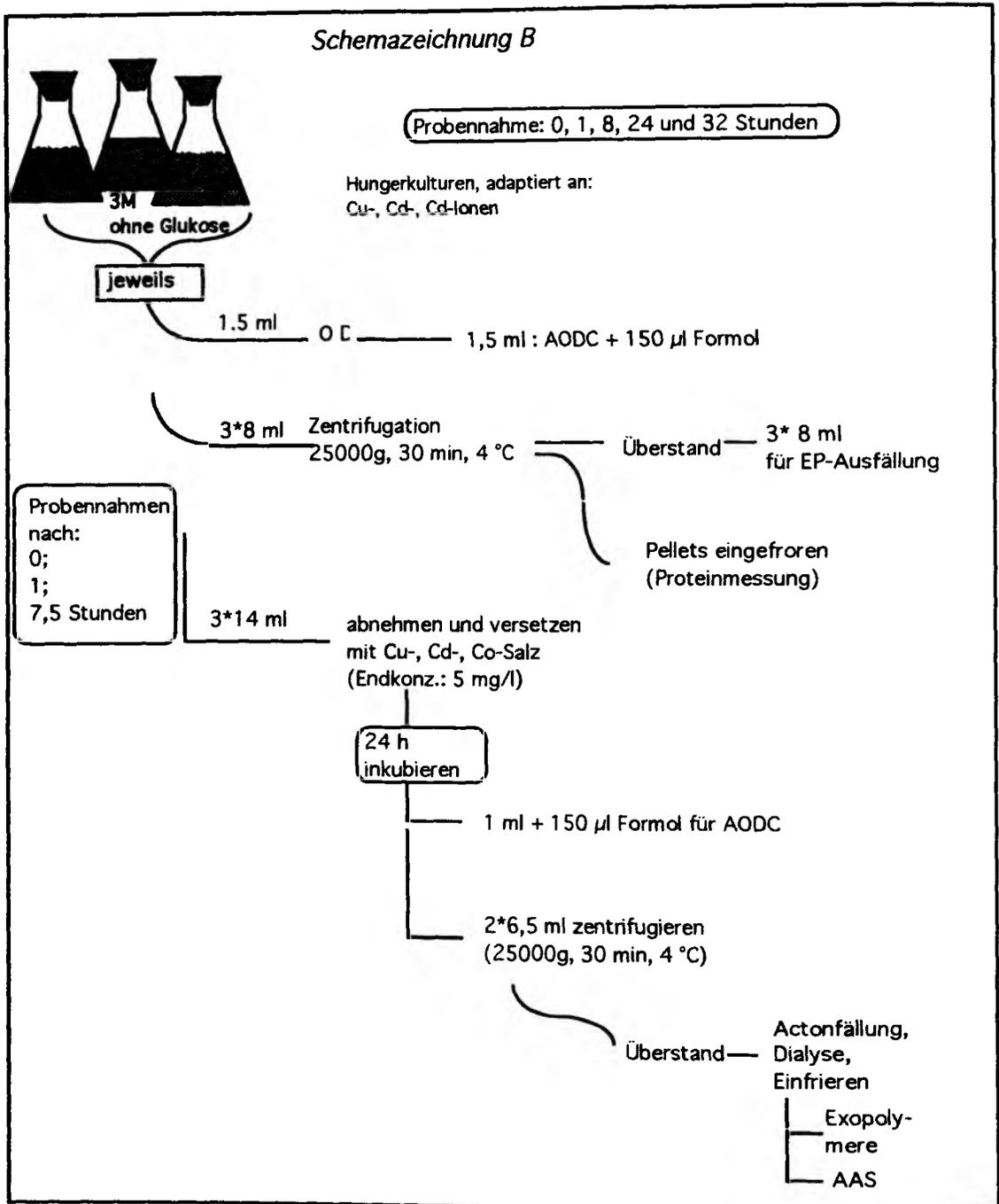


Abb. 13: Schematische Darstellung der Versuche mit Metall-adaptierten Kulturen zur Exopolymergewinnung.

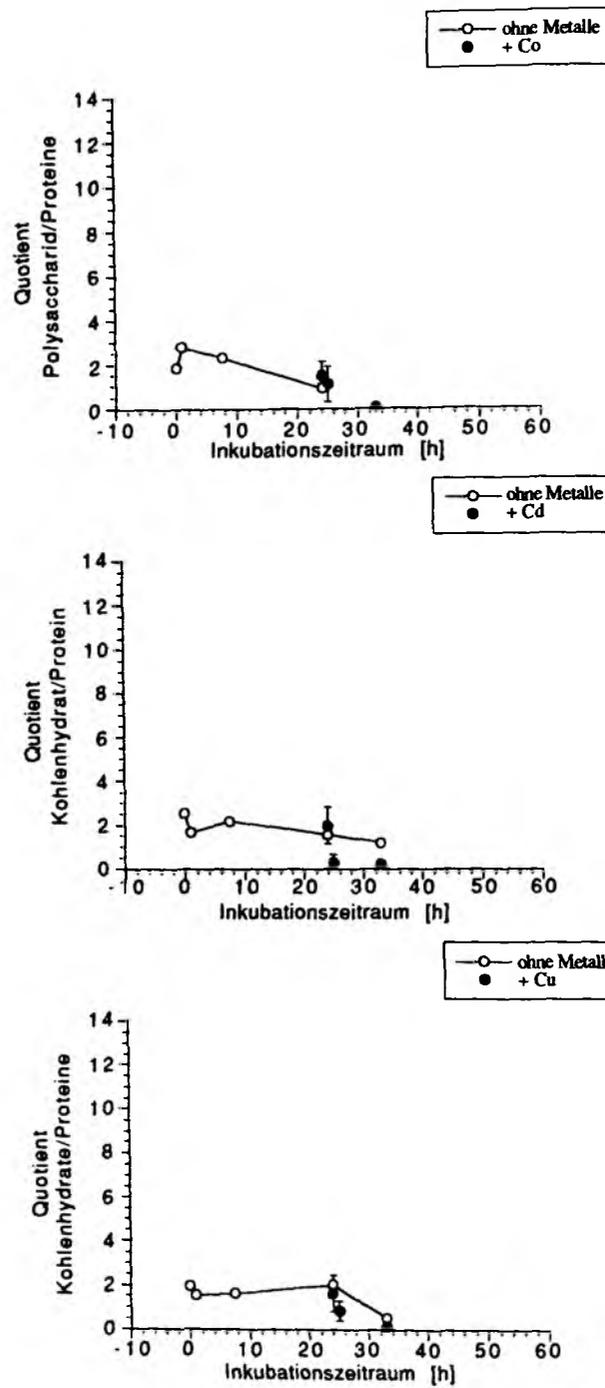
### 3.3.3.3. *Kulturen mit Metalladaptation*

Die Exopolymere von Kulturen, die an erhöhte Metallkonzentrationen adaptiert worden waren, wurden im Hinblick auf selektive Tendenzen mit solchen von nicht-adaptierten verglichen.

Kulturen, die stufenweise mit steigenden Konzentrationen von  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ - oder  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen inkubiert worden waren und auch bei 50 mg/l noch exponentielles Wachstum gezeigt hatten, wurden aus einer mit Metall angereicherten Kultur abzentrifugiert und überimpft in je 250 ml Metall-freiem Hungermedium. Nach 0, 1, 8, 24 und 32 Stunden wurden jeweils 3 Mal Proben genommen, die Exopolymere extrahiert, dialysiert und Protein- sowie Kohlenhydratbestimmungen durchgeführt. Außerdem wurde pro Probennahme aus jedem Kolben 1 ml für die Gesamtzellzahlbestimmung entnommen.

Nach 0, 1 und 8 Stunden wurden aus den  $\text{C}_{\text{ORG}}$ -freien Ansätzen 3 Mal 14 ml entnommen und mit 5 mg/l des jeweiligen Metalles für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Exopolymere wie beschrieben untersucht (siehe Versuchsschema B).

Die Kohlenhydrat/Protein-Verhältnisse wurden jeweils für die Inkubation in Gegenwart von und ohne Metallionen ermittelt: Die Exopolymere aller adaptierten Kulturen wiesen unabhängig vom Element einen geringeren Kohlenhydrat:Protein-Quotienten auf, verglichen mit nicht-adaptierten Kulturen. Die Inkubation in Gegenwart der jeweiligen Metallspezies hatte außer bei Inkubation mit Kadmium keinen Effekt, der dem der nicht-adaptierten Kulturen vergleichbar wäre (Abb. 14).



**Abb.14:** Gewichts-Quotienten aus EP-Polysacchariden und -Proteinen einer an erhöhte Metallkonzentrationen adaptierten Kultur bei Inkubation in Corg-freiem Medium mit und ohne Zusatz von Metallsalzen.

#### 3.3.3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse Kapitel 3.3.3.

- Erhöhte Metallkonzentrationen im Medium des Teststammes führten zu einer Abnahme des zellulären Proteinpools, die unter aeroben Bedingungen stärker ausgeprägt war als unter anaeroben (Tab. 6)
- Nach 24stündiger, aerober Exposition gegenüber Schwermetallen nahm der gewichtsmäßige Proteinanteil zu während die Kohlenhydratwerte gleichblieben. Dabei war diese Tendenz nach 8 Stunden vorherigen Hungerns stärker ausgeprägt. Unter anaeroben Bedingungen nahmen unabhängig von der Vorhungerzeit die EP-Kohlenhydrat-Gehalte zu, während keine quantitative Veränderung bei den Proteinen zu messen war (Abb. 11).
- Dies wurde noch einmal belegt anhand des Verhältnisses von gewichtsmäßigen Kohlenhydrat- zu Protein-Anteilen: Die Verhältnisse waren unter aeroben Bedingungen stark abgesunken, während sie unter anaeroben die Werte der Metallfreien Ansätze weit überstiegen (Abb. 12).
- Bei Metall-adaptierten waren ebenfalls unter aeroben Bedingungen stark verringerte EP-Kohlenhydrat- zu Protein-Verhältnisse zu beobachten, die unabhängig vom Vorhandensein von Metallen im Medium gleich klein blieben.

#### 3.3.4. Die Metallbindungskapazität der EP-Komponenten (Abb. 15, Tab. 7)

In diesem Versuch wurde untersucht, ob es unterschiedliche Affinitäten der einzelnen Metallionen zu Exopolymeren gab, die unter unterschiedlichen Bedingungen bzgl. Dauer des Substratmangels und Sauerstoffverfügbarkeit gebildet worden waren.

Aus Kulturen, die 24 Stunden lang aerob bzw. anaerob mit 5 mg/l der Kupfer-, Kadmium- bzw. Kobalt-Salze in  $C_{org}$ -freiem Medium inkubiert worden waren, wurden die Exopolymere extrahiert und wie beschrieben untersucht. Die Protein- und Kohlenhydratfraktionen wurden bestimmt und zusätzlich adsorbierte Metallgehalte mit der Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt. Ein Vergleich der biochemischen Komponenten mit den Metallgehalten ergaben gute Korrelationen zwischen Kadmiumgehalten und den gemessenen aeroben EP-Kohlenhydratwerten ( $R= 0.796$ ) sowie zwischen Kupfer- und EP-Proteingehalten unabhängig von der Sauerstoffverfügbarkeit ( $R_{aerob} =$

0.8166,  $R_{\text{anaerob}} = 0.9358$ ). Bei Kobalt zeigte sich keine Korrelation zu Kohlenhydraten und Proteinen.

Bei den extrahierten Polymeren der Metall-adaptierten Kulturen zeigten die Korrelationen ähnliche Tendenzen mit Ausnahme der Kupfer/Kohlenhydrat-Beziehung, die hier einen erhöhten Korrelationskoeffizienten hatte ( $R = 0.813$ ) (Tab. 7).

*Tab. 7: Korrelations-Koeffizienten der linearen Korrelation zwischen Kohlenhydraten bzw. Proteinen und verschiedenen Metallionen in extrahierten Exopolymeren nach 24-stündiger Inkubation adaptierter ( $n=9$ ) und nicht-adaptierter FI2-Kulturen ( $n=12$ ) in Gegenwart von 5 mg/l des jeweiligen Schwermetallsalzes unter aeroben bzw. anaeroben, *Corr*-freien Bedingungen.*

Metallion	verwendete Kultur	Kohlenhydrate in EP [ $\mu\text{g/ml}$ ]		Proteine in EP [ $\mu\text{g/ml}$ ]	
		aerober Ansatz	anaerober Ansatz	aerober Ansatz	anaerober Ansatz
Kupfer	nicht adaptiert	0.316	0.214	<b>0.817</b>	<b>0.936</b>
	adaptiert	<b>0.813</b>		<b>0.834</b>	
Kadmium	nicht adaptiert	<b>0.796</b>	0.236	0.260	0.675
	adaptiert	<b>0.832</b>		0.527	
Kobalt	nicht adaptiert	0.176	0.481	0.116	0.027
	adaptiert	<b>0.730</b>		0.605	

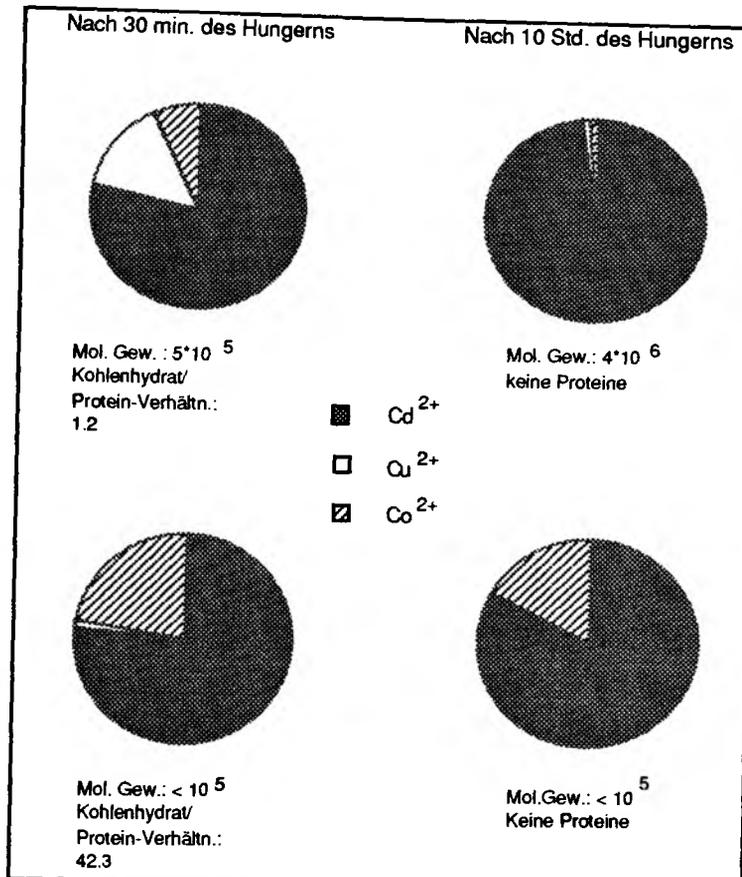


Abb. 15: Relative Sorption von  $\text{Cd}^{2+}$ -,  $\text{Cu}^{2+}$ - und  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen an extrahierte Exopolymere, die von FL2 unter  $\text{C}_{\text{org}}$ -Mangelbedingungen produziert worden waren. Sie waren mit Metallionen-Konzentrationen von je 10 mg/l versetzt und in einer Sephacryl-S500 HR-Säule gelchromatographisch nach der Molekülgröße getrennt worden (pH 7.0). Die einzelnen Fraktionen wurden auf Protein- und Kohlenhydratwerte analysiert. Die Schwermetallgehalte der getrockneten Fraktion wurden über die AAS bestimmt.

Um die maximale Metallbelastung der Exopolymere zu bestimmen, wurden zu je 10 mg der extrahierten, lyophilisierten Polymere unterschiedlich langer Limitierungszeit 2 ml Milli-Q und je 20  $\mu\text{l}$  der Metallsalzlösungen (5g/l) gegeben und nach einer halben Stunde auf die Säule aufgetragen. Die Protein- bzw. Kohlenhydratgehalte der einzelnen Proben wurden bestimmt, die Proben mit erhöhten Konzentrationen lyophilisiert und anschließend in 2 ml Milli-Q für die Atomabsorptionsspektrometrie resuspendiert. Die säulenchromatographische Auftrennung zeigte eine hohe Affinität des Kupfers zu Proteinen und des Kadmiums zu Kohlenhydraten: Erhöhte Kupferanteile waren ausschließlich bei hohen Proteinkonzentrationen in den aufgefangenen Fraktionen meßbar.

### 3.3.4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse Kapitel 3.5.4.

- Kupfer wurde am stärksten durch Proteine, Kadmium durch Polysaccharide gebunden.

### 3.3.5. Entgiftende Funktion der Proteine bei Metallstress (Abb. 16, 17)

In einem Versuch mit einem Proteinsynthese-Inhibitor wurde die Rolle der extrazellulären Proteine untersucht, die unter Hunger-Bedingungen bei der Reaktion auf Metalle produziert worden waren. Es sollte dabei die Frage beantwortet werden, ob die nach 3 Stunden des Hungerns produzierten EP-Proteine eine detoxifizierende Wirkung gegenüber Metallen haben. Außerdem war zu klären, ob die Wirkung der einzelnen Metallionen unterschiedlich war.

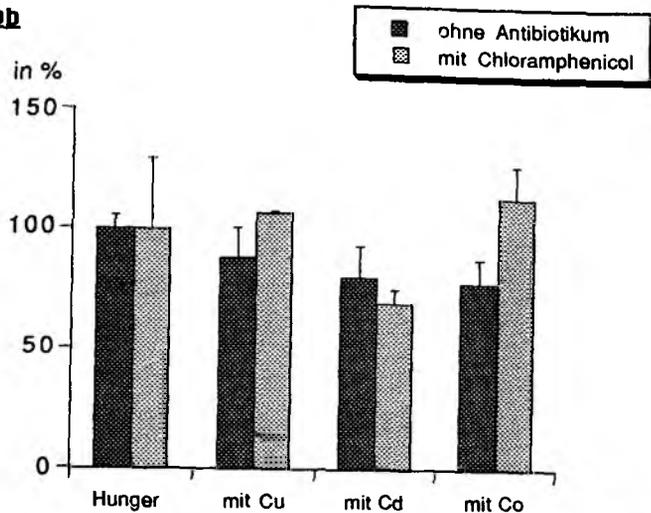
Im folgenden Versuch wurde die Bildung von Proteinen durch Zusatz des Antibiotikums Chloramphenicol zum Medium in Konzentrationen von 50 µg/ml verhindert (Maniatis, et al. 1982). Chloramphenicol ist ein bakteriostatischer Wirkstoff, der an die 50 S Untereinheit der Ribosomen bindet und die Bildung von Peptidbindungen verhindert.

Die Zugabe des Antibiotikums zu aeroben und anaeroben Kulturen erfolgte nach 3 h des Hungerns. Nach einer Einwirkungszeit von 1,5 h wurden in 3 Parallelen Metalle bis zu einer Gesamt-Konzentration von 500 µg/l zugegeben.

Zur Kontrolle der antibiotischen Wirkung wurden entsprechende Kulturen in 3 Parallelen, die nicht zuvor mit Chloramphenicol behandelt worden waren, mit Metallen versetzt. Zur Kontrolle des Metalleffektes diente ein Metallfreier Ansatz ohne Antibiotika. Nach 23stündiger Inkubation mit Metall-Ionen, also nach einem Inkubationszeitraum von fast 30 Stunden, wurden die CO<sub>2</sub>-Freisetzung und Inkorporation in den Proben gemessen. Dabei wurde mit hochmarkierter <sup>14</sup>C-Glukose (298,0 mCi/mmol) gearbeitet und ca 1 µCi pro Probe eingesetzt.

Es ließen sich bei der aeroben Inkubation keine signifikanten Veränderungen in den Mineralisierungs-Raten der mit Metall versetzten Ansätze im Vergleich zu den Kontrollen feststellen, die Werte schienen unbeeinflusst von der Zugabe des Antibiotikums. Anaerob inkubiert führte die Blockierung der Proteinsynthese zu einer verringerten CO<sub>2</sub>-Freisetzung bei den Kupfer- und Kadmium-Ansätzen im Vergleich zur Kontrolle, wobei dieser Effekt beim Kupfer am stärksten ausgeprägt war. Beim Kobalt war keine Wirkung erkennbar (Abb. 16)

**aerob**



**Anaerob**

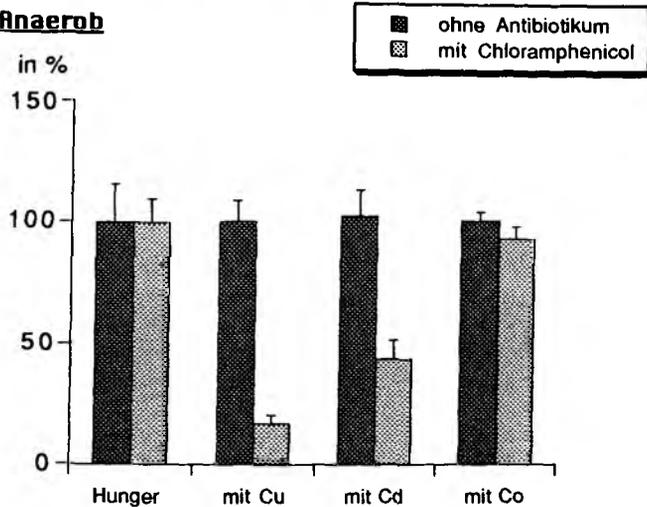


Abb.16 :  
Die Auswirkungen der Proteinsynthese-Hemmung vor der Erhöhung der Metallkonzentrationen auf die Mineralisierung von Glukose unter aeroben und anaeroben Hunger-Bedingungen.

Die Inkorporation von Glukose in die Zellbiomasse wurde bei aerober Inkubation in Gegenwart von Metallen verstärkt. Eine Zugabe des Antibiotikums hatte unter gleichen Bedingungen eine starke Reduktion des inkorporierten Materials zur Folge. Unter anaeroben Bedingungen wurde die Inkorporationsrate durch Metallzugabe bzgl. der Kontrolle nicht verändert. Durch Versetzen der Ansätze mit Chloramphenicol kam es jedoch wie unter aeroben Bedingungen zu einer Verringerung der Inkorporation bei allen Metallen. Dieser Effekt war beim Kupfer am stärksten ausgeprägt und - im Gegensatz zu den Mineralisierungsergebnissen - auch beim Kobalt vorhanden (Abb. 17).

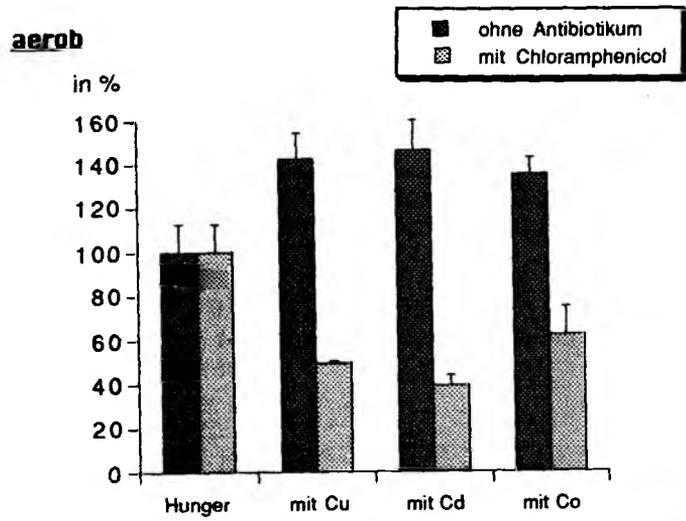
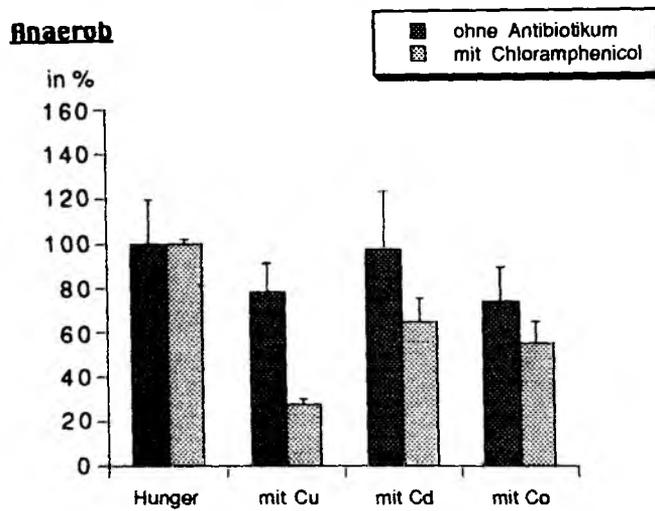


Abb. 17:  
Auswirkungen der Proteinbiosynthese-Hemmung vor der Erhöhung der Metallkonzentrationen auf die **Inkorporation** von Glukose unter aeroben und anaeroben Bedingungen.



