

# 1 MATERIAL UND METHODEN

## 1.1 Organismen und Stämme

In allen Versuchen dieser Arbeit wurden die soziale Amöbe AX-2 *Dictyostelium discoideum* (Klon F6) und das Enterobacterium *Escherichia coli*  $\beta$ 1308 eingesetzt. Als Nahrungsgrundlage für *D. discoideum* im Plaque-Test wurde das Enterobakterium *Klebsiella planticola* eingesetzt. Das Bakterium  $\beta$ 1308 ist ein Abkömmling von *E. coli* MG1655, in dem die Kodons 26 bis 256 des *thyA* Gens durch das *erm* Gen von Tn1545 ersetzt wurden. Dieser Stamm ist Erythromycin resistent und ist auf die Zufuhr von Thymin angewiesen, da er eine Deletion für die Thymidylatsynthase besitzt.

MG1655 besitzt weder eine Erythromycinresistenzkassette noch eine Deletion in seinem *thyA* Gen und kann bei der Amplifikation der Erythromycinresistenzsequenz und der anschließenden Sequenzierung MG1655 als Negativkontrolle dienen.

### 1.1.1 Überprüfung evolvierter Stämme auf ihre genetische Identität

Die Identifizierung von *E. coli* erfolgte durch den Nachweis der Erythromycincassette, welche die Thymidilatsynthesesequenz ersetzt. Am Ende jedes Experiments wurde eine Probe entnommen und auf LB-Agar ausgestrichen. Jeweils drei Kolonien wurden auf das Vorhandensein der erwähnten Sequenz mittels PCR überprüft.

Alle Isolate wiesen ihre ursprüngliche Identität auf (siehe Anhang: Identifikation der Isolate).

### 1.1.2 Klonen und Konservieren der Organismen

#### *Escherichia coli*

Um die Identität von *E. coli*  $\beta$  1308 nach der Lagerung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  zu prüfen, wurde seine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Erythromycin nachgewiesen. Als Kontrolle diente *E. coli* MG 1655, welcher Erythromycin sensitiv ist.

Eine gut isolierte Einzelkultur  $\beta$  1308 wurde in 50ml NMS-Medium (für  $\beta$  1308 NMS+Thymin) überführt und auf eine Zellzahl von  $10^8$ - $10^9$  eingestellt (ÜK, Schüttler,  $37^{\circ}\text{C}$ ). Aus dieser Suspension wurden 20 x 1ml Proben mit DMSO (Dimethylsulfoxid, 100 $\mu$ l/1ml Bakteriensuspension) versetzt und als Isolat bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Nachdem die Resistenzeigenschaft anhand eines der Isolate von *E. coli*  $\beta$  1308 überprüft und durch den Kontrollstamm *E. coli* MG 1655 bestätigt werden konnte, wurde eines der eingefrorenen Aliquots in 30 ml A+C Medium (s.u.) über Nacht

## MATERIAL UND METHODEN

---

inkubiert (22°C) und die Anlage angeimpft. Nach einer Adaptationsphase von 48-72h erfolgte dann mit der Inokulation von *D. discoideum* der Start des Experiments.

### ***D. discoideum***

Ein Milliliter der Ausgangskultur AX 2 (Klon: F6) von *D. discoideum* wurde in 30 ml AX-Medium (s.u.) inokuliert und auf eine Zellzahl von  $1-5 \times 10^5$ /ml angezogen. Diese Vorkultur wurde in eisgekühltem AX-Medium auf eine Zellzahl von 2 Zellen/ml eingestellt und mit einer Pipette jeweils drei Tropfen (150  $\mu$ l) in jede Öffnung ('well') einer Microtiter Platte gegeben. Rechnerisch wird durch Gebrauch dieser Methode Wachstum in jedem dritten well erwartet. Es sollten insgesamt ca. 40 wells befüllt werden, um eine möglichst hohe Erfolgsquote zu erreichen. Nach einer Inkubationszeit von 7-8 Tagen (22°C) war in einigen der wells mit dem Mikroskop Wachstum erkennbar. In diesen wells wurden die Zellen mit eiskaltem AX-Medium resuspendiert und im Anschluss insgesamt 6 Klone in 30 ml AX-Medium überführt. Nach 2-3 Tagen Wachstum wurde die gesamte Vorkultur in 300ml AX-Medium aufgenommen und weitere 12h inkubiert.

Die Kultur wurde anschließend einmal in sterilem SP-Puffer (s.u.) gewaschen und wieder resuspendiert, so dass eine Zellzahl von  $5 \times 10^6$ /ml resultierte. Jeweils fünf Milliliter der Kultur wurden in 9cm SP-Agar-Platten ausplattiert und anschließend 30min sedimentiert. Der überschüssige Puffer wurde vorsichtig abgesaugt und die Entwicklung von Fruchtkörpern über einen Zeitraum von 2 Tagen bei 22°C abgewartet. Nach dieser Zeit wurde die Hälfte einer Petri-Schale abgekratzt und die Fruchtkörper aliquotiert. Die Aliquots müssen bei -70 °C gelagert werden. Da die Kulturen für den Betrieb in der Kulturapparatur geeignet sein müssen, sollen die Sporen in FM-Medium (s.u.) angezogen werden. AX-Medium führt aufgrund seines hohen Proteingehalts in Verbindung mit Air-Lift-Reaktoren zu Schaumbildung und ist somit ungeeignet. Um das Wachstum der Sporen zu gewährleisten, wurden die FM-Vorkulturen 5%ig mit AX-Medium versetzt. Bei dieser Konzentration konnte im Versuch Zellteilung beobachtet werden; Schaumbildung setzte erst bei 10%iger AX Beimischung ein. Die Kultur wurde bis zu einer Zellzahl von etwa  $1 \times 10^5$ /ml inkubiert und unter sterilen Bedingungen in das Inokulationsbesteck überführt.

### **1.1.3 Animpfen der Kulturapparatur**

Vor der Inokulation wurde aus dem Reaktor ein Volumen von 3ml entnommen, um sicherzustellen, dass der Reaktor während der Inokulation nicht überläuft. Unter Berücksichtigung des Volumens, das durch den zuführenden Schlauch eingenommen wird (= 6ml Totraum), erfolgte die Injektion der *Dictyostelium*-Kultur, in den Reaktor. Zielzellzahl war in allen Versuchen etwa  $1 \times 10^4$  Zellen/ml als Startpopulation im Reaktor. Das fehlende Volumen im Reaktor wurde durch die automatisierte Medienzufuhr der Anlage eigenständig aufgefüllt und hat keinen Einfluss auf die Organismenanzahl im Reaktor, da die Zielzellzahl auf das aktive Reaktorvolumen (=22ml) bezogen wurde. Mit der Inokulation der Anlage durch *D. discoideum* startet das jeweils durchgeführte Experiment, da *E. coli* zur Adaptation schon einige Tage zuvor kultiviert wurde. Die Methode der bakteriellen Inokulation erfolgte wie bei *D. discoideum* beschrieben, nur dass das Inokulationsvolumen jeweils 2ml betrug.

