

**Physiologische und genomische Analysen zur
Sodorifen-Biosynthese verschiedener *Serratia*-Spezies**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

am Institut für Biowissenschaften
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock



vorgelegt von

Teresa Weise

geb. am 21.05.1983 in Rostock

Rostock, Februar 2013

Gutachter:

1. Gutachter:

Prof. Dr. Birgit Piechulla,
Institut für Biowissenschaften, Universität Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. Jörn Piel
Institut für Mikrobiologie, ETH Zürich

Datum der Einreichung: 27. Februar 2013

Datum der Verteidigung: 12. April 2013

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1. Einleitung	3
1.1 Sekundäre Metabolite	3
1.2 Flüchtige Verbindungen	3
1.3 Die Gattung <i>Serratia</i>	5
1.4 Zielstellung	7
2. Material und Methoden	8
2.1 Organismen und Plasmide	8
2.1.1 Bakterienstämme	8
2.1.2 Pflanzen	9
2.1.3 Rekombinante Plasmide und Vektoren	9
2.1.4 Verwendete Oligonukleotide	10
2.2 Nährmedien und Anzucht der Organismen	10
2.2.1 Nährmedien für Bakterien	10
2.2.2 Kultivierung der Bakterien	12
2.2.3 Nährmedien für Pflanzen	13
2.2.4 Kultivierung der Pflanzen	14
2.3 Bestimmung der physiologischen Parameter	14
2.3.1 Wachstumsbestimmung der Bakterien	15
2.3.2 Bestimmung der Glucose Konzentration	16
2.3.3 Bestimmung des pH-Wertes	17
2.3.4 Bestimmung der pflanzlichen Frischmasse	17
2.3.5 Bestimmung der Wurzellänge	17
2.4 Co - Kulturen – Testsystem	17
2.5 Bestimmung von Ammoniak	18
2.5.1 Qualitativer Nachweis von Ammoniak	18
2.6 Funktionelle Bioassays	18
2.6.1 Co - Kulturen - Testsystem mit Phosphorsäure	19
2.6.2 Wachstum von <i>Arabidopsis thaliana</i> unter Einfluss von Ammoniaklösung	19

2.6.3	Wachstum von <i>Arabidopsis thaliana</i> unter unterschiedlichen pH – Bedingungen	20
2.7	Gaschromatographische - massenspektrometrische Analyse der organischen, flüchtigen Verbindungen	20
2.7.1	Adsorption der flüchtigen Analyte mittels VOC-Sammelsystem und SPME	20
2.7.2	GC/MS – Analyse	22
2.7.3	Bestimmung der flüchtigen Analyte	23
2.8	Arbeiten mit Nukleinsäuren	23
2.8.1	Isolierung chromosomaler DNA aus Bakterien	25
2.8.2	Isolierung von Plasmiden	25
2.8.3	PCR – Techniken	26
2.8.4	Trennung von Nukleinsäuren	28
2.8.5	Reinigung von Nukleinsäuren	29
2.9	DNA-Transfer in <i>Serratia</i> -Spezies	29
2.9.1	Herstellung elektrokompetenter <i>Serratia plymuthica</i> -Zellen	29
2.9.2	Elektroporation	30
2.10	Ortsspezifische Mutagenese nach dem „ <i>Quick & Easy</i> E. coli <i>Gene Deletion Kit</i> “ (Gene Bridges), mod.	31
2.11	Genom-Analyse von <i>Serratia plymuthica</i> 4Rx13	32
3.	Ergebnisse	33
3.1.	Analysen zur Biosynthese von Sodorifen	33
3.1.1	Verteilung der Sodorifen-Emission innerhalb der Gattung <i>Serratia</i>	33
3.1.1.1	Emission volatiler Verbindungen verschiedener <i>Serratia</i> -Spezies	33
3.1.1.2	Phylogenetischer Stammbaum und Verwandtschaft der Sodorifen-Produzenten	37
3.1.2	Genom-Analyse von <i>Serratia plymuthica</i> 4Rx13	40
3.1.2.1	Genom-Sequenzierung von <i>S. plymuthica</i> 4Rx13	40
3.1.2.2	Vergleichende Genom-Analysen innerhalb der <i>Serratia</i> -Spezies	41
3.1.2.3	Etablierung eines <i>knock-out</i> Systems für	

