

**Die Phyllosphäre als Lebensraum für Bakterien:  
Mechanismen der Interaktion epiphyller Bakterien  
mit der pflanzlichen Kutikula**

Dissertation  
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES (Dr. rer. nat.)

An der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von  
**Thomas Vitus Linnemann**  
aus  
Bonn

Bonn, 2020



angefertigt in der Arbeitsgruppe Ökophysiologie der Pflanzen  
am Institut für Zelluläre und Molekulare Botanik (IZMB)  
mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Lukas Schreiber  
2. Gutachter: PD Dr. František Baluška  
Tag der Promotion: 01.12.2020  
Erscheinungsjahr: 2020

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Die pflanzlichen Kutikula .....	2
1.2 Die Phyllosphäre .....	3
1.3 Bakterienarten in der Phyllosphäre .....	7
1.4 Produktion von Biotensiden in der Phyllosphäre .....	10
1.5 Die isolierte Kutikulamembran als Phyllosphärenmodell .....	11
1.6 Zielsetzung der Arbeit .....	12
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>15</b>
2.1 Isolierung von Kutikulamembranen .....	16
2.2 Pflanzenanzucht .....	16
2.3 Anzucht der Bakterienstämme und Herstellung von Bakteriensuspensionen .....	17
2.4 Oberflächenspannungs- und Kontaktwinkelmessungen der Bakteriensuspensionen .....	17
2.5 Chemisch-analytische Untersuchungen .....	18
2.5.1 Gaschromatographie und Massenspektrometrie .....	18
2.5.2 Überprüfung der Qualität und Instandhaltung der Kapillarsäule .....	20
2.5.3 Analyse von polaren Stoffen (Kohlenhydrate) .....	21
2.5.3.1. Einstufige und zweistufige Derivatisierungsmethode für Kohlenhydrate .....	21
2.5.3.2. Gaschromatographische Analyse von Kohlenhydraten auf Blättern der Bohne ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	21
2.5.4 Gaschromatographische Analyse von Paraffinwachsen mit unterschiedlichen Schmelzpunkten .....	23
2.6 Untersuchungen zum Metabolismus verschiedener C-Quellen .....	24
2.6.1 Radiochemische Untersuchungen .....	24

2.6.1.1.	Die Bedeutung von Biotensiden für den Metabolismus <sup>14</sup> C-markierter hydrophiler Substanzen, die durch die pflanzliche Kutikula diffundieren .....	24
2.6.1.2.	Abbau aliphatischer <sup>14</sup> C-markierter Wachsmomere durch <i>R. fascians</i> , <i>P. syringae</i> WT und db KO	27
2.6.1.3.	Abbau aliphatischer <sup>14</sup> C-markierter lipophiler Substanzen (Wachsmomere) durch <i>R. fascians</i> , <i>P. syringae</i> WT und db KO in Flüssigkultur.....	27
2.6.1.4.	Abbau aliphatischer <sup>14</sup> C-markierter lipophiler Substanzen (Wachsmomere) durch <i>R. fascians</i> , <i>P. syringae</i> WT und db KO auf isolierten Kutikulamembranen .....	28
2.6.2	Wachstum von <i>R. fascians</i> und <i>P. syringae</i> auf verschiedenen lipophilen Substraten (Paraffinwachse und Triglyceride).....	30
<b>2.7</b>	<b>Auswertung und graphische Darstellung der Daten .....</b>	<b>31</b>
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1</b>	<b>Oberflächenspannungs- und Kontaktwinkelmessungen der Bakteriensuspensionen .....</b>	<b>33</b>
<b>3.2</b>	<b>Chemisch-analytische Untersuchungen.....</b>	<b>34</b>
3.2.1	Chemisch-analytische Untersuchungen von Kohlenhydraten: Methodenentwicklung .....	34
3.2.2	Chemisch-analytische Untersuchungen von Kohlenhydraten auf der Kutikula von Bohnenblättern ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ).....	39
3.2.3	Chemisch-analytische Untersuchungen verschiedener Paraffinwachse .....	41
<b>3.3</b>	<b>Untersuchungen zum Metabolismus verschiedener C-Quellen.....</b>	<b>43</b>
3.3.1	Radiochemische Untersuchungen .....	43
3.3.1.1.	Einfluss von Biotensiden auf den Metabolismus potenzieller <sup>14</sup> C-markierter C-Quellen, die durch die Kutikula diffundieren.....	43
3.3.1.2.	Abbau aliphatischer <sup>14</sup> C-markierter lipophiler Substanzen (Wachsmomere) durch <i>R. fascians</i> , <i>P. syringae</i> WT und db KO in Flüssigkultur.....	53
3.3.1.3.	Abbau aliphatischer <sup>14</sup> C-markierter lipophiler Substanzen (Wachsmomere) durch <i>R. fascians</i> , <i>P. syringae</i> WT und db KO auf isolierten Kutikulamembranen .....	63
3.3.2	Wachstum von <i>R. fascians</i> , <i>P. syringae</i> WT und db KO auf verschiedenen lipophilen Substraten (Paraffinwachse und Triglyceride).....	66

<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>71</b>
<b>4.1 Gaschromatographische Analyse von Kohlenhydraten .....</b>	<b>72</b>
4.1.1 Chemisch-analytische Untersuchungen von Kohlenhydraten: Methodenentwicklung .....	73
4.1.2 Chemisch-analytische Untersuchungen von Kohlenhydraten auf der Kutikula von Bohnenblättern ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ).....	77
4.1.3 Zusammenfassung: Gaschromatographische Analyse von Kohlenhydraten.....	79
<b>4.2 Untersuchungen zum Metabolismus verschiedener C-Quellen.....</b>	<b>80</b>
4.2.1 Radiochemische Untersuchungen .....	80
4.2.1.1. Einfluss von Biotensiden auf den Metabolismus potenzieller <sup>14</sup> C-markierter C-Quellen, die durch die Kutikula diffundieren.....	80
4.2.1.2. Zusammenfassung: Einfluss von Biotensiden auf den Metabolismus potenzieller <sup>14</sup> C- markierter C-Quellen, die durch die Kutikula diffundieren.....	87
4.2.1.3. Wachskomponenten als potenzielle C-Quellen für <i>P. syringae</i> und <i>R. fascians</i> Bakterien.....	87
4.2.1.4. Abbau aliphatischer <sup>14</sup> C-markierter lipophiler Substanzen (Wachsmonomere) durch <i>R. fascians</i> , <i>P. syringae</i> WT und db KO in Flüssigkultur.....	88
4.2.1.5. Abbau aliphatischer <sup>14</sup> C-markierter lipophiler Substanzen (Wachsmonomere) durch <i>R. fascians</i> , <i>P. syringae</i> WT und db KO auf isolierten Kutikulamembranen .....	91
4.2.2 Wachstum von <i>R. fascians</i> , <i>P. syringae</i> WT und db KO auf verschiedenen lipophilen Substraten (Paraffinwaxse und Triglyceride) .....	92
4.2.3 Zusammenfassung: Wachskomponenten als potenzielle C-Quellen für <i>P. syringae</i> und <i>R. fascians</i>	96
<b>4.3 Zusammenfassung .....</b>	<b>97</b>
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>100</b>
<b>6. ANHANG .....</b>	<b>117</b>
<b>6.1 Chemikalienliste .....</b>	<b>118</b>
<b>6.2 Lösungen und Medien .....</b>	<b>122</b>
<b>6.3 Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>124</b>
<b>6.4 Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>125</b>

<b>6.5</b>	<b>Formelverzeichnis.....</b>	<b>129</b>
<b>6.6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>130</b>
<b>7.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>131</b>

# **1. Einleitung**

## 1.1 Die pflanzlichen Kutikula

Die pflanzliche Kutikula stellt nicht nur einen effektiven Schutz gegen das Eindringen von Mikroorganismen dar, sondern auch eine Anpassung an die Lebenswidrigkeiten, die das Leben auf dem Land im Gegensatz zum Meer darstellen. Vor 500 Millionen Jahren eroberten die Pflanzen das Land. Da das Wasserpotenzial der Atmosphäre stark negativ ist, entstand eine effektive Barriere, die dem drohenden Wasserverlust entgegenwirkt (Schreiber und Schönherr, 2009). Oberirdische Primärorgane der Pflanze, wie Blätter, Früchte und Spross, sind mit der Kutikula bedeckt. Diese Kutikula wird von den Epidermiszellen gebildet. Sie besteht aus dem Biopolyester Kutin und ein- und aufgelagerten Wachsen (Abbildung 1). Das Kutin verleiht der Kutikula die nötige Stabilität. Es besteht überwiegend aus C<sub>16</sub>- und C<sub>18</sub>- $\omega$ -Hydroxyfettsäuren, die über Esterbindungen miteinander verknüpft sind (Espelie *et al.*, 1980). Aromatische Komponenten können in sehr geringem Maße Teil des Polymers sein (Hunt und Baker, 1980).

Den eigentlichen Transpirationsschutz bilden die Wachse. Ohne die Wachse erhöht sich die Transpiration um den Faktor 300 bis 500 (Schönherr, 1976). Die Wachse bestehen aus aliphatischen und zyklischen Lipiden, deren Zusammensetzung je nach Pflanzenart variieren kann (Jetter *et al.*, 2008).

Die Kutikula, bestehend aus Kutin sowie epi- und intrakutikulären Wachsen, ist der Epidermis aufgelagert. Unter der Kutinmatrix finden sich als Ausläufer der Mittellamelle der Epidermiszellen pektinreiche Zellwanddomänen, die mit der Kutinmatrix assoziiert sind. Die Epidermiszellen bilden an ihrer Oberseite eine cellulosereiche Zellwand aus. Cellulosefibrillen reichen bis zur Kutinmatrix und sind mit ihr assoziiert (Abbildung 1). Die Kutikula kann je nach Pflanzenart eine Dicke von 30 nm (*Arabidopsis thaliana*) bis 30  $\mu$ m (*Malus domestica*, Frucht) aufweisen (Schreiber und Schönherr, 2009).

Die kontrollierte Wasser- und O<sub>2</sub>-Abgabe sowie CO<sub>2</sub>-Aufnahme erfolgt über die Stomata. Über die Kutikula diffundieren zu einem geringen Maße unkontrolliert Wasser und Solute nach außen. Von außen können Xenobiotika auf die Kutikula gelangen und durch diese nach innen diffundieren (Schönherr, 2002). Tenside können die kutikuläre Transpiration um den Faktor 2 bis 16 erhöhen (Gutenberger *et al.*, 2013). Solute diffundieren auf zwei unterschiedlichen Wegen durch die pflanzliche Kutikula; den polaren und den apolaren Weg. Lipophile und kleine ungeladene Moleküle, wie Wasser, diffundieren über den apolaren Weg durch die amorphe Phase des Wachses (Schreiber und Riederer, 1996; Baur *et al.*, 1997).

Polare Moleküle, wie Zucker und organische Säuren, aber auch Wasser diffundieren über polare Poren durch die Kutikula (Schönherr und Luber, 2001; Schönherr, 2002). Polare Poren werden vermutlich durch polare funktionelle Hydroxyl- und Carboxylgruppen der Wachsmomere gebildet (Chamel *et al.*, 1991). Durch deren Hydratisierung wird die Öffnungsweite der Poren erweitert, sodass das Durchdringen von zum Teil sehr großen Molekülen (z.B. Fructose) möglich ist (Remus-Emsermann *et al.*, 2011). Je höher die Luftfeuchtigkeit ist, desto mehr polare Poren entstehen und desto höher ist die Diffusion von polaren Substanzen durch die pflanzliche Kutikula (Schönherr und Luber 2001). Der Radius einer polaren Pore reicht von 0,45 bis 1,18 nm (Schönherr, 2006).

Eine weitere wichtige Funktion der Kutikula ist die Abwehr gegen pathogene Bakterien, Pilze (Jenks *et al.*, 1994) und Herbivore. Die Kutikula selbst ist eine physische Barriere. Phenolische Substanzen können zum anderen antimikrobiell wirken oder als Signalmoleküle dienen (Steinkellner *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009). Gegen Herbivore sind Bitterstoffe aus der Klasse der Alkaloide wirksam (Lemieux, 1996). Terrestrische Pflanzen sind der UV-Strahlung stärker ausgesetzt als aquatische. Phenolische Pigmente in der Kutikula absorbieren einen Großteil der schädlichen UV-Strahlung und schützen diese vor der schädigenden Wirkung auf Proteine und DNA (Krauss *et al.*, 1997).

## 1.2 Die Phyllosphäre

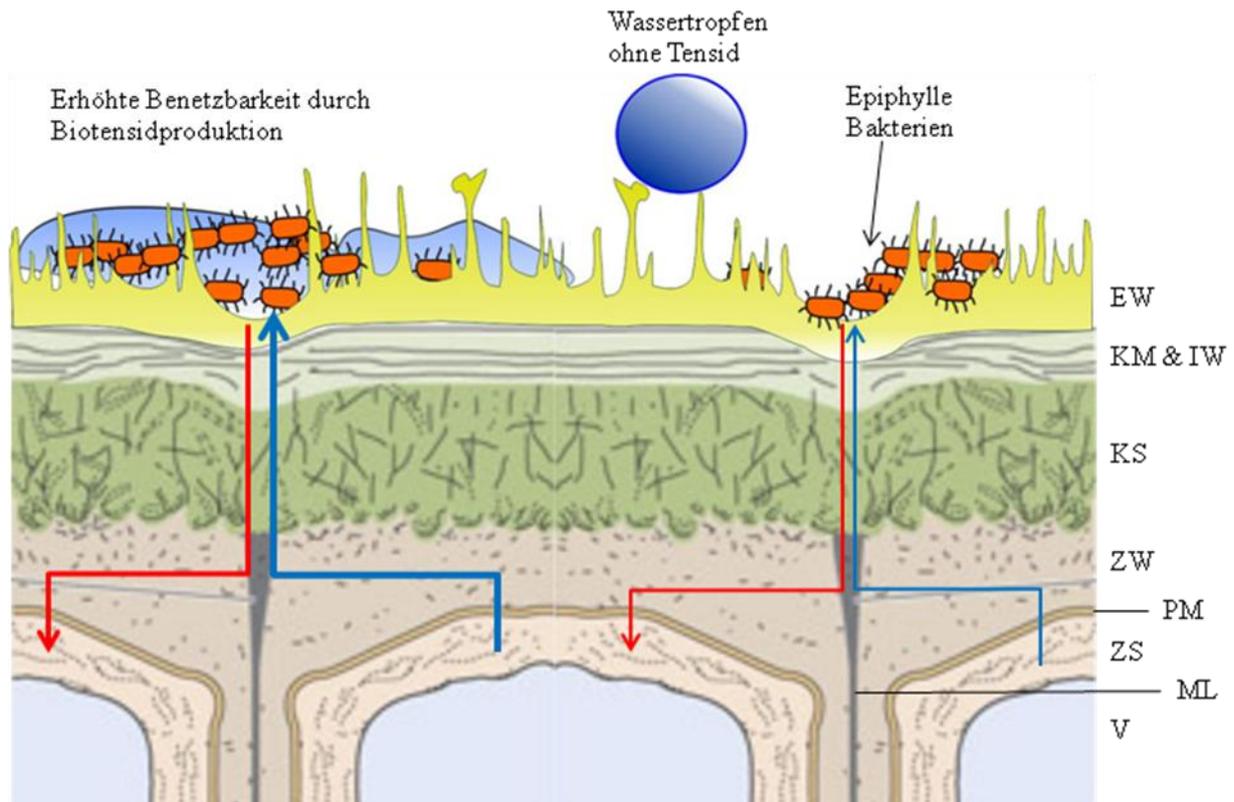
Bakterien sind die ältesten Lebewesen der Erde und besiedeln fast jeden Lebensraum. Sie sind zum Beispiel in aquatischen Sedimenten, im Ozean, im Boden und in der Atmosphäre zu finden. Mit dem Fortschreiten der Evolution bildeten sich neue Lebensräume, die mit anderen Lebewesen assoziiert sind, wie zum Beispiel der Intestinaltrakt von Tieren oder unterirdische (Wurzel) und oberirdische Organe von Pflanzen (Blätter, Stamm), Rhizosphäre und Phyllosphäre genannt (Ruinen, 1961).

Die Rhizosphäre ist im Vergleich zur Phyllosphäre ein bis zwei Größenordnungen dichter besiedelt (Liljeroth und Bååth, 1988; Duineveld und Van Veen, 1999; Jaeger *et al.*, 1999). Die Rhizosphäre bildet einen stabilen Lebensraum, da die Lebensspanne einer Wurzel länger ist als die eines Blattes (Vorholt, 2012). Sehr deutlich zeigt sich die positive Interaktion von Rhizosphäre und Mikroorganismen bei den Symbiosen mit der Mykorrhiza und den Knöllchenbakterien. Bei der Mykorrhiza handelt es sich um eine Symbiose zwischen Pflanze und Pilz. Die Pflanze versorgt den Pilz mit Assimilaten aus der Photosynthese und der Pilz

versorgt die Pflanze mit Mineralien (Bonfante und Anca, 2009). Knöllchenbakterien sind Bakterien der Familie Rhizobiaceae und *Frankia*, ein Actinomycet, (Gage, 2004). Sie können atmosphärischen Stickstoff in für die Pflanze verwertbare Stickstoffverbindungen umwandeln und werden im Gegenzug mit Nährstoffen versorgt.

Während die Rhizosphäre ein lebensfreundliches Habitat für Mikroorganismen bildet stellt die Phyllosphäre ein lebensfeindliches Habitat für sie dar. Durch die exponierte Lage der Blätter und primären Sprosse sind Mikroorganismen in der Phyllosphäre stark wechselnder Temperatur, Feuchtigkeit und UV-Strahlung ausgesetzt (Lindow und Brandl, 2003). Das Sonnenlicht kann Temperaturunterschiede von 50 °C auf ein und demselben Blatt bewirken. Starke Wetterschwankungen können von einer sehr feuchten Umgebung zu einer trockenen innerhalb eines Tages wechseln.

Da die pflanzliche Kutikula Wachse auf- und eingelagert hat, ist sie sehr hydrophob, sodass Wassertropfen leicht abrollen und die Kutikula trocken bleibt. Diese Eigenschaft bewirkt einen Selbstreinigungseffekt der Kutikula, den Lotus-Effekt (Barthlott und Neinhuis 1997), sodass Schadstoffe und auch Mikroorganismen weggewaschen werden. Das Verbleiben von Mikroorganismen auf der Kutikula ist also erschwert und Mikroorganismen müssen Mechanismen der Anhaftung besitzen.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung pflanzlicher Kutikula als epiphyller Lebensraum (modifiziert nach Taiz *et al.* 2015); Durch Biotensidproduktion erreichen epiphyllische Bakterien eine erhöhte Benetzbarkeit der hydrophoben Kutikula; Organische Solute diffundieren aus den Pflanzenzellen in den Apoplasten und erreichen durch *Leaching* (blaue Pfeile) die Blattoberfläche; Im Gegenzug gelangen bakteriell produzierte Substanzen wie Phytohormone das Blattinnere (rote Pfeile); Das *Leaching* und die Diffusion bakterieller Substanzen sind an benetzten Stellen höher als an nicht benetzten Stellen, was durch die Stärke der Pfeile gezeigt wird; Wassertropfen ohne Tenside perlen an der Blattoberfläche auf Grund des Lotus-Effektes ab; Die pflanzliche Kutikula ist aufgebaut aus epikutikulären Wachsen (EW), der Kutikulamembran (KM) bestehend aus dem Kutinpolymer und intrakutikulären Wachsen (IW) und der Kutikularschicht (KS), in die vereinzelt Polysaccharidfasern reichen; Darunter befinden sich Epidermiszellen zwischen denen sich die pektinreiche Mittellamelle (ML) befindet; gezeigt sind zusätzlich Zellwand (ZW), Plasmamembran (PM), Zytosol (ZS) und Vakuole (V) der Epidermiszellen

Da die pflanzliche Kutikula unkontrollierten Wasser- und Metabolitenverlust verhindert, stellt sie einen nährstoffarmen Lebensraum dar. Dennoch diffundieren geringe Mengen an potenziellen Nährstoffen aus dem Inneren des Blattes an die Oberfläche (Abbildung 1). Dieser Vorgang wird „*Leaching*“ genannt (Tukey, 1970). Es kann auch zu externem Nahrungseintrag durch Blattläuse, die Honigtau ausscheiden, oder Pollenflug kommen (Warren, 1972; Fokkema *et al.*, 1983).

Die großen Schwankungen physikalischer Einflüsse und der erschwerte Zugang zu Nahrungsquellen in der Phyllosphäre führen zu einer hohen Fluktuation innerhalb der Mikroorganismenpopulationen und zu einer weniger diversen Gemeinschaft als in der

Rhizosphäre (Redford und Fierer, 2009; Bodenhausen et al., 2013). Trotz dieser unwirtlichen Umweltbedingungen leben  $10^6 - 10^7$  Bakterienzellen pro  $\text{cm}^2$  in der Phyllosphäre (Beattie und Lindow, 1995; Andrews und Harris, 2000; Hirano und Upper, 2000).

Bakterien haben im Laufe der Evolution Mechanismen entwickelt, um diesen unwirtlichen Lebensbedingungen entgegen zu wirken. Viele Bakterien produzieren Pigmente und besitzen Mechanismen, ihre DNA zu reparieren, um sich vor schädlichen UV-Strahlen zu schützen (Jacobs und Sundin, 2001; Gunasekera und Sundin, 2006).

Vorteilhaft für das Leben in der Phyllosphäre ist die Beweglichkeit durch Geißeln (Lindow *et al.*, 1993). Dadurch ist es Bakterien möglich lebensfreundlichere Areale auf dem Blatt zu erreichen (Haefele und Lindow, 1987; Wilson et al., 1999). Bevorzugte Bereiche des Blattes, die eine höhere Nährstoffverfügbarkeit aufweisen, sind die Basis von Trichomen, Stomata, epidermale Zellwandverbindungen und die Furchen der Blattadern (Miles et al., 1977; Bashan et al., 1981; Timmer et al., 1987; Mansvelt und Hattingh, 1989; Davis und Brlansky, 1991; Mariano und McCarter, 1993; Leveau und Lindow, 2001; Miller et al., 2001), da dort das *Leaching* besonders erhöht ist. Remus-Emsermann et al. (2011) konnten mit Hilfe eines *Erwinia herbicola* Stammes, der einen GFP-basierten Bioreporter für Fructose trug, zeigen, dass es an der Basis von Trichomen eine erhöhte Fructoseverfügbarkeit gibt.

Einmal an einer günstigen Stelle auf dem Blatt etabliert, bilden epiphytische Bakterien häufig Aggregate, die durch extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) zusammengehalten werden. EPS, häufig Polysaccharide, wirken hygroskopisch und schützen die Bakterienzellen dadurch vor Austrocknung (Monier und Lindow, 2003). Des Weiteren schützen diese Polysaccharide, wie zum Beispiel Alginat, vor reaktiven Sauerstoffspezies wie  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Beattie und Lindow, 1995; Costerton et al., 1995; Kiraly, El-Zahaby und Klement, 1997). *Pseudomonas syringae* produziert Alginat während Austrocknungsstress und Kontakt mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Singh et al., 1992; Keith und Bender, 1999). Dadurch wird die epiphytische Fitness von *P. syringae* erhöht (Yu et al., 1999). Die auf dem Blatt gebildeten Aggregate beherbergen Bakterien und Pilze verschiedener Arten (Morris et al., 1997, 1998).

Die epiphytische Bakteriengemeinschaft speist sich aus unterschiedlichen Quellen. Die Kerngemeinschaft setzt sich aus Bakterien vom Boden, benachbarter Pflanzen und des Samens selber zusammen (Vorholt, 2012). Samen sind oftmals schon mit Bakterien besiedelt, die nach dem Keimen einen Vorteil haben, da die Pflanze nahezu unbesiedelt ist (Van Outryve et al., 1988; Schaad et al., 1989; Holland und Polacco, 1994; Dutta et al., 2014).

Regentropfen und Wind können Bakterien sowohl vom Boden als auch von benachbarten Pflanzen aufwirbeln, die dadurch auf umliegende Pflanzen gelangen (Faulwetter, 1917; Fitt et al., 1989; Blakeman, 1993; Lindow und Andersen, 1996).

Außerdem befördern Wind und Regen Bakterien und häufig ganze Bakterienaggregate in die Troposphäre (Lindemann *et al.*, 1982, 1984; Lighthart, 1997), die dann als weitere Quelle epiphyller Bakterien dienen kann (Kinkel, 1997; Leveau und Lindow, 2001). Dort können sie 2 – 15 Tage überleben (Burrows *et al.*, 2009) und durch Regen oder Schnee wieder auf Pflanzen gelangen (Nagarajan und Singh, 1990; Morris et al., 2013a). Wind und Regen sorgen für Bakterieneintrag in die Phyllosphäre. Beide Faktoren können aber auch dafür sorgen, Bakterien wieder aus der Phyllosphäre auf den Boden, benachbarte Pflanzen oder in die Atmosphäre zu befördern (Lindemann und Upper, 1985; Constantinidou et al., 1990). Ein nicht zu unterschätzender Vektor sind Insekten, die Bakterien auf eine Pflanze bringen können (Lilley *et al.*, 1997; Stavrinides *et al.*, 2009).

### 1.3 Bakterienarten in der Phyllosphäre

Die Phyllosphäre beherbergt vor allem Proteobakterien, Bacteroidetes, Actinobakterien und Firmicutes (Whipps *et al.*, 2008; Vorholt, 2012). Je nach Pflanzenart kann die Zusammensetzung variieren, jedoch bilden Proteobakterien meist den größten Anteil mit bis zu 70 % der epiphyllen Bakterienpopulationen.

Repräsentative Bakteriengattungen sind *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Sphingomonas*, *Methylobacterium*, *Pantoea* und *Erwinia*. Innerhalb der Proteobacteria finden sich phytopathologische Bakterienarten wie *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia cepacia*, *Pantoea agglomerans*, *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas campestris*, *Ralstonia solanacearum* und *P. syringae*. Aus der Gruppe der Actinobacteria sind *Leifsonia xyli*, *Clavibacter michiganensis* und *Rhodococcus fascians* als phytopathologische Bakterienarten bekannt. Sie leben zunächst als Kommensalen auf der Blattoberfläche und können unter günstigen Lebensbedingungen pathogen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit zwei epiphytisch vorkommenden Bakterienarten gearbeitet, die, wenn sie einmal in das Pflanzeninnere gelangen, pathogen sein können: *P. syringae* und *R. fascians*.

*P. syringae* ist ein in der Phyllosphärenforschung gut untersuchtes Bakterium. Erstmals wurde *P. syringae* 1899 vom gemeinen Flieder (*Syringa vulgaris* L.) von M. W. Beijerinck

isoliert und von C. J. J. van Hall benannt und charakterisiert (Young, 1991). Es gehört zu der  $\gamma$ -Gruppe der Proteobakterien, ist stäbchenförmig und polar begeißelt. Typisch für Bakterien der Gattung *Pseudomonas* produziert *P. syringae* fluoreszierende Pigmente.

In den 1970er Jahren entdeckten amerikanische Forscher, dass *P. syringae* Frostschäden verursachen kann. Spezielle Proteine dienen als Eis-Nukleus, wodurch Wasser schon bei Temperaturen ab  $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$  Eiskristalle bildet, sodass Kutikula und Zellmembranen geschädigt werden (Lindow et al., 1978; Lindow, 1983; Hirano und Upper, 2000). Durch diese Frostschäden treten Wasser und Nährstoffe nach außen und durch die entstandenen Verletzungen können *P. syringae* und andere Eis-Nukleus positive Bakterien, wie *Erwinia herbicola*, in das Pflanzeninnere gelangen.

Eine weitere Eintrittspforte in das Pflanzeninnere bieten Stomata. *P. syringae* produziert Coronatin. Dieses Phytotoxin bindet an den Jasmonatrezeptor, sodass sich die Stomata öffnen (Melotto et al., 2008; Xin et al., 2018). Im Inneren der Pflanze kommt ein großes Repertoire an Virulenzfaktoren von *P. syringae* zum Tragen. Mit Hilfe des Typ III Sekretionssystems schleust *P. syringae* unter anderem Immunsuppressoren und Detergenzien in die Pflanzenzellen, sodass Nährstoffe und Wasser freigesetzt werden (Hauck et al., 2003; Xin et al., 2016).

Bevor *P. syringae* jedoch ins Innere der Pflanze eindringen kann, muss das Bakterium epiphytisch überleben. Hierfür besitzt *P. syringae*, wie schon im Vorherigen beschrieben, einige Mechanismen, um den widrigen Lebensbedingungen der Phyllosphäre zu trotzen. Das Bakterium besitzt unter anderem Melanine zum Schutz vor UV-Strahlung, Siderophore, um Nährstoffvorteile zu bekommen, Toxine gegen andere Mikroorganismen und Effluxproteine, um Biozide anderer Mikroorganismen entgegenzuwirken. Exopolysaccharide, wie Alginat, schützen sowohl gegen Biozide als auch gegen oxidativen Stress und Austrocknung (Morris et al., 2013a).

Bekannt ist *P. syringae* auch für die Produktion von Biotensiden, die durch ihre hygroskopische Eigenschaft Wasser binden können. Dieser Wasserfilm hilft die Mobilität der Bakterien auf der Kutikula des Blattes zu erhöhen, bildet einen „sink“ für Stoffe, die durch die Kutikula diffundieren und steigert die Permeabilität der Kutikula für Wasser (Burch et al., 2014).

Neben den Verbreitungsstrategien über die Samen, die Keimlinge und das Mähen wird *P. syringae* über trockene Aerosole, Regenfall und Regenspritzer verbreitet (Hirano und Upper, 2000). *P. syringae* kann hunderte bis tausende Kilometer über Land und Ozeane in der

Troposphäre in Wolkenhöhe und höher vorkommen (Nagarajan und Singh, 1990; Morris et al., 2013b). Typisch für Bakterienzellen sind zwei bis 15 Tage als bakterielles Aerosol. Regen, Schnee und Hagel kann sie dann wieder zu Boden bringen (Morris et al., 2008, 2013a; Burrows et al., 2009).

*R. fascians* ist ein grampositives, aerobes und unbewegliches Bakterium. Es gehört in die Familie Nocardiaceae (Gürtler et al., 2004) und ist eng verwandt mit den Gattungen *Corynebacterium*, welche Pflanzen- wie Tierpathogene beinhaltet, und *Mycobacterium*, welche Tier- und Menschenpathogene beinhaltet (Putnam und Miller, 2007).

*R. fascians* wurde das erste Mal durch Tilford, 1936, beschrieben. Das Bakterium erschien erstmals im Wurzelbereich als Pathogen für Varietäten der duftenden Platterbse (*Lathyrus odoratus*), der Gartenerbse (*Pisum sativum*), von Petunien (*Petunia hybrida*), Geranien (*Pelargonium*), Tabak (*Nicotiana*) und rispigem Gipskraut (*Gypsophila paniculata*). Bei *Chrysanthemum* fand man durch *R. fascians* verursachte Fasziationen, die im Wurzelbereich auftraten (Tilford, 1936).

Tödlich sind die Infektionen nicht, jedoch stellen sie im Gegensatz zum Wurzelbereich im Bereich der oberirdischen Pflanzenorgane große Probleme in der Zierpflanzenindustrie dar, da die Infektionen zu Blattgallen und Sprosswucherungen führen (Putnam und Miller, 2007).

*R. fascians* gelangt über den Boden, Sprinklerwasser, Insekten oder durch die Vermehrung der Pflanzen über Stecklinge von Pflanze zu Pflanze. Das Bakterium überlebt lange Perioden in grönländischem Eis und polarem Seewasser (Mergaert et al., 2001; Miteva et al., 2004). Auch lange Hungerperioden kann es überstehen und daher lange epiphytisch überleben bevor Krankheitssymptome bemerkbar sind. Dadurch kann das Bakterium durch Stecklinge unbemerkt verbreitet werden und zu einem Problem bei der Zierpflanzenproduktion werden (Putnam und Miller, 2007).

Auf den oberirdischen Pflanzenorganen ist *R. fascians* durch eine Schleimschicht gegen Austrocknung geschützt und die gelb-orangene Pigmentierung kann vor UV-Strahlung schützen. Der Bakterienbiofilm verursacht die Verletzung einiger epidermaler Zellen, wodurch die Bakterien in die Pflanze eindringen können (Sundin und Jacobs, 1999; Cornelis et al., 2001). *R. fascians* ist im Stande Phytohormone wie Cytokinine zu produzieren und Auxine abzubauen, was zur Aktivierung der meristematischen Zellen führt. Durch das hohe Cytokinin/Auxin-Verhältnis entsteht ein Sprossprimordium, welche sich dann zu Blattgallen entwickeln (Alvarez, 2010). Es wird vermutet, dass *R. fascians* Glyoxylat, Glycolat und

Glycin aus der Photorespiration der Pflanzengallen mit Hilfe des eigenen Glyoxylatzyklus als Energiequelle nutzt (Vereecke *et al.*, 2002).

*R. fascians* besitzt ein sehr breites metabolisches Spektrum an potenziellen Kohlenstoffquellen. Es kann viele unterschiedliche hydrophobe Substrate abbauen. Hierfür besitzt es zellgebundene Mykolsäuren und Biotenside, die die Zelloberfläche hydrophober werden lassen. Dies erleichtert den Kontakt zum hydrophoben Substrat und die Aufnahme in die Zelle. Die Gattung *Rhodococcus* hat das Potential eine Reihe von organischen Molekülen, unter anderem Kohlenwasserstoffe, chlorierte Phenole, Steroide, Lignin, Kohle und Erdöl, abbauen zu können (Espuny *et al.*, 1995; Lang und Philp, 1998; Whyte *et al.*, 1998; Tuleva *et al.*, 2008).

## 1.4 Produktion von Biotensiden in der Phyllosphäre

Im Vergleich zu aquatisch lebenden (5 %) und bodenlebenden (8 %) Bakterien produzieren 12 % der epiphytisch lebenden Bakterien Biotenside (Burch *et al.*, 2011). Bunster *et al.* (1989) konnten zeigen, dass 50 % der getesteten *Pseudomonas*-Stämme, eine in der Phyllosphäre häufig vorkommende Bakteriengattung, Biotenside produzieren (Bunster *et al.*, 1989).

Biotenside sind amphiphile Moleküle, die aus hydrophilen und hydrophoben Domänen bestehen. Dies gibt ihnen die Eigenschaft, die Oberflächenspannung an Grenzflächen unterschiedlicher Polarität zu senken, wie Öl/Wasser oder Luft/Wasser (Prabhu und Phale, 2003). Die hydrophile Domäne wird durch Carboxylgruppen, Peptidionen, Mono-, Di- oder Polysaccharide gebildet. Die hydrophobe Gruppe stellen ungesättigte oder gesättigte Kohlenwasserstoffketten oder Fettsäurereste dar (Banat *et al.*, 2010).

Es wird in der Klasse der Biotenside mit niedrigem Molekulargewicht zwischen Lipopeptiden und Glycolipiden unterschieden. Im Bereich der oberflächenaktiven Molekülen mit hohem Molekulargewicht handelt es sich um Polysaccharide, Lipopolysaccharide, Proteine oder Lipoproteine, die als Bioemulsifizierer klassifiziert werden (Neu, 1996). Glycolipide sind meist Disaccharide, die mit langkettigen Fettsäuren oder Hydroxyfettsäuren acetyliert wurden.

Glycolipide wurden in diversen Mikroorganismen gefunden. *Rhodococcus erythropolis* zum Beispiel produziert Trehalosedimykolate (Kim *et al.*, 1990) und die Hefe *Torulopsis* produziert Sophorolipide (Inoue und Ito, 1982). Gut untersuchte Glycolipide sind

Rhamnolipide, die von *Pseudomonas*-Arten produziert werden. Sie bestehen aus zwei Mol Rhamnose und zwei Mol  $\beta$ -Hydroxydecan säure (Hauser und Karnovsky, 1954; Lang und Wullbrandt, 1999).

Lipopeptide bestehen aus kleineren linearen oder zyklischen Peptiden, die den hydrophilen Teil des Biotensides ausmachen, und einem hydrophoben Fettsäurerest (Ron und Rosenberg, 2001). *Bacillus subtilis* produziert Surfactin, ein zyklisches Lipopeptid (Peypoux *et al.*, 1999).

Bei *Pseudomonas*-Arten ist Viscosin ein bekanntes Lipopeptid (Neu und Poralla, 1990).

Bakterielle Biotenside wurden erstmals bei bodenlebenden Bakterien entdeckt. Mit Hilfe der Biotenside konnten diese Bakterien besser an hydrophobe Substanzen als Kohlenstoffquellen gelangen, da sie die Löslichkeit hydrophober Substanzen in Wasser erhöhen. Seit dem wurden viele weitere Funktionen, wie die Entwicklung und Instandhaltung von Biofilmen (Pamp und Tolker-Nielsen, 2007), und als Schmiermittel bei der Bewegung auf trockenem Grund entdeckt (Neu, 1996; Ron und Rosenberg, 2001).

Bei dem epiphytisch lebenden Bakterium *P. syringae* pv. *syringae* B728a konnte gezeigt werden, dass die Produktion des Biotensids Syringafactin die Überlebensrate bei fluktuierender Wasserverfügbarkeit und relativer Luftfeuchte im Gegensatz zu einem nicht biotensidproduzierenden Knock-outs erhöhte. Zum einen adsorbiert dieses Biotensid in der hydrophoben pflanzlichen Kutikula und wirkt hygroskopisch, sodass Wasser aus der Atmosphäre kondensieren kann. Zum anderen erhöht dieses Biotensid die Transpirationsrate von Wasser durch die pflanzliche Kutikula (Burch *et al.*, 2014).

## 1.5 Die isolierte Kutikulamembran als Phyllospärenmodell

Die Kutikula kann mit Hilfe von Enzymen, die Cellulose und Pektin degradieren, isoliert werden (Schönherr und Riederer, 1986). Die so isolierten Kutikulamembranen bestehen aus dem Kutinpolymer sowie den kutikulären Wachsen und bilden ein Abbild des Blattes. Unebenheiten, wie Kutikulafalten und Blattadern, bleiben erhalten, die Wachszusammensetzung ändert sich nicht und die Transporteigenschaften stimmen mit denen des intakten Blattes überein (Kirsch *et al.*, 1997). Somit können Experimente, die sich mit der Interaktion von Bakterien mit der pflanzlichen Kutikula beschäftigen, mit isolierten Kutikulamembranen durchgeführt werden. Faktoren wie Luftfeuchtigkeit und Temperatur sind kontrollierbar. Zusätzlich ist sichergestellt, dass keine Veränderungen durch das noch lebende Blatt und den Metabolismus der lebenden Zellen entstehen. Isolierte

Kutikulamembranen wurden schon in vielen wissenschaftlichen Arbeiten zur Phyllosphärenforschung verwendet. Mit Hilfe von DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) oder Acridinorange können Bakterien, mit denen pflanzliche Kutikulamembranen inokuliert wurden, angefärbt werden. Unter dem Fluoreszenzmikroskop kann danach untersucht werden, wie sich Bakterien auf der Kutikula ansiedeln (Krimm, 2005). Remus-Emsermann et al. (2011) zeigte so, dass sich *Erwinia herbicola* Bakterien gleichmäßig auf *Populus canescens* Kutikulamembranen verteilte. Mit Hilfe einer GFP-basierten Fluoreszenz von dem verwendeten *Erwinia herbicola* Stamm, welche nur bei Verfügbarkeit von Fructose zu sehen war, konnte gezeigt werden, dass an der Basis von Trichomen erhöhte Fructosepermeabilität vorliegt. Die Fructosepermeabilität von *Populus canescens* Kutikulamembranen konnte Remus-Emsermann et al. (2011) gaschromatographisch nachweisen. Den Einfluss von bakteriellen Biotensiden auf die kutikuläre Transpiration konnte auch mit Hilfe von isolierten Kutikulamembranen untersucht werden (Schreiber et al., 2005; Burch et al., 2014). Die Fähigkeit epiphyller Bakterien mit Hilfe von Biotensiden die Benetzbarkeit der pflanzlichen Kutikula zu erhöhen kann auch mit isolierten Kutikulamembranen untersucht werden. Hierfür können Kontaktwinkel gemessen werden (Knoll und Schreiber 2000). Die Besiedelung durch epiphyll Bakterien auf isolierten Kutikulamembranen kann mittels Rasterelektronenmikroskopie visualisiert werden (Zeisler, 2013).

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die lebenswidrigen Bedingungen in der Phyllosphäre stellen Bakterien vor die Herausforderung, Überlebensstrategien zu entwickeln, um zu überleben. Ein entscheidender Faktor in der Phyllosphäre ist es, an C-Quellen zur Energiegewinnung zu gelangen.

Diese potenzielle Fähigkeit wurde in dieser Arbeit an den beiden epiphyllen Bakterienarten *P. syringae* und *R. fascians* untersucht. Als potenzielle C-Quellen wurden polare Substanzen, wie Fructose, Arginin und Glycerin, die aus dem Innern der Pflanze an die Oberfläche diffundieren können, und Wachse, die den löslichen Teil der pflanzlichen Kutikula darstellen, betrachtet.

Für die Analyse von Kohlenhydraten, die auf der pflanzlichen Kutikula zu finden sind, gibt es verschiedene Methoden. Kohlenhydrate können kolorimetrisch, über die HPLC oder mittels der Gaschromatographie analysiert werden (Stammitti et al., 1995; Mercier und Lindow, 2000; Becker et al., 2013).

Die Gaschromatographie findet ihre Anwendung in der Auftrennung von Substanzgemischen, die bis 400 °C flüchtig sind und meistens lipophilen Charakter aufweisen. Kohlenhydrate gehörten grundsätzlich nicht zu dieser Kategorie von Substanzen, können jedoch durch geeignete Derivatisierungen so modifiziert werden, dass sie im genannten Temperaturspektrum flüchtig werden. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde eine zweistufige Derivatisierung nach Becker et al. (2013) so modifiziert, sodass die sehr geringen Mengen an Kohlenhydraten auf der pflanzlichen Kutikula von Bohnenblättern (*Phaseolus vulgaris*) optimal analysiert werden konnten. Die Bohne wurde hier verwendet, da sie viele Trichome auf der Blattoberfläche besitzt, was zu der Annahme führt, dass eine gut detektierbare Menge an Kohlenhydraten zu finden sein wird. Das *Leaching* ist unter anderem an der Basis von Trichomen erhöht. Des Weiteren ist *Phaseolus vulgaris* ein Wirt für das Bakterium *P. syringae* pv. *syringae* B728a, welches im Folgenden dieser Arbeit untersucht wurde (Hirano et al., 1996).

Bakterien der Phyllosphäre produzieren häufig Biotenside (Burch et al., 2011). Die hygroskopischen Eigenschaften von Tensiden könnte dazu führen, dass das „*Leaching*“ (Tukey, 1970) von Substanzen aus dem Innern des Blattes erhöhen, da sie dazu führen, dass sich mit Tensiden eher ein Wasserfilm auf der hydrophoben Kutikula bildet und somit die Auswaschung von Nährstoffen gefördert wird.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde diese Eigenschaft von Biotensiden am Beispiel des biotensidproduzierenden Bakteriums *P. syringae* untersucht. Dafür wurde der Stamm *P. syringae* pv. *syringae* B728a verwendet, der für seine Biotensidproduktion bekannt ist (Berti et al., 2007). Dieser Stamm und eine Doppelmutante, die keine Biotenside produziert, wurden aus dem Labor „Ecology of Plant-Associated Microorganisms“ von Professor Steven E. Lindow der UC Berkely bezogen. Mit Hilfe von <sup>14</sup>C-markierten Substanzen sollte der Einfluss der Biotenside auf die Auswaschung von pflanzlichen Kutikulamembranen von *Hedera helix* und *Populus canescens* indirekt ermittelt werden. *Hedera helix*, ein Modellorganismus in der Kutikulaforschung, diente hier als Repräsentant sehr undurchlässiger Kutikulamembranen. *Populus canescens* ist bekannt viele polare Poren zu besitzen und wurde als Beispiel gut durchlässiger Kutikulamembranen verwendet (Schreiber und Schönherr, 2009).

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob die kutikulären Wachse der pflanzlichen Kutikula direkt als C-Quelle für *P. syringae* und *R. fascians* dienen könnten.

*R. fascians* ist bekannt dafür, dass es ein sehr großes Spektrum an Substanzen hat, die als C-Quelle dienen können (Gesheva *et al.*, 2010). Es wurden <sup>14</sup>C-markierte Wachsmonomere verwendet. Die Fähigkeit diese abzubauen zu können wurde zum einen in Flüssigkultur und zum anderen auf *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen durchgeführt. *Prunus laurocerasus* ist ein Modellorganismus in der Kutikulaforschung und hat robuste Kutikulamembranen, die sich gut für die Experimente eignen (Zeisler, 2013).

Des Weiteren wurde die Fähigkeit beider Bakterienarten unterschiedliche hydrophobe Substanzen abzubauen zu können in Wachstumsexperimenten untersucht.

