

Charakterisierung einer bakteriellen
Gemeinschaft aus dem Süßwasser mit dem
Schwerpunkt auf dem horizontalen Gentransfer
durch Konjugation und Transduktion

Dissertation
Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Biologie
der Universität Bielefeld

vorgelegt von
Frauke Beilstein

Dezember 2005

Inhaltsverzeichnis

Seite:

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	3
2.1	Klassifizierung von Mikroorganismen aus bakteriellen Gemeinschaften	3
2.2	Die bakterielle Gemeinschaft des Umwelthabitats Süßwasser	4
2.3	Bakterielle Plasmide	5
2.3.1	Multiplasmid Stämme	5
2.3.2	Plasmidgröße und kleine cryptische Plasmide	5
2.3.3	Genfracht von Plasmiden	6
2.3.4	Plasmid-Inkompatibilität	6
2.4	Bakteriophagen	7
2.4.1	Klassifizierung der Bakteriophagen	7
2.4.2	Mechanismen der Bakteriophageninfektion	9
2.4.3	Endstrukturen der Bakteriophagen-DNA	11
2.5	Vorkommen von Plasmiden und Bakteriophagen im Süßwasser	11
2.6	Horizontaler Gentransfer	13
2.6.1	Konjugation und Mobilisierung	13
2.6.2	Transduktion	15
2.6.3	Transformation	16
2.7	Horizontaler Gentransfer im Umwelthabitat Süßwasser	17
2.8	Zielsetzung dieser Arbeit	19
3.	Material und Methoden	20
3.1	Bakterienstämme	20
3.2	Plasmide	20
3.3	Nährmedien	21
3.4	Längenstandards	22
3.5.	Plasmidisolierungen	22

Inhaltsverzeichnis

3.5.1	Plasmidisolierung nach Birnboim & Doly (1979 modifiziert)	22
3.5.2	Isolierung von Plasmid-DNA mittels Qiagen Plasmid Midi Kit	23
3.5.3	Plasmidisolierung mit dem Qiagen Spin Prep Kit	23
3.5.4	Plasmidisolierung nach Ramos-Gonzales (Ramos-Gonzales <i>et al.</i> , 1991)	23
3.5.5	Plasmidisolierung nach der „cleared lysats“ Methode	24
3.5.6	Qiagen-Klonanalyse	25
3.6	Isolierung von Gesamt-DNA (Hopwood, 1985)	25
3.7	PCR-Amplifikation	26
3.7.1	PCR zur Amplifikation von 16S-rDNA	26
3.7.2	PCR zur Amplifikation von Quecksilberresistenzgenen	27
3.7.3	PCR zur Bestimmung von Plasmidinkompatibilitätsgruppen	27
3.7.4	PCR zur Detektion des <i>aphA-3</i> und <i>aphA-2</i> Gens	28
3.8	High Pure PCR Produkt Purification Kit (Roche)	28
3.9	Agarose-Gel-Elektrophorese	28
3.10	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	28
3.11	Fragmentisolierung mittels QIAquick Gel-Extraktion-Kit	29
3.12	Hydrolyse von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	29
3.13	Ligation von DNA-Fragmenten	29
3.14	Transformation von <i>E.coli</i> (nach Mandel und Higa, 1970 modifiziert)	30
3.15	Elektroporation	30
3.16	Mobilisierung und Konjugation	31
3.17	Transduktion	31
3.18	<i>In vitro</i> Transposonmutagenese	31
3.19	Random Primed DNA Markierung	32
3.20	Southernblot	32
3.21	Hybridisierung	33
3.22	Zellschnellaufschluß zur qualitativen Analyse vom Gesamtprotein	34
3.23	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) nach Lämmli modifiziert (1970)	34
3.24	Anreicherung von Bakteriophagen aus Süßwasser	35
3.25	Herstellung einer Indikatorplatte	35
3.26	Abwaschlysate	35
3.27	Herstellung eines Bakteriophagenlysats	36
3.28	Induktion von Prophagen	36
3.29	Isolierung von Bakteriophagen-DNA	36
3.30	Elektronenmikroskopie von Bakteriophagen	37
3.31	Partielle Hydrolyse mit Lambda Exonuklease	37
3.32	Partielle Hydrolyse mit Nuklease <i>Bal-31</i>	37
3.33	Datenbanken und Computersoftware	38

4. Ergebnisse	39
4.1 Isolierung einer bakteriellen Gemeinschaft aus Bielefelder Teichen	39
4.1.1 Einordnung der Bakterienstämme durch den Vergleich ihrer Gesamtproteinmuster	39
4.1.2 Bestimmung der Bakteriengattungen durch Sequenzanalysen von 16S-rDNA	40
4.1.3 Vergleich der bakteriellen Gemeinschaft aus drei Fließgewässern Ostwestfalens	43
4.2 Identifizierung und Charakterisierung der Plasmide	44
4.2.1 Ermittlung des Plasmidgehaltes der Isolate	45
4.2.2 Test auf Antibiotikaresistenzen	49
4.2.3 Zuordnung der Plasmide zu bekannten Inkompatibilitätsgruppen	52
4.2.4 Mobilisierung von pSunny durch Plasmide ausgewählter Isolate	53
4.2.5 <i>In vitro</i> Transposonmutagenese zur Markierung potentiell konjugativer Plasmide	56
4.2.6 Mobilisierung transposonmarkierter Plasmide	57
4.2.7 Transfer durch Konjugation	58
4.3 Charakterisierung der Plasmide des Bakterienstammes M101	61
4.3.1 Partielle Sequenzierung des Plasmides pM101.7	61
4.3.2 Sequenzierung des Plasmides pM101.1	75
4.4 Vergleich der charakterisierten bakteriellen Gemeinschaft aus dem Süßwasser mit einer Gemeinschaft aus dem Habitat Boden	77
4.5 Isolierung von Bakteriophagen aus Süßwasser	80
4.5.1 UV-Induktion von Prophagen	81
4.5.2 Morphologische Einordnung der Bakteriophagen durch Elektronenmikroskopie	83
4.5.3 Größenbestimmung der Bakteriophagen Genome durch Pulsfeldgelelektrophorese	86
4.5.4 Detektion kohäsiver Enden durch Pulsfeldgelelektrophorese	88
4.5.5 Bestimmung von terminaler Redundanz bei Bakteriophagen-DNAs	89
4.5.6 Bestimmung von zyklischer Permutation bei terminal redundanten Bakteriophagen-DNAs	90
4.5.7 Wirtsbereichsbestimmung der <i>E.coli</i> Bakteriophagen	92
4.5.8 Charakterisierung der <i>Brevundimonas vesicularis</i> Bakteriophagen	93
4.5.8.1 Wirtsbereichsbestimmung der <i>Brevundimonas vesicularis</i> Bakteriophagen	94
4.5.8.2 Bestimmung der Plaque-Morphologie der <i>Brevundimonas vesicularis</i> Bakteriophagen	95
4.5.8.3 Spaltungsanalysen der <i>Brevundimonas vesicularis</i> Bakteriophagen-DNAs	95

4.5.9	Plasmidtransduktion durch Umweltbakteriophagen	97
4.5.9.1	Steigerung der Transduktionsfrequenz durch Insertion von Bakteriophagen DNA in die zu transduzierenden Plasmide.	99
4.5.10	Transposonmutagenese zur Markierung von Bakteriophagenwirtsstämmen	101
4.5.11	Transduktion genetischer Marker durch Umweltbakteriophagen	101
5.	Diskussion	104
5.1	Isolierung einer bakteriellen Gemeinschaft aus dem Habitat Süßwasser	104
5.2	Bestimmung des Plasmidgehalts der bakteriellen Gemeinschaft	105
5.2.1	Die Plasmide der aus dem Süßwasser isolierten Gemeinschaft gehören zu keiner bekannten Inkompatibilitätsgruppe	107
5.2.2	Bestimmung des Gentransferpotentials durch Mobilisierung und Konjugation	108
5.2.3	Die Genorganisation des konjugativen Plasmid pM101.7 ähnelt der des Plasmides pBi1063 aus <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	109
5.2.4	Ist das Plasmid pM101.1 eine Form von <i>selfish</i> DNA?	110
5.2.5	Haben einzelne Untergruppen einer bakteriellen Gemeinschaft ein höheres Potential im horizontalen Gentransfer?	111
5.3	Isolierung von Bakteriophagen	112
5.3.1	Morphologische Einordnung der Bakteriophagen durch Elektronenmikroskopie	114
5.3.2	Charakterisierung der <i>B. vesicularis</i> sowie der <i>E. coli</i> Bakteriophagengruppe	114
5.3.3	Bestimmung des Gentransferpotentials durch Transduktion	115
5.4	Vergleich der Bakteriengattungen und ihrer Bakteriophagen in Bezug auf ihre mögliche Rolle im horizontalen Gentransfer.	118
5.5	Bedeutung der ermittelten Daten zum horizontalen Gentransfer in Bezug auf das natürliche Habitat Süßwasser	119
6.	Literaturverzeichnis	121
7.	Abkürzungsverzeichnis	139

8.	Anhang	141
8.1	Tabelle aller aus dem Oetkerparkteich isolierte Bakterienstämme	141
8.2	Tabelle aller aus dem Schlosshofteich isolierte Bakterienstämme	147
8.3	Tabelle aller aus dem Meierteich isolierte Bakterienstämme	152
8.4	Testergebnisse des api 20 E Identification Strip von bio Mérieux für die Isolate M2 und M101	158
8.5	Testergebnisse der Biolog GN2 Micro Plate™ für die Stämme <i>Brevundimonas vesicularis</i> ATCC 11426 ^T , LGM 2350 ^T , S121c und O283	158

1. Zusammenfassung

Innerhalb dieser Arbeit wurden aus den drei Bielefelder Teichen im Oetkerpark, am Schloßhof und am Meierteich eine bakterielle Gemeinschaft isoliert und charakterisiert. Von 848 verschiedenen Isolaten konnten 367 Bakterienstämme durch Vergleiche ihrer Gesamtproteinmuster und anschließender Sequenzanalyse ihrer 16S-rDNA 14 verschiedenen Bakteriengattungen zugeordnet werden. Die abundantesten Gattungen sind hierbei *Pseudomonas* und *Aeromonas*. Kleinere Gruppen konnten den Gattungen *Flexibacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Escherichia*, *Hydrogenophaga*, *Brevundimonas*, *Shigella*, *Chromobacterium*, *Streptomyces*, *Pantoea* und *Rahnella* zugeordnet werden.

Unter 600 auf ihren Plasmidgehalt untersuchten Bakterienstämmen wurden 75 plasmidhaltige detektiert, was einem Plasmidgehalt von 12.5 % entspricht. Besonders auffällig erwies sich hierbei die mit 12 Isolaten zahlenmäßig sehr kleine *E.coli*-Gruppe. Alle Isolate dieser Art sind ausnahmslos plasmidhaltig und beinhalten bis zu 11 verschiedene Plasmide. Ein Großteil dieser Plasmide ist kleiner als 4 kb und aufgrund fehlender Funktion als cryptisch zu bezeichnen.

Die durchgeführten Antibiotika- und Schwermetallresistenztests ergaben keine Hinweise auf plasmidkodierte Resistenzen. Die isolierten Plasmide entsprechen größtenteils nicht den bisher bekannten Inkompatibilitätsgruppen, welche unter Verwendung klinischer Plasmide erstellt wurden. Lediglich zwei Plasmide aus den *E.coli*-Isolaten konnten den Inkompatibilitätsgruppen IncY und IncI zugeordnet werden.

Mit Mobilisierungsexperimenten wurde einerseits der Transfer des Plasmides pSunny durch endogene Plasmide der Isolate aus dem Süßwasser oder andererseits der Transfer des Plasmides selbst analysiert. Von insgesamt 25 untersuchten Isolaten (der Bakteriengattungen *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Escherichia* sowie nicht näher bestimmten Gattungen) oder Plasmiden waren 15 in der Lage, pSunny zu mobilisieren oder selbst mobilisiert zu werden. Insgesamt betrachtet sind 60 % aller untersuchten Plasmide mobilisierbar, oder können pSunny mobilisieren und sind daraus folgend potentiell konjugativ.

Sieben Plasmide konnten mit Hilfe eines *in vitro* Transposonmutagenesesystems mit einem Kanamycinresistenzgen markiert werden. Vier dieser Plasmide kamen allerdings aufgrund ihrer zu geringen Größe für eine selbstständige Konjugation nicht in Frage. Für die übrigen drei transposonmarkierten Plasmide aus den Gruppen *Aeromonas* (pO50), *Rahnella* (pO60) und *E.coli* (pM101.7) konnte ein konjugativer Transfer gezeigt werden. Bei dem Plasmid pM101.7 handelt es sich um ein *broad host range* Plasmid, für das eine Transfer innerhalb verschiedener Proteobakteriengruppen gezeigt werden konnte. Die Genorganisation der Tral- und Trall-Region von pM101.7 zeigt Homologien zu der des Plasmides pBi1063 aus *Stenotrophomonas maltophilia*. Die Sequenzierung des kleinsten cryptischen Plasmides des *E.coli* Isolates pM101 ergab, daß dieses 1832 kb große Plasmid nur für sein eigenes Rep-Protein kodiert.

Aus Wasserproben der beschriebenen Teiche sowie anliegender Gewässer konnten 39 Bakteriophagen für Wirte der Gattungen *Aeromonas*, *Brevundimonas*, *Escherichia*, *Pseudomonas*,

Zusammenfassung

Arthrobacter sowie nicht näher spezifizierten Gattungen isoliert werden. Durch UV-Induktion wurden aus zwei *Aeromonas* Isolaten sowie aus zwei *E.coli* Isolaten je ein Prophage induziert.

Mittels Elektronenmikroskopie konnten 19 Bakteriophagen der Ordnung der *Caudalovirales* zugeordnet werden. Hiervon entfallen auf die Familie der *Siphoviridae* 42 %, auf die Familie der *Podoviridae* 32 % und 26 % aller Phagen konnten der Familie der *Myoviridae* zugeordnet werden. Alle Phagen enthalten lineare DNA. Die DNA Größe von 31 Bakteriophagen wurde durch Pulsfeldgelelektrophorese bestimmt und liegt zwischen 27 kb (*Aeromonas* Φ 18P) und 180 kb (*Aeromonas* Φ O238), wobei die meisten DNAs in ihrer Größe ungefähr der von λ entsprechen.

Bei fünf der untersuchten Bakteriophagen-DNAs konnten kohäsive Enden detektiert werden. Durch λ -Exonuklease Verdau konnten bei weiteren 16 Phagen-DNAs terminal redundante Endstrukturen nachgewiesen werden. Die DNAs von vier dieser Phagen, der Gattungen *Aeromonas* (Φ S32D), *Escherichia* (Φ M101.11 und Φ O221.15) sowie *Arthrobacter* (Φ O262) sind zusätzlich zyklisch permutiert.

Die sieben Bakteriophagen der *Brevundimonas vesicularis* Gruppe wurden nach morphologischen und molekularbiologischen Charakteristika eingehender untersucht und in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe enthält drei genetisch sehr eng miteinander verwandten Phagen. Die zweite Gruppe beinhaltet drei Phagen, die genetisch sehr unterschiedlich sind, aber gleiche Plaque- und Partikelmorphologie zeigen. Die Ergebnisse dieser Versuche wurden bereits publiziert (Res. Microbiol, im Druck).

17 Bakteriophagen wurden auf die Fähigkeit zur Transduktion von Plasmiden getestet. Es konnte hierbei für fünf Phagen mit Wirten aus den Gruppen *E.coli* und *Pseudomonas* eine Transduktion des Plasmides pSunny gezeigt werden. Die Transduktion des Kanamycin-Markergens *aphA2* wurde für zwölf Phagen getestet. Hierbei konnte gezeigt werden, daß alle Bakteriophagen, die Plasmide transduzieren können auch in der Lage sind, das verwendete Markergen weiterzugeben.

2. Einleitung

2.1 Klassifizierung von Mikroorganismen aus bakteriellen Gemeinschaften

Natürliche Habitate beinhalten eine hochgradig diverse mikrobielle Gemeinschaft. Die Abundanz und Zusammensetzung der Spezies werden durch das besiedelte Habitat bestimmt. Hierbei wirken sich chemische, physikalische und biotische Faktoren, sowie die Interaktionen der Organismen untereinander auf die Zusammensetzung der Gemeinschaft aus.

Die Identifizierung von Mikroorganismen spielt eine zentrale Rolle in den verschiedensten mikrobiologischen Bereichen wie der Klassifizierung von Ökosystemen und der Identifizierung von medizinischen Isolaten. Allerdings sind bis heute die meisten bakteriellen Spezies unbekannt, da sie mit Hilfe der üblichen Methoden nicht kultivierbar sind (Amann *et al.*, 1995; Bartsch *et al.*, 1999). Aufgrund dessen gibt es bis heute nur wenige Arbeiten, welche sich mit der Identifizierung einer mikrobiellen Gemeinschaft eines Habitats beschäftigen. Die genetische Diversität im Boden sowie in marinen Sedimenten soll allerdings 4000 – 13000 verschiedene Spezies umfassen (Torsvik *et al.*, 1990). Eine 30g schwere Bodenprobe aus dem Wald soll gar eine halbe Million verschiedener Spezies innehaben (Dykhuisen, 1998). Kulturabhängige Methoden zur Bestimmung sind aufwendig, wobei nur ca. 0.1 % aller Bakterien durch sie erfaßt werden können. Es wird vermutet, daß die meisten Bakterien nicht kultivierbar sind, da sie an geringe Nährstoffkonzentrationen adaptiert sind und nur niedrige maximale Wachstumsraten erreichen (Schut *et al.*, 1993). Neue Ansätze, wie die Klonierung von 16S-rDNA einer Gesamt-DNA oder diverse Fingerprintmethoden, ermöglichen die Detektion nicht kultivierbarer Organismen. Sie erlauben aber keine Aussagen über Plasmidgehalt, Lysogenie, etc. Des weiteren sind definierte Wirtsstämme nötig, um Bakteriophagen zu charakterisieren oder Aussagen über den Wirtsbereich konjugativer Plasmide zu treffen.

Einen ersten Hinweis für die Klassifizierung und Identifizierung von Mikroorganismen bieten makroskopisch morphologische Merkmale der Kolonien wie ihre Farbe, Form und der Geruch oder mikroskopisch Merkmale wie Form und Beweglichkeit. Eine genaue Einordnung kann allerdings nur mit Hilfe von physiologischen und biochemischen Methoden vorgenommen werden. Hierzu zählen z.B. die Analyse von Fettsäuren, Zuckern und Lipiden, DNA-DNA Hybridisierungen, 16S-rDNA Sequenzanalysen, sowie die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung der Zellwand und der Fettsäuren der Membran.

Der Vergleich von Proteinmustern durch SDS-Polyacrylamide Elektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode zur Bestimmung von Verwandtschaftsverhältnissen auf Ebene des Genus oder der Spezies (Busse *et al.*, 1996). Der visuelle Vergleich der Proteinmuster gibt Aufschluß über den Grad der Ähnlichkeit und fungiert als Maßstab für die Verwandtschaft. Bei dieser Methode handelt es sich um eine schnelle und vergleichsweise kostengünstige Methode, bei der nur eine geringe Menge Biomasse aufgewendet werden muß und eine hohe Anzahl an Isolaten untersucht werden kann.

Eine Standardmethode bei der Identifizierung eines bakteriellen Isolates bietet die Sequenzanalyse der 16S-rDNA (Amann *et al.*, 1995). Ribosomale DNA ist ein essentieller Bestandteil des Proteinsyntheseapparates aller Organismen, welcher in der Evolution schon früh entwickelt wurde und

deshalb Homologien zum Tier und Pflanzenreich aufweist. Bakterielle Ribosomen bestehen aus zwei Untereinheiten, wobei die große 50S-Untereinheit die 5S- und 23S-rDNA enthält und die kleine 30S-Untereinheit die 16S-rDNA beinhaltet. Die rRNA besitzt hoch konservierte Regionen, die eine vergleichende Analyse zu entfernt verwandten Gruppen ermöglicht, sowie variable und hochvariable Regionen, mit deren Hilfe nah verwandte Organismen klassifiziert werden können (Woese, 1987). Für einen Sequenzvergleich der 1500 Nukleotide umfassenden Sequenz sind mittlerweile verschiedene Datenbanken wie z.B. Ribosomal-Database-Projekt-II (Maidak *et al.*, 2001; rdp. cmc. msu. edu) oder Blast-Datenbank (Altschul *et al.* 1997; ncbi. nlm. nih. gov) verfügbar, deren Daten als Referenz für die taxonomische Einordnung neuer Spezies dienen.

2.2 Die bakterielle Gemeinschaft des Umwelthabitats Süßwasser

Nur weniger als 0.25 % aller sich im Süßwasser befindlichen Bakterien, können durch standardisierte Methoden unter Laborbedingungen kultiviert werden (Jones, 1977; Amann *et al.*, 1995; Bartsch *et al.*, 1999). Aus diesem Grund repräsentieren die im folgenden aufgelisteten Bakterientiter immer nur einen kleinen Teil der natürlichen bakteriellen Gemeinschaft. So liegen die für das Habitat Süßwasser bestimmten Bakterientiter im Fort Loudon See in den USA zur Zeit der Probenentnahme bei 2.45×10^2 cfu (*colony forming unit*) /ml (Ogunseitan *et al.*, 1992) und für einen Fischteich in den Morton Arboretum, Downers Grove USA bei 1×10^4 cfu/ml (Miller, 1998).

Aufgrund der zu geringen Rate kultivierbarer Bakterien innerhalb dieses Habitates ist es nicht möglich durch traditionelle Kultivierungsmethoden die gesamte mikrobielle Diversität dieser Gemeinschaft zu analysieren. Aber auch unter Verwendung kulturunabhängiger Methoden –wie z.B. der Analyse von 16S-rDNA Sequenzen oder der rRNA-gekoppelten Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung- durchgeführte Studien liefern nur limitierte Informationen über die bakterielle Zusammensetzung, da größtenteils nur funktionelle Gruppen isoliert wurden oder die Stichprobenzahl zu gering war, um Rückschlüsse auf die Gesamtheit der Gemeinschaft zu ziehen (Hiorns *et al.*, 1997; Kenzaka *et al.*, 1998). Beispielsweise wurde, innerhalb einer Studie, die bakterielle Gemeinschaft von sieben Seen im Staat New York (USA) bestimmt. Die Sequenzanalyse von 100 partiellen 16S-rDNA Sequenzen ergab Homologien zu einer Vielzahl verschiedener Gattungen, wobei 59 % zur Klasse der *Proteobacteria*, 15 % zu Gruppe der *Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides* und 18 % zur Ordnung *Actinomycetales* zugeordnet wurden (Hiorns *et al.*, 1997).

Aufgrund dessen bleiben kulturabhängige Studien wichtig, da die Rolle der Bakterien in ihrem natürlichen Habitat nur beschrieben werden kann, wenn sie auch erfolgreich kultiviert und charakterisiert werden können. Bisher sind nur wenige Daten zur kulturabhängigen Bestimmung einer bakteriellen Gemeinschaft des Habitats Süßwasser erstellt worden. Die einzigen mir bekannten Studien wurden am Lehrstuhl für Didaktik an der Universität Bielefeld durchgeführt und beschreiben die Gemeinschaft eines kleinen Baches (der Jölle) und eines Flusses (der Werre) in Ostwestfalen (teilweise beschrieben in Mannesmann *et al.*, 1990). Hierbei wurden aus der Jölle 671 Isolate und aus der Werre 272 Isolate durch api-Systeme bestimmt. Innerhalb dieser Habitats bilden die Gattungen *Escherichia*, *Enterobacter*, *Enterococcus* sowie *Aeromonas* die abundantesten Gruppen. In anderen Gewässern konnten besonders häufig Bakterien der Gattungen *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Klebsiella* und *Citrobacter* detektiert werden (beschrieben in: Rochelle *et al.*, 1989).

2.3 Bakterielle Plasmide

Bakterielle Plasmide sind definiert als nicht essentielle extrachromosomale-DNA, welche autonom als stabile Komponente der Zelle repliziert. Plasmide sind für Gram-negative sowie für Gram-positive Bakterien beschrieben. Die Größe natürlich vorkommender Plasmide reicht von einem kb bis hin zu über 2400 kb. Hierbei sind Kopiezahlen von einem bis zu mehreren hundert Kopien pro Zelle möglich. Plasmide mit einer Kopiezahl bis zu 15 Plasmide werden als *low copy*, solche mit höheren Vorkommen als *high copy* bezeichnet (Schumann, 1990). Die meisten bisher beschriebenen Plasmide, wie z.B. RP4, R388 oder RSF1010, liegen in zirkulärer Form vor. Für verschiedene *Streptomyces* Spezies, *Borrelia* sowie Hefen und Pilze sind allerdings auch Plasmide, welche in linearer Form vorkommen, beschrieben (Kado, 1998).

2.3.1 Multiplasmid Stämme

Als multiplasmid Stämme werden bakterielle Isolate bezeichnet, welche eine besonders hohe Anzahl verschiedener Plasmide beinhalten. Das Vorkommen von multiplasmid Stämmen wurde erstmals für klinische Isolate (Laufs und Kleinmann, 1978; Burian *et al.*, 1997) beschrieben. Sie konnten mittlerweile aber auch für Isolate aus den verschiedensten Umwelthabitaten detektiert werden. So sind z.B. für die fischpathogenen Bakterienstämme *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas piscida* (Toranzo *et al.*, 1983) und für *Erwinia* (nun *Pantoea*) *stewartii* (Coplin *et al.*, 1981) das Vorkommen multipler Plasmide beschrieben worden. Die Existenz multipler Plasmide wurde auch für Gram-positive Stämme, wie *Bacillus thuringiensis*, berichtet, wo in einem Isolat elf verschiedenen Plasmide detektiert werden konnten (González and Carlton, 1980).

Es wird diskutiert, daß eine hohe Anzahl von Plasmiden verschiedener Größen, Kopiezahlen und genetischer Ausstattungen der Bakterienzelle innerhalb einer Gemeinschaft ein Höchstmaß an Fitneß verleihen kann (Kado, 1998). Eine Ansammlung von Plasmiden, welche für unterschiedliche vorteilhafte Funktionen kodieren, bietet dem Bakterium eine höhere Überlebenschance in seinem Umwelthabitat oder bei der Erschließung eines neuen Lebensraums, was das Überleben der Plasmide an sich sichert. Dieser Vorteil überwiegt gegenüber den Kosten für die Replikation und *Maintenance* der Plasmide.

2.3.2 Plasmidgröße und kleine cryptische Plasmide

Bakterielle Plasmide sind bisher in Größen von 1 kb (z.B. pXF868 aus *Xylella fastidiosa*) bis hin zu einer Größe von 2400 kb (z.B. pSymB aus *Sinorhizobium meliloti*) beschrieben worden (Kado, 1998). Große Plasmide sind oft konjugativ und kodieren für nützliche Funktionen wie Antibiotikaresistenzen oder Bacteriocine. Aber es gibt auch viele kleine Plasmide, deren Größe unter 4 kb liegt, welche in hoher Kopiezahl replizieren. Solch kleine Plasmide können aufgrund ihrer geringen Größe für nicht mehr als ein oder zwei Gene kodieren. Da ihre Funktion bisher unklar ist, werden sie auch als cryptisch bezeichnet (Astill *et al.*, 1993; Nath and Deb, 1995).

Kleine cryptische Plasmide wurden bisher für die verschiedensten Gattungen wie z.B. *Shigella sonnei* (Croft *et al.*, 1983), *Lactobacillus plantarum* (Skaugen, 1989), *Lactobacillus curvatus* (Klein *et al.*, 1993) *Neisseria gonorrhoeae* (Sarandopoulos and Davies, 1993) und *Corynebacterium renale* (Nath and Deb, 1995) beschrieben.

Momentan werden verschiedene Theorien über die Bedeutung dieser kleinen Plasmide diskutiert. Möglicherweise haben diese Plasmide früher für Funktionen kodiert, die nach dem Verlust des Selektionsdruckes verloren gingen. Andererseits haben sie in der Zukunft die Möglichkeit, Gene durch Mechanismen wie homologe Rekombination oder Transposition aufzunehmen (Astill *et al.*, 1993). Indes werden diese Plasmide auch als *selfish*-DNA beschrieben, deren einzige Funktion nur in der eigenen stabilen Replikation in hoher Kopiezahl besteht (Doolittle and Sapienza, 1980). Eine andere Theorie besagt, daß es eine molekulare Symbiose zwischen verschiedenen Plasmiden unterschiedlicher Größe und Funktionen geben könnte.

2.3.3 Genfracht von Plasmiden

Plasmide sind auf das Überleben ihrer Wirtszelle angewiesen. Aus diesem Grund kodieren viele Plasmide für Funktionen, die das Überleben ihres Wirtsbakteriums sichern. Dies können z.B. Gene sein, welche den Bakterien eine Resistenz verleihen. Die bekanntesten Plasmide wie RP4 und R388 gehören zur Gruppe der Resistenzplasmide (R-Plasmide) und kodieren für Antibiotikaresistenzgene. Plasmidkodierte Schwermetallresistenzgene erlauben ihren Wirten, die toxischen Effekte der Schwermetalle zu neutralisieren und erweitern so die ökologische Nische des Bakteriums. Abgesehen von solchen nicht essentiellen Resistenzgenen liegen auf Plasmiden oft Gene, die den Bakterien innerhalb ihres Energiemetabolismus zusätzliche Stoffwechselwege eröffnen. Viele Plasmide besitzen Gene, welche eine Rolle in der Virulenz, Pathogenität oder Symbiose innehaben. Oft kodieren Plasmide auch für Bakteriocine und Restriktionsenzyme oder sie schützen sich selber durch Antirestriktions- und Modifikationssysteme (*ard*-Gene). Weiterhin besitzen Plasmide aber auch Gene, durch die eine stabile Etablierung eines anderen Plasmides in derselben Wirtszelle verhindert wird (siehe Kapitel 4.3.1).

Nicht essentielle durch Plasmide kodierte Gene präsentieren einen weiten Pool verschiedener Funktionen, welche einer Bakterienzelle eine genetische Adaption an sich verändernde Umweltbedingungen ermöglichen können. Der durch endogene Isolierung beschriebene Plasmidgehalt von Isolaten aus industriell genutzten marinen Habitaten liegt um ein Vielfaches höher als der bei parallelen Analysen von Habitaten ohne Industrie und Nutzung durch den Menschen detektierte Plasmidgehalt (Cook *et al.*, 2001). Allerdings konnte bisher vielen dieser aus natürlichen Habitaten isolierten Plasmide keine Funktion zugeordnet werden, weshalb sie als cryptisch bezeichnet werden (Sobecky *et al.*, 1997).

2.3.4 Plasmid-Inkompatibilität

Als Inkompatibilität wird das Unvermögen von Plasmiden derselben Gruppe bezeichnet, in Anwesenheit von koexistierenden Plasmiden aber ohne externen Selektionsdruck stabil in einer Zelle zu replizieren (Novick, 1987; Couturier *et al.*, 1988; Sýkora, 1992). Dieses Phänomen wird zur Klassifizierung von Plasmiden in verschiedenen Inkompatibilitätsgruppen (Inc-Gruppen) verwendet. Bis heute sind über 30 verschiedene Inc-Gruppen beruhend auf Unterschieden in der Replikationskontrolle und des *Partitioning*-Systems beschrieben.

Auf Basis der Sequenz von Replikationsregionen klinischer Plasmide aus Enterobakterien und Pseudomonaden wurden für 19 Inc-Gruppen Replikon-Sonden (Couturier *et al.*, 1988) und Primer (Götz *et al.*, 1996) entwickelt.

Mit Hilfe dieser Sonden und Primer ist es möglich, Plasmide klinischen Ursprungs oder Plasmide, die aus Kläranlagen isoliert wurden, den erstellten Inc-Gruppen zuzuordnen (Dröge *et al.*, 2000). Allerdings konnten diesen Gruppen bis heute nur wenige Plasmide aus den verschiedensten natürlichen Umwelthabitaten beigeordnet werden (Battermann, 2002; Cook *et al.*, 2001).

2.4 Bakteriophagen

Bakteriophagen (Phagen) wurden unabhängig voneinander 1915 von dem britischen Pathologen Frederick William Twort und 1917 von dem kanadischen Forscher Félix Hubert d'Hérelle entdeckt. Twort beobachtete die Aufklärung von *Micrococcus* Kolonien und vermutete unter anderem, daß dieses Phänomen durch Viren zustande kam. Der am Pasteur Institut in Paris arbeitende d'Hérelle dagegen widmete sein ganzes Leben der Erforschung der Bakteriophagen. Er beobachtete 1917 das Aufklaren einer *Shigella*-Kultur und schlußfolgerte sofort, daß es sich bei dieser Beobachtung um das Werk von Viren handelte (d'Hérelle, 1918). Daraufhin prägte er den Begriff Bakteriophagen und entwickelte Arbeitstechniken im Umgang mit ihnen, die auch heute noch in abgeänderter Form Verwendung finden. Allerdings wurde erst 1940 mit der Entdeckung der Elektronenmikroskopie die Existenz der Bakteriophagen als Viren von Bakterien endgültig bestätigt (Pfankuch und Kausche, 1940).

Félix d'Hérelle glaubte, daß es nur einen Bakteriophagen, nämlich *Bacteriophagum intestinale* gibt (d'Hérelle, 1918). Heute weiß man, daß viele verschiedene Bakteriophagen für die verschiedensten Bakteriengattungen existieren.

2.4.1 Klassifizierung der Bakteriophagen

Die ersten Schemata zur Klassifizierung der Phagen wurden 1965 von Bradley aufgestellt. In Grundzügen ist dieses System, nachdem es 1987 von Ackermann und DuBow erweitert wurde, noch heute gültig. Es sieht eine Einteilung der Bakteriophagen in die sieben morphologischen Gruppen (Typ) A-G vor (vgl. Abb. 1 und Tab. 1).

Bei den Typen A-C handelt es sich um doppelsträngige DNA beinhaltende Bakteriophagen mit Schwänzen. Sie werden in der Ordnung *Caudovirales* zusammengefaßt. Innerhalb dieser Ordnung gibt es drei Familien. *Myoviridae*, zu denen auch der Phage T4 gehört, besitzen einen langen und dicken kontraktilen Schwanz. Bakteriophagen der Familie *Siphoviridae* wie der Phage λ haben einen langen, nicht kontraktilen Schwanz. Die dritte Familie mit Namen *Podoviridae* weist nur einen kurzen, nicht kontraktilen Schwanz auf. Zu dieser Familie zählt zum Beispiel der Phage T7. Innerhalb dieser Familien gibt es je drei Untertypen (1-3) welche sich auf die unterschiedliche Kopflänge beziehen.

Die Ordnung der *Caudovirales* ist mit 96 % aller bisher elektronenmikroskopisch untersuchten Bakteriophagen (5100 Stück bis 2003) die größte (Ackermann, 2003). Hiervon entfallen auf die Familie der *Siphoviridae* 60.1 %, auf die *Myoviridae* 25.1 % und auf Bakteriophagen der Familie der *Podoviridae* 14.1 %. Nur etwa 3.6 % aller bisher untersuchten Bakteriophagen erwiesen sich als isometrisch, filamentös oder pleomorph. Die Typen D und E bezeichnen die isometrischen Phagen.

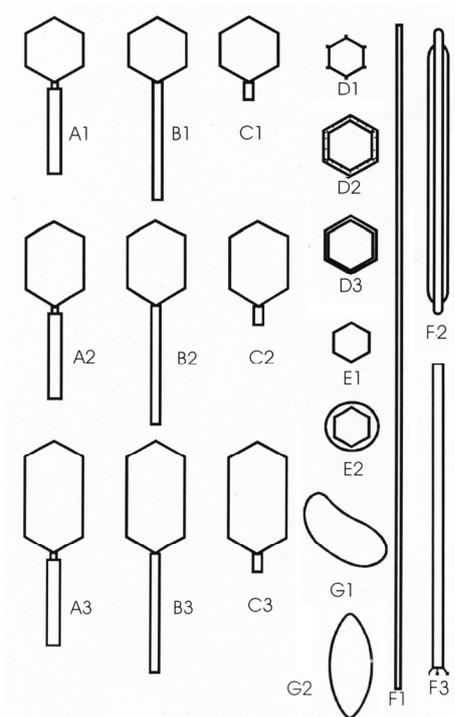


Abb.1:
Morphotypen der Bakteriophagen
(nach Ackermann, 2003)

Zu den fünf bisher bekannten Familien gehören die *Microviridae*, *Corticoviridae*, *Tectiviridae*, *Leviviridae* und die *Cystoviridae*. Die filamentösen Phagen (Typ F) gliedern sich in die drei Familien der *Inoviridae*, *Lipothrixvirida* und *Rudiviridae* auf. Die letzte Gruppe der pleomorphen Phagen (Typ G) beinhaltet die Familien *Plasmaviridae* und *Fuselloviridae*.

Tab.1: **Klassifikation und Charakteristika der Bakteriophagen** (nach Ackermann, 2003)

Abbildung	Form	Genom	Familie	Charakteristika
A1 – A3	geschwänzt	DNA, doppelsträngig, linear	<i>Myoviridae</i>	kontraktiler Schwanz
B1 – B3			<i>Siphoviridae</i>	Schwanz lang, nicht kontraktile
C1 – C3			<i>Podoviridae</i>	kurzer Schwanz
D1	isometrisch	DNA, einzelsträngig, zirkulär	<i>Microviridae</i>	
D2		DNA, doppelsträngig, zirkulär, superhelix	<i>Corticoviridae</i>	Kapsid komplex, Lipide
D3		DNA, doppelsträngig, linear	<i>Tectiviridae</i>	Kapsid doppelt
E1		RNA, einzelsträngig, linear	<i>Leviviridae</i>	
E2		RNA, doppelsträngig, linear, segmentiert	<i>Cystoviridae</i>	Hülle, Lipide
F1	filamentös	DNA, einzelsträngig, zirkulär	<i>Inoviridae</i>	lange Filamente
F2		DNA, doppelsträngig, linear	<i>Lipothrixviridae</i>	Hülle, Lipide
F3		DNA, doppelsträngig, linear	<i>Rudiviridae</i>	TMV-ähnlich
G1	pleomorph	DNA, doppelsträngig, zirkulär, superhelical	<i>Plasmaviridae</i>	Hülle, Lipide, kein Kapsid
G2		DNA, doppelsträngig, zirkulär, superhelical	<i>Fuselloviridae</i>	spindelförmig, kein Kapsid

2.4.2 Mechanismen der Bakteriophageninfektion

Bakteriophagen sind in der Lage, sich über vier verschiedene Mechanismen zu vermehren (siehe Abb. 2) Hierzu zählen die lysogene, lytische, pseudolytische und chronische Infektion.

Der erste Schritt des lytischen Zyklus ist die Adsorption des Phagen an eine bestimmte Oberflächenstruktur des Wirtsbakteriums. Die Adhäsion findet in zwei Schritten statt, wobei der erste reversibel ist, und danach eine irreversible Bindung zwischen dem zelleigenen Rezeptor (z.B. Proteinen, Polysacchariden, Pili, oder Flagellen) und dem Bakteriophagen stattfindet. Die Adsorption erfolgt bei schwanzlosen Phagen mit Hilfe eines Hüllproteins und bei geschwänzten Phagen durch das distale Schwanzende. Anschließend erfolgt die Injektion der Phagen-DNA durch die bakterielle Zellwand, welche im Vorfeld durch phagenspezifische Enzyme durchlässig gemacht wurde. Die Proteinhülle des Bakteriophagen verbleibt außerhalb der Zelle. Wenn die Nukleinsäure eines temperenten Bakteriophagen in das bakterielle Genom integriert (Prophage) und mit der Wirtszelle repliziert wird, spricht man vom lysogenen Zyklus (das Bakterium ist Lysogen). Nach Induktion (z.B. durch UV-Licht) ist es dem Phagen möglich, wieder in den lytischen Zyklus zurückzukehren. Verbleibt die DNA nach erfolgter Injektion in Cytoplasma, erfolgt die Replikation der viralen Nukleinsäuren und die Translation der Phagenproteine. Während der Morphogenese werden die Kapside und Schwänze hergestellt und nach Verpackung der DNA die Phagenpartikel komplettiert.

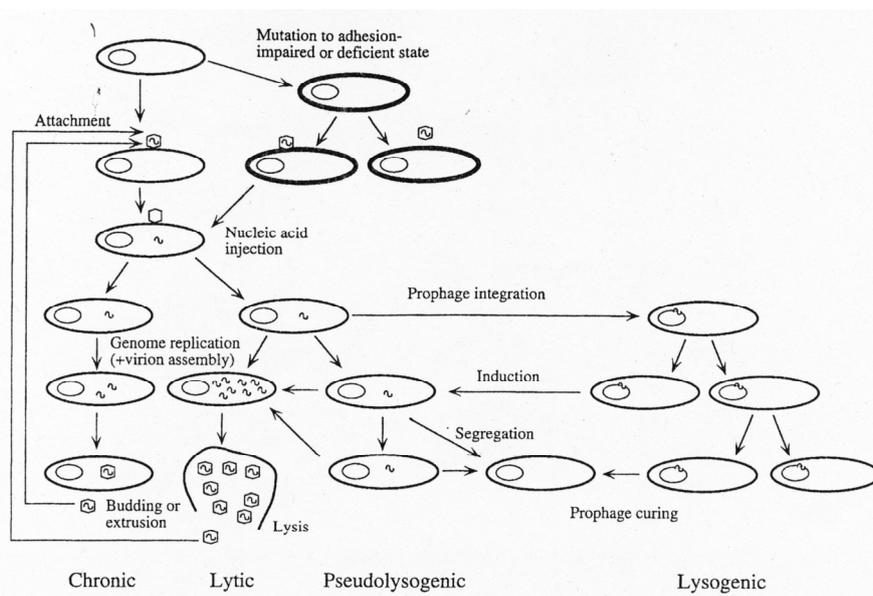


Abb. 2: **Mechanismen der Bakteriophageninfektion** (aus Weinbauer, 2004)

Für die Verpackung der DNA sind verschiedene Mechanismen bekannt (Abb. 3). Allen gemeinsam ist konkatermeres DNA Substrat. Beim *headful* Mechanismus wird die Verpackung der Nukleinsäure an einer spezifischen Stelle (*pac-site* z.B. bei P1 oder P22) oder an einer unspezifischen Stelle (z.B. T4) durch die Terminase initiiert und terminiert, nachdem 100 + X % des Genoms in das Kapsid verpackt wurden (Leffers und Rao, 1996) (Abb. 3C und 3D). Bei Bakteriophagen mit kohäsiven Enden, wie z.B. λ , erfolgt die DNA Maturation ebenfalls durch Terminasen, welche die konkatermere Form der DNA durch einen symmetrischen Nick in der Nähe der *cos-site* in eine monomere Form überführt (Abb. 3A).

Bei terminal redundanten Phagen wie T7 (Abb. 3B) führt die Terminase *staggerd nicks* ein, welche ausgehend von den 3'Enden der separierten DNA wieder aufgefüllt werden. Es entstehen auf diese Weise Phagen mit identischen Wiederholungen an beiden DNA-Enden.

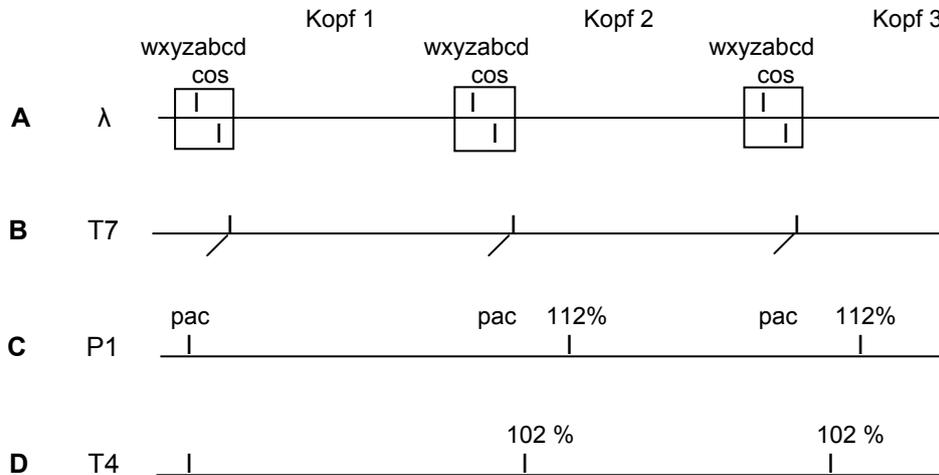


Abb. 3: **Verpackungsmechanismen von Phagen-DNA Konkateren**

A: Phagen mit kohäsiven Enden Bsp. λ

Die λ-Terminase führt an den *cos-sites* der DNA-Konkatemeren *staggerd nicks* ein, woraus 12 Basenpaar lange 5'überhängende kohäsive End-Sequenzen resultieren. Hierbei befinden sich separate *nicking-* und *binding-*Regionen auf der DNA.

B: Phagen mit terminal redundanten Enden Bsp. T7

T7 besitzt identische Sequenzwiederholungen (160 bp) an beiden DNA-Enden. Diese *blunt-ends* entstehen durch *staggerd nicks* gefolgt von einer Polymerisation ausgehend der freien 3'Enden.

C: Phagen mit *pac-site* Bsp. P1

Ausgehend von der ersten *pac-site* erfolgt das *Packaging* der DNA nach dem *headful* Mechanismus, wobei immer mehr als die Länge eines Genoms verpackt wird.

D: Phagen, welche ihr Genom nach dem *headful* Mechanismus verpacken Bsp. T4

Beim einfachen *head-filling* Mechanismus wird die Verpackung des Genoms an einer unspezifischen Stelle initiiert und terminiert nachdem 100 + X % in das Kapsid verpackt wurde.

Das Enzym-DNA-Intermediat bindet am leeren Prokapsid und induziert hierdurch das *Packaging*. In einer zweiten Runde erfolgt am folgenden kohäsiven Ende der DNA die nächste *Packaging* Reaktion (Catalano, 1995).

Nachdem die Nukleinsäure in die Kapside verpackt ist, erfolgt der Anbau der Schwänze. Anschließend werden die Phagen durch Lyse der Zellwand freigesetzt. Hierbei erfolgt zuerst die Depolarisierung und Degradation der Membran durch Holine und anschließend der Abbau der Peptidoglycanschicht durch Endolysine (Review siehe: Young, 2000). Aus einer infizierten Bakterienzelle werden zwischen 20 und mehreren hundert neue Bakteriophagen freigesetzt, was als *burst size* bezeichnet wird.

Von einer chronischen Infektion spricht man, wenn die Bakterienzelle mit einem Phagen infiziert ist, welcher sich in ihr vermehrt, sie bei seiner konstanten Freisetzung aber nicht beschädigt (z.B. M13-Phage). Bei einer pseudolysogenen Entwicklung koexistiert das Bakteriophagen-genom relativ geschützt in der hungrigen Wirtszelle. Wenn wieder Nährstoffe vorhanden sind, kann der

pseudolysogene Phage entweder zum echten Prophagen transformieren oder den lytischen Zyklus einschlagen (Review: siehe Weinbauer, 2004).

2.4.3 Endstrukturen der Bakteriophagen-DNA

Die Ausbildung verschiedener Endstrukturen resultiert aus der Notwendigkeit einem DNA-Verlust bei der Replikation entgegenzuwirken. Die DNA der meisten geschwänzten Bakteriophagen hat entweder kohäsive Enden oder ist terminal redundant und oft zyklisch permutiert.

Caudovirales besitzen nur in den seltensten Fällen keine terminal redundanten oder kohäsiven DNA-Enden. Ein Beispiel hierfür ist der *Bacillus subtilis* Bakteriophage $\Phi 29$ oder der *E.coli* Phage MS2. $\Phi 29$ benötigt zur Zirkularisation seiner DNA ein Protein (Genprodukt 3), das kovalent über eine Serin-Brücken-Bindung an kurze *inverted repeats* am 5'Ende der linearen DNA gebunden wird. Der Komplex aus Protein 3 und 5'-dAMP formt den Initiationskomplex und fungiert als Primer für die phagenkodierte DNA Polymerase (Serrano *et al.*, 1993).

Das bekannteste Beispiel für einen Bakteriophagen, dessen DNA kohäsive Enden besitzt, ist der *E.coli* Phage λ . Die meisten kohäsiven Enden der Phagen von Gram-negativen Bakterien sind 5' überhängende Enden (z.B. die *E.coli* Phagen λ und P2), wohingegen Phagen-DNAs von Gram-positiven Bakterien 3' überhängende Enden besitzen (z.B. der *Lactococcus lactis* Phage c2 und *Rhodococcus rhodochrous* Phage NJL) (Murialdo, 1991; Ziermann und Calendar, 1990; Lubbers *et al.*, 1994; Sunairi *et al.*, 1993). Aber auch Ausnahmen von dieser Regel sind bekannt: der *Pseudomonas aeruginosa* Bakteriophage D3 und der *Yersinia enterocolitica* Phage PY54, welche beide 3' überhängende Enden besitzen (Sharp *et al.*, 1996; Hertwig *et al.*, 2003). Die Länge der bisher bekannten kohäsiven Enden variiert zwischen 7 ($\Phi 105$ von *Bacillus subtilis*) und 21 (Φ CTX von *Pseudomonas aeruginosa*) Basen (Ellis und Dean, 1985; Hayashi *et al.*, 1993).

Terminal redundante Bakteriophagen DNAs, wie z.B. von T3 und T7, beginnen und enden mit der gleichen Nukleotidesequenz. Die terminalen Wiederholungen machen hierbei zwischen einem und 6 % (z.B. A118 aus *Listeria monocytogenes*) ihres Genoms aus (Ritchie *et al.*, 1967). Die DNA-Enden der Phagen T2 und P1 sind terminal redundant und zyklisch permutiert. Jedes Molekül besitzt an den Enden sich wiederholende Nukleotid Sequenzen, wobei das beim ersten Molekül die Region 1 und 2, beim zweiten die Region 3 und 4 und beim nächsten die Region 5 und 6 wiederholt wird (MacHattie *et al.*, 1967). Diese Permutation ist eine Folge des *headful* Verpackungsmechanismus (siehe Kapitel 2.4.2).

2.5 Vorkommen von Plasmiden und Bakteriophagen im Süßwasser

Für verschiedene aquatische Systeme konnte bewiesen werden, daß es sich bei den Bakteriophagen um die abundanteste Gruppe unter den vorhandenen Mikroorganismen handelt (Weinbauer *et al.*, 1993; Stopar *et al.*, 2004). Im Oberflächenwasser aquatischer Habitate konnten Phagentiter von ca. 10^9 Phagen pro ml ermittelt werden (Fuhrmann, 1999; Stopar *et al.*, 2004). Für marine Gewässer, konnte eine saisonale Variation innerhalb der Konzentration von Phagen bestimmt werden. Deshalb wird vermutet, daß auch in anderen aquatischen Habitaten in den kälteren Wintermonaten der Bakteriophagentiter niedriger ist (Bergh *et al.*, 1989). Neben dem hohen Titer freier Phagen sollte die große Anzahl an temperenten Bakteriophagen in lysogenen Bakterien nicht unterschätzt werden.

Lysogene Vertreter konnten in allen bakteriellen Gattungen einschließlich der Archaeobakterien und der Cyanobakterien detektiert werden (Ackermann und DuBow, 1987b). Nach Ackermann und DuBow beinhalten über 50 % aller bakteriellen Isolate Prophagen. Ogunseitian konnte durch Koloniehbridisierung innerhalb einer Population von *Pseudomonas* Isolaten, welche zuvor aus einem Süßwassersee isoliert wurden, zeigen, daß 70 % aller Isolate einen Prophagen beinhalten (Ogunseitian *et al.*, 1990,1992). Nach einer Hypothese von Kokjohn *et al.*, 1991 sind temperente Bakteriophagen in lysogenen Bakterien die häufigste Vorkommensweise von Phagen in den meisten oligotrophen aquatischen Systemen und die hohe Anzahl virulenter Bakteriophagen, welche bisher aus aquatischen Habitaten isoliert werden konnten, nur ein Artefakt einer auf hohen Nährstoffgehalten basierenden Anreicherungs-methode.

Der Plasmidgehalt einer bakteriellen Gemeinschaft kann sowohl durch exogene als auch durch endogene Plasmidisolierungsmethoden bestimmt werden.

Die endogene Plasmidisolierung setzt die Kultivierung bakterieller Isolate mit ihrer anschließenden Vereinzelung bis zur Reinkultur voraus. Anschließend werden die Plasmide physikalisch detektiert und die Abundanz der Plasmide innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft beschrieben. Indes ist diese Methode aufwendig und auf die mit den herkömmlichen Methoden kultivierbaren Bakteriengattungen beschränkt. Weiterhin wird vermutet, daß die durch kulturabhängige Methoden isolierten Plasmide nicht einer repräsentativen natürlichen Population entsprechen (Sobecky, 2002). Der Vorteil der endogenen Plasmidisolierung liegt in der Möglichkeit der Erfassung sämtlicher Plasmide innerhalb einer Gemeinschaft. Hierbei kann sowohl die Anzahl der Plasmide innerhalb eines Isolates als auch ihre Verteilung in verschiedenen Vertretern (z.B. einer kleinen Gruppe) bestimmt werden. Nur mittels dieser Isolierungsmethode ist es möglich, ein Plasmid einer bakteriellen Gattung oder Art konkret zuzuordnen.

Die alternative Methode, die auch ohne die Notwendigkeit der Kultivierung eines bakteriellen Wirtes auskommt, ist die exogene Plasmidisolierung (Bale *et al.*, 1987). Bei dieser Methode werden Plasmide durch bi- oder tri-parentale Kreuzungen direkt aus der bakteriellen Gemeinschaft isoliert. Bei der bi-parentalen Kreuzung wird die gesamte bakterielle Gemeinschaft eines Habitats mit einem Rezipientenstamm versetzt. Mittels eines geeigneten Mediums kann nach erfolgtem Gentransfer auf die Existenz von beispielsweise Resistenzplasmiden oder degradativen Plasmiden selektioniert werden. Bei der tri-parentalen Kreuzung werden konjugative Plasmide durch die gleichzeitige Mobilisierung eines nicht konjugativen Plasmides in einen Rezipientenstamm nachgewiesen (Top *et al.*, 1994). Für diese Art von Kreuzungen werden oft IncQ-Plasmide wie RSF1010 eingesetzt, welche mobilisierbar jedoch nicht konjugativ sind und außerdem einen sehr weiten Wirtsbereich besitzen (Rawlings und Tietze, 2001). Diese Methode setzt voraus, daß die Plasmide entweder mobilisierbar oder konjugativ sind und weiterhin für Gene kodieren, auf deren Genprodukte nach einer Kreuzung selektioniert werden kann. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, daß auch Plasmide nicht kultivierbarer Bakterien beschrieben und ein phänotypisches Merkmal direkt einem Plasmid zugeordnet werden kann. Mittels dieser Methode ist es allerdings nicht möglich, Aussagen über die Identität des ursprünglichen Wirtsbakteriums zu treffen oder Plasmide ohne erkennbaren Phänotyp zu isolieren.

In der Literatur sind nur sehr wenige Studien beschrieben, in denen der Plasmidgehalt einer bakteriellen Gemeinschaft des Habitats Süßwasser beschrieben wird. Aus einer mikrobiellen Gemeinschaft der Oberfläche von Steinen aus dem Fluß Ely in Wales konnten 400 Isolate gewonnen werden. Der ermittelte Plasmidgehalt beträgt in einem unbelasteten Bereich 9.4 % (n=180) und in einem durch industrielle Nutzung belasteten Gebiet 15 % (n=220) (Burton *et al.*, 1982). Hierbei besitzen 86 % aller detektierten Plasmide eine ausreichende Größe, um für Funktionen der bakteriellen Konjugation zu kodieren.

2.6 Horizontaler Gentransfer

Horizontaler Gentransfer (HGT) ist definiert als die Übertragung von genetischem Material in eine Zelle. Die drei ausführenden Mechanismen sind: 1) der Zell-Zell Kontakt abhängige Mechanismus der Konjugation, 2) die Aufnahme freier DNA durch Transformation und 3) die Transduktion, bei der die zu transferierende DNA durch einen Bakteriophagen, welcher als Vektor agiert, in eine Rezipientenzelle injiziert wird (Davison, 1999; Lanka und Wilkins, 1995; Miller, 2001).

Die Bedeutung des horizontalen Gentransfers wird seit langem in vielfältiger Weise diskutiert. Ein wesentlicher Aspekt ist dabei heute die Frage nach dem Beitrag des HGT zur Diversität der Arten und zur Adaption von Bakterien an sich verändernde Umweltbedingungen. Hierbei beschränkte man sich früher im wesentlichen auf den Gentransfer durch Konjugation. Aber gerade durch die vermehrte Sequenzierung bakterieller Genome und der darin detektierten Prophagen oder prophagen-ähnliche Segmente wird auch wieder die Transduktion als Faktor für den horizontalen Gentransfer neu beachtet. Die gesamte Molekularbiologie der Phagen, welche lange Zeit eher vernachlässigt wurde, erfährt eben durch diese Sequenzierungen einen neuen Aufschwung. Obwohl einem Großteil der identifizierten Proteine auch heute immer noch keine Funktion zugeordnet werden kann, erregt zum Beispiel das Vorhandensein von Photosynthese-Genen in Cyanophagen aufsehen (Lindell *et al.*, 2005).

Auf dem Gebiet der konjugativen Plasmide und ihrer Genfracht sind trotz vieler Detailkenntnisse von Modellplasmiden wie RP4 und F noch viele Fragen offen, z.B. ist die Frage nach den Inkompatibilitätsgruppen in der Umwelt (vgl. Kapitel 2.3.4) und der modularen Anordnung der *tra*-Gene noch nicht ausreichend beschrieben.

2.6.1 Konjugation und Mobilisierung

Als Konjugation bezeichnet man den Selbsttransfer von Plasmiden. Der horizontale Gentransfer durch Konjugation verschiedener Bakterien konnte für eine Vielzahl von verschiedener bakterieller Spezies und Genera beschrieben werden. Das beste Beispiel für ein Plasmid, für das ein besonders weiter Wirtsbereich innerhalb Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien beschrieben werden konnte, ist das Plasmid RP4 (Bates *et al.*, 1998). Für das Ti Plasmid von *Agrobacterium tumefaciens* konnte sogar ein Plasmidtransfer in Hefe und in Pflanzen, d.h. in zwei unterschiedlichen Reiche, nachgewiesen werden (Review siehe: Davidson, 1999).

Konjugative Plasmide, die Gene für alle essentiellen DNA-Transfer Komponenten, d.h. *oriT* und *tra*-Gene besitzen, sind für Gram-positive sowie Gram-negative Bakterien bekannt.

Bei Gram-negativen Bakterien beginnt die Konjugation mit einem durch Pili vermittelten Zellkontakt zwischen Donor und Rezipientenzelle. Der folgende Transfer kann in zwei Abschnitte geteilt werden: Zuerst wird an der sich in der *oriT*-Region befindlichen *nic-site* durch Relaxasen ein Einzelstrangbruch initiiert. Der Komplex, der aus Relaxase und anderen plasmid- oder wirtskodierten Proteinen mit dem *oriT* gebildet wird, wird als Relaxosom bezeichnet. Die Proteine dieses Komplexes werden von Genen kodiert, welche mit Dtr für DNA-Transfer und Replikation bezeichnet werden. Im zweiten Schritt erfolgt der Transfer des Einzelstrangs, der am 5'Ende kovalent mit der Relaxase verbunden ist, vom Donor in die Rezipientenzelle. Die für den Transfer nötige komplexe Membranpore, durchspannt die Cytoplasmamembran, das Periplasma und die äußere Membran. Sie wird von Proteinen gebildet, welche von Genen des Mpf (*mating pair formation*) Clusters kodiert werden (Lanka und Wilkins, 1995). Die Verbindung zwischen dem Relaxosom und der Membranpore wird durch ein *coupling*-Protein hergestellt (Hamilton *et al.*, 2000). Bei diesen, TraG ähnlichen Proteinen, handelt es sich um TraD von F, TraG von RP4, TrwB von R388 oder VirD4 von Ti.

In den meisten bisher untersuchten Plasmiden liegen die für die Konjugation benötigten Gene modulartig in zwei Regionen vor. Die *Tral*-Region beinhaltet den *oriT* und die Gene des Dtr, wohingegen in der *Trall*-Region hauptsächlich Gene lokalisiert sind, deren Proteine eine Funktion in der Ausbildung der Membranpore haben (Mpf) (Lessel *et al.*, 1992; Zatyka und Thomas, 1998).

Bisher wurden vorwiegend *broad host range* Antibiotikaresistenzplasmide wie z.B. RP4 aus *Pseudomonas aeruginosa*, R388 aus *E.coli* oder pKM101 aus *Enterobacter cloacae* untersucht (Datta und Hedges, 1972).

Unter Mobilisierung versteht man die Fähigkeit eines nicht konjugativen Plasmides, durch die Funktionen konjugativer Plasmide in eine andere Zelle transferiert zu werden. Mobilisierbare Plasmide besitzen einen *oriT* und kodieren häufig für Proteine, durch die ein Transfer ermöglicht wird, wenn ein geeignetes Konjugationssystem durch ein koexistierendes Plasmid zur Verfügung gestellt wird. Eines der bekanntesten mobilisierbaren Plasmide, welches keine *tra*-Gene besitzt und somit nicht in der Lage ist Pili sowie andere für die Konjugation spezifische Funktionen auszubilden, ist das IncQ Plasmid RSF1010 (Scherzinger *et al.*, 1992). Es gibt zwei verschiedene Mechanismen für die Mobilisierung eines Plasmides: Die Plasmide RSF1010 oder ColE1 kodieren für ihre eigene Relaxase und die am *nicking* beteiligte Proteine (Mob-Proteine). Diese interagieren mit dem *oriT* des zu mobilisierenden Plasmides. Die Membranpore wird durch den Mpf-Komplex des konjugativen Plasmides gebildet. In den meisten Fällen wird das *coupling*-Protein, welches die Verbindung zwischen dem Relaxosom und dem Mfp-Komplex herstellt, vom konjugativen Plasmid zur Verfügung gestellt (Cabezón *et al.*, 1997). Anders bei CloCF13, dieses Plasmid besitzt Gene, um für sein eigenes *coupling*-Protein zu kodieren (Cabezón *et al.*, 1994).

Die Mobilisierungsfrequenzen sind abhängig von der Interaktion des Relaxosoms mit dem *coupling*-Protein des Helfer Plasmides. Bei Plasmiden, die für ihr eigenes *coupling*-Protein kodieren, ist die Mobilisierungsrate abhängig von der Interaktion desselben mit dem Mpf-Komplex des konjugativen Plasmides (Cabezón *et al.*, 1994 und 1997). Bedingt durch diese Interaktion scheinen mobilisierbare Plasmide an spezifische Konjugationssysteme adaptiert zu sein. So können manche Plasmide wie ColE3 nur von wenigen Konjugationssystemen mobilisiert werden (*narrow host range*), wohingegen

CloDF13 durch verschiedene Konjugationssysteme (*broad host range*) transferiert werden kann (Cabezón *et al.*, 1997).

Der zweite Mobilisierungsmechanismus, der besonders bei kleinen Plasmiden eine Rolle spielt, die für keine eigenen Mob-Proteine kodieren, ist der Transfer über eine Kointegratbildung zwischen dem konjugativen und dem zu mobilisierenden Plasmid. Hierbei erfolgt die Kointegratbildung über Transposition oder Rekombination im Donor und wird nach dem Transfer im Rezipienten wieder aufgelöst (Reimann und Haas, 1993).