## MATERIAL UND METHODEN

---

### 1.1.4 Chemikalienliste

(Die für die Nährmedien verwendeten Chemikalien wurden vor dem Beginn der Experimente neu erworben und separat aufbewahrt. Ausschließlich diese Chargen kamen in Untersuchungen dieser Arbeit zum Einsatz, um stets mit dem gleichen Ausgangsmaterial zu arbeiten).

Komponente	Firma	Charge
Agar-Agar	Roth	52103
Ammoniumchlorid, $\text{NH}_4\text{Cl}$	Riedel de Haen	31107
Bacto-Pepton	Oxoid	L37
Bromphenolblau	Fluka	61698
Citronensäure-Monohydrat, $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$	Merck	K91568044
D (-)-Mannit, $\text{C}_6\text{O}_{14}\text{O}_6$	Merck	K91612382409
di-Kaliumhydrogenphosphat, $\text{K}_2\text{HPO}_4$	Merck	A434904346
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck	1084180250
Eisenchlorid, $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$	Riedel de Haen	12319
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich	1239458
Glucose, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \times \text{H}_2\text{O}$	Merck	K29285642
Glycerin	Roth	75301
Kaliumdihydrogenphosphat, $\text{KH}_2\text{PO}_4$	KMF	64711
Kaliumsulfat, $\text{K}_2\text{SO}_4$	Riedel de Haen	31270
L-Methionin, $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$	Sigma-Aldrich	034K0393
Magnesiumchlorid-Hexahydrat, $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	Merck	645A183533
Magnesiumsulfat, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	Merck	A105486844
Maltose	Fluka	70167
Natriumhydroxid	Roth	45362
Pepton	Oxoid	L37
Primer (oFum223-226)	Metabion	
Thymin, $\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$	Sigma-Aldrich	106HO644
Tris-hydroxymethyl-aminomethan, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$	AppliChem	10649
Yeast-Extrakt	Gibco	20047-056
<b>Fertigmedien:</b>		
Final Medium	Formedium	FM0304258
AX-Medium	Formedium	FM0204245

### **Antibiotika**

Ampicillin, Natriumsalz Roth

### **Standards für Agarosegele**

Mass Ruler DNA-Ladder Mix MBI Fermentas

## MATERIAL UND METHODEN

### **Puffer für molekularbiologische Methoden**

50xTAE

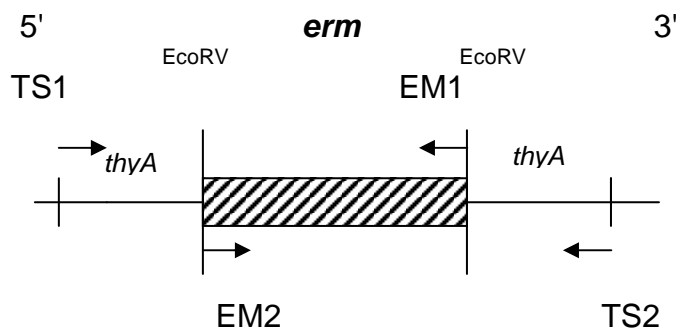
Tris	pro Liter H <sub>2</sub> O bidest
Eisessig	121g
EDTA	28,55g
	9,31g

### **Oligonukleotide („Primer“)**

oFum223	: TS1 (s.o.: Organismen und Stämme)
5'GTGCTCGACGAAGGCACACAG3'	
oFum224	: TS2
5'CGTAATTAGATAGCCACCGGCG3'	
oFum225	: EM1
5'GCGCGCGTGTTGATAGTGCAGTAT3'	
oFum226	: EM2
5'GCGCGCCCCGTAGGCGCTAGGG3'	

### **Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Im Genom von  $\beta$ 1308 befindet sich an der Stelle des *thyA* Gens eine Erythromycinresistenzkassette. Diese konnte mittels der Kolonie-PCR amplifiziert werden. Die für das zu amplifizierende Gen verwendeten Primer waren TS2 und EM2, bzw. TS1 und EM1 (Abbildung 6).



**Abb.6:** Schematische Darstellung des *thyA::erm* Locus in  $\beta$ 1308

Ein Großteil des *thyA* Gens wurde deletiert. Nur am 5' und 3' finden sich noch Sequenzen des ursprünglichen Gens. Zur Vervielfältigung von DNA-Stücken wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet. Durch den Nachweis der Erythromycinkassette in der bakteriellen DNA am Ende des jeweiligen Experiments wurde die Identität von *E. coli*  $\beta$ 1308 überprüft. Hierzu wurden Anlagenisolate auf SM-Agar-Platten (s.u.: Medien) ausgebracht und nach 48h (22°C) die Kolonien gepickt. Die Zellen wurden in 10  $\mu$ l destilliertem Wasser suspendiert. 12,5  $\mu$ l PCR-Mix wurden zu 8,5  $\mu$ l destilliertem Wasser und 2  $\mu$ l der Zellsuspension hinzugefügt. Die

## MATERIAL UND METHODEN

---

Primer wurden in den Kombinationen TS1+TS2, TS1+EM1, EM1+EM2 und TS2+EM2 eingesetzt. Ihr Volumen betrug 1µl. Das Endvolumen der Ansätze umfasste 25µl. In einem programmierbaren Heizblock („Cycler“) durchlief die Probe dann ein Temperaturprogramm mit 30 Zyklen. Die Temperaturschritte betragen 45sec bei 95°C, 45sec bei 56°C und 2 Minuten bei 72°C. Die Taq-Polymerase arbeitete 5 Minuten bei 72°C.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden im Anschluss im Agarose-Gel dargestellt und die Banden mit einem Größen-Marker („MassRuler“) abgeglichen.

### 1.1.5 Medien

#### **Sterilität**

Medien, Kulturgefäße, Pipettenspitzen und alle weiteren zum sterilen Arbeiten notwendigen Instrumente wurden 20 Minuten bei 121°C autoklaviert.

#### **A+C-Medium**

A+C Medium ist ein definiertes Medium für *E. coli* β1308 .

	Konzentration
Zitronensäure	4 mM
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1 mM
NH <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>	14 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	38 mM
FeCl <sub>3</sub> (10mM)	1 ml
Mannit	11 mM
Thymin	1 mM
Methionin	5 mM
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 mM

#### **A+B-Medium**

Im Unterschied zu A+C-Medium ist das A+B Medium schwefelfrei. Es wurde verwendet für Versuche der in-vivo-Symbiose.

	Konzentration
Zitronensäure	4 mM
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1 mM
NH <sub>4</sub> CL	14 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	38 mM
FeCl <sub>3</sub> (10mM)	1ml
Mannit	11 mM
Thymin	1 mM
Methionin	5 mM

## MATERIAL UND METHODEN

---

### **J-Medium**

J-Medium ist ein schwefel- und stickstoffreies Medium (Ausnahme: Methionin) und wurde für in-vivo-Symbiose Versuche verwendet.

