

Untersuchungen zu Biotensid produzierenden epiphyllen Pseudomonaden

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Filip Leonard Fuchs

aus

Bonn

Bonn, 2019

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1.Gutachter: Prof. Dr. Lukas Schreiber

2.Gutachterin: Prof. Dr. Claudia Knief

Tag der Promotion: 19.09.2019

Erscheinungsjahr: 2019

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Phyllosphäre	1
1.2 Die pflanzliche Kutikula	3
1.3 Biofilme und Mikrokolonien in der Phyllosphäre	5
1.4 Tenside	7
1.4.1 Biotenside	8
1.6 Ziel dieser Arbeit	10
2. Material und Methoden	12
2.1 Geräte, Medien und Verbrauchslösungen	12
2.2 In dieser Arbeit verwendete Bakterien, Plasmide und Pflanzenmaterial	15
2.2.1 Bakterien	15
2.2.2 Plasmide	15
2.2.3 Primer	15
2.2.4 Pflanzenmaterial	16
2.3 Mikrobiologische Methoden	17
2.3.1 Kultivierung der Bakterien	17
2.3.2 Bestimmung der Optischen Dichte	18
2.3.3 Wachstumskurven	18
2.3.4 Zellzahlbestimmung durch das Spatelplattenverfahren	18
2.3.5 Schäumungsverhalten	19
2.3.6 Spreitungsverhalten	19
2.3.7 Oberflächenspannungsbestimmung mit dem DSA von Krüss	19
2.3.8 Kontaktwinkelbestimmung	20
2.3.9 Kontaktwinkel auf inkubierten Kutikularmembranen	21
2.3.10 Oberflächenbiofilmbildung in 12-Well-Platten	21
2.3.11 Swarming	22
2.4 Molekularbiologische Methoden	22
2.4.1 Nukleinsäure-Extraktion (RNA/DNA)	22
2.4.2 Gel Elektrophorese	22
2.4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	23
2.4.4 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)	23
2.4.5 Herstellung elektrokompetenter Zellen	24
2.4.6 Transformation von Pseudomonaden	24
2.4.7 Selektion und Screening auf fehlende Biotensid-Produktion „Atomized Oil Assay“	25
2.4.8 Identifikation der betroffenen Gene	26
2.5 Analytische Methoden	27
2.5.1 Wachsextraktion und Probenvorbereitung	27
2.5.2 Gaschromatographie (GC)	28
2.5.3 Massenspektroskopie (MS)	29
2.5.4 Statistische Auswertung und Interpretation der analytischen Daten	29
2.5.5 Extraktion von Biotensiden	29

2.5.6	Lc:Ms/Ms.....	30
2.6	Pflanzenphysiologische Methoden.....	30
2.6.1	Isolation von Kutikularmembranen von <i>Prunus laurocerasus</i>	30
2.6.3	Überlebensrate auf Kutikularmembranen (ATP-Messung).....	32
3.	Ergebnisse	33
3.1	Mutagenese und Screening.....	33
3.1.1	Identifikation und Datenbankanalyse.....	34
3.2	Vergleichende Untersuchungen zwischen Wildtypen und Mutanten.....	35
3.2.1	Wachstumseigenschaften im Komplexmedium.....	35
3.2.2	Wachstumseigenschaften in Minimal-Medium und Glucose.....	38
3.2.3	Swarmingeigenschaften auf 0,4% Agarplatten.....	40
3.2.4	Schäumungsverhalten und Spreitung auf Parafilm.....	41
3.2.5	Kontaktwinkel der Kulturüberstände auf Parafilm und Kutikularmembranen von <i>Prunus laurocerasus</i>	43
3.2.6	Oberflächenspannung (OFS) der Kulturüberstände (DSA Krüss).....	44
3.2.7	Oberflächenbiofilmbildung in Komplex- und Minimal-Medium.....	46
3.2.8	Kritische Mizellenbildungskonzentration (CMC) der Biotenside.....	48
3.2.9	Effekt von aufgereinigten Biotensiden auf die Transpiration von isolierten Kutikularmembranen.....	48
3.2.10	Biotensid Untersuchung.....	51
3.4	Weiterführende Versuche an <i>P. fluorescens</i>	53
3.4.1	Expression von <i>viscB</i> in Flüssigkultur und Biofilm.....	53
3.4.2	Wachsabbau in Schüttelkulturen.....	55
3.4.3	Effekt von Zellsuspensionen von <i>P. fluorescens</i> auf die Transpiration von <i>Prunus laurocerasus</i> Kutikulamembranen.....	56
3.4.4	Überlebensrate auf Kutikularmembranen.....	58
4.	Diskussion	60
4.1	Transposonmutagenese und physiologische Auswirkungen.....	60
4.2	Weiterführende Experimente an <i>P. fluorescens</i> als Modellorganismus für phyllosphärische Bakterien.....	66
5.	Zusammenfassung	71
6.	Literatur	73
6.1	Internet Quellen.....	81
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	81
6.2.1	Liste der Bilder.....	81
6.2.2	Liste der Formeln.....	82
6.2.3	Liste der Tabellen.....	82
7.	Danksagung	83

1. Einleitung

1.1 Die Phyllosphäre

Mit dem Aufkommen der ersten Landpflanzen vor ca. 500 Millionen Jahren entstand auch eine neue komplexe und vielseitige ökologische Nische: Die Phyllosphäre, bestehend aus allen oberirdischen Teilen einer Pflanze. Aktuelleren Schätzungen zufolge ist die Oberfläche der Phyllosphäre in etwa so groß wie die der Erde und stellt somit die größte biologische Oberfläche auf dem Planeten dar (Kendrick und Crane 1997, Lindow und Brandl 2003). Ein Großteil dieser Fläche ist von einer Mischung aus verschiedenen Mikroorganismen besiedelt. Bakterien bilden dabei den größten Anteil, gefolgt von Pilzen und verschiedensten Protisten, aber auch Algen und Moose können Bewohner der Phyllosphäre sein (Morris *et al.*, 2002). Der Grad der Besiedelung hängt dabei stark von unterschiedlichen Faktoren wie der Art der Wirtspflanze, der Biosphäre selbiger (tropischer Regenwald, borealer Nadelwald, Steppe usw.) und dem Alter der besiedelten Blattoberfläche ab (Ercolani 1991, Kinkel 1997). Zusätzlich zu diesen konstanten Faktoren sind die Phyllosphäre und ihre Bewohner stark schwankenden abiotischen Faktoren wie der Temperatur, der Luftfeuchtigkeit und der Sonnenstrahlung ausgesetzt. Kommt es im Verlauf eines Tages zu starken Wetterschwankungen haben diese unmittelbar Einfluss auf die Dichte und Zusammensetzung der mikrobiellen Flora (Leben 1965). Bakterien sind die dominierende Domäne der Phyllosphäre, sowohl was ihre Diversität als auch was ihre Anzahl betrifft. Auf einem Quadratzentimeter Blattfläche können 10^6 bis 10^7 bakterielle Zellen siedeln. Das entspricht einer geschätzten Gesamtzahl von 10^{36} bakteriellen Zellen in der gesamten Phyllosphäre (Vorholt 2012). Es wird angenommen, dass 96% der vorkommenden Arten als Kommensale ohne größeren Einfluss auf ihren Wirt leben, 2% pathogene Arten sind und weitere 2% zu den **Plant Growth Promoting Bacteria** (PGPB) gehören (Lindow and Leveau 2002). Pathogene Arten wie *Pseudomonas syringae* oder *Xanthomonas campestris* können Pflanzen befallen und invasiv zu systemischen Bakteriosen oder lokalen Nekrosen führen (Hirano und Upper 2000). PGPB hingegen können zur biologischen Fitness von Pflanzen beitragen indem sie zum Beispiel systemische Resistenzen induzieren, pflanzliche Hormone wie Auxin produzieren oder das Wachstum anderer pathogener Arten mit antimikrobiellen Substanzen unterdrücken (Vorholt 2012). Die vorherrschende Besiedelungsform der Phyllosphäre durch Bakterien ist, wie in Abb. 1

zu sehen, ein oberflächlicher Biofilm (Lindow und Leveau 2002). Die Mehrzahl aller bakteriellen Zellen ist dabei in **Extrazelluläre Polymere Substanzen (EPS)** eingebettet und bedeckt die pflanzliche Kutikula als dünne Schicht, bevorzugt über Zell-Zell Verbindungen oder an der Basis von Trichomen (Remus-Emsermann *et al.*, 2011, Monier und Lindow 2004). Die Kutikula ist ein lipophiles extrazelluläres Biopolymer, welches Blätter und Gewebe ohne Periderm, die der Atmosphäre ausgesetzt sind, bedeckt (Schönherr 1982). Die Kutikularmembran war die evolutionäre Antwort auf das größte Problem, welchem Pflanzen gegenüberstanden als sie sich von ihrem ursprünglich aquatischen in das neue terrestrische Habitat ausbreiteten: Wasserverlust. Die Kutikularmembran bildet eine effektive Transportbarriere für die passive Diffusion von Wasser und schützt so die Pflanze vor Austrocknung (Schönherr 1982). Verschiedene Anpassungen an die genannten harschen Umweltbedingungen auf der Kutikularmembran ermöglichen Mikroorganismen dennoch ein Überleben in der oligotrophen Phyllosphäre.

Die Erforschung der Phyllosphäre als Schnittstelle zwischen Pflanzen und Mikroorganismen ist auch aus ökonomischer und ökologischer Sicht wichtig. So können Phytopathogene für starke Ernteeinbußen verantwortlich sein. Ein tieferes Verständnis für die Ökologie und die Zusammenhänge in der Phyllosphäre könnte neue Strategien und Methoden im Agrarsektor hervorbringen (Glick und Bashan 1997).

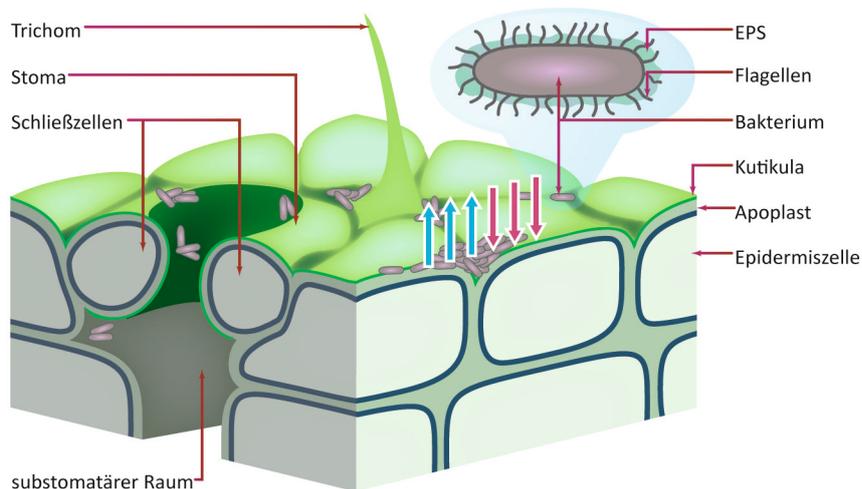


Abb.1 Schematische Darstellung eines mit epiphyllen Bakterien besiedelten Blattes (Querschnitt, abaxial).

Die Bakterien siedeln sich auf der pflanzlichen Kutikula an und bilden dafür kleine Aggregate und Biofilme mit einem hohen Anteil Extra Polymere Substanzen (EPS). Pathogene Bakterien können die Stomata als Einfallstor in den substomatären Raum nutzen. Die stark hydrophobe Kutikula lässt eine moderate Transpiration von Wasser und die Diffusion von gelösten organischen Molekülen aus dem Apoplast (blaue Pfeile) sowie die Aufnahme von bakteriellen Produkten (rote Pfeile) zu.

1.2 Die pflanzliche Kutikula

Ein Großteil der terrestrischen Biomasse wird durch pflanzliche Photosynthese produziert (Groombridge und Jenkins 2002). Eine häufig zu beobachtende evolutionäre Entwicklung zur Steigerung des Stoffaustausches mit der Umwelt ist die Vergrößerung der Oberfläche. Im Falle der Pflanzen führte es zu den zweidimensionalen, flächigen Strukturen von Blättern und Nadeln. Die Vergrößerung dieser stoffwechselaktiven Teile der Pflanzen führte zu einer gesteigerten Aufnahme von photosynthetisch aktiver Strahlung (PAR). Zudem erleichtert es den schnellen Gasaustausch von Kohlenstoffdioxid (CO_2) und Sauerstoff (O_2). Durch den in fast jedem Landhabitat vorherrschenden Gradienten im Wasserpotential zwischen Blatt (hoch) und Atmosphäre (gering) führt eine vergrößerte Oberfläche auch zu einem gesteigerten Wasserverlust (Schreiber *et al.*, 2004). Der große Erfolg der Landpflanzen ging mit der Fähigkeit einher sich mit Hilfe der Kutikula vor Austrocknung zu schützen. Die genaue chemische Zusammensetzung und Dicke der Kutikulamembran ist von Art zu Art sehr variabel. Die Spannweite der verschiedenen Dicken (Faktor 1000) reicht von einigen nm, wie bei der Blattkutikula von *Arabidopsis thaliana* (30nm), bis hin zu mehreren μm , wie bei der Kutikula von Früchten von *Malus domestica* (30 μm ; Schreiber und Schönherr 2009). Die Kutikula ist ein extrazelluläres Lipidpolymer und lässt sich in zwei Hauptkomponenten unterteilen: das Kutinpolymer und auf-, beziehungsweise eingelagerten Wachse. Das Kutinpolymer bildet eine mechanisch stabile Matrix. Es besteht zu Großteilen aus C_{16} und C_{18} ω -Hydroxyfettsäuren, die über Ester und Etherbindungen miteinander verknüpft sind (Espelie *et al.*, 1980; Kolattukudy, 1981; Pollard *et al.*, 2008). Zusätzlich können aromatische Komponenten Bestandteil des Kutinpolymers sein (Hunt und Baker 1980). Auch kleine Mengen Polysaccharide (Fang *et al.*, 2001) wie Pektin und Cellulose können auf der Innenseite der Kutikula nachgewiesen werden. Sie reichen von der epidermalen Zellwand ins Innere der Kutinschicht und tragen vermutlich zur mechanischen Integrität und der Verankerung in der Zellwand bei (Guzman *et al.*, 2014; Segado *et al.*, 2016). Es wurde vorgeschlagen, dass diese polaren Polymere innerhalb der stark lipophilen Kutikularmembran polare Poren formen, welche die Diffusion von geladenen kleinen Molekülen und Ionen durch die Kutikularmembran hindurch ermöglichen (Schreiber 2005, Schreiber und Schönherr 2009). Die zweite Hauptkomponente der pflanzlichen Kutikula sind Wachse. Sie lassen sich unterteilen in intrakutikuläre und epikutikuläre Wachse. Die intrakutikulären Wachse sind in das Kutinpolymer eingelagert und hauptverantwortlich für die Barriereigenschaften der Kutikula (Zeisler und

Schreiber 2016). Epikutikuläre Wachse befinden sich auf der Außenseite der Kutikula und sind maßgeblich an der Struktur der Oberfläche beteiligt. In Abhängigkeit von ihrer chemischen Zusammensetzung formen epikutikuläre Wachse dreidimensionale Strukturen wie Schuppen, Plättchen und Stacheln und haben damit einen sehr großen Einfluss auf die physikochemischen Eigenschaften der Blattoberfläche (Barthlott *et al.*, 1998). Die Benetzbarkeit einer Blattoberfläche mit Wasser wird maßgeblich durch die dreidimensionale Struktur der epikutikulären Wachse bestimmt. Eine Erosion dieser Wachse, wie sie im Verlauf eines Jahres natürlicherweise durch Wind, Regen und Staub zustande kommt, führt zu einer gesteigerten Benetzbarkeit (Cape und Percy 1993). Aber auch eine Besiedelung mit epiphyllen Organismen führt zu einer verringerten Oberflächenhydrophobizität und somit zu einer erhöhten Benetzbarkeit (Knoll und Schreiber 1998). Wie dieser Effekt zustande kommt ist noch nicht restlos geklärt. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen legen nahe, dass die epikutikulären Wachstrukturen teilweise von bakteriellem Biofilm überlagert/verdeckt werden. Auch die Produktion von Biotensiden, also Stoffen, welche die Oberflächenspannung einer Flüssigkeit herabsetzen, führen indirekt zu einer erhöhten Benetzbarkeit (Rosenberg 1985). Kutikuläre Wachse bestehen hauptsächlich aus linearen, langkettigen Aliphaten wie Alkoholen, Aldehyden, Alkanen und zudem aus pentacyklischen Triterpenen. Die Kettenlängen der linearen aliphatischen Bestandteile variieren zwischen C_{20} und C_{30} und sind ursprünglich C_{16} und C_{18} Fettsäuren, die durch Fettsäureelongation verlängert wurden und mit funktionalen Gruppen weiter modifiziert wurden (Kunst und Samuels 2003). Ester aus langkettigen Fettsäuren und Alkoholen erreichen Kettenlängen von C_{40} bis C_{60} . Triterpene wie Ursolsäure und Betulinsäure stammen, typischerweise mit C_{30} -Körpern, aus dem Terpenoidstoffwechsel der Pflanze. Kutikuläre Wachse sind in ihrer genauen Zusammensetzung von Art zu Art aber sehr variabel (Buschhaus und Jetter 2011). Abgesehen von diesen beiden Hauptkomponenten wurden zu kleinen Teilen - stark artabhängig - Ketone, Diole und sekundäre Alkohole als Bestandteil der Kutikula nachgewiesen (Jetter *et al.*, 2006). Es wird angenommen, dass manche Bakterien die Kutikula nicht nur als Substratum, sondern epikutikuläre Wachse auch als Substrat verwenden können (Hankin und Kolattukudy 1969). Bakterien der Gattung *Rhodococcus* und *Pseudomonas* sind in der Lage eine Reihe von aliphatischen Kohlenwasserstoffen zu verstoffwechseln (Kotlar *et al.*, 2007) und Umweltisolate von *Pseudomonas* sp. aus Obstgärten konnten Ursolsäure als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen (Kolattukudy und Hankin 1969). Elektronenmikroskopische Aufnahmen legen zudem nahe, dass neben dem bakteriellen Abbau von Wachsen auch epiphyll Pilze die Struk-

tur der epikutikulären Wachse verändern. Der Einfluss von epiphyllen Bewohnern auf die physikochemischen Eigenschaften der Kutikula stellt möglicher Weise eine gezielte Veränderung dar, um die Permeabilitätseigenschaften selbiger zu beeinflussen (Zeisler *et al.*, 2018).

1.3 Biofilme und Mikrokolonien in der Phyllosphäre

Die vorherrschenden Bedingungen auf der Blattoberfläche sind Trockenheit, Mangel an verfügbaren Energie- und Kohlenstoffquellen und schwankende Temperaturen. Eine Reihe von evolutiven Anpassungen - etwa das Wachstum in einem Biofilm oder die Produktion von Biotensiden - ermöglichen Bakterien ein Überleben in der oligotrophen Phyllosphäre. Biofilme sind die verbreitetste Form von bakteriellem Leben auf dem Planeten (Flemming und Wingender 2010). Fossilisierte, geschichtete und aquatische Biofilme, sogenannte Stromatolithen, zählen als älteste durch lebendige Organismen geschaffene Strukturen auf unserem Planeten und werden teilweise auf ein Alter von 3,5 Milliarden Jahren geschätzt (Byerly *et al.*, 1986). Ein Biofilm ist ein Konglomerat aus bakteriellen Zellen, welches von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) umgeben ist und an einer anorganischen oder biologischen Oberfläche haftet. Biofilme entstehen typischerweise an der Grenzfläche zwischen einer flüssigen und einer festen Phase. Beispiele dafür wären Rohrleitungen oder jegliche Oberflächen unter Wasser (Geesey *et al.*, 1977). Biofilme können aber auch zwischen einer flüssigen und einer gasförmigen Phase entstehen. So sind bakterielle Kahmhäute nichts anderes als schwimmende Biofilme. Manche Bakterien sind auch in der Lage Biofilme an der Grenzfläche zwischen zwei flüssigen Phasen zu etablieren. So sind Bakterien der Gattung *Rhodococcus* in der Lage hydrophobe Alkantrophen zu besiedeln und gleichzeitig als Substrat und Substratum zu verwenden (Wagner *et al.*, 1979). Biofilme der Phyllosphäre, also an der Grenzfläche zwischen Blatt und Atmosphäre, sind üblicherweise dünner als aquatische Biofilme und sowohl auf der adaxialen als auch der abaxialen Seite von Blättern zu finden (Espinosa-Urgel *et al.*, 2004). Den Hauptteil der Masse eines Biofilms bildet die hydrierte extrazelluläre Matrix (ECM), die kontinuierlich von seinen Bewohnern produziert wird. Hauptbestandteil sind Polysaccharide und extrazelluläre DNA (eDNA), gefolgt von Proteinen und verschiedenen Lipiden (Branda *et al.*, 2005). Die ECM erfüllt mehrere Zwecke: So verhindert sie das Austrocknen der bakteriellen Zellen, kann als Depot für toxische Stoffwechselmetabolite dienen, Pig-

mente gegen Strahlung akkumulieren oder selber als Energie und Kohlenstoffquelle genutzt werden. Zusätzlich bietet die schleimige Umgebung einen Schutz gegen grasende Protozoen (Flemming und Wingender 2010). Biofilmbildung startet häufig mit einzelnen motilen Zellen, welche von Wind und Regen verbreitet werden (Lindow 1996). Die anfängliche Interaktion zwischen einem Bakterium und einer Oberfläche wird bestimmt von der Zelloberflächenhydrophobizität sowie von van der Waals und elektrostatischen Kräften. Dieser lose Kontakt wird durch wirtsspezifische Adhesine auf der Zelloberfläche oder an bakteriellen Anhängen wie Pili oder Fimbrien verstärkt (Romatschuk 1996; Vorholt 2012). Ist diese irreversible Anhaftung erfolgt, beginnt das Bakterium – bei guten Bedingungen – sich zu vermehren und bildet eine in EPS eingebettete Mikrokolonie. Solche Mikrokolonien wachsen weiter oder verschmelzen mit anderen Mikrokolonien aus der Umgebung zu ausgereiften, hoch komplexen dreidimensionalen Biofilmen (Fuqua *et al.*, 2004). Der letzte Schritt in der Entwicklung eines Biofilms ist die weitere Verbreitung durch Schwärmer-Zellen. Durch Nahrungsmangel oder andere Reize kommt es dazu, dass einzelne motile Zellen sich gezielt aus dem Verbund ablösen und sich in noch unbesiedelte Regionen bewegen um neue Mikrokolonien zu etablieren. Durch die hohe Diversität in der Phyllosphäre bestehen die meisten Mikrokolonien und Biofilme aus mehreren Spezies, die sich eine ECM teilen. So kann das Wachstum in Multi-Spezies-Biofilmen metabolische Vorteile bieten (Wilson und Lindow 1994). Eines der größten Probleme für die Bewohner der Phyllosphäre ist der Mangel an brauchbaren, für heterotrophe Organismen zu verwertende Kohlenstoffquellen. Manche Bakterien sind in der Lage mit sehr einfachen kohlenstoffhaltigen Verbindungen ihren gesamten Energie- und Kohlenstoffhaushalt zu decken. Sie können bei der Erstbesiedlung von nährstoffarmen Habitaten eine entscheidende Rolle spielen. Methylo trope Bakterien sind Pionierarten der Phyllosphäre und bilden oft die Grundlage für folgende Besiedelungen: Methylo trope können Methanol und/oder Methan als einzige Energie und Kohlenstoffquelle nutzen (Sakai *et al.*, 2015). Methanol kommt als Nebenprodukt bei der Hydrolyse der Methyl-Phenyl-Ethergruppe in Lignin zustande und ist in der Phyllosphäre ubiquitär (Fall *et al.*, 1993). So bilden Methylo trope Bakterien erste Mikrokolonien und EPS, welche wiederum als Besiedelungs- und Nahrungsgrundlage für andere Organismen dienen kann. Auch andere Bakterien aus den Gattungen *Rhodococcus* und *Variovorax* konnten Isopren, ein ebenso wie Methanol häufig vorkommendes Molekül in der Phyllosphäre, als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle verstoffwechseln (McGenity *et al.*, 2018). Die Koexistenz mehrerer Spezies in einem Biofilm und die teilweise hoch komplexe Strukturierung eines Biofilms setzen auch eine

Art der Kommunikation zwischen den Zellen voraus. So ist Quorum sensing mit Hilfe von AHLs (N-Acyl-Homoserin-Lacton) und anderen Stoffen in pflanzenassoziierten Biofilmen weit verbreitet. Das phytopathogene Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* verwendet AHLs um die Exopolysaccharidproduktion und seine Beweglichkeit zu steuern (Lindow et al., 2005). Bei dem PGPB *Pseudomonas fluorescens* 2P24 ist die Biofilmentstehung direkt von AHLs abhängig (Zhang und Wei 2006).

1.4 Tenside

Tenside im Allgemeinen sind Stoffe, welche die Grenzflächenspannung zwischen zwei Phasen herabsetzen. Tenside bilden keine einheitliche chemische Substanzklasse, sondern gleichen sich durch einen ähnlichen Aufbau und physikochemische Eigenschaften. Per Definition handelt es sich um amphiphile Moleküle die aus einer hydrophilen Kopfgruppe und einem hydrophoben Schwanzbereich aufgebaut sind (Van Hamme et al., 2006). Es wird unterschieden zwischen ionischen (anionischen und kationischen) und nichtionischen Tensiden, deren Kopfgruppe keine Ladung hat. Durch diesen Aufbau können sie zwischen zwei unterschiedlichen Phasen als Vermittler fungieren. Wenn eine steigende Tensidkonzentration in einer wässrigen Lösung die Oberflächenspannung nicht weiter herabsetzen kann, ist die sogenannte Kritische Mizellenkonzentration (CMC) erreicht. Ab dieser Tensidkonzentration bilden sich Mizellen, wobei die CMC bei jedem Tensid unterschiedlich ist und als Maß für die Wirksamkeit herangezogen wird (Abb.2). Technische Tenside finden in fast allen Bereichen des täglichen Lebens Anwendung. Sie werden als Waschmittel verwendet, als Emulgatoren in der Lebensmittelindustrie oder in der Textil- und Faserproduktion. Als Additiv für Pflanzenschutzmittel können sie mehrere Zwecke erfüllen: Zum einen reduzieren sie die Oberflächenspannung der applizierten Lösung und wirken somit als Benetzungsmittel (Green 2000). Zum anderen können durch die hygroskopische Wirkung von Tensiden Wassermoleküle der Atmosphäre gebunden werden. So wird dem ‚Kaffeering- Effekt‘, einem austrocknen des applizierten Pestizides auf der Blattoberfläche vorgebeugt (Soltman und Subramanian 2008). Darüber hinaus können bestimmte Tenside als Anker auf der Blattoberfläche für Wirkstoffe fungieren (Green 2000) oder gegenteilig die Diffusion eines Wirkstoffes über die Kutikula ins Blattinnere erhöhen (Perkins et al., 2005).

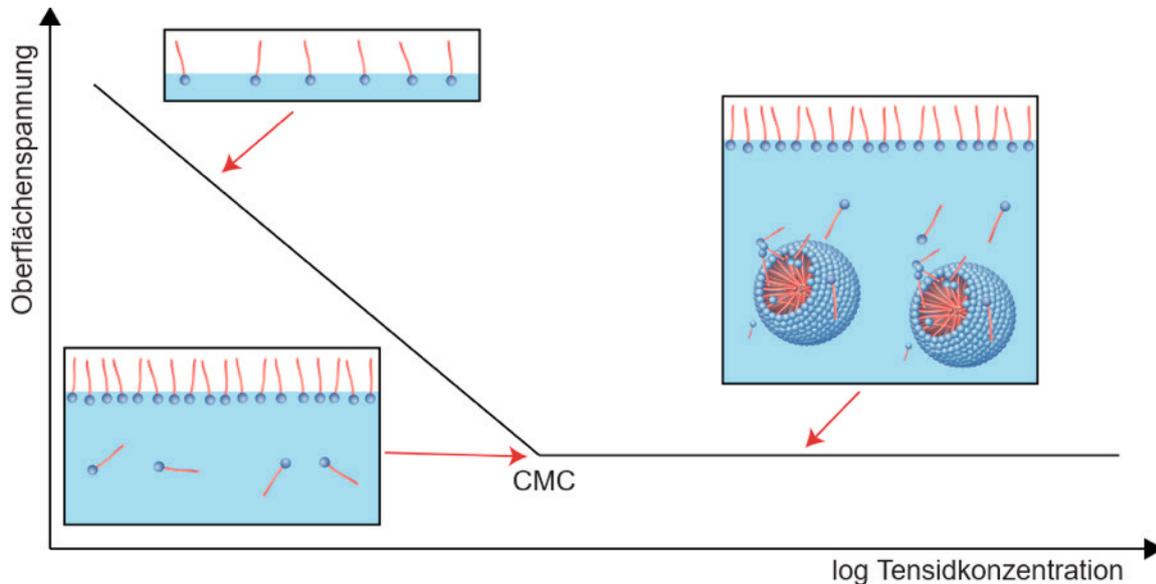


Abb.2 Schematische Darstellung des Verhaltens von Tensiden in wässriger Lösung in Abhängigkeit von ihrer Konzentration.

Die Bilder zeigen schematisch wie sich einzelne Tensidmoleküle bei unterschiedlichen Konzentrationen anordnen. (oben) Bei einer geringen Tensidkonzentration schwimmen einzelne Tensidmoleküle an der Grenzfläche zwischen den Phasen (z.B. Wasser/Luft) und beeinflussen so die Anziehungskräfte. (links) Eine Zunahme der Tensidkonzentration führt zu einem konstanten absinken der Oberflächenspannung. (rechts) Ist die Kritische Mizellenkonzentration erreicht, bilden die Tensidmoleküle Mizellen und die Oberflächenspannung der Lösung bleibt konstant.

1.4.1 Biotenside

Biotenside oder auch Biosurfactants (**Surface active agent**) sind Substanzen, die genau wie technische Tenside wirken, also aufgrund ihres amphiphilen Charakters eine Verbindung zwischen hydrophilen und hydrophoben Phasen herbeiführen können. Der Unterschied zu technischen Tensiden besteht in ihrer biologischen Herkunft. Technische Tenside werden großchemisch zumeist aus Mineralöl oder tierischen und pflanzlichen Fetten hergestellt (Fabry 1991). Biotenside werden von Bakterien synthetisiert und sind, im Gegensatz zu vielen technischen Tensiden, biologisch abbaubar. Biotenside sind in ihrer chemischen Zusammensetzung sehr heterogen. Bestimmte Bakteriengattungen produzieren oft für sie charakteristische Verbindungen. So produzieren Bakterien der Gattung *Bacillus* oft das Lipopeptid Surfactin, epiphyllle Pseudomonaden oft ein Rhamnolipid (Mulligan 2005). Aber auch Mischungen aus verschiedenen Biotensiden sind möglich. So produziert *P. syringae*, ein pflanzenpathogener Stamm, einmal ein Rhamnolipid und zusätzlich Syringafactin, ein Lipopeptid (Lindow *et al.*, 2012). Aber auch Polysaccharide, Proteine und Lipoproteine können Biotenside sein (Banat 1997). Biotenside sind an einer Vielzahl von Interaktionen zwischen Bakterien und Pflanzen beteiligt. Sowohl in der Rhizosphäre als auch in der Phyllosphäre sind Biotenside an verschiedensten Prozessen

beteiligt (Raaijmakers *et al.*, 2010). So spielen Biotenside eine entscheidende Rolle bei der Biofilmbildung (Ron und Rosenberg 2001) und der Verbreitung und Bewegung von Mikroorganismen in der Phyllospäre (Thomas *et al.*, 2007). Zudem können manche Biotenside antimikrobielle Eigenschaften besitzen und bei der Abwehr von pathogenen Keimen helfen (Raaijmakers *et al.*, 2003). So wirkt das Biotensid Viscosin (Abb.3) schon in geringen Konzentrationen sporolytisch auf Sporen mancher Oomyceten (De Bruijn *et al.*, 2007). Aber auch das Gegenteil kann der Fall sein. So können Biotenside auch Virulenzfaktoren sein. Mutanten eines pektolytischen *P. fluorescens*, die kein Biotensid mehr produzieren, konnten nach wie vor Blütenfäule auslösen, waren aber nicht mehr in der Lage sich auf der Brokkoliblüte zu verbreiten (Hildebrand *et al.*, 1998). Biotenside können auch direkt zu verbesserten Lebensbedingungen von epiphyllen Bakterien beitragen. Durch ihren hygroskopischen Effekt begünstigen sie die Ausbildung eines Wasserfilms auf der Kutikula und erhöhen dadurch passiv die Diffusion von gelösten Stoffen aus dem Blattinneren (Burch *et al.*, 2014). Der sogenannte Leaching-Effekt, die Diffusion von organischen und anorganischen Stoffen über die pflanzliche Kutikula, wurde schon anfangs des 18. Jahrhunderts von Stephan Hales beschrieben und Mitte der sechziger Jahre des 20. Jahrhunderts mit Radioisotop-Versuchen von Tukey nachgewiesen (Tukey 1970). In wieweit Biotenside dabei ein direktes leaching von dem Apoplasten durch eine gesteigerte Permeabilität der Kutikula begünstigen, bleibt offen.