	<i>S. plymuthica</i> 4Rx13	45
3.1.3	Physiologische Untersuchungen der Sodorifen-Emission	50
3.1.3.1	Fütterungsversuche mit verschiedenen Kohlenstoffquellen	50
3.1.3.2	Fütterungsversuche mit ¹³ C-markierten Substraten	54
3.1.4	Sodorifen-Emission unter ökologisch relevanten Nährstoffbedingungen	59
3.2	Einfluss bakterieller Volatile auf das Wachstum von <i>Arabidopsis thaliana</i>	60
3.2.1	Einfluss bakterieller Volatile auf verschiedene <i>A. thaliana</i> -Akzessionen	60
3.2.2	Regeneration von <i>A. thaliana</i> nach Einfluss bakterieller Volatile	62
3.2.3	Emission von bakteriellen anorganischen Volatilen und deren Einfluss auf <i>Arabidopsis thaliana</i>	63
3.2.3.1	Einfluss bakterieller Volatile auf das Wachstum von <i>A. thaliana</i> bei unterschiedlichen Nährstoffbedingungen	63
3.2.3.2	Korrelation zwischen NH ₃ -Emission und pH-Wert-Veränderung	66
3.2.3.3	Einfluss von NH ₃ -Lösung auf das Wachstum von <i>A. thaliana</i>	68
3.2.3.4	Einfluss des pH-Wertes auf das Wachstum von <i>A. thaliana</i>	69
3.2.3.5	Verwendung von Phosphorsäure zur Bindung von Ammoniak	70
3.2.3.6	NH ₃ -Emission und pH-Wert-Veränderung verschiedener Rhizobakterien	72
4.	Diskussion	73
4.1	Emission volatiler organischer Verbindungen verschiedener <i>Serratia</i> -Spezies	73
4.2.	Biosynthese von Sodorifen	79
4.2.2.1	Genom-Analysen	80
4.2.2.2	Stoffwechselphysiologische Untersuchungen	83
4.3	Einfluss volatiler Verbindungen von <i>Serratia plymuthica</i> auf das Wachstum von <i>Arabidopsis thaliana</i>	90
5.	Literaturverzeichnis	97

A	Abkürzungsverzeichnis	108
B	Abbildungsverzeichnis	110
C	Tabellenverzeichnis	112
D	Lebenslauf	113
E	Selbstständigkeitserklärung	116
F	Danksagung	117
G	Anhang	beigelegte CD

Zusammenfassung

Bakterien sind in der Lage neben einer Vielfalt an Sekundär-Metaboliten komplexe Profile flüchtiger Verbindungen zu produzieren. Häufig befinden sich unter diesen flüchtigen Metaboliten auch neuartige Volatile, wie das von *Serratia plymuthica* emittierte Sodorifen. Dessen Struktur wies durch seinen polymethylierten Bicyklus ($C_{16}H_{26}$) auf einen ungewöhnlichen und einzigartigen Naturstoff mit unbekannter Biosynthese hin (von Reuß et al. 2010). Nachdem erste Sekundärmetabolit-Klassen (Polyketide, Phenylpropane) für die Struktur von Sodorifen ausgeschlossen werden konnten, war es das primäre Ziel dieser Arbeit Hinweise über das Vorkommen und der Verbreitung der Sodorifen-Emission sowie Informationen über dessen Biosyntheseweg zu erhalten.

Dafür wurde die Sodorifen-Emission zunächst innerhalb der Gattung *Serratia* untersucht und dem Habitat der Bakterien gegenüber gestellt. Interessanterweise konnte Sodorifen ausschließlich bei *Serratia plymuthica*-Isolaten (4Rx13, HRO-C48 und 3Re-4-18) nachgewiesen werden, die aus der Rhizosphäre von *Brassica napus* oder der Endorhiza von *Solanum tuberosum* von Feldern in der Umgebung von Rostock (Mecklenburg-Vorpommern) stammen.