## **2. Material und Methoden**

## 2.1 Isolierung von Kutikulamembranen

Für die Kutikulamembranisolation wurden Blätter der Pflanzenarten *Populus canescens*, *Hedera helix* und *Prunus laurocerasus* auf der abaxialen Seite mit einem schwarzen Filsstift markiert. *Hedera helix* und *Prunus laurocerasus* wurden vom Institutsparkplatz des IZMB (Institut für zelluläre und molekulare Botanik) der Universität Bonn geerntet. Kutikulamembranen von *Populus canescens* befanden sich im Laborbestand der Arbeitsgruppe Ökophysiologie der Pflanzen der Universität Bonn und wurden 1995 in Hannover isoliert.

Zur Isolierung aus frischem Pflanzenmaterial wurden Blattscheiben mit einem Korkbohrer der Größe 14 (3,142 cm<sup>2</sup>) ausgestanzt. Die gewonnenen Blattscheiben wurden in einen Erlenmeyerkolben in Enzymlösung gegeben (2 % Cellulase/Pektinase) und unter Vakuum in einem Exsikkator mit der Enzymlösung infiltriert. Der Erlenmeyerkolben wurde mit Parafilm verschlossen und die Enzymlösung täglich gewechselt. Die abgelösten adaxialen Kutikulamembranen wurden in einen Erlenmeyerkolben mit Boraxlösung überführt, wodurch noch enthaltene phenolische Komponenten herausgelöst wurden. Die mit dem schwarzen Filsstift markierten abaxialen Seiten wurden verworfen, da diese bei allen drei Membranen Stomata aufweisen. Die Boraxlösung wurde ebenfalls täglich gewechselt bis sie sich nicht mehr durch herausgelöste phenolische Substanzen verfärbte. Die Kutikulamembranen wurden danach in einem Erlenmeyerkolben mit Aqua demin. gewaschen und unter leichtem Luftstrom auf Teflonplättchen geglättet und getrocknet. Die trockenen Kutikulamembranen wurden danach bei Raumtemperatur in Petrischalen gelagert.

## 2.2 Pflanzenanzucht

Samen der Buschbohne (*Phaseolus vulgaris*) wurden auf feuchtem Filterpapier für einen Tag in einem Brutschrank bei 25 °C vorgekeimt. Die gekeimten Samen wurden ca. 2 cm tief in Erde gepflanzt und wuchsen bei 22/20°C für 2 Wochen bei einem 16/8-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus.

## 2.3 Anzucht der Bakterienstämme und Herstellung von Bakteriensuspensionen

In dieser Arbeit wurden zwei Bakterienstämme verwendet.

*P. syringae* pv. *syringae* B728a und der zugehörige double Knock-Out (db KO) wurden auf King's B Agar (KB) für zwei Tage bei 25 °C inkubiert. Der db KO produziert keine Biotenside, wohingegen der Wildtyp das Biotensid Syringafactin produziert. In geringen Mengen produziert der Wildtyp noch ein weiteres Biotensid, welches eine Vorstufe eines Rhamnolipids ist (Burch *et al.*, 2012). Dieses Tensid ist jedoch zellgebunden und hat keinen Einfluss auf die Permeabilität der Kutikula (Burch *et al.*, 2014). Der *P. syringae* pv. *syringae* B728a Wildtyp und der db KO wurden von Adrien Y. Burch von der UC Berkeley zur Verfügung gestellt. Die Herstellung des double Knock-Outs ist in Burch *et al.* (2012) beschrieben ( $\Delta syfA \Delta rhIA$ ).

*R. fascians* wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. *R. fascians* DSM20131 wurde für drei Tage auf Coryne-Agar inkubiert. Für die Bakteriensuspensionen wurden je 4 ml steriles Aqua demin. auf die Agarplatten pipettiert und mit Hilfe eines Drigalski-Spatels verteilt. Die Bakteriensuspension wurde mit Hilfe einer Pipette in ein 15 ml Falcon Tube überführt. Diese Bakteriensuspension wurde auf eine optische Dichte ( $OD_{600}$ ) von 1 in Aqua demin. verdünnt.

## 2.4 Oberflächenspannungs- und Kontaktwinkelmessungen der Bakteriensuspensionen

Biotenside haben die Eigenschaft, die Oberflächenspannung von Wasser herabzusetzen. Um die Präsenz von Biotensiden der einzelnen Isolate festzustellen, wurden die Oberflächenspannung und der damit korrelierende Kontaktwinkel gemessen.

Die Oberflächenspannung der Bakteriensuspensionen wurde mittels des Drop-Shape Analysers (Krüss GmbH, Hamburg, Deutschland) nach der *Pendant drop* Methode durchgeführt. Dafür wird ein hängender 10  $\mu$ l großer Tropfen der Bakteriensuspension an der Kanüle einer Spritze gebildet, der von einer Kamera gefilmt wird. Die Software errechnet mit Hilfe der *Young Laplace* Gleichung die Oberflächenspannung.

Der Kontaktwinkel wurde auf der industriell hergestellten Oberfläche Parafilm nach der *Sessile drop* Methode gemessen. Parafilm besteht aus Wachsen und Polyolefinen, was ihn sehr hydrophob macht. Dadurch kann die Eigenschaft der Tenside gut dargestellt werden, die Benetzung von hydrophoben Oberflächen zu erhöhen. Der Parafilm wurde mit doppelseitigem Klebeband auf einen Objektträger geklebt. Ein 10 µl großer Tropfen der Bakteriensuspension wurden auf den Parafilm gegeben. Parallel wurde ein Tropfen Aqua demin. als Negativkontrolle gemessen. Die Kamera erfasst das Bild und setzt die Basislinie und die Tangente automatisch an. Dadurch kann der Kontaktwinkel zwischen der Tangente und der Basislinie gemessen werden.

### 2.5 Chemisch-analytische Untersuchungen

Mit Hilfe der Gaschromatographie lassen sich Gemische organischer Substanzen nach ihrer Größe und Polarität auftrennen. Für die qualitative Untersuchung werden der Kapillarsäule Massenspektrometer nachgeschaltet, um die Bestandteile der Gemische zu identifizieren. Mit Hilfe eines FID (Flammen-Ionisations-Detektor) lässt sich die Menge der Einzelsubstanzen eines Gemisches feststellen. Die Gaschromatographie findet weite Anwendung bei der Analyse von lipophilen Substanzen, die bei Temperaturen bis 310 °C flüchtig sind. Gemische aus eher hydrophilen Substanzen, wie Aminosäuren oder Kohlenhydraten, werden meist mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography) aufgetrennt und analysiert. Die Gaschromatographie bildet jedoch eine nicht zu unterschätzende Alternative zur Analyse solcher hydrophilen Substanzen, vor allem, wenn die zu analysierenden Mengen sehr klein sind. Die Reaktivität ihrer hydrophilen funktionellen Gruppen muss für die gaschromatographische Analyse zunächst durch Derivatisieren gesenkt werden und die Flüchtigkeit durch Senkung der Polarität gesteigert werden. Hierfür wurden zwei verschiedene Derivatisierungsmethoden verglichen, um die Anzahl der bei der gaschromatographischen Analyse von Kohlenhydraten entstehenden Peaks zu minimieren und die Sensitivität des Analyseansatzes zu steigern.

#### 2.5.1 Gaschromatographie und Massenspektrometrie

Mit Hilfe der Chromatographie lassen sich Stoffgemische in ihre Einzelsubstanzen auftrennen. Dabei werden die Substanzen mit Hilfe einer mobilen Phase über eine stationäre Phase transportiert. Die Einzelsubstanzen weisen unterschiedliche physikalische wie auch

chemische Eigenschaften auf und interagieren somit auf unterschiedliche Weise mit der mobilen wie auch der stationären Phase.

Bei der Gaschromatographie bedingen die molekulspezifischen Siedepunkte und unterschiedlichen Wechselwirkungen mit der Beschichtung der Kapillarsäule, die die stationäre Phase bildet, das Auftrennen des Stoffgemisches. Die wie in 2.5.3 beschriebenen derivatisierten Kohlenhydrate wurden gaschromatographisch mit einem Agilent 6890N Gaschromatograph analysiert. Als stationäre Phase diente eine Kapillarsäule (DB-1, 30 m x 0,32 mm, 0,1 µm (J&W, Agilent Technologies, Deutschland)). Wasserstoff (H<sub>2</sub>) wurde als Trägergas (mobile Phase) mit einer Flussrate von 2 ml/min verwendet. Es wurde jeweils 1 µl jeder Probe „*on-column*“ injiziert.

Als Detektoreinheit diente zur Quantifizierung der aufgetrennten Substanzen ein Flammen-Ionisations-Detektor (Flame-Ionization-Detector; FID). An diesem Detektor entsteht eine Knallgasflamme aus Sauerstoff der Luft und zugeführtem Wasserstoff. Organische Substanzen, die durch den Gaschromatographen aufgetrennt wurden, werden in dieser Flamme thermisch ionisiert und erhöhen dadurch die vorhandene elektrische Leitfähigkeit. Diese Erhöhung spiegelt sich in dem digitalisierten Signal als Peak wieder.

Zur Identifizierung der Einzelsubstanzen diente ein hinter den Gaschromatographen (siehe oben) geschaltetes Massenspektrometer (Agilent 5973 MS, J&W, Agilent Technologies, Deutschland). Als stationäre Phase wurde eine DB-1-MS-Kapillarsäule (30 m x 0,32 mm, 0,1 µm (J&W, Agilent Technologies, Deutschland)) verwendet. Als Trägergas diente Helium (He). Die Injektion von 1 µl jeder Probe verlief wie oben beschrieben auch „*on-column*“. Im Massenspektrometer findet unter Hochvakuum eine Ionisierung der Moleküle durch Elektronenbeschuss (Electron Impact; EI) statt. Die entstehenden positiven Ionen sind thermodynamisch instabil und fragmentieren in kleinere Ionen. Durch einen Quadrupol wird ein elektromagnetisches Feld angelegt, welches die Ionen beschleunigt. Eine Wechselspannung am Quadrupol lässt nur Ionen bestimmter Größe passieren, die dann am Detektor detektiert werden. Durch stetige Änderung der Wechselspannung können unterschiedliche Fragmente passieren, die somit nach ihrem Verhältnis von Masse zu Ladung aufgetrennt werden. Es entsteht ein für jedes Molekül charakteristisches Fragmentationsmuster.

## 2.5.2 Überprüfung der Qualität und Instandhaltung der Kapillarsäule

Vor und nach jeder Analysereihe mittels GC-FID und GC-MS wurden diese auf ihre Säulenqualität und den Qualitätszustand überprüft. Hierfür wurde ein Gemisch gleicher Mengen von dem Alkan Tetracosan ( $C_{24}$ ) und den drei Carbonsäuren Nonacosansäure ( $C_{29}$ ), Triacontansäure ( $C_{30}$ ) und Hentriacontansäure ( $C_{31}$ ) in Chloroform verwendet. Die Lösung wurde mit 20  $\mu$ l Pyridin und 20  $\mu$ l BSTFA versetzt und für 45 Minuten bei 70 °C derivatisiert. Dieser Säurestandard wurde auf die Kapillarsäule injiziert und mit dem Temperaturprogramm von Tabelle 1 aufgetrennt. Der Quotient der Peakflächen von Tetracosan und Hentriacontansäure sollte nicht höher als 1,3 betragen und die Peakformen symmetrisch sein. Traf dies nicht zu, wurde die Säule nach Unreinheiten untersucht und mit einem Teflonschneider gekürzt, mit Chloroform gespült und bei 310 °C ausgeheizt, bis die Basislinie konstant um den Wert 10 pA lag. Der Spülvorgang wurde mit dem Temperaturprogramm in Tabelle 1 durchgeführt. Dies wurde so oft wiederholt bis der oben beschriebene Quotient 1,3 oder weniger betrug.

**Tabelle 1:** Temperaturprogramm für den Säurestandard zur Überprüfung der Säulenqualität der Gaschromatographen

Protokoll zur Überprüfung der Säulenqualität
Injektion bei 50 °C
1 Minute bei 50 °C
40 °C/Minute bis auf 200 °C
2 Minuten bei 200 °C
3 °C/Minute bis auf 310 °C
20 Minuten bei 310 °C

### 2.5.3 Analyse von polaren Stoffen (Kohlenhydrate)

#### 2.5.3.1. Einstufige und zweistufige Derivatisierungsmethode für Kohlenhydrate

Bei den zwei Derivatisierungsmethoden handelt es sich um eine einstufige und eine zweistufige Derivatisierung. Die einstufige Derivatisierung erfolgte modifiziert nach Remus-Emsermann et al. (2011) und die zweistufige Derivatisierung nach Becker et al. (2013).

Zur Validierung der beiden Derivatisierungsmethoden wurden Verdünnungsreihen des Monosaccharids Fructose und des Disaccharids Saccharose angefertigt, um Linearitäten zweifelsfrei nachzuweisen. Dafür wurden 1, 5, 50, 100, 200 und 500 µl einer 200 µg/ml konzentrierten Lösung in Reacti Vials komplett unter N<sub>2</sub>-Strom bei 70 °C eingedampft.

Bei der einstufigen Derivatisierung wurden den Proben jeweils 30 µl Pyridin, 30 µl N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) und 50 µl Chloroform hinzugegeben und für eine Stunde bei 70 °C inkubiert. Für die zweistufige Derivatisierung wurden den Proben jeweils 80 µl O-Ethylhydroxylamin x Hydrochlorid in Pyridin (40 mg/ml) hinzugegeben und für eine Stunde bei 70 °C inkubiert. Nach dieser ersten Derivatisierung wurden den Proben der zweistufigen Derivatisierung 80 µl Dimethylaminopyridin (DMAP) in Pyridin (2 mg/ml) und 50 µl BSTFA hinzugegeben und für zwei Stunden bei 70 °C inkubiert. Nach dem zweiten Derivatisierungsschritt wurden den Proben jeweils 200 µl Chloroform hinzugefügt. Die Proben der einfachen Derivatisierung wurden komplett, von den zweistufig derivatisierten Proben wurden 200 µl Aliquots in Analysegläschen für die gaschromatographische Analyse überführt.

#### 2.5.3.2. Gaschromatographische Analyse von Kohlenhydraten auf Blättern der Bohne (*Phaseolus vulgaris*)

Für die Zuckeranalyse wurden pro Parallele die Oberseite und Unterseite von jeweils drei Fiedern eines Sekundärblattes der Buschbohne (*Phaseolus vulgaris*) mit einer Schere abgetrennt und nacheinander in 50 ml HPLC-Wasser in einer eckigen Petrischale getaucht. Es wurde darauf geachtet, dass die Schnittflächen nicht in Kontakt mit dem Wasser kamen, um keine Solute aus den Leitbündeln der Pflanze zu lösen. Die 50 ml HPLC-Wasser wurden dann in ein 50 ml Falcontube überführt und 50 µl des internen Standards Methyl-β-D-galactopyranosid (200 µg/ml) hinzugefügt. Die Falcontubes wurden dann geöffnet über Nacht in einen Brutschrank bei 60 °C gestellt, um das Volumen auf 1 ml einzuengen. Die

Abwaschungen wurden in vorher mit Chloroform gereinigte Reacti Vials überführt und unter N<sub>2</sub>-Strom bei 70 °C komplett eingedampft. Parallel wurden je 50 µl verschiedener Zucker- und Zuckeralkoholstandards (Myoinositol, Glucose, Fructose, Galactose, Saccharose, Glycerin mit der Konzentration 200 µl/ml) in vorher mit Chloroform gereinigte Reacti Vials gegeben und bei 70 °C im Heizblock unter N<sub>2</sub>-Strom komplett eingedampft.

Allen eingedampften Proben wurden 80 µl O-Ethylhydroxylamin in Pyridin (40 mg/ml) hinzugegeben und für eine Stunde bei 70 °C im Heizblock derivatisiert. Den Proben wurden danach je 80 µl Dimethylaminopyridin in Pyridin (2 mg/ml) und 50 µl BSTFA hinzugefügt und zwei Stunden bei 70 °C im Heizblock derivatisiert. Danach wurden den Proben je 200 µl Chloroform hinzugefügt und auf dem Vortexer gemischt. Für die gaschromatographische Analyse wurden je 200 µl der derivatisierten Proben in Analysevials überführt und mit dem Temperaturprogramm SUGAR.M mittels GC-FID aufgetrennt (Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Temperaturprogramm SUGAR.M für die gaschromatographische Auftrennung von Kohlenhydraten

Protokoll zur Analyse von Kohlenhydraten
Injektion bei 65 °C
3 Minuten bei 65 °C
8 °C/Minute bis auf 240 °C
12 °C/Minute bis auf 310 °C
35 Minuten bei 310 °C

### 2.5.4 Gaschromatographische Analyse von Paraffinwachsen mit unterschiedlichen Schmelzpunkten

Die vier verschiedenen Paraffinwachse, die bei den vorherigen Wachstumsversuchen verwendet wurden, wurden im Anschluss gaschromatographisch untersucht, um die chemische Zusammensetzung der einzelnen Proben zu identifizieren. Die Paraffinwachse hatten die Schmelzpunkte 42 °C, 52 °C, 69 °C und 90 °C. Für die Analyse wurden 0,1 %ige Paraffinwachslösungen in Hexan hergestellt. Die Proben wurden mit dem Wachsprogramm (Tabelle 3) auf dem Gaschromatographen analysiert. Die Identifikation der einzelnen Monomere erfolgte mittels der Massenspektrometrie. Für die Anteilsverteilung der einzelnen Monomere wurden die Peakflächen der Chromatogramme, die mit Hilfe des FID ermittelt wurden, verwendet. Prozentanteile der einzelnen Paraffinwachse wurde mit Hilfe von SigmaPlot (SigmaPlot, USA) in einem Balkendiagramm dargestellt.

**Tabelle 3:** Temperaturprogramm für die gaschromatographische Wachsanalyse

Protokoll zur Wachsanalyse
Injektion bei 50 °C
2 Minuten bei 50 °C
40 °C/Minute bis auf 200 °C
2 Minuten bei 200 °C
3 °C/Minute bis auf 310 °C
30 Minuten bei 310 °C

## 2.6 Untersuchungen zum Metabolismus verschiedener C-Quellen

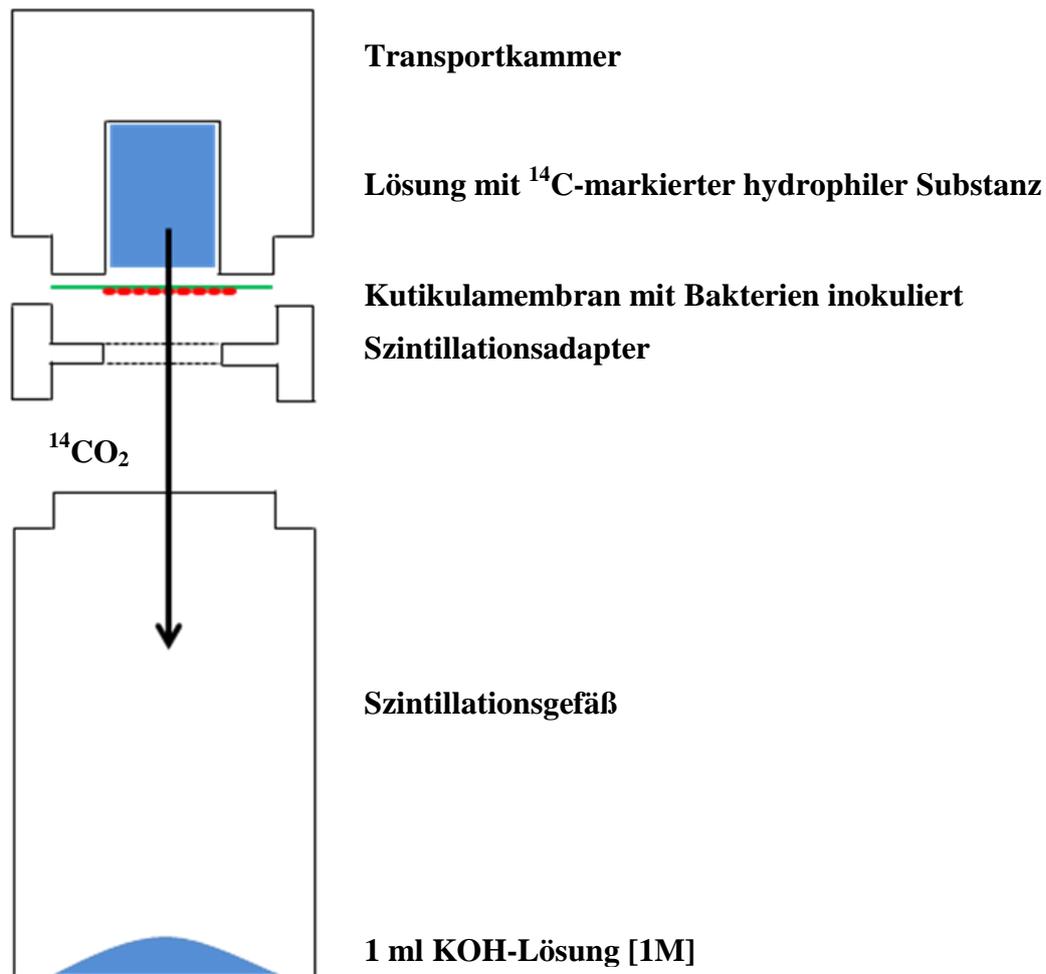
### 2.6.1 Radiochemische Untersuchungen

#### 2.6.1.1. Die Bedeutung von Biotensiden für den Metabolismus $^{14}\text{C}$ -markierter hydrophiler Substanzen, die durch die pflanzliche Kutikula diffundieren

In diesem Teil der Arbeit sollte die Fähigkeit des biotensidproduzierenden Bakteriums *P. syringae* im Vergleich zu dem korrespondierenden nicht biotensidproduzierenden db KO organische Solute, die durch die pflanzliche Kutikula auf die Außenseite diffundieren, metabolisieren zu können untersucht werden. Durch die hygroskopischen Eigenschaften von Tensiden kann sich ein Wasserfilm auf der Kutikula bilden. Dieser kann als „Sink“ wirken und die organischen Solute aus der Kutikula desorbieren (Burch *et al.*, 2014). Es wurden Kutikulamembranen von *Populus canescens* (Graupappel) und *Hedera helix* (gemeiner Efeu) nach einer Methode von Schreiber *et al.* (2001) mit der physiologischen Außenseite nach oben in geschlossene Transportkammern mit Adaptern für Szintillationsgefäße gespannt.

**Tabelle 4:** Spezifische Aktivitäten der  $^{14}\text{C}$ -markierten hydrophilen Substanzen

<i>Substanz</i>	<i>Spezifische Aktivität</i>
$^{14}\text{C}$ -Fructose	300 mCi/mmol
$^{14}\text{C}$ -Arginin	318 mCi/mmol
$^{14}\text{C}$ -Glycerin	150 mCi/mmol



**Abbildung 2:** Aufbau der radioaktiven Transportstudien, um den Einfluss von Biotensiden auf die Metabolisierung von  $^{14}\text{C}$ -markierten hydrophilen Substanzen, die durch die Kutikula diffundieren, zu untersuchen;  $^{14}\text{CO}_2$ , welches bei dem Abbau der  $^{14}\text{C}$ -markierten hydrophilen Substanz durch *P. syringae* WT oder db KO entsteht, wird in KOH-Lösung im Szintillationsgefäß in Form von  $\text{K}_2^{14}\text{CO}_3$  gebunden und kann mittels Szintillationszähler gemessen werden; modifiziert nach Schreiber (2001)

Die Kammern wurden mit 800  $\mu\text{l}$  der jeweiligen  $^{14}\text{C}$ -markierten Substanzen,  $^{14}\text{C}$ -Fructose (2000 dpm/ $\mu\text{l}$ ),  $^{14}\text{C}$ -Arginin (2000 dpm/ $\mu\text{l}$ ) oder  $^{14}\text{C}$ -Glycerin (1000 dpm/ $\mu\text{l}$ ), befüllt und die Kutikulamembran wurde auf den mit PTFE-Paste (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) bestrichenen Rand gesetzt. Die spezifischen Aktivitäten der drei Substanzen sind in Tabelle 4 aufgeführt. Um Beschädigungen in der Kutikula zu finden, wurden 10  $\mu\text{l}$  Ethanol appliziert. Ethanol diffundiert durch mit dem bloßen Auge nicht erkennbare Beschädigungen und läuft auf der Unterseite der Kutikula breit, was als schwarze Punkte erkennbar wird. Unbeschädigte Kutikulamembranen wurden für die weitere Versuchsdurchführung benutzt. Der Szintillationsadapter wurde auf der zur Kutikulamembran gerichteten Seite mit PTFE-Paste bestrichen, auf die Kammer gesetzt und der Rand mit Tesafilm (Tesa, Norderstedt, Deutschland) abgedichtet.

Die Transportkammern wurden auf Szintillationsgefäße gesetzt, in denen sich immer 1 ml einer KOH-Lösung [1 M] befand, und über Nacht bei 25 °C im Wärmeschrank äquilibriert. Als Negativkontrolle wurden die Kammern auf neue Szintillationsgefäße gesetzt und nach 1, 2, 4 und 6 Stunden ebenfalls auf neue Szintillationsgefäße gesetzt. Etwaige Kontaminationen konnten dadurch ausgeschlossen werden.

Danach wurden 100 µl einer Bakteriensuspension (OD 1) von *P. syringae* Wildtyp (WT) oder dem db KO auf die jeweiligen Kutikulamembranen pipettiert und über Nacht eintrocknen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Transportkammern wieder auf Szintillationsgefäße gesetzt und nach 1, 2, 4 und 6 Stunden auf jeweils neue Szintillationsgefäße gesetzt. Das produzierte  $^{14}\text{CO}_2$  reagiert im Szinti Vial mit KOH zu  $\text{K}_2^{14}\text{CO}_3$  und  $\text{H}_2\text{O}$  und ist somit gebunden. Die Luftfeuchtigkeit in den Szintillationsgefäßen betrug 100 %. Dadurch kristallisieren die Tenside nicht aus und die Bakterien sterben nicht (Abbildung 2).

Die Szintillationsgefäße wurden nach dem Experiment mit 5 ml Szintillationscocktail (Ultima Gold XR, Perkin Elmer) aufgefüllt und gevortext. Die Menge an durch bakteriellen Metabolismus freigesetzten  $^{14}\text{CO}_2$ , welches in Form von  $\text{K}_2^{14}\text{CO}_3$  gebunden wurde, wurde durch einen Szintillationszähler (Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2800TR, Perkin Elmer) ermittelt.  $^{14}\text{C}$  ist ein beta-strahlendes Radionuklid. Bei dem radioaktiven Zerfall wird die freiwerdende Energie mit Hilfe des Szintillationscocktails in Licht proportional zur Partikelenergie umgewandelt. Der Photoelektronenvervielfacher („*photomultiplier*“) fängt die Lichtquanten auf, die dann in digitale Form umgewandelt werden. Die gemessenen „*counts per minute*“ (cpm) werden mit Hilfe einer Quench-Kurve in „*Disintegrations per minute*“ (dpm) umgerechnet, sodass etwaige Löscheffekte und Quench-Effekte der einzelnen Proben herausgerechnet wurden (Vogt, 2004).

Um das Fehlen von Biotensiden bei *P. syringae* db KO zu komplementieren, wurden die Bakteriensuspensionen mit industriell hergestellten Tensiden angesetzt. Die Bakteriensuspension mit einer  $\text{OD}_{600}$  1 wurde nicht mit Aqua demin., sondern mit einer 0,1 %-igen Glucopton 215 CSUP- oder einer 0,1 %-igen Plurafac LF 300 Lösung versetzt. Als  $^{14}\text{C}$ -markierte Substanz wurde  $^{14}\text{C}$ -Fructose und Kutikulamembranen von *Populus canescens* verwendet. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie oben beschrieben.

### 2.6.1.2. Abbau aliphatischer $^{14}\text{C}$ -markierter Wachsmonomere durch *R. fascians*, *P. syringae* WT und db KO

In diesem Versuchsteil wurde getestet, ob und in welchem Maße die beiden epiphyllen Bakterien *R. fascians* und *P. syringae* langkettige aliphatische Wachsmonomere, aus denen pflanzliche Wachse bestehen, in Flüssigkultur abbauen.

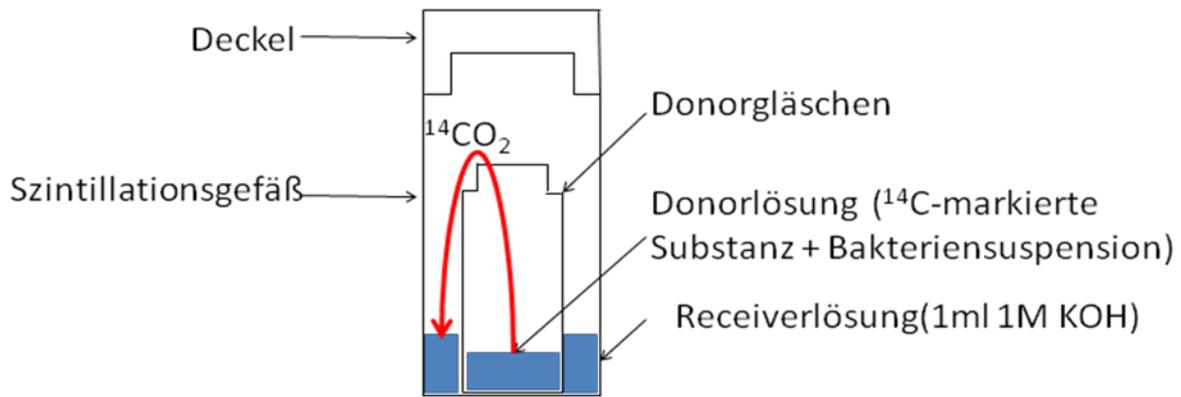
### 2.6.1.3. Abbau aliphatischer $^{14}\text{C}$ -markierter lipophiler Substanzen (Wachsmonomere) durch *R. fascians*, *P. syringae* WT und db KO in Flüssigkultur

Getestet wurden Octacosan, Hexacosansäure, Tetracosanol und Octadecansäure, die jeweils am C1-Atom  $^{14}\text{C}$ -markiert waren. Die spezifischen Aktivitäten der einzelnen Substanzen sind in Tabelle 5 aufgeführt.

**Tabelle 5:** Spezifische Aktivitäten der vier  $^{14}\text{C}$ -markierten aliphatischen Wachsmonomere

<i>Substanz</i>	<i>Spezifische Aktivität</i>
$^{14}\text{C}$ -Octacosan	55 mCi/mmol
$^{14}\text{C}$ -Hexacosansäure	50 mCi/mmol
$^{14}\text{C}$ -Tetracosanol	55 mCi/mmol
$^{14}\text{C}$ -Octadecansäure	53 mCi/mmol

Wenn die Substanzen abgebaut wurden, entstand  $^{14}\text{CO}_2$ , welches mittels KOH [1 M] gebunden wurde. Abbildung 3 zeigt den Versuchsaufbau. Szintillationsgefäße aus Glas gefüllt mit 1 ml KOH [1 M] dienten hier als Receiver, um das produzierte  $^{14}\text{CO}_2$  aufzufangen.

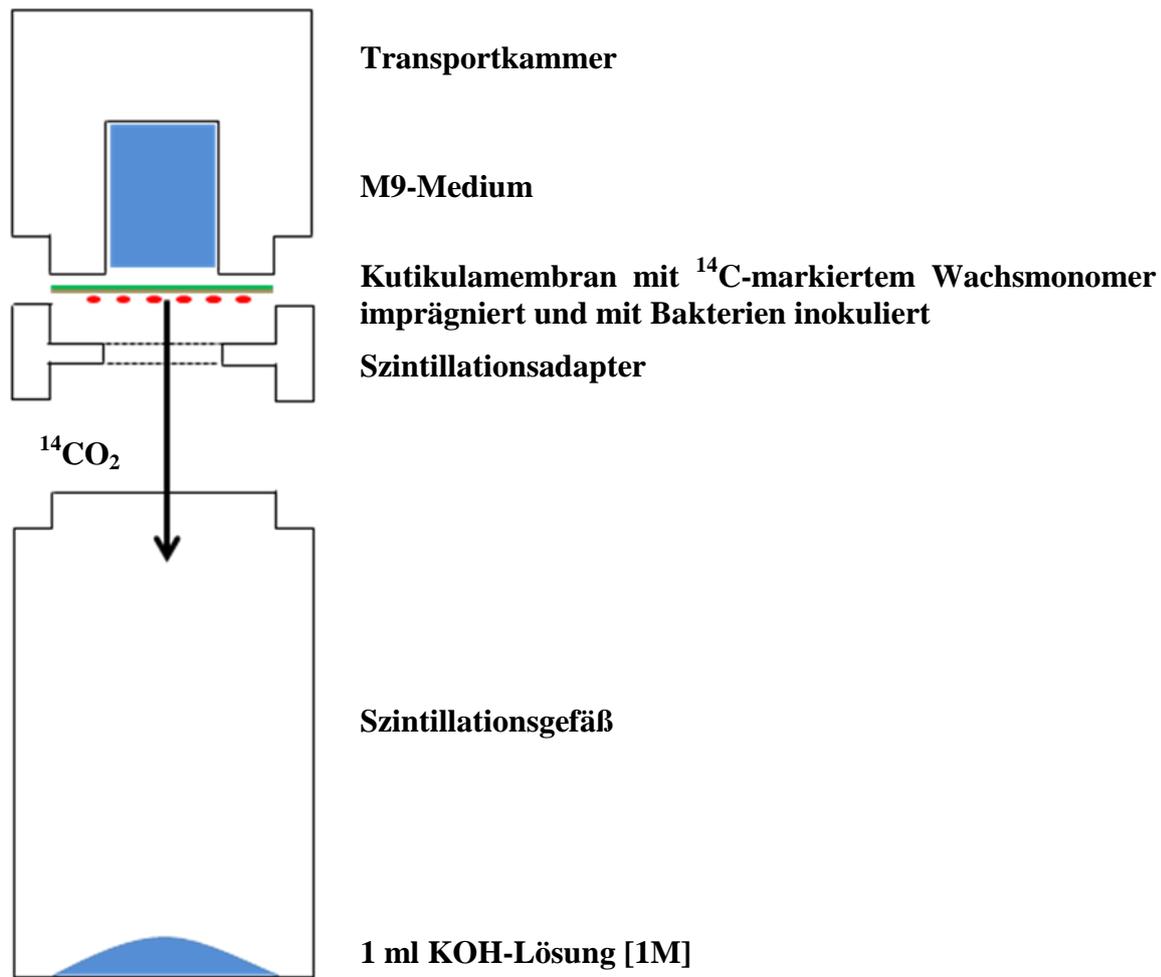


**Abbildung 3:** Versuchsaufbau des Abbaus  $^{14}\text{C}$ -markierter Wachsmomere durch *R. fascians*, *P. syringae* WT und db KO;  $^{14}\text{CO}_2$ , welches im Donorgläschen bei dem Abbau des  $^{14}\text{C}$ -markierten Wachsmonomeres durch das jeweilige Bakterium entsteht, wird in KOH-Lösung im Szintillationsgefäß in Form von  $\text{K}_2^{14}\text{CO}_3$  gebunden und kann mittels Szintillationszähler gemessen werden.

In die Szintillationsgefäße wurden kleinere Gläser gestellt. In diese kleineren Gläser wurden 400  $\mu\text{l}$  einer Bakteriensuspension in M9-Medium (OD 1) von *R. fascians*, *P. syringae* WT und db KO pipettiert. Dazu wurden 20  $\mu\text{l}$  der zu untersuchenden Wachskomponente [5000 dpm/ $\mu\text{l}$ ] pipettiert. Die Receiver-Lösung wurde täglich gewechselt, mit 5 ml Szintillationscocktail versetzt und die Radioaktivität mit dem Szintillationszähler (Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2800TR, Perkin Elmer) gemessen.

#### 2.6.1.4. Abbau aliphatischer $^{14}\text{C}$ -markierter lipophiler Substanzen (Wachsmomere) durch *R. fascians*, *P. syringae* WT und db KO auf isolierten Kutikulamembranen

Um im experimentellen Aufbau dem Lebensraum Phyllosphäre näher zu kommen, wurden isolierte Kutikulamembranen verwendet, die jeweils mit den  $^{14}\text{C}$ -radioaktiv markierten Wachskomponenten Octacosan, Hexacosansäure, Tetracosanol und Octadecansäure auf der physiologischen Außenseite imprägniert wurden (Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Versuchsaufbau zur Untersuchung des Abbaus  $^{14}\text{C}$ -markierter aliphatischer Wachsmonomere auf isolierten Kutikulamembranen durch epiphyllie Bakterien; Inokuliert wurde mit *R. fascians*, *P. syringae* WT oder db KO;  $^{14}\text{CO}_2$ , welches bei dem Abbau des  $^{14}\text{C}$ -markierten Wachsmonomeres durch das jeweilige Bakterium entsteht, wird in KOH-Lösung im Szintillationsgefäß in Form von  $\text{K}_2^{14}\text{CO}_3$  gebunden und kann mittels Szintillationszähler gemessen werden; modifiziert nach Schreiber (2001)

Zunächst wurden Transportkammern mit 800  $\mu\text{l}$  M9-Medium befüllt und die Ränder mit PTFE-Paste bestrichen. Auf die Ränder wurden *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen mit der physiologischen Außenseite nach oben eingespannt. Die Kammer wurde dann mit einem Adapter verschlossen, der von innen mit PTFE-Paste bepinselt war, und mit Tesaband abgedichtet. Wie in Obeschieden, wurde mittels Ethanol auf Dichtigkeit der Kutikulamembran getestet.

Es wurden 5x2  $\mu\text{l}$  (=10  $\mu\text{l}$ ) der jeweiligen  $^{14}\text{C}$ -markierten Substanz [5000dpm/ $\mu\text{l}$ ] auf die Kutikulamembran aufgegeben und jeweils gewartet bis das Lösungsmittel Ethanol verdampft war. Danach wurden 100  $\mu\text{l}$  Bakteriensuspension von *P. syringae* WT, db KO oder *R. fascians* in Aqua demin. (OD 1) aufpipettiert. Nach ca. einer Stunde war die

Bakteriensuspension eingetrocknet und die Transportkammern wurden kopfüber auf Szintillationsgefäße gesetzt, die mit 1 ml KOH [1M] gefüllt waren. Die Transportkammern wurden täglich auf neue Szintillationsgefäße gesetzt. In die benutzten Szintillationsgefäße wurden zur Messung 5 ml Szintillationscocktail gegeben, gevortext und die Radioaktivität mittels Szintillationszähler (Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2800TR, Perkin Elmer) gemessen. Das von den Bakterien durch Verstoffwechslung der  $^{14}\text{C}$ -markierten Wachsmonomere produzierte  $^{14}\text{CO}_2$  reagiert mit dem KOH in den Szintillationsgefäßen zu  $\text{K}_2^{14}\text{CO}_3$ .

### 2.6.2 Wachstum von *R. fascians* und *P. syringae* auf verschiedenen lipophilen Substraten (Paraffinwachse und Triglyceride)

Von *R. fascians* und *P. syringae* WT und db KO wurden Wachstumskurven auf verschiedenen Paraffinwachsen, die als dem Wachs ähnliche lipophile C-Quellen betrachtet werden können, mit den Schmelzpunkten 42 °C, 52 °C, 69 °C und 90 °C, Paraffinöl und Sonnenblumenöl (Netto Markendiscout), angefertigt.

Vorkulturen wurden in 100 ml Erlenmeyerkolben in jeweils 50 ml Coryne-Medium für *R. fascians* und KB-Medium für *P. syringae* WT und db KO bei 25 °C bei 150 rpm angezogen. *R. fascians* Vorkulturen wurden 2 Tage, *P. syringae* Vorkulturen 1 Tag angezogen. Die Kulturen wurden in 50 ml Falcon-Tubes überführt und 10 Minuten bei 2000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und erneut 50 ml Aqua demin. hinzugegeben und das Pellet durch Vortexen gelöst. Die wässrige Bakteriensuspension wurde für 10 Minuten bei 2000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen. Das Pellet wurde in 50 ml Aqua demin. resuspendiert.

Für die Hauptkulturen wurden 500 ml Erlenmeyerkolben mit 200 ml M9-Medium befüllt. Dem M9-Medium wurden 2 % der jeweiligen C-Quelle beigefügt. Die Hauptkulturen wurden mit 3 ml der Bakteriensuspensionen angeimpft. Es wurde täglich die  $\text{OD}_{600}$  gemessen. Bei Werten über 1 wurde die Probe verdünnt und die tatsächliche  $\text{OD}_{600}$  mittels des Verdünnungsfaktors rückgerechnet. Das Wachstum von *P. syringae* WT und db KO wurde nicht auf den Paraffinwachsen 52 °C, 69 °C und 90 °C gemessen, da sie schon auf dem Paraffinwachs 42 °C nicht wuchsen.

## 2.7 Auswertung und graphische Darstellung der Daten

Die Chromatogramme der gaschromatographischen Analyse der Kohlenhydrate wurden mit Hilfe der Software GC-Chemstation (Hewlett Packard Corporation, USA) ausgewertet. Die Peaks der einzelnen Substanzen, die auf Bohnenblättern mittels Standards und Massenspektroskopie identifiziert wurden, wurden integriert. Mit der Hilfe der Peakflächen und dem Standard konnten die Stoffmengen pro Fläche und pro Masse berechnet werden (Formel 1).

**Formel 1:** Formel zur Berechnung der Menge einer gaschromatographisch analysierten Substanz

$$\text{Substanzmenge} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{cm}^2 \text{ oder } \text{g}} \right) = \frac{\text{Peakfläche Stoff } x \times \text{Masse interner Standard } (\mu\text{g})}{\text{Peakfläche des internen Standards} \times \text{Bezugsgröße der Probe } (\text{cm}^2 \text{ oder } \text{g})}$$

Die Datenauswertung wurde mit dem Programm MS-Excel (Microsoft, USA) durchgeführt. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe von SigmaPlot (SigmaPlot, USA). Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm OriginPro9 (OriginLab, USA) ausgeführt. Um Signifikanzen zwischen Datensätzen zu ermitteln, wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Das Signifikanzlevel wurde auf  $p \leq 0,05$  gesetzt.

### **3. Ergebnisse**

### 3.1 Oberflächenspannungs- und Kontaktwinkelmessungen der Bakteriensuspensionen

Tenside und somit auch Biotenside setzen die Oberflächenspannung von Wasser herab, erhöhen durch ihre Amphiphilie die Benetzbarkeit von hydrophoben Oberflächen mit Wasser und verkleinern den Kontaktwinkel. Die Oberflächenspannungen und Kontaktwinkel der einzelnen Bakteriensuspensionen (OD 1) auf Parafilm zeigt Tabelle 6.

Die Suspension von *P. syringae* WT weist eine Oberflächenspannung von  $26,5 \pm 0,35$  mN/m und einen Kontaktwinkel von  $54,3 \pm 2,75^\circ$  auf. Die Suspension von *P. syringae* db KO zeigt eine höhere Oberflächenspannung von  $52,65 \pm 2,18$  mN/m und einen höheren Kontaktwinkel von  $91,67 \pm 3,6^\circ$ , liegt aber unter der Negativkontrolle, dem KB-Agar-Abwasch, der eine Oberflächenspannung von  $64,56 \pm 0,8$  mN/m und einen Kontaktwinkel von  $103,8 \pm 2,11^\circ$  aufweist.

Eine *R. fascians* Bakteriensuspension mit einer OD von 1 hat eine Oberflächenspannung von  $55,01 \pm 1,1$  mN/m und einen Kontaktwinkel auf Parafilm von  $95,27 \pm 0,97^\circ$ . Die zugehörige Negativkontrolle, der Abwasch einer Coryne-Agarplatte, hat eine Oberflächenspannung von  $62,25 \pm 0,45$  mN/m und einen Kontaktwinkel von  $103,18 \pm 1,53^\circ$  und liegt damit höher. Aqua demin. hat die höchsten Werte bei Oberflächenspannung und Kontaktwinkel.

**Tabelle 6:** Oberflächenspannungen und Kontaktwinkel auf Parafilm der Bakteriensuspensionen (OD 1) und der Abwaschungen der zugehörigen Agarplatten. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

	Oberflächenspannung [mN/m]	Kontaktwinkel [°] auf Parafilm
<i>P. syringae</i> WT	$26,5 \pm 0,35$	$54,3 \pm 2,75$
<i>P. syringae</i> db KO	$60,65 \pm 2,18$	$99,67 \pm 3,6$
KB-Agar	$64,56 \pm 0,8$	$103,8 \pm 2,11$
<i>R. fascians</i>	$61,01 \pm 1,1$	$100,27 \pm 0,97$
Coryne-Agar	$62,25 \pm 0,45$	$103,18 \pm 1,53$
Aqua demin.	$74,31 \pm 0,17$	$111,52 \pm 1,47$

## 3.2 Chemisch-analytische Untersuchungen

### 3.2.1 Chemisch-analytische Untersuchungen von Kohlenhydraten: Methodenentwicklung

Die Phyllosphäre stellt einen nährstoffarmen Lebensraum dar. Um die geringen Mengen an Kohlenhydraten, die auf der pflanzlichen Kutikula zu finden sind, zu analysieren, bietet sich die Gaschromatographie an. Bevor Kohlenhydrate jedoch gaschromatographisch analysierbar sind, müssen sie derivatisiert werden, sodass die polaren funktionellen Gruppen kaschiert werden. Dadurch werden die Moleküle hydrophober und gelangen bei Temperaturen bis 310 °C in die Gasphase. Hierfür wurden eine einstufige und eine zweistufige Derivatisierungsmethode verglichen.