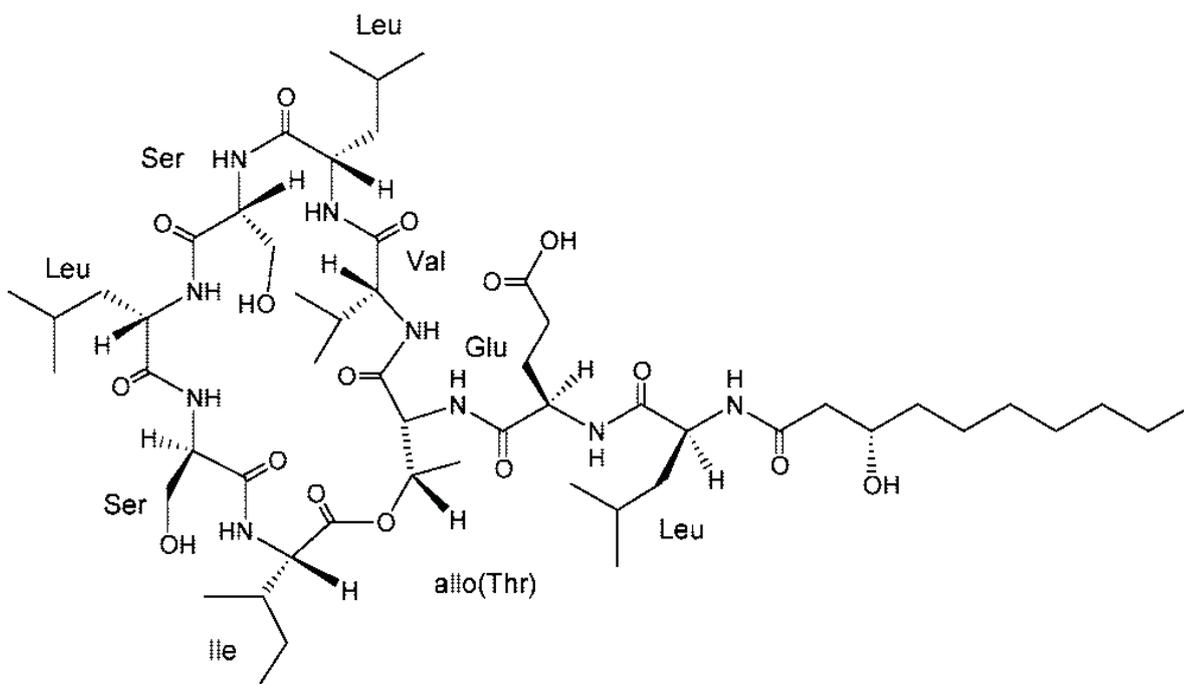


Abb.3 Darstellung des Lipopeptids Viscosin.

Viscosin besteht aus einem zirkulären Peptid aus 7 Aminosäuren verbunden mit 2 weiteren Aminosäuren die mit einer Fettsäure verestert sind (Saini *et al.*, 2008).

1.5 Pseudomonaden als Bewohner der Phyllosphäre

In dieser Arbeit wurde mit vier Umweltisolaten aus der Phyllosphäre gearbeitet, die alle der Gattung *Pseudomonas* angehören: *Pseudomonas fluorescens* SWB25, *Pseudomonas cedrinala* sp., *Pseudomonas lurida* sp. und *Pseudomonas poae* sp. Pseudomonaden sind motile, gram-negative, meist saprophytisch lebenden Stäbchen und gehören zu den γ -Proteobacteria. Sie sind in der Umwelt weit verbreitet und leben oft assoziiert mit Pflanzen in deren Rhizo- und Phyllosphäre (Thompson *et al.*, 1992; Bazhanov und Yatsevich 2010). Es gibt epiphyllle Pseudomonaden, die zu den PGPB gezählt werden können, sowie pathogene Arten, wie zum Beispiel *Pseudomonas syringae*, einem weit verbreiteten Erreger diverser Fäulniserkrankungen an Nutzpflanzen (Lindow *et al.*, 2005). Alle Arten wurden aufgrund ihrer Fähigkeit, Biotenside zu produzieren, ausgewählt und sind keine bekannten Pathovaren. Zudem produzieren sie alle bei Eisenmangel fluoreszierende Siderophore, die Pyoverdine. Das Genom von drei Arten ist komplett sequenziert (*fluorescens*, *cedrina*, *poae*), wobei nur das Genom von *P. fluorescens* SWB25 weitgehend annotiert ist (Winsor *et al.*, 2016). *P. fluorescens* SWB25 ist auch die am genauesten physiologisch untersuchte Art und zählt zu den PGPB (Silby *et al.*, 2009). *P. cedrina* wurde erstmals aus libanesischem Quellwasser isoliert und ist ebenso wie *P. fluorescens* SWB25 ein starker Biotensidproduzent (Dabboussi *et al.*, 1999; Lindemann 2015 persönliche Nachricht). *P. poae* wurde das erste Mal in der Phyllosphäre von Süßgräsern (*Poaceae*) in Deutschland isoliert (Behrendt *et al.*, 2003). Bisher sind drei Stämme beschrieben, von denen einer als Beizmittel (pestcontrol) gegen Wurzelfäule bei der Zuckerrübe verwendet wird (Müller *et al.*, 2013). *P. lurida* ist phylogenetisch eng mit *P. poae* und *P. fluorescens* verwandt und wird wie ersterer unter anderem mit der Phyllosphäre von Gräsern assoziiert (Behrendt *et al.*, 2007).

1.6 Ziel dieser Arbeit

Ziel der Arbeit war es, die Rolle von bakteriellen Biotensiden bei der Interaktion von Pflanzen und Bakterien besser zu verstehen und experimentelle Voraussetzungen zu schaffen, damit diese weiter untersucht werden können. Um die Funktion eines bestimmten Stoffes innerhalb eines biologischen Systems zu überprüfen hat es sich bewährt, Mutanten zu erzeugen, die den zu untersuchenden Stoff nicht mehr produzieren können und diese

Mutanten dann phänotypisch und physiologisch mit dem Wildtypen zu vergleichen. So sind phänotypische Änderungen und geändertes Verhalten unter Stressbedingungen auf das Fehlen des einen Stoffes zurückzuführen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Pseudomonaden - als typische Bewohner der Phyllosphäre - gentechnisch so verändert, dass sie keine Biotenside mehr produzieren können. Alle Arten wurden aufgrund ihrer Fähigkeit, Biotenside zu produzieren, ausgewählt und sind keine bekannten Pathovaren. Die Wildtypen und ihre korrespondierenden Mutanten wurden dann verschiedenen physiologischen Experimenten unterzogen. Anschließend wurde eine mögliche Verstoffwechslung von kutikulären Wachsen durch *P. fluorescens* SBW25 untersucht. Zusätzlich wurde ein experimenteller Aufbau etabliert, mit welchem sich der Einfluss von Biotensiden auf die Überlebensrate von *P. fluorescens* SBW25 auf isolierten Kutikularmembranen beobachten lässt. Mit Hilfe von massenspektrometrischen Methoden sollte zudem, wenn möglich eine genauere Charakterisierung der von den Pseudomonaden produzierten Biotenside erfolgen.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte, Medien und Verbrauchslösungen

Tab.1 Verwendete Geräte und Hersteller

Autoklav	DB-23 Systec
Blockthermostat	MKR13 HLC BioTech
Brutschrank Serie FD	Binder
Brutschrank MIR-554-PE	Panasonic
Brutschrank MIR-154-PE	Panasonic
Drop Shape Analyser DSA25	Krüß GmbH
Elektroporator Gene Pulser/Gene controller	BIO-RAD
Gelelektrophorese Netzteil	Consort E 835
Kühlschrank Labcool	SANYO
Mikroskop Axioplan 2	ZEISS
Nano-Drop 2000c Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH
Single Action Airbrush-Pistole	Conrad Electronic
Sterilbank HERAsafe	Thermo
Thermocycler Primus 96 advanced	Peqlab Biotechnologie GmbH
Ultraschallbad Sonorex Super RK 510	H BANDELIN electronic GmbH & Co. KG
UV Licht Gerät BDA	Biometra
Vortex Mixer MELB 1719	Merck Eurolab
Waage METTLER TOLEDO AG204	DeltaRange
Plate Reader TriStar2	BertholdTech GmbH
Wasserbad HE 4	JULABO
Zentrifuge / 300 K	HERMILE
Zentrifuge Z 160 M	HERMILE
-80 Grad Schrank Labcool	SANYO
Gaschromatograph 6890N	Agilent Technologies

Tab.2 Verwendete Medien**KB Medium (400ml) pH-7**

8g	Proteosepepton
0,46g	Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)
0,6g	Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($Mg[SO_4] \cdot 7H_2O$)
4ml	Glycerin
6g	(1,5%) Agarose für ein Festmedium
1,6g	Agarose (0,4%) für ein halbfestes Medium

Auf 400ml mit H_2O dest. Auffüllen

LB Medium (400ml) pH-7

2g	Hefeextrakt
4g	Trypton
0,2g	Natriumchlorid (NaCl)
6g	(1,5%) Agarose für ein Festmedium

Auf 400ml mit H_2O dest. Auffüllen

MM Medium (400ml) pH-7

6ml	Glycerin
2g	L-Glutamin
0,6g	Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)
0,46g	Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($Mg[SO_4] \cdot 7H_2O$)
6g	Agarose zusätzlich für ein Festmedium

Auf 400ml mit H_2O dest. Auffüllen

SOC Medium (400ml)

8g	Trypton
2g	Hefeextrakt
10mM	Natriumchlorid (NaCl)
2,5mM	Kaliumchlorid (KCl)
6g	Agarose zusätzlich für ein Festmedium

Nach dem Autoklavieren werden unter der Sterilbank folgende sterilfiltrierte Lösungen zugegeben:

10mM	Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)
20mM	Glukose

Auf 400ml mit H_2O dest. Auffüllen

PBS 10 x (200ml)

16g	Natriumchlorid (NaCl)
0,4g	Kaliumchlorid (KCl)
1,53g	Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)
0,4g	Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)

Auf 200ml mit H_2O dest. Auffüllen

M9 Salt solution

30g	Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
12g	Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)
2g	Natriumchlorid (NaCl)
2g	Ammoniumchlorid (NH_4Cl)

Spurenelementlösung (TMS) 100 x (II)

5g	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
0.38g	Eisen(III)-chlorid ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
84mg	Zinkchlorid (ZnCl_2)
13mg	Kupferchlorid ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
10mg	Cobaltchlorid ($\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
10mg	Borsäure (H_3Bo_3)
1,6mg	Manganchlorid ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

Kristallviolette-Lösung (100ml)

1g	Kristallviolette
----	------------------

Auf 100ml mit H_2O dest. Auffüllen

Die Lösung wurde nicht autoklaviert und bei 8°C gelagert

Enzymlösung pH-3

2%	Pektinase
2%	Cellulase
0,01M	Zitronensäure

Die Lösung wurde nicht autoklaviert und bei 8°C gelagert

Boraxpuffer pH-9

5mM	Borax
-----	-------

Die Lösung wurde nicht autoklaviert und bei 8°C gelagert

Alle Medien und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, autoklaviert und anschließend bei Raumtemperatur gelagert.

2.2 In dieser Arbeit verwendete Bakterien, Plasmide und Pflanzenmaterial

2.2.1 Bakterien

Tab.3 Verwendete Bakterien

Stamm	Beschreibung	Referenz
<i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25	Umweltisolat von Romana Salat	Steven Lindow
<i>Pseudomonas cedrina</i>	Umweltisolat von Spinat	Steven Lindow
<i>Pseudomonas lurida</i>	Umweltisolat von Romana Salat	Steven Lindow
<i>Pseudomonas poae</i>	Umweltisolat von Romana Salat	Steven Lindow
<i>Escherichia coli</i> Dh5 α	Klonierungsstamm	New England Biolabs
<i>Rhodococcus equi</i> Δ kasA	Fettsäuresynthesemutant von <i>R. equi</i> /Transposon Positivkontrolle	Sydor (Sydor 2008)

2.2.2 Plasmide

Tab.4 Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pUC19	Klonierungsvektor	New England Biolabs

2.2.3 Primer

Tab.5 Verwendete Primer

Name	Sequenz	Beschreibung	Referenz
SLK8-F	AGAGTTTGATCATGGCTCAGAT	16srRNA-Sequenzierungsprimer	
SRK1506-R	TACCTTGTTACGACTTCACCCC	16srRNA-Sequenzierungsprimer	
Kan-F	CTCAAAATCTCTGATGTTACATTGC	Tn5-Transposonnachweis	Haas
Kan-R	GGTTGATGAGAGCTTTGTTGTAGG	Tn5-Transposonnachweis	Haas

Name	Sequenz	Beschreibung	Referenz
M13-F	GCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA	pUC19-Sequenzierungsprimer	GATC
M13-R	GAGCGGATAACAATTCACACAGG	pUC19-Sequenzierungsprimer	GATC
viscB-F	TTCTCGGTCTGGGAAATCTG	qPCR-viscB (NRPS)	Diese Arbeit
viscB-R	TGCCGTACATGTTCCACAGT	qPCR-viscB (NRPS)	Diese Arbeit
gyrA-F	TCGAGGAATACACCGAAGGT	qPCR-gyrA (DNA-Gyrase)	Diese Arbeit
gyrA-R	GGGATCAGCATCGAAATCAG	qPCR-gyrA (DNA-Gyrase)	Diese Arbeit
dnaG-F	GGCAAGAAATGGGACAAGAA	qPCR-dnaG (DNA-Primase)	Diese Arbeit
dnaG-R	CTTTCAACAATCGGCCTTGT	qPCR-dnaG (DNA-Primase)	Diese Arbeit
L23-F	TGAACCAGGAACGCGTATTT	qPCR-L23 (Ribisomales Protein)	Diese Arbeit
L23-R	TTTCACGCTGAACAGGCTTT	qPCR-L23 (Ribisomales Protein)	Diese Arbeit
gap-F	ACACCCAGTACGGCATCAAG	qPCR-gap (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)	Diese Arbeit
gap-R	TCGATCAGGTTCTGGTCGTT	qPCR-gap (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)	Diese Arbeit

2.2.4 Pflanzenmaterial

Das Pflanzenmaterial von *Prunus laurocerasus*, aus welchem die in den Versuchen verwendeten Blattkutikeln isoliert wurden, stammte von mehreren großen *P. laurocerasus* Büschen im Garten der Mathematischen Fakultät in Bonn, Endenicher Allee 60, 53115 Bonn.

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung der Bakterien

2.3.1.1 Agarplatten

Um Einzelkolonien zu erhalten wurde mit einer sterilen Impföse etwas Material aus einer Glycerindauerkultur entnommen und wie in Abb.4 zu sehen auf einer Agarplatte ausgestrichen. Dabei wurde die Impföse zwischen dem ersten und zweiten, sowie zwischen dem zweiten und dritten Strich über dem Bunsenbrenner ausgeglüht. Die Platten wurden anschließend bei der jeweiligen bakterienspezifischen Optimaltemperatur (25°C oder 37°C; siehe 2.3.1.2, 2.3.3, 2.4.8) mit dem Boden nach oben in einem Brutschrank inkubiert.

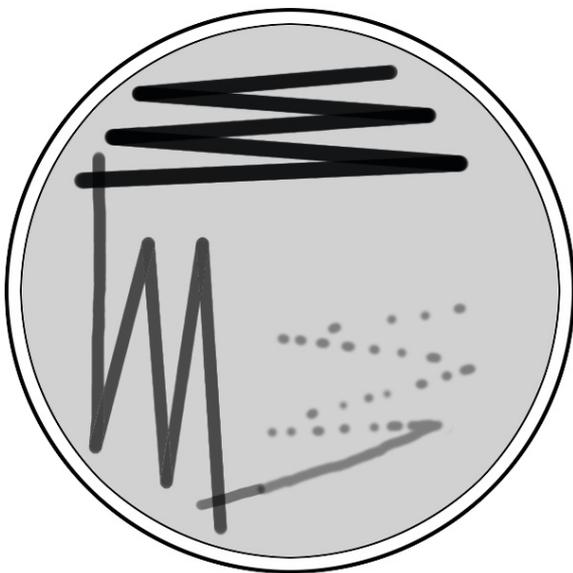


Abb.4 Schematische Darstellung des Beimpungsmuster bei dem drei Ösen-Ausstrichverfahren.

Zu Beginn wird etwas Material aus einem Glycerinstock mit der Impföse aufgenommen und mäandrierend ausgestrichen (schwarz). Zwischen den folgenden Strichen (grau, hellgrau) wurde die Impföse jeweils in einer Bunsenbrennerflamme sterilisiert.

2.3.1.2 Agarplatten zur Gewinnung von Biotensiden

Die Agarplatten wurden, im Gegensatz zu dem drei Ösen-Ausstrichverfahren (MM.2.3.1), mit einem Gitter aus zwei mal fünf parallelen Strichen, welche über die gesamte Agarfläche reichen, inokuliert. Anschließend wurden die Platten bei 25°C für 48 Stunden inkubiert. Die Kolonien wurden mit 5ml sterilem Wasser abgewaschen und die Zellsuspension in einem 50ml Falcon aufgefangen. Anschließend wurden 15ml der Suspension auf eine OD_{600} von 1 eingestellt und bei 5.000rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und als standardisierte Tensidlösung in verschiedenen Versuchen verwendet.

2.3.1.3 Flüssigkulturen

Für Flüssigkulturen wurden 5-10ml eines entsprechenden Komplexmediums in 15ml Schnappdeckelröhrchen überführt und anschließend mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte angeimpft. Die Kulturröhrchen wurden bei 150rpm auf einem Schüttler bei

der bakterienspezifischen Optimaltemperatur (2.3.1.2, 2.3.3, 2.4.8) inkubiert.

2.3.1.4 Flüssigkulturen mit isolierten Kutikularmembranen als C-Quelle

Für Flüssigkulturen mit isolierten Kutikularmembranen als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle wurden 100ml Erlenmeyerkolben mit 50ml Minimalmedium mit Spurenelementlösung (TMS) und 3 UV-sterilisierten und gewaschenen Kutikularmembranen befüllt. Die Kolben wurden anschließend mit 1ml einer zweimal mit PBS gewaschenen Übernachtskultur inokuliert und bei 25°C auf dem Schüttler inkubiert.

2.3.1.5 Cryokulturen

Um Dauerkulturen für die -80°C Tiefkühltruhe anzufertigen wurden 5ml einer Übernachtskultur bei 13.000rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in frischem PBS resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension erneut zentrifugiert, das Pellet in 1ml 25% Glycerin resuspendiert, in ein Drehdeckelröhrchen gefüllt und eingefroren.

2.3.2 Bestimmung der Optischen Dichte

Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte mit Hilfe eines Nano-Drop 2000c Spectrophotometer. Dafür wurde 1ml der zu messenden Bakteriensuspension in eine Plastikküvette überführt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 600nm gemessen. Übertraf der gemessene Wert eine OD_{600} von 1 wurde die Probe mit Medium oder PBS - entsprechend der Versuchsreihe - verdünnt.

2.3.3 Wachstumskurven

Für die Bestimmung der bakterienspezifischen Wachstumsrate beziehungsweise der Verdoppelungszeit wurden Wachstumskurven in verschiedenen Flüssigmedien erstellt. 100ml einer Nährlösung wurden in einem sterilen 500ml Schikanen-Erlenmeyerkolben mit 1ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 25°C auf dem Schüttler inkubiert. Alle 30 Minuten wurde unter sterilen Bedingungen 1ml der Kultur entnommen und die optische Dichte bestimmt.

2.3.4 Zellzahlbestimmung durch das Spatelplattenverfahren

Um die Zahl der Kolonie bildenden Einheiten (KBE/Lebendzellzahl) einer Bakteriensuspension zu bestimmen wurde das Spatelplattenverfahren angewendet. Mit 1ml der Ausgangssuspension wurde eine 1:10-Verdünnungsreihe auf Eis angefertigt. Anschließend wurden 50µl der Zellsuspensionen mit der Verdünnungsstufe x^{-4} bis x^{-8} mit Hilfe eines

sterilen Drigalskispatels auf KB-Agarplatten ausplattiert. Dabei wurde mit der höchsten Verdünnungsstufe begonnen und der Spatel zwischen jeder der Verdünnungsstufen mit Ethanol gereinigt und am Bunsenbrenner abgeflämmt. Nach 48 Stunden Inkubation bei 25°C im Brutschrank wurden die Platten ausgewertet. Platten mit mehr als 300 oder weniger als 10 KBE wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

2.3.5 Schäumungsverhalten

Wenn tensidhaltige Lösungen geschüttelt werden und damit Luft eingebracht wird, entsteht in Abhängigkeit von der chemischen Beschaffenheit des Tensids mehr oder weniger sowie festerer oder lockererer Schaum. Bakterielle Kulturüberstände können mit dieser Methode auf das Vorhandensein eines Tensids/Biosurfactant hin untersucht werden. Flüssigkulturen wurden durch Zentrifugation aufgetrennt und 5ml des klaren Kulturüberstandes in ein 15ml Analyse-Glasfläschchen überführt und fünf Mal ruckartig geschüttelt. Der entstandene Schaum wurde fotografisch festgehalten.

2.3.6 Spreitungsverhalten

Um eine veränderte Oberflächenspannung einer Lösung schnell qualitativ und visuell zu ermitteln wurde ein 10µl Tropfen der zu testenden Lösung auf einen Streifen Parafilm aufgetragen. Daneben wurde ein Tropfen demineralisiertes H₂O appliziert und die Ausbreitung des Tropfens mit der zu testenden Probe verglichen. Die Ergebnisse wurden fotografisch festgehalten.

2.3.7 Oberflächenspannungsbestimmung mit dem DSA von Krüss

Die genaue quantitative Ermittlung der Oberflächenspannung einer Lösung wurde mit dem Drop Shape Analyzer (DSA) von Krüss durchgeführt. Der DSA besteht aus einer fest eingespannten Spritze und einer Kamera (Abb.5). Die Spritze wird von einem Servo präzise angesteuert und kann langsam und kontrolliert Tropfen mit gewünschtem Volumen erzeugen. Dieser Tropfen wird von einer fest installierten Kamera aufgenommen und die Oberflächenspannung anhand dessen Form berechnet. Dies erfolgt mit Hilfe der Krüss-Software (Programm → hängender Tropfen; Programm → liegender Tropfen), welche auf der Young-Laplace-Gleichung basiert.

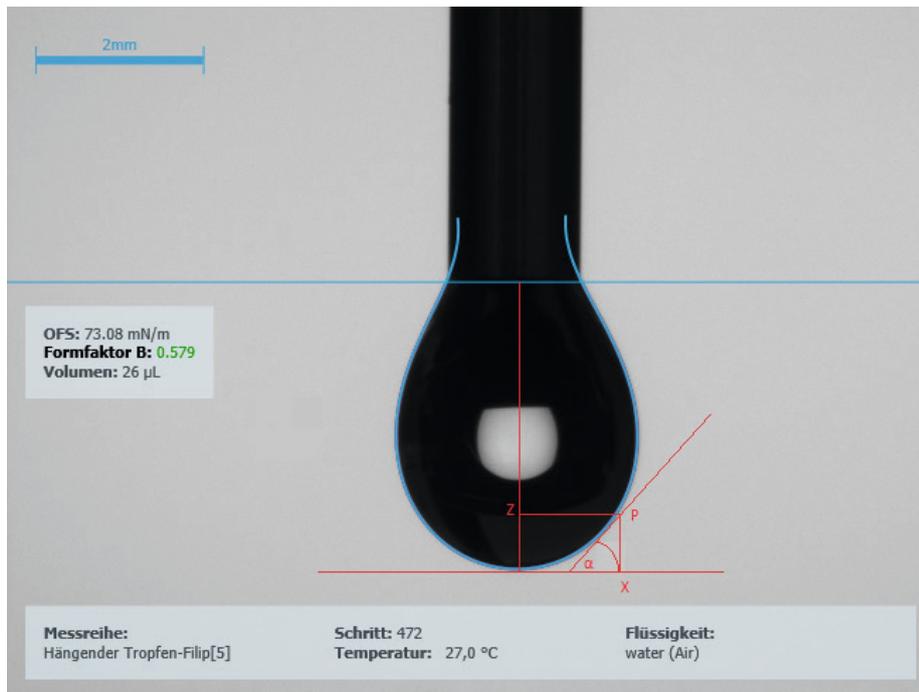


Abb.5 Aufnahme eines Tropfens bei der Bestimmung der Oberflächenspannung an einem hängenden Tropfen mit dem DSA von Krüss.

Mit einer Spritze wird kontrolliert ein kleiner Tropfen erzeugt der von einer Kamera aufgenommen wird. Mithilfe einer Software errechnet das Programm die Oberflächenspannung anhand der Tropfenform.

2.3.8 Kontaktwinkelbestimmung

Wenn eine Flüssigkeit auf eine Oberfläche appliziert wird, entsteht an der Kontaktstelle zwischen fester und flüssiger Phase ein spezifischer Winkel. Dieser sogenannte Kontaktwinkel ist ein Maß für die Benetzbarkeit einer Oberfläche und hängt von den physikochemischen Eigenschaften der Oberfläche und der Flüssigkeit ab. Je kleiner der Kontaktwinkel ist, desto höher ist die Benetzbarkeit der Oberfläche. Bei Kontaktwinkeln unter 90° spricht man von einer „guten Benetzbarkeit“, bei Kontaktwinkeln über 90° von „schlechter Benetzbarkeit“. Die genaue Erfassung des Kontaktwinkels erfolgte mit dem DSA von Krüss. Mit Hilfe der Spritze wurde ein $10\mu\text{l}$ großer Tropfen auf die zu untersuchende Oberfläche appliziert (Programm \rightarrow liegender Tropfen). Anschließend wurde der Fokus der Kamera eingestellt und manuell mit der PC-Maus zwischen Tropfen und Oberfläche eine Basislinie eingezeichnet (Abb. 6). Anhand dieser Basislinie und einer Tangente am Tropfen wurde der Kontaktwinkel ermittelt.

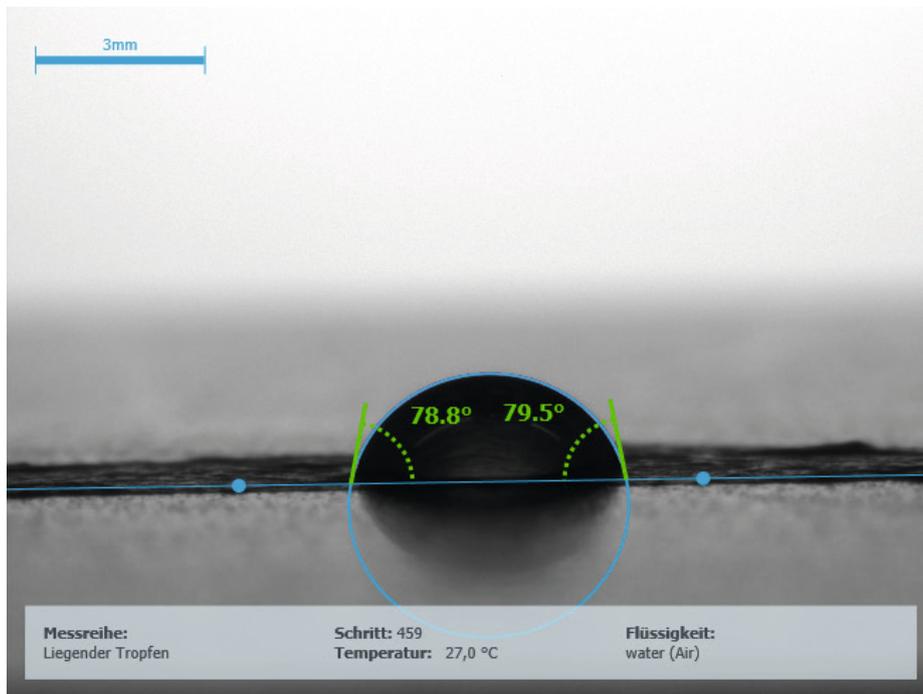


Abb.6 Aufnahme eines Tropfens bei der Bestimmung der Oberflächenspannung an einem liegenden Tropfen mit dem DSA von Krüss.

Eine isolierte Kutikularmembran von *P. laurocerasus* wurde mit einem Tropfen Wasser auf der Oberfläche eines Objektträgers fixiert und mit einer Rasierklinge geteilt. Mit der Spritze des DSA wurde ein Tropfen auf der Kutikularmembran abgesetzt und nach ein paar Sekunden Wartezeit wurde mit der Software der Kontaktwinkel anhand des Bildes dargestellt.

2.3.9 Kontaktwinkel auf inkubierten Kutikularmembranen

Für die Kontaktwinkelanalyse auf isolierten Kutikularmembranen wurden Kutikeln von *P. laurocerasus* mit einem Tropfen Wasser auf Glasobjektträgern fixiert und mit einer Rasierklinge geteilt, um eine saubere Aufnahmefläche für die Kamera des DSA zu ermöglichen. Ansonsten wurde wie in Kap. 2.3.8. beschrieben vorgegangen.

2.3.10 Oberflächenbiofilmbildung in 12-Well-Platten

Manche Bakterien sind in der Lage, unter bestimmten Bedingungen Oberflächenbiofilme an der Grenzschicht zwischen Medium und Atmosphäre auszubilden. Um diese Eigenschaft qualitativ und quantitativ zu untersuchen wurden Oberflächenbiofilme gezüchtet. Die Wells einer 12-Well-Platte wurde mit 3ml Medium (MM/KB) gefüllt und mit 10µl einer Übernacht-Flüssigkultur angeimpft. Die Platte wurde anschließend 48h bei 25°C im Brutschrank inkubiert. Da die meisten Oberflächenbiofilme sehr instabil sind und leicht reißen oder im Medium untergehen, wurde besonders auf erschütterungsarmes Arbeiten und Handhaben der Platten geachtet. Für die Quantifizierung wurde der an den Wellrändern haftende Biofilm mit 1% Kristallviolette-Lösung gefärbt. Dazu wurde wie in (O'Toole 2011) beschrieben vorgegangen.

2.3.11 Swarming

Um das swarming Verhalten der Pseudomonaden zu testen, wurden 10µl einer Übernachtskultur mittig auf eine 0,4% Agarplatte pipettiert. Die Agarplatte wurde anschließend mit dem Boden nach unten bei 25°C in einem Brutschrank inkubiert. Im Abstand von 24 Stunden wurden Bilder, auch unter UV-Licht, der Platte aufgenommen.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Nukleinsäure-Extraktion (RNA/DNA)

2.4.1.1 Isolation von genomischer DNA aus Pseudomonaden

Die Extraktion genomischer DNA erfolgte mit Hilfe des Macherey und Nagel Kits NucleoSpin® Microbial DNA. Dabei wurde wie in der Gebrauchsanweisung angegeben vorgegangen. Der Zellaufschluss erfolgte mit dem Mikro Dismembrator II, einer Kugelmühle von B. Braun. Die Elution erfolgte teilweise mit geringerem Volumen (25µl anstatt 50µl) und erhöhter Temperatur (auf 60°C vorgewärmter Elutionspuffer) um die Konzentration für anschließende molekularbiologische Reaktionen, wie Restriktionsverdauung, hoch zu halten.

2.4.1.2 Isolation von RNA aus Pseudomonaden

Die Extraktion von RNA erfolgte mit Hilfe des Macherey und Nagel Kits NucleoSpin® RNA. Dabei wurde wie in der Gebrauchsanweisung angegeben vorgegangen. Das Ausgangsmaterial aus Flüssigkulturen und von Agarplatten wurde unmittelbar nach der Ernte mit flüssigem Stickstoff schockartig eingefroren und anschließend auf Eis gekühlt, bis der erste Lysispuffer, RA1, appliziert wurde. 2µl der isolierten RNA wurden mit Hilfe eines Agarose-Gels (2%) auf ihre Reinheit und Qualität überprüft.

2.4.1.3 Isolation von Plasmid DNA aus *E. coli*

Die Extraktion von Plasmiden aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe des Macherey und Nagel Kits NucleoSpin® Plasmid. Dabei wurde wie in der Gebrauchsanweisung angegeben vorgegangen.

2.4.2 Gel Elektrophorese

Bei einer Gel Elektrophorese wird ein Gemisch aus verschiedenen großen DNA-Fragmenten mittels einer elektrischen Spannung aufgetrennt und anschließend visualisiert. Je nach zu erwartenden DNA-Fragmentgrößen wurden 1-2%ige Gele gegossen, die zuvor mit einem Tropfen (ca. 25µl) Ethidiumbromid 0,5% versetzt wurden. Die Gele wurden bei einer

Spannung von 80V und einer Stromstärke von 150mA für 45 Minuten laufen gelassen. Anschließend wurden die Gele auf einen UV-Tisch gelegt und das Ergebnis fotografisch festgehalten.

2.4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion diente der Multiplikation von DNA-Abschnitten. Mit spezifischen Primern konnten ausgewählte Regionen der bakteriellen DNA vervielfältigt und anschließend beispielweise für eine Sequenzierung verwendet werden. Über die Amplifikation eines bestimmten Abschnittes der 16sRNA mit anschließender Sequenzierung konnte eine Identifikation beziehungsweise eine phylogenetische Einordnung der verwendeten Bakterien stattfinden. Zusätzlich wurde die PCR als molekularbiologischer Nachweis für die erfolgreiche Transposonmutagenese verwendet. Da die Sequenz des Transposons bekannt ist, konnte mit spezifischen Primern eine Insertion in das bakterielle Genom nachgewiesen werden.

Tab.6 PCR-Ansatz

Komponente	Volumen [μ l]
KAPA 2G Fast 2x Ready Mix with Dye	12,5
Steriles HPLC H ₂ O	9
FP SLK 8 (c = 0,5 μ mol/ μ l)	1,25
RP SRK 1506 (c = 0,5 μ mol/ μ l)	1,25
Template	1
Gesamt Reaktionsansatz	25

Tab.7 PCR-Programm

Phase	Dauer	Temperatur
Initiale Denaturierung	3 min.	95 °C
Denaturierung		95°C
Annealing	30 Wiederholungen à 15 sek.	56°C (16s) 60°C (Kan)
Elongation		72°C
Abschließende Elongation	1 min.	72°C
Lagerung	∞	4 °C

2.4.4 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Echtzeit-PCR wurde eingesetzt um die Genexpression eines bestimmten Gens unter verschiedenen Umweltbedingungen zu untersuchen. *P. fluorescens* wurde

dazu als Schüttelkultur und als Biofilm auf Agarplatte vermehrt. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation oder durch Abkratzen des Biofilms von der Agaroberfläche. Das so erhaltene Zellmaterial wurde schnellstmöglich in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die RNA-Extraktion erfolgte wie in Kap. 2.4.1.2 beschrieben. Anschließend wurde mit Hilfe des RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit von ThermoFisher die RNA in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde wie in der Gebrauchsanweisung angegeben vorgegangen. Als Primer wurden Oligo (dT) 18 Primer verwendet. Die erhaltene DNA wurde als Template für die anschließende qPCR verwendet. Hierfür wurde das my-Budget 5x EvaGreen (R) QPCR-Mix II (ROX) Kit nach Anleitung verwendet. Als Thermocycler für die qPCR-Reaktion wurde ein StepOne™ Real-Time PCR System von Applied Biosystems™ verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle, normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe, ergibt sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

2.4.5 Herstellung elektrokompenter Zellen

Für die Herstellung elektrokompenter Zellen wurden 6ml KB-Flüssigmedium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 25°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein 500ml Erlenmeyerkolben mit 100ml KB-Flüssigmedium mit 3ml der Übernacht-Kultur angeimpft. Anschließend wurde die Kultur bei 25°C wieder auf dem Schüttler inkubiert. Um eine möglichst hohe Transformationseffizienz zu erzielen, wurden die Zellen in ihrer exponentiellen Wachstumsphase geerntet (Artiguenave *et al.*, 1997). Anschließend wurde die gesamte Kultur zu gleichen Teilen auf zwei 50ml Falcons aufgeteilt und für jeweils 30 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Bakteriensuspensionen bei 4.000rpm für 10 Minuten zentrifugiert (4°C) und die Überstände verworfen. Danach wurden zwei Waschschriffe mit 50ml eisgekühltem, sterilem Wasser durchgeführt. Anschließend wurde jedes Pellet in 25ml sterilem Wasser resuspendiert und in einem 50ml Falcon zusammengeführt. Nach erneutem Zentrifugieren wurden das Zellpellet nun in 250µl sterilem Glycerin (10%) resuspendiert und jeweils 50µl der Suspension auf fünf 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Für eine spätere Verwendung wurden die kompetenten Zellen im -80°C Schrank eingefroren.