	Konzentration
Zitronensäure	4 mM
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	38 mM
FeCl <sub>3</sub> (10mM)	1ml
Mannit	11 mM
Thymin	1 mM
Methionin	5 mM

### **SM-Medium**

Zur Durchführung des Viabilitätstests von *D. discoideum* (Schwenkmethode)

	pro Liter H <sub>2</sub> O bidest
Glucose	10 g
Bactopepton	10 g
Hefeextrakt	1 g
MgSo <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	1 g
KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3H <sub>2</sub> O	1,3 g

### **AX-Medium (=HL-5)**

Vollmedium für *D. discoideum* (s.o.: Chemikalienliste)

### **AX-Medium (Watts & Ashworth, 1970)**

	pro Liter H <sub>2</sub> O bidest, pH 6.7
Pepton	14,3 g
Hefeextrakt	7,15 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O	1,28 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,486 g
Maltose	18,0 g

### **FM-Medium (Franke & Kessin, 1977)**

Definiertes Medium für *D. discoideum*.

	pro Liter H <sub>2</sub> O bidest, pH 6.5
250 ml 4x Aminosäuren	
50 ml 20x Vitamine	
20 ml 50x Salze	
0,1 ml 100000x Spurenelemente	
10 g Glucose	
0,87 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	

## MATERIAL UND METHODEN

---

### 4x Aminosäuren Stammlösung (in 8 mM NaOH) (für 5 Liter)

1,6 g NaOH  
14 g Arginin-HCl  
6 g Asparagin  
4 g Cystein  
10 g Glutaminsäure  
18 g Glycin  
6 g Histidin-HCl-H<sub>2</sub>O  
12 g Isoleucin  
18 g Leucin  
18 g Lysin-HCl  
6 g Methionin  
10 g Phenylalanin  
16 g Prolin  
10 g Threonin  
4 g Tryptophan  
14 g Valin

Der pH Wert sollte bei 4,2 liegen. Auf 5 Liter auffüllen und bei -20°C lagern.

### 50x Salze (1 Liter)

50 ml 1 M NH<sub>4</sub>Cl  
1 ml 1 M CaCl<sub>2</sub>  
50 ml 0,1 M FeCl<sub>3</sub>  
20 ml 1 M MgCl<sub>2</sub>

Auf 1 Liter auffüllen und bei -20°C lagern.

### 20x Vitamine (1 Liter)

100 ml Biotin (4 mg in 1 Liter 10 mM NaHCO<sub>3</sub>)  
20 ml Cyanocobalamin (5 mg in 1 Liter H<sub>2</sub>O)  
100 ml Folsäure (40 mg in 1 Liter 10 mM NaHCO<sub>3</sub>)  
100 ml Liponsäure (80 mg in 1 Liter 10 mM NaHCO<sub>3</sub>)  
100 ml Riboflavin (100 mg in 1 Liter 10 mM NaHCO<sub>3</sub>)  
100 ml Thiamin-HCl (120 mg in 1 Liter H<sub>2</sub>O)

Auffüllen auf 1 Liter und bei -20°C lagern.

## MATERIAL UND METHODEN

---

### 10.000 x Spurenelemente (100 ml)

4,84 g Na<sub>2</sub>-EDTA·2H<sub>2</sub>O  
2,30 g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O  
1,11 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>  
0,51 g MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O  
0,17 g CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O  
0,15 g CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O  
0,10 g (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O

Einstellen auf pH to 6.5 und ein Volumen von 100 ml. Aliquots bei -20°C einfrieren.

### **Wachstumsstimulierung von *Escherichia coli* durch konditioniertes Medium**

Konditioniertes Medium ist das Medium, mit welchem getestet wurde, ob *D. discoideum* aus Methionin Schwefel freisetzen kann. Der Schwefel sollte dann innerhalb der metabolischen Kopplung im Anschluss von *E. coli* verwertet werden (Symbioseexperimente).

*D. discoideum* AX2 wurde in Final-Medium (s.o.: Medien) auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^7$  Z/ml eingestellt und zweimal in AB-Medium gewaschen. Das Pellet wurde in 110 ml AB-Medium aufgenommen und über einen Zeitraum von 6h von *D. discoideum* konditioniert, um das im Medium enthaltenen Methionin von den Organismen in Schwefel und Stickstoff abbauen zu können. *Escherichia coli* β 1308 wurde in drei Passagen über jeweils 24h (in AB-Medium, ohne Schwefelquelle) bei 22°C kultiviert und so wurde durch Auszehrung ein Bedarf an diesen Substraten erzeugt.

Konditioniertes Medium wurde schrittweise (0, 10, 25, 50, 100%) zu unkonditioniertem J-Medium gegeben und das Wachstum von *E. coli* β 1308 (24h+48h/22°) wurde mit dem Photometer bei einer optischen Dichte von 600nm erfasst.

### **SP-Puffer**

Suspensionen und Verdünnen von Bakterien

	Konzentration (pH 6)
Kaliumdihydrogenphosphat, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14,7 mM
Dinatriumhydrogenphosphat, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,0 mM

### **Natronlauge**

Sterilisation der Reaktoren in der Kulturapparatur

	Konzentration
Natriumhydroxid NaOH	5M



## MATERIAL UND METHODEN

---

### **Kalium-Phosphat-Puffer**

Neutralisation der Natronlauge in der Kulturapparatur

Kaliumdihydrogenphosphat, $\text{KH}_2\text{PO}_4$	Konzentration (pH 5,0) 50 mM
--	---------------------------------

Zum Titrieren pH 5,0: di-Kaliumhydrogenphosphat, $\text{K}_2\text{HPO}_4$	50 mM
--	-------

### **1.1.6 Bestimmung mikrobiologischer Grundgrößen**

Die Zählung der Zellen von *D. discoideum* erfolgte mit Hilfe des Plaque Tests. Bei diesem Verfahren wird ein definiertes Volumen der zu untersuchenden Probe auf einen Bakterienrasen ausgebracht. Dieser Bakterienrasen dient den in der Probe enthaltenen Dictyostelien als Nahrung. An der Stelle, an der sich eine einzelne *Dictyostelium* Zelle befand, bilden sich über einen Zeitraum von 72h aus dieser Zelle Tochterzellen, die einen, mit dem Auge sichtbaren, Plaque hervorrufen. Diese Plaques werden gezählt und von der ausgebrachten Probenmenge auf einen Milliliter bezogen. Dieses Verfahren identifiziert im Unterschied zu Zählkammern nur die (relevanten) lebenden Organismen. Ein Nachteil des Plaque Tests in seiner ursprünglichen Form ist, dass abhängig von der durchführenden Person unterschiedliche Ergebnisse produziert werden. Der Test musste so modifiziert werden, dass, unabhängig von der durchführenden Person, gleichbleibende Ergebnisse erzielt werden können. Demzufolge wurden alle Arbeitsschritte, in denen der Experimentator Ergebnisse negativ beeinflussen könnte, auf ein Minimum reduziert:

### ***Dictyostelium discoideum* Viabilitätstest (Schwenk-Methode)**

200 $\mu\text{l}$  einer *Klebsiella planticola* ÜN-Kultur ( $\text{OD}_{600}=1,0 \approx 5 \times 10^8$  Z/ml) wurde auf eine SM-Platte pipettiert. Diese Suspension wird durch 2ml SP-Puffer und 100 $\mu\text{l}$  der zu analysierenden Probe ergänzt. Die Petrischale wurde geschlossen und vorsichtig kreisend für ca. 60s bewegt. Anschließend wurde die Platte unter der Sterilbank geöffnet und 2h gewartet bis der Puffer eingezogen, bzw. verdunstet war.