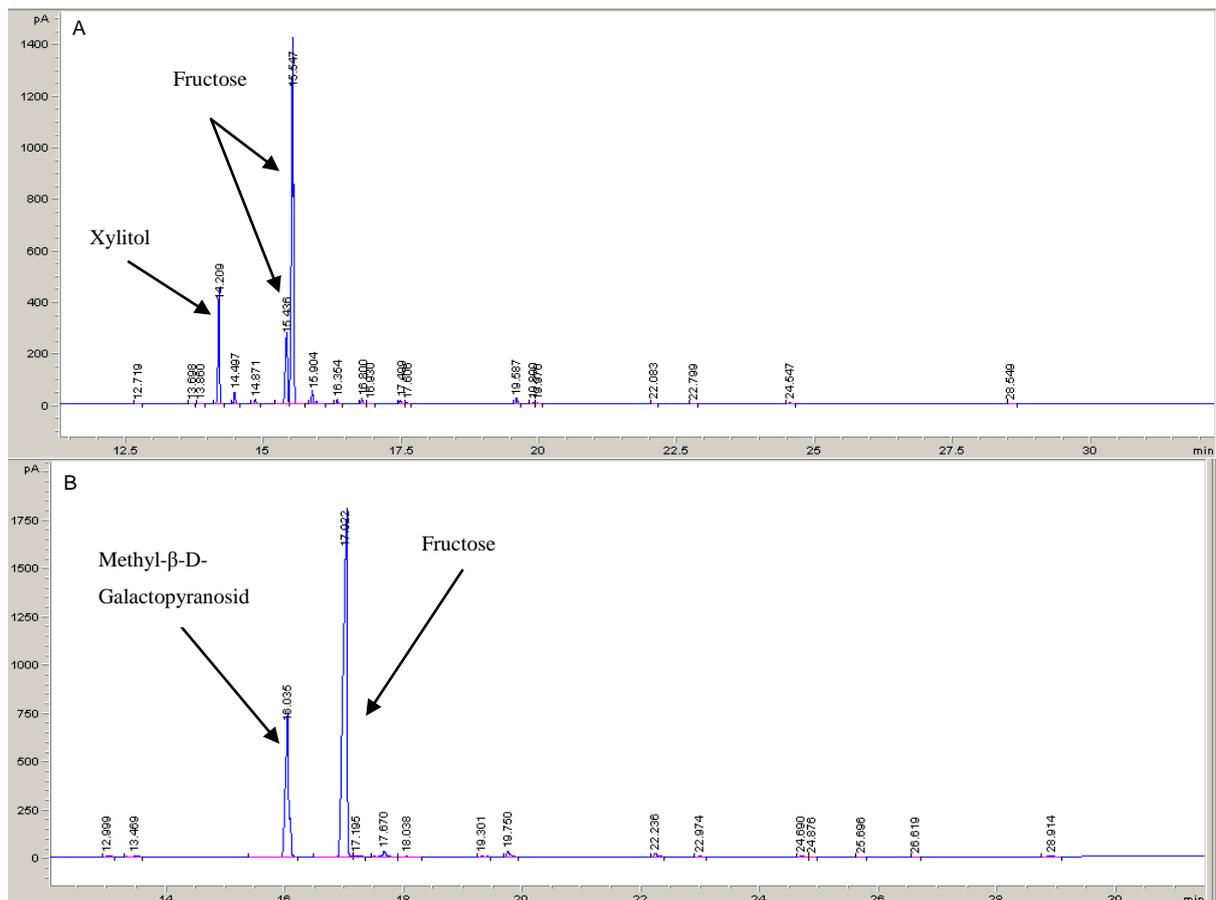
Bei der einstufigen Derivatisierung wurden die Hydroxylgruppen der Kohlenhydrate mittels BSTFA zu ihren Trimethylsilyl-Derivaten verethert. Bei der zweistufigen Derivatisierung wurden die Oxo-Gruppen der Kohlenhydrate in einem ersten Derivatisierungsschritt zu einem Oxim umgeformt. In einem zweiten Schritt wurden die Hydroxylgruppen wie bei der einstufigen Derivatisierung zu Trimethylsilyl-Derivaten verethert. Abgekürzt werden die einstufig derivatisierten Moleküle TMS-Derivate und die zweistufig derivatisierten Moleküle EO-TMS-Derivate genannt.

Die zweistufige Derivatisierung von Kohlenhydraten wurde modifiziert nach Becker et al. (2013) durchgeführt. Um die Derivatisierungsmethode für die Analyse von Kohlenhydraten, die auf der pflanzlichen Kutikula zu finden sind, zu optimieren, musste das Volumen des Derivatisierungsansatzes verringert werden. Zu große Ansatzvolumina würden dazu führen, dass die geringen Mengen an zu analysierenden Kohlenhydraten so stark verdünnt würden, dass sie nicht mehr detektierbar sind.

Ziel war es auch mit Hilfe der zweistufigen Derivatisierung die Anzahl der Peaks einer jeweiligen Substanz zu minimieren.

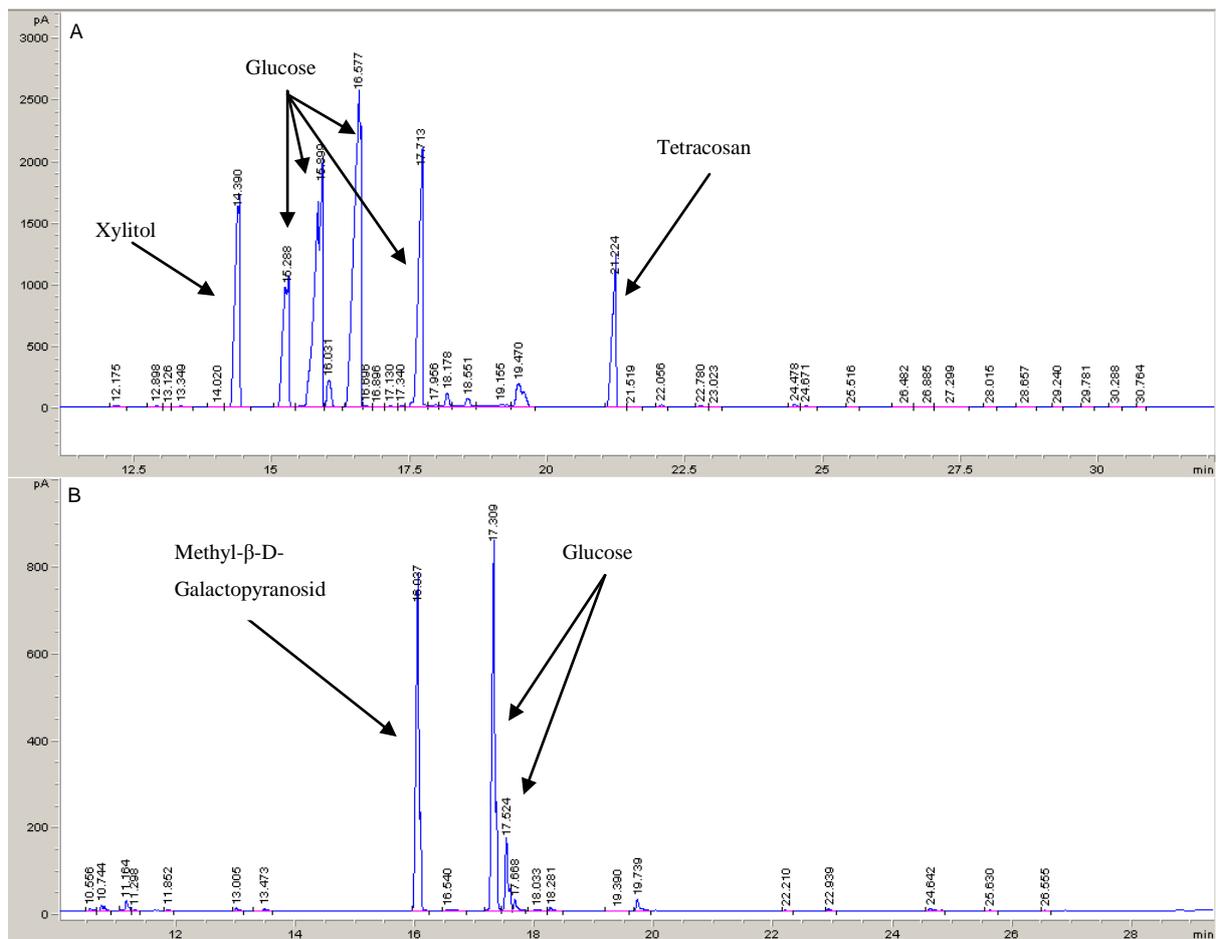
Im Folgenden wurde die einstufige mit der zweistufigen Derivatisierung im gaschromatographischen Auftrennungsverhalten verglichen. Fructose eluiert in zwei Peaks, wenn sie einstufig derivatisiert wurde. Der erste Peak eluiert nach 15,4 Minuten, der zweite Peak nach 15,5 Minuten (Abbildung 5 A). Der Peak bei 14,2 Minuten entspricht dem Zuckeralkohol Xylitol, der bei diesem Versuchsansatz als interner Standard verwendet wurde. Wird Fructose in zwei Stufen derivatisiert, eluiert sie in einem einzigen Peak nach 17

Minuten. Als interner Standard wurde bei diesem Versuchsansatz Methyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid verwendet, welches nach 16 Minuten eluiert (Abbildung 5 B).



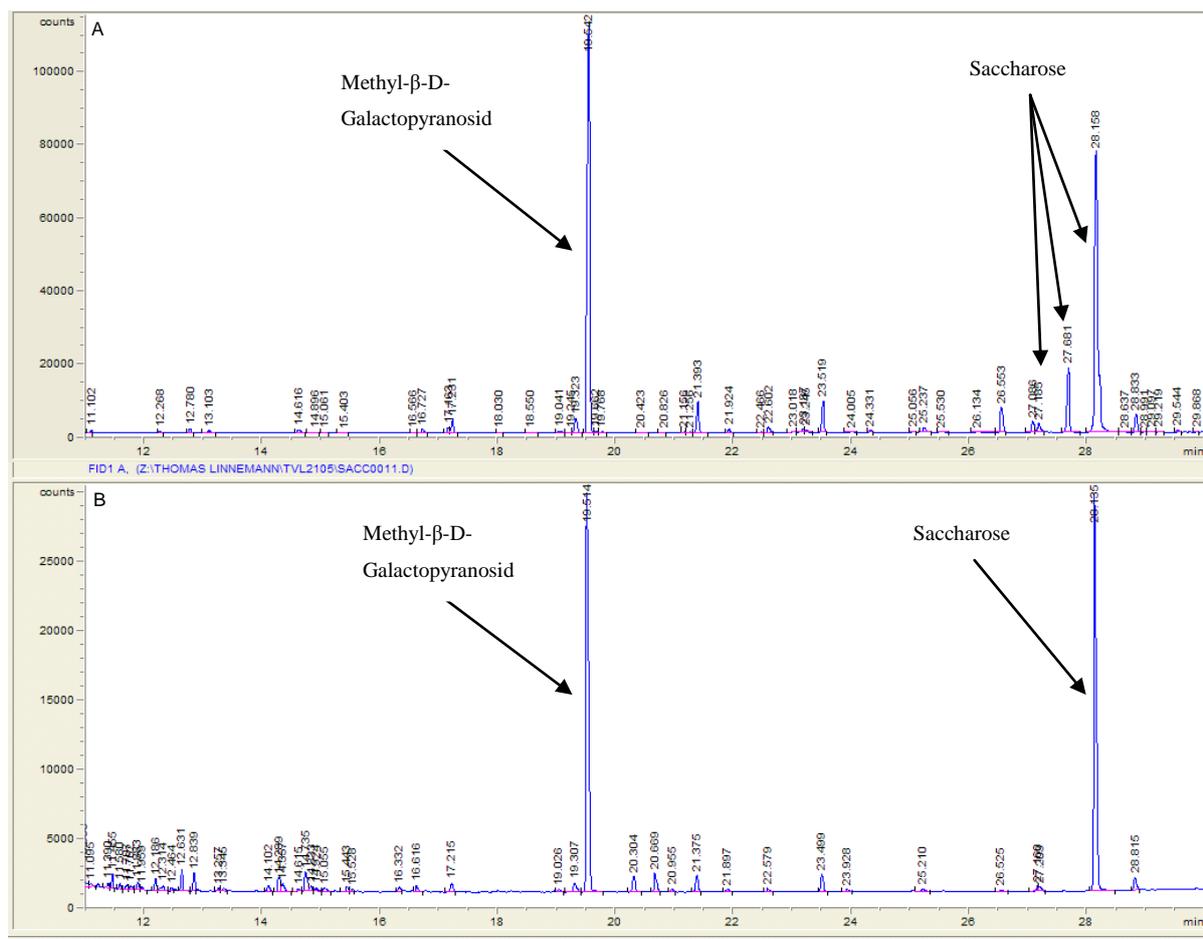
**Abbildung 5:** Darstellungen der gaschromatographischen Auftrennung und Detektion mittels FID von Fructose einstufig (A) und zweistufig (B) derivatisiert

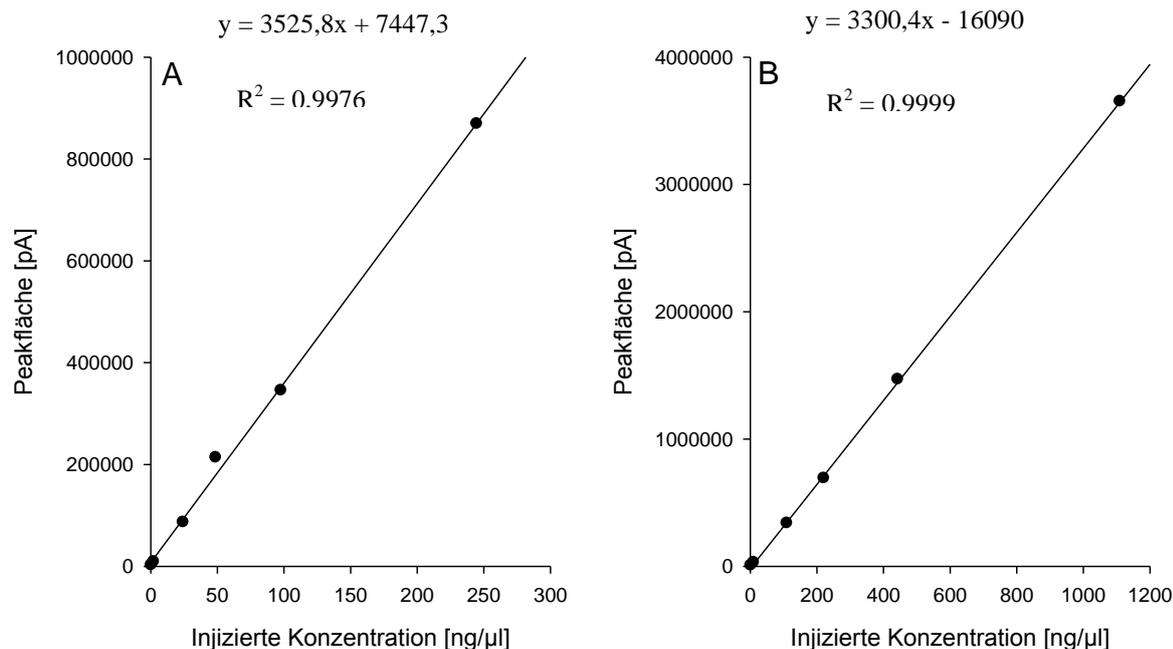
Bei der einstufigen Derivatisierung von Glucose zu ihren TMS-Derivaten, entstehen 4 Peaks, die nach 15,2, 15,9, 16,6 und 17,7 Minuten eluieren (Abbildung 6 A). In diesem Versuchsansatz wurden Xylitol (14,4 Minuten) und Tetracosan (21,2 Minuten) als interne Standards verwendet. Durch die zweistufige Derivatisierung reduzierte sich die Anzahl der Peaks auf zwei, einen ersten Peak nach 17,3 Minuten und einen zweiten Peak nach 17,5 Minuten (Abbildung 6 B). Der interne Standard war in dem zweistufigen Derivatisierungsansatz Methyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid, welches nach 16 Minuten eluiert.



**Abbildung 6:** Darstellungen der gaschromatographischen Auftrennung und Detektion mittels FID von Glucose einstufig (A) und zweistufig, (B) derivatisiert

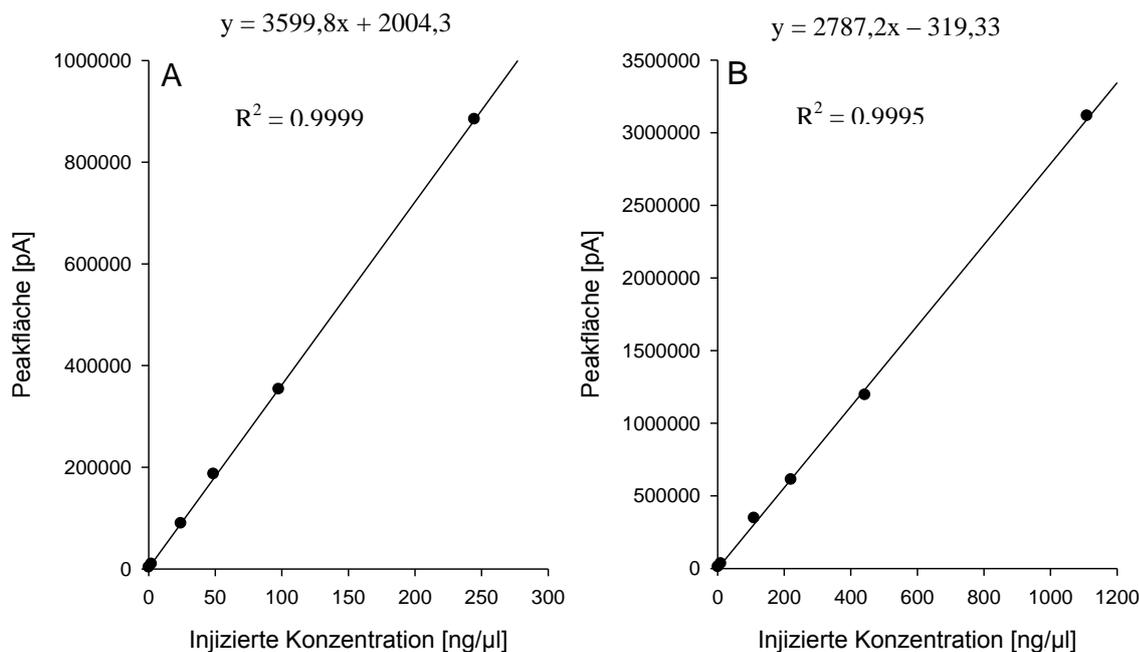
Als drittes exemplarisches Kohlenhydrat wurde das Disaccharid Saccharose nach ein- und zweistufiger Derivatisierung in seinem chromatographischen Auftrennungsverhalten untersucht (Abbildung 7). Derivatisiert man Saccharose einstufig zeigen sich drei Peaks nach 27,2, 27,7 und 28,2 Minuten (Abbildung 7 A). Die zweistufige Derivatisierung führt zu einer Reduktion der Anzahl auf einen einzelnen Peak nach 28,1 Minuten (B). Bei beiden Derivatisierungsmethoden wurde Methyl-β-D-Galactopyranosid als interner Standard verwendet, der nach 19,5 Minuten eluiert (Abbildung 7).





**Abbildung 8:** Verdünnungsreihen von EO-TMS-Derivaten (A) und TMS-Derivaten (B) der Fructose. Dargestellt sind die injizierten Mengen auf eine DB-1 Kapillarsäule gegen die Peakflächen; Im Falle von mehreren Peaks pro Substanz wurden die Peakflächen aufaddiert.

Abbildung 8 zeigt die Verdünnungsreihen für Fructose mit den zwei Derivatisierungsmethoden. In Abbildung 8 A sind die Peakflächen verschiedener injizierter Fructosemengen, die zu ihren EO-TMS-Derivaten derivatisiert wurden, dargestellt. In Abbildung 8 B wurden verschiedene Fructosemengen mittels der einstufigen Derivatisierung zu ihren TMS-Derivaten verethert. Beide Verdünnungsreihen weisen einen Regressionskoeffizienten besser als 0,99 auf, was bei beiden Derivatisierungsmethoden auf eine sehr gute Linearität hindeutet.



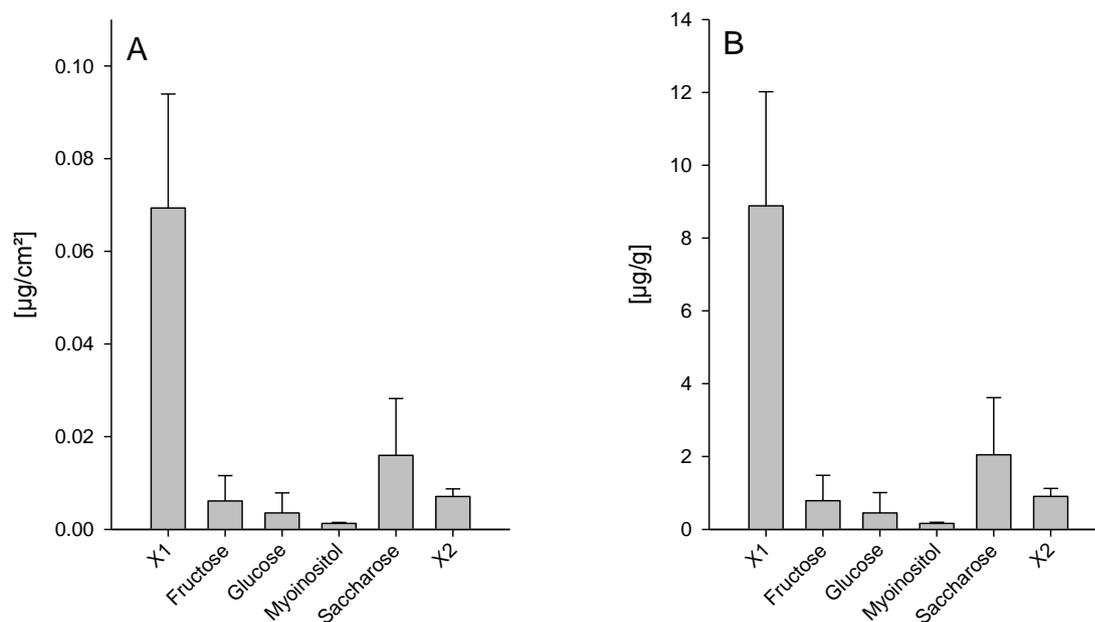
**Abbildung 9:** Verdünnungsreihen von Saccharose. A: EO-TMS-Derivate; B: TMS-Derivate. Dargestellt sind die injizierten Mengen auf eine DB-1 Kapillarsäule gegen die Peakflächen; Im Falle von mehreren Peaks pro Substanz wurden die Peakflächen aufaddiert.

Die Verdünnungsreihen von Saccharose als EO-TMS-Derivate (A) und TMS-Derivate (B) sind in Abbildung 9 aufgezeigt. Beide Kurven weisen auch hier einen Regressionskoeffizienten auf, der besser als 0,99 ist, was auf eine sehr gute Linearität deutet. Die niedrigste eingesetzte Menge an EO-TMS derivatisierter Fructose und Saccharose betrug 0,49 ng/µl. Die niedrigste injizierte Menge der TMS-derivatisierten Fructose und Saccharose betrug 2,2 ng/µl.

### 3.2.2 Chemisch-analytische Untersuchungen von Kohlenhydraten auf der Kutikula von Bohnenblättern (*Phaseolus vulgaris*)

Diese zweistufige Derivatisierung von Zuckern wurde etabliert, um Kohlenhydrate gaschromatographisch zu analysieren, die auf der Kutikula von Bohnenblättern (*Phaseolus vulgaris*) zu finden sind. Als interner Standard wurde Methyl-β-D-Galactopyranosid verwendet. Der Zuckeralkohol Xylitol wurde nicht verwendet, da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass es natürlich auf der Kutikula von *Phaseolus vulgaris* vorkommt. Tetracosan ist ein Alkan, welches als interner Standard bei der gaschromatographischen Analyse von pflanzlichen Wachsen eingesetzt wird. Ein interner Standard sollte immer zur Stoffklasse der zu analysierenden Substanzen gehören. Daher wurde Tetracosan nicht als

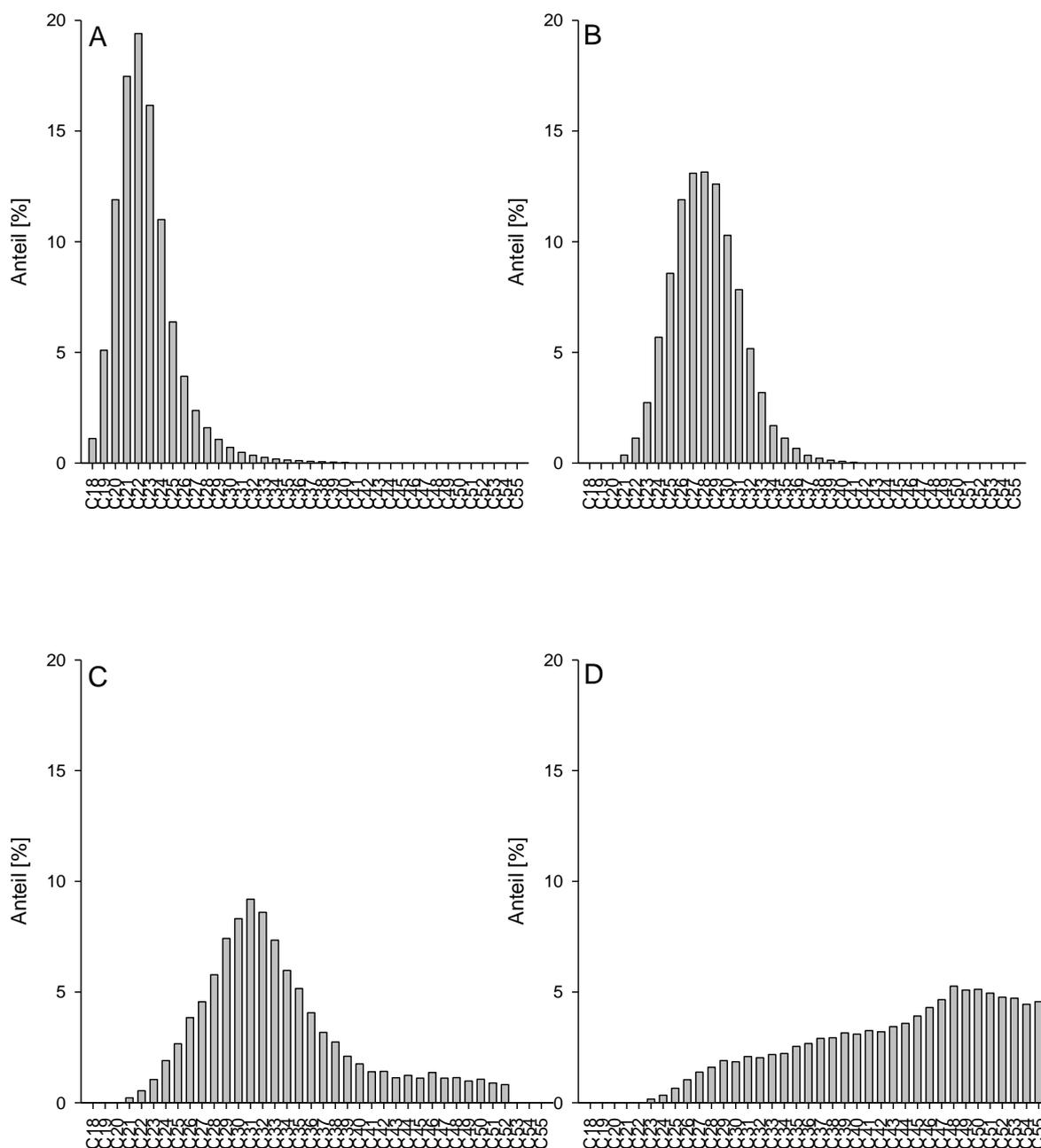
interner Standard verwendet. Die Darstellung der sechs analysierten Substanzen, die auf der pflanzlichen Kutikula von *Phaseolus vulgaris* gefunden wurden, sind in der Reihenfolge ihrer Elution in Abbildung 10: dargestellt. Vier der Substanzen konnten mit Hilfe von Standards identifiziert werden. Zwei Substanzen konnten nicht eindeutig identifiziert werden. Mit Hilfe der NIST-Library kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei X1 um einen Zucker und bei X2 um ein Flavonoid handelt. Die Konzentrationen konnten mit Hilfe des internen Standards Methyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid ermittelt werden. Für Monosaccharide beträgt der Korrekturfaktor 0,8, für Zuckeralkohole 0,7 und für Saccharose 1. Bei X1 wurde der Korrekturfaktor 0,8 angewandt, da die Massenspektroskopie zeigen konnte, dass es sich um ein Monosaccharid handelt. Bei X2 wurde kein Korrekturfaktor angewandt. Dies ist bei der Interpretation der Daten zu beachten. Saccharose machte bei den identifizierten Substanzen mit  $0,016 \pm 0,012 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $2,05 \pm 1,57 \mu\text{g}/\text{g}$ ; Frischgewicht) den größten Anteil an der Gesamtzuckermenge aus. Fructose folgt mit  $0,006 \pm 0,005 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $0,79 \pm 0,7 \mu\text{g}/\text{g}$ ; Frischgewicht) und Glucose mit  $0,004 \pm 0,004 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $0,45 \pm 0,55 \mu\text{g}/\text{g}$ ; Frischgewicht). Myoinositol fand man mit  $0,001 \pm 0,0002 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $0,16 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{g}$ ; Frischgewicht). Den größten Anteil der sechs Substanzen machte die unbekannte Substanz X1 mit  $0,07 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $8,89 \pm 3,13 \mu\text{g}/\text{g}$ ; Frischgewicht) aus. Die zweite unbekannte Substanz X2 war mit  $0,007 \pm 0,002 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $0,91 \pm 0,21 \mu\text{g}/\text{g}$ ; Frischgewicht) zu finden. Die ermittelte Gesamtmenge der hydrophilen Substanzen auf der Kutikula von *Phaseolus vulgaris* betrug  $0,1 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $13,25 \pm 5,5 \mu\text{g}/\text{g}$ ; Frischgewicht). Ohne die nicht eindeutig identifizierten Substanzen X1 und X2 betrug die Gesamtmenge  $0,03 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $3,45 \pm 2,8 \mu\text{g}/\text{g}$ ; Frischgewicht).



**Abbildung 10:** Darstellung der Kohlenhydrate, die auf der Kutikula von *Phaseolus vulgaris* mittels Gaschromatographie analysiert wurden in  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (A) und  $\mu\text{g}/\text{g}$  (B); Analysiert wurden die EO-TMS-Derivate der einzelnen Substanzen, die mittels der zweistufigen Derivatisierung hergestellt wurden. n=4

### 3.2.3 Chemisch-analytische Untersuchungen verschiedener Paraffinwachse

Vier verschiedene Paraffinwachse mit unterschiedlichen Schmelzpunkten wurden gaschromatographisch analysiert, um die chemische Zusammensetzung der Einzelsubstanzen zu ermitteln. Das Ergebnis der gaschromatographischen Analyse der vier Paraffinwachse, die als C-Quelle bei den Wachstumsversuchen von *R. fascians* dienen ist in Abbildung 11 dargestellt. Aufgrund der unterschiedlichen Kettenlängenverteilungen der Alkane, der einzigen Bestandteile der Paraffinwachse, haben die vier Paraffinwachse unterschiedliche Schmelzpunkte.



**Abbildung 11:** Gaschromatographische Analyse vier verschiedener Paraffinwaxe mit den Schmelzpunkten 42 °C (A), 52 °C (B), 69 °C (C) und 90 °C (D). Dargestellt sind die verschiedenen Kettenlängen der Alkane und ihr Anteil am Gesamtwachs in %. Dargestellt sind Einzelreplikate

Das Paraffinwachs mit dem Schmelzpunkt 42 °C (Abbildung 11 A) enthält zu mehr als 90 % Alkane der Kettenlängen C18 bis C29. Alkane, die mehr Kohlenstoffatome als 29 bis 45 besaßen, wurden in Spuren weniger als 1 % detektiert. Die Alkane mit den Kettenlängen C20 bis C24 machen jeweils mehr als 10 % der Gesamtwachsmenge aus.

Das Paraffinwachs mit dem Schmelzpunkt 52 °C (Abbildung 11 B) besteht zu mehr als 90 % aus Alkanen der Kettenlängen C21 bis C35. Alkane mit höherer Kettenlänge bis C43 wurden in Spuren weniger als 1 % detektiert. Die Kettenlängen C23 bis C27 machen jeweils mehr als 10 % des Gesamtwachses aus.

Das Paraffinwachs mit dem Schmelzpunkt 69°C (Abbildung 11 C) weist eine breitere Kettenlängenverteilung auf als die vorherigen beiden Paraffinwachse. Hier machen die Kettenlängen C25 bis C39 mehr als 80 % der Gesamtwachsmenge aus. Die Kettenlängen C21 bis C24 und C40 bis C52 machen jeweils weniger als 2 % des Gesamtwachses aus.

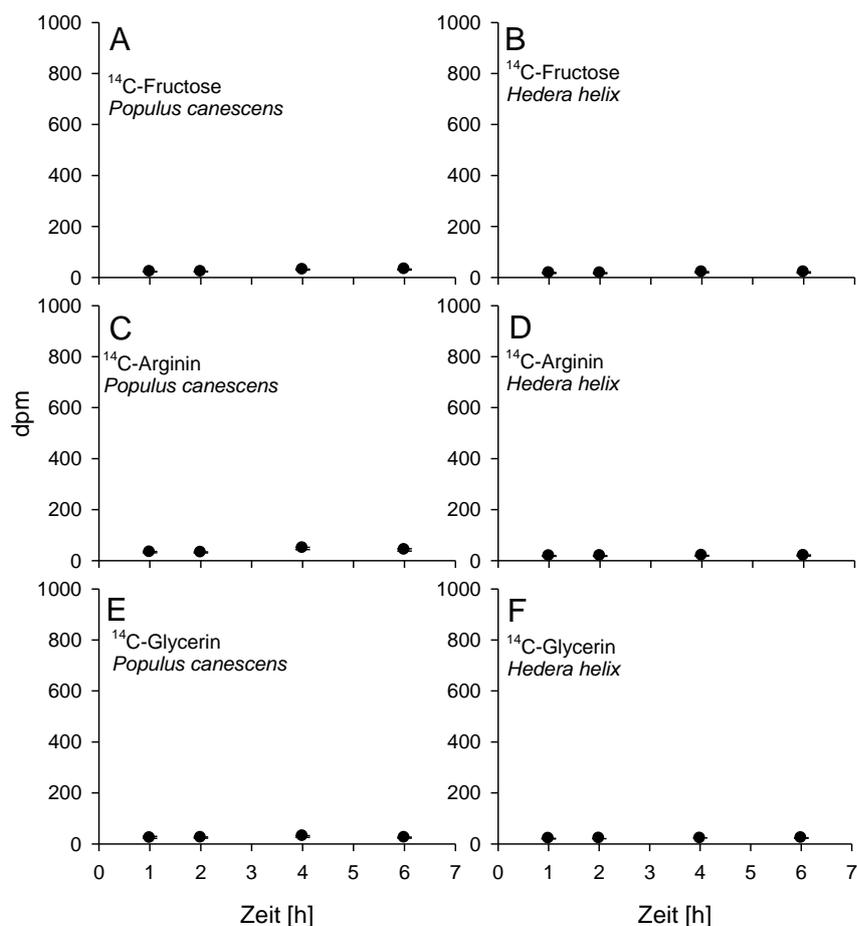
Das Paraffinwachs mit dem Schmelzpunkt 90°C zeigt eine sehr breite Verteilung der Kettenlängen der Alkane auf (Abbildung 11 D). Die Kettenlängen C23 bis C25 kommen jeweils unter 1 % vor. Die Kettenlängen C26 bis C30 machen jeweils einen Anteil von 1,03 bis 1,85 % aus. Zwischen 2,09 und 2,93 % kommen die Kettenlängen C31 bis C38 vor. Die Kettenlängen C39 bis C45 machen jeweils zwischen 3,15 und 3,91 % am Gesamtwachsgehalt aus. Zwischen 4,3 und 4,66 % machen die Kettenlängen zwischen C51 und C55 und C46 und C47 aus. Die Kettenlängen von C48 bis C50 machen jeweils einen Anteil von 5,09 bis 5,27 % aus. Die Kettenlängen C31 bis C55 machen zusammen mehr als 90 % des Gesamtwachsgehaltes aus.

### 3.3 Untersuchungen zum Metabolismus verschiedener C-Quellen

#### 3.3.1 Radiochemische Untersuchungen

##### 3.3.1.1 Einfluss von Biotensiden auf den Metabolismus potenzieller <sup>14</sup>C-markierter C-Quellen, die durch die Kutikula diffundieren

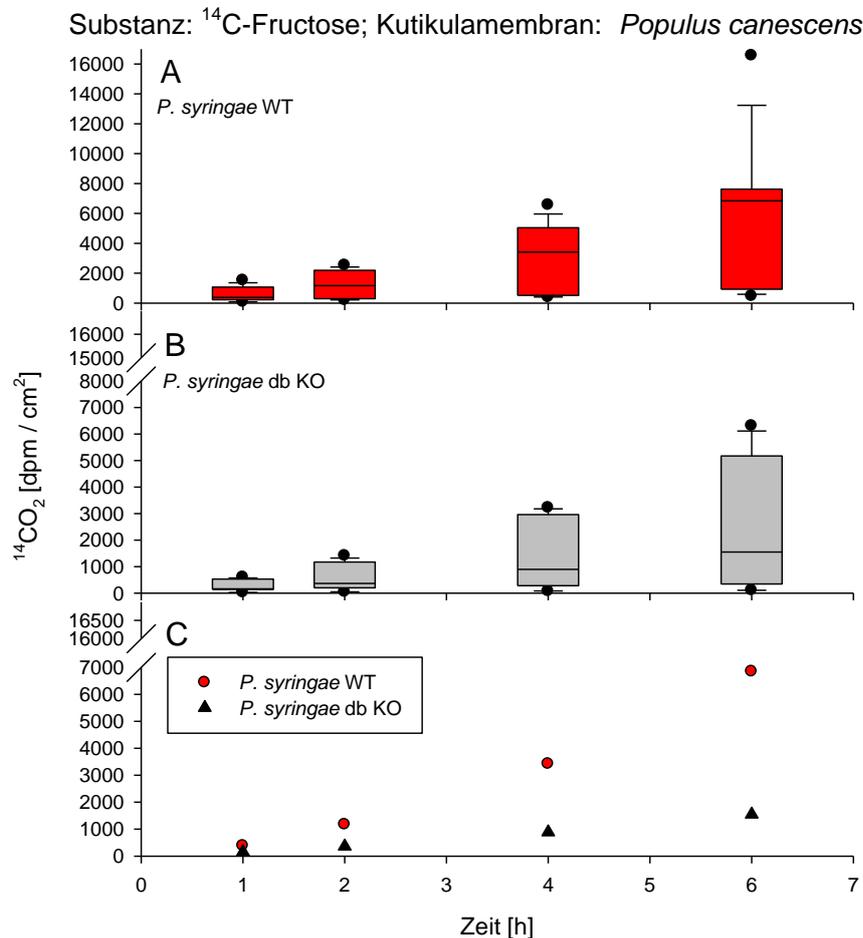
Die Transportkammern wurden mit unterschiedlichen <sup>14</sup>C-markierten Substanzen befüllt. Diese konnten als potenzielle C-Quelle für *P. syringae* dienen, nachdem sie durch die Kutikulamembran diffundiert sind. Der Einfluss bakterieller Biotenside auf die Fähigkeit hydrophile Substanzen, die durch die pflanzliche Kutikula diffundiert sind, auszuwaschen, wurde dann indirekt durch die Menge an <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> ermittelt, welches durch die auf der Außenseite der isolierten Kutikulamembranen aufgetragenen *P. syringae* WT und db KO produziert wurde.



**Abbildung 12:** Messungen der Negativkontrollen mit dem Szintillationszähler vor Applikation von 100  $\mu\text{l}$  Bakteriensuspensionen ( $\text{OD}_{600}$  1) von *P. syringae* WT oder db KO. Gemessen wurde über 6 Stunden und die einzelnen Werte wurden nicht aufaddiert. In den Transportkammern befanden sich 800  $\mu\text{l}$  einer 2000 dpm/ $\mu\text{l}$  konzentrierten  $^{14}\text{C}$ -Fructoselösung (A, B),  $^{14}\text{C}$ -Argininlösung (C, D) oder einer 1000 dpm/ $\mu\text{l}$  konzentrierten Glycerinlösung (E, F); Die verwendeten Kutikulamembranen waren *Populus canescens* (A, C, E) und *Hedera helix* (B, D, F); dargestellt sind Mediane und oberes und unteres Quartil; n = 5-10

Vor jeder Versuchsreihe wurden nach 1, 2, 4 und 6 Stunden als Negativkontrolle die Szintillationsgefäße gewechselt und im Szintillationszähler gemessen (Abbildung 12). Die Mediane befinden sich zwischen 20,9 dpm und 24,8 dpm. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass die Lösungen oder die Kutikulamembranen kontaminiert waren. Die Werte liegen im Bereich der Receiverlösung (1 ml KOH [1 M]), die Messwerte zwischen 16 dpm bis 34 dpm zum Ergebnis haben, da die KOH-Lösung durch das natürlich vorkommende Isotop  $^{40}\text{K}$  selbst radioaktiv ist. Danach wurden die Kutikulamembranen mit *P. syringae* WT und *P. syringae* db KO inokuliert und nach 24 Stunden erneut eine Messreihe über 6 Stunden durchgeführt, um das produzierte  $^{14}\text{CO}_2$ , welches bei dem Abbau der durch die

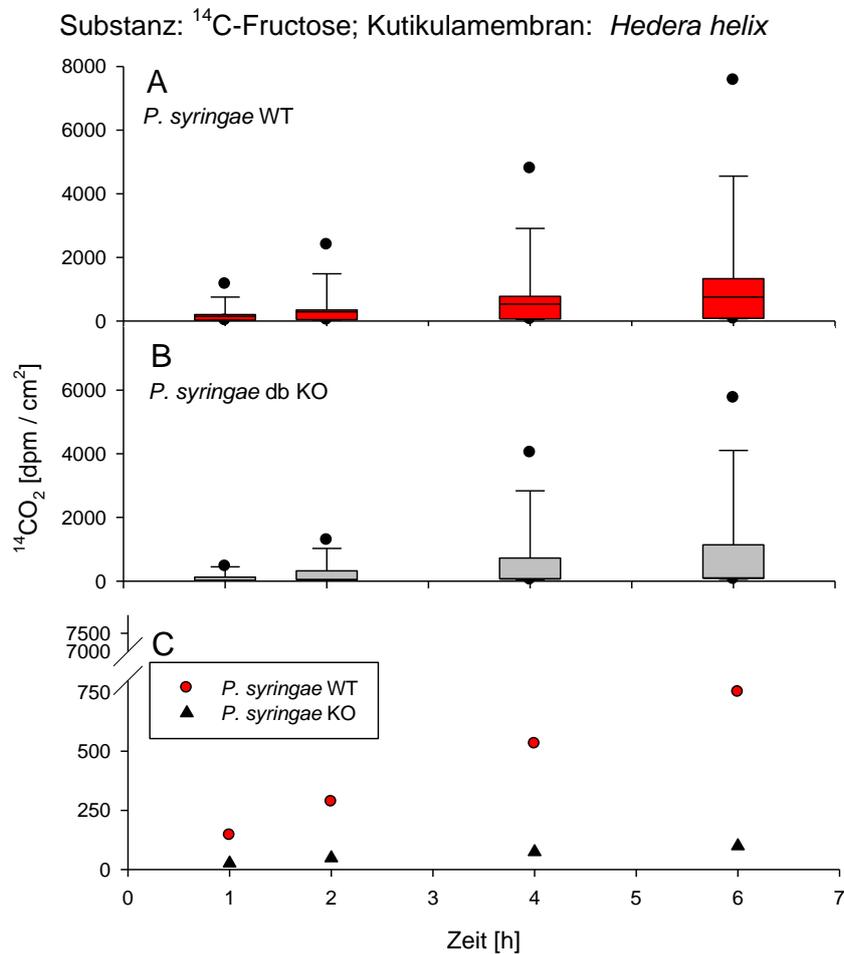
Kutikulamembran von *Populus canescens* und *Hedera helix* diffundierten hydrophilen Substanzen entsteht, zu messen.



