

1 ERGEBNISSE

1.1 Umbau der Kulturapparatur

Stand der Technik zur Untersuchung von Räuber-Beuteoszillationen war bisher das Chemostatregime, bzw. die serielle oder sogar Batch-Kultur (KOTESWARA et al. 1989). Die Dauer der Experimente erstreckt sich von 24h (KOTESWARA et al. 1989) bis zu 30 Tagen (HAHN et al. 1998, TSUCHIYA & DRAKE 1972, HAHN & HÖFLE, 1999).

Nur wenige Publikationen erwähnen die Entstehung von Biofilmen in den Reaktoren und beziehen diese Beobachtung mit in ihre Ergebnisse ein (DRAKE & TSUCHIYA 1976, TOPIWALA & HAMER 1971).

Aufgrund von eigenen Beobachtungen und den Hinweisen aus den erwähnten Arbeiten, kann man davon ausgehen, dass sich in jedem befüllten Gefäß mit bakterieller Besiedelung nach etwa einer Woche ein Biofilm an der Gefäßoberfläche bildet. Die Bakterien verklumpen, bilden Flocken in der Suspension und sind nicht mehr zu quantifizieren, das Experiment muss eigentlich abgebrochen werden, wenn Mengenverhältnisse von Räuber und Beute in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt werden sollen (DRAKE & TSUCHIYA 1976).

Ein zweites wesentliches analytisches Problem in den erwähnten Arbeiten stellen die Intervalle der Probenentnahmen dar. Obwohl die Generationszeiten der eingesetzten Bakterien und Einzeller zwischen 2h (*E. coli*) und 3-8h (*D. discoideum*) liegen, betrug das kleinste Analyseintervall 12h (HAHN et al. 1998) und das größte Intervall 10 Tage (HAHN & HÖFLE 1999).

Unter Berücksichtigung der biologischen Eigenschaften der untersuchten Mikroorganismen wurde in dieser Arbeit ein Probeentnahmeintervall von 3h angestrebt. Dieses Intervall wurde lediglich in den Arbeiten von Drake & Tsuchiya (1976) erreicht (die Dauer des Experiments war auf nur 24h angesetzt).

Um die Entstehung von Biofilmen zu vermeiden (oder kontrolliert zuzulassen) und Probenentnahmen in kurzen Intervallen zu ermöglichen, wurde die Probenentnahme automatisiert.

1.2 Räuber-Beute-Oszillationen

Nach Umsetzung der geschilderten technischen Anpassungen wurde die zentrale Fragestellung bearbeitet:

- Treten bei variierenden Verdünnungsraten die von Lotka und Volterra prognostizierten ungedämpften Oszillationen zwischen Räuber- und Beutepopulation auf?

Es wurden drei unterschiedliche Verdünnungsraten (0,27/d, 0,57/d, 0,77/d) gewählt. Bei jeder Verdünnungsrate wurde ein Lauf mit Sterilisation des Reaktors ('Suspension') und ein Lauf bei dem die Bildung von Biofilmen im Reaktor erlaubt war ('Adhäsion'), durchgeführt. Damit gingen insgesamt sechs Läufe in die Analyse ein. Die Läufe 1.1., 2.1 und 3.1 sind Suspensions-Läufe (Endung: .1). Die Läufe 1.2., 2.2 und 3.2 sind Adhäsions-Läufe (Endung: .2).

Um die Schwingungen aller Läufe miteinander vergleichen zu können, wurden folgende Definitionen und Parameter eingesetzt:

Laut WKS-Sampling-Theorem (WHITTAKER, KOTELNIKOW, SHANNON) muss das Probenentnahmeintervall pro Oszillation mindestens halb so lang sein wie die Dauer der betrachteten Oszillation, um eine Schwingung gut wiederzugeben. In dieser Arbeit wurden vier Werte vorausgesetzt (Abbildung 12), um eine Oszillation abzubilden. Das Probenentnahmeintervall betrug drei Stunden, Schwingungen ab einer Dauer von 12 Stunden sollten somit gut abgebildet werden.

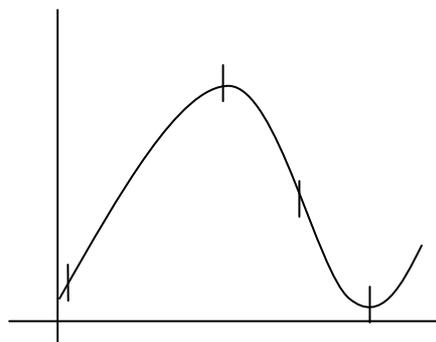


Abb.12: Definition einer Oszillation über mindestens vier Werte

ERGEBNISSE

Eine *Schwingung* (Abbildung 13) stellt eine zeitlich periodische Änderung einer Größe um einen Mittelwert dar. Als Auslenkung wird der Abstand des Schwingungsmaximums zur Ruhelage bezeichnet, die größtmögliche Auslenkung heißt *Amplitude*. Die Zeit, die vergeht, um eine volle Schwingung zu durchlaufen, wird als *Schwingungsdauer* bezeichnet. Eine volle Schwingung kann in Anlehnung an die Darstellung eines Kreises in 360° eingeteilt werden. Wird die Schwingung an einer bestimmten Stelle von einer zweiten Schwingung geschnitten, wird die Verschiebung beider Oszillationen als *Phasenverschiebung* in Grad angegeben. Als *zeitliche Verschiebung* wird hier die Zeit verstanden, die vergeht bis einem Beutemaximum ein Räubermaximum folgt. Die Anzahl von Schwingungen pro Zeiteinheit wird als *Frequenz* bezeichnet.

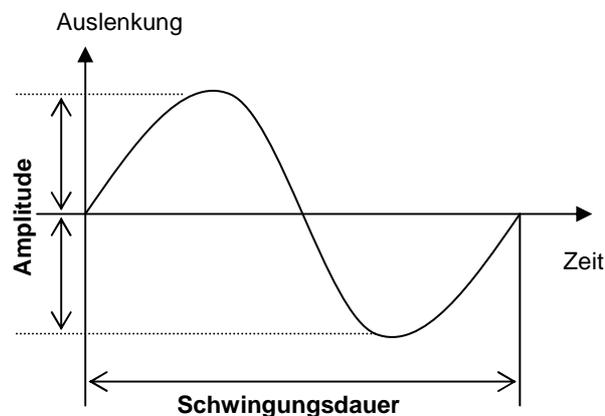


Abb.13: Zusammenhang zwischen Amplitude, Auslenkung und Schwingungsdauer

Nach Abschluss der Kurveninterpretation stellte sich heraus, dass nach dem oben geforderten WKS-Theorem in jedem Lauf zwei Kurven zu unterscheiden waren. Da sich beide Kurven hinsichtlich der Amplituden unterscheiden, wird hier der Graph mit der längeren Schwingungsdauer als 'große Welle', der mit der kürzeren Schwingungsdauer als 'kleine Welle' bezeichnet.

Die Schwingungen der großen Welle setzen sich aus vielen kleinen Räuber-Beute Oszillationen zusammen und stellen sozusagen eine Schwingung in der Schwingung dar.

Zunächst wird kurz die kleine Welle dargestellt:

ERGEBNISSE

1.2.1 Kleine Welle

Die oben beschriebene große Welle setzt sich teilweise aus kleineren Oszillationen zusammen (kleine Welle). Erst das Aneinanderfügen der Einzelabschnitte ließ eine detaillierte Untersuchung der großen Welle zu. Die Analyse der 58 Graphen der kleinen Welle ist im Anhang einzusehen. Aus Platzgründen werden dort nur die Abschnitte gezeigt, die gekoppelte Oszillationen aufweisen. Des Weiteren befindet sich im Anhang die detaillierte Darstellung der auch bei der großen Welle überprüften Parameter. Da die Existenz der kleinen Welle in dieser Arbeit dadurch bewiesen wird, dass auch hier die Räuberpopulation auf vorangegangene Beutemaxima reagiert, wird die Zusammenfassung der Schwingungsanalyse aller Läufe in Abbildung 14 kurz präsentiert.

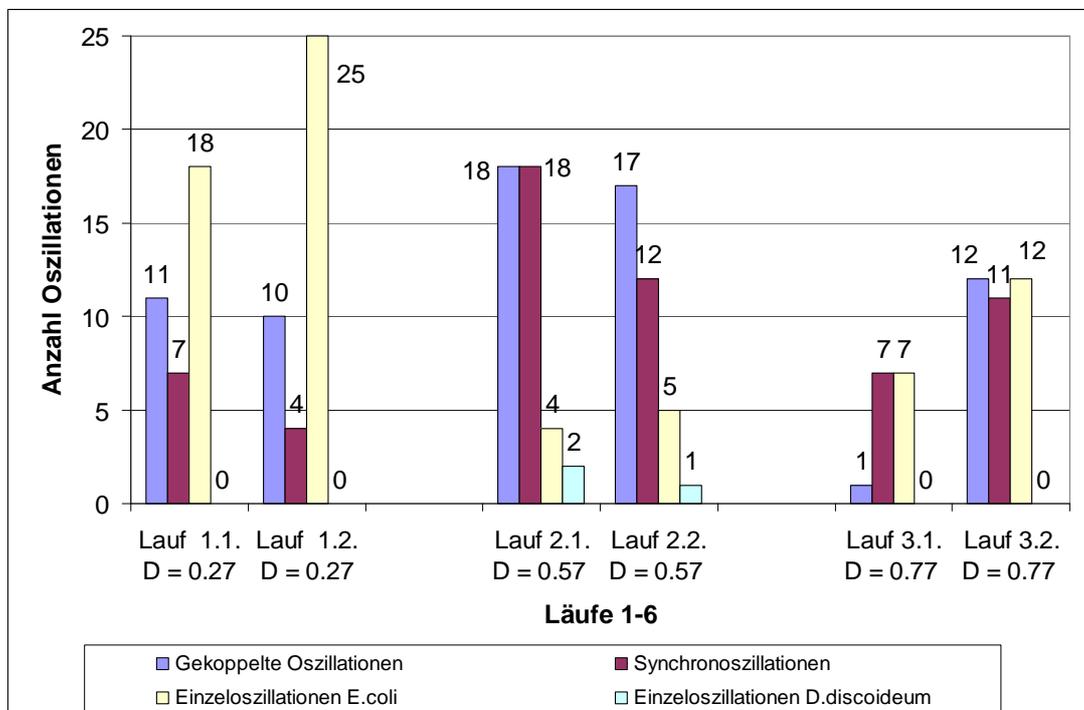


Abb.14: Vergleich der Oszillationsarten und -häufigkeiten über sechs Läufe und einen Zeitraum von 822h, kleine Welle

Als Einzeloszillationen beider Organismen werden Schwingungen bezeichnet, die ohne Kopplung zu anderen Oszillationen entstanden sind. Innerhalb von synchronen Oszillationen erreichen Beute- und Räuberpopulation zum gleichen Zeitpunkt das Maximum. Gekoppelte Oszillationen liegen dann vor, wenn sich Räubermaxima auf vorangegangene Beutemaxima zurückführen lassen. Nach Lotka und Volterra wird auch das Maximum der Beuteoszillation von der Räuberpopulation bestimmt, so dass eine gegenseitige Kopplung vorliegt. Nur in Lauf 2 treten in geringer Anzahl autonome Oszillationen von *D. discoideum* (1-2 Eigenoszillationen) auf. In den übrigen Läufe sind Räuberschwingungen immer Bestandteil von gekoppelten Oszillationen. Es kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei den

ERGEBNISSE

Räuberoszillationen um Einzelschwingungen handelt, die unabhängig von den Beuteoszillationen auftreten. In diesem Fall würden in den sechs Experimenten autonome Räuberoszillationen zu beobachten sein, deren Amplitude nicht mit Amplituden der Beutepopulation interferieren. Daraus folgt, dass ein Zusammenhang zwischen beiden Populationen besteht und die große Welle sich in den oben beschriebenen Abschnitten aus gekoppelten Schwingungen niedrigerer Schwingungsdauer (10-16h) konstituiert.

1.2.2 Grosse Welle

Zu Beginn werden alle Läufe, in denen die Entstehung eines Biofilms unterbunden wurde, dargestellt (aufgrund der kurzen Laufzeit und des atypischen Oszillationsverhaltens wird Lauf 3.1. zwar gezeigt, aber nur unter Vorbehalt diskutiert). Schwingungsdauer und Phasenverschiebung aller Läufe werden aus Gründen der Übersichtlichkeit im Anschluss an die qualitative Kurveninterpretation präsentiert. Die große Welle wird auf den folgenden Seiten in Diagrammen dargestellt, bei denen im oberem Teil alle Datenpunkte und im unteren Teil der gleitende Durchschnitt (14. Periode) dieser Datenpunkte gezeigt wird. Hierbei werden von jedem Datenpunkt einer Schwingung ausgehend sieben Werte gemittelt und dann als ein neuer Wert abgebildet. Die Abbildung der Mittelwerte aus jeweils 14 originären Datenpunkten der Kurve gleicht Ausreißer aus und lässt ein leichteres Erkennen von Schwingungsmustern zu. Um einen Vergleich zu den exponentiell zunehmenden Zellen herstellen zu können, ist ergänzend die Auswaschratesrate toter Partikel (wash-out) aufgetragen.