2.4.6 Transformation von Pseudomonaden

Die Transformation der Pseudomonaden erfolgte mit dem EZ-Tn5™ <KAN-2>Tnp Transposome™ Kit von Epicentre® nach Protokoll des Herstellers. Als Elektroporator wurde

der Gene Pulser von BIO-RAD verwendet. 50µl elektrokompetente *Pseudomonas* Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit 1µl des Tn5-Transposom und 1µl Endonuklease-Inhibitor gemischt. Dieser Transformationsansatz wurde weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,1cm gap) überführt. Der Puls erfolgte mit 2,5kV bei einem eingestellten Widerstand von 200 Ohm und einer Kapazität von 25µF. Unmittelbar danach wurde 1ml SOC-Medium zugegeben. Der Transformationsansatz wurde in einem Schnappdeckelröhrchen bei 30°C und 150rpm für eine Stunde inkubiert. Verschiedene Volumina des Transformationsansatzes (20-50-100µl) wurden auf MM-Kanamycin-Agarplatten ausplattiert und die Platten bis zum Erscheinen von Kolonien (2Tage) bei 25°C bebrütet. Ein Minimal-Medium wurde verwendet um Stoffwechselmutanten von vorneherein auszuschließen.

2.4.7 Selektion und Screening auf fehlende Biotensid-Produktion „Atomized Oil Assay“

Im Anschluss an die Transformation wurden jene Mutanten gesucht, die in ihrer Fähigkeit, Biotensid zu produzieren, eingeschränkt waren. Eine Methode, um qualitativ und semi-quantitativ das Vorhandensein von Biotensiden zu detektieren, ist der Atomized Oil Assay (Burch *et al.*, 2010). Dabei wird mit einem Airbrush-System ein leichter Nebel einer hydrophoben Flüssigkeit (Dodecan) auf die zu untersuchende Agarplatte gesprüht. Wenn die Bakterien ein Biotensid produzieren, wird ein heller Hof (Halo) um die Kolonie sichtbar. Wenn die Biotensidproduktion beeinträchtigt ist, entsteht ein Hof mit einem kleineren Radius. Wenn das Bakterium nicht mehr in der Lage ist, ein Tensid zu produzieren, ist kein Hof zu erkennen. Unter sterilen Bedingungen wurden Positive, gegen Kanamycin resistente Mutanten mit einer normalen Wachstumsgeschwindigkeit mit einem sterilen Zahnstocher „gepickt“ und auf eine quadratische MM Agarplatte übertragen. Die Mutanten wurden dabei in einem Schachbrettmuster aufgetragen, sodass jeweils 2cm zu jeder Seite der Kolonie frei waren. Auf jede Platte wurden 24 zu testende Klone und eine Kontrolle aufgetragen (5x5 Kolonien, Abb.7). Als Kontrolle wurde ein Doppel-Knock-Out Mutant von *P. syringae* verwendet, der nachweislich keine Biotenside mehr produziert und daher nach einem Atomized Oil Assay keinen Hof aufweist. Die Platten wurden bei 25°C für 48 Stunden inkubiert und anschließend mit Dodecan besprüht. Mutanten mit einem stark reduzierten oder fehlenden Hof wurden erneut gepickt und mit dem 3 Ösen ausstrichverfahren auf KB-Platten aufgetragen.

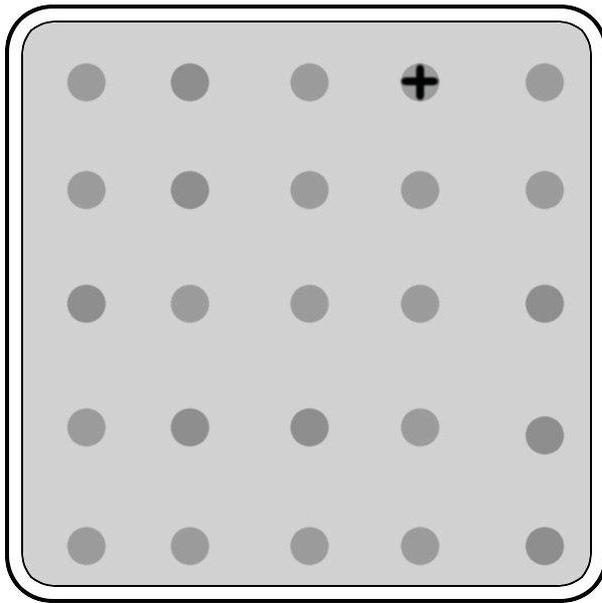


Abb.7 Quadratische Agarplatte zur Selektion mit dem Atomised Oil Assay.

Die Klone wurden im Abstand von ca. 2cm aufgetragen. Eine Positivkontrolle für fehlende Biotensidproduktion (dKO von *P. syringae*) wurde mit etwas Abstand zu einer Ecke auf jede Platte geimpft.

2.4.8 Identifikation der betroffenen Gene

2.4.8.1 Hitzetransformation von *Escherichia coli* („Heat shock method“)

Die Transformation von *E. coli* wurde nach der Hitzeschock- Methode durchgeführt (Hahnahan *et al.*, 1991). Chemisch kompetente *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut und 50µl der Zellsuspension mit 5µl Ligationsansatz oder 2µl Plasmid-DNA gemischt und für weitere 20 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C für 42 Sekunden mit anschließender Abkühlung auf Eis für 5 Minuten. Der Transformationsansatz wurde dann mit 1ml SOC-Medium gemischt und eine Stunde bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. 100µl der transformierten Zellen wurden auf dem entsprechenden Selektivmedium ausplattiert und bis zum Erscheinen von Kolonien bei 37°C inkubiert.

2.4.8.2 Restriktionsverdau

Der Reaktionsansatz wurde auf Eis zusammen pipettiert und anschließend bei 37°C für 1 Stunde inkubiert.

Tab.8 Restriktionsverdau-Ansatz

Komponente	Volumen [µl]
DNA 10-100ng/µl	5
Cut Smart Puffer	5
KpnI oder SacI oder EcoRI	1
Steriles HPLC-Wasser	39
Gesamter Ansatz	50

2.4.8.3 Dephosphorylierung

Um die Religation von linearisierten Vektoren zu verhindern wurden die geschnittenen Plasmide dephosphoryliert. Dies erfolgte mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP). Hierzu wurde nach erfolgtem Restriktionsverdau 1U CIP direkt in den Restriktionsansatz gegeben und dieser für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch rasches Einfrieren gestoppt. Der Reaktionsansatz wurde mit einem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit aufgereinigt. 4µl dieses Ansatzes wurden mit Ladepuffer gemischt und zur Kontrolle auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

2.4.8.4 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten und linearisierter Plasmid-DNA erfolgte in einem Reaktionsansatz mit 1µl T4-Ligase und 2µl 10x T4-Ligasepuffer, 100ng dephosphorylierter Vektor-DNA und der fünffachen molaren Menge Insert-DNA in einem Gesamtvolumen von 25µl. Der Ligationansatz wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Um den Ligationserfolg zu kontrollieren, wurden Teile der Proben mit Ladepuffer gemischt und auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

2.4.8.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung des Plasmids erfolgte durch die Firma Eurofins Genomic. Die Ergebnisse der Sequenzierungen wurden via E-Mail in verschiedenen Formaten und mit Zusatzinformationen zur Sequenzgenauigkeit zugesandt.

2.4.8.6 Blast-Basic Local Alignment Search Tool

Die zusammengefügte Teile der Gensequenz vor und hinter der Transposonsequenz wurden mit Hilfe von BLAST mit einer großen Datenbank an Pseudomonaden abgeglichen. Dazu wurde bei den Auswahlkriterien „Choose search Set“ → „Organism“ → Pseudomonadales (taxid:72274) ausgewählt.

2.5 Analytische Methoden

2.5.1 Wachsextraktion und Probenvorbereitung

Für die Gesamtwachsextraktion wurden jeweils 3 Kutikularmembranen aus den Wachsabbauxperimenten aus ihren Erlenmeyerkolben in 6ml Analyse-Gläschen überführt. Die Kutikularmembranen wurden mit deionisiertem Wasser für 1 Stunde auf der Rollbank gewaschen um überschüssiges Medium und eventuell anhaftende Bakterien zu entfer-

nen. Anschließend wurden die Kutikularmembranen auf Teflonplättchen überführt, getrocknet und gewogen. Jeweils 3 Kutikularmembranen aus einem Ansatz wurden in einem gewaschenen Analysegläschen in 4ml Chloroform für 1 Stunde auf der Rollbank inkubiert. Anschließend wurden die Kutikularmembranen erneut getrocknet und gewogen. Damit eine quantitative Bestimmung erfolgen konnte, wurde allen Wachsextraktionen 100µl eines C-24 Alkan Standards (10mg/50ml) zugefügt. Das Chloroform mit dem gelösten Gesamtwachs wurde in ein kleines Glas-Reaktionsgefäß überführt und auf ca. 250µl eingedampft. Um reaktive funktionelle Gruppen zu maskieren und damit Wechselwirkungen zwischen den Probenbestandteilen untereinander und mit der Säule des Gaschromatographen zu minimieren, wurden die Proben mit BSTFA und wasserfreiem Pyridin derivatisiert. Die Gesamtwachsextraktionen wurden dazu jeweils mit 20µl BSTFA und 20µl wasserfreiem Pyridin zusammen gevortext und bei 70°C für 45 Minuten in einem Heizblock inkubiert. Nach der Derivatisierung wurden die Proben in Analyse-Glasgefäße überführt, verschlossen und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.5.2 Gaschromatographie (GC)

Bei Gesamtwachsextrakten handelt es sich um ein Substanzgemisch aus verschiedenen Alkanen, Säuren, Alkoholen und Triterpenen. Um diese Stoffe aufzutrennen und getrennt voneinander quantitativ zu erfassen, werden die Proben zunächst verdampft, um dann mit Wasserstoff (H₂) als Trägergas (mobile Phase, 2ml/min) durch eine Gaschromatographiesäule (stationäre Phase) geleitet. Die Auftrennung erfolgt dabei nach der Größe und Polarität der einzelnen Stoffe. Verwendet wurde ein 6890N Gaschromatograph von Agilent mit einer Kapillarsäule (DB-1, 30m x 0,32mm; 0,1µm (J&W)). Die Detektion und Quantifizierung der einzelnen Substanzen erfolgte durch einen Flammen- Ionisations-Detektor (FID). Die nacheinander am Detektor ankommenden Verbindungen werden zusammen mit dem Trägergas zu CO₂ und H₂O verbrannt (oxidiert). Dabei frei werdende Elektronen werden abgefangen und beeinflussen eine am Detektor angelegte Spannung, was als Signal wahrgenommen wird.

Tab.9 GC-Programm**Protokoll zur Analyse der Wachse**

Injektion	bei 50 °C
2 min	bei 50 °C
40 °C/min	bis auf 200 °C
2 min Erhaltung	bei 200 °C
Erhöhung um 3 °C/min	auf 310 °C
30 min	bei 310 °C

2.5.3 Massenspektroskopie (MS)

Die Identifikation der einzelnen Komponenten der Gesamtwachsextraktion erfolgte durch einen Gaschromatographen mit nachgeschaltetem Massenspektrometer (MS). Die unterschiedlichen Substanzen werden bei ihrer Passage mit Helium als Trägergas (H₂) durch die Chromatographiesäule (DB-1MS, 30m x 0,32mm; 0,1µm (J&W)) nach ihrer Größe und Polarität aufgetrennt. Nach dem Eintritt in das Massenspektrometer (5973 MS, Agilent, Deutschland) werden die Probenbestandteile durch Elektronenbeschuss ionisiert. Die dabei entstehenden, ionisierten Moleküle sind instabil und zerfallen nach charakteristischen Fragmentierungsmustern. Diese Fragmente werden in einem Quadrupol-Magnetfeld beschleunigt und nach ihrem Masse: Ladungs-Verhältnis aufgetrennt und detektiert.

2.5.4 Statistische Auswertung und Interpretation der analytischen Daten

Die Chromatogramme der Wachsenanalysen wurden mit Hilfe der Software GC-Chemstation (Hewlett Packard Corporation, USA) ausgewertet. Die in den GC-MS-Chromatogrammen identifizierten Substanzen wurden durch die grobe Deckungsgleiche der Läufe den Peaks der GC-FID-Chromatogrammen zugeordnet. Diese Peaks wurden integriert und anhand ihrer Flächen wurden die Stoffmengen der einzelnen Substanzen anhand Formel 1 berechnet.

Formel 1: Substanzkonzentration

$$\frac{\mu\text{g}}{\text{cm}^2} = \frac{\text{PX} \times \text{MS}}{\text{PS} \times \text{FC}}$$

2.5.5 Extraktion von Biotensiden

Für die Extraktion von Biotensiden wurden die Bakterien wie in MM.2.3.1.2 beschrieben

angezogen, jedoch wurden die gewonnenen Zellsuspensionen (5 Platten mit 5ml H₂O gewaschen) nicht auf eine OD₆₀₀ von 1 runterverdünnt, sondern als Ganzes in ein 50ml Falcon überführt. Anschließend wurden 25ml Ethylacetat hinzugegeben und das Falcon mehrere Minuten gevortext. Durch eine anschließende Zentrifugation bei 1.000rpm für 10 Minuten wurde eine Phasentrennung beschleunigt. Danach wurde die organische Phase mit einer Glaspipette abgenommen und in ein Glasfläschchen überführt. Der Inhalt wurde unter einem konstanten Zulauf von Stickstoff eingedampft und in 5ml Ethanol aufgenommen und sterilfiltriert. Die Lösung wurde erneut eingedampft und gewogen. Mit dem Extrakt konnten definierte Stammlösungen hergestellt werden, welche in der LC-MS/MS Analyse (2.5.6) und der CMC-Bestimmung verwendet wurde.

2.5.6 Lc-MS/MS

Die massenspektrometrische Analyse der extrahierten Biotensiede erfolgte am Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften (IEL) der Universität Bonn in der Arbeitsgruppe für Bioanalytik von Prof. Wüst. Als Massenspektrometer kam ein SCIEX Triple Quad™ 4500 LC-MS/MS mit Elektrosprayionisationsquelle (ESI) zum Einsatz. Die Proben (5µg/ml) wurden erst durch eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie aufgetrennt und anschließend durch eine Elektrosprayionisation verdampft und geladen. Die entstandenen Ionen werden anschließend in einem Triple Quad MS/MS anhand ihres Masse/Ladungs Verhältnisses aufgetrennt und detektiert. Die ESI-Quelle wurde im negativen Modus und im m/z-Bereich von 1000 – 1200 betrieben.

2.6 Pflanzenphysiologische Methoden

2.6.1 Isolation von Kutikularmembranen von *Prunus laurocerasus*

Kutikularmembranen von *Prunus laurocerasus* dienten in vielen Versuchen als Surrogat der Blattoberfläche beziehungsweise als Substratum für Bakterien, oder waren selbst Gegenstand von Transpirationmessungen. Da aufgrund der artspezifischen Stomataverteilung ausschließlich Kutikeln der Oberseite der Blätter für Transpirationmessungen verwendet werden, wurden die gesammelten Blätter (2.2.4) auf der abaxialen Seite mit Edding markiert. Anschließend wurden mit Korkbohrern Scheiben mit einem Radius von 1cm (Ø 2cm) ausgestanzt. Diese wurden zusammen mit Enzymlösung (2.1) in einem 500ml Erlenmeyerkolben vakuumfiltriert, mit Parafilm verschlossen und bei RT für 24 Stunden inkubiert. Die Enzymlösung wurde am Anfang täglich, später alle 2-3 Tage ge-

wechselt, bis sich die Kutikeln - nach leichtem Schwenken - von selber von allen Blattresten ablösen. Saubere adaxiale Kutikeln wurden in Boraxpuffer überführt, abaxiale Kutikeln verworfen. Der Boraxpuffer wurde nach 2, 4 und 6 Tagen gewechselt. Anschließend wurden die entfärbten Kutikeln für 24 in demineralisiertem H₂O inkubiert. Zur Trocknung wurden die Kutikeln auf Teflonplättchen überführt und mit einem schwachen Luftstrom geglättet. Nach der Trocknung wurden die Kutikeln mindestens 6 Wochen in Plastikpetrisschalen aufbewahrt und erst anschließend für Experimente verwendet.

2.6.2.1 Transpirationsmessung im Kammersystem

Um den möglichen Einfluss von Bakteriensuspensionen oder bakteriellen Biotensiden auf die Wasserpermeabilität von isolierten Kutikularmembranen zu testen, wurden gravimetrische Transpirationsmessungen durchgeführt (Schönherr und Lenzian 1981). In ein auf einer Seite offenes Einkammersystem aus Edelstahl (Abb. 8) wurden 800µl Wasser gefüllt, eine Kutikularmembran eingespannt und mit Hilfe von PTFE-Paste an den Rändern abgedichtet. Die physiologische Innenseite der Kutikel zeigt dabei nach innen zu dem mit Wasser gefüllten Kammerkompartiment. Diese Transpirationskammern werden anschließend in eine Plastikbox gestellt und für 24 Stunden equilibriert. Die relative Luftfeuchtigkeit in der Plastikbox wurde mit einem Glycerin-Wasser-Gemisch eingestellt. Die Kammern wurden 3-4 Tage nacheinander und jeweils um die gleiche Uhrzeit mit der Feinwaage gewogen. Nun wurde wahlweise eine Bakteriensuspension oder ein bakterielles Biotensid auf die Kutikula appliziert und über Nacht eintrocknen gelassen. Anschließend wurden die Kammern erneut mehrere Tage in Folge gewogen.

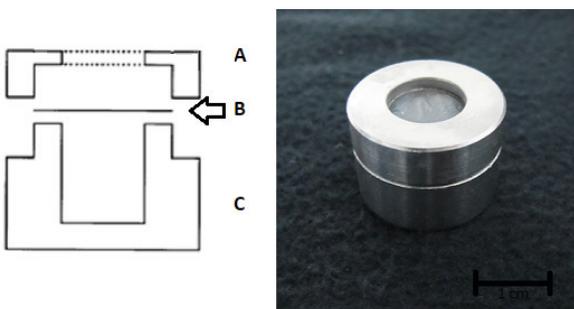


Abb.8 Transpirationskammer aus Edelstahl für Transpirationsexperimente und die Überlebensrate von Bakterien (2.6.3).

Für Transpirationsexperimente wurden Kutikularmembranen jeweils in mit 800µl Wasser gefüllte Transpirationskammern eingespannt und mit PTFE-Paste abgedichtet. Für Experimente zu der Überlebensrate von Pseudomonaden wur-

den die Kammern mit flüssigem Agarmedium befüllt, mit einer Kutikularmembran abgedeckt und geschlossen. Nach Abkühlung des Agars konnte die Oberfläche beimpft werden.

2.6.2.2 Auswertung von Transpirationsmessungen

Die mathematische Auswertung der Transpirationsexperimente erfolgte mit Excel, die grafische Auswertung erfolgte mit SigmaPlot. Der Permeabilitätskoeffizient **P** in m/s für Wasser wurde mit Formel 2 berechnet. **F** stellt den Wasserfluss über die Kutikularmem-

bran in g/s dar, **A** ist die Fläche in m² und **ΔC** ist der Unterschied zwischen den Wasserkonzentrationen innerhalb der Kammern und außerhalb in der Inkubationskammer. Der Effekt wurde nach Formel 3 berechnet und beschreibt die Veränderung der Permeabilität nach einer Behandlung der Kutikularmembranen.

Formel 2: Permeabilitätskoeffizient

$$P = \frac{F}{A \times \Delta C}$$

Formel 3: Effekt

$$\text{Effekt} = \frac{P_2}{P_1}$$

2.6.3 Überlebensrate auf Kutikularmembranen (ATP-Messung)

Um zu untersuchen, ob Biotenside einen direkten Einfluss auf die Überlebensrate von Bakterien auf Blattoberflächen haben, wurden „künstliche Blätter“ (siehe unten) mit dem Wildtyp von *P. fluorescens* und dem biotensid-defizienten Mutanten inokuliert. Die Überlebensraten wurden nach verschiedenen Inkubationszeiten (Tage) indirekt über die Menge an ATP bestimmt. Transpirationskammern (siehe 2.6.2.1) wurden dazu mit Nährmedien unterschiedlicher Glycerinkonzentrationen befüllt und anschließend mit einer Kutikularmembran verschlossen („künstliche Blätter“). 20µl der Bakteriensuspensionen (OD₆₀₀=0,05) wurden als einzelne Tropfen auf das Zentrum einer Kutikel appliziert. Die Tropfen wurde 1-2 Stunden unter der Sterilbank eingetrocknet, danach wurden unmittelbar die ersten Proben genommen (Zeitpunkt=0). Mit einer sterilen Kanüle wurden die Kutikeln ausgeschnitten und in einzelne 1,5ml Reaktionsgefäße mit 200µl HPLC Wasser überführt. Die Proben wurden 5 Minuten in einem Ultraschallwasserbad sonifiziert und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben der verschiedenen Messzeitpunkte wurden zusammen bei -80°C gelagert. Am letzten Tag der Versuchsreihe wurden alle Proben zusammen aufgetaut, erneut 5 Minuten sonifiziert und bei -80°C eingefroren. Nach erneutem auftauen auf Eis wurden jeweils 100µl der einzelnen Proben für das BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay eingesetzt. Dabei wurde wie in der Gebrauchsanweisung angegeben vorgegangen. Da es sich um ein enzymatisches Assay handelt und die Enzymaktivität von Lagerung und Alter der verwendeten Lösungen abhängt, wurde zu Beginn jeder Messreihe eine ATP-Standardkurve mit 10⁻¹⁰ -10⁻¹⁶mol ATP angefertigt und mit den gemessenen relativen Lichteinheiten (**Relative Light Units**) verglichen.

3. Ergebnisse

3.1 Mutagenese und Screening

Mit Hilfe des EZ::TNTM<KAN-2> Transposome™ Kits der Firma EPICENTRE wurden Transposonmutanten verschiedener Pseudomonaden hergestellt. Das Transposom, ein Konstrukt aus Transposon und Transposase wurde mittels Elektroporation in die Zellen eingeschleust. Die elektroporierten Zellen wurden auf Minimal-Medium-Agar, in welchem das Antibiotikum Kanamycin enthalten war, ausgestrichen und inkubiert. Durch eine in dem Transposon kodierte Kanamycin-Resistenz konnten erfolgreich transformierte Mutanten selektiert werden. Positive Mutanten wurden auf quadratischen Agarplatten überführt und anschließend mit dem Atomised Oil Assay auf eine veränderte Biotensidproduktion untersucht (Abb.9). Nach der Applikation des Dodecan-Nebels wurden verschieden große Höfe um die Kolonien sichtbar. Die Negativkontrolle hatte keinen erkennbaren Hof und war im Gegensatz zu den anderen Kolonien glänzend schleimig und nicht matt. Zusätzlich wurde mit zufällig ausgewählten Mutanten eine Kolonie-PCR mit den Primern Kan-F und Kan-R (Tab.5) durchgeführt. Bei der Positivkontrolle sowie bei allen Mutanten ist auf Höhe von 1200bp eine deutliche Bande zu sehen (Abb.9).

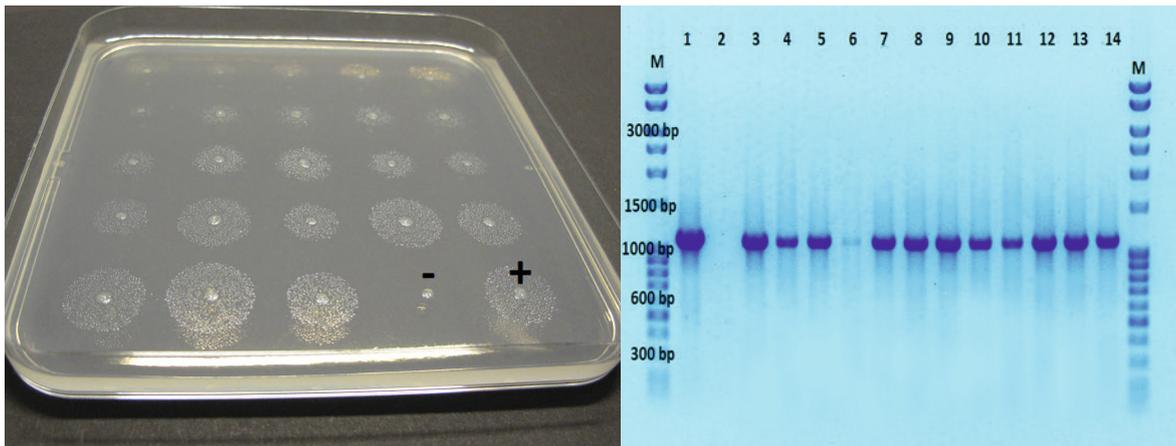


Abb.9 Links: Quadratische Agarplatte.

Quadratische Agarplatte mit 23 unterschiedlichen Transposonmutanten von *P. fluorescens*, einer Negativkontrolle (-, *P. syringae* dKo) ohne Tensidhof und einer Positivkontrolle (+, *P. fluorescens* Wildtyp).

Rechts: UV-Lichtaufnahme eines mit EtBr gefärbten Agarose-Gels.

Die erste Tasche wurde mit einer Positivkontrolle beladen (Template: *Rhodococcus equi* Δ KasA), die zweite Tasche wurde mit einer Negativkontrolle beladen (Template: *P. fluorescens* Wildtyp), Taschen 3-14 wurden mit Kolonie-PCR Ansätzen beladen.

Für das Bakterium *Pseudomonas fluorescens* SBW 25 wurden ca. 1100 Mutanten mit dem Atomised Oil Assay untersucht. Davon wiesen vier Mutanten einen deutlich verkleinerten oder keinen Hof auf. Diese fünf Mutanten wurden anschließend auf ihre Biotensidproduktion untersucht, indem die Oberflächenspannung der jeweiligen Kulturüberstände mit dem DSA 25 von Krüss ermittelt wurden (Abb.10). Die Oberflächenspannung (OFS) der Agar-Kontrolle lag bei 70,3nN/m. Die OFS des Wildtyps lag bei 27.3nN/m. Die Oberflächenspannungen der getesteten Mutanten lagen zwischen 31 und 69.7nN/m. Der Mutant R8K1 wurde daraufhin für die weiteren Versuche als Mutant genutzt.

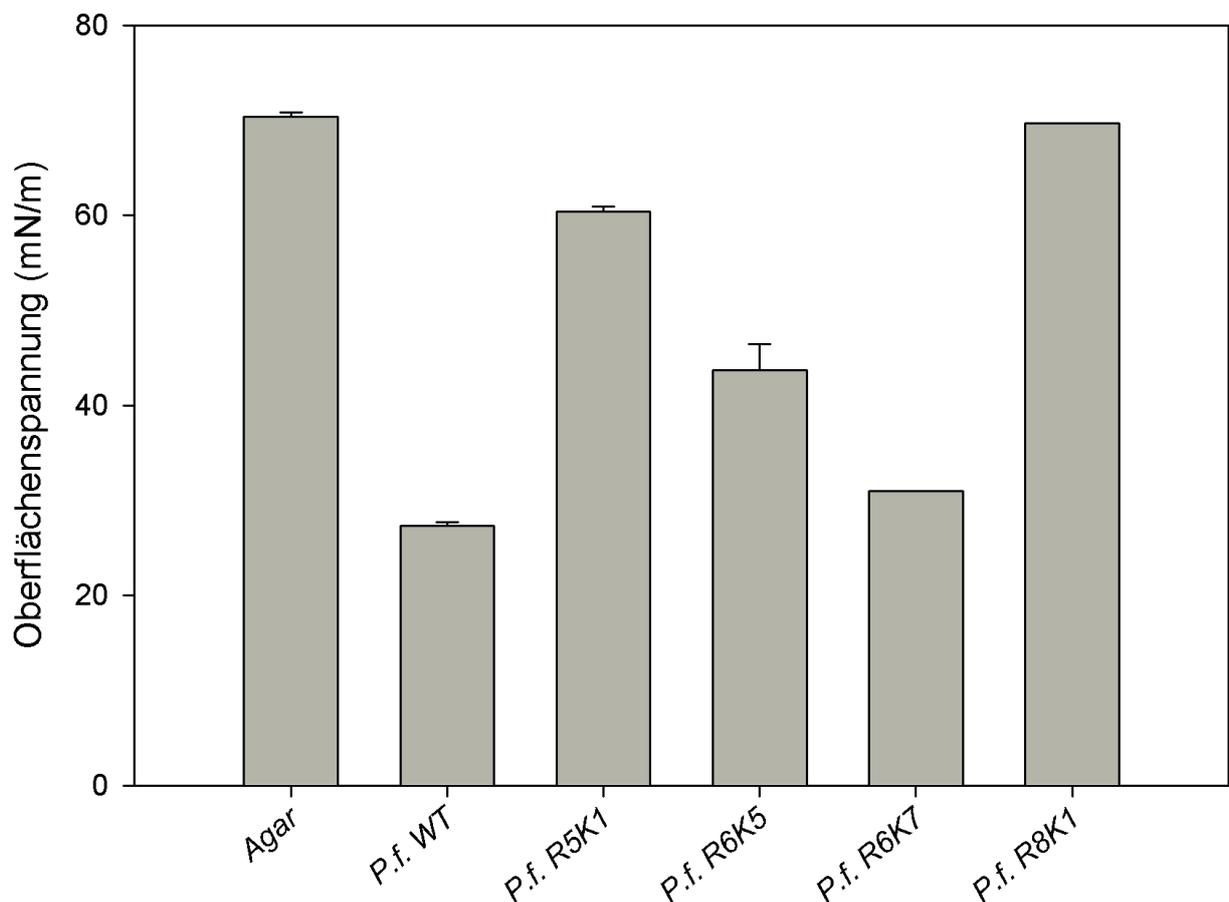


Abb.10 Oberflächenspannung von Kulturüberständen.

Oberflächenspannung von Kulturüberständen von *P. fluorescense* Wildtyp und Transposonmutanten mit verändertem Hof, als Negativkontrolle wurden unbesiedelte Agarplatten abgewaschen. Alle Ergebnisse sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten.

3.1.1 Identifikation und Datenbankanalyse

Die Identifikation der durch die Transposonmutagenese ausgeschalteten Gene erfolgte mit Hilfe der durch das Transposon vermittelten Antibiotikaresistenz. Die genomische DNA der Transposonmutanten wurde isoliert und in unterschiedlichen Ansätzen mit jeweils

einem Restriktionsenzym (KpnI, SacI oder EcoRI) fragmentiert. Bei der Auswahl der Restriktionsenzyme wurde darauf geachtet, dass relativ wenig spezifische Restriktionsstellen in dem Chromosom selber und keine einzige Restriktionsstelle innerhalb des Transposon vorhanden ist. Statistisch gesehen erhält man auf diese Weise ca. 1000-5000bp (Virtueller Restriktionsverdau mit Geneious®) große Fragmente, die in einem anderen Ansatz in den Klonierungsvektor pUC19 kloniert wurden. Die relegierten Vektoren wurden mittels Wärmeschocktransformation in *E. coli* Dh5 α transformiert (MM 2.4.8.1).

Nur jene Klone, in die ein Vektor mit Transposon (und Stücken des gesuchten Gens) transformiert wurde, konnten durch die vermittelte Resistenz auf Agarplatten mit Kanamycin wachsen. Diese Klone wurden vermehrt, das Plasmid isoliert und anschließend sequenziert (2.4.8.5). Die das Transposon flankierenden Regionen wurden zusammengefügt und nach einer Sangersequenzierung mit BLAST untersucht. Die gewonnenen Sequenzen waren bei *P. fluorescens* SBW25 180bp, bei *P. cedrina* 1000bp, bei *P. lurida* 760bp und bei *P. poae* 870bp lang. Die BLAST Analysen (2.4.8.5) der gewonnenen Sequenzen ergaben im Falle von *P. fluorescens* SBW25 eine 100% Homologie zu dem Gen *viscB* (PFLU 2552). Das Gen *viscB* bildet zusammen mit *viscA* und *viscC* einen Gen-Cluster, der eine nichtribosomale Peptidsynthase kodiert. Die Gensequenz von *P. cedrina* hatte eine 84% Übereinstimmung mit *viscB* und eine 99% Homologie zu einer nicht näher charakterisierten nichtribosomalen Peptidsynthase von *P. orientalis* F9. Die Gensequenz, die aus den positiven Klonen von *P. poae* gewonnen werden konnte, hatten eine 100% Homologie zu dem Massetolide A Biosynthese Gen-Cluster von *Pseudomonas fluorescens* SS101. Die Sequenz aus den positiven Klonen von *P. lurida* konnte keiner nichtribosomalen Peptidsynthase zugeordnet werden, sondern war 100% homolog zu einem Gen aus der *lysR*-Genregulator-Familie von *P. fluorescens* A506.

3.2 Vergleichende Untersuchungen zwischen Wildtypen und Mutanten

3.2.1 Wachstumseigenschaften im Komplexmedium

Um physiologische Unterschiede zwischen den Wildtypen und den Mutanten zu erkennen, wurden ihre Wachstumsgeschwindigkeiten in Komplex- und Minimal-Medium untersucht. Als Maß für die metabolische Fitness diente dabei die Verdopplungszeit (T_d) der Bakterien. Schüttelkulturen in 500ml Erlenmeyerkolben wurden dafür inkubiert und in

regelmäßigen Abständen wurden Proben genommen und photometrisch untersucht (2.3.2). Nach 48 Stunden Inkubation bei 25°C zeigten die Kulturen der Wildtypen alle eine deutliche Schaumbildung, die auch noch nach Minuten zu sehen war. Auf den Kulturen der Biotensidmutanten war deutlich weniger Schaum sichtbar, auch kollabierte dieser innerhalb von Sekunden (Abb.11).