Abschließend wurden die Platten geschlossen und bei 22°C inkubiert. Die Auszählung der Plaques erfolgte nach 72h, die Zellzahl wurde auf einen Milliliter bezogen. Hierbei waren die Verdünnungsstufe und das Volumen der untersuchten Probe zu beachten.

Die Ermittlung von Zellzahlen mit der Neubauer-Zählkammer erfolgte nur bei Zählungen, die keine genauen Ergebnisse hinsichtlich lebender Zellen forderten (z.B. Einstellen von Zellzahlen in Flüssigkulturen).

## MATERIAL UND METHODEN

---

### ***Nachweis von E. coli***

Die Biomasse des Bakteriums *Escherichia coli* wurde indirekt über die Ermittlung der optischen Dichte im Photometer (OD600) ermittelt.

### **Zur Probenentnahme aus der Anlage**

#### Entnahme der Organismensuspension aus der Anlage:

Eine steril verpackte Spritze wurde aus einem Vorratsbehälter (z.B. größere verschließbare Glasschale) entnommen. Die an der Spritze und am Anlagenschlauch befestigte Alufolie wurde entfernt, der Probenschlauch abgezogen und abgeflammt. Der sterile Probenschlauch wurde mit der Spritze verbunden und die so entstandene Kopplung nochmals abgeflammt. Nachdem ein Stück Alufolie kurz abgeflammt wurde, konnte damit das Verbindungsstück wieder umwickelt werden. Abschließend wurden beide Schraubklemmen geöffnet und langsam ca. 2ml Probenflüssigkeit aspiriert.

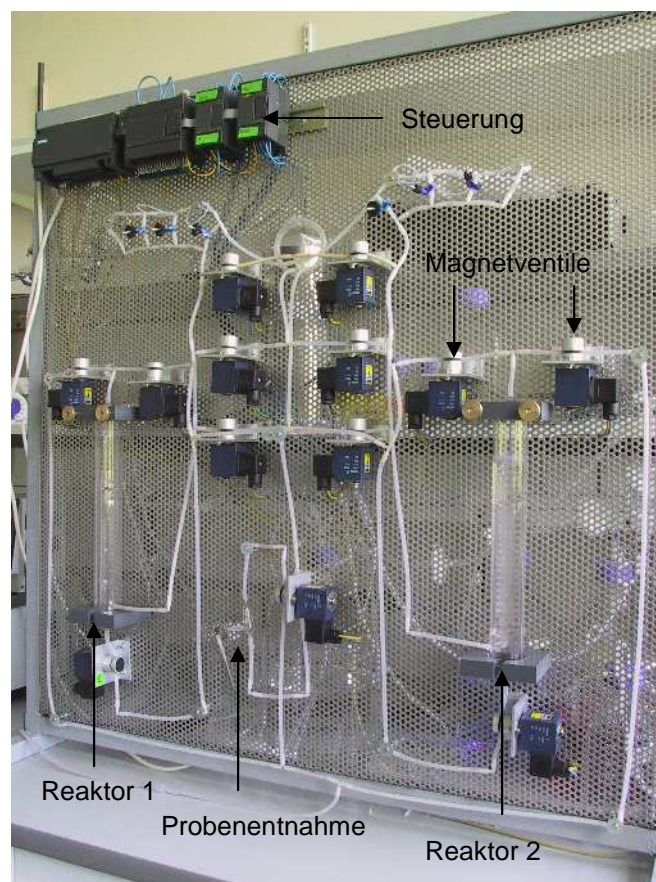
Die Spritze wurde mit Schlauch aus der Anlage gezogen und 1ml Suspension in das Kryogefäß, und der Rest in das Reagenzglas eingefüllt. In das Kryogefäß wurden 100µl DMSO eingefüllt und die Probe bei -70°C eingefroren (=Backup *E. coli*).

#### Labor:

Aus dem Rest der Probe wurden 0,5 ml Anlagensuspension entnommen und in 50ml J-Medium inokuliert (zwei Tage bei 22°C, Schüttler: Backup *D. discoideum*). Der Rest der Probe wurde mikroskopisch beurteilt: Zellzahl und Morphologie von *D. discoideum*; Motilität, Filamentbildung von *E.coli*.

### 1.2 Kulturapparatur

Die in dieser Arbeit genutzte Anlage zur beschleunigten Proliferation lebender Zellen in Suspension (MARLIERE & MUTZEL 1998, Abbildung 7) zerstört automatisch residente, adaptiv statische Varianten. Kultivierte Populationen befinden sich im steady state, wenn die Bedingungen konstant gehalten werden und sind mathematisch interpretierbar. Schlecht adaptierte Subpopulationen werden infolge kontinuierlicher Verdünnung aus dem System entfernt. Dieser Vorgang führt zu einer Zunahme der Zellzahl von Subpopulationen, die besser an die gewählten Bedingungen angepasst sind.



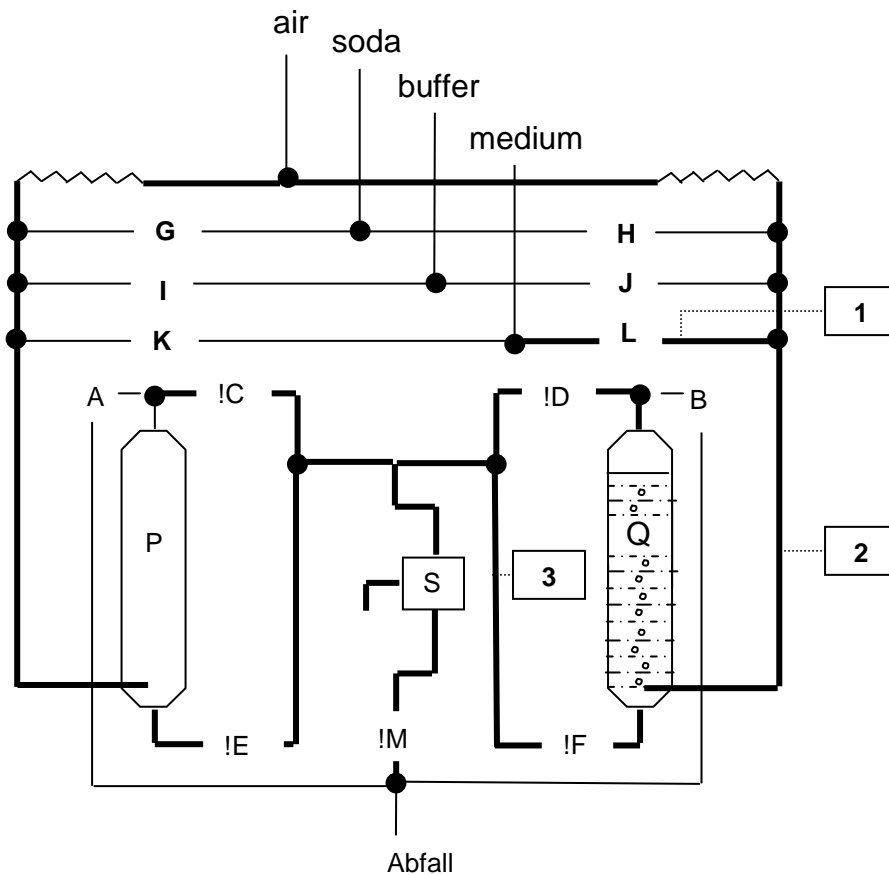
**Abb.7:** Kulturapparatur, Originalaufbau mit 250ml Reaktoren

