

1 EINLEITUNG

Die Gesamtheit eines Ökosystems kann nur verstanden werden, wenn die Wechselwirkungen der interagierenden Populationen bekannt sind. Einen wichtigen Bestandteil dieser Interaktionen stellen Räuber-Beute-Beziehungen dar. Für diese Form der Wechselwirkung ist die zeitverschobene Kopplung des Räubermaximums an das vorangegangene Beutemaximum charakteristisch. Da beide Maxima in regelmäßigen Abständen erreicht werden, ist es möglich, das Schwingungsverhalten mathematisch zu formulieren. Räuber-Beute-Interaktionen sind im Freilandversuch aufgrund der vielfältigen biotischen und abiotischen Einflüsse sehr schwierig zu modellieren. Neben Temperatur, Konvektion, pH-Wert, Strahlung oder Niederschlag müssten inter- und intraspezifische Wechselwirkungen berücksichtigt und entsprechende mathematische Funktionen eingeführt werden.

Die von A.J. Lotka (1925) und V. Volterra (1926) entwickelten Gleichungen gelten als einfachstes Modell zur Beschreibung von zyklischem Verhalten bei Räuber-Beute-Beziehungen, da nur wenige Koeffizienten in die Gleichungen eingehen. Die Anwendung dieses Modells könnte für die Beschreibung idealer Systeme geeignet sein, in denen alle Faktoren bekannt sind. Der Verzicht auf weitere Parameter im Gleichungssystem ist im Experiment nur durch eine Reduzierung nicht kontrollierbarer Einflüsse zu legitimieren. Die Generationszeit der untersuchten Populationen sollte kurz sein, um die Analyse einer Vielzahl von Oszillationen zu ermöglichen. Der Einsatz von Populationen mit großer Individuenzahl reduziert stochastische Schwankungen auf ein Minimum.

Diesen Anforderungen entspricht der Einsatz von mikrobiellen Räuber-Beutesystemen in kontinuierlicher Kultur. Bei den bis zu diesem Zeitpunkt veröffentlichten Untersuchungen zu mikrobiellen Räuber-Beute-Interaktionen ist die Kultur im Chemostat Stand der Technik (KOTESWARA et al. 1989, HAHN et al. 1998, TSUCHIYA & DRAKE 1972, HAHN & HÖFLE 1999). Chemostat Kulturen selektionieren jedoch verdünnungsresistente Varianten und begünstigen so die Entstehung von Biofilmen (CHAO & RAMSDELL 1985). Ohne Kenntnis der genauen Individuenzahl beider Populationen sind die in der Kultur vorliegenden Verhältnisse mathematisch nicht zugänglich.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen durch den Einsatz einer Apparatur zur kontinuierlichen Kultur von lebenden Zellen in Suspension (MUTZEL & MARLIERE 1999) erzielt werden. Die Kulturapparatur umgeht das oben erwähnte Risiko und lässt die kontrollierte Vermeidung oder Entstehung von Biofilmen zu. In dem so geschaffenen idealen System sollen die Einflüsse von Biofilmen und variierenden Verdünnungsraten auf das Schwingungsverhalten von Beutepopulation (*Escherichia coli*) und Räuberpopulation (*Dictyostelium discoideum*) ermittelt und mit dem von Lotka und Volterra geforderten Schwingungsmuster verglichen werden. In einem weiteren Schritt wird durch metabolische Kopplung eine gegenseitige Abhängigkeit von Räuber- und Beutepopulation erzeugt, um die Entstehung einer experimentellen Symbiose zu erwirken.

Im Hinblick auf Vorgänge wie Populationsfluktuationen und Entstehung von Symbiosen ist ein detailliertes Verständnis der elementaren Prozesse notwendig. Die vorliegende Arbeit versucht dazu beizutragen.

1.1 Die Versuchsorganismen

Alle Experimente dieser Arbeit wurden mit dem Bakterium *Escherichia coli* und der sozialen Amöbe *Dictyostelium discoideum* durchgeführt.

Beide Mikroorganismen werden im Folgenden näher charakterisiert.

1.1.1 *Dictyostelium discoideum*

Taxonomie

Dictyostelium wurde 1869 von dem Mykologen Oskar Brefeld entdeckt und beschrieben. Brefeld untersuchte fungale Lebensgemeinschaften in Pferdeäpfeln und ordnete seine Neuentdeckung irrtümlicherweise den Jochpilzen zu. Bei näherer Betrachtung fiel Brefeld jedoch auf, dass die Reifung der Sporen nicht zur Entwicklung von Pilzhypen und Mycelium führte, sondern zu sich amöboid fortbewegenden Zellen. Die Verschmelzung der beobachteten amöboiden und fungalen Struktur- und Funktionsmerkmalen in einem Organismus machte es schwierig, *Dictyostelium* eindeutig zu klassifizieren. Nach Sequenzvergleichen ribosomaler RNA wird *Dictyostelium discoideum* in die Klasse der Mycetozoa (Schleimpilze) und weiter in die Ordnung der Dictyosteliida (zelluläre Schleimpilze) eingeordnet. Die Art *Dictyostelium discoideum* gehört zu der Familie der Dictyosteliidae, Gattung *Dictyostelium* und ist als Zelllinie NC4 weltweit Modellorganismus für das Studium von Chemotaxis, Signaltransduktion, Bewegung, Zelldifferenzierung und Musterbildung geworden.

Die auch als 'soziale Amöben' bezeichneten Organismen weisen nach Brefelds Beobachtungen zwei Entwicklungsstadien auf: die netzartige (lat.: Dicty) Aggregation der einzelnen Zellen zu den turmähnlichen (lat.: -stelium) Fruchtkörpern. Er beobachtete, dass die einzelnen amöboiden Zellen das vegetative Wachstumsstadium repräsentieren und der Fruchtkörper mit den darin enthaltenen Sporen der Überdauerung bei ungünstigen Nahrungsbedingungen dienen.