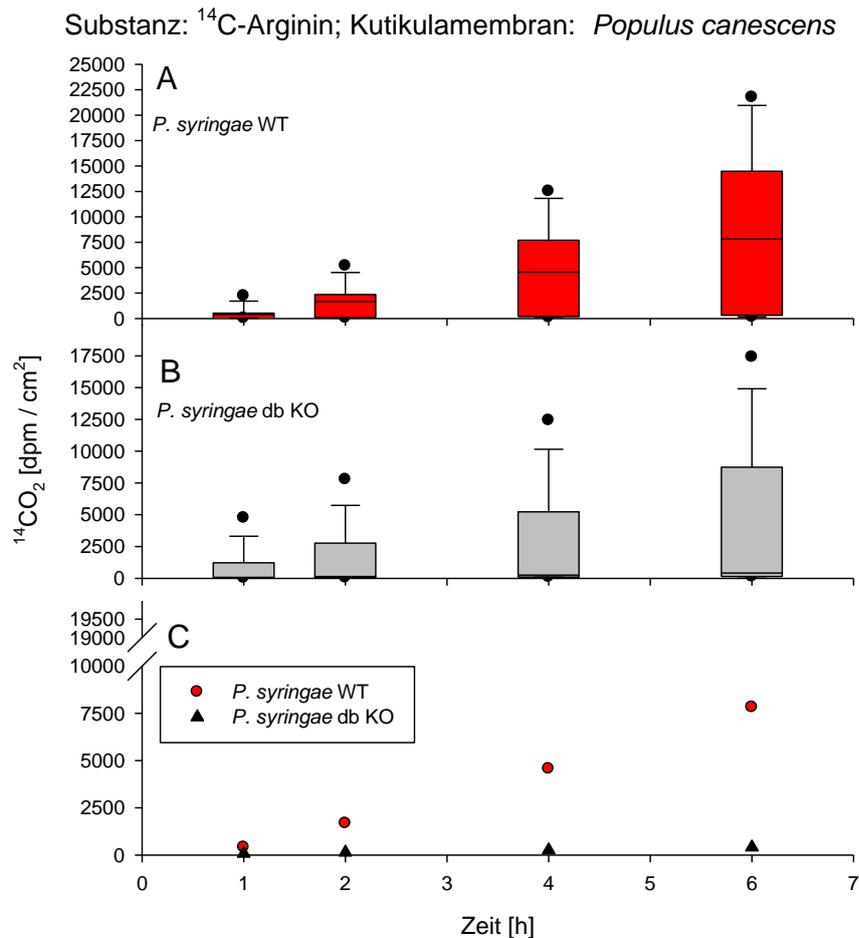
**Abbildung 13:** Messungen der  $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung 24 Stunden nach Inokulation von *Populus canescens* Kutikulamembranen mit 100  $\mu\text{l}$  einer Bakteriensuspension von *P. syringae* WT bzw. db KO ( $\text{OD}_{600}$  1). Das Donorkompartiment enthielt 800  $\mu\text{l}$  einer wässrigen Lösung von  $^{14}\text{C}$ -Fructose (2000 dpm/ $\mu\text{l}$ ). Die gemessene Radioaktivität wurde aufaddiert. Dargestellt sind Boxplots (A und B) und Mediane (C). Die Boxen reichen vom 25. Perzentil zum 75. Perzentil. Die waagerechte Linie innerhalb der Box entspricht dem Median. Die Whisker zeigen das 5. und das 95. Perzentil. Ausreißer werden als Punkte außerhalb der Whisker dargestellt. C zeigt den Verlauf der Mediane in Detailansicht.  $n = 9-10$

Als erste hydrophile Substanz diente  $^{14}\text{C}$ -Fructose. Nach der Inokulation stiegen die  $^{14}\text{CO}_2$ -Kinetiken linear an. *P. syringae* WT produzierte höhere Mengen an  $^{14}\text{CO}_2$  als der korrespondierende db KO. Mit *Populus canescens* als trennende Kutikulamembranen produzierte *P. syringae* WT in 6 Stunden 6843,94 dpm/cm<sup>2</sup> und der korrespondierende db KO 1547,33 dpm/cm<sup>2</sup> (Abbildung 13). Mit *Hedera helix* als trennende Kutikulamembranen produzierte *P. syringae* WT in 6 Stunden 750,33 dpm/cm<sup>2</sup> und der korrespondierende db KO

99,35 dpm/cm<sup>2</sup> (Abbildung 14). Die produzierten Mengen an <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> des jeweiligen Bakteriums waren mit *Populus canescens* als trennende Kutikulamembran signifikant ( $p < 0,05$ ) höher als bei *Hedera helix*.

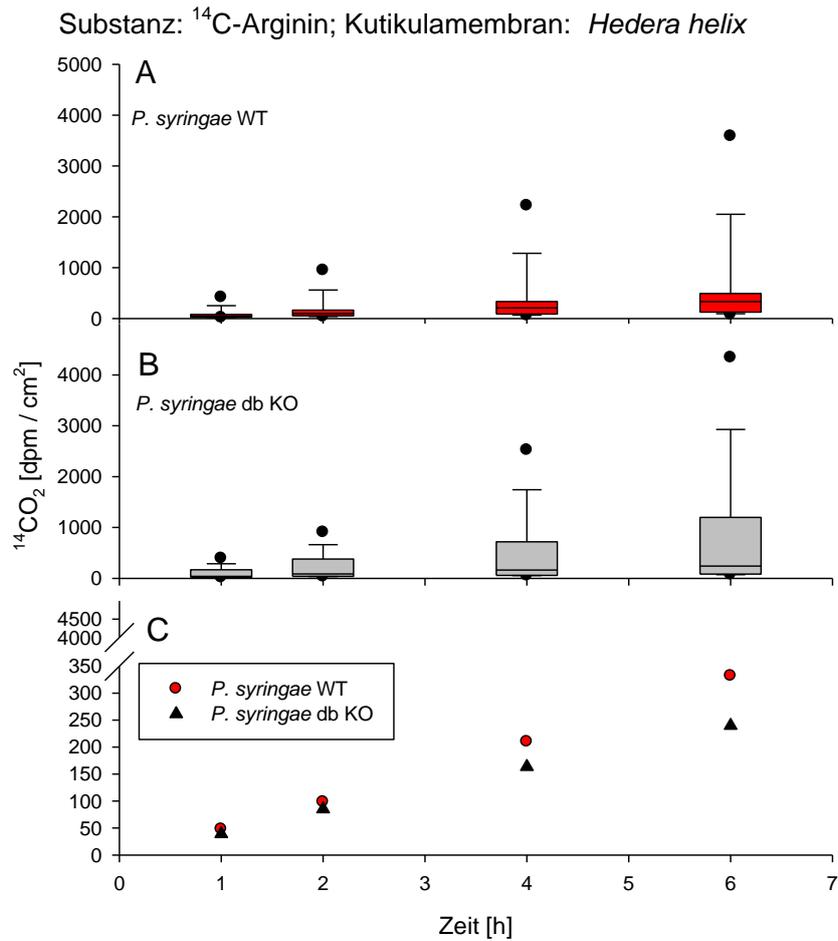


**Abbildung 14:** Messungen der <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Entwicklung 24 Stunden nach Inokulation von *Hedera helix* Kutikulamembranen mit 100 µl einer Bakteriensuspension von *P. syringae* WT bzw. db KO (OD<sub>600</sub> 1). Das Donorkompartiment enthielt 800 µl einer wässrigen Lösung von <sup>14</sup>C-Fructose (2000 dpm/µl). Die gemessene Radioaktivität wurde aufaddiert. Dargestellt sind Boxplots (A und B) und Mediane (C). Die Boxen reichen vom 25. Perzentil zum 75. Perzentil. Die waagerechte Linie innerhalb der Box entspricht dem Median. Die Whisker zeigen das 5. und das 95. Perzentil. Ausreißer werden als Punkte außerhalb der Whisker dargestellt. C zeigt den Verlauf der Mediane in Detailansicht. n = 10

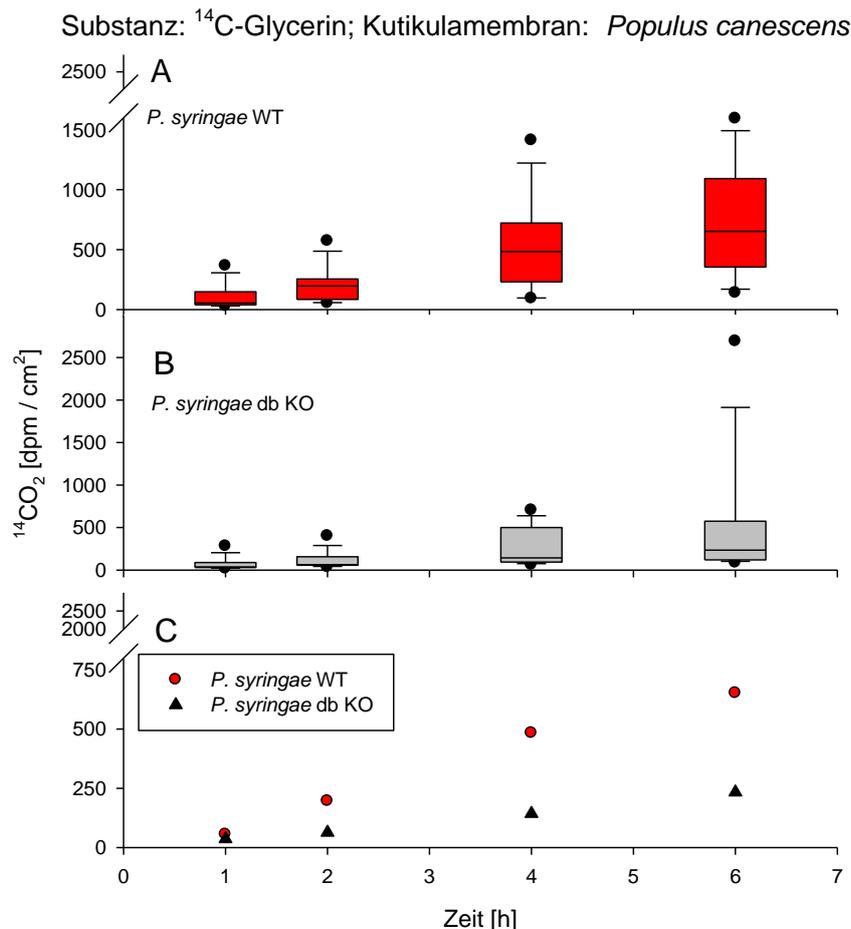


**Abbildung 15:** Messungen der  $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung 24 Stunden nach Inokulation von *Populus canescens* Kutikulamembranen mit 100  $\mu\text{l}$  einer Bakteriensuspension von *P. syringae* WT bzw. db KO ( $\text{OD}_{600}$  1). Das Donorkompartiment enthielt 800  $\mu\text{l}$  einer wässrigen Lösung von  $^{14}\text{C}$ -Arginin (2000 dpm/ $\mu\text{l}$ ). Die gemessene Radioaktivität wurde aufaddiert. Dargestellt sind Boxplots (A und B) und Mediane (C). Die Boxen reichen vom 25. Percentil zum 75. Percentil. Die waagerechte Linie innerhalb der Box entspricht dem Median. Die Whisker zeigen das 5. und das 95. Percentil. Ausreißer werden als Punkte außerhalb der Whisker dargestellt. C zeigt den Verlauf der Mediane in Detailansicht.  $n = 8-10$

Als zweite hydrophile Substanz wurde  $^{14}\text{C}$ -Arginin verwendet. Nach der Inokulation stiegen die  $^{14}\text{CO}_2$ -Kinetiken linear an. Auch hier produzierte *P. syringae* WT mehr  $^{14}\text{CO}_2$  als der korrespondierende db KO. Wenn *Populus canescens* als trennende Kutikulamembran verwendet wurde, produzierte *P. syringae* WT in 6 Stunden 7813,38 dpm/cm $^2$  und der korrespondierende db KO 414,25 dpm/cm $^2$  (Abbildung 15). Mit *Hedera helix* als trennende Kutikulamembran produzierte *P. syringae* WT in 6 Stunden 331,8 dpm/cm $^2$  und *P. syringae* db KO 239,9 dpm/cm $^2$  (Abbildung 16). Die produzierten Mengen an  $^{14}\text{CO}_2$  waren mit *Populus canescens* als trennende Kutikulamembran höher (für *P. syringae* WT signifikant;  $p < 0,05$ ) als mit *Hedera helix*.

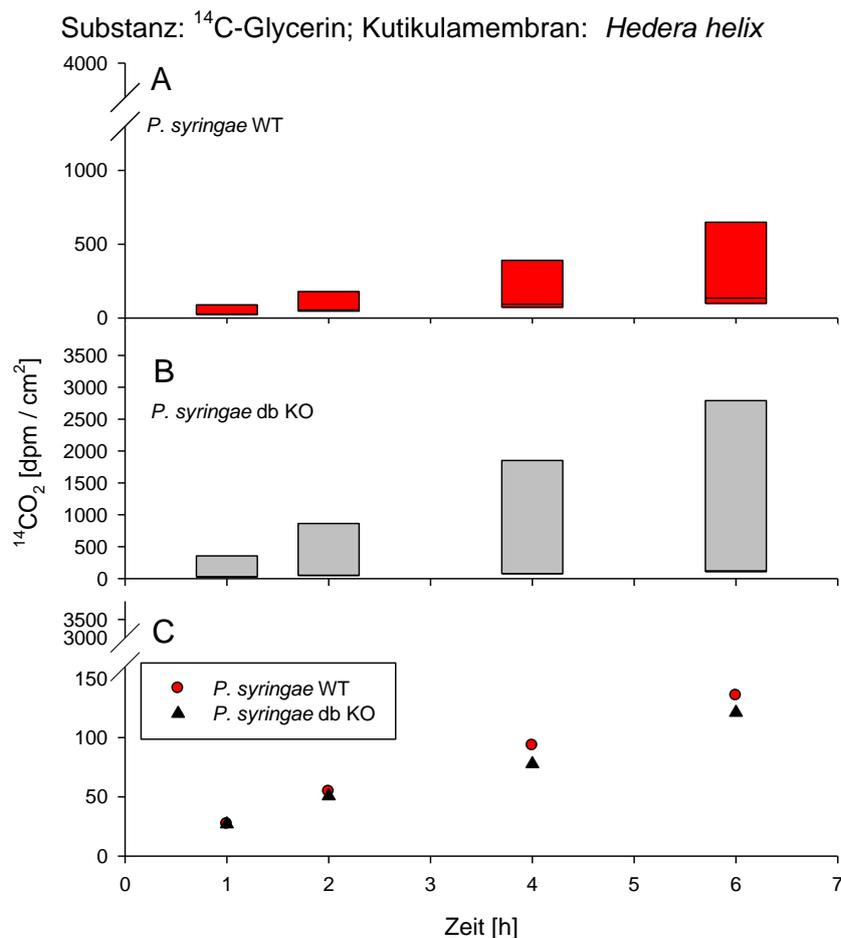


**Abbildung 16:** Messungen der  $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung 24 Stunden nach Inokulation von *Hedera helix* Kutikulamembranen mit 100  $\mu\text{l}$  einer Bakteriensuspension von *P. syringae* WT bzw. db KO ( $\text{OD}_{600}$  1). Das Donorkompartiment enthielt 800  $\mu\text{l}$  einer wässrigen Lösung von  $^{14}\text{C}$ -Arginin (2000 dpm/ $\mu\text{l}$ ). Die gemessene Radioaktivität wurde aufaddiert. Dargestellt sind Boxplots (A und B) und Mediane (C). Die Boxen reichen vom 25. Perzentil zum 75. Perzentil. Die waagerechte Linie innerhalb der Box entspricht dem Median. Die Whisker zeigen das 5. und das 95. Perzentil. Ausreißer werden als Punkte außerhalb der Whisker dargestellt. C zeigt den Verlauf der Mediane in Detailansicht.  $n = 10$



**Abbildung 17:** Messungen der  $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung 24 Stunden nach Inokulation von *Populus canescens* Kutikulamembranen mit 100  $\mu\text{l}$  einer Bakteriensuspension von *P. syringae* WT bzw. db KO ( $\text{OD}_{600}$  1). Das Donorkompartiment enthielt 800  $\mu\text{l}$  einer wässrigen Lösung von  $^{14}\text{C}$ -Glycerin (1000 dpm/ $\mu\text{l}$ ). Die gemessene Radioaktivität wurde aufaddiert. Dargestellt sind Boxplots (A und B) und Mediane (C). Die Boxen reichen vom 25. Perzentil zum 75. Perzentil. Die waagerechte Linie innerhalb der Box entspricht dem Median. Die Whisker zeigen das 5. und das 95. Perzentil. Ausreißer werden als Punkte außerhalb der Whisker dargestellt. C zeigt den Verlauf der Mediane in Detailansicht.  $n = 8-10$

Als dritte hydrophile Substanz wurde  $^{14}\text{C}$ -Glycerin im Donorkompartiment verwendet. Hier stiegen die  $^{14}\text{CO}_2$ -Kinetiken nach Inokulation auch linear an. *P. syringae* WT produzierte mehr  $^{14}\text{CO}_2$  als der korrespondierende db KO. *P. syringae* WT produzierte in 6 Stunden 652,27 dpm/cm<sup>2</sup> und *P. syringae* db KO 233,8 dpm/cm<sup>2</sup> mit *Populus canescens* als trennende Kutikulamembran (Abbildung 17). Mit *Hedera helix* als trennende Kutikulamembran produzierte *P. syringae* WT in 6 Stunden 135,5 dpm/cm<sup>2</sup> und der korrespondierende db KO 121,2 dpm/cm<sup>2</sup> (Abbildung 18). Auch hier waren die produzierten Mengen an  $^{14}\text{CO}_2$  mit *Populus canescens* als trennende Kutikulamembran höher als mit *Hedera helix*.

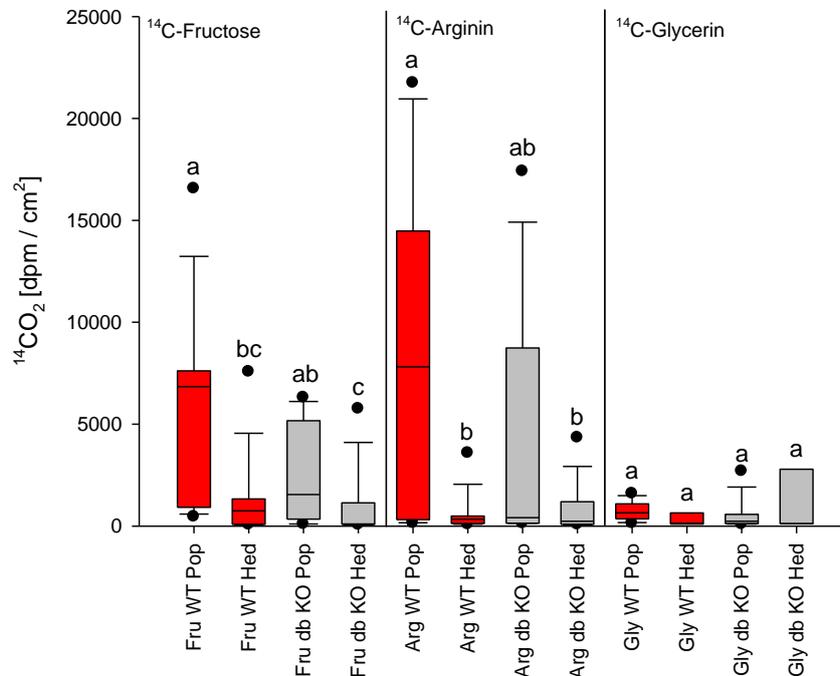


**Abbildung 18:** Messungen der  $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung 24 Stunden nach Inokulation von *Hedera helix* Kutikulamembranen mit 100  $\mu\text{l}$  einer Bakteriensuspension von *P. syringae* WT bzw. db KO ( $\text{OD}_{600}$  1). Das Donorkompartiment enthielt 800  $\mu\text{l}$  einer wässrigen Lösung von  $^{14}\text{C}$ -Glycerin (1000 dpm/ $\mu\text{l}$ ). Die gemessene Radioaktivität wurde aufaddiert. Dargestellt sind Boxplots (A und B) und Mediane (C). Die Boxen reichen vom 25. Percentil zum 75. Percentil. Die waagerechte Linie innerhalb der Box entspricht dem Median. C zeigt den Verlauf der Mediane in Detailansicht.  $n = 3-4$

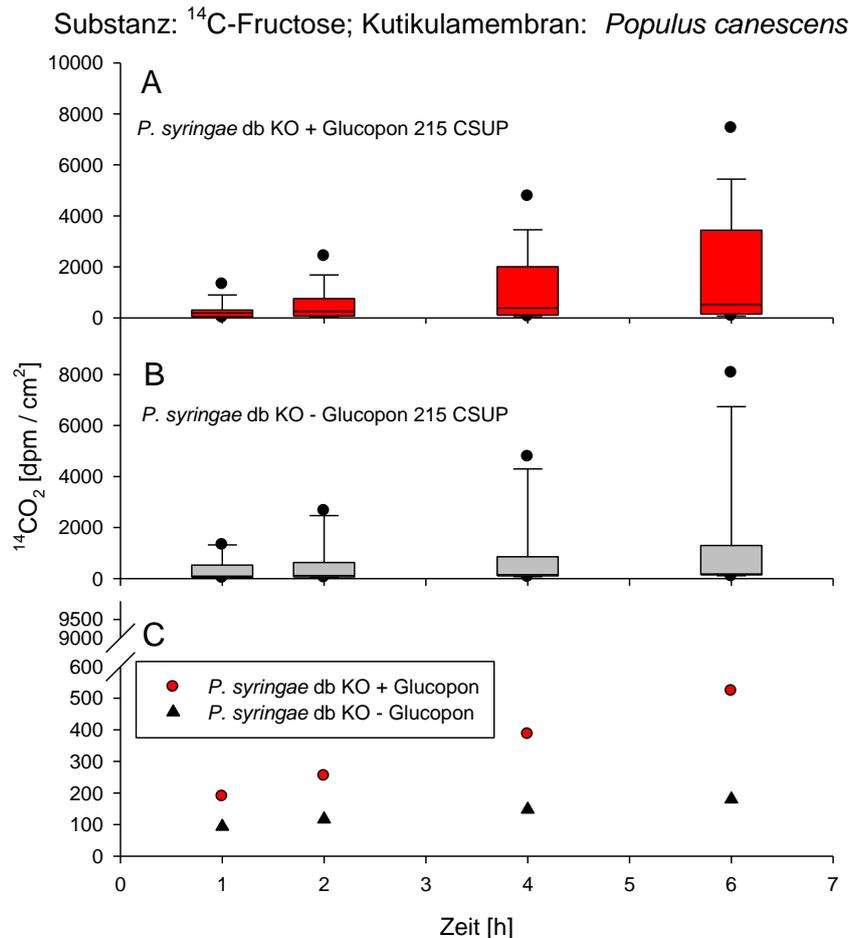
Die produzierten Mengen an  $^{14}\text{CO}_2$  mit *Populus canescens* als trennende Kutikulamembran sind sowohl für den WT als auch den db KO generell höher als mit *Hedera helix* als trennende Kutikulamembran.

Signifikante Unterschiede der  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion durch *P. syringae* WT und db KO zwischen den beiden Kutikulamembranen *Populus canescens* und *Hedera helix* sind in Abbildung 19 dargestellt. Diese Signifikanz verdeutlicht noch einmal die höhere Permeabilität der Kutikula von *Populus canescens* im Gegensatz zu *Hedera helix* für verschiedene hydrophile Substanzen. *P. syringae* WT und db KO produzierten jeweils signifikant mehr  $^{14}\text{CO}_2$  aus  $^{14}\text{C}$ -Fructose, die vorher durch *Populus canescens* Kutikulamembranen diffundiert ist, als wenn

sie vorher durch *Hedera helix* diffundiert ist. Bei  $^{14}\text{C}$ -Arginin zeigt sich diese Signifikanz nur für den *P. syringae* WT. Bei  $^{14}\text{C}$ -Glycerin finden sich keine Signifikanzen zwischen *Populus canescens* und *Hedera helix*.



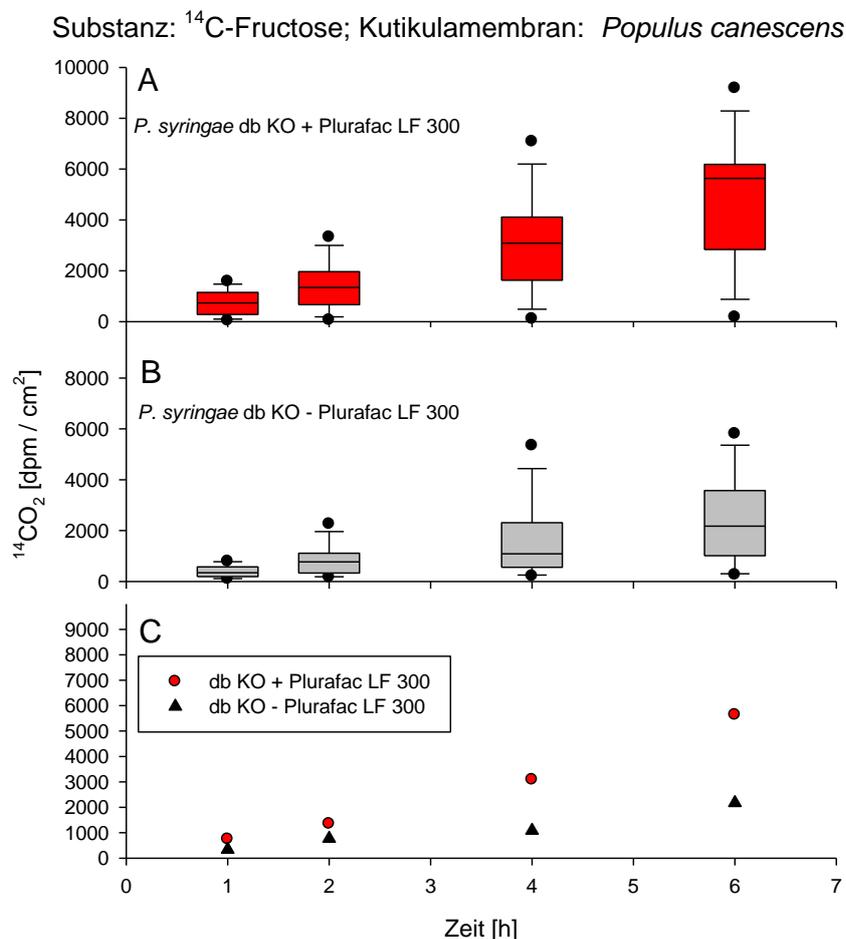
**Abbildung 19:** Messungen der  $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung 24 Stunden nach Inokulation von *Populus canescens* (Pop) und *Hedera helix* (Hed) Kutikulamembranen mit 100  $\mu\text{l}$  einer Bakteriensuspension ( $\text{OD}_{600}$  1) von *P. syringae* WT (WT) bzw. db KO (db KO). Die Werte entsprechen der Gesamtproduktion an  $^{14}\text{CO}_2$  nach 6 Stunden Messung. Das Donorkompartiment enthielt 800  $\mu\text{l}$  einer wässrigen Lösung von  $^{14}\text{C}$ -Fructose (Fru) oder  $^{14}\text{C}$ -Arginin (Arg) mit einer Konzentration von 2000 dpm/ $\mu\text{l}$  oder  $^{14}\text{C}$ -Glycerin (Gly) mit einer Konzentration von 1000 dpm/ $\mu\text{l}$ . Dargestellt sind Boxplots. Die Boxen reichen vom 25. Percentil zum 75. Percentil. Die waagerechte Linie innerhalb der Box entspricht dem Median. Die Whisker zeigen das 5. und das 95. Percentil. Ausreißer werden als Punkte außerhalb der Whisker dargestellt. Die unterschiedlichen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ), gleiche Buchstaben zeigen an, dass kein signifikanter Unterschied besteht;  $n = 3-10$



**Abbildung 20:** Messungen der  $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung 24 Stunden nach Inokulation von *Populus canescens* Kutikulamembranen mit 100  $\mu\text{l}$  einer Bakteriensuspension ( $\text{OD}_{600}$  1) von *P. syringae* db KO mit oder ohne dem industriellen Tensid Glucopon 215 CSUP ( $\text{OD}_{600}$  1). Die Konzentration des Tensids in der Bakteriensuspension war 0,1 %. Das Donorkompartiment enthielt 800  $\mu\text{l}$  einer wässrigen Lösung von  $^{14}\text{C}$ -Fructose (2000 dpm/ $\mu\text{l}$ ). Die gemessene Radioaktivität wurde aufaddiert. Dargestellt sind Boxplots (A und B) und Mediane (C). Die Boxen reichen vom 25. Percentil zum 75. Percentil. Die waagerechte Linie innerhalb der Box entspricht dem Median. Die Whisker zeigen das 5. und das 95. Percentil. Ausreißer werden als Punkte außerhalb der Whisker dargestellt. C zeigt den Verlauf der Mediane in Detailansicht.  $n = 10$

Im Weiteren sollte die fehlende Produktion von Biotensiden bei *P. syringae* db KO durch das Beifügen industrieller Tenside kompensiert werden. Hierfür wurde *P. syringae* db KO Glucopon 215 CSUP bzw. Plurafac LF 300 beigefügt, sodass eine 0,1 %ige Bakterien-Tensidlösung entstand. Als hydrophile Substanz und potenzielle C-Quelle, die durch *Populus canescens* Kutikulamembranen diffundiert, diente  $^{14}\text{C}$ -Fructose. Die  $^{14}\text{CO}_2$ -Kinetiken steigen linear an. *P. syringae* db KO mit beigemischem Tensid produzierte mehr  $^{14}\text{CO}_2$  als *P. syringae* db KO ohne Tensid. Mit dem Tensid Glucopon 215 CSUP produzierte *P. syringae* db KO in 6 Stunden 522,8 dpm/cm $^2$  und ohne Glucopon 215 CSUP 180,4 dpm/cm $^2$  (Abbildung 20). Mit dem Tensid Plurafac LF 300 produzierte

*P. syringae* db KO in 6 Stunden 5632,26 dpm/cm<sup>2</sup> und ohne Tensid 2176,72 dpm/cm<sup>2</sup> (Abbildung 21).



**Abbildung 21:** Messungen der <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Entwicklung 24 Stunden nach Inokulation von *Populus canescens* Kutikulamembranen mit 100 µl einer Bakteriensuspension (OD<sub>600</sub> 1) von *P. syringae* db KO mit oder ohne dem industriellen Tensid Plurafac LF 300 (OD<sub>600</sub> 1). Die Konzentration des Tensids in der Bakteriensuspension war 0,1 %. Das Donorkompartiment enthielt 800 µl einer wässrigen Lösung von <sup>14</sup>C-Fructose (2000 dpm/µl). Die gemessene Radioaktivität wurde aufaddiert. Dargestellt sind Boxplots (A und B) und Mediane (C). Die Boxen reichen vom 25. Percentil zum 75. Percentil. Die waagerechte Linie innerhalb der Box entspricht dem Median. Die Whisker zeigen das 5. und das 95. Percentil. Ausreißer werden als Punkte außerhalb der Whisker dargestellt. C zeigt den Verlauf der Mediane in Detailansicht. n = 8

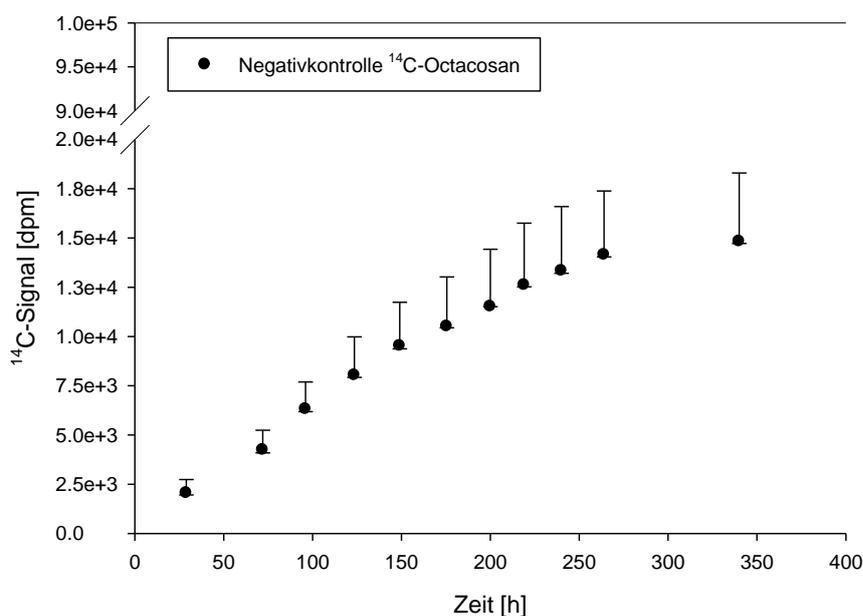
### 3.3.1.2. Abbau aliphatischer <sup>14</sup>C-markierter lipophiler Substanzen

#### (Wachsmomere) durch *R. fascians*, *P. syringae* WT und db KO in Flüssigkultur

Um zu untersuchen, ob pflanzliche Wachse eine potentielle C-Quelle für epiphyllie Bakterien darstellen, wurde der Metabolismus von <sup>14</sup>C-markierten Wachsmomeren (Octadecansäure (C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>), Tetracosanol (C<sub>24</sub>H<sub>50</sub>O), Hexacosansäure (C<sub>26</sub>H<sub>52</sub>O<sub>2</sub>) und

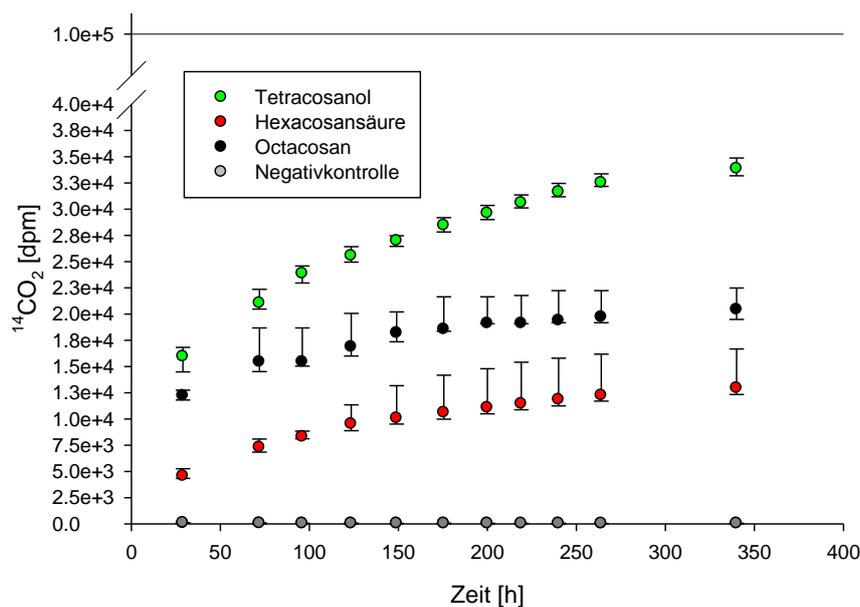
Octacosan ( $C_{28}H_{58}$ ) durch *R. fascians* und *P. syringae* untersucht. Die Bakterien wurden auf Agarplatten angezogen und es wurden C-Quellen freie Bakteriensuspensionen in M9-Medium angesetzt, denen jeweils  $^{14}C$ -markierte Wachsmomere beigefügt wurden. Das produzierte  $^{14}CO_2$  wurde mittel Szintillationsmesser gezählt.

Da die Substanz  $^{14}C$ -Octacosan auch ohne Zusatz von Bakterien  $^{14}C$ -Signale lieferte, wurde diese jeweils von den Messwerten mit Zusatz von Bakterien abgezogen. Der Verlauf der aufaddierten  $^{14}C$ -Mengen der  $^{14}C$ -Octacosan Negativkontrolle ist in Abbildung 22 dargestellt.



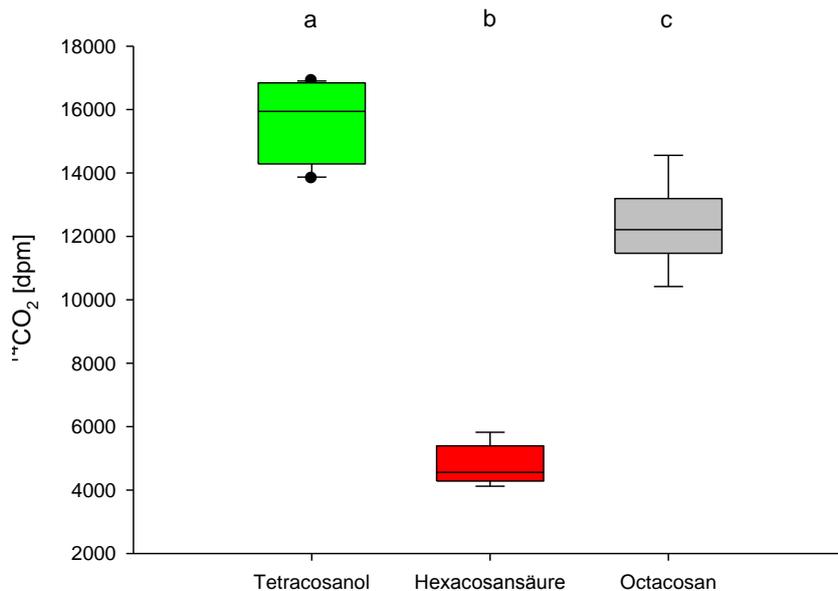
**Abbildung 22:** Messung der  $^{14}C$ -Mengen, die bei der Negativkontrolle von  $^{14}C$ -Octacosan freigesetzt wurden und in 1 ml KOH [1M] gebunden wurden. Dargestellt ist die jeweils aufaddierte Menge an produziertem  $^{14}CO_2$  in Abhängigkeit der Zeit. Die Punkte entsprechen dem Median und die Fehlerbalken den unteren und oberen Quartilen. Die schwarze Linie zeigt die eingesetzte Gesamtmenge von 100000 dpm. N=3

Der Abbau der drei  $^{14}C$ -markierten sehr langkettigen Wachsmomere Tetracosanol, Hexacosansäure und Octacosan durch *R. fascians* ist in Abbildung 23 dargestellt. *R. fascians* produzierte in den 340 Stunden des Versuchsablaufs in absteigender Folge bei  $^{14}C$ -Tetracosanol als C-Quelle 33862,39 dpm, bei  $^{14}C$ -Octacosan 20429,55 dpm und bei  $^{14}C$ -Hexacosansäure 12934,9 dpm an  $^{14}CO_2$ . Der jeweils erste Messwert macht bei  $^{14}C$ -Tetracosanol 47,08 %, bei  $^{14}C$ -Hexacosansäure 35,23 % und bei  $^{14}C$ -Octacosan 59,78 %, des jeweils insgesamt produzierten  $^{14}CO_2$  aus.



**Abbildung 23:** Messung der  $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung durch die Metabolisierung der  $^{14}\text{C}$ -markierten Wachskomponenten Tetracosanol, Hexacosansäure und Octacosan durch *R. fascians*. Dargestellt ist die jeweils aufaddierte Menge an produziertem  $^{14}\text{CO}_2$  in Abhängigkeit der Zeit. Die Punkte entsprechen dem Median und die Fehlerbalken den unteren und oberen Quartilen. Die schwarze Linie zeigt die eingesetzte Gesamtmenge der jeweiligen  $^{14}\text{C}$ -markierten Substanz von 100000 dpm. Die Negativkontrollen wurden nicht aufaddiert; N=5-6

Die  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion durch *R. fascians* ist für jedes Wachsmonomer signifikant unterschiedlich. Als Beispielmesspunkt zeigt Abbildung 24 die  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion nach 29 Stunden als Boxplots dargestellt. *R. fascians* zeigt eine signifikant höhere  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion mit  $^{14}\text{C}$ -Tetracosanol als mit  $^{14}\text{C}$ -Octacosan, welches zu einer signifikant höheren  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion führt als mit  $^{14}\text{C}$ -Hexacosansäure als C-Quelle.



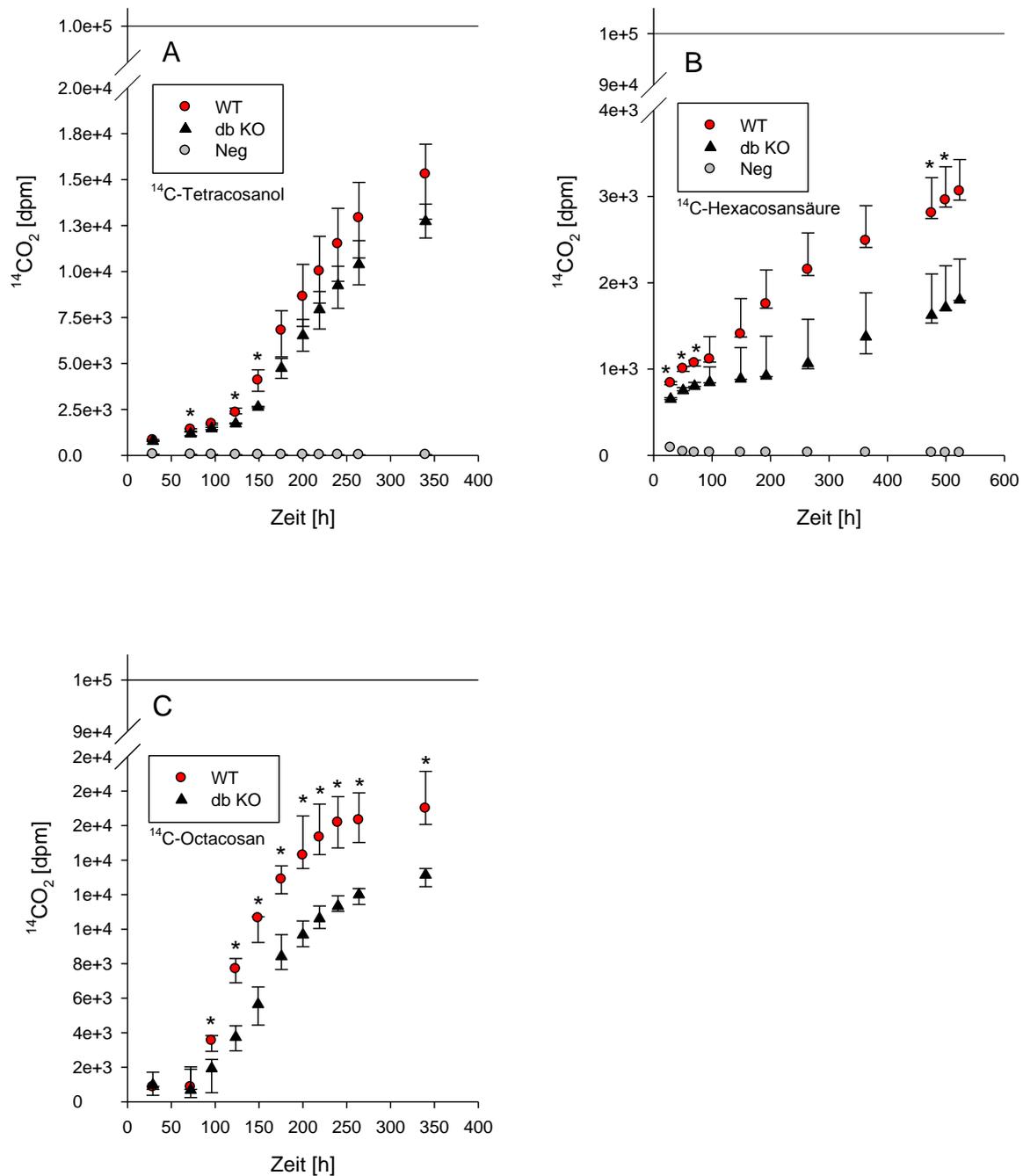
**Abbildung 24:** Erster Messwert der  $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung nach 29 Stunden durch die Metabolisierung der  $^{14}\text{C}$ -markierten Wachskomponenten Tetracosanol, Hexacosansäure und Octacosan durch *R. fascians*. Dargestellt sind Boxplots. Die Boxen reichen vom 25. Perzentil zum 75. Perzentil. Die waagerechte Linie innerhalb der Box entspricht dem Median. Die Whisker zeigen das 5. und das 95. Perzentil. Ausreißer werden als Punkte außerhalb der Whisker dargestellt. Die unterschiedlichen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ).

Den Abbau der  $^{14}\text{C}$ -markierten Wachskomponenten Tetracosanol (A), Hexacosansäure (B) und Octacosan (C) durch *P. syringae* WT (rote Punkte) und *P. syringae* db KO (schwarze Dreiecke) zeigt Abbildung 25.