Römische Zahlen bezeichnen Beuteoszillationen, Großbuchstaben Räuberoszillationen.

ERGEBNISSE

Läufe in denen die Entstehung von Biofilmen unterbunden wurde

Lauf 1.1: $D=0,27/d$ (Suspension)

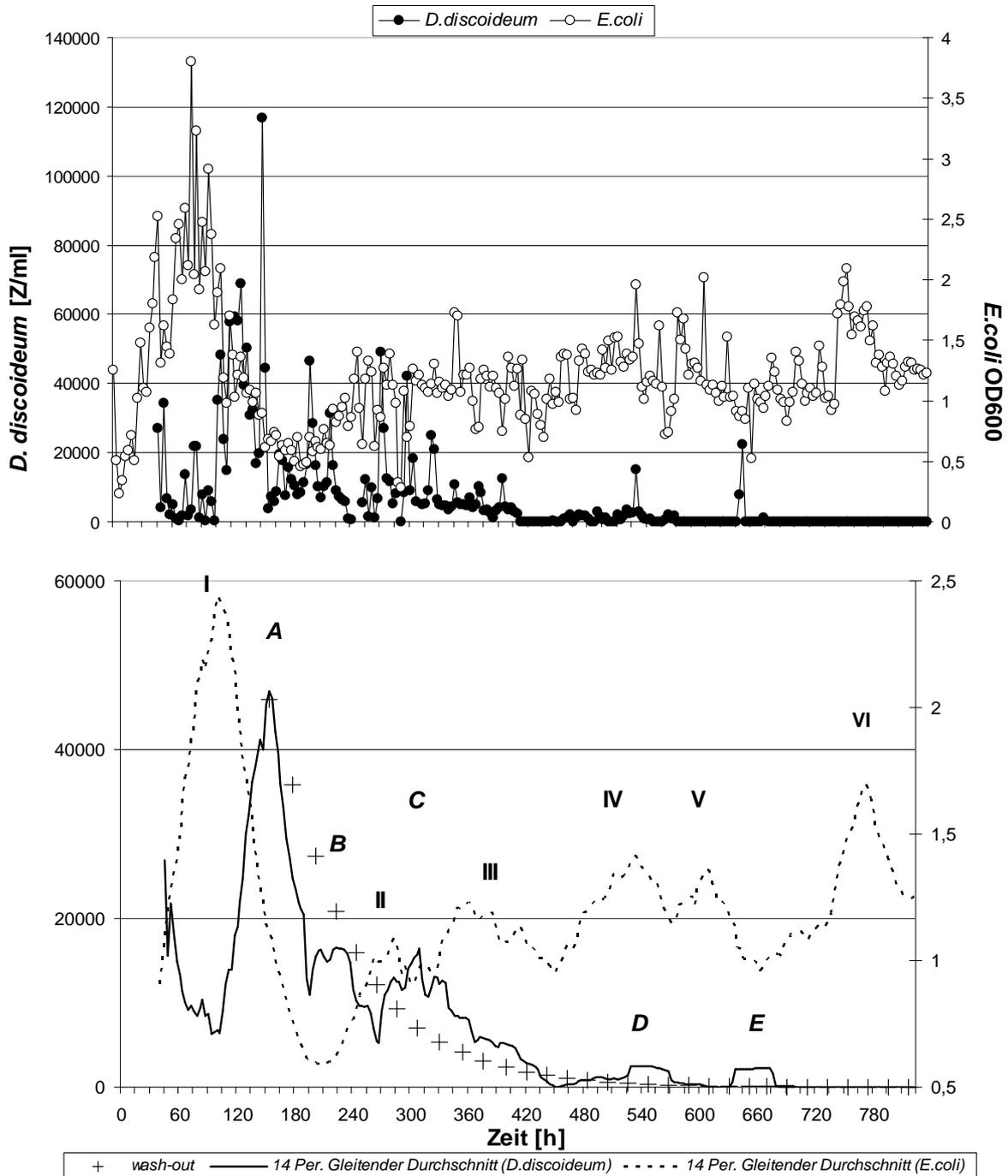


Abb. 15: Schwingungsmuster von *D. discoideum* und *E. coli* bei $D=0,27$

In einem Zeitraum von 822h treten sechs Beute- und fünf Räuberoszillationen auf. *D. discoideum* erreicht mit der ersten Oszillation (**A**) das Maximum von 116800 Z/ml. Die Maxima von **B** nach **E** nehmen kontinuierlich ab und schwanken um einen Mittelwert von 8113 Z/ml. Nach der maximalen Auslenkung **A** beträgt der Mittelwert der verbleibenden Oszillationen 4088 Z/ml. Die Biomasse von *E. coli* (MW=1,25) wird durch den Anstieg der Räuberpopulation (**A**) von 3,8 auf 0,47 (OD600) reduziert. Die Räubermaxima **C** und **E** folgen den Beutemaxima **II** und **IV** und unterbrechen das ab **II** entstehende Schwingungsmuster der Bakterienpopulation nur geringfügig. Im Unterschied zu den sich teilenden Zellen der Räuberpopulation, sind rechnerisch auch nach 822h noch Partikel (+) in der Kultur vorhanden. *D. discoideum* ist nach 663h ausgewaschen. In den Kurvenabschnitten von 48-250h und 270-327h setzt sich die große Welle aus Schwingungen der kleinen Welle zusammen.

ERGEBNISSE

Lauf 2.1: $D=0,57/d$ (Suspension)

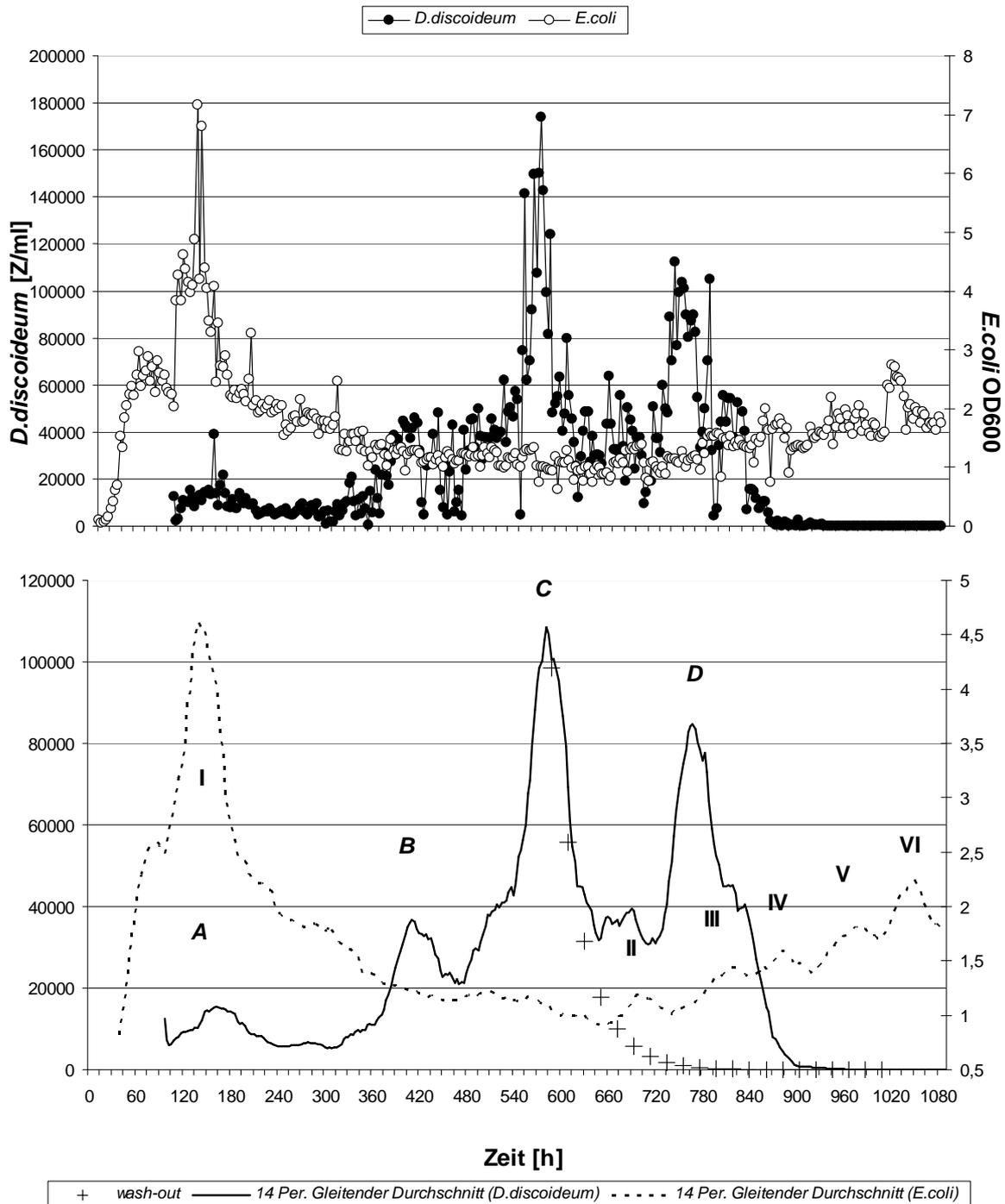


Abb.16: Schwingungsmuster von *D. discoideum* und *E. coli* bei $D=0,57$

Nach Erhöhung der Verdünnungsrate werden in 822h drei Beuteoszillationen und vier Räuberoszillationen beobachtet. Das Maximum der Beutepopulation (I) liegt bei einer optischen Dichte von 7,16. Nachdem das Beutemaximum erreicht wurde, baut sich das Maximum von *D. discoideum* (C, 175000 Z/ml) über A und B (MW: 17160 Z/ml) allmählich auf und reduziert die Beutepopulation nach 588 h auf eine optische Dichte von 0,63 (MW: 1,64). Nach der maximalen Auslenkung A beträgt der Mittelwert der verbleibenden Oszillationen 17160 Z/ml. Nach 660h nimmt die bakterielle Biomasse wieder zu, obwohl die Zahl der Predatoren hoch ist. Die Beutepopulation oszilliert nach C von II bis VI weiter, die Schwingungsdauer beträgt im Mittel 72h. *D. discoideum* kann von dem zunehmendem Nahrungsangebot nicht profitieren und ist im Anschluss an Oszillation D (nach 972h) ausgewaschen. Partikel wären rechnerisch nach 1008h nicht mehr in der Suspension nachzuweisen. In den Kurvenabschnitten von A, C und D setzt sich die große Welle aus Schwingungen der kleinen Welle zusammen.

ERGEBNISSE

Lauf 3.1: $D=0,77/d$ (Suspension)