Ökologie

Obwohl zuerst aus verschiedenen Dungsorten isoliert, sind soziale Amöben hauptsächlich in der obersten Schicht von Waldböden zu finden (FRANCIS, EISENBERG 1993; ELLISON, BUSS 1983). Ändern sich klimatische und Nährstoffbedingungen zugunsten der im Boden verteilten Bakterien, induziert das bakterielle Wachstum die Entstehung vegetativer Amöbenzellen aus Sporen. Um sich einmal zu teilen, müssen etwa tausend Bakterienzellen aufgenommen und verdaut werden (GERISCH 1963). *Dictyostelium* nimmt außer den verschiedensten Bodenbakterien auch Hefen auf. In der Laborkultur ist *D. discoideum* auf die Zuführung essentieller Aminosäuren wie z.B. Methionin angewiesen (FRANKE & KESSIN 1977), wenn keine mikrobielle Nahrungsquelle zur Verfügung steht. Als Nahrungskonkurrenten und als Predatoren treten hauptsächlich Nematoden auf. *Caenorhabditis elegans* kann sich z.B. nur so lange von *Dictyostelium* ernähren, bis diese beginnen zu aggregieren (Abbildung 1). Das Aggregat ist umgeben von Mucopolysacchariden, die den Zellverband während der Entwicklung zum schützt.

Entwicklungszyklus

Anfang der dreißiger Jahre entdeckte Kenneth Raper, dass *Dictyostelium* sich nicht von den Inhaltsstoffen der verschiedenen bis dahin verwendeten Dungarten ernährt, sondern dass die darin enthaltenen Bakterien die eigentliche Nahrungsgrundlage sind. Raper isolierte 1935 die bis dahin unbekannte Art *Dictyostelium discoideum* aus Bodenproben der Wälder von Ashville, North Carolina (Stamm NC4). Es gelang nun leicht, die Amöben zu kultivieren, da es problemlos möglich war, einen Bakterienrasen bereitzustellen, der von *Dictyostelium* abgeweidet werden konnte. Mit Etablierung dieses Räuber/Beute Systems gelang es Raper und Thom detaillierte Angaben über den vollständigen Entwicklungszyklus von *Dictyostelium discoideum* zu machen (Abbildung 1). Da sich *D. discoideum* im natürlichen Habitat von Bakterien ernährt und im amöboiden Stadium problemlos in Flüssigkulturen vermehren lässt, konnte der Organismus in dieser Arbeit als Predator zur Untersuchung von Räuber-Beute- Interaktionen eingesetzt werden.

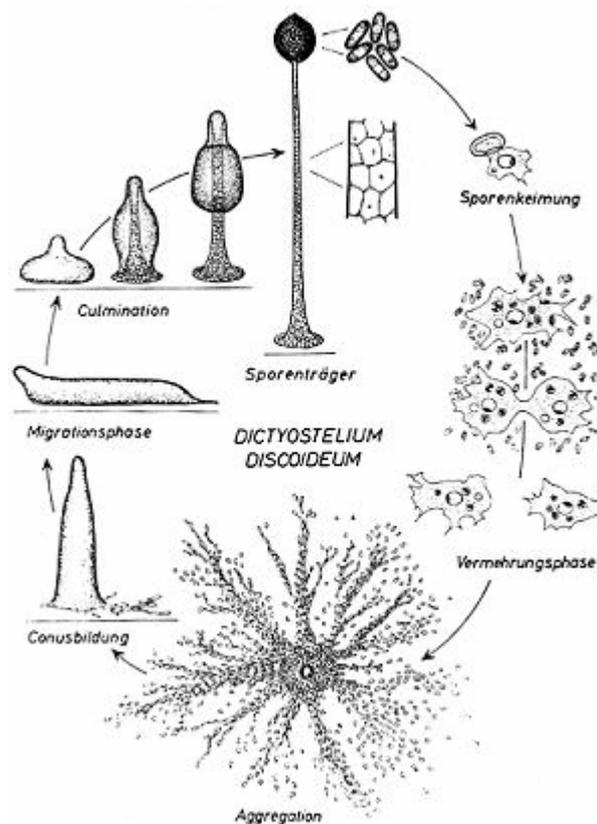


Abb.1: Entwicklungszyklus von *D. discoideum* (W. Nellen, Universität Kassel)

Die amöboid lebenden Zellen von *Dictyostelium discoideum* findet man in den oberen Laubschichten des Waldbodens, wo sie Bakterien phagozytieren. Hierbei scheint die von Bakterien produzierte Folsäure den Amöben zu helfen, ihre Beute chemotaktisch aufzufinden (LOOMIS 1975). Mit dem Versiegen der Nahrungsquelle leiten die Zellen

ihren Entwicklungsprozess ein. Nach dem Beginn der Hungerperiode etabliert sich zwischen den Einzelzellen ein Kommunikationssystem, das auf Synthese und Detektion von zyklischem AMP (cAMP) basiert. Etwa vier Stunden nach dem Einsetzen der Hungerphase beginnen einige Zellen mit der Sezernierung von cAMP. Die Ausscheidung verläuft in Pulsen mit einem Intervall von 5-6 Minuten und bewirkt bei bisher unbeteiligten Zellen ebenfalls die Produktion und Ausschüttung von cAMP. Die aggregierenden Zellen bilden konzentrische Wellen, das Signal wird verstärkt und die Zellen beginnen sich chemotaktisch auf das Aggregationszentrum zu zubewegen. Die Amöben beginnen End-zu-End-Kontakte auszubilden und sich in Zellströmen in Richtung des Aggregationszentrums zu bewegen (RAPER 1935). In zehn Stunden bildet sich aus bis zu 10^5 Zellen solch ein Aggregat (LOOMIS 1975). Das so entstandene Pseudoplasmodium ist von einer schützenden extrazellulären Matrix umgeben und wird aufgrund der Ähnlichkeit zu Nacktschnecken als 'slug' bezeichnet. Im 'slug' werden zwei vordifferenzierte Zelltypen unterschieden: die Prästielzellen im anterioren Bereich und die Präsporenzellen im posterioren Bereich (RAPER 1940). Der slug ist in der Lage, sich phototaktisch und chemotaktisch zu orientieren. Als 'first-finger' gelingt es ihm durch kreisende Bewegungen sicher zu stellen, dass er nicht in unmittelbarer Nachbarschaft zu anderen slugs mit den nächsten Entwicklungsschritten beginnt. In diesem Falle migriert der slug in einen freien Bereich und beginnt mit der Ausbildung der 'mexican-hat' Struktur. Hierbei richtet sich die Spitze des slugs auf und die Prästielzellen strömen an den Präsporenzellen vorbei in den unteren Bereich des 'mexican-hat'. Die Prästielzellen verfestigen sich durch Vakuolisierung und die Ausbildung einer zellulosehaltigen Zellwand. Sind beide Prozesse abgeschlossen, sterben die Zellen ab und sind mechanisch in der Lage einen Stiel auszubilden, der stark genug ist, die Präsporenzellen zu tragen. Die Präsporenzellen werden durch die Bildung des Stiels an die Spitze gehoben und bilden den Sporenkopf aus. In ihm reifen die Sporen heran, um bei günstigen Umweltbedingungen wieder auszukeimen und in das amöboide Stadium einzutreten.