Der biotensidproduzierende Wildtyp zeigt in allen drei Versuchsansätzen eine tendenziell höhere  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion als der korrespondierende db KO. Signifikante Unterschiede zeigen sich bei  $^{14}\text{C}$ -Tetracosanol in der Anfangsphase nach 72, 123,5 und 140 Stunden. Bei  $^{14}\text{C}$ -Hexacosansäure produziert *P. syringae* WT in den ersten 70 Stunden signifikant mehr  $^{14}\text{CO}_2$  als der db KO. Danach zeigen sich erst wieder bei den Messpunkten nach 475,5 und 499,5 Stunden signifikante Unterschiede. Wenn  $^{14}\text{C}$ -Octacosan als C-Quelle diente produzierte *P. syringae* WT ab dem dritten Messpunkt (96 Stunden) signifikant höhere Mengen an  $^{14}\text{CO}_2$ . *P. syringae* WT hat nach 340 Stunden bei  $^{14}\text{C}$ -Tetracosanol als C-Quelle 15290,30 dpm und der db KO 12734,05 dpm  $^{14}\text{CO}_2$  produziert. Mit  $^{14}\text{C}$ -Hexacosansäure als C-Quelle produzierte *P. syringae* WT 3060,21 dpm und der db KO 1801,88 dpm  $^{14}\text{CO}_2$  nach 523,5 Stunden.  $^{14}\text{C}$ -Octacosan wurde nach 340 Stunden durch *P. syringae* WT in 16990,36 dpm und durch db KO in 13140,54 dpm  $^{14}\text{CO}_2$  umgesetzt.

*P. syringae* WT und db KO zeigen bei allen drei Komponenten eine Anfangsphase, in der sie wenig  $^{14}\text{CO}_2$  produzieren, dann jedoch in eine exponentielle Phase mit hoher  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion übergehen, und dann ein Plateau erreichen (Abbildung 25).

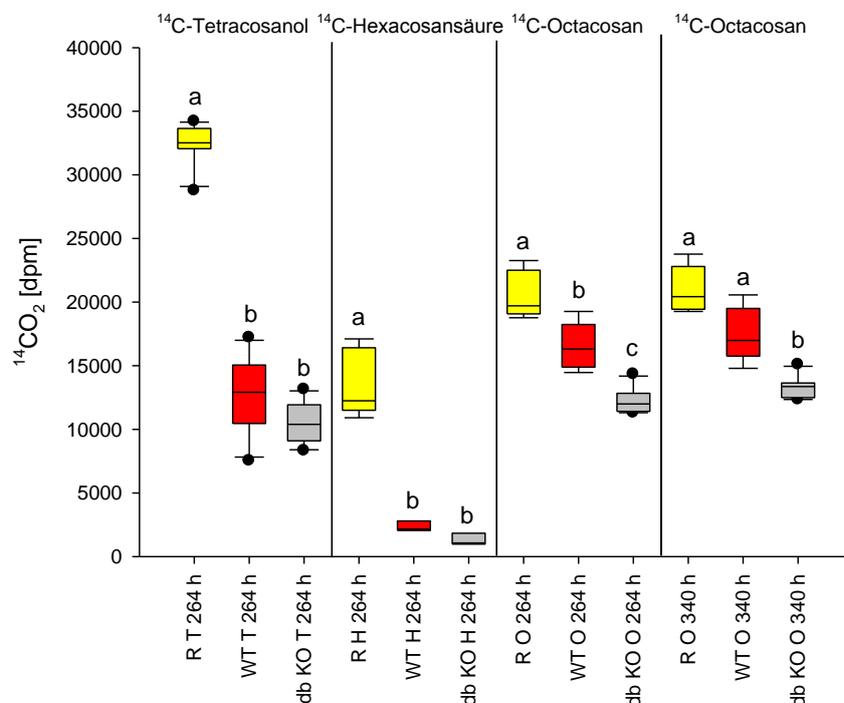
*R. fascians* zeigt beim Abbau des  $^{14}\text{C}$ -Tetracosanol zu Beginn (nach 29 Stunden) auch einen hohen  $^{14}\text{CO}_2$ -Wert, produziert jedoch über die 340 Stunden noch einmal so viel  $^{14}\text{CO}_2$ .



**Abbildung 25:** Messung der  $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung durch die Metabolisierung der  $^{14}\text{C}$ -markierten Wachskomponenten Tetracosanol (A), Hexacosansäure (B) und Octacosan (C) durch *P. syringae* WT (rote Punkte) und db KO (schwarze Dreiecke). Dargestellt sind die aufaddierten Mengen des produzierten  $^{14}\text{CO}_2$  in Abhängigkeit der Zeit. Die Negativkontrolle wurde nicht aufaddiert. Die Messpunkte entsprechen dem Median und die Fehlerbalken den unteren und oberen Quartilen. Die schwarze Linie zeigt die eingesetzte Gesamtmenge der jeweiligen  $^{14}\text{C}$ -markierten Substanz von 100000 dpm. Sternchen markieren signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ );  $N=6$

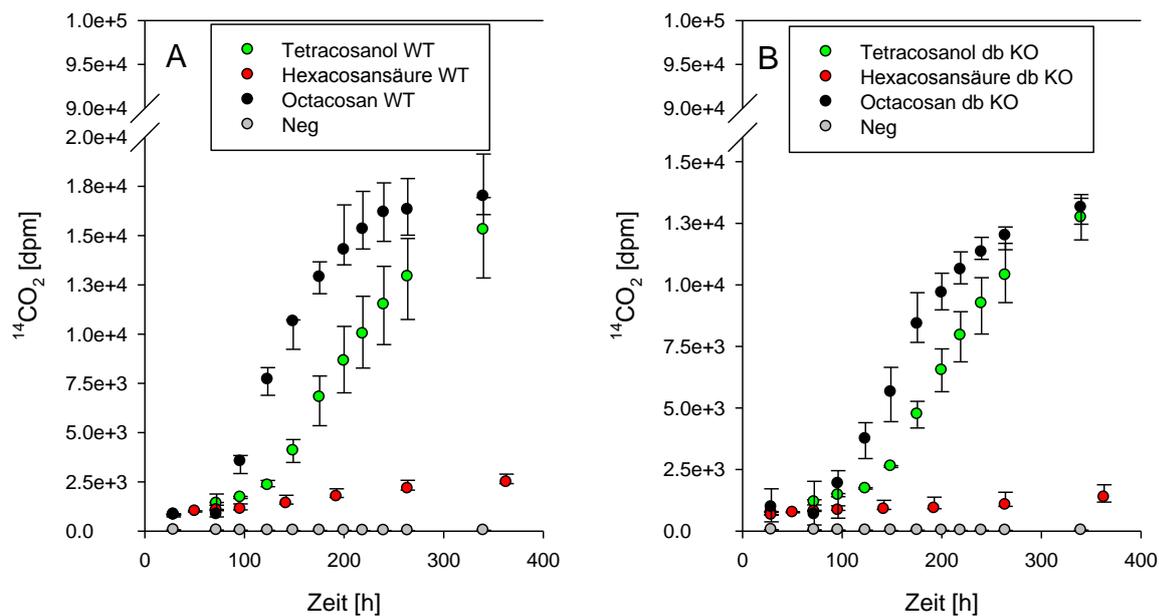
*R. fascians* produziert mit jeder der drei sehr langkettigen aliphatischen  $^{14}\text{C}$ -markierten Wachskomponenten signifikant mehr  $^{14}\text{CO}_2$  als *P. syringae* WT und db KO. Erst zum letzten

Messpunkt hin hat *P. syringae* WT mit  $^{14}\text{C}$ -Octacosan als C-Quelle nicht signifikant unterschiedliche Mengen an  $^{14}\text{CO}_2$  produziert als *R. fascians*. Dargestellt sind repräsentative Messpunkte der  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktionskinetiken in Abbildung 26, um die Signifikanzen zu verdeutlichen.



**Abbildung 26:** Darstellung von vier repräsentativen Messpunkten der Versuchsansätze zum Abbau der  $^{14}\text{C}$ -markierten Wachskomponenten Tetracosanol, Hexacosansäure und Octacosan durch die Bakterien *P. syringae* WT (WT), db KO (db KO) und *R. fascians* (R); Dargestellt sind Boxplots. Die Boxen reichen vom 25. Percentil zum 75. Percentil. Die waagerechte Linie innerhalb der Box entspricht dem Median. Die Whisker zeigen das 5. und das 95. Percentil. Ausreißer werden als Punkte außerhalb der Whisker dargestellt. Die unterschiedlichen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ), gleiche Buchstaben zeigen an, dass kein signifikanter Unterschied besteht; h=Stunden; n=3-6

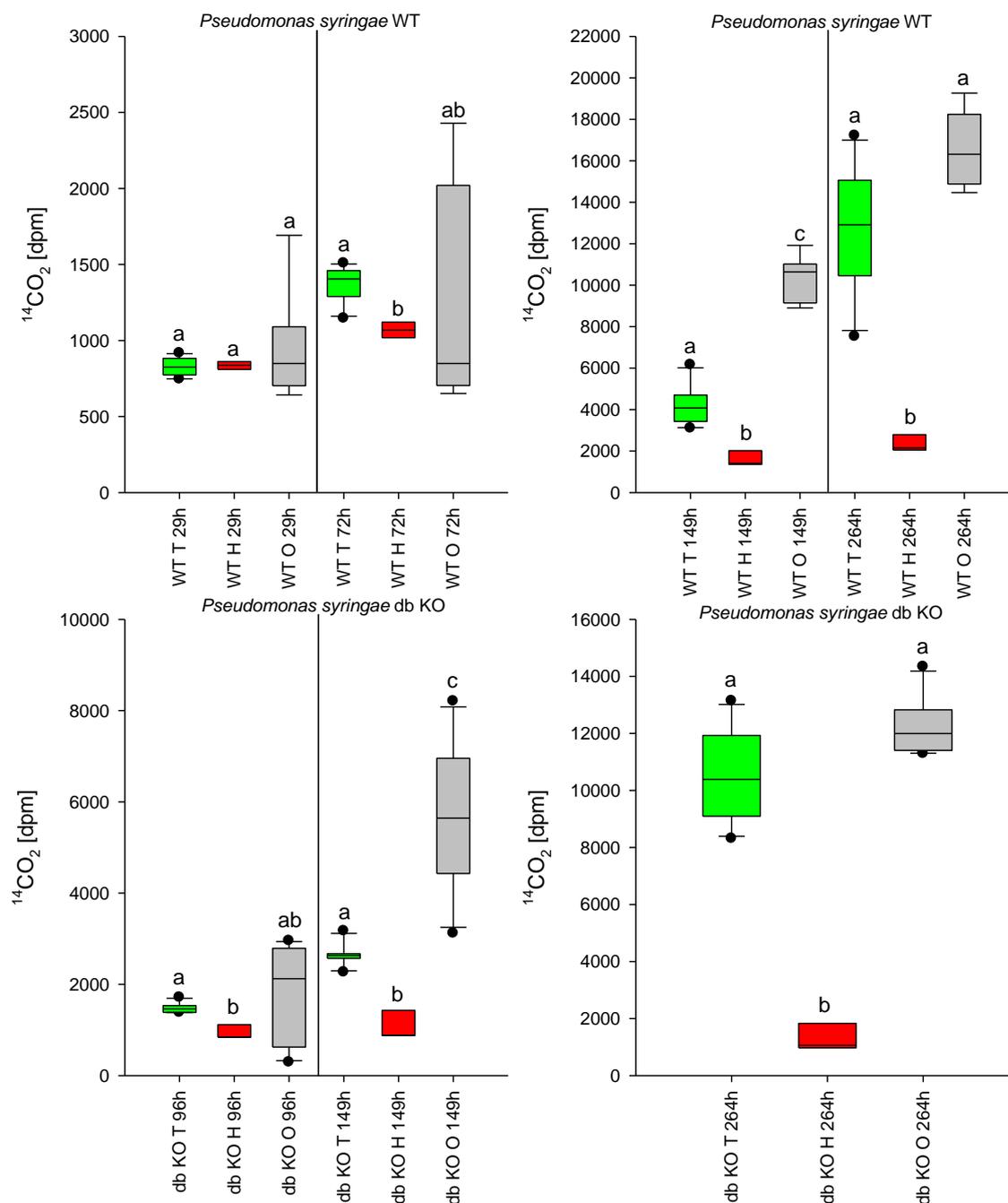
Mit  $^{14}\text{C}$ -Tetracosanol und  $^{14}\text{C}$ -Octacosan produzieren *P. syringae* WT und db KO am meisten  $^{14}\text{CO}_2$ , gefolgt von  $^{14}\text{C}$ -Hexacosansäure als C-Quelle. Der Abbau der drei  $^{14}\text{C}$ -markierten Wachsmomere Tetracosanol, Hexacosansäure und Octacosan im Vergleich durch jeweils *P. syringae* WT und db KO ist als  $^{14}\text{CO}_2$ -Kinetiken in Abbildung 27 dargestellt.



**Abbildung 27:** Messung der  $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung durch die Metabolisierung der  $^{14}\text{C}$ -markierten Wachskomponenten Tetracosanol, Hexacosansäure und Octacosan durch *P. syringae* WT (A) und db KO (B). Dargestellt ist die jeweils aufaddierte Menge an produziertem  $^{14}\text{CO}_2$  in Abhängigkeit der Zeit. Die Punkte entsprechen dem Median und die Fehlerbalken den unteren und oberen Quartilen. Die schwarze Linie zeigt die eingesetzte Gesamtmenge der jeweiligen  $^{14}\text{C}$ -markierten Substanz von 100000 dpm. Die Negativkontrollen wurden nicht aufaddiert; N=3-6

*P. syringae* WT zeigt im Abbau der  $^{14}\text{C}$ -markierten Wachsmomere nach 29 Stunden keine signifikanten Unterschiede. Nach 72 Stunden zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion mit  $^{14}\text{C}$ -Tetracosanol als C-Quelle im Vergleich zu  $^{14}\text{C}$ -Hexacosansäure. Ab dem Zeitpunkt von 96 Stunden sind die drei  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktionskinetiken jeweils zu einander signifikant unterschiedlich bis zur Messung nach 264 Stunden. Ab diesem Zeitpunkt ist die  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion zwischen  $^{14}\text{C}$ -Tetracosanol und  $^{14}\text{C}$ -Octacosan nicht mehr signifikant unterschiedlich, bleibt aber signifikant unterschiedlich zu der  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion mit  $^{14}\text{C}$ -Hexacosansäure. *P. syringae* db KO zeigt schon nach den ersten 29 Stunden eine signifikant höhere  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion mit  $^{14}\text{C}$ -Tetracosanol als C-Quelle im Vergleich zu  $^{14}\text{C}$ -Hexacosansäure. Die  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion mit  $^{14}\text{C}$ -Octacosan als C-Quelle zeigt zu diesem Zeitpunkt zu keiner der beiden anderen einen signifikanten Unterschied. Nach 149 Stunden zeigen alle drei  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktionskinetiken signifikante Unterschiede jeweils zu einander. Ab dem Messpunkt nach 264 Stunden zeigt sich, dass die  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion zwischen  $^{14}\text{C}$ -Tetracosanol und  $^{14}\text{C}$ -Octacosan als C-Quellen nicht mehr signifikant unterschiedlich sind, beide zu derjenigen mit  $^{14}\text{C}$ -Hexacosansäure als C-Quelle signifikant unterschiedlich bleiben.

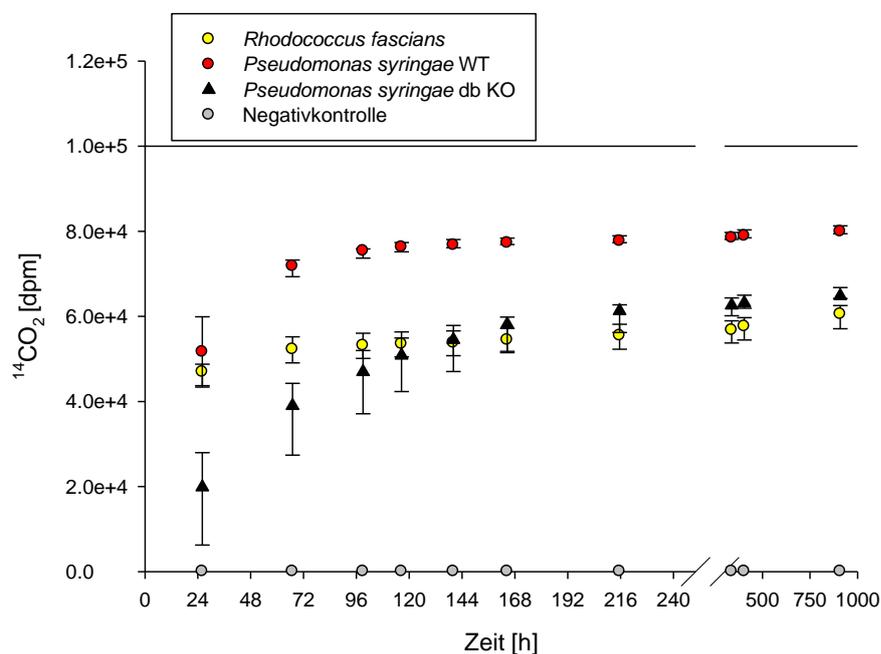
Repräsentative Messpunkte wurden in Abbildung 28 dargestellt, um die unterschiedlichen Signifikanzen zu verdeutlichen.



**Abbildung 28** Darstellung von repräsentativen Messpunkten der Versuchsansätze zum Abbau der  $^{14}\text{C}$ -markierten Wachskomponenten Tetracosanol (T), Hexacosansäure (H) und Octacosan (O) durch die Bakterien *P. syringae* WT (WT) und db KO (db KO); Dargestellt sind Boxplots. Die Boxen reichen vom 25. Percentil zum 75. Percentil. Die waagerechte Linie innerhalb der Box entspricht dem Median. Die Whisker zeigen das 5. und das 95. Percentil. Ausreißer werden als Punkte außerhalb der Whisker dargestellt. Die unterschiedlichen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ), gleiche Buchstaben zeigen an, dass kein signifikanter Unterschied besteht; h=Stunden; n=3-6

Als vierte C-Quelle wurde der Abbau des kürzerkettigen aliphatischen Wachsmonomers  $^{14}\text{C}$ -Stearinsäure durch die Bakterien *R. fascians*, *P. syringae* WT und db KO untersucht (Abbildung 29).

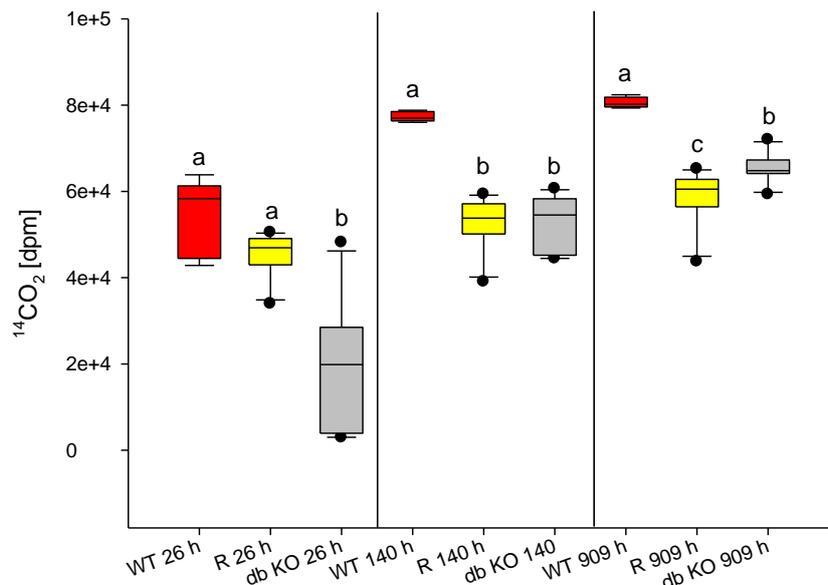
Dargestellt sind die jeweils aufaddierten produzierten Mengen an  $^{14}\text{CO}_2$  gegen die Zeit. *R. fascians* hat nach den ersten 26 Stunden 46943,03 dpm, *P. syringae* WT 51644,62 dpm und *P. syringae* db KO 19849,94 dpm  $^{14}\text{CO}_2$  produziert. *R. fascians* erreichte nach 909 Stunden einen Endwert von 60506,4 dpm  $^{14}\text{CO}_2$ , *P. syringae* WT einen von 79917,04 dpm  $^{14}\text{CO}_2$  und *P. syringae* db KO erreichte mit 64822,56 dpm  $^{14}\text{CO}_2$  einen signifikant höheren Wert als *R. fascians*.



**Abbildung 29:** Messung der  $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung durch die Metabolisierung der  $^{14}\text{C}$ -markierten Wachskomponente Stearinsäure (Octadecansäure) durch *R. fascians* und *P. syringae* WT und db KO. Dargestellt ist die aufaddierte  $^{14}\text{CO}_2$ -Menge in Abhängigkeit von der Zeit. Die Negativkontrolle wurde nicht aufaddiert; Die Messpunkte entsprechen dem Median und die Fehlerbalken den unteren und oberen Quartilen. Die schwarze Linie zeigt die eingesetzte Gesamtmenge der jeweiligen  $^{14}\text{C}$ -markierten Substanz von 100000 dpm. N=5-6

Nach 26 Stunden sind die produzierten Mengen an  $^{14}\text{CO}_2$  von *P. syringae* WT und *R. fascians* untereinander nicht signifikant unterschiedlich jedoch beide produzierten signifikant höhere Mengen an  $^{14}\text{CO}_2$  als *P. syringae* db KO. Ab dem zweiten Messpunkt nach 67 Stunden bis 215,5 Stunden sind die produzierten Mengen von *P. syringae* WT signifikant höher als diejenigen von *R. fascians* und *P. syringae* db KO. In dieser Zeitspanne sind die produzierten Mengen an  $^{14}\text{CO}_2$  von *R. fascians* und *P. syringae* db KO nicht signifikant unterschiedlich. Ab dem achten Messpunkt nach 337,5 Stunden bis zum Endzeitpunkt nach 909 Stunden

produzierten alle drei Bakterien signifikant unterschiedliche  $^{14}\text{CO}_2$ -Mengen. Diese drei unterschiedlichen Signifikanzkonstellationen sind mit drei Beispielmesspunkten (26 Stunden, 140 Stunden und 909 Stunden) in Abbildung 30 in Form von Boxplots dargestellt. Verglichen mit den sehr langkettigen Wachsmomere  $^{14}\text{C}$ -Tetracosanol,  $^{14}\text{C}$ -Hexacosansäure und  $^{14}\text{C}$ -Octacosan als C-Quelle, produzieren *P. syringae* WT, db KO und *R. fascians* höhere Mengen an  $^{14}\text{CO}_2$  mit  $^{14}\text{C}$ -Octadecansäure.



**Abbildung 30:** Darstellung von drei repräsentativen Messpunkten (26, 140 und 909 Stunden) des Versuchsansatzes zum Abbau der  $^{14}\text{C}$ -markierten Wachskomponente Stearinsäure (Octadecansäure) durch die Bakterien *P. syringae* WT (WT), db KO (db KO) und *R. fascians* (R); Dargestellt sind Boxplots. Die Boxen reichen vom 25. Percentil zum 75. Percentil. Die waagerechte Linie innerhalb der Box entspricht dem Median. Die Whisker zeigen das 5. und das 95. Percentil. Ausreißer werden als Punkte außerhalb der Whisker dargestellt. Die unterschiedlichen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ), gleiche Buchstaben zeigen an, dass kein signifikanter Unterschied besteht;  $n=5-6$

### 3.3.1.3. Abbau aliphatischer $^{14}\text{C}$ -markierter lipophiler Substanzen

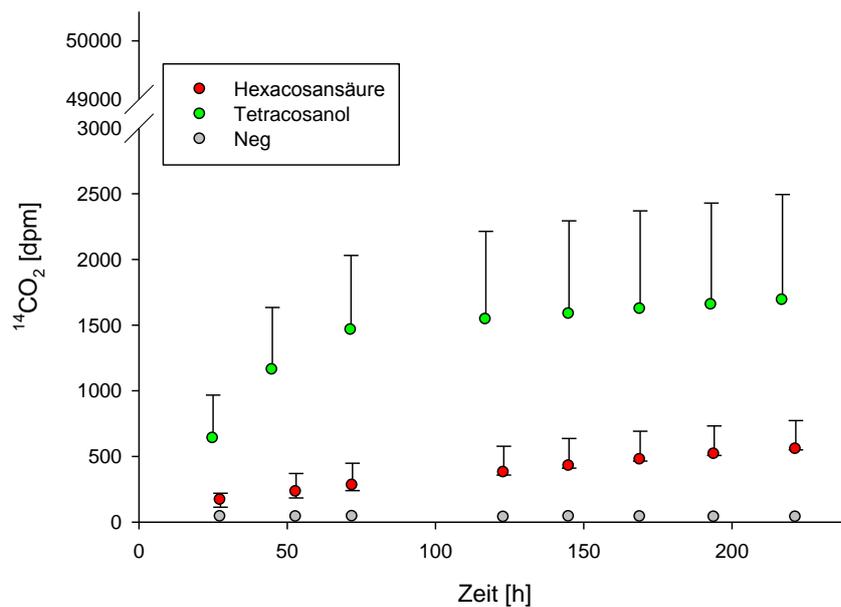
#### (Wachsmomere) durch *R. fascians*, *P. syringae* WT und db KO auf isolierten Kutikulamembranen

Um die in vivo Situation der Bakterien in der Phyllosphäre möglichst getreu nachzustellen, wurden isolierte Kutikulamembranen von *Prunus laurocerasus* in Transportkammern eingespannt und in das Donorkompartiment M9-Medium ohne jegliche C-Quelle hinzugefügt. Die physiologische Außenseite der Kutikulamembranen wurde jeweils mit den  $^{14}\text{C}$ -markierten aliphatischen Wachskomponenten Octadecansäure, Tetracosanol, Hexacosansäure

und Octacosan imprägniert. Die imprägnierten Kutikulamembranen wurden anschließend mit der jeweiligen Bakteriensuspension (OD 1) von *R. fascians*, *P. syringae* WT oder db KO inokuliert.

Die produzierte Menge an  $^{14}\text{CO}_2$  wurde aufaddiert und gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 31, Abbildung 32). *R. fascians* zeigt nur bei vorheriger Imprägnierung mit  $^{14}\text{C}$ -Octadecansäure,  $^{14}\text{C}$ -Tetracosanol und  $^{14}\text{C}$ -Hexacosansäure eine  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion. Die Negativkontrolle des Versuchsansatzes mit  $^{14}\text{C}$ -Octacosan zeigte wie bei dem Versuchsansatz in Flüssigkultur  $^{14}\text{C}$ -Signale. Da diese  $^{14}\text{C}$ -Signale nicht unterschiedlich von denen waren, die bei den Versuchsansätzen mit den drei Bakterien *R. fascians*, *P. syringae* WT und db KO gemessen wurden, ist zu schlussfolgern, dass  $^{14}\text{C}$ -Octacosan auf Kutikulamembranen nicht metabolisiert werden konnte.

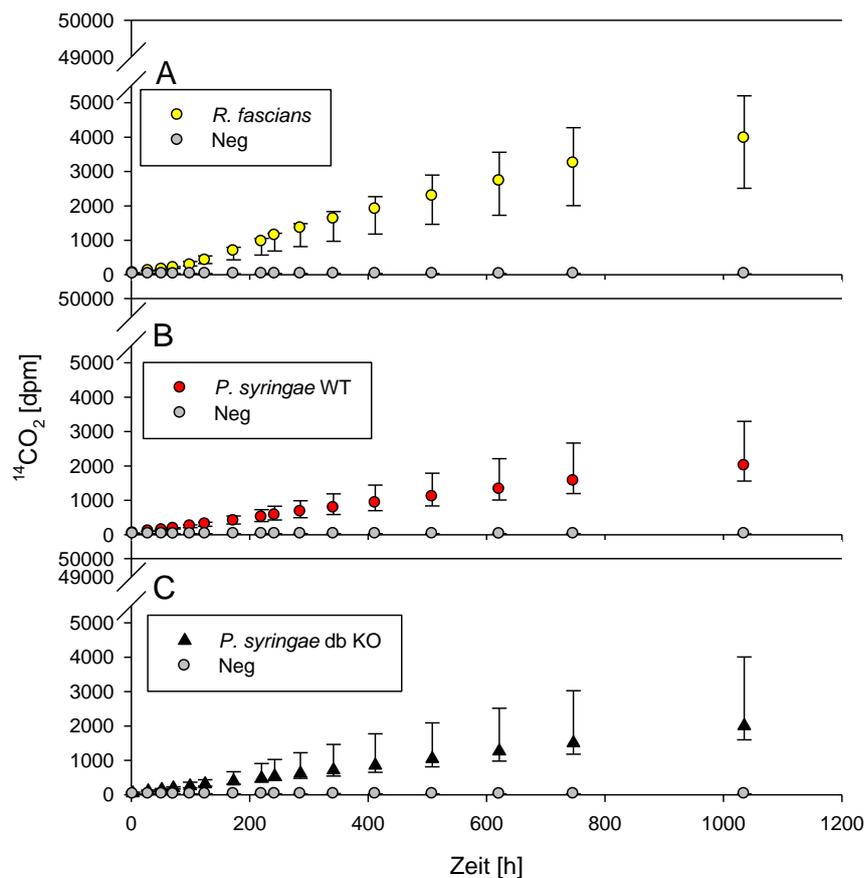
*P. syringae* WT und db KO zeigen bei keinem der drei sehr langkettigen aliphatischen Wachskomponenten ein  $^{14}\text{CO}_2$ -Signal. Nur bei Octadecansäure zeigen *P. syringae* WT und db KO Bakterien ein  $^{14}\text{CO}_2$ -Signal. Nach 217 Stunden und  $^{14}\text{C}$ -Tetracosanol als radioaktiv markierte Wachskomponente, produzierte *R. fascians* 1689,3 dpm  $^{14}\text{CO}_2$ . Mit  $^{14}\text{C}$ -Hexacosansäure als radioaktiv markierte Wachskomponente entstehen nach Inokulation mit *R. fascians* 554,72 dpm  $^{14}\text{CO}_2$  nach 221,5 Stunden (Abbildung 31). Die Mediane der  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion mit  $^{14}\text{C}$ -Tetracosanol als C-Quelle sind höher als mit  $^{14}\text{C}$ -Hexacosansäure als C-Quelle, jedoch sind die Datensätze nicht signifikant unterschiedlich.



**Abbildung 31:** Messungen der  $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung durch Metabolisierung von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Tetracosanol (grüne Punkte) und Hexacosansäure (rote Punkte) durch *R. fascians* auf *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen; Diese wurden vor Inokulation mit *R. fascians* mit  $^{14}\text{C}$ -Tetracosanol bzw.  $^{14}\text{C}$ -Hexacosansäure imprägniert. Dargestellt ist die aufaddierte  $^{14}\text{CO}_2$ -Menge in Abhängigkeit von der Zeit. Die Negativkontrolle wurde nicht aufaddiert; Die Messpunkte entsprechen dem Median und die Fehlerbalken den unteren und oberen Quartilen. Die schwarze Linie zeigt die eingesetzte Gesamtmenge der jeweiligen  $^{14}\text{C}$ -markierten Substanz von 50000 dpm; n= 5-7

Die  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion von *R. fascians*, *P. syringae* WT und db KO Bakterien nach Imprägnierung der *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen mit  $^{14}\text{C}$ -Octadecansäure, die zu den langkettigen Fettsäuren gehört, ist in Abbildung 32 dargestellt.

Alle drei Bakterienarten bauen  $^{14}\text{C}$ -Octadecansäure ab und zeigen ein radioaktives  $^{14}\text{CO}_2$ -Signal. *R. fascians* produzierte nach 1035 Stunden 3970,98 dpm, *P. syringae* WT 2006,64 dpm und db KO 2002,09 dpm  $^{14}\text{CO}_2$ . Die produzierten Mengen an  $^{14}\text{CO}_2$  der drei verschiedenen Bakterien untereinander sind nicht signifikant unterschiedlich.



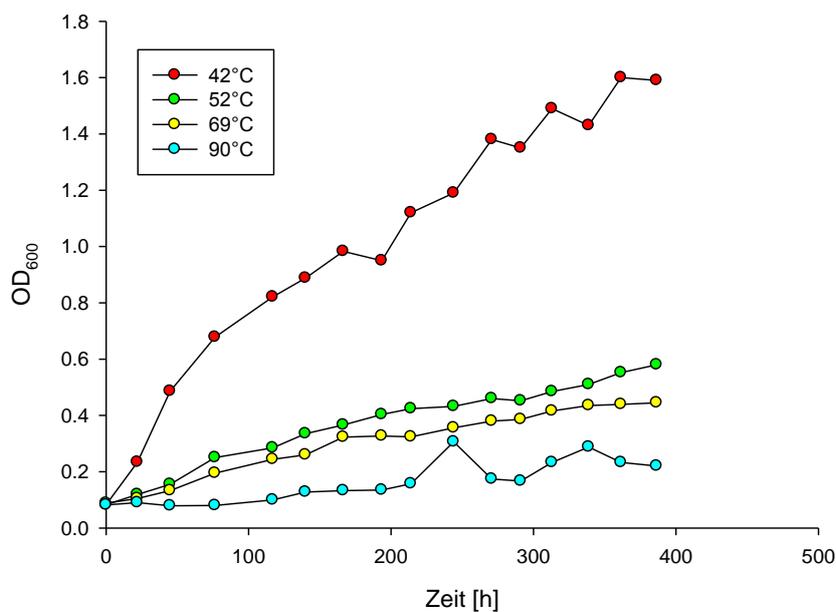
**Abbildung 32:** Messung der  $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung durch die Metabolisierung von  $^{14}\text{C}$ -markierter Octadecansäure durch *R. fascians* (A) *P. syringae* WT (B) und db KO (C) auf *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen; Diese wurden vor Inokulation mit  $^{14}\text{C}$ -markierter Octadecansäure imprägniert. Dargestellt ist die aufaddierte  $^{14}\text{CO}_2$ -Menge in Abhängigkeit von der Zeit. Die Negativkontrolle wurde nicht aufaddiert; Die Messpunkte entsprechen dem Median und die Fehlerbalken den unteren und oberen Quartilen. Die schwarze Linie zeigt die eingesetzte Gesamtmenge der  $^{14}\text{C}$ -Octadecansäure von 50000 dpm.  $n=6$

### 3.3.2 Wachstum von *R. fascians*, *P. syringae* WT und db KO auf verschiedenen lipophilen Substraten (Paraffinwaxse und Triglyceride)

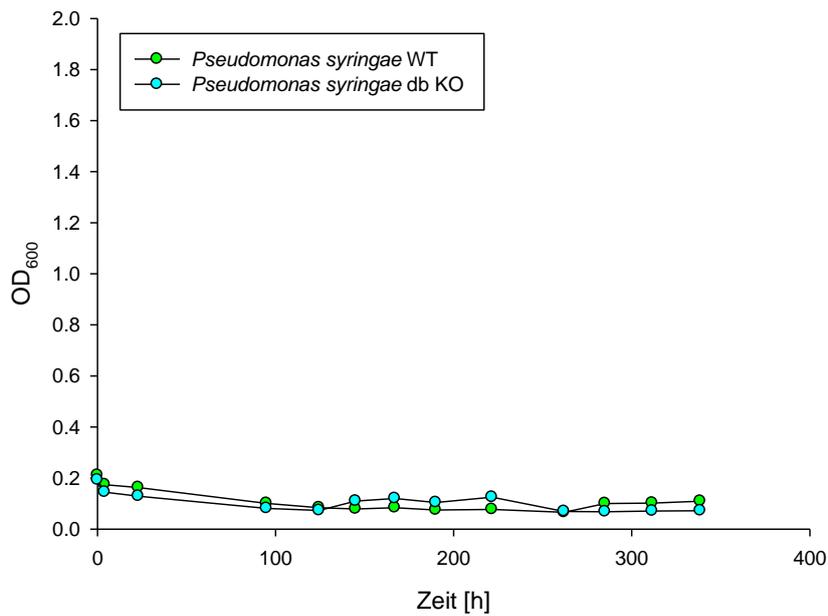
In diesem Versuchsteil wurden die Fähigkeiten der drei Bakterien *R. fascians*, *P. syringae* WT und db KO untersucht, verschiedene C-Quellen zum Aufbau von Biomasse zu nutzen. Dafür wurde C-Quellen freies M9-Medium mit verschiedenen Paraffinwachsen, Paraffinöl und Sonnenblumenöl versetzt und mit zweimal gewaschenen Bakterienvorkulturen beimpft. Danach wurde einmal am Tag die  $\text{OD}_{600}$  gemessen und eine Wachstumskurve erstellt.

Zunächst wurden Paraffinwaxe, einfache Mischungen von Alkanen verschiedener C-Kettenlängen, mit Schmelzpunkte von 42 °C, 52 °C, 69 °C und 90 °C, als C-Quelle verwendet (Abbildung 33).

*P. syringae* WT und db KO wiesen kein Wachstum auf den vier verschiedenen Paraffinwachsen auf (Abbildung 34, am Beispiel des Paraffinwaxes mit dem Schmelzpunkt 42 °C). *R. fascians* zeigte bei allen vier Paraffinwachsen Wachstum. Auf dem Paraffinwachs mit dem Schmelzpunkt von 42 °C erreicht *R. fascians* nach 817 Stunden eine OD<sub>600</sub> von 1,67, auf dem Paraffinwachs mit dem Schmelzpunkt von 52 °C eine OD<sub>600</sub> von 0,85, auf dem Paraffinwachs mit dem Schmelzpunkt von 69 °C eine OD<sub>600</sub> von 0,63 und auf dem Paraffinwachs mit dem Schmelzpunkt von 90 °C eine OD<sub>600</sub> von 0,32. Mit zunehmendem Schmelzpunkt nimmt die Biomasseproduktion von *R. fascians* ab.

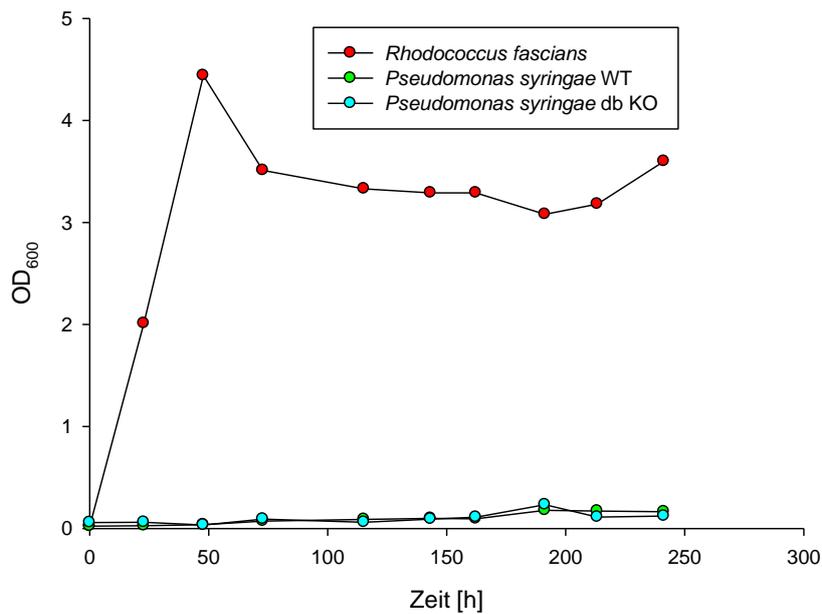


**Abbildung 33:** Wachstum von *R. fascians* auf vier Paraffinwachsen mit unterschiedlichen Schmelzpunkten (42 °C, 52 °C, 69 °C und 90 °C). Dargestellt ist die OD<sub>600</sub> in Abhängigkeit von der Zeit. Dargestellt sind Einzelwerte



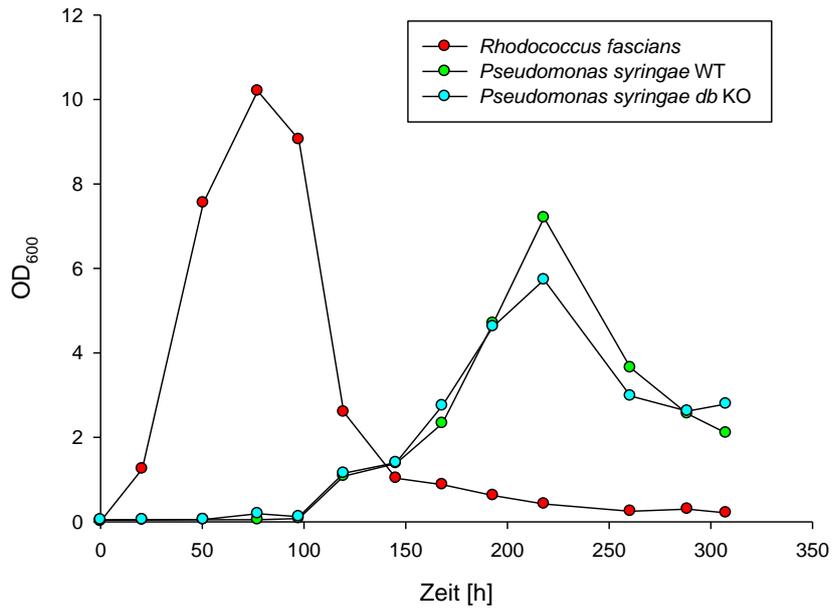
**Abbildung 34:** Wachstum von *P. syringae* WT und *P. syringae* db KO auf dem Paraffinwachs mit dem Schmelzpunkt 42°C. Dargestellt ist die OD<sub>600</sub> in Abhängigkeit von der Zeit. Dargestellt sind Einzelwerte

Der Wachstumsverlauf von *R. fascians*, *P. syringae* WT und db KO mit Paraffinöl als einziger C-Quelle wird in Abbildung 35 dargestellt. *R. fascians* erreicht nach 47,75 Stunden eine OD<sub>600</sub> von 4,44 und sinkt leicht auf eine OD<sub>600</sub> von 3,6 nach 241,25 Stunden. Es bildete sich eine orangene Zellkugel mit einem Durchmesser von ca. 2 cm. *P. syringae* WT erreicht nach 241,25 Stunden eine OD<sub>600</sub> von 0,165 und *P. syringae* db KO eine OD<sub>600</sub> von 0,122. Dies deutete darauf hin, dass kein Wachstum stattfand.



**Abbildung 35:** Wachstum von *R. fascians* und *P. syringae* WT und db KO auf Paraffinöl. Dargestellt ist die OD<sub>600</sub> in Abhängigkeit von der Zeit. Dargestellt sind Einzelwerte

Abbildung 36 zeigt das Wachstum von *R. fascians*, *P. syringae* WT und db KO auf Sonnenblumenöl. *R. fascians* erreicht nach 77,25 Stunden eine maximale OD<sub>600</sub> von 10,2 und sinkt dann bis Stunde 193 auf eine OD<sub>600</sub> von 0,62 ab. *P. syringae* WT und db KO beginnen ab Stunde 119,5 OD<sub>600</sub>-Werte größer als 1 zu verzeichnen und steigen bis OD<sub>600</sub> 7,2 und 5,7 an in Stunde 218. Vorher blieben die OD<sub>600</sub>-Werte unterhalb von 0,1. Nach der Stunde 218 sinken die OD<sub>600</sub> Werte von *P. syringae* WT und db KO auf 2,1 und 2,8 bis Stunde 307,5. *R. fascians* sinkt bis Stunde 307,5 auf eine OD<sub>600</sub> von 0,21. Es bildeten sich kleine Zellaggregate bei allen drei Wachstumsansätzen, die mit bloßem Auge erkennbar waren.



**Abbildung 36:** Wachstum von *R. fascians* und *P. syringae* WT und db KO mit Sonnenblumenöl als C-Quelle. Dargestellt ist die OD<sub>600</sub> in Abhängigkeit von der Zeit. Dargestellt sind Einzelwerte

## **4. Diskussion**

Mikroorganismen haben eine Vielzahl von Adaptionen entwickelt, um den lebenswidrigen Umständen in der Phyllosphäre Stand zu halten und aktiv entgegenzuwirken. Im Gegensatz zur Rhizosphäre, die ein stabiles Lebensumfeld bietet (Vorholt, 2012), sind Mikroorganismen in der Phyllosphäre UV-Strahlung, Wind, Regen, Trockenheit und Nährstoffknappheit ausgesetzt (Beattie und Lindow, 1995; Hirano und Uppel, 2000). Eine zentrale Frage bezüglich der verschiedenen Adaptionen der epiphyllen Bakterien ist also, wie sie an Nährstoffe kommen, um ihren Energiebedarf zu decken.

Den Großteil der Mikroorganismen machen Bakterien aus, die eine Zelldichte von  $10^6$  bis  $10^7$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf dem pflanzlichen Blatt erreichen können (Lindow und Brandl, 2003). Die Kutikula ist durch die in das Kutinpolymer eingelagerten und aufgelagerten Wachse hydrophob. Viele Bakterien erhöhen die Benetzbarkeit der Blattoberfläche, indem sie Biotenside produzieren.

Die pflanzliche Kutikula stellt eine effektive Barriere dar, die der Pflanze Schutz vor unkontrolliertem Wasser- und Solutverlust bietet (Schreiber und Schönherr, 2009). Trotz der effektiven Barrierefunktion verliert die Pflanze Wasser durch kutikuläre Transpiration und organische Solute durch das *Leaching* (Tukey, 1970; Schreiber und Riederer, 1996). Auf der pflanzlichen Kutikula befinden sich als potenzielle Nährstoffe neben den zur Kutikula gehörenden hydrophoben Wachsmolekülen auch vom Innern nach außen diffundierte hydrophile organische Substanzen, wie Zucker, organische Säuren, Aminosäuren und Zuckeralkohole (Tukey, 1970; Mercier und Lindow, 2000).