**3.3.5.1. Zusammenfassung der Ergebnisse Kapitel 3.5.5.**

- Erhöhte Metallkonzentrationen hatten nur unter anaeroben Bedingungen einen negativen Effekt auf die Mineralisierung, wenn die Zellen nicht mehr in der Lage waren, nach Metallzugabe Proteine zu synthetisieren (Abb. 16).
- Die Inkorporation von Glukose war in Gegenwart von Metallen aerob und anaerob stark gehemmt, wenn eine Proteinsynthese nicht möglich war (Abb. 17).

### 3.3.6. Veränderung der EP-Protein-Fingerprints durch Inkubation mit Metallen (Abb. 18, 19)

Es sollte schließlich untersucht werden, ob sich die qualitative Zusammensetzung extrazellulärer EP-Proteine durch die Inkubation von hungernden Kulturen in Gegenwart von Metallen ändert.

Parallel zu dem Versuch zur "Entgiftenden Funktion der Proteine bei Metallstreß" (3.3.5) wurden Proben abgenommen, um die Exoproteine für eine gelelektrophoretische Auftrennung zu extrahieren. Sie wurden mit Di-Natriumsulfat ausgefällt und auf die diskontinuierliche Gelelektrophorese aufgetragen. Gefärbt wurde mit der polychromatischen Silberfärbung (2.3.9.).

Neben 30 Stunden lang gehungerten Kontrollen, denen keine Metalle zugegeben worden waren, wurden die extrazellulären Proteine der jeweils mit Gesamt-Metallkonzentrationen von 500 µg/l versetzten Ansätze aufgetrennt. Um die in Reaktion auf Metallionen gebildeten Proteine erkennen zu können, wurden jeweils Proben zum Vergleich aufgetragen, denen zur Verhinderung der Proteinbiosynthese 1.5 h vor Zugabe der Metallsalzlösungen 50 µg/ml Chloramphenicol zugesetzt worden war.

In allen aeroben Metallansätzen zeigten sich Banden, die Proteinen mit einem Molekulargewicht von 23, 32 bzw 200 kDalton entsprachen. Die Bandenmuster waren in abgeschwächter Form auch in den Chloramphenicol-Ansätzen zu erkennen, nicht jedoch in der Probe ohne Metallzusätze.

Unter anaeroben Bedingungen dagegen zeigte sich ein Unterschied zwischen den Exoproteinen der mit Kupfer-Ionen inkubierten Kultur und denen der anderen Metallansätze. Im Molekulargewichtsbereich zwischen 168 und 231 kDalton wiesen die Kupferansätze mehrere Banden auf, für die die anderen Metallansätze keine Entsprechungen hatten. Während dort zwei eng nebeneinanderliegende Banden bei 119 und 126 kDalton lagen, tauchten weiterhin beim Cu-Ansatz zwei Proteine der Größe 112 und 133 kDalton auf (Abb. 18, 19).

Abb. 18, 19: Gelelektrophoretische Auftrennung der EP-Proteinfractionen von 30 Stunden lang aerob (Abb. 18) und anaerob (Abb. 19) gehungerten Ansätzen des Teststammes FL2, denen nach 3 h Inkubationszeit 50 µg/ml Chloramphenicol (Cm) und nach weiteren 1.5 h Metalle (Kobalt-, Kadmium-, Kupfer-Ionen) in einer Endkonzentration von 500 µg/l zugegeben worden war.

Als Kontrollen wurden EP-Extrakte aus Kulturen ohne Chloramphenicol aufgetragen.

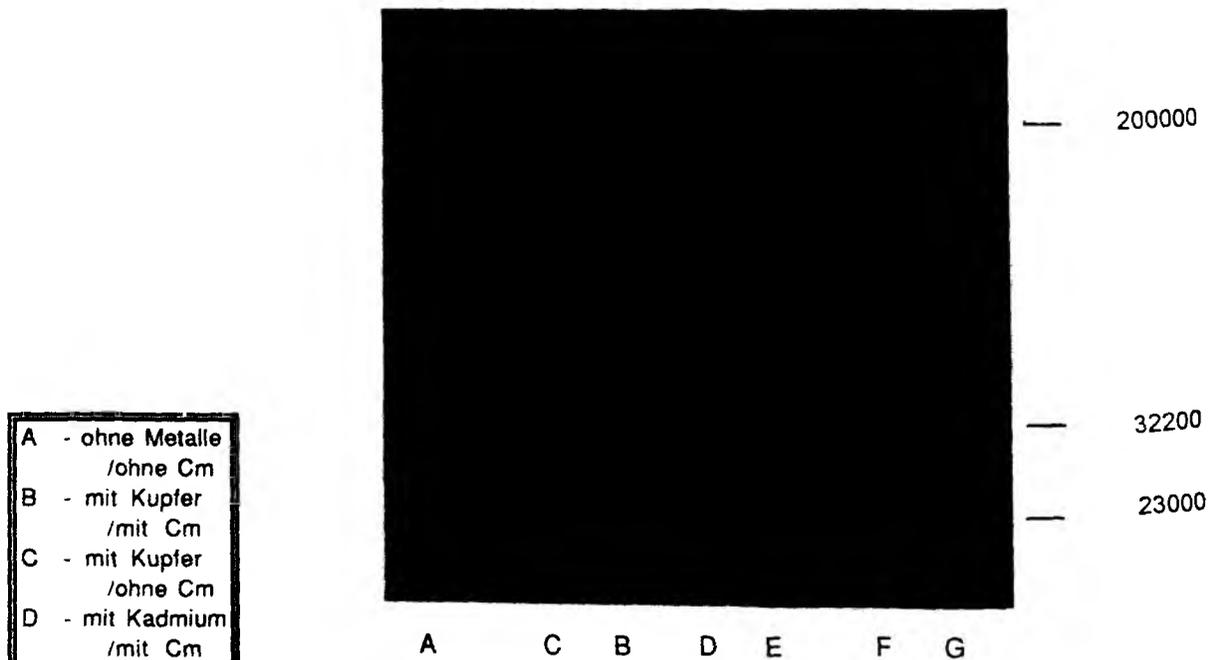


Abb. 18: Aerobe Inkubation

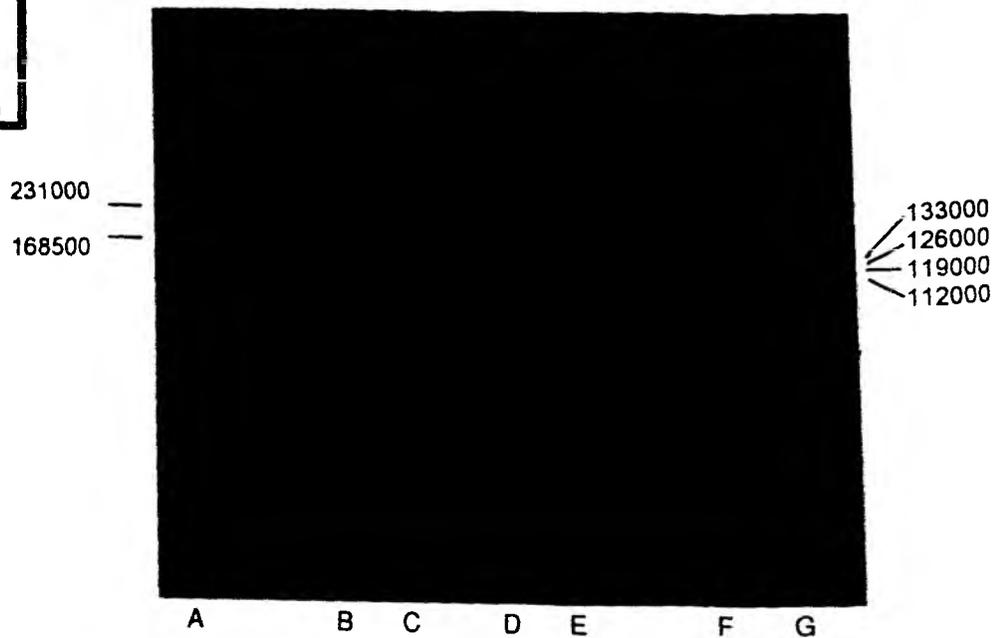


Abb. 19 Anaerobe Inkubation

#### 3.3.6.1. Zusammenfassung der Ergebnisse 3.5.6.

- Unter aeroben Bedingungen waren in die Bandenmuster der Metallansätze gleich, unterschieden sich von den Metall-freien Ansätzen durch Banden, die einigen kleinen (23 und 32 kDa) und einem großen Protein entsprachen.
- Anaerob ergaben die Bandenmuster ein Metall-spezifisches Bild, indem Proteine der Größe 168 bis 231 kDa nur in den Kupferansätzen auftraten, während andere Banden, die nach Zugabe von Kadmium- und Kobalt-Ionen auftraten, nur hier zu sehen waren (119 und 126 kDa).

#### 3.3.7. Der Einfluß von Metallionen auf extrazelluläre Protease-Aktivitäten hungernder Bakterien (Abb. 20)

Der Frage, inwieweit Schwermetalle die proteolytische Aktivität beeinflussen, wurde durch Inkubation der zellfreien Überstände mit HidePowderAzure (HPA) nachgegangen. Dieser Versuch wurde über einen Zeitraum von 150 Stunden angesetzt.

Zu 1,6 h lang gehungerten Kulturen wurden Cu-, Cd- bzw. Co-Salzlösungen in einer Endkonzentration von 500 µg/l (Zeitpunkt  $t_1$ ) gegeben. Zwei nicht mit Metallen versetzte Kulturen dienten als Kontrollen. Zu den Zeitpunkten  $t_2$  bis  $t_5$  wurden je 10 ml jedes Ansatzes mit HPA in Konzentrationen von 1 mg/ml versetzt. Die Extinktionsänderungen wurden über einen Zeitraum von ca 150 h protokolliert.

Die Kulturen wurden ebenso wie die mit HPA versetzten Überstände bei 28 °C inkubiert. Blindwerte enthielten steriles NSS mit 1 mg/ml HPA.

Der Verlauf der Enzymaktivität im Substrat-freien Ansatz zeigte, daß proteolytische Enzyme hauptsächlich in den ersten 10 bis 20 Stunden der Inkubation gebildet wurden. In Gegenwart von Kobalt- und Kadmium-Ionen veränderte sich die Enzymaktivität nur langsam, erreichte jedoch am Ende der Inkubationszeit fast die in der Kontrolle gemessenen Aktivitäten von  $3.175 \mu\text{g h}^{-1}\text{ml}^{-1}$ ). In Gegenwart von  $3.1 \mu\text{M}$  Kupfer-Ionen dagegen blieb die Enzymaktivität sehr gering und erreichte innerhalb der 75 Stunden einen Maximalwert von  $1.02 \mu\text{g h}^{-1}\text{ml}^{-1}$ ) (Abb. 20).

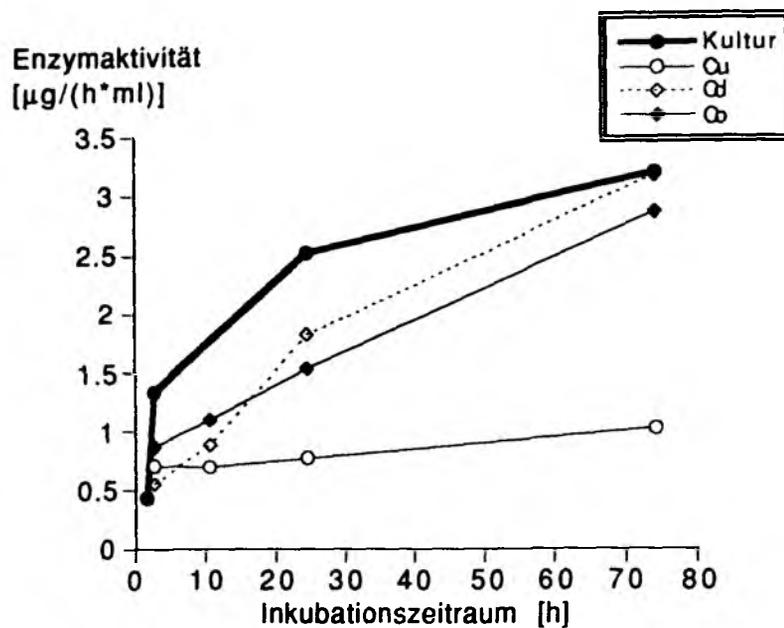


Abb. 20: Verlauf der exoproteolytischen Enzymaktivität nach Überführung der FL2-Kultur in *C<sub>org</sub>*-freies Medium, Metall-frei, oder versetzt mit Kupfer-, Kadmium- und Kobalt-Ionen (Endkonzentrationen: 3.1, 1.9 bzw. 2.1 µM).

#### 3.3.7.1. Zusammenfassung der Ergebnisse 3.5.7.

- Die extrazelluläre proteolytische Aktivität stieg in den ersten 10 bis 20 der Überführung in *C<sub>org</sub>*-freies Medium stark an.
- Die Protease-Aktivität wurde am stärksten gehemmt von Kupfer-Ionen, während sie sich in Gegenwart von Kadmium und Kobalt über einen Zeitraum von 75 Stunden wieder dem Wert der Metall-freien Kultur annäherte (Abb. 20).

### **3.4. Beeinflussung der Adhäsion von Bakterien**

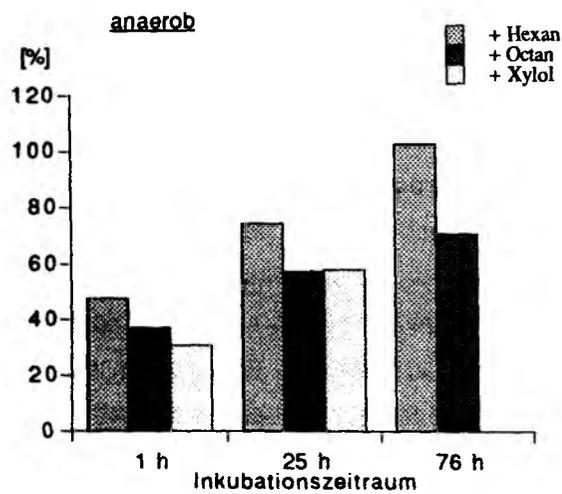
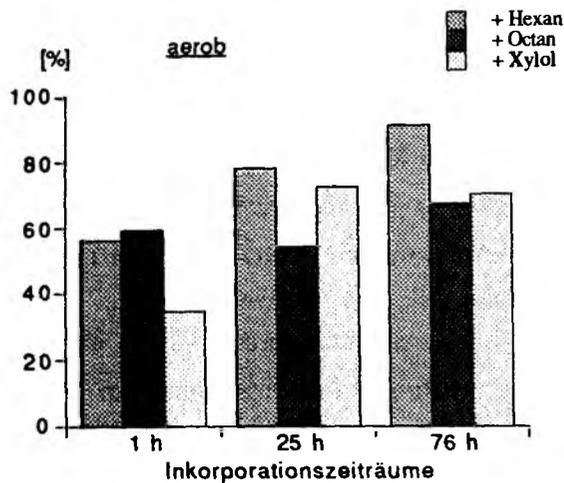
#### **3.4.1. Hydrophobizität der Zellen (Abb. 21, 22)**

Die Hydrophobizität einer Oberfläche oder eines Moleküls bestimmt seine Möglichkeiten, mit den Bestandteilen des wässrigen Milieus zu interagieren. Ein Versuch sollte klären, ob äußere Faktoren wie Nährstoff-Mangel, Sauerstoffdefizite und erhöhte Metallkonzentrationen die Hydrophobizität der Zelloberfläche veränderten.

1, 25 und 76 Stunden lang unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen im  $C_{org}$ -freien Medium inkubierte Kulturen von FI2 wurden abzentrifugiert, im PUM-Puffer resuspendiert und die Hydrophobizität der Zellen durch den BATH-Test (2.3.11.) bestimmt.

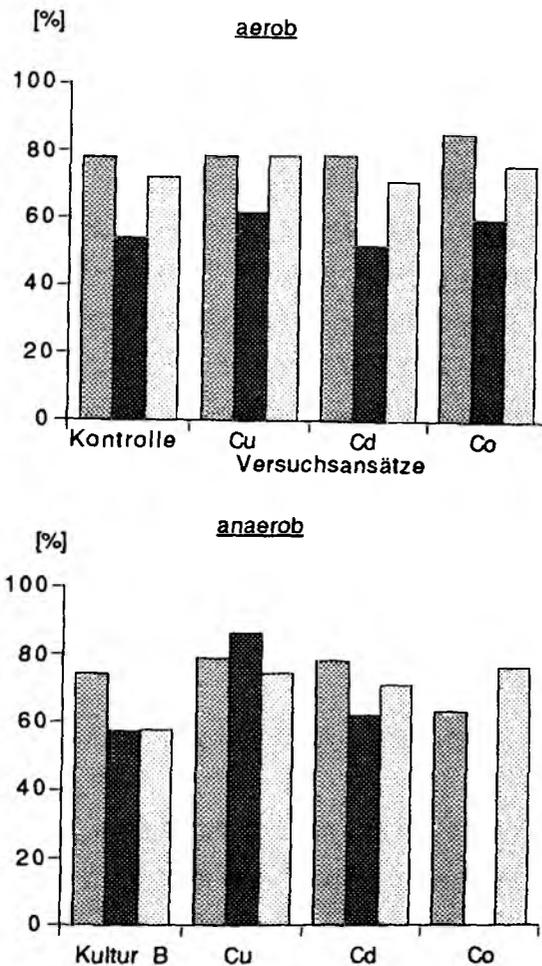
Weiterhin wurden nach 1 h des Hungerns parallele Ansätze mit 5 mg/l der Cu-, Cd- oder Co-Salze bestückt und jeweils aerob oder anaerob für 24 Stunden weiter inkubiert. Nach der Überschichtung der jeweiligen Proben mit organischen Lösungsmitteln verteilten sich die Zellen - ihrem hydrophoben Charakter entsprechend - zwischen den Phasen.

Durch einen Vergleich der optischen Dichte in der wässrigen Phase vor und nach der Überschichtung zeigte sich, daß die Bakterienoberflächen mit andauerndem Substrat-Mangel hydrophiler wurden. Es kam bei Kulturen, die eine Stunde gehungert hatten, zu einer Verringerung der optischen Dichte um 40 bis 60 % unter aeroben, zu 50 bis 70 % unter anaeroben Bedingungen. Die Extinktion in der wässrigen Phase nahm mit der Länge des Inkubationszeitraum auf 70 bis 90 % (aerober Ansatz) bzw. 70 bis 100 % (anaerober Ansatz) der ursprünglichen optischen Dichte zu (Abb. 21).



**Abb. 21:**  
 Verringerung der optischen Dichte verschieden lang gehungelter Kulturen bei Überschichtung mit organischen Lösungsmitteln als Maß der Hydrophobizität. Als 100 % wurde die optische Dichte des Teststammes angenommen.

Bei den mit Metallen inkubierten Kulturen wurden im Vergleich zum Ansatz ohne Metalle unter oxischen Verhältnissen keine Unterschiede deutlich. Im anaeroben Ansatz dagegen war in Gegenwart der Kupferionen eine erniedrigte Hydrophobizität zu beobachten: die optische Dichte betrug hier 76 bis 86 % der ursprünglichen O.D. im Gegensatz zu 60 bis 78 % im Ansatz ohne Metalle (Abb. 22).



**Abb. 22:**  
 Verringerung der optischen Dichte bei 25 h lang Corg-freien Kulturen mit und ohne erhöhten Metallkonzentrationen im Medium bei Überschichtung mit organischen Lösungsmitteln als Maß der Hydrophobizität (100% = OD des Teststammes vor der Überschichtung).

### 3.4.2. Adhäsionstendenz hungernder Bakterien (Abb. 23, 24)

Die Adhäsion von Bakterien unter unterschiedlichen Inkubationsbedingungen wurde durch Aufwuchs auf Glasflächen bestimmt. In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob sich die Adhäsionsfähigkeit von hungernden Zellen mit dem Inkubationszeitraum unter unterschiedlichen Bedingungen ändert (nach unterschiedlichen Hungerzeiten, mit/ohne Einfluß von Metallen, aerob/anaerob).

Durch Markierung der Zellen in der exponentiellen Phase mit <sup>3</sup>H-Thymidin sollte ihre Anheftung an Glasdeckgläschen (20 x 20 mm) verfolgt werden. Die Deckgläser wurden nach einer Idee von Fletcher (1990) in O-Ringe geschoben, die als Abstandshalter und Manipulationshilfen dienen.

Zur Markierung der Kulturen mit  $^3\text{H}$ -Thymidin wurden  $300\mu\text{Ci}$  ( $=300\mu\text{l}$ )  $^3\text{H}$ -Tdr zu 300 ml einer anaerob bzw. aerob wachsenden Kultur gegeben bei folgenden optischen Dichten ( $\text{OD}_{500}$ ): aerob: 0.09, anaerob: 0.115.

Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurden die Kulturen abzentrifugiert (8000 U/min, 15 min) und das Pellet in aerobem bzw. anaerobem 3M-GLU resuspendiert.

Die markierten Kulturen wurden auf einzelne Polypropylen-Zentrifugenröhrchen aufgeteilt, die jeweils mit drei Deckgläsern bestückt wurden.

Blindwerte wurden mit 2 ml Formalin (Endkonz. Formol: 1.5%) versetzt. Sie enthielten 4 Deckgläser.

Da nicht davon ausgegangen werden konnte, daß die pro Zelle inkorporierte Thymidin-Menge über die Hungerzeit konstant blieb, mußte das System geeicht werden:

Zu den Probenahmezeiten wurden 3 Mal je 1 ml aus dem Ansatz ohne Deckgläser abgenommen, zentrifugiert und von dem Zellpellet über die Bestimmung des Proteingehalts die Zellzahl bestimmt (3.1.5.). Außerdem wurde die Radioaktivität des Pellets gemessen, so daß über die radioaktive Strahlung der Deckgläser auf die Zahl adhärirter Zellen geschlossen werden konnte.

Die Strahlungswerte von Deckgläsern in formolisierten Ansätzen wurden als Blindwerte betrachtet und abgezogen.

Bei der Probennahme wurden die Deckgläschen<sup>2</sup> nach der Entnahme (Pinzette) 3 Mal in steriles Medium getaucht, um die im anhaftenden Wasser befindlichen Bakterien und gelöstes Thymidin zu entfernen, und anschließend in Szintillationsvials mit Lumagel SB versetzt.

#### 3.4.2.1. *Abhängigkeit vom Sauerstoffangebot (Abb. 23)*

Es lagen folgende Ansätze jeweils anerob<sup>3</sup> und aerob vor:

- a) bis c): je 3 Parallelen zur Adhäsion (Je 1 Deckglas pro Parallele und Probennahme)
- d) ohne Deckgläser zur Eichung
- e) mit 2 ml Formol versetzt (Blindwerte)
- f) ohne Tdr für REM

Die Probennahmen erfolgten zwei Mal nach jeweils einstündiger Exposition der Glasoberflächen, und zwar

1. nach der ersten Stunde in Substrat-freien Medium,

---

<sup>2</sup>Vorbehandlung der Deckgläser: in heißem Dampf autoklaviert  
Vorbehandlung der O-Ringe: in ETOH desinfiziert.

<sup>3</sup>Die anaeroben PP-Röhrchen wurden bei kurzer Inkubationszeit begast, bei längerer eingeschweißt in Folie mit GasPak<sup>®</sup>-Anaerobic System versehen.

2. nachdem die Zellen insgesamt 41 Stunden gehungert hatten (Exposition der Oberflächen für eine Stunde nach 40 Stunden des Hungerns).

Außerdem wurden Deckgläser beprobt, die während der ganzen 41 Stunden als Aufwuchs-substrate zur Verfügung standen.

Aerob inkubierte Kulturen zeigten in der ersten Stunde des Hungerns mit  $1.4 \times 10^7$  Zellen pro Deckglas die höchste Adhäsionstendenz. Nach 40 Stunden war die Besiedlung neu eingebrachter Glasflächen innerhalb einer Stunde auf  $3 \times 10^5$  Zellen geschrumpft. Auch die Flächen, die sich während 40 Stunden im aeroben Versuchsmedium befanden, zeigten eine geringere Adhäsion als nach 1 Stunde. Ein anderes Bild lieferte der anaerobe Ansatz: Hier war die Besiedlung innerhalb der ersten Stunde mit  $4 \times 10^6$  deutlich geringer als unter aeroben Bedingungen. Die Zählungen pro Fläche während der 40 Stunden Inkubation nahm nur wenig (auf  $2.4 \times 10^6$  Zellen pro Deckglas) ab.