1.1.2 *Escherichia coli*

Taxonomie

Die prokaryontische Art *Escherichia coli* ist Bestandteil des Reiches der Bacteria, und gehört hier in die Klasse der Gamma-subdivision der Proteobacteria. Der Stamm der Proteobacteria gliedert sich weiter in die Ordnung der Enterobacteriales und die Enterobacteriaceae auf. Die Enterobacteriaceae, eine Familie Gram-negativer, stäbchenförmiger Bakterien, die durch ein vergleichsweise schnelles Wachstum auffällt, teilen eine Vielzahl biochemischer und morphologischer Eigenschaften. Sie sind Oxidase negativ, Katalase positiv, nicht Sporen bildend, aufgrund von peritricher Begeißelung beweglich und besitzen die Möglichkeit Nitrat zu Nitrit zu reduzieren (BALOWS et al 1992). Sind Mineralien und eine Kohlenstoffquelle vorhanden, kann *E. coli* als prototropher Organismus alle Wachstumsstoffe selbst synthetisieren. Das Genom von *E. coli* ist vollständig sequenziert (BLATTNER et. al. 1997) und die physiologischen Eigenschaften sind ausführlich beschrieben (NEIDHARDT 1987)

Ökologie

Obwohl *E. coli* weder in Böden noch in Gewässern lange überlebt (NEIDHARDT 1987), hat das Bakterium eine ökologische Nische gefunden: den Verdauungstrakt von Säugetieren und Vögeln. Nicht immer ist das Zusammenleben zwischen *E. coli* und seinem Wirt harmonisch, in einigen Fällen kommt es zu schweren Durchfallerkrankungen, in anderen Fällen infizieren Varianten des Bakteriums den Urogenitaltrakt und können Blasen- und Nierenbeckenentzündungen hervorrufen (MADIGAN et al. 1997, MURRAY et al. 1984).

1.2 Mikrobielle Lebensgemeinschaften

Die Summe der in einem Lebensraum interagierenden Populationen wird als Lebensgemeinschaft (Biozönose) bezeichnet. Die betrachteten Populationen einer Biozönose sind untereinander durch starke Interaktionen miteinander verbunden, während sie mit benachbarten Lebensgemeinschaften nur durch schwache Interaktionen verbunden sind. Wie bei höheren Organismen kann auch das Verhalten von mikrobiellen Populationen innerhalb einer Biozönose in wichtige Wechselwirkungen unterteilt werden (Tabelle 1, ODUM 1999). Die für diese Arbeit relevanten Interaktionen werden kurz dargestellt:

Typ der Wechselwirkung	Arten		Beschreibung der Wechselwirkung
	1	2	
Parasitismus	+	-	Art 1 lebt als Parasit auf Art 2
Räuber-Beute-Beziehung	+	-	Art 1 ernährt sich als Räuber von Art 2 (Beute)
Protocooperation	+	+	Interaktion für beide förderlich, nicht obligat
Mutualismus, (~Symbiose)	+	+	Interaktion für beide förderlich, obligat

Tab.1: Typen der Wechselbeziehungen zwischen den Arten 1 und 2
(0 = ohne Relevanz, + = positiver Einfluss, - = negativer Einfluss)

Im Gegensatz zu den oben erwähnten Wechselwirkungen ist der Begriff der Symbiose ungenau definiert. Er bedeutet übersetzt 'Zusammenleben' und wird vielfältig verwendet. In dieser Arbeit wird Symbiose entsprechend dem Begriff Mutualismus eng ausgelegt und bezeichnet das Zusammenleben von zwei Arten miteinander in gegenseitiger Abhängigkeit. Werden die Arten voneinander getrennt, sterben beide Populationen, da keine der Arten einzeln lebensfähig ist.

Wie auch in Laborkulturen bilden Bakterien in ihrem natürlichen Habitat Biofilme, um ihr Überleben und Wachstum zu sichern. Biofilme sind ein wirksamer Abwehrmechanismus gegen physikalische Kräfte wie Strömung, Verdünnung und Austrocknung. Zellen des Immunsystems und toxischen Substanzen wie Antibiotika wird es erschwert, ihre Wirkung zu entfalten. Die bakterielle Schichtenbildung erleichtert die interzelluläre Kommunikation und ermöglicht effizienten Gentransfer. Neben Abwehrmechanismen ermöglichen Biofilme die dauerhafte Besiedlung einer bevorzugten Nische. Nischenbildung erfolgt oft auf nährstoffreichen Oberflächen wie zum Beispiel Körpergewebe, medizinischen Beatmungs- Ernährungs- und

Infusionssystemen, sanitären Rohrleitungssystemen und Filtersubstraten von Bioreaktoren und Klärwerken (MADIGAN & MARTINKO 1997). Aufgrund der wichtigen Bedeutung in ökologischen Kreisläufen und technischen und medizinischen Anwendungen ist es von besonderem Interesse, mehr über die Eigenschaften und somit die Kontrolle von Biofilmen zu erfahren. Im natürlichen aquatischen Habitat werden Biofilme von Protozoen und anderen Räubern besiedelt und phagozytiert. Dieses als 'Grazing' bezeichnete Abweiden des Bakterienrasens durch mikrobielle Konsumenten 1. Ordnung ist klassischer Bestandteil einer Räuber-Beute-Beziehung und stellt die wichtigste biologische Ursache bakterieller Mortalität dar.