#### 4.1 Gaschromatographische Analyse von Kohlenhydraten

Am leichtesten verfügbare und schnellsten verwertbare Nährstoffe für die meisten heterotrophen Organismen bilden hydrophile Substanzen, wie Zucker, Zuckeralkohole oder organische Säuren. Hydrophile Substanzgemische werden meist mittels High Performance Liquid Chromatographie (HPLC) aufgetrennt, quantifiziert und analysiert. Die Gaschromatographie (GC) findet ihre Anwendung normalerweise in der Analyse von lipophilen Substanzen, die bei Temperaturen bis 310 °C flüchtig werden und so aufgetrennt werden können. Dennoch findet die Gaschromatographie immer häufiger ihre Anwendung auch hydrophile Substanzen, wie Zucker, Zuckeralkohole, organische Säuren und Aminosäuren, zu analysieren (Katona, Sass und Molnár-Perl, 1999; Becker et al., 2013).

Lipophile flüchtige Substanzen werden mittels Gaschromatographie aufgetrennt und durch unterschiedliche Detektoren analysiert und quantifiziert.

Jedoch auch hydrophile Substanzen können durch vorherige Derivatisierung so verändert werden, dass eine gaschromatographische Analyse möglich wird. Die Gaschromatographie zeigt eine höhere Auflösung, Selektivität und Sensibilität als HPLC oder Kapillarelektrophorese (Sanz, Sanz und Martínez-Castro, 2004). Die Analyse komplexer Substanzgemische, die organische Säuren, Zucker und Zuckeralkohole enthalten, benötigt bei der HPLC zwei verschiedene Detektoren, einen Brechungsindexdetektor sowie einen sensitiveren UV-Detektor. Bei der Gaschromatographie können solche organischen Substanzgemische mit einem nachgeschalteten FID (Flammen-Ionisations-Detektor) oder MS (Massenspektrometer) detektiert werden (Molnár-Perl, 1999). Sun et al., (2016) zeigten, dass bei der Analyse von acht verschiedenen Zuckern und Zuckeralkoholen die Analyse mit HPLC ein Detektionslimit (Limit of Detection; LOD) von  $> 1 \mu\text{g/ml}$  aufwies, die gaschromatographische Analyse eine LOD von  $< 0,5 \mu\text{g/ml}$ . Während mit der HPLC nur fünf der acht Zucker detektiert werden konnten, Rhamnose, Xylitol und Arabitol nicht, konnten mit dem Gaschromatographen alle acht Substanzen detektiert werden. Dies spricht klar für die Gaschromatographie als Analyseinstrument.

#### 4.1.1 Chemisch-analytische Untersuchungen von Kohlenhydraten: Methodenentwicklung

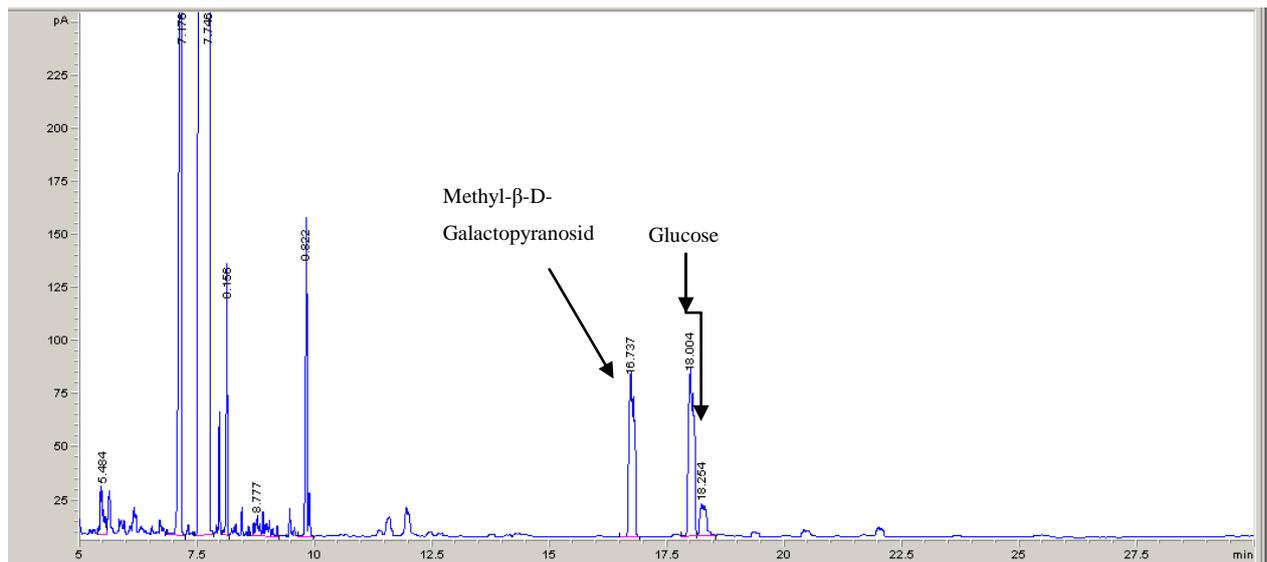
Für die Analyse von potenziellen hydrophilen C-Quellen für epiphyllle Bakterien auf der pflanzlichen Kutikula sind sehr sensitive Analysemethoden wie die Gaschromatographie erforderlich, da Mengen  $\leq 2 \mu\text{g/g}$  zu erwarten sind (Mercier und Lindow, 2000). Hydrophile Substanzen, wie Zucker und Zuckeralkohole, sind kaum flüchtig und schlecht ionisierbar (Sun *et al.*, 2016). Um die Flüchtigkeit und Ionisierbarkeit zu erhöhen, werden polare Substanzen daher vor der gaschromatographischen Analyse derivatisiert, um deren polare funktionelle Gruppen mit apolaren zu kaschieren. Neben der besseren Flüchtigkeit durch die Senkung der Polarität wird auch die Wechselwirkung zwischen den Molekülen über die polaren Gruppen verhindert, die der optimalen Auftrennung hinderlich wäre (Ruiz-Matute *et al.*, 2011; Becker *et al.*, 2013).

Eine gängige Methode ist es, die hydrophilen funktionellen Gruppen, wie Hydroxyl-, Carboxyl, Thiol-, Amino- und Iminogruppen, mit Trimethylsilylgruppen zu derivatisieren (Kouremenos *et al.*, 2010). Ein sehr gutes Silylierungsmittel stellt BSTFA (N,O-

Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid) dar, welches aktive Wasserstoffatome durch Trimethylsilylgruppen ersetzt. Es ist selbst Lösungsmittel, ausreichend flüchtig und interferiert nicht mit früh eluierenden Substanzen. Pyridin wird in den Derivatisierungsreaktionen als Katalysator verwendet und kann durch seine Basizität als Säurefänger dienen (Kouremenos *et al.*, 2010; Lv *et al.*, 2015). Durch diese Derivatisierung können nun Zucker mit einem niedrigen Molekulargewicht, hauptsächlich Mono-, Di- und Trisaccharide, gaschromatographisch analysiert werden (Ruiz-Matute *et al.*, 2011).

Kohlenhydrate besitzen die Eigenschaft durch Tautomerisierung und Halbacetalbildung verschiedene Isoformen zu bilden. So würden für eine Aldohehexose theoretisch fünf verschiedene Tautomere existieren, die  $\alpha$ -Pyranose,  $\beta$ -Pyranose,  $\alpha$ -Furanose,  $\beta$ -Furanose und die offenkettige Form (García-Raso *et al.*, 1989; Becker *et al.*, 2013). Durch das hohe Auftrennungsvermögen der Gaschromatographie entstehen für eine Aldohehexose daher mehrere Peaks, da die verschiedenen Tautomere zu unterschiedlichen Zeiten eluieren. Bei kohlenhydratreichen Proben ist es wegen der Eindeutigkeit daher von Interesse die Anzahl der Peaks für einen Zucker zu minimieren. Das kann erreicht werden, indem die Oxogruppe, über die durch Halbacetalbildung die unterschiedlichen Ringstrukturen gebildet werden, blockiert wird. Die gängige Methode besteht darin, in einem ersten Derivatisierungsschritt aus der Oxogruppe des Zuckers ein Oxim mit Hilfe von Hydroxylamin-Derivaten herzustellen. Im zweiten Schritt werden dann die Hydroxylgruppen mittels BSTFA trimethylsilyliert (Becker *et al.*, 2013).

Um eine optimale gaschromatographische Analyse von Kohlenhydraten, die sich auf der pflanzlichen Kutikula befinden, durchführen zu können, wurden die einstufige Silylierungsderivatisierung und die zweistufige Derivatisierungsmethode, bei der vor der Silylierung die Oxogruppe mittels O-Ethylhydroxylamin ethoximiert wurde, verglichen.



**Abbildung 37:** Darstellungen der gaschromatographischen Auftrennung und Detektion mittels FID von Glucose, die mit dem Derivatisierungsansatz nach Becker et al. (2013), sodass EO-TMS-Derivate entstanden

Vor dem Vergleich wurde der Originalversuchsansatz (Abbildung 37) nach Becker et al. (2013), der mit relativ großen Mengen an Kohlenhydraten arbeitet, so verändert, dass er den Anforderungen einer Analyse kleinster Mengen von Kohlenhydraten gerecht wurde. Dafür wurde das Ansatzvolumen auf 2/5 reduziert, damit die Kohlenhydratmenge so wenig wie möglich verdünnt wurde. Statt Ethylacetat wurde Chloroform als Lösungsmittel verwendet, was dazu führte, dass die Peaks eindeutige Spitzen hatten und nicht gezackt waren, was auf schlechte Auftrennungseigenschaften hindeutet (Abbildung 37). Die Volumenreduktion war möglich, da die Mengen der Derivatisierungsagenzien im Vergleich mit den Mengen an Kohlenhydraten in der Probe in sehr großem Überschuss vorhanden sind.

Wie stark die Mengenverhältnisse der Reagenzien und der Lösungsmittel variiert werden konnten, zeigte sich aus der Kalkulation ihrer Molverhältnisse. Im von Becker et al. (2013) verwendeten Ansatz befinden sich 82  $\mu\text{mol}$  O-Ethylhydroxylamin und 466  $\mu\text{mol}$  BSTFA. 10  $\mu\text{g}$  Glucose entsprechen 56 nmol. Da Glucose fünf Hydroxylgruppen enthält, die trimethylsilyliert werden sollen, muss das fünffache Molgewicht an BSTFA auf 10  $\mu\text{g}$  Glucose bezogen eingesetzt werden, also 280 nmol. Damit ist die Menge an Glucose drei beziehungsweise vier Größenordnungen kleiner als die Derivatisierungsagenzien. Ein Teil des BSTFA wird zur Derivatisierung der Aminogruppe des überschüssigen O-Ethylhydroxylamins verbraucht. Die primäre Aminogruppe kann mit zwei Trimethylsilylgruppen derivatisiert werden. Da BSTFA eine Trimethylsilylgruppen abgeben

kann (Gehrke, Nakamoto, und Zumwalt 1969; Moldoveanu und David 2018), werden 164  $\mu\text{mol}$  (35,2 %) der 466  $\mu\text{mol}$  BSTFA von O-Ethylhydroxylamin verbraucht. Somit bleiben noch 302  $\mu\text{mol}$  (64,8 %), um die Glucose zu derivatisieren. BSTFA liegt damit in 1078-fachem molarem Überschuss vor. Andere Quellen zeigen, dass BSTFA beide Trimethylsilylgruppen abgeben kann. Somit würde es in 2156-fachem molarem Überschuss vorliegen (Evershed, 1993).

Da die Derivatisierungsagenzien drei beziehungsweise vier Größenordnungen im Überschuss vorliegen, wurde das komplette Ansatzvolumen auf 2/5 des Ursprungsvolumens reduziert und auf die chromatographischen Eigenschaften getestet. Durch die Reduktion des Ansatzvolumens konnte die Sensitivität durch Vergrößerung der Peakhöhe, Peakfläche und eine schärfer abgetrennte Peakform erhöht werden. DMAP wirkt wie Pyridin als Katalysator für die Trimethylsilylierung und wurde deshalb, im Gegensatz zum bei Becker et al. (2013) verwendeten Ansatzprotokoll, erst beim zweiten Derivatisierungsschritt hinzugefügt (Becker et al., 2013). Es zeigte sich außerdem, dass eine bessere chromatographische Auftrennung von Kohlenhydraten erreicht werden konnte, wenn anstelle von Ethylacetat, welches bei Becker et al. (2013) verwendet wurde, Chloroform als Lösungsmittel eingesetzt wurde. Im Folgenden wurden die einstufige und die zweistufige Derivatisierungsmethode verglichen. Beide Derivatisierungsmethoden führten bei allen untersuchten Zuckern zu klaren und eindeutigen Peakformen (Abbildung 5, 6 und 7). Auch die Linearität der Kalibrierungskurven von Fructose und Saccharose zeigen, dass beide Derivatisierungsmethoden reproduzierbare und quantifizierbare Derivate liefern.

Es zeigte sich allerdings, dass durch die zweistufige Derivatisierung die Anzahl der einem Zucker zugehörigen Peaks im Vergleich zur einstufigen Derivatisierung reduziert werden konnte. Es konnte bei Glucose von vier Peaks auf zwei Peaks reduziert werden, bei Fructose von zwei Peaks auf einen Peak und bei Saccharose von drei Peaks auf einen Peak. Die zwei Glucosepeaks repräsentieren ein *syn*- und ein *anti*-Isomer. Durch die Ethoximierung wird das anomere Kohlenstoffatom der Aldehydgruppe bei Aldosen zu einem stereoisomeren Kohlenstoffatom, sodass zwei Isomere entstehen können (Becker et al., 2013).

Die einstufige Derivatisierung zeigt im Konzentrationsbereich von  $< 2,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$  und die zweistufige Derivatisierung im Bereich von  $< 0,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$  noch detektierbare und quantifizierbare chromatographische Ergebnisse. Die zweistufige Derivatisierungsmethode führt zu einfacheren und damit klarer identifizierbaren Chromatogrammen. Die Wahl für den internen Standard fiel auf Methyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid, da es sich wie die zu analysierenden

Substanzen um ein Kohlenhydrat handelt. Der interne Standard sollte immer zur gleichen Substanzklasse gehören, wie die zu analysierenden Substanzen. Xylitol erfüllt diese Bedingung. Jedoch kommt Xylitol als natürlicher Zuckeralkohol in der Natur vor. Da im Folgenden hydrophile Substanzen auf der Kutikula von Bohnenblättern (*Phaseolus vulgaris*) analysiert wurden, und die Zusammensetzung unbekannt war, empfahl sich Methyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid, welches kein natürlich vorkommendes Kohlenhydrat ist. Wenn Xylitol auf der Kutikula von Bohnenblättern (*Phaseolus vulgaris*) vorkommen würde und Xylitol als interner Standard verwendet werden würde, würde das Ergebnis verfälscht werden. Das Alkan Tetracosan wird gerne in der Analyse von pflanzlichen Wachsen als interner Standard genutzt, da geradzahlige Alkane nicht in bevorzugt als pflanzliches Wachs vorkommt, aber zur Substanzklasse der pflanzlichen Wachse gehört. Für die Zuckeranalyse bietet es sich nicht an, da es zu lipophil ist und sich daher nicht in der wässrigen Lösung der zu analysierenden Substanzen löst. Ein interner Standard muss so früh wie möglich zu dem zu analysierenden Substanzgemisch hinzugefügt werden. Wenn ein Standard erst bei späteren Pipettierungsschritten hinzugefügt wird, gilt er als externer Standard und kann zu Mengenermittlung nicht verwendet werden.

#### 4.1.2 Chemisch-analytische Untersuchungen von Kohlenhydraten auf der Kutikula von Bohnenblättern (*Phaseolus vulgaris*)

Mithilfe der zweistufigen Derivatisierung sollten im Folgenden die Kohlenhydrate analysiert werden, die sich auf der pflanzlichen Kutikula von *Phaseolus vulgaris* befinden und etwaigen epiphyllen Bakterien zur Verfügung stehen können. *P. syringae* kann auf *Phaseolus vulgaris* Blättern vorkommen und pathogen werden. Es löst die sogenannte Fettfleckenkrankheit aus. Bevor jedoch die Krankheit ausbrechen kann, muss *P. syringae* epiphytisch überleben. Daher ist es von Interesse, wie die Verfügbarkeit von Nährstoffen, insbesondere C-Quellen, auf der Kutikula von *Phaseolus vulgaris* ist. Alle analysierten Mengen der einzelnen Substanzen befanden sich im linearen Bereich der vorher angefertigten Verdünnungsreihen, was ein repräsentatives Verhältnis von Peakfläche und Substanzmenge zeigt und die Daten daher stimmig sind. Neben den Zuckern Fructose, Glucose und Saccharose konnte Myoinositol identifiziert und gefunden werden. Myoinositol ist im pflanzlichen Metabolismus unter anderem ein Vorläufermolekül in der Biosynthese von Pektin und Hemizellulose, welche Bestandteil der pflanzlichen Zellwand sind (Loewus und Murthy, 2000). Bei der Biosynthese der Zellwand epidermaler Zellen könnte Myoinositol auch an die Blattoberfläche gelangt sein

und somit bei der gaschromatographischen Analyse gefunden worden sein. Lombarkia und Derridj (2002) konnten Myoinositol auf Apfelblättern und Apfelfrüchten nachweisen. Sie zeigten, dass Zucker und Zuckeralkohole, darunter auch Fructose und Myoinositol, auch eine Rolle bei der Erkennung der Wirtspflanze für die Eiablage von Insekten spielen. Fructose, Glucose und Saccharose konnten von Mercier und Lindow (2000) mittels HPLC auf der Blattoberfläche von *Phaseolus vulgaris* gefunden werden. Sie fanden 1,4 µg/g Glucose und die Gesamtzuckermenge betrug 2,5 µg/g. Mittels der Gaschromatographie konnten in dieser Arbeit Mengen der gleichen Größenordnung an Glucose gefunden werden ( $0,45 \pm 0,55$  µg/g). Jedoch konnte Glucose nur in zwei der vier Parallelen detektiert werden, was die hohe Standardabweichung erklärt. Die Gesamtzuckermenge bestand bei Mercier und Lindow (2000) zum größten Teil aus Glucose, Fructose und Saccharose. Kleine Mengen an Galactose und einer nicht identifizierten Substanz zählten zu der Gesamtzuckermenge von 2,5 µg/g. Die Gesamtmenge, die in dieser Arbeit ermittelt wurde, betrug  $13,25 \pm 5,5$  µg/g, wobei die als Zucker identifizierte Substanz X1 mit  $8,89 \pm 3,13$  µg/g den größten Anteil hatte. Ohne die Substanz X1 war die Gesamtmenge  $3,45 \pm 2,79$  µg/g. Fiala et al. (1990) fanden zwischen 0,06 und  $0,36$  µg/cm<sup>2</sup> von drei Zuckern (Fructose, Glucose und Saccharose) auf der Blattoberfläche von Mais. Die in dieser Arbeit ermittelte Gesamtzuckermenge betrug  $0,1 \pm 0,04$  µg/cm<sup>2</sup>, ohne die Substanz X1 betrug sie  $0,03 \pm 0,02$  µg/cm<sup>2</sup>. Wildman und Parkinson (1981) fanden mittels Gaschromatographie 0,37 bis  $1,4$  µg/cm<sup>2</sup>, je nach Alter des Blattes, Kohlenhydrate auf *Populus tremuloides* Blättern. Sie fanden neben Glucose, Fructose und Saccharose auch Inositol, Galactose, Maltose, Raffinose und zwei unbekannte Substanzen.

Die Elutionszeiten hängen primär von der Masse der jeweiligen Substanz ab, da durch die Derivatisierung polare Gruppen kaschiert wurden. Dadurch kann eine verzögerte Elution auf Grund der Polarität ausgeschlossen werden. Da die Substanz X1 mit 17,9 Minuten vor dem internen Standard Methyl-β-D-Galactopyranosid eluiert, lässt darauf schließen, dass diese Substanz eine geringere Masse hat. Mit Hilfe des Zerfallsspektrums, welches durch die Massenspektroskopie ermittelt wurde, konnte sie als Zucker identifiziert werden. Es könnte sich um eine Pentose handeln. Die Substanz X2 eluiert nach Saccharose und das Zerfallsspektrum im Massenspektrometer lässt darauf schließen, dass es sich um ein Flavonoid handelt. Flavonoide haben unterschiedliche Schutzfunktionen in Pflanzen. Sie können vor UV-Strahlung schützen aber auch antimikrobiell wirken (Pourcel *et al.*, 2007).

Es konnte gezeigt werden, dass es auf Blättern von *Phaseolus vulgaris* hydrophile Substanzen gibt, die Bakterien als C-Quelle dienen können. Lokal kann die Menge an Nährstoffen noch höher sein, da das *Leaching* an der Basis von Trichomen, die *Phaseolus vulgaris* besitzt, an Blattadern und an Stomata erhöht ist (Leveau und Lindow 2001; Remus-Emsermann et al. 2011).

Im Folgenden dieser Arbeit wurden für Diffusionsversuche durch die pflanzliche Kutikula jedoch nicht Kutikulamembranen von *Phaseolus vulgaris* verwendet, da die enzymatische Behandlung mit Pektinase und Cellulase dazu führt, dass sich die ausgestanzten Blattscheiben zersetzen. Daher wurden im Folgenden Kutikulamembranen von Pflanzenarten verwendet, die in der Kutikulaforschung verwendet werden. Diese Arten sind *Populus canescens*, *Hedera helix* und *Prunus laurocerasus*. *Populus canescens* diente als Vertreter mit einer hohen Anzahl an polaren Poren in der Kutikulamembran (Schönherr, 2006). *Hedera helix* stellt ein Beispiel einer sehr undurchlässigen Kutikulamembran dar (Lukas Schreiber und Schönherr 2009). *Prunus laurocerasus* besitzt robuste Kutikulamembranen und konnten somit gut als Matrix für die Imprägnierung mit Wachsmonomeren dienen (Zeisler, 2013).

#### 4.1.3 Zusammenfassung: Gaschromatographische Analyse von Kohlenhydraten

Die gaschromatographische Analyse von Kohlenhydraten verlangt eine Derivatisierung der polaren funktionellen Gruppen. In diesem Teil der Arbeit wurde die einstufige Derivatisierung mit der zweistufigen verglichen. Bei der einstufigen Derivatisierung werden aktive Wasserstoffatome mit Hilfe von BSTFA zu ihren jeweiligen Trimethylsilylderivaten verethert. Für die zweistufige Derivatisierung werden im ersten Schritt Oxogruppen mittels O-Ethylhydroxylamin ethoximiert sodass ein Oxim entsteht. Und erst im zweiten Schritt folgt die Trimethylsilylierung wie bei der einstufigen Derivatisierung. Der Vorteil der zweistufigen Derivatisierung sind weniger Peaks pro Substanz und eine bessere Separierung der Peaks bei der Gaschromatographie. Nachteile im Vergleich zur einstufigen Derivatisierung sind längere Derivatisierungszeiten und es werden mehr Agenzien gebraucht. Die Wahl der Methode hängt immer von dem Anwendungsbereich ab. Für komplexe Kohlenhydratgemische bietet sich die zweistufige Derivatisierung an, da sie unterschiedliche Kohlenhydrate besser voneinander trennt. Die einstufige Derivatisierung fand für Kohlenhydrate, in diesem Fall Fructose, Anwendung bei Remus-Emsermann et al. (2011) zur Analyse der Permeabilität von *Populus canescens* Kutikulamembranen für Fructose. Da hier nur eine einzelne Substanz analysiert

wurde, war die höhere Anzahl von Peaks für Fructose bei der Gaschromatographie nicht von Nachteil. Bei den geringen Mengen an hydrophilen Substanzen auf der Kutikula von *Phaseolus vulgaris* fand die zweistufige Derivatisierung zur Analyse ihre Anwendung. Besonders Kohlenhydrate mit der gleichen Anzahl an C-Atomen können durch diese Derivatisierungsform besser voneinander getrennt werden. Die Kombination von Substanzstandards und des Massenspektrometers helfen bei der Analyse von solchen Substanzgemischen.

## 4.2 Untersuchungen zum Metabolismus verschiedener C-Quellen

### 4.2.1 Radiochemische Untersuchungen

#### 4.2.1.1 Einfluss von Biotensiden auf den Metabolismus potenzieller <sup>14</sup>C-markierter C-Quellen, die durch die Kutikula diffundieren

Die pflanzliche Kutikula stellt einen kargen nährstoffarmen Lebensraum dar. Trotz ihrer hervorragenden Barrierefunktion diffundieren dennoch organische Solute aus dem Innern des Blattes nach außen auf die Blattoberfläche. Dieser Vorgang wird als *Leaching* bezeichnet (Tukey, 1970). Um an diese knapp verfügbaren Nährstoffe zu gelangen, haben epiphyllle Bakterien diverse Mechanismen entwickelt. Sie produzieren Siderophore, um knapp verfügbares Eisen zu binden, besitzen optimierte Aufnahmemechanismen für unterschiedliche Substanzen und sind zum Teil auf Nieschensubstrate, wie zum Beispiel Methanol, spezialisiert (Abanda-Nkpwatt *et al.*, 2006; Wensing *et al.*, 2010; Vorholt, 2012).

Einige epiphytisch lebende Bakterien produzieren Biotenside (12 %), vornehmlich Mitglieder des Genus *Bacillus* und *Pseudomonas*. Im Vergleich dazu zeigen nur 8 % der Bodenbakterien und 5 % der aquatisch lebenden Bakterien Biotensidproduktion (Burch *et al.*, 2011). Dies zeigt, dass die Produktion von Biotensiden in der Phyllosphäre einigen hinderlichen Lebensumständen entgegenwirken kann. Durch ihren amphiphilen Charakter wird die hydrophobe Oberfläche der pflanzlichen Kutikula besser benetzbar für Wasser, sodass sich ein Wasserfilm bilden kann, der es dem jeweiligen Bakterium ermöglicht mobil zu sein und Stellen zu erreichen, an denen eine erhöhte Nährstoffverfügbarkeit und der Schutz vor widrigen Umweltbedingungen verbessert ist. Solche Orte auf der pflanzlichen Kutikula sind

---

Kutikulafalten, Blattadern oder auch Trichome (Monier und Lindow, 2004; Schreiber et al., 2006).

Auch bei der Biofilmbildung und deren Instandhaltung spielen Biotenside eine wichtige Rolle, da sie zum Beispiel Wasserkanäle aufrecht erhalten (Davey, Caiazza und O'Toole, 2003). Eine weitere wichtige Rolle von Biotensiden zeigt sich, wenn man die Nutzung von industriellen Tensiden in der Landwirtschaft betrachtet. Hier dient die Amphiphilie der Tenside dazu, die Permeabilität der pflanzlichen Kutikula zu erhöhen, sodass zum Beispiel Herbizide besser oder schneller in die Pflanze penetrieren (Gutenberger *et al.*, 2013). Gleichzeitig erhöhen industrielle Tenside, aber auch bakterielle Biotenside, auf der Blattoberfläche die Transpiration durch die pflanzliche Kutikula (Riederer und Schönherr, 1990; Schreiber et al., 2005; Burch et al., 2014). Niederl et al. (1998) konnten zeigen, dass die Diffusion von Wasser durch die pflanzliche Kutikula gekoppelt ist an die Diffusion von organischen Soluten, sodass auch die Permeabilität der pflanzlichen Kutikula für organische Solute durch industrielle Tenside und Biotenside erhöht werden kann.

In diesem Versuchsabschnitt wurde untersucht, in wie weit die Biotensidproduktion von *P. syringae* WT im Vergleich zu seinem db KO, der keine Biotenside produziert, die Verfügbarkeit von drei hydrophilen Substanzen erhöhen kann.

Als organische Solute wurden in dieser Arbeit  $^{14}\text{C}$ -radioaktiv markierte Fructose, Arginin und Glycerin verwendet. Der Einfluss der bakteriellen Biotenside auf die Erreichbarkeit dieser Substanzen auf den isolierten Kutikulamembranen von *Populus canescens* und *Hedera helix* wurde indirekt gemessen, indem die  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion durch die Metabolisierung dieser Substanzen des auf der Außenseite applizierten *P. syringae* WT oder db KO gemessen wurde. Gleichzeitig befand sich auf der Innenseite der Kutikulamembran eine der drei  $^{14}\text{C}$ -markierten Substanzen. Eine  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion konnte also nur entstehen, wenn die markierte Substanz vom Innern durch die Kutikulamembran auf die Außenseite diffundierte und dort von den applizierten Bakterien verwertet wurde. Man kann nicht davon ausgehen, dass die durch die Kutikula diffundierten Substanzen komplett zu  $^{14}\text{CO}_2$  oxidiert wurden, da C-Quellen auch im Anabolismus zelleigener Substanzen verwendet werden. Da *P. syringae* db KO keinen Wachstumsphänotypen aufwies, wird aber davon ausgegangen, dass die jeweiligen  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktionen zwischen Wildtyp und Mutant vergleichbar sind. Die Kutikulamembranen wurden mit 100  $\mu\text{l}$  einer Bakteriensuspension ( $\text{OD}_{600}$  von 1) inokuliert, was einer Zellzahl von ca.  $10^7$  entspricht. Dies ist mit der in der Phyllosphäre vorkommenden Mengen an Bakterien von  $10^6$ - $10^7$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  vergleichbar (Beattie and Lindow, 1995).

Mit *Populus canescens* und *Hedera helix* Kutikulamembranen als Diffusionsbarriere zeigt der biotensidproduzierende *P. syringae* WT bei allen drei verwendeten Stoffen, Fructose, Arginin und Glycerin, eine höhere  $^{14}\text{CO}_2$  Produktion als der db KO. Die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant.

Es existieren zwei unterschiedliche Pfade, über die Stoffe durch die pflanzliche Kutikula diffundieren können. Den lipophilen Pfad, den die amorphe Wachsfraktion der Kutikula und die Kutinmatrix darstellen, und über den lipophile Substanzen und kleine ungeladene hydrophile Moleküle, wie Wasser, diffundieren können. Den hydrophilen Pfad bilden die polaren Poren (Schönherr 2000).

Polare Poren entstehen, wenn sich Wassermoleküle an polare funktionelle Gruppen anlagern und wassergefüllte Kanäle bilden. Diese polaren funktionellen Gruppen sind Hydroxyl- und Carboxylgruppen nicht veresterter Kutinmonomere (Schreiber *et al.*, 2001). Von der äußeren Epidermiszellschicht reichen Fibrillen von Kohlenhydraten in das Kutinpolymer und sogar bis an die Blattoberfläche (Wattendorff und Holloway, 1984). Die pflanzliche Kutikula enthält bis zu 20 % Kohlenhydrate (Schreiber und Schönherr 1990). Es wird vermutet, dass diese durch Anlagerung von Wassermolekülen auch polare Pfade bilden, die die Diffusion von polaren Stoffen durch die pflanzliche Kutikula ermöglichen (Hoch 1979; Schreiber 2002).

Die Produktion der Biotenside könnte bei der Bildung dieser polaren Poren eine Rolle spielen. Das Lipopeptid Syringafaktin wird von *P. syringae* sekretiert, wenn es sich auf der pflanzlichen Kutikula befindet bzw. wenn es auf Agarplatten anwächst. Von der produzierten Menge an Syringafaktin bleiben 9 % zellgebunden und 70 % auf der pflanzlichen Kutikula, wenn die inokulierten Blätter mit Wasser abgespült wurden (Burch *et al.*, 2014). Mit Hilfe des hydrophoben Fettschwanzes verankert sich dieses Biotensid in der kutikulären Wachsschicht. Der hydrophile Peptidteil wirkt hygroskopisch und zieht Wasser an die Wachs Oberfläche, was zu einem Wasserfilm führen kann. Dies führt zum einen zur Erhöhung der Anzahl der gebildeten polaren Poren und zum anderen generell zur Erhöhung der Permeabilität der Kutikula. Denn durch die Bildung einer Wasserschicht auf der physiologischen Außenseite der Kutikula wird ein „Sink“ gebildet, der hydrophile Substanzen vom Innern der Kutikula nach außen zieht (Van Der Wal und Leveau 2011).

Alle drei Substanzen Fructose, Arginin und Glycerin sind durch die Kutikulamembranen von *Populus canescens* und *Hedera helix* diffundiert. Remus-Emsermann *et al.* (2011) konnte schon zeigen, dass Fructose durch *Populus canescens* Kutikulamembranen diffundiert. Stammitti, Garrec, und Derridj (1995) konnten die Diffusion von Fructose, Glucose und

Saccharose durch *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen nachweisen. Die Präsenz von Aminosäuren auf der pflanzlichen Kutikula konnte auch in der Vergangenheit nachgewiesen werden (Tukey 1970; Soldaat, Boutin, und Derridj 1996). Tukey (1970) erwähnt auch Zuckeralkohole, auf der pflanzlichen Kutikula zu finden sind. Sie werden nicht näher beschrieben, jedoch könnte Glycerin dazu gehören. Für alle drei hydrophilen organischen Solute zeigt sich, dass das Vorhandensein der Biotenside eine höhere  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion bewirkte, als die Verfügbarkeit bzw. die Auswaschung der organischen Solute auf *Populus canescens* und *Hedera helix* Kutikulamembranen verbessert wird.

Die produzierten Mengen an  $^{14}\text{CO}_2$  mit *Populus canescens* als trennende Kutikulamembran sind sowohl für den WT als auch den db KO generell höher als mit *Hedera helix* als trennende Kutikulamembran.

*Populus canescens* weist eine 18 mal höhere Permeabilität für Wasser mit einem Leitwert von  $2,68 \times 10^{-9}$  m/s auf als *Hedera helix* mit  $1,49 \times 10^{-10}$  m/s (Schreiber und Schönherr, 2009). Remus-Emsermann et al. (2011) konnte eine für die Diffusion von Fructose durch *Populus canescens* Kutikulamembranen einen Leitwert von  $3,39 \times 10^{-9}$  m/s ermitteln, welcher in der gleichen Größenordnung wie der Leitwert für Wasser liegt. Lokal an der Basis von abgebrochenen Trichomen (0,37 % der Oberfläche) konnte ein Leitwert von  $9,15 \times 10^{-7}$  m/s errechnet werden. Dies legt nahe, dass die organischen Solute Fructose, Arginin und Glycerin besser durch Kutikulamembranen von *Populus canescens* diffundieren als durch Kutikulamembranen von *Hedera helix*, was die Kinetiken zeigen konnten. Die Daten deuten darauf hin, dass *Hedera helix* weniger polare Poren oder solche mit kleinerem Radius aufweist und generell eine bessere Barrierefähigkeit besitzt als *Populus canescens* (Schreiber et al. 2006). Ein lokaler Effekt der Biotenside an polaren Poren kann durch die Messmethode verschleiert werden, da die  $^{14}\text{CO}_2$  Produktion über die gesamte Fläche der Kutikulamembran gemessen wurde. Je mehr polare Poren eine Kutikulamembran also aufweist, desto besser kann der Effekt der Biotenside gemessen werden. Dies könnte unter anderem erklären, warum man die Effekte besser bei *Populus canescens* als bei *Hedera helix* Kutikulamembranen sehen kann.

Es lässt sich vermuten, dass Arginin, da es ein geladenes Teilchen ist, durch die polaren Poren diffundiert. Fructose und Glycerin sind zwar nicht geladen, diffundieren aber als polare Substanzen mit Hydrathülle höchstwahrscheinlich auch ausschließlich durch die polaren Poren, die für *Populus canescens* molare Volumen bis  $110 \text{ cm}^3/\text{mol}$  passieren lassen (Popp et al., 2005). Fructose besitzt ein molares Volumen von  $113 \text{ cm}^3/\text{mol}$  und liegt damit knapp über

dem maximalen molaren Volumen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Fructose durch *Populus canescens* und *Hedera helix* diffundieren konnte. Aminosäuren im Bereich von 57 – 91 cm<sup>3</sup>/mol (Glycin, Alanin, Serin, Valin und Threonin) diffundierten durch *Hedera helix* Kutikulamembranen. Die Aminosäuren Leucin (113 cm<sup>3</sup>/mol) und Phenylalanin (131 cm<sup>3</sup>/mol) waren nicht detektierbar (Popp, 2005). Im Gegensatz dazu konnten Popp *et al.* (2005) zeigen, dass Maltotriose mit einem molaren Volumen von 278,8 cm<sup>3</sup>/mol durch Kutikulamembranen von *Hedera helix* diffundieren kann. Tatsächlich wird vermutet, dass dissoziierte Aminosäuren schlechter durch die Kutikulamembran diffundieren als ungeladene Kohlenhydrate (Popp, 2005). In dieser Arbeit konnte im Gegensatz dazu nachgewiesen werden, dass Arginin (118 cm<sup>3</sup>/mol) durch die Kutikulamembranen von *Populus canescens* und *Hedera helix* diffundiert. Glycerin hat ein molares Volumen von 70,9 cm<sup>3</sup>/mol, was im Bereich der molaren Volumen liegt, die polare Poren passieren können.

Die gemessenen Mengen an <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, die nach 6 Stunden produziert wurden, lassen sich mit Hilfe der spezifischen Aktivität in ng/cm<sup>2</sup> der Ursprungssubstanz umrechnen. Bei *Populus canescens* zeigen sich für <sup>14</sup>C-Fructose Werte von 1,64 ng/cm<sup>2</sup> (*P. syringae* WT) und 0,37 ng/cm<sup>2</sup> (*P. syringae* db KO). <sup>14</sup>C-Arginin zeigt mit *Populus canescens* als trennende Kutikulamembran Werte von 1,7 ng/cm<sup>2</sup> (*P. syringae* WT) und 0,09 ng/cm<sup>2</sup> (*P. syringae* db KO). Von <sup>14</sup>C-Glycerin wurden 0,16 ng/cm<sup>2</sup> (*P. syringae* WT) und 0,06 ng/cm<sup>2</sup> (*P. syringae* db KO) zu <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> umgesetzt. Mit *Hedera helix* als trennende Kutikulamembran wurden 0,18 ng/cm<sup>2</sup> (*P. syringae* WT) und 0,02 ng/cm<sup>2</sup> (*P. syringae* db KO) <sup>14</sup>C-Fructose umgesetzt. 0,07 ng/cm<sup>2</sup> (*P. syringae* WT) und 0,05 ng/cm<sup>2</sup> <sup>14</sup>C-Arginin wurden mit *Hedera helix* als trennende Membran umgesetzt. Und 0,03 ng/cm<sup>2</sup> (*P. syringae* WT und db KO) <sup>14</sup>C-Glycerin wurden umgesetzt, welches durch *Hedera helix* Kutikulamembranen diffundiert ist. Diese Mengen lassen sich mit den auf *Phaseolus vulgaris* gaschromatographisch analysierten Mengen an Kohlenhydraten vergleichen. Fructose wurde in Mengen von 6,14 ng/cm<sup>2</sup>. Glucose wurde in Mengen von 3,5 ng/cm<sup>2</sup> gefunden. Größere Mengen zeigte Saccharose, die mit 15,98 ng/cm<sup>2</sup> vertreten war. Die radioaktiv und die gaschromatographisch gemessenen Werte befinden sich in der gleichen Größenordnung. Es handelt sich bei den radioaktiv ermittelten Werten um die Mengen der drei Substanzen, die zu <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> oxidiert wurden.

Die Tatsache, dass die <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Produktionen von *P. syringae* WT im Vergleich zu db KO zwar höher aber nicht signifikant höher waren, könnte auch daran liegen, dass die produzierten Biotenside in Hungersituationen wieder konsumiert zu werden, sodass man den Effekt nur abgeschwächt messen konnte.

In zwei weiteren Versuchsansätzen wurde getestet, ob der Verlust der Biotensidproduktion bei *P. syringae* db KO durch die Zugabe industrieller Tenside substituiert werden konnte und damit die Fähigkeit, die Fähigkeit  $^{14}\text{C}$ -Fructose, die durch *Populus canescens* Kutikulamembranen diffundiert ist, besser auswaschen zu können, wieder hergestellt werden konnte.

Es wurden zwei industrielle Tenside verwendet, Glucopon 215 CSUP und Plurafac LF 300 (BASF). Glucopon 215 CSUP ist ein Alkylpoliglycosid mit Alkylgruppen von 8 und 10 C-Atomen. Glucopon 215 CSUP dient als Benetzungsmittel (Schönherr, 2000, 2002). Im Versuchsansatz konnte gezeigt werden, dass Glucopon 215 CSUP die Permeabilität der *Populus canescens* Kutikulamembranen für Fructose erhöhen kann, da der *P. syringae* db KO mit Glucopon 215 CSUP-Zusatz mehr  $\text{CO}_2$  produzierte als der *P. syringae* db KO ohne Zusatz von Glucopon 215 CSUP. Glucopon 215 CSUP kann die Permeabilität für Glyphosat durch *Populus canescens* (Schönherr 2002) Kutikulamembranen und Calciumchlorid durch *Pyrus communis* L. Kutikulamembranen (Schönherr, 2000; Schönherr und Luber, 2001) erhöhen. Ethomeen T/25, ein Aminethoxylat mit einer durchschnittlichen Polyethoxyethylenkettenlänge von 15, dient auch als Benetzungsmittel und erhöht die Permeabilität von *Vitis vinifera* Kutikulamembranen für das Herbizid Paraquat (Popp, 2005). Glyphosat, Calciumchlorid und Paraquat sind Ionen, die durch polare Poren diffundieren (Schönherr 2000; Schreiber und Schönherr 2009). Durch den lipophilen Pfad können Ionen nicht diffundieren. Kohlenhydrate sind so groß, dass auch sie durch die polaren Poren diffundieren. Die hygroskopischen Benetzungsmittel erhöhen die Anzahl der polaren Poren und somit die Diffusion der polaren Stoffe durch die pflanzliche Kutikula. Genauso wirkt auch das Biotensid Syringafactin, wie in den vorherigen Versuchen durch den *P. syringae* Wildtypen gezeigt wurde.

Plurafac LF 300 ist ein polydisperses Tensid bestehend aus ethoxylierten und propoxylierten Alkoholen. Das häufigste Monomer ist  $\text{C}_{13}\text{E}_{x1}\text{P}_{x2}$ . Gutenberger et al. (2013) konnten zeigen, dass dieses polydisperse Tensid die Diffusion von  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol um das 11- bis 16-fache erhöhen kann. Da sowohl die simultane Applikation des Tensids mit dem Wirkstoff auf die Außenseite der Kutikulamembran als auch die Verwendung des Tensids als Desorptionsmittel im Innern der Versuchsapparatur eine Erhöhung der Diffusion bewirkten, kann davon ausgegangen werden, dass die Weichmacher-Eigenschaften von Plurafac LF 300 eine Erhöhung bewirkten. Lipophile Tenside interagieren mit den kutikulären Wachsen und

erhöhen die Fluidität (Schreiber und Schönherr 2009). Lipophile Stoffe, wie Epoxiconazol, können dadurch schneller durch die amorphen Wachsteregionen diffundieren.

Der lipophile und hydrophile Pfad durch die pflanzliche Kutikula sind jedoch strikt getrennt. Das bedeutet auch, dass Tenside, die einen Einfluss durch ihre Plasticiser Eigenschaft auf den lipophilen Pfad haben, da sie die Wachse anlösen, keinen Effekt auf den polaren Pfad haben (Schreiber 2005; Schönherr 2000). Shi, Schönherr, und Schreiber (2005) zeigten, dass lipophile Tenside die Diffusion von hydrophoben Substanzen wie Metribuzin und Iprovalicarb durch Kutikulamembranen von *Stephanotis floribunda* und *Pyrus communis* erhöhen konnten, nicht jedoch für die hydrophile Substanz Methylglucose. Der polare Pfad durch die pflanzliche Kutikula, durch den Methylglucose diffundiert, wird durch lipophile Tenside, die die Fluidität der Wachse erhöhen, nicht beeinflusst. Dennoch zeigt *P. syringae* db KO, dem Plurafac LF 300 beigefügt wurde, eine höhere  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion als *P. syringae* db KO ohne Tensidzugabe. Es diffundierte also in Anwesenheit von Plurafac LF 300 mehr  $^{14}\text{C}$ -Fructose durch die *Populus canescens* Kutikulamembranen.

Eine weitere Eigenschaft von Plurafac LF 300 ist, dass es hygroskopisch wirkt (BASF, technical Information). Durch die hygroskopischen Eigenschaften entstehen wie bei Glucopon 215 CSUP und Syringafactin mehr polare Poren, durch die Fructose diffundieren kann. Bei dem Versuchsaufbau ist ein wichtiger Faktor die Tatsache, dass nicht die direkte Diffusion der  $^{14}\text{C}$ -markierten Substanzen gemessen wird, sondern das  $^{14}\text{CO}_2$ , welches die Bakterien nach Aufnahme der Stoffe produzieren. Somit werden nur die diffundierten Moleküle gemessen, die von Bakterien erreicht werden und dann zu  $^{14}\text{CO}_2$  oxidiert werden. Stellen auf den isolierten Kutikulamembranen, an denen  $^{14}\text{C}$ -Fructose, -Glycerin oder -Arginin an die Oberfläche diffundieren, die nicht besiedelt wurden, werden also vernachlässigt. Durch das Biotensid Syringafactin, wie auch durch die industriellen Tenside Glucopon 215 CSUP und Plurafac LF 300, wird die Benetzung der Kutikula zusätzlich erhöht. Das bedeutet also auch, dass in Anwesenheit eines Tensids *P. syringae* db KO bzw. *P. syringae* WT eine größere Fläche auf der pflanzlichen Kutikula besiedeln können. Dadurch können *P. syringae* WT bzw. der *P. syringae* db KO mit beigefügtem Tensid mobiler auf der Oberfläche sein und an bevorzugte Stellen gelangen. Bei der Inokulation mit Tensid verbessert sich nicht nur die Benetzung der isolierten Kutikulamembran, sondern es bildet sich durch die Hygroskopizität der Tenside ein leichter Wasserfilm, der die Mobilität der Bakterien verbessert.