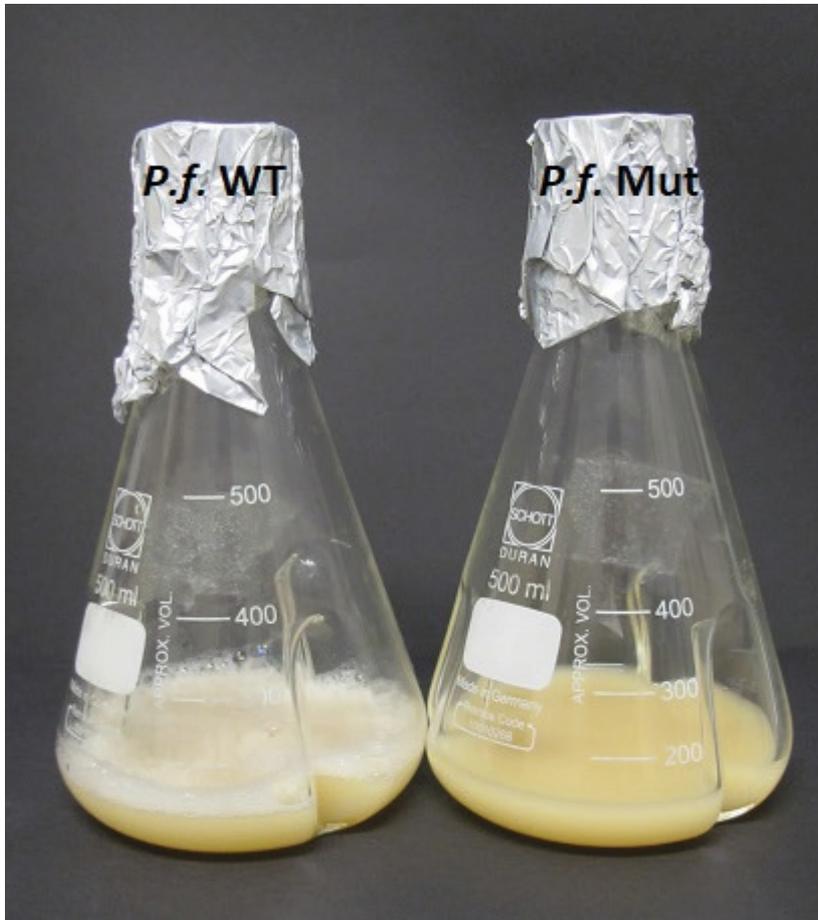


Abb.11 KB-Kulturen von *P. fluorescens* nach 48 Stunden Inkubation bei 25°C und 150rpm.

(A) Der Wildtype zeigt starkes schaumverhalten welches der Biotensid knockout Mutante (B) fehlt.

Exemplarisch ist die Wachstumskurve von *Pseudomonas fluorescens* SBW25 und dem korrespondierenden Biotensidmutanten in KB-Komplex-Medium zu sehen (Abb.12). Nach einer lag-Phase von ca. 5 Stunden begannen die Kulturen schnell zu wachsen und hatten nach 10 Stunden eine OD_{600} von 2 erreicht. Innerhalb der nächsten 6 Stunden konnte ein schnelles exponentielles Wachstum der Kulturen gemessen werden. Nach ca. 18 Stunden erreichten alle Kulturen von *P. fluorescens* die stationäre Phase. Aus den in der exponentiellen Phase gemessenen Werten wurde anschließend die Verdopplungszeit T_d berechnet.

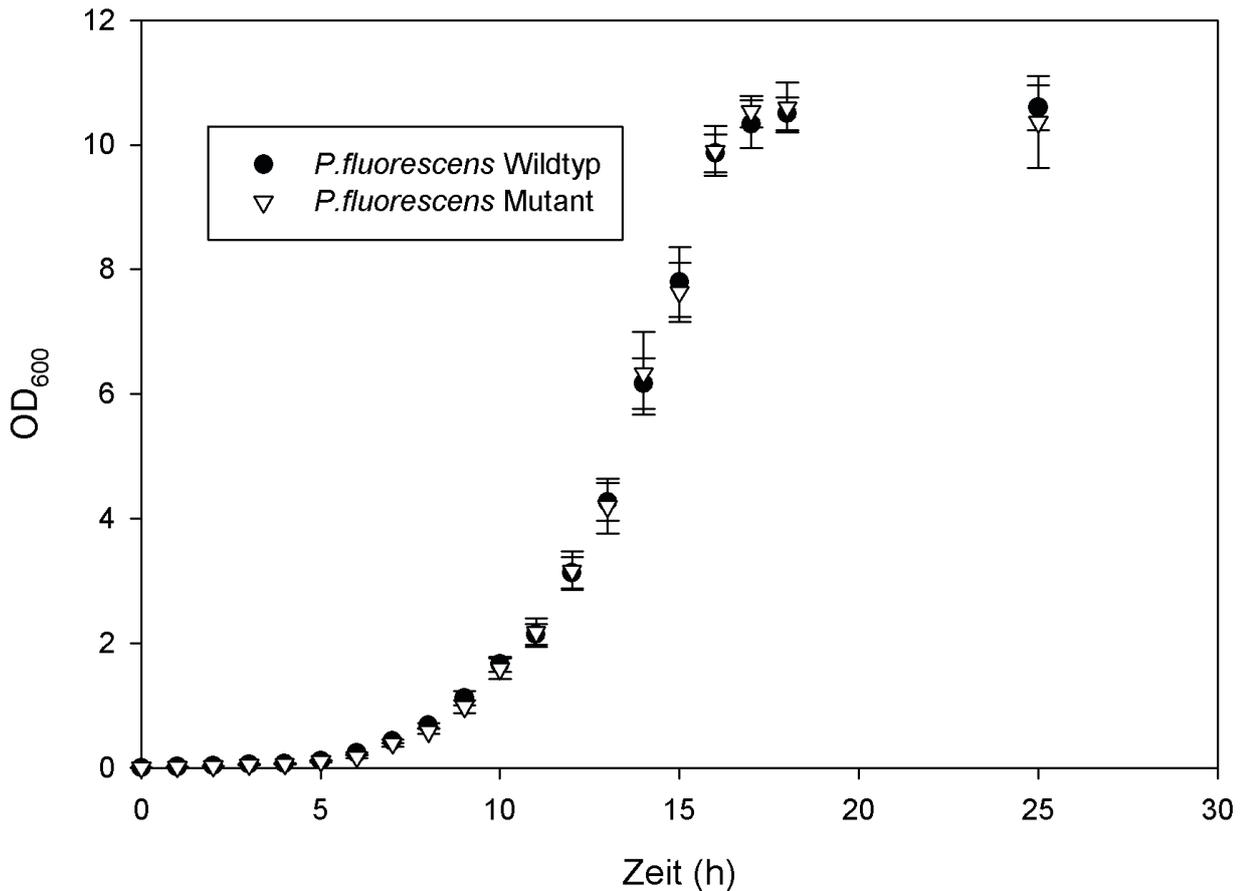


Abb.12 Wachstumskurve von *P. fluorescens* und Biotensidmutant in KB-Komplex-Medium.

Wachstum von *P. fluorescens* und Biotensidmutant in KB-Komplex-Medium bei 25°C und 150rpm. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standard Abweichungen von drei biologischen Replikaten.

Alle Wildtypen und ihre Mutanten hatten jeweils eine vergleichbare Verdopplungszeit. Der Wildtyp von *P. fluorescens* hatte eine Verdopplungszeit von 79min ±9min, der Mutant eine von 96min ±8min. Der Wildtyp von *P. cedrina* hatte eine Verdopplungszeit von 175min ±29min, der Mutant 192min ±22min. Die Td des Wildtyps von *P. lurida* wurde mit 180min ±24min berechnet, die des Mutanten lag bei 188min ±30min. Der Wildtyp von *P. poae* war mit einer Verdopplungszeit von 74min ±8min der am schnellsten wachsende Organismus, der Mutant lag mit 79min ± 3min gleichauf mit dem Wildtypen von *P. fluorescens* (Abb.13).

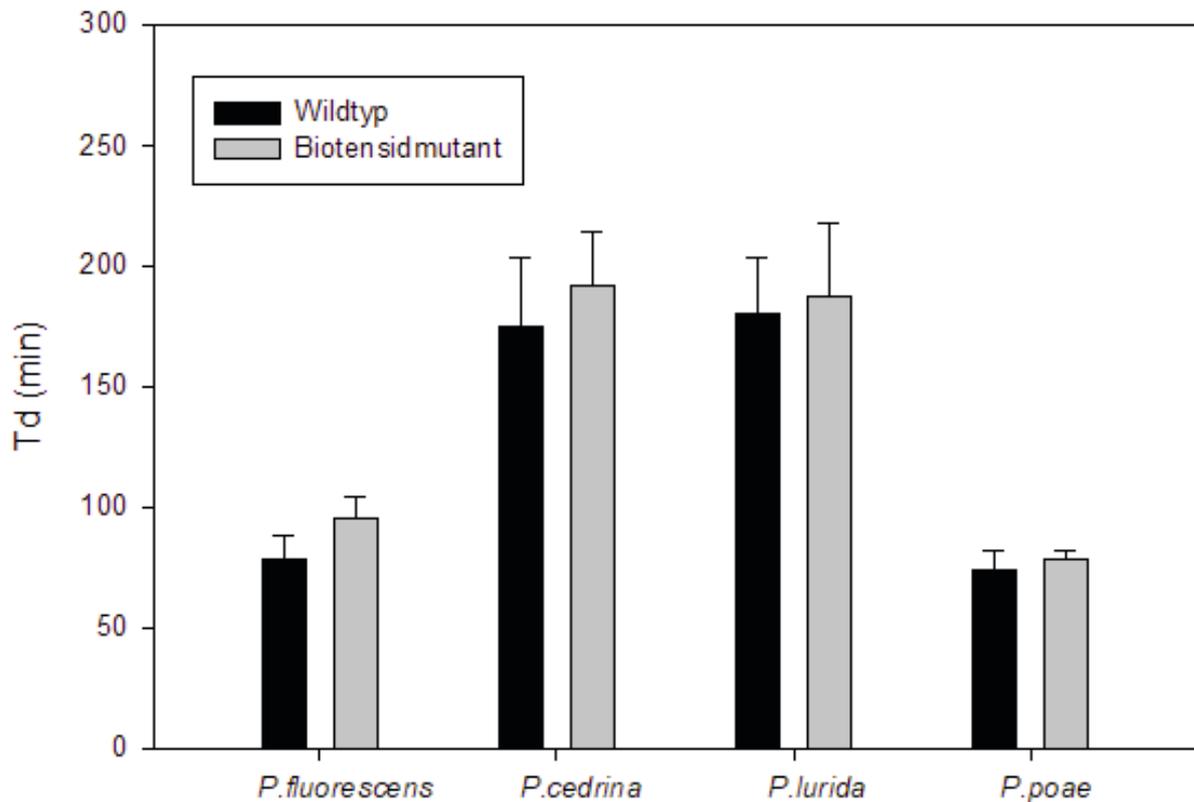


Abb.13 Verdopplungszeiten der vier Wildtypen und ihrer Biotensidmutanten.

Verdopplungszeit der vier Pseudomonaden und ihrer Biotensidmutanten in KB-Komplexmedium. Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Messungen.

3.2.2 Wachstumseigenschaften in Minimal-Medium und Glucose

Die Wachstumseigenschaften der Pseudomonaden wurden auch in Minimal-Medium mit Glucose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle untersucht. Exemplarisch ist die Wachstumskurve von *P. fluorescens* SWB 25 und dem dazugehörigen Biotensidmutanten gezeigt (Abb.14). Die lag-Phase war nach 4 Stunden vorüber und ein deutliches Wachstum war in allen Kulturen zu messen. Nach 9 Stunden befanden sich alle Kulturen im Bereich einer optischen Dichte (OD_{600}) von 1. Zwischen 10 und 13 Stunden ist bei allen Kulturen das stärkste Wachstum zu verzeichnen. Die stationäre Phase ist bei allen Kulturen nach ca. 18 Stunden erreicht und lag bei einer OD_{ww} von 3.

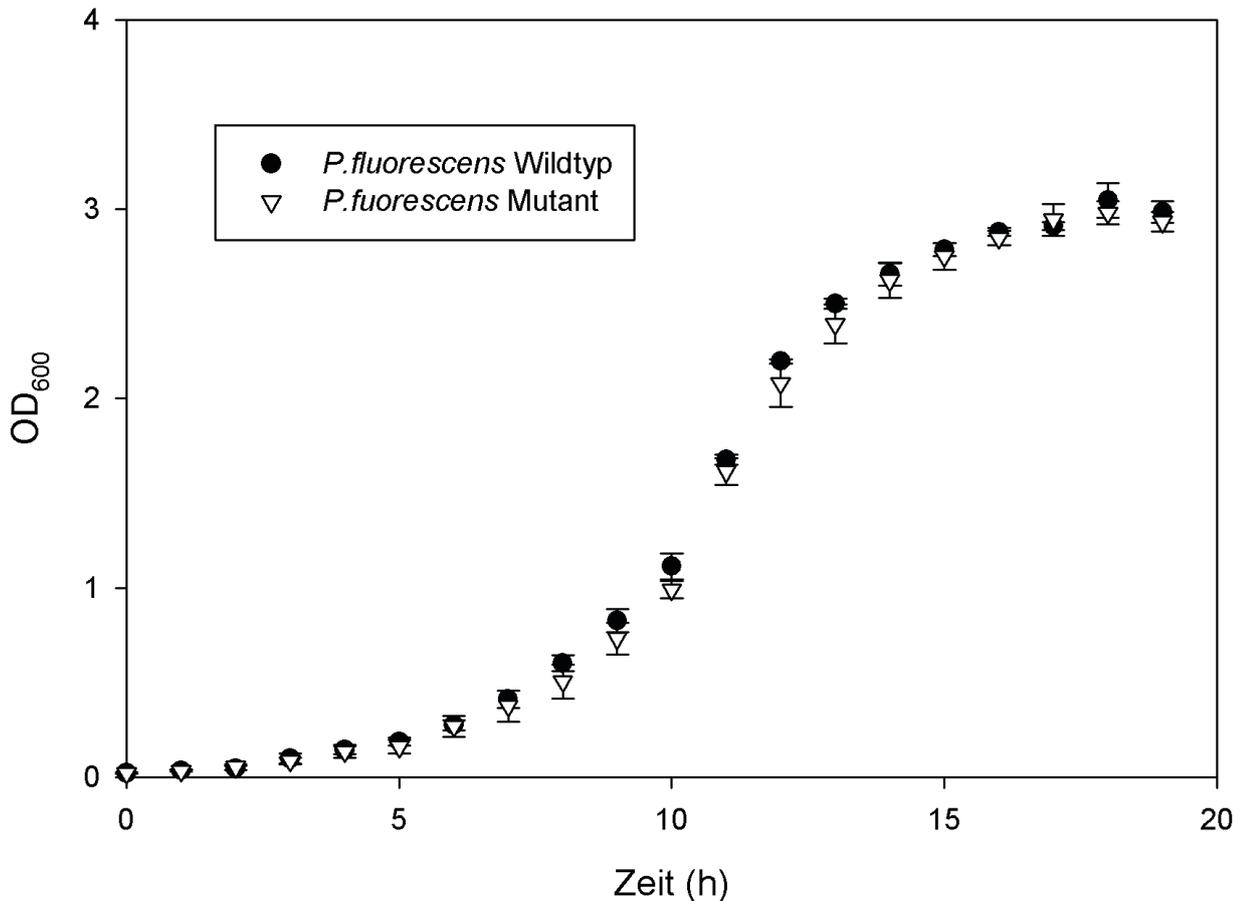


Abb.14 Wachstumskurve von *P. fluorescens* in M9-Minimal-Medium.

Wachstumskurve von *P. fluorescens* in M9-Minimal-Medium mit Glucose bei 25°C und 150rpm. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten.

Die Verdoppelungszeiten der Wildtypen entsprachen ungefähr denen der Mutanten und lagen bei allen getesteten Arten im Bereich der Standardabweichung. Der Wildtyp von *P. fluorescens* hatte eine T_d von 122min \pm 10min. *P. cedrina* und *P. lurida* hatten mit 210min \pm 12min und 230min \pm 28min eine deutlich höhere Verdopplungszeit. Ihre Mutanten waren mit 222min \pm 30min und 215min \pm 13min nur unwesentlich langsamer. Der Wildtyp von *P. poae* war mit einer T_d von 134min \pm 7min nur leicht schneller als der Mutant mit 142min \pm 9min (Abb.15).

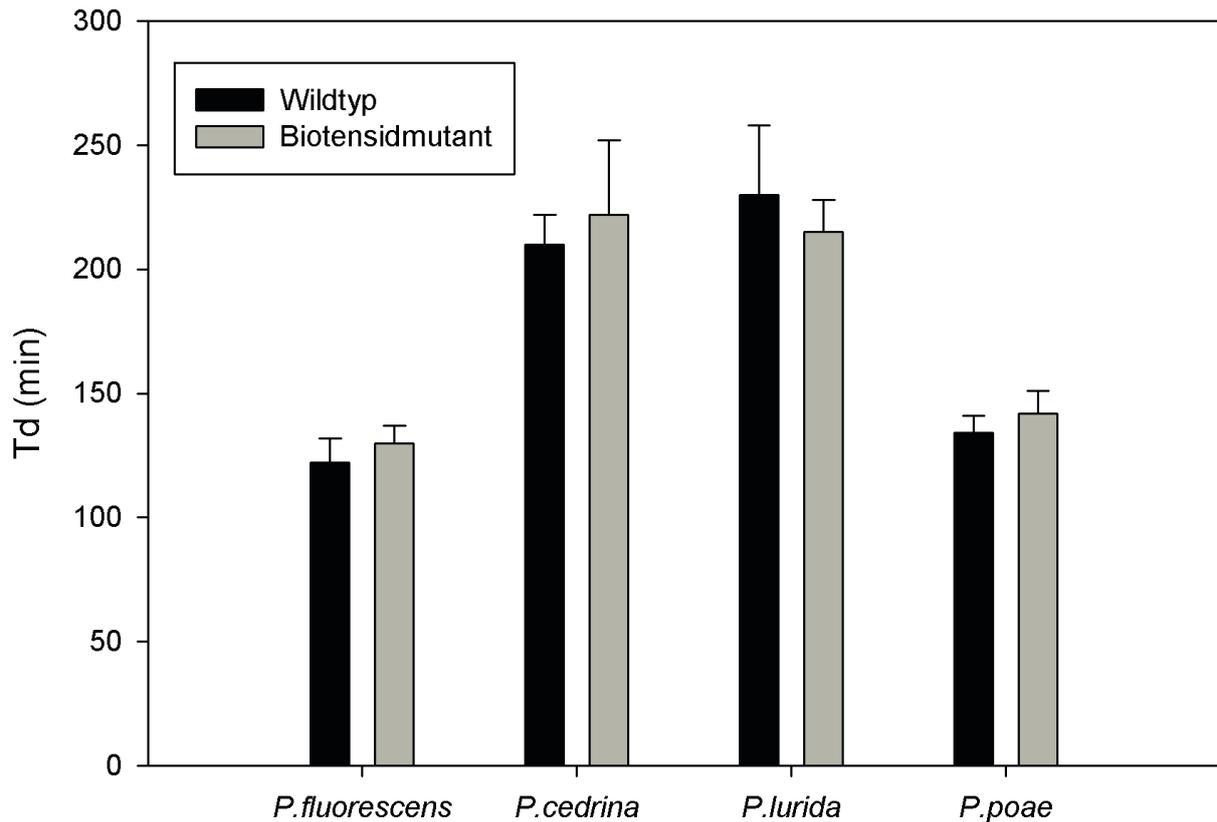


Abb.15 Verdopplungszeiten der vier Pseudomonaden und ihrer Biotensidmutanten.

Verdopplungszeit der vier Pseudomonaden und ihrer Biotensidmutanten in Minimal-Medium mit Glucose als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Messungen.

3.2.3 Swarmingegenschaften auf 0,4% Agarplatten

Um die Motilität der Pseudomonaden und ihre Fähigkeit, auf semifesten Agarflächen auszuschwärmen, zu untersuchen, wurde Wildtypen und Mutanten auf 0,4% Agarplatten ausplattiert (2.3.11) und für drei Tage inkubiert. Exemplarisch für alle Pseudomonaden ist hier das swarming von *P. fluorescens* und seinem Biotensidmutanten abgebildet (Abb.16). Schon nach 24 Stunden hatte der Wildtyp die komplette Agaroberfläche besiedelt, wohingegen der Mutant lediglich im Zentrum eine kleine, kreisförmige Kolonie gebildet hat. An Tag 2 nahm die Intensität der Besiedelung durch den Wildtypen zu, im Zentrum bildeten sich davon auslaufend mäandrierende Strukturen, die an Tag 3 noch deutlicher zugenommen und sich über die gesamte Agarfläche ausgebreitet haben. Die Kolonie des Mutanten veränderte sich innerhalb der 72 Stunden nicht: sowohl Ausdehnung als auch Höhe, Farbe und Konsistenz blieben über den Versuchszeitraum nach Tag 1 unverändert. In Tabelle (Tab.10) sind die Swarmingegenschaften der anderen Pseudomonaden festgehalten.

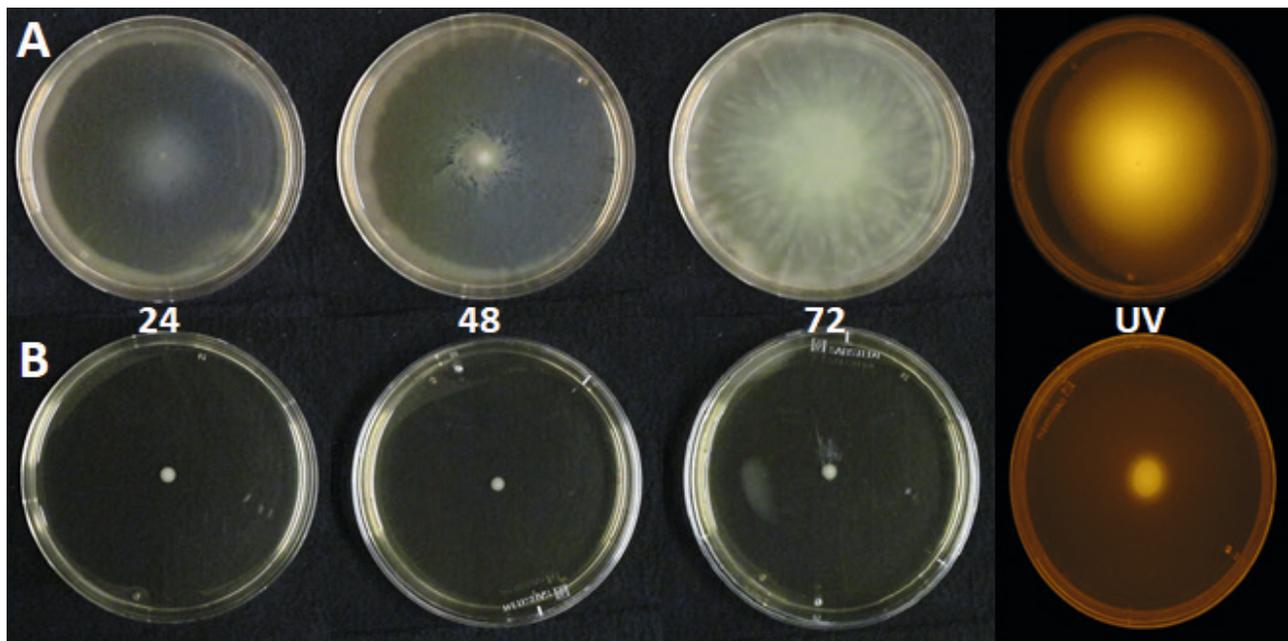


Abb.16 Swarmingverhalten von *P. fluorescens*.

Ausbreitung des Wildtypen (A) von *P. fluorescens* und des Biotensidmutanten (B) nach 24, 48 und 72 Stunden (von links nach rechts) auf 0,4% Agarplatten. Rechts daneben jeweils eine Aufnahme unter UV-Licht.

Tab.10 Swarmingverhalten der Wildtypen und ihrer Biotensidmutanten

Name	Wildtyp	Mutant
<i>P. fluorescens</i> SBW25	✓	✗
<i>P. cedrina</i>	✓	✗
<i>P. lurida</i>	✓	✗
<i>P. poae</i>	✓	✗

3.2.4 Schäumungsverhalten und Spreitung auf Parafilm

Um die Schäumungseigenschaften von Kulturüberständen zu untersuchen wurden standardisierte Kulturüberstände hergestellt (MM.2.3.1.2). 5ml der Kulturüberstände wurden in kleine Glasfläschchen gefüllt, geschüttelt und 1 Minute ruhen gelassen (Abb.17). Der Kulturüberstand des Wildtypen von *P. fluorescens* zeigte eine ausgeprägte Schaumbildung, die auch nach mehreren Minuten stabil war. Der Überstand des Mutanten hatte deutlich weniger und instabileren Schaum auf der Oberfläche. Bei der Wasserkontrolle war kein Schaum zu sehen. Die Ergebnisse der anderen Pseudomonaden waren sehr ähnlich und können Tabelle 11 entnommen werden.

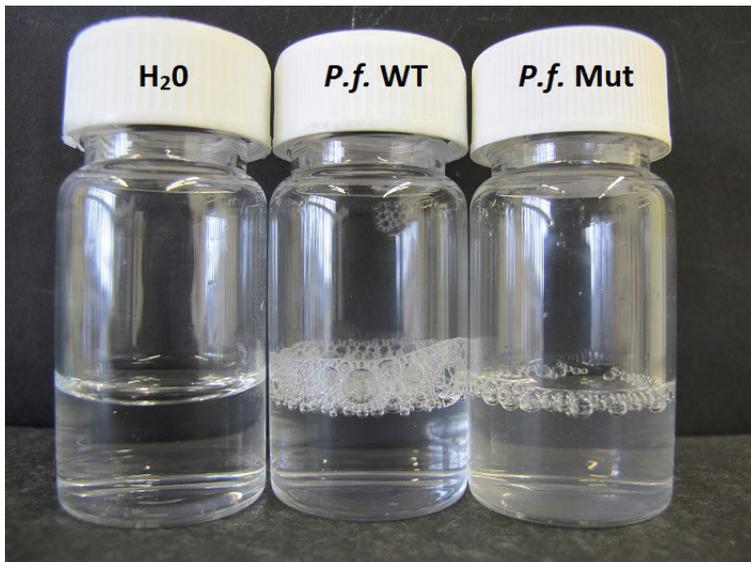


Abb.17 Schäumungsverhalten.

Standardisierte Kulturüberstände von *P. fluorescens* nach mehrmaligem Schütteln. Wasser dient als Negativkontrolle.

Tab.II Schäumungsverhalten der Wildtypen und ihrer Biotensidmutanten

Name	Wildtyp	Mutant
<i>P. fluorescens</i> SBW25	✓	✗
<i>P. cedrina</i>	✓	✗
<i>P. lurida</i>	✓	✗
<i>P. poae</i>	✓	✗

Das Spreitungsverhalten auf extrem hydrophoben Oberflächen wie Parafilm wurde mit 10µl großen Tropfen der verschiedenen Kulturüberstände getestet. Der Tropfen der Wasserkontrolle formte eine Halbkugel und blieb auf dem Parafilm sitzen. Die Tropfen aller Wildtypen hingegen kollabierten, breiteten sich über einen größeren Bereich aus und formten nur noch eine leicht Wölbung über dem Parafilm. Die Tropfen aller Biotensidmutanten formten, ebenso wie die Wasserkontrolle, eine Halbkugel und blieben auf dem Parafilm sitzen, anstatt sich zu verteilen (Abb.18).

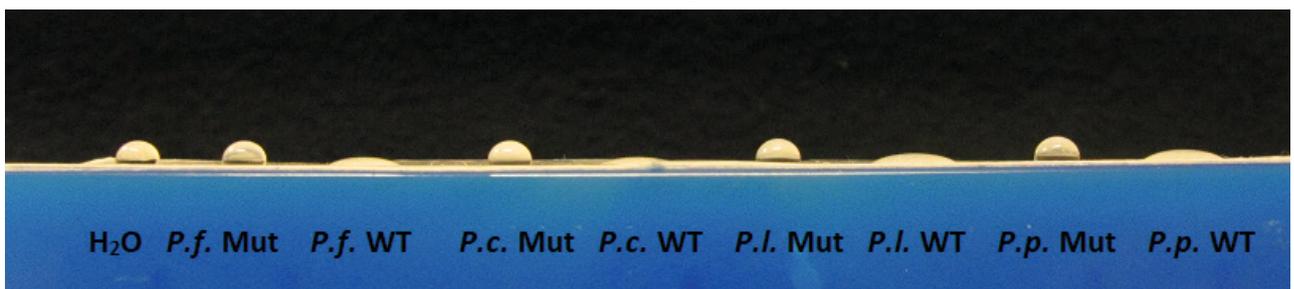


Abb.18 Spreitungsverhalten auf Parafilm.

Standardisierte Kulturüberstände von vier verschiedenen Pseudomonaden und ihren tensiddefizienten Mutanten. Wasser mit einer OFS von ≈ 73 mN/m diente als Kontrolle.

3.2.5 Kontaktwinkel der Kulturüberstände auf Parafilm und Kutikularmembranen von *Prunus laurocerasus*

Mit Hilfe des DSA25 von Krüss konnten die genauen Kontaktwinkel von standardisierten Kulturüberständen auf künstlichen und natürlichen hydrophoben Oberflächen ermittelt werden (Abb.19). Die Kontaktwinkel der Negativkontrollen und der Mutanten auf Parafilm lagen alle im Bereich von 100° - 105° . Die Kontaktwinkel der Wildtypen lagen deutlich darunter mit Werten zwischen 43° und 73° , wovon das Umweltisolat von *P. lurida* mit $73^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$ die höchsten Werte zeigte. Der Wildtyp von *P. fluorescens* wies mit 43° den kleinsten Kontaktwinkel auf und benetzte den Parafilm am besten.

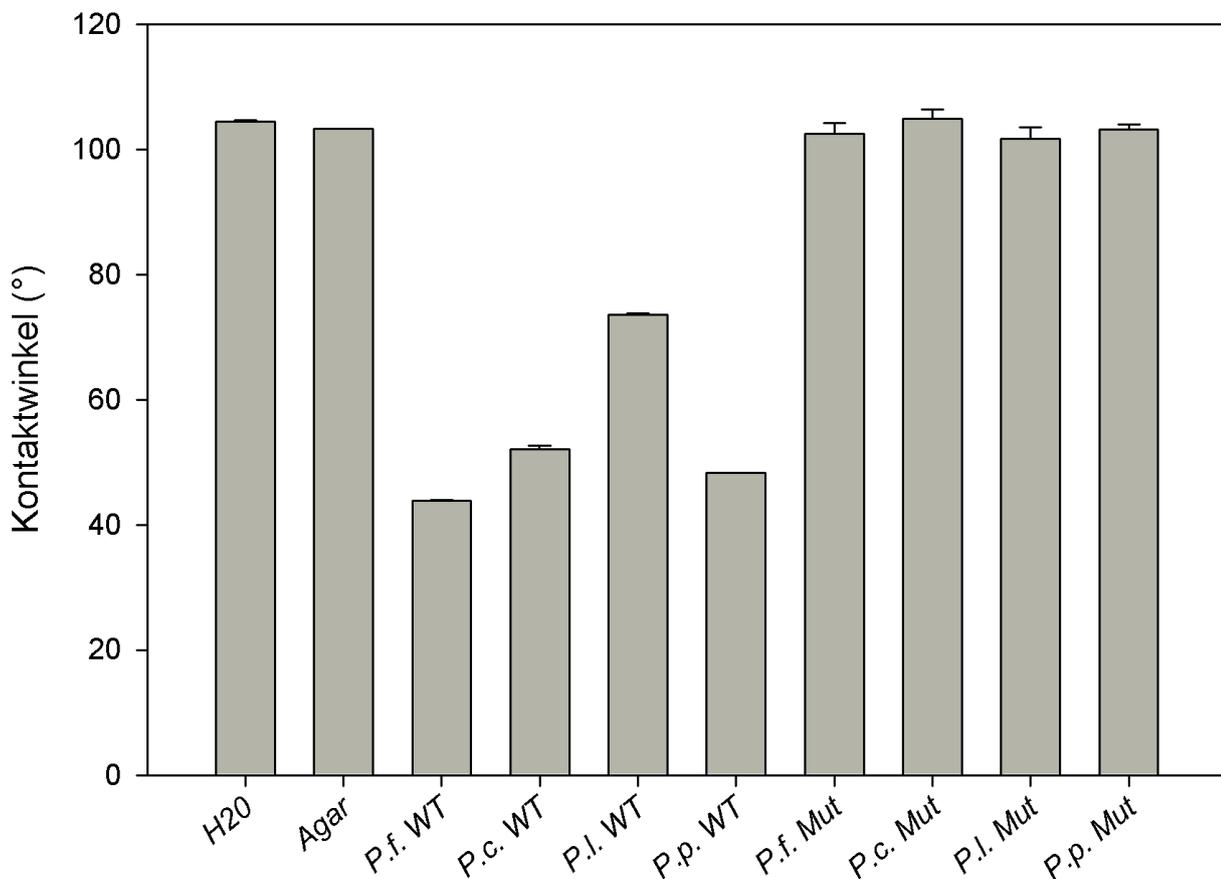


Abb.19 Kontaktwinkel auf Parafilm.

Kontaktwinkel der Kulturüberstände aller Pseudomonaden und ihrer Biotensidmutanten auf Parafilm. Die Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei technischen Replikaten.

Die Kontaktwinkel auf isolierten Kutikularmembranen waren tendenziell ähnlich denen auf Parafilm (Abb.20). Die Werte lagen im Mittel 20° unter denen auf Parafilm und schwankten zwischen 26° und 81° . Die Negativkontrollen und alle Mutanten hatten Kontaktwinkel zwischen 73° und 81° . Unter den Wildtypen stach *P. lurida* mit einem Kontaktwinkel von $48^{\circ} \pm 0,4^{\circ}$ hervor. Die drei anderen Wildtypen kamen auf Werte zwischen 26° und 31° .