Im Folgenden werden die für diese Arbeit relevanten Wechselwirkungen kurz beschrieben.

1.2.1 Räuber-Beute-Beziehungen

Innerhalb von Beutepopulationen entstehen immer wieder Varianten, denen es gelingt, dem Räuber zu entkommen. In der Folge setzen sich Räubervarianten durch, die diese Resistenzstrategie umgehen können. Bakterien haben Mechanismen entwickelt, durch die ihre Aufnahme durch den Predator verhindert wird (preingestional strategies) oder aber die Verdauung im Räuber unterbleibt (postingestional strategies). Predatoren unterliegen dem Selektionsdruck, diese Mechanismen zu umgehen (HAHN, HÖFLE 1998). In marinen und limnischen Habitaten gibt es Hinweise auf so genannte 'grazing-resistant-bacteria' (GRB), die durch morphologische und chemische Veränderungen sowie Verhaltensänderungen und Wachstum in räumlichen Nischen ihre Überlebenschancen erhöhen. Hierbei ist die Zellgröße der Beute von erheblicher Bedeutung, da Zellen im unteren und oberen Größenbereich in geringerem Maße gefressen werden (JÜRGENS u. GÜDE 1994, HAHN et al. 1999, BÖNIGK et al. 2004). HAHN und Mitarbeiter (1999) haben gezeigt, dass die Fadenbildung bei fakultativ fädigen Bakterien spezialisiert von der Wachstumsrate abhängt. Sie wird indirekt durch Predatoren stimuliert, indem die Reduktion der Biomasse zu einer erhöhten Wachstumsrate und damit zu verstärkter Fadenbildung führt. In diesem Fall ist es auch möglich, dass die Fadenbildung nicht aus einem besseren Nährstoffangebot heraus resultiert, sondern dass größere Bakterien nicht gefressen werden können und so positiv selektioniert werden. In Abhängigkeit von den experimentell eingesetzten Bakterienstämmen ist die Wachstumsrate der bakterivoren Predatoren sehr unterschiedlich. Matz und Mitarbeiter (2003) belegten, dass es zwischen Nanoflagellaten (*Ochromonas* sp., *Spumella* sp., *Bodo saltans*) und Violacein produzierenden Bakterien (*Janthinobacterium lividum*, *Chromobacterium violaceum*) nicht nur zu einem verminderten Predatorenwachstum kommt, sondern dass sogar auf die Bakterien zurückzuführende toxische Effekte auftreten können.

In den zwanziger Jahren entwickelten LOTKA und VOLTERRA (1925/26) unabhängig voneinander ein mathematisches Modell zur Darstellung von Räuber-Beute-Beziehungen. Ursache für die Entwicklung der Gleichungen war die Beobachtung, dass in Kanada die Populationsdichten von Luchs und Schneeschuhhase in immer gleichen Zyklen oszillierten (Abbildung 2), so dass ein mathematisch formulierbarer Zusammenhang vermutet wurde (BEGON et al. 1997).

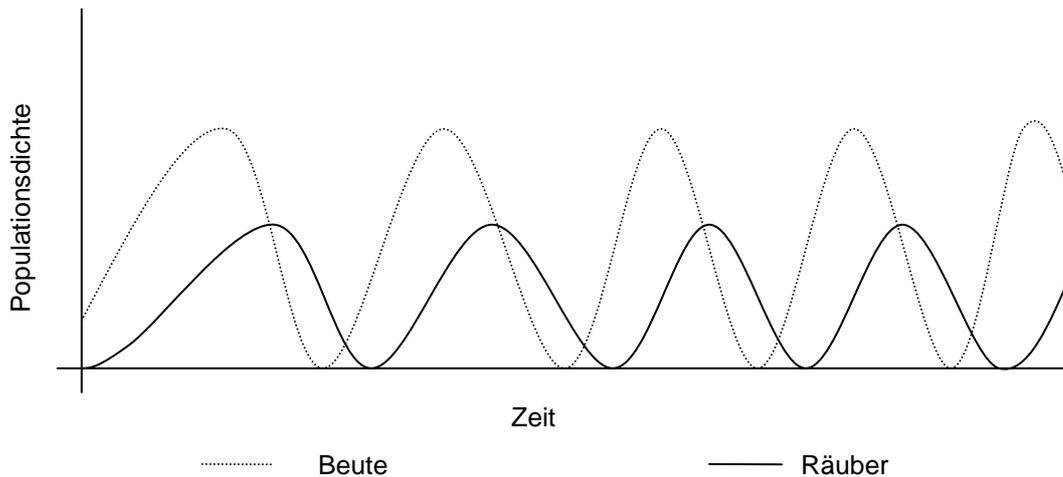


Abb.2: Räuber-Beute-Oszillationen nach Lotka und Volterra

Die Predatoren (hier: *D. discoideum*) ernähren sich von der Beute (hier: *E.coli*) und vermehren sich. Die wachsende Räuberpopulation reduziert die Beutepopulation bis zu einer Dichte, die nicht mehr ausreichend ist, um die Räuberpopulation zu ernähren. In der Folge nimmt die Dichte der Predatoren ab und die Dichte der Beutepopulation wieder zu, da weniger Predatoren vorhanden sind. Aufgrund kürzerer Generationszeiten und anderer Parameter in mikrobiellen Räuber-Beutebeziehungen wurde eine Vielzahl von Gleichungen entworfen, die dem in der Realität beobachteten Verhalten möglichst nahe kommen sollten (CANALE 1970, CANALE et. al. 1973, PAVLOU 1985).

Umweltbedingte Rückkopplungen werden durch Lotka und Volterra nicht berücksichtigt. Es ist davon auszugehen, dass durch Änderungen abiotischer und biotischer Faktoren auch ein verändertes Oszillationsverhalten zu beobachten ist.