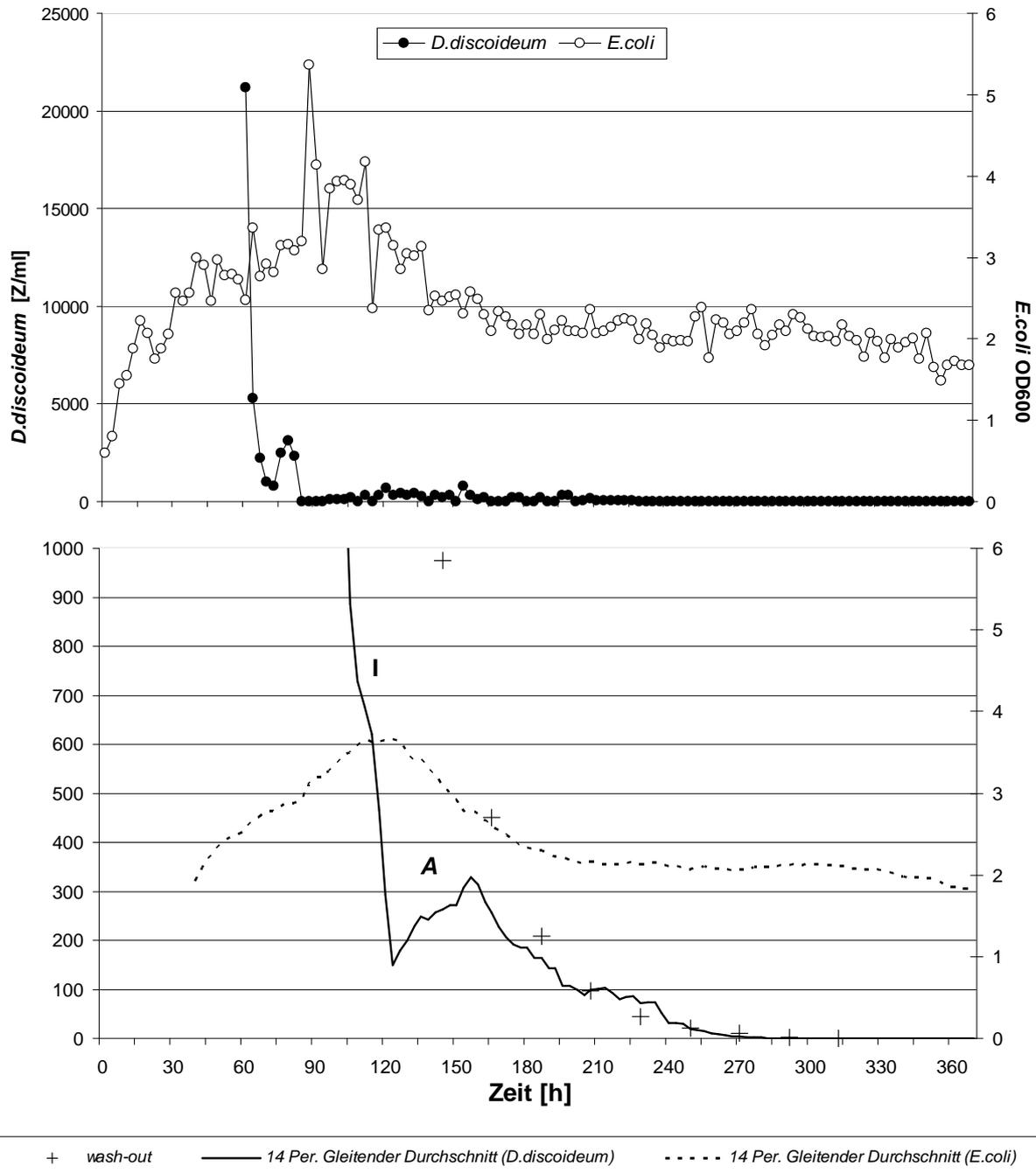


Abb.17: Schwingungsmuster von *D. discoideum* und *E. coli* bei $D=0,77$

Bei höchster Verdünnungsrate ist nach dem ersten Maximum der Räuberpopulation von 17600 Z/ml nur noch eine weitere Schwingung zu beobachten (A). Obwohl mit einer optischen Dichte von 2,3 (MW) ein besseres bakterielles Nahrungsangebot für die Predatoren besteht als bei dem vorhergehenden Lauf mittlerer Verdünnungsrate, liegt die Dichte der Räuberpopulation im Mittel bei nur 337 Z/ml. Nach der maximalen Auslenkung A beträgt der Mittelwert der verbleibenden Oszillationen 211 Z/ml. *D. discoideum* kann auf das Nahrungsangebot nicht reagieren und nach 246h nicht mehr in der Kultur nachgewiesen werden. Im Vergleich sind rechnerisch nach 312h keine Partikel mehr im System vorhanden. Die große Welle setzt sich im Kurvenabschnitt von 11-234h (B) aus Oszillationen der kleinen Welle zusammen.

ERGEBNISSE

Lauf 2.2: D=0,57/d (Adhäsion)

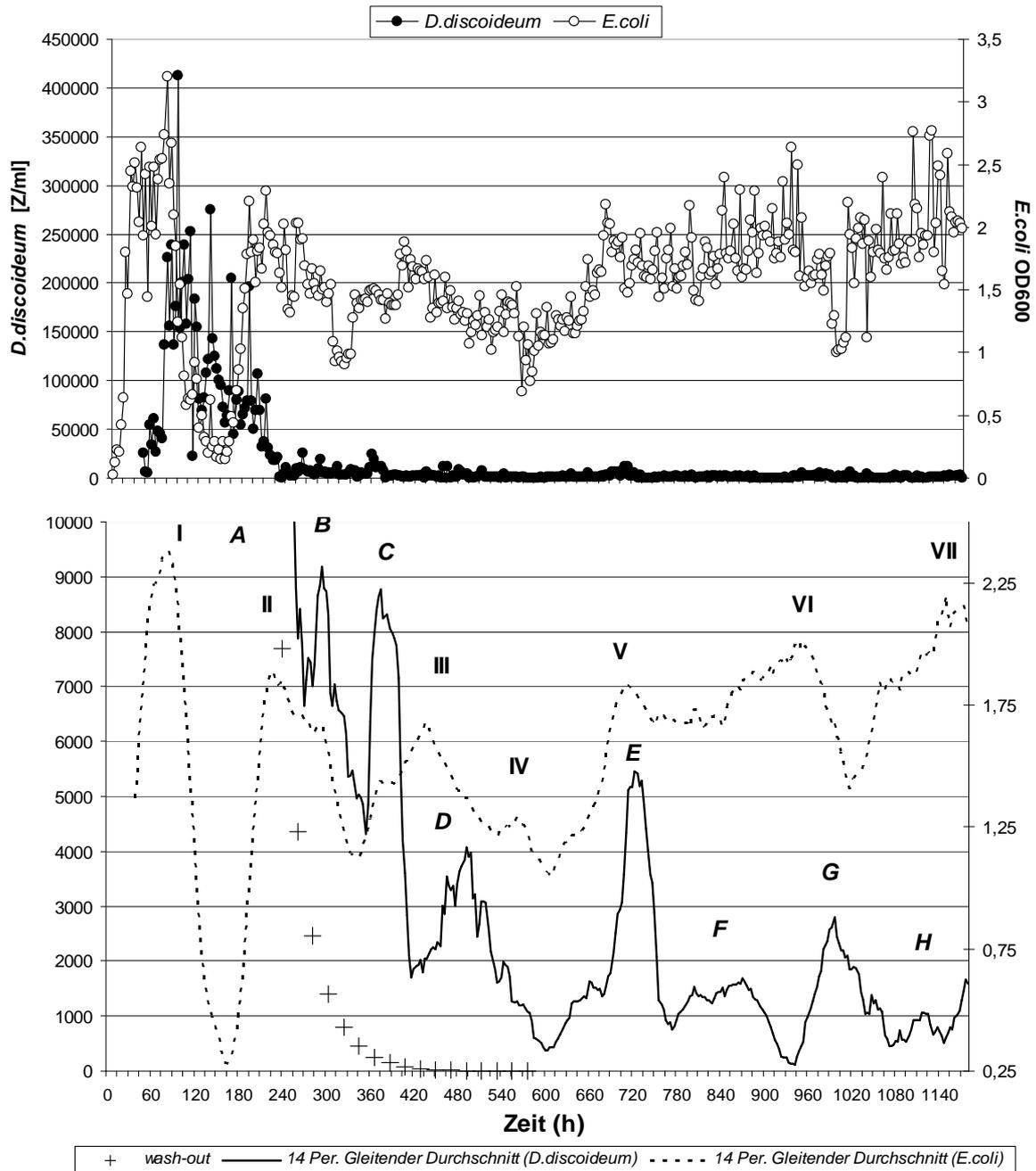


Abb.19: Schwingungsmuster von *D. discoideum* und *E. coli* bei D=0,57

Bei mittlerer Verdünnungsrate sind in dem Untersuchungszeitraum von 822h fünf Beuteoszillationen und fünf Räuberoszillationen zu erkennen. *D. discoideum* erreicht nach 90h das Maximum von 412800 Z/ml und schwankt anschließend um einen Mittelwert von 19245 Z/ml. Nach der maximalen Auslenkung **A** beträgt der Mittelwert der verbleibenden Oszillationen 18964 Z/ml. Die bakterielle Dichte liegt nach 75h bei einem maximalen Wert von 3,3 (OD600) und liegt im Mittel bei 1,56. Nach der anfänglichen großen Schwingung von *D. discoideum* oszillieren **D-H** um einen Mittelwert von 1640 Z/ml, die Amplituden von **D**, **E** und **G** treten jeweils nach einem vorangegangenen Beutemaximum auf. Die Bakterienpopulation wird dadurch stark reduziert, steigt aber gleich wieder an, so dass ab **B** ein recht einheitliches Schwingungsmuster der Bakterienpopulation erkennbar wird. Partikel befinden sich nach 600h nicht mehr in der Kultur, *D. discoideum* ist bis zum Abbruch des Experiments in der Kultur nachzuweisen. In den Kurvenabschnitten von 72-120h, 157-207h, 234-503h, 536-662h, 698-789h (**E**), 804-984h und 1038-1131h (**H**) setzt sich die große Welle aus der kleinen Welle zusammen.

ERGEBNISSE

Lauf 3.2: $D=0,77/d$ (Adhäsion)

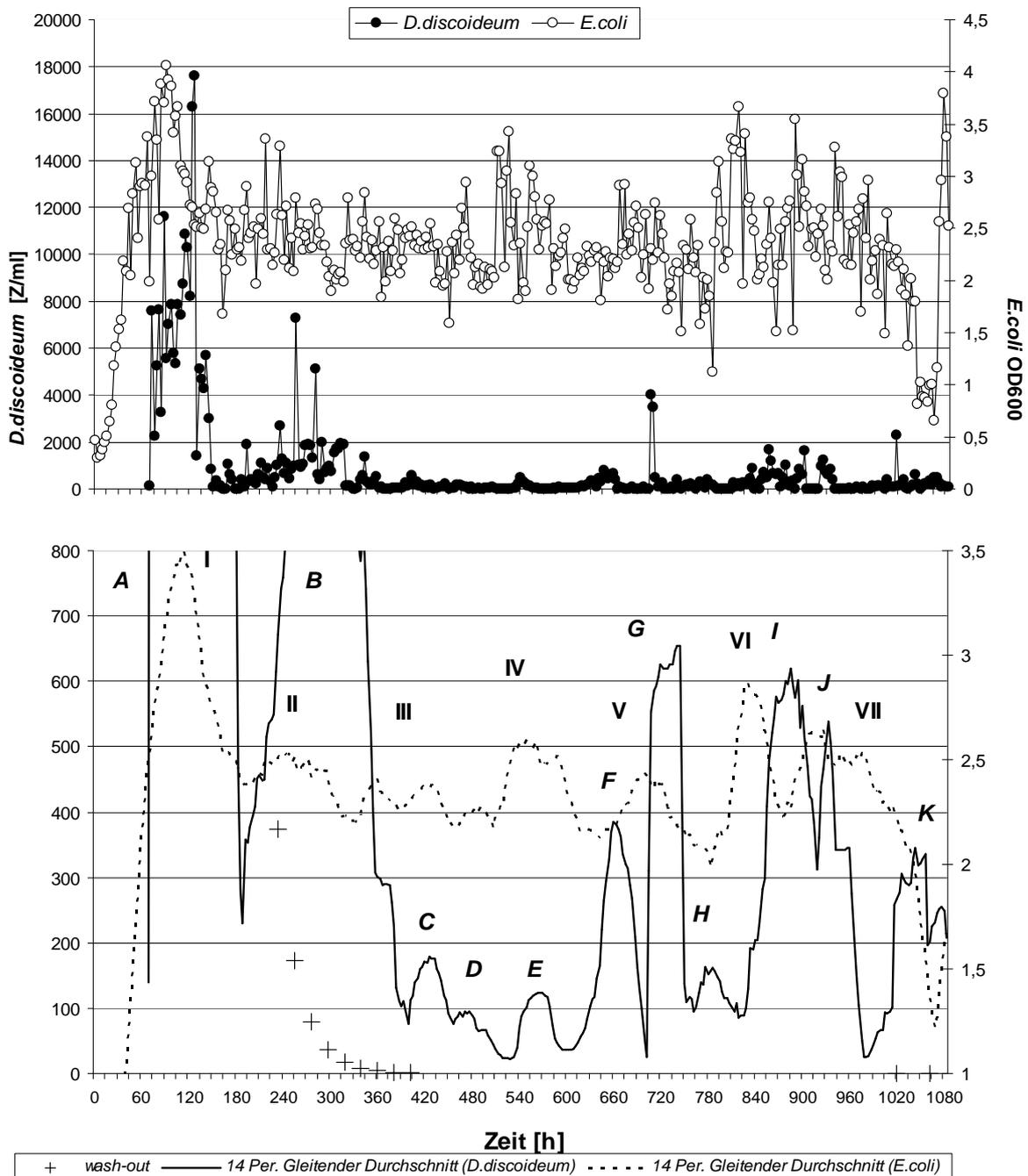


Abb.20: Schwingungsmuster von *D. discoideum* und *E. coli* bei $D=0,77$

Bei höchster Verdünnungsrate lassen sich in einem Zeitraum von 822h sieben Räuberoszillationen und fünf Beuteoszillationen beobachten. *D. discoideum* erreicht nach 126h das Maximum von 17600 Z/ml und schwankt anschließend um einen Mittelwert von 919 Z/ml. Nach der maximalen Auslenkung **A** beträgt der Mittelwert der verbleibenden Oszillationen 707 Z/ml. Die bakterielle Dichte liegt nach 90h bei einem maximalen Wert von 4,06 (OD600) und liegt im Mittel bei 2,34. Das gute Nahrungsangebot lässt *D. discoideum* von **C** bis **K** um einen Mittelwert von 227 Z/ml oszillieren, ohne dass es zur Extinktion des Räubers kommt. Die Räubermaxima von **B**, **F** und **H** scheinen nicht an vorangegangene Beutemaxima gekoppelt zu sein. Alle übrigen Räuberoszillationen treten in unmittelbarer Nähe zu einem vorangegangenen Beutemaximum auf und reduzieren die Beutepopulation. *E. coli* oszilliert von **I** bis **VII** mit stark variierenden Amplituden, aber ähnlicher Schwingungsdauer. In den Zeitabschnitten von 75h-177h (**A**), 204h-276h, 299h-405h (**B**), 429h-474h, 525h-555h (**E**), 621h-663h (**F**), 702h-714h, 744h-792h (**H**), 838h-939h und 1023h-1074h (**K**) setzen sich beide Kurven aus Oszillationen der 'kleinen Welle' zusammen.