Zur Aufklärung des Biosyntheseweges von Sodorifen wurde eine Kombination aus physiologischen und genomischen Analysen gewählt. Zunächst wurde das Genom von *S. plymuthica* 4Rx13 vollständig sequenziert und automatisch annotiert. Der Vergleich des *S.p.* 4Rx13-Genoms mit Genomen von nicht-Sodorifen-produzierenden *Serratia*-Spezies ergab 312 ausschließlich in *S. plymuthica* 4Rx13 vorkommende offene Leserahmen, von denen 176 keine Funktionszuweisung haben. Diese sind präferierte potentielle Kandidatengene für bisher neuartige Enzyme oder Regulatoren, die an unbekanntem Stoffwechselwegen der Sodorifen-Biosynthese beteiligt sein können. Das für *S. plymuthica* etablierte knock-out-System wurde genutzt, um erste Mutanten dieser Kandidatengene herzustellen, von denen keine einen Einfluss auf die Emission von Sodorifen hatte. Über die Fütterung verschiedener Kohlenstoffquellen konnten diverse Substrate, wie Aminosäuren (z.B. Cystein und Prolin), Glucose, Propionat und Acetat, als mögliche Vorstufen ausgeschlossen werden, während die Aminosäuren Alanin und Methionin sowie die Carbonsäure Succinat zu sehr hohen Sodorifen-Produktionen führten. NMR-Analysen mit $[1,4-^{13}C_2]$, $[2,3-^{13}C_2]$ oder $[U-^{13}C_4]$ - Succinat ergaben zunächst vier mögliche Synthese-Szenarien und wiesen u.a. auf mehrere Reduktionsschritte und der direkten Übertragung von zwei Methylgruppen durch Methyltransferasen während der Biosynthese auf Sodorifen hin. Zusammenfassend ergibt sich, dass Kohlenstoff-Atome vom Succinat und dem Aminosäure-Metabolismus (insbesondere Alanin und Methionin) über einen bisher unbekanntem, neuartigen Stoffwechselweg für die Produktion von Sodorifen verwendet werden.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit der durch diverse Vorarbeiten (Kai et al. 2009, Wenke et al. 2012) bekannte negative Einfluss bakterieller Volatile auf das Wachstum von *Arabidopsis thaliana* untersucht. Unter 24 getesteten *A. thaliana*-Akzessionen zeigten C24 und Ler geringfügige morphologische Unterschiede in der durch bakterielle Volatile induzierten Wachstumsinhibition gegenüber den anderen Akzessionen. Als negativ wirkende Komponente im Petrischalen-Testsystem stellte sich Ammoniak heraus, das über die Alkalisierung des Mediums das Pflanzenwachstum beeinträchtigt.

1. Einleitung

1.1 Sekundäre Metabolite

Das Interesse an sekundären Metaboliten und Naturstoffen verschiedenster Organismen ist in den letzten Jahrzehnten enorm in den Fokus der Wissenschaft getreten. Bu'Lock (1961) führte den Begriff „Sekundär-Metabolit“ erstmals in die wissenschaftliche Gemeinschaft der Mikrobiologie ein und erklärte, dass die Produktion bakterieller Sekundär-Metabolite häufig mit dem Ende der exponentiellen und Beginn der stationären Wachstumsphase einhergeht. Seitdem konnten alleine bis Mitte der 90er Jahre etwa 50.000 Verbindungen von Mikroorganismen gefunden werden (zusammengefasst in Demain 1999). Diskutierten Wissenschaftler anfangs, dass es sich dabei um „Abfallprodukte“ oder evolutionäre Überbleibsel handeln würde (Haslam 1986, Davies 1990), ist heute bekannt, dass sekundäre Metabolite (auch Spezial-Metabolite) wie Antibiotika, Pigmente, Toxine, Effektoren für ökologische Konkurrenz und Symbiose aber auch Pheromone, Enzym-Inhibitoren, Pestizide, Antitumor-Agenzien und Wachstums promotoren von Tieren und Pflanzen verbergen können (Demain 1998), die ausgesprochen wichtig für das Leben und Überleben der Organismen in den natürlichen Habitaten sind. Der Sekundär-Metabolismus zeichnet sich durch die Produktion von strukturell diversen Molekülen aus, die entgegen dem Primär-Metabolismus nicht essentiell für das Wachstum der produzierenden Organismen sind (Bu'Lock 1961, Brakhage 2013). Dabei können sekundäre Metaboliten wirksame Agenzien darstellen, die weiter noch als Transport- und Signalmoleküle agieren können (Demain & Fang 2000) und durch Nährstoffe, Wachstumsraten, Rückkopplungs-Kontrollen und/oder Enzymaktivitäten reguliert werden (Demain, 1998). In der Medizin stellen sie zusätzlich ein Modellsystem zur Untersuchung neuer Medikament dar (zusammengefasst in Austin 1989), so dass vor allem schnelle, einfache, genom-basierende Screening-Methoden entwickelt wurden, um neue Sekundär-Metabolite aus der Natur zu erfassen (Medema et al. 2011, Ichikawa et al. 2013).