Konkret wird der Anforderung, dass eine Population von Zellen unter kontinuierlichen Kulturbedingungen ausschließlich in Suspension proliferiert, durch automatisierte periodische Überführung der Organismensuspension aus einem ersten in ein zweites Kulturgefäß entsprochen. Nach der Überführung wird das erste Kulturgefäß sterilisiert und im Anschluss neutralisiert. Das erste Kulturgefäß ist bereit für die Rücküberführung der Kultur aus dem zweiten Kulturgefäß, das anschließend der Sterilisation und Neutralisation unterzogen wird. Dieser Ablauf stellt sicher, dass die Population von Organismen in Suspension zu jedem Zeitpunkt erhalten bleibt und alle verdünnungsresistenten Varianten in einem beliebigen Teil der Apparatur während jedem Zyklus zerstört werden. Das Verfahren der alternierenden

## MATERIAL UND METHODEN

Sterilisierung der Kulturgefäße selektioniert direkt und regelmäßig gegen variante Organismen, welche die Oberflächen in der Apparatur besiedeln und verhindert die Proliferation und Adaptation einer statischen, verdünnungsresistenten Population. Die kultivierten Populationen haben nur die Möglichkeit durch eine Erhöhung der Proliferationsrate in Suspension der Verdünnung zu entgehen. Im Unterschied zum Fermentationsverfahren werden statische Varianten gegenselektioniert und dynamische Varianten bevorzugt, die zunehmend besser an die gewählten Kulturbedingungen angepasst sind.

Abbildung 8 zeigt schematisch den Aufbau der Kulturapparatur:



Legende:		= Luftwiderstand
	A-M	= Ventile, stromlos geschlossen
	! + Buchstabe	= Ventile, stromlos geöffnet
	P, Q	= Reaktoren
	S	= Sampling-Küvette
		= T-Verbindungsstück
		= L-Verbindungsstück
		= Schlauchverbindung

**Abb.8:** Aufbau der Kulturapparatur, schematisch

## MATERIAL UND METHODEN

---

Wie aus Abbildung 9 hervorgeht, erfolgt die Kultivierung der Mikroorganismen alternierend in den Reaktoren **Q** und **P**. **Q** und **P** sind über ein Schlauchsystem mit Nährmedium, Natronlauge und Puffer verbunden. Alle drei Flüssigkeiten werden kontinuierlich mit steriler Druckluft versorgt, so dass in jeder Flasche ein Überdruck von 0,3 bar herrscht.

Öffnet sich eines der oben beschriebenen Ventile, wird der Leitungsabschnitt freigegeben, der durch das Ventil führt. Die Flüssigkeit wird aufgrund des Luftdrucks aus der Vorratsflasche in einen der Reaktoren gedrückt, bis das Ventil wieder schließt.

Alle Flüssigkeitsströme der Anlage werden durch Luftdruck erzeugt und dem Programmierschema entsprechend durch Öffnung und Schließung der Ventile gesteuert. Über zwei Luftwiderstände wird Druckluft nach **Q** und **P** geleitet, um die Durchmischung der Kultur durch die aufsteigenden Luftbläschen sicherzustellen.

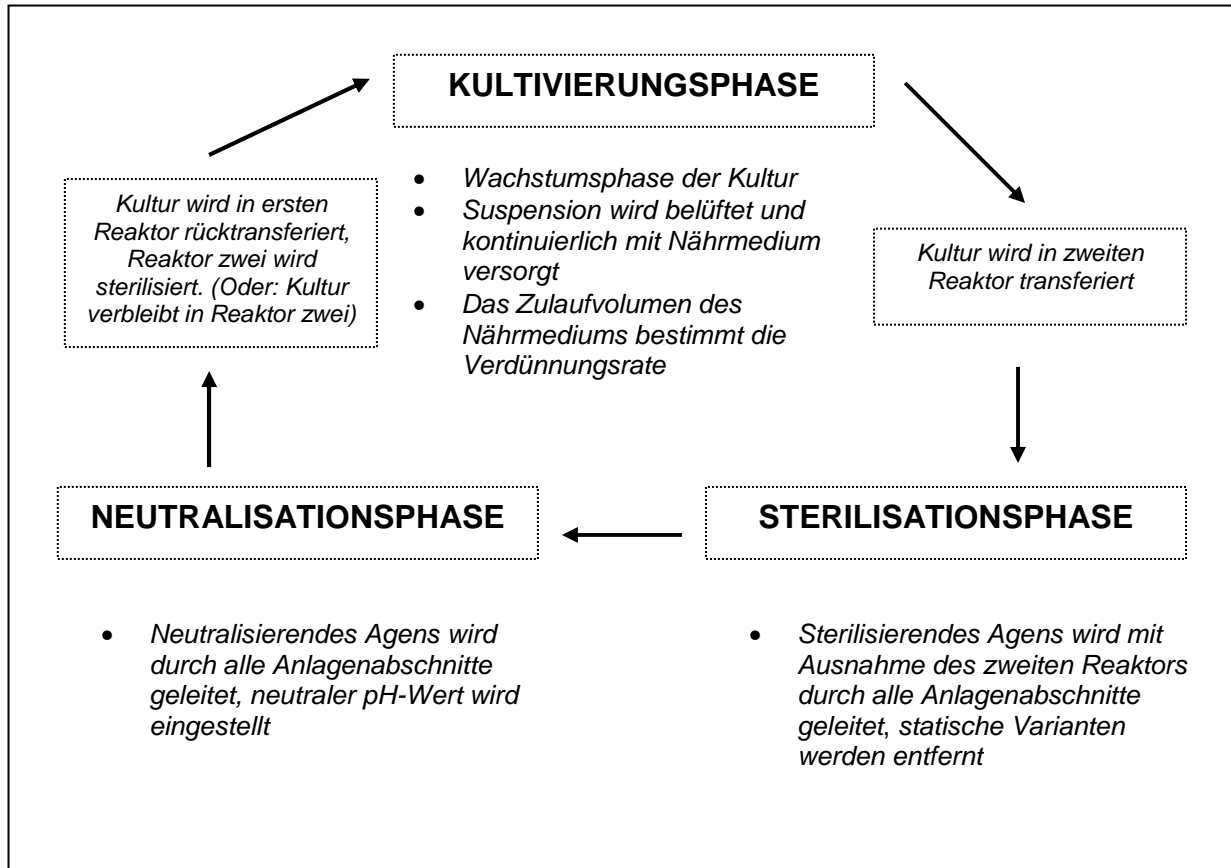
Als Beispiel wird die Beschickung von **Q** mit Nährmedium (**medium**) kurz beschrieben:

Die Kultur befindet sich in Reaktor **Q**. Sie wird durch den airlift durchmischt und soll in Intervallen von sechs Minuten mit frischem Nährmedium versorgt werden (Kultivierungsphase). Hierzu wird Ventil **L** dem Programm entsprechend alle sechs Minuten mit Strom versorgt und geöffnet. Der über der Medienflasche anliegende Luftdruck presst das Nährmedium über die in der Zeichnung fett dargestellten Leitungen **1** und **2** in Reaktor **Q**. Leitungen, die im Anschluss an **Q** fett dargestellt sind, können aufgrund der Ventilprogrammierung ebenfalls durchströmt werden. Die Flüssigkeitssäule in Reaktor **Q** und Leitungsabschnitt **3** bilden einen Siphon: Wird **Q** ein Volumen von zwei Millilitern Nährmedium zugeführt, fließen über Leitung **3** zwei Milliliter aus dem Reaktor ab. Die Öffnungszeiten von Ventil **L** bestimmen das in den Reaktor **Q** einlaufende Volumen und somit die Verdünnungsrate. Das ausgetauschte Medium strömt durch die Samplingküvette und das stromlos geöffnete Ventil **!M** bis es in den Ablauf abfließt. Auf diesem Wege gelangen durch entsprechende Leitungen und Ventile alle Agenzien in Reaktor **Q**.

Der Kultivierungsphase folgen Sterilisations- und Neutralisationsphase. Hierzu wird die Kultur aus Reaktor **Q** in Reaktor **P** überführt und dort weiter belüftet. Reaktor **Q** ist bereit für die Sterilisationsphase, in der Biofilme von den Gefäß- und Leitungsoberflächen entfernt werden.

Während der Sterilisationsphase werden **Q** und alle Leitungsabschnitte mit Natronlauge sterilisiert. Da geringste Mengen von Natronlauge in den Leitungen ausreichen, um die Kultur zu zerstören, müssen die Rückstände durch einen geeigneten Puffer neutralisiert und aus dem System entfernt werden (Neutralisationsphase). Sind Sterilisations- und Neutralisationsphase beendet, wird die Kultur entweder wieder in Reaktor **Q** zurück überführt, oder verbleibt bis zum nächsten Zyklus in Reaktor **P** (symmetrische Betriebsweise).

## MATERIAL UND METHODEN



**Abb.9:** Betriebszyklus der Kulturapparatur, schematisch

### 1.3 Umbau der Kulturapparatur

Die Verbindung aus den Vorzügen der kontinuierlichen Kultur mit der automatisierten Selektion gegen verdünnungsresistente Varianten (Biofilme) ermöglichen Langzeitkulturen ohne das Auftreten von residenten Populationen, deren Dauer bisher nicht erreicht wurde. Aufgrund der gewählten Fragestellung war es notwendig die Anlage so umzubauen, dass auch die Probenentnahme und -kühlung automatisiert wurde. Dadurch, dass die Proben direkt nach der Entnahme in die Kühlung überführt werden, soll erreicht werden, dass das Probenmaterial länger erhalten bleibt und der Zeitpunkt der Probenanalyse frei gewählt werden kann.

Die Intervalle der Probenentnahmen in der Literatur zu diesem Thema liegen, sofern beschrieben, bei zehn (KOTESWARA 1990) oder sogar zwölf Stunden (DRAKE et al. 1976, TSUCHIYA et al. 1972). Da die im Experiment eingesetzten Mikroorganismen Generationszeiten von zwei Stunden (Beute: *Escherichia coli*) und drei bis acht Stunden (Räuber: *Dictyostelium discoideum*) aufweisen können, erschienen diese Intervalle zu lang, um das vollständige Geschehen in der Kokultur wiedergeben zu können. Erschwerend kam bei den oben erwähnten Untersuchungen hinzu, dass die Bakterien in Batch-Kultur zu Flockenbildung neigen und nicht mehr verlässlich analysiert werden konnten. Wurde, um dieses Problem zu umgehen, die serielle

## MATERIAL UND METHODEN

Kultur angewendet, entstand nach jeder Neuinokulation eine anfängliche lag-Phase, die das eventuell zuvor entstandene Schwingungsmuster unterbrach. Diese Problematik sollte durch die Anwendung der Kulturapparatur und einige Veränderungen in Topologie und Programmierung der Anlage gelöst werden.

### 1.3.1 Automatisierung der Probenentnahme

Nach dem Umbau der Kulturapparatur sollten automatisiert, über vierundzwanzig Stunden hinweg, in dreistündlichen Intervallen Proben genommen, in die Kühlung überführt und in standardisierter Form ausgewertet werden können (s.u. Material und Methoden: Plaque Test, Schwenk-Methode). Die Kontrolle der abiotischen Parameter musste ebenso selbstverständlich sein, wie die Vermeidung, bzw. Erzeugung von Biofilmen. Somit wäre vom Zeitpunkt der Inbetriebnahme der Anlage (Inokulation) bis zur Entnahme der Probe durch den Experimentator der gesamte Ablauf automatisiert und der Einfluss eines etwaigen menschlichen Unsicherheitsfaktors gleich Null. Die Aufarbeitung der Proben soll in einem Zeitfenster von bis zu 48h noch möglich sein. Da als Zielvorstellung in festen Intervallen ein definiertes Probenvolumen gewonnen und im Anschluss über einen Zeitraum von max. 48h gekühlt aufbewahrt werden sollte, lag es nahe den Probenablauf an den Mediumszulauf zu koppeln. Hierzu wurde die Topologie der Anlage in soweit verändert (Abbildung 10), als dass die ehemalige Abfallbehälter-Leitung (2, s.u.) zum Probenzulauf umfunktioniert wurde.