Plasmide für die ein Wirtsbereich innerhalb verschiedener Proteobakteriengruppen detektiert werden kann, bezeichnet man als *broad host range* Plasmide (Drønen *et al.*, 1999). Das für seinen weiten Wirtsbereich bekannten IncP-Plasmid RP4 ist in der Lage, in Wirtsbakterien, welche nicht zur gleichen Proteobakteriengruppe gehören, transferiert zu werden. Es ist weiterhin dazu befähigt, in allen bisher getesteten Gram-negativen sowie Gram-positiven Bakterien und sogar in Hefen zu replizieren (Bates *et al.*, 1998). Plasmide der Inkompatibilitätsgruppe IncQ kodieren für ihre eigenen Helikasen und Primasen (Scherzinger *et al.*, 1991) wohingegen IncP-1-Plasmide häufig zwei verschiedene Formen von Rep-Proteinen besitzen (Smith und Thomas, 1984). Unter anderem durch diese Strategien können Plasmide ihre Abhängigkeit von Wirtsenzymen verringern und ihre Unabhängigkeit bei der Initiation der Replikation steigern. Für das *narrow host range* Plasmid ColE1 konnte nur eine Replikation in nah verwandten Spezies gezeigt werden. Dieses Plasmid besitzt dementsprechend einen engen Wirtsbereich (Schumann, 1990).

Die DNA-Transfersysteme der konjugativen Plasmide RP4 (Haase *et al.*, 1995), R388 (Bolland *et al.*, 1990), pKM101 (Pohlmann *et al.*, 1994) sowie das VirB-Operon vom Ti-Plasmid aus *Agrobacterium tumefaciens* (Cook und Farrand, 1992) wurden als Typ-IV-Sekretionssysteme klassifiziert. Zu dieser Gruppe gehören ferner Sekretionssysteme, deren Funktion nicht im DNA-Transfer sondern im Transport von Proteinkomplexen aus pathogenen Bakterien zu eukaryontischen Zellen liegt. Hierzu gehören z.B. das Ptl-Operon von *Bordetella pertussis* (Johnson und Burns, 1994), welches in den Pertussis Toxin Export involviert ist und die *cag*-Pathogenitätsinsel von *Helicobacter pylori* (Censini *et al.*, 1996).

2.6.2 Transduktion

Unter Transduktion versteht man den Bakteriophagen vermittelten Transfer von DNA, von einer Zelle (Donor) zu einer anderen Zelle (Rezipient). Transduktion setzt immer die Lyse der Donorzelle und die Infektion der Rezipientenzelle mit den transduzierenden Partikeln voraus. Eine Zelle, die durch transduzierende Partikel einen rekombinanten Phänotyp erhält, wird Transduktant genannt. Transduzierende Partikel können chromosomale DNA der Wirtszelle oder Plasmide enthalten.

Bei der Transduktion wird zwischen genereller und spezieller Transduktion unterschieden. Beide Typen der Transduktion resultieren aus Fehlern der enzymatischen Systeme, die entweder das für die Exzision oder für die Verpackung der Phagen-DNA zuständig sind.

Bei der speziellen Transduktion, bei der ein integrierter temperenter Phage wie z.B. λ voraussetzt wird, werden Gene übertragen, welche sich in der Nähe der Prophagenintegrationsstelle befinden (Davison, 1999). Bei diesem Mechanismus wird ein DNA-Molekül bestehend aus Phagen- und bakterieller DNA übertragen.

Bei der generellen Transduktion werden zufällige chromosomale DNA-Fragmente unterschiedlichster Größe, die durch Degradierung der Wirts-DNA durch den Phagen entstehen, transduziert. Indes werden nicht alle Gene mit gleicher Frequenz an eine Rezipientenzelle weitergegeben (Saye *et al.*, 1990; Ripp *et al.*, 1994).

Plasmide werden mit derselben Frequenz wie chromosomale Markergene transferiert (Saye *et al.*, 1990). Hierbei werden kleine Plasmide mit gleicher Effizienz transduziert wie große. Alle bisher beschriebenen generell transduzierenden Phagen verpacken ihre DNA nach dem *headful* Mechanismus (Leffers und Rao, 1996), wobei jedes transduzierende Partikel nur bakterielle DNA oder Plasmidkonkatemere (Novick *et al.*, 1986) enthält. Beispiele für generell transduzierende Phagen sind P1 und P22 (Lennox, 1955). Durch Transduktion ist es möglich, Plasmide in verschiedene Bakterienstämme einzubringen. Für Stämme, in denen bisher nur geringe Transformationsraten erreicht werden können oder für die bisher noch keine funktionelle Transformationsmethode entwickelt werden konnte, stellt dies eine interessante Alternative dar. So konnte durch Transduktion zum ersten Mal ein Plasmid in den Stamm *Myxococcus xanthus* eingebracht werden (O'Connor und Zusman, 1983).

Zinder und Lederberg (1952) waren die ersten, die Transduktion am Beispiel von *Salmonella* und dem Phagen P22 beschrieben. Seitdem konnte der Vorgang der Transduktion in verschiedenen natürlichen Habitaten nachgewiesen werden. Die Gruppe um Zeph zeigte schon 1988 die Transduktion des *E.coli* Phagen P1 in sterilem und unsterilem Boden und ermittelte eine Überlebensrate von 28 Tagen für die Transduktanten. Fast alle Arbeiten, welche sich mit der Transduktion im Habitat Süßwasser beschäftigen, wurden von der Arbeitsgruppe um Miller ausgeführt (z.B. Miller, 1998). Hier konnte Transduktion in zellfreiem Wasser sowie in Süßwasser nachgewiesen werden, wobei die natürliche bakterielle Gemeinschaft den Vorgang der Transduktion reduziert aber nicht verhindert. Des weitern wurde gezeigt, daß lysogene sowie nicht lysogene Bakterien als Rezipienten dienen können. Bedingt durch die Homöimmunität der lysogenen Bakterien, wurden für diese höhere Transduktionsraten ermittelt (Saye *et al.*, 1987; 1990). Selbst die Transduktion von Mitgliedern einer natürlichen bakteriellen Gemeinschaft durch einen im Süßwasser vorkommenden Bakteriophagen (UT1 von *Pseudomonas aeruginosa*) konnte für dieses Habitat nachgewiesen werden (Ripp *et al.*, 1994). Der Phagen vermittelte Gentransfer wurde ebenfalls für die Phylloplane bewiesen. Für diese Studie wurde der pflanzenpathogene Stamm *Pseudomonas aeruginosa* und der gut charakterisierte Bakteriophage F116 verwendet (Kidambi *et al.*, 1994). Transduktanten in marinen Habitaten konnten in Versuchen von Jiang und Paul nachgewiesen werden (Jiang und Paul; 1998).

2.6.3 Transformation

Die Transformation war der erste Prozeß, bei dem der Austausch von genetischem Material bei Bakterien beobachtet werden konnte. Bei der natürlichen Transformation wird freie DNA von einer Rezipientenzelle aufgenommen und durch Rekombination in das bakterielle Chromosom integriert. Eine Reihe verschiedener Bakterienarten ist in der Lage, freie DNA aus der Umwelt aufzunehmen, wobei Bakterien der Gattungen *Bacillus*, *Streptococcus* und *Hemophilus* bisher am besten untersucht wurden (Lorenz und Wackernagel, 1994). Mehrere Studien, bei denen der Vorgang der Transformation in aquatischen und terrestrischen Umwelthabitaten nachgewiesen werden konnte,

widerlegen die oft geäußerte Meinung, daß es sich bei der Transformation nur um ein im Labor anzutreffendes Artefakt handelt (Davison, 1999).

2.7 Horizontaler Gentransfer im Umwelthabitat Süßwasser

Bis heute wurde viel über die Rolle des horizontalen Gentransfers in natürlichen Habitaten diskutiert. Hierbei stand meistens die Risikoabschätzung bei Freisetzungsexperimenten jedoch auch Spekulationen über die Rolle des genetischen Austausches in der Evolution im Vordergrund.

Auffällig ist, daß die meisten Studien sich mit dem Gentransfer durch Konjugation oder seltener durch Transformation beschäftigen. Bisher gibt es nur sehr wenige Arbeiten über phagenvermittelte Transduktion aus der Umwelt isolierter Phagen. Dies beruht möglicherweise auf der Notwendigkeit von Indikatorstämmen ohne die Isolierungen von Phagen aus natürlichen Habitaten nicht möglich sind. Aber gerade die Beschaffung potentieller Wirte stellt häufig ein Problem dar, da zwischen 90 % und 99.9 % aller Bakterien mit den üblichen Kultivierungsmethoden nicht detektiert werden können (Amann *et al.*, 1995). Neuere Studien beschäftigen sich deshalb mit der Entwicklung von wirtsunabhängigen Techniken zur Untersuchung von transduzierenden Bakteriophagen (Sander und Schmieger, 2001).

Bei der Untersuchung des horizontalen Gentransfers durch Konjugation besteht das größte Interesse in der Bestimmung des Gentransferpotentials durch *broad host range* Plasmide. Bisher wenig beachtet wurde allerdings bis heute, daß es auch Bakteriophagen gibt, die Bakterien verschiedener Arten einer Gattung infizieren können (z.B. CP-51 von *Bacillus*; Ruhfel *et al.*, 1984). Es gibt weitere Anhaltspunkte, welche vermuten lassen, daß der genetische Austausch durch Transduktion bisher unterschätzt wurde. Vorteile gegenüber dem Gentransfer durch Konjugation sind z.B. der Schutz der DNA im Phagenkopf vor Nukleasen sowie vor vielen organischen Lösungsmitteln. Verpackte DNA ist nicht sensitiv gegenüber Antibiotika und in der Lage, über einen längeren Zeitraum ohne den Verlust ihrer Aktivität im Phagen zu überleben.

Innerhalb verschiedener Arbeiten konnte der konjugative *in situ* Plasmidtransfer im Habitat Süßwasser gezeigt werden. Für das durch exogene Plasmidisolierung gewonnene Quecksilber-Resistenzplasmid pQM1 konnte ein Transfer zwischen Rezipienten der Gattung *Pseudomonas* auf Membranfiltern auf der Oberfläche von Steinen innerhalb des Flusses Taff in South Wales nachgewiesen werden (Bale *et al.*, 1987, 1988a; 1988b). Die Konjugationsraten erwiesen sich abhängig von der Temperatur, der Donor zu Rezipient Rate und dem verwendeten Rezipienten. Weiterhin konnten höhere Konjugationsraten bestimmt werden, wenn die natürliche bakterielle Gemeinschaft auf den Steinen eliminiert wurde. Bedingt durch die Freisetzung von Nährstoffen, nach der Hitzeinaktivierung der natürlichen mikrobiellen Gemeinschaft, konnte eine wiederholte Steigerung der Transferfrequenz detektiert werden. Ein Selbsttransfer von *Aeromonas* Oxytetracyclin-Resistenzplasmiden konnte unter Laborbedingungen sowie *in situ* innerhalb Dänischer Fischfarmen in Rezipienten wie *E.coli*, *Aeromonas* und *Yersinia ruckeri* gezeigt werden (Bruun *et al.*, 2003). Ein weiteres Beispiel für den horizontalen Gentransfer in Teichwasser ist die Konjugation der *broad host range* Plasmide R68.45 und FP5 innerhalb der Gattung *Pseudomonas* (O'Morchoe *et al.*, 1988). Auch hier ergaben die Versuche, daß die natürliche mikrobielle Gemeinschaft den konjugativen Transfer herabsetzt, nicht jedoch verhindert.

Eine *in situ* Plasmidtransduktion innerhalb von Teichwasser konnte für ein nicht konjugatives Plasmid durch die *Pseudomonas* Bakteriophagen DS1 und F116 gezeigt werden (Saye *et al.*, 1987; Ripp and Miller, 1995). Die Transduktion von chromosomaler DNA wurde für die Phagen F116 und DS1 schon 1978 (Morrison *et al.*) und 1990 (Saye *et al.*) bewiesen. Auch für den aus dem Habitat Süßwasser isolierten *Pseudomonas* Bakteriophagen UT1 konnten *in situ* generelle sowie Plasmidtransduktion nachgewiesen werden (Ripp *et al.*, 1994). Die Transduktionsraten sind abhängig von Parametern, welche die Adsorption der Phagen an die Wirtszelle, ihre Vermehrung und den physiologische Status der Wirtszelle beeinflussen (Review: Dröge *et al.*, 1999). Weiterhin scheint nach Arbeiten von Wiggins und Alexander (1985) eine bestimmte Zelldichte für eine erfolgreiche Infektion Voraussetzung zu sein. Dies wird allerdings in Arbeiten von Kokjohn *et al.* (1991) nicht bestätigt. Innerhalb ihrer Versuche konnte eine Infektion mit virulenten sowie temperenten Phagen von *Pseudomonas aeruginosa* auch bei geringen Zelldichten nachgewiesen werden. Eine höhere Transduktionsrate kann aber auch durch die Aggregatbildung zwischen suspendierten (Boden-)Partikeln und den Bakteriophagen sowie ihren Wirten erreicht werden (Ripp und Miller, 1995).

2.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Innerhalb dieser Arbeit sollte eine bakterielle Gemeinschaft des Habitats Süßwasser isoliert werden, um diese hinsichtlich ihres Potentials für horizontalen Gentransfer zu charakterisieren.

Physiologische und molekulare Interaktionen zwischen mikrobiellen Gemeinschaften und den ihnen assoziierten Phagen aus natürlichen Habitaten sind bislang noch nicht eingehender untersucht worden. Die genetische und evolutionäre Bedeutung der Bakteriophagen wurde lange Zeit wenig beachtet und gewinnt erst seit den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung. Auch gibt es bis heute nur wenige Daten über die Abundanz, die Diversität sowie die Verteilung von Plasmiden innerhalb von Isolaten des Habitats Süßwasser. Innerhalb dieser Arbeit sollte ein Beitrag zum Nachholbedarf der Datenerhebung zu Bakteriophagen innerhalb des Habitats Süßwasser geleistet werden.

Als Habitat der zu analysierenden Gemeinschaft wurde das Süßwasser gewählt, in diesem Fall ein Gewässersystem, welches mehrere kleine Teiche speist. Es war geplant, durch die Verwendung der endogenen Plasmidisolierungsmethode, eine Korrelation zwischen den bestimmten bakteriellen Spezies und den ihnen assoziierten Plasmiden zu bestimmen. Ein Ziel war, die Ergebnisse mit einer weiteren Arbeit unserer Arbeitsgruppe, die sich mit einer bakteriellen Bodengemeinschaft beschäftigt hatte, zu vergleichen. In dieser Gemeinschaft war eine Ungleichverteilung der Plasmide in den verschiedenen Gruppen festgestellt worden (Battermann, 2002).

Die Plasmide sollten molekular und phänotypisch analysiert werden. Neben einigen Untersuchungen zur Genfracht der Plasmide wie Antibiotika- und Schwermetallresistenzen und der Zuordnung der Plasmide zu Inkompatibilitätsgruppen, lagen die Schwerpunkte auf der Bestimmung der Wirtsbereiche der Plasmide und dem Gentransferpotential. Deshalb wurden die Plasmide durch Mobilisierungs- und Konjugationsexperimente eingehend analysiert. Beispielhaft sollte zur Erweiterung der Daten zu konjugativen Plasmiden aus natürlichen Habitaten die Transferregion sequenziert werden.

Es war vorgesehen die der Gemeinschaft assoziierten temperenten und virulenten Bakteriophagen zu isolieren und morphologisch sowie molekularbiologisch zu charakterisieren. Da das Wissen der Bakteriophagen im Wesentlichen aus den Prototypen wie λ , T7, T4 und eventuell M13, Mu und Φ 29 beschränkt ist muß die Sammlung von morphologisch und molekularbiologischen Daten von Phagen aus der Umwelt erweitert werden, da diese Prototypen nicht ausreichen, einen großen Teil der Phagengesamtheit abzudecken. Dazu können z.B. morphologische Untersuchungen wie Elektronenmikroskopie oder die Art des Genoms und der Endstrukturen der DNA, die etwas über den Verpackungsmechanismus sagt durchgeführt werden. Ein wesentlicher Aspekt bei der Untersuchung der Phagen sollte wiederum der horizontale Gentransfer, d.h. die Frage nach der Häufigkeit generell transduzierender Phagen sein.

3. Material und Methoden

3.1 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	Clontech
<i>E. coli</i> C600	F ⁻ e14 ^(McrA⁻) <i>thr-1</i> <i>leuB6</i> <i>thi-1</i> <i>lacY1</i> <i>supE44</i> <i>rfdD1</i> <i>fhuA21</i>	Bachmann, 1987
<i>E. coli</i> S17-1	RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>E. coli</i> Gene Hogs	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i> <i>fhuA</i> ::IS2	Invitrogen
<i>E. coli</i> S605	C600 <i>met</i> :: Tn5	Simon, 1984
<i>E. coli</i> SF8	<i>recB21</i> , <i>recC22</i> , <i>lop-11</i> , <i>tonA1</i> , <i>thr-1</i> , <i>leu-6</i> , <i>thi-1</i> , <i>lacY1</i> , <i>supE44</i>	Stammsammlung, B. Dreiseikelmann
<i>E. coli</i> C		Stammsammlung, B. Dreiseikelmann
<i>E. coli</i> Ec294	<i>hsdR</i> , <i>pro</i> ⁻ , <i>endA</i> , <i>thi</i> , <i>lac</i> ⁺	Craine, 1992
<i>Pseudomonas putida</i>		DSM 2112
<i>Pseudomonas stutzeri</i>		Stammsammlung W. Wackernagel
<i>Paracoccus aminophilus</i>		DSM 8538
<i>Pseudomonas sp.</i> Bi 860		Stammsammlung B. Dreiseikelmann
<i>Yersinia ruckeri</i>		LMG 3280
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		Stammsammlung, B. Dreiseikelmann
<i>Salmonella thyphimurium</i> WT#55 LT2		Stammsammlung, Dreiseikelmann
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> UBAPFZ		Stammsammlung M. Stienz
<i>Alcaligenes spec.</i> Bi147		Stammsammlung B. Dreiseikelmann
<i>Brevundimonas diminuta</i>		Stammsammlung S. Fetzner
<i>Brevundimonas vesicularis</i>		LMG 2350 ¹

3.2 Plasmide

Plasmid	genetische Marker	Referenz
pJFF 350	Km ^r	Fellay <i>et al.</i> , 1989
pSunny	Sm ^r , Km ^r , <i>gfp</i>	Güttler, 1998
pBBR 122	Km ^r , Cm ^r	mobitec

3.3 Nährmedien

TBY-Vollmedium

- 15 g Trypton
- 5 g Hefe-Extrakt
- 5 g NaCl
- ad 1 l H₂O deion.
- pH mit NaOH auf 7.5 einstellen
- autoklavieren

½ TBY-Medium

- 5 g Trypton
- 2.5 g Hefe-Extrakt
- 0.5 g NaCl
- ad. 1 l H₂O deion.
- pH mit NaOH auf 7.5 einstellen
- autoklavieren

4-fach TBY-Medium

- 60 g Trypton
- 20 g Hefe-Extrakt
- 20 g NaCl
- ad 1 l H₂O deion.
- pH mit NaOH auf 7.5 einstellen
- autoklavieren

TBY-Agar

- 1 l TBY-Vollmedium
- 15 g Agar
- autoklavieren

TBY-Weichagar

- 1 l TBY-Vollmedium
- 7.5 g Agar
- autoklavieren

Selektivmedien

Zugabe von Antibiotika	Endkonzentration:
Ampicillin	150 mg/l
Chloramphenicol	30 mg/l
Gentamycin	20 mg/l
Kanamycin	30 mg/l
	50 mg/l
Nalidixinsäure	50 mg/l
Rifampicin	100 mg/l
Streptomycin	100 mg/l
Tetracyclin	10 mg/l

Zugabe von Schwermetallen	Endkonzentration:
CdCl ₂	1 mM
CoCl ₂	5 mM
NiCl ₂	5 mM
ZnCl ₂	1 mM

3.4 Längenstandards

λ-EH DNA Marker (1)

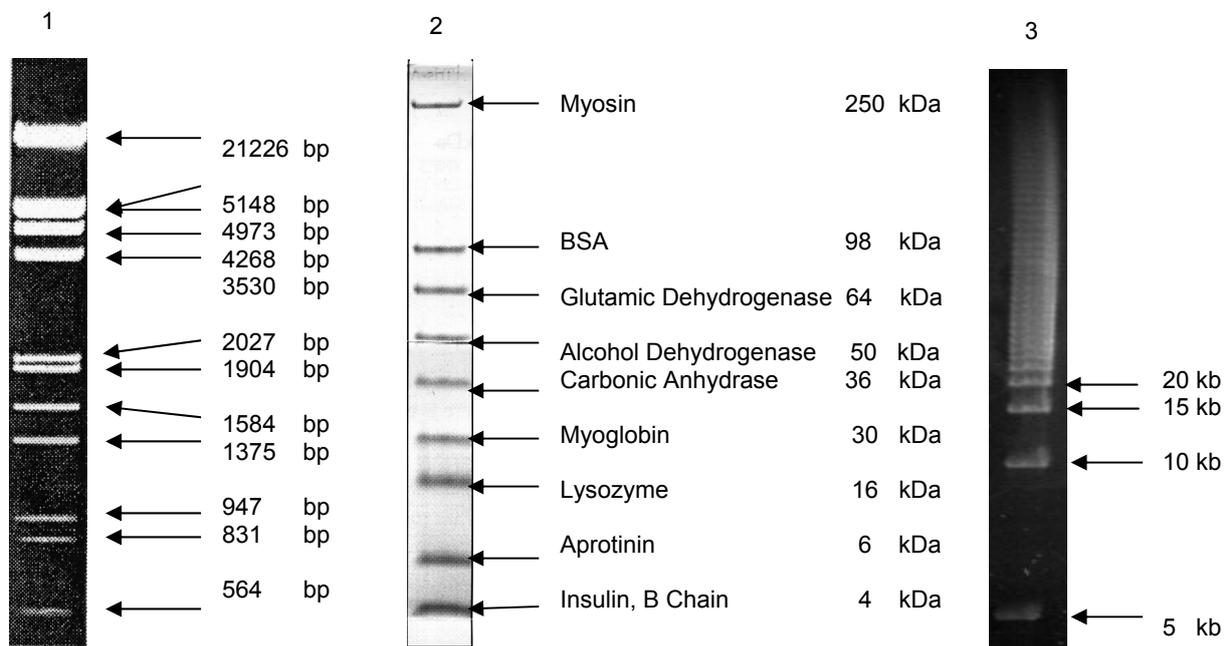
Als Größenstandard für die DNA-Fragmente diente Lambda-DNA, die mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *HindIII* hydrolisiert wurde. Für die Hybridisierungen wurde ein Digoxigenin markierter Lambda Marker (*EcoRI* / *HindIII*) (Roche) verwendet.

See Blue Pre-Stained Standard Proteinmarker (2)

Als Größenstandard für SDS-Polyarylamidgele diente der See-Blue Pre-Stained Standard Proteinmarker. Das Molekulargewicht bezieht sich auf ein Tris-Glycine SDS-Page Puffersystem.

5 Kb Leiter der Firma Bio Rad (3)

Die 5 kb Leiter besteht aus ligierter pBR328 DNA, welche vorher inkomplett mit *EcoRI* gespalten wurde. Dieser Marker wurde zur Größenbestimmung von Bakteriophagen-DNA durch Pulsfeldgelelektrophorese verwendet.



Verwendete Marker: λ-EH DNA Marker (1), See Blue Pre-Stained Standard Proteinmarker (2) und 5 Kb Leiter der Firma Bio Rad (3)

3.5. Plasmidisolierungen

3.5.1 Plasmidisolierung nach Birnboim & Doly (1979 modifiziert)

Verwendete Puffer:

Mix I

- 50 mM Glucose
- 10 mM EDTA
- 25 mM Tris-HCl, pH 7.5
- 2 mg / ml Lysozym, frisch ansetzen

Mix II

- 0.2 N NaOH
- 1% SDS (w/v), frisch ansetzen

CsCl gesättigtes Isopropanol

- 37 g CsCl gelöst in 41 ml TE-Puffer
- 100 ml Isopropanol

TE-Puffer

- 10 mM Tris-HCl, pH 7.5
- 1 mM EDTA

Durchführung:

- 40 ml üNK
- zentr. 10 min. bei 6500 rpm (Rotor A8.24)
- Pellet in 8 ml Mix I resuspendieren
- 30 min bei 0°C
- add. 16 ml Mix II
- 10 min bei RT inkubieren
- add. 12 ml 3 M Na-Acetat, pH 4.8
- mindestens 30 min bei 0°C inkubieren
- zentr. 30 min., 20000 rpm, 4°C (Rotor A8.24)
- Überstand auf zwei 40 ml Zentrifugenröhrchen verteilen
- add. 18 ml Isopropanol pro Zentrifugenröhrchen
- 45 min. bei -80°C
- zentr. 20 min., bei 20000 rpm, 4°C (Rotor A8.24)
- Pellets gut abtropfen lassen
- Pellets in insgesamt 4.1 ml TE-Puffer lösen
- add. 4.2 g CsCl
- add. 300 µl Ethidiumbromidlg. (5 mg / ml)
- zentr. 30 min., bei 20000 rpm, 15°C (Rotor A8.24)
- Überstand in Quick-Seal Röhrchen füllen und verschweißen
- zentr. in UZ mindestens 8 h, bei 50000 rpm, 15°C (Rotor Vti65.2)
- unter UV-Licht die untere ccc-Bande abziehen
- Extraktion mit CsCl gesättigtem Isopropanol, bis keine Färbung mehr sichtbar ist
- Dialyse 2 x 1 h gegen 1 x TE-Puffer

3.5.2 Isolierung von Plasmid DNA mittels Qiagen Plasmid Midi Kit

wurde nach Herstellerangaben durchgeführt

3.5.3 Plasmidisolierung mit dem Qiagen Spin Prep Kit

wurde nach Herstellerangaben durchgeführt

3.5.4 Plasmidisolierung nach Ramos-Gonzales (Ramos-Gonzales *et al.*, 1991)

Die Plasmidisolierung nach Ramos Gonzales ist eine zuverlässige Methode, um Plasmide bis zu einer Größe von 150 kb in den verschiedensten Gram-positive und Gram-negative Stämmen nachzuweisen. Allerdings kann DNA, welche mittels dieser Methode isoliert wurde, nicht gespalten werden.

Material:

Lösung A

- 20 % Saccharose
- 50 mM Tris-HCl, pH 7.5
- 25 mM EDTA
- 5 mg/ml Lysozym

Lösung B

- 0.3 N NaOH
- 2 % SDS

Kirby-Mix

- 88 ml Phenol
- 12 ml Kresol
- 0.1 g Hydroxychinolin
- gesättigt mit 100 mM Tris-HCl, pH 8

Durchführung:

- 0.5 ml üNK in Eppendorfgesäß überführen
- 5 min bei 13000 rpm (Eppendorfzentrifuge) zentrifugieren
- Überstand quantitativ entfernen
- Zellen in 200 µl Lsg A resuspendieren
- 100 µl Lsg B zugeben und sofort vorsichtig mischen
- 5 min 55°C
- add. 300 µl Kirby Mix, vorsichtig mischen
- 30 min bei 13000 rpm (Eppendorfzentrifuge) zentrifugieren
- wässrige Phase abnehmen

3.5.5 Plasmidisolierung nach der „clyred lysats“ Methode

Diese Methode ist geeignet zur Isolierung Alkali-sensitiver Plasmide wie RSF1010 und seine Derivate.

Material:

Puffer 1

- 20 % Sucrose in 50 mM Tris-HCl, pH 8

Triton Lösung

- 50 mM Tris-HCl, pH 8
- 10 mM CDTA
- 1 % Triton-X-100

Kirby-Mix

- 88 ml Phenol
- 12 ml Kresol
- 0.1 g Hydroxychinolin
- Gesättigt mit 100 mM Tris-HCl, pH 8

TE-Puffer

- 10 mM Tris-HCl, pH 8.0
- 10 mM NaCl
- 1 mM EDTA

Durchführung:

- 5 ml üNK in Greiner Röhrchen füllen
- 10 min 8000 rpm 4°C (Rotor A8.24) zentrifugieren
- Zellen suspendieren in 100 µl Puffer 1
- In Eppendorfgesäß überführen
- add. 10 µl Lysozym (5 mg/ml)
- add. 10 µl 10 mM CDTA
- 15 min auf Eis inkubieren
- add. 100 µl Triton Lösung
- 30 min bei 13000 rpm (Eppendorfzentrifuge) zentrifugieren
- wässrige Phase in neues Eppendorfgesäß überführen
- add. 100 µl H₂O und 100 µl Kirby Mix, mischen
- 3 min bei 13000 rpm (Eppendorfzentrifuge) zentrifugieren

- wässrige Phase in neues Eppendorfgefäß überführen und mit 1 ml EtOH mischen
- 15 min bei 13000 rpm (Eppendorfszentrifuge) zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- add. 0.5 ml 80 % EtOH
- 10 min bei 13000 rpm (Eppendorfszentrifuge) zentrifugieren
- Überstand quantitativ entfernen
- im Heizblock bei 70°C trocknen
- DNA in 30 µl TE-Puffer lösen

3.5.6 Qiagen-Klonanalyse

Verwendete Puffer:

Puffer P1

- 50 mM Tris-HCl, pH 8.0
- 10 mM EDTA
- 100 µg / ml RNase A

Puffer P2

- 200 mM NaOH
- 1 % SDS

Puffer P3

- 3 M K-Acetat, pH 4.8

Durchführung:

- 1.5 ml üNK in Eppendorf-Gefäß
- zentr. 5 min., 13000 rpm (Biofuge)
- Pellet in 0.3 ml Puffer P1 resuspendieren
- add. 0.3 ml Puffer P2, 6 x invertieren
- 5 min. RT
- add. 0.3 ml vorgekühlten Puffer P3, 6 x invertieren
- 5 min. 0°C
- zentr. 10 min., 13000 rpm (Biofuge)
- 0.75 ml des ÜS in neues Eppendorf-Gefäß
- add. 0.75 ml Isopropanol, invertieren
- zentr. 20 min., 13000 rpm (Biofuge)
- ÜS verwerfen,
- Pellet add. 0.5 ml 70 % Ethanol
- zentr. 5 min., 13000 rpm (Biofuge)
- Pellet trocknen bei 70°C
- Pellet in 50 µl TE-Puffer lösen

3.6 Isolierung von Gesamt- DNA (Hopwood, 1985)

Material:

AK1

- 6.7 % Saccharose
- 1mM EDTA
- 50 mM Tris-HCl, pH 8
- Lysozym (10 mg/ml)

SDS Lösung

- 2 % SDS

Kirby-Mix

- 88 ml Phenol
- 12 ml Kresol
- 0.1 g Hydroxychinolin
- Gesättigt mit 100 mM Tris-HCl, pH 8

TE-Puffer

- 10 mM Tris-HCl, pH 8.0
- 10 mM NaCl
- 1 mM EDTA

Durchführung:

- 1.5 ml üNK in ein Eppendorfgefäß überführen
- 5 min bei 13000 rpm (Eppendorfszentrifuge) zentrifugieren
- Überstand quantitativ entfernen
- Zellen in 250 µl AK1 suspendieren
- 1h bei 37°C inkubieren
- add. 125 µl 2 % SDS
- sofort intensiv vortexen
- add. 250 µl Kirby Mix
- intensiv vortexen
- 10 min bei 13000 rpm (Eppendorfszentrifuge) zentrifugieren
- Oberphase in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- add. 250 µl Kirby Mix
- intensiv vortexen
- 10 min bei 13000 rpm (Eppendorfszentrifuge) zentrifugieren
- Oberphase mindestens 2 x 6 h gegen TE-Puffer dialysieren

3.7 PCR-Amplifikation

Das Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist die enzymatische Vermehrung eines DNA-Abschnitts zwischen zwei Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind.

3.7.1 PCR zur Amplifikation von 16S-rDNA

Primer 27f: 5'GAG TTT GAT CCT GGC TCA 3'

Primer 1385r: 5'CGG TGT TGR CAA GGC CC 3'

Material:

- dNTP Mix: je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- Primer-Konzentration: 50 pM/µl
- Taq-Polymerase: Fa. New England Biolabs, 2000U/ml

PCR Ansatz:

- folgende Komponenten in ein 1.5 ml Eppendorf Gefäß pipettieren:
- steriles H₂O Millipore 268 µl
- Taq Puffer 43 µl
- MgCl 25 mM 43 µl
- dNTP Mix 43 µl
- Primer 1 8.5 µl
- Primer 2 8.5 µl
- Template DNA 8.5 µl
- Taq Polymerase 4.0 µl

je 50 µl in 0.2 ml PCR Gefäß pipettieren und mit PCR-Öl überschichten. Deckel sorgfältig verschließen und Gefäße in vorgeheizten Gradientencycler stellen.

PCR-Programm:

1. Denaturierung	95°C	5 min
2. je 30 Zyklen: Denaturierung	95°C	1.30 min
Primer Annealing	76°C-54°C	1.30 min
Kettenverlängerung	72°C	1.30 min
3. finale Kettenverlängerung	72°C	10 min

3.7.2 PCR zur Amplifikation von Quecksilberresistenzgenen

Der Nachweis auf Quecksilberresistenz erfolgte mit Primern gegen das essentielle Gen *merA* des Quecksilberresistenzoperons. Mit den von Liebert *et al.* (1997) entwickelten Primern werden ca. 72 % dieses Gens amplifiziert.

Primer A1: 5' ACC ATC GTC AGG TAG GGG AAC AA 3'

Primer A5: 5' AAC ATC GGC GGC ACC TGC GT 3'

PCR-Ansatz und Programm: siehe oben

3.7.3 PCR zur Bestimmung von Plasmid-Inkompatibilitätsgruppen

Zur Bestimmung von Plasmidinkompatibilitätsgruppen wurden die von Götz *et al.*, 1996 entwickelten Primer verwendet. Das Primerpaar repC 1 und repC 2 zum Nachweis von IncQ Plasmiden stammt von Dr. E. Tietze, Robert Koch Institut Werningerode.

Inc Gruppe	Primer	Primer Sequenz	Produktgröße (bp)	Anneling-temp. (°C)
Inc Q	<i>repC</i> 1	CTG GAC GTG ACG TAT GAC TAC G	460	60
	<i>repC</i> 2	ACC TCG TCC ATG CTG ATG CG		
	<i>repB</i> 1	TCG TGG TCG CGT TCA AGG TAC G	1160	62
	<i>repB</i> 2	CTG TAA GTC GAT GAT CTG GGC GTT		
	<i>oriV</i> 1	CTC CCG TAC TAA CTG TCA CG	436	57
	<i>oriV</i> 2	ATC GAC CGA GAC AGG CCC TGC		
	<i>oriT</i> 1	TTC GCG CTC GTT GTT CTT CGA GC	191	57
	<i>oriT</i> 2	GCC GTT AGG CCA GTT TCT CG		
IncW	<i>oriV</i> 1	GAC CCG GAA AAC CAA AAA TA	1140	58
	<i>oriV</i> 2	GTG AGG GTG AGG GTG CTA TC		
	<i>oriT</i> 1	TCT GCA TCA TTG TAG CAC C	317	51
	<i>oriT</i> 2	CCG TAG TGT TAC TGT AGT GG		
Inc N	<i>kik</i> 1	ACT TAC CTT TAT CAA CAT TCT GGC G	329	55
	<i>kik</i> 2	CGA CTG GTT ACT TCC ACC TTC GC		
Inc P	<i>trfA</i> 1 1	ATG ACG ACC AAG AAG CG	889	57
	<i>trfA</i> 1 2	AAC CCC CAG CCG GAA CTG		
	<i>traG</i> 1	CTG CGT CAC GAT GAA CAG GCT TAC C	762	63
	<i>traG</i> 2	ACT TCC AGC GGC GTC TAT GTG G		

PCR-Ansatz und Programm: siehe oben

3.7.4 PCR zur Detektion des *aphA-3* und *aphA-2* Gens

Die Primer pAG408 Km 1 und pAG408 Km 2 wurden verwendet, um das Vorhandensein des *aphA-3* Gen der Plasmide pSunny und pAG 408 nachzuweisen. Mit Hilfe des Primerpaares *aphA-2 f* und *aphA-2 r* wurde die Amplifikation des *aphA-2* Gens des Plasmides pJFF 350 durchgeführt.

Primer pAG408 Km 1: 5'GTTGGGGTATCTTTAAATACT 3'
Primer pAG408 Km 2: 5'CAAGCTTTTTAGACATCT 3'
Primer *aphA-2 f*: 5' GGATTGCACGCAGGTTCTC 3'
Primer *aphA-2 r*: 5'CTCGTCAAGAAGGCGATAG 3'

PCR-Ansatz und Programm: siehe oben

3.8 High Pure PCR Produkt Purification Kit (Roche)

Bei dieser Methode zur Reinigung von PCR-Produkten wird das Amplifikat an die im Filtrationsgefäß vorhandenen Glasfasern gebunden. Die Waschschrte entfernen danach kontaminierende, nicht eingebaute Nukleotide, Primer, Mineralöl, Salz und die Polymerase von der DNA.

Die Reinigung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.9 Agarose-Gel-Elektrophorese

Verwendete Puffer:

Bromphenolblau-Ladepuffer

- 40 % Glycerin
- 125 mM EDTA, pH 8.0
- Spatelspitze Bromphenolblau

TA-Puffer

- 40 mM Tris-Acetat, pH 7.5
- 10 mM Na-Acetat
- 1mM EDTA

Durchführung:

- 0.8 – 2.0 g Agarose nach Bedarf abwiegen
- add. 100 ml 1 x TA-Puffer
- kurz aufkochen
- Kamm in Gelträger einsetzen und Agarose hineingießen
- Gel erstarren lassen
- Elektrophoresekammer mit Puffer füllen
- Gelträger in Elektrophoresekammer einsetzen und Kamm ziehen
- Proben mit BPB-Ladepuffer versetzen
- Geldaschen mit Proben beladen
- Gel bei einer Spannung von ca. 90 V laufen lassen
- Gel 10 min in verdünnter Ethidiumbromidlösung färben
- Gel unter fließendem Wasser abspülen
- Gel im UV-Durchlicht fotografieren

3.10 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Zur Größenbestimmung von Phagen-DNA, welche sich mit einer Größe von über 20 kb nicht mittels normalen Agarosegelen auftrennen läßt, wurde die Pulsfeldgelelektrophorese (Chef DR-II Biorad) verwendet. Die zu untersuchende DNA wurde mit 10 µl 25 % Sucrose in TBE auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese lief 23 Stunden bei 5 Volt und einem Pulswechsel von 5/15 Sekunden.

TBE-Puffer

- 89 mM Tris-borate, pH 8.3
- 2 mM Na₂EDTA

3.11 Fragmentisolierung mittels QIAquick Gel-Extraktion-Kit (Qiagen)

Mit dem QIAquick Gel-Extraktion-Kit wurden DNA-Fragmente nach Herstellerangaben aus Agarosegelen isoliert.

3.12 Hydrolyse von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Verwendete Puffer:

Die aufgeführten Puffer wurden als 10 x konzentrierte Lösungen von der Firma New England Biolabs bezogen.

NEB-Puffer 1

- 10 mM Bis-Tris-Propan-HCl, pH 7.0
- 10 mM MgCl₂
- 1 mM DTT

NEB-Puffer 2

- 10 mM Tris-HCl, pH 7.9
- 10 mM MgCl₂
- 50 mM NaCl
- 1 mM DTT

NEB-Puffer 3

- 50 mM Tris-HCl, pH 7.9
- 10 mM MgCl₂
- 100 mM NaCl
- 1 mM DTT

NEB-Puffer 4

- 20 mM Tris-Acetat, pH 7.9
- 10 mM Mg-Acetat
- 50 mM K-Acetat
- 1 mM DTT

Durchführung:

- X µl DNA (entsprechend ca. 0.2 µg DNA)
- add. 2 µl 10 × NEB-Puffer
- add. 2 U Restriktionsendonuklease
- ad 20 µl H₂O Millipore
- Inkubationszeit im Temperaturoptimum nach Herstellerangaben
- gegebenenfalls Inaktivierung nach Herstellerangaben

3.13 Ligation von DNA-Fragmenten

Verwendete Puffer:

T4 DNA Ligase Puffer (New England Biolabs)

- 50 mM Tris-HCl, pH 7.5
- 10 mM MgCl₂
- 10 mM DTT
- 1 mM ATP
- 25 µg / ml BSA

Durchführung:

- X µl Fragment-DNA
- add. Y µl Vektor-DNA
- (Das Verhältnis Vektor zu Fragment sollte 1:2 bis 1:10 betragen.)
- add. 2 µl 10 × T4 DNA Ligase-Puffer
- add. 1-2 U T4 DNA Ligase
- ad 20 µl H₂O Millipore
- Inkubation bei 4°C oder 16°C üN

3.14 Transformation von *E.coli* (nach Mandel und Higa, 1970 modifiziert)

Herstellung kompetenter Zellen:

- 10 ml TBY mit üN-Kultur von *E.coli* animpfen (je nach Bakterienstamm 1:50 bis 1:100)
- Inkubation bei optimaler Wachstumstemperatur bis zu einem Titer von ca. 2×10^8 cfu/ml (log-Phase)
- zentr. 5 min., 6500 rpm, 4°C (Rotor A8.24)
- Zellen in 5 ml vorgekühltem 100 mM CaCl₂ resuspendieren
- 30 min. 0°C
- zentr. 5 min., 6500 rpm, 4°C (Rotor A8.24)
- Zellen in 1 ml 100 mM CaCl₂ aufnehmen und zur direkten Transformation einsetzen oder in 1 ml 100 mM CaCl₂ mit 20 % Glycerin aufnehmen und bei -80°C lagern.

Transformation:

- Ligationsansatz oder ca. 0.5 µg DNA
- add. 200 µl kompetente Zellen
- 20 min. 0°C
- 3 min. 42°C (Hitzeschock)
- add. 1 ml TBY
- 45 min. 37°C (Expression der Antibiotikaresistenzen)
- Ausplattieren auf antibiotikahaltigem Selektivmedium
- Inkubation bei optimaler Wachstumstemperatur

3.15 Elektroporation

Bei dieser Methode wird die Membran von Bakterienzellen durch einen kurzen elektrischen Impuls durchlässig gemacht. Die Zellen sind somit in der Lage, freie DNA aus der Umgebung aufzunehmen.

SOC-Medium

- 10 g Trypton
- 2.5 g Hefeextrakt
- 0.3 g NaCl
- 0.09 g KCl
- 1.02 g MgCl
- 1.23 g MgSO₄
- ad. 500 ml H₂O deion.
- autoklavieren
- add. 0.4 % Glucose

Herstellung elektrokompetenter Zellen:

- 40 ml Medium mit 2 ml üNK animpfen
- schütteln bis zu einem Titer von ca. 3×10^8
- 15 min in Eiswasser abkühlen
- 15 min bei 6000 rpm (Rotor A8.24) und 4°C zentrifugieren (Rotor vorkühlen)
- Überstand quantitativ entfernen
- Zellen in 5 ml H₂O resuspendieren
- Zentrifugenbecher mit H₂O auffüllen

- 15 min bei 6000 rpm (Rotor A8.24) und 4°C zentrifugieren
- Überstand quantitativ entfernen
- Zellen suspendieren in 20 ml 15 % Glycerin
- 15 min bei 6000 rpm (Rotor A8.24) und 4°C zentrifugieren
- Überstand quantitativ entfernen
- Zellen suspendieren in 0.5 - 1 ml 15 % Glycerin
- im 100 µl Portionen in Eppendorfgefäße füllen
- zur Elektroporation einsetzen oder bei -80°C lagern

Elektroporation:

- elektrokompetente Zellen auf Eis auftauen
- Elektroporationsküvetten auf Eis stellen
- Pulsdaten: 25 µF, 600 Ω, 2.5 kV
- 100 µl Zellen + x µl Plasmid DNA
- Ansatz 1 min auf Eis
- Ansatz in die Küvette füllen
- Küvette trocken abwischen, in den Gene Pulser einsetzen und den Puls auslösen
- sofort 1 ml SOC-Medium zugeben
- Ansatz in ein Eppendorfgefäß überführen
- Regeneration 1 h bei 28-30°C
- auf Selektivmedium ausplattieren

3.16 Mobilisierung und Konjugation

- Konjugationspartner in geeigneten Medium bis zu einem Titer von $2-3 \times 10^8$ wachsen lassen
- Cellulose-Nitrat-Filter auf eine TBY-Agarplatte ausbringen
- je 50 µl der zu kreuzenden Kulturen auf den Filter auftropfen
- den Filter trocknen lassen und die Agarplatte über Nacht bei geeigneter Temperatur bebrüten
- das Konjugationsgemisch vom Filter mittels geeigneten Medium abschwemmen
- Verdünnungsstufen auf Selektivmedien ausplattieren und 1-2 Tage bei geeigneter Temperatur bebrüten

3.17 Transduktion

- Bakterienzellen in geeigneten Medium (50 ml) bis zu einem Titer von $2-3 \times 10^8$ anwachsen lassen
- zentr. 10 min., 6000 rpm, 15°C (Rotor A8.24)
- Zellen in 5 ml TBY-Medium resuspendieren
- Zellen mit Phagen mit einer Multiplizität zwischen 1 und 0.5 infizieren (bei P1 Zugabe von 20 µl 1M CaCl₂)
- nach 20, 30, 40 und 50 min je 200 µl Kultur mit 2 ml Weichagar mischen und auf Selektivmedien ausgießen
- 48-72 h bei geeigneter Temperatur bebrüten

3.18 *In vitro* Transposonmutagenese

Template Generation System TGS™ Finnzymes

Mit Hilfe dieses *in vitro* Transposonmutagenese Kits ist es möglich, das Transposon des Phagen Mu in Plasmid-DNA zu transferieren. Diese *in vitro* Reaktion wird durch die MuA-Transposase katalysiert.

Durchführung:

- 10 µl Plasmid DNA
- 4 µl H₂O
- 4 µl Puffer für MuA Transposase
- 1 µl Entranceposon Km^r, 20 ng
- 1 µl MuA Transposase
- 1 h bei 30°C reagieren lassen

- Inaktivierung der MuA Transposase 10 min bei 75°C
- Transformation oder Elektroporation des markierten Plasmides

3.19 Random Primed DNA Markierung

Bei dieser Methode zur Herstellung einer markierten Sonde wird die doppelsträngige Template-DNA denaturiert und mit Zufallshexameren (*random primers*) hybridisiert, die dann als Primer für die Polymerase dienen.

Durchführung:

- DNA 10 min bei 100°C denaturieren, rasche Abkühlung auf Eis
- auf Eis hinzufügen:
- 2 µl Hexanucleotid Mix
- 2 µl dNTP
- steriles bidest. bis zum Endvolumen von 19µl
- 1µl Klenow-Enzym
- zentr. 60 min bei 37°C
- Reaktion mit 2µl 0.2 M EDTA, pH 8.0 stoppen
- DNA mit 4µl 3 M Na-Acetat, pH 7.5 und 200µl EtOH fällen
- 10 min bei -20°C
- zentr. 10 min bei 13000 rpm (Biofuge)
- Pellet bei 70°C trocknen und anschließend in 50 µl TE-Puffer lösen

3.20 Southernblot

Beim Southernblot werden DNA-Fragmente, die zuvor mittels Gelelektrophorese entsprechend ihrer Länge getrennt wurden, auf einer Membran fixiert und später durch Hybridisierung mit einer markierten Sonde spezifisch angefärbt.

Verwendete Lösungen:

Lösung I

- 0.25 N HCl

Lösung II

- 1.5 M NaCl
- 0.5 N NaOH

Lösung III

- 1 M Tris-HCl
- 2 M NaCl, pH 5.0

20 x SSC

- 174 g NaCl
- 88.2 g Na-Citrat
- ad. 1000 ml Millipore, pH 7.0

Durchführung:

- Trägermaske in den Blotter einsetzen
- Plastikmaske anfeuchten und glatt auflegen
- Ausschnitt in der Plastikmaske mit Folie bedecken; zum Testen: Pumpe an den Blotter anschließen und 50 mbar Unterdruck erzeugen, Folie entfernen
- angefeuchtete Membran auf den Ausschnitt legen
- Agarosegel auf die Membran legen
- Lsg. I auf das Gel pipetieren und 4 min einwirken lassen (Depurinierung)
- absaugen
- Lsg. II auf das Gel geben (Denaturierung)
- nach 3 min absaugen
- zur Neutralisierung 3 min Lsg. III

- absaugen
- zum Transfer 60 min 20 x SSC
- Quervernetzung: Membran 5 min auf den Transilluminator legen

3.21 Hybridisierung

Verwendete Puffer:

Prähybridisierungspuffer

- 5 x SSC
- 0.1 % (w/v) N-laurosylsarcosine
- 0.02 % SDS (w/v)
- 2 % Blocking reagent

Puffer I

- 150 mM NaCl
- 100 mM Maleinsäure, pH 7.5

Puffer II

- 2 % Blocking reagent in Puffer I

Puffer III

- 100 mM Tris-HCl, pH 9.5
- 100 mM NaCl
- 50 mM MgCl₂

Waschlösung I

- 2 x SSC
- 0.1 % SDS

Waschlösung II

- 0.1 x SSC
- 0.1 % SDS

Durchführung:

- Membran 10 min in 5 x SSC waschen
- Membran luftblasenfrei in den Hybridisierungszylinder überführen
- 20 ml Prähybridisierungslsg. zugeben
- mindestens 60 min Prähybridisierung bei 68°C
- markierte Sonde 10-15 min bei 98°C denaturieren
- Prähybridisierungslsg. aus dem Zylinder entfernen
- 10 ml Hybridisierungslsg. und denaturierte Sonde zur Membran geben
- über Nacht bei 68°C hybridisieren
- Hybridisierungslsg. vollständig abgießen
- zweimal 5 min mit Waschlösung I bei RT waschen
- zweimal 15 min mit Waschlösung II bei 68°C waschen
- Membran in Schale überführen und 1 min mit Puffer I behandeln (Schüttler)
- 30 min Puffer II (Schüttler)
- 30 min Puffer II mit anti-Digoxygenin-alkalische Phosphatase-Konjugat
- 1µl / 10 ml Puffer II
- Membran in neue Schale überführen
- zweimal 15 min mit Puffer I + Tween 80 (0.3 %) waschen (Schüttler)
- zweimal 5 min mit Puffer III waschen (Schüttler)
- Nachweis: 30 ml Puffer III + 44µl NBT + 32µl BCIP im Dunklen (nicht schütteln)
- Reaktion mit H₂O stoppen

3.22 Zellschnellaufschluß zur qualitativen Analyse vom Gesamtprotein

Probenpuffer für SDS-PAGE

- 100 mM Tris-HCl, pH 6.8
- 1 M β -Mercaptoethanol
- 6 % SDS
- 12 % Glycin
- 0,2 % Bromphenolblau

Durchführung:

- \bar{u} N-Kultur anwachsen lassen und o.D. einer 1:10 Verdünnung bei 450 nm bestimmen
- 1.5 ml Kultur in Eppendorfgesäß überführen
- zentr. 5 min., 13000 rpm (Biofuge)
- Überstand quantitativ entfernen
- Pellet in Probenpuffer resuspendieren (30 μ l Probenpuffer/o.D. 450)
- 10-15 min., 100°C
- zentr. 10 min., 13000 rpm (Biofuge)
- Überstand für SDS-PAGE oder bei -20°C lagern
- 3-10 μ l auf SDS-Gel auftragen

3.23 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) nach Lämmlil modifiziert (1970)

Die Proteine wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Mengenangaben für Verbrauchsmittel beziehen sich hierbei auf Glasplatten mit den Maßen 28 x 15 cm.

Verwendete Puffer und Lösungen:

RB-Stammlösung 10 X

- 144 g Glycin
- 30 g Tris-Base
- ad 1 l H₂O Millipore

RB-Gebrauchslösung

- 100 ml RB-Stammlösung
- 10 ml 10 % SDS
- ad 1 l H₂O Millipore

Coomassie Blue Färbelösung

- 25 % Isopropanol
- 10 % Essigsäure
- 1 % Coomassie Brilliant Blue G250

Entfärber für Acrylamid-Gele

- 25 % Isopropanol
- 10 % Essigsäure

Konservierungspuffer für Acrylamid-Gele

- 3 % Glycerin
- 25 % Isopropanol

Die Mengenangaben für Verbrauchsmittel beziehen sich hierbei auf Glasplatten mit den Maßen 28 x 15 cm.

	15 % Trenngel	5 % Sammelgel
30 % Acrylamid	16.5 ml	1.26 ml
1 % Bisacrylamid	2.85 ml	0.99 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.7	8.25ml	-
1 M Tris-HCl, pH 6.8	-	0.93 ml
H ₂ O Millipore	4.95 ml	4.29 ml
10 % SDS	330 µl	90 µl
10 % APS	115 µl	51 µl
TEMED	14.5 µl	12 µl

Färben von SDS-Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie Blue

- Gel in Coomassie Blue-Färbelösung überführen
- mind. 30 min. bei RT schütteln
- Gel mit Wasser abspülen
- Entfärber zugeben und bei RT schütteln bis kein Hintergrund mehr sichtbar ist (eventuell Entfärber wechseln)

Trocknen von SDS-Polyacrylamid-Gelen zur Konservierung

- nach vollständigem Entfärben Konservierungspuffer zugeben und 15 min. bei RT schütteln
- Gel luftblasenfrei zwischen Einmachhaut auf Rahmen aufspannen
- Gel mind. zwei Tage trocknen, RT
- getrocknetes Gel in Plastikfolie einschweißen

3.24 Anreicherung von Bakteriophagen aus Süßwasser

- Sterilfiltration von ca. 20 ml Wasserprobe durch einen Membranfilter (0.44µm)
- 2 ml Wasserprobe add. 0.5 ml 4-fach TBY, 100µl üNK des Indikators
- bei 26°C über Nacht rollern
- 10 min Zentrifugation 13000 rpm (Eppendorfzentrifuge)
- 20 µl auf Indikatorplatte tropfen
- über Nacht bei 26°C bebrüten
- weitere Anreicherung identifizierter Phagen aus Einzelplaques

3.25 Herstellung einer Indikatorplatte

- 100 µl log-Kultur in ein Weichagarröhrchen füllen
- (bei P1 Zugabe von 20 µl 1 M CaCl₂)
- add. 3 ml Weichagar
- zügig auf Agarplatte ausgießen

3.26 Abwaschlysate

- in ein Weichagarröhrchen pipetieren
100-200 µl log Kultur des Wirtsbakterium (je nach Titer)
x µl Phagenlysat (so daß ca. 20000 - 30000 Plaques zu erwarten sind)
(bei P1 Zugabe von 20 µl 1 M CaCl₂)
- 0.5 ml TBY
- 3 ml Weichagar
- zügig auf die Platte ausgießen
- Inkubation bis zur konfluenten Lyse

- Weichagarschicht mit 0.5 ml TBY überschichten und anschließend in ein Corex-Röhrchen überführen
- add. 100 µl Chloroform, mit Glaspipette unterrühren
- 15 min stehen lassen
- 30 min 10000 rpm 4°C (Rotor A8.24) zentrifugieren
- Überstand in ein Glasröhrchen füllen

3.27 Herstellung eines Bakteriophagenlysats

Puffer D

- 20 mM Tris-HCl, pH 7.5
- 50 mM NaCl

Durchführung:

- 500 ml Vollmedium mit üNK des Wirtsstammes animpfen
- bei geeigneter Temperatur bis zu einem Titer von $2-3 \times 10^8$ schütteln
- Infektion mit Phagen mit einer Multiplizität von 0.1 - 0.5
- bis zur vollständigen Lyse weiterschütteln
- 15 min 7000 rpm 4°C (Rotor A6.14) zentrifugieren
- Überstand 2 h bei 12000 rpm 4°C (Rotor A6.14) zentrifugieren
- Überstand quantitativ entfernen
- Pellet vorsichtig in kleinem Volumen (ca. 1 ml) TBY suspendieren
- CsCl Stufengradienten herstellen, dazu je 0.7 ml CsCl Lösung der Dichten 1.6, 1.5, 1.4 und 1.3 vorsichtig übereinanderschichten
- Phagenlysats auf den Gradienten auftragen und vorsichtig mit Puffer D überschichten
- austrarieren
- in der Ultrazentrifuge 2 h bei 35000 rpm (Rotor TST 55.5) bei 15°C zentrifugieren
- Zentrifugenröhrchen unten anstechen und Phagenbande auffangen
- Dialyse gegen Puffer D

3.28 Induktion von Prophagen

- Bakterienkultur auf TBY-Agarplatte ausstreichen und ca. 6 h bei geeigneter Temperatur inkubieren
- UV-Induktion 20 sek auf Transilluminator Wellenlänge 312 nm
- Bakterien mit 3 ml Weichagar und 100 µl log Kultur eines möglichen Wirtsstammes überschichten
- Inkubation über Nacht bei geeigneter Temperatur
- Anreicherung der induzierten Prophagen aus Einzelplaques

3.29 Isolierung von Bakteriophagen-DNA

Material:

Kirby-Mix

- 88 ml Phenol
- 12 ml Kresol
- 0.1 g Hydroxychinolin
- Gesättigt mit 100 mM Tris-HCl, pH 8

TE-Puffer

- 10 mM Tris-HCl, pH 8.0
- 10 mM NaCl
- 1 mM EDTA

Durchführung:

- Phagenlysats mit gleichem Volumen Kirby Mix mischen
- 5 min bei 13000 rpm (Biofuge) zentrifugieren
- Oberphase in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- Phenolextraktion ein zweites mal wiederholen
- Oberphase ün gegen TE-Puffer (mindestens 2 Wechsel) dialysieren

3.30 Elektronenmikroskopie von Bakteriophagen

Die elektronenmikroskopischen Bilder der Bakteriophagen wurden mit dem Zeiss Elektronenmikroskop 109 gemacht. Hierfür wurden 8 µl durch zwei CsCl-Gradienten aufgereinigte Bakteriophagen (siehe 3.7.23 Herstellung eines Phagenlysats) mit einem Titer von 1×10^9 auf Kohlebeschichtete und beglimmte Grits aufgetragen. Nach 30 Sekunden wurden die Phagen mit Filterpapier abgesaugt und anschließend 3 mal mit 8µl 1%iger Uranylacetatlösung gewaschen.

3.31 Partielle Hydrolyse mit Lambda Exonuklease

Lambda Exonuklease ist ein prozessives Enzym, welches die 5'-Enden von doppelsträngiger DNA degradiert. Es wurde verwendet, um terminale Redundanz von Bakteriophagen DNA mittels PFGE nachzuweisen.

- x µl Bakteriophagen DNA
- 67 mM Glycine-KOH
- 2.5 mM MgCl₂
- auf 19 µl mit H₂O auffüllen
- add. 1 µl Lambda Exonuklease (5000 U/ml)
- je nach Länge der terminalen Redundanz 15, 20 oder 25 Minuten Inkubation bei 12°C
- 20 Minuten 80°C, danach im ausgeschalteten Wasserbad auf mindestens 40°C abkühlen lassen
- DNA für Pulsfeldgelelektrophorese einsetzen

3.32 Partielle Hydrolyse mit Nuclease *Bal-31*

Bal-31 Exonulease degradiert 3' und 5' Enden von doppelsträngiger DNA. Das Enzym wurde verwendet, um zyklische Permutation bei terminal redundanter Bakteriophagen-DNA nachzuweisen.

- x µl Bakteriophagen DNA
- 2 µl 10x Nuclease *Bal-31* Puffer:
 - 6 M NaCl
 - 120 mM CaCl₂
 - 120 mM MgCl₂
 - 200 mM Tris-HCl
 - 10 mM EDTA pH 8.0
- auf 19µl mit H₂O auffüllen
- add. 1µl *Bal-31* Nuclease
- Inkubation bei 30°C (0, 10, 20, 30, 40 min)
- add. 20 mM EGTA
- Inaktivierung des Enzyms 10 min bei 65°C
- Hydrolyse der DNA mit geeignetem Restriktionsenzym
- Agarosegelelektrophorese

3.33 Datenbanken und Computersoftware

Die taxonomische Einordnung von 16S-rDNA-Sequenzen erfolgte durch Vergleiche mit Sequenzen einer speziellen Datenbank für ribosomale-DNA (Ribosomal-Database-Projekt II (Maidak *et al.*, 2001)).
Ribosomal Database: rdp.cmc.msu.edu

DNA-Sequenzen wurden mit dem Programm BlastN der NCBI Datenbank auf Homologien zu gespeicherten Datensätzen verglichen. Für den Vergleich von Aminosäuresequenzen wurde die BlastP Datenbank verwendet (Altschul *et al.* 1997). Konservierten Proteindomänen wurde mittels des Programms NCBI Conserved Domain Search untersucht.
NCBI: ncbi.nlm.nih.gov

Plasmidkarten wurden mit dem Programm Clone-Manager 5.0 (Scientific and Educational Software) erstellt.

Einzelsequenzen wurden mit dem Seq-Man-Programm DNA-Star 4.06 (Lasergene) bearbeitet.
Die Bearbeitung von Sequenzkurven erfolgte mit dem Programm Chromas (Version 2.2, Technelysium).
Chromas: technelysium.com.au/chromas.html

Potentielle Transmembrandomänen wurden mit dem Programm TMHMM-Server v. 2.0 der technischen Universität Dänemark untersucht.
TMHMM: cbs.dtu.dk/services/TMHMM/

Zur Bestimmung von Signalpeptiden wurde das Programm Signal-P 3.0 Server der technischen Universität Dänemark verwendet.
Signal P: cbs.dtu.dk/services/SignalP/

4. Ergebnisse

4.1 Isolierung einer bakteriellen Gemeinschaft aus Bielefelder Teichen

Zu Beginn dieser Arbeit wurden im Oktober 2003 Wasserproben aus dem Oberflächenwasser von drei Bielefelder Teichen entnommen. Die Teiche im Oetkerpark, am Schloßhof und am Meierteich sind laut Gewässerkatasteramt Bestandteil eines Gewässersystems, welches an der Ochsenheide beginnt und im Johannisbach endet. Es handelt sich aufgrund der Besiedelung mit Wasservögeln sowie deren regelmäßiger Fütterung um ein stark eutrophes Gewässer.

Die Wasserproben wurden auf ½ TBY-Medium ausplattiert und bei 28°C bebrütet. Auf diese Weise entstandene Kolonien wurden vereinzelt und fortlaufend durchnummeriert. Die Isolate aus dem Oetkerpark wurden mit O, die Stämme aus dem Schloßhofteich mit S und die Stämme aus dem Meierteich mit M bezeichnet. Insgesamt konnten auf diese Weise 848 Bakterienisolate gewonnen werden, 299 aus dem Oetkerpark-Teich, 257 aus dem Schloßhofteich und 292 Isolate aus dem Meierteich. Die Populationsdichte der unter den genannten Bedingungen kultivierbaren Bakterien in diesem Habitat betrug zur Zeit der Probenentnahme ca. 2×10^4 cfu/ml.

Ziel der ersten Versuche war es, möglichst viele der isolierten Bakterienstämme mindestens einer Bakteriengattung zuzuordnen.

4.1.1 Einordnung der Bakterienstämme durch den Vergleich ihrer Gesamtproteinmuster

In einem ersten Schritt wurden die 848 isolierten Stämme nach morphologischen Kriterien vorsortiert. Hierbei wurden folgende Eigenschaften der Bakterienkolonien bewertet:

- a) bakterielle Pigmente (Es weisen zum Beispiel 10 % der Isolate eine rote Farbe auf, 30 % der Bakterien zeigen verschiedene Gelbtöne und 60 % besitzen eine beige bis weiße Farbe),
- b) Kolonieform (rund, oval, ausgefranst),
- c) Struktur der Ränder der Kolonien (ausgefranst, glatt),
- d) Wachstum der Kolonie auf der Agarplatte (in den Agar hinein, erhoben, flach),
- e) Konsistenz der Kolonie (weich, hart, schleimig),
- f) Bildung von Fluoreszenzfarbstoffen,
- g) Geruch und
- h) Zellmorphologie und Beweglichkeit.

Eine genaue Einordnung konnte allerdings nur mit Hilfe von physiologischen und biochemischen Methoden vorgenommen werden. Hier fiel die Wahl auf den Vergleich der Gesamtproteinmuster der verschiedenen Bakterienisolate. Es handelt sich dabei um eine schnelle und preiswerte Methode, die sehr sensitiv ist und eindeutige Ergebnisse liefert. Anschließend sollte je ein Vertreter der so gebildeten Gruppen durch Sequenzanalyse der 16S-rDNA bestimmt werden.