ERGEBNISSE

Ergebnisse der großen Welle im Überblick

Allen Läufen gemeinsam ist die erste maximale Auslenkung der Beute- und der Räuberpopulation: wird der Reaktor mit *D. discoideum* beimpft, gelangen kleinere Mengen des sehr nährstoffreichen Anzuchtmediums mit in das eigentliche Kulturmedium. Dieser zusätzliche Nährstoffeintrag führt zu einer Erhöhung der bakteriellen Biomasse und in der Folge zu einer Zunahme der Zellzahl von *D. discoideum*. Somit spiegeln die maximal erreichten Werte beider Organismen während der ersten Oszillation die Nährstoffkonzentration nach Inokulation wider und wurden nicht durch das in der Kulturapparatur eingesetzte Nährmedium hervorgerufen. Das eigentliche Schwingungsverhalten der Populationen wird somit erst nach anfänglichen maximalen Auslenkungen sichtbar, wenn das eingetragene Nährmedium ausgewaschen ist. Der Zusammenhang zwischen Verdünnungsrate und gemittelter bakterieller Biomasse, bzw. Zellzahl von *D. discoideum* wird in den Abbildungen 21-23 gut sichtbar:

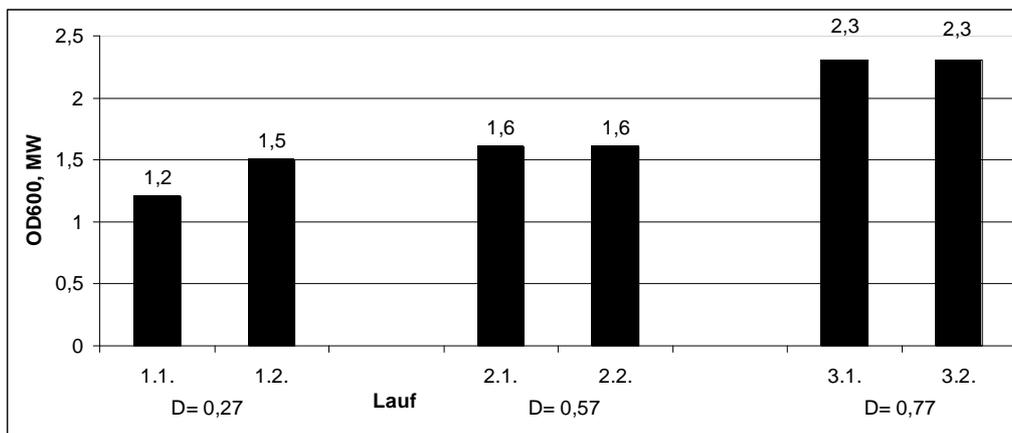


Abb.21: Entwicklung der bakteriellen Biomasse im Mittelwert bei ansteigender Verdünnungsrate

Im steady-state ist die Verdünnungsrate gleich der Wachstumsrate der kultivierten Organismen. Erwartungsgemäß nimmt die bakterielle Biomasse mit ansteigender Verdünnungsrate zu. Erst wenn die Verdünnungsrate die Wachstumsrate einer Population übersteigt, kommt es zu Extinktion der Population. Da in allen Läufen *E. coli* bis zum Abbruch des Experiments nachweisbar war, wird dieser Zustand nie erreicht, die Bakterienpopulation befand sich demnach zu jedem Zeitpunkt im steady-state. Im Vergleich zu den Werten der Suspensionsläufe führt nur Adhäsions-Lauf 1.2 zu einer signifikanten Erhöhung der Biomasse.

ERGEBNISSE

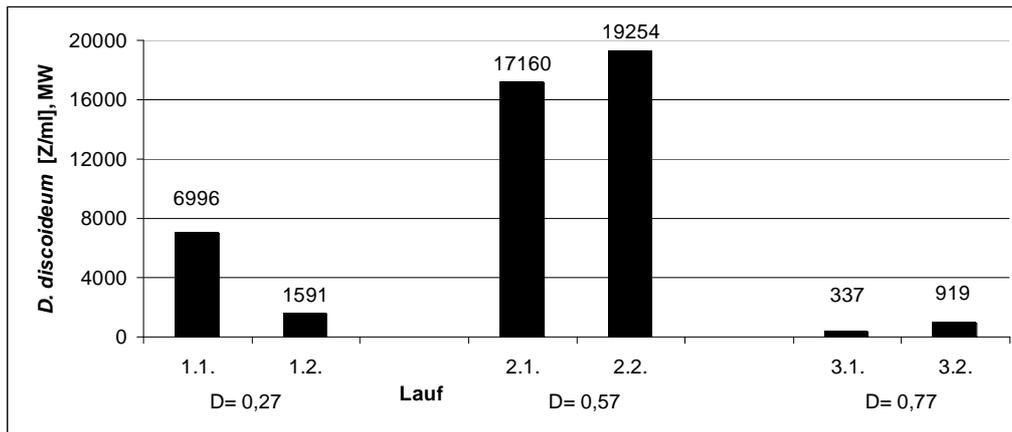


Abb.22: Entwicklung der Zellzahlen von *D. discoideum* im Mittelwert bei ansteigender Verdünnungsrate

Die gemittelten Zellzahlen der Räuber gleichen die erste maximale Auslenkung (s.o.) aus, die durch den zusätzlichen Nährstoffeintrag erzeugt wurden. Lauf 2.2. weist die höchsten Zellzahlen von *D. discoideum* auf. Damit wird die abweichende Entwicklung der bakteriellen Biomasse (s.o.) verständlich: die hohe Zelldichte des Predators reduziert die Beutepopulation hier so stark, dass trotz Biofilm eine geringere bakterielle Zelldichte erreicht wird als bei gleicher Verdünnungsrate unter Vermeidung eines Biofilms. Bei niedrigster Verdünnungsrate besitzen 1.1. und 1.2. in Folge eines geringeren bakteriellen Nahrungsangebotes nur die zweithöchste Zelldichte, das Schwingungsmuster der Predatoren. Bei höchster Verdünnungsrate (3.1.+3.2.) kann *D. discoideum* nicht von der hohen bakteriellen Zelldichte profitieren und der Verdünnungsrate entgegen wachsen: in Lauf 3.1. verlässt der Predator der Partikelwaschrates entsprechend die Kultur, in Lauf 3.2. oszilliert er auf niedrigem Niveau weiter, da er die Reaktorinnenwand besiedeln und nicht ausgewaschen werden kann.

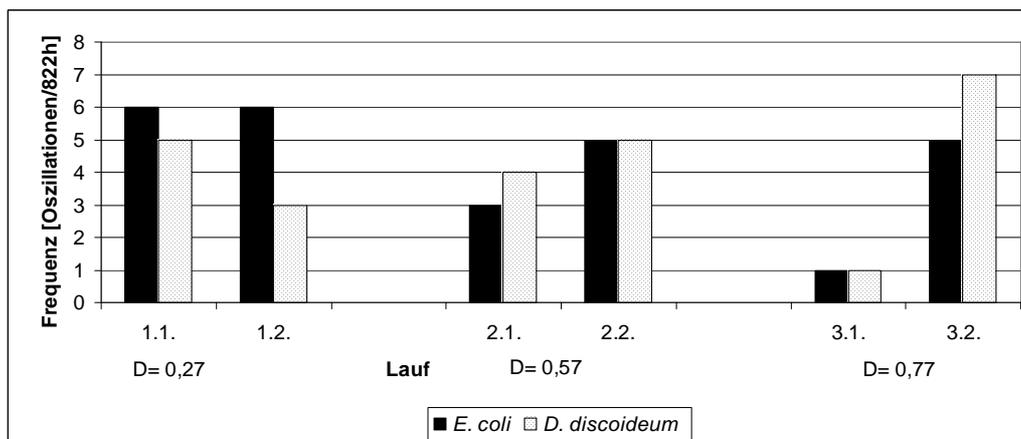


Abb.23: Anzahl der Oszillationen von *D. discoideum* und *E. coli* über einen Zeitraum von 822h bei steigender Verdünnungsrate

ERGEBNISSE

Die Frequenz der Predatoroszillationen steigt mit zunehmender Verdünnungsrate leicht an, obwohl die Frequenz bakterieller Oszillationen nahezu konstant ist. Der einzige Parameter, der zusammen mit der Verdünnungsrate ansteigt, ist die bakterielle Biomasse. Dies kann als Hinweis darauf verstanden werden, dass die Schwingungsfrequenz von *D. discoideum* nicht von der Schwingungsfrequenz, sondern eher von der Zelldichte der Beute abhängig ist. Mit Ausnahme von Lauf 2.1. (Lauf 3.1. bleibt aufgrund seiner kurzen Laufzeit unberücksichtigt), der ein vergleichsweise untypisches Schwingungsmuster aufweist, liegt die Frequenz der Schwingungen von *E. coli* *unabhängig* von Verdünnungsrate und Predatordichte bei 5-6 Oszillationen/822h. Hieraus lässt sich schließen, dass der Predator das Schwingungsverhalten der Beutepopulation nur unwesentlich beeinflusst und für die bakteriellen Oszillationen andere Faktoren maßgeblich sein müssen. Wie besonders deutlich aus Lauf 1.1. und Lauf 1.2 hervorgeht, beeinflusst die Anwesenheit des Predators die maximale Auslenkung der Beuteoszillationen. Aus minimalen Zellzahlen von *D. discoideum*, bzw. deren Extinktion resultieren Oszillationen mit größerer Amplitude, als wenn der Predator in hoher Zelldichte vorhanden ist.

Zusammenfassend wird festgestellt, dass die Dichte der Beutepopulation von deren Wachstumsrate abhängt, welche wiederum durch die Verdünnungsrate bestimmt wird. Die Dichte der Beutepopulation steigt demzufolge mit der Verdünnungsrate ausgehend von Lauf 1 bis Lauf 3 kontinuierlich an, die Dichte der Räuber kann dieser Tendenz nur bis einschließlich Lauf 2 folgen. Trotz höchster bakterieller Zelldichte kann *D. discoideum* dort nur geringste Zellzahlen erreichen oder wird wie in Lauf 2.1. ausgewaschen, wenn die Besiedlung von Oberflächen unterbunden wird.

Wird der Räuberpopulation eine ökologische Nische (hier: Reaktorinnenwand) angeboten, welche Wachstum unabhängig von hohen Verdünnungsraten gewährleistet, wird deren Extinktion verhindert (Läufe 1.2., 2.2., 3.2.). Fehlt diese ökologische Nische, wird der Predator ausgewaschen (Läufe 1.1., 2.1., 3.1.).

Die Oszillationsfrequenz der Predatoren steigt mit der Verfügbarkeit bakterieller Biomasse leicht an und ist nicht identisch mit der Oszillationsfrequenz der Beutepopulationen.

ERGEBNISSE

Vergleich der Oszillationsarten- und Häufigkeiten, große Welle

Um das Schwingungsverhalten der sechs Läufe auch quantitativ beschreiben zu können, wurde jedes der oben gezeigten Diagramme so skaliert, dass aus jedem Lauf etwa 15 Einzeldiagramme mit jeweils 30 Werten resultierten. Diese Diagramme wurden aneinandergesetzt und auf Parameter wie *Oszillationsarten* und –*häufigkeiten*, *Phasenverschiebung*, *zeitliche Verschiebung* und *Schwingungsdauer* überprüft. Der Schwingungsverlauf der beiden Populationen wurde eingezeichnet und die erwähnten Parameter abgelesen. Um eine möglichst objektive Interpretation der Daten zu gewährleisten, wurden die Werte gemittelt (Abbildung 24).