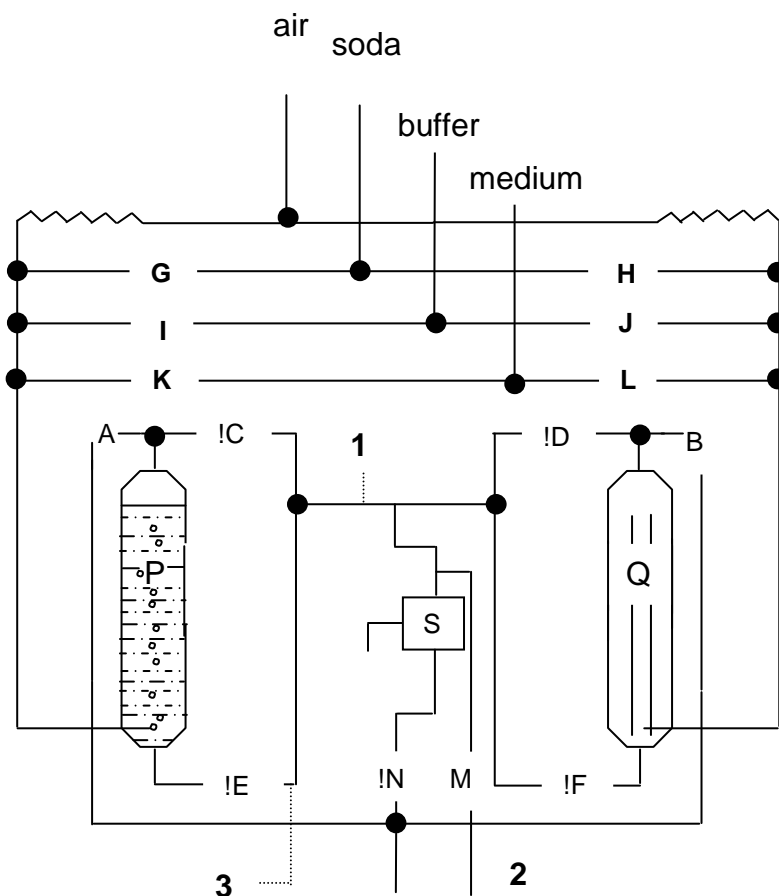


Abb.10:

Aufbau der Kulturapparatur nach Umbau, schematisch

## MATERIAL UND METHODEN

---

Hierdurch wird erreicht, dass mit jedem Nährmediumspuls (reguliert über Ventil K) das Kulturvolumen in Reaktor P über das Niveau des Siphons aus Leitung 3 steigt und über 1 und 2 in den Probensammler gelangt. Der Probensammler besteht aus einem BioRad-Fraktionssammler (Model 2110), der, in einen Kühltisch eingebaut, in dreistündigen Intervallen ein frisches Röhrchen unter dem Endstück des Probenzulaufs positioniert. Der Kühltisch ist durch Bohrungen für die Aufnahme der Leitung 2 vorbereitet worden und auf eine Temperatur von 2-4°C eingestellt.

Da das Temperaturoptimum für das Wachstum von *D. discoideum* bei 22°C und für *E. coli* bei 37°C liegt, ist sichergestellt, dass die Probe nach dem Transport von P über 2 in das jeweilige Probenröhrchen bei 2-4°C zu keinem Wachstum mehr fähig ist und den genauen Wachstumszustand der Kultur zum Zeitpunkt des Nährmediumspulses wiedergibt. (s.u.: *Fehlerabschätzung*). Um diesen Ansprüchen gerecht zu werden, mussten die Zeitabstände, in denen das Nährmedium den Reaktoren zugeführt wird, und die Öffnungszeiten von Ventil K verlängert werden. Es hatte sich gezeigt, dass bei zweiminütigem Öffnen von je 3 Sekunden die Menge des zulaufenden Mediums so gering ist, dass das gleichzeitig ablaufende Volumen nicht ausreicht, um die Organismen unbeschadet in die Probenröhrchen zu überführen. Im Experiment wurde deutlich, dass *D. discoideum* in einem Volumen von unter 0,7ml pro Puls (entspricht  $D=0,25$ ) eine zu hohe Mortalität aufweist und im Probenröhrchen keinen Aufschluss über die wirklichen Verhältnisse im Kulturgefäß gibt. Wird eine bestimmte Anzahl von Zellen in einer verhältnismäßig geringen Wassermenge durch 2 geleitet, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass Zellen an der Oberfläche der Wassersäule zerstört werden. Mit ansteigendem Wasservolumen sinkt die Wahrscheinlichkeit für Zellen-Luft-Kontakte, die Überlebensrate der Zellen steigt.

Die Programmierung der Anlage (s.a. Anhang: *Änderung des Programmierablaufs*) hinsichtlich der Öffnungszeiten von Ventil K wurde so gewählt, dass der Nährmediumspuls jeweils ein frisches Röhrchen in dem Fraktionssammler befüllen konnte (Probenentnahme alle 180min). Der Fraktionssammler ist in der Lage über einen Zeitraum von 72h Proben zu nehmen, danach muss er neu gestartet werden. Die Proben wurden üblicherweise nach 24h entnommen (am Wochenende nach 48h), eiskühlt und sofort analysiert (s.a.: *Material u. Methoden, Plaque Test, optische Dichte*).

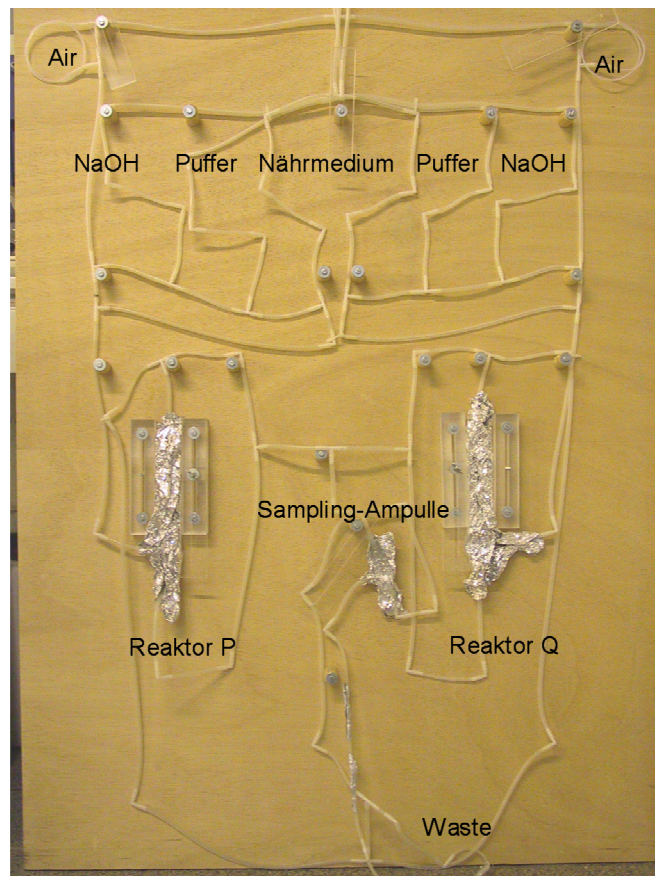
### ***Sterilisation der Kulturapparatur***

Nach dem Abbruch eines Experiments wurden alle Medien aus den Vorratsflaschen entfernt und durch destilliertes Wasser ersetzt. Die Ventile wurden geöffnet und die Kulturapparatur eine Stunde lang mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurde das destillierte Wasser mittels Druckluft restlos aus dem Schlauchsystem entfernt. Über einen Zeitraum von 24h trocknete die Anlage, verschlissene Schlauchteile konnten ersetzt und Verbindungsstücke separat gereinigt und wieder eingesetzt werden. Das Leitungssystem war insofern auf das Autoklavieren vorbereitet, als das sämtliche Leitungsabschnitte geöffnet waren und vom Dampf durchströmt werden konnten. Schlauchenden, die nicht miteinander verbunden waren, wurden mit zwei Luftfiltern versehen, um Kontaminationen im Anschluss an das Autoklavieren zu vermeiden. Kulturgefäße, Samplingküvette und metallische Verbindungsstücke wurden mit Aluminiumfolie umwickelt. Hierdurch wurden Beschädigungen und Kontaminationen vorgebeugt (Abbildung 11).