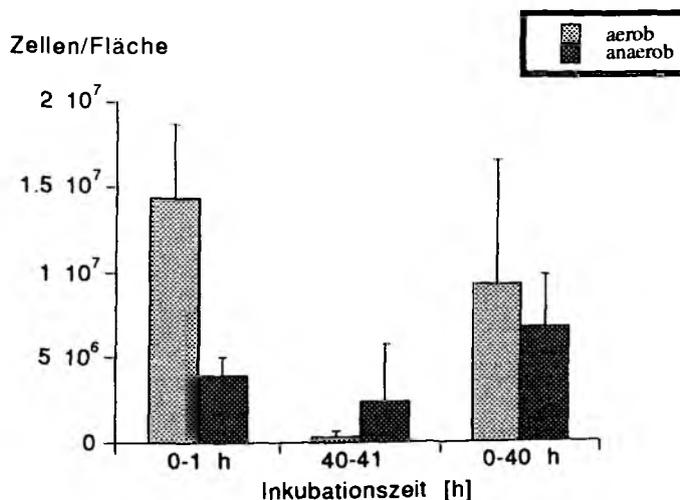


Abb. 23:  
Adhäsion  $^{14}\text{C}$ -markierter Zellen an Glasoberflächen innerhalb der ersten Stunde des Corg-Mangels, innerhalb einer Stunde nach 40 Stunden des Hungerns und über den gesamten Hungerzeitraum hinweg (0-40 h) unter aeroben und anaeroben Bedingungen.

#### 3.4.2.2. Adhäsion in Gegenwart von Schwermetallen (Abb. 24)

Zu aerob und anaerob inkubierten  $^3\text{H}$ -Thymidin-markierten Kulturen, die 40 Stunden lang gehungert hatten, wurden Cu-, Cd- und Co-Ionen zu einer Gesamt-Konzentration von 6.3, 3.9 bzw. 4.2  $\mu\text{M}$  gegeben. Diese Ansätze wurden ebenso wie je eine aerobe und anaerobe, nicht mit Metallen versetzte Kultur mit 3 Deckgläsern bestückt und diese eine Stunde lang inkubiert.

Einen Einfluß auf die Adhäsion der Bakterien hatten zwei Metall-Ionen: Kupfer verhinderte eine Besiedlung neuer Glasoberflächen unter aeroben Bedingungen völlig, während in Gegenwart von Kobalt-Ionen ein leichter Anstieg im aeroben Ansatz zu verzeichnen war, unter anaeroben Bedingungen dagegen fast um das 4fache gesteigerte CPM-Werte erreicht wurden.

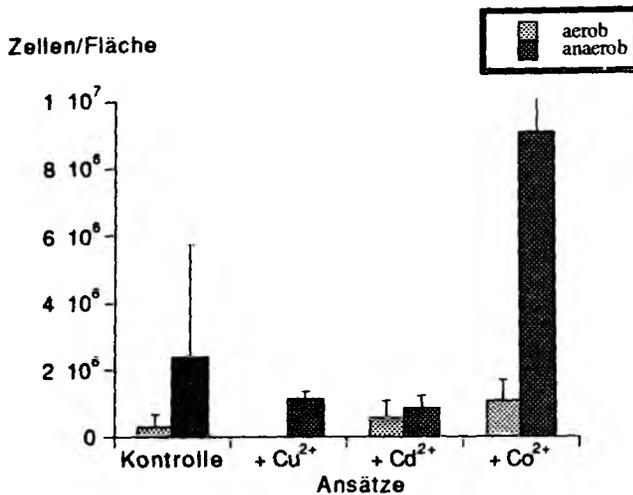


Abb. 24:  
Adhäsion von Zellen an frische Glasoberflächen nach 40 Stunden des Hungerns und in Gegenwart von erhöhten Konzentrationen an Cu-, Cd- und Co-Ionen.

### 3.4.3. Rasterelektronenmikroskopische Beobachtungen

In einer nicht-radioaktiv markierten Kultur wurden Deckgläser in einem aeroben und einem anaeroben Ansatz für die ersten drei Stunden im Substrat-freien Medium exponiert, um die unter 3.4.2. erzielten Ergebnisse elektronenoptisch zu überprüfen.

Hierzu wurden die Deckgläser nach der Entnahme in sterilem Medium gewaschen, anschließend luftgetrocknet und für die Rasterelektronenmikroskopie vorbehandelt (2.2.8.).

Auf den Deckgläsern war die Anzahl der angehefteten Bakterien nach aerober Inkubation deutlich höher als nach anaerober, bei der die Verteilung sehr unregelmäßig war (Abb. 25, 26).

### 3.4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse Kapitel 3.4.

- Die Hydrophobizität des Teststammes nahm mit der Inkubationszeit in Substrat-freiem Medium ab.
- Die Adhäsion pro Stunde von aerob gehungerten Zellen an Glasflächen war zu Beginn der Hungerphase am größten und hatte nach 40 Stunden Inkubation um zwei Größenordnungen abgenommen, während sich die unter anaeroben Bedingungen kaum änderte.
- Unter anaeroben Bedingungen führte die Gegenwart von Kobalt-Ionen zu einer 4fach erhöhten Besiedlungsdichte von Glasflächen.

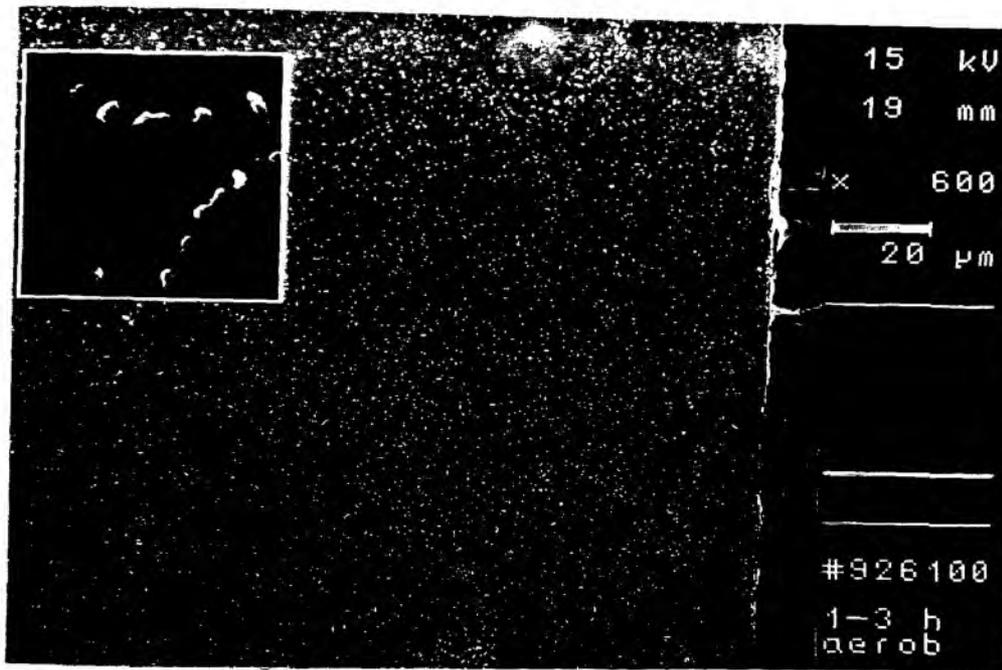


Abb. 24: Glasoberfläche, die drei Stunden lang in einer neu angesetzten, aerobe Hungerkultur von FL2 inkubiert worden ist.  
 Rasterelektronen-mikroskopische Aufnahme. Vergrößerung 200

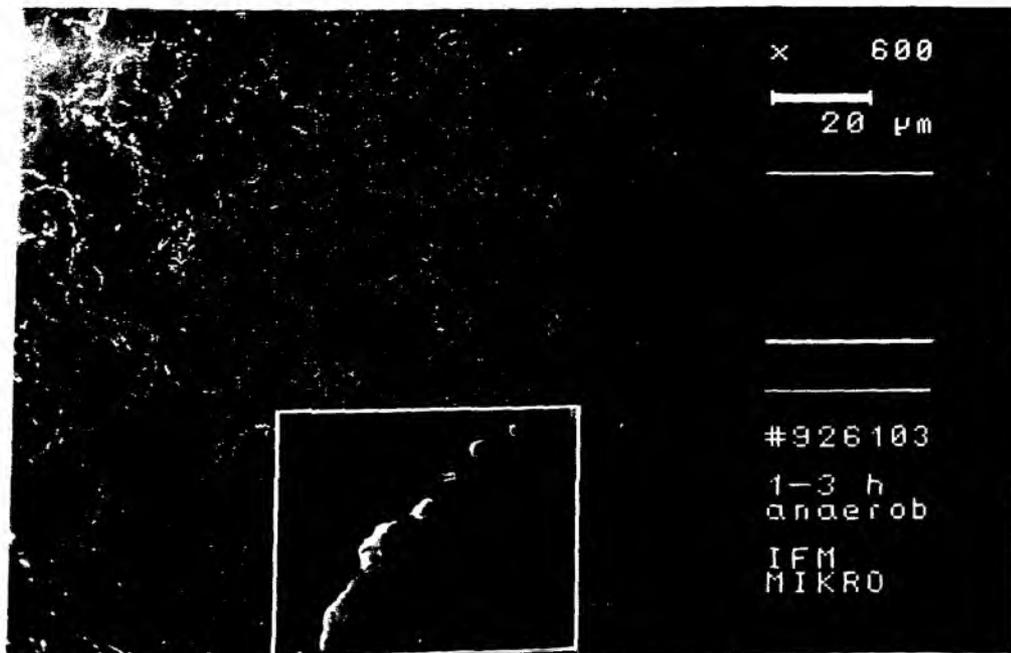


Abb. 25: Glasoberfläche, die drei Stunden lang in einer neu angesetzten, anaeroben Hungerkultur von FL2 inkubiert worden ist.  
 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme. Vergrößerung 200

## **4. Diskussion**

### **4.1. EP-Produktion durch marine Bakterien:**

#### **Vibrios als Modellfall**

Einzelnen haben Bakterienzellen aufgrund ihres spezifischen Gewichts, das dem des Wassers gleicht, keine Chance, ungünstigen Umweltbedingungen zu entgehen, da sie mit dem Wasserkörper verdriftet werden. Durch Ausscheidung exopolymerer Substanz aber haben sie die Möglichkeit, sich an Vektoren festzusetzen wie sinkenden Partikeln oder festen Oberflächen. Sogenannte anheftende Polymere ("adhesive Polymers", Neu und Marshall 1991) versetzen sie in die Lage, größeren Scherkräften zu widerstehen, andere Ausscheidungen führen zur Ablösung der Zellen (Neu und Marshall 1990).

Exopolymere bilden auch die Matrix der pelagischen, dicht von Bakterien besiedelten Aggregate wie "Marine Snow" (Herndl 1988), "Transparent Exopolymer Particles" (TEP) (Alldredge, et al. 1993) oder "Lake Snow" (Grossart und Simon 1993). Extrazelluläre Polymere sind jedoch auch wesentlicher Bestandteil von festsitzenden Biofilmen, die jede benetzte Oberfläche innerhalb von Stunden überziehen (Wahl 1989). Auf geringen räumlichen Distanzen bilden sich hier Sauerstoff- und Substrat-Gradienten aus, die ein Zusammenleben von Bakterien verschiedenster physiologischer Gruppen möglich werden lassen (Costerton 1994).

Durch ihre unterschiedlichen Eigenschaften in Bezug auf Ladungsverhältnisse, Konformation und hydrophoben Gruppen modifizieren Exopolymere die Umwelt der Bakterien. Unterliegt aber diese Modifikation einer ökophysiologischen Steuerung?

Sind Mikroorganismen in der Lage, die Ausscheidung von exopolymerer Substanz in Reaktion auf veränderte Umweltfaktoren zu regulieren?

Können sie sie aktiv als Schutz gegen toxische Substanzen einsetzen?

Um diese Fragen auf kausalanalytischer Grundlage klären zu können, mußte ein reduktionistischer Versuchsansatz gewählt werden, der physiologische Wirkungsmechanismen aufzeigt. Als Modellorganismus wurde ein Vertreter der im marinen Milieu sehr häufigen Familie der Vibrionaceae ausgewählt. Bis zu 75 % mariner Isolate können aus Bakterien dieser Familie bestehen (Simidu, et al. 1980). Es handelt sich dabei um Copiotrophe, die an ein hohes Nährstoffangebot angepaßt sind. In der meist oligotrophen marinen Umgebung liegen diese Bakterien in dem physiologischen Zustand des "starvation survival" vor, der es ihnen ermöglicht, lange "Hungerzeiten" zu überstehen. Als fakultativ anaerobe Organismen überleben sie auch Sauerstoff-Defizite.

Eine gute Anpassung an die im Meer auftretenden Streßfaktoren ließ den ausgewählten Organismus als geeignet erscheinen für die

*Untersuchung des Einflusses von Umweltfaktoren  
auf die Bildung exopolymerer Substanz.*

Bevor jedoch die Ergebnisse auf die Möglichkeit der gezielten Veränderung von Exopolymeren hin diskutiert werden können, sollen noch einmal im Überblick Funktionen, Struktur und Bildung der extrazellulären Substanzen erläutert werden, um zu verdeutlichen, weshalb eine Regulation stattfinden sollte und wo sie physiologisch zu suchen ist.

Der Zustand des "starvation survival" als physiologische Reaktion der Bakterien zum Überleben von Nährstoffmangelsituationen, der die Ausgangssituation der Testorganismen in den Versuchen darstellt, wird kurz erläutert.

Schließlich ist, um die Übertragbarkeit der Ergebnisse einschätzen zu können, eine Beschreibung des Testbakteriums notwendig, die im Kapitel 4.1.3 gegeben wird.

#### 4.1.1. Bildung und Struktur bakterieller Exopolymere

Die Zellwand umgebendes, extrazelluläres Material, ohne das die Zelle zwar lebensfähig bleibt, das jedoch ihre Kommunikation mit der Umgebung wesentlich bestimmen kann, wird zusammenfassend als Glykokalyx (Costerton, et al. 1981) bezeichnet oder in "Kapsel" und "Schleim" unterteilt. Die kapsulären Polymere sind mit der Zellwand fest assoziiert und vermutlich kovalent gebunden (Whitfield 1988), während die Schleime diffus die Zelle umgeben. Laboruntersuchungen ergaben, daß die meisten Exopolymere (EP) aus Polymerketten mit Molekulargewichten von 100.000 bis 300.000 Dalton bestehen (Decho 1990). Die größte Masse hiervon machen Exo-Polysaccharide (EPS) aus, die funktionell und strukturell (Platt, et al. 1985) eng mit Proteinen verbunden sein können. Dabei handelt es sich häufig um Glycoproteine (Decho 1990), die nicht nur enzymatischen Charakter haben, sondern als Informationsträger in Zell/Zell-Kontakten diskutiert werden (Neu und Marshall 1990).

Die meisten extrazellulären Polysaccharide im marinen Milieu sind vermutlich Heteropolysaccharide. Sie bauen sich aus sich wiederholenden Sequenzen einfacher Hexosen wie Glukose, Galaktose, Mannose, Fucose und Rhamnose auf, Pentosen sind seltener vertreten. Die einzelnen Polysaccharid-Ketten können unterschiedliche Zusammensetzungen und Längen haben und besitzen verschiedene Seitenketten (Sutherland 1977). Neben den Einfach-Zuckern sind häufig noch Uronsäuren vertreten, die den

Polymeren negative Ladungen und saure Eigenschaften verleihen (Kennedy und Sutherland 1987).

Prinzipiell kann jedes Molekül, das die Zelle synthetisieren und transportieren kann, in der Glykokalyx vertreten sein (Neu und Marshall 1990), so z. B. Lipide, Phosphate, Fettsäuren, Aminosucker, Pyruvate. Auch sie spielen vermutlich in der Tertiärstruktur der Exopolymere eine wesentliche Rolle (Decho 1990).

Für die untersuchten bakteriellen Exopolysaccharide sind zwei verschiedene Synthesewege bekannt (Sutherland 1993): Die extrazelluläre Synthese dient der Bildung von Dextranen. Sie ist abhängig von bereitgestellten Saccharid-Molekülen, die durch extrazelluläre Transferase-Enzyme zum Homopolysaccharid verknüpft werden.

Verbreiteter ist die gekoppelte intrazellulär-extrazelluläre Synthese von Heteropolysacchariden, die bei Gram-negativen Bakterien an der inneren Zellmembran lokalisiert ist. Die Bildung ist hierbei nicht abhängig vom angebotenen C-Substrat, da die Bausteine über aktivierte Gruppenüberträger wie Nukleotid-diPhosphate (NDP), Phosphoenolpyruvat (PEP) und Coenzym A aus dem intrazellulären Stoffwechsel bereitgestellt werden (Sutherland 1993). Eine wichtige, wenn auch bisher nicht eindeutig präzisierete Rolle dabei spielt Bactoprenol (Synonym: C<sub>55</sub>-Isoprenyl, Undecaprenyl); es transferiert die Zucker von den NDP und ist u. U. am Transport durch die Membran beteiligt (Whitfield 1988). Die Exkretion der Polysaccharide aus der Zelle erfolgt vermutlich durch Porine (Sutcliffe, et al. 1983). Extrazelluläre Modifikationen der eigenen Polysaccharide sind nur im Falle von bakteriellen Alginaten beobachtet worden (Kennedy, et al. 1992).

Eine Veränderung der Exopolysaccharid-Hülle als Reaktion auf äußere Streßfaktoren kann nach diesen Aussagen damit nur bei der Synthese und hier neben der genetischen Kontrolle bei der Steuerung der Verfügbarkeit von Stoffwechselzwischenprodukten ansetzen. Der wohl häufigste Streßfaktor, dem marine Bakterien ausgesetzt sind, ist die Nährstofflimitierung, da die Nährstoffkonzentrationen in marinen Ökosystemen im Mittel gering sind.

#### 4.1.2. Anpassung mariner Bakterien an das oligotrophe Milieu

Die Kombination der niedrigen Konzentration organischen Kohlenstoffs im Meer und der gemessenen geringen bakteriellen Produktion im Pelagial führt zu dem Schluß, daß die meisten marinen Bakterien dem ständigen Streß ausgesetzt sind, mit einem minimalen Angebot an Nährstoffen zu überleben.

Der Gehalt an gelöstem organischen Kohlenstoff ("DOC") im Ozean beträgt zwischen 0.3 und 1.2 mg/l (Morita 1982, Morita 1984), Glucose-Konzentrationen liegen im Nanomol-Bereich (Thurman 1986, Vaccaro, et al. 1968). Turnover-Zeiten des pelagischen Bakterioplanktons können mehr als 10 Tage betragen (Güde, et al. 1991).

Mittlere Zellgrößen der Bakterien im Pelagial liegen zwischen 0.02 und 0.12  $\mu\text{m}^3$  (Fuhrman 1981, Lee und Fuhrman 1987). Zusammen mit der direkten Abhängigkeit der Bakterienproduktivität vom Eintrag organischer Substanz durch Phytoplanktonblüten o. ä. (Ammerman, et al. 1984, Cole, et al. 1988) weisen diese Beobachtungen stark daraufhin, daß sich die Mikroben meistens in einem physiologischen Zustand befinden, der als "starvation survival" bezeichnet wird. Dieser ist das Ergebnis eines Nährstoffangebots, das zu gering ist, um Wachstum und Reproduktion zu gewährleisten (Morita 1988). Besonders betroffen sind sogenannte "copiotrophe" Bakterien (Poindexter 1981), die bei organischen Kohlenstoffgehalten von mehr als 2 g/l wachsen können, bei geringen Konzentrationen jedoch mit den an geringe Nährstoffgehalte angepaßten "Oligotrophen" (Poindexter 1981) nicht konkurrieren können (Martin und MacLeod 1984). Dennoch dominieren in marinen Gewässern copiotrophe Bakterien (Carlucci, et al. 1986), zu denen auch Genera wie *Vibrio* und *Pseudomonas* gehören. Mit dem Zustand des "starvation survival" gehen eine Reihe von morphologischen und physiologischen Veränderungen einher: Es kommt zu einem Abbau endogenen Materials (Boylan und Ensign 1970, Hood, et al. 1986, Horan und Shanmugan 1986) verbunden mit der Bildung coccoider Hungerzellen von weniger als 0.4  $\mu\text{m}$  Durchmesser (Hood und MacDonell 1987)("Ultramicrococci" (Torella und Morita 1981) oder "dwarf cells" (Novitsky und Morita 1976)). Von einigen Autoren wird eine reduktive Zellteilung beschrieben ("reductive division", (Amy, et al. 1983, Baker, et al. 1983, Nyström und Kjelleberg 1987), die zu einem Anwachsen der Zellzahlen um mehrere Größenordnungen führen kann. Die Größenreduktion der Hungerzellen führt zu einem kleineren Zellvolumen zu Oberfläche-Verhältnis, und damit zu günstigeren Substrataufnahme- und -transportmöglichkeiten. Oliver und Stringer (1984) stellen eine Veränderung der Membran-Lipide fest, die zu einer erhöhten Fluidität führten. Diese könnte zum gemessenen Anstieg der Substrataufnahmekapazität der hungrigen Bakterien beitragen. Unterschiedliche Aufnahmesysteme bieten schließlich eine weitere Erklärungsmöglichkeit (Reichardt und Morita 1982, Davis und Robb 1985, Mården, et al. 1987). Der Hungerzustand dieser copiotrophen Bakterien wird demnach eingeleitet von einer aktiven Veränderung der Zellphysiologie, die es den Organismen ermöglichen soll, mit möglichst wenig Energieaufwand in Zeiten geringen Nährstoffangebots zu überleben und plötzlich auftretende Substratkonzentrationen effektiv zu nutzen.

#### 4.1.3. Die Ökologie von *Vibrio anguillarum*

Biochemische Untersuchungen (2.1.) stützen die Hypothese, daß es sich bei dem anaerob fermentierenden, beweglichen, copiotrophen Organismus, der wie viele Vibrios auf selectivem TCBS-Agar wächst und durch das Vibriostaticum 0/129 gehemmt wird, um

einen Vertreter der Art *Vibrio anguillarum* handelt. Damit gehört er einer in marinen Gewässern dominierenden Bakteriengattung an (Simidu, et al. 1980, Carlucci, et al. 1986). Eine immunologische Identifizierung wurde nicht vorgenommen. Nach Larsen et al. (1994) ist unter dem Namen *Vibrio anguillarum* eine Vielzahl von Serotypen beschrieben worden, die als Verursacher der Fischkrankheit "Vibriosis" in Frage kommen und vermutlich sogar verschiedene Spezies Vibriosis erregender Bakterien umfassen.

Vibriosis ist eine in Aquakulturen gefürchtete Krankheit, die fast 50 verschiedene Fischarten befallen kann. Es handelt sich dabei um eine blutende Sepsis, wobei sich die Vibrios hauptsächlich im Blut aufhalten, obwohl sie auch aus anderen Geweben zu isolieren sind. Die Mortalitätsrate von Vibriosis, die auch als "Rote Pest" bezeichnet wird, ist hoch (Austin und Austin 1987).

*Vibrio anguillarum* ist ein opportunistisch pathogenes Bakterium. Es kann aus dem Wasser, aus dem Sediment und aus gesunden Fischen isoliert werden (Larsen, et al. 1988). In Gegenwart von Fischen ist die Ernährungslage gut, in der Wassersäule und im Sediment jedoch können Substrate rasch aufgebraucht sein, so daß es in der Lage sein muß, sich rasch auf veränderte Bedingungen einzustellen.

Bei der Adhäsion an lebende Oberflächen und an der Infektion von Fischen mögen exopolymere Substanzen beteiligt sein. Die Umstände, unter denen eine Krankheit ausbricht, sind noch nicht geklärt. Die Virulenz des Bakteriums ist gekoppelt an einen Plasmid-codierten Eisen-Rekrutierungsmechanismus, bestehend aus einem Siderophoren und zwei Proteinen der äußeren Membran, die unter Eisen-limitierten Bedingungen induziert werden (Crosa und Hodges 1981, Crosa, et al. 1980). Toranza et al. (1983) erkannten bei einer Untersuchung von *V. anguillarum* und verwandten Stämmen, daß alle pathogenen sowohl hämolytische als auch hämagglutinierende Aktivitäten zeigten, konnten jedoch keine direkte virulente Funktion ableiten, da auch nicht pathogene Stämme Hämolyse produzierten, bzw. bei bestimmten befallenen Fischen keine Agglutinationen hervorgerufen wurden. Auch eine Korrelation zwischen der Virulenz von *Vibrio anguillarum* und der Cytotoxizität der extrazellulären Substanzen konnte nicht nachgewiesen werden.