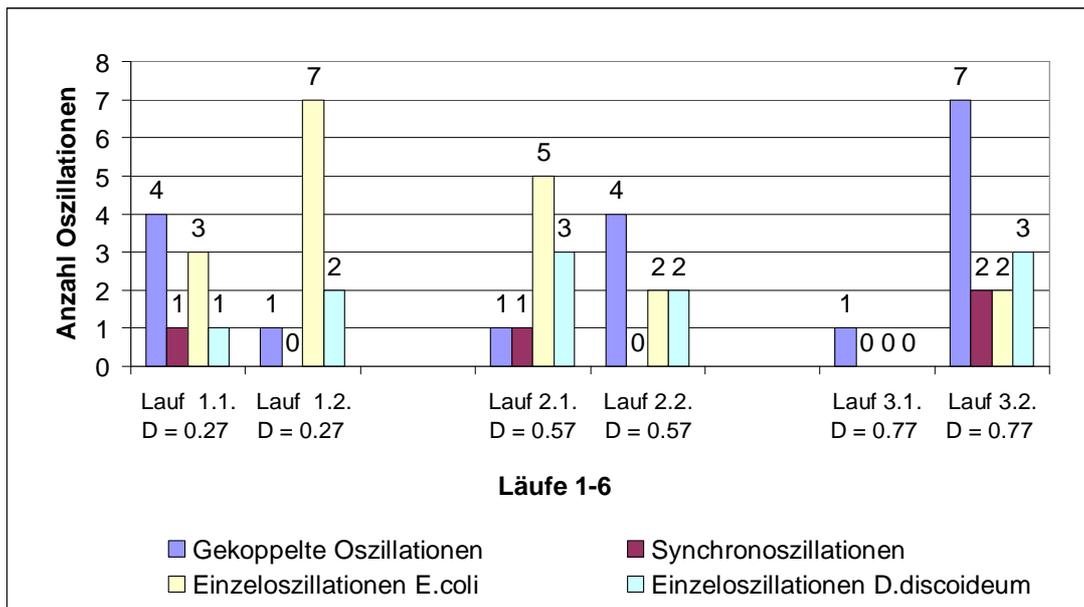


Abb.24: Zusammenführung der in den sechs Läufen über 822h beobachteten Oszillationsarten

Lauf 1.1.:

In dem Experiment mit der geringsten Verdünnungsrate sind die Anzahl der gekoppelten Oszillationen (4) und die Zahl der *E. coli* Einzelschwingungen (3) etwa gleich hoch. Die *D. discoideum* Einzelschwingungen (1) weichen nur wenig von den synchronen Oszillationen (1) ab.

Lauf 1.2.:

Wird die Entstehung eines Biofilms zugelassen, sinkt die Anzahl der gekoppelten Oszillationen auf einen Wert von eins. Es treten keine synchronen Oszillationen auf. *E. coli* erzeugt in dem beobachteten Zeitraum sieben und *D. discoideum* zwei Einzeloszillationen.

Lauf 2.1.:

Eine Verdünnungsrate von 0,57/d erzeugt jeweils eine gekoppelte und eine

ERGEBNISSE

synchrone Oszillation. Die Anzahl der Einzeloszillationen liegt für *D. discoideum* mit drei nur wenig unter der Anzahl der *E. coli* Einzelschwingungen (fünf).

Lauf 2.2.:

Bei gleicher Verdünnungsrate, jedoch ohne Sterilisation des Kulturgefäßes werden jeweils zwei Einzeloszillationen von *D. discoideum* und *E. coli* beobachtet. Es treten keine synchronen Oszillationen auf. Die Anzahl der Räuber-Beute-Oszillationen ist mit vier deutlich höher als in Lauf 1.1.

Lauf 3.1.:

Da dieser Lauf nur 369h lief, erfolgte die Analyse nicht über 822h wie bei den übrigen Läufen. Im genannten Zeitraum trat außer einer Räuber-Beuteoszillation keine weitere Oszillation mehr auf.

Lauf 3.2.:

Bei der höchsten gewählten Verdünnungsrate, ist auch die größte Anzahl Räuber-Beute-Oszillationen zu beobachten. Synchron- und Einzeloszillationen halten sich mit je einer Oszillation die Waage. Es treten drei Einzeloszillationen von *D. discoideum* auf.

Vergleich der Phasenverschiebung

Die Phasenverschiebung aller drei Suspensions-Läufe liegt bei 90°. Die Phasenverschiebung aller drei Adhäsions-Läufe liegt zwischen 45° und 52°.

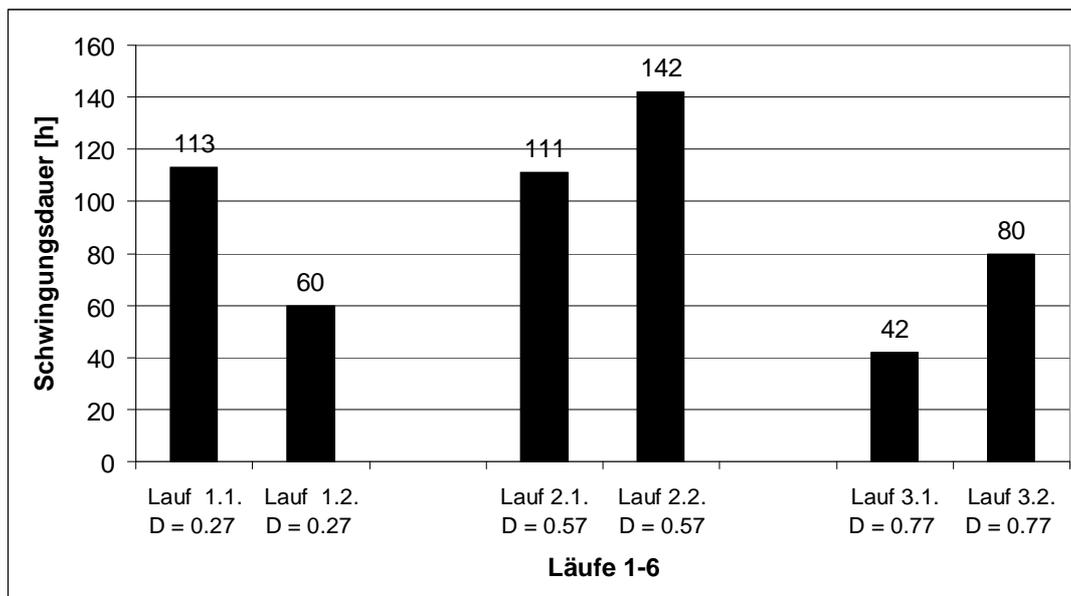


Abb.25: Vergleich der Schwingungsdauer (MW) von Räuberoszillationen innerhalb von R/B-Schwingungen

ERGEBNISSE

Die Dauer der Schwingungen von Räuberoszillationen, deren Amplitude mit der Amplitude der Beutepopulation interferiert (gekoppelte Oszillationen, Abbildung 25), schwankt zwischen 42h (Lauf 3.1.) und 142h (Lauf 2.2.). Die Läufe 1.1. (113h) und 3.2. (79h 30min) weisen etwa die doppelte Schwingungsdauer auf, wie ihre korrespondierenden Läufe 1.2. (60h) und 3.1. (42h). Ausgenommen Lauf 1 ist die Schwingungsdauer der Räuberoszillationen in Adhäsionsläufen stets länger als im Suspensionsexperiment.

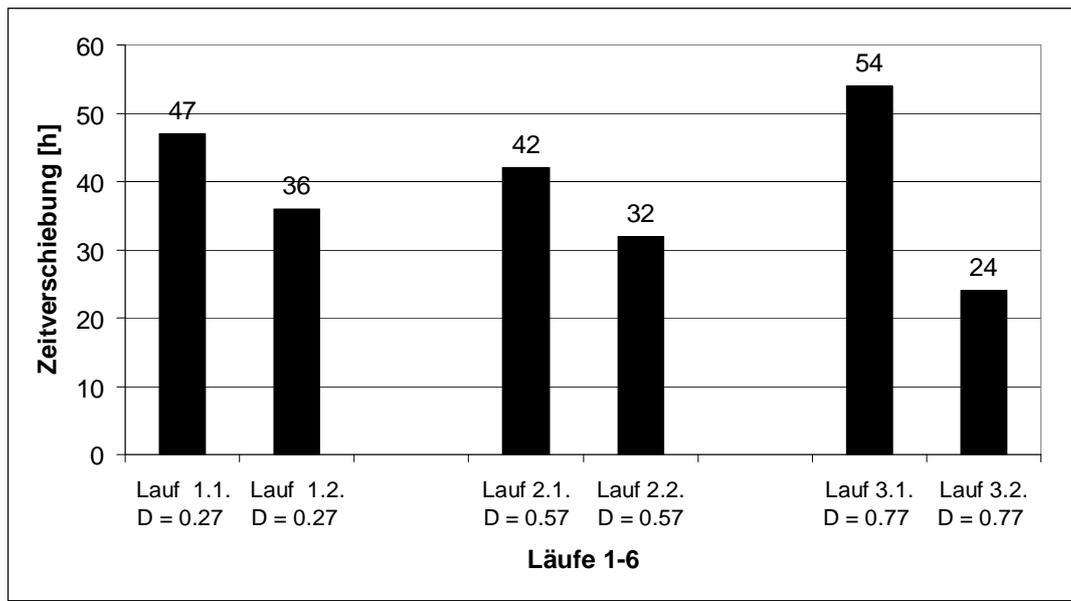


Abb.26: Vergleich der zeitlichen Verschiebung zwischen Beute- und Räubermaxima

Es wurden die Maxima von Räuber- und Beuteszillationen betrachtet, deren Amplituden sich überschneiden (gekoppelte Oszillationen). Die Zeit, die vergeht, bis einem Beutemaximum ein Räubermaximum folgt wurde abgelesen und als gemittelter Wert für jeden Lauf dargestellt (Abbildung 26). Im Vergleich zu den Adhäsions-Läufen dauert es in den Suspensions-Experimenten in allen Läufen länger, bis dem Maximum der Beutepopulation ein Räubermaximum folgt. Unabhängig von der Verdünnungsrate vergehen im Mittel 48h bevor die Predatoren ein Maximum erreichen. In den Adhäsions- Experimenten verkürzt sich die Zeit bis zum folgenden Räubermaximum zusammen mit der steigenden Verdünnungsrate.

Einfluss der Verdünnungsrate auf Beute- und Räuberpopulation

Die Verfügbarkeit von Nahrung in Form von bakterieller Biomasse kann für die Interpretation von Räuber-Beute Oszillation von Bedeutung sein. Abbildung 27 zeigt die Entwicklung der Biomasse aller sechs Läufe in Abhängigkeit von der jeweils gewählten Verdünnungsrate.

ERGEBNISSE

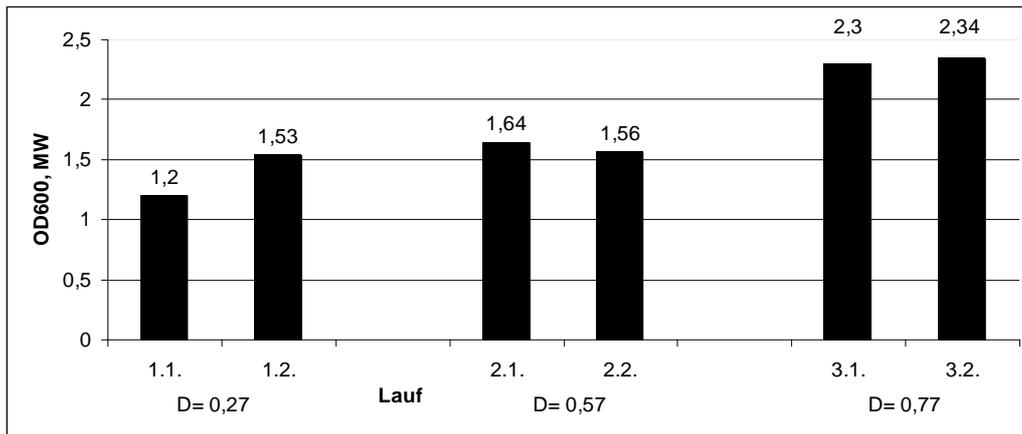


Abb.27: Entwicklung der bakteriellen Biomasse im Mittelwert bei den gewählten Verdünnungsraten 0,27, 0,57, 0,77.

Der Anstieg der Verdünnungsrate führt in allen Läufen zu einer Zunahme der bakteriellen Biomasse (Abbildung 27). Mit Ausnahme von Lauf 1.1. ist die optische Dichte der Läufe, in denen die Entstehung eines Biofilms zugelassen wurde, höher als in Versuchen, in denen Biofilme unterbunden wurden.

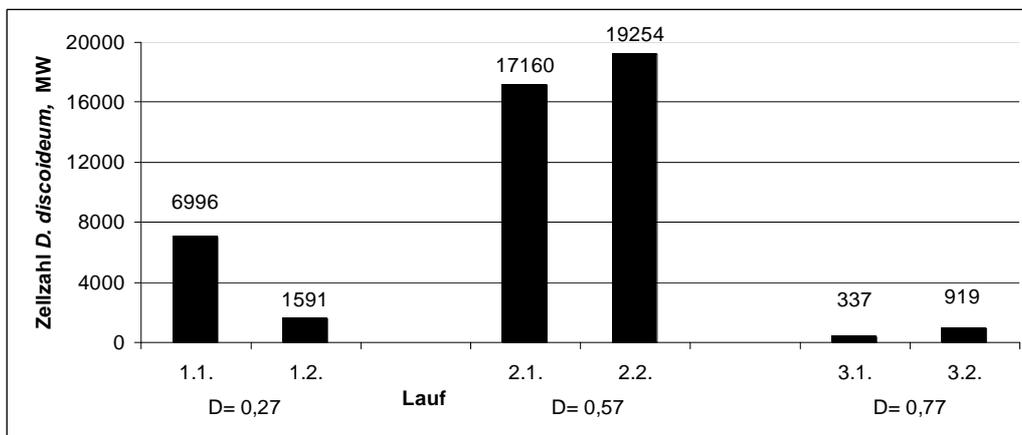


Abb.28: Entwicklung der Zellzahlen von *D. discoideum* im Mittelwert bei den gewählten Verdünnungsraten 0,27, 0,57, 0,77.