Von 600 Isolaten wurden Gesamtproteinaufschlüsse erstellt und in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE) verglichen. 284 Bakterienstämme konnten in ½ TBY- oder TBY-Flüssigmedium nicht kultiviert

Ergebnisse

werden, oder stellten nach mehrmaligem Überimpfen ihr Wachstum ganz ein und wurden deshalb bei allen weiteren Versuche nicht weiter berücksichtigt.

Die folgende Abbildung zeigt ein SDS-Polyacrylamidgel mit Beispielen für die Einordnung von Bakterienstämmen nach ihrem Gesamtproteinmuster.

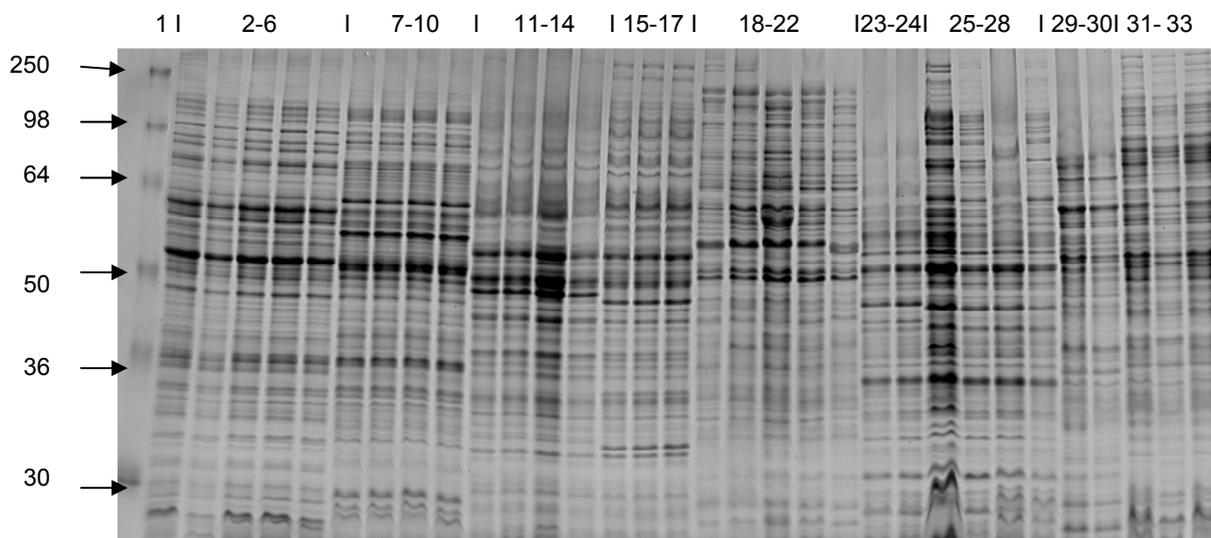


Abb. 4: SDS-Polyacrylamidgel mit Beispielen zur **Einordnung von Bakterienstämmen nach ihrem Gesamtproteinmuster** (Größenangaben in kDa)

Spur 1:	See Blue Pre-Stained Standard Protein Marker
Spur 2-6:	Gruppe <i>Pseudomonas</i> I (S56, S65, S72, S117, S118)
Spur 7-10:	Gruppe <i>Pseudomonas</i> II (S166, S176, S185, S244)
Spur 11-14:	Gruppe <i>Aeromonas</i> (S45, S46, S61, S115)
Spur 15-17:	Gruppe <i>Aeromonas</i> (S30, S32, S53)
Spur 18-22:	Gruppe <i>Brevundimonas</i> (O212, O214, O217, O272, O283)
Spur 23-24:	Gruppe <i>E.coli</i> I (M2, M4)
Spur 25-28:	Gruppe <i>E.coli</i> II (M11, M25, M27, M101)
Spur 29-30:	Gruppe <i>Flexibacter</i> (M183, M236)
Spur 31-33:	Gruppe <i>Flavobacterium</i> (S114, S18, S102)

Von den 600 untersuchten Bakterienisolaten zeigten 98 im SDS-PAGE mittels der gewählten Proteinaufarbeitungsmethode kein detektierbares Proteinmuster. 367 Bakterienstämme konnten anhand ähnlicher Proteinmuster zu größeren Gruppen formiert werden (Tab. 2). Die übrigen Bakterienstämme besaßen individuell verschiedene Gesamtproteinmuster und konnten so keiner speziellen Gruppe zugeordnet werden.

4.1.2 Bestimmung der Bakteriengattungen durch Sequenzanalysen von 16S-rDNA

Von jeweils ein bis zwei Vertretern der durch den Vergleich von Gesamtproteinmustern gebildeten Gruppen wurde eine 16S-rDNA-Sequenzanalyse durchgeführt. Die ermittelten Sequenzen wurden mit Datenbankeinträgen bereits bekannter 16S-rDNA Sequenzen verglichen und die Isolate hierdurch taxonomisch eingeordnet. Hierbei wurden die Ergebnisse der Ribosomalen-Datenbank: Ribosomal-

Ergebnisse

Database-Projekt II (Maidak *et al.*, 2001; rdp. cmc. msu. edu) denen der Blast-Datenbank (Altschul *et al.*, 1997; ncbi. nlm. nih. gov) vorgezogen, da hier beim Vergleich eine besondere Gewichtung auf die konservierten und variablen Regionen der 16S-rDNA gelegt wird.

Aufgrund einer größtenteils ermittelten Übereinstimmung unter 98 % wurden die gebildeten Gruppen nur den verschiedenen Bakteriengattungen und nicht einzelnen Arten zugeordnet. Für die Sequenzierung der 16S-rDNA wurden größtenteils zwei oder mehrere Vertreter jeder Gruppe ausgewählt. Dies sollte sicherstellen, daß ein sehr ähnliches Proteinmuster die Zuordnung zur gleichen Bakteriengattung rechtfertigt.

Die 367 eingruppierten Isolate konnten durch die oben beschriebene Methode 14 Bakteriengattungen zugeordnet werden. Der größte Anteil der Isolate (140; 38%) wurde der Gattung *Pseudomonas* zugeschrieben. Die Bakterienstämme der Gattung *Pseudomonas* und der Art *E.coli* wurden, bedingt durch minimale Unterschiede im Gesamtproteinmuster, in 3 bzw. 2 Gruppen aufgeteilt. Eine weitere große Gruppe stellen die *Aeromonaden* mit 74 Isolaten (20%) dar. Alle weiteren Gruppen beinhalten weniger als 10% im Gemeinschaftsvergleich. Es konnten 8 Isolate der Gattung *Flexibacter* (2.2%) sowie 25 Isolate der Gattung *Flavobacterium* (6.8%) zugeordnet werden. Zwei Untergruppen bestehen aus Gram-positiven Bakterien und konnten zur Gattung *Bacillus* (10%) bzw. *Arthrobacter* (5.7%) klassifiziert werden. Kleinere Gruppen konnten den Gattungen *Escherichia* (12 Isolate; 3.2%), *Hydrogenophaga* (14 Isolate; 3.8%), *Brevundimonas* (9 Isolate; 2.5%), *Shigella* (12 Isolate; 3.2%), *Chromobacterium* (5 Isolate; 1.4%), *Streptomyces* (4 Isolate; 1.1%), *Pantoea* (4 Isolate; 1.1%) und *Rahnella* (1 Isolat; 0.3%) zugeordnet werden.

Die Tabelle gibt Aufschluß, welche Bakterienstämme den oben genannten Gattungen zugeordnet werden konnten.

Tab. 2: Einordnung der aus dem Wasser isolierter Bakterien zu bekannten Gattungen

Gattung	Anzahl der Isolate	Zugeordnete Bakterienstämme
<i>Aeromonas</i>	74 20%	O5, O9, O11, O13, O17, O18, O19, O50, O51, O52, O56, O58, O59, O69, <u>O70</u> , O73, O76, O77, O81, O82, O85, O90, O92, O93, O98, O101, O104b, O153, O161, O238 S2, S9, S19, S20, <u>S24</u> , S26, S27, S30D, S32D, S32, S35, S45, S46, S52, S53, S61, S69, S115, S143, S151, S162, S195, S236, S237, S242, M1, M8, M10, M14, M34, M48, M51, M55, M61, M63, M74, M82, M142, M168, M172, M234, M269, M272
<i>Arthrobacter</i> I	21 5.7%	O122, O254, O261, O262, <u>O270</u> , O275, S168, S184
<i>Arthrobacter</i> II		O40, O170, <u>O177</u> , O186, O215, O216, O249, O250, O255, O264, O278 S17, M256

Ergebnisse

Gattung	Anzahl der Isolate	Zugeordnete Bakterienstämme
<i>Brevundimonas</i>	9 2.5%	O212, <u>O214</u> , O217, O272, <u>O283</u> , O284, O287c, S121c, M164
<i>Bacillus</i>	38 10%	O34, O49, O71, O87, O94, O155, O268, S29, M28, M35, M38, M39, M40, M41, M42, M46, M54, M57, M75a, M85, M87, M91, M125, M148, M158, <u>M159</u> , M174, M198, M200, M206a, <u>M110</u> , M111, M228, M229, <u>M231</u> , M251, M259, M261
<i>Chromobacterium</i>	5 1.4%	OB1, OB2, OB3, OB4, OB5
<i>Escherichia</i> I	12	<u>M2</u> , M4, M7
<i>Escherichia</i> II	3.2%	O221, M11, M15, M25, M26, M27, M52, M78, <u>M101</u>
<i>Flavobacterium</i>	25 6.8%	O11c, O165, O178, O179a, O180a, O194, O235, O237, S18, S93, S102, <u>S114</u> , S122, S123, S131, S139, S221, M89, M102, M117, M197, M212b, M124, M136, M278
<i>Flexibacter</i>	8 2.2%	M175, M180b, <u>M183</u> , M190, M235, M236, M271b, M279
<i>Hydrogenophaga</i>	14 3.8%	O39, O46, O48, O61, <u>O67</u> , O75, O83, O134, O146, O260, O269, O270, M140, M248
<i>Pantoea</i>	4 1.1%	O15, O22, <u>O25</u> , O57
<i>Pseudomonas</i> I	140 38%	O12, O23, O27, O29, O55, O62, O65, O66, O72, O78, O79, O112, O119, O128, O182, O190, O207, O286, S3, S4, S5, S10, S23, S42, S51, S56, S65, S72, S117, S118, S166, S176, S185, S208, S232, S244, S248, S251, S252, M19, M69, M75b, M86, M92, M114, M115, M121, M206b, M225
<i>Pseudomonas</i> II		O2, O3, O4, O6, O7, O8, O10, O16, O28, O33, <u>O43</u> , O53, O54, O63, O64, O80, O84, O86, O96, O100, O105, O107, O114, O224, O226, O230, O233, O242, O248, <u>S1</u> , S6, S7, S8, S11, S13, S14, S15, S16, S22, S36, S39, S40, S101, S108, S159, S169, S190, S203, S213, S212a, S214, S228, S239, S245, M9, M12, M16, M17, M21, M22, M24, M29, M47, M53, M56, M62, M72, M73, M77, M97, M100, M129, M144, M147, M177, M189, M203, M210, M221, M227a, M227b, M232, M241, M249, M277
<i>Pseudomonas</i> III		O228, O281, O282, <u>O287a</u> , O288
<i>Rahnella</i>	1 0.3%	<u>O60</u>
<i>Shigella</i>	12 3.2%	O171, O172, O173, O179b, O180b, S127, S152, S164, S167, <u>S182</u> , S199
<i>Streptomyces</i>	4 1.1%	O232, O257, O280, S218

Da schon früh ein besonderes Interesse an den Bakterienstämmen der *E.coli* Gruppe bestand, wurde die Artbestimmung zusätzlich zur Sequenzierung der 16S-rDNA mittels eines api 20 E Identification Strip der Firma bio Mérieux bestätigt (die jeweiligen Testergebnisse befinden sich im Anhang dieser Arbeit). Für diese Tests wurden die Isolate M2 (Gruppe I) und M101 (Gruppe II) ausgewählt. Zusätzlich konnte die Zuordnung zu dieser Art durch Phagentypisierung verifiziert werden (siehe Kapitel: 4.5.7).

Die Bakterienstämme O18, O58 und S26 konnten durch RFLP-Analysen ihrer 16S-rDNA der Art *Aeromonas media* zugeordnet werden (Daten erstellt durch Figueras, Spanien).

Die Artbestimmung der *Brevundimonas vesicularis* Gruppe erfolgte zusätzlich zur Sequenzierung der 16S-rDNA durch Vergleiche physiologischer Daten des *Brevundimonas vesicularis* Typenstamm LMG 2350^T mit den Isolaten S121c und O283 in BIOLOG GN2 Mikrotierplatten (die Testergebnisse befinden sich im Anhang der Arbeit). Die 16S-rDNA des Isolates O283 wurde unter der Accession Nummer: DQ111026 in die Blast Datenbank aufgenommen. Auch für die Isolate dieser Gattung konnte durch Phagentypisierung die Artzuordnung bestätigt werden (siehe Kapitel: 4.5.8).

4.1.3 Vergleich der bakteriellen Gemeinschaft aus drei Fließgewässern Ostwestfalens

Die charakterisierte bakterielle Gemeinschaft des Gewässersystems, welches unter anderem die drei Teiche im Oetkerpark, am Schloßhof und den Meierteich beinhaltet, konnte mit zwei anderen Studien, in denen bakterielle Gemeinschaften von Fließgewässern in Ostwestfalen untersucht wurden, verglichen werden. Bei denen am Lehrstuhl für Didaktik der Universität Bielefeld angefertigten Arbeiten wurden die Gewässersysteme der Jölle und der Werre im Bezug auf ihre bakterielle Zusammensetzung näher charakterisiert (teilweise beschrieben in: Mannesmann *et al.*, 1990). Aus der Jölle wurden 671 Bakterien isoliert und mittels api-Analysen 21 verschiedenen Gattungen zugeordnet. Aus der Werre wurden an den Probenentnahmestellen Boffzen und Porta 272 Stämme isoliert und ebenfalls mittels api-Testsystemen charakterisiert und 14 verschiedenen Bakteriengattungen beigeordnet (Tab. 3).

Bei allen drei untersuchten Systemen handelt es sich um Fließgewässer im Raum Ostwestfalen. Hierbei bildet das von mir charakterisierte System das kleinste, fast stehende Gewässer mit einer nur geringen Durchflußrate. Bei der Jölle handelt es sich um ein kleines Gewässer im Bereich Bielefeld. Die Werre, das größte untersuchte Gewässer, verläuft über Boffzen und Porta bevor es in die Weser mündet.

Die drei Gemeinschaften zeigen eine unterschiedliche Zusammensetzung. Innerhalb der drei charakterisierten bakteriellen Gemeinschaften konnten Bakterien aus 35 verschiedenen Gattungen identifiziert werden. Die abundantesten Gruppen innerhalb der Gemeinschaften sind in der Jölle die Gattungen *Escherichia* und *Enterobacter* sowie in der Werre die Gattungen *Aeromonas* und *Enterococcus*. In der von mir beschriebenen Gemeinschaft sind die Gattungen *Pseudomonas* und *Aeromonas* zahlenmäßig am häufigsten vertreten. Interessant sind die hohen Anzahlen an *Escherichia* und *Enterobacter*-Spezies, welche in Verbund der untersuchten Teiche zahlenmäßig nur geringfügig vertreten sind. Die Reinheit des Trink-Wassers wird durch den Gehalt an coliformen Bakterien bestimmt. Da sie im Darmtrakt von Menschen und warmblütigen Tieren in hoher Anzahl existieren dienen sie als Indikator für eine fäkale Kontamination des Wassers.

Auch die Gattung *Pseudomonas*, welche innerhalb der Teiche die größte Gruppe bildet, macht prozentual in der Jölle nur 4.6 % der Gemeinschaft aus. Die Gattungen *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Klebsiella* und *Shigella* scheinen innerhalb der Gewässer die zahlenmäßig häufigsten Gruppen darzustellen, wobei in allen drei Systemen nur die Gattungen *Escherichia*, *Pseudomonas* sowie *Aeromonas* detektiert werden konnten. Hierbei handelt es sich (mit Ausnahme der Gattung *Escherichia*, welche mit 3.2 % erst an Position 7 der relativen Häufigkeit steht) innerhalb des von mir untersuchten Systems um die am häufigsten detektierten Gattungen.

Tab. 3: Zusammensetzung von Gemeinschaften verschiedener Standorte

Gattung	Anzahl der Isolate in %		
	Jölle	Werre	Teiche
<i>Pseudomonas</i>	4.6	7.7	38
<i>Aeromonas</i>	9.1	19.9	20
<i>Escherichia</i>	22.8	4	3.2
<i>Enterobacter</i>	17.4	12.9	
<i>Klebsiella</i>	7.7	6.6	
<i>Serratia</i>	7.1	2.2	
<i>Shigella</i>	4.3		3.2
<i>Citrobacter</i>	4.4	1.8	
<i>Flavobacterium</i>	1.3		6.8
<i>Vibrio</i>	1.4	4	
<i>Enterococcus</i>		17.3	
<i>Bacillus</i>			10
<i>Micrococcus</i>		11	
<i>Staphylococcus</i>		7.7	
<i>Arthrobacter</i>			5.7
<i>Yersinia</i>	2.4		
<i>Actinobacter</i>	2.2		
<i>Hydrogenophaga</i>			3.8
<i>Brevundimonas</i>			2.5
<i>Pasteurella</i>	1.3		
<i>Hafnia</i>	1.3	1.5	
<i>Flexibacter</i>			2.2
<i>Providencia</i>	1.2		
<i>Kluyvera</i>	0.3	1.8	
<i>Chromobacterium</i>			1.4
<i>Moraxella</i>	0.6		
<i>Streptomyces</i>			1.1
<i>Pantoea</i>			1.1
<i>Streptococcus</i>		1.5	
<i>Proteus</i>	0.4		
<i>Salmonella</i>	0.3		
<i>Edwardsiella</i>	0.1		
<i>Alcaligenes</i>	0.1		
<i>Rahnella</i>			0.3

4.2 Identifizierung und Charakterisierung der Plasmide

Da das Hauptinteresse dem Potential für horizontalen Gentransfer galt, wurde der Plasmidgehalt der Gemeinschaft bestimmt.

Die Bezeichnung der Plasmide erfolgte nach ihrer jeweiligen Stammnummer. Das 30 kb- Plasmid aus dem Stamm O60 der Gattung *Rahnella* wird demnach als pO60 bezeichnet. Bei Bakterienstämmen mit mehr als einem Plasmid wurden die Plasmide zusätzlich nach steigender Größe numeriert. Das kleinste Plasmid des *E.coli* Stammes M101 heißt dementsprechend pM101.1; das größte pM101.10.

4.2.1 Ermittlung des Plasmidgehaltes der Isolate

Um den Plasmidgehalt der Isolate zu bestimmen, wurde die Plasmidisolierungsmethode nach Ramos-Gonzales *et al.* (1991) ausgewählt. Bei dieser qualitativen Analyse handelt es sich um eine alkalische Lyse mit der Plasmide aus Gram-negativen sowie diversen Gram-positiven Bakterienstämmen isoliert werden können. Hierbei ist es möglich, Plasmide mit einer Größe zwischen 1 kb und 250 kb im Agarosegel zu trennen. Mittels dieser Methode können allerdings aufgrund der alkalischen Lyse keine RNA-haltigen Plasmide sowie lineare und intergrierte Plasmide nachgewiesen werden. Das nachfolgende Bild zeigt eine Auswahl verschiedener plasmidhaltiger Isolate. Zur Größenbestimmung von Plasmiden wurden die Referenzplasmide F (100 kb), SAL (80 kb) und RP4 (54 kb) verwendet. Die Größe der kleinen Plasmide wurde anhand des λ -Markers und pUC-Vektorplasmiden abgeschätzt.

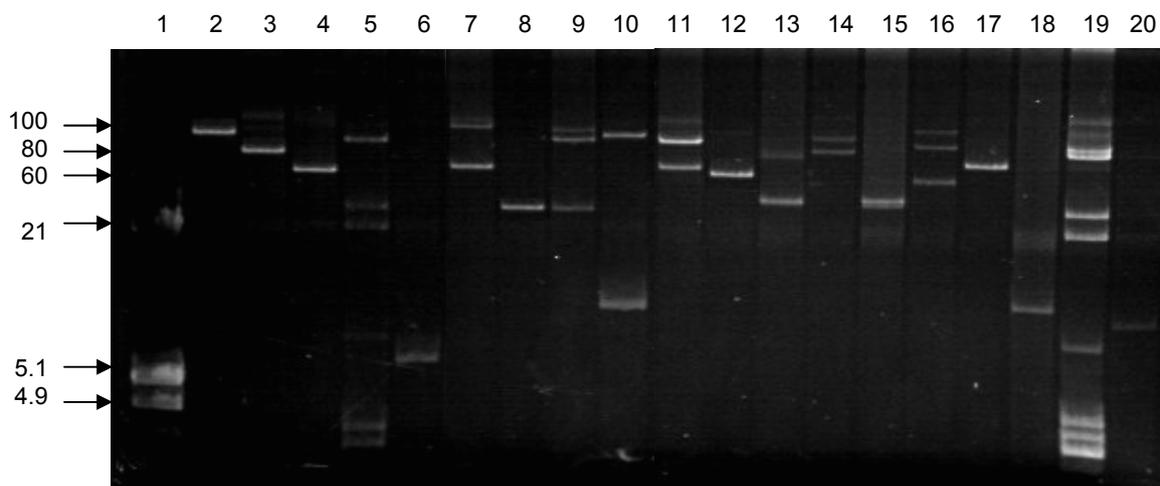


Abb. 5: Identifizierung von Plasmid-DNA verschiedener Isolate

Spur 1: λ EH-Marker (Größenangaben in kb), Spur 2: F-Faktor, Spur 3: SAL, Spur 4: RP4, Spur 5: pM78 *E.coli*, Spur 6: pM97 *Pseudomonas*, Spur 7: pM134, Spur 8: pM162, Spur 9: pM166 Spur 10: pM74, Spur 11: pM261, Spur 12: pM278, Spur 13: pO5 *Aeromonas*, Spur 14: pO15 *Pantoea*, Spur 15: pO18 *Aeromonas*, Spur 16: pO25 *Pantoea*, Spur 17: pO34, Spur 18: pO210, Spur 19: pO221 *E.coli*, Spur 20: pS35
Agarosegel 0.8%

Die folgende Tabelle (Tab. 4) zeigt alle plasmidhaltigen Vertreter der 600 auf ihren Plasmidgehalt untersuchten Bakterienstämme, sowie die geschätzte Größe der Plasmide.

Es konnten nur für 5 der 14 bestimmten Bakteriengattungen plasmidhaltige Vertreter gefunden werden (Tab. 5). Die meisten plasmidhaltigen Stämme wurden in der *E.coli* Population von nur 12 Mitgliedern nachgewiesen. Hier besitzen alle Isolate Plasmide. Von der abundantesten Gattung *Pseudomonas* enthalten dagegen nur 5.7 % aller Isolate Plasmide (8 Stämme).

Ergebnisse

Tab. 4: Plasmidhaltige Bakterienstämme

Stamm	Gattung	Plasmidgröße (kb)	
O5	<i>Aeromonas</i>	80, 25	
O18		25	
O19		85	
O50		30	
O52		100	
O85		30	
O98		30	
M8		18, 10	
M19		40	
M82		5	
O221		<i>Escherichia</i>	1.8, 2.3, 3.5, 3.8, 4, 20, 30, 80, 85, 88
M2			25, 78, 85
M4			25, 78, 85
M7	78, 80		
M11	1.8, 2.3, 2.4, 3.3, 3.5, 3.8, 30, 85, 86		
M15	1.5, 2.4, 2.6, 3., 2 3.3, 4.2, 5.3, 7, 8.5, 15, 86		
M25	2.3, 3.5, 3.8, 84, 85		
M26	2.3, 2.4, 3.4, 78, 88		
M27	1.8, 2.5, 3.5, 3.8, 20, 85		
M52	2.3, 2.4, 3.5, 3.8, 20, 30, 83, 84		
M78	1.8, 2.3, 2.4, 3.3, 3.5, 3.8, 20, 30, 85		
M101	1.8, 2.3, 3.5, 3.8, 4, 20, 30, 80, 85, 88		
O15	<i>Pantoea</i>	85, 80	
O25		100, 90, 50	
O33	<i>Pseudomonas</i>	30	
O72		30	
S16		85	
M9		70	
M12		70	
M29		70	
M97		6	
O182		90, 35	
O60		<i>Rahnella</i>	30
O34	66		
O37		85, 20	
O41		40	
O47		18	
O120		30, 15	
O146		60, 6	
O188		60	
O193		95	
O200		95, 5	
O210		12	
O226		88, 21	
O259		50	
O260		10	
O265		86	
O271		80	
O281		86	
S34		60, 15	
S35		10	
S59		45	
S139		90, 88, 30	
S153		60, 8	
S165		90, 88, 30	

Ergebnisse

Stamm	Gattung	Plasmidgröße (kb)
S167		89, 15
S168		95, 90
S182		90, 88, 30
S199		90, 88, 30
S209		90, 88, 30
M34		100, 15, 4.5
M36		80
M37		55
M74		93, 13
M92		100
M134		100, 65
M141		25
M162		35
M166		95, 90, 22
M182		25
M194		60, 40
M242		90
M258		120, 25
M261		90, 65
M263		90, 55
M278		93, 55

Der Plasmidgehalt der Gattung *Aeromonas* (74 Stämme) beträgt mit 10 plasmidhaltigen Stämmen 13.5 %, weiterhin sind zwei der vier isolierten Stämme der Gattung *Pantoea* (50 %) sowie der *Rahnella* Stamm plasmidhaltig. Für alle übrigen Gattungen konnten keine plasmidhaltigen Vertreter bestimmt werden. Von den 233 nicht zugeordneten Stämmen sind 43 (18.5 %) plasmidhaltig. Insgesamt konnten unter den 600 untersuchten Bakterienstämmen 75 plasmidhaltige Isolate gefunden werden. Dies entspricht einem Prozentsatz von 12.5.

Tab.5: Plasmidgehalt der einzelnen Bakteriengattungen sowie deren Anzahl plasmidhaltigen Vertreter und die Gesamtzahl der Bakterienstämme der jeweiligen Gattungen

Gattung	Gesamtzahl der Isolate	Anzahl der plasmidhaltigen Isolate	Plasmidgehalt in %
<i>Pseudomonas</i>	140	8	5.7
<i>Aeromonas</i>	74	10	13.5
<i>Bacillus</i>	38	0	0
<i>Flavobacterium</i>	25	0	0
<i>Arthrobacter</i>	21	0	0
<i>Hydrogenophaga</i>	14	0	0
<i>Escherichia</i>	12	12	100
<i>Shigella</i>	12	0	0
<i>Brevundimonas</i>	9	0	0
<i>Flexibacter</i>	8	0	0
<i>Chromobacterium</i>	5	0	0
<i>Streptomyces</i>	4	0	0
<i>Pantoea</i>	4	2	50
<i>Rahnella</i>	1	1	100
ohne Zuordnung	233	43	18.5
Gesamt	600	75	12.5

Ergebnisse

In den meisten der 75 plasmidhaltigen Isolate konnten ein bis zwei Plasmide detektiert werden. Zehn Isolate, welche größtenteils keiner Gattung zugeordnet werden konnten, beinhalten drei verschiedene Plasmide. Bei dieser Bestimmung wurde davon ausgegangen, daß jede Plasmidbande im Agarosegel einem Plasmid entspricht und es sich hierbei nicht um verschiedene Konformationen ein und desselben Plasmides handelt (vgl. Abb. 6).

Auffällig -in der Anzahl ihrer Plasmide- zeigte sich die Isolate der *E.coli* Population. Die Stämme der *E.coli* Gruppe II beinhalten alle zwischen 5 und 11 Plasmide. Mit Größen von 1.8 kb bis zu ca. 88 kb. Die drei Stämme der *E.coli* Gruppe I, die sich in ihrem Gesamtproteinmuster geringfügig von den in die Gruppe II eingeordneten Stämmen unterschieden, enthalten auch alle immer noch zwischen zwei und drei Plasmide.

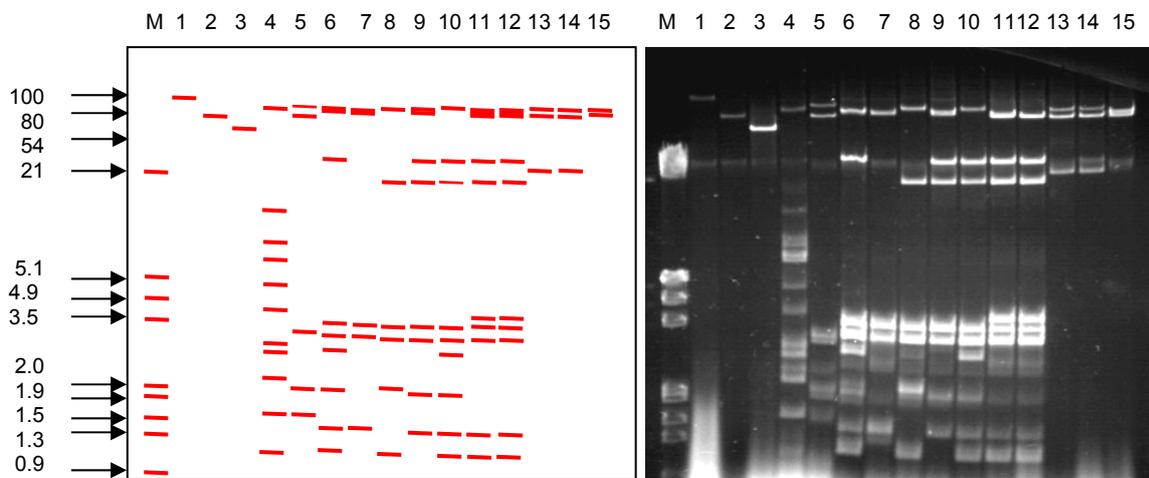


Abb. 6: **Bestimmung des Plasmidgehaltes der *E.coli*-Isolate**

Zur besseren Veranschaulichung der Plasmidanzahl in den *E.coli* Isolaten befindet sich links neben dem Agarosegel eine Graphik, welche die Lage der einzelnen Plasmide demonstriert.

M: λ -EH Marker, Plasmid DNA aus: Spur 1: F, Spur 2: SAL, Spur 3: RP4, Spur 4: M15, Spur 5: M26, Spur 6: M11, Spur 7: M25, Spur 8: M27, Spur 9: M52, Spur 10: M78, Spur 11: M101, Spur 12: O221, Spur 13: M2, Spur 14: M4, Spur 15: M7

Agarosegel 0.8%

Die meisten Plasmide - insgesamt 11 - finden sich im Isolat M15. Die Bakterienstämme M101 und O221 tragen je 10 verschiedene Plasmide. Diese beiden Stämme, welche aus unterschiedlichen Bielefelder Teichen stammen (Oetkerpark-Teich und Meierteich), zeigen ein identisches Plasmidmuster. Die übrigen Isolate der Gruppe *E.coli* II besitzen wahrscheinlich größtenteils dieselben oder ähnliche Plasmide. Allerdings fehlen jeweils einzelne Plasmide oder es sind zusätzliche vorhanden, was beweist, daß die Isolate nicht direkte Geschwister sind.

Zur besseren Veranschaulichung zeigt die Tabelle (Tab. 6) nochmals den Plasmidgehalt und die Anzahl an Plasmiden dieser besonders interessanten Gruppe.

Ergebnisse

Tab. 6: **Anzahl und Größe von Plasmiden aus *E.coli* Isolaten**

Gruppe	Isolat	Anzahl Plasmide	Plasmidgröße in kb
I	M2	3	25, 78, 85
	M4	3	25, 78, 85
	M7	2	78, 80
II	O221	10	1.8, 2.3, 3.5, 3.8, 4, 20, 30, 80, 85, 88
	M11	9	1.8, 2.3, 2.4, 3.3, 3.5, 3.8, 30, 85, 86
	M15	11	1.5, 2.4, 2.6, 3.2, 3.3, 4.2, 5.3, 7, 8.5, 15, 86
	M25	5	2.3, 3.5, 3.8, 84, 85
	M26	5	2.3, 2.4, 3.4, 78, 88
	M27	6	1.8, 2.5, 3.5, 3.8, 20, 85
	M52	8	2.3, 2.4, 3.5, 3.8, 20, 30, 83, 84
	M78	9	1.8, 2.3, 2.4, 3.3, 3.5, 3.8, 20, 30, 85
	M101	10	1.8, 2.3, 3.5, 3.8, 4, 20, 30, 80, 85, 88

Die Anzahl der Plasmide in den *E.coli* Isolaten wurde aus vergleichenden Analysen der Plasmidmuster und Daten aus Hybridisierungen mit Sonden von vereinzelt Plasmiden gewonnen. Bedingt durch die hohe Anzahl an verschiedenen Plasmiden handelt es sich bei den beschriebenen Daten -im Bezug auf die Größe und Anzahl der Plasmide- um Schätzungen und möglicherweise nicht um genaue Anzahlen.

4.2.2 Test auf Antibiotikaresistenzen

Da Interesse an der Genfracht der jeweiligen Plasmide bestand, wurden in den folgenden Versuchen die plasmidhaltigen Vertreter auf das Vorhandensein von Antibiotika- und Schwermetallresistenzen getestet. Dies geschah auch im Hinblick auf die Detektion von Markergenen, welche für eine Selektion bei den folgenden Mobilisierungs- und Konjugationsexperimenten verwendet werden konnten.

Für die Antibiotikaresistenztests wurden die plasmidhaltigen Bakterienstämme auf TB-Y-Agarplatten ausplattiert. Dabei wurden folgende Antibiotika getestet: Ampicillin (100 µg/ml), Chloramphenicol (30 µg/ml), Gentamycin (20 µg/ml), Kanamycin (30 µg/ml), Nalidixinsäure (50 µg/ml), Streptomycin (100 µg/ml) und bei den Stämmen der Gruppen *Aeromonas* und *E.coli* zusätzlich Tetracyclin (10 µg/ml).

Sowohl die plasmidhaltigen als auch die plasmidfreien Stämme der Gattung *Aeromonas* sind ausnahmslos tetracyclinresistent und größtenteils Ampicillin resistent. Bei den anderen Stämmen und im besonderen bei den Vertretern der Art *E.coli* (Gruppe II) zeigte sich eine besonders häufige Resistenz gegen die Antibiotika Ampicillin und Chloramphenicol. Resistenzen gegen Gentamycin und Kanamycin konnten hingegen eher selten innerhalb der getesteten Stämmen detektiert werden.

Da plasmidfreie und plasmidhaltige Stämme derselben Gattung häufig gleiche Antibiotikaresistenzen aufweisen und es bei vereinzelt Plasmiden der Stämme M101, O60 und O50 nicht möglich war, die Antibiotikaresistenzen einem einzelnen Plasmid zuzuordnen, liegt die Vermutung nahe, daß die meisten Antibiotikaresistenzen chromosomal- und nicht plasmidkodiert vorliegen. Möglicherweise handelt es sich bei dem beschriebenen Phänomen auch eher um eine Toleranz gegen die jeweiligen Antibiotika als um eine „echte“ Resistenz. Die folgende Tabelle (Tab. 7) zeigt das Antibiogramm aller plasmidhaltigen Bakterienstämme.

Ergebnisse

Tab. 7: **Antibiogramm aller plasmidhaltigen Bakterienstämme**

Stamm	Gattung	Plasmidgröße (kb)	Amp 100	Cm 30	Gm 20	Km 30	Nx 50	Sm 100	Tc 10
O5	<i>Aeromonas</i>	80, 25	+	-	-	-	-	-	+
O18		25	-	-	-	-	-	-	+
O19		85	+	-	-	-	-	-	+
O50		30	+	-	-	-	-	-	+
O52		100	+	-	-	-	-	+	+
O85		30	+	-	-	-	-	-	+
O98		30	+	-	-	-	-	-	+
M8		18, 10	+	-	-	-	-	-	+
M19		40	-	-	-	-	-	-	+
M82		5	+	-	-	-	-	+	+
O221		<i>Escherichia</i>	1.8, 2.3, 3.5, 3.8, 4, 20, 30, 80, 85, 88	-	+-	-	-	-	-
M2	25, 78, 85		-	-	-	-	-	-	-
M4	25, 78, 85		-	-	-	-	-	-	-
M7	78, 80		-	-	-	-	-	-	-
M11	1.8, 2.3, 2.4, 3.3, 3.5, 3.8, 30, 85, 86		+	+	-	-	-	+-	+
M15	1.5, 2.4, 2.6, 3.2, 3.3, 4.2, 5.3, 7, 8.5, 15, 86		+	+	-	+	-	+-	-
M25	2.3, 3.5, 3.8, 84, 85		+	+	-	-	-	+	+
M26	2.3, 2.4, 3.4, 78, 88		-	+	-	-	-	-	+
M27	1.8, 2.5, 3.5, 3.8, 20, 85		+	+	-	-	-	+	+
M52	2.3, 2.4, 3.5, 3.8, 20, 30, 83, 84,		+	+	-	-	-	+	+
M78	1.8, 2.3, 2.4, 3.3, 3.5, 3.8, 20, 30, 85		+	+	-	-	-	+	+
M101	1.8, 2.3, 3.5, 3.8, 4, 20, 30, 80, 85, 88		+	+	-	-	-	+	+
O15	<i>Pantoea</i>		85, 80	-	+	-	-	-	-
O25		100, 90, 50	-	-	-	-	-	-	
O33	<i>Pseudomonas</i>	30	-	+	-	-	-	-	
O72		30	+	+	-	-	+	-	
S16		85	+	-	+-	-	+	-	
M9		70	-	-	-	-	-	-	
M12		70	-	-	-	-	-	-	
M29		70	+	+	-	-	+	-	
M97		6	+	-	-	-	-	-	
O182		90, 35	-	+-	-	-	-	-	
O60	<i>Rahnella</i>	30	+	+	-	-	-	-	
O34		66	+	-	-	-	-	+-	
O37		85, 20	+	-	-	-	-	-	
O41		40	-	-	+-	+-	+	-	
O47		18	+	-	+-	-	-	-	
O120		30, 15	+	+	-	-	+	-	
O146		60, 6	-	-	-	-	-	-	
O188		60	-	-	-	-	-	-	
O193		95	+	-	-	-	-	-	
O200		95, 5	-	-	-	-	-	-	
O210		12	-	-	-	-	-	-	
O226		88, 21	+	-	-	-	+	-	
O259		50	+	-	-	+	+-	-	
O260		10	+	+-	-	-	-	-	
O265		86	-	+	-	-	+	-	

Ergebnisse

Stamm	Gattung	Plasmidgröße (kb)	Amp 100	Cm 30	Gm 20	Km 30	Nx 50	Sm 100	Tc 10
O271		80	+	-	-	-	-	-	
O281		86	-	+	+/-	-	+	-	
S34		60, 15	-	-	-	-	-	-	
S35		10	+	-	+/-	-	-	-	
S59		45	-	-	-	-	-	-	
S139		90, 88, 30	-	-	-	-	-	-	
S153		60, 8	-	-	-	-	-	-	
S165		90, 88, 30	-	-	-	-	-	-	
S167		89, 15	+	-	-	-	-	+/-	
S168		95, 90	-	-	-	-	-	+	
S182		90, 88, 30	-	-	-	-	-	-	
S199		90, 88, 30	-	-	-	-	+/-	-	
S209		90, 88, 30	-	-	-	-	-	-	
M34		100, 15, 4.5	-	-	-	-	-	-	
M36		80	-	-	-	-	+	+/-	
M37		55	-	-	-	-	-	-	
M74		93, 13	+	-	-	+/-	-	+/-	
M92		100	-	-	-	-	-	-	
M134		100, 65	+	-	-	+/-	-	-	
M141		25	-	-	+	+	-	-	
M162		35	+	-	-	-	+/-	+	
M166		95, 90, 22	-	-	-	-	-	+/-	
M182		25	-	-	-	-	-	-	
M194		60, 40	+	-	-	-	-	-	
M242		90	+	-	-	-	-	-	
M258		120, 25	-	-	-	-	-	-	
M261		90, 65	+	-	-	-	+	-	
M263		90, 55	-	-	-	-	-	-	
M278		93, 55	+	-	-	-	-	-	

+ resistent / - sensitiv

Da Isolate aus aquatischen Habitaten häufig Schwermetallresistenzen und im besonderen Quecksilberresistenzen aufweisen (Gauthier *et al.*, 1985), wurden im folgenden Versuchsteil alle Bakterienstämme dahingehend untersucht. Hierbei erfolgte der Test auf die Schwermetalle Kobalt, Zink, Nickel und Kadmium mit Hilfe von flüssigen Schwermetalllösungen, welche, in gestanzte Vertiefungen von TBV-Platten gefüllt wurden. Die zu testenden Bakterienstämme wurden vorher sternförmig auf das Loch zu auf die Agarplatten ausgestrichen. Stämme, bei denen sich kein Hemmhof um die Vertiefung mit der eingebrachten Schwermetalllösung ausbildete, wurden als resistent gewertet. In Vorversuchen konnte ermittelt werden, daß bei den Schwermetallen Kobalt, Zink und Nickel Konzentrationen von 5 mM und bei Kadmium 1 mM Lösungen notwendig sind, um eine Resistenz nachzuweisen.

Der Nachweis von Quecksilberresistenzgenen erfolgte mit den von Liebert *et al.* (1997) entwickelten *merA*- spezifischen Primern. Bei dem *merA*-Gen handelt es sich um ein essentielles Gen des Quecksilberresistenzoperons.

Es konnten bei ca. 40% der getesteten Isolate eine Reihe von Schwermetallresistenzen (vorwiegend gegen NiCl₂) nachgewiesen werden. Da wie im Fall der Antibiotikaresistenzen auch die Schwermetallresistenzen nicht eindeutig einem Plasmid zugeordnet werden konnten wurden die Experimente nicht weiter vertieft.

Plasmide mit zum Teil multiplen Antibiotikaresistenzen werden häufig durch exogene Isolierung in klinischen Isolaten oder in Kläranlagen detektiert (Dröge *et al.*, 2000). Aber auch für Isolate aus marinen Habitaten konnten Antibiotikaresistenzplasmide beschrieben werden (Hill *et al.*, 1992). Schwermetallresistenzplasmide werden dagegen oft nur innerhalb industriell belasteter Habitate detektiert (Campbell *et al.*, 1995). Auf den meisten Plasmiden, welche durch endogene Plasmidisolierung aus marinen Isolaten gewonnen werden konnten, liegen dagegen keine selektierbaren Markergene (Sobecky *et al.*, 1998). Auch bei vielen anderen exogenen sowie endogen isolierten Plasmiden aus natürlichen Habitaten wie dem Ackerboden (Battermann, 2002), marinen Sedimenten (Sobecky *et al.*, 1997; Cook *et al.*, 2001; Hermansson *et al.*, 1987), der Weizenrhizosphäre (van Elsas *et al.*, 1998) und der Rhizoplane von Salzsumpfmakrophyten (Beeson *et al.*, 2002) konnte keine Korrelation zwischen Plasmidgehalt und Antibiotika- oder Schwermetallresistenz festgestellt werden.

4.2.3 Zuordnung der Plasmide zu bekannten Inkompatibilitätsgruppen

Die Plasmide der 75 plasmidhaltigen Isolate sollten im folgenden bekannten Inkompatibilitätsgruppen (Inc-Gruppen) zugeordnet werden. Für den Nachweis von IncQ-, IncN-, IncP, und IncW-Plasmiden wurden Inc-spezifische Primer von Götz *et al.* (1996) und Tietze (Robert Koch Institut Werningerode) verwendet. Mit Hilfe dieser Primer wurden Amplifikate mit Inc-spezifischen Referenzplasmiden hergestellt und als Hybridisierungs-Sonden eingesetzt. Als Referenzen dienten die Plasmide RSF1010 (IncQ), R388 (IncW), RP4 (IncP) und pKM101 (IncN). Für die Detektion der Inc-Gruppen IncFI, IncFII, com9, IncII, IncB/O, IncK, IncHII, IncL/M, IncT, IncU, IncX und IncY wurden die von Couturier *et al.* (1988) entwickelten Sonden verwendet. Aufgrund der hohen Anzahl an verschiedenen Inc-Gruppen spezifischen Sonden wurden -für Hybridisierungen mit den Couturier Sonden- nur die besonders interessanten multiplasmid Stämme der *E. coli* Gruppe ausgewählt.

Tab. 8: Zuordnung der Plasmide zu bekannten Inkompatibilitätsgruppen

Stamm	Gattung	Plasmid	Inc-Gruppe
O50	<i>Aeromonas</i>	pO30	Q ?
O85		pO30	Q ?
O221	<i>Escherichia</i>	?	I
M101		?	I
M26		?	Y

Mit Hilfe der Inc-spezifischen Sonden konnten für die beiden 30 kb Plasmide pO50 und pO85 aus den *Aeromonas* Isolaten O50 und O85 bei Hybridisierungen mit einer IncQ spezifischen Sonde Signale erhalten werden (Tab. 8). Durch Hydrolysen mit Restriktionsendonukleasen konnte gezeigt werden, daß beide Plasmide identisch sind (Daten nicht gezeigt). PCR Amplifikationen mit den IncQ-spezifischen Primerpaaren *repC1/2* und *oriV1/2* ergaben Amplifikate der erwarteten Produktgröße. Mit den Primerpaaren *repB1/2* und *oriT1/2* konnten allerdings keine Amplifikate der richtigen Größe nachgewiesen werden. Alles in allem konnte nicht sicher bewiesen werden, daß es sich um Plasmide der IncQ-Gruppe handelt. Allerdings spricht ein weiteres Ergebnis für die Zugehörigkeit zur IncQ-Gruppe. Trotz mehrfacher Versuche konnten O50 und O85 nicht mit pSunny (IncQ) und RSF1010

(IncQ) transformiert werden (vgl. Kapitel 4.2.4). Um eine endgültige Klärung dieser Ergebnisse zu erhalten, müssten die PCR-Amplifikate in einem nächsten Schritt sequenziert und auf Homologien zu IncQ ähnlichen Sequenzen überprüft werden.

Ein Plasmid aus den multiplasmid *E.coli* Stämmen O221 und M101 konnte durch eine IncI spezifische Sonde detektiert werden. Hierbei handelt es sich um eines der drei größten Plasmide beider Stämme, welche ein identisches Plasmidmuster besitzen. Aufgrund der eng beieinander liegenden fast gleich großen Plasmide (ca. 80, 85, 88 kb) war es nicht möglich zu bestimmen, welches Plasmid durch die Hybridisierung detektiert werden konnte.

Im *E.coli* Isolat M26 konnte mittels einer IncY spezifischen Sonde ein Plasmid detektiert werden. Auch hier kann, bedingt durch die ähnliche Größe der Plasmide (78 und 88 kb), nicht genau bestimmt werden, um welches Plasmid es sich handelt.

Zur genauen Identifikation der detektierten Plasmide in den multiplasmid Stämmen müssten diese entweder vereinzelt werden oder durch Plasmid *curing* Mutanten erzeugt werden, welchen jeweils eines der großen Plasmide fehlt.

Zusammenfassung der Bakterien- und Plasmidisolierungsversuche

Insgesamt konnten aus den drei Bielefelder Teichen im Oetkerpark, am Schlosshof und am Meierteich 848 verschiedenen Bakterienstämme isoliert werden. 367 dieser Isolate konnten durch Vergleiche ihrer Gesamtproteinmuster 14 Bakteriengattungen zugeordnet werden. Durch Verwendung der Plasmidisolierungsmethode nach Ramos-Gonzales konnten unter den 600 untersuchten Bakterienstämmen 75 plasmidhaltige detektiert werden. Dies entspricht einem Plasmidgehalt von 12.5 %. Die Anzahl der beschriebenen Plasmide reicht hierbei von einem bis zu elf Plasmiden je Bakterienstamm. Die durchgeführten Antibiotika- und Schwermetallresistenztests gaben keine Hinweise auf plasmidkodierte Resistenzen. Die Plasmide pO50 und pO85 gehören möglicherweise zur Inkompatibilitätsgruppe IncQ. Bei einem der großen Plasmide aus den Bakterienstämmen M101 und O221 handelt es sich wahrscheinlich um ein IncI-Plasmid; weiterhin konnte im Isolat M26 eines der großen Plasmide der Inkompatibilitätsgruppe IncY zugeordnet werden.

4.2.4 Mobilisierung von pSunny durch Plasmide ausgewählter Isolate

Da die Markierung und Vereinzelnung der Plasmide aus den Isolaten aufwendig ist, wurden konjugative Plasmide zunächst indirekt durch Mobilisierung eines eingebrachten Plasmides (pSunny) (Güttler, 1998) nachgewiesen.

Bei dem Plasmid pSunny handelt es sich um ein Derivat des IncQ-Plasmides RSF1010 (Derbyshire *et al.*, 1987). IncQ-Plasmide sind *broad host range* Plasmide, mit deren Hilfe ein breites Spektrum an Rezipienten abgedeckt werden kann. Das Plasmid pSunny vermittelt Kanamycinresistenz (*aphA3*-Gen), Streptomycinresistenz und trägt ein modifiziertes *gfp*-Gen. Die Gene für Replikations- und Mobilisierungsfunktionen stammen ursprünglich vom Plasmid RSF1010. Vom konjugativen Plasmid werden alle weiteren für den Transfer benötigten Proteine zur Verfügung gestellt. Der Nachweis einer Mobilisierung eines nicht konjugativen Plasmids ist somit ein indirekter Nachweis eines konjugativen Plasmides.

Ergebnisse

Ausgewählte plasmidhaltige Bakterienstämme sollten im folgenden auf ihre Fähigkeit, pSunny zu mobilisieren, getestet werden. Hierzu wurden größtenteils Stämme mit nur einem Plasmid verwendet. Weiterhin wurden einzelne Isolate ausgewählt, die zusätzlich ein oder mehrere kleine Plasmide beinhalten, welche aufgrund ihrer Größe für eine Mobilisierung von pSunny nicht in Frage kommen. Da konjugative Plasmide von Gram-negativen Bakterien in der Regel größer als 30 kb sind, wurden fast ausschließlich Plasmide mit einer Größe von deutlich über 30 kb für die folgenden Versuche ausgewählt.

Das Plasmid pSunny wurde durch Elektroporation in die ausgewählten plasmidhaltigen Bakterienstämme eingebracht. Eine erfolgreiche Elektroporation wurde anhand der erworbenen Kanamycinresistenz und der unter UV-Licht grün-fluoreszierenden Farbe des *gfp*-Genprodukts ermittelt. Des Weiteren wurde pSunny mittels einer alkalifreien Plasmidisolierungsmethode nachgewiesen. Da es sich bei RSF1010 und seiner Derivate um alkali-sensitive Plasmide handelt, können diese nur mittels dieser speziellen Methode isoliert werden.

Auf diese Weise konnten 11 Stämme der Gattungen *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Rahnella* sowie sieben nicht eingruppierte Isolate für einen folgenden Test auf Mobilisierung erhalten werden.

Eine Elektrotransformation sowie die Mobilisierung von pSunny aus dem Stamm *E.coli* S17.1 in die *Aeromonas* Stämme O50 und O85 konnte nicht gezeigt werden. Beide Stämme beinhalten ein 30 kb Plasmid, welches möglicherweise zur IncQ-Gruppe gehört (Kapitel 4.2.3). Da zwei Plasmide einer Inc-Gruppe in derselben Bakterienzelle nicht koexistieren können, ist dies ein weiterer Hinweis für die mögliche Zuordnung der Plasmide zur IncQ Gruppe.

Als Rezipienten für die Mobilisierungstests wurden Bakterien der α - und γ -Proteobakteriengruppen ausgewählt. Hierbei wurden aus der γ -Proteobakteriengruppe als Rezipienten *E.coli* mit den Vertretern Ec294 und C600, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri* sowie das *Aeromonas media* Isolat S26 verwendet. Aus der α -Proteobakteriengruppe wurden das *Brevundimonas vesicularis* Isolat S121c und der Stamm *Paracoccus aminophilus* ausgewählt.

Zur Mobilisierung von pSunny wurden logarithmisch wachsende Kulturen der jeweiligen pSunnyhaltigen Isolate (Titer $1-3 \times 10^8$) mit logarithmisch wachsenden Kulturen der verschiedenen Rifampicin-resistenten Rezipientenstämmen im Verhältnis 1:1 gemischt und auf einer TBV-Agarplatte über Nacht bei 28°C inkubiert. Anschließend wurden die Kreuzungsansätze auf geeigneten Selektionsmedien ausplattiert. Die Transkonjuganten wurden –um spontanresistente Donoren von Transkonjuganten zu unterscheiden– durch den Vergleich ihrer Proteinmuster als solche bestätigt. Jeder Test auf den Transfer des Plasmides pSunny wurde wiederholt. Alle positiv bewerteten Ergebnisse wurden zur Berechnung der Mobilisierungsfrequenzen ein drittes Mal durchgeführt.

Von den 18 getesteten Stämmen konnte für 9 Isolate (O19, O34, O60, O188, O265, S16, M7, M12 und M92) ein Plasmidtransfer von pSunny gezeigt werden (Tab. 9). Keines der Isolate war in der Lage, pSunny in einen Stamm der α -Proteobakteriengruppe zu transferieren. Es konnte auch kein Transfer in den Stamm *Pseudomonas stutzeri*, wohl aber in *Pseudomonas putida* gezeigt werden.

Von allen getesteten *Pseudomonas* Isolaten waren nur S16 und M12 in der Lage, pSunny in die Rezipienten Ec294 und C600 (*E.coli*) bzw. *Aeromonas media* zu mobilisieren. Ein Plasmidtransfer der nicht näher charakterisierten Isolate O34, O188, O265 und M92 konnte in verschiedene Rezipienten

Ergebnisse

der γ -Proteobakteriengruppe nachgewiesen werden. Aus den Donorstämmen O60 (*Rahnella*) und M7 (*E.coli*) konnte eine Mobilisierung in drei der ausgewählten Rezipienten gezeigt werden. Die höchsten Transferraten und gleichzeitig die weiteste *host range* konnte für den Transfer des Plasmides pSunny aus dem *Aeromonas* Isolat O19 beschrieben werden. Hier erfolgte der Plasmidtransfer in die Rezipienten *E.coli* (Ec294 und C600), *Pseudomonas putida* und *Aeromonas media*.

Tab. 9: Mobilisierung von pSunny

Donor			Rezipient						
			Proteobakteriengruppe						
			γ					α	
Isolat mit pSunny	Gattung	Plasmidgröße in (kb)	<i>E.coli</i> Ec294	<i>E.coli</i> C600	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Aeromonas media</i> (S26)	<i>Brevundimonas vesicularis</i> (S121c)	<i>Paracoccus aminophilus</i>
O19	<i>Aeromonas</i>	85	1.5×10^{-3}	1.2×10^{-4}	3.4×10^{-4}	-	1.8×10^{-3}	-	-
M19		40	-	-	-	-	-	-	
M7	<i>E.coli</i>	78, 80	4.7×10^{-5}	1.3×10^{-4}	1×10^{-5}	-	-	-	-
O33	<i>Pseudomonas</i>	30	-	-	-	-	-	-	-
O72		25	-	-	-	-	-	-	
O182		90, 35	-	-	-	-	-	-	
S16		85	4.6×10^{-6}	9.5×10^{-6}	-	-	-	-	-
M9		70	-	-	-	-	-	-	
M12		70	-	-	-	-	5×10^{-7}	-	-
M29		70	-	-	-	-	-	-	
O60		<i>Rahnella</i>	30	1.2×10^{-5}	6×10^{-7}	4.4×10^{-5}	-	-	-
O34		66	-	-	3.3×10^{-8}	-	-	-	-
O37		85, 20	-	-	-	-	-	-	
O188		95	7.4×10^{-5}	-	-	-	1.2×10^{-5}	-	-
O193		95	-	-	-	-	-	-	
O265		86	-	6×10^{-7}	-	-	-	-	-
O281		86	-	-	-	-	-	-	
M92		100	-	-	-	-	6×10^{-7}	-	-

In allen Transkonjuganten konnte immer nur pSunny und nie das potentiell konjugative Plasmid nachgewiesen werden. Isolate, die in der Lage waren pSunny in einen der gewählten Rezipienten zu transferieren, beinhalten Plasmide die aufgrund ihrer Größe potentiell konjugativ sind. Aufgrund dessen sind die oben beschriebenen Plasmide höchstwahrscheinlich konjugativ. Hierbei kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß ein integriertes Plasmid für den erfolgten Transfer des Plasmides verantwortlich ist.

Die ermittelten Mobilisierungsfrequenzen sind vom jeweiligen potentiell konjugativen Plasmid abhängig und variieren von 10^{-3} bis 10^{-8} Transkonjuganten pro eingesetztem Rezipienten. Hierbei zeigen Isolate, welche in der Lage sind, pSunny in verschiedene Bakteriengattungen zu mobilisieren, höhere Transferraten als Isolate, welches pSunny nur in einen Rezipienten transferieren können. Die ermittelten Mobilisierungsraten sind nur spezifisch für das Plasmid pSunny und die gewählten Reaktionsbedingungen. Andere mobilisierbare Plasmide wie CloDF13 oder ColEI würden durch

dasselbe konjugative Plasmid mit unterschiedlichen Transferraten mobilisiert werden, wobei die Mobilisierungsrate von der Interaktion des *coupling*-Proteins des konjugativen Plasmides mit dem Relaxosom des zu mobilisierenden Plasmides abhängt (Willets und Crowther, 1981).

4.2.5 *In vitro* Transposonmutagenese zur Markierung potentiell konjugativer Plasmide

Da nicht die Möglichkeit bestand, auf plasmidkodierte Antibiotika- und oder Schwermetallresistenzen selektionieren zu können, wurde es für weitere Versuche unumgänglich, einzelne Plasmide mit Markergenen zu versehen, auf welche selektioniert werden kann. Hierbei fiel die Wahl auf das *in vitro* Transposonmutagenessystem der Firma Finnzymes.

Das „Template-Generation-System“ basiert auf dem Transpositionsmechanismus des Phagen Mu (Mizuuchi, 1992). Während der *in vitro* Reaktion wird in einem ersten Schritt der Mu Transpositionscomplex gebildet. Hierbei binden vier Monomere des MuA-Transposase-Proteins an die R1 und R2 Bindestellen am Ende des Entransceposon (Savilahti *et al.*, 1995). Dieser Komplex kann an jeder Position der Sequenz in die Target-DNA inserieren (Haapa *et al.*, 1999). Im nächsten Schritt erfolgt eine um 5 Basen verschobene Spaltung der Target-DNA. Die 3' Enden der vorbehandelten Donor-DNA ligieren mit den 5' Enden der gespaltenen Target-DNA. Die so entstandenen 5 Basenpaar großen Lücken werden durch einen *E.coli* eigenen Reparaturmechanismus wieder aufgefüllt, wodurch an den Insertionsstellen eine Duplikation dieser fünf Basenpaare entsteht. Das ausgewählte Mu-Transposon enthält ein Kanamycinresistenzgen, auf welches bei den folgenden Versuchen selektioniert werden konnte.

Da Plasmide nach der *in vitro* Mutagenese durch Elektroporation oder durch Transformation in neue Wirtsstämme eingebracht werden müssen, war es nicht möglich, Plasmide mit einer Größe über 70 kb für weitere Versuche auszuwählen. Hiervon betroffen war auch das 85 kb Plasmid aus dem Stamm O19 der Gattung *Aeromonas*, welches wegen seiner Fähigkeit, das Plasmid pSunny in vier Bakterienstämme aus drei verschiedenen Gattungen zu mobilisieren, sehr interessant im Hinblick auf selbstständigen Transfer gewesen wäre. Für die folgende *in vitro* Mutagenese wurden die Plasmide pO60 (*Rahnella*) und pO50 (*Aeromonas*) ausgewählt. pO60, wegen seiner besonderen Fähigkeit pSunny in *E.coli* und *Pseudomonas* zu mobilisieren und das Plasmid pO50, weil es sich hierbei möglicherweise um ein der Inkompatibilitätsgruppe IncQ zugehöriges Plasmid handelt und eine Mobilisierung von pSunny nicht durchführbar war. Des weiteren wurde Plasmid-DNA des multiplasmid Stammes M101 (*E.coli*) für eine Mutagenese verwendet. Alle beschriebenen Plasmide haben eine Größe bis höchstens 30 kb.

Für das Plasmid pO50 konnten sechs Mutanten und für das Plasmid pO60 fünf Mutanten nach erfolgreicher Elektroporation in die *E.coli* Stämme DH5 α oder Gene Hogs erhalten werden. Nach der Mutagenese der Plasmide des Stammes M101 konnten diverse Mutanten für Plasmide mit den Größen 30 kb, 3.8 kb, 3.5 kb, 2.3 kb und 1.8 kb erhalten werden. Für diese Arbeit sind folgende transposonmarkierten Plasmide von Interesse: mit einer Größe von 30 kb die Plasmide pM101.7::D38, pM101.7::G5, pM101.7::G6, pM101.7::D17 und pM101.7::D26 mit einer Größe von 3.8 kb das Plasmid pM101.4::D2 mit der Größe 3.5 kb das Plasmid pM101.3::D5 mit der Größe 2.3 kb das Plasmid pM101.2::D10 und mit einer Größe von 1.8 kb die Plasmide pM101.1::D19 und pM101.1::G3.

4.2.6 Mobilisierung transposonmarkierter Plasmide

Die transposonmarkierten Plasmide wurden im folgenden auf ihre Fähigkeit überprüft, in Rezipienten der γ -Proteobakteriengruppe mobilisiert zu werden.

Zu diesem Zweck wurde der Stamm S17.1 der als Donor bei den folgenden Mobilisierungsexperimenten verwendet wurde, mit den Plasmiden transformiert. Bei dem Stamm S17.1 (Simon *et al.* 1983) handelt es sich um einen *E.coli* Stamm, in dessen Genom Teile des Plasmides RP4 inseriert wurde. Hierdurch ist man in der Lage, durch die Transfer-Funktionen des *broad host range* Plasmides RP4 ein mobilisierbares Plasmide in einen anderen Wirtsstamm zu transferieren, ohne einen Selbsttransfer des konjugativen Plasmides beachten zu müssen. Als Rezipienten wurden die *E.coli* Stämme Ec294 und C600, die Stämme *Pseudomonas putida* und *Pseudomonas stutzeri*, der *Aeromonas media* Stamm S26 und der Stamm *Yersinia ruckeri* (alle zugehörig zur γ -Proteobakteriengruppe) verwendet. Die Mobilisierungsrate wurde, wie oben beschrieben, als Anzahl der Transkonjuganten pro Rezipienten bestimmt.

Bei der Kreuzung wurden logarithmisch wachsende Kulturen der Donoren (S17.1 mit dem transposonmarkierten Plasmid) und der jeweiligen Rifampicin-resistenten Rezipienten im Verhältnis 1:1 gemischt, auf eine TBX-Agarplatte aufgetropft und über Nacht bei 28°C (bei Kreuzungsansätzen zwischen zwei *E.coli* Stämmen bei 37°C) bebrütet. Anschließend wurden die Kreuzungsansätze auf Kanamycin (30 $\mu\text{g/ml}$) und Rifampicin (100 $\mu\text{g/ml}$) haltigen Selektionsmedien ausplattiert. Ob es sich bei den erhaltenen Transkonjuganten wirklich um den Rezipientenstamm und nicht um Rifampicin-resistente Donoren handelte, wurde durch den Vergleich der Gesamtproteinmuster (Methode siehe Kapitel 4.1.1) der erhaltenen Transkonjuganten mit dem Gesamtproteinmuster des Rezipientenstammes bewiesen. Jeder Test auf den Transfer des transposonmarkierten Plasmides wurde wiederholt. Alle als positiv bewerteten Ergebnisse wurden zur Berechnung der Mobilisierungsfrequenzen ein drittes Mal durchgeführt (Tab. 10).

Wie schon bei den oben beschriebenen Mobilisierungsexperimenten für das Plasmid pSunny konnte auch bei diesem Versuch kein Transfer von Plasmiden in den Rezipienten *Pseudomonas stutzeri*, einem Stamm der γ -Proteobakteriengruppe gezeigt werden.