GAUSE (1934) war der erste Biologe, der versuchte die komplexen Prozesse einer Biozönose nachzuvollziehen, indem er zwei Arten isolierte und diese in serieller Kultur untersuchte. Von besonderer Bedeutung schien ihm die Vermeidung von störenden Einflüssen, die eine Diskussion der Ergebnisse erschweren oder sogar unmöglich machen könnten. Außer FREDRICKSON (1977), MALLORY und Mitarbeitern (1983), GURIJALA und ALEXANDER (1990) haben sich zahlreiche Wissenschaftler mit der Thematik mikrobieller Räuber-Beutesysteme in Laborkulturen befasst. Sowohl Gause als auch POWELL (1977) hatten Schwierigkeiten ihre experimentellen Ergebnisse mit den Lotka-Volterra Gleichungen in Übereinklang zu bringen. Powell löste das Problem für seine Experimente durch die Einführung des Sättigungsmodells nach Monod. Dieses Modell erfuhr bis zum heutigen Zeitpunkt die verschiedensten Modifikationen und Ergänzungen, um den experimentellen Beobachtungen möglichst nahe zu kommen. Monod berücksichtigt in seinem Modell, dass die Wachstumsrate der Predatoren bei ausreichendem Nährstoffangebot einen sigmoiden Verlauf nimmt und asymptotisch abnimmt. Hierbei wird das Wachstum der Beute nicht berücksichtigt, die Versuche wurden mit totem oder sich in stationärer Phase befindlichem Zellmaterial durchgeführt. Weiterhin geht die Verdünnungsrate nicht in das Monod Modell mit ein. Hieraus folgt, dass die Dichte der Beute und Predatoren niemals Null und eine Extinktion einer der beiden

Populationen unmöglich wird. Genau dieses Verhalten wurde in Experimenten aber beobachtet.

Werden entsprechende zusätzliche Parameter mit in die Gleichungen eingearbeitet beschreiben diese Gleichungen in spezialisierter Form die Interaktionen in dem gewählten Biotop, ohne vollständig sein zu können. Die Beurteilung von Wechselwirkungen kann nur akkurat vorgenommen werden, wenn Stärke und Qualität aller Populationsinteraktionen bekannt sind. Dieses Wissen fehlt bei der Betrachtung von natürlichen Ökosystemen in den meisten Fällen (ODUM 1999).

In dieser Arbeit wird von dem Standpunkt ausgegangen, dass die Kultivierung zweier Populationen unter strikt kontrollierten Bedingungen (s.u. `Kulturapparatur`) zu einer großen Übereinstimmung mit dem ursprünglichsten der mathematischen Modelle, dem Modell nach Lotka-Volterra, führen sollte.

1.2.2 Symbiotische Beziehungen

Positive Wechselwirkungen zwischen zwei Populationen sind in der Natur weit verbreitet. Als ersten Schritt in Richtung Symbiose kann der Kommensalismus (lat.: Tischgemeinschaft) betrachtet werden. Einer der Partner (Kommensale) wird von den nicht verarbeiteten oder abgegebenen Substanzen des Wirtes miternährt, ohne diesen zu schädigen. Kommensalismus kann als erste Stufe zur Entwicklung gegenseitiger vorteilhafter Beziehungen betrachtet werden. Praktisch alle marinen Schalentiere und Schwämme bergen verschiedene Kommensalen, die den Schutz des Wirtes nutzen, ohne ihm zu schaden.

Der nächste Schritt wird als Protokooperation bezeichnet. Beide Populationen profitieren voneinander, sind bei Trennung jedoch einzeln lebensfähig. Hierin liegt der Unterschied zum Mutualismus (lat.: wechselseitig), bzw. der obligaten Symbiose. Diese unter Mikroorganismen weit verbreitete Interaktion setzt voraus, dass beide Populationen absolut abhängig voneinander sind und nach einer Trennung nicht mehr einzeln lebensfähig sind. Ein Übergang von negativen zu positiven Wechselwirkungen scheint besonders dann erleichtert, wenn schlechte Umweltbedingungen (z.B. Nährstoffe) so stark limitieren, dass Kooperation einen starken selektiven Vorteil bietet (ODUM 1983). In dieser Arbeit wird Symbiose als Zusammenleben zum gegenseitigen Vorteil verstanden. Es ist nicht möglich, einen der beiden Organismen von dem anderen zu trennen, ohne dass beide absterben. Bis zu diesem Zeitpunkt ist es noch nicht gelungen, eine zuvor nicht bestehende Symbiose im Labor künstlich zu erzeugen. In einem Einzelfall (JEON 1995) konnte die Entstehung einer Symbiose auf die bakterielle Kontamination einer *Amoeba proteus* Kultur zurückverfolgt werden. Da die Organismen im Anschluss nicht mehr getrennt werden konnten, gelang es nicht, das Bakterium (`X`) zu charakterisieren und den Versuch zu wiederholen. `X` reduzierte bei *Amoeba proteus* die Synthese von S-Adenosylmethioninsynthase (SAMS) um fünfzig Prozent, da eines von zwei SAMS exprimierenden Genen durch den bakteriellen Endosymbiont blockiert wurde (JEON & JEON 2003).

In dieser Arbeit soll der Versuch unternommen werden, unter strikt kontrollierten Laborbedingungen zwischen zwei Organismen, die ursprünglich in einer Räuber-

Beute-Beziehung leben (Beute: *E. coli*, Räuber: *D. discoideum*), eine künstliche Symbiose zu etablieren. Vorangegangene Experimente (TSUCHIYA et al. 1972; DENT et al. 1976) stellten in der gewählten Kokultur sicher, dass die Beute hinsichtlich des Mediums keiner Limitation unterlag. Diese Untersuchungen zeigten nach anfänglichen gedämpften Oszillationen stets den gleichen Ausgang: die Beute wuchs in hoher Dichte, die Räuber waren nur noch in geringer Zahl nachzuweisen. Natürliche Selektion hatte unter den gewählten Bedingungen die Beutevarianten begünstigt, welche eine Resistenz gegenüber dem Räuber entwickelt hatten.