---

#### 4.2.1.2. Zusammenfassung: Einfluss von Biotensiden auf den Metabolismus potenzieller <sup>14</sup>C-markierter C-Quellen, die durch die Kutikula diffundieren

Die pflanzliche Kutikula stellt eine sehr effiziente Barriere zur Atmosphäre dar, durch die trotzdem in geringem Maße Wasser und Solute aus dem Innern nach außen diffundieren können (Schreiber und Schönherr, 2009; Remus-Emsermann et al., 2011). Es konnte hier gezeigt werden, dass das bakterielle Biotensid Syringafactin nicht nur die kutikuläre Transpiration erhöhen kann (Burch *et al.*, 2014), sondern auch die Auswaschung aus der pflanzlichen Kutikula von organischen Soluten wie Fructose, Arginin und Glycerin. Niederl et al. (1998) zeigten, dass die Diffusion von Wasser und organischen Säuren durch die pflanzliche Kutikula korrelieren. Auch wenn die verwendeten organischen Säuren relativ hydrophob sind und die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen hydrophil sind, zeigt sich dennoch, dass Kutikulamembranen, die schlechter durchlässig für Wasser sind auch schlechter durchlässig für die drei hydrophilen Substanzen waren. So diffundiert durch *Hedera helix* Kutikulamembranen weniger Wasser als durch *Populus canescens* Kutikulamembranen (Schreiber und Schönherr, 2009). Diese Barriereeigenschaft spiegeln die Ergebnisse für die drei Substanzen Fructose, Arginin und Glycerin wider. Mit Hilfe der beiden industriellen Tenside Glucopon 215 CSUP und Plurafac LF 300 konnte der Verlust der Biotensidproduktion von *P. syringae* dbKO wiederhergestellt werden, was die erhöhte <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Produktion mit industriellem Tensid zeigte.

#### 4.2.1.3. Wachskomponenten als potenzielle C-Quellen für *P. syringae* und *R. fascians* Bakterien

Es konnte gezeigt werden, dass (Bio-)Tenside die Permeabilität der pflanzlichen Kutikula für hydrophile organische Solute erhöhen können. Die Biotensidproduktion gibt Bakterien in der Phyllosphäre damit einen Vorteil. Zum einen können sie durch erhöhte Mobilität zu präferierten nährstoffreicheren Stellen auf dem Blatt gelangen, und zum anderen lokal das *Leaching* erhöhen.

In der Vergangenheit wurden Biotenside zunächst bei Bodenbakterien entdeckt. Dort erhöhten sie den Zugang zu hydrophoben C-Quellen (Neu, 1996; Ron und Rosenberg, 2001). Die amphiphile Eigenschaft von Biotensiden ermöglicht es, hydrophobe Stoffe in Wasser zu emulgieren. Diese Emulsion gibt den Bakterien die Fähigkeit die hydrophoben Stoffe ins Zellinnere aufzunehmen und dort zu metabolisieren. Die Gattung *Rhodococcus* besitzt die

Fähigkeit Mycolsäuren in die Zellwand einzulagern, was dazu führt, dass die Bakterienzelle hydrophob ist (Alvarez, 2010). Dadurch können hydrophobe Substanzen besser durch direkten Kontakt an die Zelle gelangen und leicht in die Zelle aufgenommen werden (Whyte *et al.*, 1999). Solche hydrophoben Substanzen finden sich auch als intra- und epikutikuläre Wachse auf der pflanzlichen Kutikula wieder, und könnten epiphyllen Bakterien als C-Quelle dienen. Im Folgenden wurde dieses Potenzial der pflanzlichen Wachse untersucht.

#### **4.2.1.4. Abbau aliphatischer $^{14}\text{C}$ -markierter lipophiler Substanzen (Wachsmonomere) durch *R. fascians*, *P. syringae* WT und db KO in Flüssigkultur**

In diesem Versuchsteil wurde der Metabolismus von vier  $^{14}\text{C}$ -radioaktiv markierten aliphatischen Wachsmonomeren durch *P. syringae* WT, db KO und *R. fascians* untersucht. Die verwendeten Wachsmonomere waren Octadecansäure, Tetracosanol, Hexacosansäure und Octacosan. Es wurden Bakteriensuspensionen in M9-Medium verwendet, denen jeweils eine der vier  $^{14}\text{C}$ -radioaktiv markierten Substanzen zugefügt wurde. Das produzierte  $^{14}\text{CO}_2$  wurde dann in einer 1 M KOH-Lösung als  $\text{K}_2^{14}\text{CO}_3$  gebunden und die Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler gezählt. Octadecansäure gehört zu den langkettigen Fettsäuren. Tetracosanol, Hexacosansäure und Octacosan gehören zu den sehr langkettigen Fettsäuren und Fettsäurederivaten. *R. fascians* setzte mehr  $^{14}\text{CO}_2$  frei als *P. syringae* WT und db KO, wenn Tetracosanol, Hexacosansäure und Octacosan als C-Quelle zur Verfügung standen. Die Gattung *Rhodococcus* zeigt eine große metabolische Vielfalt. Sie kann eine große Anzahl organischer Substanzen abbauen. Darunter befinden sich neben kurz- und langkettigen Alkanen auch halogenierte oder nitrosubstituierte Aromaten und heterozyklische und polyzyklische Aromaten (Larkin *et al.*, 2005). Die Gattung *Rhodococcus* besitzt neben ihrem großen Genom meist mehrere lineare Plasmide, die eine große Zahl an katabolischen Genen beherbergen, die der metabolischen Vielfalt zutragen. Gesheva, Stackebrandt und Vasileva-Tonkova (2010) isolierten einen *R. fascians* Stamm aus dem Boden der Casey Station, Wilkes Land, Antarktis, welches Paraffinöl und auch Erdöl als C-Quelle nutzen kann. Oso *et al.* (2019) isolierten einen *Rhodococcus* sp. Stamm aus der Phyllosphäre, der mit Diesel als einzige C-Quelle wachsen kann. Auch zu der Gattung *Pseudomonas* gehören Arten, die Alkane als C-Quelle nutzen können. Liu *et al.* (2014) isolierten *Pseudomonas aeruginosa* aus einem mit Erdöl kontaminierten Boden und konnten zeigen, dass dieser mit Alkanen als einzige C-Quelle wachsen kann. *P. syringae* B728a zeigte bei Oso *et al.* (2019) Wachstum auf

Diesel, welches aus C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub> Alkanen besteht. In den beschriebenen Versuchsansätzen zeigt sich deutlich, dass *P. syringae* <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> produziert, wenn sehr langkettige aliphatische Wachsmonomere zur Verfügung stehen.

Die <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Produktionskinetik von *R. fascians* bei <sup>14</sup>C-Hexacosansäure und <sup>14</sup>C-Octacosan zeigt, dass nahezu das gesamte <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> in den ersten 29 Stunden produziert und die Kinetik bis zum Ende hin abflacht. Bei <sup>14</sup>C-Tetracosanol als C-Quelle wird auch in den ersten 29 Stunden das meiste <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> produziert, bis zum Ende hin wird aber noch einmal so viel <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> produziert. Auch hier flacht die Kinetik stark ab. *P. syringae* WT und db KO zeigen bei den drei sehr langkettigen <sup>14</sup>C-markierten Wachsmonomeren exponentielle <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Produktionskinetiken, die zum Ende hin abflachen. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Bakterienarten ist, dass *P. syringae* mobil ist und *R. fascians* nicht (Bell *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2013). Dadurch kann sich *R. fascians* nicht gezielt im wässrigen Medium aktiv zu den lipophilen C-Quellen bewegen, die sich entweder am Boden oder an der Oberfläche befinden. Nach der Zugabe kommen die Bakterienzellen von *R. fascians* in Kontakt mit der jeweiligen sehr langkettigen C-Quelle und können diese nutzen, was die hohe Anfangsproduktion von <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> hervorruft. Sind die <sup>14</sup>C-markierten Moleküle in unmittelbarer Umgebung verwertet, kann *R. fascians* die verbleibenden Moleküle nicht aktiv erreichen, da die Gläschen des Versuchsaufbaus nicht bewegt werden, eine Durchmischung ausbleibt und die Bakterienzellen zu Boden sinken. *P. syringae* hingegen ist beweglich und kann gezielt zu potenziellen C-Quellen gelangen. *P. syringae* WT und db KO gelangen nach einer Anlaufphase von zwei Tagen in eine exponentielle <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Produktionsphase, die zum Ende hin abflacht. Es ist bekannt, dass Bakterien ihren Stoffwechsel von hydrophilen auf lipophile C-Quellen umstellen können (Rojo, 2009). Es konnte bei *Bacillus subtilis* Stämmen gezeigt werden, dass die Zelloberfläche mit Hilfe von Biotensiden hydrophober beziehungsweise hydrophiler wurde (Ahimou, Jacques, und Deleu 2000). Dadurch kann zum Beispiel der direkte Kontakt zu hydrophoben C-Quellen verbessert werden. Die Anfangsphase von *P. syringae* WT und db KO zeigt die Umstellung von dem hydrophilen Glycerin, welches bei der Bakterienanzucht als C-Quelle diente, auf lipophile sehr langkettige Wachsmonomere.

*P. syringae* WT zeigt mit <sup>14</sup>C-Tetracosanol, <sup>14</sup>C-Hexacosansäure und <sup>14</sup>C-Octacosan als C-Quelle eine höhere <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Produktion als der db KO. Daraus lässt sich schließen, dass die produzierten Biotenside die Wachsmonomere emulgieren, somit in wässriger Lösung besser für das Bakterium verfügbar machen und der Verbrauch ansteigt. Es gibt unterschiedliche Strategien, die Verfügbarkeit hydrophober Substanzen zu verbessern. Zum einen können sie

mit Hilfe von Biotensiden in Wasser emulgiert und somit gelöst werden. Dadurch entstehen Micellen, die durch die Bakterienzellen aufgenommen werden können, was wahrscheinlich hier zur Strategie von *P. syringae* gehört. Eine zweite Strategie ist der Zugang der Bakterienzelle zum Öltropfen bzw. hydrophoben Partikel durch direkten Kontakt. Hierfür lagert *R. fascians* Mycolsäuren, Glycolipide und Fettsäuren in die Zellwand ein, um eine hydrophobe Zelloberfläche zu bekommen. Biotenside, die *R. fascians* produziert, bleiben meist zellwandgebunden (Perfumo *et al.*, 2010).

Auf Grunde der aufsteigenden Kohlenstoffkettenlängen wurde erwartet, dass in dem wässrigen Medium Tetracosanol besser als Hexacosansäure und Hexacosansäure besser als Octacosan abgebaut werden konnte, da mit steigender Kettenlänge die Hydrophobizität steigt. Hinzu kommt, dass die polaren funktionellen Gruppen von Tetracosanol und Hexacosansäure zu einer besseren Löslichkeit in Wasser führen. *R. fascians* konnte Tetracosanol besser abbauen als Octacosan und Hexacosansäure, jedoch zeigte sich bei Octacosan eine höhere  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion als bei Hexacosansäure. Bei *P. syringae* WT und db KO zeigte sich sogar zeitweise eine höhere  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion bei Octacosan als bei Tetracosanol. An dieser Stelle ist wichtig zu beachten, dass die Negativkontrolle von dem Versuchsansatz mit Octacosan schon ohne Zusatz von Bakterien radioaktive  $^{14}\text{C}$ -Signale zeigte. Die Ergebnisse sind also mit diesem Hintergrund zu interpretieren. Es könnte sein, dass  $^{14}\text{C}$ -Octacosan radiochemische Verunreinigungen aufwies, die flüchtig waren.

Mit  $^{14}\text{C}$ -Octadecansäure als C-Quelle hat *P. syringae* WT die höchste  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion. *R. fascians* zeigt wie bei den sehr langkettigen Wachskomponenten einen sehr hohen Anfangswert. *P. syringae* db KO produziert zunächst am wenigsten  $^{14}\text{CO}_2$ , überholt die Produktion von *R. fascians* jedoch zum Ende hin. Octadecansäure gehört mit 18 Kohlenstoffatomen zu den langkettigen Fettsäuren. Langkettige Fettsäuren können über die  $\beta$ -Oxidation verwertet werden (Schulz, 1991). Die Kinetiken der  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion zeigen, dass sowohl *R. fascians* als auch *P. syringae* Octadecansäure sehr gut abbauen können. Der Unterschied zu den drei sehr langkettigen Wachsmolekülen ist hier, dass *P. syringae* WT im Abbau der Octadecansäure einen Vorteil gegenüber *R. fascians* hat. *P. syringae* db KO zeigt in den ersten 26 Stunden am wenigsten  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion. Zwischen 67 Stunden und 215,5 Stunden ist die  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion des *P. syringae* db KO jedoch nicht mehr signifikant unterschiedlich zu derjenigen von *R. fascians*. Und nach 337,5 Stunden produziert *P. syringae* db KO signifikant mehr  $^{14}\text{CO}_2$  als *R. fascians*. Die Immobilität von *R. fascians* gibt dem Bakterium in diesem Versuchsaufbau einen Nachteil gegenüber *P. syringae* WT und zum

Ende hin auch gegenüber db KO, was zu einem hohen Anfangswert der  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion führt, welche jedoch schnell abflacht. Des Weiteren ist Octadecansäure besser in Wasser löslich als die drei sehr langkettigen Wachsmonomere und kann direkt in den Zyklus der  $\beta$ -Oxidation eintreten. Die Biotensidproduktion scheint dem *P. syringae* Wildtyp bei dem Abbau der  $^{14}\text{C}$ -markierten Octadecansäure durch Emulgieren einen Vorteil gegenüber dem db KO zu verleihen.

#### **4.2.1.5. Abbau aliphatischer $^{14}\text{C}$ -markierter lipophiler Substanzen (Wachsmonomere) durch *R. fascians*, *P. syringae* WT und db KO auf isolierten Kutikulamembranen**

Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.3.1.2 zeigen die generelle Fähigkeit von *P. syringae* WT, db KO und *R. fascians* aliphatische Wachsmonomere abzubauen. Jedoch wurden wässrige Lösungen verwendet, die den Lebensumständen in der Phyllosphäre nicht entsprechen. Deshalb wurde ein weiterer Versuchsansatz gewählt, in dem Kutikulamembranen von *Prunus laurocerasus* in Transportkammern eingespannt wurden und jeweils mit den  $^{14}\text{C}$ -markierten aliphatischen Wachsmonomeren Octacosan, Hexacosansäure, Tetracosanol oder Octadecansäure imprägniert wurden. Im Inneren der Transportkammer befand sich M9-Medium ohne C-Quelle. Die imprägnierten Kutikulamembranen wurden dann mit dem jeweiligen Bakterium *P. syringae* WT, db KO oder *R. fascians* inokuliert und über mehrere Tage die  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion dokumentiert. Zu erwarten war, dass weniger  $^{14}\text{CO}_2$  produziert wird als im Versuchsansatz im Flüssigmedium. Denn die Mobilität und Diffusion auf der pflanzlichen Kutikula ist im Vergleich zu einem flüssigen Medium stark reduziert. Nur *R. fascians* zeigt bei den sehr langkettigen aliphatischen Wachsmonomeren  $^{14}\text{C}$ -Tetracosanol und  $^{14}\text{C}$ -Hexacosansäure eine  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion, nicht aber bei  $^{14}\text{C}$ -Octacosan. Für  $^{14}\text{C}$ -Tetracosanol zeigt *R. fascians* eine höhere  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion als bei  $^{14}\text{C}$ -Hexacosansäure. Es zeigt sich also wieder, dass mit Abnahme der Kohlenstoffkettenlänge, der Abbau steigt. Whyte *et al.* (1998) konnten bei einem *Rhodococcus*-Stamm zeigen, dass kürzerkettigere Alkane (C12, C16) besser abgebaut wurden als sehr langkettige Alkane (C28, C32). *P. syringae* WT und db KO zeigen erst bei  $^{14}\text{C}$ -Octadecansäure eine  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion. Hier produzierten *R. fascians*, *P. syringae* WT und db KO nicht signifikant unterschiedliche Mengen an  $^{14}\text{CO}_2$ .

Der bakterielle Abbau  $^{14}\text{C}$ -radioaktiv markierter aliphatischer Wachsmonomere in Flüssigkultur und auf isolierten Kutikulamembranen unterscheidet sich. Die Bakterien

produzieren in Flüssigkultur mehr  $^{14}\text{CO}_2$  als auf der Kutikulamembran. Unschwer lässt sich erkennen, dass in Flüssigkultur viele hinderliche Lebensumstände, die sich auf der pflanzlichen Kutikula wiederfinden, nicht existieren. So kann sich das mobile Bakterium *P. syringae* in Flüssigkultur frei bewegen und gezielt zu der verfügbaren lipophilen C-Quelle gelangen. *R. fascians* ist nicht mobil (Bell *et al.*, 1998), wird sich jedoch trotzdem entweder direkt an den Fetttröpfchen oder lipophilen Partikeln anlagern oder frei im Medium schweben und so durch Zufall an die lipophilen C-Quellen gelangen. Bei dem Versuchsaufbau mit isolierten Kutikulamembranen zeigen sich die schwierigen Lebensumstände der Phyllosphäre. Trotz der 100 % Luftfeuchte entspricht der etwaige Wasserfilm auf der Kutikula nicht einem flüssigen Medium. Die Mobilität auf den Kutikulamembranen ist eingeschränkter als in Flüssigmedium. Des Weiteren müssen die  $^{14}\text{C}$ -markierten Aliphaten erst einmal wieder in Lösung gebracht werden, da sie sich durch das Aufbringen auf die Kutikulamembran in die Wachschiicht eingebettet haben. Es zeigt sich, dass *P. syringae* sehr langkettige aliphatische Wachsmonomere in der Phyllosphäre nicht abbauen kann.

Erst kürzerkettige aliphatische Carbonsäuren wie Octadecansäure, die zu den langkettigen Carbonsäuren zählen, können durch den normalen Fettsäurestoffwechsel abgebaut werden.

*R. fascians* hingegen kann auch unter den Lebensumständen in der Phyllosphäre sehr langkettige aliphatische Substanzen der pflanzlichen Wachse abbauen, was ihm einen metabolischen Vorteil gegenüber anderen epiphyllen Bakterien gibt.

Hinzukommt, dass mit steigender Kohlenstoffanzahl des Moleküls die Löslichkeit in wässrigen Medien sinkt und somit die Verfügbarkeit für das jeweilige Bakterium. Das zeigt sich sowohl in den Ergebnissen des ersten wie auch des zweiten Versuchsteils dieses Abschnitts. Je kürzerkettiger das jeweilige  $^{14}\text{C}$ -markierte aliphatische Wachsmonomer, desto höher ist die  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion der Bakterien *P. syringae* WT, db KO und *R. fascians*. Nur in der Flüssigkultur haben *P. syringae* WT und db KO mehr  $^{14}\text{CO}_2$  mit Octacosan als C-Quelle als mit Hexacosansäure produziert.

#### 4.2.2 **Wachstum von *R. fascians*, *P. syringae* WT und db KO auf verschiedenen lipophilen Substraten (Paraffinwachse und Triglyceride)**

In diesem Versuchsteil wurden *R. fascians* und *P. syringae* WT und db KO auf ihr Wachstumsverhalten auf verschiedenen lipophilen Substraten untersucht. Dazu wurden zum

einen vier feste Paraffinwaxse mit unterschiedlichen Schmelzpunkten (42 °C, 52 °C, 69 °C und 90 °C) und zum anderen flüssiges Paraffinöl und Sonnenblumenöl getestet. Hierfür wurde M9-Medium mit 2 % der jeweiligen C-Quelle versetzt und mit zweimal gewaschenen Bakterien aus Vorkultur angeimpft. Der Waschvorgang war nötig, damit jegliche potenziellen C-Quellen des Anzuchtmediums der Vorkulturen entfernt wurden und somit nur die jeweilige C-Quelle in dem M9-Medium zum Wachstum zur Verfügung stand.

*R. fascians* zeigte sowohl auf den Paraffinwachsen, dem Paraffinöl und dem Sonnenblumenöl Wachstum, wohingegen *P. syringae* WT und db KO nur Wachstum auf Sonnenblumenöl zeigten. Geschätzt 10 % der Trehaloselipide *R. fascians* werden zur vorbereitenden Emulgierung der hydrophoben Substanzen sezerniert, der Rest bleibt zellgebunden (Perfumo *et al.*, 2010). Die gemessenen Oberflächenspannungen und Kontaktwinkel von *R. fascians* Suspensionen, die hydrophobe Substanzen als C-Quelle beinhalteten, konnten dies jedoch nicht zeigen, beziehungsweise war die sezernierte Menge wahrscheinlich zu gering (Daten nicht gezeigt).

In Abhängigkeit der Kettenlängenverteilung bei den Paraffinwachsen, wuchs *Rhodococcus fascians* am besten auf dem Paraffinwachs mit dem geringsten Schmelzpunkt von 42 °C, was einherging mit einem hohen Anteil an kurzkettigen Alkanen. Es ist zu erkennen, dass der Abbau und das damit verbundene Wachstum der *R. fascians* Bakterien umso geringer ausfällt, je höher der Anteil längerer Alkane in einem Paraffinwachs ist. Ein ähnlicher Trend ließ sich schon bei dem Abbau der radioaktiv markierten Wachsmonomere erkennen, bei denen der C<sub>24</sub>-Alkohol in höherem Maße als die C<sub>26</sub>-Carbonsäure und diese wiederum in höherem Maße als das C<sub>28</sub>-Alkan abgebaut wurden. Die Korrelation zwischen den mittleren Kettenlängen der vier verschiedenen Paraffinwachsen (42°C, 52°C, 69°C und 90°C) und der Wachstumssteigerung von *R. fascians* ist in Abbildung 38 dargestellt. Betrachtet man nur die drei Paraffinwaxse 52°C, 69°C und 90°C, so korrelieren die mittleren Kohlenstoffkettenlängen der einzelnen Waxse mit der Wachstumssteigerung von *R. fascians* mit einem Korrelationsfaktor von -0,9964 sehr gut. Das bedeutet je höher die mittlere Kettenlänge des Paraffinwaxes desto geringer das Wachstum von *R. fascians*. Wird die Wachstumssteigerung von *R. fascians* auf dem Paraffinwachs 42°C mit einbezogen führt das zu einem Korrelationsfaktor von -0,6877, was auf eine schlechtere Korrelation hindeutet. Betrachtet man die Zusammensetzung des Paraffinwaxes 42°C im Vergleich zu den drei anderen so lässt sich erkennen, dass nur in diesem Paraffinwachs Alkane mit den Kettenlängen C18, C19 und C20 gefunden wurden. Es könnte darauf hindeuten, dass diese

Kettenlängen von *R. fascians* sehr viel besser abgebaut werden können, als Kettenlängen über C20, was zu dem erhöhten Wachstum führt.

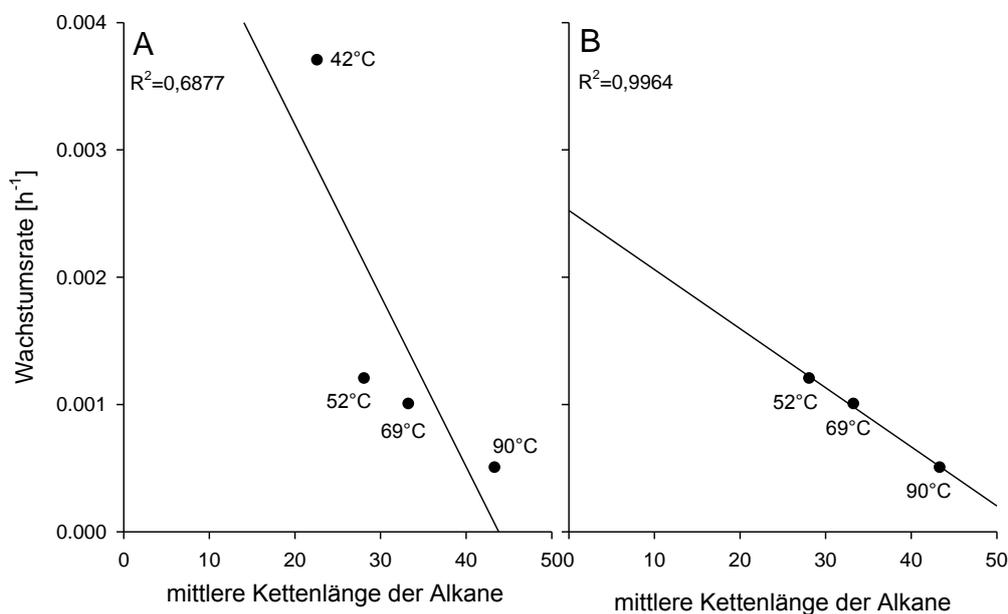


Abbildung 38: Korrelation zwischen den mittleren Kettenlängen der vier unterschiedlichen Paraffinwache (42°C, 52°C, 69°C und 90°C) und der Wachstumssteigung von *R. fascians*. Bei A ist die Korrelation mit allen vier Paraffinwachsen dargestellt mit einem Korrelationsfaktor von 0,6877; B zeigt die Korrelation zwischen den drei Paraffinwachsen 52°C, 69°C und 90°C mit einem Korrelationsfaktor von 0,9964

Die gaschromatographische Analyse der vier verschiedenen Paraffinwache konnte zeigen, dass sich die Kettenlängenverteilung der Alkane mit steigendem Schmelzpunkt hin zu längerkettigen Alkanen verschob. Das Paraffinwachs mit dem Schmelzpunkt von 90 °C zeigte sehr langkettige Alkane, die wahrscheinlich nicht komplett durch die gaschromatographische Analyse abgebildet werden konnten, da die Maximaltemperatur 310 °C war, bei der sehr langkettige Alkane nicht mehr in die Gasphase übergehen können.

Mit sehr langkettigen Wachsmonomeren als C-Quelle zeigten *P. syringae* WT und db KO jedoch bei den Versuchsansätzen mit <sup>14</sup>C-markierten Wachsmonomeren eine <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Produktion. Anscheinend ist die Kapazität von *P. syringae* Wachsmonomere abzubauen nicht ausreichend, um eine Zellteilung und somit ein Wachstum zu ermöglichen. Es könnte sich auch um unspezifische Bindung der sehr langkettigen Wachsmonomere an Enzyme handeln, die für den Fettsäurestoffwechsel kürzerkettiger Fettsäuren zuständig sind. Bei dem Wachstum auf Paraffinöl zeigt *R. fascians* die höchste Zelldichte bei den kurz-kettigen Alkanen. Paraffinöl besteht aus sehr kurz-kettigen Alkanen und zyklischen Verbindungen. Die

Gattung *Rhodococcus* findet sich häufig in Böden, die mit Kohlenwasserstoffen, wie Alkanen, kontaminiert sind, da sie diese sehr gut abbauen können. So fand man diese Gattung sowohl in der Antarktis wie auch in der arktischen Tundra, was auch ihre Kälteresistenz widerspiegelt. Die Remediation solcher kontaminierter Böden lässt sich mit *Rhodococcus* gut verwirklichen (Bej, Saul, und Aislabie 2000; Eriksson, Ka, und Mohn 2001). Saul et al. (2005) kontaminierten den Boden in der Nähe der Scott Base, Antarktis, mit aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffen an und reicherten dadurch Proteobakterien und Actinobakterien an. Unter den Isolaten waren Vertreter der Gattung *Rhodococcus*, welcher Alkane abbaute, *Sphingomonas*, welcher das aromatische Phenantren abbaute und *Pseudomonas*, welcher Alkane und das monoaromatische Toluol abbaute.

Bei dem Wachstum von *R. fascians* auf Paraffinöl formte sich eine ca. 2 cm große gelbe Zellkugel. Mit Hilfe von in der Zellwand eingelagerten Mycolsäuren und Trehaloselipiden wird die Zelloberfläche von *R. fascians* hydrophob (Perfumo et al., 2010). Dadurch bilden sich in dem wässrigen Wachstumsansatz hydrophobe Zellaggregate bis hin zu großen Zellklumpen. Chang, Liu und Liu (2009) fanden das gleiche Phänomen mit der Art *Rhodococcus erythropolis*, wenn sie auf Octadecan wuchs. Ihre Theorie ist, dass sich die hydrophoben Bakterienzellen zunächst um Öltröpfchen lagern und dadurch kleine Aggregate bilden, die sich mit anderen Aggregaten zu immer größeren Aggregaten bis hin zu der großen Kugel verbinden. Es wurden drei Aufnahmearten von Alkanen postuliert. Zum einen können einzeln in Wasser gelöste Alkanmoleküle aufgenommen werden (minimal für Alkane mit mehr Kohlenstoffatomen als 10), zum anderen können die Bakterienzellen direkten Kontakt zu dem hydrophoben Substrat haben oder Kontakt zu feinen kleinen gelösten Öltröpfchen (Pseudosolubilisierung). *Rhodococcus* hat durch seine hydrophobe Zelloberfläche zum Großteil direkten Zellkontakt zu dem hydrophoben Substrat (Hommel, 1990). Das Wachstum auf Kohlenwasserstoffen ist dennoch limitiert auf die Grenzfläche zwischen hydrophobem Substrat und der Wasserphase, da die Oxigenasen nie extrazellulär sondern immer membrangebunden sind (Rosenberg, 1993).

Sonnenblumenöl besteht aus Triglyceriden, die zum größten Teil die Monomere Linolsäure und Ölsäure beinhalten (Ramos et al., 2009).

Auf Sonnenblumenöl zeigt *R. fascians* ein starkes Wachstum bis zu einer OD von 10,2 nach 77,25 Stunden. Danach sinkt die OD wieder bis zu einem Wert von 0,21. Es zeigt sich, dass sich während des Wachstums auf Sonnenblumenöl nach dem Erreichen der maximalen OD von 10,2 Zellaggregate bildeten, die zu ca. 0,5 cm großen Aggregaten heranwuchsen.

Dadurch sank allerdings die OD., da diese mit einzelnen Zellen und nicht mit Zellaggregaten korreliert.

*P. syringae* wuchs überhaupt nicht auf Paraffinen und schien zunächst nicht auf Sonnenblumenöl zu wachsen. Jedoch nach einer Inkubationszeit von drei Tagen begannen sowohl der Wildtyp als auch der db KO zu wachsen. Beide erreichten eine OD von 4,7 (WT) und 4,62 (db KO). Auch hier bildeten sich Aggregate, sodass die jeweiligen OD auf 2,1 (WT) und 2,8 (db KO) sanken. Die Ergebnisse der radioaktiven Studien zur  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion von *P. syringae* und *R. fascians* mit  $^{14}\text{C}$ -Octadecansäure als C-Quelle ließen darauf schließen, dass *P. syringae* ein besseres Wachstum auf Sonnenblumenöl als *R. fascians* zeigen würde, da die Monomere des Sonnenblumenöls im Bereich der Kettenlänge von Octadecansäure liegen. Dies ließ sich jedoch nicht bestätigen. *R. fascians* zeigt trotzdem ein schnelleres und dichteres Wachstum als *P. syringae*. Das kann im Gegensatz zu den radioaktiven Versuchsansätzen daran liegen, dass die Glaskolben auf Flachbettagitatoren inkubiert wurden, sodass die Immobilität von *R. fascians* keine limitierende Eigenschaft darstellte.

Es zeigt erneut, dass *R. fascians* einen physiologischen und verwertungstechnischen Vorteil im Abbau von lipophilen Substanzen hat. Bei der Anzucht auf Coryneagar beziehungsweise KB-Agar zeigt sich, dass *R. fascians* langsamer wächst als *P. syringae*, jedoch kompensiert *R. fascians* diesen Nachteil in der Phyllosphäre mit einer hohen Spannbreite an Substraten, die das Bakterium abbauen kann. Bei den lipophilen Substraten kommt erleichternd hinzu, dass die Zelloberfläche von *R. fascians* durch die Einlagerung von Mycolsäuren hydrophobe Eigenschaften besitzt und somit der Kontakt zum Substrat schnell entsteht und deshalb auch ein Vorteil im Wachstum auf Sonnenblumenöl hervorruft.

#### 4.2.3 **Zusammenfassung: Wachskomponenten als potenzielle C-Quellen für *P. syringae* und *R. fascians***

Neben Soluten, die aus dem Innern der Pflanze nach außen auf die pflanzliche Kutikula diffundieren können und als C-Quelle dienen können, bieten die Wachskomponenten, die einen Teil der pflanzlichen Kutikula bilden, eine potenzielle C-Quelle. In diesem Abschnitt der Arbeit konnte gezeigt werden, dass *R. fascians*, *P. syringae* WT und db KO einzelne  $^{14}\text{C}$ -markierte Wachskomponenten zu  $^{14}\text{CO}_2$  abbauen konnten. In Flüssigmedium weisen alle eine  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion auf. *R. fascians* hatte bei den sehr langkettigen Wachskomponenten eine höhere  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion als *P. syringae* WT und db KO. Bei Octadecansäure produzierten *P. syringae* WT und db KO mehr bzw. gleichviel  $^{14}\text{CO}_2$  wie *R. fascians*. Mit 18 C-Atomen

gehört sie zu den langkettigen Fettsäuren und kann durch den normalen Fettsäurestoffwechsel abgebaut werden. Die Biotensidproduktion von *P. syringae* WT verschafft ihm gegenüber dem db KO einen Vorteil. Befinden sich die  $^{14}\text{C}$ -markierten Wachskomponenten auf der pflanzlichen Kutikula werden der Abbau und die Verfügbarkeit schwieriger für die Bakterien. *R. fascians* besitzt hier einen Vorteil durch sein großes metabolisches Spektrum. *P. syringae* WT und db KO konnten auf der isolierten Kutikulamembran nur Octadecansäure zu  $^{14}\text{CO}_2$  abbauen. Die Wachstumsversuche mit vier verschiedenen Paraffinwachsen, einem Paraffinöl und Sonnenblumenöl zeigten, dass *R. fascians* auf allen C-Quellen wachsen konnte. *P. syringae* wuchs nur auf Sonnenblumenöl. Man erkennt erneut die metabolische Vielfalt von *R. fascians*. Interessanterweise bildeten sich bei den beiden Ölen bei allen Bakterien Zellklumpen, was darauf hindeutet, dass die Zelloberflächen hydrophob werden und sich dadurch die Zellen im wässrigen Milieu zusammenschließen.

### 4.3 Zusammenfassung

Die Phyllosphäre stellt einen lebensfeindlichen Lebensraum dar. Jedoch gibt es epiphytisch lebende Bakterien, die diesen Lebensumständen entgegenwirken und Mechanismen entwickelt haben, in diesem kargen Lebensraum Nährstoffe zu bekommen. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt hydrophile Substanzen, besonders Kohlenhydrate, die auf der pflanzlichen Kutikula zu finden sind, mittels Gaschromatographie zu analysieren. Ziel dieser Methode war es die Anzahl der entstehenden Peaks, die Kohlenhydrate aufgrund ihrer unterschiedlichen Isomere hervorrufen, zu minimieren. Dadurch, dass die Oxogruppe der Kohlenhydrate mit Hilfe von O-Ethylhydroxylamin zu einem Oxim reagierte, wurde der Ringschluss verhindert und die Anzahl der Isomere auf ein (Fructose und Saccharose) bis zwei Formen (Glucose) reduziert. BSTFA diente dazu, die Hydroxygruppen zu Trimethylsilylethern zu verethern und somit die Hydrophobizität zu erhöhen. Diese ist nötig, damit die Substanzen flüchtiger werden. Hydrophile Substanzen, die auf Blättern von Bohne (*Phaseolus vulgaris*) vorkommen, wurden analysiert. Es konnten die Substanzen Glucose, Fructose, Saccharose und Myoinositol eindeutig mit Hilfe von Standards und der Massenspektroskopie identifiziert werden. Zwei Substanzen, eines aus der Klasse der Kohlenhydrate und eines aus der Klasse der Flavonoide, konnten nicht eindeutig bestimmt werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, wie die Biotensidproduktion von *P. syringae* die Diffusion von den  $^{14}\text{C}$ -markierten organischen Soluten Fructose, Arginin und Glycerin durch die pflanzliche Kutikula erhöhen kann. Hierfür wurde der Wildtyp und ein zugehöriger knock-out, der keine Biotenside produziert, verwendet. Die Diffusion wurde indirekt ermittelt, indem die  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion der Bakterien gemessen wurde. Der Wildtyp zeigte meistens eine höhere  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion als der knock-out. *Hedera helix* diente als Vertreter sehr undurchlässiger Kutikulamembranen und *Populus canescens* als Vertreter relativ durchlässiger Kutikulamembranen mit mehr polaren Poren (Schreiber und Schönherr, 2009). Im Weiteren konnte das Fehlen der Biotensidproduktion bei *P. syringae* db KO kompensiert werden, indem industriell hergestellte Tenside, Glucopon 215 CSUP beziehungsweise Plurafac LF 300, hinzugegeben wurden. So produzierte *P. syringae* db KO mit beigefügtem Tensid mehr  $^{14}\text{CO}_2$  als ohne bei *Populus canescens* Kutikulamembranen und Fructose als diffundierendes Solut.

Im letzten Teil wurden Wachskomponenten als potenzielle C-Quellen für *P. syringae* und *R. fascians* untersucht. Auf Grund seines großen metabolischen Spektrums konnte *R. fascians* die  $^{14}\text{C}$ -markierten Wachsmonomere in Flüssigmedium und auf pflanzlichen Kutikulamembranen zu  $^{14}\text{CO}_2$  abbauen. Nur Octacosan konnte auf der pflanzlichen Kutikula nicht abgebaut werden. *P. syringae* weißt nicht ein solch breites metabolisches Spektrum auf und zeigte bei den sehr langkettigen Wachsmonomeren zumindest auf der pflanzlichen Kutikula keine  $^{14}\text{CO}_2$  Produktion. In Flüssigmedium zeigte sich eine  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion, und man konnte die höhere  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion bei *P. syringae* WT auf Grund der Biotensidproduktion im Vergleich zum db KO erkennen. Octadecansäure konnte von allen Bakterien abgebaut werden, da sie im normalen Fettsäurestoffwechsel vorkommt. Hier erwies sich bei *P. syringae* WT die Biotensidproduktion in Flüssigmedium als Vorteil gegenüber seinem db KO. *R. fascians* hatte dennoch keinen Nachteil im Abbau von Octadecansäure. *R. fascians* ist bekannt dafür, zellgebundene Biotenside zu besitzen, die seine Zelloberfläche hydrophob machen und dadurch der Kontakt und die Aufnahme von hydrophoben Substanzen erleichtert wird.

In den Wachstumsversuchen konnte man erneut *R. fascians* Fähigkeit erkennen, Alkane abzubauen zu können. Nur *R. fascians* wuchs auf den vier Paraffinwachsen und dem Paraffinöl. *P. syringae* WT und db KO zeigten nur auf Sonnenblumenöl Wachstum, welches *R. fascians* auch abbauen konnte.

Es zeigte sich, dass es verschiedene Mechanismen in der Phyllosphäre gibt, das karge Nahrungsangebot optimal zu nutzen. Zum einen kann die Biotensidproduktion von *P. syringae* die Verfügbarkeit von Nährstoffen auf der pflanzlichen Kutikula erhöhen. Zum anderen können das breite metabolische Spektrum von *R. fascians* und die hydrophobe Zelloberfläche hilfreich sein, einzelne Wachsmonomere abzubauen.

## **5. Literaturverzeichnis**

- 
- Abanda-Nkpwatt D, Müsch M, Tschiersch J, Boettner M, Schwab W.** 2006. Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: Growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. *Journal of Experimental Botany* **57**, 4025–4032.
- Ahimou F, Jacques P, Deleu M.** 2000. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme and Microbial Technology* **27**, 749–754.
- Alvarez HM.** 2010. *Biology of Rhodococcus*. Springer Science & Business Media.
- Andrews JH, Harris RF.** 2000. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annual Review of Phytopathology* **38**, 145–180.
- Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, Smyth TJ, Marchant R.** 2010. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**, 427–444.
- Barthlott W, Neinhuis C.** 1997. Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. *Planta* **202**, 1–8.
- Bashan Y, Sharon E, Okon Y, Henis Y.** 1981. Scanning electron and light microscopy of infection and symptom development in tomato leaves infected with *Pseudomonas tomato*. *Physiological Plant Pathology* **19**, 139–144.
- Baur P, Buchholz A, Schönherr J.** 1997. Diffusion in plant cuticles as affected by temperature and size of organic solutes: similarity and diversity among species. *Plant, Cell & Environment* **20**, 982–994.
- Beattie GA, Lindow SE.** 1995. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. *Annual Review of Phytopathology* **33**, 145–172.
- Becker M, Zweckmair T, Forneck A, Rosenau T, Potthast A, Liebner F.** 2013. Evaluation of different derivatisation approaches for gas chromatographic-mass spectrometric analysis of carbohydrates in complex matrices of biological and synthetic origin. *Journal of Chromatography A* **1281**, 115–126.
- Bej AK, Saul D, Aislabie J.** 2000. Cold-tolerant alkane-degrading *Rhodococcus* species from Antarctica. *Polar Biology* **23**, 100–105.

- 
- Bell KS, Philp JC, Aw DWJ, Christofi N.** 1998. A review: The genus *Rhodococcus*. *Journal of Applied Microbiology* **85**, 195–210.
- Berti AD, Greve NJ, Christensen QH, Thomas MG.** 2007. Identification of a biosynthetic gene cluster and the six associated lipopeptides involved in swarming motility of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Journal of Bacteriology* **189**, 6312–6323.
- Blakeman JP.** 1993. Pathogens in the foliar environment. *Plant Pathology* **42**, 479–493.
- Bodenhausen N, Horton MW, Bergelson J.** 2013. Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* **8**, e56329
- Bonfante P, Anca I-A.** 2009. Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annual Review of Microbiology* **63**, 363–383.
- Bunster L, Fokkema NJ, Schippers B.** 1989. Effect of surface-active *Pseudomonas* spp. on leaf wettability. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 1340–1345.
- Burch AY, Browne PJ, Dunlap CA, Price NP, Lindow SE.** 2011. Comparison of biosurfactant detection methods reveals hydrophobic surfactants and contact-regulated production. *Environmental Microbiology* **13**, 2681–2691.
- Burch AY, Shimada BK, Mullin SWA, Dunlap CA, Bowman MJ, Lindow SE.** 2012. *Pseudomonas syringae* coordinates production of a motility-enabling surfactant with flagellar assembly. *Journal of Bacteriology* **194**, 1287–1298.
- Burch AY, Zeisler V, Yokota K, Schreiber L, Lindow SE.** 2014. The hygroscopic biosurfactant syringafactin produced by *Pseudomonas syringae* enhances fitness on leaf surfaces during fluctuating humidity. *Environmental Microbiology* **16**, 2086–2098.
- Burrows SM, Butler T, Jöckel P, Tost H, Kerkweg A, Pöschl U, Lawrence MG.** 2009. Bacteria in the global atmosphere—Part 2: Modeling of emissions and transport between different ecosystems. *Atmospheric Chemistry and Physics* **9**, 9281–9297.
- Chamel A, Pineri M, Escoubes M.** 1991. Quantitative determination of water sorption by plant cuticles. *Plant, Cell and Environment* **14**, 87–95.
- Chang W-N, Liu C-W, Liu H-S.** 2009. Hydrophobic cell surface and bioflocculation behavior of *Rhodococcus erythropolis*. *Process Biochemistry* **44**, 955–962.

- Constantinidou HA, Hirano SS, Baker LS, Upper CD.** 1990. Atmospheric dispersal of ice nucleation-active bacteria: the role of rain. *Phytopathology* **80**, 934–937.
- Cornelis K, Ritsema T, Nijse J, Holsters M, Goethals K, Jaziri M.** 2001. The plant pathogen *Rhodococcus fascians* colonizes the exterior and interior of the aerial parts of plants. *The American Phytopathological Society* **14**, 599–608.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM.** 1995. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology* **49**, 711–745.
- Davey ME, Caiazza NC, O'Toole GA.** 2003. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology* **185**, 1027–1036.
- Davis CL, Brlansky RH.** 1991. Use of immunogold labelling with scanning electron microscopy to identify phytopathogenic bacteria on leaf surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 3052–3055.
- Duineveld BM, Van Veen JA.** 1999. The number of bacteria in the rhizosphere during plant development: Relating colony-forming units to different reference units. *Biology and Fertility of Soils* **28**, 285–291.
- Dutta B, Gitaitis R, Smith S, Langston Jr D.** 2014. Interactions of seedborne bacterial pathogens with host and non-host plants in relation to seed infestation and seedling transmission. *PLoS One* **9**, e99215.
- Eriksson M, Ka J-O, Mohn WW.** 2001. Effects of low temperature and freeze-thaw cycles on hydrocarbon biodegradation in Arctic tundra soil. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 5107–5112.
- Espelie KE, Davis RW, Kolattukudy PE.** 1980. Composition, ultrastructure and function of the cutin-and suberin-containing layers in the leaf, fruit peel, juice-sac and inner seed coat of grapefruit (*Citrus paradisi* Macfed.). *Planta* **149**, 498–511.
- Espuny MJ, Egjido S, Mercadé ME, Manresa A.** 1995. Characterization of trehalose tetraester produced by a waste lube oil degrader *Rhodococcus* sp. 51T7. *Toxicological & Environmental Chemistry* **48**, 83–88.
- Evershed RP.** 1993. Advances in silylation. *Handbook of derivatives for chromatography* **2**, 51–108.

