

Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin
AG Prof. Dr. R. Mutzel

**ANALYSE VON ADAPTATIONSPROZESSEN
IN EINEM
MIKROBIELLEN RÄUBER-BEUTE-SYSTEM
IN KONTINUIERLICHER KULTUR**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Vorgelegt von
Dipl.-Biol. Jens Baumgardt

Berlin 2006

Disputation am 30.6.2006

Diese Arbeit entstand in der Zeit zwischen Januar 2002 und Mai 2006 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rupert Mutzel an der Freien Universität Berlin.

1. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel
2. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Hausmann

SUMMARY

Interactions between predator (*Dictyostelium discoideum*) and prey (*Escherichia coli*) in continuous culture have been examined using varying dilution rates ($D= 0.27, 0.57, 0.77$). A continuous culture apparatus which prevented biofilm development was used and the resulting oscillation patterns have been compared to the predictions of Lotka and Volterra. According to the first rule of Lotka and Volterra time shifted coupling of a predator maximum to a previous prey maximum should produce undamped oscillations without time limits.

This oscillation pattern was not observed. Irrespective of the dilution rate predators became extinct in all experiments due to bacterial resistance strategies. Self oscillations of prey were observed in the absence of predators, suggesting that oscillations were not driven by predation pressure but rather by substrate competition between prey subpopulations. The postulated undamped oscillations were observed when both organisms were allowed to colonise the inner surface of reactor vessels. The development of this biofilm created an ecological niche which prevented the extinction of *D. discoideum* and offered a sufficient food supply.

Artificial interdependence between prey and predator was established using metabolic coupling in a second experiment to reconstruct the development of an artificial symbiosis. Growth of prey depended on the sulphur concentration in the culture medium. Sulphur was extracted from methionine by *D. discoideum* and coupled growth of prey to growth of predator. Predators depended on *E. coli* cells as nutrition and accomplished the metabolic coupling.

Application of a medium which contained methionine as the sole source of sulphur and nitrogen led to extinction of predators after 180 days ($D= 1.0$), due to low densities of bacterial biomass. Offering a source of nitrogen led to extinction of predators after 268 days due to a relatively high density of bacterial biomass. The increased bacterial density could be explained by bacterial variants which can extract sulphur from the amino group of methionine. In both experiments prey maxima were reached *after* predator maxima because of bacterial resistance strategies (filamentation, higher motility) which led to the extinction of predators under high predation pressure. The occurrence of bacterial self oscillations in symbiosis experiments suggests that bacterial oscillation patterns are mainly a result of bacterial food supply. Predators only reacted to prey maxima but did not cause prey minima as predicted by Lotka's and Volterra's coupled oscillations.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Wechselwirkungen zwischen Räuberpopulation (*Dictyostelium discoideum*) und Beutepopulation (*Escherichia coli*) wurden in kontinuierlicher Kultur in Abhängigkeit von variierenden Verdünnungsraten ($D = 0,27, 0,57, 0,77$) überprüft. Unter Verwendung einer Kulturapparatur, welche die Entstehung von Biofilmen vermeidet, wurden die entstandenen Schwingungsmuster mit den von A.J. Lotka und V. Volterra prognostizierten Oszillationen verglichen. Entsprechend der ersten Regel nach Lotka und Volterra konnten zeitverschobene Kopplungen der Räubermaxima an die vorangegangenen Beutemaxima erwartet werden, deren zyklischer Wechsel zeitlich nicht begrenzte, ungedämpfte Oszillationen hervorruft.

Dieses Schwingungsverhalten wurde nicht beobachtet. Unabhängig von der gewählten Verdünnungsrate kam es zur Extinktion der Räuberpopulation, welche auf die Entwicklung von bakteriellen Resistenzstrategien zurückzuführen war. Auch nach Extinktion der Räuberpopulation traten Eigenoszillationen der Beutepopulation auf, welche möglicherweise auf Konkurrenz von bakteriellen Subpopulationen um wachstumslimitierende Substrate zurückzuführen sind. Hieraus wurde geschlossen, dass ein Beuteminimum primär durch ein sinkendes Substratangebot und nicht durch Predation hervorgerufen wurde. Die von Lotka und Volterra geforderten ungedämpften Schwingungen konnten dann beobachtet werden, wenn beiden Populationen die Besiedlung der Reaktorinnenwand ermöglicht wurde. Der so entstandene Biofilm stellt eine ökologische Nische dar, welche das Auswaschen von *D. dictyostelium* verhinderte und ein ausreichendes Nahrungsangebot gewährleistete.