## MATERIAL UND METHODEN

---



**Abb.11:** Schlauchsystem der Kulturapparatur nach dem Autoklavieren

### 1.3.2 Fehlerabschätzung

Nach dem Umbau der Kulturapparatur wurde es notwendig, die einzelnen, neu hinzugekommenen Komponenten auf ihre Eigenschaften zu überprüfen. Als Bereiche, in denen Zellmaterial zerstört werden könnte, wurden der Probenzulauf, die Kühlung und der Plaque Test zu Bestimmung der Lebendzellzahl von *D. discoideum* identifiziert. Alle drei Module wurden innerhalb eines Experiments überprüft. Durch einen 90cm langen Silikonschlauch mit einem Innendurchmesser von 3mm wurden 3 Probenröhrchen befüllt (Test: Zellverluste durch Probenzulauf). Das Volumen lag bei 1ml, 2ml und 2,7 ml pro Röhrchen, den Volumina, die auch in Lauf 1-3 als Probenvolumen anfielen. Die Röhrchen wurden bei 4°C gekühlt und über einen maximalen Zeitraum von 48h gelagert (Test: Zellverluste durch Kühlung). Aus diesen Proben wurden über drei Tage 100µl Zellsuspension entnommen und per Plaque Test ausgewertet (Test: Zellverluste im Plaque Test). Zu Beginn des Versuchs wurde die im Ausgangsvolumen vorhandene Zellzahl von *D. discoideum* bestimmt. Dies ließ eine Beurteilung über die Zellverluste in den drei Abschnitten bei drei variierenden Volumina zu .

Ein Nährmediumsschub von 1,0ml führte nach der Passage des Probenzulaufschlauches zu einem Verlust von 25% des Zellmaterials. Nach einer Kühlungsperiode von 24h wurden 9,5% mehr Zellen nachgewiesen als in der Probe, die ohne Kühlung sofort nach der Passage des Probenzulaufs aufgearbeitet wurde (Zellen vollenden begonnenen Teilungszyklus noch). Nach 48h Kühlung war im Vergleich zur Ausgangsprobe ein Verlust von 4,8% des Zellmaterials entstanden. Ein Nährmediumsschub von 2,0ml führte nach der Passage des Probenzulaufschlauches zu keinem Verlust des Zellmaterials. Nach einer Kühlungsperiode von 24h wurden 17,9% weniger Zellen nachgewiesen als in der Probe, die ohne Kühlung sofort nach der Passage des Probenzulaufs aufgearbeitet wurde. Nach 48h Kühlung war im Vergleich zur Ausgangsprobe ein Verlust von 26,2% des Zellmaterials entstanden. Ein Nährmediumsschub von 2,7ml führte nach der Passage des Probenzulaufschlauches zu einem Verlust von 1,4% des Zellmaterials. Nach einer Kühlungsperiode von 24h wurden 43,4% weniger Zellen nachgewiesen als in der Probe, die ohne Kühlung sofort nach der Passage des Probenzulaufs aufgearbeitet wurde. Nach 48h Kühlung war im Vergleich zur Ausgangsprobe ein Verlust von 52% des Zellmaterials entstanden. Aufgrund dieser Daten wurde die Probenentnahme so eingestellt, dass ein Nährmediumsschub mindestens ein Volumen von 2 ml aufwies und die Proben nicht länger als 48h in der Kühlung aufbewahrt wurden.

## MATERIAL UND METHODEN

### Zellzahlen von *D. discoideum* nach Passage des Probenzulaufs und 24h und 48h Kühlung

D.d. Z/ml	EMK, Mikroskop:										
D.d.Z/ml	EMK, Plaque-Test:	Plaque-Test									
	0h	0h	MW	3 Röhrchen	24h	24h	3 Röhrchen	48h	48h	3 Röhrchen	
Röhrchen	Mikroskop	Plaque-Test			Mikroskop	Plaque-Test		Mikroskop	Plaque-Test		
640000											
140000											
1,0ml	880000	100000		105000	650000	120000		780000	100000		
		110000	105000				130000			110000	
1,0ml	670000	100000				830000	130000		830000	50000	
		100000	100000				100000			50000	
1,0ml	850000	120000				660000	110000		920000	140000	
		100000	110000				110000	115000		150000	100000
2,0ml	680000	150000				410000	110000		550000	110000	
		130000	140000				100000			100000	
2,0ml	840000	110000				720000	170000		660000	70000	
		100000	105000				160000			100000	
2,0ml	470000	200000		140000	700000	80000		680000	120000		
		150000	175000				70000	115000		120000	103333
2,7ml	410000	100000				730000	70000		740000	70000	
		220000	165000				90000			90000	
2,7ml	760000	130000				730000	100000		500000	60000	
		150000	140000				70000			60000	
2,7ml	710000	90000				730000	60000		560000	50000	
		130000	110000		138333		80000	78333		70000	66666

## 1.4 Betriebsparameter der eingesetzten Anlagen im Vergleich

Im Folgenden werden die wichtigsten Betriebsparameter beider Kulturapparaturen vergleichend dargestellt. Die ursprüngliche patentierte Topologie wurde für die Untersuchung experimenteller Symbiosen genutzt. Nach dem Umbau der Anlage konnte dann die Untersuchung von Räuber-Beute-Oszillationen erfolgen.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind in der Tabelle beide Anlagentypen in Bezug auf ihren Aufgabenbereich dargestellt:

<b>Betriebsparameter</b>	<b>Räuber-Beute-Oszillationen</b>	<b>Experimentelle Symbiose</b>
<i>Kulturvolumen</i>	22ml	233ml
<i>Reaktorvolumen</i>	30ml	250ml
<i>Länge der Kultivierungsphase</i>	24h	72h
<i>Verdünnungsrate/n</i>	D= 0,27/ 0,57/ 0,77	D= 1,0
<i>Intervall der Probenentnahmen</i>	3 stdl.	24stdl.
<i>Kultivierung in Reaktor/en</i>	<b>P</b>	alternierend: <b>P</b> und <b>Q</b>