Für die transposonmarkierten Plasmide pO50.3 und pO50.8, welche aus dem Isolat O50 der Gattung *Aeromonas* isoliert wurden, konnte ein Transfer durch den *E.coli* Stamm S17.1 in *E.coli* Ec294 und in *Aeromonas media* (S26) gezeigt werden. Die Transferraten für das mobilisierte Plasmid liegen bei beiden Plasmiden um 5×10^{-7} Transkonjuganten pro eingesetzten Rezipienten. Auch für die Plasmide pO60.1 und pO60.3, welche in der Lage sind, das Plasmid pSunny in Stämme der Gattungen *E.coli* und *Pseudomonas* zu mobilisieren, konnte ein Transfer in *E.coli* Ec294 und C600, *Pseudomonas putida* und *Yersinia ruckeri* mit Mobilisierungsfrequenzen zwischen 2 bis 4×10^{-4} gezeigt werden. Für das Isolat M101 (*E.coli*) konnten Plasmide in fünf verschiedenen Größen transposonmarkiert werden. Für alle markierten Plasmide konnte ein Transfer in *E.coli*, *Aeromonas media* und *Yersinia ruckeri* beschrieben werden. Auffällig ist bei den Plasmiden pM101.7::G5 und pM101.7::G6 die besonders hohe Mobilisierungsfrequenz von 1.5×10^{-2} (in *Yersinia ruckeri*) bis 2.2×10^{-3} (in *Aeromonas media*). Selbst die kleineren Plasmide aus diesem Stamm, mit einer Größe zwischen nur 1.8 kb und 3.5 kb, werden durch RP4 mobilisiert.

Ergebnisse

Tab. 10: Mobilisierung transposonmarkierter Plasmide

Donor			Rezipient					
S17.1 mit transposonmarkiertem Plasmid			<i>E. coli</i> Ec294	<i>E. coli</i> C600	<i>P. putida</i>	<i>P. stutzeri</i>	<i>A. media</i> (S26)	<i>Y. ruckeri</i>
Plasmid	aus Gattung (Isolat)	Plasmidgröße in kb						
pO50.3	<i>Aeromonas</i> (O50)	30	5×10^{-7}	-	-	-	4×10^{-7}	-
pO50.8			4×10^{-7}	-	-	-	5×10^{-7}	-
pO60.1	<i>Rahnella</i> (O60)	30	3.1×10^{-4}	4×10^{-4}	2×10^{-4}	-	-	2.9×10^{-4}
pO60.3			2.9×10^{-4}	3.5×10^{-4}	2×10^{-4}	-	-	3.5×10^{-4}
pM101.7 ::G5	<i>E. coli</i> (M101)	30	4.8×10^{-2}	3.5×10^{-2}	6×10^{-5}	-	2.2×10^{-3}	1.9×10^{-2}
pM101.7 ::G6			2.7×10^{-2}	2.9×10^{-2}	7×10^{-5}	-	2×10^{-3}	1.5×10^{-2}
pM101.4 ::D2		3.8	1.5×10^{-6}	2×10^{-6}	-	-	1×10^{-7}	7.6×10^{-6}
pM101.3 ::D5		3.5	1.1×10^{-4}	1.5×10^{-4}	-	-	1.8×10^{-6}	8.7×10^{-6}
pM101.2 ::D10		2.3	5.9×10^{-5}	1.2×10^{-4}	-	-	2.5×10^{-6}	5×10^{-7}
pM101.1 ::G3		1.8	3×10^{-7}	5×10^{-7}	-	-	1.7×10^{-7}	8.7×10^{-7}

Fraglich ist nun, welche der transposonmarkierten Plasmide in der Lage sind, durch Selbsttransfer, das heißt durch Konjugation in andere Stämme, zu transferieren. Hierbei sollte des weiteren getestet werden, ob es sich bei den Plasmiden um *narrow host range* Plasmide handelt, für die eine Replikation nur in Rezipienten derselben Proteobakteriengruppe möglich ist, oder ob die Plasmide in der Lage sind, in Rezipienten verschiedener Proteobakteriengruppen zu transferieren und somit *broad host range* sind.

4.2.7 Transfer durch Konjugation

Zum Test auf den Selbsttransfer von Plasmiden wurden logarithmisch wachsende Kulturen des *E. coli* Stammes DH5 α , welcher das transposonmarkierte Plasmid enthielt, 1:1 mit logarithmisch wachsenden Kulturen der Rifampicin-resistenten Rezipienten gemischt und bei 28°C (bzw. bei 37°C für *E. coli* Stämme) über Nacht inkubiert. Um zu testen, ob es sich bei den drei transposonmarkierten Plasmiden um *broad host range* Plasmide handelt, wurden für die Kreuzungen als Rezipienten Stämme der α -, β - und γ -Proteobakteriengruppen eingesetzt. Hierbei handelt es sich im einzelnen um die *E. coli* Stämme Ec294 und C600, *Pseudomonas putida*, *Aeromonas media* (S26) und *Yersinia ruckeri* (alle zugehörig zur γ -Proteobakteriengruppe), die Stämme *Paracoccus aminophilus*, *Agrobacterium tumefaciens* (UBAPFZ) und *Brevundimonas vesicularis* (S121c) (alle zugehörig zur α -Proteobakteriengruppe) und ein *Alcaligenes* Isolat (Bi147), das zur β -Proteobakteriengruppe gehört. Die Selektion erfolgte auf Rifampicin (100 μ g/ml) und Kanamycin (30 μ g/ml) haltigem Selektivmedium. Transkonjuganten wurden auf die Präsenz der konjugativen Plasmide überprüft. Wie schon bei den Mobilisierungsexperimenten beschrieben, wurden im Falle der *E. coli* Transkonjuganten durch Vergleiche der Gesamtproteinmuster bestätigt, daß es sich um die Rezipientenstämme und nicht um

Rifampicin-resistente Donoren handelt. Durch eine Infektion mit dem Bakteriophagen Φ M101.11, welcher sich nur auf *E.coli* Isolaten lytisch vermehren kann (siehe Kapitel 4.5.7), wurden die Transkonjuganten der Kreuzungen mit allen nicht *E.coli* Rezipienten bestätigt. Jede Kreuzung wurde wiederholt, um die Richtigkeit des erhaltenen Ergebnisses zu bestätigen. Bei positiv bewerteten Kreuzungen wurde in einer dritten Kreuzung die Konjugationsrate durch *Filter-mating* bestimmt. Hierbei wurde die Konjugationsrate als Anzahl der Transkonjuganten pro Anzahl der eingesetzten Rezipienten bestimmt.

Nachdem für ein Plasmid durch Kreuzung ein Selbsttransfer nachgewiesen werden konnte, wurden alle weiteren Mutanten dieses Plasmides überprüft. Hierdurch sollten Plasmide detektiert werden, welche durch Insertion des Transposons in für die Konjugation essentielle Gene nicht mehr in der Lage waren, selbstständig zu transferieren.

Insgesamt konnte für alle drei größeren Plasmide ein konjugativer Transfer gezeigt werden (Tab. 11). Da konjugative Plasmide von Gram-negativen Bakterien in der Regel größer als 30 kb sind, wurde bei den vier kleinen Plasmiden pM101.4::D2, pM101.3::D5 pM101.2::D10 und pM101.1::G3 aus dem Stamm M101 von vorne herein kein Selbsttransfer erwartet.

Für alle sechs transposonmarkierten pO50 Plasmide konnte ein konjugativer Transfer in den *E.coli* Stamm Ec294 und in *Aeromonas media* gezeigt werden. Die Konjugationsfrequenzen liegen hierbei im Mittel bei 5×10^{-7} Transkonjuganten pro eingesetztem Rezipienten. Die fünf Mutanten des *Rahnella* Plasmides pO60 konnten, wie schon im Falle der Mobilisierung gezeigt, in die Rezipienten C600, Ec294, *Pseudomonas putida* und *Yersinia ruckeri* transferiert werden. Hierbei liegen die Transferraten bei 3×10^{-4} . Für das 30 kb Plasmid aus dem *E.coli* Stamm M101 konnten fünf Transposonmutanten erzeugt werden, die im Folgenden mit pM101.7::G5, pM101.7::G6, pM101.7::D17, pM101.7::D26 und pM101.7::D38 bezeichnet werden. Ein Selbsttransfer mit einer Frequenz von durchschnittlich 3×10^{-2} für *E.coli* und *Yersinia ruckeri* und mit durchschnittlich 5×10^{-5} für *Pseudomonas putida* und *Aeromonas media* konnte für die ersten vier Mutanten gezeigt werden. Die Transferraten für die Rezipienten der α -Proteobakteriengruppe *Agrobacterium tumefaciens* und *Paracoccus aminophilus* liegen zwischen 2.9 und 4.4×10^{-3} . Die fünfte Mutante pM101.7::D38 erwies sich als konjugations-negativ. Bei diesem Plasmid ist das Transposon wahrscheinlich in einem für die Konjugation essentiellen Gen inseriert.

Für keines der getesteten Plasmide konnte ein Selbsttransfer in Rezipienten der Gattungen *Brevundimonas* sowie *Alcaligenes* gezeigt werden.

Bei den Plasmiden pO50 und pO60 handelt es sich um *narrow host range* Plasmide, da nur ein Transfer innerhalb der γ -Proteobakteriengruppe detektiert werden konnte. Das Plasmid pM101.7 ist dagegen in der Lage, in Rezipienten der α - und γ -Proteobakteriengruppe zu replizieren und gehört somit zu den *broad host range* Plasmiden.

Ergebnisse

Tab. 11: **Selbsttransfer transposonmarkierter Plasmide durch Konjugation**

Donor			Rezipient								
DH5α mit transposonmarkiertem Plasmid			Proteobakteriengruppe								
Plasmid	aus Gattung (Isolat)	Plasmidgröße (kb)	γ					α		β	
			<i>E. coli</i> (Ec294)	<i>E. coli</i> (C600)	<i>P. putida</i>	<i>A. media</i> (S26)	<i>Y. ruckeri</i>	<i>P. amino-philus</i>	<i>A. tumefaciens</i> (UBAPFZ)	<i>B. vesicularis</i> (S121c)	<i>Alcaligenes</i> (Bi147)
pO50.1	<i>Aeromonas</i> (O50)	30	8×10^{-7}	-	-	2×10^{-7}	-	-	-	-	-
pO50.2			2.8×10^{-8}	-	-	4×10^{-7}	-	-	-	-	-
pO50.3			5.8×10^{-6}	-	-	5×10^{-7}	-	-	-	-	-
pO50.4			5×10^{-7}	-	-	4×10^{-7}	-	-	-	-	-
pO50.5			6.3×10^{-7}	-	-	4×10^{-7}	-	-	-	-	-
pO50.8			6×10^{-7}	-	-	5×10^{-7}	-	-	-	-	-
pO60.1	<i>Rahnella</i> (O60)	30	2×10^{-4}	3×10^{-4}	2.4×10^{-4}	-	7.6×10^{-4}	-	-	-	-
pO60.2			1.9×10^{-4}	3.1×10^{-4}	2.1×10^{-4}	-	7.1×10^{-4}	-	-	-	-
pO60.3			1.5×10^{-4}	2.7×10^{-4}	1.7×10^{-4}	-	6×10^{-4}	-	-	-	-
pO60.4			9×10^{-3}	9.1×10^{-3}	8×10^{-3}	-	9×10^{-5}	-	-	-	-
pO60.5			1.7×10^{-4}	2.9×10^{-4}	1.5×10^{-4}	-	6.9×10^{-4}	-	-	-	-
pM101.7.:G5	<i>E. coli</i> (M101)	30	1.7×10^{-2}	4.5×10^{-2}	6.5×10^{-5}	4.2×10^{-5}	4.4×10^{-2}	3.1×10^{-3}	3.5×10^{-3}	-	-
pM101.7.:G6			2.4×10^{-2}	5×10^{-2}	7.1×10^{-5}	5.1×10^{-5}	4.2×10^{-2}	4.4×10^{-3}	2.9×10^{-3}	-	-
pM101.7.:D17		+				+					
pM101.7.:D26		+				+					
pM101.7.:D38		-				-					
pM101.4.:D2		3.8	-			-					
pM101.3.:D5		3.5	-			-					
pM101.2.:D10		2.3	-			-					
pM101.1.:G3		1.8	-			-					

Zusammenfassung der Mobilisierungs- und Konjugationsexperimente

Bei den oben beschriebenen Mobilisierungsexperimenten wurden die Plasmide aus 20 Isolaten der Bakteriengattungen *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Rahnella* aus den multiplasmid *E.coli* Isolaten sowie nicht näher bestimmter Gattungen untersucht. Hierbei wurde entweder die Mobilisierung des Plasmides pSunny durch die Isolate oder der Transfer des Plasmides selbst detektiert. Insgesamt betrachtet sind 60 % aller untersuchten Plasmide mobilisierbar, oder können pSunny mobilisieren und sind daraus folgend potentiell konjugativ.

Sieben Plasmide konnten mit Hilfe des *in vitro* Transposonmutagenesesystems der Firma Finnzymes markiert werden. Vier dieser Plasmide kamen allerdings aufgrund ihrer zu geringen Größe für eine selbstständige Konjugation nicht in Frage. Diese Plasmide sind alle durch pSunny mobilisierbar. Für die übrigen drei transposonmarkierten Plasmide der Gattungen *Aeromonas* (pO50), *Rahnella* (pO60) und *Escherichia* (pM101.7::G5 oder pM101.7::G6) konnte ein konjugativer Transfer detektiert werden. Für das Plasmid pM101.7 konnte ein Transfer innerhalb verschiedener Proteobakteriengruppen gezeigt werden. Es handelt sich hierbei also um ein *broad host range* Plasmid.

4.3 Charakterisierung der Plasmide des Bakterienstammes M101

Die Isolate der *E.coli* Gruppe waren aufgrund der vielen Plasmide sehr auffällig. Das Isolat M101 wurde ausgewählt, um die Plasmide etwas näher zu charakterisieren. Dieser Stamm aus dem Meierteich sowie das Isolat O221 aus dem Oetkerpark-Teich zeigen ein identisches Plasmidmuster. Die 10 Plasmide haben eine Größe zwischen 1.8 kb und 88 kb. Bei klinischen Isolaten ist das Vorkommen multipler Plasmide ein schon lange bekanntes Phänomen (Christiansen *et al.*, 1973; Laufs und Kleinmann, 1978) und auch für Umweltisolate wurde diese Erscheinung schon beschrieben (Toranzo *et al.*, 1983; Coplin *et al.*, 1981).

Nachdem eine Mobilisierung sowie der konjugative Transfer des Plasmides pM101.7 oben gezeigt werden konnte, stellte sich nun die Frage nach der Genfracht dieses Plasmides sowie möglichen Ähnlichkeiten zu anderen aus der Umwelt isolierten Plasmiden.

4.3.1 Partielle Sequenzierung des Plasmides pM101.7

Konjugationsexperimente haben gezeigt, daß es sich bei dem 30 kb großen Plasmid pM101.7 aus dem *E.coli* Isolat M101 um ein *broad host range* Plasmid handelt. Ein Selbsttransfer konnte in Rezipienten der α - und γ -Proteobakteriengruppen gezeigt werden. Aus diesem Grund sollten durch eine partielle Sequenzierung die Transfergene kartiert und bestimmt werden, sowie potentielle Genfracht dieses Plasmides charakterisiert werden.

Für die Sequenzierung wurden das konjugative Plasmid pM101.7::G5 und die konjugationsdefiziente Variante pM101.7::D38 ausgewählt.

Die Sequenzierung erfolgte, ausgehend von der Transposonintegrationsstelle der Plasmide, mit Hilfe der von der Firma Finnzymes vorgeschlagenen Sequenzierprimer SeqA und SeqB. Angrenzende Gene wurden über *Primer-Walking* sequenziell bestimmt. Die Sequenzauswertung erfolgte über BlastP- Datenbankvergleiche. Die Benennung der Proteine erfolgte in Anlehnung an das Protein mit dem höchsten Ähnlichkeitsgrad aus den Datenbankabfragen.

Insgesamt wurde ein 23161 bp langes Fragment des Plasmides pM101.7 sequenziert. Der GC-Gehalt dieses Teilstückes entspricht 62.6%. Die DNA-Sequenz wurde nur einzelsträngig bestimmt und aufgrund dessen nicht in einer Datenbank veröffentlicht. Sie ist allerdings jederzeit bei mir abrufbar.

Die folgende Abbildung zeigt eine genetische und physikalische Karte der sequenzierten Region. In der nachstehenden Tabelle (Tab. 12) sind die Homologien der abgeleiteten Aminosäuresequenzen zusammengefasst.

Die Transposonintegrationsstellen in den Plasmide pM101.7::D38 und pM101.7::G5 befinden sich an den Positionen 2721 und 12867 in der partiellen Sequenz.

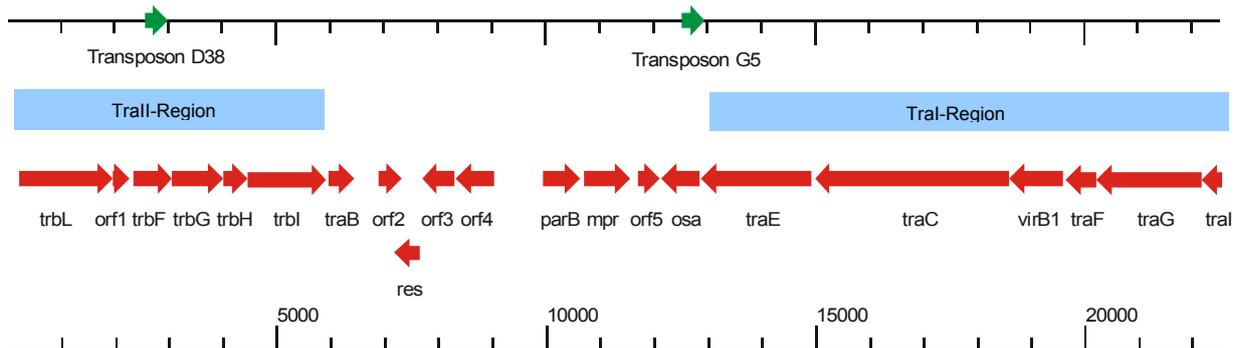


Abb. 7: **Physikalische und genetische Karte der Teilsequenz des Plasmides pM101.7**

Wie bei den meisten konjugativen Plasmiden liegen auch bei pM101.7 die Gene der Tral- sowie der Trall-Region in zwei getrennten Bereichen vor. Auf dem sequenzierten Teilstück des Plasmides konnten im vorderen Bereich die Gene für die Bildung des Mpf-Komplex und im hinteren Teil Gene des Dtr identifiziert werden.

Die Trall-Region und die Trb-Proteine

Innerhalb der partiellen Sequenz beginnt die Trall-Region mit einem *trbL*-Gen gefolgt von einem offenen Leseraster und den in Folge liegenden Genen *trbF*, *trbG*, *trbH* und *trbI*. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen dieser Gene besitzen Homologien zu den Trb-Proteinen des Plasmides pBi1063 aus *Stenotrophomonas maltophilia* (Acc.-Nummer: AY299014; Battermann, 2002).

Die *trb*-Gene *trbA* bis *trbN* sind Bestandteil der Trall-Region der meisten konjugativen Plasmide (Lessel *et al.*, 1992). Sie kodieren für Proteine des Mpf-Komplexes, dessen Funktion die Bildung einer Membranpore ist, welche beim DNA-Transfer der bakteriellen Konjugation und bei der Transformation der Pflanzenzelle durch *Agrobacterium tumefaciens* benötigt wird (Grahn *et al.*, 2000). Hierbei bilden die Gene des Mpf-Komplex von RP4 (Haase *et al.*, 1995) das VirB-Operon vom Ti-Plasmid aus *Agrobacterium tumefaciens* (Cook und Farrand, 1992), die *pilW*-Region des IncW-Plasmides R388 (Bolland *et al.*, 1990), die Trall-Region von pKM101 (Pohlmann *et al.*, 1994), die *cag*-Pathogenitätsinsel von *Helicobacter pylori* (Censini *et al.*, 1996) sowie das *ptl*-Operon von *Bordetella pertussis* (Johnson und Burns, 1994), welches in den Pertussis Toxin Export involviert ist, eine Gruppe von verwandten Exportsystemen von Makromolekülen, welche auch als Typ-IV Sekretionsysteme bezeichnet werden. Die aus Komponenten der Trall-Region bestehende Transmembranpore wurde bisher am intensivsten am Beispiel des Ti-Plasmid (Das und Xie, 2000;

Schröder und Lanka, 2005) und bei RP4 (Grahn *et al.*, 2000) untersucht. Viele, wenn nicht alle, Proteine, welche am Aufbau der Membranpore beteiligt sind, sind Membranproteine oder membranassoziierte Proteine (Kuldau *et al.*, 1990; Lessel *et al.*, 1992). Bei Ti wird vermutet, daß die Proteine VirB6, VirB7, VirB8, VirB9 und VirB10 Bestandteile der Transportpore sind, wobei VirB6, VirB8 und VirB10 einen Komplex an der inneren Membran und VirB7 und VirB9 einen Komplex an der äußeren Membran bilden (Das und Xie, 2000). Hierbei ist das VirB6-Protein homolog zu TrbL, VirB7 zu TrbK, VirB8 zu TrbF, VirB9 zu TrbG und VirB10 zu TrbB von RP4 (Lessel *et al.*, 1992). Für die Transmembranpore von RP4 wird ein hypothetisches Modell bestehend aus Proteinen des Mpf-Komplex in Grahn *et al.*, (2000) diskutiert.

Vergleich der Genanordnung innerhalb der Trall-Regionen von RP4, pM101.7, pBi1063 und pTi

Auf dem sequenzierten Teilstück des Plasmides pM101.7 liegen die *trb*-Gene *trbL* und *trbF* bis *trbI* in Folge vor. Auch in der Transferregion der Plasmide pBi1063 (Battermann, 2002; Acc. Nummer: AY299014) und pTi (Octopin) (Alt-Mörbe *et al.*, 1996; Acc. Nummer: AF242881) besteht diese Genanordnung, in der das Modul der Gene *trbF* bis *trbI* –im Vergleich zu RP4- verschoben ist. Bei den Plasmiden pBi1063 und RP4 beginnt die Trall-Region mit dem *trbA*-Gen. Hierbei handelt es sich um ein Regulatorgen für die Expression der *trb*-Gene (Zatyka und Thomas, 1998). Danach folgen die Gene *trbB*, *trbC*, *trbD* und *trbE*. Die hohe Homologie zu den *trb*-Genen des Plasmides pBi1063 läßt vermuten, daß auch bei pM101.7 die restlichen Trall-Gene in der Anordnung *trbA* bis *trbE* und *trbJ* vorliegen. Im Gegensatz dazu sind die *trb*-Gene innerhalb der Trall-Region von RP4 von *trbA* bis *trbO* angeordnet (Lessl *et al.*, 1992; Acc. Nummer: M93696). Die Sequenzierung von pM101.7 ergaben für die abgeleitete Aminosäuresequenz des dem *trbI* folgenden Gens Homologien zu einem TraB-Protein von RP4 (Acc. Nummer: CAA42457). Dies korreliert mit den Sequenzdaten der Plasmide pBi1063 und Ti-Plasmid (Octopin), bei denen die Trall-Region ebenfalls mit dem *trbI*-Gen endet.

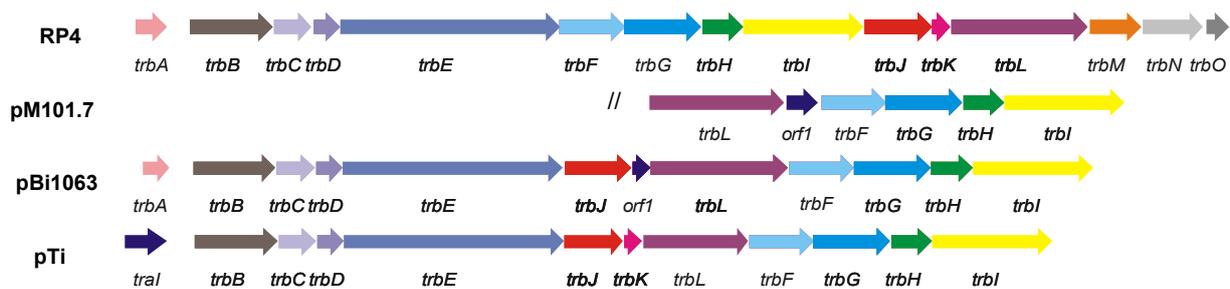


Abb. 8: Vergleich der Genanordnung der Trall-Regionen der Plasmide RP4, pM101.7, pBi1063 und pTi (Octopin). Homologe Gene sind jeweils durch gleiche Farben dargestellt.

Genbereich zwischen der Trall- und der Tral-Region

Der Bereich nach der Trall-Region beginnt mit einem Gen, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz Homologien zum TraB-Protein von RP4 (Acc. Nummer: CAA42457) aufweist. Obwohl dieses Gen funktionell der Tral-Region zuzuordnen ist, liegen zwischen diesem und dem nächsten Gen dieser Region acht offene Leseraster, deren Funktion nicht mit dem Dtr in Verbindung steht.

Nach einem offenen Leseraster (orf2) folgt ein Gen, dessen Produkt Homologien zu einer Resolvase aufweist (Acc. Nummer: CAC80087). Allerdings ist dieses Protein mit 68 Aminosäuren nur etwa 1/5 so lang wie ein funktionstüchtiges Resolvase-Protein. Es ist deshalb unwahrscheinlich, daß dieses Protein noch seine ursprüngliche Funktion innehat. Für die nächsten beiden sequenzierten offenen Leseraster (orf3 und orf4) konnten keinerlei Homologien detektiert werden. In der Sequenz folgt ein *parB*-Gen dessen hypothetisches Produkt Homologien zu einem ParB-Protein des Plasmides pRR54 aus einem nicht kultivierten Bakterium (Acc.-Nummer: AAP75188) aufweist. Das nächste Gen kodiert für ein Protein, mit der höchsten Homologie zu einer putativen Zink-Metalloproteinase aus *Aeromonas punctata* (Acc. Nummer: YP-067822). Die abgeleitete Aminosäuresequenz des folgenden offenen Leserasters (orf5) konnte mittels Blast-Datenbankabfragen keinem Protein zugeordnet werden. Das nachfolgende *osa*-Gen kodiert für ein Protein mit Homologien zum hypothetischen Protein 3 des Plasmides pSA aus *Shigella flexneri* (Acc.-Nummer: S23149) und zu einem Osa-Protein des Plasmide R388 aus *E. coli* (Acc.-Nummer: BAD24131).

Die *Tral*-Region und die *Tra*-Proteine

Die *Tral*-Region der meisten konjugativen Plasmide beinhaltet den *oriT* sowie Gene, die eine Rolle in der Replikation und im DNA-Transfer spielen. Auf dem sequenzierten Teilstück der *Tral*-Region konnten bisher die Gene *traB*, *traE* (Topoisomerase), *traC* (Primase), *traF* (Präpilin-Zirkularisation), *traG* (*coupling*-Protein) und *tral* (Relaxase) lokalisiert werden. Für das Topoisomerase-Protein konnten Homologien zu einer Topoisomerase des Plasmides pFBAOT6 aus *Aeromonas punctata* (Acc. Nummer: YP-067822) und für die Primase Homologien zu *TraC*-Proteinen der Plasmide pB4 und RP4 (Acc.-Nummer: CAD24390 und CAA42455) ermittelt werden. Interessanterweise wurden für das *TraC*-Protein gleichermaßen Homologien zu verschiedenen Antirestriktions-Proteinen z.B. aus *Nitrosomonas eutropha* C71 (Acc. Nummer: ZP_00671101) ermittelt. Die abgeleitete Aminosäuresequenz der Gene *traF* und *traG* weist die höchste Homologie zu Proteinen aus *Nitrosomonas eutropha* C71 (Acc. Nummer: ZP_00671099) auf. Die *Tral*-Region wird zwischen den Genen *traE* und *traF* von einem *virB1* Gen unterbrochen, welches für eine putative Transglykosylase kodiert und die besten Homologievergleiche ebenfalls zu einem Protein aus *Nitrosomonas eutropha* C71 (Acc. Nummer: EAO16371) erbrachte.

Die meisten abgeleiteten Proteine der *Tral*-Region weisen Homologien zu Proteinen unterschiedlicher Plasmide oder Genomsequenzen auf. Lediglich für die Proteine *TraB* sowie *TraC* konnten die höchsten Ähnlichkeiten zu den entsprechenden Proteinen von RP4 ermittelt werden. Weiterhin auffällig ist die hohe Anzahl von Homologien zu Proteinen aus der Genomsequenz von *Nitrosomonas eutropha* C71. Bei vier der bestimmten Proteine konnten Homologien zu diesem Stamm detektiert werden, was vermuten läßt, daß in diesem Isolat ein integriertes Plasmid vorliegen könnte.

Vergleich der Genanordnung innerhalb der *Tral*-Regionen von RP4, pM101.7 und pBi1063

Bei den Plasmiden RP4 (Ziegelin *et al.*, 1991; Pansegrau *et al.*, 1994) und pBi1063 (Battermann, 2002; Acc. Nummer: AY299014) sind die *tra*-Gene in zwei gegenläufigen Transkriptionseinheiten angeordnet. Hierbei sind die Gene *traJ* bis *traA* gegen und die Gene *traK* bis *traM* mit dem Uhrzeigersinn ausgehend vom *oriT* ausgerichtet. Promotoren konnten vor den Genen *traG*, *traJ* und

Ergebnisse

traK lokalisiert werden (Zatyka *et al.*, 1994). Die Gene *traF*, *traG*, *traH*, *tral*, *traJ* und *traK* sind essentiell für die bakterielle Konjugation. Innerhalb der partiellen Sequenz des Plasmides pM101.7 konnten die Gene *traB*, *traE*, *traC*, *traF*, *traG* sowie *tral* identifiziert werden. Hierbei sind die Gene *traC* und *traF* strukturell durch ein Gen mit Homologien zur abgeleiteten Aminosäuresequenz von VirB1, einer putativen Transglycosylase, getrennt. Trotz der selben Genanordnung konnten für die abgeleiteten Sequenzen der TraI-Region (mit Ausnahme von TraI) keinerlei Homologien zu Proteinen von Genen des Plasmides pBi1063 aus *Stenotrophomonas maltophilia*, welches durch hohe Ähnlichkeiten zu verschiedenen Trb-Proteinen auffiel, beschrieben werden. Im Gegensatz zu RP4 folgt nach der Primase ein *traE* homologes Gen. Ein *traD* ähnliches Gen konnte in der Sequenz nicht detektiert werden. Das folgende TraB Protein weist allerdings trotz divergenter Anordnung die höchste Homologie zu TraB von RP4 auf.

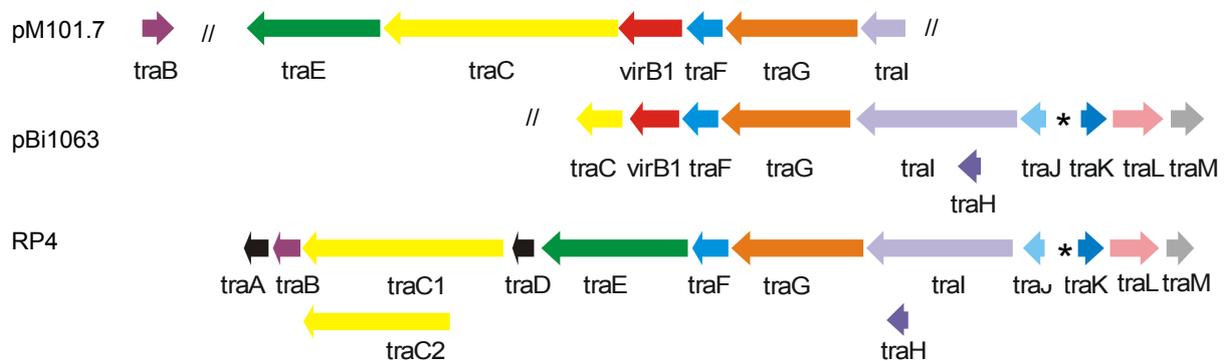


Abb.9: **Vergleich der Genanordnung der TraI-Region der Plasmide pM101.7, pBi1063 und RP4.** Homologe Gene sind jeweils durch gleiche Farben dargestellt. Der *oriT* ist durch einen Stern gekennzeichnet.

Im folgenden werden die potentiellen Genprodukte der partiellen Sequenz des Plasmides pM101.7 in Bezug auf mögliche Proteinmotive, Transmembrandomänen und Signalsequenzen analysiert. Vergleiche zu homologen Proteinen und ihrer Funktion werden im Hinblick auf die potentiellen Funktionen der Proteine von pM101.7 diskutiert (Tab. 12).

Ergebnisse

Tab. 12: Sequenzanalyse des sequenzierten Teilstücks des Plasmides pM101.7

Gen	kodierende Region (Start – Ende)	AS des Gen- produkts	Proteinmotive und Domänen	Homologe Proteine (Identität /Ähnlichkeit) (Acc.-Nummer)	mögliche Funktion
<i>trbL</i>	240-1958	572	Signalpeptid 9Transmembran- domänen	TrbL <i>Nitrosomonas eutropha</i> C71 (73/99) (EAO16297) TrbL <i>Brucella suis</i> 1330 (67/99) (AAN33564) TrbL pBI1063 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (54/102) (AAP82055)	Komponente der Konjugationspore
<i>orf1</i>	1962-2267	101		nicht signifikant	
<i>trbF</i>	2341-3066	241	Transmembran- domäne	TrbF pBI1063 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (79/222) (AAP82056) TrbF <i>Rhizobium</i> sp. (70/215) (NP_443813)	Komponente der Konjugationspore
<i>trbG</i>	3066-4004	312	Signalpeptid	TrbG pBI1063 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (144/248) (AAP82057) TrbG pTB11 nicht kultiviertes Bakterium (133/259) (NP_598148)	Komponente der Konjugationspore
<i>trbH</i>	4006-4464	152	Signalpeptid	TrbH pBI1063 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (41/122) (AAP82058) hyp. P. BH14980 <i>Bartonella henselae</i> (30/96) (YP_034196)	
<i>trbI</i>	4461-5921	484	Transmembran- domäne	TrbI pBI1063 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (163/451) (AAP82059) TrbI pB4 nicht kultiviertes Bakterium (101/213) (NP_598150)	Komponente der Konjugationspore
<i>traB</i>	5962-6438	158		TraB RP4 <i>E.coli</i> (58/112) (CAA42457) KfrB pTB11 nicht kultiviertes Bakterium (25/77) (CAG30908)	
<i>orf2</i>	6890-7315	141		nicht signifikant	
<i>res</i>	7646-7174	68		Resolvase <i>Pseudomonas</i> sp. (65/122) (CAC80087) Resolvase <i>Xanthomonas campestris</i> (64/121) (CAB65714)	Resolvase/ Partitioning
<i>orf3</i>	8300-7692	202		nicht signifikant	
<i>orf4</i>	9033-8317	238		hyp Protein YhbB R721 <i>E.coli</i> (107/202) (NP_065378)	

Ergebnisse

Gen	kodierende Region (Start – Ende)	AS des Genprodukts	Proteinmotive und Domänen	Homologe Proteine (Identität /Ähnlichkeit) (Acc.-Nummer)	mögliche Funktion
<i>parB</i>	9949-10626	225	2 Transmembrandomänen	ParB pRR54 nicht kultiviertes Bakterium (82/143) (AAP57188) ParB pAB4 <i>E.coli</i> (82/143) (P22997)	Partitioning
<i>mpr</i>	10693-11559	288	HExxH-Motiv	Mpr pFBAOT6 <i>Aeromonas punctata</i> (128/244) (YP_067822) Mpr pDTG1 <i>Pseudomonas putida</i> (90/250) (NP_863119)	Zink-Metallopeptidase
<i>orf5</i>	11699-12094	131		nicht signifikant	
<i>osa</i>	12841-12134	235		hyp. Protein 3 pSa <i>Shigella flexneri</i> (71/154) (S23149) Osa R388 <i>E.coli</i> (71/154) (BAD24131) FiwA pTB11 nicht kultiviertes Bakterium (68/172) (YP_112385)	Inhibition des Transfers koexistierender konjugativer Plasmide
<i>traE</i>	14918-12873	681		DNA Topoisomerase pFBAOT6 <i>Aeromonas punctata</i> (338/656) (YP_067822) Topoisomerase I <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c (328/656) (NP_061659)	Topoisomerase
<i>traC</i>	18584-14976	1201	EGYATA-Motiv	TraC RP4 <i>E.coli</i> (401/1032) (CAA42455) <i>Nitrosomonas eutropha</i> C71 (297/497 und 244/319) (ZP_00671101)	Primase
<i>virB1</i>	19576-18587	327	Transglycosylase-Domäne 1-3	SLT <i>Nitrosomonas eutropha</i> C71 (145/296) (EAO16371) TrwN R388 <i>E.coli</i> (68/197) (BAD24114)	Transglykosylase
<i>traF</i>	20142-19573	189	Signalpeptid Transmembrandomäne SxDxRYFGP-Motiv	Protein der Konjugation <i>Nitrosomonas eutropha</i> C71 (76/160) (ZP_00671099) TraF pHCG3 <i>Oligotropha carboxidovorans</i> (62/160) (CAG28510)	Präpilin-Zyklisierung
<i>traG</i>	22100-20139	650	Walker-Box A und B 3 Transmembrandomänen	TraG <i>Nitrosomonas eutropha</i> C71 (432/629) (ZP_671098) TraG RP4 <i>E.coli</i> (291/627) (CAA38327)	<i>coupling</i> -Protein
<i>tral</i>	22097-	bisher 333		Tral pBI1063 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (67/139) und (42/81) (AAP82040)	Relaxase

TrbL

Für das 572 Aminosäuren lange hypothetische Protein TrbL konnten Übereinstimmungen zu TrbL-Proteinen aus den Bakterien *Nitrosomonas eutropha* C71 (Acc. Nummer: EAO16297) und *Brucella suis* 1330 (Acc. Nummer: AAN33564) detektiert werden. Schwächere Ähnlichkeit besteht zu dem 560 Aminosäuren langen TrbL-Protein des konjugativen Plasmides pBi1063 aus *Stenotrophomonas maltophilia* (Acc. Nummer AAP82055). Die partielle Sequenz beinhaltet 9 Transmembrandomänen sowie eine Proteinsignalsequenz mit einer möglichen Schnittstelle zwischen den Positionen 29 und 30. Auch für die TrbL-Proteine von RP4 (528 Aminosäuren) und pBi1063 sind mehrere Transmembrandomänen sowie ein Proteinsignalsequenz beschrieben worden (Battermann, 2002; Grahn *et al.*, 2000).

TrbL von RP4 ist in der Cytoplasmamembran lokalisiert (Grahn *et al.*, 2000). Das TrbL homologe Protein VirB6 von *Agrobacterium tumefaciens* befördert zusammen mit VirB8 das T-DNA Substrat zu den mit der äußeren Membran assoziierten Proteinen VirB2 und VirB9 (Cascales und Christie, 2004). Das in der inneren Membran lokalisierte Protein ist eines der zentralen Komponenten der Membranpore und in eine Vielzahl verschiedener Interaktionen zwischen Substrat und Mfp-Komponenten involviert (Schröder und Lanka, 2005).

Orf1

Zwischen dem *trbL* und dem *trbF*-Gen befindet sich ein offenes Lesraster, welches für ein putatives Protein mit einer Größe von 101 Aminosäuren kodiert. Weder auf DNA- noch auf Proteinebene konnten signifikante Übereinstimmungen für dieses hypothetische Protein detektiert werden.

TrbF

Das 241 Aminosäuren lange, putative TrbF-Protein von pM101.7 besitzt Homologien zum 226 Aminosäuren langen hypothetischen TrbF-Protein von pBi1063 und schwächere Homologie zum 223 Aminosäuren langen TrbF-Protein vom Ti-Plasmid. Wie andere TrbF-Proteine besitzt auch TrbF von pM101.7 eine Transmembrandomäne und gehört zu den essentiellen Transportproteinen (Dale *et al.*, 1993; Haase *et al.*, 1995). Das TrbF Homologe VirB8 von *Agrobacterium tumefaciens* ist ein Protein der inneren Membran mit kurzem cytoplasmatischen N-Terminus und einer C-terminalen periplasmatischen Domäne (Thorstenson und Zambryski, 1994; Das und Xie, 1998). Für dieses Protein ist bisher eine Interaktion mit sich selbst sowie mit VirB9 und VirB10 beschrieben (Das und Xie, 2000; Beaupré *et al.*, 1997). Diese Protein-Interaktion bildet eine direkte Brücke zwischen der inneren und der äußeren Membran, was ein Schlüsselcharakteristikum bei Typ-IV-Sekretionssystemen darstellt. Durch diese Verbindung wird der direkte Transport von Substraten und / oder Pilusuntereinheiten vom Cytoplasma zur Außenseite -ohne die Notwendigkeit zur Ausbildung von periplasmatischen Intermediaten- ermöglicht (Schröder und Lanka, 2005).

TrbG

Das *trbG*-Gen von pM101.7 kodiert für ein 312 Aminosäuren langes hypothetisches Protein, welches Homologien zum 246 Aminosäuren langen putativen TrbG-Protein von pBi1063 aufweist. Die detektierte Proteindomäne zeigt Ähnlichkeiten zur Proteindomäne von VirB9 aus *Agrobacterium*

tumefaciens. Das putative TrbG-Protein besitzt ein Signalpeptid mit einer möglichen Schnittstelle zwischen den Positionen 27 und 28. Bei VirB9 und TrbG von RP4 handelt es sich um periplasmatische Proteine (Das und Xie, 1998; Grahn *et al.*, 2000), welche Strukturkomponenten der Transmembranpore sind (Beaupré *et al.*, 1997). Ihre Funktion besteht möglicherweise in der Verankerung des Transmembran-Komplexes in der äußeren Membran (Schröder und Lanka, 2005).

TrbH

Das aus 152 Aminosäuren bestehende putative TrbH-Protein zeigt Homologien zum 151 Aminosäuren langen putativen TrbH-Protein von pBi1063. Das hypothetische TrbH-Protein beginnt mit einem Signalpeptid mit einer wahrscheinlichen Schnittstelle zwischen den Positionen 27 und 28. Bei TrbH von RP4 handelt es sich um ein essentielles Transferprotein (Lessel *et al.*, 1993; Grahn *et al.*, 2000), welches wahrscheinlich mit der äußeren Membran assoziiert ist (Grahn *et al.*, 2000).

TrbI

Das *trbI*-Gen kodiert für ein 486 Aminosäuren langes hypothetisches Protein mit Homologien zum 460 Aminosäuren langen putativen TrbI Protein von pBi1063. Weiterhin weist es schwächere Ähnlichkeit zum 377 Aminosäuren langen VirB10 Protein von Ti auf. Das Protein von pM101.7 besitzt eine TrbI spezifische Transmembrandomäne. Bei VirB10 handelt es sich um ein Protein der Cytoplasmamembran mit einer kurzen N-terminalen cytoplasmatischen Domäne und einem langen periplasmatischen Teil (Ward *et al.*, 1990). Wie schon bei TrbF beschrieben, bilden VirB8, VirB9 und VirB10 einen Komplex, welcher die innere und die äußere Membran durchspannt. Dieser Komplex ist durch VirB8 in der inneren und durch VirB9 in der äußeren Membran verankert (Schröder und Lanka, 2005). Für die N-terminale Domäne dieses Proteins ist außer einer Interaktion mit sich selbst eine Interaktion mit dem *coupling*-Protein beschrieben (Gilmour *et al.*, 2003; Llosa *et al.*, 2003).

TraB

Das *traB*-Gen kodiert für ein 157 Aminosäuren langes putatives TraB-Protein. Die höchsten Homologien konnten zum 146 Aminosäuren langen TraB-Protein des Plasmides RP4 aus *E.coli* detektiert werden (CAA42457; Miele *et al.*, 1991). Das *traB*-Gen von RP4 ist mit den Genen *traA*, *traC* und *traD* Bestandteil des Primase-Operons und liegt in der *TraI*-Region (Miele *et al.*, 1991). Bis heute konnte für dieses Protein noch keine Funktion ermittelt werden.

Orf2

Zwischen dem putativen *traB*-Gen und dem Gen, welches für eine putative Resolvase kodiert, befindet sich ein offenes Leseraster, welches für ein putatives Protein mit einer Größe von 141 Aminosäuren kodiert. Weder auf DNA- noch auf Proteinebene konnten signifikante Übereinstimmungen für dieses hypothetische Protein detektiert werden.

Resolvase

Die abgeleitete Sequenz des folgenden offenen Leserasters zeigt Homologien zum N-terminalen Anteil einer Resolvase. Mit 68 Aminosäuren macht sie etwa 1/5 des funktionsfähigen Proteins aus.

Möglicherweise besitzt dieses Gen demzufolge nicht mehr seine ursprüngliche Funktion. Allerdings konnte in diesem Protein ein Teilfragment einer für Resolvasen spezifischen Proteindomäne detektiert werden. Die besten Homologien für das partielle Protein wurden für ein 308 Aminosäuren langes Resolvase-Protein aus *Pseudomonas* sp. (Acc. Nummer: CAC80087) und für ein 308 Aminosäuren langes Resolvase-Protein aus *Xanthomonas campestris* (Acc. Nummer: CAB65714) detektiert. Neben chromosomal kodierten Resolvasen konnten aber auch Ähnlichkeiten zu plasmidkodierten Resolvasen der *Pseudomonas* Tol-Plasmiden pWW53 und pDK1 (Acc. Nummer: P30739) und dem pPCP1 Plasmid aus *Yersinia pestis* (Acc. Nummer: AAC62593) nachgewiesen werden.

Orf3 und Orf4

Hinter dem partiellen Resolvase-Gen befindet sich ein offenes Lesraster, welches für ein putatives Protein mit einer Größe von 202 Aminosäuren kodiert. Weder auf DNA- noch auf Proteinebene konnten signifikante Übereinstimmungen für dieses hypothetische Protein detektiert werden.

Es folgt ein weiteres offenes Lesraster, welches für ein putatives Protein mit einer Größe von 238 Aminosäuren kodiert. Es konnten hierfür Homologien zu einem 220 Aminosäuren großen putativen Protein unbekannter Funktion des 75582 kb großen Plasmides R721 aus *E. coli* detektiert werden (Kim und Komano, 1992; Acc. Nummer: NP_065378).

ParB

Das *parB*-Gen des Plasmides pM101.7 kodiert für ein 225 Aminosäuren langes Protein, das eine Nuklease-spezifische Proteindomäne aufweist. Des weitern beinhaltet das Protein zwei Transmembrandomänen. Ein Homologievergleich erbrachte die höchsten Ähnlichkeiten zu einem 177 Aminosäuren langen ParB-Protein des Plasmides pRR54 aus *Pseudomonas aeruginosa* (Acc. Nummer: AAP57188) und einem 281 Aminosäuren langen ParB-Protein des Plasmides RP4 (Acc. Nummer: P22997). Der *Partitioning* Gencluster von RP4 besteht aus fünf Genen (*parA-D*), welche aus zwei gegenläufigen Operons transkribiert werden (Roberts und Helinski, 1992). Das *parB*-Gen von RP4 kodiert gleichermaßen für eine Nuklease (Grohmann und Schwab, in Eberl *et al.*, 1994). Die Funktionen dieses Genlocus liegen höchstwahrscheinlich in der Plasmidsegregation und der Auflösung von Plasmidmultimeren. Alle chromosomalen oder Plasmid-*Partitioning*-Systeme benötigen drei Komponenten: Zwei in *trans* aktive Faktoren, meist ParA und ParB sowie eine in *cis* wirkende centromer-ähnliche Region (Gerdes, 2000). Bei ParB handelt es sich um ein DNA-Bindeprotein, das die centromer-ähnliche Region erkennt und spezifisch an ihr bindet. Es interagiert mit ParA, einer für den Segregationsprozess essentiellen ATPase (Gerdes, 2000). Viele *low copy* Plasmide wie z.B. F, P1, oder RP4 besitzen *Partitioning*-Gen-Kassetten um sicherzustellen, daß jede Tochterzelle eine Plasmidkopie erhält (Williams und Thomas, 1992).

Mpr

Das *mpr*-Gen kodiert für eine 288 Aminosäuren lange putative Zink-Metallopeptidase. Die höchsten Homologien konnten zum 243 Aminosäuren großen hypothetischen Zink-Metallopeptidase Protein des Plasmides pFBAOT6 aus *Aeromonas punctata* (Acc. Nummer: YP_067822) und zu einer putativen Zink-Metalloprotease des Plasmides pDTG1 aus *Pseudomonas putida* (Acc. Nummer: NP_863119)

detektiert werden. Über die wahrscheinliche Funktion der Proteine in den sequenzierten Plasmiden konnten noch keine Daten gewonnen werden. Innerhalb des hypothetischen Mpr-Proteins des Plasmides pM101.7 konnten Teile einer Proteindomäne nachgewiesen werden. Dieses Teilstück beinhaltet das konservierte HExxH Motiv, welches eine mögliche Metalloprotease-Funktion indiziert.

Orf5

Zwischen dem putativen *mpr*-Gen und dem *osa*-Gen befindet sich ein offenes Leseraster, welches für ein putatives Protein mit einer Größe von 146 Aminosäuren kodiert. Weder auf DNA- noch auf Proteinebene konnten signifikante Übereinstimmungen für dieses hypothetische Protein detektiert werden.

Osa

Für das 235 Aminosäuren große Produkt des *osa*-Gens konnten Homologien zu einem Protein des IncW-Plasmides pSa (Acc. Nummer: S23149), des Osa- (*Oncogenic suppression activity*) Proteins aus dem IncW-Plasmid R388 (Acc. Nummer: BAD24131) und zu einem FiwA-Protein aus dem IncP-1 α Plasmid pTB11 (Acc. Nummer: YP_112385; Tennstedt *et al.*, 2005) ermittelt werden. Das Osa-Protein von pSa ist in der Lage, die Transformation der Pflanzenzelle zu inhibieren, wenn es mit dem Ti-Plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* koexistiert, (Close und Kado 1992; Lee *et al.*, 1999). Dieses auch als *Oncogenic-supression* beschriebene Phänomen vermittelt die Fähigkeit, den konjugativen Transfer von Plasmiden verschiedener Inkompatibilitätsgruppen zu unterdrücken. Für das Osa-Protein von pSa konnte gezeigt werden, daß nicht der Transfer der T-DNA, sondern der Export des DNA-Einzelstrangbindepoteins VirE2 inhibiert wird (Lee *et al.*, 2004). Das Osa-Protein weist Homologien zum FiwA- (*fertility inhibition of IncW-plasmids*) Protein von RP1 auf, welches in der Lage ist, den konjugativen Transfer des IncW-Plasmides R388 zu inhibieren (Yusoff und Stanisich, 1984; Fong und Stanisich, 1989). Die Inhibition des konjugativen Transfers von einem Plasmid durch ein zweites -in derselben Zelle koexistierendes- Plasmid, ist für Plasmide verschiedener Inkompatibilitätsgruppen beschrieben worden (Winans und Walker, 1985). Das Fip- (*fertility inhibition of IncP plasmids*) Protein von pKM101 reduziert beispielsweise den Transfer von RP1 um das 10000-fache (Winans und Walker, 1985) und für das F-Plasmid konnte eine durch *pifC*-Gen vermittelte Reduktion des konjugativen Transfers von IncP-Plasmiden wie RP4 und RP1 gezeigt werden (Miller *et al.*, 1985; Tanimoto und Iino, 1983; Santini und Stanisich, 1998).

Obwohl für pM101.7 keine Reduktion des konjugativen Transfers der IncW-Plasmide R388 und R7K gezeigt werden konnte (Daten nicht gezeigt), liegt die Vermutung nahe, daß das Osa-Genprodukt den konjugativen Transfer anderer koexistierender Plasmide senkt.

TraE

Das 681 Aminosäure lange putative Topoisomerase-Protein beinhaltet eine Topoisomerase Subtyp IA Proteindomäne und besitzt die höchste Homologie zum DNA-Topoisomerase-Protein (658 Aminosäuren) des Plasmides pFBAOT6 aus *Aeromonas punctata* (YP_067822; Rhodes *et al.*, 2004). Das *traE*-Gen von RP4 kodiert für ein Polypeptid mit Sequenzähnlichkeit zur Topoisomerase III von *E.coli* (Li *et al.*, 1997). Bei diesem Protein handelt es sich um eine potente Decatenase, deren

mögliche Funktion in der Auflösung von Plasmid-DNA Replikationsintermediaten während der vegetativen Replikation oder beim konjugativen DNA-Transfer liegt. Hierbei katalysiert TraE von RP4 die Spaltung von Einzelstrang-DNA an gleicher Stelle wie die Topoisomerase III von *E.coli* (Li *et al.*, 1997). Topoisomerasegene wurden außer bei RP4 (Pansegrau *et al.*, 1994) auch auf verschiedenen anderen *broad host range* Plasmiden Gram-negativer sowie Gram-positiver Isolate gefunden. Hierzu gehören zum Beispiel das *trsl*-Gen von pGO1 aus *Staphylococcus aureus* (Morton *et al.*, 1993), das *topX*-Gen des Plasmides pXO1 aus *Bacillus anthracis* (Fouet *et al.*, 1994) oder das *traE*-Gen von R571 aus *Enterobacter aerogenes* (Pansegrau *et al.*, 1994).

Das für den Transfer von Plasmiden nicht essentielle *traE*-Gen von RP4 ist im Primase Gencluster eingegliedert, obwohl hier nur für den Plasmidtransfer essentielle Gene lokalisiert sind (Lessel *et al.*, 1992; Pansegrau *et al.*, 1994). Auch das *traE*-Gen von pM101.7 liegt neben einem Gen, welches möglicherweise für eine putative Primase kodiert. Die Rolle von *traE* (bei RP4) im Plasmidmetabolismus ist bisher unklar, da dieses Gen für die Plasmidreplikation aufgrund von homologen Genen im Wirtsorganismus nicht essentiell ist (Thomas *et al.*, 1980, 1981). Es wird allerdings vermutet, daß die Präsenz einer funktionellen, kompatiblen und vom Wirt unabhängigen plasmidkodierten Topoisomerase für ein *broad host range* Plasmid von Vorteil sein könnte (Li *et al.*, 1997).

TraC

Die ermittelte Nukleotid-Sequenz kodiert für ein 1201 Aminosäuren langes putatives Protein, welches Homologien zu TraC-Proteinen sowie zu Antirestriktionsproteinen aufweist. Homologievergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenz ergaben die besten Homologien zu dem TraC-Protein (1145 AS) des Plasmides RP4 (Acc.-Nummer: CAA42455; Miele *et al.*, 1991) sowie zu einem Antirestriktions-Protein (1060 AS) aus *Nitrosomonas eutropha* C71 (Acc. Nummer: ZP_00671101).

Die Genprodukte der Antirestriktions-Gene (*ard* – *alleviation of restriction of DNA*) inhibieren die Restriktion durch TypI Restriktions- und Modifikationssysteme. Antirestriktionssysteme sind vor allem für Bakteriophagen beschrieben worden und bei konjugativen Plasmiden bisher erst phänotypisch untersucht oder nur aufgrund von Sequenzhomologien postuliert. Es wird vermutet, daß ArdB-Proteine während der bakteriellen Konjugation die Restriktion unterdrücken und so dem fremden Plasmid erlauben, eine schützende Modifizierung aufzubauen (Wilkins, 2002). Bisher wurden *ard*-Gene oder ihnen homologe Gene auf dem F-Faktor sowie auf den IncN-Plasmiden pKM101 und R46 und dem IncW-Plasmid pSa detektiert (Ray und Skurray, 1983; Belogurov *et al.*, 1993; 2000).

Antirestriktions-Proteine des TypC –wie das ArdC-Protein des Plasmides pSA- weisen oft Homologien zu TraC-Primasen auf (Belogurov *et al.*, 2000). Diese Proteine beinhalten allerdings nicht das EGYATA-Motiv, welches in der C-terminalen Region der Primasen lokalisiert ist (Strack *et al.*, 1992). Die Homologien bestehen meistens nur im N-terminalen Bereich, durch den die Bindung an den DNA-Einzelstrang gewährleistet wird (Rees und Wilkins, 1990; Miele *et al.*, 1991).

Da in der Teilsequenz das den Primasen eigene konservierte Proteinmotif 34-EGYATA-39, welches Teil der Primasedomäne ist, detektiert werden konnte, handelt es sich bei dem beschriebenen Protein höchstwahrscheinlich um eine Primase.

Ergebnisse

DNA-Primasen sind ein Bestandteil des DNA-Transfer-Systems und für viele konjugative Plasmide wie z.B. RP4 (TraC) oder Collb-P9 (Sog) beschrieben (Strack *et al.*, 1992). Primasen sind meist in der TraI-Region lokalisiert. Die bifunktionellen Enzyme besitzen *Priming*-Funktionen und eskortieren das zu transferierende Plasmid durch die Membranpore in die Rezipientenzelle (Rees und Wilkins, 1989, 1990). Hierbei sind die Funktionen für *Priming* und Transport in verschiedenen Domänen des Proteins lokalisiert. Beim Sog-Protein von Collb-P9 befindet sich auf dem 210 AS großen N-terminalen Teil die Primaseaktivität, welche nach dem Transfer am übertragenen Strang die DNA-Synthese durch Generierung von Oligonukleotidprimern initiiert (Chafield, 1982; Chatfield und Wilkins, 1984). Der C-terminale Abschnitt wird für den DNA-Transfer benötigt. Es wird vermutet, daß die Sog-Polypeptide im Donor einen Komplex mit dem zu transferierenden Einzelstrang bilden, welcher den DNA-Transport fördert (Wilkins, 2000). Allerdings konnte für die Sog-Primase auch ein DNA-unabhängiger Transfer durch Komponenten des Konjugationsapparats gezeigt werden (Wilkins, 2000). Die Primase Aktivität von Sog und TraC ist nicht essentiell für die Konjugation in *E.coli* (Chatfield *et al.*, 1982), aber sie steigert die Transferrate des Einzelstranges bei Collb-P9 um das 200-fache (Narahara *et al.*, 1997). Außerdem spielt sie eine Rolle für den Wirtsbereich des Transfers (Merryweather *et al.*, 1986; Lanka und Barth, 1981; Nash und Krishnapillai, 1988).

VirB1

Das *virB1*-Gen kodiert für ein hypothetisches Protein mit einer Länge von 327 Aminosäuren. Die höchsten Homologien konnten zum Protein SLT aus *Nitrosomonas eutropha* C71(252 AS) (Acc. Nummer: EAO16371) und zum 198 Aminosäuren langen TrwN-Protein des IncW-Plasmides R388 aus *E.coli* detektiert werden (Acc. Nummer: BAD24114). Innerhalb des beschriebenen Proteins konnte eine für lytische Transglykosylasen typische Membrandomäne identifiziert werden.

Motiv I

Konsensus		CAPxUxxxUUxxUxxxESxxxP				Acc. Nummer:
pM101.7	VirB1	7	MMACAPNVAPATIEKVIQVESGGNPLAL	34		
pKM101	TraL	34	AQRCAPDVSPLTMAYIVGHESNGPYRI	61	UO9868	
pTi15955	VirB1	34	ARKCAPSVATSTLAAIAKVESRFDPLAI	61	XO6826	
RP4	TrbN	50	SAAKYEIPANILLAIREKEGGKPGQWV	77	M93696	

Motiv II

Konsensus		DxGLMQU			
pM101.7	VirB1	92	GHSVDMGYMQVNSTN	106	
pKM101	TraL	90	NKSFDMGLAQINSNN	102	
pTi15955	VirB1	90	RHSLDVGLMQINSRN	102	
RP4	TrbN	81	NGTYDVGELQFNTAY	95	

Motiv III

Konsensus		UxxYNxG			
		147	LRAALSAYNTGDFNK	161	
		147	LRHALSCYNTGSLTN	161	
		145	LRRAISAYNTGNFIR	159	
		135	LWTRAANYHSRTPSK	149	

Abb. 10: **Multiples Alignment der drei konservierten Sequenzmotive VirB1 homologer Proteine.** Hierbei steht U für eine der hydrophoben Aminosäuren I, V, L, M, W oder F.

Die Aminosäuresequenz von VirB1 (pM101.7) entspricht eindeutig der Konsensus-Sequenz innerhalb der Motive I und III (Abb. 10). Auch im Bereich des Motivs II stimmen fünf von sechs Aminosäuren mit der konservierten Sequenz überein. Bei den beiden Abweichungen handelt es sich um konservative Austausche.

Die Funktion der VirB1 ähnlichen Proteine konjugativer Plasmide liegt wahrscheinlich in der partiellen Degradation der Peptidoglykanschicht, wodurch möglicherweise der Aufbau der Transmembranpore erleichtert wird (Dijkstra und Thunnissen, 1994, Llosa *et al.*, 2000). Das Protein ist nicht essentiell für die Konjugation, allerdings konnte gezeigt werden, daß seine Inaktivierung die Konjugationsfrequenz um das 10 bis 100 fache reduziert (Winans und Walker, 1985).

TraF

Datenbankabfragen für das putative TraF-Protein (189 AS) von pM101.7 ergaben die höchsten Homologien zu einem Protein des konjugativen Transfers aus *Nitrosomonas eutropha* (186 AS) (Acc. Nummer: ZP_00671099) und zu einem TraF-Protein (170 AS) des Plasmides pHCG3 aus *Oligotropha carboxidovorans* (Acc. Nummer: CAG28510). Das Protein hat eine TraF spezifische Membrandomäne und besitzt -wie z.B. TraF von RP4 (Waters *et al.*, 1992)- eine besonders gute Signalsequenz mit einer möglichen Schnittstelle zwischen den Positionen 24 und 25.

Obwohl *traF* in der TraI-Region angesiedelt ist, ist das Produkt funktionell mit verschiedenen Proteinen der TraII-Region korreliert. Für TraF von RP4 konnte gezeigt werden, daß dieses essentielle Transferprotein die Zyklisierung des Präpilins TrbC katalysiert.

In allen bisher beschriebenen TraF sowie TraF-analogen Proteinen konnten mehrere konservierte Aminosäuren detektiert werden. An den Positionen 37 sowie 89 aller prokaryotischen Type-I Signalpeptidasen befinden sich die konservierten Aminosäuren Serin und Lysin. Bei pM101.7 konnten diese Aminosäuren an den Positionen 36 sowie 88 im entsprechenden Protein lokalisiert werden. Mutationen an diesen Orten führen zu einer reduzierten Aktivität des Proteins und zu Defekten in der Synthese von konjugativen Pili (Eisenbrandt *et al.*, 2000). Im C-terminalen Teil aller bisher bekannten TraF-ähnlichen Proteasen liegt die konservierte Region 153 SxDxRYFGP 161. Dieses Sequenzmotiv befindet sich bei TraF von pM101.7 ebenfalls um eine Aminosäure verschoben zwischen den Positionen 152 bis 160. Obwohl die Funktion des Aminosäurerests D 155 bis heute noch nicht geklärt werden konnte, führt auch ein Austausch dieser Aminosäure zu Defekten in der TrbC-Reifung. Bei RP4 konnte allerdings gezeigt werden, daß auch Mutationen an allen weiteren konservierten Aminosäuren die Konjugationsraten erheblich reduzieren (Eisenbrandt *et al.*, 2000).

TraG

Das putative TraG-Protein (650 AS) von pM101.7 zeigt große Ähnlichkeit zu TraG-Proteinen aus *Nitrosomonas eutropha* C71 (643 AS) (Acc. Nummer: ZP_671098) und RP4 (637 AS) (Acc. Nummer: CAA38327). Innerhalb der Sequenz des TraG-Proteins von pM101.7 konnte eine TraG spezifische Protein-Domäne sowie drei Transmembrandomänen identifiziert werden.