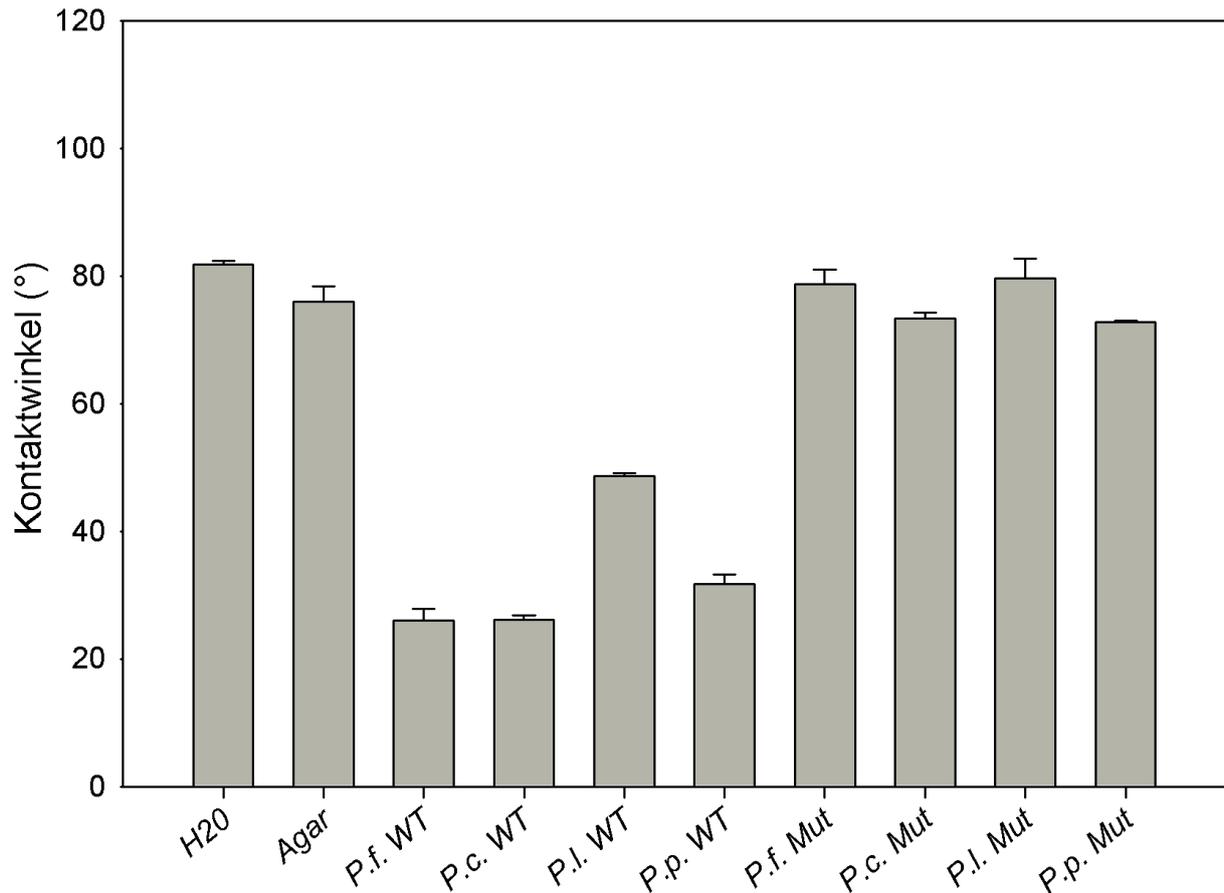


Abb.20 Kontaktwinkel auf Kutikularmembranen.

Kontaktwinkel von standardisierten Kulturüberständen aller Pseudomonaden und ihrer Biotensidmutanten auf isolierten Kutikularmembranen von *P.laurocerasus*. Die Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei technischen Replikaten.

3.2.6 Oberflächenspannung (OFS) der Kulturüberstände (DSA Krüss)

Mit Hilfe des DSA 25 von Krüss konnten die OFSs der Kulturüberstände aller Wildtypen und Mutanten ermittelt werden. In Abbildung 21 sind jeweils Tropfen der Kulturüberstände von *P. fluorescens* abgebildet. Zu sehen sind die Tropfen kurz bevor die OFS nicht mehr ausreicht um die Oberfläche zusammenzuhalten und der Tropfen abreißt. Der Tropfen des Mutanten ist wesentlich größer und bauchiger, die errechnete OFS lag im Mittel bei $70,8 \text{ mN/m} \pm 1,2 \text{ mN/m}$ (Abb. 22). Der Kulturüberstand des Wildtyps hatte eine OFS von $27,8 \text{ mN/m} \pm 1,8 \text{ mN/m}$. Genauso verhielt es sich bei den anderen Wildtypen und Mutanten. Die drei anderen Mutanten hatten eine OFS zwischen 69 mN/m und 71 mN/m . Die OFS der entsprechenden Wildtypen lag bei $26 \text{ mN/m} \pm 1 \text{ mN/m}$.

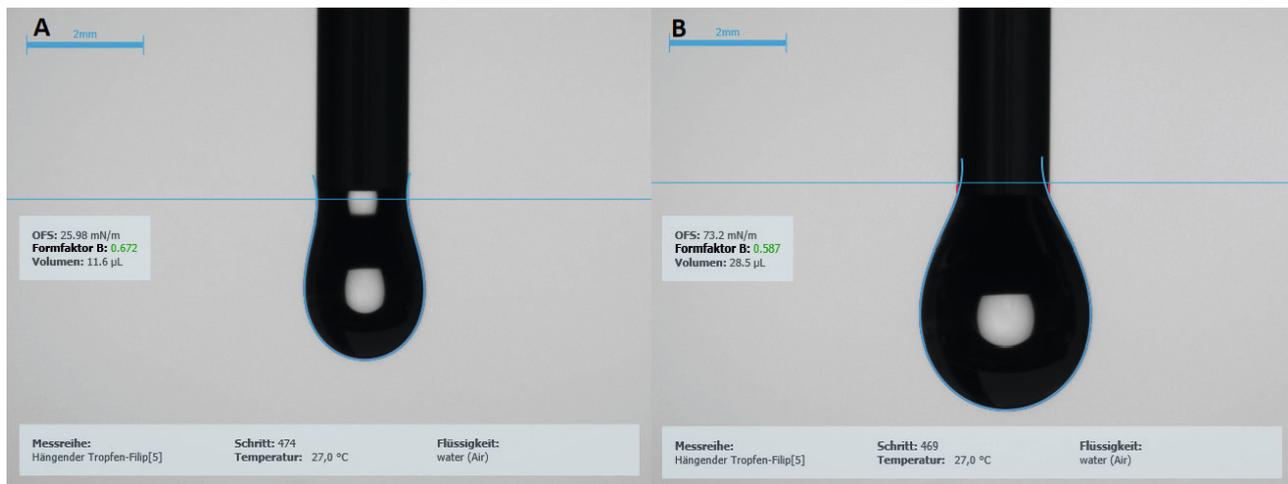


Abb.21 Hängende Tropfen am DSA.

(A) Aufnahme des DSA von einem ca. 12µl Tropfen standardisierten Kulturüberstands des Wildtypen von *P. fluorescens*.

(B) Aufnahme des DSA von einem ca. 30µl Tropfen standardisierten Kulturüberstands des Biotensidmutanten von *P. fluorescens*.

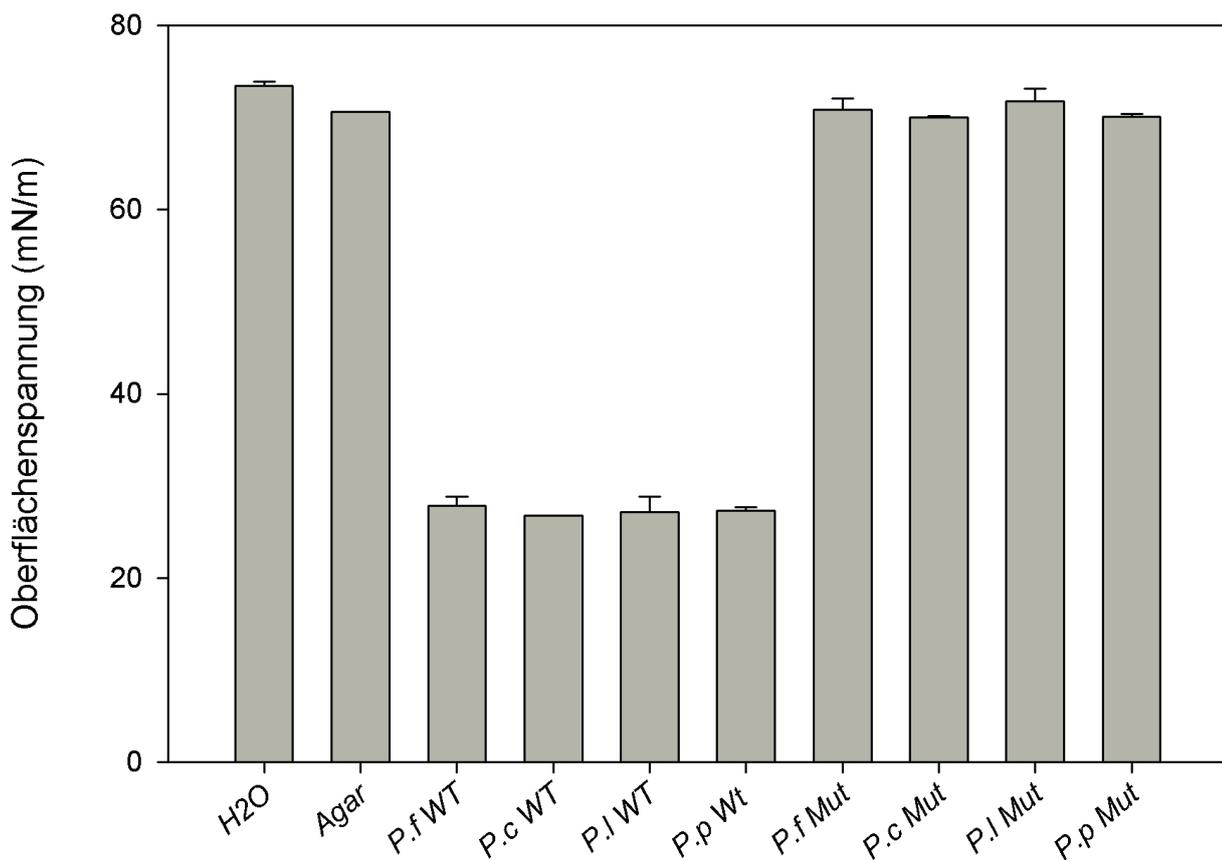


Abb.22 Oberflächenspannung am DSA.

OFS von standardisierten Kulturüberständen aller Pseudomonaden und ihrer Biotensidmutanten. Als Kontrolle wurden unbesiedelte Agarplatten abgewaschen. Alle Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten.

3.2.7 Oberflächenbiofilmbildung in Komplex- und Minimal-Medium

Die Oberflächenbiofilmbildung der zu untersuchenden Pseudomonaden wurde in 12 Well-Platten getestet (Abb.23). Nach der Inkubationszeit von 48 Stunden wurden die Wells gewaschen und auf der Oberfläche anhaftender Biofilm mit 1% (w/v) Kristallviolett Lösung gefärbt und anschließend fotometrisch quantifiziert (2.3.10). Der Wildtyp von *P. cedrinala* produzierte durchschnittlich 15,6µg anhaftende Biomasse, der Wildtyp von *P. lurida* hingegen produziert mit 43,5µg 2,8 x so viel Biomasse. Die Mutanten von *P. fluorescens* und *P. cedrinala* produzierten 20% bzw. 30% mehr Biomasse als ihre Wildtypen. Bei *P. lurida* ist der Trend umgekehrt und der Wildtyp produziert ca. 25% mehr Biomasse als der Mutant. Bei *P. poae* lässt sich mit jeweils ca. 41µg Biomasse kein Unterschied erkennen. Alle Wildtypen produzierten im Durchschnitt zusammen ca. 131µg, die Mutanten produzierten zusammen, unter Einberechnung der Ungenauigkeit der Methode, mit 132µg die gleiche Masse.

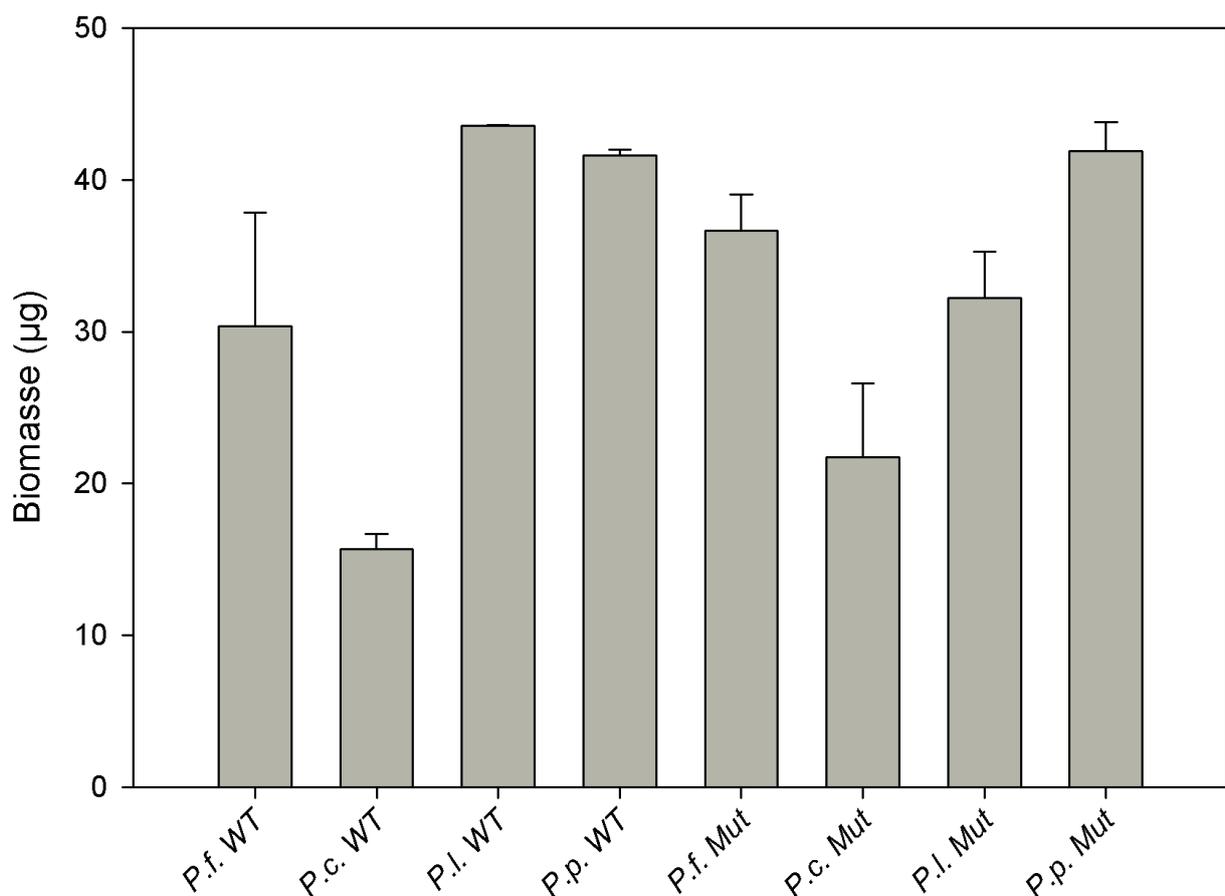


Abb.23 Biofilmbildung in KB-Medium.

Masse der anhaftenden Oberflächenbiofilme in 12-Well-Platten aller Pseudomonaden und ihrer Biotensidmutanten in KB-Medium. Alle Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei technischen Replikaten.

Oberflächenbiofilme auf Minimal-Medium bestanden im Durchschnitt aus 80% weniger Biomasse (Abb.24). Der Wildtyp von *P. lurida* produzierte auch auf Minimal-Medium mit 9.2µg die meiste Biomasse. Der Wildtyp von *P. fluorescens* produzierte von allen getesteten Stämmen mit 2,7µg am wenigsten Biofilm. Der Biotensidmutant von *P. fluorescens* hingegen gehörte mit 6,3µg zu den stärkeren Produzenten. Auf Minimal-Medium konnte der Wildtyp von *P. cedrina* mit 6,2µg ±0,5µg geringfügig mehr Biofilm bilden als der Mutant mit 5,3µg ±0,3µg. Der Mutant von *P. poae* produzierte mit 8,9µg ±0,9µg fast doppelt so viel Biomasse wie der Wildtyp. Die Wildtypen und ihre korrespondierenden Biotensidmutanten produzierten mit insgesamt 22µg und 24µg zusammen ähnlich viel Biomasse.

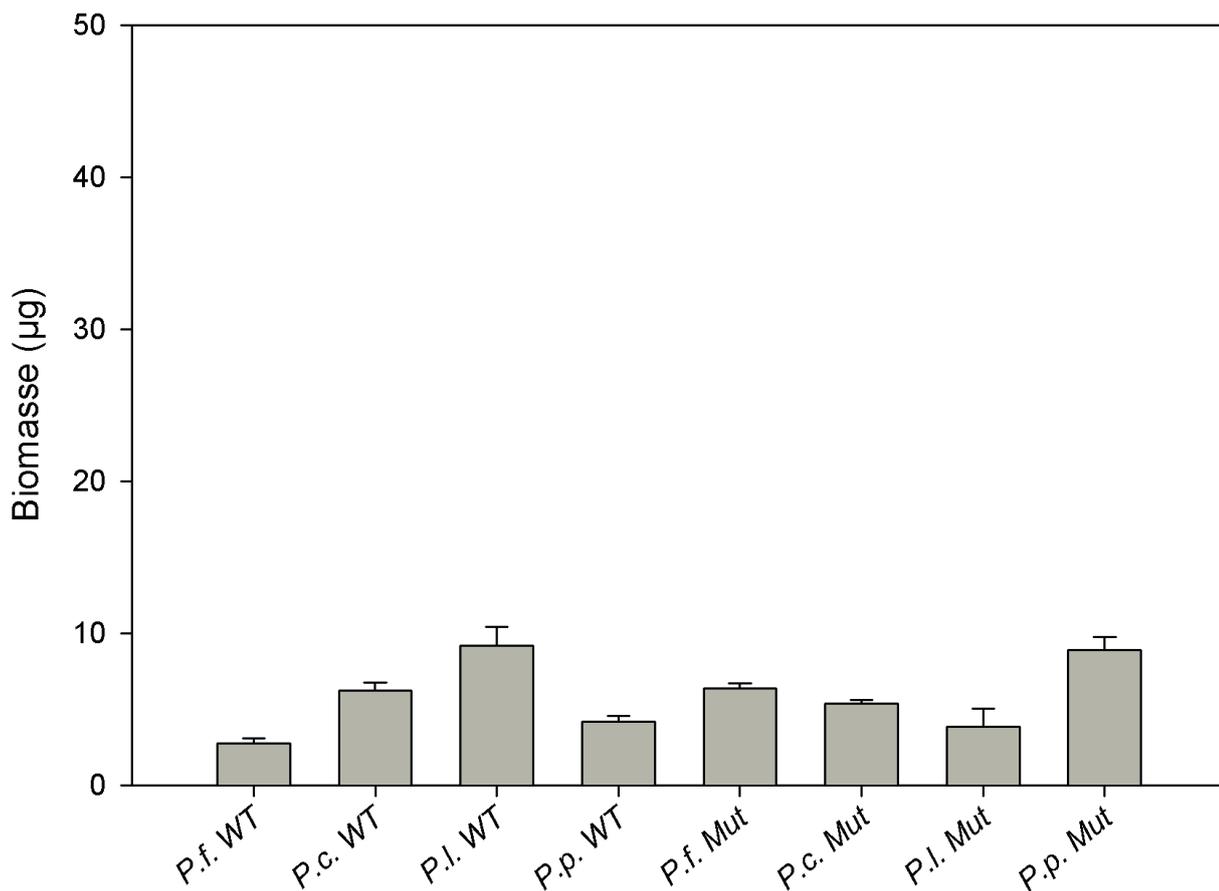


Abb.24 Biofilmbildung in MM-Medium.

Masse der anhaftenden Oberflächenbiofilme in 12-Well-Platten aller Pseudomonaden und ihrer Biotensidmutanten in MM mit Glucose. Alle Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei technischen Replikaten.

3.2.8 Kritische Mizellenbildungskonzentration (CMC) der Biotenside

Die Kritische Mizellenbildungskonzentration eines Tensides lässt sich durch eine Verdünnungsreihe und die Messung der Oberflächenspannung der Tensidlösung bestimmen. Die aufgereinigten Extrakte (2.5.5) wurden in sterilem Wasser resuspendiert und für 5 Minuten sonifiziert. In Abbildung 25 ist exemplarisch der Graph für die Bestimmung der CMC des Wildtypen von *P. fluorescens* zu sehen. Der graphisch ermittelte Wert lag bei ca. 18mg/l. Die niedrigste CMC wurde bei *P. lurida* mit 9mg/l gemessen. Bei *P. cedrina* konnte eine CMC von 23mg/l ermittelt werden. Die höchste CMC, mit ca. 90mg/l, wurde bei *P. poae* gemessen. Die CMCs der Mutanten konnten nicht ermittelt werden, da die Extrakte keine Oberflächenspannungsverändernden Stoffe beinhalteten (3.2.6).

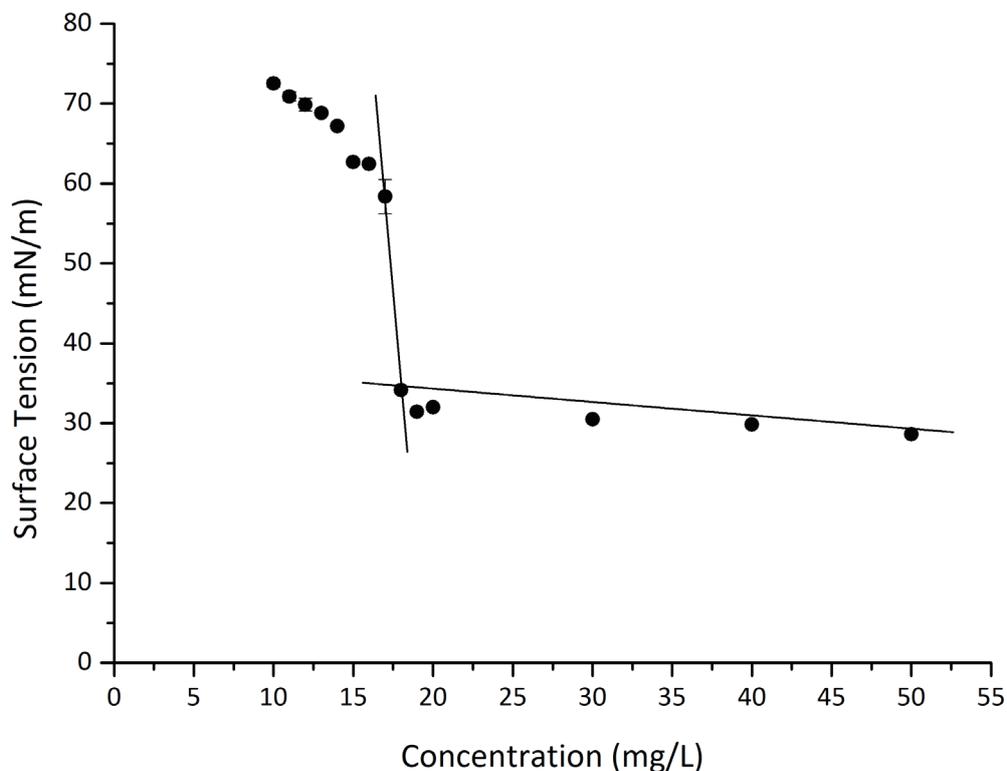


Abb.25 Kritische Mizellenkonzentration von Viscosin.

Gezeigt ist die graphische Bestimmung der CMC von Viscosin. Die gemessenen Oberflächenspannungen wurden gegen die aufsteigende Konzentration des Biotensids aufgetragen.

3.2.9 Effekt von aufgereinigten Biotensiden auf die Transpiration von isolierten Kutikularmembranen

Um den Einfluss von Biotensiden auf die Permeabilität von Wasser über Kutikularmembranen zu untersuchen, wurden Transpirationmessungen mit Edelstahlkammern (2.6.2.1) durchgeführt. Um eine konstante Luftfeuchtigkeit (2%-50%) zu gewährleisten, wurden die Kammern in luftdichten Boxen inkubiert, in denen die RLF über ein Glyce-

rin:Wasser-Gemisch eingestellt wurde. Gezeigt werden Transpirationskinetiken von Kutikularmembranen, die mit Biotensid von *P. fluorescens* oder Wasser behandelt wurden (Abb.26, 27). Bei 50% RLF ist der Verlauf beider Kinetiken durchgehend geradlinig, wobei der Wasserverlust bei den mit Biotensid behandelten Kutikularmembranen geringfügig größer war. Bei 2% RLF sind die Kinetiken insgesamt steiler, jedoch immer noch über die gesamte Messlänge linear. Der errechnete Effekt des Biotensids von *P. fluorescens* bei 50% RLF lag bei 1.17 ± 0.22 , bei 2% RLF lag der Effekt bei 0.96 ± 0.11 (Abb.28). Die Effekte der drei anderen Pseudomonaden und ihrer Biotensidmutanten schwankten ebenfalls um den Wert 1. Den niedrigsten Effekt hatte das Biotensid von *P. poae* bei einer RLF von 2%. Betrachtet man alle Werte mit ihren Standardabweichungen ist keine signifikante Abweichung von 1 zu beobachten.

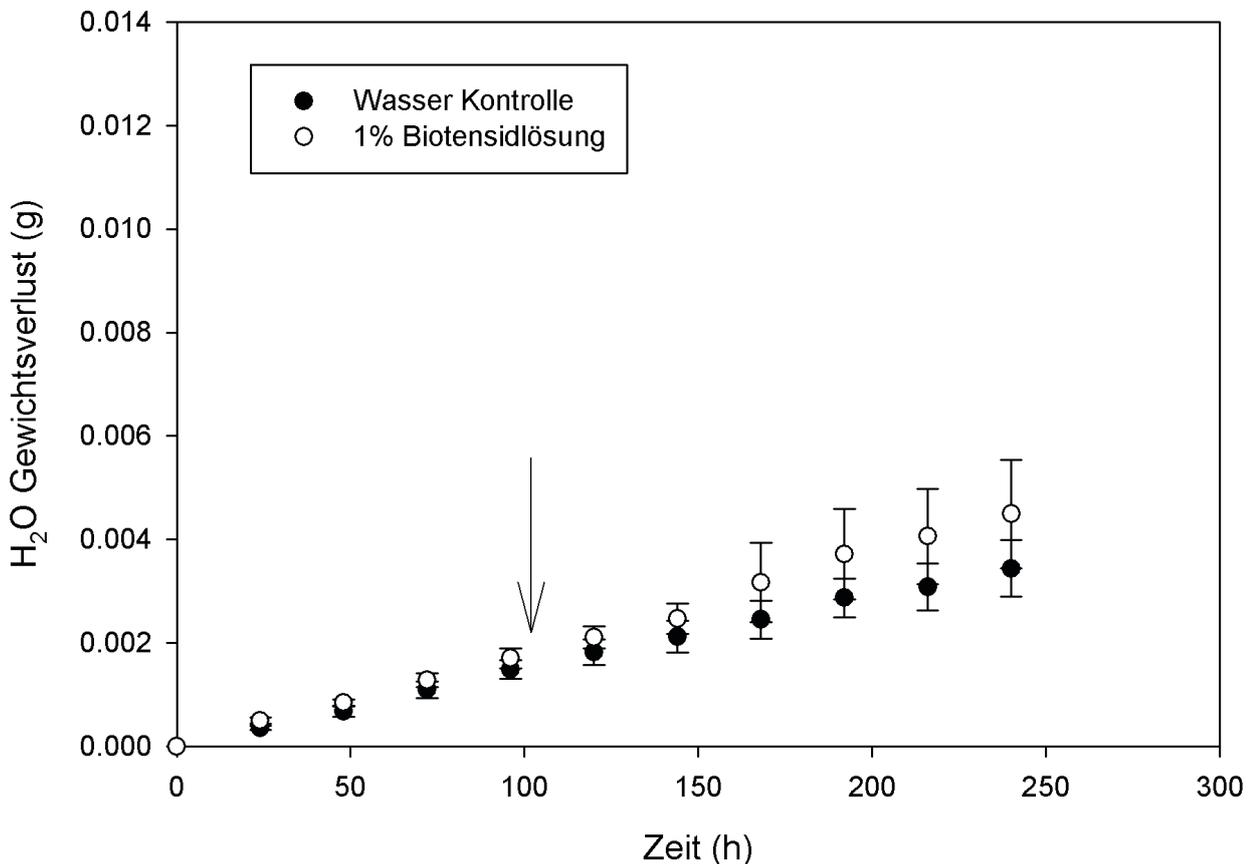


Abb.26 Transpirationskinetik bei 50% RLF und 1% Tensidlösung.

Zusammengefasste Transpirationskinetik von jeweils fünf mit Biotensid von *P. fluorescens* behandelten Kutikularmembranen und fünf mit Wasser behandelten Kontrollen, bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% (n=5). Der Zeitpunkt der Applikation von Biotensid oder Wasser ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

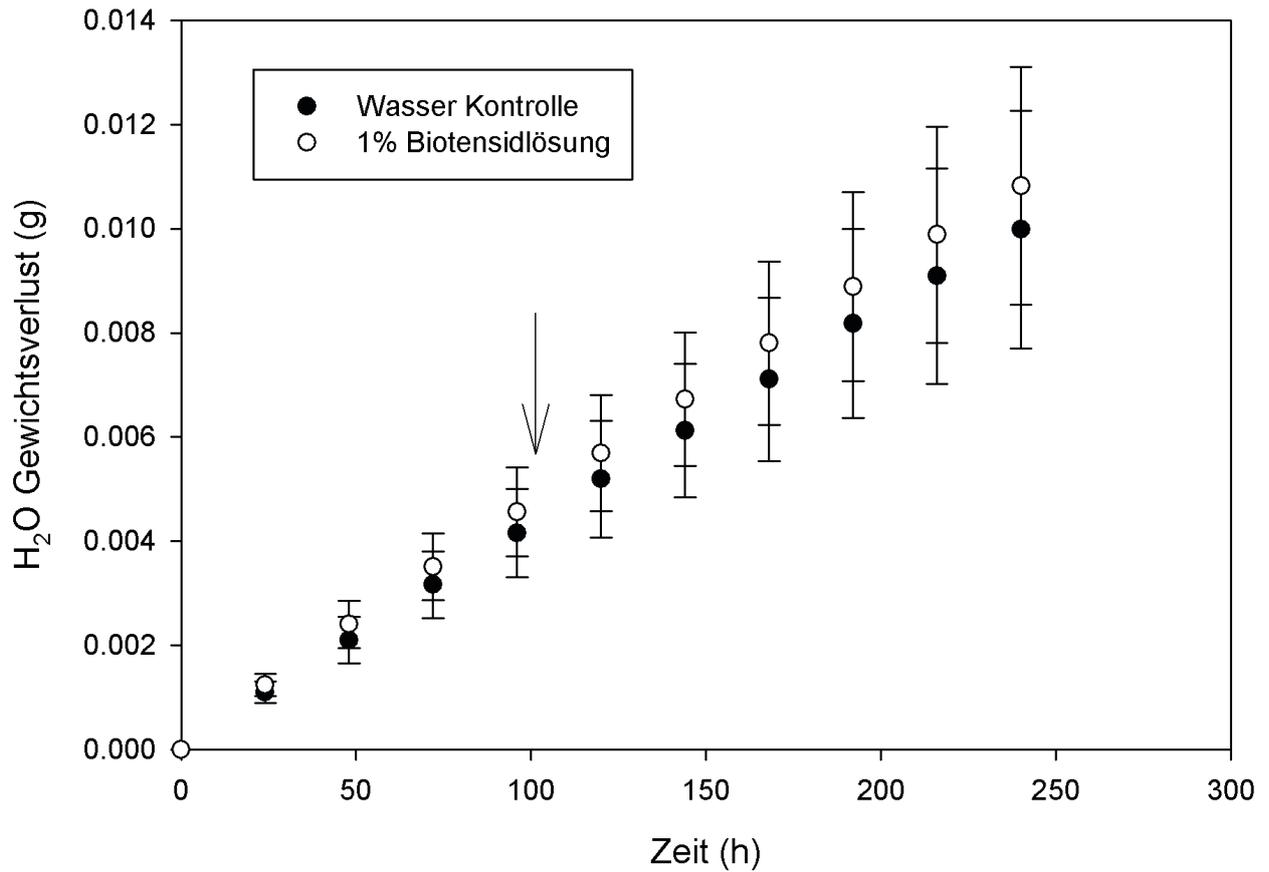


Abb.27 Transpirationskinetik bei 2% RLF und 1% Tensidlösung.

Zusammengefasste Transpirationskinetik von jeweils fünf mit Biotensid von *P. fluorescens* behandelten Kutikularmembranen und fünf mit Wasser behandelten Kontrollen, bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 2% (n=5). Der Zeitpunkt der Applikation von Biotensid oder Wasser ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

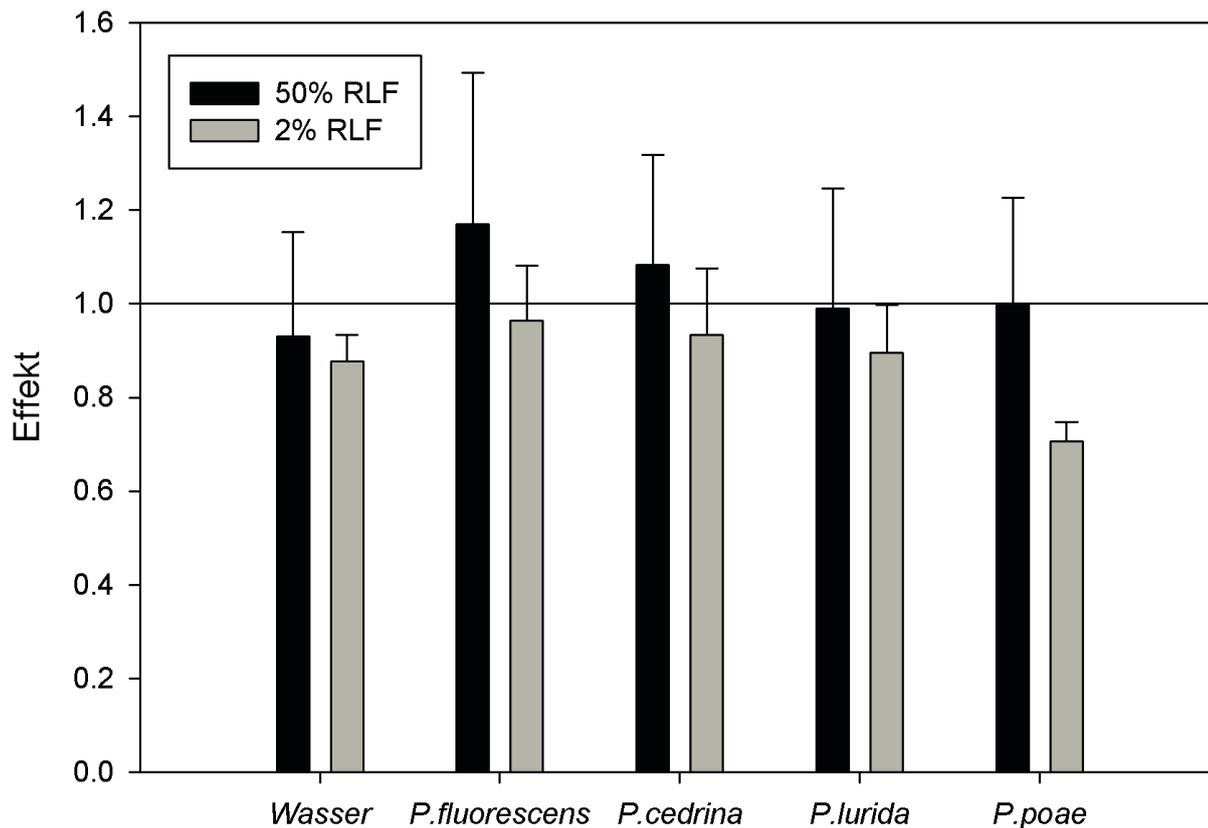


Abb.28 Effekte von Biotensiden auf die Transpiration von Kutikularmembranen.