In einem weiteren Experiment wurde durch metabolische Kopplung ein künstliches Abhängigkeitsverhältnis zwischen Räuber- und Beutepopulation geschaffen, um die Entstehung einer experimentellen Symbiose hervorzurufen. Das Wachstum der Beute war von der Schwefelkonzentration im Medium abhängig. Schwefel wurde aus dem Abbau von Methionin von *D. discoideum* gewonnen und dadurch das Wachstum der Beutepopulation an das Wachstum der Predatoren gekoppelt. Die Predatoren waren auf *E. coli* als Nahrungsquelle angewiesen und die metabolische Kopplung somit vollendet.

In Medium, in dem außer Methionin keine Stickstoff- und Schwefelquelle enthalten war, kam es bei einer Verdünnungsrate von $D = 1,0$ nach 180 Tagen zur Extinktion der Räuberpopulation: die Dichte der bakteriellen Biomasse war zu gering, um *D. discoideum* über einen längeren Zeitraum im System zu halten. In Gegenwart einer Stickstoffquelle erfolgte die Extinktion der Predatoren erst nach 268 Tagen, da die bakterielle Dichte ausreichend hoch war: vermutlich sind Varianten aufgetreten, die Schwefel aus der Aminogruppe des im Medium enthaltenen Methionins freisetzen können. In beiden Versuchen wurden Beutemaxima stets *nach* den Räubermaxima erreicht. Ursache hierfür können bakterielle Resistenzstrategien sein (filamentöses Wachstum, erhöhte Motilität), die bei hohem Predationsdruck das Absterben der Räuberpopulation hervorrufen und erst dann zu einem Beutemaximum führen. Auch in den Symbioseexperimenten bestimmten bakterielle Eigenoszillationen das Schwingungsmuster. Die Räuberpopulation reagierte auf substratabhängige Beutemaxima, hatte aber auf das Auslösen eines Beuteminimums im Sinne der von Lotka und Volterra geforderten gekoppelten Oszillationen keinen Einfluss.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Die Versuchsorganismen	2
1.1.1	<i>Dictyostelium discoideum</i>	2
1.1.2	<i>Escherichia coli</i>	4
1.2	Mikrobielle Lebensgemeinschaften	5
1.2.1	Räuber-Beute-Beziehungen	6
1.2.2	Symbiotische Beziehungen	8
1.3	Kontinuierliche Kulturen	12
1.3.1	Kontinuierliche Kultivierung und Biofilme	13
1.4.	Zielsetzung der Arbeit	14
2.	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	Organismen und Stämme	15
2.1.1	Überprüfung evolvierter Stämme auf ihre Identität	15
2.1.2	Klonen und Konservieren der Organismen	15
2.1.3	Animpfen der Kulturapparatur	16
2.1.4	Chemikalienliste	17
2.1.5	Medien	19
2.1.6	Bestimmung mikrobiologischer Grundgrößen	23
2.2	Kulturapparatur	25
2.3	Umbau der Kulturapparatur	28
2.3.1	Automatisierung der Probenentnahme	29
2.3.2	Fehlerabschätzung	32
2.4	Betriebsparameter im Vergleich	34
3.	ERGEBNISSE	35
3.1	Umbau der Kulturapparatur	35
3.2	Räuber-Beute-Oszillationen	36
3.2.1	Kleine Welle	38
3.2.2	Grosse Welle	39
3.3	Experimentelle Symbiose	53
3.3.1	Umwandlung von Methionin durch <i>D.discoideum</i>	53
3.3.2	Oszillationsverhalten von <i>E.coli</i> und <i>D.discoideum</i>	55
3.3.3	Überprüfung evolvierter Stämme auf Resistenz	60
4.	DISKUSSION	62
4.1	Räuber-Beute-Oszillationen	62
4.1.1	Kleine Welle	63
4.1.2	Grosse Welle	68
4.2	Experimentelle Symbiose	76
4.3.	Überprüfung evolvierter Stämme auf Resistenz	88
4.4	Populationsentwicklungen	89
4.4.1	Räuber-Beute Experimente	89
4.4.2	Symbiose Experimente	90
5.	ANHANG	92
5.1	Literatur	92
5.2	Änderung des Programmierablaufs	100
5.3	Darstellung und Beschreibung der kleinen Welle	103
5.5	Identifikation der Isolate aller Experimente	111