- Faulwetter RC.** 1917. Wind-blown rain, a factor in disease dissemination. *Journal of Agricultural Research* **10**, 639–648.
- Fiala V, Glad C, Martin M, Jolivet E, Derridj S.** 1990. Occurrence of soluble carbohydrates on the phylloplane of maize (*Zea mays* L.): variations in relation to leaf heterogeneity and position on the plant. *New Phytologist* **115**, 609–615.
- Fitt BDL, McCartney HA, Walklate PJ.** 1989. The role of rain in dispersal of pathogen inoculum. *Annual Review of Phytopathology* **27**, 241–270.
- Fokkema NJ, Riphagen I, Poot RJ, De Jong C.** 1983. Aphid honeydew, a potential stimulant of *Cochliobolus sativus* and *Septoria nodorum* and the competitive role of saprophytic mycoflora. *Transactions of the British Mycological Society* **81**, 355–363.
- Gage DJ.** 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**, 280–300.
- García-Raso A, Fernández-Díaz M, Páez MI, Sanz J, Martínez-Castro I.** 1989. Gas chromatographic retention of carbohydrate trimethylsilyl ethers: III. Ketohehexoses. *Journal of Chromatography A* **471**, 205–216.
- Gehrke CW, Nakamoto H, Zumwalt RW.** 1969. Gas-liquid chromatography of protein amino acid trimethylsilyl derivatives. *Journal of Chromatography A* **45**, 24–51.
- Gesheva V, Stackebrandt E, Vasileva-Tonkova E.** 2010. Biosurfactant production by halotolerant *Rhodococcus fascians* from Casey Station, Wilkes Land, Antarctica. *Current Microbiology* **61**, 112–117.
- Gunasekera TS, Sundin GW.** 2006. Role of nucleotide excision repair and photoreactivation in the solar UVB radiation survival of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a. *Journal of Applied Microbiology* **100**, 1073–1083.
- Gürtler V, Mayall BC, Seviour R.** 2004. Can whole genome analysis refine the taxonomy of the genus *Rhodococcus*? *FEMS Microbiology Reviews* **28**, 377–403.
- Gutenberger A, Zeisler V V., Berghaus R, Auweter H, Schreiber L.** 2013. Effects of poly- and monodisperse surfactants on <sup>14</sup>C-epoxiconazole diffusion in isolated cuticles of *Prunus laurocerasus*. *Pest Management Science* **69**, 512–519.

- 
- Haefele DM, Lindow SE.** 1987. Flagellar motility confers epiphytic fitness advantages upon *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 2528–2533.
- Hauck P, Thilmony R, He SY.** 2003. A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 8577–8582.
- Hauser G, Karnovsky ML.** 1954. Studies on the production of glycolipide by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **68**, 645–654.
- Hirano SS, Baker LS, Upper CD.** 1996. Raindrop momentum triggers growth of leaf-associated populations of *Pseudomonas syringae* on field-grown snap bean plants. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 2560–2566.
- Hirano SS, Upper CD.** 2000. Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas syringae*—a Pathogen, Ice Nucleus, and Epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**, 624–653.
- Hoch HC.** 1979. Penetration of chemicals into the *Malus* leaf cuticle - An ultrastructural analysis. *Planta* **147**, 186–195.
- Holland MA, Polacco JC.** 1994. PPFMs and other covert contaminants: Is there more to plant physiology than just plant? *Annual Review of Plant Biology* **45**, 197–209.
- Hommel RK.** 1990. Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms. *Physiology of Biodegradative Microorganisms*. Springer **1**, 107–119.
- Hunt GM, Baker EA.** 1980. Phenolic constituents of tomato fruit cuticles. *Phytochemistry* **19**, 1415–1419.
- Inoue S, Ito S.** 1982. Sophorolipids from *Torulopsis bombicola* as microbial surfactants in alkane fermentations. *Biotechnology Letters* **4**, 3–8.
- Jacobs JL, Sundin GW.** 2001. Effect of solar UV-B radiation on a phyllosphere bacterial community. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 5488–5496.
- Jaeger CH, Lindow SE, Miller W, Clark E, Firestone MK.** 1999. Mapping of sugar and amino acid availability in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 2685–2690.

- Jenks M a., Joly RJ, Peters PJ, Rich PJ, Axtell JD, Ashworth EN.** 1994. Chemically induced cuticle mutation affecting epidermal conductance to water vapor and disease susceptibility in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Plant Physiology* **105**, 1239–1245.
- Jetter R, Kunst L, Samuels AL.** 2008. Composition of plant cuticular waxes. *Biology of the Plant Cuticle* **23**, 145–181.
- Katona Z, Sass P, Molnár-Perl I.** 1999. Simultaneous determination of sugars, sugar alcohols, acids and amino acids in apricots by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **847**, 91–102.
- Keith LMW, Bender CL.** 1999. AlgT ( $\sigma^{22}$ ) Controls alginate production and tolerance to environmental stress in *Pseudomonas syringae*. *Journal of Bacteriology* **181**, 7176–7184.
- Kim J-S, Powalla M, Lang S, Wagner F, Lünsdorf H, Wray V.** 1990. Microbial glycolipid production under nitrogen limitation and resting cell conditions. *Journal of Biotechnology* **13**, 257–266.
- Kinkel LL.** 1997. Microbial population dynamics on leaves. *Annual Review of Phytopathology* **35**, 327–347.
- Kiraly Z, El-Zahaby HM, Klement Z.** 1997. Role of extracellular polysaccharide (EPS) slime of plant pathogenic bacteria in protecting cells to reactive oxygen species. *Journal of Phytopathology* **145**, 59–68.
- Knoll D, Schreiber L.** 2000. Plant-microbe interactions: Wetting of Ivy (*Hedera helix* L.) Leaf surfaces in relation to colonization by epiphytic microorganisms. *Microbial Ecology* **41**, 33–42.
- Kouremenos KA, Harynuk JJ, Winniford WL, Morrison PD, Marriott PJ.** 2010. One-pot microwave derivatization of target compounds relevant to metabolomics with comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography B* **878**, 1761–1770.
- Krauss P, Markstädter C, Riederer M.** 1997. Attenuation of UV radiation by plant cuticles from woody species. *Plant Cell and Environment* **20**, 1079–1085.
- Krimm U.** 2005. Untersuchungen zur Interaktion epiphyller Bakterien mit Blattoberflächen und Veränderungen in der Phyllosphäre während der Vegetationsperiode. Dissertation. Universität Bonn

- 
- Lang S, Philp JC.** 1998. Surface-active lipids in rhodococci. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* **74**, 59–70.
- Lang S, Wullbrandt D.** 1999. Rhamnose lipids–biosynthesis, microbial production and application potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**, 22–32.
- Larkin MJ, Kulakov LA, Allen CCR.** 2005. Biodegradation and *Rhodococcus* - Masters of catabolic versatility. *Current Opinion in Biotechnology* **16**, 282–290.
- Lemieux B.** 1996. Molecular genetics of epicuticular wax biosynthesis. *Trends in Plant Science* **1**, 312–318.
- Leveau JH, Lindow SE.** 2001. Appetite of an epiphyte: quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 3446–3453.
- Lighthart B.** 1997. The ecology of bacteria in the alfresco atmosphere. *FEMS Microbiology Ecology* **23**, 263–274.
- Liljeroth E, Bååth E.** 1988. Bacteria and fungi on roots of different barley varieties (*Hordeum vulgare* L.). *Biology and Fertility of Soils* **7**, 53–57.
- Lilley AK, Hails RS, Cory JS, Bailey MJ.** 1997. The dispersal and establishment of pseudomonad populations in the phyllosphere of sugar beet by phytophagous caterpillars. *FEMS Microbiology Ecology* **24**, 151–157.
- Lindemann J, Army DC, Upper CD.** 1984. Epiphytic population of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on snap bean and nonhost plants and the incidence of bacterial brown spot disease in relation to cropping patterns. *Phytopathology* **74**, 1329–1333.
- Lindemann J, Constantinidou HA, Barchet WR, Upper CD.** 1982. Plants as sources of airborne bacteria, including ice nucleation-active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **44**, 1059–1063.
- Lindemann J, Upper CD.** 1985. Aerial dispersal of epiphytic bacteria over bean plants. *Applied and Environmental Microbiology* **50**, 1229–1232.
- Lindow SE.** 1983. The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. *Annual Review of Phytopathology* **21**, 363–384.

- Lindow SE, Andersen GL.** 1996. Influence of immigration on epiphytic bacterial populations on navel orange leaves. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 2978–2987.
- Lindow SE, Andersen G, Beattie GA.** 1993. Characteristics of insertional mutants of *Pseudomonas syringae* with reduced epiphytic fitness. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 1593–1601.
- Lindow SE, Arny DC, Upper CD.** 1978. Distribution of ice nucleation-active bacteria on plants in nature. *Applied and Environmental Microbiology* **36**, 831–838.
- Lindow SE, Brandl MT.** 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 1875–1883.
- Liu H, Xu J, Liang R, Liu J.** 2014. Characterization of the medium- and long-chain n-alkanes degrading *Pseudomonas aeruginosa* strain SJTD-1 and its alkane hydroxylase genes. *PLoS One* **9**, e105506
- Loewus FA, Murthy PPN.** 2000. myo-Inositol metabolism in plants. *Plant Science* **150**, 1–19.
- Lombarkia N, Derridj S.** 2002. Incidence of apple fruit and leaf surface metabolites on *Cydia pomonella* oviposition. *Proceedings of the 11th International Symposium on Insect-Plant Relationships*. Springer, 79–87.
- Lv G, Hu D, Zhao J, Li S.** 2015. Quality control of sweet medicines based on gas chromatography-mass spectrometry. *Drug Discoveries & Therapeutics* **9**, 94–106.
- Mansvelt EL, Hattingh MJ.** 1989. Scanning electron microscopy of invasion of apple leaves and blossoms by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 533–538.
- Mariano RLR, McCarter SM.** 1993. Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava* on tomato and selected weed species. *Microbial Ecology* **26**, 47–58.
- Melotto M, Mecey C, Niu Y, Chung HS, Katsir L, Yao J, Zeng W, Thines B, Staswick P, Browse J.** 2008. A critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of Arabidopsis JAZ proteins in mediating coronatine- and jasmonoyl isoleucine-dependent interactions with the COI1 F-box protein. *The Plant Journal* **55**, 979–988.

- Mercier J, Lindow SE.** 2000. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 369–374.
- Mergaert J, Verhelst AN, Cnockaert MC, Tan T-L, Swings J.** 2001. Characterization of facultative oligotrophic bacteria from polar seas by analysis of their fatty acids and 16S rDNA sequences. *Systematic and Applied Microbiology* **24**, 98–107.
- Miles WG, Daines RH, Rue JW.** 1977. Presymptomatic egress of *Xanthomonas pruni* from infected peach leaves. *Phytopathology* **67**, 895–897.
- Miller WG, Brandl MT, Quiñones B, Lindow SE.** 2001. Biological sensor for sucrose availability: Relative sensitivities of various reporter genes. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 1308–1317.
- Miteva VI, Sheridan PP, Brenchley JE.** 2004. Phylogenetic and physiological diversity of microorganisms isolated from a deep Greenland glacier ice core. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 202–213.
- Moldoveanu S, David V.** 2018. Derivatization methods in GC and GC/MS. *Gas Chromatography*. IntechOpen, 1–33.
- Molnár-Perl I.** 1999. Simultaneous quantitation of acids and sugars by chromatography: Gas or high-performance liquid chromatography? *Journal of Chromatography A* **845**, 181–195.
- Monier JM, Lindow SE.** 2003. Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promotes aggregate formation on leaf surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15977–15982.
- Monier JM, Lindow SE.** 2004. Frequency, Size, and Localization of Bacterial Aggregates on Bean Leaf Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 346–355.
- Morris CE, Monier J-M, Jacques M-A.** 1997. Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 1570–1576.
- Morris CE, Monier J-M, Jacques M-A.** 1998. A technique to quantify the population size and composition of the biofilm component in communities of bacteria in the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 4789–4795.
- Morris CE, Monteil CL, Berge O.** 2013a. The life history of *Pseudomonas syringae*: linking agriculture to earth system processes. *Annual Review of Phytopathology* **51**, 85–104.

- Morris CE, Sands DC, Glaux C, Samsatly J, Asaad S, Moukahel AR, Gonçalves FLT, Bigg EK.** 2013b. Urediospores of rust fungi are ice nucleation active at  $> -10$  °C and harbor ice nucleation active bacteria. *Atmospheric Chemistry and Physics* **13**, 4223–4233.
- Morris CE, Sands DC, Vinatzer BA, Glaux C, Guilbaud C, Buffiere A, Yan S, Dominguez H, Thompson BM.** 2008. The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *The ISME journal* **2**, 321–334.
- Nagarajan S, Singh D V.** 1990. Long-distance dispersion of rust pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **28**, 139–153.
- Neu TR.** 1996. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiological Reviews* **60**, 151–166.
- Neu TR, Poralla K.** 1990. Emulsifying agents from bacteria isolated during screening for cells with hydrophobic surfaces. *Applied Microbiology and Biotechnology* **32**, 521–525.
- Niederl S, Kirsch T, Riederer M, Schreiber L.** 1998. Co-Permeability of  $^3\text{H}$ -labeled water and  $^{14}\text{C}$ -labeled organic acids across isolated plant cuticles. Investigating cuticular paths of diffusion and predicting cuticular transpiration. *Plant Physiology* **116**, 117–123.
- Oso S, Walters M, Schlechter RO, Remus-Emsermann MNP.** 2019. Utilisation of hydrocarbons and production of surfactants by bacteria isolated from plant leaf surfaces. *FEMS Microbiology Letters* **366**, fnz061.
- Van Outryve MF, Gosselé V, Gosselé F, Swings J.** 1988. Composition of the microflora of witloof chicory seeds. *Microbial Ecology* **16**, 339–348.
- Pamp SJ, Tolker-Nielsen T.** 2007. Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **189**, 2531–2539.
- Perfumo A, Smyth TJP, McClean S, Marchant R, Banat IM.** 2010. Production and roles of biosurfactants and bioemulsifiers in accessing hydrophobic substrates. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* **1**, 1–6.
- Peypoux F, Bonmatin JM, Wallach J.** 1999. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**, 553–563.
- Popp C.** 2005. Cuticular transport of hydrophilic molecules with special focus on primary metabolites and active ingredients. Dissertation. Universität Würzburg

- Popp C, Burghardt M, Friedmann A, Riederer M.** 2005. Characterization of hydrophilic and lipophilic pathways of *Hedera helix* L. cuticular membranes: Permeation of water and uncharged organic compounds. *Journal of Experimental Botany* **56**, 2797–2806.
- Pourcel L, Routaboul J-M, Cheynier V, Lepiniec L, Debeaujon I.** 2007. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science* **12**, 29–36.
- Prabhu Y, Phale PS.** 2003. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PP2: Novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **61**, 342–351.
- Putnam ML, Miller ML.** 2007. *Rhodococcus fascians* in herbaceous perennials. *Plant Disease* **91**, 1064–1076.
- Ramos MJ, Fernández CM, Casas A, Rodríguez L, Pérez Á.** 2009. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource Technology* **100**, 261–268.
- Redford AJ, Fierer N.** 2009. Bacterial succession on the leaf surface: A novel system for studying successional dynamics. *Microbial Ecology* **58**, 189–198.
- Remus-Emsermann MNP, de Oliveira S, Schreiber L, Leveau JHJ.** 2011. Quantification of lateral heterogeneity in carbohydrate permeability of isolated plant leaf cuticles. *Frontiers in Microbiology* **2**, 1–7.
- Riederer M, Schönherr J.** 1990. Effects of surfactants on water permeability of isolated plant cuticles and on the composition of their cuticular waxes. *Pesticide Science* **29**, 85–94.
- Rojo F.** 2009. Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental Microbiology* **11**, 2477–2490.
- Ron EZ, Rosenberg E.** 2001. Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology* **3**, 229–236.
- Rosenberg E.** 1993. Exploiting microbial growth on hydrocarbons - new markets. *Trends in Biotechnology* **11**, 419–424.
- Ruinen J.** 1961. The phyllosphere. *Plant and Soil* **15**, 81–109.

- Ruiz-Matute AI, Hernández-Hernández O, Rodríguez-Sánchez S, Sanz ML, Martínez-Castro I.** 2011. Derivatization of carbohydrates for GC and GC-MS analyses. *Journal of Chromatography B* **879**, 1226–1240.
- Saettler AW, Schaad NW, Roth DA.** 1989. *Detection of bacteria in seed and other planting material*. American Phytopathological Society.
- Sanz ML, Sanz J, Martínez-Castro I.** 2004. Gas chromatographic–mass spectrometric method for the qualitative and quantitative determination of disaccharides and trisaccharides in honey. *Journal of Chromatography A* **1059**, 143–148.
- Saul DJ, Aislabie JM, Brown CE, Harris L, Foght JM.** 2005. Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology* **53**, 141–155.
- Schoenherr J, Riederer M.** 1986. Plant cuticles sorb lipophilic compounds during enzymatic isolation. *Plant, Cell and Environment* **9**, 459–466.
- Schönherr J.** 1976. Water permeability of isolated cuticular membranes: The effect of cuticular waxes on diffusion of water. *Planta* **131**, 159–164.
- Schönherr J.** 2000. Calcium chloride penetrates plant cuticles via aqueous pores. *Planta* **212**, 112–118.
- Schönherr J.** 2002. A mechanistic analysis of penetration of glyphosate salts across stomatous cuticular membranes. *Pest Management Science* **58**, 343–351.
- Schönherr J.** 2006. Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. *Journal of Experimental Botany* **57**, 2471–2491.
- Schönherr J, Luber M.** 2001. Cuticular penetration of potassium salts: Effects of humidity, anions, and temperature. *Plant and Soil* **236**, 117–122.
- Schreiber L.** 2002. Co-permeability of <sup>3</sup>H-labelled water and <sup>14</sup>C-labelled organic acids across isolated *Prunus laurocerasus* cuticles: Effect of temperature on cuticular paths of diffusion. *Plant, Cell and Environment* **25**, 1087–1094.
- Schreiber L.** 2005. Polar paths of diffusion across plant cuticles: New evidence for an old hypothesis. *Annals of Botany* **95**, 1069–1073.

- 
- Schreiber L, Elshatshat S, Koch K, Lin J, Santrucek J.** 2006. AgCl precipitates in isolated cuticular membranes reduce rates of cuticular transpiration. *Planta* **223**, 283–290.
- Schreiber L, Krimm U, Knoll D, Sayed M, Auling G, Kroppenstedt RM.** 2005. Plant-microbe interactions: Identification of epiphytic bacteria and their ability to alter leaf surface permeability. *New Phytologist* **166**, 589–594.
- Schreiber L, Riederer M.** 1996. Ecophysiology of cuticular transpiration: comparative investigation of cuticular water permeability of plant species from different habitats. *Oecologia* **107**, 426–432.
- Schreiber L, Schönherr J.** 1990. Phase transitions and thermal expansion coefficients of plant cuticles. *Planta* **182**, 186–193.
- Schreiber L, Schönherr J.** 2009. *Water and solute permeability of plant cuticles*. Springer.
- Schreiber L, Skrabs M, Hartmann KD, Diamantopoulos P, Simanova E, Santrucek J.** 2001. Effect of humidity on cuticular water permeability of isolated cuticular membranes and leaf disks. *Planta* **214**, 274–282.
- Schulz H.** 1991. Beta oxidation of fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta* **1081**, 109–120.
- Shi T, Schönherr J, Schreiber L.** 2005. Accelerators increase permeability of cuticles for the lipophilic solutes metribuzin and iprovalicarb but not for hydrophilic methyl glucose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 2609–2615.
- Singh S, Koehler B, Fett WF.** 1992. Effect of osmolarity and dehydration on alginate production by fluorescent pseudomonads. *Current Microbiology* **25**, 335–339.
- Soldaat LL, Boutin J-P, Derridj S.** 1996. Species-specific composition of free amino acids on the leaf surface of four *Senecio* species. *Journal of Chemical Ecology* **22**, 1–12.
- Stammitti L, Garrec J-P, Derridj S.** 1995. Permeability of isolated cuticles of *Prunus laurocerasus* to soluble carbohydrate. *Plant Physiology and Biochemistry* **33**, 319–326.
- Stavrínides J, McCloskey JK, Ochman H.** 2009. Pea aphid as both host and vector for the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 2230–2235.

- Steinkellner S, Lenzemo V, Langer I, Schweiger P, Khaosaad T, Toussaint J-P, Vierheilig H.** 2007. Flavonoids and strigolactones in root exudates as signals in symbiotic and pathogenic plant-fungus interactions. *Molecules* **12**, 1290–1306.
- Sun S, Wang H, Xie J, Su Y.** 2016. Simultaneous determination of rhamnose, xylitol, arabitol, fructose, glucose, inositol, sucrose, maltose in jujube (*Zizyphus jujube* Mill.) extract: comparison of HPLC–ELSD, LC–ESI–MS/MS and GC–MS. *Chemistry Central Journal* **10**, 25.
- Sundin GW, Jacobs JL.** 1999. Ultraviolet radiation (UVR) sensitivity analysis and UVR survival strategies of a bacterial community from the phyllosphere of field-grown peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Microbial Ecology* **38**, 27–38.
- Taiz L, Zeiger E, Møller IM, Murphy A.** 2015. Plant physiology and development.
- Tilford PE.** 1936. Fasciation of sweet peas caused by *Phytomonas fascians* n. sp. *Journal of Agricultural Research* **53**, 383–394.
- Timmer LW, Marois JJ, Achor D.** 1987. Growth and survival of xanthomonads under conditions nonconductive to disease development. *Phytopathology* **77**, 1341–1345.
- Tukey HB.** 1970. The Leaching of Substances from Plants. *Annual Review of Plant Physiology* **21**, 305–324.
- Tuleva B, Christova N, Cohen R, Stoev G, Stoineva I.** 2008. Production and structural elucidation of trehalose tetraesters (biosurfactants) from a novel alkanotrophic *Rhodococcus wratislaviensis* strain. *Journal of Applied Microbiology* **104**, 1703–1710.
- Vereecke D, Cornelis K, Temmerman W, Holsters M, Goethals K.** 2002. Versatile persistence pathways for pathogens of animals and plants. *Trends in Microbiology* **10**, 485–488.
- Vogt M.** 2004. Verteilung des Kohlenstoffs beim Abbau von <sup>14</sup>C-markiertem Weizenstroh in den verschiedenen Kompartimenten eines Bodens mit unterschiedlicher Bewirtschaftung. Dissertation. Universität Braunschweig
- Vorholt JA.** 2012. Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology* **10**, 828–840.

- Van Der Wal A, Leveau JHJ.** 2011. Modelling sugar diffusion across plant leaf cuticles: The effect of free water on substrate availability to phyllosphere bacteria. *Environmental Microbiology* **13**, 792–797.
- Warren RC.** 1972. The effect of pollen on the fungal leaf microflora of *Beta vulgaris* L. and on infection of leaves by *Phoma betae*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **78**, 89–98.
- Wattendorff J, Holloway PJ.** 1984. Periclinal penetration of potassium permanganate into mature cuticular membranes of *Agave* and *Clivia* leaves: New implications for plant cuticle development. *Planta* **161**, 1–11.
- Wensing A, Braun SD, Büttner P, Expert D, Völksch B, Ullrich MS, Weingart H.** 2010. Impact of siderophore production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 on epiphytic fitness and biocontrol activity against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* 1a/96. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 2704–2711.
- Whipps JM, Hand P, Pink D, Bending GD.** 2008. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *Journal of Applied Microbiology* **105**, 1744–1755.
- Whyte LG, Hawari J, Zhou E, Bourbonnière L, Inniss WE, Greer CW.** 1998. Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus* sp. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 2578–2584.
- Whyte LG, Slagman SJ, Pietrantonio F, Bourbonniere L, Koval SF, Lawrence JR, Inniss WE, Greer CW.** 1999. Physiological adaptations involved in alkane assimilation at a low temperature by *Rhodococcus* sp. strain Q15. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 2961–2968.
- Wildman HG, Parkinson D.** 1981. Seasonal changes in water-soluble carbohydrates of *Populus tremuloides* leaves. *Canadian Journal of Botany* **59**, 862–869.
- Wilson M, Hirano SS, Lindow SE.** 1999. Location and survival of leaf-associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 1435–1443.
- Xin X-F, Kvitko B, He SY.** 2018. *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology* **16**, 316–328.

- Xin X-F, Nomura K, Aung K, Velásquez AC, Yao J, Boutrot F, Chang JH, Zipfel C, He SY.** 2016. Bacteria establish an aqueous living space in plants crucial for virulence. *Nature* **539**, 524–529.
- Young JM.** 1991. Pathogenicity and identification of the lilac pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall 1902. *Annals of Applied Biology* **118**, 283–298.
- Yu X, Lund SP, Scott R a, Greenwald JW, Records AH, Nettleton D, Lindow SE, Gross DC, Beattie G a.** 2013. Transcriptional responses of *Pseudomonas syringae* to growth in epiphytic versus apoplastic leaf sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 425–434.
- Yu J, M A, Pen A, Bender CL.** 1999. Involvement of the exopolysaccharide alginate in the virulence and epiphytic fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Molecular Microbiology* **33**, 712–720.
- Zeisler V.** 2013. Die pflanzliche Kutikula: Aufbau, Funktion und epiphyller Lebensraum. Dissertation. Universität Bonn
- Zhang J, Subramanian S, Stacey G, Yu O.** 2009. Flavones and flavonols play distinct critical roles during nodulation of *Medicago truncatula* by *Sinorhizobium meliloti*. *The Plant Journal* **57**, 171–183.

## **6. Anhang**

## 6.1 Chemikalienliste

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>
Agar	für die Mikrobiologie Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA)	Macherey- Nagel (Düren, Deutschland)
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	≥ 98 % Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Casein Pepton, tryptisch verdaut	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Cellulase	WeissBioTech GmbH (Ascheberg, Deutschland)
Chloroform	für die Analyse 99,2 % VWR International (Fontenay-sous-Bois, Frankreich)
Citronensäure Monohydrat	≥ 99,5 % Grüssing (Filsum, Deutschland)
<sup>14</sup> C-Arginin	Hartmann Analytic GmbH (Braunschweig, Deutschland)
<sup>14</sup> C-Fructose	Hartmann Analytic GmbH (Braunschweig, Deutschland)
<sup>14</sup> C-Glycerin	Hartmann Analytic GmbH (Braunschweig, Deutschland)
<sup>14</sup> C-Hexacosansäure	Hartmann Analytic GmbH (Braunschweig, Deutschland)

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>
<sup>14</sup> C-Octacosan	Hartmann Analytic GmbH (Braunschweig, Deutschland)
<sup>14</sup> C-Octadecansäure	Hartmann Analytic GmbH (Braunschweig, Deutschland)
<sup>14</sup> C-Teracosanol	Hartmann Analytic GmbH (Braunschweig, Deutschland)
Dimethylaminopyridin (DMAP)	≥ 99 % Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Dikaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	wasserfrei für Analyse ≥ 99 % Merck (Darmstadt, Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
O-Ethylhydroxylamin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ethanol	≥ 99,8 % Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ethylacetat	≥ 99,5 % Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Fructose	für die Biochemie ≥ 99,5 % Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Galactose	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glucopon 215 CSUP	Fluka (Buchs, Schweiz)
Glucose	Merck (Darmstadt, Deutschland)

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>
Glycerin	wasserfrei für die Analyse 99,5 % Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Hentriacontansäure	≥ 99 % Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
HPLC-Wasser	VWR Chemicals (Fontenay-sous-Bois, Frankreich)
Kaliumhydroxid (KOH)	≥ 85 % TH. Geyer (Renningen, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Magnesiumsulfat Heptahydrat (MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O)	für die Analyse ≥ 99 % Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Methyl-β-D-Galactopyranosid	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Myoinositol	≥ 99 % Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	≥ 99 % Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Natriumtetraborat	für die Analyse Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Nonacosansäure	≥ 99 % Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Paraffinwachs (42 °C, 52 °C, 69 °C, 90 °C)	Schüttfähig Merck (Darmstadt, Deutschland)

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>
Paraffinöl dünnflüssig	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Pektinase	WeissBioTech GmbH (Ascheberg, Deutschland)
Plurafac LF 300	BASF SE (Limburgerhof, Deutschland)
Protease Pepton	für die Mikrobiologie, Roth (Karlsruhe, Deutschland)
PTFE-Paste	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Pyridin	Puriss, absolut, $\geq 0,005$ H <sub>2</sub> O; Sigma Aldrich (USA)
Rifampicin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Saccharose	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Szintillationscocktail Ultima Gold	Perkin Elmer (Rodgau, Deutschland)
Tetracosan	$\geq 99$ % Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Triacontansäure	$\geq 99$ % Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Xylitol	$\geq 99$ % Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

## 6.2 Lösungen und Medien

### *Enzymlösung*

0,01 M Zitronensäuremonohydrat

2 % (v/v) Cellulase

2 % (v/v) Pektinase

0,001 M NaN<sub>3</sub>

pH-Wert 3

### *Boraxlösung*

0,01 M Natriumtetraborat

pH-Wert 9

### *KB-Agar/-Medium*

*Substanz*

*Menge*

Protease Pepton

20 g/l

Dikaliumhydrogenphosphat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

1,15g/l

Magnesiumsulfat Heptahydrat  
(MgSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O)

1,5 g/l

Glycerin

10 ml/l

Rifampicin

5 mg/l

Für Agar hinzufügen:

Agar

15 g/l

---

<b><i>Coryne-Agar/-Medium</i></b>	
<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
Casein Pepton, tryptisch verdaut	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
Glucose	5 g/l
Natriumchlorid (NaCl)	5 g/l
Für Agar hinzufügen:	
Agar	15 g/l

---

<b><i>M9-Medium</i></b>	
<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ )	8,51 g/l
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	3 g/l
Natriumchlorid (NaCl)	0,5 g/l
Ammoniumchlorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )	1 g/l
Nach Autoklavieren hinzufügen:	
Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4$ )	0,5 g/l
Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )	0,015 g/l

---

---

### 6.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Temperaturprogramm für den Säurestandard zur Überprüfung der Säulenqualität der Gaschromatographen.....	20
<b>Tabelle 2:</b> Temperaturprogramm SUGAR.M für die gaschromatographische Auftrennung von Kohlenhydraten .....	22
<b>Tabelle 3:</b> Temperaturprogramm für die gaschromatographische Wachsanalyse.....	23
<b>Tabelle 4:</b> Spezifische Aktivitäten der $^{14}\text{C}$ -markierten hydrophilen Substanzen.....	24
<b>Tabelle 5:</b> Spezifische Aktivitäten der vier $^{14}\text{C}$ -markierten aliphatischen Wachsmonomere .	27
<b>Tabelle 6:</b> Oberflächenspannungen und Kontaktwinkel auf Parafilm der Bakteriensuspensionen (OD 1) und der Abwaschungen der zugehörigen Agarplatten. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.....	33

## 6.4 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung pflanzlichen Kutikula als epiphyller Lebensraum (modifiziert nach Taiz <i>et al.</i> 2015).....	5
<b>Abbildung 2:</b> Aufbau der radioaktiven Transportstudien, um den Einfluss von Biotensiden auf die Metabolisierung von $^{14}\text{C}$ -markierten hydrophilen Substanzen, die durch die Kutikula diffundieren, zu untersuchen; modifiziert nach Schreiber (2001).....	25
<b>Abbildung 3:</b> Versuchsaufbau des Abbaus $^{14}\text{C}$ -markierter Wachsmomere durch <i>R. fascians</i> , <i>P. syringae</i> WT und dbKO;.....	28
<b>Abbildung 4:</b> Versuchsaufbau zur Untersuchung des Abbaus $^{14}\text{C}$ -markierter aliphatischer Wachsmomere auf isolierten Kutikulamembranen durch epiphyllle Bakterien; modifiziert nach Schreiber (2001) .....	29
<b>Abbildung 5:</b> Darstellungen der gaschromatographischen Auftrennung und Detektion mittels FID von Fructose einstufig (A) und zweistufig (B) derivatisiert.....	35
<b>Abbildung 6:</b> Darstellungen der gaschromatographischen Auftrennung und Detektion mittels FID von Glucose einstufig (A) und zweistufig, (B) derivatisiert.....	36
<b>Abbildung 7:</b> Darstellungen der gaschromatographischen Auftrennung und Detektion mittels FID von Saccharose einstufig (A) und zweistufig, (B) derivatisiert.....	37
<b>Abbildung 8:</b> Verdünnungsreihen von EO-TMS-Derivaten (A) und TMS-Derivaten (B) der Fructose.. ..	38
<b>Abbildung 9:</b> Verdünnungsreihen von Saccharose. A: EO-TMS-Derivate; B: TMS-Derivate .....	39
<b>Abbildung 10:</b> Darstellung der Kohlenhydrate, die auf der Kutikula von <i>Phaseolus vulgaris</i> mittels Gaschromatographie analysiert wurden in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (A) und $\mu\text{g}/\text{g}$ (B) .....	41
<b>Abbildung 11:</b> Gaschromatographische Analyse vier verschiedener Paraffinwachse mit den Schmelzpunkten $42\text{ }^\circ\text{C}$ (A), $52\text{ }^\circ\text{C}$ (B), $69\text{ }^\circ\text{C}$ (C) und $90\text{ }^\circ\text{C}$ (D). .....	42
<b>Abbildung 12:</b> Messungen der Negativkontrollen mit dem Szintillationszähler vor Applikation von $100\text{ }\mu\text{l}$ Bakteriensuspensionen ( $\text{OD}_{600}$ 1) von <i>P. syringae</i> WT oder db KO. 44	

<b>Abbildung 13:</b> Messungen der $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung 24 Stunden nach Inokulation von <i>Populus canescens</i> Kutikulamembranen mit 100 $\mu\text{l}$ einer Bakteriensuspension von <i>P. syringae</i> WT bzw. db KO ( $\text{OD}_{600}$ 1). Das Donorkompartiment enthielt 800 $\mu\text{l}$ einer wässrigen Lösung von $^{14}\text{C}$ -Fructose (2000 dpm/ $\mu\text{l}$ ).....	45
<b>Abbildung 14:</b> Messungen der $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung 24 Stunden nach Inokulation von <i>Hedera helix</i> Kutikulamembranen mit 100 $\mu\text{l}$ einer Bakteriensuspension von <i>P. syringae</i> WT bzw. db KO ( $\text{OD}_{600}$ 1). Das Donorkompartiment enthielt 800 $\mu\text{l}$ einer wässrigen Lösung von $^{14}\text{C}$ -Fructose (2000 dpm/ $\mu\text{l}$ ).....	46
<b>Abbildung 15:</b> Messungen der $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung 24 Stunden nach Inokulation von <i>Populus canescens</i> Kutikulamembranen mit 100 $\mu\text{l}$ einer Bakteriensuspension von <i>P. syringae</i> WT bzw. db KO ( $\text{OD}_{600}$ 1). Das Donorkompartiment enthielt 800 $\mu\text{l}$ einer wässrigen Lösung von $^{14}\text{C}$ -Arginin (2000 dpm/ $\mu\text{l}$ ).....	47
<b>Abbildung 16:</b> Messungen der $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung 24 Stunden nach Inokulation von <i>Hedera helix</i> Kutikulamembranen mit 100 $\mu\text{l}$ einer Bakteriensuspension von <i>P. syringae</i> WT bzw. db KO ( $\text{OD}_{600}$ 1). Das Donorkompartiment enthielt 800 $\mu\text{l}$ einer wässrigen Lösung von $^{14}\text{C}$ -Arginin (2000 dpm/ $\mu\text{l}$ ).....	48
<b>Abbildung 17:</b> Messungen der $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung 24 Stunden nach Inokulation von <i>Populus canescens</i> Kutikulamembranen mit 100 $\mu\text{l}$ einer Bakteriensuspension von <i>P. syringae</i> WT bzw. db KO ( $\text{OD}_{600}$ 1). Das Donorkompartiment enthielt 800 $\mu\text{l}$ einer wässrigen Lösung von $^{14}\text{C}$ -Glycerin (1000 dpm/ $\mu\text{l}$ ).....	49
<b>Abbildung 18:</b> Messungen der $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung 24 Stunden nach Inokulation von <i>Hedera helix</i> Kutikulamembranen mit 100 $\mu\text{l}$ einer Bakteriensuspension von <i>P. syringae</i> WT bzw. db KO ( $\text{OD}_{600}$ 1). Das Donorkompartiment enthielt 800 $\mu\text{l}$ einer wässrigen Lösung von $^{14}\text{C}$ -Glycerin (1000 dpm/ $\mu\text{l}$ ).....	50
<b>Abbildung 19:</b> Messungen der $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung 24 Stunden nach Inokulation von <i>Populus canescens</i> (Pop) und <i>Hedera helix</i> (Hed) Kutikulamembranen mit 100 $\mu\text{l}$ einer Bakteriensuspension ( $\text{OD}_{600}$ 1) von <i>P. syringae</i> WT (WT) bzw. db KO (db KO). Das Donorkompartiment enthielt 800 $\mu\text{l}$ einer wässrigen Lösung von $^{14}\text{C}$ -Fructose (Fru) oder $^{14}\text{C}$ -Arginin (Arg) mit einer Konzentration von 2000 dpm/ $\mu\text{l}$ oder $^{14}\text{C}$ -Glycerin (Gly) mit einer Konzentration von 1000 dpm/ $\mu\text{l}$ .....	51

- Abbildung 20:** Messungen der  $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung 24 Stunden nach Inokulation von *Populus canescens* Kutikulamembranen mit 100  $\mu\text{l}$  einer Bakteriensuspension ( $\text{OD}_{600}$  1) von *P. syringae* db KO mit oder ohne dem industriellen Tensid Glucopon 215 CSUP ( $\text{OD}_{600}$  1). Das Donorkompartiment enthielt 800  $\mu\text{l}$  einer wässrigen Lösung von  $^{14}\text{C}$ -Fructose (2000 dpm/ $\mu\text{l}$ )..... 52
- Abbildung 21:** Messungen der  $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung 24 Stunden nach Inokulation von *Populus canescens* Kutikulamembranen mit 100  $\mu\text{l}$  einer Bakteriensuspension ( $\text{OD}_{600}$  1) von *P. syringae* db KO mit oder ohne dem industriellen Tensid Plurafac LF 300 ( $\text{OD}_{600}$  1). Das Donorkompartiment enthielt 800  $\mu\text{l}$  einer wässrigen Lösung von  $^{14}\text{C}$ -Fructose (2000 dpm/ $\mu\text{l}$ ). ..... 53
- Abbildung 22:** Messung der  $^{14}\text{C}$ -Mengen, die bei der Negativkontrolle von  $^{14}\text{C}$ -Octacosan freigesetzt wurden und in 1 ml KOH [1M] gebunden wurden. .... 54
- Abbildung 23:** Messung der  $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung durch die Metabolisierung der  $^{14}\text{C}$ -markierten Wachskomponenten Tetracosanol, Hexacosansäure und Octacosan durch *R. fascians*. .... 55
- Abbildung 24:** Erster Messwert der  $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung nach 29 Stunden durch die Metabolisierung der  $^{14}\text{C}$ -markierten Wachskomponenten Tetracosanol, Hexacosansäure und Octacosan durch *R. fascians*..... 56
- Abbildung 25:** Messung der  $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung durch die Metabolisierung der  $^{14}\text{C}$ -markierten Wachskomponenten Tetracosanol (A), Hexacosansäure (B) und Octacosan (C) durch *P. syringae* WT (rote Punkte) und db KO (schwarze Dreiecke)..... 58
- Abbildung 26:** Darstellung von vier repräsentativen Messpunkten der Versuchsansätze zum Abbau der  $^{14}\text{C}$ -markierten Wachskomponenten Tetracosanol, Hexacosansäure und Octacosan durch die Bakterien *P. syringae* WT (WT), db KO (db KO) und *R. fascians* (R);..... 59
- Abbildung 27:** Messung der  $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung durch die Metabolisierung der  $^{14}\text{C}$ -markierten Wachskomponenten Tetracosanol, Hexacosansäure und Octacosan durch *P. syringae* WT (A) und db KO (B)..... 60
- Abbildung 28** Darstellung von repräsentativen Messpunkten der Versuchsansätze zum Abbau der  $^{14}\text{C}$ -markierten Wachskomponenten Tetracosanol (T), Hexacosansäure (H) und Octacosan (O) durch die Bakterien *P. syringae* WT (WT) und db KO (db KO); ..... 61

---

<b>Abbildung 29:</b> Messung der $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung durch die Metabolisierung der $^{14}\text{C}$ -markierten Wachskomponente Stearinsäure (Octadecansäure) durch <i>R. fascians</i> und <i>P. syringae</i> WT und db KO.....	62
<b>Abbildung 30:</b> Darstellung von drei repräsentativen Messpunkten (26, 140 und 909 Stunden) des Versuchsansatzes zum Abbau der $^{14}\text{C}$ -markierten Wachskomponente Stearinsäure (Octadecansäure) durch die Bakterien <i>P. syringae</i> WT (WT), db KO (db KO) und <i>R. fascians</i> (R).....	63
<b>Abbildung 31:</b> Messungen der $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung durch Metabolisierung von $^{14}\text{C}$ -markiertem Tetracosanol (grüne Punkte) und Hexacosansäure (rote Punkte) durch <i>R. fascians</i> auf <i>Prunus laurocerasus</i> Kutikulamembranen .....	65
<b>Abbildung 32:</b> Messung der $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung durch die Metabolisierung von $^{14}\text{C}$ -markierter Octadecansäure durch <i>R. fascians</i> (A) <i>P. syringae</i> WT (B) und db KO (C) auf <i>Prunus laurocerasus</i> Kutikulamembranen.....	66
<b>Abbildung 33:</b> Wachstum von <i>R. fascians</i> auf vier Paraffinwachsen mit unterschiedlichen Schmelzpunkten (42 °C, 52 °C, 69 °C und 90 °C). .....	67
<b>Abbildung 34:</b> Wachstum von <i>P. syringae</i> WT und <i>P. syringae</i> db KO auf dem Paraffinwachs mit dem Schmelzpunkt 42°C.....	68
<b>Abbildung 35:</b> Wachstum von <i>R. fascians</i> und <i>P. syringae</i> WT und db KO auf Paraffinöl. .	69
<b>Abbildung 36:</b> Wachstum von <i>R. fascians</i> und <i>P. syringae</i> WT und db KO mit Sonnenblumenöl als C-Quelle.....	70
<b>Abbildung 37:</b> Darstellungen der gaschromatographischen Auftrennung und Detektion mittels FID von Glucose, die mit dem Derivatisierungsansatz nach Becker et al. (2013), sodass EO-TMS-Derivate entstanden .....	75
<b>Abbildung 38:</b> Korrelation zwischen den mittleren Kettenlängen der vier unterschiedlichen Paraffinwachse (42°C, 52°C, 69°C und 90°C) und der Wachstumssteigerung von <i>R. fascians</i> .	94

## 6.5 Formelverzeichnis

<b>Formel 1:</b> Formel zur Berechnung der Menge einer gaschromatographisch analysierten Substanz .....	31
---	----

## 6.6 Abkürzungsverzeichnis

Physikalische Einheiten wurden entsprechend des internationalen Einheitssystems (SI) abgekürzt.

Aqua demin.	demineralisiertes Wasser
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
°C	Grad Celsius
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
db KO	double Knock Out
DMAP	Dimethylaminopyridin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpm	Disintegrations per minute
EO	ethoximiert
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
FID	Flammen-Ionisations-Detektor
g	Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatograph
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MS	Massenspektrometer
n	Anzahl
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PTFE	Polytetrafluorethylen
TMS	Trimethylsilyl
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp

## **7. Danksagung**

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Schreiber für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe Ökophysiologie der Pflanzen angefertigt haben zu dürfen. Ich danke auch für die fachlichen Diskussionen.

Des Weiteren danke ich Dr. Viktoria Zeisler-Diehl dafür, diese Arbeit Korrektur gelesen zu haben und mir in der gesamten Zeit meiner Dissertation mit Rat und Tat beigestanden hat.

Der gesamten Arbeitsgruppe Ökophysiologie der Pflanzen, ehemalige wie aktuelle Mitglieder, danke ich für die schöne Zeit, hilfreiche Diskussionen und Unterstützung im Labor.

Ich danke Dr. Katharina Moritz für hilfreiche Diskussionen und Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung während meiner gesamten Doktorarbeitszeit.