TraG ähnliche Proteine werden auch als *coupling*-Proteine bezeichnet, da vermutet wird, daß sie das Relaxosom an den Translokationsapparat koppeln. Interaktionen zwischen dem *coupling*-Protein und Proteinen des Relaxosoms sowie Proteinen des Mpf-Komplexes sind in der Literatur beschrieben

(Szpirer *et al.*, 2000; Schröder *et al.*, 2002; Gilmour *et al.*, 2003; Llosa *et al.*, 2003). Bei TraG handelt es sich um eine putative Nucleosid Triphosphatase (NTPase), deren Rolle möglicherweise der Motor bei der Sekretion ist (Schröder und Lanka, 2003). TraG-Proteine sind für die Konjugation essentiell und in der inneren Membran lokalisiert (Gomis-Rüth *et al.*, 2002). Sie besitzen zwei konservierte Domänen mit Ähnlichkeit zu den von Walker beschriebenen Boxen A und B (Schröder *et al.*, 2002; Walker *et al.*, 1982). Die Nucleotidbindestellen zeigen innerhalb der Walker-Box A einen konservativen Austausch in der letzten Aminosäure der Konsensussequenz (Abb. 11). Allerdings zeigt die Sequenz von pM101.7 Übereinstimmungen zur P-Loop-Sequenz der Adenylate-Kinasen (GxxxSGKG) und es handelt sich dementsprechend möglicherweise um ein funktionelles P-Loop-Motiv (Saraste *et al.*, 1990).

<u>Walker-Box A</u>			<u>Walker-Box B</u>				
Konsensus		AxxxxGKS			DE		
pM101.7	TraG	162	CAL A PTRS GK GVGL	175	453	LLLML DE FPT	462
<i>N. eutropha</i> C71	TraG	157	CAI A PTRS GK GVGL	170	448	LLLML DE FPT	457
RP4	TraG	179	LT Y A P TRS GK GVGL	192	445	LLMML DE FPS	454

Abb. 11: **Multiples Alignment der Walker Boxen A und B von TraG homologen Proteinen.**

Tral

Aufgrund von Schwierigkeiten bei der Sequenzierung konnte von *tral*-Gen nur ein Teilfragment, welches für 333 Aminosäuren kodiert, bestimmt werden. Die höchsten Homologien wurden für das Tral-Protein (823 AS) von pBi1063 aus *Stenotrophomonas maltophilia* ermittelt (Acc. Nummer: AAP82040).

Beim Plasmid RP4 bilden die Gene *tral*, *traH* und *traJ* das Relaxaseoperon, wobei sich das *traH*-Gen innerhalb von *tral* befindet (Ziegelin *et al.*, 1991, Pansegrau *et al.*, 1990). Der erste Schritt bei der Einleitung des Transfers ist die Bildung des Relaxosoms am *oriT*. Die Formation ist ein stufenweiser Prozeß, bei dem zuerst das essentielle Protein TraJ an den *oriT* bindet (Ziegelin *et al.*, 1989). Dieser Komplex ist notwendig für die Bindung von Tral, welches eine 6-bp lange Nucleotid-Sequenz zwischen der *nic*-Site und der TraJ Bindestelle erkennt (Waters *et al.*, 1991, Pansegrau *et al.*, 1993). Das Protein TraH stabilisiert diesen Komplex indem es sowohl an Tral als auch an TraJ bindet (Pansegrau *et al.*, 1990). Auch bei Tral von RP4 handelt es sich um ein für die Konjugation essentielles Protein (Fürste *et al.*, 1989), wohingegen die Abwesenheit von TraH die Transfer-Frequenz nicht bedeutend reduziert (Cole *et al.*, 1993).

4.3.2 Sequenzierung des Plasmides pM101.1

Bei dem Plasmid pM101.1::D19 handelt es sich um das kleinste transposonmarkierte Plasmid aus dem *E. coli* Stamm M101. Kleine Plasmide mit einer Größe unter 2 kb wurden bereits für verschiedene klinischen Isolate beschrieben. Diese Plasmide wie z.B. das 1.5 kb große Plasmid pKL1 aus *E. coli* (Burian *et al.*, 1997) oder pSC101 mit 1.25 kb (Vocke und Bastia, 1985) tragen sehr wenig genetische Information, liegen aber in hoher Kopiezahl in der Zelle vor.

Aufgrund der sehr geringen Größe des Plasmides sollte eine Sequenzierung Aufschluß über die vorhandene Genfracht und den Nutzen eines so kleinen Plasmides bringen. Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe der Sequenzierprimer SeqA (5'-ATCAGCGGCCGCGATCC-3') und SeqB (5'-TTATTCGGTCGAAAAGGATCC-3') ausgehend vom inserierten Transposon. Homologievergleiche wurden mit den Blast-Programmen (Altschul *et al.*, 1990) durchgeführt.

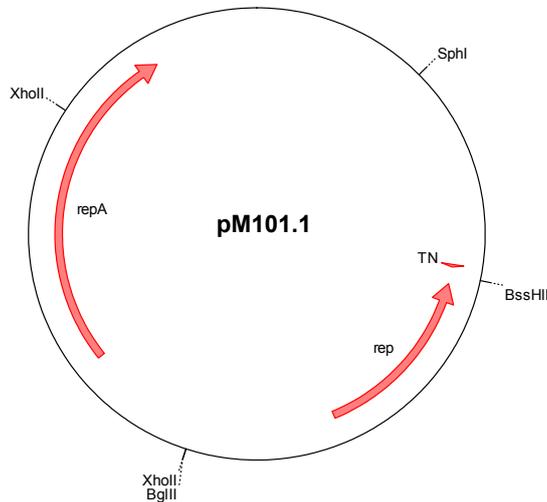


Abb. 12: **Genetische und physikalische Karte des 1823 bp großen Plasmides pM101.1**

Auf dem 1832 bp großen Plasmid pM101.1 konnten zwei offene Leseraster detektiert werden, dessen abgeleitete Aminosäuresequenzen Ähnlichkeiten zu zwei verschiedenen Rep-Proteinen aufweisen. Hierbei handelt es sich um ein *repA*-Gen, welches für ein 165 Aminosäuren langes RepA-Protein kodiert und die höchste Homologie zu einem 175 Aminosäuren langen RepA-Protein des Plasmides pHS649 aus *Histophilus somni* 649 (Acc. Nummer: AAP44497) besitzt. Weitere Ähnlichkeiten bestehen zu dem 183 Aminosäuren großen RepA-Protein des Plasmides pL9 aus *Histophilus somni* 9L (Acc. Nummer: AAN52085) und zu einem 158 Aminosäuren langen RepA-Protein des Plasmides pKL1 aus *E.coli* (Acc. Nummer: NP_863059; Burian *et al.*, 1997).

Das zweite *rep*-Gen kodiert für ein 88 Aminosäuren langes Protein, mit Homologien zu einem 194 Aminosäuren langen Rep-Protein des Plasmides pCR1 aus *Corynebacterium renale* (Acc. Nummer: CAA67573; Nath und Deb, 1995). Aufgrund seiner zu geringen Größe ist dieses Protein wahrscheinlich nicht funktionell. Des weiteren scheint es unwahrscheinlich, daß ein so kleines Plasmid für zwei verschiedene Rep-Proteine -mit Homologien zu Proteinen aus einem Gram-positiven sowie einem Gram-negativen Organismus- kodieren sollte.

Alle homologen *repA*-Gene sind Bestandteil kleiner cryptischer Plasmiden. Die Plasmide pHS649 und p9L aus *Histophilus somni* besitzen eine Größe von 1347 bzw. 1338 bp. Das pKL1 Plasmid aus *E.coli* ist mit 1548 bp nur unwesentlich größer als das 1488 bp Plasmid pCR1 aus *Corynebacterium renale*. Die Transposonintegrationsstelle befindet sich für die Mutante pM101.1::D19 an Position 501 der Sequenz.

pM101.1::D19 ist in der Lage, in den Arten *E.coli*, *Aeromonas media* sowie *Yersinia ruckeri* stabil zu replizieren. Auch das oben beschriebene Plasmid pKL1 repliziert in Bakterienstämmen der Gattungen *Shigella*, *Citrobacter*, *Salmonella* und *Serratia* und besitzt somit einen für seine geringe Größe weiten Wirtsbereich (Burian *et al.*, 1997). Beide Plasmide sind mobilisierbar, wobei für pM101.1::D19 sogar

gezeigt werden konnte, daß es durch ein konjugatives Plasmid des Stammes M101 mobilisiert werden kann (Diplomarbeit Kristina Ehrlich, 2005). Hierfür kommen die drei großen Plasmide dieses Isolates (80, 85 und 88 kb) in Frage, welche aufgrund ihrer Größe potentiell konjugativ sind, sowie das 30 kb Plasmid dieses Stammes, für das ein Gentransfer durch Konjugation bewiesen werden konnte.

Stabilitätstests über 75 Generationen haben gezeigt, daß pM101.1::D19 in *E.coli* Stämmen sehr stabil replizieren kann (Diplomarbeit Kristina Ehrlich, 2005). Ein *curing* dieses Plasmides durch Hitze, Ethidiumbromid oder Elektroporation konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden. Ideen, aus pM101.1::D19 einen Vektor zu konstruieren, wurden aufgrund von Inkompatibilitäten zu diversen pUC-Vektoren nicht weiter verfolgt.

Zusammenfassung der Charakterisierung des Bakterienstammes M101 und seiner Plasmide

Bei dem *E.coli* Isolat M101 handelt es sich um einen multiplasmid Stamm mit zehn verschiedenen Plasmiden. Eines seiner großen Plasmide konnte der IncI-Inkompatibilitätsgruppe zugeordnet werden. Durch *in vitro* Transposonmutagenese konnte ein 30 kb großes Plasmid sowie verschiedene kleinere Plasmide unter 5 kb mit einem Kanamycinresistenzgen versehen werden, mit dessen Hilfe gezeigt werden konnte, daß alle markierten Plasmide mobilisierbar sind. Für das 30 kb Plasmid pM101.7 konnte ein konjugativer Transfer in Rezipienten verschiedener Gattungen der α - und γ -Proteobakteriengruppe gezeigt werden. Die partielle Sequenzierung dieses *broad host range* Plasmides ergab Sequenzhomologien innerhalb der TralI-Region sowie Homologien in der Anordnung der Gene der TralI-Region zum Plasmid pBi1063 aus *Stenotrophomonas maltophilia*. Die Sequenzierung des kleinsten cryptischen Plasmides dieses Isolates zeigte, daß diese Plasmid nur für sein eigenes Rep-Protein kodiert.

4.4 Vergleich der charakterisierten bakteriellen Gemeinschaft aus dem Süßwasser mit einer Gemeinschaft aus dem Habitat Boden

Im Rahmen des BMBF Projektes „Diversität und Gentransfer in denitrifizierenden Bakteriengemeinschaften“ wurde eine Gemeinschaft von Bodenbakterien analysiert. Zu diesem Zweck wurden am 15.9.1998 Proben eines sandigen humusreichen Bodens auf dem Versuchsgut der Hochschulen in der Füsinger Au genommen. Bei der Probenentnahme wurden jeweils acht Proben mit einem Probenstecher aus einer Tiefe von 10 cm entnommen und vereinigt. Die taxonomische Einordnung der Einzelisolate erfolgt mittels ARDRA-Analysen, wobei 1000 Isolate auf ihre Zugehörigkeit zu den verschiedenen Bakteriengattungen untersucht wurden. Um die abundantesten ARDRA-Gruppen zu spezifizieren, wurden von insgesamt 26 Isolaten 16S-rDNA Sequenzanalysen durchgeführt.

Die folgende Tabelle (Tab. 13) zeigt die Ergebnisse für alle Gram-negativen Isolate dieser Gemeinschaft, da nur diese für weitere Versuche zur Bestimmung des Gentransferpotentials von Interesse waren (Lin, Diplomarbeit, 1998). Der Nachweis plasmidhaltiger Isolate erfolgt wie schon bei der Gemeinschaft aus dem Süßwasser beschrieben mittels der alkalischen Lyse nach Ramos-Gonzales *et al.*, 1991 (Battermann, 2002).

Ergebnisse

Tab. 13: **Vergleich der Gram-negativen Isolate zweier bakterieller Gemeinschaften** aus den Habitaten Boden und Süßwasser im Bezug auf die vorherrschenden Gattungen und den Plasmidgehalt der Isolate.

Habitat	Gattung	Anzahl Isolate	%	Anzahl plasmidhaltiger Isolate	%
Boden	<i>Pseudomonas</i>	361	70.8	21	6
	<i>Stenothrophomonas</i>	51	10	1	2
	<i>Xanthomonas</i>	34	6.7	3	9
	<i>Alcaligenes</i>	25	4.9	2	8
	<i>Paracoccus</i>	14	2.7	14	100
	<i>Agrobacterium</i>	13	2.5	2	15
	<i>Enterobacter</i>	12	2.3	2	17
	Gesamt	510		45	8.8
Süßwasser	<i>Pseudomonas</i>	140	46	8	5.7
	<i>Aeromonas</i>	74	25	10	13.5
	<i>Flavobacterium</i>	25	8.3	0	0
	<i>Hydrogenophaga</i>	14	4.6	0	0
	<i>Escherichia</i>	12	4	12	100
	<i>Shigella</i>	12	4	0	0
	<i>Brevundimonas</i>	9	3	0	0
	<i>Flexibacter</i>	8	2.6	0	0
	<i>Chromobacterium</i>	5	1.7	0	0
	Gesamt	299		30	10

Innerhalb der bestimmten bakteriellen Gemeinschaft aus dem Ackerboden konnten von tausend Isolaten 510 den Gram-negativen Bakterien zugeordnet werden. Die größte Gruppe wird von der Gattung *Pseudomonas* (361 Isolate, 70.8%) gebildet, gefolgt von diversen kleineren Gruppen mit *Stenothrophomonas* (51 Isolate, 10%), *Xanthomonas* (34 Isolate, 6.7%), *Alcaligenes* (25 Isolate, 4.9%), *Paracoccus* (14 Isolate, 2.7%), *Agrobacterium* (13 Isolate, 2.5) und *Enterobacter* (12 Isolate, 2.3%). Innerhalb dieser Gattungen wurden 45 plasmidhaltige Isolate detektiert. Hierbei verteilen sich die plasmidhaltigen Isolate wie folgt auf die verschiedenen Gattungen: *Pseudomonas* 21 (6%), *Stenothrophomonas* 1 (2%), *Xanthomonas* 3 (9%), *Alcaligenes* 2 (8%), *Paracoccus* 14 (100%), *Agrobacterium* 2 (15%) und *Enterobacter*, 2 (17%). Der Gesamtplasmidgehalt innerhalb der Gram-negativen Isolate dieser Gemeinschaft beträgt 8.8 %.

Die beiden untersuchten Gemeinschaften stammen aus unterschiedlichen Habitaten, dadurch bedingt sind sie aus unterschiedlichen Mitgliedern zusammengesetzt sind. In beiden Gemeinschaften stellt die Gattung *Pseudomonas* jedoch die abundanteste Gruppe dar. Wie die Graphiken zeigen, beinhalten beide Gemeinschaften ein oder zwei anteilmäßig sehr stark vertretene Gattungen sowie viele weitere durch wenige Vertreter repräsentierte Gattungen. Bei der Gemeinschaft aus dem Boden bildet die Gattung *Pseudomonas* mit 70 % aller Isolaten die größte Gruppe, wohingegen die anderen sechs beschriebenen Gattungen dieser Gemeinschaft die restlichen 30 % ausmachen.

Im Habitat Süßwasser werden die beiden größten Gruppen durch Vertreter der Gattungen *Pseudomonas* (46%) und *Aeromonas* (25%) gebildet. Alle anderen Gattungen liegen prozentual gesehen jeweils unter 10 %.

Ergebnisse

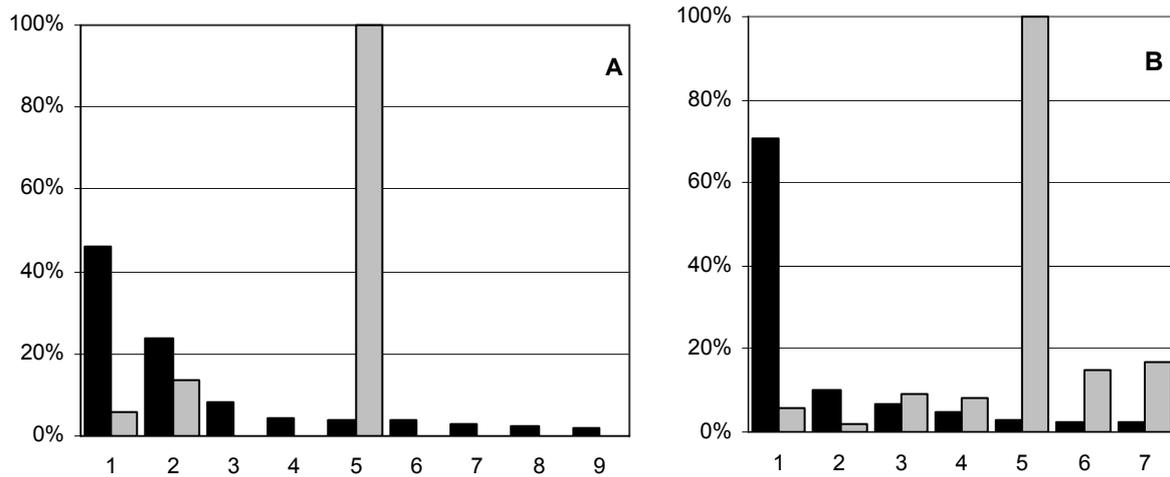


Abb. 13: **Vergleich zweier bakterieller Gemeinschaften der Habitate Süßwasser (A) und Boden (B).** Die Graphiken zeigen den Prozentsatz der Isolate der jeweiligen Gattungen (linker Balken) sowie die prozentuale Häufigkeit der plasmidhaltigen Isolate innerhalb der Gattungen (rechter Balken). Abbildung A: 1: *Pseudomonas*, 2: *Aeromonas*, 3: *Flavobacterium*, 4: *Hydrogenophaga*, 5: *E.coli*, 6: *Shigella*, 7: *Brevundimonas*, 8: *Flexibacter* und 9: *Chromobacterium*. Abbildung B: 1: *Pseudomonas*, 2: *Stenothrophomonas*, 3: *Xanthomonas*, 4: *Alcaligenes*, 5: *Paracoccus*, 6: *Agrobacterium* und 7: *Enterobacter*.

Der Plasmidgehalt unter allen Gram-negativen Mitgliedern der Gemeinschaft ist mit 8,8 % innerhalb der Bodengemeinschaft und 10 % innerhalb der Gemeinschaft des Süßwasser ähnlich. Bei beiden Gemeinschaften konnte für die Gattung *Pseudomonas* ein Plasmidgehalt von ca. 6 % detektiert werden. Innerhalb der meisten anderen Gattungen liegt der Plasmidgehalt zwischen 0 und 17 %.

Auffällig ist allerdings, daß in beiden Gemeinschaften jeweils eine zahlenmäßig kleine Gruppe die höchste Anzahl an plasmidhaltigen Vertretern enthält. In der Gemeinschaft des Habitats Boden sind die Isolate einer *Paracoccus* Population zu 100 % plasmidhaltig, wohingegen in der beschriebenen Gemeinschaft aus dem Süßwasser in allen Isolaten der *E.coli* Population Plasmide detektiert werden konnten. Alle *Paracoccus* Isolate besitzen ein 23 kb großes Plasmid sowie diverse größere und kleinere Plasmide (Battermann *et al.*, 2003). Auch bei den *E.coli* Isolaten handelt es sich um multiplasmid Stämme, welche eine hohe Anzahl an Plasmiden beinhalten (siehe Kapitel 4.2.1). Auch bei diesen Isolaten sind in den verschiedenen Stämmen, einige Plasmide gleich und andere nicht.

4.5 Isolierung von Bakteriophagen aus Süßwasser

Aus den drei Teichen im Oetkerpark, am Schloßhof und am Meierteich konnten 600 auf TBY-Medium langfristig kultivierbare Bakterienstämme isoliert werden. Für diese Bakterienstämme sollten im folgenden aus den gleichen Teichen sowie aus umliegenden Gewässern Bakteriophagen isoliert werden.

Tab. 14: **Aus Bielefelder Teichen isolierten Bakteriophagen** und deren zugehörigen Wirtsbakterien

Bakteriophagen aus Bielefelder Gewässern		
Phage	Wirtsbakterium	Gattung
ΦO18	O18	<i>Aeromonas</i>
ΦO58	O58	
ΦO238	O238	
ΦS26	S26	
ΦS30D	S30D	
ΦS32D	S32D	
ΦS53	S53	
ΦM34	M34	
ΦM63	M63	
ΦM93	M93	
ΦO272	O272	<i>Brevundimonas</i>
ΦO283	O283	
ΦO283.6	O283	
ΦO283.12	O283	
ΦO283.15	O283	
ΦS121c	S121c	
ΦM164	M164	
ΦO221.15	O221	<i>Escherichia</i>
ΦM2	M2	
ΦM25.8	M25	
ΦM25.11	M25	
ΦM101.11	M101	
ΦO233	O233	<i>Pseudomonas</i>
ΦS117	S117	
ΦS118	S118	
ΦS228	S228	
ΦS239	S239	
ΦM144	M144	
ΦM203	M203	
ΦM232	M232	
ΦO261	O261	<i>Arthrobacter</i>
ΦO262	O262	
ΦO88	O88	
ΦO263	O263	
ΦM127b	M127b	
ΦM201	M201	
ΦM219	M219	
ΦM239	M239	
ΦM242	M242	

Zur Isolierung der Phagen wurden die Wasserproben durch einen Membranfilter (0.44µm) sterilfiltriert und zur Anreicherung mit einer Übernachtskultur des möglichen Wirtsstammes sowie 4-fach TBY-Medium über Nacht bei 28°C inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, Biofuge) wurde der Überstand dieser Kultur auf Indikatorplatten getropft und diese über Nacht bei 28°C bebrütet.

Auf diese Weise konnten zu 39 Bakterienisolaten zunächst je ein Bakteriophage isoliert werden (Tab.14). Später wurden aus anderen Wasserproben zusätzliche Phagen für die *Brevundimonas vesicularis* und *E.coli* Stämme isoliert. Restriktionsanalysen der Phagen-DNA zeigte, daß es mit einer Ausnahme (Φ O283.6 und Φ O283.15) um jeweils verschiedene Phagen handelt. Nachdem hochtitrige Phagenlysate hergestellt worden waren, konnten mit den Phagen weitere Isolate der jeweiligen Gruppen infiziert werden. Beispielsweise wurden von 74 *Aeromonas* Isolaten 23 mit dem Phagen Φ O18 und 17 mit dem Phagen Φ O58 infiziert. Da die beiden Ursprungswirte O18 und O58 von M. Figueras eindeutig als *Aeromonas media* eingruppiert wurden, kann mit einiger Vorsicht vermutet werden, daß *Aeromonas media* der häufigste Vertreter in der *Aeromonas* Gruppe ist.

Insgesamt konnten für Bakterienstämme der Gattung *Aeromonas* zwölf Phagen, für die Art *E.coli* fünf Phagen und für Isolate der Gattung *Brevundimonas* sieben Bakteriophagen isoliert werden. Acht Bakteriophagen konnten für Bakterienstämme der Gattung *Pseudomonas* und zwei Phagen für Isolate der Gattung *Arthrobacter* isoliert werden. Die Wirtsstämme von weiteren sieben Phagen sind unbekannt. Sieben der isolierten Bakteriophagen stammen nicht aus den selben Teichen, wie die zugehörigen Wirtsstämme. Die Wasserprobe, aus der die Phagen Φ O283.15 und Φ O221.15 isoliert wurden, stammt aus der Kanalisation. Die Phagen Φ M25.11 und Φ M101.11 wurden aus Wasserproben der Kläranlage Heepen (Bielefeld) gewonnen. Der Phage Φ O283.6 kommt aus einer Wasserprobe eines Bielefelder Baches und die Probe in welcher der Phage Φ O283.12 detektiert wurde, stammt aus der Weser im Bereich Höxter.

Alle Phagen tragen die Namen der Isolate, welche für die erste Anreicherung verwendet wurde. Die Tabelle (Tab. 14) gibt eine genaue Übersicht über alle isolierten Bakteriophagen und Bakterienstämme, mit denen sie angereichert wurden.

4.5.1 UV-Induktion von Prophagen

Zusätzlich zur Isolierung von freien Bakteriophagen aus Wasserproben wurden die verschiedenen Bakterienisolate auf Prophagen untersucht. Zu diesem Zweck wurde jeweils ein Isolat auf einer TBV-Agarplatte anwachsen gelassen und die SOS-Antwort durch UV-Licht induziert. Anschließend erfolgte die Überschichtung mit einem für den möglichen temperenten Phagen potentiellen Wirtstamm. Aufgrund der Vielzahl der möglichen Prophagen / Wirt Kombinationen wurden nur Isolate der Gruppen *E.coli*, *Brevundimonas vesicularis* und *Aeromonas* auf das Vorhandensein von Prophagen untersucht. UV-Licht wirkt als natürlicher Regulator in der Bakteriophagen / Wirtszelle Interaktion. Unter dem Einfluß dieses Induktors beenden temperente Phagen ihren Prophagenstatus in der lysogenen Zelle und wechseln in den lytischen Vermehrungszyklus. Dieser Mechanismus beruht auf einer Spaltung des Bakteriophagen Repressors durch aktiviertes RecA (Miller, 2001).

Tab. 15: **Temperente Bakteriophagen** und die für sie lysogenen Wirte

Bakteriophage	Wirt	Gattung
Φ O18	O18	<i>Aeromonas</i>
Φ O81	O81	
Φ M25K	M25	<i>Escherichia</i>
Φ M26K	M26	

Ergebnisse

Auch durch intensive Versuche war es nicht möglich, einen Prophagen in den neun Isolaten der Art *Brevundimonas vesicularis* zu detektieren. Möglicherweise sind die Isolate wirklich nicht lysogen, denkbare Prophagen sind defekt, oder alle beinhalten den selben Prophagen und sind dadurch bedingt immun.

Aus dem *E.coli*-Isolat M25 konnte durch UV-Induktion ein Prophage isoliert werden, welcher verschiedene *E.coli* K12 Laborstämme infizieren kann. Der Wirtsbereich von Φ M25K ist im Abschnitt 4.5.7 (Wirtsbereichsbestimmung der *E.coli* Bakteriophagen) näher charakterisiert. Auch aus dem Isolat M26 konnte der temperente Phage Φ M26K induziert werden. Alle anderen zehn Isolate dieser Gruppe scheinen keine induzierbaren Prophagen zu beherbergen (Diplomarbeit Kristina Ehrlich, 2005).

Bei der Untersuchung von 3 Gruppen mit je 7-12 Isolaten der Gattung *Aeromonas* (Gruppe I: O52, O85; O19, O50, O98, O5, S35, M74; Gruppe II: O58, O18, O70, S61, M10, S26, S46, M92, O81, S45, O93, S115; Gruppe III: S151, S162, S195, O85, S236, O104b, O82), welche aufgrund von ähnlichen Proteinmustern für diese Untersuchungen zusammengestellt wurden, konnten zwei Prophagen induziert werden. Der *Aeromonas media* Stamm O18 ist lysogen für den Prophagen Φ O18P und der *Aeromonas* Stamm O81 enthält den temperenten Bakteriophagen Φ O81P (Abb. 14).



Abb. 14:

Die Abbildung zeigt die Plaquebildung des **temperenten Bakteriophagen Φ O81P nach UV-Induktion** des lysogenen Bakterienisolats O81. Die Überschichtung erfolgte mit dem Isolat O58 als neuem Wirtstamm.

Da für die Induktion der Bakterienisolate nur UV-Licht als Induktor verwendet wurde ist fraglich ob, die anderen untersuchten Isolate wirklich nicht lysogen sind. Möglicherweise könnten hier durch den Einsatz anderer Induktoren, wie z.B. Ethidiumbromid oder Wasserstoffperoxid, weitere Prophagen isoliert werden.

Φ O18P und Φ O81P sind nur in der Lage, das Wirtsbakterium O58 zu infizieren. Bei diesem Stamm handelt es sich auch um ein Isolat der Art *Aeromonas media*. Möglicherweise beinhaltet dieses Isolat einen Helfer-Phagen, ohne den die beiden temperenten Phagen nicht selbstständig replizieren können.

Der plasmidhaltige Stamm O18 beinhaltet das 25 kb große Plasmid pO18. Es stellt sich daher die Frage, ob der Prophage in zyklischer Form in der Zelle vorliegt und dem Plasmid pO18 entspricht. Ein Indiz hierfür war die Bestimmung einer ähnlichen Größe für das Bakteriophagen Genom (ca. 27 kb) mittels PFGE (siehe Kapitel 4.5.3). Die DNA des Phagen konnte durch die Restriktionsendonukleasen *EcoRI*, *HindIII* sowie *PstI* hydrolisiert werden. Da eine Hydrolyse der Plasmid-DNA eben durch diese Enzyme nicht möglich war, handelt es sich demnach bei dem Plasmid nicht um den Prophagen.

Der aus dem Isolat O81 induzierte Prophage Φ O81P ist wie Φ O18P nur in der Lage, den Stamm O58 als Wirt zu verwenden. Identische Restriktionsmuster beider Bakteriophagen-DNAs beweisen, daß es sich bei Φ O81P und Φ O18P um identischen Phagen handelt.

Fraglich war nun, ob alle anderen getesteten Isolate gleichermaßen einen Prophagen tragen und somit immun gegen Φ O18P und Φ O81P sind, oder ob dieser Phage wirklich einen dermaßen begrenzten Wirtsbereich besitzt. Zur Klärung dieser Frage wurden Gesamt-DNAs der *Aeromonas* Isolate S46, M10, O92, O70, S45, O93, S26, S61, S115, O18, O81 und O58 mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* hydrolysiert und mit einer Sonde aus Digoxigenin-markierter Φ O18P-DNA hybridisiert. Durch diese Versuchsanordnung konnte gezeigt werden, daß keiner der oben genannten Stämme lysogen für einen Prophagen, welcher Ähnlichkeit mit Φ O18P und Φ O81P besitzt, aufweist. Dies läßt vermuten, daß dieser Phage nur einen sehr geringen Wirtsbereich hat.

Des weiteren stellte sich die Frage, ob die DNA des Prophagen Φ O18P Ähnlichkeiten zu den DNAs anderer für die Gattung *Aeromonas* isolierten Bakteriophagen aufweist. Getestet wurden DNAs der folgenden *Aeromonas* spezifischen Bakteriophagen: Φ O18, Φ O58, Φ O238, Φ S32D, Φ S26 und Φ M34. Bei der Hybridisierung wurde Φ O18P markierte Phagen-DNA als Sonde verwendet. Unter stringenten Bedingungen (Hybridisierung bei 68°C) konnten allerdings keinerlei Homologien zwischen Φ O18P und den anderen getesteten *Aeromonas* Bakteriophagen detektiert werden.

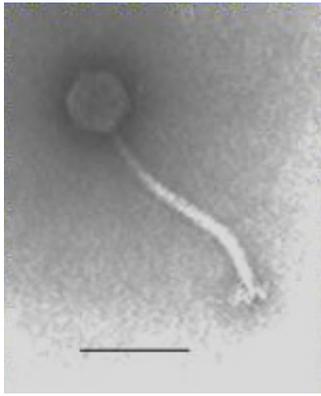
Ein großer Anteil der frei aus dem Wasser isolierten Phagen wurden darauf überprüft, ob sie temperent sind. Dazu wurden Bakterien aus den Plaques isoliert, über mehrere Passagen gereinigt und durch UV induziert. In allen Fällen wurden resistente aber keine immunen Stämme erhalten.

4.5.2 Morphologische Einordnung der Bakteriophagen durch Elektronenmikroskopie

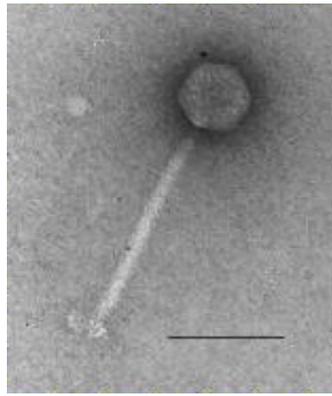
Seit 1959 wurden ungefähr 5100 Bakteriophagen mittels Elektronenmikroskopie charakterisiert. Die größte Gruppe mit 96 % aller Phagen besitzt Schwänze und wird in der Ordnung *Caudovirales* zusammengefaßt. 60.8 % von ihnen gehören zur Familie der *Siphoviridae* und besitzen lange, nicht kontraktile Schwänze. *Podoviridae* (14.1%) haben kurze, nicht kontraktile Schwänze und Phagen der Familie *Myoviridae* (25.1%) zeigen dicke, lange, kontraktile Schwänze. Nur 3.6 % aller bisher beschriebenen Phagen sind kubisch, filamentös oder pleomorph (Ackermann, 2001). Basierend auf diesem System, welches von Bradley (1965) entwickelt und von Ackermann und DuBow (1987) verfeinert wurde, erfolgte die Einordnung der Bakteriophagen in die verschiedenen Phagenfamilien.

Die Bakteriophagen wurden wie -in Material und Methoden beschrieben- auf kohlebeschichtete Grids aufgebracht (je 8 μ l eines Lysates mit einer Konzentration von 1×10^9 pfu/ml) und mit 1 % Uranylacetat negativ gefärbt. Für die Elektronenmikroskopie wurde ein Zeiss 109 Elektronenmikroskop verwendet.

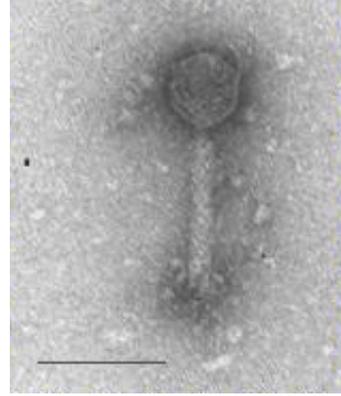
Die folgenden Photos zeigen eine Auswahl der verschiedenen Morphotypen (Abb. 15). Insgesamt wurden 19 Bakteriophagen mit den Wirten *Aeromonas spec.*, *Brevundimonas vesicularis*, *E.coli* und *Pseudomonas spec.* den verschiedenen Bakteriophagen Familien zugeordnet. Der Größenstandard auf den Photos beträgt 100 nm.



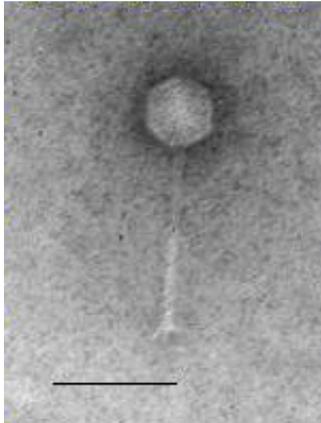
ΦO18



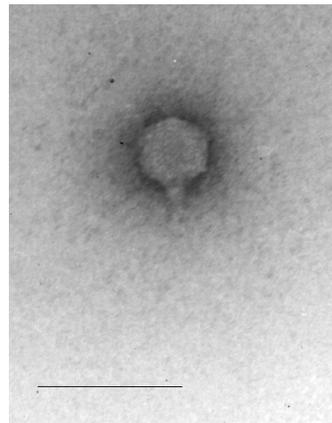
ΦO18



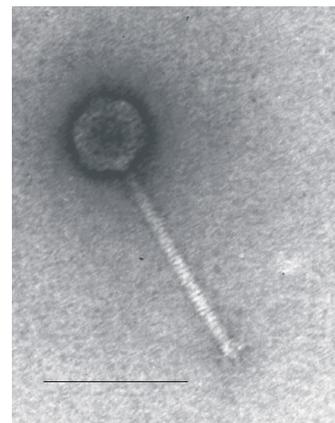
ΦM144



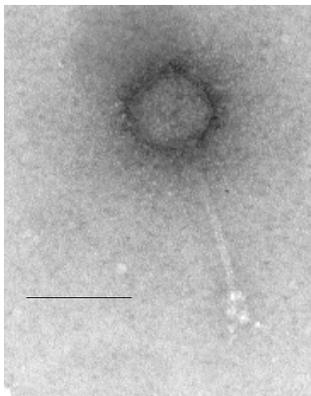
ΦM164



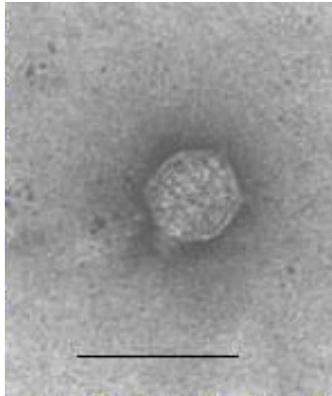
ΦO283.12



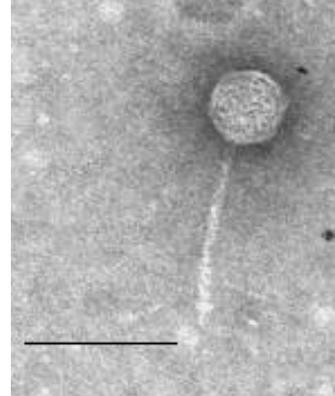
ΦS121c



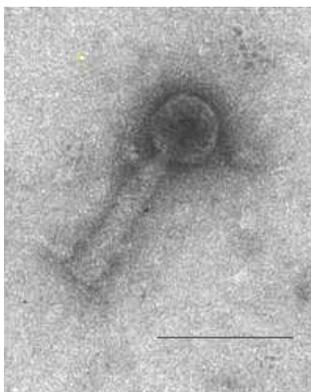
ΦM101



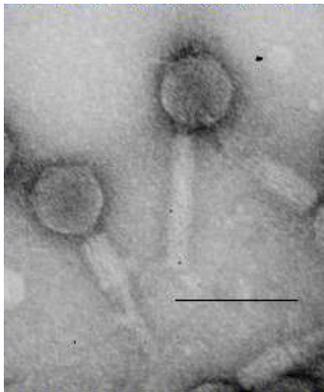
ΦM2



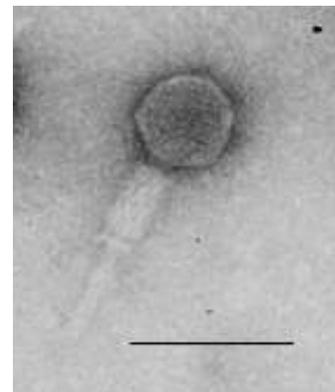
ΦM25K



ΦO18P



ΦO58



ΦO58

Ergebnisse

Abb. 15: **Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Bakteriophagen** mit den Wirten *E.coli* (Φ M101, Φ M25K und Φ M2), *Brevundimonas vesicularis* (Φ O283.12, Φ S121c und Φ M164), *Aeromonas media* (Φ O18, Φ O18P und Φ O58) und *Pseudomonas spec.* (Φ M144). Der eingezeichnete Größenmaßstab beträgt 100 nm.

Bei allen untersuchten Bakteriophagen handelt es sich um geschwänzte Phagen, welche dementsprechend der Ordnung *Caudovirales* zugehörig sind (Tab. 16).

Die *Pseudomonas* Bakteriophagen Φ M144 und Φ S118 gehören zur Phagen-Familie der *Myoviridae*. Sie besitzen einen langen Schwanz, der -wie in der Abbildung des Phagen Φ O58 sichtbar ist- kontrahiert werden kann. Die Schwanzstrukturen dieser Phagen sind im Vergleich zu den Schwänzen der Phagen, welche zur Familie der *Siphoviridae* gehören, dicker und strukturierter. Ferner ist bei diesen Phagen eine sich verjüngende Halsstruktur erkennbar. Am distalen Schwanzende sind beim Phagen Φ M144 mehrere Schwanzfibern zu erkennen, die, ähnlich wie bei T4, angewinkelt zu sein scheinen. Auch der *Aeromonas media* Bakteriophage Φ O58 und der temperente *E.coli* Phage Φ M26K gehören in die *Myoviridae* Phagen-Familie.

Von den drei weiteren untersuchten Phagen mit Wirten der *E.coli* Gruppe konnten zwei (Φ M101 und Φ M25K) zur Familie der *Siphoviridae* und einer (Φ M2) zur Familie der *Podoviridae* zugeordnet werden. Die sechs *Brevundimonas vesicularis* Bakteriophagen lassen sich in zwei Gruppen aufteilen. Alle Phagen, welche vom Wirt O283 isoliert wurden und große Plaques bilden (Φ O283, Φ O283.6 und Φ O283.12), besitzen kurze Schwänze, wohingegen alle Bakteriophagen, die kleine Plaques ausbilden (Φ O272, Φ S121c und Φ M164), lange Schwänze besitzen und somit zur Familie der *Siphoviridae* gehören.

Tab. 16: **Auswertung elektronenmikroskopischer Bilder der Phagen**

Bakteriophage	Wirtsstamm	Phagen Familie	Schwanzlänge in nm	Kopfdurchmesser in nm
Φ O18	<i>Aeromonas</i>	<i>Siphoviridae</i>	190	60
Φ S32D				
Φ S26		<i>Podoviridae</i>	7	60
Φ 18P		<i>Myoviridae</i>	110	50
Φ O58			130	55
Φ O272	<i>B. vesicularis</i>	<i>Siphoviridae</i>	150	50
Φ S121c			150	50
Φ M164			150	50
Φ O283		<i>Podoviridae</i>	10	50
Φ O283.6			10	50
Φ O283.12			10	50
Φ M101			<i>Siphoviridae</i>	160
Φ M25K	130	60		
Φ M26K	<i>E.coli</i>	<i>Myoviridae</i>		
Φ M2		<i>Podoviridae</i>	10	50
Φ S118		<i>Myoviridae</i>	60	65
Φ M144	150		50	
Φ O263		<i>Siphoviridae</i>		
Φ 88		<i>Podoviridae</i>	10	60

Innerhalb dieser Phagen-Familie konnten bei den untersuchten Bakteriophagen sowohl Vertreter mit starren sowie in selteneren Fällen mit beweglichen Schwänzen beobachtet werden, wohingegen bei

den Phagen der *Myoviridae*-Familie nur Exemplare mit starren Schwanzstrukturen beobachtet werden konnten. Von den fünf untersuchten Bakteriophagen mit Wirtsbakterien der Gattung *Aeromonas* konnten die Phage Φ O18 und Φ S32D zu den *Siphoviridae* und der Phage Φ S26 zur Familie der *Podoviridae* zugeordnet werden. Hier ist anzumerken, daß für den Bakteriophagen Φ O18 wie auf den beiden vergleichenden Photos zu sehen besonders häufig Vertreter mit beweglichen Schwänzen beobachtet werden konnten. Beim diesen Phagen war die Basisplatte, von der kurze Schwanzfibern abzweigen besonders deutlich zu sehen. Die beiden Phagen Φ O18P und Φ O58 konnten in die Phagen-Familien der *Siphoviridae* und *Myoviridae* eingeordnet werden.

Die Phagen Φ O272, Φ S121c und Φ M164 sind morphologisch nicht zu unterscheiden. Sie haben nur kurze Schwanzfibern, welche aus dem leicht verdickten distalen Ende des Schwanzes entspringen. Das Schwanzende des λ -ähnlichen Phagen Φ M25K verläuft, wie bei dem Phagen Lambda, spitz zulaufend.

Für alle beschriebenen Bakteriophagen liegt der Kopfdurchmesser zwischen 50 und 75 nm. Die kurzen Schwänze der zur Familie der *Podoviridae* zugeordneten Phagen wurden auf 7-10 nm geschätzt. Die Schwanzlänge der Bakteriophagen aus der Familie *Siphoviridae* variiert zwischen 60 (Φ S118) und 190 nm (Φ O18).

4.5.3 Größenbestimmung der Bakteriophagen Genome durch Pulsfeldgelelektrophorese

Die Größenbestimmung von Bakteriophagen-DNA durch Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) ist eine oft angewandte und gut etablierte Technik (Doškař *et al.*, 2000).

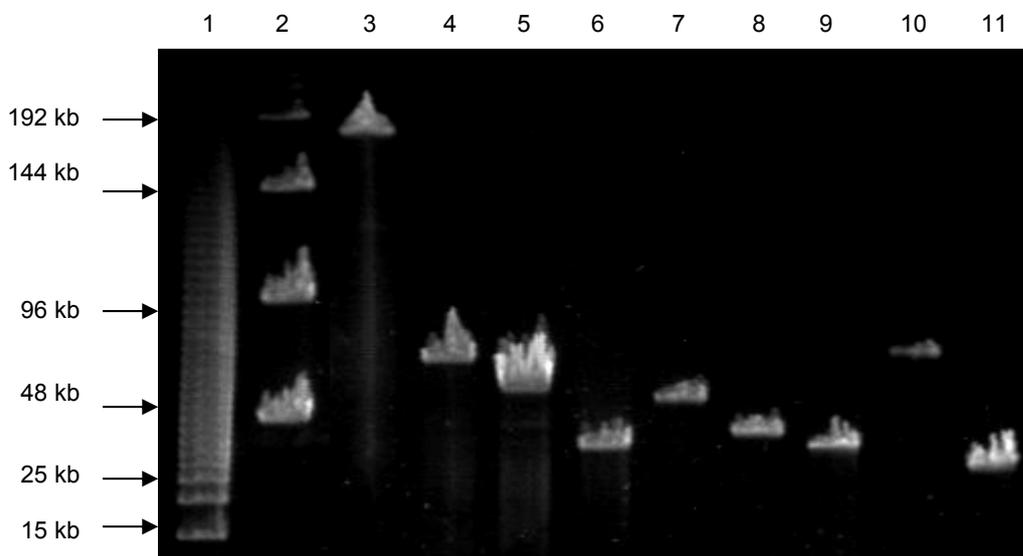


Abb. 16: Pulsfeldgelelektrophorese zur **Größenbestimmung der Bakteriophagen-Genome**

Spur 1: 5 kb Leiter Spur 2: λ -DNA Spur 3: Φ O238-DNA Spur 4: Φ M34-DNA Spur 5: Φ S32-DNA Spur 6: Φ S26-DNA Spur 7: Φ M144-DNA Spur 8: Φ S118-DNA Spur 9: Φ M2-DNA Spur 10: Φ M232-DNA Spur 11: Φ O88-DNA
1% Agarosegel / Die Laufzeit betrug 23 Stunden bei einem Pulswechsel von 5/15 Sekunden bei fünf Volt.

Ergebnisse

DNA-Fragmente ab einer Größe von 20 kb sind in einem üblichen Agarosegel nicht mehr aufzutrennen. Zur Größenbestimmung der Phagen-DNA war es deshalb notwendig, auf eine Trennung durch Pulsfeldgelelektrophorese zurückzugreifen. Bei dieser Methode der Elektrophorese ändert sich die Richtung des elektrischen Feldes in gewissen Zeitabständen so, daß größeren DNA-Fragmenten die Möglichkeit gegeben wird, sich im Gel leichter auszurichten.

Die Phagen-DNA wurde mit 10 µl 25% Sucrose in TBE gemischt und auf das Gel aufgetragen. Als Marker zur Größenbestimmung wurden λ-DNA Konkatemere und eine 5 kb Leiter der Firma BioRad (Konkatemere des Plasmides pBR328) verwendet. Anzumerken ist hierbei, daß es sich bei den bestimmten Größen nur um ungefähre Werte handelt, welche anhand der aufgetragenen Marker abgeschätzt wurden (Abb. 16).

Tab. 17: Durch Pulsfeldgelelektrophorese bestimmte **Genomgrößen der Phagen**

Phage	Wirtsbakterium	Genomgröße in kb
ΦO18	<i>Aeromonas</i>	55
ΦO18P		27
ΦO58		52
ΦO238		180
ΦS26		36
ΦS32		58
ΦS53		55
ΦM34		68
ΦO261	<i>Arthrobacter</i>	38
ΦO262		38
ΦO272	<i>Brevundimonas</i>	37
ΦO283		37
ΦO283.6		37
ΦO283.12		37
ΦO283.15		37
ΦS121c		37
ΦM164		37
ΦO221.15		<i>E.coli</i>
ΦM2	36	
ΦM25K	45	
ΦM25.8	96	
ΦM101.11	110	
ΦO233	<i>Pseudomonas</i>	160
ΦS117		45
ΦS118		42
ΦM144		55
ΦM232		70
ΦO88		30
ΦO263		40
ΦS239		40
ΦM201		52

Insgesamt wurde für 31 Bakteriophagen die Genomgröße durch PFGE bestimmt (Tab. 17). Auffällig ist hierbei, daß alle *Brevundimonas*-Phagen DNAs mit 37 kb die selbe Größe besitzen. Auch die beiden *Arthrobacter*-Phagen DNAs haben die gleiche Größe. Die Phagen-DNAs aller anderen Bakteriengattungen variieren in ihrer Größe von 27 kb (*Aeromonas* Φ18P) bis hin zu 180 kb

(*Aeromonas* Φ O238), wobei die meisten Phagen-DNAs eine Größe ähnliche der des Phagen λ (48 kb) besitzen.

Zusammenfassung der Phagenisolierungen

Aus Wasserproben der drei Teiche im Oetkerpark, am Schloßhof und am Meierteich sowie anliegender Gewässer konnten 39 Bakteriophagen isoliert werden. Diese haben ihre Wirte innerhalb der Gattungen *Aeromonas*, *Brevundimonas*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter* sowie nicht näher spezifizierten Arten. Durch UV-Induktion konnten aus den *Aeromonas* Isolaten O18 und O81 sowie aus den *E.coli* Isolaten M25 und M26 vier Prophagen induziert werden. Alle durch Elektronenmikroskopie untersuchten Phagen gehören zur Ordnung der *Caudovirales*. Acht Phagen (42%) wurden der Familie *Siphoviridae* zugeordnet. Sechs der untersuchten Phagen (32%) gehören zur Familie der *Podoviridae* und fünf der untersuchten Phagen (26%) zur Familie der *Myoviridae*. Die Genomgröße von 31 Bakteriophagen wurde durch PFGE bestimmt und liegt zwischen 27 kb (*Aeromonas* Φ 18P) und 180 kb (*Aeromonas* Φ O238), wobei die meisten DNAs in ihrer Länge λ ähneln.

4.5.4 Detektion kohäsiver Enden durch Pulsfeldgelelektrophorese

Durch Hydrolyse mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen (Daten nicht gezeigt) konnte bewiesen werden, daß alle Phagen Genome aus doppelsträngiger DNA bestehen. Folgend sollte ermittelt werden, ob die DNA-Endstrukturen kohäsiv oder terminal redundant sind.

Kohäsive Enden führen zur Konkaterisierung und diese lässt sich durch Auftrennung der Bakteriophagen-DNA mittels Pulsfeldgelelektrophorese nachweisen. Abbildung 17 zeigt die Pulsfeldgelelektrophorese aller Bakteriophagen-DNAs, bei denen kohäsive Enden detektiert werden konnten.

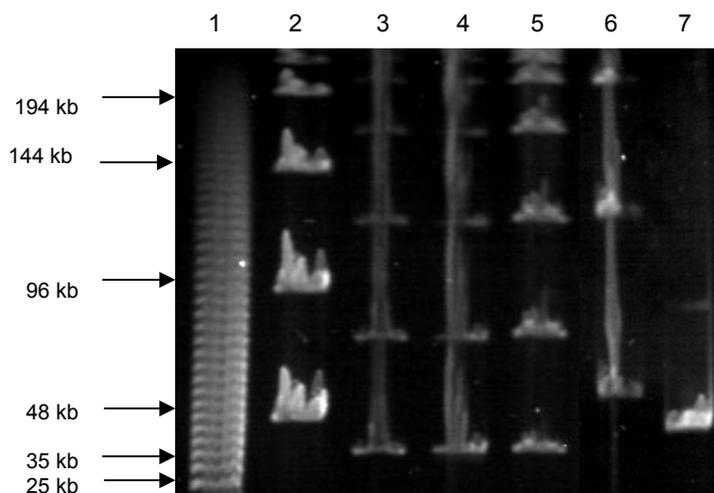


Abb. 17: Pulsfeldgelelektrophorese von **Bakteriophagen-DNA mit kohäsiven Endstrukturen**

Spur 1: 5-kb Leiter der Firma Bio-Rad, Spur 2: λ -DNA, Spur 3: Φ S121c-DNA (*B. vesicularis*), Spur 4: Φ M164-DNA (*B. vesicularis*), Spur 5: Φ O272-DNA (*B. vesicularis*), Spur 6: Φ O18-DNA (*A. media*) und Spur 7: Φ M25K-DNA (*E.coli*) PFGE-Bedingungen wie in Abb. 16

Für fünf Bakteriophagen konnten kohäsive Enden nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um den *Aeromonas media* Phagen Φ O18, sowie den drei *Brevundimonas* Bakteriophagen Φ O272, Φ S121c und Φ M164 und den temperenten *E.coli*-Phagen Φ M25K.

4.5.5 Bestimmung von terminaler Redundanz bei Bakteriophagen-DNAs

Alle Bakteriophagen, bei deren DNA durch Pulsfeldgelelektrophorese keine kohäsiven Enden detektiert werden konnten, wurden anschließend auf terminale Redundanzen untersucht. Zu diesem Zweck wurde mit Lambda-Exonuklease behandelte DNA durch Pulsfeldgelelektrophorese aufgetrennt. Bei Lambda-Exonuklease handelt es sich um ein hoch prozessives Enzym, welches doppelsträngige DNA vom 5'-Ende her degradiert.

Restriktionsspaltungen der Bakteriophagen-DNAs haben gezeigt, daß alle isolierten Phagen doppelsträngige DNA besitzen. Um unterschiedlicher Länge der terminalen Redundanz Rechnung zu tragen, wurde der Exonuklease Verdau 15, 20 oder 25 Minuten bei 12°C durchgeführt. Zur Förderung der Ausbildung der Konkatemere, wurde die DNA anschließend 20 Minuten auf 80°C erhitzt und langsam auf mindestens 40°C abgekühlt. Die anschließende Pulsfeldgelelektrophorese erfolgte 23 Stunden bei fünf Volt und einem Pulswechsel von 5/15 Sekunden. Terminale Redundanz wurde aus der Bildung von Konkatemeren geschlossen, welche durch die Pulsfeldgelelektrophorese sichtbar gemacht wurden (Abb. 18).

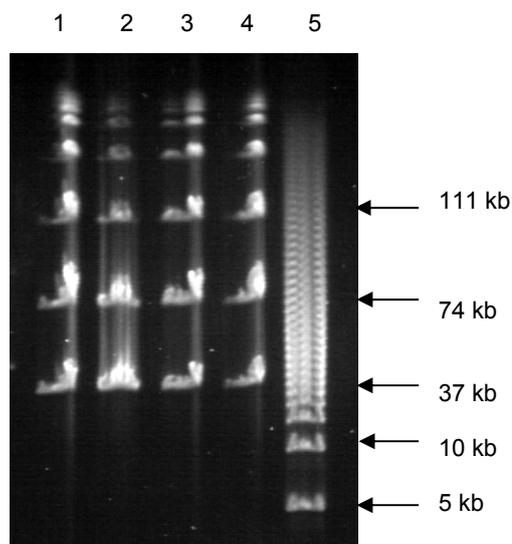


Abb. 18: **Identifizierung von terminalen Redundanzen**

Spur 1: Φ O283-DNA, Spur 2: Φ O283.6-DNA, Spur 3: Φ O283.12-DNA, Spur 4: Φ O283.15-DNA (alle *Brevundomonas vesicularis*) und Spur 5: 5 kb Leiter der Firma Biorad
PFGE Bedingungen wie in Abb. 16

Insgesamt konnte bei 16 Phagen-DNAs terminale Redundanz nachgewiesen werden (Tab. 18). Hierbei handelt es sich um die vier *Aeromonas* Phagen Φ O58, Φ S26, Φ S32D und Φ M34, sowie die *Brevundimonas vesicularis* Bakteriophagen Φ O283, Φ O283.6, Φ O283.12 und Φ O283.15, die beiden *E.coli* Phagen Φ O221 und Φ M101, sowie die *Arthrobacter* Phagen Φ O261 und Φ O262 und die Phagen Φ O88, Φ O263, Φ S239 und Φ M201, deren Wirtsstämme nicht näher bestimmt werden konnten.

Tab. 18: **Bakteriophagen mit terminaler Redundanz der DNA**

Bakteriophage	Wirtsbakterium
ΦO58	<i>Aeromonas</i>
ΦS26	
ΦS32 D	
ΦM34	
ΦO283	<i>Brevundimonas vesicularis</i>
ΦO283.6	
ΦO283.12	
ΦO283.15	
ΦO221	<i>E.coli</i>
ΦM101	
ΦO261	<i>Arthrobacter</i>
ΦO262	
ΦO88	
ΦO263	
ΦS239	
ΦM201	

Von insgesamt 30 Bakteriophagen, deren DNA auf kohäsive Enden oder terminale Redundanz untersucht wurden, konnten 21 diese Endstrukturen zugeordnet werden. Hierbei erscheint es unwahrscheinlich, daß die nicht zugeordneten Bakteriophagen-DNAs andere Formen der Endstrukturen besitzen. Bisher sind nur sehr wenige Phagen bekannt, deren DNA-Enden nicht kohäsiv oder terminal redundant sind. Beispiele hierfür sind der *Bacillus subtilis* Bakteriophage Φ29 oder der *E.coli*-Phage MS2 (Serrano *et al.*, 1993). Wahrscheinlich liegt es an der Qualität der erstellten Phagen-DNA und den gewählten Versuchsbedingungen, daß für einige Phagen-DNAs keine Einordnungen getroffen werden konnten.

4.5.6 Bestimmung von zyklischer Permutation bei terminal redundanten Bakteriophagen-DNAs

Die 16 Bakteriophagen Genome, bei denen durch PFGE eine terminale Redundanz nachgewiesen werden konnte, wurden anschließend auf zyklische Permutation untersucht. Hierbei wurde ein zeitabhängiger *Ba*/31-Nuklease Verdau mit anschließender Hydrolyse der DNA durch ein geeignetes Restriktionsenzym durchgeführt (Loessner *et al.*, 2000).

Ist eine DNA zyklisch permutiert, werden alle Fragmente gleichermaßen durch die Exonuklease degradiert im Gegensatz zum spezifischen Abbau der beiden Endfragmente bei nicht permutierter DNA. Für diesen Versuch wurden als negative und positive Kontrollen die DNAs der Bakteriophagen T7 (terminal redundant) und P1 (terminal redundant und zyklisch permutiert) verwendet.

Abbildung 19 zeigt je ein Beispiel einer nicht permutierten Phagen-DNA (ΦO283.12) und einer permutierten DNA (ΦM101.11) nach partieller Hydrolyse mit *Ba*/31.

Ergebnisse

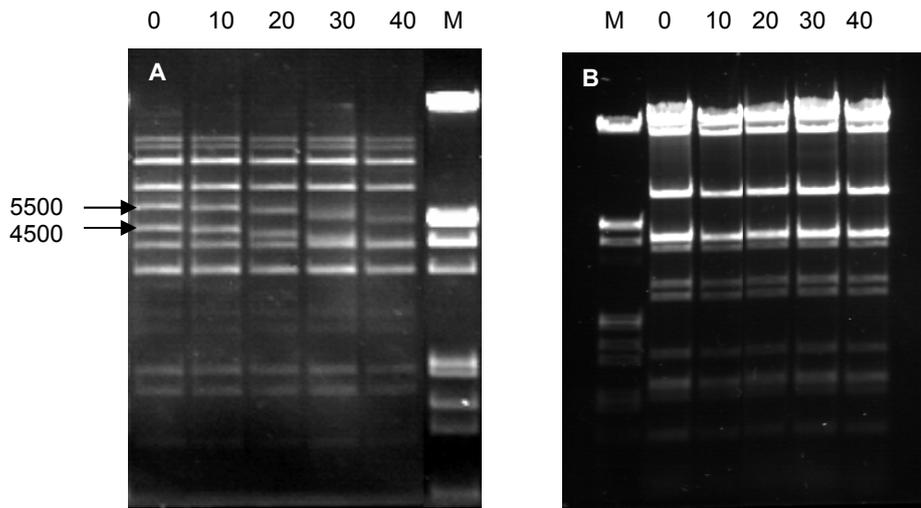


Abb. 19: **Zeitabhängige Hydrolyse von Φ O283.12 (A) sowie Φ M101.11 (B) Phagen-DNA mit *Ba*/31-Exonuklease (0-40 min).**

M) λ -Marker (*Eco*RI / *Hind*III) Die Pfeile indizieren, welche DNA-Banden beim nicht zyklisch permutierten Phagen Φ O283.12 spezifisch abgebaut werden (Größen in bp). Die DNA des Phagen Φ M101.11 ist zyklisch permutiert und wird gleichmäßig degradiert.

Von den elf untersuchten Bakteriophagen-DNAs, mit terminal redundanten Enden, konnte für die beiden *E.coli* Phagen Φ M101.11 (Abb. 19B) und Φ O221.15 gezeigt werden, daß die DNA zusätzlich zyklisch permutiert ist (Tab. 19). Zimmer *et al.* (2003) stellten die Hypothese auf, daß nur zyklisch permutierte Phagen die ihre DNA nach dem *headful*-Mechanismus verpacken zur generellen Transduktion befähigt sind. Diese Hypothese konnte für die beiden Phagen Φ M101.11 und Φ O221.15 bestätigt werden (Kapitel 4.5.9 Plasmidtransduktion durch Umweltbakteriophagen).

Auch für die DNAs der beiden Bakteriophagen Φ S32D (*Aeromonas*) und Φ O263 konnte zyklische Permutation nachgewiesen werden (Diplomarbeit Désirée Jakobs, 2006).

Tab. 19: **Bakteriophagen mit zyklisch permutierter DNA**

Bakteriophage	Wirtsbakterium	zyklische Permutation
Φ O58	<i>Aeromonas</i>	-
Φ S26		-
Φ S32D		+
Φ M34		-
Φ O283	<i>Brevundimonas</i>	-
Φ O283.6		-
Φ O283.12		-
Φ O283.15		-
Φ O221.15	<i>E.coli</i>	+
Φ M101.11		+
Φ O262	<i>Arthrobacter</i>	-
Φ O88		-
Φ O263		+

4.5.7 Wirtsbereichsbestimmung der *E.coli* Bakteriophagen

Aus dem Wasser der Teiche am Oetkerpark, am Schloßhof und am Meierteich konnte für die Gruppe der *E.coli* Isolate nur ein Phage isoliert werden. Hierbei handelt es sich um den Bakteriophagen Φ M2. Da allerdings gerade diese Bakteriengruppe im Mittelpunkt des Interesses stand, sollte für diese Stämme in Wasserproben aus benachbarten Gewässern nach passenden Bakteriophagen gesucht werden. Hierzu wurden Wasserproben aus dem Bielefelder Klärwerk in Heepen und aus der Kanalisation entnommen. Bei Wasserproben dieser Herkunft war die Wahrscheinlichkeit aufgrund des hohen Anteils an *E.coli* Bakterienzellen besonders groß, *E.coli* infizierende Phagen zu isolieren.

Es konnten insgesamt sechs weitere Bakteriophagen isoliert werden. Die Bakteriophagen Φ M101.11 und Φ M25.11 stammen aus Wasserproben der Kläranlage, der Phage Φ O221.15 aus Wasserproben der Kanalisation und der Phage Φ M25.8 wurde aus einer Wasserprobe des Beckens II der Kläranlage Heepen isoliert. Weiterhin wurde der temperente Phage (Φ M25K) des lysogenen Stammes M25 mit in die Wirtsbereichsbestimmung einbezogen.

Durch Hydrolysen mit verschiedenen Endonukleasen konnte gezeigt werden, daß die sechs isolierten Bakteriophagen nicht identisch sind (Daten nicht gezeigt).

Bei der folgenden Lysotypie wurden Lysate der sechs Bakteriophagen, mit einem Titer zwischen 10^9 und 10^{10} pfu/ml, auf verschiedenen *E.coli* Stämmen getitert (Tab. 20). Hierzu gehörten die neun Bakterienstämme der *E.coli*-Gruppe II, die drei Stämme der *E.coli*-Gruppe I, drei *E.coli* K12 Laborstämme (SF8, C600 und DH5 α) sowie ein *E.coli* C Stamm. Des weiteren wurden die mit *E.coli* nah verwandten Bakterienstämme *Klebsiella pneumoniae* und *Salmonella thyphimurium* mit in den Test einbezogen. Um die sechs Phagen mit anderen bekannten Bakteriophagen zu vergleichen, wurden die Versuche zusätzlich mit P1 und λ durchgeführt.