Anhand der Gesamtkinetiken errechnete Effekte von Biotensiden der Wildtypen auf die Transpiration von isolierten Kutikularmembranen von *P.laurocerasus* bei verschiedenen Luftfeuchtigkeiten.

3.2.10 Biotensid Untersuchung

Die Kulturüberstände von allen Wildtypen und Mutanten wurden wie beschrieben (2.5.5) behandelt, um mögliche amphiphile organische Moleküle aus der wässrigen Phase zu extrahieren. Das Endprodukt war in allen Fällen ein weißliches Pulver mit einem leichten, gelb-orangenem Farbstich. Im Verlauf dieser Arbeit wurden mehrere Extraktionen in verschiedenen Maßstäben angefertigt und jedes Mal war die Ausbeute bei den Wildtypen um den Faktor 10-20 erhöht. Die Extrakte wurden in 1:1 Methanol:H₂O aufgenommen und mit einem LC-MS/MS untersucht (2.5.6). Gezeigt sind jeweils die Masse/Ladungs Spektren der Wildtypen und ihrer Mutanten. Das Spektrum des Wildtypen von *P. fluorescens* hat vier deutliche Peaks. Der erste distinkte, kleinere Peak liegt bei 1110.66. Ihm folgt der charakteristische Hauptpeak bei 1124.60m/z mit einer Intensität von 20000. Der Hauptpeak selber besteht aus vier absteigenden Einzelpeaks, deren Massen sehr dicht beieinander liegen. Auf den Hauptpeak folgen zwei größeren Peaks bei 1146.57m/z und 1162.60m/z (Abb.29). Aus der Literatur ist bekannt, dass es sich dabei um das CLP Viscosin handelt. Die Wildtypen von *P. fluorescens* und *P. cedrina* haben – bis auf minimale Abweichungen –

ein identisches Spektrum. So befindet sich der Hauptpeak des Extrakts von *P. cedrina* bei 1124.59m/z. In den Extrakten der jeweiligen Mutanten ist kein Hauptpeak auszumachen. Die Basislinie schwankt durchgehend zwischen einer Intensität von 1500 und 3000. Das Spektrum von *P. lurida* hat lediglich zwei deutliche Peaks. Den ersten bei 1124.62m/z und den ca. 5-mal höheren Hauptpeak bei 1138.64m/z. Der Hauptpeak besteht wieder aus vier dicht beieinander liegenden, absteigenden Massen. Das Spektrum des Wildtyps von *P. poae* zeigt sehr ähnliche Peaks bei 1124.65m/z und 1138.60m/z, zusätzlich lassen sich zwei kleinere Peaks bei 1160.56m/z und 1176.78m/z erkennen. In den Spektren der korrespondierenden Tensidmutanten ließ sich bei selben Einstellungen kein Peak erkennen.

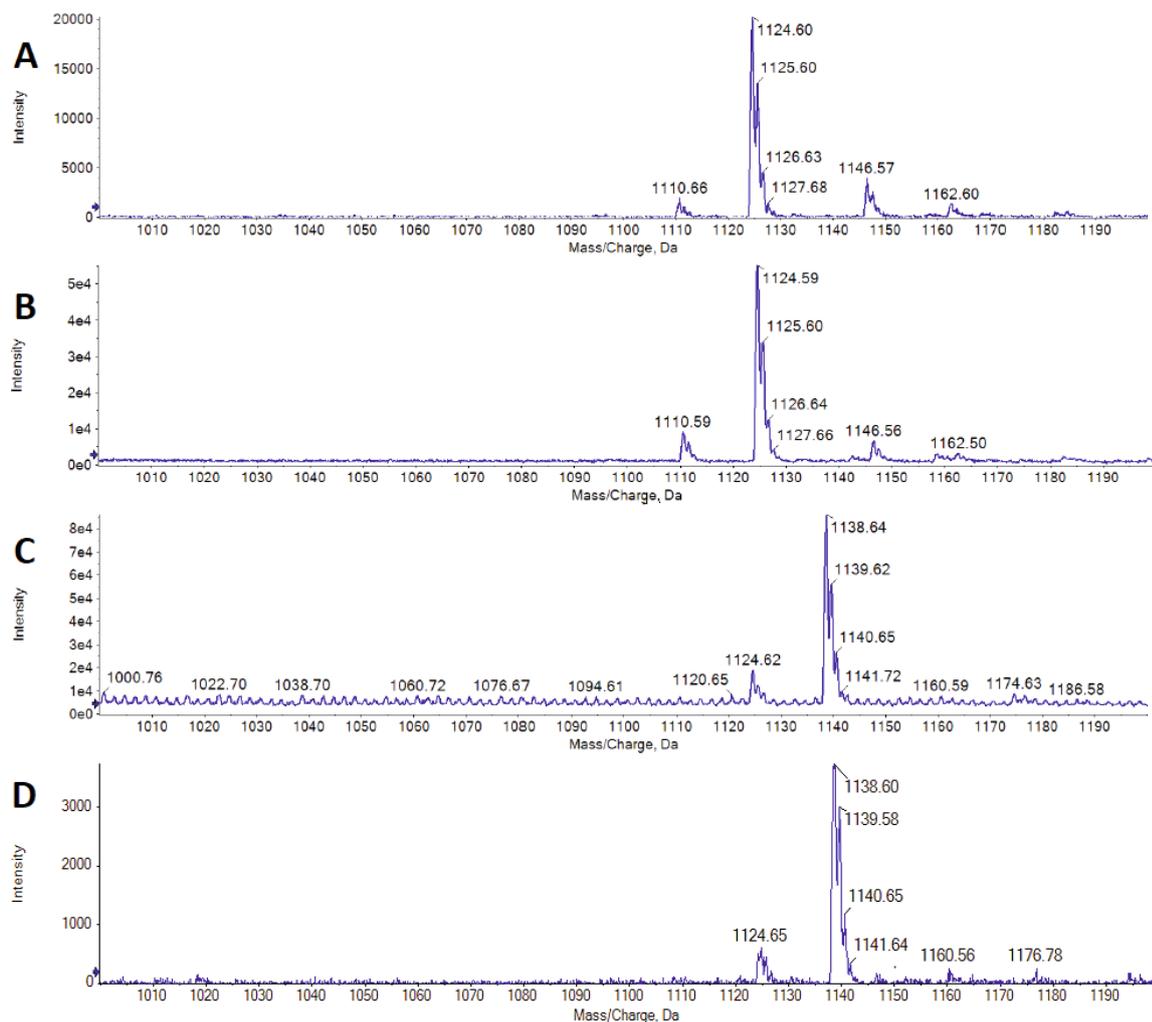


Abb.29 Ms/Ms-Spektren der Biotensiduntersuchung.

Abgebildet sind die vier Spektren der Ms/Ms Biotensiduntersuchung von (A) *P. fluorescens*, (B) *P. cedrina*, (C) *P. lurida* und (D) *P. poae* in den Bereichen zwischen 1000m/z und 1200m/z. Die Hauptpeaks von (A) und (B) liegen bei 1124.60 und 1124.59m/z. Die Hauptpeaks von (C) und (D) liegen bei 1138.64 und 1138.60m/z.

3.4 Weiterführende Versuche an *P. fluorescens*

3.4.1 Expression von *viscB* in Flüssigkultur und Biofilm

Die Produktion von Biotensiden hängt stark von den Umweltbedingungen und der Besiedelungsform der Produzenten ab. Werden Kutikularmembranen flächig mit Bakterien suspensionen von Wildtyp und Biotensidmutant inokuliert und nach einer Eintrocknungsphase mit dem "Liegenden Tropfen" (DSA, Krüss) untersucht, zeigen anfangs beide Tropfen eine ähnliche Form. Bei Kutikularmembranen, die mit dem Wildtyp inokuliert wurden, betrug der Kontaktwinkel $76,6^\circ \pm 1,1^\circ$, bei dem Biotensidmutant lag der Kontaktwinkel bei $78,3^\circ \pm 2^\circ$. Nach 24 Stunden Inkubation lag der Kontaktwinkel des Biotensidmutanten bei $77^\circ \pm 2,6^\circ$ (Abb.30), während die Tropfen auf den Wildtyp-Proben komplett kollabierten, sodass kein Kontaktwinkel mehr messbar war (Abb.31). Nach 48 Stunden lag der Kontaktwinkel des Biotensidmutanten bei $76^\circ \pm 2,6^\circ$, der des Wildtypen lag weiterhin unterhalb des messbaren Bereichs. Um eine mögliche Änderung in dem Expressionsniveau der Biotensidgene (*viscB*) zwischen Flüssigkulturen und Biofilmen zu untersuchen, wurden zusätzlich Bakterien des Wildtypen in Flüssigkulturen und auf Agarplatten angezogen. Die aus den Kulturen extrahierte RNA wurde in einer qPCR als Template eingesetzt. Die CT-Werte von drei biologischen und jeweils drei technischen Replikaten wurden zusammengefasst und die relative Expressionsrate im Vergleich zu zwei Referenzgenen mit der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode berechnet. Als Referenzgene wurden das ribosomale Protein BL23 und die cytosolische GAP-Dehydrogenase verwendet, die beide auf einem konstanten Level expremiert wurden. Wurde die Expression von *viscB* mit der von *bl23* verglichen konnte keine signifikante Abweichung zwischen den Expressionsniveaus zwischen Flüssigkulturen und Biofilmen festgestellt werden ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}=0,7 \pm 0,5$). Auch in Relation zu der GAP-Dehydrogenase konnte keine stark veränderte Expression von *viscB* festgestellt werden ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}=0,5 \pm 2,8$, Abb.31)

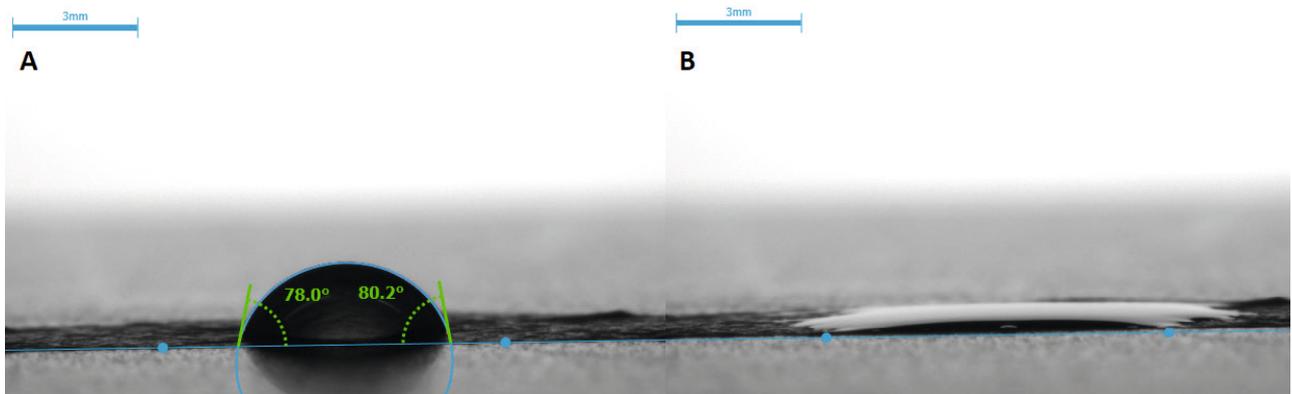


Abb.30 Wassertropfen auf besiedelter Kutikularmembran.

(A) 24 Stunden nach der Inokulation der Kutikularmembran mit Bakterien des Biotensidmutanten wurde ein Tropfen Wasser appliziert und der Kontaktwinkel mit dem DSA von Krüss gemessen. Die angegebenen Messwerte sind Mittelwerte (aus jeweils rechtem und linken Kontakwinkel) aus jeweils drei individuellen Messungen.

(B) 24 Stunden nach der Inokulation der Kutikularmembran mit Bakterien des Wildtypen wurde ein Tropfen Wasser appliziert und versucht, den Kontaktwinkel mit dem DSA von Krüss zu messen.

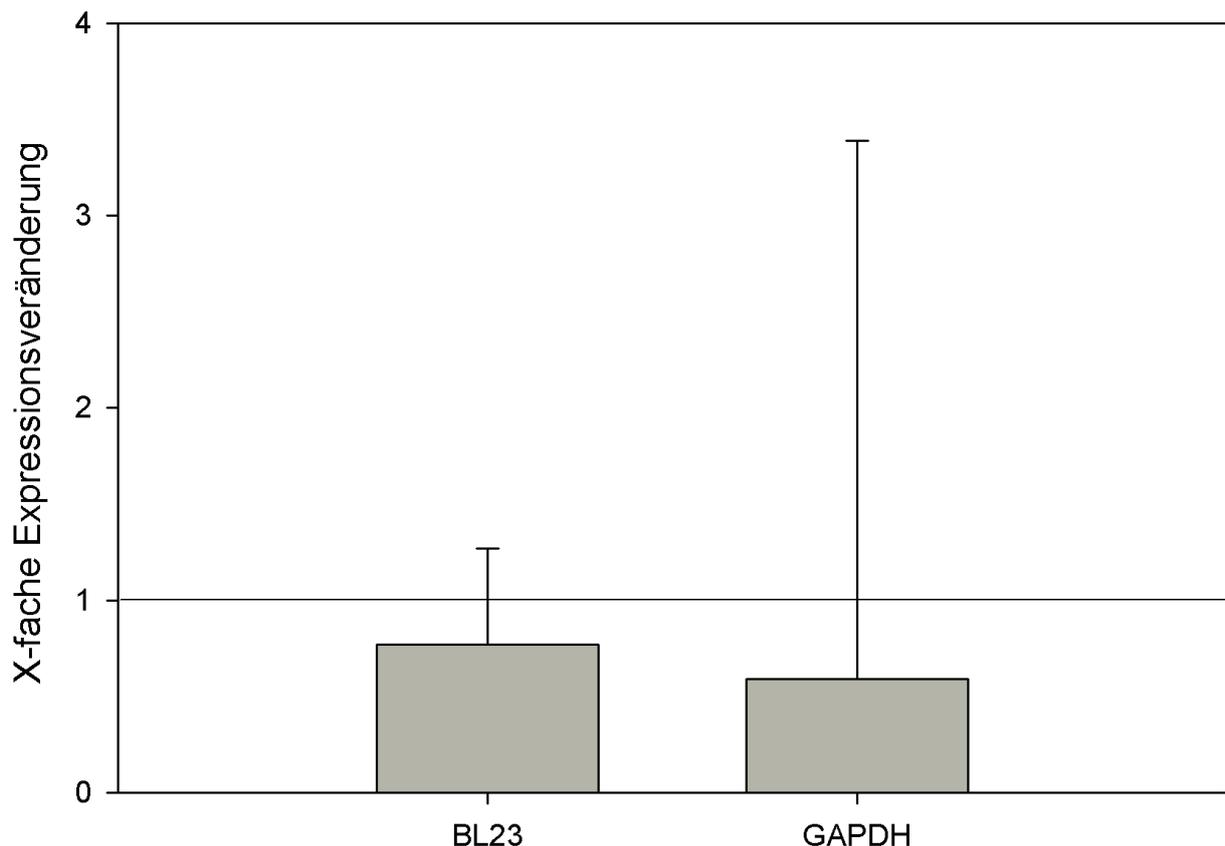


Abb.31 Expression von *ViscB*.

Gezeigt ist die Änderung der Expression von *ViscB* im Verhältnis zu den Referenzgenen zwischen Flüssigkulturen und Biofilm. Die Ergebnisse wurden mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode errechnet und als Funktion ($2^{\Delta\Delta C_t}$) dargestellt. Die eingesetzte RNA stammte von drei biologischen Replikaten, von denen jeweils drei technische Replikate angefertigt wurden (n=9).

3.4.2 Wachsabbau in Schüttelkulturen

Um zu untersuchen, ob kutikuläre Wachse eine mögliche Kohlenstoff- und Energiequelle für *P. fluorescens* darstellen, wurden Schüttelkulturen in 100ml Erlenmeyerkolben mit Zellsuspensionen des Wildtypen, des Biotensidmutanten und einer sterilen Kontrolllösung angeimpft (n=3) und mit isolierten Kutikularmembranen über 23 Tage inkubiert (2.3.1.4). Um einen Zeitpunkt zur Ernte der Kulturen und Extraktion der Wachse aus den Kutikularmembranen zu ermitteln, wurden alle zwei Tage Proben der Kulturen genommen und die grobe Zellzahl mittels Spatelplattenverfahren ermittelt. Die Zellzahl stieg in den ersten Tagen sowohl bei dem Wildtypen als auch bei dem Biotensidmutanten stark an und bildete zwischen Tag 3 und Tag 14 ein Plateau mit der höchsten Zellzahl von $1.75 \cdot 10^6$ Zellen/ml an Tag 12. Nach Tag 14 fiel die Zellzahl stark ab. Der Kurvenverlauf des Wildtypen und des Biotensidmutanten zeigten keine signifikanten Unterschiede. In der Negativkontrolle waren zu keinem Zeitpunkt Mikroorganismen nachweisbar. Die Ergebnisse der Wachsanalyse wurden in Substanzklassen aufgeteilt und als Anteil der Gesamtwachsmenge dargestellt (Abb.32). Die Gesamtwachsmenge aller Kutikularmembranen wurde mit $48.49 \pm 2.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ berechnet und setzt sich aus 17 Einzelsubstanzen zusammen. Den größten Anteil mit $91.98 \pm 0.6 \%$ bildeten die Triterpene Ursolsäure, Oleanolsäure und Uvaol. Zudem konnten die Alkane C_{29} und C_{31} identifiziert werden, die mit $3.1 \pm 0.1\%$ der Gesamtwachsmenge die zweitgrößte Fraktion stellten. Organische Fettsäuren (C_{16} bis C_{30}) hatten einen Anteil von $2.2 \pm 0.6 \%$ am Gesamtwachs. Alkohole (C_{24} bis C_{30}) bildeten mit $1.6 \pm 0.08\%$ den kleinsten Anteil am Gesamtwachs. Nach 23 Tagen Inkubation konnte bei den Fettsäuren ein signifikanter Unterschied gemessen werden. Bei der Kontrolle lag der Anteil bei $2.9 \pm 0.3\%$, bei mit Bakterien inkubierten Kutikularmembranen lag der Anteil bei $1.8 \pm 0.2\%$ (Wildtyp) und $1.6 \pm 0.3\%$ (Biotensidmutant).

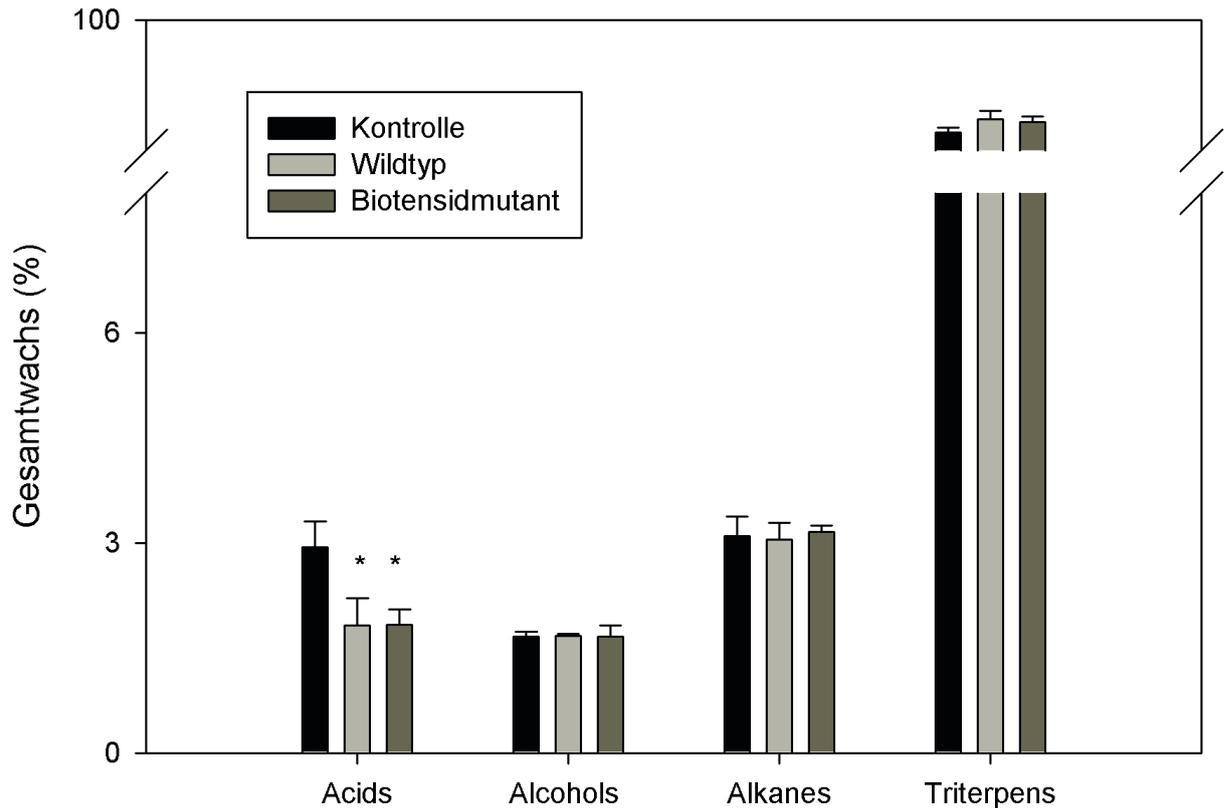


Abb.32 Wachsanalyse von inkubierten Kutikularmembranen.

Relative Darstellung der Ergebnisse der Gaschromatographischen Analyse der inkubierten Kutikularmembranen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei parallelen Analysen aufgeteilt in Substanzklassen. * $p < 0,05$ = signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und behandelten Kutikularmembranen.

3.4.3 Effekt von Zellsuspensionen von *P. fluorescens* auf die Transpiration von *Prunus laurocerasus* Kutikularmembranen

Um den Effekt von Bakteriensuspensionen auf die Transpirationseigenschaften von isolierten Kutikularmembranen zu untersuchen, wurden Zellsuspensionen des Wildtyps und des Biotensidmutanten auf Kutikularmembranen appliziert. Bei einer RLF von 50% steigen beide Kinetiken linear an, nach 300 Stunden lag der Unterschied der gemittelten Werte bei ca. 30% (Abb.33). Auch bei 2% RLF lagen die Messreihen dicht beieinander. Sie stiegen durchgehend streng linear und unterschieden sich nach 300 Stunden um ca. 20% (Abb.34). Die errechneten Effekte bei einer RLF von 50% lagen für den Wildtyp bei $0,99 \pm 0,09$ und für den Biotensidmutant bei $0,99 \pm 0,05$. Bei einer RLF von 2% lagen die errechneten Effekte bei $1,02 \pm 0,2$ für den Wildtyp und $0,99 \pm 0,05$ für den Biotensidmutant.

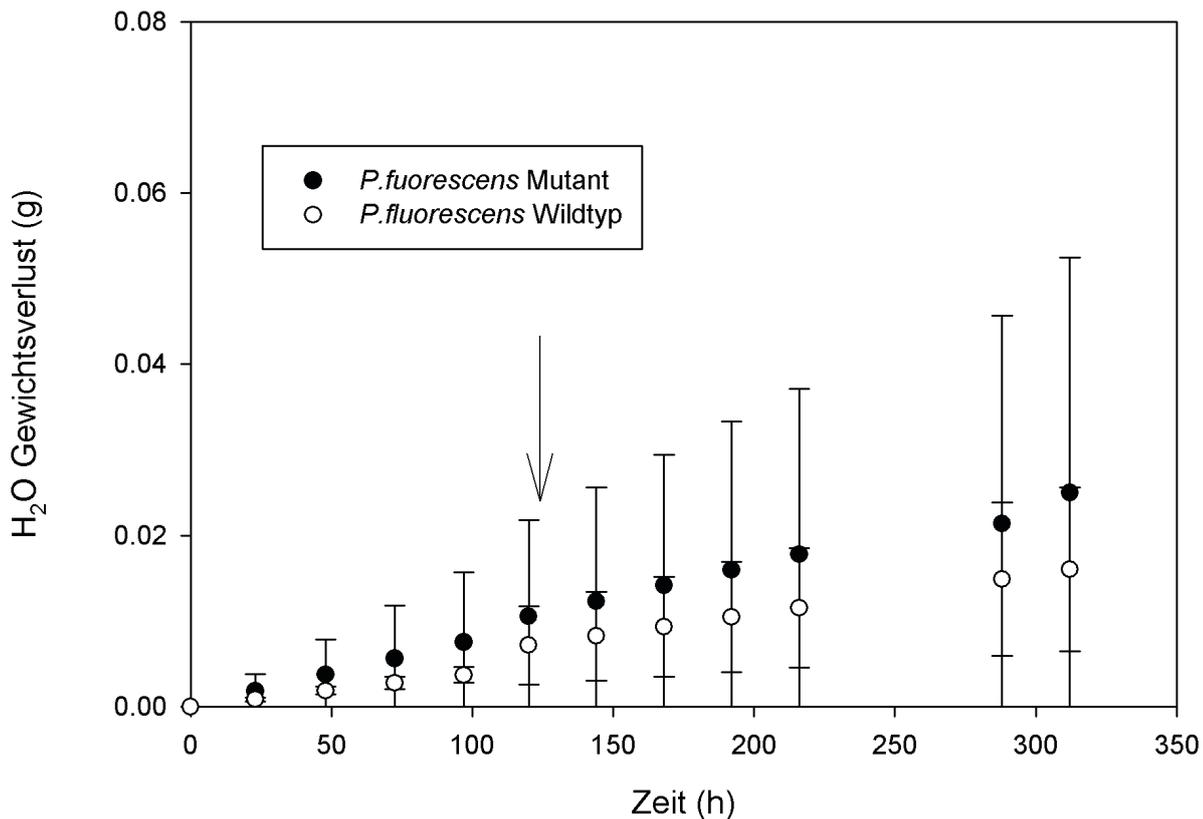


Abb.33 Transpirationskinetik bei 50% RLF mit Bakteriensuspension.

Zusammengefasste Transpirationskinetik von jeweils fünf mit Bakteriensuspension behandelten Kutikularmembranen bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50%. Der Zeitpunkt der Applikation der Zellsuspension ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

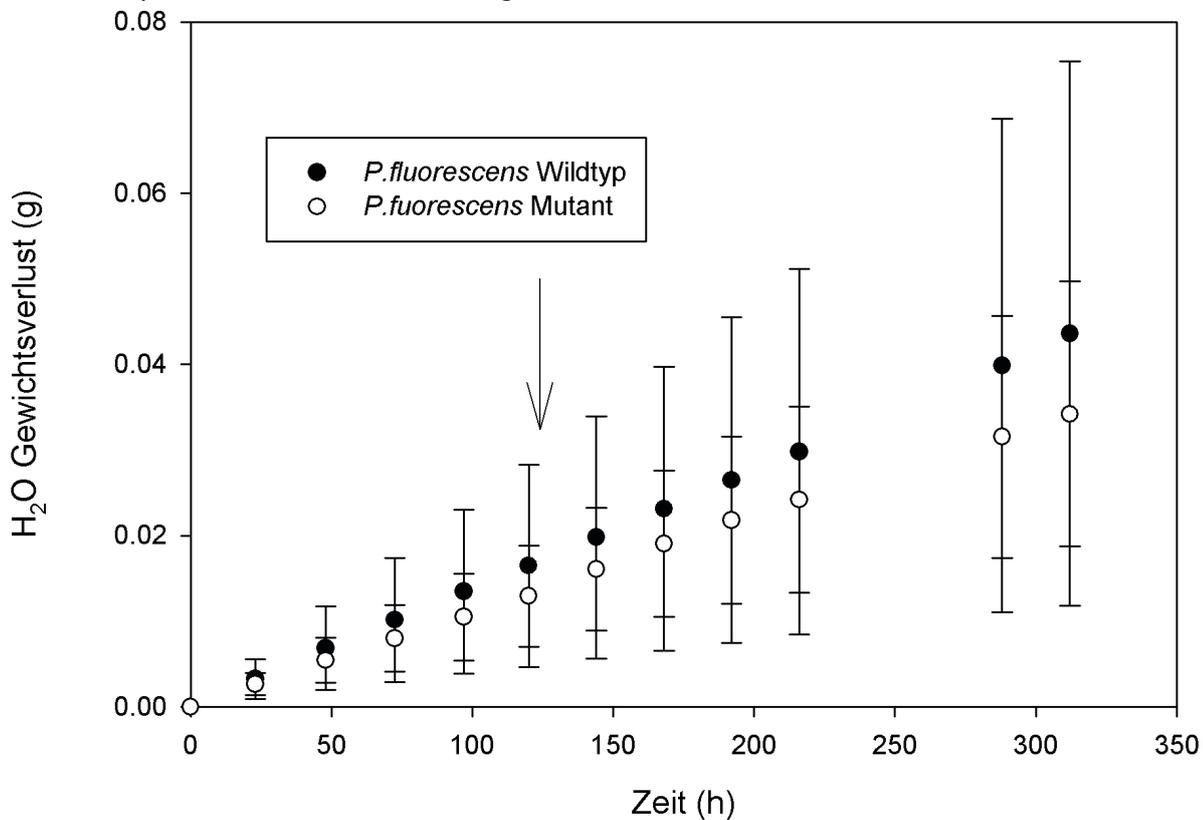


Abb.34 Transpirationskinetik bei 2% RLF mit Bakteriensuspension.

Zusammengefasste Transpirationskinetik von jeweils fünf mit Bakteriensuspension behandelten Kutikularmembranen bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 2%. Der Zeitpunkt der Applikation der Zellsuspension ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

3.4.4 Überlebensrate auf Kutikularmembranen

Um die Überlebensrate von phyllospährischen Bakterien unter möglichst realistischen Umweltbedingungen in Hinsicht auf ihr Substrat und Substratum zu untersuchen, wurde im Laufe dieser Arbeit ein neuer experimenteller Ansatz erarbeitet. Der Nachweis von Bakterien erfolgte dabei indirekt über die quantitative Erfassung von Adenosintriphosphat (ATP) auf zuvor inokulierten Kutikularmembranen. Abbildung 35 zeigt den ersten Versuch mit dieser Methode bei 50% RLF. Nach der Inokulation mit ca. 40000 Zellen pro Kutikel konnten nach 24 Stunden Inkubationszeit bei Wildtyp und Biotensidmutant von *P. fluorescens* SBW25 unter beiden Nährstoffbedingungen ca. 10% der Zellen nachgewiesen werden. An Tag 2 lagen alle Werte erneut dicht zusammen, im Durchschnitt konnten 2760 \pm 280 Zellen nachgewiesen werden, wobei der Biotensidmutant auf 0,1% Glycerin mit durchschnittlich 3160 Zellen den höchsten Wert aufwies. An Tag 3 fielen alle Werte zwischen 19% (Biotensidmutant 1%) und 36% (Wildtyp 1%) im Vergleich zum Vortag.

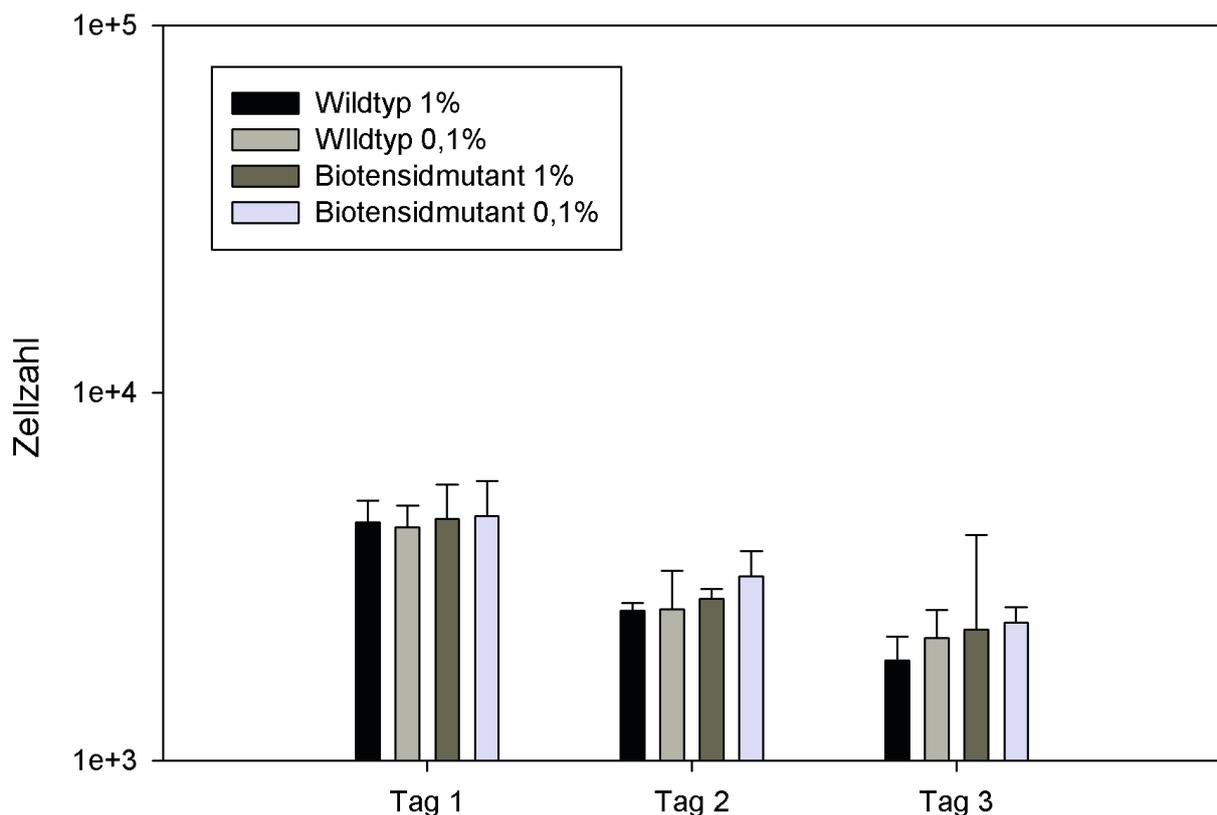


Abb.35 Zellzahlbestimmung über 3 Tage auf isolierten Kutikularmembranen via ATP-Analyse.