Um dieser Entwicklung zu entgehen, kann die bakterielle Beute von einem Stoffwechselprodukt des Räubers abhängig gemacht werden. Dieser vom Räuber gebildete Metabolit ist nicht im Nährmedium der Kokultur enthalten und macht das Wachstum der Beute von der des Räubers abhängig. Ziel einer solchen obligaten Syntrophie durch metabolische Kopplung kann der Metabolismus schwefelhaltiger Aminosäuren sein. *E. coli* nimmt anorganischen Schwefel auf und synthetisiert Cystein, aus dem dann Methionin aufgebaut wird (GREENE 1996). *E. coli* ist nicht in der Lage, aus Methionin Cystein zu gewinnen.

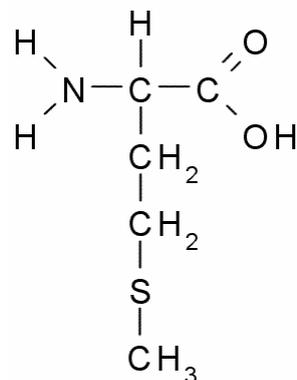


Abb.3: Strukturformel der schwefelhaltigen Aminosäure Methionin

Methionin ist für *D. discoideum* eine essentielle Aminosäure (Abbildung 3), die aufgenommen und über S-Adenosylhomocystein, Homocystein und Cystathionin zu Cystein umgebaut wird. Der Überschuss an Schwefel wird in das Medium abgegeben und kann dort von *E. coli* als Schwefelquelle (in Form von Cystein, Sulfat, Sulfit, Sulfid) genutzt werden (Abbildung 4). Schwefel und Stickstoff sind im Methionin gebunden, *E. coli* kann der metabolischen Kopplung nur entkommen, wenn Enzyme von *D. discoideum* übernommen werden, die den Abbau beider Substrate aus Methionin erlauben.

Dictyostelium discoideum

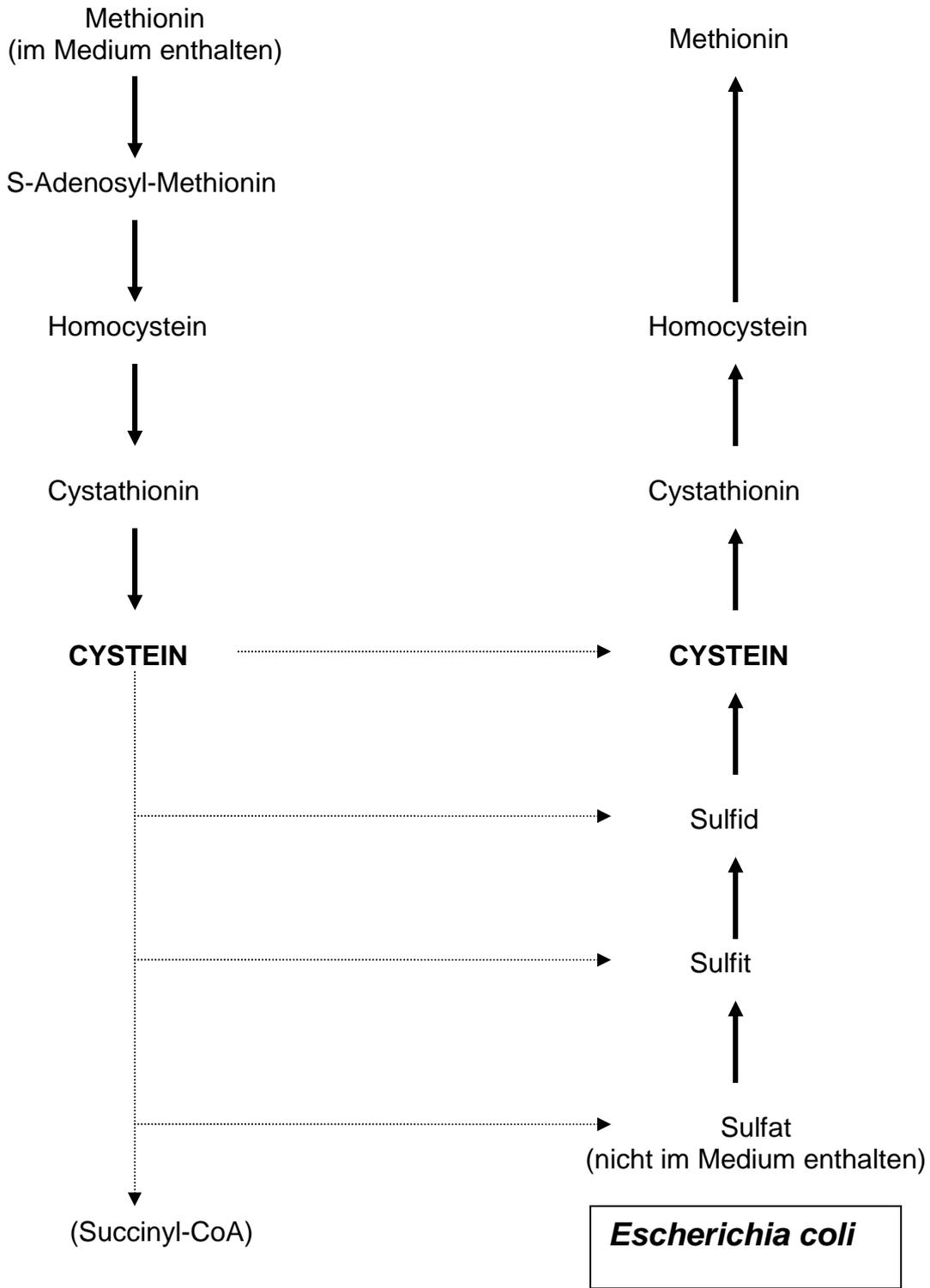


Abb.4: Metabolische Kopplung zwischen *D. discoideum* und *E. coli*

Somit ist die metabolische Kopplung zwischen Räuber und Beute vollzogen (Abbildung 5):

E. coli dient *D. discoideum* als Nahrung. Methioninquellen sind die phagozytierten Bakterienzellen und das im Nährmedium enthaltene Methionin. *D. discoideum* dient *E. coli* als Produzent für Schwefel (als Bestandteil von Cystein, Sulfat, Sulfit oder Sulfit), welcher aus dem Medium aufgenommen und zu Methionin aufgebaut wird.