Mit Ausnahme von Lauf 1.1. ist die Zellzahl von *D. discoideum* in den Versuchen, in denen kein Biofilm zugelassen wurde, niedriger als in Versuchen, in denen die Entstehung von Biofilmen geduldet wurde (Abbildung 28). Bei mittlerer Verdünnungsrate ($D=0,57$) ist die Zellzahl der Amöben mit 17160 (ohne Biofilm) und 19254 (mit Biofilm) höher als bei niedrigster und höchster Verdünnungsrate. Da das Beuteangebot in Lauf 1 mit dem von Lauf 2 vergleichbar ist und Lauf 3 eine noch höher bakterielle Zelldichte aufweist, ist fraglich, warum die Räuberpopulation in Lauf 1 und 3 keine höheren Zellzahlen erreicht. Hierfür kommen möglicherweise Resistenzstrategien der Beute (Lauf 1) in Verbindung mit einer höheren Verdünnungsrate (Lauf 3) in Betracht.

ERGEBNISSE

1.3 Experimentelle Symbiose

1.3.1 Umwandlung von Methionin durch *D. discoideum*

Der Beweis, dass *D. discoideum* Methionin aus dem Medium aufnimmt und zu einer verwertbaren Schwefelquelle umwandelt, wurde mit Hilfe von konditioniertem Medium (s.a.: *Material und Methoden, konditioniertes Medium*) erbracht. Unter Verwendung ansteigender Konzentrationen von konditioniertem Medium sollte eine Zunahme der optischen Dichte zu beobachten sein. *D. discoideum* wurde durch mehrmaliges Waschen von Rückständen des Anzuchtmediums befreit und für sechs Stunden in dem Medium inkubiert, das auch für die Symbioseexperimente verwendet wurde. Diese Medium enthielt Methionin als einzige Schwefelquelle (nicht verwertbar für *E. coli*).

Das konditionierte Medium wurde auf Grundlage von zwei unterschiedlichen Medien hergestellt: Im ersten Fall wurde *D. discoideum* in einem Medium inkubiert, welches keinen Schwefel enthielt (= AB-Medium). Wenn konditioniertes Medium die Ausbeute der Bakterien fördert, ist von einer Freisetzung von Schwefel durch *D. discoideum* auszugehen (Abbildung 29).

Im zweiten Fall erfolgte die Inkubation von *D. discoideum* in einem Medium, in dem weder Schwefel noch Stickstoff enthalten war (J-Medium). Erhöht sich in diesem Medium die Ausbeute zusammen mit der Konzentration konditionierten Mediums, kann von einer Freisetzung von Stickstoff *und* Schwefel ausgegangen werden. Zum Vergleich wurde in Abbildung 30 das Wachstum von *E. coli* in schwefelfreiem, bzw. schwefel- *und* stickstofffreiem Medium aufgetragen.

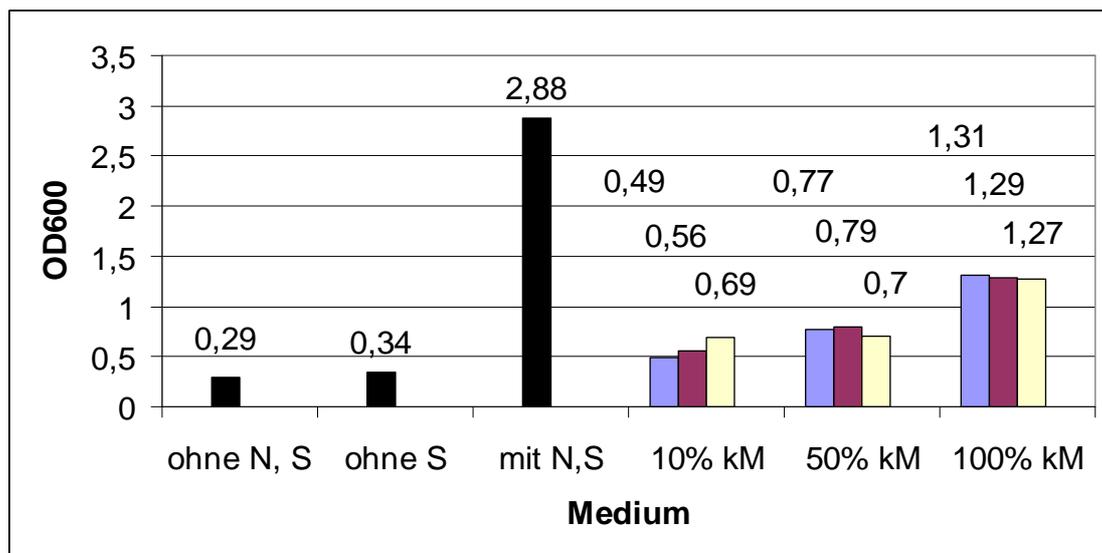


Abb.29: Wachstumsstimulierung von *E. coli* (ohne *D. discoideum*) durch variierende Konzentrationen konditionierten Mediums (kM); die Konditionierung erfolgte in schwefelfreiem Medium

ERGEBNISSE

Es wurden bei jeder Konzentration drei Messungen durchgeführt. Die bakterielle Ausbeute steigt mit der Konzentration des konditionierten Mediums vom Ausgangswert 0,58 (OD600, MW) über 0,75 bis auf 1,29 an. Die maximale Ausbeute in reinem konditioniertem Medium liegt damit deutlich unter der Ausbeute des definierten Mediums (2,88), in dem sowohl Stickstoff, als auch Schwefel enthalten sind. Gegenüber den Medien in denen keine Schwefelquelle (0,34) oder Schwefel- und Stickstoffquelle (0,29) enthalten ist, ist eine deutliche Steigerung der Ausbeute zu beobachten (OD600 steigt um 0,95 in schwefelfreiem Medium und um 1,0 in schwefel- und stickstofffreiem Medium).

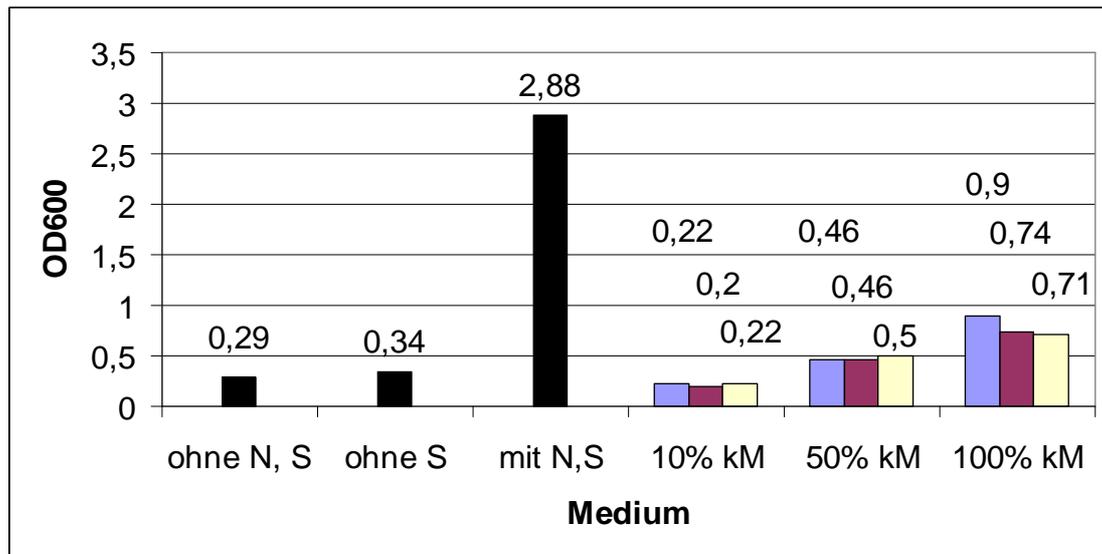


Abb.30: Wachstumsstimulierung von *E. coli* durch variierende Konzentrationen konditionierten Mediums (kM); die Konditionierung erfolgte in schwefel- und stickstofffreiem Medium

Die bakterielle Ausbeute steigt mit der Konzentration des konditionierten Mediums vom Ausgangswert 0,21 (OD600, MW) über 0,47 bis auf 0,78 an. Die maximale Ausbeute in reinem konditioniertem Medium liegt damit deutlich unter der Ausbeute des definierten Mediums (2,88), in dem sowohl Stickstoff, als auch Schwefel enthalten sind. Gegenüber den Medien in denen keine Schwefelquelle (0,34) oder Schwefel- und Stickstoffquelle (0,29) enthalten ist, ist eine deutliche Steigerung der Ausbeute zu beobachten (OD600 steigt um 0,44 in schwefelfreiem Medium und um 0,44 in schwefel- und stickstofffreiem Medium).

Wird die bakterielle Ausbeute anhand der zwei unterschiedlichen Medien verglichen, auf deren Grundlage das jeweilige konditionierte Medium hergestellt wurde, fällt auf, dass die Ausbeute in dem Medium, in dem lediglich Schwefel fehlt, um einen Wert von 0,51 höher ist, als in dem Medium in dem Schwefel und Stickstoff fehlen. In beiden Medien wird durch die Konditionierung eine deutliche Erhöhung der bakteriellen Ausbeute deutlich. Diese ist auf die Degradierung von Methionin durch *D. discoideum* und die Abgabe von Schwefel und Stickstoff (in geringerer Menge) in das Medium zurückzuführen.

ERGEBNISSE

1.3.2 Oszillationsverhalten von *E.coli* und *D. discoideum*

Es werden die Kurven der Langzeitkulturen in J-Medium (ohne Schwefel, ohne Stickstoff) und AB-Medium (ohne Schwefel) dargestellt.

Beide Experimente laufen zum Zeitpunkt der Niederschrift dieser Arbeit kontinuierlich seit 276 Tagen (AB-Medium) und 383 Tagen (J.-Medium). Die Verdünnungsrate beträgt jeweils 1,0/d, das Kulturvolumen beträgt im Reaktor für J-Medium 233ml, im Reaktor für AB-Medium 250ml. Der Sterilisationszyklus ist auf einen Intervall von 72h festgelegt und erfolgt in Abänderung zu den Räuber-Beute-Experimenten der großvolumigen Anlagen symmetrisch. Die Kultur wird nach der Sterilisation nicht in den ursprünglichen Reaktor zurück überführt, sondern verbleibt bis zu dem nächsten Zyklus im zweiten Reaktor.

ERGEBNISSE

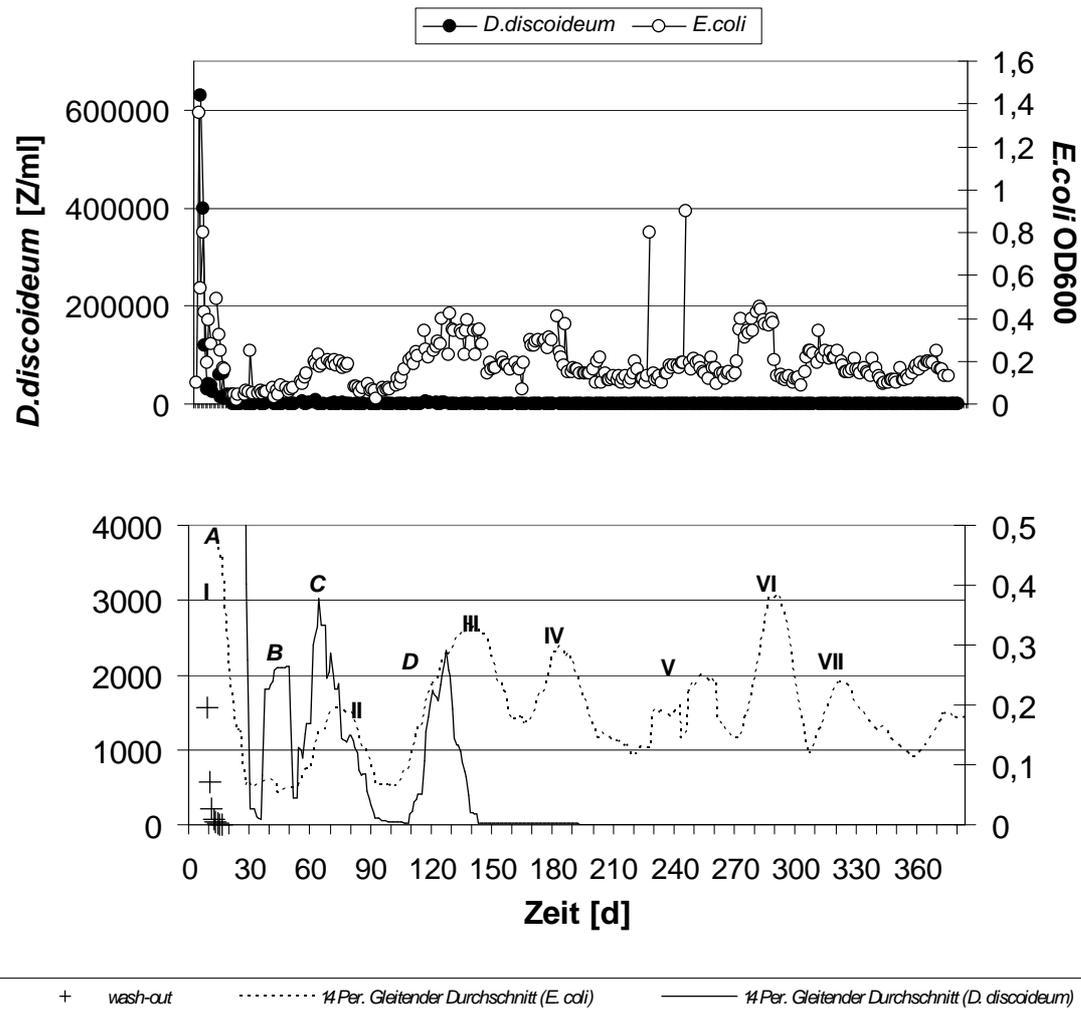


Abb.31: Kurvenverlauf der Kokultur aus *E. coli* und *D. discoideum* in Medium ohne Schwefel- und Stickstoffquelle (J-Medium)