Trotz ihres unterschiedlichen Restriktionsmusters sind die Bakteriophagen Φ M101.11 und Φ O221.15 in der Lage die selben Wirtsstämme zu infizieren. Hierbei handelt es sich um die jeweiligen Stämme, von denen sie isoliert wurden, das Isolat M25 sowie alle getesteten *E.coli* K- und C-Laborstämme. Interessanterweise können diese Phagen, die verwendeten Laborstämme 5 bis 30 Mal besser infizieren, als die Stämme, von denen sie ursprünglich isoliert wurden und werden demnach vom *E.coli* K Restriktionssystem des K12 Stammes C600 nicht restringiert.

Die M25-Phagen Φ M25.8 und Φ M25.11, deren DNA ebenso nach Restriktionsspaltungen verschiedenartige Bandenmuster aufweisen, sind nur in der Lage, den *E.coli* Bakterienstamm M25 zu infizieren. Der temperente Phage Φ M25K bildet auf allen *E.coli* Laborstämmen, nicht aber auf anderen *E.coli* Süßwasserisolaten, Plaques. Für den Bakteriophagen Φ M2 konnte eine lytische Vermehrung auf seinem Wirtstamm und mit einer reduzierten Wirksamkeit von ca. 10^{-7} auf allen *E.coli* Laborstämmen nachgewiesen werden. Diese Reduktion weist eventuell auf eine Modifikation der Phagen hin, die nicht K12 spezifisch ist.

Keiner der sechs verschiedenen Bakteriophagen besitzt die Fähigkeit, die nah mit *E.coli* verwandten Stämme *Klebsiella pneumoniae* oder *Salmonella thyphimurium* zu infizieren. Die Bakteriophagen λ und P1 sind nicht in der Lage, einen der aus dem Teichwasser isolierten *E.coli* Bakterienstämme erfolgreich zu infizieren.

Ergebnisse

Tab. 20: **Plattierungswirksamkeit der *E.coli* Bakteriophagen** auf verschiedenen *E.coli* Stämmen sowie den nahe verwandten Arten *Klebsiella pneumoniae* und *Salmonella thyphimurium*.

Wirt		Bakteriophagen							
		ΦM101.11	ΦO221.15	ΦM25.8	ΦM25.11	ΦM25K	ΦM2	P1	λ
M25	II	1x10 ⁻³	1x10 ⁻⁴	1	1	-	-	-	-
M11		-	-	-	-	-	-	-	-
M101		1	1	-	-	-	-	-	-
O221		2	1	-	-	-	-	-	-
M52		-	-	-	-	-	-	-	-
M27		-	-	-	-	-	-	-	-
M78		-	-	-	-	-	-	-	-
M26		-	-	-	-	-	-	-	-
M15		-	-	-	-	-	-	-	-
C600		K12	5	10	-	-	1	+	+
SF8	5		10	-	-	1	+	+	+
DH5α	6		30	-	-	1	+	+	+
<i>E. coli</i> C	C	6	30	-	-	1	+	+	+
M2	I	-	-	-	-	-	+	-	-
M4		-	-	-	-	-	1	-	-
M7		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella thyphimurium</i>		-	-	-	-	-	-	-	-

Da vier der isolierten Bakteriophagen *E.coli* Laborstämme sowie Isolate der *E.coli* Gruppe infizieren konnten, ist dies ein weiterer Beweis für die Zuordnung der Isolate zu dieser Art. Die Bakteriophagen zeigen –mit Ausnahme von ΦM25K- keine Ähnlichkeit zu den gut charakterisierten *E.coli* Phagen P1 und λ. Für den Phagen ΦM25K konnte durch Elektronenmikroskopie auf morphologischer Ebene, sowie durch Hybridisierungen auf molekulare Ebene, eine starke Verwandtschaft zu λ beschrieben werden (Diplomarbeit, Kristina Ehrlich, 2005).

Durch die Lysotypieergebnisse erscheint die *E.coli* Gruppe noch sehr divers. Eventuell handelt es sich bei den Isolaten um unterschiedliche Subspezies oder die Plasmide beeinflussen die Phageninfektion (vgl. Kapitel 4.2.1). So wurden z.B. in den Isolaten unterschiedliche Typ-II Restriktionsenzyme nachgewiesen (Diplomarbeit, Nicole Günther, 2006). Eine weitere denkbare Möglichkeit wären z.B. plasmidkodierte Funktionen (*abi*-Gene), die eine abortive Infektion zur Folge haben.

4.5.8 Charakterisierung der *Brevundimonas vesicularis* Bakteriophagen

Die Ergebnisse des folgenden Kapitels wurden bereits in Research in Microbiologie publiziert.

Die *Brevundimonas vesicularis* Population ist mit neun Isolaten eine der kleinsten innerhalb der beschriebenen bakteriellen Gemeinschaft. Trotzdem war es möglich, für diese kleine Gruppe sieben Bakteriophagen zu isolieren. In Vergleich hierzu konnten für die beiden größten Gruppen der Gattungen *Pseudomonas* mit 140 Isolaten nur zehn und *Aeromonas* mit 74 Isolaten nur zwölf Phagen isoliert werden. Auf Grund dessen erfolgte eine nähere Charakterisierung der Bakteriophagen hinsichtlich ihres Wirtsbereiches, der Plaque-Morphologie und ihrer genetischen Verwandtschaft.

4.5.8.1 Wirtsbereichsbestimmung der *B. vesicularis* Bakteriophagen

Um den Wirtsbereich der verschiedenen Bakteriophagen zu charakterisieren, wurden Verdünnungen der Lysate (Ausgangstiter 10^{10} – 10^{11}) auf alle isolierten *Brevundimonas* Isolate sowie *Brevundimonas diminuta* und den Typenstamm *Brevundimonas vesicularis* LMG 2350^T getitert (Tab. 21). Die Phagen Φ O272, Φ S121c und Φ M164 besitzen einen ähnlichen Wirtsbereich. Sie bilden auf den meisten Stämmen -mit Ausnahme der Isolate O283, O214, O287- Plaques. Auf den Isolaten O212 und O284 ist wahrscheinlich durch ein Restriktionssystem der Bakterienstämme nur ein stark reduzierter Titer zu beobachten. Ein Φ O272 Phage, welcher zuvor auf dem Isolat O212 vermehrt wurde, ist in der Lage, den Bakterienstamm O272 mit derselben Plattierungswirksamkeit zu infizieren wie ein Phage, der auf seinem eigentlichen Wirtstamm vermehrt wurde. Dies läßt vermuten, daß O272 kein eigenes Restriktionssystem besitzt.

Alle Bakteriophagen, welche vom Isolat O283 isoliert wurden (Φ O283, Φ O283.6, Φ O283.12 und Φ O283.15), zeigen einen anders gearteten Wirtsbereich. Sie sind nicht in der Lage, sich auf den Isolaten O212, O284 und O214 zu vermehren. Den geringsten Wirtsbereich innerhalb dieser Gruppe besitzt der Phage Φ O283.12.

Keiner der isolierten Bakteriophagen zeigt lytische Aktivität gegen den Stamm O214 und *Brevundimonas diminuta*. Nur der Phage Φ O283.6 ist in der Lage, mit einer sehr geringen Effizienz den Typenstamm LMG 2350^T zu infizieren. Die Infektion des *Brevundimonas vesicularis* Typenstammes LMG 2350^T ist ein weiterer Hinweis für die Zuordnung der Isolate zu dieser Art. Allerdings zeigen die Ergebnisse, daß es sich bei der isolierten *Brevundimonas vesicularis* Population immer noch um eine sehr diverse Gruppe handelt.

Tab. 21: **Bestimmung des Wirtsbereiches der *Brevundimonas* Bakteriophagen** auf den *Brevundimonas* Umweltisolaten, *Brevundimonas diminuta* sowie dem *Brevundimonas vesicularis* Typenstamm LMG 2355^T.

Wirt	Bakteriophagen						
	Gruppe I			Gruppe II			
	Φ O272	Φ S121	Φ M164	Φ O283	Φ O283.6	Φ O283.12	Φ O283.15
O272	1	1	10	6	1	10^{-3}	1.5×10^{-2}
S121c	2	1	9	1	2×10^{-2}	-	4×10^{-4}
M164	1.2	1	1	6	5×10^{-2}	-	10^{-3}
O283	-	-	-	1	1	1	1
O212	2×10^{-5}	10^{-6}	-	-	-	-	-
O214	-	-	-	-	-	-	-
O217	1.7	1	1	2×10^{-2}	2×10^{-2}	-	3×10^{-4}
O284	2×10^{-3}	10^{-6}	-	-	-	-	-
O287	-	-	-	-	0.2	1	6×10^{-4}
<i>B. diminuta</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. vesicularis</i> LMG 2350 ^T	+	+	-	-	2×10^{-7}	-	-

4.5.8.2 Die Plaque-Morphologie der *B. vesicularis* Bakteriophagen

Die sieben isolierten *Brevundimonas vesicularis* Bakteriophagen lassen sich anhand der Größe ihrer Plaques in zwei Gruppen einteilen (Abb. 20; Tab. 22).

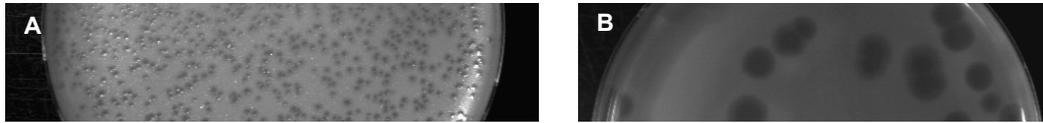


Abb. 20: **Plaquemorphologie der *Brevundimonas vesicularis* Bakteriophagen Φ O272 (A) und Φ O283 (B) auf ihren Wirtsstämmen.**

Phagen der Gruppe I bilden sehr kleine Plaques mit einer Größe zwischen 0.8 und 1 mm (Abb. 20A). Hierzu zählen die Phagen Φ O272, Φ S121c und Φ M164. Zur Gruppe II gehören alle Phagen, die den Bakterienstamm O283 als Wirt besitzen. Diese Phagen bilden Plaques mit einer Größe zwischen 4 und 5 mm (Abb. 20B). Alle Phagen bilden klare Plaques mit scharf abgegrenzten Rändern, was vermuten läßt, daß die Phagen virulent sind.

Tab. 22: **Gruppen-Einteilung der sieben *Brevundimonas vesicularis* Phagen anhand der Größe ihrer Plaques**

	Bakteriophage	Plaque Größe in mm
Gruppe I	Φ O272	1
	Φ S121c	0.8
	Φ M164	0.8
Gruppe II	Φ O283	4
	Φ O283.6	5
	Φ O283.12	4
	Φ O283.15	4

4.5.8.3 Spaltungsanalysen der *B. vesicularis* Bakteriophagen- DNAs

Um die genetischen Unterschiede zwischen den sieben Phagen zu ermitteln, wurden Restriktionsanalysen mit verschiedenen Enzymen durchgeführt. Diese Methode, welche ein fester Bestandteil bei der Bestimmung von Sequenz-Variationen bei Bakterien ist (Dowling *et al.*, 1990), findet auch Anwendung bei der Charakterisierung von Bakteriophagen (Campell, 1988). Änderungen im Restriktionsmuster resultieren aus Insertionen, Deletionen und Transpositionen (Arber, 1995) und sind daraus folgend immer ein Zeichen genetischer Varianz.

Da für alle Bakteriophagen die Hydrolyse mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen möglich war, handelt es sich ausnahmslos um Doppelstrang-DNA-Phagen. Die folgende Tabelle zeigt, mit welchen Enzymen eine Hydrolyse möglich ist oder nicht.

Ergebnisse

Tab. 23: Restriktionsanalyse der *Brevundimonas vesicularis* Phagen-DNA

Phagen DNA	Hydrolyse mit Endonucleasen	Keine Hydrolyse mit Endonucleasen
ΦS121c ΦO272 ΦM164	<i>Ascl, BglI, BspHI, EcoRV, HincII, MluI, NaeI, NciI, NruI, StuI, Tth111, XhoI</i>	<i>AccI, BglII, EcoRI, HindIII, KpnI, MfeI, NcoI, PmlI, PstI, PvuII, SalI, SmaI, SphI, XbaI</i>
ΦO283	<i>SmaI, Sau3AI</i>	<i>AccI, EcoRI, EcoRV, HindIII, PstI, SphI, XhoI</i>
ΦO283.6 ΦO283.15	<i>AccI, Ascl, BglI, BspHI, HindIII, MluI, NciI, Sau3AI, StuI</i>	<i>EcoRI, NaeI, PstI, SmaI</i>
ΦO283.12	<i>AccI, BspHI, HindIII, Sau3AI, StuI,</i>	<i>Ascl, MluI, NaeI, PstI, SmaI, Tth111</i>

Für alle in Gruppe I zusammengefaßten Bakteriophagen ΦS121c, ΦM164 und ΦO272 ist eine Hydrolyse mit den gleichen Restriktionsendonucleasen möglich oder nicht durchführbar. Die Phagen-DNAs der Gruppe II sind bis auf ΦO283.6 und ΦO283.15 mit unterschiedlichen Enzymen zu hydrolysieren.

Die Spaltungsmuster der Phagen ΦO272, ΦS121c und ΦM164 zeigen starke Ähnlichkeiten sind aber nicht identisch (Abb. 21). Bei einer Hybridisierung mit ΦS121c Phagen-DNA als Sonde wurde jedes Restriktionsfragment detektiert (Abb. 21). Es besteht demzufolge eine Homologie über das gesamte Bakteriophagen-Genom, was die sehr enge genetische Verwandtschaft zwischen diesen drei Phagen, welche interessanterweise aus drei verschiedenen Teichen stammen, bestätigt. Die drei Phagen der Gruppe I gehören zu den *Siphoviridae*. Die Genome sind 37 kb lang und tragen kohäsive Enden.

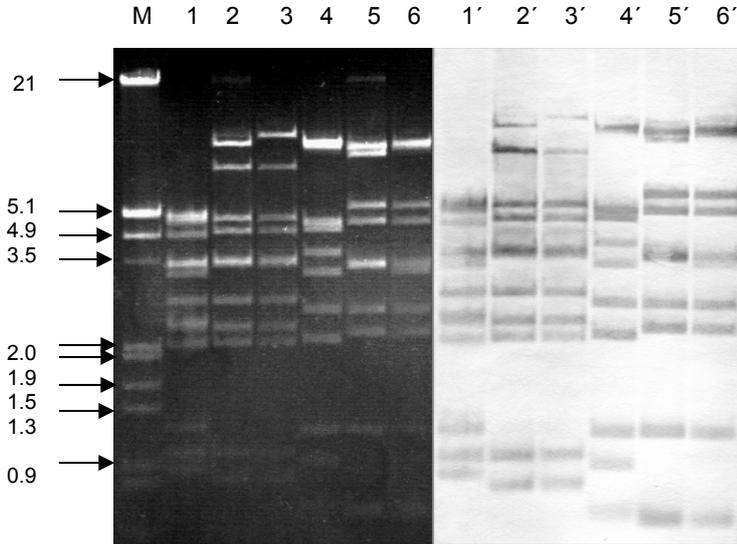


Abb. 21: Vergleich der Genome der *Siphoviridae* Phagen ΦO272, ΦS121c und ΦM164

M: λ-DNA (*EcoRI* / *HindIII*), Spur 1: ΦO272-DNA *MluI*, Spur 2: ΦS121c-DNA *MluI*, Spur 3: ΦM164-DNA *MluI*, Spur 4: ΦO272-DNA *AsclI*, Spur 5: ΦS121c-DNA *AsclI*, Spur 6: ΦM164-DNA *AsclI*. Die Spuren 1'-6' zeigen das Ergebnis der Hybridisierung mit Digoxigenin-markierter ΦS121c Phagen-DNA bei 68°C.

Die Bakteriophagen ΦO283.6 und ΦO283.15 zeigen mit dem Enzym *HindIII* gespalten das selbe Restriktionsmuster. Auch wenn diese beiden Phagen aus verschiedenen Gewässern stammen, muß es sich hier um denselben Phagen handeln. Die Bakteriophagen der Gruppe II (ΦO283, ΦO283.6,

(Φ O283.15) and Φ O283.12) besitzen dieselbe Plaque-Morphologie und einen ähnlichen Wirtsbereich; allerdings weisen sie unterschiedliche Spaltungsmuster auf (Abb. 22). In diesem Fall konnte durch Hybridisierungen mit markierter Φ O283 Phagen-DNA keine Homologie zwischen den Phagen-DNA Fragmenten festgestellt werden. Diese drei Phagen bilden verschiedene morphologische Untergruppen innerhalb der Gruppe II. Allerdings gehören alle zu den *Podoviridae*, die Genome haben eine Länge von 37 kb und sind ternimal redundant.

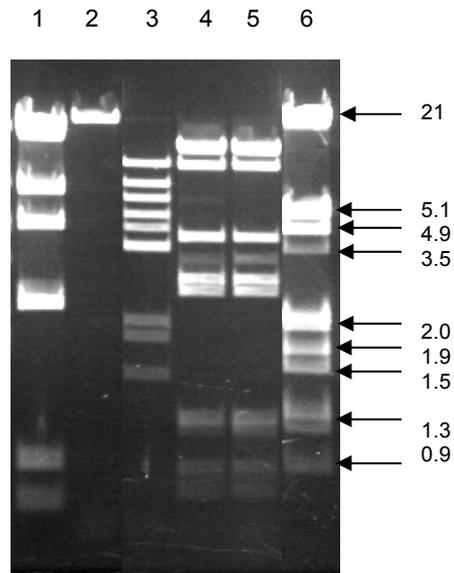


Abb. 22: **Restriktionsanalyse von DNAs der Phagen des Wirtsstammes O283.**

Spur 1: Φ O283-DNA *Sma*I, Spur 2-5: DNA der Phagen Φ O283, Φ O283.6, Φ O283.12 und Φ O283.15 *Hind*III Spur 6: λ -DNA *Eco*RI / *Hind*III (Größenangaben in kb)

4.5.9 Plasmidtransduktion durch Umweltbakteriophagen

Bis heute existieren nur sehr wenige Studien über transduzierende Bakteriophagen aus dem Habitat Süßwasser. Um weitere Erkenntnisse über ihr Potential zum horizontalen Gentransfers zu ermitteln wurden die in den Wasserproben detektierten Bakteriophagen auf die Fähigkeit, Plasmide zu transduzieren, untersucht. Für diese Versuche wurde das oben beschriebene IncQ-Plasmid pSunny ausgewählt. Mittels Elektroporation wurde das *broad host range* Plasmid in verschiedene Bakterienstämme der Gattungen *Aeromonas*, *Brevundimonas*, *Escherichia* und *Pseudomonas* eingebracht. Die Transduktion des pSunny-Plasmides wurde anschließend durch zwei verschiedene Versuchsansätze nachgewiesen.

Bei der ersten Methode –dem direkten Nachweis der Transduktion- wurde der Phage zuerst auf einem pSunny-haltigen Bakterienstamm vermehrt. Die so erhaltenen Phagen (Titer $\geq 5 \times 10^9$) wurden für eine weitere Infektion auf demselben Bakterienstamm –allerdings ohne das pSunny-Plasmid- eingesetzt. Hierbei wurden 50 ml einer logarithmisch wachsenden Bakterienkultur zentrifugiert und die Zellen in 5 ml TBV-Medium resuspendiert. Die auf diese Weise konzentrierten Bakterien wurden mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 0.5 mit den Phagen infiziert und zu je 200 μ l Portionen aliquotiert. In einem Zeitabstand von je 10 Minuten wurden je fünf Ansätze mit 2 ml Weichagar gemischt und auf kanamycinhaltiges Selektivmedium ausgegossen. Die Auswertung des Versuches fand nach 48 stündiger Inkubation bei 28°C statt. Befinden sich im Phagenlysat transduzierende Partikel, die pSunny eingepackt haben, entstehen auf kanamycinhaltigen Antibiotikaplatten unter UV-Licht grün fluoreszierende Transduktantenkolonien. Die Transduktionsraten wurden als Transduktanten pro

Ergebnisse

plaque forming unit (pfu) bestimmt. Jedes erhaltene Ergebnis wurde durch zwei unabhängige Transduktionen bestätigt. Dieser, vom Material her sehr umfangreiche Versuchsansatz, wurde benötigt, da sich in Vorversuchen gezeigt hat, daß die Transduktionsraten von pSunny sehr gering sind.

Die zweite Methode stellt einen indirekten Nachweis der Plasmidtransduktion dar. Hierbei wurde nicht die Weitergabe des Plasmides durch Bakteriophagen als solches gezeigt, sondern das Vorhandensein des Plasmides in den Phagen selbst nachgewiesen (nach Sander und Schmieger, 2001). Bei diesem Versuch wurde eine logarithmische Kultur eines pSunny-haltigen Bakterienstammes mit dem zugehörigen Bakteriophagen mit einer MOI von 0.1 infiziert und über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die nicht infizierten oder resistenten Bakterien mit Chloroform abgetötet und die Phagen durch Zentrifugation konzentriert. Während einer ersten DNase-Inkubation wurde anschließend freie DNA degradiert. Die so gewonnenen Bakteriophagen wurden zweimal hintereinander über eine CsCl-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. Um sicherzustellen, daß sich im so entstandenen Phagenlysat keine freie Plasmid-DNA mehr befand, wurde eine zweite DNase-Inkubation durchgeführt, bevor durch Phenolisierung der Bakteriophagen die Phagen-DNA gewonnen wurde. Durch diese Methode aufgereinigte Phagen-DNA wurde für den Nachweis des Kanamycinresistenzgens (*aphA3*-Gen) des pSunny Plasmides durch eine PCR-Amplifikation verwendet.

Tab. 24: **Plasmidtransduktion des Plasmides pSunny**

Bakteriophage	Gattung Wirtsbakterium	Amplifikation des <i>aphA3</i> Gens	Plattentest Transduktionsrate
ΦO18	<i>Aeromonas</i>	-	-
ΦO18P		-	-
ΦS26		-	-
ΦM34		-	-
ΦS121c	<i>Brevundimonas</i>	-	-
ΦO272		-	-
ΦO283		-	-
ΦO283.6		-	-
ΦO283.12		-	-
ΦM164		-	-
ΦO221.15	<i>E.coli</i>	+	-
ΦM2		+	-
ΦM25.8		-	-
ΦM25.11		-	-
ΦM25K		-	-
ΦM101.11		+	-
ΦS118	<i>Pseudomonas</i>	+	+ 1.5×10^{-9}
ΦM144		+	+ 2.3×10^{-8}

Da es sich bei beiden Methoden um sehr zeit- und materialaufwendige Versuche handelt, wurden nur wenige Bakteriophagen aus vier verschiedenen Bakteriengattungen für diese Tests ausgewählt. Dazu gehörten die *Aeromonas*-Phagen ΦO18, ΦO18P, ΦS26 und ΦM34 und die *Brevundimonas*-Phagen ΦS121c, ΦM164, ΦO272, ΦO283, ΦO283.6 und ΦO283.12. Des Weiteren wurden die *E.coli*-Phagen

Φ M2, Φ O221.15, Φ M25.8, Φ M25.11, Φ M25.K und Φ M101.11 sowie die *Pseudomonas*-Phagen Φ S118 und Φ M144 ausgewählt.

Durch Amplifikation des *aphA3*-Gens konnte die Plasmidtransduktion von pSunny bei fünf verschiedenen Phagen nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um die drei *E.coli* Phagen Φ O221.15, Φ M2 und Φ M101.11 sowie die beiden *Pseudomonas*-Phagen Φ S118 und Φ M144. Mit dieser Methode konnte für die Bakteriophagen mit Wirtsstämmen der Gattungen *Aeromonas* und *Brevundimonas* keine Plasmidtransduktionen gezeigt werden (Tab. 24).

Durch den oben beschriebenen Plattentest konnte nur für zwei der getesteten Phagen eine Plasmidtransduktion gezeigt werden. Hierbei handelt es sich um die beiden *Pseudomonas*-Phagen Φ S118 und Φ M144. Die höchste Transduktionsrate konnte für Φ M144 mit 2.3×10^{-8} bestimmt werden. Die Transduktionsfrequenz von pSunny beträgt für den Phagen Φ S118 1.5×10^{-9} .

Leider konnte für die drei *E.coli* Phagen kein positives Ergebnis bei der Transduktion erzielt werden. Dies kann möglicherweise an der zu geringen Transduktionsrate liegen, die unter der Nachweisgrenze der gewählten Versuchsbedingungen lag. Des Weiteren handelt es sich beim indirekten Nachweis durch PCR um eine empfindlichere Methode, da nicht jedes transduzierende Partikel erfolgreich weitergegeben wird.

4.5.9.1 Steigerung der Transduktionsfrequenz durch Insertion von Bakteriophagen-DNA in die zu transduzierenden Plasmide.

Studien der Arbeitsgruppe um Novick (1986) haben gezeigt, daß sich die Transduktionsfrequenz steigern läßt, wenn die zu transduzierenden Plasmide Phagen-DNA enthalten. Durch Verwendung dieser Methode sollte exemplarisch für vier Phagen versucht werden, ob dadurch auch bei den isolierten Bakteriophagen eine gesteigerte Transduktion nachzuweisen ist.

Bei dem für die Versuche ausgewählten Plasmid pBBR122 handelt es sich um ein *broad host range* Plasmid, welches in einer Vielzahl von Gram-negativen Bakterienstämmen stabil replizieren kann. Der Vektor besitzt mit 5304 bp eine relativ geringe Größe und ist kompatibel mit anderen *broad host range* Plasmiden, da er weder zu den Inkompatibilitätsgruppen IncP, IncQ oder IncW gehört.

Die DNAs der Phagen Φ M144, Φ S118, Φ M2 und Φ M101 wurden mit dem Restriktionsenzym *EcoRI*, bzw. *NcoI* hydrolysiert und *shot gun* in das Chloramphenicolresistenzgen des Vektors pBBR122 inseriert. Die Selektion erfolgte über das intakte Kanamycinresistenzgen des Vektors. Anschließend wurden Konstrukte mit verschiedenen großen Phagen-DNA Fragmenten ausgewählt und durch Elektroporation in die Phagenwirtsstämme eingebracht. Zum Vergleich wurden alle Transduktionstest jeweils nur mit dem Plasmid pBBR122 durchgeführt. Die Transduktionsrate wurde als Mittelwert aus zwei unabhängigen Transduktionstests bestimmt (Tab. 25).

Beim Phagen Φ M144 konnte für pSunny eine Transduktionsrate von 1.5×10^{-9} und für pBBR122 eine Rate von 9×10^{-8} ermittelt werden. Des Weiteren wurden Transduktionsraten für Hybridplasmide von pBBR122 mit Insertionen eines 5 kb (pBBRM144.18) und eines 4 kb (pBBRM144.23) Fragmentes der DNA von Φ M144 bestimmt. Mit dem Hybridplasmid pBBRM144.18 wurde eine Transduktionsrate von 3×10^{-8} erzielt, welche mit der Transduktionsfrequenz des Vektors korreliert. Allerdings konnte für das Plasmid pBBRM144.23 eine um vier Zehnerpotenzen höhere (9×10^{-4}) Transduktionsrate bestimmt werden.

Ergebnisse

Für den *Pseudomonas* Bakteriophagen Φ S118 wurden für pSunny Transduktionsraten von 2.3×10^{-8} und für pBBR122 Raten von 6.5×10^{-8} bestimmt. Die Hybridplasmide pBBRS118.2 und pBBRS118.27 beinhalten jeweils ein, 2 kb und 5 kb großes Phagen-DNA Fragment. Die Transduktionsfrequenzen liegen bei 5×10^{-9} für pBBRS118.2 und 1×10^{-7} für pBBRS118.27. Mit beiden Hybridplasmiden konnte die Transduktionsrate nicht gesteigert werden.

Tab. 25: **Ergebnisse der Tests auf Transduktion von Plasmiden, in welche Phagen-DNA inseriert wurde.**

Phage	Wirtsbakterium	Plasmid	Transduktionsrate
Φ M144	<i>Pseudomonas</i>	pSunny	1.5×10^{-9}
		pBBR122	9×10^{-8}
		pBBRM144.18 (Fragment 5 kb)	3×10^{-8}
		pBBRM144.23 (Fragment 4 kb)	9×10^{-4}
Φ S118		pSunny	2.3×10^{-8}
		pBBR122	6.5×10^{-8}
		pBBRS118.2 (Fragment 2 kb)	5×10^{-9}
		pBBRS118.27 (Fragment 5 kb)	1×10^{-7}
Φ M2	<i>E. coli</i>	pSunny	-
		pBBR122	-
		pBBRM2.5 (Fragment 2 kb)	8.4×10^{-9}
		pBBRM2.6 (Fragment 4 kb)	3.5×10^{-8}
Φ M101		pSunny	-
		pBBR122	-
		pBBRM101.2 (Fragment 2.5 kb)	-
		pBBRM101.3 (Fragment 3 kb)	-

Mit den Bakteriophagen Φ M101 und Φ M2 konnten für die Plasmide pSunny und pBBR122 keine Transduktionsraten bestimmt werden. Transduktion konnte hier nur indirekt durch PCR-Amplifikation in den Phagen verpackter Plasmide gezeigt werden. Beim Phagen Φ M101 konnte auch für die Plasmide pBBRM101.2 (2.5 kb Fragment) und pBBRM101.3 (3 kb Fragment) keine Transduktion gezeigt werden. Mit Phagen-DNA des Phagen Φ M2 wurden die Plasmide pBBRM2.5 (enthält ein 2 kb Fragment) und pBBRM2.6 (beinhaltet ein 4 kb Fragment) erstellt. Hierbei konnte für pBBRM2.5 eine Transduktionsrate von 8.4×10^{-9} und für pBBRM2.6 eine Frequenz von 3.5×10^{-8} ermittelt werden. Durch Insertion von Φ M2 Phagen-DNA in pBBR läßt sich die Transduktionsfrequenz für den Bakteriophagen Φ M2 in einem Maße steigern, daß nun durch einen Plattentest eine Transduktion nachgewiesen werden konnte.

4.5.10 Transposonmutagenese zur Markierung von Bakteriophagenwirtsstämmen

Um die Transduktion chromosomaler Marker durch Bakteriophagen testen zu können, war es notwendig, die jeweiligen uncharakterisierten Wirtsstämme durch ein Transposon zu markieren. Für diesen Zweck wurde das Transposon Omegon-Km aus dem Plasmid pJFF350 verwendet (Fellay *et al.*, 1989). Das Plasmid wurde aus *E.coli* S17.1 (RP4) in die Rezipientenstämme mobilisiert. In diesem ist das Plasmid nicht in der Lage, zu replizieren und das Transposon kann in das Genom der Rezipientenzelle inserieren. Die Insertion ist sehr stabil, da die Transpositionsfunktionen des IS1-Elements auf dem Donor-Plasmid und nicht im Transposon selbst liegen. Das Transposon trägt das *aphA2*-Gen aus Tn5 und ist so anhand der kombinierten Kanamycin–Neomycin Resistenz zu identifizieren.

Mit Hilfe des Plasmides pJFF350 wurden die beiden *Pseudomonas* Stämme M144 und S118, der *Aeromonas* Stamm M34 sowie die *Brevundimonas* Stämme S121c, O283, O272 und M164 transposonmarkiert. Hierfür wurden logarithmisch wachsende Kulturen des plasmidhaltigen Donorstammes sowie der Rifampicin-resistenten Rezipienten gemischt und auf TBY Platten über Nacht bei 28°C bebrütet. Die Selektion der Transposonmutanten erfolgte auf Kanamycin (30 µg/ml) und Rifampicin (100 µg/ml) haltigem Selektivmedium. Durch die Plasmidisolierungsmethode nach Ramos-Gonzales wurde sichergestellt, daß das transferierte Plasmid in den Rezipientenstämmen nicht replizieren kann. Die Insertion des Transposon wurde durch Amplifikation des *aphA2*-Gens nachgewiesen.

Eine Insertionsmutagenese der *E.coli* Stämme M101, O221, M25 und M2, für die die Transduktion des Plasmides pSunny nachgewiesen werden konnte, war nicht möglich, da pJFF350 in diesen Stämmen replizieren kann. Durch die Lysotypie der *E.coli* Bakteriophagen konnte allerdings gezeigt werden, daß die Phagen Φ M101.11, Φ O221.15 und Φ M25K in der Lage sind, verschiedene *E.coli*-K Laborstämme zu infizieren. Die Transduktionstests wurden deshalb für diese drei Phagen mit den Wirtsstamm S605, (Simon, 1984), welcher gleichfalls ein Transposon mit einem Kanamycinresistenzgen im Chromosom trägt, durchgeführt.

4.5.11 Transduktion chromosomaler Marker durch Umweltbakteriophagen

Während der folgenden Versuche sollte die Transduktion chromosomaler Marker der markierten Stämme (M34 (*Aeromonas*), S121c, O283, M164 und O272 (alle *Brevundimonas*) sowie S118 und M144 (beide *Pseudomonas*)) getestet werden. Die Transduktion durch die *E.coli* Bakteriophagen (Φ M101.11, Φ O221.15 und Φ M25K) wurde mit Hilfe des bereits transposonmarkierten *E.coli*-Stammes S605 durchgeführt.

Bei vier verschiedenen Bakteriophagen konnte das Kanamycinresistenzgen in aufgereinigter Phagen-DNA nachgewiesen werden (Tab. 26). Hierbei handelt es sich um die *E.coli*-Phagen Φ O221.15 und Φ M101.11 und die *Pseudomonas*-Phagen Φ S118 und Φ M144. Für diese Phagen konnte bereits im vorherigen Versuch die Plasmidtransduktion des Plasmides pSunny gezeigt werden. Transduktanten wurden nur mit den *Pseudomonas*-Phagen erzielt. Die ermittelten Transduktionsraten für den Marker *aphA2* liegen für Φ S118 bei 7×10^{-10} und für Φ M144 bei 8×10^{-10} Transduktanten pro pfu. Die ermittelten Transduktionsraten liegen nahe an der Nachweisgrenze. Es ist deshalb nicht verwunderlich, daß für

Ergebnisse

beide *E.coli* Bakteriophagen mittels Plattentests keine Transduktion des Markergens gezeigt werden konnte. Die Transduktionsraten für das Gen *aphA2* sind 1-2 Zehnerpotenzen niedriger, als für das transduzierte Plasmid pSunny. Dies mag einerseits an der höheren Kopiezahl des Plasmides im Vergleich zu einem einzelnen Markergen liegen, andererseits kann auch eventuell der Insertionsort des Transposons zu einer niedrigeren Transduktionsfrequenz führen. Ripp *et al.* (1994) haben gezeigt, daß je nach transduziertem Gen die Frequenz um mehrere Zehnerpotenzen variieren kann. Allerdings liegt eine Varianz in der Größe von 1-2 Zehnerpotenzen immer noch im normalen Fehlerbereich und bestätigt die Ergebnisse von Saye *et al.*, 1990, nach denen die Transduktionsraten für Plasmide und ein Markergen gleich sind.

Für alle *Brevundimonas*-Bakteriophagen den *Aeromonas* Phagen Φ M34 und den *E.coli*-Prophagen Φ M25K konnte keine Transduktion des chromosomalen Markergens ermittelt werden. Dies bestätigt die vorhergehenden Versuche bei denen für diese Phagen auch keine Plasmidtransduktion nachgewiesen werden konnte.

Tab. 26: **Transduktion eines chromosomalen Markers durch Bakteriophagen.**

Bakteriophage	Wirtsbakterium Gattung	Amplifikation des <i>aphA2</i> Gens	Plattentest Transduktionsrate
Φ M34	<i>Aeromonas</i>	-	-
Φ O272	<i>Brevundimonas</i>	-	-
Φ O283		-	-
Φ O283.6		-	-
Φ O283.12		-	-
Φ S121c		-	-
Φ M164		-	-
Φ O221.15	<i>E.coli</i>	+	-
Φ M25K		-	-
Φ M101.11		+	-
Φ S118	<i>Pseudomonas</i>	+	7×10^{-10}
Φ M144		+	8×10^{-10}

Der Marker wurde durch PCR-Amplifikation des Kanamycinresistenzgen (*aphA2*) in CsCl-gereinigter Phagen-DNA nachgewiesen. Des weiteren wurde mittels eines Plattentests die Transduktion des Markers durch Bakteriophagen gezeigt und die Transduktionsraten bestimmt.

Zusammenfassung der Transduktionstests

Insgesamt wurden 18 Bakteriophagen auf die Fähigkeit zur Transduktion von Plasmiden getestet. Es konnte für fünf Phagen mit Wirten aus den Gruppen *E.coli* (Φ M101.11, Φ M2 und Φ O221.15) und *Pseudomonas* (Φ M144 und Φ S118) eine Transduktion des Plasmides pSunny gezeigt werden. Die Transduktionsraten liegen zwischen 2.3×10^{-8} und 1.5×10^{-9} Transduktanten pro pfu.

Die Transduktion des chromosomalen Markergens *aphA2* wurde für zwölf Phagen getestet. Hierbei konnte gezeigt werden, daß alle Bakteriophagen, die Plasmide transduzieren können (mit Ausnahme des Phagen Φ M2, für den kein markierter Wirt vorhanden war), auch in der Lage sind, das chromosomale Markergen weiterzugeben. Die Transduktionsraten liegen für das Gen *aphA2* bei 7×10^{-10} (Φ S118) und 8×10^{-10} (Φ M144).

Die folgende Tabelle zeigt noch einmal eine Zusammenstellung aller in dieser Arbeit ermittelten Phagendaten.

Ergebnisse

Tab. 27: Zusammenstellung aller Phagendaten

Bakteriophage	Wirtsbakterium (Gattung)	Phagen Familie	Schwanzlänge in nm	Kopfdurchmesser in nm	Genom Größe in kb	kohäsive Enden	terminal redundant	zyklisch permutiert	Plasmid Td.	generelle Td.
ΦO18	Aeromonas	<i>Siphoviridae</i>	190	60	55	+			-	
ΦO18P		<i>Myoviridae</i>	110	50	27	-	-		-	
ΦO58		<i>Myoviridae</i>	130	55	52	-	+	-		
ΦO238					180	-	-			
ΦS26		<i>Podoviridae</i>	7	60	36	-	+	-	-	
ΦS32		<i>Siphoviridae</i>			58	-	+	+		
ΦS53					55	-	-			
ΦM34					68	-	+	-	-	-
ΦO261	Arthrobacter				38	-	+			
ΦO262					38	-	+			
ΦO272	Brevundimonas	<i>Siphoviridae</i>	150	50	37	+			-	-
ΦO283		<i>Podoviridae</i>	10	50	37	-	+	-	-	-
ΦO283.6		<i>Podoviridae</i>	10	50	37	-	+	-	-	-
ΦO283.12		<i>Podoviridae</i>	10	50	37	-	+	-	-	-
ΦO283.15		<i>Podoviridae</i>	10	50	37	-	+	-	-	-
ΦS121c		<i>Siphoviridae</i>	150	50	37	+			-	-
ΦM164		<i>Siphoviridae</i>	150	50	37	+			-	-
ΦO221.15	Escherichia				110	-	+	+	+	+
ΦM2		<i>Podoviridae</i>	10	50	36	-	-		+	
ΦM25.K		<i>Siphoviridae</i>	130	60	45	+			-	-
ΦM26K		<i>Myoviridae</i>								
ΦM101.11		<i>Siphoviridae</i>	160	75	110	-	+	+	+	+
ΦO233	Pseudomonas				160	-	-			
ΦS117					45	-	-			
ΦS118		<i>Myoviridae</i>	60	65	42	-	-		+	+
ΦM144		<i>Myoviridae</i>	150	50	55	-	-		+	+
ΦM232					70	-	-			
ΦO88		<i>Podoviridae</i>	10	60	30	-	+	-		
ΦO263		<i>Siphoviridae</i>			40	-	+	+		
ΦS239					40	-	+			
ΦM201					52	-	+			

5. Diskussion

5.1 Isolierung einer bakteriellen Gemeinschaft aus dem Habitat Süßwasser

Zur Charakterisierung einer bakteriellen Gemeinschaft des Habitats Süßwasser wurde ein Bielefelder Gewässer ausgewählt, das in seinem Verlauf mehrere Teiche speist.

Die Populationsdichte kultivierbarer Bakterien dieses natürlichen Habitats betrug im Oktober 2003 ca. 2×10^4 cfu/ml (die Daten beziehen sich auf eine Anzucht auf $\frac{1}{2}$ TBY-Medium bei 28°C). Dieses Ergebnis ist vergleichbar zu publizierten Daten ähnlicher Projekte zur Isolierung von bakteriellen Gemeinschaften aus Süßwasser-Habitaten. Für den Fort Loudon Lake in Knoxville USA konnte nach Anzucht auf LB-Medium bei 37°C ein Bakterientiter von 2.45×10^2 cfu/ml bestimmt werden (Ogunseitan *et al.*, 1992). Die von Miller (1998) ermittelten Titer für den Fisher-Teich in den Morton Arboretum, Downers Grove, USA betragen für den Monat Oktober 1×10^4 cfu/ml (Anzucht auf LB-Medium).

Aus den Wasserproben des Oberflächenwassers der Teiche konnten 848 verschiedene Isolate gewonnen werden. Hiervon entfallen 299 Isolate auf den Oetkerparkteich, 257 auf den Schloßhofteich und 292 Stämme konnten aus dem Wasser des Meierteiches isoliert werden.

10 % aller isolierten Bakterien sind rot pigmentiert und 30 % aller Isolate weisen eine gelbe Färbung auf. Das Vorkommen einer hohen Anzahl pigmentierter Isolate in der Luft-Wasser Grenzschicht ist ein hinlänglich beschriebenes Phänomen. Pigmentierung bietet den Zellen Schutz vor UV-Licht (Hermansson *et al.*, 1987).

Durch vergleichende Analysen von Gesamtproteinmustern der Isolate und Sequenzanalysen der 16S-rDNA einzelner Vertreter konnten insgesamt 367 Isolate 14 verschiedenen Bakteriengattungen zugeordnet werden. Die beiden größten Gruppen bilden hierbei die Gattungen *Pseudomonas* und *Aeromonas*. Kleinere Gruppen konnten aus Vertretern der Gattungen *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Hydrogenophaga*, *Escherichia*, *Shigella*, *Brevundimonas*, *Flexibacter*, *Chromobacterium*, *Streptomyces*, *Pantoea* und *Rahnella* gebildet werden.

Bislang gibt es nur wenige Studien, die sich mit der Isolierung und Charakterisierung einer natürlichen bakteriellen Gemeinschaft ohne vorherige Selektion auf bedeutende Parameter wie Fluoreszenz oder Antibiotika- und Schwermetallresistenzen beschäftigen. Die einzigen mir bekannten Arbeiten, in denen eine bakterielle Gemeinschaft aus dem Süßwasser durch eine kulturabhängige Methode charakterisiert wurde, sind die am Lehrstuhl für Didaktik der Universität Bielefeld erstellten Arbeiten zur Bestimmung der bakteriellen Gemeinschaft zweier Fließgewässer im Raum Ostwestfalen (teilweise beschrieben in Mannesmann *et al.*, 1990). Hierbei wurden 671 Isolate aus der Jölle bestimmt, wobei die abundantesten Gruppen die Gattungen *Escherichia* und *Enterobacter* darstellen. Unter 272 Isolaten aus der Weser bilden die Gattungen *Aeromonas* und *Enterococcus* die zahlenmäßig größten Gruppen (siehe auch Kapitel 4.1.3). Innerhalb dieser sowie der von mir beschriebenen Gemeinschaft konnten die Gattungen *Escherichia*, *Pseudomonas* sowie *Aeromonas* als die zahlenmäßig größten Gruppen beschrieben werden. In dem untersuchten Gewässersystem der Teiche handelt es sich bei den Gattungen *Pseudomonas* und *Aeromonas* um die am häufigsten detektierten Gattungen.

Die Entwicklung von Fingerprintmethoden sowie neuer Techniken z.B. T-RFLP (*terminal restriction fragment length polymorphism*), Real-time PCR Analysen oder die Klonierung mit anschließender Sequenzierung von 16S-rDNA Sequenzen hat die kulturabhängige Methode zur Bestimmung einer bakteriellen Gemeinschaft nahezu ersetzt (z.B. in: Besemer *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2005; Bowman *et al.*, 1997). Durch Klonierung von 16S-rDNA Sequenzen und anschließender Sequenzierung selbiger wurde beispielsweise eine bakterielle Gemeinschaft von sieben Seen im Staat New York (USA) bestimmt. Die Sequenzanalyse von 100 partiellen 16S-rDNA Sequenzen ergab Homologien zu einer Vielzahl verschiedener Gattungen, wobei 59 % zur Klasse der *Proteobacteria*, 15 % zu Gruppe der *Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides* und 18 % zur Ordnung *Actinomycetales* zugeordnet wurden (Hiorns *et al.*, 1997).

Die von mir beschriebene bakterielle Gemeinschaft entspricht in keiner Weise der natürlichen Gemeinschaft des Habitats Süßwasser. Sie ist vielmehr als Momentaufnahme des Gewässers zu einem bestimmten Zeitpunkt, den vorherrschenden Umweltbedingungen und den gewählten Kultivierungsbedingungen zu betrachten. Wie vielerorts beschrieben, gelten bisher 99.75 % aller Bakterien des Habitats Süßwasser als nicht kultivierbar (Jones, 1977; Amann *et al.*, 1995; Bartsch *et al.*, 1999).

Aber im Hinblick auf die folgende Form endogener Plasmidisolierung zur Bestimmung von Plasmidgehalt und Plasmideigenschaften war es notwendig, auf eine charakterisierte Gemeinschaft zurückgreifen zu können. Desgleichen konnten Versuche, welche sich mit dem horizontalen Gentransfer innerhalb oder zwischen spezifischen Gruppen beschäftigen, nur durch einen bekannten Donorstamm ermöglicht werden. Schließlich war es notwendig zur Isolierung der Bakteriophagen auf eine charakterisierte Gemeinschaft zurückgreifen zu können.

5.2 Bestimmung des Plasmidgehalts der bakteriellen Gemeinschaft

Von den 848 aus dem Süßwasser Bielefelder Teiche isolierten Bakterienstämmen wurden 600 auf ihren Plasmidgehalt untersucht. Der Anteil plasmidhaltiger Isolate in der Gemeinschaft betrug 12.5 %. Die Plasmide wurden unter Verwendung der Isolierungsmethode von Ramos-Gonzales *et al.* (1991) detektiert, durch welche Plasmide in Gram-positiven sowie Gram-negativen Bakterien beschrieben werden können. Da es sich bei dieser Methode um eine alkalische Lyse handelt war es nicht möglich, RNA-haltige sowie lineare Plasmide zu detektieren. Des weiteren ist diese Methode für sehr große (über 250 kb) und sehr kleine Plasmide (unter 1 kb) nicht sehr sensitiv, was vermuten läßt, daß der eigentliche Plasmidgehalt höher als 12.5 % liegt.

Über den endogen bestimmten Plasmidgehalt von Gemeinschaften natürlicher Habitats gibt es nur wenige Daten, wobei in den meisten Fällen die zugehörige bakterielle Gemeinschaft nicht näher charakterisiert wurde. In einer Untersuchung unserer Arbeitsgruppe wurden 3055 Isolate des Ackerbodens analysiert, davon waren 3.2 % plasmidhaltig (Battermann, 2002). In aquatischen Isolate liegt der Plasmidgehalt meist höher. So konnten z.B. im marinen Sediment unter 1086 Isolate 297 plasmidhaltige Vertreter detektiert werden, das 27 % entspricht (Sobecky *et al.*, 1997). Durch endogene Plasmidisolierung konnten in industriell belasteten marinen Gewässern Plasmidgehalte zwischen 16 % und 31 % bestimmt werden, wohingegen in Vergleichsproben aus naturbelassenen marinen Gewässern 10 % – 12 % plasmidhaltige Vertreter isoliert werden konnten

(Cook *et al.*, 2001). Innerhalb des Habitats Süßwasser wurde für eine bakterielle Gemeinschaft des Flusses Ely der Plasmidgehalt durch endogene Isolierung bestimmt. Er beträgt in einem unbelasteten Bereich 9.4 % (n=180) und in einem durch industrielle Nutzung belasteten Gebiet 15 % (n=220) (Burton *et al.*, 1982). 86 % aller durch Burton isolierten Plasmide besitzen eine ausreichende Größe, um für Funktionen der bakteriellen Konjugation zu kodieren. Diese Daten sind vergleichbar mit den oben beschriebenen Ergebnissen.

Innerhalb der hier beschriebenen bakteriellen Gemeinschaft gibt es einzelnen Gruppen, deren Mitglieder keine Plasmide tragen und Gruppen, für deren Mitglieder ein sehr hoher Plasmidgehalt detektiert werden konnte. Auffällig sind die zwölf Isolate der *E.coli* Population, welche ausnahmslos mehrere Plasmide enthalten und somit als multiplasmid Stämme bezeichnet werden können. Das Vorkommen von multiplasmid Isolaten ist sowohl für klinische Isolate (Laufs und Kleinmann, 1978; Burian *et al.*, 1997) als auch für Isolate aus natürlichen Habitaten beschrieben worden (z.B. in: Toranzo *et al.*, 1983; González and Carlton, 1980; Coplin *et al.*, 1981). Die Gattung *Pseudomonas* (140 Isolate) besitzt einen Plasmidgehalt von 5.7 % und für die Gattung *Aeromonas* (74 Isolate) konnte ein Plasmidgehalt von 13.5 % bestimmt werden. In alle anderen Isolate, mit Ausnahme von zwei der vier Isolate der Gattung *Pantoea* und einem Isolat der Gattung *Rahnella*, konnten keine Plasmide nachgewiesen werden.

Unter den 75 plasmidhaltigen Isolaten beinhalten 35 Vertreter je ein Plasmid, 21 zwei Plasmide, zehn drei Plasmide und in zehn Isolaten konnten mehr als 3 verschiedene Plasmide detektiert werden. Alle Isolate welche, mehr als drei Plasmide besitzen, gehören zur Art *E.coli*. Die größte Anzahl an Plasmiden, nämlich elf, befinden sich im Bakterienstamm M15 gefolgt von den Isolaten O221 und M101, welche jeweils zehn verschiedene Plasmide beinhalten. Keines der Isolate dieser Gattung besitzt weniger als zwei Plasmide. Auch die Arbeitsgruppe um Sherley (2003) konnte innerhalb einer Gruppe aus 223 Enterobacteriaceae, welche aus wilden Säugetieren isoliert wurden, 33 ausnahmslos plasmidhaltige *E.coli* Isolate identifizieren. Innerhalb dieser Isolate wurden bis zu sieben verschiedene Plasmide detektiert, wobei 45 % aller Plasmide kleiner als 16 kb und damit wahrscheinlich nicht konjugativ sind.

Insgesamt gesehen beinhalten die 600 untersuchten Isolate 180 Plasmide. Hiervon sind 102 Plasmide größer / gleich 30 kb und somit potentiell konjugativ. Kleinere Plasmide sind wahrscheinlich nicht zum DNA-Selbsttransfer befähigt, da die für den konjugativen Transfer benötigte Transferregion meist mehr als 15 kb in Anspruch nimmt (z.B. RP4 Pansegrau *et al.*, 1994).

Auffällig ist die hohe Anzahl an kleinen cryptischen Plasmiden in Isolaten der Art *E.coli*. Fast alle Isolate beinhalten bis zu sechs Plasmide (M15), welche eine Größe unter 4 kb besitzen. Kleine cryptische Plasmide sind schon für die verschiedensten Gattungen beschrieben worden; ihre Funktion konnte dagegen bis heute noch nicht geklärt werden (siehe Kapitel 5.2.4).

5.2.1 Die Plasmide der aus den Süßwasser isolierten Gemeinschaft gehören zu keiner bekannten Inkompatibilitätsgruppe

Alle 75 plasmidhaltigen Isolate wurden auf die Zugehörigkeit zu den Inc-Gruppen IncP, IncW, IncQ und IncN überprüft. Zu diesem Zweck wurden die Inc-spezifischen Primer von Götz *et al.* (1996) und Tietze (Robert Koch Institut Werningerode) verwendet. Zwei 30 kb große Plasmide aus den *Aeromonas*-Isolaten O50 und O85 ergaben mit IncQ Primern ein spezifisches PCR-Produkt. Die scheinbare Inkompatibilität mit pSunny und RSF1010 unterstreichen den Verdacht der IncQ Zugehörigkeit. Da aber mit verschiedenen IncQ spezifischen Primerpaaren divergente Ergebnisse erzielt wurden, müßte hier zur Klärung eine Sequenzierung der erhaltenen PCR-Amplifikate mit anschließendem Homologievergleich zu IncQ ähnlichen Sequenzen durchgeführt werden. Allerdings ist es ziemlich unwahrscheinlich, daß es sich bei Plasmiden dieser Größe um den IncQ-Typ handelt, da alle bisher beschriebenen Plasmide dieser Inkompatibilitätsgruppe höchstens eine Größe von 14 kb (pTC-F14) aufweisen (Rawlings und Tietze, 2001). Für pO50 konnte ein Selbsttransfer gezeigt werden. Bisher wurden allerdings keine konjugativen IncQ Plasmide beschrieben. Da IncQ-Plasmide nach dem *single strand displacement* Mechanismus replizieren (Rawlings und Tietze, 2001) wird vermutet, daß der Raum, welchen Gene für den konjugativen Plasmidtransfer einnehmen, zu groß ist, um eine Plasmidreplikation nach diesem Mechanismus zuzulassen.

Alle anderen untersuchten Plasmide (bis auf zwei Ausnahmen s.u.) zeigten keine Übereinstimmung zu den getesteten Inkompatibilitätsgruppen. Diese Ergebnisse zeigen erneut, daß mit den bisher bekannten Inkompatibilitätsgruppen nur ein kleiner Teil der Plasmiddiversität beschrieben werden kann.

Die Inc-spezifischen Sonden von Götz *et al.* (1996) und Couturier *et al.* (1988) wurden auf Basis von Sequenzen von klinischen Plasmiden aus Enterobakterien und Pseudomonaden entwickelt. Plasmide aus Süßwasserisolaten scheinen sich im Bezug auf ihr Replikationssystem und den darauf basierenden Inkompatibilitätsgruppen von Plasmiden aus klinischen Isolaten zu unterscheiden. Auch anderen Arbeitsgruppen war es bisher nicht möglich, die vorhandenen Inc-Gruppen auf Plasmide aus natürlichen Habitaten zu übertragen. So konnten Plasmide aus dem Boden (Drønen *et al.*, 1999; Battermann, 2002), aus marinen Habitaten (Dahlberg *et al.*, 1997; Cook *et al.*, 2001), aus der Weizenrhizosphäre (van Elsas *et al.*, 1998) und aus der Zuckerrübenrhizosphäre (Lilley *et al.*, 1996) keiner der bekannten Inkompatibilitätsgruppe zugeordnet werden. Allerdings war es möglich, exogen isolierte Plasmide aus dem Klärschlamm einer Bielefelder Kläranlage bekannten Inkompatibilitätsgruppen zuzuordnen (Drøge *et al.*, 2000).

Da die Vermutung bestand, daß es sich bei den *E.coli* multiplasmid Stämmen um Plasmide mit klinischem Hintergrund handeln könnte, wurden diese zusätzlich mit den von Couturier *et al.* (1988) entwickelten Sonden auf die Zugehörigkeit zu den Inc Gruppen IncFI, IncFII, com9, IncII, IncB/O, IncK, IncHII, IncL/M, IncT, IncU, IncX und IncY analysiert.

Mit Hilfe dieser Sonden konnte ein Plasmid aus den Isolaten O221 und M101 der IncI-Gruppe zugeordnet werden. Des weiteren konnte mittels einer IncY spezifischen Sonde ein Plasmid im Isolat M26 detektiert werden. Die Ergebnisse lassen vermuten, daß es sich bei den multiplasmid *E.coli* Isolaten um Stämme handelt, welche höchstwahrscheinlich nicht klinischen Ursprungs sondern schon lange Teil der natürlichen Süßwassergemeinschaft sind. Es wäre denkbar, daß sich die Plasmide

schon über einen längeren Zeitraum im Süßwasser befinden und sich dementsprechend verändert haben oder eher, daß aus der Wassergemeinschaft Plasmide durch HGT aufgenommen wurden. Auch innerhalb einer Gruppe bestehend aus 65 natürlichen coliformen-Isolaten konnten nur vier Isolate durch Inc-F Replikon-Sonden detektiert werden (Hales *et al.*, 1992).

5.2.2 Untersuchung des Gentransferpotentials durch Mobilisierung und Konjugation

Zur Untersuchung des Gentransferpotentials in der bakteriellen Gemeinschaft des Süßwassers wurden 19 der 75 plasmidhaltigen Isolate auf ihre Fähigkeit, das RSF1010 Derivat pSunny zu mobilisieren, überprüft. Durch die Mobilisierung dieses nicht konjugativen Plasmides sollte indirekt der Nachweis auf möglicherweise konjugative Plasmide erfolgen. Da der Transferapparat, welcher zum konjugativen Transfer von Plasmiden Gram-negativer Bakterien notwendig ist, eine gewisse Anzahl an Genen voraussetzt, wurden nur Isolate ausgewählt, deren Plasmide eine Größe über 30 kb besitzen und somit potentiell zur Konjugation befähigt sind.

Von den 19 getesteten Isolaten waren neun in der Lage, pSunny zu mobilisieren. Ein Transfer konnte nur in Rezipienten der γ -Proteobakteriengruppe beobachtet werden. Die Transferraten hängen von der Wahl des zu mobilisierenden Plasmides ab. Schon Willetts and Crowther (1981) konnten zeigen, daß das IncQ-Plasmid RSF1010 mit unterschiedlichen Frequenzen durch Plasmide verschiedener Inc-Gruppen mobilisiert wird. Dementsprechend beziehen sich die ermittelten Ergebnisse auf das Plasmid pSunny. Eine erneute Durchführung mit Plasmiden anderer Inc-Gruppen würde höchstwahrscheinlich abweichende Mobilisierungsfrequenzen liefern.

Ca. 50 % aller getesteten Isolate waren unter den gewählten Bedingungen nicht in der Lage, pSunny in einen der ausgewählten Rezipientenstämmen zu transferieren. Für eine erfolgreiche Mobilisierung von pSunny muß das koexistierende konjugative Plasmid für die Gene des Mpf-Komplex kodieren und dem Plasmid das *coupling*-Protein, welches die Verbindung zwischen dem Relaxosom und dem Mpf-Komplex herstellt, zur Verfügung stellen (Cabezón *et al.*, 1997). Die Mobilisierungsfrequenzen sind abhängig von der Interaktion des Relaxosoms mit dem *coupling*-Protein des Helfer Plasmides. Bei Plasmiden, welche für ihr eigenes *coupling*-Protein kodieren, resultiert die Transferfrequenz aus dem Zusammenspiel desselben mit dem Mpf-Komplex des konjugativen Plasmides (Cabezón *et al.*, 1994; 1997). Aber auch äußere Einflüsse wie Temperatur, das verwendete Medium, der pH-Wert und das Wachstumsstadium des Donors können sich auf die Transferraten auswirken (Rochelle *et al.*, 1989; Hill *et al.*, 1992; Smets *et al.*, 1993).

Durch *in vitro* Transposonmutagenese wurden Plasmide der Isolate O50 (*Aeromonas*), O60 (*Rahnella*) sowie M101 (*E.coli*) mit einem Kanamycinresistenzgen markiert. Auf diese Weise konnten verschiedene Mutanten für die 30 kb Plasmide der Stämme O50, O60 sowie für Plasmide mit einer Größe von 1.8 kb, 2.3 kb, 3.5 kb, 3.8 kb und 30 kb des Stammes M101 erhalten werden. Für alle markierten Plasmide konnte eine Mobilisierung aus dem Donorstamm S17.1 gezeigt werden. Selbst die kleinen Plasmide des Isolates M101 konnten in Stämme der γ -Proteobakteriengruppe mobilisiert und stabil etabliert werden. Die 30 kb Plasmide wurden auf die Fähigkeit zur selbstständigen Konjugation getestet. Bei den Plasmiden pO50 und pO60 konnte nur ein Transfer in Rezipienten der γ -Proteobakteriengruppe gezeigt werden. Es handelt sich demnach um *narrow host range* Plasmide.

Das *E.coli* Plasmid pM101.7 besitzt dagegen einen weiteren Wirtsbereich. Bei diesem Plasmid, welches in Rezipienten verschiedener Proteobakteriengruppen (α und γ) replizieren kann, handelt es sich dementsprechend um ein *broad host range* Plasmid.

Interessanterweise konnte für pO50 nur ein Transfer in den *E.coli* Stamm Ec294 nicht aber in C600 detektiert werden. Dieses Ergebnis ist verwunderlich, da beide Stämme zur *E.coli* K12 Gruppe gehören, wobei es sich bei Ec294 um einen restriktionsnegativen und bei C600 um einen restriktionspositiven Stamm handelt. Eine Variabilität der Transferraten, mit Rezipienten der gleichen Bakterienart, konnte allerdings auch schon für andere konjugative Plasmide beobachtet werden (Battermann, 2002; Rochelle *et al.*, 1989). Für das *Pseudomonas*-Plasmid pBI860.182 liegt die Konjugationsrate für den Rezipienten PaW340 (*Pseudomonas putida*) bei 2×10^{-4} , wohingegen für den Rezipienten KT2440 (*Pseudomonas putida*) nur eine Transferrate von 4×10^{-7} beschrieben werden konnte (Battermann, 2002).

5.2.3 Die Genorganisation des konjugativen Plasmid pM101.7 ähnelt der des Plasmides pBi1063 aus *Stenotrophomonas maltophilia*

Bei sehr vielen der bisher sequenzierten Plasmiden (z.B. RP4, R388, oder R751) handelt es sich um Resistenzplasmide, welche aus klinischen Stämmen isoliert wurden. Bis heute fehlen generelle Informationen über Plasmide, die aus natürlichen aquatischen und terrestrischen Habitaten isoliert wurden. Gerade in Bezug auf die Inkompatibilität, die Transfereigenschaften und ihre Funktionen sind Plasmide aus klinischen Isolaten nur bedingt mit denen aus natürlichen Habitaten vergleichbar. Um durch ein weiteres Beispiel einen kleinen Einblick in die Funktionen eines Plasmides natürlichen Ursprungs zu erhalten, wurden Teile des konjugativen Plasmides pM101.7 sequenziert.

Die Sequenzierung eines 23161 bp langen Teilstückes des konjugativen Plasmides pM101.7 ergab Homologien zu Genen der Tral- und Trall-Region konjugativer Plasmide sowie zu zwei Genen, deren abgeleitete Funktionen nicht direkt mit dem DNA-Transfer assoziiert sind.

Der erste sequenzierte Teilbereich kodiert für Trb-Proteine, deren Funktion in der *mating pair formation* besteht. Dieser Bereich ist Bestandteil der Trall-Region. Alle abgeleiteten Proteine dieses Gebiets weisen Homologien zu Proteinen des konjugativen Plasmides pBi1063 aus *Stenotrophomonas maltophilia* auf. Die beschriebene Anordnung der Transferegene ist identisch mit der für die Plasmide pBi1063 (Battermann, 2002) und pTi (Octopin) (Alt-Mörbe *et al.*, 1996) beschriebenen. Aus diesem Grund besteht die Vermutung, daß die restlichen *trb*-Gene von pM101.7 wie bei den eben genannten Plasmiden in der Anordnung *trbA* bis *trbE* und *trbJ* vorliegen. Im Gegensatz dazu sind die *trb*-Gene innerhalb der Trall-Region von RP4 fortlaufend von *trbA* bis *trbO* angeordnet (Lessl *et al.*, 1992).

Nach den Genen der Trall-Region folgt ein *traB*-Gen (dessen Orientierung allerdings im Vergleich zu RP4 gegenläufig ist) sowie ein Gen, welches für eine putative Resolvase kodiert. Der Vergleich mit homologen Resolvasen zeigt, daß das Protein stark verkürzt ist. Da ca 50% des C-terminalen Anteils fehlen, ist dieses Protein wahrscheinlich nicht mehr funktionsfähig. Außerdem sind in diesem Bereich, die Gene *parB*, *mpr* und *osa* lokalisiert. Interessant ist hierbei das *osa*-Gen, welches für ein *Oncogenic suppression activity* Protein kodiert. Möglicherweise wird in den multiplasmidhaltigen Isolaten durch die Inhibition des Transfers koexistierender konjugativer Plasmide die eigene

Transferrate positiv beeinflusst, indem z.B. die gebildete Membranpore nur von dem ausführenden Plasmid genutzt werden kann.