Der Nachweis hämolytischer Aktivität der FL2-Kulturen ist somit ein Hinweis auf eine mögliche Pathogenität der Bakterien, von ihm kann jedoch nicht direkt auf eine Virulenz geschlossen werden.

## **4.2. Veränderung der Bildung und Funktion von Exopolymeren in Abhängigkeit von der Sauerstoffverfügbarkeit**

### **4.2.1. EP-Produktion während der Wachstumsphase**

In der Wachstumsphase von FL2 in Gegenwart von Glukose wurden fast ausschließlich Polysaccharide produziert. Die höchsten Polysaccharidgehalte wurden am Ende der logarithmischen Phase gemessen. Beim Übergang in die stationäre Phase ging der Anteil an Kohlenhydraten auf ein Minimum zurück.

Eine in der späten Wachstumsphase erhöhte Exopolymerproduktion ist für viele marine Bakterien typisch (Decho 1990). Der Abbau der eigenen produzierten exopolymeren Substanz durch ein Bakterium erfolgt jedoch nach Angaben in der Literatur sehr selten (Sutherland 1993), da entweder das entsprechende Enzymbesteck fehlt oder aber die Enzyme wie im Falle der *Azotobacter* -Alginate-Lyase im Periplasma lokalisiert sind, wo sie mit exkretierten Polymeren nicht mehr in Kontakt kommen (Kennedy, et al. 1992). Dennoch ist die bei FL2 beobachtete Abnahme der exopolymeren Substanz, die auch Antón et al. (1988) bei dem Archaeobakterium *Haloferax mediterranei* beobachteten, nur durch katabolische Prozesse zu erklären. Die in den Exopolysacchariden enthaltenen Zucker stellen Kohlenstoff- und Energiequellen dar, die bei Einsetzen von Substratmangel genutzt werden könnten, wenn sie dem Zitronensäurezyklus zugeführt würden. Werden sie nicht genutzt, liegt die Vermutung nahe, daß sie auch bei Kohlenstoffmangel eine wichtige extrazelluläre Funktion zu erfüllen haben. Auch in den Fällen, in denen sich die in der logarithmischen bzw. stationären Phase produzierten Exopolymere voneinander unterscheiden (Abe, et al. 1984, Christensen, et al. 1985), nehmen diese wahrscheinlich verschiedene Funktionen wahr.

### **4.2.2. EP-Produktion unter Corg-Mangelbedingungen**

Die von FL2 in der stationären und auch in der Substrat-verarmten Phase neu gebildeten Exopolymere zeichnen sich im Gegensatz zu denen der logarithmischen Phase durch einen mit der Expositionszeit wachsenden Proteinanteil aus. Der Quotient aus Kohlenhydrat- und Proteinanteil in den Exopolymeren sinkt unter aeroben Bedingungen innerhalb von 50 Stunden von anfänglich 13 auf weniger als zwei, während der Quotient unter anaeroben Bedingungen schon nach 10 Stunden einen konstanten Wert von weniger als zwei erreicht aufgrund eines schnelleren Anstiegs der Proteinkonzentration. Hierbei handelt es sich vermutlich um eine Parallele zu der von Kragelund und Nybroe (

1994) beschriebenen Bildung von spezifischen Proteinen in der äußeren Membran und dem Auftreten intrazellulärer Streß-Proteine handeln:

Bei Auftreten von Streßfaktoren wie z.B. Nährstoffmangel in *Vibrio*-Kulturen kommt es zu einem "stringent response"- einer Verringerung der rRNA-Synthese durch erhöhte Konzentrationen von ppGpp (Guanosin-5'diphosphat-3'diphosphat), die vermutlich die Initiation der Transkription oder die Kettenverlängerungsreaktion bei der Proteinsynthese hemmt (Jensen und Pedersen 1990). Der Perzeption der Mangelsituation erfolgt wahrscheinlich über ungeladene tRNA-Moleküle, die die stringente Kontrolle auslösen, während die erhöhten ppGpp-Konzentrationen als Signale in der Zelle wirken (Nyström 1989, Nyström, et al. 1990). Von dem gemeinsamen regulatorischen rel-Gen der stringenten Antwort wird die anschließende Synthese starvation-spezifischer Proteine induziert, die z.T. für einzelne Streßfaktoren zum Teil spezifisch sind.

Wie die Synthese von intrazellulären Streß-Proteinen könnte auch die Freisetzung extrazellulärer Moleküle eine spezifische Streßantwort sein. Nyström unterteilt die starvation-Proteine funktionell in zwei Gruppen: 1. in Proteine, die die Integrität und das Überleben der Zelle unter Hungerbedingungen sichert, z.B. durch erhöhte Autolyseresistenz, und 2. in Proteine, die bei Wegfall des Streßphänomens eine "Erholung" der Zelle ermöglichen (Nyström 1989). Im Falle der exopolymere Proteine ist eine ähnliche Unterscheidung denkbar: Indem EP-Polysaccharide eine hydratisierte Hülle bilden, in der physikalische Bedingungen konstant gehalten werden, ist für extrazelluläre Enzyme ein Reaktionsraum geschaffen, in dem sie von den EP-Polysacchariden adsorbierte Nährstoffe hydrolysieren und der Zelle zugänglich machen können (extrazelluläre enzymatische Funktion, 4.2.3.). Die Bindung von schädigenden Stoffen wie z.B. Schwermetallen durch Proteine oder Polysaccharide hält diese von der Zellmembran fern (Schutzfunktion, siehe 4.2.4.). Eine Möglichkeit, die äußeren Umstände der Zelle aktiv zu verbessern, besteht, wenn die Zelle ihre Position verändert z. B. durch Adhäsion (siehe 4.2.5.)

#### 4.2.3. Exopolymere Proteine mit enzymatischer Aktivität

Eine der wenigen Studien über exoenzymatische Aktivität unter Hungerbedingungen, die zusammenfällt mit der Produktion eines Exopolysaccharids, veröffentlichten Albertson et al. (1990) für einen *Vibrio* und einen *Pseudomonas*-Stamm. Sie stellten fest, daß die extrazelluläre proteolytische Aktivität während des gesamten Untersuchungszeitraumes von 120 Stunden meßbar blieb. Das Maximum lag bei 4 bis 5 Stunden. Extrazelluläre proteolytische Aktivität war auch für FL2 unter Hungerbedingungen zu messen mit einem

raschen Anstieg der Enzymaktivität in den ersten 10 bis 20 Stunden. Aber auch nach 170 Stunden waren sowohl die unspezifischen Esterase- ( $4.05$  bzw.  $1.6 \mu\text{gh}^{-1}\text{ml}^{-1}$ ) als auch Proteinase- und Chitinase-Aktivitäten meßbar, wobei die proteolytischen Enzyme die höchste Aktivität aufwiesen, was auch für Sedimentproben gefunden wurde (Reichardt 1986).

Sowohl Esterase- als auch Proteinase-Aktivitäten zeigten erhöhte Umsetzungsraten unter oxidischen Bedingungen ( $4.05$  gegenüber  $1.6 \mu\text{gh}^{-1}\text{ml}^{-1}$ , bzw.  $172$  gegenüber  $106 \mu\text{gh}^{-1}\text{ml}^{-1}$ ), während Chitinasen höhere Aktivitäten nach 170 Stunden anaerober Inkubation aufwiesen ( $30$  gegenüber  $13 \mu\text{gh}^{-1}\text{ml}^{-1}$ ). Eine Verringerung der Protease-Aktivität unter reduzierten Bedingungen fand auch Reichardt (1986) bei der Untersuchung von Sedimentbakterien. Parallel ermittelte Plattenkeimzahlen ließen auf kurze Persistenz dieser Enzyme schließen, während die Aktivität von Chitinasen über einen längeren Zeitraum anhielt. Eine Fortdauer der Aktivität einmal produzierter Chitinasen bietet jedoch im vorliegenden Fall keine ausreichende Erklärung, da die chitinolytischen Umsetzungsraten nach anaerober Inkubation mehr als doppelt so hoch sind wie nach aerober. Diese Beobachtung weist eher auf eine Anpassung an die Verwertung persistierender Makromoleküle unter anaeroben Bedingungen hin.

Die gemessene Esterase-Aktivität war, verglichen mit Werten, die für Biofilme in unterschiedlichen Flüssen gefunden wurden, gering. In Biofilmen des eutrophen "Nant Waen" Flusses erreichte sie um den Faktor zehn höhere Werte pro Fläche als im vorliegenden Ansatz pro Volumen, während sie in Biofilmen des oligotrophen Clywedog nach 30 Tagen noch um den Faktor fünf höher lag (Jones und Lock 1989).

Weitere Enzyme, die von FL2 produziert werden, sind thermolabile Hämolsine. Diese wurden sowohl von wachsenden Kulturen produziert, als auch in der exopolymeren Fraktion von hungernden Zellen (3.2.3.2.). Die hämolysierende Aktivität unter anaeroben Bedingungen ist geringer. Hämolsine sind an der Virulenz von *V. anguillarum* wesentlich beteiligt (Munn 1980). Es gibt jedoch Hinweise, daß sie nur während der stationären Phase gebildet werden (Austin und Austin 1987), die in ihren physiologischen Auswirkungen Ähnlichkeiten mit Nährstoffmangel-Bedingungen hat.

Die hämo-, chitino- und proteolytischen Enzyme sind neben anderen somit für einen Teil der unter Hungerbedingungen exkretierten Proteine verantwortlich.

#### 4.2.4. Entgiftung von Metallionen

Bei Versetzen extrahierter Exopolymere mit einer Mischung von Cu-, Cd- und Co-Ionen und anschließender Auftrennung in der Säulenchromatographie ergaben sich für die aufgefangenen Fraktionen mit Polysaccharid-Maxima erhöhte Kadmium- und, vermutlich auf Grund von Konkurrenzerscheinungen (Rudd, et al. 1984), geringere Kobalt-Werte. Kupfer dagegen war in vergleichbaren Konzentrationen nur nachzuweisen, wenn sich auch Proteine bei den Polysacchariden befanden. Unter aeroben Bedingungen waren die Kadmiumgehalte deutlich mit den Kohlenhydratgehalten der Exopolymere korreliert. Unabhängig vom Redoxpotential galt das Gleiche für Kupfer und die Proteingehalte.

Die Zusammensetzung aus verschiedenen Makromolekülen beeinflusst somit, welche Metalle an die exkretierten Schleime adsorbiert werden

Dieses steht im Widerspruch zu der Hypothese von Irving und Williams (1948), die die folgende, viel zitierte generelle Abfolge von Komplex-Stabilitäten zweiwertiger Metalle mit complexierenden Agentien veröffentlichten:

$Pb > Cu > Ni > Co > Zn > Cd > Fe > Mn > Mg$  (Irving und Williams 1948).

Rudd et al. (1984) fanden Stabilitätskonstanten von Cu-, Co- und Cd-Ionen mit extrazellulären Polymeren von *Klebsiella aerogenes* von 7.69, 5.48 und 5.16, die der angegebenen Tendenz entsprechen.

Insbesondere die Bindung von Kupfer durch Polysaccharide ist vielfach beschrieben worden (Bitton und Freihofer 1978, Mittelman und Geesey 1985, Rendleman 1978, Rendleman 1978), aber auch Schreiber, Harwood und Gordon (1990) fanden, daß extrazelluläre Proteine von *Vibrio alginolyticus* für die Adsorption von Kupfer verantwortlich sind (siehe auch Schreiber, et al. 1990).

Exopolysaccharide binden divalente Metallionen meist durch ionische Bindung an ihre Carboxylgruppen (bei sauren Exopolysacchariden) bzw. durch schwache elektrostatische Wechselwirkungen (bei neutralen Molekülen) (Geesey und Jang 1989). Daß entgegen der Stabilitätsreihe Kadmium stärker an das vorliegende Exopolymer bindet als Kobalt, könnte ein Hinweis auf den sauren Charakter des Polysaccharides sein: Kadmium hat einen größeren Atomradius aufgrund seiner Elektronenkonfiguration bzw. Kernladungszahl als Kobalt und zeigt damit stärkere Wechselwirkungen mit geladenen Gruppen.

Die Wirksamkeit der metallbindenden Exopolymere als Schutzhülle wird in 4.3.4. diskutiert.

#### 4.2.5. Adhäsion unter Hungerbedingungen und Hydrophobizität

Als weitere Funktionen von Exopolymeren neben der Aufrechterhaltung eines Mikrohabitats mit Nährstoffanreicherung, Schutz gegen Toxische Stoffe und räumlicher Begrenzung enzymatischer Aktivität wird die Erleichterung von Adhäsion und Aggregation diskutiert. Durch Anheften an eine Oberfläche, bzw. aneinander zur Bildung von Partikeln, die u.a. aus Bakterien extrazellulären Polymeren bestehen, können die sonst passiv verdrifteten Zellen den Wasserkörper wechseln und dem Fraßdruck entgehen (Jürgens und Güde 1994). Zellgröße (Andersson, et al. 1986), Exopolymerbildung (Jürgens und Güde 1990) und Hydrophobizität (Jürgens und Güde 1994) scheinen die Grazing-Rate von Protozoen auf Bakterien zu beeinflussen.

Es galt mit diesem Versuch zu prüfen, ob sich die Eigenschaften Hydrophobizität und Exopolymer-vermittelte Adhäsion von *Vibrio anguillarum* mit dem Aufenthalt unter Nährstoffmangel verändern und ob die Exposition in Sauerstoff-freier Umgebung einen Einfluß hat.

Während als "Adsorption" nur die Anlagerung von Molekülen aufgrund Brown'scher Molekularbewegung an eine Grenzschicht bezeichnet wird, wird der Terminus "Adhäsion" zur Beschreibung der Bindungsenergie zwischen zwei Oberflächen benutzt (zwei Oberflächen adhärieren, wenn Energie aufgewendet werden muß, um sie zu trennen). An der Adhäsion von Bakterien an Oberflächen sind über die Entfernung einiger Nanometer wirkende ("long-range forces") Kräfte und über eine geringere Distanz ("short-range forces") wirkende Kräfte sowie sterische Interaktionen wirksam (Neu und Marshall 1990). Die für die erste Phase der Anheftung verantwortlichen Wechselwirkungen werden in guter Näherung durch die DLVO-Theorie (gleichzeitig von Derjaguin und Landau, sowie Verwey und Overbeek für ein ideales System mit nicht-lebenden Partikeln entwickelt) beschrieben. Dabei bestimmen Van der Waals-Kräfte und elektrostatische Wechselwirkungen die Änderung der Gibbs'schen Freien Enthalpie, die eine Adhäsion thermodynamisch möglich werden läßt (Rutter und Vincent 1984). Van der Waals-Kräfte wirken anziehend, elektrostatische in der Regel abstoßend, da sowohl Bakterien als auch die meisten natürlichen Oberflächen eine negative Ladung aufweisen (Harden und Harris 1953).

Die ladungsabhängige Abstoßung ist stark abhängig von der Ionenstärke des Mediums, da sich durch die Anlagerung von Kationen die effektive Dicke der elektrischen Doppelschicht verändert. Bei mittleren Ionenstärken von z. B.  $0.1 \mu$  (VanLoosdrecht, et al. 1990) kommt es dadurch zur Ausbildung eines sekundären Minimums, das zur reversiblen Adhäsion von Bakterien führt. In diesem Zustand - wenige Nanometer von der Oberfläche

entfernt - können sich die Zellen leicht wieder ablösen. Zu irreversibler Adhäsion, die nur durch Produktion bestimmter Polymere oder Aktivität von Enzymen überwunden werden kann (Neu und Marshall 1990), kommt es, wenn das primäre energetische Minimum erreicht ist. Es kann durch die DLVO-Theorie nur qualitativ beschrieben werden, da bei dieser Distanz spezifische Wechselwirkungen zwischen Makromolekülen auftreten, die sich z. B. sterisch behindern und Wasserstoffbrücken ausbilden.

#### 4.2.5.1. *Adhäsion unter aeroben Hungerbedingungen*

Bei einer Ionenstärke von  $I=0.2$  im "Marine Mineral Medium" war bei dem Versuch zur Adsorption an Oberflächen das Auftreten beider Minima möglich. Eine Unterscheidung zwischen reversibler und irreversibler Bindung wurde im vorliegenden Adsorptionsversuch nicht vorgenommen. Sie wird häufig subjektiv nach der Anzahl der Waschgänge des Substrates eingeschätzt (Hermansson und Marshall 1985, Kjelleberg, et al. 1983). Um alle adhärenierten Zellen zu erfassen, wurden die Substrate wenige Male vorsichtig in neues Medium getaucht, um nur überstehendes Wasser mit darin enthaltenen Bakterien auszutauschen (Kjelleberg und Hermansson 1984).

Die exponierten Glasoberflächen können als Beispiel angesehen werden für natürliche Silikate und Oxide (VanLoosdrecht, et al. 1990). Sie sind durch die Freisetzung von Protonen und Bildung von Si-O<sup>-</sup>-Gruppen im Wasser hydrophil mit negativer Ladung. Van Loosdrecht et al. (1990) zeigten in einem Vergleich von Polystyrol (hydrophob, negative Ladungen) und Glas, daß bei der hydrophilen Oberfläche die elektroforetische Mobilität (entspricht in Annäherung dem elektrischen Potential) bestimmend für die Adhäsion ist, während hydrophobe Charakteristika, gemessen als Kontaktwinkel mit der Wasseroberfläche ("contact angle"), den Prozeß kaum beeinflussen.

Daher müßte bei einer Kurzzeit-Inkubation davon ausgegangen werden, daß das elektrische Potential der Zelloberfläche eine Adsorption an das Glas verhindert. Bei einer Inkubationszeit von einer Stunde ist jedoch die hohe Oberflächenenergie von sauberem Glas zu berücksichtigen, die zu einer raschen und starken Adsorption von Molekülen aus der Lösung führt (Fletcher 1990). Der Gehalt an organischen Molekülen im nährstoffarmen Medium sollte sehr gering sein, dennoch ist er aufgrund bakterieller Exudate und Verschleppungen nicht gleich Null zu setzen. So kann von der Bildung einer organischen Schicht auf dem Glas innerhalb der ersten Stunde ausgegangen werden, die ausreichend ist, hydrophobe Wechselwirkungen mit Molekülen auf der Bakterienoberfläche zu induzieren. Nach Baier liegen die durch Adsorptionsprozesse veränderten Oberflächenenergien der meisten natürlicher Substrate unabhängig von der ursprünglichen Oberfläche in einem Bereich von 30 bis 40 dyn/cm<sup>1</sup> (Baier 1981).

---

<sup>1</sup>dyn/cm = 10<sup>-3</sup>N/m

Im rasterelektronenmikroskopischen Vergleich der Besiedlung von Oberflächen ist die Adsorption der Zellen auf Glas nach drei Stunden eher gering. Im Verlauf der nächsten 40 Stunden aerober Inkubation nimmt sie bei aerober Inkubation noch weiter ab, obwohl der hydrophobe Charakter der Glasoberfläche durch Anlagerung der Moleküle zunimmt und das elektrische Potential infolgedessen eine geringere Rolle als die Hydrophobizität der Zelle spielt.

Die gemessene Hydrophobizität von FL2-Zellen unter aeroben Bedingungen ist nach den vorgeschlagenen Kriterien von Santos et al. (1990) als moderat (20-50 % Veränderung), unter anaeroben Bedingungen als stark (>50 % Veränderung) zu bezeichnen. Damit liegt es im Bereich der für einige Stämme des Serotyps 02 von *Vibrio anguillarum* auf die gleiche Weise bestimmten hydrophoben Charakters. Nach Enger et al. (1990) dagegen hat *Vibrio anguillarum* keine ausgeprägten hydrophoben Eigenschaften. Diese unterschiedlichen Aussagen unterlegen die Behauptung von Rosenberg und Kjelleberg (1986), daß die Hydrophobizität der Oberflächen zwischen einzelnen Stämmen unterschiedlich sein kann, sich aber auch stark in Abhängigkeit der physiologischen Bedingungen verändert.

Von mehreren Autoren wurde eine Zunahme der Hydrophobizität unter optimalen Bedingungen festgestellt (Marshall, et al. 1971, Van Loosdrecht, et al. 1987), während andere eine Zunahme hydrophober Eigenschaften mit andauernder Nährstofflimitierung beobachteten (Allison und Sutherland 1987, Kjelleberg und Hermansson 1984, Kjelleberg, et al. 1985). Dawson et al. (1981) interpretierten dies als "Taktik" mariner Vibrios, dem Nährstoffmangel durch Adhäsion an Oberflächen, die von abbaubaren organischen Molekülen bedeckt sind, zu entkommen.

Für den Stamm FL2 kann diese Beobachtung nicht bestätigt werden, da die Zellen - unabhängig von der Sauerstoffverfügbarkeit - mit zunehmender Hungerzeit hydrophiler werden. Damit erringen sie einen Selektionsvorteil, da Untersuchungen, gestützt durch "Mikrosphärenversuche" darauf hindeuten, daß der Fraßdruck auf Bakterien mit deren Hydrophilie abnimmt (Jürgens und Güde 1994).

Außerdem nimmt die Adhäsionsrate ab. An Glasoberflächen, die nach 40 Stunden eingebracht worden sind, hat sich die Besiedlungsdichte von Hungerzellen bereits nach einer Stunde aerober Inkubation um zwei Zehnerpotenzen verringert. Hydrophobe Wechselwirkungen sind minimal geworden, und die abstoßenden Kräfte beruhen vermutlich auf elektrostatischen Wechselwirkungen, wenn nicht - ebenso wie bei der einstündigen Inkubation zu Beginn des Versuchs - mit der sofortigen Adsorption von organischen Molekülen zu rechnen ist. Die Konzentration von Makromolekülen im Medium steigt unter Hungerbedingungen an. Adsorbierte Polymere können Van der Waals- und elektrostatische Wechselwirkungen beeinflussen, und wenn sie beide Oberflächen bedecken, erfolgt eine Abstoßung durch sterische Behinderung. Auf der anderen Seite

können durch Brückenbildungen starke Bindungen entstehen (VanLoosdrecht, et al. 1990). Neu und Marshall (1990) betonen, daß nicht nur die Zusammensetzung der Polymere, sondern auch die Konfiguration und die Konformation eine wichtige Rolle in den Adsorptionsprozessen spielen. Somit ist eine Aussage über die Funktion von Polymeren aufgrund ihrer chemischen Analyse schwierig, zumal es nach erfolgter Adhäsion zur Produktion von weiteren Makromolekülen kommt, die zur Biofilmbildung führen kann (Allison 1993, Allison und Sutherland 1987). Die Abnahme der adsorbierten Zellen unter aeroben Bedingungen mit der Zeit weist jedoch auf Ablösungsprozesse hin, für die die Produktion von Exopolymeren aufgrund räumlicher Behinderungen oder enzymatischer Aktivität verantwortlich sein kann.

#### 4.2.5.2. *Adhäsion unter anaeroben Bedingungen*

Ein anderes Bild zeigt die Inkubation unter anaeroben Bedingungen. Hier lösen sich die Zellen über die Zeit nicht ab, sondern der Bedeckungsgrad nimmt zu. Die Zahl der pro Stunde adhärierenden Zellen ist zu Beginn so groß wie nach 40 Stunden im anaeroben Hungermedium. Der Grund für das unterschiedliche Adhäsionsverhalten kann nicht in physiko-chemischen Reaktionen zu suchen sein, da bei der Zusammensetzung des Mediums eine Reduktion einzelner Komponenten, deren Adsorption zu Ladungsveränderungen führen könnte, nicht zu erwarten ist. Die stärkere Hydrophobizität der anaeroben Zellen, die ebenfalls mit andauernder Hungerphase abnimmt, sollte eher zu einer verstärkten Anheftung zu Beginn der Inkubation führen. Somit müssen andere Mechanismen wirksam sein, die in der physiologischen Antwort der Zellen auf reduzierte Verhältnisse zu suchen sind:

Da der Inkubation unter Nährstoffmangel jeweils eine exponentielle Wachstumsphase unter den entsprechenden Sauerstoff-Bedingungen vorausging, erfolgte die Energiegewinnung der anaerob inkubierten Bakterien durch die viel ineffizientere Fermentation von Glucose (ATP-Bildung durch Abbau von einem Mol Glucose: aerob: 38 Mol ATP; anaerob 2 Mol ATP). Dieses äußert sich in langsameren Wachstumsraten und einer Abnahme der mittleren Zellgröße: Die Medianwerte der Biovolumina von FL2-Zellen sind schon zu Beginn der anaeroben Hungerphase um 45 % kleiner als die aeroben. Mikroskopisch ist eine Mobilität in aerob, nicht jedoch in anaerob gehungerten Zellen, noch nach drei Stunden noch zu beobachten. Vermutlich wurde die Energie für Motilität eingespart, und die Zellen waren nicht mehr beweglich, als sie in das limitierende Medium übertragen wurden. Damit beschränken sich die Möglichkeiten der Bakterien, sich der Oberfläche zu nähern, auf diffusiven Transport durch die laminare Grenzschicht über Oberflächen. Dagegen können die aeroben Bakterien mit Hilfe ihrer polaren Geißeln einem Konzentrationsgradienten in Richtung der Oberfläche aktiv folgen (VanLoosdrecht, et al. 1990).