Zur graphischen Darstellung gingen Proben aus einem Zeitraum von 383 Tagen ein. Vom ersten Wert, unmittelbar nach dem Animpfen der Anlage (630.000 Z/ml), sinkt die Zelldichte der Räuberpopulation innerhalb von drei Tagen auf einen Wert von 30.000 Z/ml. Vom vierten Tag an erfolgt eine kleine Schwingung über 32.000, 37.000 und 24.000 Z/ml. Mit zwei Ausreißern senkt sich die Zellzahl der Räuber stetig auf 1000 Z/ml (ab 17. Tag). In den folgenden 127 Tagen liegen die Werte zwischen 10 und 12800 Z/ml. Es sind vier Oszillationen (Dauer: **A**=23 Tage, **B**=15 Tage, **C**=38 Tage, **D**= 29 Tage) zu beobachten. Im Anschluss an die vier Predatoroszillationen treten über einen Zeitraum von 110 Tagen nur noch Werte zwischen 10 und 50 Z/ml auf. Ab dem 180. Tag lassen sich keine Zellen von *D. discoideum* in der Kultur mehr nachweisen. Die Partikelauswaschrates zeigt, dass nach 14 Tagen keine Zellen der Predatoren mehr in der Kultur vorhanden sein dürften. Die Räuberpopulation kann sich aber bis zu ihrer Extinktion trotz einer vergleichsweise geringen Beutedichte (MW =0,19 OD600) 180 Tage im System halten. Somit ist eine von zwei Bedingungen der metabolischen Kopplung erfüllt: *D. discoideum* ernährt sich von *E. coli*. Im Gegenzug lassen sich Hinweise darauf finden, dass hohe Dichten der Räuber- die Beutepopulation positiv beeinflussen. Dieses Ergebnis muss gefordert werden, wenn die Beute an essentielle Metabolite der Räuber gekoppelt ist. Die Oszillationen **C** und **D** sind den beiden folgenden Beuteoszillationen um 11 Tage (**II**), bzw. 13 Tage (**III**) vorgelagert. Wird angenommen, dass eine hohe Räuberichte zu einer erhöhten Schwefel und Stickstoffkonzentration führt, könnte das darauf folgende Beutemaximum erklärt werden. Da die Partikelauswaschrates bei 14 Tagen liegt, sollten sowohl nach 11, als auch nach 13 Tagen Schwefel und Stickstoff noch nicht ausgewaschen worden sein und der Beutepopulation zur Verfügung stehen. Allerdings wäre die Konzentration beider Metabolite dann nur sehr gering. Der beschriebene Zusammenhang wird bei Betrachtung der bakteriellen Biomasse entkräftigt: nach dem Maximum von 1,36 oszilliert die Beutepopulation um einen Mittelwert von 0,19 (OD600) sieben Mal (**I**=50, **II**= 50, **III**=35, **IV**=44, **V**=31, **VI**=24 und **VII** 27 Tage). Es liegt eine Frequenz von 1 Osz./69 Tage vor. Das bakterielle Schwingungsmuster scheint somit nicht stark von *D. discoideum* beeinflusst zu sein, denn es bleibt auch nach deren Extinktion weitgehend erhalten.

ERGEBNISSE

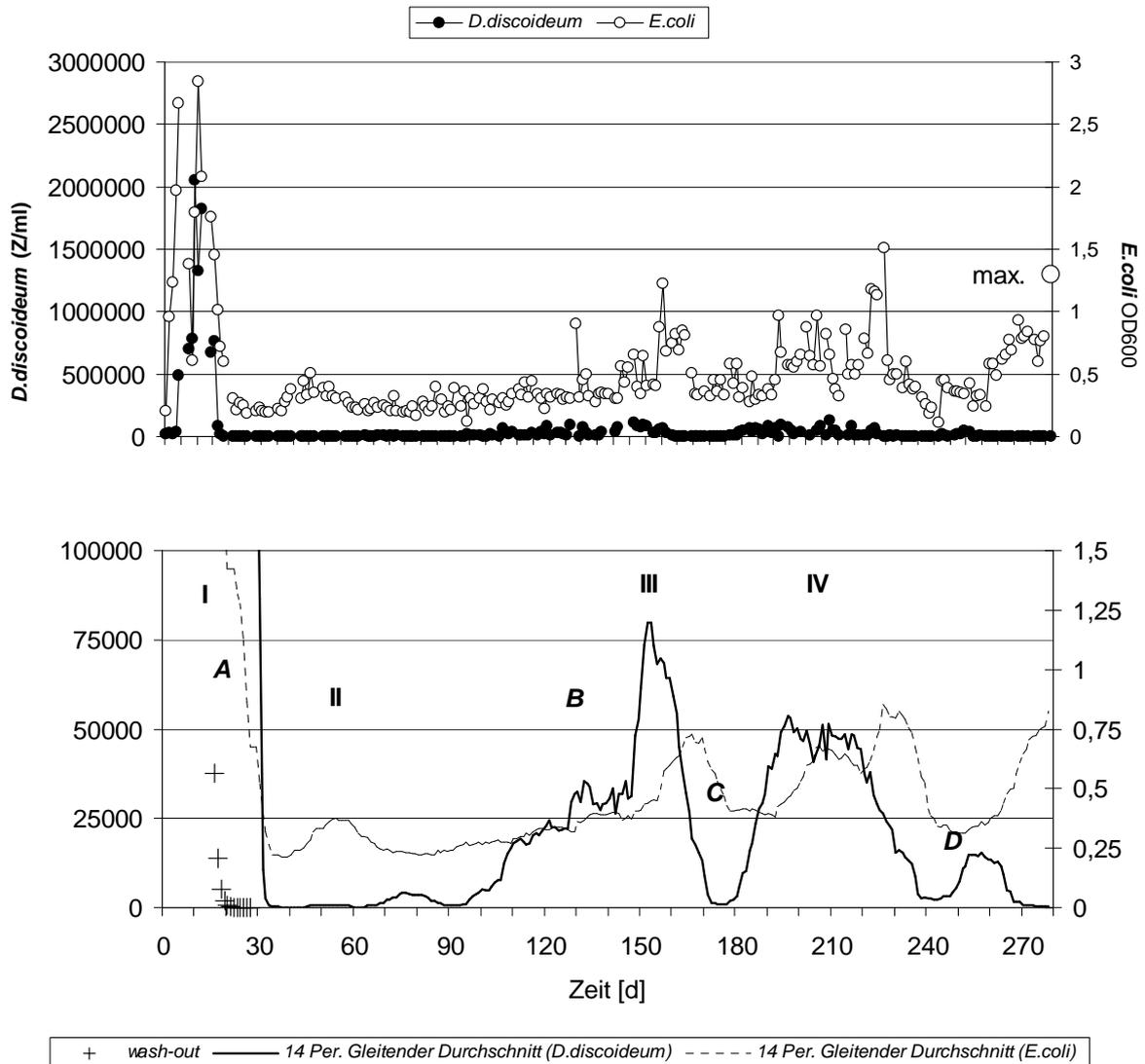


Abb.32: Kurvenverlauf der Kokultur aus *E. coli* und *D. discoideum* in Medium ohne Schwefelquelle (AB-Medium)

Nach dem Startwert von 23.000 Z/ml erreicht die Zellzahl von *D. discoideum* am 15. Tag ihr absolutes Maximum von 760.000 Z/ml (Oszillation **A**). Es folgt die allmähliche Steigerung zu Oszillation **B** mit einer Dauer von 94 Tagen. Diese Oszillation ist der nächsten Beuteoszillation um 12 Tage vorgelagert. Im Anschluss folgt Oszillation **C** mit einer Dauer von 65 Tagen. **C** ist der nächsten Beuteoszillation um 11 Tage vorgelagert. Oszillation **D** dauert 29 Tage. **D** ist der nächsten Beuteoszillation um 17 Tage vorgelagert. Die Predatorenpopulation schwingt mit einer Frequenz von 1 Osz./69 Tage und ist nach 268 Tagen nicht mehr nachzuweisen. Die optische Dichte der Bakterienpopulation startet mit 0,2 und entwickelt sich über ein Maximum nach zehn Tagen zu einer deutlichen Oszillation **I**. Nach 37 Tagen startet die **II**. Oszillation, welche nach 45 Tagen ihr Maximum erreicht und am 71. Tag wieder ausschwingt. Die Dauer von Oszillation **II** ist 35 Tage. Im Anschluss steigt die optische Dichte stetig bis auf einen Wert von 0,43 am 143. Tag. Von diesem Wert aus beginnt die **III**. Schwingung. Die Dauer von Oszillation **III** beträgt 47 Tage. Ausgehend vom 190. Tag erreicht die **IV**. Oszillation am 231. Tag mit 0,97 ihr Maximum und endet am 253. Tag mit einer OD von 0,24. Die Dauer der Oszillation **IV** beträgt 64 Tage. Das gute Nahrungsangebot (MW=0,5 OD600) führt zu einer mittleren Predatordichte von 56878 Z/ml. Diese hohe Zellzahl reduziert die Beutepopulation dahingehend, dass bakterielle Oszillationen erst nach etwa 140 Tagen entstehen können. Die Räubermaxima **B** und **C** sind den Beutemaxima um 12 Tage (**III**) und 11 Tage (**IV**) vorgelagert und lassen vermuten, dass auch hier das Wachstum von *E. coli* durch die Freisetzung von Schwefel durch *D. discoideum* gefördert wird. Mit dem Sinken der Zellzahlen der Predatoren nach Schwingung **B** entsteht wiederum ein bakterielles Schwingungsmuster, welches durch Zunahme der Räuberichte (**D**) wenig beeinträchtigt wird.

ERGEBNISSE

Schwingungsdauer und -anzahl von *D.discoideum* und *E.coli*

Die Anzahl der Oszillationen in einem Zeitraum von 276 Tagen bei gleicher Verdünnungsrate ist für *D. discoideum* in beiden Medien gleich (4 Oszillationen, Abbildung 33). Auch die Anzahl der Beuteoszillationen ist mit fünf in beiden Experimenten identisch. Dies entspricht einer Frequenz von 1 Osz./69 Tage. Die Frequenz von *E.coli* ist in J-Medium (1 Osz./ 69 Tage) niedriger als in AB-Medium (1 Osz./55 Tage). Da die Schwingungsfrequenz der Räuberpopulationen in beiden Medien identisch ist, sollte man annehmen, dass sich auch die Schwingungsdauer in beiden Medien ähnelt:

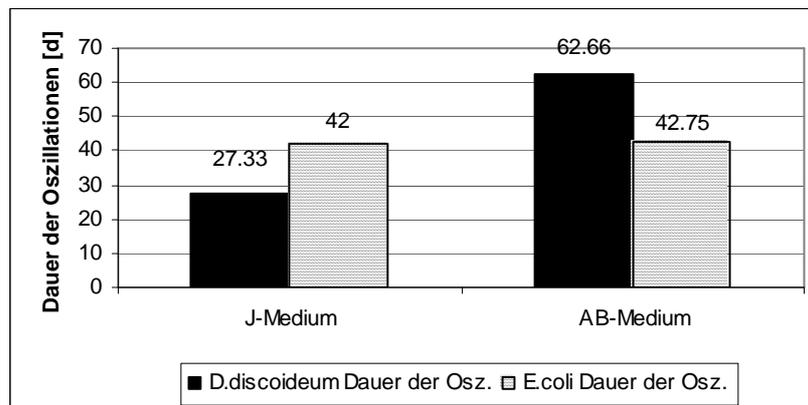


Abb.33: Vergleich der Oszillationsdauer von *E. coli* und *D. discoideum* über einen Zeitraum von 276 Tagen bei einer Verdünnungsrate von $D=1/d$

Die Dauer der Oszillationen von *D. discoideum* erhöht sich jedoch vom J-Medium (26 d 8h) zum AB-Medium (58 d 8h) um 32 Tage. Die Dauer der Oszillationen der Beutepopulation bleibt nahezu konstant (42 d/J-Medium, 42,75 d/AB-Medium). Die Zunahme der Schwingungsdauer in AB-Medium ist durch die hohe Anzahl von Beuteorganismen zu erklären, welche *D. discoideum* für einen längeren Zeitraum als Nahrung dienen kann, als wenn die Dichte der bakteriellen Biomasse gering wäre.