Zellzahlbestimmung von Wildtyp und Biotensidmutant auf isolierten Kutikularmembranen mit 1% Glycerin oder 0,1% Glycerin im Medium.

Zu sehen sind die absoluten Zellzahlen pro Kutikel (n=3) errechnet aus der Menge an nachgewiesenen ATP-Moleküle über einen Zeitraum von 3 Tagen.

Das Experiment wurde erneut durchgeführt, die „Künstlichen Blätter“ (2.6.3) aber über einen Zeitraum von 10 Tagen bei 50% RLF inkubiert. An vier Tagen wurden Proben genommen und für die spätere ATP-Analyse weggefroren. An Tag 1 lagen alle Werte, bis auf den des Wildtyps mit 130 Zellen (1%), bei 2% der applizierten Zellen (Abb.36). An Tag 5 stieg die nachweisbare Zellzahl des Wildtyps, als auch die der Biotensidmutanten mit 1% Glycerin stark an. Der Wildtyp lag bei ca. 1400 Zellen und der Biotensidmutant bei ca. 23000 Zellen. Beide Proben mit 0,1% Glycerin lagen mit 180 (Wildtyp) und 360 (Biotensidmutant) Zellen deutlich darunter. An Tag 7 stiegen alle Werte stark an wobei die 1% Proben von Wildtyp und Biotensidmutant um 1-2 Potenzen über den 0,1% Proben lagen. Der Wildtyp lag mit ca. 84000 Zellen deutlich über dem Biotensidmutant mit ca. 46000 Zellen. An Tag 10 nahmen die Zellzahlen der 1% Proben um ca. 15% ab. Bei den 0,1% Proben veränderte sich Zellzahl des Biotensidmutanten kaum, während die des Wildtypen um ca. 30% zunahm.

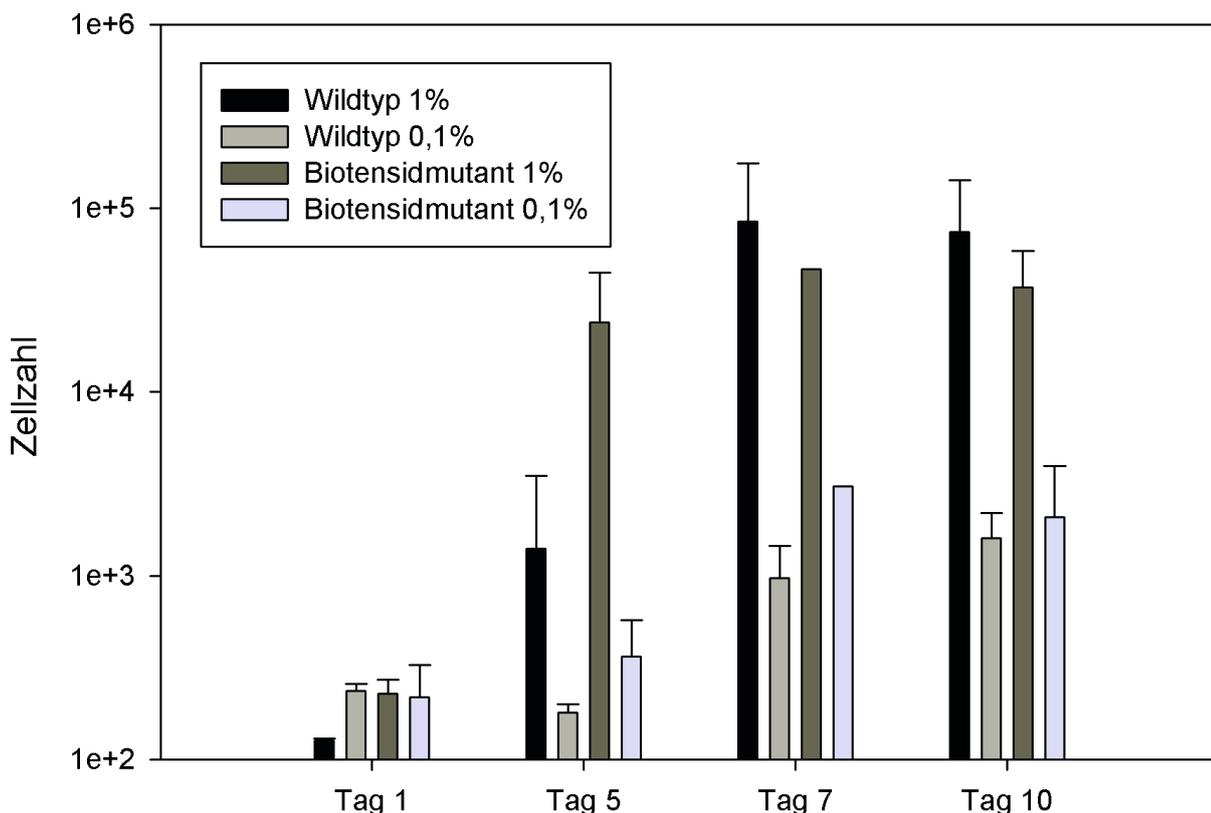


Abb.36 Zellzahlbestimmung über 10 Tage auf isolierten Kutikularmembranen via ATP-Analyse.

Zellzahlbestimmung von Wildtyp und Biotensidmutant auf isolierten Kutikularmembranen mit 1% Glycerin oder 0,1% Glycerin im Medium. Zu sehen sind die absoluten Zellzahlen pro Kutikel ($n=3$), errechnet aus der Menge an nachgewiesenen ATP-Molekülen. Über einen Zeitraum von 10 Tagen wurden vier Proben genommen.

4. Diskussion

Phyllosphärische Mikroorganismen sind hoch spezialisierte Bewohner in einer physiologisch und ökologisch betrachtet sehr unwirtlichen und komplexen Umwelt. Einige Mikroorganismen können diese Umgebung aktiv verändern und die physikochemischen Bedingungen in ihrem Habitat zu ihren Gunsten beeinflussen. Vor allem die Produktion von Biotensiden, welche an einer Vielzahl von Interaktionen zwischen Pflanzen und Bakterien beteiligt sind, bieten auf unterschiedlichste Art und Weise Vorteile für das Überleben der Mikroorganismen in der Phyllosphäre (Raaijmakers *et al.*, 2010). Ob und inwiefern Biotenside die Überlebensrate von Bakterien auf Blattoberflächen durch physiologische Effekte - wie eine erhöhte Diffusionsrate von Stoffen aus dem Apoplast oder eine Verbesserung der C-Quellen Verfügbarkeit - steigern, war die zentrale Frage dieser Arbeit. Fragestellungen bei denen ein bereits identifiziertes Gen oder Molekül im Zentrum steht, können gut mit Knockout-Mutanten untersucht werden. Alle Veränderungen des Mutanten gegenüber dem Wildtypen können auf das Fehlen des Zielmoleküls zurückgeführt werden. Ob diese Veränderungen einen Einfluss auf die biologische Fitness haben, kann nur in möglichst natur getreuen und empfindlichen Experimenten über längere Zeiträume untersucht werden. Diese Arbeit lässt sich inhaltlich in zwei Teile untergliedern. Im ersten Teil wurde eine Transposonmutagenese von phyllosphärischen, Biotensid produzierenden Bakterien durchgeführt, mit dem Ziel Biotensid-defiziente Mutanten zu erhalten und diese anschließend physiologisch zu untersuchen. Im zweiten Teil wurde ein experimenteller Aufbau erdacht der eine genauere, nicht-mikroskopische Untersuchung der Überlebensraten von *P. fluorescens* SBW25 und seinem korrespondierenden Biotensidmutanten auf isolierten Kutikularmembranen ermöglicht.

4.1 Transposonmutagenese und physiologische Auswirkungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Pseudomonaden gehören alle zu der Gruppe der fluoreszierenden Pseudomonaden und wurden aus der Phyllosphäre von anuellen Pflanzen isoliert (Daboussi *et al.*, 1999; Behrendt *et al.*, 2003; Behrendt *et al.*, 2007). Alle Stämme wurden aufgrund Ihrer Fähigkeit, Biotenside zu produzieren (nicht publizierte Arbeiten:

Lindemann, Bruun, Petruschke), ausgewählt. Mit Hilfe einer Tn5 Transposonmutagenese wurden von jedem Stamm Mutanten erzeugt, die nicht mehr in der Lage waren Biotenside zu produzieren. Das Atomised Oil Assay (2.4.7) war in dem Zusammenhang ein sehr brauchbares Hochdurchsatz-Screening, insbesondere durch den geringen technischen Aufwand und die leichte qualitative Auswertung (Burch *et al.*, 2010). Für diese Arbeit wurde die Methode dahingehend abgeändert, dass Minimalmedium verwendet wurde um Defekte und Unterschiede im Wachstum und Stoffwechsel, die nicht an der Biotensidproduktion beteiligt sind, sie aber indirekt quantitativ beeinflussen, im Vorhinein zu erkennen und auszuschließen. Alle Mutanten, die keinen erkennbaren Hof bildeten (3.1), wurden ausgewählt und mit einer PCR auf das Transposon getestet. Durch ihre Fähigkeit, auf Agar mit Kanamycinzusatz zu wachsen, war es sehr wahrscheinlich, dass sie das Transposon mit der Kanamycinresistenz in ihr Genom integriert hatten (3.1). Da Biotenside die Oberflächenspannung von Flüssigkeiten auch in geringen Konzentrationen herabsetzen (Miller-Meier *et al.*, 1998) wurden die Kulturüberstände aller positiven Klone eines Stammes auf ihre Oberflächenspannung getestet, um jene mit komplett ausgeschalteter Biotensidsynthese zu identifizieren (3.2.6). Der Mutant eines jeden Stammes wurde ausgewählt, dessen Kulturüberstand die gleichen Oberflächenspannungswerte hatte wie der der Agarkontrolle. Um sicher zu gehen, dass sich keine Stoffwechselmutanten unter den ausgewählten Biotensidmutanten befinden, wurden Wachstumskurven mit Komplex- und Minimalmedium durchgeführt (3.2.1; 3.2.2). Die Ergebnisse bestätigten, dass es weder signifikante Unterschiede in den errechneten Verdopplungszeiten gab, noch eine klare Tendenz zwischen den Biotensidmutanten und den Wildtypen zu erkennen war. In dem Komplexmedium vermehrten sich die Stämme mit Verdopplungszeiten zwischen 79 und 180 Minuten (Abb.13). In der Literatur finden sich keine konkreten Verdopplungszahlen unter ähnlichen Bedingungen zu den gleichen Stämmen. Ein Stamm von *P. aeruginosa* hatte in einem vergleichbaren Komplexmedium (LB, lysogeny broth) eine Verdopplungszeit von 139 Minuten und würde somit zwischen den hier untersuchten Stämmen liegen (Yang *et al.*, 2008). Mit der gleichen Tendenz unter den Stämmen und wieder gleichen Verdopplungszeiten zwischen Wildtypen und Biotensidmutanten, lagen die errechneten Zeiten bei 120 und 220 Minuten in Minimalmedium (Abb.15). Dass die Verdopplungszeiten bei einem Wachstum in Minimalmedium länger sind, ist mit dem erhöhten biochemischen Aufwand für die Synthese von zum Beispiel Aminosäuren zu erklären (Fuchs 2014, 9.Aufl.). Weitere Untersuchungen der Kulturüberstände bekräftigten die Vermutung, dass die ausgewählten Mutanten kein Biotensid mehr produzierten. So war kein

Biotensidmutant mehr in der Lage, sich auf 0,4% Agar auszubreiten (Tab.10). Die Fähigkeit zum swarming ist eng verknüpft mit der Fähigkeit ein Biotensid zu produzieren. So konnten Massetolid-A defiziente Mutanten von *P. fluorescens* SS101 und Surfactin defiziente Mutanten von *B. subtilis* auf 0,6% Agarplatten nicht swarmen (Raijmakers *et al.*, 2010). Alsohim *et al.* konnten ebenfalls Transposonmutanten von *P. fluorescens* SBW25 herstellen. Eine Mutante war in dem Gen *viscC*, die andere Mutante in dem Gen *viscB* von dem Knock-Out betroffen und beide waren nicht in der Lage zu swarmen (Alsohim *et al.*, 2014). Die Komplementierung von Biotensidmutanten mit fremden Biotensiden konnte die Beweglichkeit auf Agaroberflächen wiederherstellen. So konnten Biotensidmutanten von *S. marcescens* sowohl mit dem eigenen Biotensid Serrawettin als auch mit dem Tensid Surfactin aus *B. subtilis* auf Agaroberflächen swarmen (Matsuyama *et al.*, 1995). Ein weiterer Versuch, um den Verlust der Biotensidproduktion zu testen, ist den Kulturüberstand der jeweiligen Bakterienfraktionen zu schütteln. Bei Biotensidproduktion entsteht ein stabiler Schaum, der sich auf für Minuten hält (Souza *et al.*, 2003). Die Biotensidmoleküle lagern sich dabei in zwei Monolayern um eine dünne Wasserschicht wobei sich der hydrophobe Teil jeweils in das Innere der Blase oder zur Atmosphäre hin orientiert (Hailing und Walstra 1981). Die Überstände aller Wildtypen konnten positiv auf eine Schaumbildung getestet werden, wohingegen die Überstände ihrer korrespondierenden Biotensidmutanten alle negativ waren (Tab.11). Der im Vergleich zu der Wasserkontrolle auftretende leichte, instabile Schaum (Abb.17) der Biotensidmutanten ist auf Zellrückstände abgestorbener Bakterien und Spuren sonstiger sezernierter Stoffe wie Pyoverdine, die von allen fluoreszierenden Pseudomonaden sezerniert werden, zurückzuführen (Merriman *et al.*, 1995). Nach diesen qualitativen Tests auf eine Biotensidproduktion wurden die Überstände mit dem DSA von Krüss untersucht, um auch etwaige minimale Veränderungen der Oberflächenspannung der Kulturüberständen aufzudecken (3.2.5-3.2.8). Die Ergebnisse der Messungen am hängenden Tropfen (3.2.6) zeigen eindeutig die starke Wirkung der bakteriellen Biotenside. Die Oberflächenspannung der Lösung aller Tenside wurde auf ca. 26mN/m herabgesetzt. Die Überstände der Biotensidmutanten verhielten sich wie die Negativkontrolle und wiesen keine veränderte Oberflächenspannung auf. Die gemessenen Werte der Wildtypen sind vergleichbar mit Literaturangaben bezüglich der Oberflächenspannung von Kulturüberständen von Biotensid produzierenden Bakterien. So setzte Massetolid-A von *P. fluorescens* SS101 die Oberflächenspannung auf 30mN/m herunter, Viscosin von *P. libanensis* ebenso wie ein von *Bacillus* BAS50 produziertes Biotensid lagen bei 28 mN/m (Souza *et al.*, 2003, Saini *et al.*, 2008, Yakimov *et al.*, 1995). Bei der Be-

stimmung der Kontaktwinkel auf künstlichen und natürlichen hydrophoben Oberflächen ergab sich ein ebenso homogenes Bild. Die Kontaktwinkel der Biotensidmutanten entsprachen auf beiden Oberflächen denen der Agarkontrolle (3.2.5). Die Kontaktwinkel der Wildtypen lagen auf Parafilm zwischen 43° und 73° und auf isolierten Kutikularmembranen bei durchschnittlich 35° . Unebene Struktur auf der Kutikularmembran, wie die Blattnervatur oder die Vertiefungen an Zell-Zellverbindungen, ermöglichen den Überständen mit Biotensid eine stärkere Ausbreitung auf der Kutikularmembran als auf der gleichmäßigen hydrophoben Oberfläche des Parafilms. Durch die Biotenside wird die Oberflächenspannung reduziert und die Benetzbarkeit der hydrophoben Oberfläche erhöht (Rosenberg 1985). In der Phyllosphäre bietet dies den Bakterien den Vorteil, dass Wassertropfen besser auf den Blättern spreiten, sie also besser benetzen können und somit die Feuchtigkeit auf der Blattoberfläche erhöht wird. Dadurch wird auch ihre Fähigkeit gefördert, sich auf Blattoberflächen auszubreiten (Alsohim *et al.*, 2014). Biofilme stellen eine weitere Möglichkeit für Bakterien dar, die Überlebensbedingungen in der Phyllosphäre zu Ihren Gunsten zu verändern. So bindet die ECM viel Wasser und schützt Bakterien vor der Austrocknung (Costerton *et al.*, 1995, Monier und Lindow 2004). Die Ergebnisse der Biofilmbildung bei Wildtypen und Biotensidmutanten auf verschiedenen Nährmedien ergaben ein komplexeres Bild als die anderen Untersuchungen. Es gab keine einheitliche Tendenz. So produzierten die Biotensidmutanten von *P. fluorescens* SBW25 und *P. cedrina* 20%-30% mehr Biofilm, während der Biotensidmutant von *P. luri* 25% weniger Biomasse produzierte. Bei *P. poae* war kein signifikanter Unterschied auszumachen (3.2.7). Alle Stämme produzierten in Minimalmedium ca. 80% weniger Biomasse als auf Komplexmedium, was nicht zwingend nur mit einer nährstoffärmeren Umgebung zusammenhängt (Costerton *et al.*, 1995), sondern auch mit den geringeren Verdoppelungszeiten in Minimalmedium (3.2.2). Ein in einer anderen Arbeit untersuchter Biotensidmutant von *P. luorescens* SBW25, der wie der in dieser Arbeit besprochene Biotensidmutant in dem Gen *viscB* beeinträchtigt war, produzierte auf KB Medium deutlich weniger Biofilm als der Wildtyp (De Bruijn *et al.*, 2007). Dies könnte an dem unterschiedlichen experimentellen Aufbau liegen. In dieser Arbeit wurden große 12-Well Platten (2ml) verwendet und keine kleinen Well-Platten (200µl). Es gibt entsprechend eine größere „frei schwimmende“ Oberfläche, was zu anderen statischen und strukturellen Bedingungen führt. Biotenside haben einen starken Einfluss auf die Entwicklung von Biofilmen und können sowohl als Signalmoleküle fungieren (Raijmakers *et al.*, 2010) als auch durch ihre Tensideigenschaften zum Beispiel bei der Aufrechterhaltung von sogenannten Wa-

ter Channels, kleinen Kanälen die den Fluss von Wasser und Soluten durch einen Biofilm ermöglichen, beteiligt sein (Klausen *et al.*, 2003). Ein linearer Zusammenhang zwischen Biotensid und Biofilm ist dabei nicht gegeben sondern der Zusammenhang scheint von Stamm und Biotensid abzuhängen. So produzierte ein Biotensidmutant von *P. fluorescens* (Massetolid A) weniger Biofilm als der Wildtyp (De Bruijn *et al.*, 2008), ein anderer Biotensidmutant von *P. fluorescens*.sp. MIS38 (Arthrofactin) produzierte hingegen mehr Biofilm (Roongswang *et al.*, 2003). Um die Biotenside genauer zu charakterisieren wurde die Kritische Mizzellkonzentration (CMC) der vier Biotenside ermittelt. Die CMCs der Biotenside lagen zwischen 9 µg/ml und 90 µg/ml Biotensid (3.2.8). Diese Werte sind für Biotenside nicht unüblich. So liegt die CMC von einem von *Bacillus* BAS50 produzierten Biotensid bei 12 µg/ml (Yakimov *et al.*, 1995) und die von Massetolid-A bei 25 µg/ml (Souza *et al.*, 2003), kann aber wie im Falle von Syringomycin mit 1250 µg/ml auch deutlich höher liegen (Roongsawang *et al.*, 2010). Die CMC des von *P. fluorescens* SBW25 produzierten Viscosin konnte als 18 µg/ml bestimmt werden und passt somit genau zwischen die voneinander abweichenden Literaturwerte von 54 µg/ml (Saini *et al.*, 2008) und 10 µg/ml (De bruijn 2007). Die CMC von *P. cedrina* lag bei 23 µg/ml was gut zu den Werten von Viscosin passt. Die CMC der Biotenside von *P. lurida* und *P. poae* lagen um den Faktor 10 mit 9 µg/ml und 90 µg/ml auseinander. Die Änderung der Wasserpermeabilität von isolierten Kutikularmembranen durch Biotenside wurde in Experimenten mit Transpirationskammern untersucht, jedoch konnte bei keinem der vier Biotenside eine Steigerung der Transpirationsrate gemessen werden (3.2.9). Die errechneten Leitwerte der isolierten Kutikularmembranen von durchschnittlich $3.9 \times 10^{-10} \text{ m/s}$ stimmen mit Literaturangaben überein (Schreiber und Schönherr 2009). Es ist nicht auszuschließen, dass manche Biotenside die Transpiration über Kutikularmembranen direkt befördern. So konnten Kulturüberstände von *P. syringae* die Wasserleitfähigkeit von isolierten Kutikularmembranen von *P. laurocerasus* verdoppeln (Burch *et al.*, 2014). Es ist anzunehmen, dass jedes Biotensid aufgrund seiner Struktur unterschiedliche Funktionen hat. Trotzdem können strukturverwandte Biotenside durchaus die gleiche Aufgabe übernehmen, was Komplementierungsversuche mit stammfremden Biotensiden der gleichen Klasse nahelegen (Matsuyama *et al.*, 1995). Die getesteten Biotenside, die alle zur Viscosin-Gruppe zählen (3.2.10), unterscheiden sich durch die in ihrem Peptid integrierten Aminosäuren, den Fettsäureresten und der Art der Ringbildung von den Biotensiden der Syringomycin (Syringafactin)- Gruppe (Raaijmakers *et al.*, 2010). Das könnte erklären, warum kein Effekt auf die Transpiration festgestellt werden konnte. Um die Struktur der Biotenside aufzuklären

wurden aufgereinigte Extrakte der vier Biotenside mit Hilfe eines LC-MS/MS untersucht. Das von *P. fluorescens* SBW25 und *P. cedrina* produzierte Biotensid konnte anhand des Hauptpeaks bei 1124.6m/z (Abb.29) und seiner Zerfallsprodukte (Saini *et al.*, 2008) als Viscosin identifiziert werden. Die Spektren der Biotenside, die von *P. lurida* und *P. poae* produziert wurden, waren bis auf minimalste Unterschiede identisch (Abb.29), was den Schluss zulässt, dass es sich um ein sehr ähnliches Biotensid handelt. Dies wiederum ist durch die phylogenetische Nähe der beiden Stämme zu erklären (Belgacem *et al.*, 2015). Der Hauptpeak bei 1138m/z (M-H⁺) würde zu Massetolid-A passen, jedoch ergibt die Fragmentierung ein anderes Muster (De Bruijn *et al.*, 2008). Dies könnte bedeuten, dass die chemische Zusammensetzung die gleiche wie bei Massetolid-A ist, eine andere Anordnung der Aminosäuren aber zu einer anderen Fragmentierung führt. Die Ergebnisse der genetischen Analysen der ausgeschalteten Gene und der massenspektrometrischen Untersuchungen der Biotenside passen gut zusammen. Die BLAST Analysen der gewonnenen Gensequenzen zeigten, dass der Biotensidmutant von *P. fluorescens* SBW25 einen Knock-Out in dem Gen *viscB* hat. Das Gen *viscB* gehört mit *viscA* und *viscC* zu einem Open Reading Frame (ORF), welches eine nichtribosomale Peptidsynthase (NRPS) kodiert (Alsohim *et al.*, 2014). NRPS sind Enzymkomplexe, die modular aufgebaut sind und die Makromoleküle, meist mit Peptidomäne, unterschiedlichster Zusammensetzung ohne mRNA-Vorlage synthetisieren können (Marahiel *et al.*, 1997). Zyklische Lipopeptide (CLPs) werden generell von NRPS produziert (Raijmakers *et al.*, 2006). Die Gensequenz von *P. cedrina* hatte eine 99% Kompatibilität mit einer nicht weiter charakterisierten NRPS aus *P. orientalis* F9 und eine 84% Ähnlichkeit zu *viscB*. Durch den modularen Aufbau ähneln sich die Sequenzen aller NRPS. Sie können also auch mit leicht unterschiedlicher Sequenz das gleiche Peptid produzieren (Marahiel *et al.*, 1997). Die Gensequenz, die aus den positiven Klonen von *P. poae* gewonnen werden konnte, hatte eine 100% Homologie zu dem Massetolide-A Biosynthese Gen-Cluster von *Pseudomonas fluorescens* SS101, was die Ergebnisse aus der massenspektrometrischen Untersuchung stützt. Die strukturelle Verwandtschaft von Viscosin und Massetolid-A (3.2.10) wird durch die genetischen Untersuchungen gestützt. So besteht der ORF von *P. fluorescens* SBW25, der für die Biotensidproduktion verantwortlich ist, aus *viscA*, *viscB* und *viscC*, während der ORF, der in *P. fluorescens* SS101 für die Massetolid-A Synthese verantwortlich ist, aus den Genen *massA*, *massB* und *massC* aufgebaut ist (De Bruijn und Raaijmakers 2009). Bei *P. lurida* war ein Gen von der Transposonmutagenese betroffen, welches der *lysR*-Familie zugeordnet werden kann. Dabei handelt es sich um eine Familie von Genen, die regulato-

rische Aufgaben übernehmen und unter anderem bei dem Quorum sensing und der Motilität eine Rolle spielen können (Maddock und Oysten 2008). Die Verknüpfung von Quorum sensing und Motilität mit Biotensiden legt die Vermutung nahe, dass auch die Produktion von Biotensiden, in diesem Falle von einem Massetolid-A Derivat, von *lysR* in *P. lurida* gesteuert wird.

4.2 Weiterführende Experimente an *P. fluorescens* als Modellorganismus für phyllosphärische Bakterien

Die Genexpression hängt bei Bakterien sehr stark von jeglichen Umwelteinflüssen ab und ca. 10% des bakteriellen Genoms übernehmen diese regulatorische Aufgaben (Fuchs 2014, 9. Aufl.). Auch die Produktion von Biotensiden wird gesteuert (Marahiel 1997), da eine genaue und zielgerichtete Sekretion bei der Biofilmbildung oder dem swarming durch eine wirkungsvolle Regulation gewährleistet sein muss (Ward *et al.*, 2006). Um zu untersuchen, ob und wann die Biotensidproduktion bei *P. fluorescens* – unter Bedingungen, die denen in der Phyllosphäre gleichen – einsetzt, wurden Kutikularmembranen mit dem Wildtypen sowie im Vergleich mit dem Biotensidmutant inokuliert und die Biotensidproduktion indirekt über einen applizierten Tropfen Wasser verdeutlicht (3.4.1). Unmittelbar nach der Eintrocknungsphase waren keine Unterschiede an einem aufgesetzten Wassertropfen zu erkennen. Nach 24 Stunden hatten die wenigen auf der Kutikula lebenden Bakterien des Wildtypen genug Biotensid produziert um einen Tropfen Wasser zum Kollabieren zu bringen. Durch den Abgleich mit dem Biotensidmutant wurde deutlich, dass der Effekt auf das Biotensid zurückzuführen ist und keine anderen Stoffwechselprodukte an der Herabsetzung der Oberflächenspannung beteiligt waren. In Flüssigkulturen von *P. fluorescens* SBW25 beginnt die Biotensidproduktion erst nach Erreichen der Plateauphase, was ein Zeichen für die Verknüpfung von Quorum sensing und Populationssteuerung mit dem produzierten CLP ist (de Kock *et al.*, 2006). Es gibt viele Hinweise darauf, dass Biotenside bei anderen Pseudomonaden auch mit der Steuerung von Vermehrung und der Populationsdichte zu tun haben und ihre Produktion stark abhängig von den Umweltbedingungen ist. Dabei kann die Expression jedoch schon von Stamm zu Stamm unterschiedlich reguliert sein (Nybroe und Sorensen 2004). So spielt das klassische Quorum sensing signal Molekül (QSS) N-Acyl-Homoserin-Lacton (N-AHL) bei der Produktion von Massetolid-A bei *P. fluorescens* R1SS101 keine Rolle (de Kock *et al.*, 2006), bewirkt aber

bei dem Pflanzenpathogen *P. fluorescens* 5064 eine Produktion des CLP Viscosin (Cui *et al.*, 2005). Die Ergebnisse der qPCR von frühen logarithmischen Flüssigkulturen (geringe erwartete Expression) und Biofilmkulturen (hohe erwartete Expression) weisen im Falle von *P. fluorescens* SBW25 keine signifikanten Unterschiede auf, was auf eine Regulation abseits der Translationshäufigkeit der NRPs hindeutet, die das Biotensid produziert. In der Literatur werden hauptsächlich zwei Arten der Regulation von NRPs genauer charakterisiert, die an der Produktion von Biotensiden beteiligt sind. Zum einen das GacA/GacS Zwei-Komponenten-System, welches als Hauptschalter für die Regulation gesehen werden kann. Eine Mutation in einem der beiden Gene führt zu einem kompletten Verlust der CLP-Produktion in Pseudomonaden (Kitten *et al.*, 1998; Rajmakers *et al.*, 2010). Zum anderen die LuxR-Proteine, die meist vor und hinter den Genen für die NRPs liegen. Sie beinhalten typische Helix-turn-Helix Motive (HTH) und können mit dieser Region an DNA binden und als Transkriptionsfaktor wirken (Gross *et al.*, 2006). Dies sind aber alles nur Regulationen auf der Translationsebene, welche bestimmen, wie viele NRPs produziert werden, jedoch nicht deren Aktivität beeinflussen. Es ist denkbar, dass zusätzlich zu den bekannten Regulationsmechanismen eine Regulation der Aktivität der NRPs erfolgt. Beispielweise durch posttranslationale Phosphorylierung. Da alle Schritte der Synthese eines CLP durch die NRPs alleine durchgeführt werden (de Kock *et al.*, 2006), ist eine Regulation über die Aktivität weiterer Enzyme, die z.B. für die Veresterung mit dem Fettsäureschwanz zuständig wären, unwahrscheinlich. Auch die Regulation über das Angebot an Substrat ist unwahrscheinlich, da Aminosäuren und Fettsäuren in der Zelle ubiquitär vorhanden sind.