Die Zunahme der angehefteten Zellen innerhalb der ersten Stunde ist damit auf die Anzahl der zufälligen Oberflächen-Kontakte zurückzuführen, die danach durch Wechselwirkungen stabilisiert wurden: Zum einen traten hier hydrophobe Bindungen auf, denn die Bakterienoberflächen zeigten nach 25 h noch eine moderate Hydrophobizität. Zusätzlich können freigesetzte Fermentationsprodukte wie Formiat, Acetat, Laktat zum organischen Film der Glasoberflächen beigetragen haben. Zum anderen könnten die in hohem Maße sekretierten Proteine bindende Funktionen erfüllen.

#### 4.2.5.3. Zusammenfassende Darstellung des Adhäsionsverhaltens

Bereits kurze Zeit (40 h) nach Einsetzen der  $C_{org}$ -Limitierung liegt die anfängliche Adhäsionsrate aerober Zellen um zwei Größenordnungen hinter der fast unverändert gebliebenen Adhäsionsrate anaerober Zellen zurück. Vermutlich ist hier zwischen zwei Ursachen zu unterscheiden:

- a) Die aerob angewachsenen Zellen haben die Fähigkeit zur aktiven Bewegung, verlieren diese aber im Laufe des Versuchszeitraumes. Dagegen besitzen die anaerob inkubierten Zellen diese Eigenschaft von vornherein nicht. Damit ist die sehr hohe Zellzahl im aeroben Ansatz auf chemotaktisches Verhalten in Richtung Oberfläche zurückzuführen, während die übrigen Anheftungen nur nach Zufallskontakten erfolgen.
- b) Anaerob inkubierte Zellen sind scheinbar fest, d. h. irreversibel mit Hilfe von abgeschiedenen Polymeren, an die Oberfläche des Substrats gebunden: Die Bakterien beider Ansätze zeigten während des Versuchs hydrophobe Oberflächeneigenschaften - bei den anaeroben stärker ausgeprägt - mit abnehmender Tendenz während des Versuches.

Unter der Annahme, daß sich die Oberflächenenergie des Glases durch Adsorptionerscheinungen verringert hat, wäre bei abnehmender Hydrophobizität der Zellen mit verringerten Adhäsionsereignissen zu rechnen. Dies wird im Falle der aeroben Inkubation experimentell bestätigt. Der starke Gegensatz zwischen aerobem und anaerobem Ansatz läßt den Schluß zu, daß hier zusätzlich positive und negative Effekte wirksam werden. Ein Vergleich der anfänglichen Besiedlungszahlen mit der Entwicklung über die ersten 40 Stunden zeigt aerob eine Abnahme, was auf aktive Abtrennung hindeutet, anaerob eine leichte Zunahme. Die Fähigkeit, sich nach der Annäherung an eine Oberfläche auch dort festzusetzen, ist mit der Exkretion von "adhesiven Polymeren" (Neu und Marshall 1991) verbunden.

Bei der Suche nach einer Erklärung für die verstärkte Adhäsion unter anaeroben Bedingungen ist zu berücksichtigen, daß Bakterien aufgrund ihres spezifischen Gewichts und ihrer geringen Größe (niedrige Reynoldszahl) den Wasserkörper, in dem sie sich befinden, nicht ohne Anheftung an Vektoren entkommen würden. Allerdings können

Stressfaktoren wie Nährstoffmangel auch innerhalb ein und derselben Wassermasse fleckenhaft verteilt auftreten. Daher kann ein pelagischer Aufenthalt mit der unter Umständen noch erhaltenen Fähigkeit zur Chemotaxis gelegentlich vorteilhafter sein als eine langfristige Anheftung an die Oberfläche eines Vektors. Wenn die Fähigkeit zur Chemotaxis jedoch nicht mehr besteht, bildet sich um die Zelle eine "Mass transfer boundary layer" (Breznak, et al. 1984), in die Substrate nur noch diffundieren können. Durch Ausbildung von lockeren, groß-volumigen Aggregaten durch Exopolymersekretion wird die Substrat-adsorbierende Oberfläche vergrößert und auch der Spielraum für extrazelluläre Enzymaktivitäten erweitert.

Für diese Erklärungsmöglichkeit spricht auch die Beobachtung, daß die Adhäsion von *Pseudomonas* bis zu einem gewissen Grad mit auftretenden Scherkräften zunimmt (Mittelman, et al. 1990).

Anoxische Bedingungen sind jedoch im freien Wasserkörper aufgrund diffusiver Effekte nicht kleinräumig verteilt. So könnte es unter anaeroben Bedingungen ein Selektionsvorteil zu sein, sich an Oberflächen (Partikel) anzuheften und sich mit ihnen relativ zum Wasserkörper fortzubewegen. Unter nährstoffarmen Bedingungen kommt hinzu, daß die Überlebensfähigkeit im anoxischen Milieu geringer als in Gegenwart von Sauerstoff ist (Heise und Reichardt 1991). So betrachtet würden also nur jene Zellen überleben, die innerhalb kürzerer Zeiträume anaerobe und nährstoffarme Bedingungen verlassen können.

### 4.3. Der Einfluß von Schwermetallen auf die Exopolymersekretion

Die Metall-bindende Kapazität von Exopolymeren ist seit langem bekannt, ihr Einsatz in der Abwasserindustrie zur Ausfällung von Schwermetallen wird diskutiert (Weiner, et al. 1985). Fraglich ist jedoch, inwieweit Bakterien unter nährstoffarmen Bedingungen in der Lage sind, durch die Exkretion hochmolekularer extrazellulärer Moleküle auf erhöhte Metallkonzentrationen zu reagieren und damit toxische Effekte zu verringern.

Vor der Diskussion dieser Frage soll zunächst ein Überblick gegeben werden über die Einteilung von Schwermetallen nach ihrer Reaktivität und die daraus folgenden toxischen Wirkungen.

#### 4.3.1. Ökochemie und Ökotoxikologie von Schwermetallen unter besonderer Berücksichtigung von Kupfer, Kadmium und Kobalt

Als Schwermetalle werden Metalle mit einem spezifischen Gewicht von mehr als 5 bezeichnet mit Ausnahme der Lanthaniden und Actiniden (Collins und Stotzky 1989). Eine Klassifizierung nach ihrem chemischen Verhalten nahmen Pearson (1968), sowie Nieboer und Richardson (1980) vor. In Anlehnung an das Lewis-Konzept von Säuren und Basen unterteilte Pearson die Schwermetalle in "starke Säuren" mit hoher Ladungsdichte und stabilen Elektronenkonfigurationen, die bevorzugt Ionenbindungen eingehen, und in "schwache Säuren", entsprechend mit geringer Ladungsdichte und teilweise nur einzeln besetzten Elektronenschalen, so daß vorzugsweise kovalente Bindungen ausgebildet werden (Pearson 1968). Nieboer und Richardson (1980) kritisieren an dieser als "HSAB" bekannten Theorie, daß sie zur Betrachtung anorganischer Systeme nützlich ist, jedoch biologisch relevante Interaktionen nicht berücksichtigt. Sie schlagen daher eine Klassifizierung vor, die auf Gleichgewichtskonstanten für Metallionen-Ligande-Komplexe beruht. Danach werden Metallionen hoher Ladungsdichte und abnehmender Stabilität der Komplexe z. B. von Fluor zu Jod und von Sauerstoff zu Selen in die Klasse A gruppiert<sup>1</sup>. Die zugewiesenen Metalle entsprechen dabei weitgehend den "harten Säuren" der HSAB-Theorie: Zur Klasse A zählen die Elemente der I. und II. Hauptgruppe (mit Ausnahme der Protonen), die III. Nebengruppe und Aluminium. Viele dieser Kationen erfüllen wichtige biologische Funktionen. Zum Beispiel dienen  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  zur Stabilisierung extrazellulärer oder intrazellulärer Strukturen (Nieboer und Richardson 1980).

---

<sup>1</sup>Weiterhin gelten folgende Komplexstabilitäts-Verhältnisse:  $\text{N} > \text{As}$ ;  $\text{O} > \text{N} > \text{S}$

Tendenzen in der Komplexbildung der Metallionen in Klasse B sind denen der Klasse A entgegengesetzt. Klasse B-Metallionen haben keine biologische Funktion und sind meist toxisch. Die Grenze von den Klasse B zu den Borderline-Ionen verläuft fließend. Zu den Borderline-Ionen gehören einige als Spurenelement wichtige "Mikro-Nährstoffe" wie z.B.  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  (Collins und Stotzky 1989).

Die Einteilung von Nieboer und Richardson nach der chemischen Reaktivität ist für die Einschätzung der Toxizität eines Elements sehr nützlich, da sie durch die Affinität zu bestimmten funktionellen Gruppen bestimmt wird. Klasse B- und Borderline-Ionen bilden sehr stabile Komplexe mit Zellkomponenten, sie haben eine hohe Affinität zu Sulphydryl, Disulfid-, Phosphat- und Aminogruppen und können somit Klasse A-Elemente verdrängen. Dadurch kann es zur Blockierung funktioneller Gruppen oder zur Veränderung der aktiven Konformation eines Moleküls oder Enzyms kommen (Collins und Stotzky 1989).

Resistenzmechanismen, die häufig extrachromosomal- oder Plasmid-lokalisiert sind (Gadd und Griffiths 1978), sorgen daher für einen möglichst kurzen Aufenthalt in aktiver Form in der Zelle.

Sie werden in den Zellen entweder enzymatisch über Oxidasen, Reduktasen, (de-)alkylierende Enzyme in ihrer toxischen Form neutralisiert, über hochspezifische Efflux-Systeme hinaus transportiert, oder aber die Aufnahme wird blockiert u. U. durch Bindung an extrazelluläre Komponenten (Silver, et al. 1989).

Die teilweise oder vollständige Bindung von Metallionen reduziert bzw. eliminiert ihre toxische Wirkung (Gadd und Griffiths 1978).

Kupfer-, Kadmium- und Kobalt-Ionen gehören zu den Borderline-Ionen. Ihr Klasse B-Charakter nimmt in folgender Richtung zu:  $\text{Co}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$ .

Borderline-Ionen können mit verschiedenen Kategorien von Liganden Komplexe bilden, wobei mit zunehmenden "Klasse B"-Eigenschaften stärkere Wechselwirkungen mit Stickstoff- und Schwefel-Verbindungen in biologischen Molekülen auftreten (Nieboer und Richardson 1980).

Kobalt- und Kupfer-Ionen sind essentielle Mikronährstoffe für alle Organismen (Brock, et al. 1994): Kobalt ist der zentrale Co-Faktor des Vitamins B12 (Kobalamin). Kupfer spielt eine Rolle in Respirationsenzymen. Kadmium dagegen erfüllt keine bekannte biologische Funktion. Mutagene, karzinogene und teratogene Eigenschaften sind nachgewiesen (Degrave 1981). Die Verteilung von Kadmium im Meerwasser zeigt eine enge Koppelung mit Nährstoffzyklen: In den oberen Wasserschichten sind die

Konzentrationen gering ( $0.2 - 60 \text{ ng liter}^{-1} = \text{weniger als } 1 \text{ nmol liter}^{-1}$ ). Dagegen nehmen sie mit der Tiefe zu (Tiefenwasser:  $0.1 - 125 \text{ ng liter}^{-1}$ ). In Randmeeren ist die Konzentration erhöht ( $10 \text{ bis } 60 \text{ ng liter}^{-1}$ ), im anoxischem Tiefenwasser jedoch stark verringert (Fowler 1990, Kremling, et al. 1987).

Die Kupferverteilung im Wasser zeigt ähnliche Tendenzen:

Gegenüber  $11-13 \text{ nmol liter}^{-1}$  in oxischem Wasser, ist die Konzentration im anoxischen auf  $0.1 \text{ nmol liter}^{-1}$  abgesunken.

Kobalt dagegen wird aus dem Sediment remobilisiert und zeigt hohe Werte in anoxischem Wasser von ca  $2 \text{ nmol liter}^{-1}$  gegenüber  $0.1 \text{ bis } 0.2 \text{ nmol liter}^{-1}$  an der Oberfläche der Ostsee (Kremling, et al. 1987). Sedimentwerte von Kupfer und Kadmium können im Gegensatz zur Wassersäule hohe Konzentrationen ergeben: In der Bucht von San Francisco gemessene Werte lagen im  $\mu\text{M}$ -Bereich (MacDonald 1989).

Die Gesamtkonzentration von Metallionen sagt jedoch noch nicht viel über deren Toxizität und die Anreicherung in der Nahrungskette aus. Diese werden neben anderen Faktoren wie biologischer und physikochemischer Remobilisierung davon bestimmt, in welcher Komplexierung die Ionen vorliegen. Stumm und Bilinski (1973) zählten die Formen auf, in denen Metalle in Wasser vorliegen können: Als freie Metallionen, anorganische Komplexe, organische Komplexe (Chelate), gebunden an hochmolekulares organisches Material, als Colloide, adsorbiert an Colloide und präzipitiert an Oberflächen.

Die Bioverfügbarkeit und damit die Reaktivität eines Metalles hängt direkt mit seiner Speziation zusammen (Hughes und Poole 1991). Dabei ist die Bindung an organische Moleküle über die Messung von Metallspezies in der Lösung abzuschätzen, wenn eine molekulare Charakterisierung der Polymere fehlt. Metallspeziationmessungen sind schwierig und mit Nachteilen behaftet (siehe auch Hughes und Poole 1991), die Komplexbildung mit anionischen Liganden jedoch kann über eine Verrechnung von Konzentrationen und Gleichgewichtskonstanten erfolgen.

Es ergab sich, daß im verwendeten Medium Kupfer als Kupfer-Carbonat (34 %), als Kupfer-Hydrogenphosphat (62 %) und Kupfer-Bicarbonat (3%) vorliegt, die Konzentration freier Ionen wurde mit 0.1% berechnet. Kadmium bildet hauptsächlich Chloride ( $\text{CdCl}^+$ ,  $\text{CdCl}_2$ ) und liegt zu 10% als freies Ion vor, während Kobalt Hydrogenphosphate (58%) und Sulfate (28%) bildet und zu 19% frei als zweiwertiges Ion im Medium verbleibt.

Von diesen Anionen neigen Phosphate am stärksten zur Ausfällung. So wird den Organismen ein großer Anteil an Kupfer und Kobalt entzogen.

Die Ladung, die ein Komplex trägt, bestimmt u. a. seine biologische Effektivität: So sind die ungeladenen Kupfercarbonate toxischer als -Bicarbonat und freie Ionen, da sie auf

nicht-spezifischen Wegen als ungeladenes Molekül in die Zelle gelangen können. Ungeladene Kadmium-Chloride dagegen sind weniger toxisch (Hughes und Poole 1991).

#### 4.3.2. Wirkung von kurzzeitiger Schwermetallexposition auf DNA-Replikation und Mineralisierung von FL2

Um die spontane Toxizität von Schwermetallen auf die Nährstoff-Mangelkulturen unter Berücksichtigung der Sauerstoffverhältnisse zu untersuchen, wurden die Thymidin-Inkorporation und die Mineralisierung von Glukose nach 30minütiger Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an Schwermetallionen in Kontroll- und Testansätzen gemessen.

##### 4.3.2.1. Hemmwirkungen

Metall-Endkonzentrationen von 19 (Cd), 21 (Co) bzw. 31(Cu)  $\mu\text{M}$  hatten nach 30 Minuten Inkubation mit aerob und anaerob gehungerten FL2-Kulturen Effekte, die für die Glukose-Mineralisierung und die Tdr-Inkorporation jeweils die gleiche Tendenz zeigten: Unter oxidischen Bedingungen zeigte sich im Gegensatz zu Kadmium und Kobalt eine deutliche Toxizität bei Kupfer. Bei anoxischer Inkubation dagegen war die Toxizität von Kupfer reduziert, während die von Kadmium und Kobalt zugenommen hatte.

Veränderungen in der Toxizität - wie hier in Abhängigkeit der Sauerstoffverfügbarkeit - können auf zwei Gründe zurückzuführen sein: Die toxische Wirkung der Metalle auf die Zellphysiologie verändert sich, oder die Metalle werden entgiftet, bevor sie mit der Zelle in Kontakt treten können.

Die Bioverfügbarkeit von Kadmium- und Kobalt-Ionen ist durch die Komplexierungen mit Chloriden bzw. Hydrogenphosphaten und Sulfaten verringert, daher rührt vermutlich z.T. die geringere Toxizität als bei Kupfer.

Unterschiede in der Wirkung von Kupfer in Abhängigkeit von der Sauerstoffverfügbarkeit stellten auch Schreiber et al. (1984) bei Untersuchungen mit *Vibrio alginolyticus* fest. Für die bei diesem Organismus unter anaeroben Bedingungen erhöhte Kupfertoxizität stellten die Autoren zwei Erklärungsmöglichkeiten zur Diskussion: a) Wechselwirkungen des Metalls mit Enzymen des anaeroben Stoffwechsels oder b) die Bindung von Kupferionen an u.U. vermehrte Sulfhydryl-Gruppen in Proteinen, deren Tertiärstruktur daraufhin gestört werde .

Bei der aerob erhöhten Cu-Toxizität gegenüber FL2 kann es sich nicht um die erste Möglichkeit handeln, da die Zellen seit 2 Tagen gehungert und damit ihre

Stoffwechselaktivitäten stark reduziert hatten. Da die Speziation des Kupfers ohne biologischen Einfluß mehrere Tage unbeeinflusst bleibt vom Redoxpotential, ist auch der Anteil der z.T. unlöslichen Kupferverbindungen wie  $\text{CuCO}_3$  und  $\text{CuHPO}_4$  in beiden Ansätzen gleich. Für die unterschiedliche Toxizität kommt damit vor allem eine Bindung durch die Exopolymere in Betracht, die unter anaeroben Bedingungen einen gegenüber aeroben Ansätzen erhöhten Proteinanteil aufweisen (Kohlenhydrat:Proteinverhältnis von 0.2 im Gegensatz zu 2 bei aerober Inkubation). Proteine hatten eine verstärkte Cu-Bindungsfähigkeit gezeigt (3.3.4), während zwischen der Adsorption von Kadmium-Ionen und EP-Polysacchariden eine gute Korrelation bestand. Zu dem gleichen Ergebnis kamen Bitton und Freihofer (1978), die der Adsorption von Schwermetallen an kapsuläre Polymere eine große Bedeutung beimessen .

Bei höheren Metallkonzentrationen traten jedoch trotzdem toxische Effekte auf, die die Thymidin-Aufnahme und Mineralisierung von Glukose völlig reduzierten. Vermutlich ist dabei die maximale Bindungskapazität der jeweiligen Exopolymere überschritten worden. Ausnahmen bildeten hier die Kobalt-Ionen, deren Wirkung im Konzentrationsbereich bis  $210 \mu\text{M}$  auf die Verdopplung genetischen Materials gering und auf die Mineralisierung nicht zu messen war. Ebenso ist kein Rückgang in der Glukose-Mineralisierung bei Kupfer-Ionen unter anaeroben und bei Kadmium-Ionen unter aeroben Bedingungen zu erkennen, während die entsprechenden inkorporierten Thymidin-Werte deutlich zurückgegangen waren. Damit zeigt sich die DNA-Replikation deutlich stärker beeinflusst von den Metallionen als die Mineralisierung. Die Ergebnisse der Thymidin-Inkorporation machten deutlich, daß Kupfer-Konzentrationen unter den gegebenen Versuchsbedingungen bei geringeren Konzentrationen toxisch wirken als Kadmium-Konzentrationen, während Kobalt kaum Effekte zeigt. Unter Berücksichtigung der errechneten Konzentrationswerte für freie Ionen bzw. für Komplexe, die nicht schwer löslich sind, erscheint die hohe Toxizität des Kupfers um so bedeutender, als hier nur ein kleiner Prozentsatz (0.1 %) im Gegensatz zu 10.4 % freien Kadmium- und 19.3 % freien Kobalt-Ionen potentiell biologisch verfügbar sein könnte. Der größte Anteil des Kupfers geht, nach dem Löslichkeitsprodukt zu urteilen, in unlösliche Carbonat und Hydrogenphosphat-Komplexe über. Die geringe Toxizität von Kobalt-Ionen liegt vermutlich an der Bildung von Komplexen mit Sulfaten und dem leicht ausfallenden Hydrogenphosphat, die biologisch kaum verfügbar sind.

Kadmium bildet neutrale Chloride, die keine hohe Zellpermeabilität haben, und geladene Moleküle, die ähnlich wie die Hydroxide von Kupfer durch ihre Adsorption eine Ladungsumkehr der Bakterienzelle bewirken und damit das Adhäsions- und Aggregationsverhalten beeinflussen können (4.3.5)(Babich und Stotzky 1980).

#### 4.3.2.2. *Stimulierungen*

Vielfach zeigen sich Stoffwechsel-Aktivitäten in Gegenwart von Metallen, die weit über die Kontrolle hinausgehen - bei der anaeroben Tdr-Inkorporation von über 400 %. Stimulierung von Aktivitäten wie Respiration und Wachstum ist in Versuchen mit Bodenproben (Zibilske und Wagner 1982) bzw. im marinen Milieu beobachtet worden und wurde mit der Freisetzung von organischer Substanz und Nährstoffen durch metallsensitive Organismen erklärt. Hines und Jones (1982) plattierten Bermuda-Sedimentproben auf Medien mit und ohne Nickel- bzw. Kupfer-Ionen ( $10^{-6}$  bis  $10^{-3}$  M) aus und erhielten im Vergleich der Keimzahlen über 500 % Erhöhung auf den gering konzentrierten Kupfer-versetzten Platten. Sie halten dafür einen indirekten Effekt eher für verantwortlich als eine direkte Stimulierung durch die Metalle: Nach ihrer Theorie ersetzen die Metallionen andere Kationen im Medium, die wachstumsfördernd waren. In den hier zu diskutierenden Versuchen wurden die Metallkonzentrationen jeweils dem  $C_{org}$ -freien Medium zugegeben, in dem die Zellen - wenn mit Glukose versetzt - auch angezogen werden konnten. Dies bedeutet jedoch nicht, daß es in ihrer Zusammensetzung optimal für die Kultur ist. Daher ist es möglich, daß durch die Wirkung der Metallionen adsorbierte Mikronährstoffe auch von der Gefäßoberfläche freigesetzt wurden, die vorübergehend für erhöhte Stoffwechselaktivität sorgten.

#### 4.3.4. *Adaptive Effekte: die Reaktion von FL2 auf längerfristige Metallexposition*

##### 4.3.4.1. *Extrazelluläre Proteaseaktivitäten*

In der Hemmung extrazellulärer Proteasen hungernder Zellen waren Kupfer-Ionen wiederum am wirksamsten und Kobalt-Ionen hatten nur geringen Einfluss auf die Enzym-Aktivitäten im Medium. In Ansätzen mit Kadmium nahmen die Protease-Aktivitäten nach anfänglicher Hemmung später wieder zu. Ob die Wirkungsmechanismen der beobachteten Hemmung auf der Enzym-Ebene (Aktivität) oder bei der Enzym-Synthese zu suchen sind, muß wegen der nicht weiter spezifizierten Testbedingungen als ungeklärt gelten.

In Gegenwart von  $1.9 \mu\text{M}$  Kupferionen ist die Enzymaktivität stark reduziert. Bei diesem Versuch läßt sich jedoch keine Aussage treffen, ob eine spezifische Hemmung der Enzymaktivität oder des Zellstoffwechsels allgemein vorliegt.