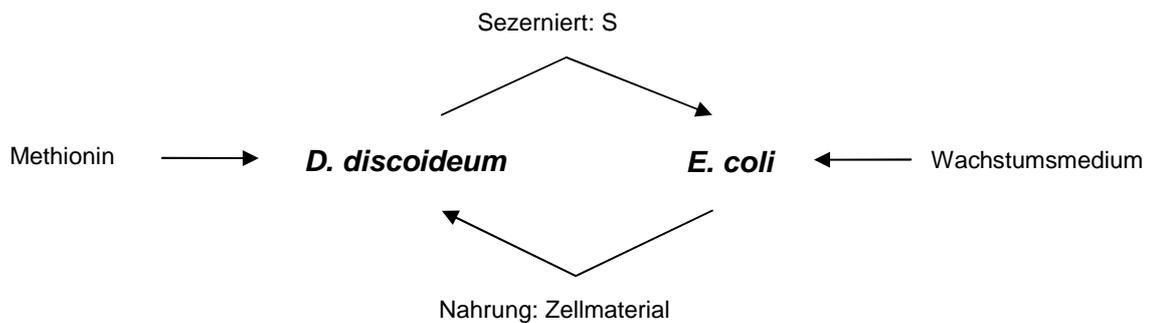


Abb.5: Metabolische Kopplung zwischen *D. discoideum* und *E. coli*

Ein solches Gleichgewicht, in dem beide Organismen voneinander abhängig sind und ihre Zellzahlen direkt mit dem Vorhandensein und der Konzentration eines einzigen Nährstoffes korrelieren, könnte eine ideale Ausgangsposition für die Selektion einer artifiziellen Symbiose sein.

Der Metabolismus von *D. discoideum* sorgt durch die Sezernierung von Schwefel und Stickstoff für steigende Zellzahlen der bakteriellen Beute. Ein gutes Nahrungsangebot für die Räuber wird die Zellzahlen von *D. discoideum* steigen lassen. Gelingt es einem der Organismen sich genetisch so zu adaptieren, dass die Methioninverfügbarkeit steigt, erhöht dies die Zellzahl beider Organismen im gesamten System. Eine Ausnahme können Subpopulationen der Beute darstellen, die Schwefel und Stickstoff aus dem Medium aufnehmen, aber aufgrund von Resistenzstrategien dem Predationsdruck entkommen. Diese Varianten sind nur begünstigt, wenn die Metabolite im Medium frei verfügbar sind.

In dieser Arbeit wird ein Medium ohne Schwefelquelle (=AB-Medium) und ein Medium ohne Schwefel- und Stickstoffquelle (=J-Medium) verwendet. Im letzten Fall ist die bakterielle Beute sowohl in der Stickstoff- als auch in der Schwefelversorgung vollständig auf *D. discoideum* angewiesen. Im ersten Fall muss der Räuber lediglich Schwefel aus Methionin sezernieren.

In den Symbiose Experimenten ist es für die Bakterien nicht von Vorteil, wenn der Räuber ausgewaschen wird, weil er die fressresistente Beute nicht mehr phagozytieren kann. Der Räuber stellt die Schwefelversorgung für die Prokaryonten bereit und *E. coli* kann dieser Abhängigkeit nur entkommen, wenn es gelingt, Schwefel aus Methionin zu gewinnen.

1.3 Kontinuierliche Kulturen

Räuber-Beute-Beziehungen und Untersuchungen zur Entstehung von Symbiosen setzen die Kenntnis der auf die Versuchsorganismen wirkenden Umweltfaktoren voraus. Der Einfluss aller abiotischen und biotischen Faktoren auf die Populationen und die Wechselwirkungen mit der Umwelt sind schwierig zu beurteilen; ein mathematisches Modell entfernt sich dann mit zunehmender Parameteranzahl von seinem Modellcharakter, der ein gewisses Maß an Allgemeingültigkeit und damit Vergleichbarkeit besitzen sollte. Um diesem Anspruch gerecht zu werden, muss das Studium von Räuber-Beute- und symbiotischen Beziehungen unter strikt kontrollierten Laborbedingungen erfolgen.

Chemostaten stellen die beste Methode dar, um die Interaktion mikrobieller Populationen unter kontrollierten Bedingungen zu untersuchen. Sie bieten definierte Kulturbedingungen und machen somit die Ergebnisse mathematisch zugänglich (FREDRICKSON, 1977). Üblicherweise unterscheidet man zwischen seriellen und kontinuierlichen Kulturmethoden. In serieller Kultur werden Kulturgefäße, welche ein steriles Nährmedium enthalten, mit einer Kultur inokuliert, welche zuvor unter gleichen Wachstumsbedingungen angezogen wurde. Dieser Zyklus wird wiederholt, wenn die neue Kultur gewachsen ist. Die in der Literatur beschriebenen Experimente zur Proliferation mikrobieller Organismen über die längsten Zeiträume wurden mit dieser Methode durchgeführt (LENSKI und TRAVISIANO 1994).

Die kontinuierliche Kultur geht auf den von Novick und Szilard entwickelten *Chemostat* (1950) und den zeitgleich von Monod entwickelten *Bactogene* (1950) zurück. Der Vorteil dieser Kulturtechnik liegt in der definierten Umwelt (Nährmedien, physikalische Bedingungen). Die Proliferationsrate der Zellen ist an die Verfügbarkeit von Nahrungssubstrat gekoppelt. Bleiben die chemischen und physikalischen Umweltbedingungen sowie der physiologische Zustand der Zellen konstant, stellt sich ein *steady state* ein: Die Population wächst kontinuierlich der Verdünnung durch das Nährmedium entgegen, die Verdünnungsrate entspricht der Wachstumsrate (KUBITSCHKE 1970).