Am Ende des sequenzierten Teilstücks sind Gene lokalisiert, deren putative Proteine für Funktionen des Dtr kodieren, welche Bestandteil Tral-Region sind. Die *tra*-Gene liegen in der Anordnung *traE*, *traC*, *traF*, *traG* und *tral* vor, wobei zwischen den Genen *traC* und *traF* ein Gen liegt, dessen Produkt Homologien zu einer lytischen Transglycosylase besitzt. Auch bei dem Plasmid pBi1063 aus *Stenotrophomonas maltophilia* (Battermann, 2002) liegen diese Gene in der selben Reihenfolge vor.

Wie bei vielen *broad host range* Plasmiden beschrieben, minimiert pM101.7 durch eigene Gene für Primase und Topoisomerase seine Abhängigkeit von wirtskodierten Enzymen für die Initiation der Replikation. Für plasmidkodierte Primasen konnte gezeigt werden, daß sie bei der *host range* des Transfers eine Rolle spielen und die Transferrate bei der Konjugation erheblich steigern können (Narahara *et al.*, 1997; Merryweather *et al.*, 1986; Nash und Krishnapillai, 1988). Unter anderem könnte dies den weiten Wirtsbereich und die hohen Konjugationsraten von pM101.7 erklären.

Der GC-Gehalt des Teilstückes liegt mit 62.6 % über dem durchschnittlichen GC-Gehalt von 50 % bei *E.coli* Isolaten. Dies spricht für einen Interspezies-Gentransfer dieses Plasmides innerhalb der Gemeinschaft.

5.2.4 Ist das Plasmid pM101.1 eine Form von *selfish* DNA?

Die Sequenzierung des kleinsten Plasmides des Bakterienstammes M101 ergab eine Größe von 1823 Basenpaaren. Auf dem Plasmid konnte ein *repA*-Gen, welches für die selbstständige Replikation unerlässlich ist detektiert werden.

Bei pM101.1 handelt es sich um ein mobilisierbares Plasmid, für das eine stabile Replikation in hoher Kopiezahl in verschiedenen Gattungen γ -Proteobakteriengruppe gezeigt werden konnte. Versuche eines *curings* durch Hitze, Ethidiumbromid oder Elektroporation konnten nicht erfolgreich durchgeführt werden. Dies korrespondiert mit Daten von Astill (Astill *et al.*, 1993) und Burian (Burian *et al.*, 1997), welche ebenso nicht in der Lage waren, ein *curing* kleiner Plasmide durchzuführen. Die Arbeitsgruppe um Pickett beschreibt sogar eine Erhöhung der Kopiezahl eines kleinen Plasmides aus *Chlamydia trachomatis*, welches auf die Stimulation der Aktivität des plasmidkodierten Rep-Proteins als Folge des durch Stresses induzierten chemischen *curing* zurückgeführt wird (Pickett *et al.*, 2005). Diese Resultate lassen vermuten, daß auch der spontane Verlust von pM101.1 in seinem natürlichen Habitat Süßwasser sehr gering ist.

Kleine cryptische Plasmide sind bisher für verschiedene Bakteriengattungen und Habitate wie z.B. *Shigella sonnei* (Croft *et al.*, 1983), *Lactobacillus plantarum* (Skaugen, 1989), *Lactobacillus curvatus* (Klein *et al.*, 1993), *Neisseria gonorrhoeae* (Sarandopoulos and Davies, 1993) und *Corynebacterium renale* (Nath and Deb, 1995) beschrieben worden. Die Funktion dieser kleinen Plasmides ist bis heute unklar. Eine Hypothese besagt, daß diese kleinen Plasmide früher möglicherweise für funktionelle Proteine kodiert haben, deren Gene nach dem Wegfall des ursprünglichen Selektionsdruckes verloren wurden. Alternativ könnten diese Plasmide als Reservoir dienen um in Zukunft über Mechanismen wie homologe Rekombination oder der Insertion von Transposons Gene aufzunehmen (Astill *et al.*, 1993). Andererseits werden diese Plasmide aber auch als *selfish*-DNA beschrieben, deren einzige Funktion ihre eigene Replikation in hohen Kopiezahlen ist (Doolittle and Sapienza, 1980). Das Vorkommen

dieser Plasmide als Bestandteil von multiplasmid *E.coli* Stämme läßt vermuten, daß eine molekulare Symbiose zwischen unterschiedlichen Plasmiden verschiedener Größen und Funktionen bestehen könnte.

5.2.5 Haben einzelne Untergruppen einer bakteriellen Gemeinschaft ein höheres Potential im horizontalen Gentransfer?

Die bakterielle Gemeinschaft des Süßwassers konnte, dank der im Rahmen des BMBF Projektes „Diversität und Gentransfer in denitrifizierenden Bakteriengemeinschaften“ beschriebenen bakteriellen Gemeinschaft des Habitats Ackerboden im Bezug auf den Plasmidgehalt und die Plasmidverteilung innerhalb der einzelnen Gattungen, miteinander verglichen werden (Lin, 1998; Battermann, 2002). In der Literatur gibt es nur wenige Studien, welche eine bakterielle Gemeinschaft durch eine kulturabhängige Methode ohne die Ausübung eines selektiven Drucks beschreiben. Des weiteren sind bis heute keine ausführlichen Daten über den durch endogene Isolierung bestimmten Plasmidgehalt innerhalb einer charakterisierten Gemeinschaft des Habitats Süßwasser verfügbar.

Die beiden charakterisierten Gemeinschaften aus den Habitaten Süßwasser und Ackerboden unterscheiden sich in Bezug auf ihre bakterielle Zusammensetzung grundlegend. Lediglich die Präsenz der Gattung *Pseudomonas* als Gruppe mit der größten Abundanz (70.8 % Boden / 46 % Süßwasser) verbindet sie. In beiden Gemeinschaften fiel dagegen eine zahlenmäßig kleine Gruppe auf, welche zu 100 % plasmidhaltig ist. Im Habitat Boden ist dies eine kleine Population einer *Paracoccus* Spezies mit 14 Isolaten, was 2.7 % der Gemeinschaft ausmacht, sowie die 12 Isolaten einer *E.coli* Population des Habitats Süßwasser, was 4 % entspricht.

Die Isolate dieser beiden Populationen sind darüber hinaus nicht nur ausnahmslos plasmidhaltig, sie beherbergen außerdem eine Vielzahl verschiedener Plasmide und zählen somit zu den multiplasmid Stämmen. Alle Isolate der Gattung *Paracoccus* beinhalten ein 23 kb großes Plasmid sowie diverse größere und kleinere Plasmide (Battermann *et al.*, 2002). In den Isolaten der *E.coli* Gruppe des Habitats Süßwasser konnten wie oben beschrieben bis zu 11 verschiedene Plasmiden detektiert werden.

Ein Bakterium mit einer hohen Anzahl an Plasmiden mit unterschiedlicher Größe, Kopiezahl und genetischer Ausstattung ist möglicherweise in der Lage seine Fitneß zu erhöhen (Kado, 1998). Dies kann beispielsweise die Adaption an sich ändernde ökologische Parameter, oder die Erschließung einer neuen ökologischen Nische sein, welches möglicherweise die Energiekosten für Plasmidreplikation und Stabilität aufwiegt. Ein hoher Plasmidgehalt verleiht bessere Chancen im horizontalen Gentransfer und bietet dadurch bedingt eine bessere Ausgangsposition innerhalb der weiteren Evolution der Population. So kann möglicherweise auch die Adaption des Enterobakteriums *E.coli* an das Habitat Wasser erleichtert werden.

Die Ungleichverteilung der Plasmide in den Untergruppen der Gemeinschaft wirft die Frage auf, ob einige Gruppen mehr oder weniger am horizontalen Gentransfer beteiligt sind und ob Interspezies-Gentransfer nicht sehr selten ist. Würde ein reger Transfer unter den Gruppen stattfinden, müßte der Plasmidgehalt sich in allen Gruppen angleichen. Andererseits ist zu beachten, daß die Gemeinschaft sich ständig neu zusammensetzt und das Habitat Wasser aus verschiedenen Nischen besteht.

In Isolaten unterschiedlicher Arten oder Gattungen konnten keine identischen (oder auch nur sehr ähnliche) Plasmide nachgewiesen werden. Die Isolate der multiplasmid Stämme enthalten alle z.T. gleiche und unterschiedliche Plasmide. Dies ist ein deutliches Zeichen eines regen HGT. Der viel beschriebene „Transkingdomsex“ (Stachel und Zambryski, 1989; Sikorski *et al.*, 1990), nach dem sich der Plasmidgehalt der Gemeinschaft gleichmäßig über die Gemeinschaft verteilen müßte, scheint hier eher eine Ausnahme zu sein. Dies korreliert auch den Ergebnissen der Mobilisierungs- und Konjugationsexperimente, in denen überwiegend *narrow host range* Plasmide beschrieben werden konnten.

Weiterhin stellt sich die Frage, inwieweit die hohe Anzahl an Plasmiden und das Vorkommen ausschließlich plasmidhaltiger Vertreter innerhalb einer Gruppe auf ein erhöhtes Gentransferpotential innerhalb dieser Gattungen schließen läßt. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Isolaten um potentere Rezeptoren in denen sich Plasmide leichter Etablieren können. Eventuell ist dieser erhöhte Gentransfer auch mit einer „Symbiose“ der Plasmide oder mit Helferfunktionen zu erklären. Andererseits bietet die geringe Dichte der Bakterien im Habitat Süßwasser nur begrenzte Möglichkeiten für einen intraspezies Transfer. Dies läßt vermuten, daß die multiplasmid-Stämme aus anderen ökologischen Nischen stammen könnten, in denen durch eine höhere Zelldichte –zum Beispiel *E.coli* im Darm warmblütiger Tiere- höhere Konjugationsfrequenzen ermöglicht werden.

5.3 Isolierung von Bakteriophagen

Mittels der gewählten Methode zur Detektion von Bakteriophagen aus Gewässerproben konnten 39 Phagen, für Wirte verschiedener Bakteriengattungen isoliert werden. Natürlich wurde durch die gewählte Methode zur Anreicherung der Bakteriophagen durch ein spezifisches Wirtsbakterium nur ein kleiner Teil der natürlichen Diversität isoliert. Unter Umständen konnten durch die gewählte Art nur die virulentesten Phagen der heterogenen Population detektiert werden. Phagen, welche nur eine geringere *burst size* besitzen, wurden möglicherweise nur in geringerem Maße isoliert. Auch könnten durch die kleinen Probenvolumina nicht alle –sich in der Gemeinschaft befindlichen Bakteriophagen- detektiert werden. Aus diesem Grund haben z.B. Primrose und Day (1977) oder Seely und Primrose (1982) bis zu 200 Liter Süßwasser filtriert um daraus Phagen zu isolieren.

Die Zusammensetzung der beschriebenen Phagen ist zusätzlich abhängig von der zum Zeitpunkt der Isolierung bestehenden bakteriellen Gemeinschaft. Sie entspricht unter Umständen nicht den normalen Verhältnissen in diesem Habitat. Indes konnte der Bakteriophage Φ O272 selbst nach 1 ½ Jahren noch in dem untersuchten Gewässersystem detektiert werden, was für eine stabile Etablierung dieses Phagen als Bestandteil der natürlichen Gemeinschaft in diesem Habitat spricht.

Da innerhalb der Sequenzierung bakterieller Genome in letzter Zeit eine hohe Anzahl an inserierten Phagen-Genomen und Phagen ähnlichen Genen beschrieben werden konnten –allein im *E.coli*-Isolat O157 konnten 18 Prophagen oder Prophagen-ähnliche Strukturen ermittelt werden (Ohnishi *et al.*, 2001)- wurden auch temperente Phagen, welche sich in Form von Prophagen in lysogenen Bakterienisolaten befinden isoliert und charakterisiert.

Für natürliche nährstoffarme Gewässer wird postuliert, daß der größte Teil der Phagen Infektionen nicht lytisch sondern lysogen ist, wobei der Phage als Prophage in Synchronität mit den Genen des Wirtsbakteriums oder in einem unabhängigen Status als Plasmid repliziert (Ogunseitan *et al.*, 1992).

Auch für 28 Isolate aus dem Golf von Trieste konnte gezeigt werden, daß 71 % lysogen und 51 % sogar polylysogen sind (Stopar *et al.*, 2004). Diese Daten übertreffen sogar die Ergebnisse von Jiang und Paul (1998 b), nach denen 24 – 64 % aller Isolate aus verschiedenen Habitaten induzierbar sind. Ein Vorteil der lysogenen Entwicklung ist die Unabhängigkeit vom Bakterientiter (Wiggins und Alexander, 1985), welcher im Habitat Wasser besonders niedrig ist. Für Phagen von *Salmonella typhi* konnte ermittelt werden, daß eine Infektion erst vonstatten geht, wenn der Bakterientiter höher als 10^4 ist (Anderson, 1957). Dies wird allerdings durch Arbeiten von Kokjohn *et al.* (1991) nicht bestätigt. Innerhalb seiner Versuchen konnte eine Infektion mit virulenten sowie temperenten Phagen von *Pseudomonas aeruginosa* auch bei geringen Zelldichten nachgewiesen werden. Ein weiterer Vorteil der lysogenen Entwicklung ist die geringe Halbwertszeit (12-24 Stunden) freier Bakteriophagen innerhalb des Habitats Süßwasser (Yates *et al.*, 1985; Miller, 1998).

Unter Verwendung aller *E.coli* und einem Großteil aller Isolate der Gattung *Aeromonas* war es möglich, mittels UV-Induktion vier Prophagen zu isolieren. Versuche, Prophagen aus Isolaten der Art *Brevundimonas vesicularis* zu induzieren, blieben erfolglos. Diese Ergebnisse entsprechen nicht der momentan herrschenden Meinung welche besagt, daß der Großteil aller bakteriellen Isolate temperente Bakteriophagen in Form von Prophagen beherbergt (Schickelmaier *et al.*, 1998; Ohnishi *et al.*, 2001). In einer Studie mit verschiedenen Isolaten der Gattungen *Salmonella* und *E.coli* konnte die spontane Induktion von Prophagen für den Großteil aller getesteten Isolate gezeigt werden. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß auch die von mir untersuchten Isolate lysogen für temperente Bakteriophagen sind, welche sich nur durch die von mir gewählte Methode zur Induktion nicht in den lytischen Zyklus überführen lassen. Wahrscheinlicher ist allerdings, daß unter der Vielzahl der beschriebenen Isolate lediglich nicht der richtige Wirt für einen möglicherweise induzierten Prophagen ausgewählt wurde. Die gewählten Wirtsbakterien können andererseits bei weiter verbreiteten Prophagen bereits immun sein.

Für *Pseudomonas aeruginosa* konnte gezeigt werden, daß 70 % aller Isolate aus verschiedenen Habitaten Phagen spezifische DNA-Sequenzen beinhalten, welche durch eine Sonde -bestehend aus DNA des Bakteriophagen Φ UT1- detektiert werden konnten (Ogunseitán *et al.*, 1990; 1992; Miller, 1998). Allerdings ließen sich in diesem Fall nur 3 % aller potentiellen Prophagen durch Mitomycin C induzieren, was dafür spricht, daß verwandte Phagen nicht notwendigerweise unter denselben Bedingungen induziert werden können (Ogunseitán *et al.*, 1992). Mit einer für den Prophagen Φ O18P spezifischen Sonde konnte bei Hybridisierungen mit anderen Bakteriophagen und Isolatn der Gattung *Aeromonas* keine Homologie detektiert werden, was dafür spricht, daß dieser Phage möglicherweise nicht besonders oft den lytischen Zyklus einschlägt oder nur in sehr geringen Maße in der Gemeinschaft existiert.

Es wären natürlich DNA-Sonden zur Detektion von Prophagen wünschenswert. Diese sind aber zur Zeit nicht verfügbar und auch aufgrund der hohen Diversität der Wirte und der damit verbundenen „codon usage“ und der hohen Diversität der Phagen nicht zu erwarten. Eventuell können weitere Sequenz-Daten zur Sondenentwicklung für die Detektion bestimmter verwandter Phagen führen (z.B. Lambdaide bei *E.coli*).

5.3.1 Morphologische Einordnung der Bakteriophagen durch Elektronenmikroskopie

Alle 19 elektronenmikroskopisch untersuchten Bakteriophagen gehören zu den geschwänzten Phagen und wurden der Ordnung *Caudovirales* zugeordnet. Hiervon entfallen acht (42%) auf die *Siphoviridae* Familie, sechs (32%) auf die Familie der *Podoviridae* und fünf auf die Familie der *Myoviridae* (26%). Bis 2003 wurden ca. 5100 Bakteriophagen elektronenmikroskopisch untersucht, wobei 96 % aller Phagen zur Ordnung *Caudovirales* zugeordnet werden konnten (Ackermann, 2003). Nach diesen Daten gehören 25.1 % zur Familie der *Myoviridae*, 14.1 % zu den *Podoviridae* und 60.8 % wurden der Familie der *Siphoviridae* zugeordnet. Trotz der geringen Stichprobe liefern die Daten der aus dem Süßwasser isolierten Phagen ähnliche Befunde.

Andere Ergebnisse erbrachte eine Studie, innerhalb der in Wasserproben des Golfs von Trieste 400 Bakteriophagen durch Transmissions-Elektronenmikroskopie morphologisch bestimmt wurden (Stopar *et al.*, 2004). Hierbei ergab sich, daß 74 % dieser Phagen nicht geschwänzt sind und somit nicht der Ordnung der *Caudovirales* zuzuordnen sind. Von den restlichen geschwänzten Phagen gehören 12 % zur Familie der *Myoviridae*, 3 % zu den *Siphoviridae* und 11 % wurden der Familie der *Podoviridae* zugeordnet. Andererseits erwiesen sich 2/3 aller temperenten Phagen (aus 28 Isolaten) als geschwänzt. Ähnliche Ergebnisse konnten auch für Bakteriophagen aus verschiedenen terrestrischen Habitaten beschrieben werden (Williamson *et al.*, 2005).

Diese Daten suggerieren eine Differenz in der Morphologie zwischen Phagen kultivierbarer Wirte und solcher die kulturunabhängig isoliert wurden.

5.3.2 Charakterisierung der *B.vesicularis* sowie der *E.coli* Bakteriophagen-gruppe

Innerhalb der bakteriellen Gemeinschaft waren die Bakteriophagen der zwei Populationen von *E.coli* sowie *B.vesicularis* von besonderem Interesse. Für die mit neun Isolaten zahlenmäßig relativ kleine *B.vesicularis* Gruppe konnte die hohe Anzahl von sieben Bakteriophagen isoliert werden. Es ist außerdem das erste Mal, daß für diese Art Bakteriophagen beschrieben werden konnten (Beilstein und Dreiseikelmann, im Druck). Die *E.coli* Gruppe beinhaltet dagegen eine hohe Anzahl mobilisierbarer sowie zum Teil konjugativer Plasmide. Aus Isolaten dieser Gruppe konnten zwei temperente und aus Gewässerproben zusätzlich fünf weitere spezifische Phagen isoliert werden.

Die sieben *B.vesicularis* Bakteriophagen lassen sich in zwei Gruppen aufteilen: Die Phagen Φ O272, Φ M164 und Φ S121c, welche von den Stämmen O272, M164 und S121c isoliert wurden, bilden kleine Plaques. Sie gehören zur Phagenfamilie der *Siphoviridae*, besitzen alle kohäsive DNA-Endstrukturen und zeigen ähnliche, aber nicht identische Spaltungsmuster nach der Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen. Weiterhin weisen sie nach Hybridisierungen eine Homologie über die gesamte Länge des Genoms auf, was die enge Verwandtschaft zwischen diesen drei Phagen bestätigt, welche interessanterweise aus drei verschiedenen Teichen isoliert wurden.

Die anderen vier Bakteriophagen Φ O283, Φ O283.6, Φ O283.12 und Φ O283.15, welche mit Hilfe des Stamm O283 isoliert wurden, bilden auf ihren Wirten große Plaques und gehören morphologisch zur Familie der *Podoviridae*. Ihr Wirtsbereich ist nicht so ähnlich wie bei den Phagen der vorherig

beschriebenen Gruppe. Durch Restriktionsspaltungen und Hybridisierungen konnte keine Verwandtschaft zwischen den Bakteriophagen dieser Gruppe detektiert werden. Die Phagen Φ O283.6 und Φ O283.15 sind identisch. Allerdings sind die DNAs dieser Phagen alle terminal redundant aber nicht zyklisch permutiert. Trotz vieler Gemeinsamkeiten ist diese Gruppe in sich immer noch ziemlich divers.

Für alle sieben Bakteriophagen, welche ausnahmslos eine Größe von ca. 37 kb besitzen, konnte weder eine generelle noch eine Plasmidtransduktion nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Hypothese der Arbeitsgruppe um Zimmer (2003), wonach nur terminal redundante und zyklisch permutierte Phagen in der Lage sind, zu transduzieren.

Die sieben Bakteriophagen der *E.coli* Gruppe sind in der Lage, sich auf diversen *E.coli* C und K Laborstämmen zu vermehren. Umgekehrt war es nicht möglich *E.coli* spezifische Phagen wie λ und P1 auf *E.coli*-Umweltisolaten anzureichern. Für die Phagen Φ M101.11 und Φ O221.15 konnte durch Restriktionsspaltungen gezeigt werden, daß sie ähnlich aber nicht gleich sind. Für beide konnte eine lytische Vermehrung auf den Isolaten O221 und M101 gezeigt werden. Alle anderen Bakteriophagen konnten innerhalb der verschiedenen *E.coli* Süßwasserisolate nur auf dem Stamm vermehrt werden, von dem sie ursprünglich isoliert wurden. Bei dem temperenten Phagen Φ M25K wurden auf molekularer sowie auf morphologischer Ebene hohe Homologien zu Lambda detektiert, er gehört also in die Gruppe der Lambdoiden Phagen (Diplomarbeit Kristina Ehrlich, 2005). Die Bakteriophagen Φ M2, Φ M101.11 und Φ O221.15 sind in der Lage Plasmide zu transduzieren. Für die beiden letzteren, welche terminal redundante sowie zyklisch permutierte DNA-Enden besitzen, konnte zusätzlich eine generelle Transduktion eines chromosomalen Markergens bewiesen werden.

Zusammenfassend gesehen besitzen die Phagen der *E.coli*-Gruppe morphologisch sowie genetisch keine Gemeinsamkeiten, indizieren aber verglichen mit den anderen Gruppen ein erhöhtes Potential für den horizontalen Gentransfer durch Transduktion.

5.3.3 Bestimmung des Gentransferpotentials durch Transduktion

Lange Jahre wurde die Transduktion als Mechanismus innerhalb des horizontalen Gentransfers nur wenig beachtet. Dies mag einerseits an der Notwendigkeit einer charakterisierten bakteriellen Gemeinschaft zur Isolierung von Bakteriophagen liegen, andererseits an dem zu dieser Zeit vorherrschenden Interesse am konjugativen Plasmidtransfer. Bis heute existieren kaum Arbeiten, welche sich mit dem horizontalen Gentransfer durch Transduktion innerhalb einer natürlichen Gemeinschaft beschäftigen. Allerdings indizieren Daten, welche sich mit transduzierenden Phagen einer eng umrissenen Bakteriengruppe oder Gattung beschäftigen, ein sehr hohes Gentransferpotential. So konnte z.B. für 43 von 46 temperenten Phagen der Gattung *Salmonella typhimurium* eine generelle und eine Transduktion des Plasmides pBR325 nachgewiesen werden, was 93.5 % entspricht (Schickelmaier und Schmieger, 1995).

Die hier beschriebenen Beispiele transduzierender Bakteriophagen beziehen sich auf die bakterielle Gemeinschaft des Habitats Süßwasser. Von den 43 aus Süßwasserproben oder aus lysogenen Isolaten induzierten Bakteriophagen wurden 18 im Verlauf dieser Arbeit auf die Fähigkeit, Plasmide und oder chromosomale Markergene zu transduzieren, untersucht. Getestet wurden hierbei Phagen von Wirten der Gattungen *Aeromonas*, *Brevundimonas*, *Escherichia* und *Pseudomonas*. Für fünf der

18 Phagen konnte indirekt eine Plasmidtransduktion des Plasmides pSunny durch Amplifikation der im Kapsid verpackten Plasmid-DNA gezeigt werden. Es handelt sich hierbei um die Bakteriophagen Φ O221.15, Φ M101.11 und Φ M2 mit Wirten der *E.coli*-Isolate sowie um die Phagen Φ S118 und Φ M144 mit Wirten der Gattung *Pseudomonas*. Nur für die beiden zuletzt genannten Phagen war es möglich, eine Transduktionsrate zu bestimmen, welche für Φ S118 bei 1.5×10^{-9} und für Φ M144 bei 2.3×10^{-8} liegt. Normalerweise liegen Transduktionsraten zwischen 10^{-5} und 10^{-7} pro aktiven Phagen (Ruhfel *et al.*, 1984; Weiss *et al.*, 1994; Jiang und Paul, 1998).

Da die Transduktionsfrequenzen sich als sehr niedrig erwiesen, sollte durch Klonierung von Bakteriophagen-DNA Fragmenten in die zu transduzierenden Plasmide die Transduktionsrate gesteigert werden. Für den Phagen Φ 11 konnte gezeigt werden, daß sich die Transduktionsrate des Plasmides pT181 von 10^{-7} auf einen Wert, welcher fast mit den Plaque bildenden Titern gleichzusetzen ist, durch Klonierung von Segmenten seiner eigenen DNA steigern läßt (Novick *et al.*, 1986); hierbei scheint es unerheblich zu sein, ob das klonierte Fragment die *pac-site* des Phagen beinhaltet. Auch Jiang und Paul (1998) beschreiben eine Erhöhung der Transduktionsfrequenzen durch Rekombination durch die Präsenz von Gensequenzen, welche Bakteriophagen-Genen entsprechen.

Die Insertion der Bakteriophagen-DNA erfolgte in den Vektor pBBR122, wobei jeweils Segmente mit einer Größe zwischen 2 kb und 5 kb ausgewählt wurden. Die Frequenz der genetischen Rekombination hängt von der Länge und der Signifikanz der Homologie ab, wobei die minimale Länge mit 20 bis 74 bp definiert ist (Watt *et al.*, 1985). Vorversuche konnten zeigen, daß das kleine Plasmid pBBR122 (5304 bp) mit gleicher Frequenz wie das größere Plasmid pSunny (11450 bp) transduziert wird, was die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Novick (1986) bestätigt. Diese besagen, daß kleine Plasmide mit der gleichen Rate wie große an eine Rezipientenzelle weitergegeben werden. Phagen sind nur in der Lage, einzelne DNA-Segmente zu verpacken, welche in ihrer Größe entweder ihrem eigenen Genom entsprechen oder im Fall von kleineren Plasmiden als Konkatemere vorliegen. Daraus folgt, daß die Transduktionsfrequenz von der Kopiezahl der Plasmide ihrer Befähigung, Konkatemere auszubilden, und der Fähigkeit der Phagen, diese zu verpacken abhängig ist.

Die Ergebnisse der Plasmid-Transduktionstests, welche mit den Phagen Φ M144, Φ S118, Φ M2 und Φ M101 durchgeführt wurden, zeigen keine Bestätigung der Daten von Novick *et al.* (1986). Zwar konnte die Transduktionsfrequenz im Falle des Phagen Φ M144 und dem Plasmid pBBRM144.23 um vier Zehnerpotenzen gesteigert werden, jedoch konnten für andere Hybridplasmide mit inserierter DNA dieses Phagen und des Bakteriophagen Φ S118 diese Ergebnisse nicht bestätigt werden. Eine hohe Homologie zwischen dem zu transduzierenden Plasmid und der Phagen-DNA alleine scheint also nicht ausreichend zu sein, um die Transduktionsrate zu steigern. Möglicherweise befindet sich im Falle von pBBRM144.23 auf dem Hybridplasmid die *pac-site* des Bakteriophagen, welches zu einer Steigerung der Frequenz geführt haben könnte. Auch für den *Lactococcus*-Phagen c2 konnte gezeigt werden, daß nicht alle Phagen-DNA Sequenzen gleichermaßen in der Lage sind, die Transduktionsfrequenz zu steigern. Für c2 konnte nur unter Verwendung eines die *cos*-Region des Phagen beinhaltenden Hybridplasmides, eine Steigerung der Transduktion gezeigt werden (Lubbers *et al.*, 1994). Gleiche Ergebnisse sind für die Bakteriophagen R4, SP02 und λ beschrieben (Morino *et al.*, 1986; Marrero *et al.*, 1981; Shimada *et al.*, 1978). Möglicherweise fungiert hier die *cos*-Region als

Substrat für die Terminase und erleichtert so die *Packaging* Reaktion. In Gegensatz hierzu stehen Arbeiten der Gruppen um Hertwig und Raya sowie Orbach, welche besagen, daß die *cos*-Region der Phagen PY54 und Φ adh sowie P22 von *Yersinia enterocolitica*, *Lactobacillus gasseri* und *Salmonella thyphimurium* nicht als wirksames *Packaging* Signal dienen (Hertwig *et al.*, 2003; Raya und Klaenhammer, 1992; Orbach und Jackson, 1982). Zusammenfassend gesehen scheint es also von einzelnen Bakteriophagen abhängig zu sein, ob und durch welche DNA-Sequenz sich die Plasmid Transduktionsfrequenz steigern läßt.

Zur Optimierung der Transduktion wären noch weitere Ansätze -wie z.B. Bestrahlung der transduzierenden Lysate mit UV-Licht- denkbar. Diese Methode erhöht die Transduktionsrate möglicherweise durch eine Stimulation der Rekombination in der Rezipientenzelle um das 10 bis 50-fache (Miller, 1992). Des weiteren konnte gezeigt werden, daß suspendierte (Boden-)Partikel die Transduktionsraten erhöhen, indem sie den Phagen und ihren Wirte einen näheren Kontakt zueinander ermöglichen (Ripp und Miller, 1995). Ebenso sollte hierbei beachtet werden, daß selbst für einen gut untersuchten Laborphagen wie P1 ermittelt wurde, daß nur 10 % der transduzierenden DNA, welche in die Rezipientenzelle injiziert wird, sich in dieser stabil etablieren kann (Sandri und Berger, 1980).

Für alle Bakteriophagen, welche in der Lage sind, Plasmide zu transduzieren (mit Ausnahme des Phagen Φ M2, für den kein geeigneter Wirt vorhanden war) konnte eine generelle Transduktion chromosomaler Markergene gezeigt werden. Hierbei konnten wieder nur für die Phagen Φ M144 und Φ S118 der Gattung *Pseudomonas* Transduktionsraten von 8×10^{-10} und 7×10^{-10} ermittelt werden. Wenn man beachtet, daß nicht alle Gene mit der gleichen Häufigkeit an eine Rezipientenzelle weitergegeben werden, und die Transduktionsfrequenz daraus bedingt um mehrere Zehnerpotenzen variieren kann (Saye *et al.*, 1990; Ripp *et al.*, 1994), erweisen sich die ermittelten Werte für Plasmid und generelle Transduktion als nahezu identisch, was die Ergebnisse der Gruppe um Saye (1990) bestätigt, in denen gezeigt wurde, daß die Transduktionsraten für Plasmide und ein chromosomales Markergen gleich sind.

Zusammenfassend erweist sich die mit der von mir gewählten Methode ermittelte Anzahl der transduzierenden Bakteriophagen als sehr gering. Für nur fünf von 18 Phagen aus vier verschiedenen Gattungen konnte ein DNA-Transfer in eine Rezipientenzelle oder ein indirekter Nachweis der Transduktion erbracht werden. Möglicherweise müssen hier für jeden einzelnen Phagen die jeweiligen Methoden optimiert werden. Allerdings bestätigen diese Ergebnisse aber auch die Hypothese der Gruppe um Zimmer (2003), welche besagt, daß transduzierende Phagen immer in Korrelation mit terminal redundanten sowie zyklisch permutierten DNA-Endstrukturen stehen. Nur diese Phagen können aufgrund des „*headful Packaging*“ ohne sequenzspezifische Termination fremde DNA in die Kapside einpacken. Für die *Brevundimonas vesicularis* Bakteriophagen Φ O283.6 und Φ O283.12 sowie die *Aeromonas media* Phagen Φ O58 und Φ S26, welche terminal redundante, nicht aber zyklisch permutierte DNA-Enden besitzen, konnte keine Transduktion gezeigt werden; wohl aber für die beiden *E.coli* Bakteriophagen Φ M101 sowie Φ O221, deren DNA terminal redundant und zyklisch permutiert ist. Des weiteren sind die Phagen bei denen kohäsive DNA-Enden detektiert werden konnten aufgrund ihrer sequenzspezifischen Verpackung, ausgehen von den *cos-sites*, nicht in der Lage, zu transduzieren.

Für temperente Phagen aus klinischen *E.coli*-Isolaten konnte gezeigt werden, daß diese vorwiegend Lambda ähnlich sind und dadurch bedingt Genome mit kohäsive DNA-Enden besitzen (Schickelmaier *et al.*, 1998). Dies korreliert mit der Induktion des Lambda ähnlichen temperenten Phagen (Φ M25K) aus dem *E.coli* Isolat M25. Alle weiteren durch Anreicherungskulturen aus dem Süßwasser gewonnenen *E.coli* Bakteriophagen entsprechen nicht dem Lambda-Typ und sind teilweise transduzierend, was auf einen DNA-Verpackungsmechanismus nach dem *headful*-Mechanismus schließen läßt.

Wenn man die fünf transduzierenden Bakteriophagen und ihre Wirte betrachtet, fällt auf, daß es Wirtsbakterien gibt, für die zwar mehrere Phagen darunter aber keine transduzierenden ermittelt werden konnten (wie z.B. *Brevundimonas* und *Aeromonas*) wohingegen für andere Wirte (*Pseudomonas* und *E.coli*) mehrere transduzierende Phagen identifiziert wurden. Diese Ergebnisse indizieren, daß möglicherweise Transduktion bei verschiedenen Gruppen einen unterschiedlichen Beitrag zum horizontalen Gentransfer leistet. Diese Hypothese müsste natürlich durch Untersuchung einer größeren Stichprobe an Phagen verifiziert werden.

5.4 Vergleich der Bakteriengattungen und ihrer Bakteriophagen in Bezug auf ihre mögliche Rolle im horizontalen Gentransfer.

Insgesamt konnten durch Vergleiche von Gesamtproteinmuster und Sequenzanalysen von 16S-rDNA 367 Bakterienstämme aus 600 getesteten Isolaten 14 Gattungen zugeordnet werden. Die 233 verbleibenden Isolate erwiesen sich als zu divers, um Zeit und Geld für ihre Identifizierung zu verwenden.

Die meisten Isolate gehören zu den Gattungen *Pseudomonas* und *Aeromonas* gefolgt von *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Hydrogenophaga*, *Escherichia* und *Shigella*. Die kleinsten Gruppen bilden Isolate der Gattungen *Brevundimonas*, *Flexibacter*, *Chromobacterium*, *Streptomyces*, *Pantoea* und *Rahnella*.

Die meisten Bakterienstämme besitzen keine Plasmide. Plasmiden konnten nur für die Gattungen *Pseudomonas* (acht plasmidhaltige Isolate), *Aeromonas* (zehn plasmidhaltige Isolate) und *Escherichia* (zwölf plasmidhaltige Isolate) sowie für *Rahnella* und *Pantoea*, welche aufgrund ihrer zu geringen Gruppenstärke keine Rolle spielen, nachgewiesen werden. Nur 5.7 % aller *Pseudomonas* und 13.5 % aller *Aeromonas* Isolate besitzen ein oder höchstens zwei Plasmide, wohingegen alle *E.coli* Isolate mindestens zwei, meistens aber zwischen fünf und elf Plasmiden besitzen.

Von 43 isolierten Phagen konnten 37 zu verschiedenen Bakteriengattungen zugeordnet werden. Hiervon entfallen acht auf die Gattung *Pseudomonas*, zwölf auf die Gattung *Aeromonas* und sieben vermehren sich auf *E.coli* Isolaten. Es konnten zwei *Arthrobacter* spezifische Bakteriophagen isoliert werden sowie sieben für die *Brevundimonas vesicularis* Isolate.

Ziel war es nun, die verschiedenen Bakteriengattungen auf genetisches Potential zum horizontalen Gentransfer zu untersuchen. Manche Gruppen -wie z.B. die Isolate der Art *Brevundimonas vesicularis*- scheinen nicht sehr aktiv am horizontalen Gentransfer teilzunehmen. Sie besitzen keine Plasmide und sind nicht lysogen für temperente Phagen. Weiterhin sind die ihnen zugeordneten Bakteriophagen nicht in der Lage, Plasmide oder chromosomale Markergene zu transduzieren. Hierbei muß dahingestellt bleiben, weshalb, gerade für diese Art eine so hohe Anzahl an

verschiedenen Bakteriophagen isoliert werden konnte, obwohl der *Brevundimonas* Titer in allen Wasserproben sehr gering war. Möglicherweise besiedelt *Brevundimonas vesicularis* eine Nische wie das Sediment oder gelöste Partikel.

In den Isolaten der Gattungen *Aeromonas* und *Pseudomonas* konnten nur wenige konjugative Plasmide detektiert werden, und nur zwei der getesteten *Pseudomonas* Phagen waren in der Lage, Plasmide und chromosomale Markergene zu transduzieren. Die *E.coli* Gruppe beinhaltet eine mannigfache Anzahl an mobilisierbaren und konjugativen Plasmiden. Mindestens zwei Isolate beinhalten einen Prophagen; von den fünf weiteren isolierten Phagen besitzen drei die Fähigkeit zur Plasmid- und generellen Transduktion. Dies läßt vermuten, daß diese Gruppe besonders aktiv am horizontalen Gentransfer teilnimmt. Zur Bestätigung dieser Hypothese müßten allerdings *in situ* Versuche im natürlichen Habitat folgen.

Leider liegen bis heute kaum Daten vor, welche die Hypothese, daß einzelne Gruppen innerhalb einer bakteriellen Gemeinschaft ein unterschiedliches Potential zum horizontalen Gentransfer besitzen, bestätigen könnten.

5.5 Bedeutung der ermittelten Daten zum horizontalen Gentransfer in Bezug auf das natürliche Habitat Süßwasser

12.5 % aller untersuchten Isolate der bestimmten Gemeinschaft des Süßwassers sind plasmidhaltig. Unter diesen 180 Plasmiden sind 102 größer / gleich 30 kb und somit potentiell konjugativ. Für neun von 19 getesteten Isolate konnte eine Mobilisierung des Plasmides pSunny gezeigt werden und alle drei transposonmarkierten Plasmide sind in der Lage, durch Konjugation in Rezipienten verschiedener Gattungen zu transferieren. Diese unter Laborbedingungen, wie großen Nährstoffangebot, optimaler Temperatur sowie hoher Donor- und Rezipientendichte auf engen Raum, erstellten Daten indizieren ein hohes Potential für den horizontalen Gentransfer durch Konjugation. Diese Parameter spiegeln allerdings nicht die Bedingungen wieder, welche im natürlichen Umwelthabitat Süßwasser herrschen. Voraussetzung für eine Konjugation ist der Zell-Zell Kontakt, welcher in Wasser bedingt durch die geringe Zelldichte oft nicht gegeben ist. Des weiteren zeigen schon Laborversuche, daß die Donor zu Rezipienten-Rate und die Wahl zwischen einer Konjugation in Flüssigmedium oder auf festem Medium ein entscheidender Faktor zu sein scheint. Hinzu kommt, daß im Nährstoff-armen Wasser die Bakterien wahrscheinlich einen reduzierten Metabolismus haben. Eine Konjugation, welche im Süßwasser unter Ausschluß der natürlichen Gemeinschaft in moderaten Frequenzen abläuft, kann unter Anwesenheit der derselbigen nur noch in geringen Raten beobachtet werden (O'Morchoe *et al.*, 1988; Bale *et al.*, 1987). Hieraus folgt, daß unter Laborbedingungen erhaltene Ergebnisse kein Indikator für einen konjugativen Gentransfer *in situ* darstellen. Ein Gentransfer durch Konjugation konnte im Habitat Süßwasser nur innerhalb der ersten 24 Stunden detektiert werden (O'Morchoe *et al.*, 1988), was zum Teil auf die Verringerung der Bakterien durch Protozoen zurückzuführen ist (Alexander, 1981).

Inwieweit die unter Laborbedingungen erstellten Daten, zum genetischen Potential für den horizontalen Gentransfer durch Konjugation, auf das natürliche Habitat mit seiner komplexen Gemeinschaft übertragbar sind kann mittels der erstellten Daten nicht bewertet werden. Die

interessante Frage nach der Häufigkeit der tatsächlich erfolgten Transferereignisse bleibt unbeantwortet.

Aus einer Gruppe von 43 Bakteriophagen wurden 17 eingehender auf ihre Fähigkeit zur Transduktion getestet. Für fünf dieser Phagen mit Wirten der Gattungen *E.coli* und *Pseudomonas* konnte eine Plasmidtransduktion sowie (mit Ausnahme des Phagen Φ M2, für den kein adäquater Rezipient vorhanden war) eine generelle Transduktion gezeigt werden. Die ermittelten Transduktionsraten liegen allerdings, wenn sie denn überhaupt ermittelt werden konnten, in einem Bereich nahe an der Nachweisgrenze. Diese Ergebnisse lassen auf ein geringes Potential für den horizontalen Gentransfer durch Transduktion schließen. Allerdings spiegeln auch diese Parameter nicht die Bedingungen wieder, welche im natürlichen Habitat vorherrschen.

In der Natur ist ein essentieller Parameter für eine erfolgreiche Bakteriophagen / Wirtszell Interaktion die Verfügbarkeit von Nährstoffen, da der Bakteriophage für seine Vermehrung eine Zelle in der logarithmischen Phase benötigt. Die Transduktionsfrequenz ist direkt proportional zur Phagen zu Bakterien Rate. Gerade im Habitat Süßwasser stellt die geringe Anzahl von Phagen und Bakterien in einem großen Raum einen begrenzenden Faktor dar. In diesem Fall scheinen physikalische Faktoren wie suspendierte (Boden-)Partikel oder das Sediment eine besondere Rolle für den Gentransfer zu spielen (Miller, 1998; Ripp und Miller; 1995; Suttle und Chen; 1992). Weiterhin besitzen freie Bakteriophagen im Wasser nur eine begrenzte Halbwertszeit (12-24 Stunden), was einen weiteren limitierenden Faktor für die Transduktion darstellt (Yates *et al.*, 1985; Miller, 1998).

Innerhalb dieser Arbeit wurde nur der Nachweis für das genetische Potential zum horizontalen Gentransfer, d.h. die Präsenz von Plasmiden und Phagen, erbracht. Nicht oder nur schwer nachweisbar bleiben die tatsächlichen Transferereignisse innerhalb des beschriebenen Habitats unter natürlichen Bedingungen, d.h. ohne Manipulation. Die geringe Zahl an transduzierenden Bakteriophagen (bei allerdings kleiner Stichprobe) und die sehr geringen Transduktionsraten lassen allerdings vermuten, daß es sich beim Gentransfer durch Transduktion in der natürlichen Gemeinschaft um einen eher seltenen Prozeß handelt.

Möglicherweise sind eher die temperenten Phagen an der Diversität der Arten beteiligt, da die Entdeckung von z.T. defekter Prophagen im Genom die Vermutung nahelegt, daß durch diese größere Rearrangements im Genom erfolgen können (Ohnishi *et al.*, 2001).

6. Literaturverzeichnis

- Ackermann, H.-W.** 2003: Bacteriophage observations and evolution. Res. in Microbiol. **154** (4): 245-251
- Ackermann, H.W.** 2001: Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Arch. Virol. **146**: 843-857
- Ackermann, H.W.** 1987: Bacteriophage taxonomy in 1987. Microbiol. Sci. **4**: 214-218
- Ackermann, H.W. and DuBow, M.S.** 1987: General properties of tailed phages, p. 1-113. In Viruses of prokaryotes. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Ackermann, H.W. and DuBow, M.S.** 1987b: Viruses of prokaryotes. Vol. 1, General properties of bacteriophages. CRC Press, Boca Raton
- Alexander, M.** 1981: Why microbial predators and parasites do not eliminate their prey and hosts. Annu. Rev. Microbiol. **35**: 113-133
- Alt-Mörbe, J., Stryker, J.L., Fuqua, C., Li, P.L., Farrand, S.K. and Winans, S.C.** 1996: The conjugal transfer system of *Agrobacterium tumefaciens* octopine-type Ti plasmids is closely related to the transfer system of an IncP plasmid and distantly related to Ti *vir* genes. J. Bacteriol. **178**: 4248-4257
- Altschul, S.F., Madden, A.A., Schaffer, J., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipmann, J.** 1997: Gapped BLAST and PSI – BLAST: a new generation of protein database search programmes. Nucleic Acids. Res. **25**: 3389-3402
- Amann, R.I., Ludwig, W. and Schliefer, K.-H.** 1995: Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. **59**: 143-169
- Anderson, E.S.** 1957: The relation of bacteriophages to bacterial ecology, p. 189-217. In R.E.O. Williams and C.C. Spicer (ed.), Microbial ecology. Cambridge University Press, Cambridge
- Astill, D.S., Manning, P.A. and Heuzenroeder, M.W.** 1993: Characterisation of the small cryptic plasmid pIMVS1, of *Salmonella enterica* ser. Typhimurium. Plasmid **30**: 258-267
- Arber, W.** 1995: The generation of variation in bacterial genomes. J. Mol. Evol. **40**: 7-12
- Bachmann, B.J.** 1987: In *E.coli* and *Salmonella typhimurium*, cellular and molecular biology, ed. F.C. Neidhardt: Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12. ASM pp. 1190-1219
- Bale, M.J., Fry, J.C. and Day, M.J.** 1987: Plasmid transfer between strains of *Pseudomonas aeruginosa* on membrane filters attached to river stones. J. Gen. Microbiol. **133**: 3099-3107

- Bale, M.J., Fry, J.C. and Day, M.J.** 1988a: Transfer and occurrence of large mercury resistance Plasmides in river epilithon. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 972-978
- Bale, M.J., Fry, J.C. and Day, M.J.** 1988b: Novel method for studying plasmid transfer in undisturbed river epilithon. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2756-2758
- Bartsch, K., Cypionka, H. and Overmann, J.** 1999: Evaluation of cell activity and of methods for the cultivation of bacteria from natural lake community. *FEMS Microbial Ecology* **28**: 249-259
- Bates, S., Cashmore, A.M. and Wilkins, B.M.** 1998: IncP plasmides are unusually effective in mediating conjugation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of the Tra2 mating system. *J. Bacteriol.* **180**: 6538-6543
- Battermann, A.** 2002: Charakterisierung von Plasmiden aus einer Gemeinschaft von Bodenbakterien mit dem Schwerpunkt auf dem genetischen Potential für konjugativen DNA-Transfer. Dissertation, Universität Bielefeld
- Battermann, A., Disse-Krömker, C. and Dreiseikelmann, B.** 2003: A functional plasmid-borne *rrn* operon in soil isolates belonging to the genus *Paracoccus*. *Microbiology* **149**: 3587-3593
- Beaupré, C.E., Bohne, J., Dale, E.M. and Binns, A.N.** 1997: Interactions between VirB9 and VirB10 membrane proteins involved in movement of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plant cells. *J. Bacteriol.* **179**: 78-89
- Beilstein, F., and Dreiseikelmann, B.** 2005: Bacteriophages of freshwater *Brevundimonas vesicularis* isolates. *Res. Microbiol.* in press
- Belogurov, A.A., Delver, E.P. and Rodzevich, O.V.** 1993: Plasmid pKM101 encodes two nonhomologous antirestriction proteins (ArdA and ArdB) whose expression is controlled by homologous regulatory sequences. *J. Bacteriol.* **175**: 4843-4850
- Belogurov, A.A., Delver, E.P., Agafonova, O.V., Belogurova, N.G., Lee, L-Y. and Kado, C.I.** 2000: Antirestriction Protein Ard (Type C) encoded by IncW plasmid pSa has a high similarity to the "Protein Transport" domain of TraC1 primase of promiscuous plasmid RP4. *J. Mol. Biol.* **296**: 969-977
- Berg, Ø., Børsheim, K.Y., Bratbak, G. and Haldal, M.** 1989: High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* **340**: 467-468
- Besson, K.E., Erder, D.L., Bagwell, C.E., Lovell, C.R. and Sobecky, P.A.** 2002: Differentiation of plasmids in marine diazotroph assemblages determined by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Microbiol.* **148**: 179-189
- Besemer, K., Moeseneder, M.M., Arrieta, J.M., Herndl, G.J. and Peduzzi, P.** 2005: Complexity of bacterial communities in a river-floodplain system (Danube, Austria). *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 609-620
- Birnboim, H.C., Doly, J.** 1979: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523

- Bolland, S., Llosa, M., Avilla, P. and De La Cruz, F.** 1990: General organisation of the conjugal transfer genes of the IncW plasmid R388 and interactions between R388 and IncN and IncP plasmids. *J. Bacteriol.* **172**: 5795-5802
- Bowman, J.P., McCammon, S.A., Brown, M.V., Nichols, D.S. and McMeekin, T.A.** 1997: Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3068-3078
- Bradley, D.E.** 1965: The morphology and physiology of bacteriophages as revealed by electron microscope. *J.R. Microsc. Soc.* **84**: 257-316
- Bruun, M.S., Schmidt, A.S., Dalsgaard, I. and Larsen, J.L.** 2003: Conjugal transfer of large plasmids conferring oxytetracycline (OTC) resistance: Transfer between environmental *Aeromonads*, fish-pathogenic bacteria and *Escherichia coli*. *J. of Aquatic Animal Health* **15**: 69-79
- Burian, J., Guller, L., Marcor, M., Kay, W.** 1997: Small cryptic plasmids of multiplasmid, clinical *Escherichia coli*. *Plasmid* **37**: 2-14
- Burton, N.F., Day, M.J. and Bull, A.T.** 1982: Distribution of bacterial plasmids in clean and polluted sites in a south Wales river. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 1026-1029
- Busse, H-J., Denner, E.B.M. and Lubitz, W.** 1996: Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *J. Biotechnology* **47**: 3-38
- Cabezón, E., Lanka, E. and de la Cruz, F.** 1994: Requirements for mobilisation of plasmids RSF1010 and ColE1 by the IncW plasmid R388: *trwB* and *traG* are interchangeable. *J. Bacteriol.* **176**: 4455-4458
- Cabezón, E., Ignacio Sastre, J. and de la Cruz, F.** 1997: Genetic evidence of a coupling role for the TraG protein family in bacterial conjugation. *Mol. Gen. Genet.* **254**: 400-406
- Campell, A.** 1988: Phage evolution and speciation. In *The Bacteriophages*, Vol. 1. Edited by R. Calendar. Plenum Press, New York
- Campbell, J.I.A., Jacobsen, C.S. and Sørensen, J.** 1995: Species variation and plasmid incidence among fluorescent *Pseudomonas* strains isolated from agricultural and industrial soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* **18**: 51-62
- Cascales, E. and Christie, P.J.** 2004: Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate. *Science* **304**: 1170-1173
- Catalano, C.E. and Tomka, M.A.** 1995: The role of gpFI protein in DNA packaging by bacteriophage lambda. *Biochemistry* **34**: 10036-10042
- Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J.E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R. and Covacci, A.** 1996: Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 14648-14653

- Chatfield, L.K., Orr, E., Boulnois, G.J. and Wilkins, B.M.** 1982: DNA primase of plasmid Collb is involved in conjugal DNA synthesis in donor and recipient bacteria. *J. Bacteriol.* **152**: 1188-1195
- Chatfield, L.K. and Wilkins, B.M.** 1984: Conjugative transfer of IncI plasmid primase. *Mol. Gen. Genet.* **197**: 461-466
- Christiansen, C., Christiansen, G., Bak, A. and Stenderup, A.** 1973: Extrachromosomal deoxyribonucleic acid in different enterobacteria. *J. Bacteriol.* **144**: 367-377
- Cole, S.P., Lanka, E. and Guiney, D.G.** 1993: Site-directed mutations in the relaxase operon of RP4. *J. Bacteriol.* **175**: 4911-4916
- Cook, D.M. and Farrand, S.K.** 1992: The *oriT* Region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiC58 shares DNA sequence identity with the transfer origins of RSF1010 and RK2/RP4 and with the T-region borders. *J. Bacteriol.* **174**: 6238-6246
- Cook, M.A., Osborn, A.M., Bettendorff, J. and Sobecky, P.A.** 2001: Endogenous isolation of replicon probes for assessing plasmid ecology of marine sediment microbial communities. *Microbiol.* **147**: 2089-2101
- Coplin, D.L., Rowan, R.G., Chrisholm, D.A. and Whitmoyer, R.E.** 1981: Characterisation of plasmides in *Erwinia stewartii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 599-604
- Close, S.M. and Kado, C.** 1991: The *osa* gene of pSa encodes a 21.1-kilodalton protein that suppresses *Agrobacterium tumefaciens* oncogenicity. *J. Bacteriol.* **173**: 5449-5456
- Close, S.M. and Kado, C.** 1992: A gene near the plasmid pSa origin of replication encodes a nuclease. *Mol. Microbiol.* **6**(4): 521-527
- Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P.L. and Maas, W.K.** 1988: Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol. Rev.* **52**: 375-395
- Craine, B.L.** 1992: Novel selection for tetracycline- or chloramphenicol- sensitive *E.coli*. *J. Bacteriol.* **151**: 487-490
- Croft, J.E., Bergquist, P.L. and Lane, D.** 1983: A cryptic plasmid from *Shigella sonnei*. *J. of general microbiology* **129**: 1513-1525
- d'Hérelle, F.** 1918: Technique de la recherche du microbe filtrant bacteriophage (Bacteriophagum intestinale), *C.R. Soc. Biol.* **81**: 1160-1162
- Dahlberg, C., Linberg, C., Torsvik, V.L. and Hermansson, M.** 1997: Conjugative plasmids isolated from bacteria in marine environments show various degrees of homology to each other and are not closely related to well-characterised plasmids. *Appl. and Environ. Microbiol.* **63**: 4692-4697
- Dale, E.M., Binns, A.N. and Ward, J.E.** 1993: Construction and characterisation of Tn5*virB*, a transposon that generates nonpolar mutations and its use to define *virB8* as essential virulence gene in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **175**: 887-891

- Das, A. and Xie, Y-H.** 1998: Construction of transposon Tn3*phoA*: its application in defining the membrane topology of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer proteins. *Mol. Microbiol.* **27**(2): 405-414
- Das, A. and Xie, Y-H.** 2000: The *Agrobacterium* T-DNA transport pore proteins VirB8, VirB9 and VirB10 interact with one another. *J. Bacteriol.* **182**: 758-763
- Datta, N. und Hedges, R.W.** 1972: Trimethoprim resistance conferred by W plasmid in *Enterobacteriaceae*. *J. Gen. Microbiol.* **72**: 349-355
- Davidson, J.** 1999: Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* **42**: 73-91
- Dijkstra, B.W. and Thunnissen, A.-M. W.H.** 1994: 'Holy' proteins II: the soluble lytic transglycosylase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**: 810-813
- Doolittle, W.F. and Sapienza, C.** 1980: Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature* **284**: 601-603
- Doškař, J., Pallová, P., Pantůček, R., Rosypal, S., Růžičková, V., Pantůčková, P., Kailerová, J., Klepárník, K., Maiá, Z. and Boček, P.** 2000: Genomoc relatedness of *Staphylococcus aureus* phages of the International Typing Set and detection of serogroup A, B, and F prophages in lysogenic strains. *Can J. Microbiol.* **46**: 1066-1076
- Dowling, E.T., Moritz, C. and Palmer, J.D.** 1990: Nucleic acids II: Restriction site analysis. In *Molecular systematics*. Edited by D.M. Hillis and Moritz. Sinauer, Sunderland, Mass. pp. 250-317
- Dröge, M., Pühler, A. and Selbitschka, W.** 1999: Horizontal gene transfer among bacteria in terrestrial and aquatic habitats as assessed by microcosm and field studies. *Biol. Fertil. Soils* **29**: 221-245
- Dröge, M., Pühler, A. and Selbitschka, W.** 2000: Phenotypic and molecular characterisation of conjugative antibiotic resistance plasmids isolated from bacterial communities of activated sludge. *Mol. Gen. Genet.* **263**: 471-482
- Drønen, A.K., Torsvik, V. and Top, E.M.** 1999: Comparison of the plasmid types obtained by two distantly related recipients in biparental exogenous plasmid isolation from soil. *FEMS Microbiol. Lett.* **176**: 105-110
- Dykhuizen, D.E.** 1998: Why are there so many species of bacteria? *Antonie van Leeuwenhoek* **73**: 25-33
- Eberl, L., Kristensen, C.S., Givskov, M., Grohmann, E., Gerlitz, M. and Schwab, H.** 1994: Analysis of the multimer resolution system encoded by the *parCBA* operon of broad-host-range plasmid PR4. *Mol. Microbiol.* **12**: 131-141
- Ehrich, K.** 2005: Charakterisierung von Plasmiden und Prophagen einer *E.coli* Population isoliert aus Bielefelder Teichwasser. Diplomarbeit, Bielefeld
- Eisenbrandt, R., Kalkum, M., Lurz, R. and Lanka, E.** 2000: Maturation of IncP pilin precursors resembles the catalytic dead-like mechanism of leader peptidases. *J. Bacteriol.* **182**: 6751-6761

- Ellis, D.M. und Dean, D.H.** 1985: Nucleotide sequence of the cohesive single-stranded ends of *Bacillus subtilis* temperate bacteriophage Φ 105. *J. Virol.* **55**: 513-515
- Fellay, R., Krisch, H.M, Prentki, P. and Frey, J.** 1989: Omegon-Km: a transposable element designed for in vivo insertional mutagenesis and cloning of genes in Gram-negative bacteria. *Gene* **76**: 215-226
- Fong, S.T. and Stanisich, V.A.** 1989: Location and characterisation of two functions on RP1 that inhibit the fertility of the IncW plasmid R388. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 499-502
- Fouet, A., Sirard, J.C. and Mock, M.** 1994: *Bacillus anthracis* pXO1 virulence plasmid encodes a type 1 DNA topoisomerase. *Mol. Microbiol.* **11**: 471-479
- Fuhrmann, J.A.** 1999: Marine viruses and their biochemical and ecological effects. *Nature* **399**: 541-548
- Fürste, J.P., Pansegrau, W., Ziegelin, G., Kröger, M. and Lanka, E.** 1989: Conjugative transfer of promiscuous IncP plasmids: interaction of plasmid-encoded products with the transfer origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 1771-1775
- Gauthier, M.J., Cauvin, F. and Breittmaier, J.P.** 1985: Influence of salts and temperature on the transfer of mercury resistance from marine pseudomonad to *E.coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 38-40
- Gerdes, K., Møller-Jensen, J. and Jensen, R.B.** 2000: Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. *Mol. Microbiol.* **37**: 455-466
- Gilmour, M.W., Gunton, J.E., Lawley, T.D. and Taylor, D.E.** 2003: Interaction between the IncHI1 plasmid R27 coupling protein and type IV secretion system: TraG associates with the coiled-coil mating pair formation protein TrhB. *Mol. Microbiol.* **49**: 105-116
- Götz, A., Pukall, R., Smit, E., Tietze, E., Prager, R., Tschäpe, H., van Elsas, J.D. and Smalla, K.** 1996: Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PRC. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2621-2628
- Grahn, A.M., Haase, J., Bamford, D.H. and Lanka, E.** 2000: Components of the RP4 conjugative transfer apparatus form an envelope structure bridging inner and outer membranes of donor cells: implication for related macromolecule transport systems. *J. Bacteriol.* **182**: 1564-1574
- Günther, Nicole** 2006: Diplomarbeit, Bielefeld
- Güttler, A.** 1998: Entwicklung eines Rekombinationssystems zum Studium horizontalen Gentransfer auf unbekannte Bakterien sowie die Konstruktion von Transportvektoren mit *gfp* als Markergen. Dissertation Technische Universität Braunschweig
- Gomis-Rüth, F.X., de la Cruz, F. and Coll, M.** 2002: Structure and role of coupling proteins in conjugal DNA transfer. *Res. in Microbiol.* **153**: 199-204

- González, J.M. and Carlton, B.C.** 1980: Patterns of plasmid DNA in crystalliferous and acrySTALLIFEROUS strains of *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid* **3**: 92-98
- Haapa, S., Taira, S., Heikkinen, E. and Savilahti, H.** 1999: An efficient and accurate integration of mini-Mu transposon *in vitro*: a general methodology for functional genetic analysis and molecular biology applications. *Nucleic Acids Res.* **27**: 2777-2784
- Haase, J., Grahn, A.M., Bamford, D.H. and Lanka, E.** 1995: Bacterial conjugation mediated by plasmid RP4: RSF1010 mobilization, donor-specific phage propagation and pilus production require the same Tra2 core components of a proposed DNA transport complex. *J. Bacteriol.* **177**: 4779-4791
- Hales, B.A., Hart, C.A., Batt, R.M. and Saunders, J.R.** 1992: The large plasmids found in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* constitute a related series of transfer-defective Inc F-IIA replicons. *Plasmid* **28**: 183-193
- Hamilton, C.M., Lee, H., Li, P.-L., Cook, D.M., Piper, K.R., Beck von Bodman, S., Lanka, E., Ream, W. and Farrand, S.K.** 2000: TraG from RP4 and TraG and VirD4 from Ti plasmids confer relaxosome specificity to the conjugal transfer system of pTiC58. *J. Bacteriol.* **182**: 1541-1548
- Hayashi, T., Matsumoto, H., Ohnishi, M. und Terawaki, Y.** 1993: Molecular analysis of a cytotoxin-converting phage, Φ CTX, of *Pseudomonas aeruginosa*: structure of the *attP-cos-ctx* region and integration into the serine tRNA gene. *Mol. Microbiol.* **7**: 657-667
- Hermansson, M., Jones, G.W. and Kjelleberg, S.** 1987: Frequency of antibiotic and heavy metal resistance, pigmentation, and plasmids in bacteria of the marine air-water interface. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2338-2342
- Hertwig, S., Klein, I., Lurz, R., Lanka, E. und Appel, B.** 2003: PY54, a linear plasmid prophage of *Yersinia enterocolytica* with covalently closed ends. *Molecular Microbiology* **48**(4): 989-1003
- Higgins, R.R., Lucko, H.J. and Becker, A.** 1988: Mechanism of *cos* DNA cleavage by bacteriophage lambda terminase: multiple roles of ATP. *Cell* **54**: 765-775
- Hill, K.E., Weightman, A.J. and Fry, J.C.** 1992: Isolation and screening of plasmids from the epilithon which mobilize recombinant plasmid pD10. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1292-1300
- Hiorns, W.D., Methé, B.A., Nierzwicki-Bauer, S.A. and Zehr, J.P.** 1997: Bacterial diversity in Adirondack mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2957-2960
- Jacobs, D.** 2006: Diplomarbeit, Bielefeld
- Jiang, S.C. and Paul, J.H.** 1998: Gene transfer by transduction in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2780-2787
- Jiang, S.C. and Paul, J.H.** 1998 b: Significance of lysogeny in the marine environment: studies with isolates and a model of lysogenic phage production. *Microb. Ecol.* **35**: 235-243