#### 4.3.3.2. Induktionseffekte

Unter aeroben Bedingungen führten Endkonzentrationen von 19  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ , 31  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ , oder 21  $\mu\text{M}$   $\text{Co}^{2+}$  in  $\text{C}_{\text{Org}}$ -limitierten Kulturen von FL2 nach 24stündiger Inkubation zu einem starken Anstieg der EP-Proteingehalte. In Metall-adaptierten Kulturen waren die EP-Proteinwerte ebenfalls erhöht. Dies läßt darauf schließen, daß ein Zusammenhang zwischen der Exopolymerproduktion und Metallexposition besteht. Da die erhöhten Proteinwerte in Exopolymeren von Metall-adaptierten Kulturen auch in metallfreiem Medium zu messen waren, scheint es sich um einen äußerst stabilen Resistenzmechanismus zu handeln. Bei *Vibrio alginolyticus* bleibt die durch Metallionen induzierbare Metallresistenz durch exopolymere Proteine auch in Metall-freien Medien noch über zehn Generationen hinweg erhalten (Harwood und Gordon 1994).

Eine solche Induktion Cu-entgiftender extrazellulärer Proteine ist in den letzten Jahren mehrfach beschrieben worden (Gordon, et al. 1993, Harwood und Gordon 1994, Harwood-Sears und Gordon 1990, Schreiber, et al. 1990). Schreiber et al. und Harwood-Sears und Gordon isolierten jeweils zwei Komponenten mit dem Molekulargewicht von 26 und 28 kDalton, bzw. 19 und 21 kDalton aus Kupfer-haltigen Kulturen von *Vibrio alginolyticus*, wobei die Unterschiede im Molekulargewicht offenbar methodenbedingt waren. In Gegenwart von 20  $\mu\text{M}$  Kupferionen wurden die Proteine auch für Substrat-limitierte Kulturen nachgewiesen (Gordon, et al. 1993).

Die gelelektrophoretische Auftrennung des Überstandes einer  $\text{C}_{\text{Org}}$ -limitierten Kultur von FL2, die Kupferionen in einer Endkonzentration von 31  $\mu\text{M}$  enthielt, bestätigt diese Ergebnisse und läßt den Schluß zu, daß die induzierte Sekretion von Proteinen zur Entgiftung von Kupfer-Ionen nicht auf *Vibrio alginolyticus* beschränkt ist. Die an FL2 gewonnenen Ergebnisse unterscheiden sich jedoch in zwei Punkten wesentlich von den bisher veröffentlichten: Neben dem Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 23 kDalton, das aus dem aeroben Kupferansatz isoliert wurde, lassen sich noch zwei weitere Proteine der Größe 32 und 200 kDalton nur in Gegenwart erhöhter Metallkonzentrationen nachweisen. Weiterhin liefern verschiedene Metall-Ionen in aerober Kultur identische Proteinbanden. Daher handelt es sich vermutlich nicht um eine Kupfer-spezifische Induktion, sondern um die Reaktion auf erhöhte Konzentration von Borderline-Metallen im Kultur-Medium.

Unter anaeroben Bedingungen dagegen unterscheidet sich das Bandenmuster des Kupferansatzes von dem der Cd- und Co-Ansätze. Während die anderen Metallansätze zwei eng nebeneinanderliegende Banden bei 119 und 126 kDalton aufweisen, sind nur in Gegenwart von Kupfer zwei Proteine der Größe 112 und 133 kDalton nachzuweisen. Im Bereich von

168 bis 231 kDalton werden in Gegenwart von Cu Proteine in das Medium abgegeben, die ansonsten nicht nachweisbar sind.

Während die Induktion extrazellulärer Proteine durch Metallionen im aeroben Milieu unspezifisch verläuft, zeigen die Kulturen ein unterschiedliches Verhalten gegenüber Kupfer unter anaeroben Bedingungen.

Kupfer spielt bei dem Ausbruch der von *Vibrio anguillarum* hervorgerufenen Fischkrankheit "Vibriosis" eine wesentliche Rolle, indem es die Infektion der Fische erleichtert (Baker, et al. 1983). Rødsæther et al. (1977) postulieren, daß *V. anguillarum* ein normaler Bewohner von Aalen sei und erst durch den Einfluß von Kupfer zu einem Krankheitserreger werde. Wenn auch noch nicht bekannt ist, wodurch die Krankheit ausgelöst wird, so zeigte doch Munn 1980, daß ein hämolysierendes Enzym mit dem Molekulargewicht von 191 Da an den Symptomen beteiligt ist. Extrazelluläre Moleküle dieser Größenordnung werden offensichtlich durch Kupfer induziert, so daß es sich vermutlich bei einigen der beobachteten Banden um die krankheitserregenden Proteine handelt. Daraus müßte geschlossen werden, daß die Induktion der fischtoxischen Proteine unter aeroben Bedingungen nicht nur durch Kupfer erfolgt, da die Bandenmuster weitgehend identisch sind. Unter anaeroben Bedingungen jedoch scheinen  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen einen wesentlich größeren Effekt auf die *de novo*-Synthese zu haben.

Die Zellgröße der Bakterien nahm unter anaeroben Bedingungen zu. Insofern wäre ein intrazellulärer Abbau organischer Zellkomponenten zur energetischen Finanzierung der Proteinsynthese auszuschließen. Bei den gelelektrophoretisch nachgewiesenen Proteinen könnte es sich um freigesetzte periplasmatische Proteine oder um die Folge einer Umschichtung des EP-Proteinpools handeln.

Unter aeroben Bedingungen dagegen ist ein deutlicher Rückgang der Zellzahlen und der Zellvolumina zu verzeichnen. Dieser liegt über der für *Vibrio alginolyticus* beschriebenen Biomassenverringering von 20 % (Gordon, et al. 1993), so daß zur Energiegewinnung zahlreiche Zellinhaltsstoffe zur Verfügung stehen.

#### 4.3.3.3. Bioenergetische Betrachtungen

Die für die Metall-Entgiftung aufgewendete Energie läßt sich mit Hilfe der Biomassen-Veränderung abschätzen (Tab. 4): In aerober Hungerkultur verringerte sich die als Biomasse-Parameter verwendete Zell-Proteinkonzentration um 22 bis 26% in Gegenwart von Metallen. Da ein Biomasse-Zuwachs aufgrund des fehlenden Substratangebots nicht berücksichtigt zu werden braucht, ist anzunehmen, daß die Energie für die Synthese Metall-entgiftender Proteine aufgewendet wurde.

Unter anaeroben Bedingungen verringerte sich der Proteinanteil um nur 6 bis 12 %. Dessen fermentativer Abbau würde nur geringes Energiepotential bereitstellen. Aus dem Vergleich des Energiebedarfs für die Synthese von Proteinen (5 ATP pro Monomer) und Polysacchariden (2 ATP pro Monomer nach Brock, et al. 1984) erklärt sich damit auch, daß anaerob eine größere Menge an EP-Polysacchariden ausgeschieden wird als unter aeroben Bedingungen.

#### 4.3.4. Schutzfunktion der induzierten Proteine

Die Hemmung der *de novo*-Proteinbildung durch Chloramphenicol liefert Hinweise auf die Bedeutung der Proteine für die Empfindlichkeit gegenüber Schwermetallen.

Nach 3 Stunden unter  $C_{org}$ -Mangel wurde einer FL2-Kultur Chloramphenicol zur Hemmung der Proteinbiosynthese und nach weiteren 1.5 Stunden Metall-Ionen zugesetzt. Als Kontrollen dienten jeweils nicht mit dem Antibiotikum behandelte Parallansätze. Nach 30 Stunden Schwermetallexposition wurde der Glukose-Umsatz als Inkorporation und  $CO_2$ -Freisetzung gemessen.

In Abwesenheit des Inhibitors der Proteinsynthese blieb der Metallzusatz ohne Einfluß auf die Glukose-Inkorporation oder Mineralisierung. Wurde die Neusynthese von Proteinen jedoch durch erhöhte Metallkonzentrationen gehemmt, verringerten sich auch die aerobe und anaerobe Inkorporation von Glukose und die (anaerobe) Glukose-Mineralisierung in Gegenwart von Kupfer- und Kadmium-Ionen. Damit bestätigt sich die Annahme, daß die toxische Wirkung von Schwermetallen auf den Metabolismus der Bakterien durch eine *de novo*-Proteinsynthese verringert wird.

Kein Effekt zeigte sich bei der aeroben Glukose-Mineralisierung, während jedoch die Inkorporation verringert war. Hohe respiratorische Aktivität verbunden mit geringer anabolischer Aktivität läßt eine Entkoppelung der Atmungskette von der Energiespeicherung vermuten: Die ATP-Synthese würde verhindert, ohne den Elektronenfluß zu beeinflussen, so daß trotz andauernder Respiration keine Energie für synthetische Prozesse zur Verfügung stünde und eine Inkorporation von Glukose nicht stattfinden könnte. Daß Kadmium und Kupfer als Entkoppeler der Atmungskette wirken, wurde bereits bei *Ulva lactuca* (Webster und Gadd 1992) und in Rattenleber-Mitochondrien nachgewiesen (Byczkowski und Sorenson 1984). Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, daß diese Metallionen auch auf den bakteriellen Metabolismus einen ähnlichen Effekt haben, zumal es auch direkt nach Zugabe von Kupfer zu der aeroben FL2-Kultur zu einem Anstieg der Mineralisierung um über 100 % kommt (Abb. 10, Tab. 5).

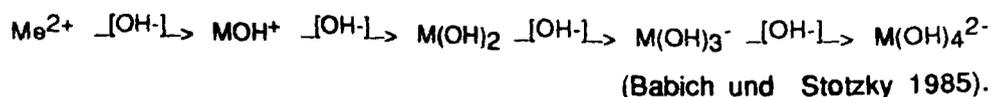
Ein Vergleich gelelektrophoretischen Auftrennung der EP-Proteine Metall-freier Ansätze mit und ohne Chloramphenicol läßt vermuten, daß die Protein-Sekretion bis zur Zugabe des Antibiotikums noch nicht abgeschlossen war. Es deutete sich jedoch das gleiche Muster an wie nach 28 Stunden unter Hungerbedingungen.

Die Bandenmuster der mit Metall versetzten Ansätze mit und ohne Antibiotikum unterschieden sich ebenfalls nicht voneinander, wohl aber von den Metall-freien Ansätzen. Da das Chloramphenicol vor den Metallionen zugegeben worden war, hätte es in diesen Ansätzen eine Reaktion auf die Metall-Exposition verhindert müssen. Es muß somit davon ausgegangen werden, daß das Antibiotikum die Proteinbiosynthese nicht vollständig verhinderte. Substrat-Limitierung führt häufig zu einer erhöhten Resistenz von Bakterien gegenüber verschiedenen Streßfaktoren wie z.B. Antibiotika (Matin und Harakeh 1990, Nyström 1989). Daher hätte eine höhere Dosis verwendet werden müssen, obwohl die unterschiedlichen Resultate der Glukose-Respiration und Inkorporation einen deutlichen Einfluß des Chloramphenicols zeigen.

#### 4.3.5. Einfluß der Metalle auf das Adhäsionsverhalten

Zwei Effekte verdienen eine nähere Betrachtung: Zum einen verhindert Kupfer unter aeroben Bedingungen eine Adhäsion völlig, zum anderen ist in Gegenwart von Kobalt die Anheftung der anaerob inkubierten Bakterien um ein Vielfaches gesteigert.

Nach McEldowney (1994) beruht der wichtigste Effekt von Metallionen auf Adsorptionsprozesse auf einer Modifikation der Zelloberflächencharakteristika durch Anlagerung von bestimmten Spezies. Versuche zum Einfluß von Zink- und Kadmium-Salzen auf die Adhäsion von *Pseudomonas* ergaben, daß Kadmium im Gegensatz zu Zink die Adhäsion stark erhöht. Im vorliegenden Versuch dagegen war kein positiver Effekt von Kadmium auf die Anheftung zu beobachten. Das Medium, das von McEldonwney verwendet wurde, hat jedoch nur einen geringen Chloridanteil, so daß die Cadmium-Ionen vermutlich als Hydroxide vorlagen. Hydroxide können sich in folgender Weise bilden:



Die Anlagerung von Hydroxiden kann bei Bakterien, Pilzen und Mineralien zu einer Ladungsumkehr führen. Collins und Stotzky (1992) stellten fest, daß sich die Netto-Ladung in Gegenwart einiger Schwermetalle bei zunehmenden pH-Werten von negativ zu positiv und wieder zu negativ änderte.

Dabei ist der Hydrolysegrad von Metallen sehr verschieden und die Metall-Spezies zeigen ein dementsprechend unterschiedliches Adsorptionsverhalten.

Nach den Ergebnissen der MaqQL-Analyse liegen im NSS-Medium drei Mal so viele ungeladene Cu-Dihydroxide wie positiv geladene Cu-Hydroxide vor. Dagegen bilden Kobaltionen neben der hydratisierten Form, die nicht zur Ladungsänderung beiträgt, mit 0.2 % einfache Hydroxide. Damit kann die Oberflächenladung der Zellen in Gegenwart von Kobaltionen ins Positive wechseln, wodurch die negative Ladung der neu eingeführten Glasoberfläche relativ schnell überwunden wird. Die Kupfer-Spezies dagegen tragen lediglich zu einer neutralen Oberfläche der Bakterien bei. Bei den Kadmium-Chloriden könnte es aufgrund der hohen Konzentration (48.5% des Gesamt-Cadmiumgehaltes) zu Behinderungen kommen, die eine Anlagerung an die Zelloberfläche verhindern.

Der im anaeroben Milieu ausgeprägte Effekt des Kobalts ist möglicherweise auf Veränderungen der Zelloberflächenstruktur zurückzuführen. Andererseits wäre es aber auch denkbar, daß die Metall-Ionen eine Aggregation von Exopolymeren hervorrufen (Geesey und Jang 1989). Dieses könnte wiederum eine sterische Hinderung zur Folge haben, die eine Adhäsion der Bakterien vereitelte.

## 5. Zusammenfassung

Dem Einfluß wachstumsbegrenzender Umweltfaktoren wie  $C_{org}$ -Mangel und Redoxpotential auf die Bildung bakterieller exopolymerer Substanz (EP) im marinen Milieu wurde in Experimenten mit einem Bakterienisolat aus der Ostsee nachgegangen. Der als *Vibrio anguillarum* "FL2" klassifizierte Test-Stamm konnte wegen der überaus bedeutenden Rolle von Vibrios im Meer als Modellfall angesehen werden. Die Untersuchungen berücksichtigen extreme Wachstumsbedingungen wie "starvation survival" bei respiratorischem und fermentativem Stoffwechsel. Im Mittelpunkt stand die Rolle der EP bei der Anheftung mariner Bakterien an feste Oberflächen (Biofilmbildung) und bei der Entgiftung von Schwermetallen.

### **Zusammensetzung der Exopolymere (EP)**

1. Die qualitative und quantitative Zusammensetzung der extrazellulären Polymere des Testbakteriums FL2 veränderte sich in Abhängigkeit von den Nährstoffverhältnissen

Die höchste Menge an Exopolymeren wurde während der spätlogarithmischen Phase freigesetzt. Dabei handelte es sich zu 90 % um Polysaccharide. Unter Nährstoffmangel ("starvation survival"-Bedingungen) dagegen stieg der Proteinanteil der EP auf mehr als 50 % an.

2. Anhaltender Sauerstoffmangel führte zu einer Erhöhung des Proteinanteils in den Exopolymeren

Die Zunahme des Protein-Anteils an den EP erfolgte unter anaeroben Bedingungen schneller als unter aeroben. Bei Sauerstoffmangel betrug der Proteinanteil nach 30 Stunden bis zu 98 %, während er in Gegenwart von Sauerstoff erst nach 50 Stunden Inkubation auf 50 % angestiegen war.

Der Abbau von Polysacchariden könnte die Diffusivität von Sauerstoff durch die Schleime wesentlich beeinflussen. Wahrscheinlich bindet die Protein-Fraktion Sauerstoff.

### **Funktionen der EP:**

3. Die exopolymeren Proteine hatten zum Teil enzymatische Funktion

Es wurde hämolytische, chitinolytische und proteolytische Aktivität unter Nährstoffmangel nachgewiesen. Während die proteolytischen Enzyme unter aeroben Bedingungen aktiver waren, war die chitinolytische Enzymaktivität unter anaeroben Bedingungen höher. Die erhöhte Persistenz von Enzymen, wie sie für Chitinasen nachgewiesen worden ist, hat unter

Nährstoffmangel und insbesondere unter anaeroben Bedingungen den Vorteil, energieaufwendige *de novo*-Synthesen zu ersparen.

4. Die Komponenten der untersuchten Polymere hatten unterschiedliche Metallbindungskapazität

Kupfer wurde am stärksten an Proteine, Kadmium dagegen maximal an Polysaccharide gebunden.

5. Die Exopolymer-vermittelte, irreversible Adhäsion der Bakterien nahm unter Sauerstoffmangelbedingungen zu

Exopolymere können im Rahmen von sterischen Effekten eine Rolle bei den ersten Adhäsionsschritten spielen und sind an der irreversiblen Adhäsion maßgeblich beteiligt.

Unter Anaerobiose und Nährstoffmangel waren die Zellen nicht beweglich und zeigten eine erhöhte Adhäsionstendenz an Glasoberflächen. Dabei mußten abstoßende elektrostatische Kräfte durch hydrophobe Wechselwirkungen überwunden werden. Diese Voraussetzung wurde vor allem durch eine relative Erhöhung des Proteinanteils erfüllt.

Adhäsion an driftendes Material ermöglicht die Verfrachtung von Bakterienzellen über weite Strecken, wo sie veränderte Wachstumsbedingungen antreffen können.

#### **Bildung Metall-entgiftender EP vor dem Kontakt mit Metallionen:**

6. Die Exopolymerkomponenten hatten präadaptiv entgiftende (detoxifizierende) Wirkung

Die Toxizität der Schwermetall-Ionen  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Co}^{2+}$  hing unter aeroben und anaeroben Bedingungen von der Konzentration der bindenden Exoproteine ab: Die Kupfer-abhängige Hemmung von Mineralisierungs- und Thymidin-Inkorporationsraten war bei aerober Inkubation höher als unter anaeroben Verhältnissen, da die aerob gebildeten Exopolymere einen geringeren Proteinanteil aufwiesen.

7. Kupfer- und möglicherweise Kadmium-Ionen fungieren als Entkoppler der Respiration

Kupferkonzentrationen von  $3.1 \mu\text{M}$  stimulierten die Respiration in aeroben Kulturen. Bei mehrtägiger Inkubation mit Kupfer- und Kadmium-Ionen und gleichzeitiger Hemmung der *de novo*-Synthese von Proteinen war eine leicht erhöhte Respiration bei verringerter Inkorporation zu verzeichnen. Daraus ist auf eine Entkoppelung von Respiration und ATP-Synthese und damit von anabolischen und katabolischen Reaktionen zu schließen.

### **Schwermetall-induzierte Veränderungen der Exopolymere**

**8. Die Fähigkeit zur Adaptation an erhöhte Schwermetallkonzentrationen ging mit einer Veränderung der Exopolymerstruktur einher**

Der Teststamm reagierte auf erhöhte Gesamt-Metallkonzentrationen von 19 ( $\text{Cd}^{2+}$ ), 21 ( $\text{Co}^{2+}$ ) bzw. 31 ( $\text{Cu}^{2+}$ )  $\mu\text{M}$  mit verstärkter Exopolymerproduktion. Welche Komponente dabei bevorzugt synthetisiert wurde, hing von der zur Verfügung stehenden Energie ab: Die energieaufwendigere Proteinsynthese herrschte im aeroben Ansatz vor. Hier stieg der Gehalt an exopolymeren Proteinen um das zehnfache der Kontrollwerte an. Unter anaeroben Bedingungen nahm dagegen die Bildung der EP-Polysaccharide um das 10fache zu, während sich der Protein-Gehalt quantitativ kaum veränderte.

**9. Die de novo-Synthese von Proteinen diente der Detoxifikation von Metallen**

Bei Hemmung einer *de novo*-Proteinsynthese in Gegenwart von Metallen wurde die Inkorporation von Glukose und die Freisetzung von  $\text{CO}_2$  stark verringert. Ohne diese Hemmung wurden durch erhöhte Metallkonzentrationen Proteine induziert, bei denen es sich um Moleküle eines Molekulargewichtes von 32000 Da und 19000 bzw. 23000 Da handelte. In diesem Größenbereich liegen auch andere für *Vibrios* nachgewiesene Cu-Bindungsproteine. Weiterhin waren hochmolekulare Proteine aerob bei 200000 Da und anaerob zwischen 112000 und 231000 Da nachzuweisen.

Im aeroben Ansatz unterschieden sich die Proteinbanden nach Zugabe der verschiedenen Metalle untereinander nicht, während anaerob in Gegenwart von Kupfer Proteine induziert wurden, die bei den Kadmium- und Kobalt-Ansätzen nicht auftraten: Diese Kupfer-spezifischen Proteine besaßen Molekulargewichte von ca. 112000, 133000 und 168000 bis 231000 Da.

**10. Metallionen können das Adhäsionsverhalten von Bakterien beeinflussen**

Kobalt-Salze verstärkten die Adhäsionstendenz des Test-Stammes. Es wird vermutet, daß sich die zu ca. 18 % unkomplexiert vorliegenden Kobalt-Ionen zwischen den negativ geladenen Oberflächen der Bakterien und des Substrats anreichern.