Die Verdünnungsrate (ω) gibt an, wieviel Medium pro Zeiteinheit in dem Kulturgefäß ersetzt wird. Das Volumen, das pro Tag in die Kultur einläuft (w/d), wird durch das Kulturvolumen des Reaktors (V) dividiert:

$$\omega = \frac{w}{V}. \quad (\text{Gl.1})$$

Für die Anzahl der Generationen (N) pro Zeiteinheit gilt:

$$N = \frac{w}{V} * \frac{1}{\ln 2} \quad (\text{Gl.2})$$

Ist die Verdünnungsrate kleiner als die Wachstumsrate der kultivierten Zellen, entwickelt sich dichtereguliertes Wachstum. Die Netto Wachstumsrate der Population wird bei zunehmender Dichte herabgesetzt, da eine Verknappung der Ressourcen einsetzt. Im steady state kann die Fitness eines Individuums definiert werden. Eine genetische Veränderung kann die Fitness der Nachkommen erniedrigen oder erhöhen. Reduktion der Fitness führt zur Abnahme der Anzahl veränderter Individuen im Verhältnis zur Gesamtpopulation. Erhöhung der Fitness führt für den veränderten Zelltyp zu einem Vorteil gegenüber der Ausgangspopulation. Die Anzahl der veränderten Individuen steigt, bis die Ausgangspopulation verdrängt ist und ein neues steady state erreicht ist. Im Chemostat ist die Zahl der Organismen am größten, welche an die gewählten Versuchsbedingungen am besten adaptiert sind. Nur diese Varianten können im steady-state nachgewiesen werden.

1.3.1 Kontinuierliche Kultivierung und Biofilme

Die vorstehend beschriebene Technik hat den Nachteil, dass nicht nur Populationen positiv selektioniert werden die an das Nährmedium angepasst sind, sondern auch solche, die Biofilme bilden können. Oberflächen bilden im Chemostaten eine ökologische Nische, die es den Zellen erlaubt als Biofilm auch bei niedrigster Wachstumsrate im System zu verbleiben, denn sie werden nicht verdünnt. Residente Populationen entkommen den gewählten selektiven Zwängen, weil sie nicht ausgewaschen werden können. Sie werden als einzige Population am Ende eines Experiments nachgewiesen, ohne der selektiven Strategie zu entsprechen (CHAO und RAMSDELL 1985). Biofilmpopulationen konkurrieren mit den in Suspension befindlichen Zellen um Nahrungsressourcen, ohne analytisch zugänglich zu sein, denn es kann nur die Biomasse von Zellen in Suspension erfasst werden. Hieraus folgt, dass mathematische Modellierung nicht möglich ist, weil weder die Stoffwechselaktivität noch Bestimmung der Wachstumsraten realisiert werden kann.

Ist die Verdünnung der Kultur an die Dichte der kultivierten Zellen gekoppelt (Turbidostat), können residente Populationen eine Erhöhung der Verdünnungsrate hervorrufen, ohne ausgewaschen zu werden. Ausgewaschen werden nur die in Suspension befindlichen Zellen, die dem selektiven Zwang des Experiments unterliegen. Ein weiteres technisches Problem stellt die Verstopfung von Leitungsabschnitten durch Biofilme dar.

Die serielle Kultur umgeht das geschilderte Problem, indem ein kleines Inokulum aus der Suspension der gewachsenen Kultur entfernt und in ein frisches Kulturgefäß überführt wird. Oberflächen, auf denen sich Biofilme bilden könnten, werden somit regelmäßig aus dem System entfernt. Hierbei treten technische und theoretische Probleme auf, die diese Methode in Frage stellen. Sie ist sehr arbeitsaufwändig und durch wiederholte Manipulationen unter Bedingungen, die absolute Sterilität erfordern, sehr kontaminationsanfällig. Nach jeder Neuinokulation muss die Kultur lag-, log-, und stationäre Phase durchlaufen und ist somit besonders für die Untersuchung von oszillativem Verhalten über längere Zeiträume ungeeignet. Bei jedem Zyklus wird außerdem nur ein geringer Bestandteil der gewachsenen Kultur überimpft, der überwiegende Anteil wird verworfen. Sollen Varianten oder Adaptationen selektioniert werden, so werden diese gerade kurz nach ihrer

Entstehung in nur geringer Anzahl vertreten sein. Im Normalfall werden sie dann mit der nächsten Überimpfung nicht weitergeführt und verworfen.

Die in dieser Arbeit verwendete Kulturapparatur umgeht die oben erwähnten Risiken und verhindert die Akkumulation verdünnungsresistenter Varianten durch regelmäßige Sterilisation und Neutralisation der Anlagenteile. Die detaillierte Schilderung von Topologie und Funktion der Kulturapparatur erfolgt unter Material und Methoden (*Kulturapparatur*).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung der Arbeit wurde in zwei Abschnitte unterteilt:

a) *Dictyostelium discoideum* (Räuber) und *Escherichia coli* (Beute) sollen kontinuierlich über mindestens 30 Tage kultiviert werden. Der Einfluss von Verdünnungsrate und Biofilmen auf das Oszillationsverhalten soll untersucht werden. Die Übereinstimmung der Ergebnisse mit der 1. Regel von Lotka und Volterra wird überprüft. Hiernach sollen zwischen Beute- und Räuberpopulation endlose, ungedämpfte Schwingungen entstehen, deren Räuberamplitude im Vergleich zur Beuteamplitude um 90° phasenverschoben ist. Ergänzend sollte der Aufbau der Kulturapparatur dahingehend verändert werden, dass im Langzeitversuch eine automatisierte Probenentnahme in kürzesten Intervallen realisiert werden kann (s.u. Material und Methoden: *Umbau der Kulturapparatur*).

Obwohl die Endosymbiontentheorie allgemein als Fundament für die Entwicklung mehrzelliger Lebensformen verstanden wird, sind die Voraussetzungen, die vorliegen müssen, um aus einer Räuber-Beute-Interaktion eine Symbiose zu entwickeln, unbekannt. Um eine experimentelle Symbiose zwischen beiden Organismen zu erzwingen wurden:

b) die Versuchsbedingungen von zwei Langzeitexperimenten so gewählt, dass die abgegebenen Metabolite der einen Art obligates Nahrungssubstrat für die andere Art darstellen. In dieser künstlich erzeugten Syntrophie ist jeder der beiden Organismen mindestens von einem Metabolit der anderen Art abhängig, die Voraussetzungen für die Entstehung einer Symbiose könnten somit gegeben sein.