Um zu überprüfen, ob Bakterien von *P. fluorescens* in der Lage sind, ohne andere externe Kohlenstoff- und Energiequelle und damit nur auf kutikulären Wachsen zu überleben und ob der Wildtyp gegenüber der Biotensidmutante einen Vorteil hat, wurden beide Stämme wie in 2.3.1.4 beschrieben angezogen. Durch die Ermittlung der Lebendzellzahl konnte eine rapide Zunahme der Zellzahlen gefolgt von einer mehrtägigen Plateauphase und einer anschließenden Abnahme beider Stämme beobachtet werden. Die Zunahme der Zellzahl in den ersten 3 Tagen deutet auf eine verfügbare Kohlenstoff- und Energiequelle hin. Da in dem Medium keine andere Kohlenstoff- und Energiequelle vorhanden war als der Kohlenstoff, der in den kutikulären Wachsen oder in dem Kutinpolymer gebunden ist, müssen sich beide Stämme von einem oder beidem ernährt haben. Das Heteropolymer Kutin ist dabei die unwahrscheinlichere Quelle. Unter 232 aus der Umwelt

isolierten Pseudomonaden konnte nur bei drei Stämmen eine Monomerisierung von Apfel-Kutin in Komplexmedium beobachtet werden, was nur der erste Schritt einer kompletten Metabolisierung darstellt (Jones 1992). Ein nicht näher charakterisierter Stamm von *Pseudomonas* war hingegen in der Lage, das Triterpen Ursolsäure, einem Hauptbestandteil der kutikulären Wachse von *Malus domestica*, als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zu verstoffwechseln (Kolattukudy und Hankin 1969). In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass von 37 Umweltisolaten, die auf hydrophobem Wollwachs als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen konnten, jene mit der stärksten Biotensidproduktion auch das stärkste Wachstum zeigten (Roper 2004). Die gaschromatographischen Ergebnisse der Wachsanalyse zwischen inokulierten und nicht inokulierten Kontrollkulturen zeigen eine deutliche Abnahme bei der Menge der organischen Säuren (3.4.2), aber keine signifikanten Unterschiede bei den restlichen Wachsfraktionen wie Alkoholen oder Triterpenen. Kurzkettige Fettsäuren können bei Prokaryoten durch Diffusion, einen noch ungeklärten Transport, sowie möglicherweise Porine in die Zellen gelangen und durch β -Oxidation abgebaut werden (Segura *et al.*, 2017; Rodriguez-Moyá und Gonzalez 2015). Langkettige Fettsäuren hingegen müssen aktiv transportiert werden und benötigen spezialisierte Membranproteine wie FadL und FadD bei *E. coli* (Black 1990). Auch Pseudomonaden besitzen Gene mit einer hohen Homologie zu *fadL* und *fadD* und sind in der Lage, langkettige Fettsäuren abzubauen und zu verwerten (Hoang *et al.*, 2013). Zwischen dem Wildtypen und der Biotensidmutante konnte dabei kein Unterschied festgestellt werden, was darauf hin deutet, dass das von *P. fluorescens* SBW25 produzierte Viscosin keinen Einfluss auf die biologische Verfügbarkeit von langkettigen, festen und wasserunlöslichen Bestandteilen von isolierten Kutikularmembranen hat. Die Verfügbarkeit von wasserunlöslichen aber flüssigen Alkanen wie Hexadecan hingegen kann durch die Anwesenheit eines Biotensids gefördert oder erst ermöglicht werden. Ein rhamnosyltransferase-Mutant von *P. aeruginosa*, der das Biotensid Rhamnolipid nicht mehr produzieren konnte, war im Gegensatz zu einem mit Wildtypgenen komplementierten Stamm nicht in der Lage, Hexadecan zu verstoffwechseln (Reiser *et al.*, 1994). In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von Hexadecan bei Biotensid produzierenden Stämmen von *P. aeruginosa* schneller erfolgt als bei Stämmen ohne Biotensid. Bei Wachstum auf Hexadecan als einziger Kohlenstoffquelle können in Zellen von *P. aeruginosa* kleine Einschlusskörper beobachtet werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass ein Aufnahmeweg über kleine Vesikel existiert, der durch Biotenside ermöglicht oder verstärkt wird (Beal und Betts 2000). Durch den emulgierenden Effekt trägt ein Biotensid

dazu bei, dass die biologisch erreichbare Oberfläche maximiert und eine Interaktion mit dem hydrophoben Substrat ermöglicht wird (Van Dyke *et al.*, 1993). Aus den Ergebnissen der Überlebensrate über drei Tage lässt sich ableiten, dass die Methode genau genug ist, um auch kleinere Schwankungen im Bereich von einigen 100 Zellen aufzulösen und die Abweichungen der Daten im Vergleich zu einem mikroskopischen Ansatz deutlich kleiner sind (3.4.4). Ein weiterer Vorteil dieser Methode gegenüber klassischen Methoden – wie dem Homogenisieren (Zeier *et al.*, 2004) oder dem Abwaschen der bakteriellen Zellen (Greenberg *et al.*, 2012; Burch *et al.*, 2014) – liegt darin, dass durch die angestrebte komplette Lyse aller Zellen mit Hilfe von Temperatur- und osmotischen Schocks alle Zellen erfasst werden. Da manche Bakterien in der Lage sind sich irreversibel an Blattoberflächen zu binden (Romatschuck 1992) und die meisten Zellen in Mikrokolonien und Biofilmen gebunden sind (Lindow und Leveau 2002), die sich nur schlecht mit Ultraschall oder durch physische Agitation komplett aufschließen lassen, wird bei den oben genannten Methoden immer nur ein Teil der Zellen erfasst und ein unbestimmter Anteil verbleibt auf der Oberfläche. Vorversuche mit einem mikroskopischen Ansatz verbunden mit einer Lebend/Tod-Färbung ergaben sehr hohe Abweichungen in den Zellzahlen, die auch auf die zufällige Auswahl der ausgezählten Bereiche beziehungsweise die inhomogene Verbreitung von Bakterien auf Blattoberflächen zurückzuführen ist (Monier und Lindow 2004). Die starke Abnahme der Zellzahl um 90% innerhalb der ersten 24 Stunden ist die Reaktion der Zellen auf die geänderten Lebensbedingungen und das knappe Nahrungsangebot. Im Verlauf der ersten drei Tage sind keine Unterschiede zwischen den Zellzahlen des Wildtypen und des Biotensidmutanten zu erkennen (Abb.35). In einem Folgeexperiment wurde der Messzeitraum verlängert und nach einer Akklimatisierungsphase von drei Tagen stiegen die gemessenen Zellzahlen (Abb.36). Aus den Unterschieden der Zellzahlen im Folgeexperiment die ab Tag 5 deutlich wurden und bis zum Ende der Messreihe Bestand hatten, ergeben sich zwei Hauptschlussfolgerungen. Erstens: die Bakterien können das Nahrungsangebot unterhalb der Kutikel trotz Diffusionsbarriere nutzen, was durch das Wachstum und den Unterschied zwischen den Zellzahlen auf 1% und 0,1% gezeigt wird. Zweitens: Viscosin erhöht die Überlebensrate in diesem experimentellen Aufbau nur geringfügig. Eine direkte starke Steigerung des Leachings von organischen Molekülen durch das Biotensid Viscosin kann durch die geringe Differenz zwischen Wildtypen und Biotensidmutante ausgeschlossen werden. Es ist wahrscheinlich, dass Viscosin durch seinen hygroskopischen Effekt die Ausbildung eines Wasserfilms auf der Kutikula begünstigt und dadurch die passive Diffusion von gelösten Stoffen aus dem Blattinneren leicht

erhöht (Burch *et al.*, 2014). So geht eine erhöhte Benetzbarkeit der Blattoberfläche mit einem gesteigerten Leaching von organischen Molekülen einher (Tukey 1970). Es konnte zudem gezeigt werden, dass weder aufgereinigte Extrakte von Viscosin, noch das strukturell zu Massetolide-A verwandte Biotensid, noch Bakteriensuspensionen von *P. fluorescens* SBW25 die Transpiration von Wasser über isolierte Kutikularmembranen steigern (3.2.9 und 3.4.3), wie es bei technischen Tensiden zu beobachten ist (Riederer und Schönherr 1990). Anhand der Gesamtkinetiken lässt sich jedoch kein Effekt auf die Transpiration feststellen. In Untersuchungen mit Überständen und Zellsuspensionen von *Pseudomonas rhizosphaerae* konnte jedoch ein signifikante Steigerung der Wasserpermeabilität von isolierten Kutikularmembranen festgestellt werden (Schreiber *et al.*, 2005). Auch das Biotensid Syringafactin steigert die Transpiration von Wasser über die Kutikulamembran (Burch *et al.*, 2014). Ein solcher Effekt ist möglicherweise ausgeprägter bei schwankender Luftfeuchtigkeit zu beobachten. So hatte der Wildtyp von *P. syringae* gegenüber einem Biotensidmutanten unter wechselhaften Bedingungen einen Wachstumsvorteil (Burch *et al.*, 2014). Auch könnte in dem Zusammenhang die Beeinträchtigung der swarming motility (3.2.3) der Grund für die leicht niedrigeren Zellzahlen des Biotensidmutanten sein, da seine Fähigkeit, neue unbesiedelte Bereiche der Kutikula zu erreichen und sich dort zu vermehren, beeinträchtigt ist (Michiels *et al.*, 2003). Eine veränderte Mikrokolonien- und Biofilmbildung als Folge des fehlenden Biotensids könnte zu einer leichten Reduktion der Zellzahl des Biotensidmutanten führen (Raaijmakers *et al.*, 2010). So könnte eine Überproduktion an EPS (3.2.7) auf Kosten der direkten Vermehrung gehen. Trotzdem ist erwiesen, dass Viscosin bei anderen Anpassungen an den phyllosphärischen Lebensraum eine wichtige Rolle spielt und antimikrobielle sowie oberflächenspannungsverändernde Eigenschaften besitzt, wie oben erläutert (Saini *et al.*, 2008). Im Hinblick auf technische Applikationen im Pflanzenschutz oder der biologischen Wiederaufarbeitung von kontaminierten Flächen mit biologisch abbaubaren Tensiden (Mulligan 2004) sind weitere Erforschungen der Eigenschaften von Biotensiden und die Verflechtung ihrer Produzenten in der Phyllosphäre nötig.

5. Zusammenfassung

Die Phyllosphäre umfasst den gesamten Lebensraum auf Blattoberflächen und bildet eine der größten ökologischen Nischen für mikrobielles Leben auf organischen Oberflächen. Zu den häufigsten Bewohnern der Phyllosphäre gehören die Bakterien, die meist in kleinen Konglomeraten oder als ausgewachsener Biofilm die Kutikula von Pflanzen besiedeln. Die Interaktionen dieser epiphyllen Mikroorganismen mit ihren Wirtspflanzen sind sehr vielfältig und können grundlegende Stoffkreisläufe, ebenso wie Immunreaktionen und den Hormonhaushalt von Pflanzen betreffen. Auch die komplexen Interaktionen der Mikroorganismen untereinander haben eine große Bedeutung für die Pflanze, da starker Selektionsdruck unter den harschen Bedingungen in der Phyllosphäre dazu führen kann, dass Phytopathogene unterdrückt oder sogar aktiv von manchen Bakterien an einer Infektion der Pflanze gehindert werden. Diese grundlegenden Verknüpfungen innerhalb der Phyllosphäre genauer zu untersuchen war Gegenstand dieser Arbeit. Ein Fokus lag dabei auf kommensalen Pseudomonaden und ihrer Fähigkeit, die physikochemischen Eigenschaften der Kutikula mit Hilfe von Biotensiden zu beeinflussen.

Von vier Pseudomonaden wurden die Biotenside charakterisiert, Biotensid defiziente Mutanten hergestellt und ihre Eigenschaften in verschiedenen Experimenten mit denen der Wildtypen verglichen. Es wurde gezeigt, dass nichtribosomale Peptidsynthasen für die Biotensidproduktion verantwortlich sind. Es konnte mittels LC-MS/MS herausgefunden werden, dass *P. cedrina* das Biotensid Viscosin produziert, für *P. fluorescens* SBW25 konnte eine schon bekannte Viscosinproduktion bestätigt werden. *P. lurida* sowie *P. poae* synthetisierten ein strukturell verwandtes zyklisches Lipopeptid, mit gleicher Summenformel wie Massetolid-A aber wahrscheinlich anderer Reihenfolge der Aminosäuren. Der Verlust der Biotensidproduktion führte bei allen untersuchten Stämmen zu einer Immobilisierung auf semiflüssigem Agar. Die Biotensidmutanten konnten zudem die Benetzbarkeit von Kutikularmembranen nicht signifikant erhöhen. Die extrahierten Biotenside erhöhten nicht die Wasserpermeabilität von isolierten Kutikularmembranen von *P. laurocerasus*. Der Einfluss der produzierten Biotenside auf die Biofilmbildung war stammabhängig. So produzierte der Biotensidmutant von *P. fluorescens* SBW25 20% mehr Biofilm als der Wildtyp. Bei *P. lurida* war der Trend umgekehrt und der Wildtyp mit Biotensid produzierte 25% mehr Biomasse. Diese Ergebnisse unterstreichen die wichtige Rolle von Bio-

tensiden bei verschiedenen Anpassungen von epiphyllen Bakterien an ihren Lebensraum.

Zudem wurde eine Methode entwickelt mit der es möglich ist, Experimente zu Überlebensraten von Bakterien auf isolierten Kutikularmembranen über längere Zeiträume und mit unterschiedlichen Nahrungsangeboten durchzuführen. Die Ergebnisse bestätigen eindeutig die Annahme, dass Bakterien von *P. fluorescens* SBW 25, die adaxial auf der Kutikularmembran aufgebracht wurden, in der Lage sind, gelöste organische Moleküle auf der abaxialen Seite zu nutzen. Das Biotensid Viscosin förderte diesen Prozess dabei nicht signifikant und hatte keinen großen Effekt auf die Überlebensrate. Trotzdem ist erwiesen, dass Viscosin bei anderen Anpassungen an den phyllosphärischen Lebensraum, wie z.B. der Biofilmbildung und Motilität, die unter geänderten Versuchsbedingungen beobachtet werden könnten, eine wichtige Rolle spielt.

6. Literatur

Alsohim AS, Taylor TB, Barrett GA, Gallie G, Zhang XX, Altamirano-Junqueira AE, Johnson LJ, Rainey PB, Jackson RW (2014): The biosurfactant viscosin produced by *Pseudomonas fluorescens* SBW25 aids spreading motility and plant growth promotion. *Environmental Microbiology*. 16 (7): 2267–2281

Artiguenave F, Vilaginès R, Danglot C (1997): High-efficiency transposon mutagenesis by electroporation of a *Pseudomonas fluorescens* strain. *FEMS Microbiology*. 153(2): 363–369

Barthlott W, Neinhuis C, Cutler D, Ditsch F, Meusel I, Theisen I, Wilhelmi H (1998): Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 126: 237–260

Bazhanov DP, Yatsevich KK (2010): Taxonomic Heterogeneity of the Collection Strains of Fluorescent *Pseudomonads*. *Microbiology*. 80: 89–95

Beal R, Betts WB (2000): Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology*. 89:158–168

Behrendt U, Ulrich A, Schumann P (2003): Fluorescent pseudomonads associated with the phyllosphere of grasses; *Pseudomonas trivialis* sp. nov., *Pseudomonas poae* sp. nov. and *Pseudomonas congelans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53: 1461–1469

Behrendt U, Ulrich A, Schumann P (2007): *Pseudomonas lurida* sp. nov., a fluorescent species associated with the phyllosphere of grasses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57: 979–985

Belgacem Z , Bijttebier S, Verreth C, Voorspoels S , Van de Voorde I, Aerts G , Willems K, Jacquemyn H, Ruyters S, Lievens B (2015): Biosurfactant production by *Pseudomonas* strains isolated from floral nectar. *Journal of Applied Microbiology*. 118: 1370–1384.

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 (17): 6312–6323

Black PN (1990): Characterization of FadL-specific fatty acid binding in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1046 (1): 97–105

Bodour AA, Miller-Maier RM (1998): Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*. 32: 273–280

Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R (2005): Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*. 13: 20–26

Burch AY, Shimada BK, Browne PJ, Lindow SE (2010): Novel high-throughput detection method to assess bacterial surfactant production. *Applied Environmental Microbiology*. 76: 5363–5372

- Burch AY, Shimada BK, Mullin SW, Dunlap CA, Bowman MJ, Lindow SE (2012):** Pseudomonas syringae coordinates production of a motility-enabling surfactant with flagellar assembly. *Journal of Bacteriology*. 194 (6): 1287-98.
- 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
- Buschhaus C, Jetter R (2011):** Composition differences between epicuticular and intracuticular wax substructures: How do plants seal their epidermal surfaces? *Journal of Experimental Botany*. 62: 841-853
- Byerly GR, Lower DR, Walsh MM (1986):** Stromatolites from the 3,300-3,500-Myr Swaziland Super-group, Barberton Mountain Land, South Africa. *Nature*. 319: 489-491
- Cape JN, Percy KE (1993):** Environmental influences on the development on of spruce needle cuticles. *New Phytologist*. 125: 787-799
- Geesey GG, Richardson WT, Yeomans HG, Irvin RT, Costerton JW (1977):** Microscopic examination of natural sessile bacterial populations from an alpine stream. *Canadian Journal of Microbiology*. 23: 1733-1736
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM (1995):** Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*. 49: 711-745
- Cui X, Harling R, Mutch P, Darling D (2005):** Identification of N- 3-hydroxyoctanoyl-homoserine lactone production in Pseudomonas fluorescens 5064, pathogenic to broccoli, and controlling biosurfactant production by quorum sensing. *European Journal of Plant Pathology*. 111: 297-308
- Dabboussi F, Hamze M, Elomari M, Verhille S, Baida N, Izard D, Leclerc H (1999):** Taxonomic study of bacteria isolated from Lebanese spring waters: proposal for Pseudomonas cedrellas p. nov. and P. orientalis sp. nov. *Research in Microbiology*. 150: 303-316
- Daniels R, Vanderleyden J, Michiels J (2003):** Quorum sensing and swarming migration in bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*. 28 (3): 261-289
- de Bruijn I, de Kock MJD, Yang M, de Waard P, van Beek TA, Raaijmakers JM (2007):** Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in Pseudomonas species. *Molecular Microbiology*. 63(2): 417-428
- de Bruijn I, de Kock MJD, de Waard P, van Beek TA, Raaijmakers JM (2008):** Massetolide A Biosynthesis in Pseudomonas fluorescens. *Journal of Bacteriology*. 190 (8): 2777-2789
- de Bruijn I, Raaijmakers JM (2009):** Diversity and Functional Analysis of LuxR-Type Transcriptional Regulators of Cyclic Lipopeptide Biosynthesis in Pseudomonas fluorescens. *Applied and Environmental Microbiology*. 75: 4753-4761

de Souza JT, de Boer M, de Waard P, van Beek TA, Raaijmakers JM (2003): Biochemical, genetic, and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptide surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 7161-7172

Desai JD, Banat IM (1997): Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 61: 47-64

Ercolani GL (1991): Distribution of epiphytic bacteria on olive leaves and the influence of leaf age and sampling time. *Microbial Ecology*. 21: 35-48

Espelie K, Davis R, Kolattukudy P (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*). *Planta*. 149: 498-511

Espinosa-Urgel M (2004): Plant-associated *Pseudomonas* populations: molecular biology, DNA dynamics, and gene transfer. *Plasmid*. 52: 139-150

Fabry B (1991): Tenside. Eigenschaften, Rohstoffe, Produktion, Anwendungen <https://doi.org/10.1002/ciuz.19910250407>

Fang X, Qiu F, Yan B, Wang H, Mort A, Stark R (2001): NMR studies of molecular structure in fruit cuticle polyesters. *Phytochemistry*. 57: 1035

Feil H, Feil WS, Chain P, Larimer F, DiBartolo G, Copeland A, Lykidis A, Trong S, Nolan M, Goltsman E, Thiel J, Malfatti S, Loper JE, Lapidus A, Detter JC, Land M, Richardson PM, Kyrpides NC, Ivanova N, Lindow SE (2005): Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102: 11064-11069

Fett WF, Gerard HC, Moreau RA, Osman SF, Jones LE (1992): Screening of nonfilamentous bacteria for production of cutin-degrading enzymes. *Applied Environmental Microbiology*. 58: 2123-2130

Flemming HC, Wingender J (2010): The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*. 8: 623-633

Fuchs G. (2014): Allgemeine Mikrobiologie 9. Auflage Thieme

Glick BR, Bashan Y (1997): Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnology Advances*. 15: 353-378

Green J (2000): Adjuvant outlook for pesticides. In: *Pest. Outlook*. 11 (5): 196-199

Groombridge B, Jenkins M (2002): World atlas of biodiversity: Earth's living resources in the 21st century. University of California Press, Berkeley

Guzman P, Fernandez V, Graca J, Cabral V, Kayali N, Khayet M, Gil L (2014): Chemical and structural analysis of *Eucalyptus globulus* and *E. camaldulensis* leaf cuticles: a lipidized cell wall region. *Frontiers in Plant Science*

Hailing PJ, Walstra P (1981): Protein-Stabilized Foams and Emulsions. September 2009 *CRC critical reviews in food science and nutrition*. 15(2): 155-203

- Hanahan D (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*. 166(4): 557-580
- Hankin L, Kolattukudy PE (1969):** Degradation of Ursolic Acid, a Major Component of Apple Wax, by a *Pseudomonad* Isolated from Soil. *Microbiology*. 56: 151-156
- Hildebrand PD, Braun PG, McRae KB, Lu X (1998):** Role of the biosurfactant viscosin in broccoli head rot caused by a pectolytic strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 20(3): 296-303
- 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
- Hunt G, Baker E (1980):** Phenolic constituents of tomato fruit cuticles. *Phytochemistry*. 19: 1415-1419
- Iguchi H, Yurimoto H, Sakai Y (2015):** Interactions of Methylophs with Plants and Other Heterotrophic Bacteria. *Microorganisms*. 3(2): 137-51
- Jimenez-Diaz L, Caballero A, Segura A (2017):** Pathways for the Degradation of FattyAcids in Bacteria Springer doi: 10.1007/978-3-319-50418-6_42
- Jetter R, Kunst L, Samuels A (2006):** Composition of plant cuticular waxes. *Biology of the plant cuticle*: 145-175
- Kenrick P, Crane PR (1997):** The origin and early evolution of plants on land. *Nature*. 389: 33-39
- Kinkel LL (1997):** Microbial population dynamics on leaves. *Annual Review of Phytopathology*. 35: 327 347
- Klausen M, Aaes-Jorgensen A, Molin S & Tolker-Nielsen T (2003):** Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Molecular Microbiology*. 50: 61-68
- Knoll D, Schreiber L (1998):** Influence of epiphytic micro-organisms on leaf wettability: wetting of the upper leaf surface of *Juglans regia* and of model surfaces in relation to colonization by micro-organisms. *New Phytologist*. 140: 271-282
- Kolattukudy P (1981):** Structure, Biosynthesis, and Biodegradation of Cutin and Suberin. *Annual Review of Plant Physiology*. 32: 539-567
- Krimm U, Knoll D, Schreiber L (2004):** Interaction between epiphytic microorganisms and leaf cuticles. *Plant surface microbiology*. Springer
- Krimm U, Abanda-Nkpwatt D, Schwab W, Schreiber L (2005):** Epiphytic microorganisms on strawberry plants (*Fragaria ananassa* cv. Elsanta): Identification of bacterial isolates and analysis of their interaction with leaf surfaces. *FEMS Microbiology Ecology*. 53:483-492
- Kunst L, Samuels A (2003):** Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in Lipid Research*. 42: 51-80

Krimm U, Knoll D, Schreiber L (2004): Interaction between epiphytic microorganisms and leaf cuticles. *Plant surface microbiology* Springer

Leben C (1965): Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. *The Annual Review of Phytopathology*.3: 209–230

Lee J, Teitzel GM, Munkvold K, del Pozo O, Martin GB, Michelmore RW, Greenberg JT (2012): Type III secretion and effectors shape the survival and growth pattern of *Pseudomonas syringae* on leaf surfaces. *Plant Physiology*. 158: 1803–1818

Lindow SE (1996): Role of immigration and other processes in determining epiphytic bacterial populations. *Aerial Plant Surface Microbiology*:155–168

Lindow SE, Leveau JHJ (2002): Phyllosphere microbiology. *Current Opinion in Biotechnology*. 13: 238–243

Lindow SE, Brandl MT (2003): Microbiology of the Phyllosphere. *Applied Environmental Microbiology*. 69 (4): 1875–1883

MacDonald RC, Fall R (1993): Detection of substantial emissions of methanol from plants to the atmosphere *Atmospheric Environment. Part A. General Topics*. 27(11): 1709–1713

McGenity TJ, Crombie AT, Murrell JC (2018): Microbial cycling of isoprene, the most abundantly produced biological volatile organic compound on Earth. *The ISME Journal*. 12: 931–941

Maddocks SE, Oyston PC (2008): Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology*. 154: 3609–3623

Marahiel MA, Stachelhaus T, Mootz HD (1997): Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chemical Reviews*. 97: 2651–2673

Matsuyama T, Bhasin A, Harshey RM (1995): Mutational analysis of flagellum-independent surface spreading of *Serratia marcescens* 274 on a low-agar medium. *Journal of Bacteriology*. 177: 987–991

Merriman TR, Merriman ME, Lamont IL (1995): Nucleotide sequence of *pvdD*, a pyoverdine biosynthetic gene from *Pseudomonas aeruginosa*: PvdD has similarity to peptide synthetases. *Journal of Bacteriology*. 177(1): 252–258

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, Barnes MB, McLean RCJ (2002): Biofilms on leaf surfaces: implications for the biology, ecology and management of populations of epiphytic bacteria. *Phyllosphere Microbiology*. 139–155

Mulligan CN (2005): Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*. 133: 183–198

McGenity TJ, Crombie AT, Murrell JC (2018): Microbial cycling of isoprene, the most abundantly produced biological volatile organic compound on Earth. *ISME Journal*. 12: 931–941

Nybroe O, Sorensen J (2004): Production of cyclic lipopeptides by fluorescent pseudomonads. In *Pseudomonas, Biosynthesis of Macromolecules and Molecular Metabolism*. Ramos JL (ed.). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 147-172

Ochsner UA, Koch AK, Fiechter A, Reiser J (1994): Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 176 (7):2044-2054

O'Toole GA (2011): Microtiter dish biofilm formation assay. *The Journal of Visualized Experiments*. 47:2437

Perkins MC; Roberts CJ; Briggs D; Davies MC.; Friedmann A; Hart C; Bell G (2005): Macro and microthermal analysis of plant wax/surfactant interactions. Plasticizing effects of two alcohol ethoxylated surfactants on an isolated cuticular wax and leaf model. *Applied Surface Science*. 243 (1-4): 158-165

Pollard M, Beisson F, Li Y, Ohlrogge JB (2008): Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends in Plant Science*. 13: 236-246

Quinones B, Dulla G, Lindow SE (2005): Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 18: 682-693

Raaijmakers JM, de Bruijn I, de Kock MJD (2006): Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 19: 699-710

Raaijmakers JM, de Bruijn I, Nybroe O, Ongena M (2010): Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: More than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiological Reviews*. 34: 1037-1062

Ramey BE, Koutsoudis M, von Bodman SB, Fuqua C (2004): Biofilm formation in plant-microbe associations. *Current Opinion in Microbiology*. 7: 602-609

Rapp P, Bock H, Wray V, Wagner F (1979): Formation, Isolation and Characterization of Trehalose Dimycolates from *Rhodococcus erythropolis* Grown on n-Alkanes. *Microbiology*. 115: 491-503

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*. 29

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

Rodríguez-Moyá M, Gonzalez R (2015): Proteomic analysis of the response of *Escherichia coli* to short-chain fatty acids. *Journal of Proteomics*. 122: 1874-3919

Romantschuk M (1992): Attachment of plant pathogenic bacteria to plant surfaces. *Annual Review of Phytopathology*. 30: 225-243

Roper MM (2004): The isolation and characterisation of bacteria with the potential to degrade waxes that cause water repellency in sandy soils. *Australian Journal of Soil Research*. 42: 427-434

Roongsawang N, Washio K, Morikawa M (2010): Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. *International journal of molecular sciences*. 12(1): 141-172

Rosenberg E (1985): Microbial surfactants. *Critical Reviews in Biotechnology*. 3: 109-132

Saini HS, Barragan-Huerta BE, Lebron-Paler A, Pemberton JE, Vazquez RR, Burns AM, Marron MT, Seliga CJ, Gunatilaka AA, Maier RM (2008): Efficient purification of the biosurfactant viscosin from *Pseudomonas libanensis* strain M9-3 and its physicochemical and biological properties. *Journal of Natural Products*. 71: 1011-1015

Schönherr J, Lenzian K (1981): A simple and inexpensive method of measuring waterpermeability of isolated plant cuticular membranes. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. 102: 321-327

Schönherr J (1982): Resistance of plant surfaces to water loss properties of cutin, suberin and associated lipids. *Encyclopedia of Plant Physiology*. 153-179

Schreiber, L (2005): Polar paths of diffusion across plant cuticles. New evidence for an old hypothesis. *Annals of botany*. 95 (7): 1069-1073.

Schreiber L, Schönherr J (2009): Water and Solute Permeability of Plant Cuticles 2009. Springer 10.1007/978-3-540-68944-7

Segado P, Dominguez E, Heredia A (2016): Ultrastructure of the epidermal cell wall and cuticle of tomato fruit (*Solanum lycopersicum* L.) during development. *Plant Physiology*. 170: 935-946

Silby MW, Cerdeño-Tárraga AM, Vernikos GS, Giddens SR, Jackson RW, Preston GM (2009): Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome Biology* 10: R51

Soltman D, Subramanian V (2008): Inkjet-Printed Line Morphologies and Temperature Control of the Coffee Ring Effect *Langmuir*. 24 (5): 2224-2231

Sydor T (2008): Der Einfluß der Zellwandzusammensetzung auf Virulenzeigenschaften von *Rhodococcus equi*. Dissertation an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Thompson IP, Bailey MJ, Fenlon JS, Fermor TR, Lilley AK, Lynch JM, McCormack PJ, McQuilken MP, Purdy KJ, Rainey PB, Whipps JM (1992): Quantitative and qualitative seasonal changes in the microbial community from the phyllosphere of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Plant and Soil*. 150: 177-191

Tukey HB (1970): The leaching of substances from plants. *Annual Review of Plant Physiology*. 21:305

Van Dyke MI, Gulley SL, Lee H, Trevors JT (1993): Evaluation of microbial surfactants for recovery of hydrophobic pollutants from soil. *Journal of Industrial Microbiology*. 11 (3)163-170

- Van Hamme JD, Singh A, Ward OP (2006):** Physiological aspects: Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnology Advances*. 24: 604–620
- Vorholt JA (2012):** Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology*. 10: 828–840
- Wang N, Lu SE, Records AR, Gross DC (2006):** Characterization of the transcriptional activators SalA and SyrF, which are required for syringomycin and syringopeptin production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Journal of Bacteriology*. 188: 3290–3298
- Wei HL, Zhang LQ (2006):** Quorum-sensing system influences root colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. *Antonie van Leeuwenhoek*. 89: 267–80
- Wentzel A, Ellingsen TE, Kotlar HK (2007):** Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 76: 1209
- Wilson M, Lindow SE (1994):** Coexistence among epiphytic bacterial populations mediated through nutritional resource partitioning. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 4468–4477
- Winsor GL, Griffiths EJ, Lo R, Dhillon BK, Shay JA, Brinkman FS (2016):** Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database
- Yakimov MM, Timmis KN, Wray V, Fredrickson HL (1995):** Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 1706–1713
- Yang L, Haagensen JA, Jelsbak L, Johansen HK, Sternberg C, Høiby N, Molin S (2008):** In situ growth rates and biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* populations in chronic lung infections. *Journal of Bacteriology*. 190(8): 2767–76
- Zachow C, Fatehi J, Cardinale M, Tilcher R, Berg G (2010):** Strain-specific colonization pattern of *Rhizoctonia* antagonists in the root system of sugarbeet. *FEMS Microbiology Ecology*. 74: 124–135
- Zarzycki-Siek J, Norris MH, Kang Y, Sun Z, Bluhm AP, McMillan IA, Hoang TT (2013):** Elucidating the *Pseudomonas aeruginosa* Fatty Acid Degradation Pathway: Identification of Additional Fatty Acyl-CoA Synthetase Homologues. *PLOS ONE* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064554>
- Zeier J, Pink B, Mueller MJ, Berger S (2004):** Light conditions influence specific defence responses in incompatible plant-pathogen interactions: Uncoupling systemic resistance from salicylic acid and PR-1 accumulation. *Planta*. 219: 673–683
- Zeisler V, Schreiber L (2016):** Epicuticular wax on cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaves does not constitute the cuticular transpiration barrier. *Planta*. 243: 65–81
- Zeisler-Diehl VV, Barthlott W, Schreiber L (2018):** Plant Cuticular Waxes: Composition, Function, and Interactions with Microorganisms. In: Wilkes H. *Hydrocarbons, Oils and Lipids: Diversity, Origin, Chemistry and Fate*. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer

6.1 Internet Quellen

Abb.2 Quelle: http://www.dataphysics.de/2/start/understanding-interfaces/basics/surfactants-and-critical-micelle-concentration-cmc/	9
--	---

6.2 Abbildungsverzeichnis

6.2.1 Liste der Bilder

Abb.1 Schematische Darstellung eines mit epiphyllen Bakterien besiedelten Blattes (Querschnitt, abaxial).....	2
Abb.2 Schematische Darstellung des Verhaltens von Tensiden in wässriger Lösung in Abhängigkeit von ihrer Konzentration.....	8
Abb.3 Darstellung des Lipopeptids Viscosin. (Saini <i>et al.</i> , 2008).....	9
Abb.4 Schematische Darstellung des Beimpfungsmuster bei dem drei Ösen-Ausstrichverfahren.....	17
Abb.5 Aufnahme eines Tropfens bei der Bestimmung der Oberflächenspannung an einem hängenden Tropfen mit dem DSA von Krüss.....	20
Abb.6 Aufnahme eines Tropfens bei der Bestimmung der Oberflächenspannung an einem liegenden Tropfen mit dem DSA von Krüss.....	21
Abb.7 Quadratische Agarplatte zur Selektion mit dem Atomised Oil Assay.....	26
Abb.8 Transpirationskammer aus Edelstahl für Transpirationsexperimente und die Überlebensrate von Bakterien (2.6.3).....	31
Abb.9 Links: Quadratische Agarplatte.....	33
Abb.10 Oberflächenspannung von Kulturüberständen.....	34
Abb.11 KB-Kulturen von <i>P. fluorescens</i> nach 48 Stunden Inkubation bei 25°C und 150rpm.....	36
Abb.12 Wachstumskurve von <i>P. fluorescens</i> und Biotensidmutant in KB-Komplex-Medium.....	37
Abb.13 Verdopplungszeiten der vier Wildtypen und ihrer Biotensidmutanten.....	38
Abb.14 Wachstumskurve von <i>P. fluorescens</i> in M9-Minimal-Medium.....	39
Abb.15 Verdopplungszeiten der vier Pseudomonaden und ihrer Biotensidmutanten.....	40
Abb.16 Swarmingverhalten von <i>P. fluorescens</i>	41
Abb.17 Schäumungsverhalten.....	42
Abb.18 Spreitungsverhalten auf Parafilm.....	42
Abb.19 Kontaktwinkel auf Parafilm.....	43
Abb.20 Kontaktwinkel auf Kutikularmembranen.....	44
Abb.21 Hängende Tropfen am DSA.....	45
Abb.22 Oberflächenspannung am DSA.....	45
Abb.23 Biofilmbildung in KB-Medium.....	46
Abb.24 Biofilmbildung in MM-Medium.....	47
Abb.25 Kritische Mizellenkonzentration von Viscosin.....	48
Abb.26 Transpirationskinetik bei 50% RLF und 1% Tensidlösung.....	49
Abb.27 Transpirationskinetik bei 2% RLF und 1% Tensidlösung.....	50
Abb.28 Effekte von Biotensiden auf die Transpiration von Kutikularmembranen.....	51

Abb.29	Ms/Ms-Spektren der Biotensiduntersuchung.....	52
Abb.30	Wassertropfen auf besiedelter Kutikularmembran.....	54
Abb.31	Expression von <i>ViscB</i>	54
Abb.32	Wachsanalyse von inkubierten Kutikularmembranen.....	56
Abb.33	Transpirationskinetik bei 50% RLF mit Bakteriensuspension.....	57
Abb.34	Transpirationskinetik bei 2% RLF mit Bakteriensuspension.....	57
Abb.35	Zellzahlbestimmung über 3 Tage auf isolierten Kutikularmembranen via ATP-Analyse.....	58
Abb.36	Zellzahlbestimmung über 10 Tage auf isolierten Kutikularmembranen via ATP-Analyse.....	59

6.2.2 Liste der Formeln

Formel 1:	Substanzkonzentration.....	29
Formel 2:	Permeabilitätskoeffizient.....	32
Formel 3:	Effekt.....	32

6.2.3 Liste der Tabellen

Tab.1	Verwendete Geräte und Hersteller.....	12
Tab.2	Verwendete Medien.....	13
Tab.3	Verwendete Bakterien.....	15
Tab.4	Verwendete Plasmide.....	15
Tab.5	Verwendete Primer.....	15
Tab.6	PCR-Ansatz.....	23
Tab.7	PCR-Programm.....	23
Tab.8	Restriktionsverdau-Ansatz.....	26
Tab.9	GC-Programm.....	29
Tab.10	Swarmingverhalten der Wildtypen und ihrer Biotensidmutanten.....	41
Tab.11	Schäumungsverhalten der Wildtypen und ihrer Biotensidmutanten.....	42

7. Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Lukas Schreiber Bedanken, der mir die Möglichkeit gab meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen und stets mit Ratschlägen und gut platzierten Kalendersprüchen Hilfestellung bot.

Mein Dank gilt der gesamten AG Schreiber und einzelnen Mitarbeitern des IZMB für viele Gespräche auf wissenschaftlicher und persönlicher Ebene. Meinen Bürokollegen Dr. Charlotte Petruschke und Dr. Tino Kreszies gilt mein besonderer Dank für die vielen unterhaltsamen Stunden und Brautage und natürlich der Durchsicht dieser Arbeit. Unter anderem danke ich Prof. Dr. Wüst und Ines Botscher für die Analyse der Biosurfactants am IEL in Bonn

Des Weiteren danke ich meiner Freundin Sarah für die Übersetzung dieser Arbeit 😊 und Sabby für die Unterstützung zu allen unmöglichen Zeiten.