## 6. Literatur

- Abe, M., Sherwood, J. E., Hollingsworth, R. I. & Dazzo, F. B. (1984): Stimulation of clover root hair infection by lectin-binding oligosaccharides from the capsule and extracellular polysaccharides of *Rhizobium trifolii*. *J. Bacteriology* 160, 517-520
- Alber, M. & Valiela, I. (1994): Production of microbial organic aggregates from macrophyte-derived dissolved organic material. *Limnol. Oceanogr.* 39, 37-50
- Albertson, N. H., Nyström, T. & Kjelleberg, S. (1990): Exoprotease activity of two marine bacteria during starvation. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 218-223
- Aldredge, A. L., Passow, U. & Logan, B. E. (1993): the abundance and significance of a class of large, transparent organic particles in the ocean. *Deep-Sea Research* 40, 1131-1140
- Allison, D. G. (1993): Biofilm-associated exopolysaccharides. *Microbiology Europe* Nov/Dez.
- Allison, D. G. & Sutherland, I. W. (1987): The role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 133, 1319-1327
- Ammerman, J. W., Fuhrman, J. A., Hagström, A. & Azam, F. (1984): Bacterioplankton growth in seawater: I. Growth kinetics and cellular characteristics in seawater cultures. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 18, 31-39
- Amy, P. S., Pauling, C. & Morita, R. Y. (1983): Starvation-survival processes of a marine vibrio. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1041-1048
- Andersson, A., Larsson, U. & Hagström, Å. (1986): Size-selective grazing by a microflagellate on pelagic bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 33, 51-57
- Antón, J., Meseguer, I. & Rodríguez-Valera, F. (1988): Production of an extracellular polysaccharide by *Haloflex mediterranei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2381-2386
- Austin, B. & Austin, D. A. (1987): Vibrios. In: Austin, B. & Austin, D. A. : Bacterial fish pathogens. Ellis Horwood Limited, Chichester, 263-296
- Azam, F. & Hodson, R. E. (1977): Size distribution and activity of marine microheterotrophs. *Limnol. Oceanogr.* 22, 492-501
- Babich, H. & Stotzky, G. (1980): Environmental factors that influence the toxicity of heavy metal and gaseous pollutants to microorganisms. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 8, 99-145
- Babich, H. & Stotzky, G. (1985): Heavy metal toxicity to microbe-mediated ecologic processes: A review and potential application to regulatory policies. *Environ. Res.* 36, 111-137

- Baier, R. E. : Early events of micro-biofouling of all heat transfer equipment. In: Somerscales, E. F. C., Knudsen, J. G.: Fouling of heat transfer equipment. Hemisphere Publ. Corp., Washington 1981, 293-304.
- Baier, R. E. : Initial events in microbial film formation. In: Costlow, J. D., Tipper, R. C.: Marine biodeterioration: an interdisciplinary study. E. & F. N. Spon Ltd., London 1984, 57-62
- Baker, K. J., Knittel, M. D. & Fryer, J. L. (1983): Susceptibility of chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum), and rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to infection with *Vibrio anguillaum* following sublethal copper exposure. *Journal of Fish Diseases* 6, 267-275
- Baker, R. M., Singleton, F. L. & Hood, M. A. (1983): Effects of nutrient deprivation on *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 930-940
- Bitton, G. & Freihofer, V. (1978): Influence of extracellular polysaccharides on the toxicity of copper and cadmium toward *Klebsiella aerogenes*. *Microb Ecol* 4, 119-125
- Blumenkrantz, N. & Asboe-Hansen, G. (1973): New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical biochemistry* 54, 484-489
- Boylen, C. W. & Ensign, J. C. (1970): Intracellular substrates for endogenous metabolism during long-term starvation of rod and spherical cells of *Arthrobacter crystallopoietes*. *J. Bacteriol.* 103, 578-587
- Bradford, M. (1976): *Anal. Biochem.* 72, 248
- Breznak, J. A., Cooksey, K. E., Eckhardt, F. E. W., Filip, Z., Fletcher, M., Güde, H., Hamilton, W. A., Hattori, T., Hoppe, H.-G., Matthysse, A. G., Savage, D. C. & Shilo, M.: Activity on surfaces. In: Marshall, K. C.: *Microbial Adhesion and Aggregation*. Springer Verlag, Berlin (1984), 203-221
- Brock, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. (1994): *Biology of Microorganisms*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey,
- Brock, T. D., Smith, D. W. & Madigan, M. T. (1984): *Biology of microorganisms*. Prentice-Hall. Inc., Englewood Cliffs, New Jersey,
- Brown, M. J. & Lester, J. N. (1980): Comparison of bacterial extracellular polymer extraction methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 40, 179-185
- Bryers, J. D. : Mixed Population Biofilms. In: Melo, L. F. et al.: *Biofilms - Science and Technology*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands 1992, 277-289
- Byczkowski, J. Z. & Sorenson, J. R. J. (1984): Effects of metal compounds on mitochondrial function: A review. *Sci. Total Environ.* 37, 133-162
- Campbell, A. (1957): Synchronization of cell division. *Bacteriol. Rev.* 21, 263-272
- Carlucci, A. F., Shimp, S. L. & Craven, D. B. (1986): Growth characteristics of low-nutrient bacteria from the north-east and central Pacific Ocean. *FEMS Microbiol. Ecol.* 38, 1-10

- Characklis, W. G., McFeters, G. A. & Marshall, K. C. (1990): Physiological ecology in biofilm systems. In: Characklis, W. G. ,Marshall, K. C.: Biofilms. John Wiley, New York, 341-394
- Cho, B. C. & Azam, F. (1988): Major role of bacteria in biogeochemical fluxes in the ocean's interior. *Nature* 332, 441-443
- Christensen, B. E., Kjosbakken, J. & Smidrod, O. (1985): Partial chemical and physical characterization of two extracellular polysaccharides produced by marine, periphytic *Pseudomonas* sp. strain NCMB 2021. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 837-845
- Cole, J. J., Findlay, S. & Pace, M. L. (1988): Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems. A cross-system overview. 43, 1-10
- Collins, Y. E. & Stotzky, G. (1989): Factors affecting the toxicity of heavy metals to microbes. In: Beveridge, T. J. ,Doyle, R. J.: Metal ions and bacteria. John Wiley & sons, New York, 31-90
- Collins, Y. E. & Stotzky, G. (1992): Heavy metals alter the electrokinetic properties of bacteria, yeasts, and clay minerals. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1592-1600
- Costerton, J. W., Irvin, R. T. & Cheng, K. J. (1981): The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* 35, 299-324
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D. & James, G. (1994): Biofilms, the customized microniche. *J. Bacteriology* 176, 2137-2142
- Crosa, J. H. & Hodges, L. L. (1981): Outer membrane proteins induced under conditions of iron limitation in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infection and Immunity* 31, 223-227
- Crosa, J. H., Hodges, L. L. & Schiewe, M. H. (1980): Curing of a plasmid is correlated with an attenuation of virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infection and Immunity* 27, 897-902
- Davis, C. L. & Robb, F. T. (1985): Maintenance of different mannitol uptake systems during starvation in oxidative and fermentative marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 743-748
- Dawson, P. M., Humphrey, B. A. & Marshall, K. C. (1981): Adhesion: A tactic in the survival strategy of a marine vibrio during starvation. *Curr. Microbiol.* 6, 195-199
- Decho, A. W. (1990): Microbial exopolymer secretions in ocean environments: Their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 28, 73-153
- Decho, A. W. & Lopez, G. R. (1993): Exopolymer microenvironments of microbial flora: Multiple and interactive effects on trophic relationships. *Limnol. Oceanogr.* 38, 1633-1645

- Degrave, N. (1981): Carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects of cadmium. *Mutat. Res.* 86, 115-135
- Deretic, V., Dikshit, R., Konyecsni, W. M., Chakrabarty, A. M. & Misra, T. K. (1989): The *algR* gene, which regulates mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*, belongs to a class of environmentally responsive genes. *J. Bacteriol.* 171, 1278-1283
- Dillon, J. K., Fuerst, J. A., Hayward, A. C. & Davis, G. H. G. (1986): A comparison of five methods for assaying bacterial hydrophobicity. *J. Microbiol. Meth.* 6, 13-19
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. (1956): Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356
- Dunbar, B. S.: *Two Dimensional Gel Electrophoresis and Immunological Techniques.* Plenum Press, New York 1987
- Enger, Ø., Hoff, K. A., Schei, G. H. & Dundas, I. (1990): Starvation survival of the fish pathogenic bacteria *Vibrio anguillarum* and *Vibrio salmonicida* in marine environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74, 215-220
- Findlay, S. E. G., Meyer, J. L. & Edwards, R. T. (1984): Measuring bacterial production via rate of incorporation of  $^3\text{H}$  thymidine into DNA. *J. Microbiol. Meth.* 2, 57-72
- Fletcher, M. (1990): *Methods for Studying Adhesion and Attachment to Surfaces.* *Methods in Microbiology* 22
- Fletcher, M. (1986): Measurement of glucose utilization by *Pseudomonas fluorescens* that are free-living and that are attached to surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 672-676
- Fletcher, M. & Floodgate, G. D. (1973): An electron microscope demonstration of an acid polysaccharide involved in adhesion of a marine bacterium to solid surfaces. *J. Gen. Microbiol.* 74, 325-334
- Fowler, S. W. (1990): *Critical Review of Selected Heavy Metal and Chlorinated Hydrocarbon Concentrations in the Marine Environment.* *Mar. Environ. Res.* 29, 1-64
- Fuhrman, J. A. (1981): Influence of method on the apparent size distribution of bacterioplankton cells: epifluorescence microscopy compared to scanning electron microscopy. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 5, 103-106
- Gadd, G. M. & Griffiths, A. J. (1978): Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microbial Ecol.* 4, 303-317
- Geesey, G. & Jang, L. : *Extracellular Polymers for Metal Binding.* In: Ehrlich, N. L.: *Microbial Mineral Recovery.* McGraw-Hill Publishing Company, New York 1989, 223-247
- Gehr, R. & Henry, J. G. (1983): Removal of extracellular material - Techniques and pitfalls. *Water Res.* 17, 1743-1748

- Gocke, K., Dawson, R. & Leibzeit, G. (1981): Availability of dissolved free glucose to heterotrophic microorganisms. *Mar. Biol.* 62, 209-216
- Goldman, D., Merril, C. R. & Ebert, M. H. (1980): *Clin. Chem.* 26, 1317
- Gordon, A. S., Gerchakov, S. M. & Millero, F. J. (1983): Effects of inorganic particles on metabolism by a periphytic marine bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 411-417
- Gordon, A. S., Harwood, V. J. & Sayyar, S. (1993): Growth, copper-tolerant cells, and extracellular protein production in copper-stressed chemostat cultures of *Vibrio alginolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 60-66
- Gordon, A. S. & Millero, F. J. (1985): Adsorption-mediated decrease in the biodegradation rate of organic compounds. *Microb. Ecol.* 11, 289-298
- Grossart, H. P. & Simon, M. (1993): Limnetic macroscopic organic aggregates (lake snow): Occurrence, characteristics, and microbial dynamics in Lake Constance. *Limnol. Oceanogr.* 38, 532-546
- Güde, H., Jürgens, K., Parth, G. & Walser, R. (1991): Indications for low net productivity of pelagic bacterioplankton. *Kieler Meeresforsch. Sonderh.* 8, 309-316
- Hames, B. D.: One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: Hames, B. D., Rickwood, D.: *Gel Electrophoresis of Proteins*. Oxford University Press, Oxford 1990, 1-147
- Harden, V. P. & Harris, J. O. (1953): The isoelectric point of bacterial cells. *J. Bacteriol.* 65, 198-202
- Harvey, R. W. & Young, L. V. (1980): Enumeration of particle-bound and unattached respiring bacteria in the salt marsh environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 40, 156
- Harwood, V. J. & Gordon, A. S. (1994): Regulation of extracellular copper-binding proteins in copper-resistant and copper-sensitive mutants of *Vibrio alginolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1749-1753
- Harwood-Sears, V. & Gordon, A. S. (1990): Copper-induced production of copper-binding supernatant proteins by the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1327-1332
- Heise, S. (1990): Hungerphasen heterotropher Bakterien aus anaeroben Sedimenten. Diplomarbeit. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Heise, S. & Reichardt, W. (1991): Anaerobic starvation survival of marine bacteria. *Kieler Meeresforsch. Sonderh.* 8, 97-101
- Herbert, D., Phipps, P. J. & Strange, R. E. (1971): Chemical analysis of microbial cells. In: *Methods in Microbiology* 5b. 210-336
- Hermansson, M. & Marshall, K. C. (1985): Utilization of surface localized substrate by non-adhesive marine bacteria. *Microb. Ecol.* 11, 91-105

- Herndl, G. J. (1988): Ecology of amorphous aggregations (marine snow) in the Northern Adriatic Sea. II. Microbial density and activity in marine snow and its implication to overall pelagic processes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 48, 265-275
- Hines, M. E. & Jones, G. E. (1982): Microbial metal tolerance in Bermuda carbonate sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 502-505
- Hood, M. A., Guckert, J. B., White, D. C. & Deck, F. (1986): Effect of nutrient deprivation on lipid, carbohydrate, DNA, RNA, and protein levels in *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Hood, M. A. & MacDonell, M. T. (1987): Distribution of ultramicrobacteria in a gulf coast estuary and induction of ultramicrobacteria. *Microb Ecol* 14, 113-127
- Horan, N. J. & Shanmugan, P. (1986): Effects of starvation and nutrient depletion on the settling properties of activated sludge. *Water Res.* 20, 661-666
- Hughes, M. N. & Poole, R. K. (1991): Metal speciation and microbial growth - the hard (and soft) facts. *Journal of General Microbiology* 137, 725-734
- Irving, M. & Williams, R. J. P. (1948): Order of stability of metal complexes. *Nature* 162, 746-747
- Jensen, K. F. & Pedersen, S. (1990): Metabolic Growth Rate Control in *Escherichia coli* May Be a Consequence of Subsaturating of the Macromolecular Biosynthetic Apparatus with Substrates and Catalytic Components. *Microbiol. Rev.* 54, 89-100
- Jones, S. E. & Lock, M. A. (1989): Hydrolytic extracellular enzyme activity in heterotrophic biofilms from two contrasting streams. *Freshwater Biology* 22, 289-296
- Jürgens, K. & Güde, H. (1994): The potential importance of grazing-resistant bacteria in planktonic systems. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 112, 169-188
- Jürgens, K. & Güde, H. (1990): Incorporation and release of phosphorus by planktonic bacteria and phagotrophic flagellates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 59, 271-284
- Kefford, B., Kjelleberg, S. & Marshall, K. C. (1982): Bacterial scavenging: Utilization of fatty acids localized at a solid-liquid interface. *Arch Microbiol* 133, 257-260
- Kefford, B. & Marshall, K. C. (1984): Adhesion of *Leptospira* at a solid-liquid interface: a model. *Arch. Microbiol.* 138, 84-88
- Kennedy, A. F. D. & Sutherland, I. W. (1987): Analysis of bacterial exopolysaccharides. *Biotechnol. appl. Biochem.* 9, 12-19
- Kennedy, L., McDowell, K. & Sutherland, I. W. (1992): Alginases from *Azotobacter* species. *J. Gen. Microbiol.* 138, 2465-2471
- Kent, M. L. (1982): Characteristics and identification of *Pasteurella* and *Vibrio* species pathogenic to fishes using API-20E (Analytab products) multitube test strips. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 39, 1725-1729

- Kjelleberg, S. & Hermansson, M. (1984): Starvation-induced effects on bacterial surface characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 497-503
- Kjelleberg, S., Humphrey, B. A. & Marshall, K. C. (1983): Initial phases of starvation and activity of bacteria at surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 978-984
- Kjelleberg, S., Marshall, K. C. & Hermansson, M. (1985): Oligotrophic and copiotrophic marine bacteria - observations related to attachment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31, 89-96
- Kragelund, L. & Nybroe, O. (1994): Culturability and expression of outer membrane protein during carbon, nitrogen, or phosphorus starvation of *Pseudomonas fluorescens* DF57 and *Pseudomonas putida* DF14. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2944-2948
- Laemmli, U. K. (1970): *Nature* 277, 680
- Lappin-Scott, H. M. & Costerton, J. W. (1989): *Bacterial biofilms and surface fouling.* *Biofouling* 1, 323-342
- Larsen, J. L., Rasmussen, H. B. & Dalsgaard, I. (1988): Study of *Vibrio anguillarum* strains from different sources with emphasis on ecological and pathobiological properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2264-2267
- Larsen, J. L., Pedersen, K. & Dalsgaard, I. (1994): *Vibrio anguillarum* serovars associated with vibriosis in fish. *Journal of Fish Diseases* 17, 259-267
- Lee, S. & Fuhrman, J. A. (1987): Relationships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1298-1303
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the foliophenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- MacDonald, D. A. (1989): A summary of status and trends in concentrations of selected chemical contaminants and measures of biological stress in San Francisco Bay. *Oceans '89 2: Ocean pollution*, 647-651
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1982): *Molecular Cloning - A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory,
- Mann, K. H. (1988): Production and use of detritus in various freshwater, estuarine, and coastal marine ecosystems. *Limnol. Oceanogr.* 33, 910-930
- Mården, P., Hermansson, M. & Kjelleberg, S. (1988): Incorporation of tritiated thymidine by marine bacterial isolates when undergoing a starvation survival response. *Arch Microbiol* 149, 427-432
- Mården, P., Nyström, T. & Kjelleberg, S. (1987): Uptake of leucine by a marine Gram-negative heterotrophic bacterium during exposure to starvation conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45, 233-241

- Marshall, K. C. (1992): Biofilms: An overview of bacterial adhesion, activity, and control at surfaces. *ASM News* 58, 202-207
- Marshall, K. C. (1980): Bacterial adhesion in natural environments. In: Berkeley, R. C. W.: *Microbial Adhesion to Surfaces*. Ellis Horwood Limited., Chichester, 187-196
- Marshall, K. C., Stout, R. & Mitchell, R. (1971): Selective sorption of bacteria from seawater. *Can. J. Microbiol.* 17, 1413-1416
- Martin, P. & MacLeod, R. A. (1984): Observations on the distinction between oligotrophic and eutrophic marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 1017-1022
- Matin, A. & Haraheh, S. (1990): Effect of starvation on bacterial resistance to disinfectants. *Drinking Water Microbiology.* 88-103
- Maugeri, T. L., Crisafi, E., Genovese, L. & Scoglio, M. E. (1983): Identification of *Vibrio anguillarum* with the API-20E system. *Microbiologica* 1, 73-79
- McEldowney, S. (1994): Effect of cadmium and zinc on attachment and detachment interactions of *Pseudomonas fluorescens* H2 with glass. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2759-2765
- Merril, C. R.: In: Dunn, M. J.: *Electrophoresis '86*. VCH Verlagsgesellschaft mbH 1986, 273
- Mittelman, M. W. & Geesey, G. G. (1985): Copper-binding characteristics of exopolymers from a freshwater-sediment bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 846-851
- Mittelman, M. W., Nivens, D. E., Low, C. & White, D. C. (1990): Differential adhesion, activity, and carbohydrate:protein ratios of *Pseudomonas atlantica* monocultures attaching to stainless steel in a linear shear gradient. *Microb Ecol* 19, 269-278
- Moriarty, D. J. W. (1986): Measurement of bacterial growth rates in aquatic systems from rates of nucleic acid synthesis. *Adv. Microb. Ecol.* 9, 245-291
- Morita, R. Y. (1988): Bioavailability of energy and its relationship to growth and starvation survival in nature. *Can. J. Microbiol.* 34, 436-441
- Morita, R. Y. (1982): Starvation-survival of heterotrophs in the marine environment. *Advances in Microbial Ecology* 6, 171-197
- Morita, R. Y. : In: Hobbie, J., Williams, P. J. L.: *heterotrophic Activity in the Sea*. Plenum, New York 1984, 83-100
- Müller, B. (1993): MacuQL. V1.1. Programm für MacIntosh. EAWAG. Kastanienbaum, Schweiz
- Munn, C. B. : Production and properties of a haemolytic toxin by *Vibrio anguillarum*. In: Ahne, W.: *Fish Diseases*. Third COPRAQ-Session. Springer, Berlin 1980, 69-74
- Nauer, H. : Atomabsorptionsspektrometrie. In: Nauer, H., Heller, W.: *Untersuchungsmethoden in der Chemie - Einführung in die moderne Analytik*. Thieme-Verlag, Stuttgart 1990, 222-235

- Neu, T. R. (1992): Microbial "footprints" and the general ability of microorganisms to label interfaces. *Can. J. Microbiol.* 38, 1005-1008
- Neu, T. R. & Marshall, K. C. (1990): Bacterial Polymers: Physicochemical aspects of their interactions at interfaces. *Biomat. Appl.* 5
- Neu, T. R. & Marshall, K. C. (1991): Microbial "Footprints" - A new approach to adhesive polymers. *Biofouling* 3, 101-112
- Neu, T. R. & Poralla, K. (1988): An amphiphilic polysaccharide from an adhesive *Rhodococcus* Strain. *FEMS Microbiol. Lett.* 49, 389-392
- Nieboer, E. & Richardson, D. H. S. (1980): The replacement of the nondescript term 'heavy metals' by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ. Poll. Ser.* 1, 3-26
- Novitsky, J. A. & Morita, R. Y. (1976): Morphological characterization of small cells resulting from nutrient starvation of a psychrophilic marine vibrio. *Appl. Environ. Microbiol.* 32, 617-622
- Nyström, T. (1989): Macromolecular synthesis and turnover during adaptation to energy and nutrient starvation by a marine *Vibrio* sp. Dissertation. University of Göteborg.
- Nyström, T., Flärdh, K. & Kjelleberg, S. (1990): Responses to multiple-nutrient starvation in marine *Vibrio* sp. strain CCUG 15956. *J. Bacteriol.* 172, 7085-7097
- Nyström, T. & Kjelleberg, S. (1987): The effect of cadmium on starved heterotrophic bacteria isolated from marine waters. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45, 143-151
- Oliver, J. D. & Stringer, W. F. (1984): Lipid composition of a psychrophilic marine *Vibrio* sp. during starvation-induced morphogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 461-466
- Östling, J., Goodman, A. & Kjelleberg, S. (1991): Behaviour of IncP-1 plasmids and a miniMu transposon in a marine *Vibrio* sp.: isolation of starvation inducible lac operon fusions. *FEMS Microbiol. Ecol.* 86, 83-94
- Pakulski, J. D. & Benner, R. (1994): Abundance and distribution of carbohydrates in the ocean. *Limnol. Oceanogr.* 39, 930-940
- Pearson, R. G. (1968): Hard and soft acids and bases, HSAB, Part 1. *J. Chem. Educ.* 45, 581
- Platt, R. M., Geesey, G. G., Davis, J. D. & White, D. C. (1985): Isolation and partial chemical analysis of firmly bound exopolysaccharide from adherent cells of a freshwater sediment bacterium. *Can. J. Microbiol.* 31, 675-680
- Poindexter, J. S. (1981): Oligotrophy. Fast and famine existence. In: Alexander, M.: *Advances in microbial ecology.* 63-89
- Reichardt, W. T. (1986): Enzymatic potential for decomposition of detrital biopolymers in sediments from Kiel Bay. *Ophelia* 26, 369-384

- Reichardt, W. T. & Morita, R. Y. (1982): Survival stages of a psychrotrophic *Cytophaga johnsonae* strain. *Can. J. Microbiol.* 28, 841-850
- Rendleman, J. A. (1978): Metal-polysaccharide complexes - part I. *Fd. Chem.* 3, 47-79
- Rendleman, J. A. (1978): Metal-polysaccharide complexes - part II. *Fd. Chem.* 3, 127-162
- Revsbech, N. P., Madsen, B. & Jørgensen, B. B. (1986): Oxygen production and consumption in sediments determined at high spatial resolution by computer simulation of oxygen microelectrode data. *Limnol. Oceanogr.* 31, 293-304
- Riebesell, U. (1992): The formation of large marine snow and its sustained residence in surface waters. *Limnol. Oceanogr.* 37, 63-76
- Rødsæther, M. C., Olafsen, J., Rae, J., Myhre, K. & Steen, J. B. (1977): Copper as an initiating factor of vibriosis (*Vibrio anguillarum*) in eel (*Anguilla anguilla*). *Journal of Fish Biology* 10, 17-21
- Rosenberg, M., Gutnick, D. & Rosenberg, E. (1980): Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters* 9, 29-33
- Rosenberg, M. & Kjelleberg, S. (1986): Hydrophobic interactions: Role in bacterial adhesion. *Adv. Microbial Ecology* 9, 353-393
- Ross, N. W., Levitan, R., Labelle, J. & Schneider, H. (1991): Protein and other compositional differences of the extracellular material from slimy and non-slimy colonies of non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 81, 257-260
- Rudd, T., Sterritt, R. M. & Lester, J. N. (1984): Formation and conditional stability constants of complexes formed between heavy metals and bacterial extracellular polymers. *Water Res.* 18, 379-384
- Rutter, P. R. & Vincent, B.: Physicochemical interactions of the substratum, microorganisms, and the fluid phase. In: Marshall, K. C.: *Microbial Adhesion and Aggregation*. Springer-Verlag, Berlin 1984, 21-38
- Sammons, D. W., Adams, L. D. & Nishizawa, E. E. (1981): Electrophoresis 2, 135
- Santos, Y., Bandin, I., Nieto, T. P., Bruno, D. W., Ellis, A. E. & Toranzo, A. E. : Comparison of the cell surface hydrophobicity of bacterial fish pathogens by different procedures. In: Perkins, F. O., Cheng, T. C.: *Pathology in marine science*. Academic Press, San Diego, CA, USA 1990, 101-115
- Schreiber, D. R., Gordon, A. S. & Millero, F. J. (1984): The toxicity of copper to the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. *Can. J. Microbiol.* 31, 83-87
- Schreiber, D. R., Millero, F. J. & Gordon, A. S. (1990): Production of an extracellular copper-binding compound by the heterotrophic marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. *Mar. Chem.* 28, 275-284

- Silver, S., Misra, T. K. & Laddaga, R. A. : Bacterial resistance to toxic heavy metals. In: Beveridge, T. J. , Doyle, R. J.: Metal ions and bacteria. John Wiley & Sons, New York 1989
- Simidu, U., Taga, N., Colwell, R. R. & Schwarts, J. R. (1980): Heterotrophic bacterial flora of the seawater from the Nansei Shoto (Ryukyo Retto) area. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. Nissuishi. 46, 505-510
- Smith, R. M. & Martell, A. E.: Critical Stability Constants. Plenum Press, New York 1976
- Smith, J. J., Quintero, E. J. & Geesey, G. G. (1990): A sensitive chromatographic method for the detection of pyruvyl groups in microbial polymers from sediments. Microb Ecol 19, 137-147
- Spira, W. M. : Tactics for detecting pathogenic vibrios in the environment. In: Colwell, R. R.: Vibrios in the environment. John Wiley & Sons, New York 1984, 251-267
- Stotzky, G. & Rem, L. T. (1966): Influence of clay minerals on microorganisms. III. Effect of particle size cation exchange capacity and surface area on bacteria. Can. J. Microbiol. 12, 1235-1246
- Stucki, G. & Alexander, M. (1987): Role of dissolution rate and solubility in biodegradation of aromatic compounds. Appl. Environ. Microbiol. 53, 292-297
- Sutcliffe, J., Blumenthal, R., Walter, A. & Foulds, J. (1983): *Escherichia coli* outer membrane protein K is a porin. J. Bacteriol. 156, 867-872
- Sutherland, I. W. : Microbial Exopolysaccharide Synthesis. In: Sanford, P. A., Laskin, A.: Extracellular Microbial Polysaccharides. Am. Chem. Soc., Washington, DC 1977, 40-57
- Sutherland, I. W. : Biosynthesis of extracellular polysaccharides (exopolysaccharides). In: Industrial Gums. Academic Press 1993, 69-85
- Sutherland, I. W. & Wilkinson, J. F. (1971): Chemical extraction of microbial cells. Methods in Microbiology 5 B, 359-371
- Switzer, R. C., Merrill, C. R. & Shifrin, S. (1979): Anal. Biochem. 98, 231
- Thurman, E. M. : Organic geochemistry of natural waters. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, Netherlands 1986
- Toranzo, A. E., Barja, J. L., Colwell, R. R., Hetrick, F. M. & Crosa, J. H. (1983): Haemagglutinating, haemolytic and cytotoxic activities of *Vibrio anguillarum* and related vibrios isolated from striped bass on the Atlantic Coast. FEMS Microbiology Letters 18, 257-262
- Torella, G. & Morita, R. Y. (1981): Microcultural study of bacterial size changes and microcolony and ultramicrocolony formation by heterotrophic bacteria in seawater. Appl. Environ. Microbiol. 41, 518-527
- Vaccaro, R. F., Hicks, S. E., Jannasch, H. W. & Carey, F. G. (1968): The occurrence and role of glucose in seawater. Limnol. Oceanogr. 13, 356-363