- Johnson, D.J. and Burns, D.L.** 1994: Detection and subcellular localization of three Ptl proteins involved in the secretion of pertussis toxin from *Bordetella pertussis*. J. Bacteriol. **176**: 5350-5356
- Jones, J.G.** 1977: The effect of environmental factors on estimated viable and total populations of planktonic bacteria in lakes and experimental enclosures. Freshwater Biol. **7**: 67-91
- Kado, C.I.** 1998: Origin and evolution of plasmids. Antonie van Leeuwenhoek **73**: 117-126
- Kenzada, T., Yamaguchi, N., Tani, K. and Nasu, M.** 1998: rRNA-targeted fluorescent *in situ* hybridisation analysis of bacterial community structure in river water. Microbiology **144**: 2085-2093
- Kim, S.R. and Komano, T.** 1992: Nucleotide sequence of the R721 shufflon. J. Bacteriol. **174**: 7053-7058
- Klein, J.R., Ulrich, C. and Plapp, R.** 1993: Characterisation and sequence analysis of a small cryptic plasmid from *Lactobacillus curvatus* LTH683 and its use for construction of new *Lactobacillus* cloning vectors. Plasmid **30**: 14-29
- Kokjohn, T.A., Sayler, G.S. and Miller, R.V.** 1991: Attachment and replication of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages under conditions simulating aquatic environments. J. Gen. Microbiol. **137**: 661-666
- Kuldau, G.A., De Vos, G., Owen, J., Mc Caffrey, G. and Zambryski, P.** 1990: The *virB* operon of *Agrobacterium tumefaciens* pTiC58 encodes 11 open reading frames. Mol. Gen. Genet. **221**: 256-266
- Lämmli, U.K.** 1970: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**: 680-685
- Lane, D.** 1991: 16S / 23SrDNA sequencing. in: E. Stackebrandt, M. Goodfellow (eds.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons, Chichester, UK. 115-165
- Lanka, E. and Barth, P.T.** 1981: Plasmid RP4 specifies a deoxyribonucleic acid primase involved in its conjugal transfer and maintenance. J. Bacteriol. **148**: 769-781
- Lanka, E. and Wilkins, B.M.** 1995: DNA processing reactions in bacterial conjugation. Annu. Rev. Biochem. **64**: 141-169
- Laufs, R. and Kleinmann, F.** 1978: Antibiotic resistance factors and other plasmids in bacterial isolates from hospitalized patients. Zentralbl. Bacteriol. **240**: 503-516
- Lee, L.-Y., Gelvin, S.B. and Kado, C.I.** 1999: pSa causes oncogenic suppression of *Agrobacterium* by inhibiting VirE2 Protein Export. J. Bacteriol. **181**: 186-196
- Lee, L.-Y. and Gelvin, S.B.** 2004: Osa protein constitutes a strong oncogenic suppression system that can block *vir*-dependent transfer of IncQ plasmids between *Agrobacterium* cells and the establishment of IncQ plasmids in plant cells. J. Bacteriol. **186**: 7254-7261

- Leffers, G. und Rao, V.B.** 1996: A discontinuous heedful packaging model for packaging less than heedful length DNA molecules by bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* **258**: 839-850
- Lennox, E.S.** 1955: Transduktion of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* **1**: 190-206
- Lessel, M., Balzer, D., Pasegrau, W. and Lanka, E.** 1992: Sequence similarities between the RP4 Tra2 and the VirB Region strongly support the conjugation model for T-DNA transfer. *J. of Biol. Chem.* **267**: 20471-20480
- Lessel, M., Balzer, D., Weyrauch, K. and Lanka, E.** 1993: The mating pair formation system of plasmid RP4 defined by RSF1010 mobilization and donor-specific phage propagation. *J. Bacteriol.* **175**: 6415-6425
- Li, Z., Hiasa, H., Kumar, U. and DiGates, R.J.** 1997: The *traE* gene of Plasmid RP4 encodes a homologue of *Escherichia coli* DNA Topoisomerase III. *J. of Biol. Chem.* **272**: 19582-19587
- Liebert, C.A., Wireman, J., Smith, T. and Summers, A.O.** 1997: Phylogeny of mercury resistance (*mer*) operons of gram-negative bacteria isolated from the fecal flora of primates. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1066-1076
- Lilley, A.K. and Bailey, M.J.** 1997: The acquisition of indigenous plasmids by a genetically marked pseudomonad population colonizing the sugar beet phytosphere is related to local environmental conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1577-1583
- Lin, K.J.** 1998: Gemeinschaftsanalyse von Bodenbakterien. Diplomarbeit, Bielefeld
- Lindell, D., Jaffe, J.D., Johnson, Z.I., Church, G.M. and Chisholm, S.W.** 2005: Photosynthesis genes in marine viruses yield proteins during host infection. *Nature* **438**: 86-89
- Llosa, M., Zupan, J., Baron, C. and Zambryski, P.** 2000: The N- and C-terminal portions of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB1 protein independently enhance tumorigenesis. *J. Bacteriol.* **182**: 3437-3445
- Llosa, M., Zunzunegui, S. and de la Cruz, F.** 2003: Conjugative coupling proteins interact with cognate and heterologous VirB10-like proteins while exhibiting specificity for cognate relaxosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 10465-10470
- Loessner, M.J., Inman, R.B., Lauer, P. and Calendar, R.** 2000: Complete nucleotide sequence, molecular analysis and genome structure of bacteriophage A188 of *Listeria monocytogenes*: implications for phage evolution. *Mol. Microbiol.* **35**(2): 324-340
- Lorenz, M.G. und Wackernagel, W.** 1994: Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.* **58**: 563-602
- Lubbers, M.W., Ward, L.J.H., Beresford, T.P.J., Jarvis, B.D.W. und Jarvis, A.W.** 1994: Sequencing and analysis of the *cos* region of the *lactococcal* bacteriophage c2. *Mol. Gen. Genet.* **245**: 160-166

- MacHattie, L.A., Ritchie, D.A. and Thomas, C.A.** 1967: Terminal repetition in permuted T2 bacteriophage DNA molecules. *J. Mol. Biol.* **23**: 355-363
- Maidak, B.L., Cole, J.R., Lilburn, T.G., Parker jun., C.T., Saxman, P.R., Farris, R.J., Garrity, G.M., Olsen, G.J., Schmidt, T.M. and Tiedje, J.M.** 2001: The RDP-II (Ribosomal database project). *Nucleic Acids Res.* **29**: 173-174
- Mandel, M. and Higa, A.** 1970: Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**: 159-162
- Maniatis, T., Fritsch, E.E. and Sambrook, J.** 1989: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY
- Mannesmann, R., Dierksheide, D., Elbertz, M. und Schlüter, H.** 1990: Mikrobiologische Untersuchung zur Abundanz und Artenverteilung von Bakterien in einem Fließgewässer Ostwestfalens. *Forum Städte-Hygiene* **41**: 262-268
- Marrero, R., Chiafari, F.A. and Lovett, P.S.** 1981: SPO2 particles mediating transduction of a plasmid containing SPO2 cohesive ends. *J. Bacteriol.* **147**: 1-8
- Merryweather, A., Barth, P.T. and Wilkins, B.M.** 1986: Role and specificity of plasmid RP4-encoded DNA primase in bacterial conjugation. *J. Bacteriol.* **167**: 12-17
- Miele, L., Strack, B., Kruff, V. and Lanka, E.** 1991: Gene organization and nucleotide sequence of the primase region of IncP plasmids RP4 and R751. *DNA Seq.* **2** (3): 145-162
- Miller, J.F., Lanka, E. and Malamy, M.H.** 1985: F factor inhibition of conjugal transfer of broad-host-range plasmid RP4: requirement for the protein product of Pif operon regulatory gene *pifC*. *J. Bacteriol.* **163**: 1067-1073
- Miller, R.V.** 1992: Methods for evaluating transduktion: an overview with environmental considerations. In M.A. Levin, R.J. Seidler and M. Rogul (ed.), *Microbial ecology. Principles, methods and applications*. McGraw-Hill, Inc., New York, N.Y.
- Miller, R.V.** 1998: The importance of the dynamics of bacteriophage-host interactions to bacterial abundance and genetic diversity in aquatic environments. *Environmental Research Brief: EPA/600/S-98/002*
- Miller, R.V.** 2001: Environmental bacteriophage-host interactions: factors contribution to natural transduction. *Antonie van Leeuwenhoek* **79**: 141-147
- Morino, T., Takagi, K., Nakamura, T., Takita, T., Saito, H. and Takahashi, H.** 1986: Studies of cosmid transduktion in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces parvulus*. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 2493-2497.
- Morrison, W.D., Miller, R.V. and Sayler, G.S.** 1978: Frequency of F116-mediated transduction of *Pseudomonas aeruginosa* in a freshwater environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**: 724-730

- Morton, T.M., Eaton, D.M., Johnston, J.L. and Archer, G.L.** 1993: DNA sequence and units of transcription of the conjugative transfer gene complex (*trs*) of *Staphylococcus aureus* plasmid pGO1. *J. Bacteriol.* **175**: 4436-4447
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A.** 1987: Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**: 335-350
- Murialdo, H.** 1991: Bacteriophage lambda DNA maturation and packaging. *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 125-153
- Narahara, K., Rahman, E., Furuya, N., and Komano, T.** 1997: Requirement of a limited segment of the *sog* gene for plasmid R64 conjugation. *Plasmid* **38**: 1-11
- Nash, J. and Krishnapillai, V.** 1988: Role of IncP-1 plasmid primase in conjugation between *Pseudomonas* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **49**: 257-260
- Nath, N. and Deb, J.K.** 1995: Partial characterisation of small plasmids from *Corynebacterium renale*. *Plasmid* **34**: 229-233
- Novick, R.P., Edelman, I. and Lofdahl, S.** 1986: Small *Staphylococcus aureus* plasmids are transduced as linear multimers that are formed and resolved by replicative processes. *J. Mol. Biol.* **192**: 209-220
- Novick, R.P.** 1987: Plasmid incompatibility. *Microbiological Reviews* **51**: 381-395
- O'Connor, K.A. and Zusman, D.R.** 1983: Coliphage P1-mediated transduction of cloned DNA from *Escherichia coli* to *Myxococcus xanthus*: use for complementation and recombinational analyses. *J. Bacteriol.* **155**: 317-329
- Ogunseitan, O.A., Sayler, G.S. and Miller, R.V.** 1990: Dynamic interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and bacteriophages in lakewater. *Microb. Ecol.* **19**: 171-185
- Ogunseitan, O.A., Sayler, G.S. and Miller, R.V.** 1992: Application of DNA probes to analysis of bacteriophage distribution patterns in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2046-2052
- Ohnishi, M., Kurokawa, K. and Hayashi, T.** 2001: Diversification of *Escherichia coli* genomes: are bacteriophages the major contributors? *Trends in Microbiology* **9** (10): 481-485
- O'Morchoe, S.B., Ogunseitan, O., Sayler, G.S. and Miller, R.V.** 1988: Conjugal transfer of R68.45 and FP5 between *Pseudomonas aeruginosa* strains in a freshwater environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1923-1929
- Mushegian, A.R., Fullner, K.J., Koonin, E.V. and Nester, E.W.** 1996: A family of lysozyme-like virulence factors in bacterial pathogens of plants and animals. *Microbiology* **93**: 7321-7326
- Ohnishi, M., Kurokawa, K. and Hayashi, T.** 2001: Diversification of *Escherichia coli* genomes: are bacteriophages the major contributors? *Trends in Microbiology* **9**: 481-485
- Orbach, M.J. and Jackson, E.N.** 1982: Transfer of chimeric plasmids among *Salmonella thymurium* strains by P22 transduction. *J. Bacteriol.* **149**: 985-994

- Pansegrau, W., Ziegelin, G. and Lanka, E.** 1990: Covalent association of the *tral* gene product of the plasmid RP4 with the 5'-terminal nucleotide at the relaxation nick site. *J. of Biol. Chem.* **265**: 10637-10644
- Pansegrau, W., Schröder, W. and Lanka, E.** 1993: Concerted action of three distinct domains in the DNA cleaving-joining reaction catalyzed by Relaxase (Tral) of conjugative plasmid RP4. *J. of Biol. Chem.* **269**: 2782-2789
- Pansegrau, W., Lanka, E., Barth, P.T., Figurski, D.H., Guiney, D.G., Haas, D., Helinski, D.R., Schwab, H., Stanisich, V.A. and Thomas, C.M.** 1994: Complete nucleotide sequence of Birmingham IncP α plasmids. *J. Mol. Biol.* **239**: 623-663
- Pfankuch, E. und Kausche, G.A.:** 1940: Isolierung und übermikroskopische Abbildung eines Bakteriophagen, *Naturwissenschaften* **28**: 46
- Pickett, M.A., Everson, J.S., Pead, P.J. and Clarke, I.N.** 2005: The plasmids of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydophila pneumoniae* (N16): accurate determination of copy number and the paradoxical effect of plasmid-curing agents. *Microbiology* **151**: 893-903
- Primrose, S.B. and Day, M.** 1977: Rapid concentration of bacteriophages from aquatic habitats. *J. Appl. Bacteriol.* **42**: 417-427
- Pohlmann, R.F., Genetti, H.D. and Winans, S.C.** 1994: Common ancestry between the IncN conjugal transfer genes and macromolar export systems of plants and animal pathogens. *Mol. Microbiol.* **14**: 655-668
- Ramos-Gonzales, M.I., Duque, E. and Ramos, J.L.** 1991: Conjugal transfer of recombinant DNA in cultures and in soil: host range of *Pseudomonas putida* TOL plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 3020-3027
- Rawlings, D.E. and Tietze, E.** 2001: Comparative biology of IncQ and IncQ-like plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**: 481-496
- Rees, C.E.D. and Wilkins, B.M.** 1989: Transfer of *tra* proteins into the recipient cell during conjugation mediated by plasmid Collb-P9. *J. Bacteriol.* **171**: 3152-3157
- Rees, C.E.D. and Wilkins, B.M.** 1990: Protein transfer into the recipient cell during bacterial conjugation: studies with F and RP4. *Mol. Microbiol.* **4** (7): 1199-1205
- Reimann, C., and Haas, D.** 1993: Mobilisation of chromosomes and nonkonjugative plasmids by cointegrative mechanisms. Kapitel 6, Seite 137-188. In *Bacterial conjugation*, Plenum Press, New York und London
- Rhodes, G., Parkhill, J., Bird, C., Ambrose, K., Jones, M.C., Huyes, G., Swings, J. and Pickup, R.W.** 2004: Complete nucleotide sequence of the conjugative tetracycline resistance plasmid pFBAOT6, member of a group of IncU plasmids with global ubiquity. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 7497-7510
- Ripp, S., Ogunseitan, O.A. and Miller, R.V.** 1994: Transduktion of a freshwater microbial community by a new *Pseudomonas aeruginosa* generalized transducing phage, UT1. *Molecular Ecology* **3**: 121-126

- Ripp, S., and Miller, R.V.** 1995: Effects of suspended particulates on the frequency of transduction among *Pseudomonas aeruginosa* in a freshwater environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1214-1219
- Ritchie, D.A., Thomas, C.A., MacHattie, L.A. and Wensink, P.C.** 1967: Terminal repetition in non-permuted T3 and T7 bacteriophage DNA molecules. *J. Mol. Biol.* **23**: 365-376
- Roberts, R.C. and Helinski, D.R.** 1992: Definition of a minimal plasmid stabilization system from the broad-host-range plasmid RK2. *J. Bacteriol.* **174**: 8119-8132
- Rochelle, P.A., Fry, J.C. and Day, M.J.** 1989: Factors affecting conjugal transfer of plasmids encoding mercury resistance from pure cultures and mixed natural suspensions of epilithic bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 409-424
- Ruhfel, R.E., Robillard, N.J. and Thorne, C.B.** 1984: Interspecies transduktion of plasmids among *Bacillus anthracis*, *B. cereus* and *B. thuringiensis*. *J. Bacteriol.* **157**: 708-711
- Roy, A. and Skurray, R.** 1983: Cloning and polypeptide analysis of the leading region in F plasmid DNA transfer. *Plasmid* **9**: 262-272
- Sander, M. and Schmieger, H.** 2001: Method for host-independent detection of generalized transducing bacteriophages in natural habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1490-1493
- Sandri, R.M. and Berger, H.** 1980: Bacteriophage P1 mediated generalized transduction in *Escherichia coli*: fate of transduced DNA in Rec⁺ and RecA⁻ recipients. *Virology* **106**: 14-29
- Santini, J.M. and Stanisich, V.A.** 1998: Both the *fipA* gene of pKM101 and the *pifC* gene of F inhibit conjugal transfer of RP1 by an effect on *traG*. *J. Bacteriol.* **180**: 4093-4101
- Sarandopoulos, S. and Davies, J.K.** 1993: Genetic organisation of the cryptic plasmid of *Neisseria gonorrhoeae*. *Plasmid* **29**: 206-221
- Saraste, M., Sibbald, P.R. and Wittinghofer, A.** 1990: The P-loop- a common motif in ATP- and GTP- binding proteins. *TIBS* **15**: 430-434
- Savilahti, H., Rice, P.A. and Mizuuchi, K.** 1995: The phage Mu transposome core: DNA requirements for assembly and function. *EMBO J.* **14**: 4893-4903
- Saye, D.J., Ogunseitan, O.A., Sayler, G.S. and Miller, R.V.** 1987: Potential for transduktion of plasmids in a natural freshwater environment: effect of plasmid donor concentration and a natural microbial community on transduktion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 987-995
- Saye, D.J., Ogunseitan, O.A., Sayler, G.S. and Miller, R.V.** 1990: Transduktion of linked chromosomal genes between *Pseudomonas aeruginosa* strains during incubation in situ in a freshwater habitat. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 140-145
- Scherzinger, E., Haring, V., Lurz, R., and Otto, S.** 1991: Plasmid RSF1010 DNA replication *in vitro* promoted by purified RSF1010 RepA, RepB, and RepC proteins. *Nucleic Acids Res.* **19**: 1203-1211

- Scherzinger, E., Lurz, R., Otto, S. and Dobrinski, B.** 1992: In vitro cleavage of double- and single-stranded DNA by plasmid RSF1010-encoded mobilisation proteins. *Nucleic Acids Res.* **20**: 41-48
- Schickelmaier, P. and Schmieger, H.** 1995: Frequency of generalized transducing phages in natural isolates of the *Salmonella typhimurium* complex. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1637-1640
- Schickelmaier, P., Moser, E., Wieland, T., Rabsch, W. and Schmieger, H.** 1998: A comparative study on the frequency of prophages among natural isolates of *Salmonella* and *Escherichia coli* with emphasis on generalized transducers. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**: 49-54
- Schickelmaier, P., Wieland, T. and Schmieger, H.** 1999: Molecular characterization and module composition of P22-related *Salmonella* phage genomes. *J. of Biotechnology* **73**: 185-194
- Schröder, G., Krause, S., Zechner, E.L., Traxler, B., Yeo, H-J., Lurz, R., Walksman, G. and Lanka, E.** 2002: TraG-like proteins of DNA transfer systems and of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system: inner membrane gate for exported substrates? *J. Bacteriol.* **184**: 2767-2779
- Schröder, G. and Lanka, E.** 2003: TraG-like proteins of type IV secretion systems: functional dissection of the multiple activities of TraG (RP4) and TrwB (R388). *J. Bacteriol.* **185**: 4371-4381
- Schröder, G. and Lanka, E.** 2005: The mating pair formation system of conjugative plasmids- A versatile secretion machinery for transfer of proteins and DNA. *Plasmid* **54**: 1-25
- Schumann, W.** 1990: *Biologie bakterieller Plasmide*. F. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft, Braunschweig
- Schut, F., de Vries, E.J., Gottschal, J.C., Robertson, B.R., Harder, W., Prins, R.A. and Button, D.K.** 1993: Isolation of typical marine bacteria by dilution culture: Growth, maintenance, and characteristics of isolates under laboratory conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2150-2160
- Seely, N.D. and Primrose, S.B.** 1982: The isolation of bacteriophages from the environment. *J. Appl. Bacteriol.* **53**: 1-17
- Serrano, M., Gutierrez, C., Salas, M. and Hermoso, J.M.** 1993: Superhelical path of the DNA in the nucleoprotein complex that activates the initiation of phage Φ 29 DNA replication. *Journal of Molecular Biology* **230**: 248-259
- Sharp, R., Jansons, I.S., Gertman, E. und Kropinski, A.M.** 1996: Genetic and sequence analysis of the *cos* region of the temperate *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage, D3. *Gene* **177**: 47-53
- Sherley, M., Gordon, D.M. and Collignon, P.J.** 2003: Species differences in plasmid carriage in the Enterobacteriaceae. *Plasmid* **49**: 79-85
- Shimada, K., Omene, K., Nakamura, T. and Takagi, Y.** 1978: Recombination in hybrid ColE1 DNAs as analyzed by lambda-mediated transduction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **43**: 991-998

- Sikorski, R.S., Michaud, W., Levin, H.L., Boeke, J.D. and Hieter, P.** 1990: Trans-kingdom promiscuity. *Nature* **345**: 581-582
- Simon, R., Priefer, U.B. and Pühler, A.** 1983: A broad host range mobilisation system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Biotechnology* **1**: 784-791
- Simon, R.** 1984: High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the in vitro constructed Tn5-Mob Transposon. *Mol. Gen. Genet.* **196**: 413-420
- Skaugen, M.** 1989: The complete nucleotide sequence of a small cryptic plasmid from *Lactobacillus plantarum*. *Plasmid* **22**: 175-179
- Smets, B.F., Rittmann, B.E. and Stahl, D.A.** 1993: The specific growth rate of *Pseudomonas putida* PAW1 influences the conjugal transfer rate of the Tol plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3430-3437
- Smith, C.A. and Thomas, C.M.** 1984: Nucleotide sequence of the *trfA* gene of broad host range plasmid RK2. *J. Mol. Biol.* **175**: 251-262
- Sobecky, P.A., Mincer, T.J., Chang, M.C. and Helinski, D.R.** 1997: Plasmids isolated from marine sediment microbial communities contain replication and incompatibility regions unrelated to those of known plasmid groups. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 888-895
- Sobecky, P.A., Mincer, T.J., Toukdarian, C.A. and Helinski, D.R.** 1998: Isolation of broad-host-range replicons from marine sediment bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2822-2830
- Sobecky, P.A.** 2002: Approaches to investigating the ecology of plasmids in marine bacterial communities. *Plasmid* **48**: 213-221
- Southern, E.** 1975: Detection of specific sequences among DNA fragment separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517
- Stachel, S.E. and Zambryski, P.C.** 1989: Generic trans-kingdom sex? *Nature* **340**: 190-191
- Stopar, D., Černe, A., Žigman, M., Poljšak-Prijatelj, M. and Turk, V.** 2004: Viral abundance and high proportion of lysogenes suggest that viruses are important members of the microbial community in the gulf of Trieste. *Microbial Ecology* **47**: 1-8
- Strack, B., Lessel, M., Calendar, R. and Lanka, E.** 1992: A common sequence motif, -E-G-Y-A-T-A-, identified within the primase domains of plasmid-encoded I- and P-type DNA primase and the α protein of the *Escherichia coli* satellite phage P4. *J. of Mol. Chem.* **267**: 13062-13072
- Suarez, A., Güttler, A., Strätz, M., Staendner, L.H., Timmis, K.N. and Guzman, C.A.** 1997: Green fluorescent protein based reporter system for genetic analysis of bacteria including monocopy applications. *Gene* **196**: 69-74
- Sunairi, M., Watanabe, T., Oda, H., Murooka, H. und Nakajima, M.** 1993: Characterisation of the genome of the *Rhodococcus rhodochrous* bacteriophage NJL. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 97-100

- Suttle, C.A. and Chen, F.** 1992: Mechanisms and rates of decay of marine viruses in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3721-3729
- Sýkora, P.** 1992: Macroevolution of plasmids: a model for plasmid speciation. *J. Theor. Biol.* **159**: 53-65
- Szipirer, C.Y., Faelen, M. and Couturier, M.** 2000: Interaction between the RP4 coupling protein TraG and the pBHR1 mobilization protein Mob. *Mol. Microbiol.* **37**: 1283-1292
- Taimoto, K. and Ilno, T.** 1983: Transfer inhibition of RP4 by F factor. *Mol. Gen. Genet.* **192**: 104-109
- Tennstedt, T., Szczepanowski, R., Krahn, I., Pühler, A. and Schlüter, A.** 2005: Sequence of the 68,869 bp IncP-1 α plasmid pTB11 from waste-water treatment plant reveals a highly conserved backbone, a Tn402-like integron and other transposable elements. *Plasmid* **53**: 218-238
- Thomas, C.M., Meyer, R. and Helinski, D.R.** 1980: Regions of broad-host-range plasmid RK2 which are essential for replication and maintenance. *J. Bacteriol.* **141**: 213-222
- Thomas, C.M., Stalker, D.M. and Helinski, D.R.** 1981: Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. *Mol. Gen. Genet.* **181**: 1-7
- Thorstenson, Y.R. and Zambryski, P.C.** 1994: The essential virulence protein VirB8 localizes to the inner membrane of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **176**: 1711-1717
- Top, E., De Smet, I., Verstraete, W., Dijkmans, R. and Mergeay, M.** 1994: Exogenous isolation of mobilizing plasmids from polluted soils and sludges. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 831-839
- Toranzo, A.E., Barja, J.L., Colwell, R.R. and Hetrick, F.M.** 1983: Characterisation of plasmids in bacterial fish pathogens. *Infection and Immunity* **39**: 184-192
- Torsvik, V., Gosksøyr, J. and Daae, F.L.** 1990: High diversity in DNA soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 782-787
- van Elsas, J.D., McSpadden Gardener, B.B., Wolters, A.C. and Smit, E.** 1998: Isolation, characterisation and transfer of cryptic gene –mobilizing plasmids in the wheat rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 880-889
- Vieira, J. and Messing, J.** 1982: The pUC plasmids, an M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**: 259-268
- Vocke, C. and Bastia, D.** 1985: The replication initiator protein of plasmid pSC101 is a transcriptional repressor of its own cistron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 2252-2256
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. and Gay, N.J.** 1982: Distantly related sequences in the alpha- and beta- subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**: 945-951

- Ward, J.E., Dale, E.M., Nester, E.W. and Binns, A.N.** 1990: Identifacation of a VirB10 protein aggregate in the inner membrane of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. **172**: 5200-5210
- Waters, V.L., Hirata, K.H., Pansegrau, W., Lanka, E. and Guiney, D.G.** 1991: Sequence identity in the nick region of IncP plasmids transfer origins and T-DNA borders of *Agrobacterium* Ti plasmids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 1456-1460
- Waters, V.L., Strack, B., Pansegrau, W., Lanka, E. and Guiney, D.G.** 1992: Mutational analysis of essential IncPa plasmid transfer genes *traF* and *traG* and involvement of *traF* in phage sensitivity. J. Bacteriol. **174**: 6666-6673
- Watt, V.M., Ingles, C.J., Ureda, M.S. and Rutter, W.J.** 1985: Homology requirements for recombination in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**: 4768-4772
- Weinbauer, M.G., Fuks, D. and Peduzzi, P.** 1993: Distributions of viruses and dissolved DNA along a coastal trophic gradient in the northern Adriatic Sea. Appl. Environ. Microbiol. **59**: 4047-4081
- Weinbauer, M.G.** 2004: Ecology of prokaryotic viruses. FEMS Microbiology Reviews **28**: 127-181
- Weiss, B.D., Capage, M.A., Kessel, M. and Benson, S.A.** 1994: Isolation and characterisation of a generalized transducing phage for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. J. Bacteriol. **176**: 3354-3359
- Wiggins, B.A. and Alexander, M.** 1985: Minimum bacterial density of bacteriophage replication: implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems. Appl. Environ. Microbiol. **49**: 19-23
- Willets, N. and Crowther, C.** 1981: Mobilization of the non-conjugative IncQ plasmid RSF1010. Genet. Res. Camb. **37**: 311-316
- Williams, D.R. and Thomas, C.M.** 1992: Active partitioning of bacterial plasmids. J. Gen. Microbiol. **138**: 1-16
- Williamson, K.E., Radosevich, M. and Wommack, E.K.** 2005: Abundance and diversity of viruses in six Delaware soils. Appl. Environ. Microbiol. **71**: 3119-3125
- Wilkins, B.M. and Thomas, A.T.** 2000: DNA-independent transport of plasmid primase protein between bacteria by the I1 conjugation system. Mol. Microbiol. **38** (3): 650-657
- Wilkins, B.M.** 2002: Plasmid promiscuity: meeting the challenge of DNA immigration control. Environmental Microbiol. **4**: 495-500
- Winans, S.C. and Walker, G.C.** 1985: Fertility inhibition of RP1 by IncN plasmid pKM101. J. Bacteriol. **161**: 425-427
- Winans, S.C. and Walker, G.C.** 1985: Conjugal transfer system of the N incompatibility plasmid pKM101. J. Bacteriol. **161**: 402-410
- Woese, C.R.** 1987: Bacterial evolution. Microbiol. Rev. **51**: 221-271

- Yates, M.V., Gerba, C.P. and Kelley, L.M.** 1985: Virus persistence in groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 778-781
- Young, R., Wang, I.-N. and Roof, W.D.** 2000: Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends in Microbiology* **8**(3): 120-128
- Yu, C-P., Ahuja, R., Sayler, G. and Chu, K-H** 2005: Quantitative molecular assay for fingerprinting microbial communities of wastewater and estrogen-degrading consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 1433-1444
- Yusoff, K. and Stanisich, V.A.** 1984: Location of a function on RP1 that fertility inhibits IncW plasmids. *Plasmid* **11**: 178-181
- Zatyka, M., Jagura-Burdzy, G. and Thomas, C.M.** 1994: Regulation of transfer genes of promiscuous IncP α plasmid RK2: repression of Tral region transcription both by relaxosome proteins and by the Trall regulator TrbA. *Microbiology* **140**: 2981-2990
- Zatyka, M. and Thomas, C.M.** 1998: Control of genes for conjugative transfer of plasmids and other mobile elements. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**: 291-319
- Zeph, L.R., Onaga, M.A. and Stotzky, G.** 1988: Transduction of *Escherichia coli* by bacteriophage P1 in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1731-1737
- Ziegelin, G., Fürste, J.P. and Lanka, E.** 1989: TraJ protein of plasmid RP4 binds to a 19-base pair inverted sequence repetition within the transfer origin. *J. of Biol. Chem.* **264**: 11989-11994
- Ziegelin, G., Pansegrau, W., Strack, B., Balzer, D., Kröger, M., Kruff, V. and Lanka, E.** 1991: Nucleotide sequence and organisation of genes flanking the transfer origin of promiscuous plasmid RP4. *DNA Sequence J.* **1**: 303-327
- Ziermann, R. und Calendar, R.** 1990: Characterisation of the *cos* sites of bacteriophages P2 and P4. *Gene* **96**: 9-15
- Zimmer, M., Sattelberger, E., Inman, R.B., Calendar, R. and Loessner, M.J.** 2003: Genome and proteome of *Listeria monocytogenes* phage PSA: an unusual case of programmed +1 translational frameshifting in structural protein synthesis. *Mol. Microbiol* **50**: 303-317
- Zinder, N.D. and Lederberg, J.** 1952: Genetic exchange in *Salmonella*. *J. Bacteriol.* **64**: 679-699

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
Abb.	Abbildung
Acc.	Accession (Nummer)
ad	auffüllen auf
add.	zugeben von
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyphosphat
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
ccc	covalently closed circle
cfu	colony forming unit
Cm	Chloramphenicol
cos	covalently closed
C-terminal	Carboxyterminaler Bereich von Polypeptiden
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
deion.	deionisiert
dig	Digoxigenin
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Dtr	DNA transfer und Replikation
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetra-acetat
EGTA	Ethylen-glycolbis-(aminoethyl)-tetra-essigsäure
<i>et al.</i>	und andere
EtOH	Ethanol
F	Farad
g	Gramm
<i>gfp</i>	green fluoreszent protein
Gm	Gentamicin
h	Stunde
HCl	Salzsäure
Inc	Inkompatibilität
IPTG	Isopropyl- β -thiogalacopyranosid
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
L	Liter
Lsg	Lösung
λ	Lambda, Lambda-Phage
log	logarithmisch
M	Mol
m	milli
MeOH	Methanol
<i>mer</i>	Quecksilberresistenzgene

Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro
mcs	multiple cloning site
min	Minute
mpf	mating pair formation
mob	Mobilisierung
moi	multiplicity of infection
N	Normalität
NaOH	Natronlauge
NBT	Nitroblue-Tetrazoliumchlorid
NEB	New England Biolabs
nt	Nukleotid
N-terminal	Aminoterminaler Bereich von Polypeptiden
Nx	Nalidixinsäure
o.D.	optische Dichte
<i>orf</i>	offenes Leseraster
ORF	Genprodukt eines offenen Leserasters
<i>oriT</i>	origin of DNA transfer
<i>oriV</i>	origin of replication
Ω	Ohm
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
pfu	plaque forming unit
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
r	resistent
Rif	Rifampicin
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
Sm	Streptomycin
Tab.	Tabelle
Tc	Tetracyclin
<i>tra</i>	Transfer
TEMED	N, N, N', N',- Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Enzymeinheit, Unit
üNK	Übernacht-Kultur
üN	über Nacht
ÜS	Überstand
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
v/v	Volumen zu Volumen
w/v	Gewicht zu Volumen
z.B.	zum Beispiel
X-Gal	5-Bromo-4-chlor-3-indolyl- β -Galaktopyranosid
zentr.	zentrifugieren

8. Anhang

8.1 Tabelle aller aus dem Oetkerparkteich isolierte Bakterienstämme

Nr.	Gattung	Farbe	Plasmidgröße in kb	Phage	Resistenzen
O1		w			
O2	<i>Pseudomonas</i> II	w			
O3	<i>Pseudomonas</i> II	w			
O4	<i>Pseudomonas</i> II	w			
O5	<i>Aeromonas</i>	w	80, 25		Amp
O6	<i>Pseudomonas</i> II	w			
O7	<i>Pseudomonas</i> II	w			
O8	<i>Pseudomonas</i> II	w			
O9	<i>Aeromonas</i>	w			
O10a	<i>Pseudomonas</i> II	w			
O10b	<i>Pseudomonas</i> II	w			
O11	<i>Aeromonas</i>	w			
O11c	<i>Flavobacterium</i>	g			
O12	<i>Pseudomonas</i> I	w			
O13	<i>Aeromonas</i>	w			
O14		w			
O15		hg	85, 80		Cm
O16	<i>Pseudomonas</i> II	w			
O17	<i>Aeromonas</i>	w			
O18	<i>Aeromonas media</i>	w	25	ja	Amp
O19	<i>Aeromonas</i>	w	85		Amp
O20		w			
O21		w			
O22		dg			
O23	<i>Pseudomonas</i> I	w			
O24		w			
O25		g	100, 90, 50		
O26		leicht orange			
O27	<i>Pseudomonas</i> I	hg			
O28	<i>Pseudomonas</i> II	w			
O29	<i>Pseudomonas</i> I	w			
O30		hg			
O31		w			
O32		w			
O33	<i>Pseudomonas</i> II	hg	30		Cm
O34		dg	66		Sm, Amp
O35		w			
O36		w			
O37		orange braun	85, 20		Amp
O38		w			
O39		g			
O40	<i>Arthrobacter</i> II	g			
O41		dg	40, 3		Nx, Gm, Km
O42		dg			
O43	<i>Pseudomonas</i> II	g			
O44		leicht orange			

Anhang

Nr.	Gattung	Farbe	Plasmid	Phage	Resistenzen
O45		g			
O46	<i>Hydrogenophaga</i>	hg			
O47		orange braun	18		Gm, Amp
O48	<i>Hydrogenophaga</i>	hg			
O49		w			
O50	<i>Aeromonas</i>	w	22		Amp
O51	<i>Aeromonas</i>	w			
O52	<i>Aeromonas</i>	w	100		Sm, Amp
O53	<i>Pseudomonas</i> II	w			
O54	<i>Pseudomonas</i> II	w			
O55	<i>Pseudomonas</i> I	w			
O56	<i>Aeromonas</i>	w			
O57		w			
O58	<i>Aeromonas media</i>	w		ja	
O59	<i>Aeromonas</i>	w			
O60	<i>Rhanella</i>	w	30		Cm Amp
O61		w			
O62	<i>Pseudomonas</i> I	w			
O63	<i>Pseudomonas</i> II	w			
O64	<i>Pseudomonas</i> II	w			
O65	<i>Pseudomonas</i> I	w			
O66	<i>Pseudomonas</i> I	w			
O67	<i>Hydrogenophaga</i>	hg			
O68		w			
O69	<i>Aeromonas</i>	w			
O70	<i>Aeromonas</i>	w			
O71		w			
O72	<i>Pseudomonas</i> I	w	30		Nx, Cm, Amp
O73	<i>Aeromonas</i>	w			
O74		w			
O75	<i>Hydrogenophaga</i>	hg	21		
O76	<i>Aeromonas</i>	w			
O77	<i>Aeromonas</i>	w			
O78	<i>Pseudomonas</i> I	w			
O79	<i>Pseudomonas</i> I	w			
O80	<i>Pseudomonas</i> II	w			
O81	<i>Aeromonas</i>	w		ja P	
O82	<i>Aeromonas</i>	w			
O83	<i>Hydrogenophaga</i>	hg			
O84	<i>Pseudomonas</i> II	w			
O85	<i>Aeromonas</i>	w	21		Amp
O86	<i>Pseudomonas</i> II	w			
O87		w			
O88		g		ja	
O89		w	21		Amp
O90	<i>Aeromonas</i>	w			
O91		hg			
O92	<i>Aeromonas</i>	w			
O93		w			
O94		w			
O95		w			
O96	<i>Pseudomonas</i> II	w			

Anhang

Nr.	Gattung	Farbe	Plasmid	Phage	Resistenzen
O97		w			
O98	<i>Aeromonas</i>	w			
O99		w			
O100	<i>Pseudomonas</i> II	w			
O101	<i>Aeromonas</i>	w			
O102		w			
O103		w			
O104a		w			
O104b	<i>Aeromonas</i>	w			
O105	<i>Pseudomonas</i> II	w			
O106		w			
O107	<i>Pseudomonas</i> II	w			
O108		r			
O109		r			
O110		g			
O111		g			
O112	<i>Pseudomonas</i> II	w			
O113		g			
O114	<i>Pseudomonas</i> II	hg			
O115		g			
O116					
O117		g			
O118		hg			
O119		g			
O120		hg	30, 15		Nx, Cm, Amp
O121		g			
O122	<i>Arthrobacter</i> I	g			
O123		g			
O124		g			
O125		w			
O126		w			
O127		w			
O128		w			
O129					
O130		g			
O131		r			
O132		r			
O133		dg			
O134		r			
O135		g			
O136		r			
O137		r			
O138		g			
O139		w			
O140		w			
O141		hg			
O142		w			
O143		w			
O144					
O145		w			
O146		r	60, 6		keine
O147		g			

Anhang

Nr.	Gattung	Farbe	Plasmid	Phage	Resistenzen
O148		w			
O149		dg			
O150		g			
O151		g			
O152		g			
O153	<i>Aeromonas</i>	w			
O154		g			
O155		w			
O156		w			
O157		w			
O158		r			
O159		g			
O160		w			
O161	<i>Aeromonas</i>	w			
O162		w			
O163		w			
O164		dg			
O165	<i>Flavobacterium</i>	g			
O166		dg			
O167		g			
O168					
O169		w			
O170	<i>Arthrobacter</i> II	g			
O171		dg			
O172		g			
O173		dg			
O174		w			
O175		w			
O176		r			
O177	<i>Arthrobacter</i> II	hg			
O178	<i>Flavobacterium</i>	dg			
O179	<i>Flavobacterium</i>	w			
O180	<i>Flavobacterium</i>	w			
O181		rosa			
O182		w	90, 35		Cm
O183					
O184		g			
O185		w			
O186	<i>Arthrobacter</i> II	hg			
O187		w			
O188		w	60		keine
O189		dg			
O190		g			
O191		dg			
O192		w			
O193		w	95		Amp
O194	<i>Flavobacterium</i>	dg			
O195		dg			
O196		g			
O197		w			
O198		w			
O199		w			

Anhang

Nr.	Gattung	Farbe	Plasmid	Phage	Resistenzen
O200		dg	95, 5		keine
O201		w			
O202		dg			
O203		rosa			
O204		rosa			
O205		w			
O206		w			
O207	<i>Pseudomonas</i> I	w			
O208		w			
O209		r			
O210		w	12		keine
O211		orange rot			
O212	<i>Brevundimonas</i>	r			
O213		orange rot			
O214	<i>Brevundimonas</i>	r			
O215	<i>Arthrobacter</i> II	hg			
O216	<i>Arthrobacter</i> II	hg			
O217	<i>Brevundimonas</i>	r			
O218		hg			
O219		g			
O220		dg			
O221	<i>E.coli</i>	w	1.8, 2.3, 3.5, 3.8, 4, 20, 30, 80, 85, 88	ja	Cm
O222					
O223		w			
O224	<i>Pseudomonas</i>	w			
O225					
O226	<i>Pseudomonas</i> II	w	88, 21		Nx, Amp
O227		dg			
O228		dg			
O229		w			
O230	<i>Pseudomonas</i> II	hg			
O231		dg			
O232	<i>Streptomyces</i>	w			
O233	<i>Pseudomonas</i> II	rosa		ja	
O234		rosa			
O235	<i>Flavobacterium</i>	g			
O236		w			
O237	<i>Flavobacterium</i>	g			
O238	<i>Aeromonas</i>	w		ja	
O239		w			
O240		g			
O241					
O242	<i>Pseudomonas</i> II	w			
O243		g			
O244		w			
O245		w			
O246		w			
O247		orange			
O248	<i>Pseudomonas</i> II	rosa			
O249	<i>Arthrobacter</i>	orange			
O250	<i>Arthrobacter</i>	orange			

Anhang

Nr.	Gattung	Farbe	Plasmid	Phage	Resistenzen
O251		dg			
O252		w			
O253		hg			
O254	<i>Arthrobacter</i> I	w			
O255	<i>Arthrobacter</i> II	hg			
O256		g			
O257	<i>Streptomyces</i>	w			
O258		g			
O259		g	50		Nx, Km, Amp
O260	<i>Hydrogenophaga</i>	hg	10		Cm, Amp
O261	<i>Arthrobacter</i> I	w		ja	
O262	<i>Arthrobacter</i> II	g		ja	
O263		w		ja	
O264	<i>Arthrobacter</i> II	g			
O265		w	86		Nx, Cm
O266		orange			
O267		rosa			
O268		w			
O269	<i>Hydrogenophaga</i>	g			
O270	<i>Arthrobacter</i> I	w			
O271	<i>Hydrogenophaga</i>	w	80		Amp
O272	<i>Brevundimonas</i>	orange		ja	
O273		dg			
O274		w			
O275	<i>Arthrobacter</i> I	g			
O276		dg			
O277		g			
O278	<i>Arthrobacter</i> II	hg			
O279		w			
O280	<i>Streptomyces</i>	w			
O281		g	86		Nx, Gm, Cm
O282		orange			
O283	<i>Brevundimonas</i>	orange		ja	
O284	<i>Brevundimonas</i>	orange			
O285		orange			
O286	<i>Pseudomonas</i> I	w			
O287a		w			
O287b		w			
O287c		r			
O288		g			
OB1	<i>Chromobacterium</i>	s			
OB2	<i>Chromobacterium</i>	s			
OB3	<i>Chromobacterium</i>	s			
OB4	<i>Chromobacterium</i>	s			
OB5	<i>Chromobacterium</i>	s			

Tabelle aller aus dem Oetkerparkteich isolierter Bakterienstämme. Die Abkürzungen bei der Farbzunordnung stehen für: weiß (w), gelb (g), rot (r), hell (h), schwarz (s) und dunkel (d).

8.2 Tabelle aller aus dem Schlosshofteich isolierte Bakterienstämme

Nummer	Gattung	Farbe	Plasmidgröße in kb	Phage	Resistenzen
S1	<i>Pseudomonas</i> II	w			
S2	<i>Pseudomonas</i> II	w			
S3	<i>Pseudomonas</i> I	w			
S4	<i>Pseudomonas</i> I	w			
S5	<i>Pseudomonas</i> I	w			
S6	<i>Pseudomonas</i> II	w			
S7	<i>Pseudomonas</i> II	w			
S8	<i>Pseudomonas</i> II	w			
S9	<i>Pseudomonas</i> II	w			
S10	<i>Pseudomonas</i> I	w			
S11	<i>Pseudomonas</i> II	w			
S12		w			
S13	<i>Pseudomonas</i> II	w			
S14	<i>Pseudomonas</i> II	w			
S15	<i>Pseudomonas</i> II	w			
S16	<i>Pseudomonas</i> II	w	85		Nx, Gm, Amp
S17	<i>Arthrobacter</i> I	neongelb			
S18	<i>Flavobacterium</i>	dg			
S19	<i>Aeromonas</i>	hg			
S20	<i>Aeromonas</i>	g			
S21		w			
S22	<i>Pseudomonas</i> II	w			
S23	<i>Pseudomonas</i> I	g			
S24	<i>Aeromonas</i>	w			
S25		w			
S26	<i>Aeromonas media</i>	w		ja	
S27	<i>Aeromonas</i>	w			
S28		w			
S29		w			
S30		w		ja	
S30D	<i>Aeromonas</i>	w			
S31		w			
S32	<i>Aeromonas</i>	w		ja	
S32D	<i>Aeromonas</i>	w			
S33		w			
S34		w	60, 15		
S35	<i>Aeromonas</i>	w	10		Gm, Amp
S36	<i>Pseudomonas</i> II	w			
S37		w			
S38		w			
S39	<i>Pseudomonas</i> II	w			
S40	<i>Pseudomonas</i> II	w			
S41		w			
S42	<i>Pseudomonas</i> I	w			
S43		w			
S44		w			
S45	<i>Aeromonas</i>	w			
S46	<i>Aeromonas</i>	w			
S47		w			
S48		w			

Anhang

Nummer	Gattung	Farbe	Plasmidgröße in kb	Phage	Resistenzen
S49		w			
S50		w			
S51	<i>Pseudomonas</i> I	w			
S52	<i>Aeromonas</i>	w			
S53	<i>Aeromonas</i>	w		ja	
S54		w			
S55		w			
S56	<i>Pseudomonas</i> I	w			
S57		w			
S58		w			
S59		w	45		keine
S60		w			
S61	<i>Aeromonas</i>	w			
S62		w			
S63		w			
S64		w			
S65	<i>Pseudomonas</i> I	w			
S66		w			
S67		w			
S68		w			
S69	<i>Aeromonas</i>	w			
S70		w			
S71		w			
S72	<i>Pseudomonas</i> I	w			
S73		w			
S74		w			
S75		w			
S76		w			
S77		w			
S78		g			
S79		w			
S80		hg			
S81		w			
S82		w			
S83		w			
S84		w			
S85		w			
S86		w			
S87		g			
S88		hg			
S89		w			
S90		w			
S91		w			
S92		hr			
S93	<i>Flavobacterium</i>	dg			
S94		g			
S95		w			
S96		w			
S97		w			
S98		w			
S99					
S100		w			

Anhang

Nummer	Gattung	Farbe	Plasmidgröße in kb	Phage	Resistenzen
S101	<i>Pseudomonas I</i>	w			
S102	<i>Flavobacterium</i>	g			
S103		w			
S104		w			
S105		w			
S106		w			
S107		w			
S108	<i>Pseudomonas I</i>	w			
S109		g			
S110		w			
S111		w			
S112		hg			
S113		w			
S114	<i>Flavobacterium</i>	w			
S115	<i>Aeromonas</i>	w			
S116		w			
S117	<i>Pseudomonas I</i>	w		ja	
S118	<i>Pseudomonas I</i>	w		ja	
S119		w			
S120		w			
S121a	<i>Pseudomonas II</i>				
S121b					
S121c	<i>Brevundimonas</i>	r		ja	
S122	<i>Flavobacterium</i>	dg			
S123	<i>Flavobacterium</i>	g			
S124		g			
S125		w			
S126					
S127		g			
S128		w			
S129					
S130		g			
S131	<i>Flavobacterium</i>	hg			
S132		w			
S133		g			
S134		g			
S135		r			
S136		g			
S137		w			
S138		g			
S139	<i>Flavobacterium</i>	g	90, 88, 30		keine
S140		g			
S141		w			
S142		w			
S143	<i>Aeromonas</i>	w			
S144		g			
S145		g			
S146		g			
S147		g			
S148		w			
S149		g			
S150		g			

Anhang

Nummer	Gattung	Farbe	Plasmidgröße in kb	Phage	Resistenzen
S151	<i>Aeromonas</i>	w			
S152		g			
S153a			60, 8		keine
S153b					
S154		g			
S155		g			
S156		g			
S157					
S158		w			
S159	<i>Pseudomonas</i> II	w			
S160		w			
S161		w			
S162	<i>Aeromonas</i>	w			
S163		w			
S164		dg			
S165		g	90, 80, 30		keine
S166	<i>Pseudomonas</i> I	w			
S167		g	89, 15		Sm, Amp
S168	<i>Arthrobacter</i> I	g	95, 90		Sm
S169	<i>Pseudomonas</i> II	w			
S170		g			
S171		w			
S172		hr			
S173		w			
S174		w			
S175		g			
S176	<i>Pseudomonas</i> I				
S177		w			
S178		w			
S179		g			
S180		g			
S181		orange			
S182		g	90, 88, 30		keine
S183					
S184	<i>Arthrobacter</i> I	g			
S185	<i>Pseudomonas</i> I	w			
S186		w			
S187		w			
S188		w			
S189		g			
S190	<i>Pseudomonas</i> II	w			
S191					
S192		w			
S193		dg			
S194		w			
S195	<i>Aeromonas</i>	w			
S196		g			
S197		w			
S198					
S199		g	90, 88, 30		Nx
S200		w			
S201		neongelb			

Anhang

Nummer	Gattung	Farbe	Plasmidgröße in kb	Phage	Resistenzen
S202		g			
S203	<i>Pseudomonas</i> II	w			
S204		g			
S205		orange			
S206		g			
S207		g			
S208	<i>Pseudomonas</i> II	w			
S209		dg	90, 88, 30		keine
S210		hg			
S211		hell w			
S212		hg			
S213	<i>Pseudomonas</i> II	w			
S214	<i>Pseudomonas</i> II	w			
S215		w			
S216		w			
S217		w			
S218	<i>Streptomyces</i>	w			
S219		w			
S220		g			
S221	<i>Flavobacterium</i>	hg			
S222		dg			
S223		w			
S224		w			
S225		rosa			
S226		hell w			
S227		w			
S228	<i>Pseudomonas</i> II	w		ja	
S229		w			
S230		hg			
S231		hg			
S232	<i>Pseudomonas</i> I	w			
S233		dg			
S234		w			
S235		w			
S236	<i>Aeromonas</i>	g			
S237	<i>Aeromonas</i>	g			
S238		w			
S239	<i>Pseudomonas</i> II	w		ja	
S240		g			
S241		g			
S242	<i>Aeromonas</i>	w			
S243		g			
S244	<i>Pseudomonas</i> II	w			
S245	<i>Pseudomonas</i> II	w			
S246		w			
S247		w			
S248	<i>Pseudomonas</i> I	w			
S249		g			
S250		g			
S251	<i>Pseudomonas</i> I	w			
S252	<i>Pseudomonas</i> I	g			

Tabelle aller aus dem Schloßhofteich isolierter Bakterienstämme. Die Abkürzungen bei der Farbzuordnung stehen für: weiß (w), gelb (g), rot (r), hell (h) und dunkel (d).

8.3 Tabelle aller aus dem Meierteich isolierte Bakterienstämme

Nummer	Gattung	Farbe	Plasmidgröße in kb	Phage	Resistenzen
M1	<i>Aeromonas</i>	w			
M2	<i>Escherichia coli</i>	w	85, 78, 27	ja	keine
M3		w			
M4	<i>Escherichia coli</i>	w	85, 78, 27		keine
M5		w			
M6		w			
M7	<i>Escherichia coli</i>	w	80, 78		keine
M8	<i>Aeromonas</i>	w	18, 10		Amp
M9	<i>Pseudomonas</i> II	w	70		keine
M10	<i>Aeromonas</i>	w			
M11	<i>Escherichia coli</i>	w	1.8, 2.3, 2.4, 3.3, 3.5, 3.8, 30, 85, 86		Sm, Cm, Amp
M12	<i>Pseudomonas</i> II	w	70		keine
M13		w			
M14	<i>Aeromonas</i>	w			
M15	<i>Escherichia coli</i>	w	1.5, 2.4, 2.6, 3.2, 3.3, 4.2, 5.3, 7, 8.5, 15, 86		Sm, Cm, Km, Amp
M16	<i>Pseudomonas</i> II	w			
M17	<i>Pseudomonas</i> II	w			
M18		w			
M19	<i>Pseudomonas</i> II	w	40		keine
M20	<i>Shigella</i>	w			
M21	<i>Pseudomonas</i> II	w			
M22	<i>Pseudomonas</i> II	w			
M23		w			
M24	<i>Pseudomonas</i> II	w			
M25	<i>Escherichia coli</i>	w	2.3, 3.5, 3.8, 84, 85	ja P	Sm, Cm, Amp
M26	<i>Escherichia coli</i>	w	2.3, 2.4, 3.4, 78, 88	ja P	Cm
M27	<i>Escherichia coli</i>	w	1.8, 2.5, 3.5, 3.8, 20, 85		Sm, Cm, Amp
M28		w			
M29	<i>Pseudomonas</i> II	w	70		Nx, Cm, Amp
M30		w			
M31		hg			
M32		dg			
M33		g			
M34	<i>Aeromonas</i>	w	100, 15, 4.5	ja	keine
M35		w			
M36		w	80		Nx, Sm
M37		w	55		keine
M38		w			
M39		w			
M40		w			
M41		hell orange			
M42	<i>Bacillus</i>	w			
M43		w			
M44		w			
M45		w			
M46		w			
M47	<i>Pseudomonas</i> II	w			
M48	<i>Aeromonas</i>	w			
M49a		orange			

Anhang

Nummer	Gattung	Farbe	Plasmidgröße in kb	Phage	Resistenzen
M49b		w			
M50		w			
M51	<i>Aeromonas</i>	w			
M52	<i>Escherichia coli</i>	w	2.3, 2.4, 3.5, 3.8, 20, 30, 83, 84		Sm, Cm, Amp
M53	<i>Pseudomonas</i> II	w			
M54		w			
M55	<i>Aeromonas</i>	w			
M56	<i>Pseudomonas</i> II	w			
M57		w			
M58		w			
M59		w			
M60		w			
M61	<i>Aeromonas</i>	w			
M62	<i>Pseudomonas</i> II	w			
M63	<i>Aeromonas</i>	w		ja	
M64		w			
M65		w			
M66		w			
M67		w			
M68		w			
M69	<i>Pseudomonas</i> I	hg			
M70		w			
M71a					
M71b					
M72	<i>Pseudomonas</i> II	w			
M73	<i>Pseudomonas</i> II	w			
M74	<i>Aeromonas</i>	w	93, 13		Sm, Km, Amp
M75a		w			
M75b	<i>Pseudomonas</i> I	w			
M76		w			
M77	<i>Pseudomonas</i> II	w			
M78	<i>Pseudomonas</i> II	w	1.8, 2.3, 2.4, 3.3, 3.5, 3.8, 20, 30, 85		Sm, Cm, Amp
M79		w			
M80		w			
M81		w			
M82	<i>Aeromonas</i>	w	5		Sm, Amp
M83		w			
M84		w			
M85		w			
M86	<i>Pseudomonas</i> I	w			
M87		w			
M88		w			
M89	<i>Flavobacterium</i>	hg			
M90		w			
M91		hg			
M92	<i>Pseudomonas</i> I	hg	100		keine
M93		w		ja	
M94		w			
M95		w			
M96		w			
M97	<i>Escherichia coli</i>	w	6		Amp

Anhang

Nummer	Gattung	Farbe	Plasmidgröße in kb	Phage	Resistenzen
M98		g			
M99		w			
M100	<i>Pseudomonas I</i>	w			
M101	<i>Escherichia coli</i>	w	1.8, 2.3, 3.5, 3.8, 4, 20, 30, 80, 85, 88	ja	Sm, Km, Amp
M102	<i>Flavobacterium</i>	dg			
M103		w			
M104		w			
M105		w			
M106		w			
M107		w			
M108		w			
M109		w			
M110		w			
M111		w			
M112		w			
M113		g			
M114	<i>Pseudomonas I</i>	hg			
M115	<i>Pseudomonas I</i>	w			
M116					
M117	<i>Flavobacterium</i>	w			
M117 a		gelb			
M118		w			
M119		w			
M120		w			
M121	<i>Pseudomonas I</i>	w			
M122		g			
M123		dg			
M124	<i>Flavobacterium</i>	g			
M125		g			
M126		g			
M127a					
M127b				ja	
M128		g			
M129	<i>Pseudomonas II</i>	w			
M130		w			
M131					
M132		w			
M133					
M134		w	100, 65		Km, Amp
M135		w			
M136	<i>Flavobacterium</i>	g			
M137		dg			
M138		g			
M139		w			
M140		w			
M141		g	25		Gm, Km
M142	<i>Aeromonas</i>	w			
M143		w			
M144	<i>Pseudomonas II</i>	w		ja	
M145		w			
M146		w			
M147	<i>Pseudomonas II</i>	w			

Anhang

Nummer	Gattung	Farbe	Plasmidgröße in kb	Phage	Resistenzen
M148		w			
M149		w			
M150		g			
M151		hg			
M152		w			
M153		w			
M154		w			
M155		w			
M156					
M157		w			
M158		w			
M159		w			
M160		w			
M161		w			
M162		dg	35		Nx, Sm, Amp
M163		w			
M164	<i>Brevundimonas</i>	orange/rot		ja	
M165					
M166		g	95, 90, 22		Sm
M167		g			
M168	<i>Aeromonas</i>				
M169		g			
M170		w			
M171		w			
M172	<i>Aeromonas</i>	w			
M173		w			
M174	<i>Bacillus cereus</i>	w			
M175	<i>Flexibacter</i>	w			
M176		hg			
M177	<i>Pseudomonas</i> II	w			
M178		w			
M179		w			
M180a					
M180b	<i>Flexibacter</i>				
M181		w			
M182		g	25		keine
M183	<i>Flexibacter</i>	w			
M184		hg			
M185		w			
M186		w			
M187		w			
M188		hg			
M189	<i>Pseudomonas</i> II	w			
M190	<i>Flexibacter</i>	g			
M191		w			
M192		rosa			
M193		g			
M194		g	60, 40		Amp
M195		g			
M196		g			
M197	<i>Flavobacterium</i>	g			
M198		g			

Anhang

Nummer	Gattung	Farbe	Plasmidgröße in kb	Phage	Resistenzen
M199		w			
M200		w			
M201		g		ja	
M202					
M203	<i>Pseudomonas</i> II	w		ja	
M204		w			
M205		w			
M206a	<i>Bacillus cereus</i>				
M206b	<i>Pseudomonas</i> I				
M207		w			
M208		g			
M209		w			
M210	<i>Pseudomonas</i> II	w			
M211		w			
M212a					
M212b	<i>Flavobacterium</i>				
M213		rosa			
M214		w			
M215		w			
M216					
M217		w			
M218		w			
M219a				ja	
M219b					
M220		w			
M221	<i>Pseudomonas</i> II	w			
M222		w			
M223		w			
M224		w			
M225	<i>Pseudomonas</i> I	w			
M226		w			
M227a	<i>Pseudomonas</i> II				
M227b	<i>Pseudomonas</i> II				
M228	<i>Bacillus cereus</i>				
M229	<i>Bacillus cereus</i>	w			
M230		hg			
M231	<i>Bacillus cereus</i>	w			
M232	<i>Pseudomonas</i> II	w		ja	
M233					
M234	<i>Aeromonas</i>	w			
M235	<i>Flexibacter</i>	w			
M236	<i>Flexibacter</i>	w			
M237		w			
M238					
M239		w		ja	
M240		hg			
M241	<i>Pseudomonas</i> II	g			
M242		w	90	ja	Amp
M243		w			
M244		w			
M245		w			
M246		w			

Anhang

Nummer	Gattung	Farbe	Plasmidgröße in kb	Phage	Resistenzen
M247		w			
M248	<i>Hydrogenophaga</i>	w			
M249	<i>Pseudomonas</i> II	w			
M250		w			
M251	<i>Bacillus cereus</i>	w			
M252		w			
M253		g			
M254		w			
M255		w			
M256	<i>Arthrobacter</i>	w			
M257		w			
M258		w	120, 25		keine
M259		g			
M260		g			
M261		g	90, 65		Nx, Amp
M262		w			
M263		g	90, 55		keine
M264		w			
M265		g			
M266		w			
M267		w			
M268		w			
M269	<i>Aeromonas</i>	w			
M270		w			
M271a					
M271b	<i>Flexibacter</i>				
M272	<i>Aeromonas</i>	g			
M273		w			
M274		w			
M275		w			
M276		w			
M277	<i>Pseudomonas</i> II	w			
M278	<i>Flavobacterium</i>	g	93, 55		Amp
M279	<i>Flexibacter</i>	w			
M280		w			
M281		w			

Tabelle aller aus dem Meierteich isolierter Bakterienstämme. Die Abkürzungen bei der Farbzuoordnung stehen für: weiß (w), gelb (g), rot (r), hell (h) und dunkel (d).

8.4 Testergebnisse des api 20 E Identification Strip von bio Mérieux für die Isolate M2 und M101

Test		Ergebniss
ONPG	2-nitrophenyl-βD-galactopyranoside	+
ADH	L-arginine	-
LDC	L-lysine	-
ODC	L-ornithine	+
CIT	trisodium citrat	-
H ₂ S	sodium thiosulfat	-
URE	urea	-
TDA	L-tryptophane	-
IND	L-tryptophane	+
VP	sodium pyruvate	-
GEL	gelatin (bovine origin)	-
GLU	D-glucose	+
MAN	D-mannose	+
INO	Inositol	-
SOR	D-sorbitol	+
RHA	L-rhamnose	+
SAC	S-sucrose	-
MEL	D-melibiose	+
AMY	Amygdalin	-
ARA	L-arabinose	+
OX	oxidase test	-

8.5 Testergebnisse der Biolog GN2 Micro Plate™ für die Stämme *Brevundimonas vesicularis* ATCC 11426^T, LGM 2350^T, S121c und O283

Characteristic	ATCC 11426 ^I	LGM 2350 ^I	S121c	O283
Colour of colonies	orange	orange	orange	orange
Galactose	+	+	-	-
Fructose	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-
L-Rhamnose	w	-	+	+
L-Alanin	-	-	-	-
L-Aspartic acid	w	+	-	-
Succinate	+	+	+	+
L-Proline	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+
D-Mannose	-	-	-	-
N-Acetyl-D glucosamin	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+
D-Mannitol	w	-	-	-
α-Cyclodextrin		+	+	+
Dextrin		+	+	+
Glycogen		+	-	-
Tween		+	+	+
D-Cellobiose		+	+	+
β-Hydroxy Butyric Acid		+	+	+
L-Glutamic Acid		+	+	+

Mein Dank gilt all denen, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit hilfreich zur Seite gestanden haben. Herrn Prof. R. Eichenlaub und Herrn Prof. K.J. Heller danke ich für die Bereitschaft, meine Arbeit zu begutachten.

Prof. Mannesmann danke ich für die Bereitstellung seiner Daten, die einen Vergleich meiner Ergebnisse mit einer anderen bakteriellen Gemeinschaft aus dem Habitat Süßwasser ermöglicht haben.

Peter Heimann danke ich für seine fachkundige Hilfe und seiner unendlichen Geduld bei den kleinen und großen Problemen, die das Arbeiten am Elektronenmikroskop mit sich gebracht haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Dreiseiklmann für die vielen fachlichen und freundschaftlichen Gespräche und Diskussionen, die diese Zeit für mich unvergeßlich machen werden.

Anja und Ulrike danke ich für die schöne Zeit im Labor und die vielen Tips und Tricks, die sie mir beigebracht haben. Meinen Laborkollegen Claudia, Agnieszka, Kristina, Desirée und Nicole sowie allen anderen Mitgliedern des Lehrstuhls danke ich für die angenehme und humorvolle Zeit im Labor und die Aufmunterungen im Laboralltag.

Meinem Verlobten Andreas Buschmann danke ich für die Minimierung von Tippfehlern in dieser Arbeit und dafür, daß er mich nach jedem Fehlschlag wieder aufgebaut hat.

Meinen Eltern, Oma Klara und Tante Erika danke ich recht herzlich für ihre jahrelange Unterstützung und den positiven Zuspruch.

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Bielefeld, im Dezember 2005

Frauke Beilstein