Zusammenfassend wird festgestellt, dass in beiden Medien eine Adaptation der Bakterien an das jeweilige Medium stattgefunden hat. Werden die anfänglichen maximalen Oszillationen weggelassen, weisen in beiden Medien die Bakterienpopulationen in den Abbildungen 34 und 35 eine positive Steigung auf:

ERGEBNISSE

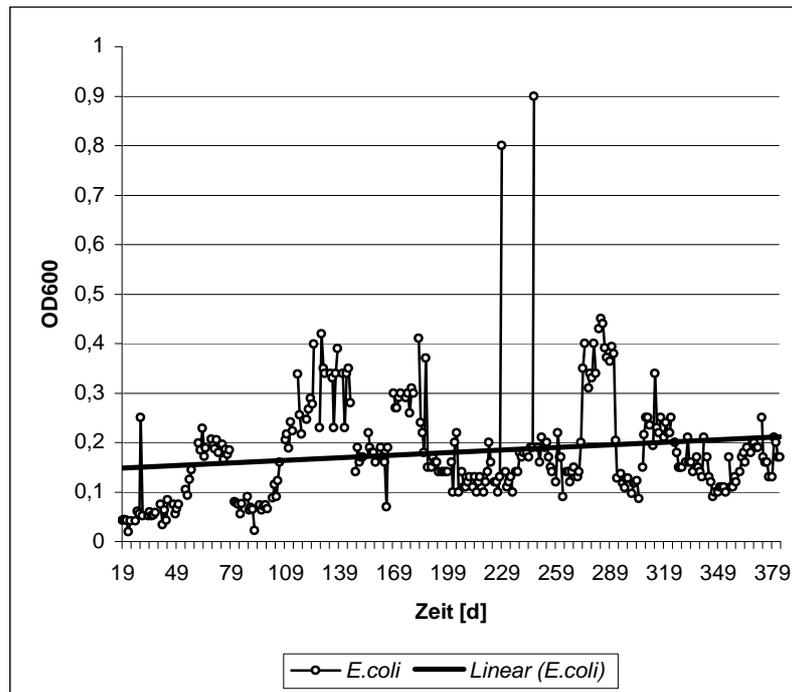


Abb.34: Entwicklung der Beutepopulation in J-Medium ab dem 19.Tag

Die bakterielle Population oszilliert mit leichter Steigung ($m= 0,03$) von einem Anfangswert von 0,04 (OD600) bis zu einem Endwert (zugleich Mittelwert) von 0,19 (OD600).

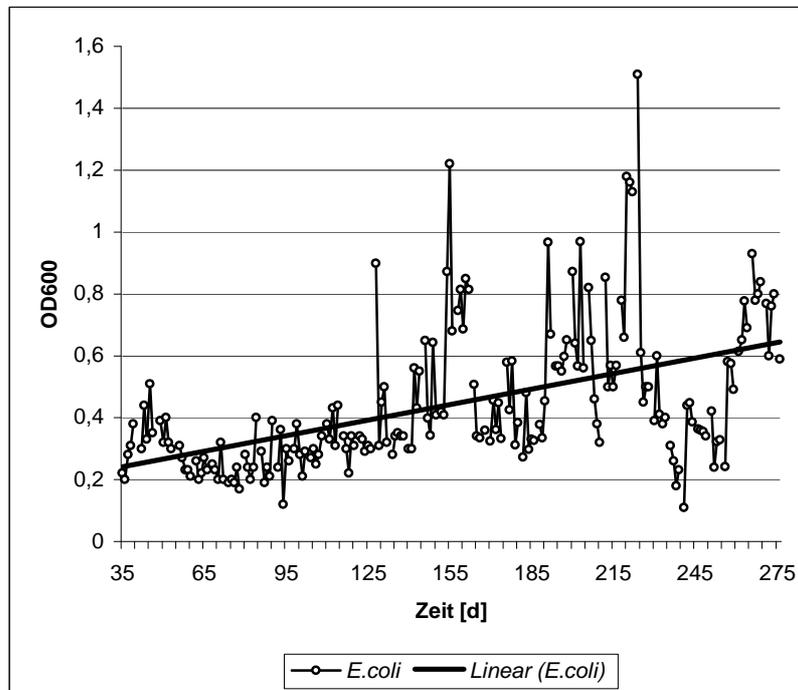


Abb.35: Entwicklung der Beutepopulation in AB-Medium ab dem 35.Tag

ERGEBNISSE

Die bakterielle Population oszilliert mit vergleichsweise stärkerer Steigung ($m=0,1$) von einem Anfangswert von 0,2 (OD600) bis zu einem Endwert von 0,58 (OD600).

Da außer von Kontaminationen der Nährmediumsreagenzien (seitens der Hersteller) keine Schwefel- und Stickstoffquellen vorhanden sind, kommt die Aminosäure Methionin als einzige Quelle für beide Substanzen in Betracht: In J-Medium oszilliert die Beutepopulation um einen Mittelwert von 0,19 (OD600), in Batch-Kultur erreicht *E.coli* in gleichem Medium eine optische Dichte von 0,29. Für den Langzeitversuch mit einem Medium in dem weder Stickstoff noch Schwefel enthalten ist, muss deshalb festgestellt werden, dass die metabolische Kopplung in schwefel- und stickstofffreiem Medium nicht überzeugend etabliert werden konnte. Die Eigenoszillationen III-VII schwingen auf einem Niveau, das mit dem Wachstum in Batch-Kultur vergleichbar ist. Es ist davon auszugehen, dass auch die Schwingungen I und II dieses Niveau erreichen würden, wenn sie nicht durch die Predatoren reduziert würden. Durch die Umsetzung einer metabolischen Kopplung sollte der von *D. discoideum* sezernierte Schwefel und Stickstoff die Dichte der bakteriellen Biomasse trotz Predationsdruck auf ein höheres Niveau heben, als in Batch-Kultur beobachtet wird. Das Erreichen des Beutemaximums *nach* dem Räubermaximum könnte als ein Hinweis auf die Bereitstellung von Schwefel und Stickstoff durch *D. discoideum* interpretiert werden, es ist jedoch wahrscheinlicher, dass bakterielle Resistenzstrategien das vorzeitige Maximum der Räuberpopulation hervorrufen. Die leichte Steigung der bakteriellen Biomasse ($m=0,03$) ist auf Adaptationen an die im Medium enthaltenen Verunreinigungen zurückzuführen.

In AB-Medium erreicht *E. coli* in Batch-Kultur eine optische Dichte von 0,34, die im Langzeitversuch auf 0,58 (OD600) erhöht werden konnte. Die Dichte der Bakterienpopulation nimmt von Beginn an zu, obwohl ein hoher Predationsdruck besteht. Auch in AB-Medium erreicht die Räuberpopulation ihr Maximum vor dem Beutemaximum und macht einen Zusammenhang im Sinne der obligaten Syntrophie wahrscheinlich (s.o.). Die Steigung der Entwicklung der bakteriellen Biomasse ($m=0,1$) weist darauf hin, dass in AB-Medium Varianten von *E. coli* selektioniert werden, die den im Methionin enthaltenen Schwefel nutzen können. Hieraus resultiert eine hohe Beutedichte, welche im Vergleich zum J-Medium über einen wesentlich längeren Zeitraum Räuber/Beuteoszillationen hervorruft.

1.3.3 Überprüfung evolvierter Stämme auf Resistenzeigenschaften

Am Ende der Experimente wurde geprüft, ob die in der Kulturapparatur evolvierten Stämme eine Resistenz gegenüber *D. discoideum* entwickelt hatten. Da potentielle bakterielle Resistenzstrategien in Suspension entwickelt wurden, ist das nachfolgende Verfahren auf SM-Agar-Platten nur bedingt aussagekräftig. Bakterielle Resistenz gegenüber *D. discoideum* sollte die Entstehung von Plaques verhindern, bzw. atypische Plaques hervorrufen. Hierzu wurde jeweils mit der letzten Probe jedes Versuchs eine Flüssigkultur angesetzt. Es wurde das in dem jeweiligen Experiment eingesetzte Medium verwendet und nach 72h (22°C) gingen 200µl der Suspension als Nahrungsgrundlage für *D. discoideum* in den Plaque Test ein (s.a.: Material und Methoden: *Plaque Test*). Anschließend wurde eine definierte Menge von *D. discoideum* auf dem Bakterienrasen ausgebracht und die Platten nach 72h ausgewertet (Abbildung 36).

ERGEBNISSE

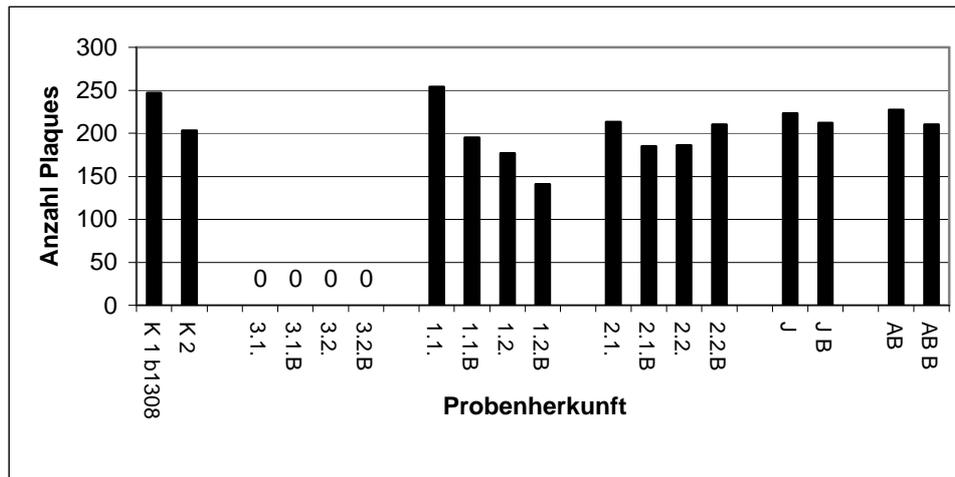


Abb.36: Entstehung von Plaques auf Bakterienisolaten aller Experimente

Wird lediglich die Anzahl der Plaques betrachtet, wird deutlich, dass bis auf Lauf 3.1. und 3.2. alle Bakterienisolate sensitiv sind, d.h. von *D. discoideum* erkannt und phagozytiert werden können.

Bei der qualitativen Beurteilung unterscheiden sich die Plaques des Symbiose Versuchs in schwefelfreiem Medium (AB-Medium) von allen anderen Läufen: die beobachteten Plaques waren so klein, dass die Oberfläche aller Plaques zusammen genommen etwa zehn Prozent der zur Kultivierung genutzten Gesamtfläche ausmachte. Eine Entwicklung von Fruchtkörpern konnte nach einem Zeitraum von 14 Tagen nicht beobachtet werden. Die Oberflächen von Plaques sensitiver Isolate nahmen in ihrer Gesamtheit etwa neunzig Prozent der zur Kultivierung genutzten Oberfläche ein, die Entwicklung von Fruchtkörpern setzte erwartungsgemäß nach etwa 72h ein. Einen weiteren qualitativen Unterschied zu den sensitiven Bakterienisolaten weist Lauf 1.2. auf: die beobachteten Plaques waren in Form und Größe mit den Plaques sensitiver Isolate vergleichbar. Bei mikroskopischer Betrachtung zeigte sich eine leichte Trübung des Plaques, die bei sensitiven Isolaten nicht beobachtet wird.

In den Läufen in denen es zur Extinktion von *D. discoideum* kam, konnte unter Berücksichtigung der Generationszeit angegeben werden, nach wie viel Generationen der Predatoren *E. coli* resistent geworden ist. Hierbei glichen sich die Suspensionsläufe 1.1. und 3.1. mit 7,6 Generationen (Lauf 1.1., bei $g=88h$) und 7,9 Generationen (Lauf 3.1., bei $g=31h$), obwohl die jeweils geringste, bzw. höchste Verdünnungsrate vorlag. Bei der mittleren Verdünnungsrate von $D=0,57$ ($g=42h$) wurden 25 Generationen von *D. discoideum* erfasst, bevor die Beutepopulation Resistenzstrategien entwickelte. In den Symbioseexperimenten konnten die Predatoren in schwefel- und stickstofffreiem Medium nach 193 Generationen und in lediglich schwefelfreiem Medium nach 268 Generationen ($D=1,0$) aufgrund von bakteriellen Resistenzstrategien nicht mehr nachgewiesen werden.