- VanLoosdrecht, M. C. M., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G. & Zehnder, A. J. B. (1987): Electrophoretic Mobility and Hydrophobicity as a Measure to Predict the Initial Steps of Bacterial Adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1898-1901
- VanLoosdrecht, M. C. M., Lyklema, J., Norde, W. & Zehnder, A. J. B. (1990): Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol. Rev.* 54, 75-87
- VanLoosdrecht, M. C. M., Norde, W., Lyklema, J. & Zehnder, A. J. B. v. (1990): Hydrophobic and electrostatic parameters in bacterial adhesion. *Aquatic Sciences* 52,
- Wachenheim, D. E. & Patterson, J. A. (1992): Anaerobic production of extracellular polysaccharide by *Butyrivibrio fibrisolvens* nyx. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 385-391
- Wahl, M. (1989): Marine epibiosis. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 58, 175-189
- Webster, E. A. & Gadd, G. M. (1992): Cadmium as an uncoupler of respiration in *Ulva lactuca*. *Environmental Toxicology and Water Quality* 7, 189-200
- Weiner, R. M., Colwell, R. R., Jarman, R. N., Stein, D. C., Somerville, C. C. & Bonar, D. B. (1985): Applications of biotechnology to the production, recovery and use of marine polysaccharides. *Biotechnology* 3, 899-902
- West, P. A. & Colwell, R. R.: Identification and classification of vibronaceae - an overview. In: Colwell, R. R.: *Vibrios in the environment*. John Wiley & Sons, New York 1984, 286-361
- Westall, J. : Chemical equilibrium including adsorption on charged surfaces. In: Kavanaugh, M. C. , Leckie, J. O.: *Particulates in Water*. American Chemistry Society, Washington, D. C. 1980, 33-44
- Whitfield, C. (1988): Bacterial extracellular polysaccharides. *Can. J. Microbiol.* 34, 415-420
- Widdel, F. (1980): Anaerober Abbau von Fettsäuren and Benzoesäure durch neu isolierte Arten Sulfat-reduzierender Bakterien. Dissertation. Universität Göttingen.
- Zibilske, L. M. & Wagner, G. H. (1982): Bacterial growth and fungal genera distribution in soil amended with sewage sludge containing cadmium, chromium, and copper. *Soil Sci.* 134, 364-370
- Zimmermann, R. & Meyer-Reil, L.-A. (1974): A new method for fluorescence staining of bacterial populations of membrane filters. *Kieler Meeresforschungen* 30, 24-27

# Anhang

## Verzeichnis:

### *Anhang 1: Rezepturen verwendeter Medien*

**Rezeptur des Marinen Minimal Mediums ("3M") pro Liter**  
nach (Östling, et al. 1991)

**Rezeptur des Modifizierten Morita Salz Medium (MMS)**  
nach (Novitsky und Morita 1978)

**TCBS-Agar**

**Luria-Bertani-Medium 15 (LB 15)**

**Die Ionen-Konzentrationen in Metallsalzlösungen:**

### *Anhang 2: Rezepturen für die Gelelektrophorese:*

### *Anhang 3: Arbeitsblätter zur Berechnung der Metallspeziationen mit dem MacμQL-Programm (Müller 1993)*

### *Literaturhinweise im Anhang*

Laemmli, U. K. (1970): Nature **277**, 680

Müller, B. (1993): MacμQL. V1.1. EAWAG

Novitsky, J. A. & Morita, R. Y. (1978): Possible strategy for the survival of marine bacteria under starvation conditions. Mar. Biol. **48**, 289-295

Östling, J., Goodman, A. & Kjelleberg, S. (1991): Behaviour of IncP-1 plasmids and a miniMu transposon in a marine Vibrio sp.: isolation of starvation inducible lac operon fusions. FEMS Microbiol. Ecol. **86**, 83-94

## Anhang 1: Rezepturen verwendeter Medien

### Rezeptur des Marinen Minimal Mediums ("3M") pro Liter nach (Östling, et al. 1991)

<b>S</b>	920 ml	NSS <sup>a</sup> (1,1 konzentriert)
<b>M</b>	40 ml	1 M MOPS <sup>*</sup> (pH 8,2)
<b>F</b>	10 ml	0,4 M Tricine und 1 mM FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O <sup>*</sup> (pH 7,8)
<b>P</b>	10 ml	132 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> <sup>a</sup>
<b>N</b>	10 ml	952 mM NH <sub>4</sub> Cl <sup>a</sup> (pH 7,8)
<b>G</b>	10 ml	Glukose-Lösung <sup>*</sup> (100 g/l)

Sterilisierung der Lösungen:     <sup>a</sup> autoklavieren  
  <sup>\*</sup> steril filtrieren

Damit ergeben sich für das Medium folgende Konzentrationen:

MOPS	40.0 mM
Tricine	4.0 mM
FeSO <sub>4</sub>	0.01 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.32 mM
NH <sub>4</sub> Cl	9.52 mM
Glukose	1 mM

Der pH liegt bei 7.8.

Zusammensetzung der NSS ("Nine salt solution", 1.1 <sup>\*</sup> konzentriert):

	in g/920 ml	
	Milli-Q	in mmol/l
NaCl	10.0 <sup>2</sup>	172
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.47	10.3
NaHCO <sub>3</sub>	0.08	0.95
KCl	0.25	3.35
KBr	0.04	0.34
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1.87	9.20
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0.41	2.79
SrCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0.008	0.03
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.008	0.13

---

<sup>1</sup>Kennzeichnung der Lösung

<sup>2</sup>Die ursprünglich für Marine Bakterien vorgesehene Rezeptur enthält hier 17,6 g NaCl. Der Salzgehalt wurde für den aus dem Brackwasser isolierten Stamm reduziert.

## Rezeptur des Modifizierten Morita Salz Medium (MMS)

nach (Novitsky and Morita 1978)

Zusammensetzung der MMS:

	in g/1000 ml Milli-Q	in mmol/l
NaCl	13	224
MgCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	5.6	58.0
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	7.6	30.8
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	1.54	10.48
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1	0.70
FeSO <sub>4</sub>	0.005	0.033
KCl	0.8	10.7

Der pH liegt bei 7.5

## TCBS-Agar

("Thiosulfate Citrate Bile Salts Agar" als Fertig-Nährboden von MERCK)

Zusammensetzung in g/l:

Pepton aus Casein	5.0
Pepton aus Fleisch	5.0
Hefeextrakt	5.0
Natriumcitrat	10.0
Natriumthiosulfat	10.0
Ochsengalle. getrockn.	5.0
Natriumchofat	3.0
Saccharose	20.0
NaCl	10.0
Eisen(III)citrat	1.0
Thymolblau	0.04
Bromthymolblau	0.04
Agar-Agar	14.0
Ansatz: 88 g/l	
pH: 8.8 +/- 0.1	

Der Nährboden darf nicht autoklaviert werden.

Für Brackwasserbakterien wurde es mit 5 g/l aufgesalzen.

## **Luria-Bertani-Medium 15 (LB 15)**

10 g Trypton

15 g NaCl

5 g Hefe-Extrakt

4 ml 1M NaOH

pH: 7.7

### **Die Ionen-Konzentrationen in Metallsalzlösungen:**

<b>Metall</b>	<b>Verbindung</b>	<b>Salzkonz.</b>	<b>Ionenanteil</b>	<b>Ionenkonz.</b>
<b>Kadmium</b>	3 CdSO <sub>4</sub> ·8 H <sub>2</sub> O (MG: 769.5 g/mol)	5 µg/l	2.19 ppb	0.0195 µM
		5 mg/l	2.19 ppm	19.5 µM
<b>Kupfer</b>	CuSO <sub>4</sub> (MG: 159.6 g/mol)	5 µg/l	1.98 ppb	0.031 µM
		5 mg/l	1.98 ppm	31.3 µM
<b>Kobalt</b>	CoCl <sub>2</sub> (MG: 237.93 g/mol)	5 µg/l	1.238 ppb	0.021 µM
		5 mg/l	1.238 ppm	21.02 µM

## **Anhang 2: Rezepturen für die Gelelektrophorese:**

### **Ansätze und Lösungen: für das diskontinuierliche Puffer-System. basierend auf der Methode von Laemmli (Laemmli 1970).**

Zusammensetzung der Puffer:

Stacking Gel-Puffer Stock-Lösung:	0.5 M Tris-HCl (6.8)
Trennende Gel-Puffer Stock-Lösung:	3.0 M Tris-HCl (pH 8.8)
Reservoir Puffer Stock-Lösung:	0.25 Tris; 1.92 M Glycine; 1% SDS (pH 8.3); 1 : 10 verdünnen

Zusammensetzung des Probenpuffers:	2 % SDS
	5 % 2-Mercaptoethanol
	0.002 % Bromophenol-Blau
	8 M Harnstoff
	in 0.0625 M Tris-HCl (pH 6.8)

Zusammensetzung des 5-20%igen Gradientengels:

5%ige Acrylamid-Mischung (30:0.8)	5 ml Acrylamid-Bisacrylamid
	3.75 ml trennender Gel-Puffer
	0.3 ml 10% ige SDS-Lsg.
	0.7ml 1.5% ige Ammonium-Persulfat-Lsg
	20.25 ml Milli-Q

20%ige Acrylamid-Mischung (30:0.8)	20 ml Acrylamid-Bisacrylamid
	3.75 ml trennender Gel-Puffer
	0.3 ml 10% ige SDS-Lsg.
	0.7ml 1.5% ige Ammonium-Persulfat-Lsg
	4.5 g Saccarose
	2.75 ml Milli-Q

Zu beiden Lösungen wird direkt vor Gießen des Gels je 10 µl TEMED zugegeben. um die Polymerisation zu initiieren.

Stacking gel:	2.5 ml Acrylamid-Bisacrylamid
	5 ml "stacking" Gel-Puffer
	0.2 ml 10% ige SDS-Lsg.
	1 ml 1.5% ige Ammonium-Persulfat-Lsg
	11.3 ml Milli-Q

Zum Stacking gel werden 15 µl TEMED zugegeben als Polymerisations-Initiator.

Sämtliche Gele wurden vor dem Gießen mit Unterdruck 1 min lang entgast.



Arbeitsblatt zur Berechnung der Kadmium-Speziationen mit dem MacqQL -Programm (Müller 1993).

Als Medium wurde das Marine Minimal Medium nach Neidhardt et al. (1974) verwendet.

Es bestand ein CO<sub>2</sub>-Austausch mit der überstehenden Gasphase.

	Na+	K+	Mg2+	Ca2+	Cd2+	Cl-	SO4-2	CO3-2	Br-	BO3-3	PO4-3	CO2	H+	
	total	free	free											
Mg+2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mg(OH)+	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-11.42
Mg(OH)4+4	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-39.7
Ca+2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ca(OH)+	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-12.7
Cd2+	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cd(OH)+	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-10.1
Cd(OH)2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-20.3
Cd(OH)3-	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-31.7
Cd(OH)4-2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-44
Cd2(OH)+3	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	-8.92
Cd4(OH)4+2	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	-31.1
Cd(II)Cl+	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1.35
CdCl2	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1.9
CdCl3-	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	1.5
Cd Cl4-2	0	0	0	0	1	4	0	0	0	0	0	0	0	1.7
Cl-	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
CdBr+	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1.55
CdBr2	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	3
CdBr3-	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0	0	3
CdBr4-2	0	0	0	0	1	0	0	0	4	0	0	0	0	2.9
Br-	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
H2SO4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1.32
MgSO4	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2.23
CaSO4	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2.31
CdSO4	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1.08
Cd(SO4)2-2	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	2
Cd(SO4)3-4	0	0	0	0	1	0	3	0	0	0	0	0	0	2.7
Cd(SO4)4	0	0	0	0	1	0	4	0	0	0	0	0	0	2.3
SO4-2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
HBO3-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	8.97
B3O3(OH)4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	2	19.62
B3O3(OH)5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	1	10.4
B4O5(OH)4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	2	20.4
B5O6(OH)4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	5	38.1
BO3-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
HCO3- (atm)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	-7.8
H2CO3 (atm)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	-1.5
CO3-2 (atm)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-2	-18.02
CO3-2 (lsg)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
HCO3- (lsg)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	10
H2CO3 (lsg)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	16.62
MgCO3	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2.37
Mg(HCO3)	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0.77
CaCO3	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3
CaHCO3	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	3.81
CdCO3	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	4.35
Na+	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NaHPO4-	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	12.34
K+	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KHPO4-	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	12.32
MgPO4-	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3.4

Arbeitsblatt zur Berechnung der Kadmium-Speziationen mit dem MacμQL -Programm (Müller 1993).

Als Medium wurde das Marine Minimal Medium nach Neidhardt et al. (1974) verwendet.

Es bestand ein CO<sub>2</sub>-Austausch mit der überstehenden Gasphase.

MgHPO <sub>4</sub>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	13.54
MgH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	20.11
CaPO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	6.46
CaHPO <sub>4</sub>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	13.04
CaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	19.61
CdPO <sub>4</sub>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3.9
PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
H <sup>+</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	0.192	0.006	0.009	0.003	1.95E-05	0.208	0.01	9.50E-04	3.00E-04	1.30E-04	1.32E-01	3.50E-04	1.58E-08		

Arbeitsblatt zur Berechnung der Kobalt-Speziationen mit dem MacqQL -Programm (Müller 1993).

Als Medium wurde das Marine Minimal Medium nach Neidhardt et al. (1974) verwendet.

Es bestand ein CO<sub>2</sub>-Austausch mit der überstehenden Gasphase.

	Na+	K+	Mg2+	Ca2+	Co2+	Cl-	SO4-2	CO3-2	Br-	B03-3	PO4-3	CO2	H+		
	total	total	total	total	total	total	total	total	total	total	total	free	free		
Mg+2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mg(OH)+	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	-11.42
Mg(OH)4+4	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-4	-39.7
Ca+2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ca(OH)+	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	-12.7
Co2+	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Co(OH)+	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	-9.8
Co(OH)2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	-2	-19.5
Co(OH)3-	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	-3	-32.3
Co(OH)4-2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	-4	-66.2
Co2(OH)+3	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	-1	-9.3
Co4(OH)4+2	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	-4	-28.5
Cl-	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Br-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
H2SO4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1.32
MgSO4	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2.23
CaSO4	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2.31
CoSO4	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2.36
SO4-2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
HBO3-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	8.97
B3O3(OH)4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	2	19.62
B3O3(OH)5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	1	10.4
B4O5(OH)4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	2	20.4
B5O6(OH)4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	5	38.1
B03-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
HCO3- (atm)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	-7.8
H2CO3 (atm)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	-1.5
CO3-2 (atm)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-2	-18.02
CO3-2 (lsg)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
HCO3-(lsg)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	10
H2CO2(lsg)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	16.62
MgCO3	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2.37
Mg(HCO3)	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0.77
CaCO3	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3
CaHCO3	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	3.81
CoCO3	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	4.91
Na+	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NaHPO4-	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	12.34
K+	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KHPO4-	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	12.32
MgPO4-	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3.4
MgHPO4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	13.54
MgH2PO4+	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	20.11
CaPO4-	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	6.46
CaHPO4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	13.04
CaH2PO4+	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	19.61
CoHPO4	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	13.92
PO4-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
H+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	1.92	0.0063	0.005	0.003	2.10E-05	0.206	0.01	9.50E-04	0.000	1.30E-04	1.32E-01	3.50E-04	1.58E-08		

Arbeitsblatt zur Berechnung der Kupfer-Speziationen mit dem MacuQL-Programm (Müller 1993).  
 Als Medium wurde das "Marine Minimal Medium" nach Neidhardt et al. (1974) verwendet. Es bestand kein CO<sub>2</sub>-Austausch.

	Na+	K+	Mg2+	Ca2+	Cu2+	Cl-	SO4-2	CO3-2	Br-	BO3-3	PO4-3	H+		
	total	total	total	total	total	total	total	total	total	total	total	free		
Mg+2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mg(OH)+	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	-11.42
Mg(OH)4+4	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-4	-39.7
Ca+2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ca(OH)+	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	-12.7
Cu2+	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cu(OH)+	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	-1	-7.7
Cu(OH)2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	-2	-15.2
Cu(OH)3-	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	-3	-27.5
Cu(OH)4-2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	-4	-39.6
Cu2(OH)2+2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	-2	-10.3
Cu(II)Cl+	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0.4
Cl-	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
CuBr2	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	-0.07
Br-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
H2SO4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1.92
MgSO4	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2.23
CaSO4	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2.31
CuSO4	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2.36
BO4-2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
HBO3-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	8.97
B3O3(OH)4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	2	19.62
B3O3(OH)5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	1	10.4
B4O5(OH)4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	2	20.9
B5O8(OH)4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	5	38.1
BO3-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
HCO3-	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1.0
H2CO3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	6.18
CO3-2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
MgCO3	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2.37
Mg(HCO3)	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0.77
CaCO3	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3
CaHCO3	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	3.81
CuCO3	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	6.75
Cu(CO3)2-2	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	9.92
Na+	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NaHPO4-	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	12.34
K+	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KHPO4-	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	12.32
MgPO4-	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3.4
MgHPO4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	13.54
MgH2PO4+	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	20.11
CaPO4-	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	6.46
CaHPO4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	13.04
CaH2PO4+	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2	19.61
CuHPO4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	14.95
CuH2PO4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2	19.61
PO4-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
H+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	0.192	0.00633	0.009	0.003	3.10E-05	0.208	0.01	9.50E-04	0.0003	1.30E-04	1.32E-01	1.58E-08		

Arbeitsblatt zur Berechnung der Kadmium-Speziationen mit dem MacμQL -Programm (Müller 1993).

Als Medium wurde das Marine Minimal Medium nach Neidhardt et al. (1974) verwendet. Es bestand kein CO<sub>2</sub>-Austausch.

	Na+	K+	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Cl-	SO <sub>4</sub> -2	CO <sub>3</sub> -2	Br-	BO <sub>3</sub> -3	PO <sub>4</sub> -3	H+		
	total	total	total	total	total	total	total	total	total	total	total	free		
Mg <sup>2+</sup>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mg(OH) <sup>+</sup>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	-11.42	
Mg(OH) <sub>4</sub> +4	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	-4	-39.7	
Ca <sup>2+</sup>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Ca(OH) <sup>+</sup>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	-1	-12.7	
Cd <sup>2+</sup>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cd(OH) <sup>+</sup>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	-1	-10.1	
Cd(OH) <sub>2</sub>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	-2	-20.3	
Cd(OH) <sub>3</sub> -	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	-3	-31.7	
Cd(OH) <sub>4</sub> -2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	-4	-44	
Cd <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub> +3	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	-1	-8.92	
Cd <sub>4</sub> (OH) <sub>4</sub> +2	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	-4	-31.1	
Cd(II)Cl <sup>+</sup>	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1.35	
CdCl <sub>2</sub>	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	1.9	
CdCl <sub>3</sub> -	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	1.5	
Cd Cl <sub>4</sub> -2	0	0	0	0	1	4	0	0	0	0	0	0	1.7	
Cl-	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
CdBr <sup>+</sup>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1.55	
CdBr <sub>2</sub>	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	3	
CdBr <sub>3</sub> -	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0	3	
CdBr <sub>4</sub> -2	0	0	0	0	1	0	0	0	4	0	0	0	2.9	
Br-	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
HSO <sub>4</sub> -	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1.32	
MgSO <sub>4</sub>	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2.23	
CaSO <sub>4</sub>	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2.31	
CdSO <sub>4</sub>	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1.08	
Cd(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> -2	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	2	
Cd(SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> -4	0	0	0	0	1	0	3	0	0	0	0	0	2.7	
Cd(SO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> -6	0	0	0	0	1	0	4	0	0	0	0	0	2.3	
SO <sub>4</sub> -2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
HBO <sub>3</sub> -2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	8.97	
B <sub>3</sub> O <sub>3</sub> (OH) <sub>4</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	2	19.62	
B <sub>3</sub> O <sub>3</sub> (OH) <sub>5</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	1	10.4	
B <sub>4</sub> O <sub>5</sub> (OH) <sub>4</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	2	20.4	
B <sub>5</sub> O <sub>6</sub> (OH) <sub>4</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	5	38.1	
BO <sub>3</sub> -3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
HCO <sub>3</sub> -	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	10	
H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	6.16	
CO <sub>3</sub> -2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
MgCO <sub>3</sub>	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2.37	
Mg(HCO <sub>3</sub> )	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.77	
CaCO <sub>3</sub>	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	3	
CaHCO <sub>3</sub>	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	3.81	
CdCO <sub>3</sub>	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	4.35	
Na <sup>+</sup>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
NaHPO <sub>4</sub>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	12.34	
K <sup>+</sup>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
KHPO <sub>4</sub>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	12.32	
MgPO <sub>4</sub>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3.4	

Arbeitsblatt zur Berechnung der Kadmium-Speziationen mit dem MacμQL -Programm (Müller 1993).  
 Als Medium wurde das Marine Minimal Medium nach Neidhardt et al. (1974) verwendet. Es bestand kein CO<sub>2</sub>-Austausch.

MgHPO <sub>4</sub>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	13.54
MgH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2	20.11
CaPO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	6.48
CaHPO <sub>4</sub>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	13.04
CaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2	19.61
CdPO <sub>4</sub>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	3.9
PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
H <sup>+</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	0.192	0.00833	0.009	0.003	1.95E-05	0.208	0.01	9.50E-04	0.0003	1.30E-04	1.32E-01	1.58E-08	

Arbeitsblatt zur Berechnung der Kobalt-Speziationen mit dem MacuQL -Programm (Müller 1993).  
 Als Medium wurde das Marine Minimal Medium nach Neidhardt et al. (1974) verwendet. Es bestand kein CO<sub>2</sub>-Austausch.

	Na+	K+	Mg2+	Ca2+	Co2+	Cl-	SO4-2	CO3-2	Br-	BO3-3	PO4-3	H+		
	total	total	total	total	total	total	total	total	total	total	total	free		
Mg+2		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mg(OH)+		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	-1	-11.42	
Mg(OH)4+4		0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	-4	-39.7	
Ca+2		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
Ca(OH)+		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	-1	-12.7	
Co2+		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
Co(OH)+		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	-1	-9.8	
Co(OH)2		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	-2	-19.5	
Co(OH)3-		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	-3	-32.3	
Co(OH)4-2		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	-4	-66.2	
Co2(OH)+3		0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	-1	-9.3	
Co4(OH)4+2		0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	-4	-28.5	
Cl-		0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
Br-		0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
H2SO4		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1.32	
MgSO4		0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2.23	
CaSO4		0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	2.31	
CoSO4		0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2.36	
SO4-2		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
HBO3-2		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	8.97
B3O3(OH)4		0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	2	19.62
B3O3(OH)5		0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	1	10.4
B4O5(OH)4		0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	2	20.4
B5O6(OH)4		0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	5	38.1
BO3-3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
HCO3-		0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	10
H2CO3		0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	6.16
CO3-2		0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
MgCO3		0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2.37
Mg(HCO3)		0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.77
CaCO3		0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	3
CaHCO3		0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	3.81
CoCO3		0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	4.91
Na+		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
NaHPO4-		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	12.34
K+		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
KHPO4-		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	12.32
MgPO4-		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3.4
MgHPO4		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	13.54
MgH2PO4+		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2	20.11
CaPO4-		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	6.46
CaHPO4		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	13.04
CaH2PO4+		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2	19.61
CoHPO4		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	13.92
PO4-3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
H+		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
		1.92	0.00638	0.009	0.003	2.10E-05	0.203	0.01	9.50E-04	0.0003	1.30E-04	1.32E-01	1.58E-08	