1.2 Flüchtige Verbindungen

Zu den Sekundär-Metaboliten zählen auch flüchtige Verbindungen, die von einer Vielzahl von verschiedenen Organismen wie Pflanzen, Tieren, Insekten oder Mikroorganismen emittiert werden (Wenke et al. 2010). 1921 publizierten Zoller & Mansfield-Clark erstmals die Emission flüchtiger Verbindungen von Bakterien. Weitere Analysen zeigten, dass Bakterien eine Vielfalt an Volatilen produzieren und an ihre Umwelt emittieren (Stotzky & Schenck 1976). Heute sind von den insgesamt 10^7 - 10^9 auf der Erde vermuteten Bakterien-Spezies (Curtis et al. 2002,

Dykhuisen 1998) bisher ca. 300 Spezies/Isolate hinsichtlich der Emission volatiler Verbindungen untersucht worden (Effmert et al. 2012). Dabei konnten etwa 800 verschiedene Substanzen dokumentiert werden. Aus dem Vergleich mit ca. 2000 flüchtigen Verbindungen von Pflanzen, von 90 Pflanzenfamilien (Dudareva et al. 2006, Knudsen & Gershenzon 2006), ergibt sich im Bereich der bakteriellen Volatile ein großes und wenig untersuchtes Forschungsgebiet.

Im Allgemeinen zeichnen sich flüchtige Verbindungen durch ein niedriges Molekulargewicht, einen hohen Dampfdruck ($> 0,01$ kPa), eine niedrige Siedetemperatur und einer geringen Polarität aus, was die evaporierenden Eigenschaften dieser Verbindungen fördert (Rowan 2011). Dabei wird zwischen organischen als auch anorganischen flüchtigen Verbindungen unterschieden. Die organischen flüchtigen Metabolite lassen sich in die Substanzklassen der Fettsäurederivate, aromatische Verbindungen, stickstoff- oder schwefelhaltige Verbindungen und Terpenoiden einteilen (Schulz & Dickschat 2007). Die Produktion dieser Substanzen in Mikroorganismen hängt von vielen Faktoren wie z.B. der Temperatur, der Populationsgröße, dem Nährstoffangebot oder aber der metabolischen Kapazität ab (Whright & Thompson 1985, Fiddaman et al. 1993, Mackie & Wheatley 1999, Stotzky & Schenk 1976, Kiviranta et al. 1998, Schulz et al. 2002, Blom et al. 2011, Weise et al. 2012). Entsprechend der Wachstumsbedingungen und der Bakterien-Spezies kann das divers, einfach oder komplex sein. Als Beispiel seien *Streptomyces* ssp. genannt, dessen Profil volatiler Verbindungen sich aus Ketonen, Alkoholen und Estern, Pyrazinen, Furanonen und aromatischen Verbindungen zusammensetzt (Pollak & Berger, 1996).

Über die biologische und ökologische Funktion vieler bakterieller Volatile ist bis heute wenig bekannt. Volatile werden als Infochemikalien diskutiert, da sie in der Biosphäre in unterschiedlichen Konzentrationen zu finden sind und über lange Distanzen agieren können (Wheatley 2002). Sie können der Kommunikation und/oder der Abwehr zwischen verschiedenen oder innerhalb gleicher Spezies dienen (Kai et al. 2009). So werden beispielsweise Moskitos vor allem durch bakterielle Volatile der humanen Haut angelockt (Verhulst et al. 2010). Die Interaktion bakterieller Volatile wurde vielfach in einfachen Test-Systemen mit anderen Organismen analysiert. Dabei konnten wachstumsfördernde als auch wachstumshemmende Effekte auf Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* (Ryu et al. 2003, Vespermann et al. 2007, Kai et al. 2010, Kai & Piechulla 2010, Blom et al. 2011, Wenke et al. 2012a) und *Physcomitrella paten* (Kai & Piechulla 2010), aber auch den verschiedensten Pilzen wie *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus nidulans* oder *Sclerotinia sclerotiorum* (Kai et al. 2007, Weise et al. 2012) sowie den Protozoen *Acanthamoeba castellanii* und *Paramecium caudatum* (Kai et al. 2009) gezeigt werden. Diese Analysen konzentrierten sich vor allem auf den Einfluss volatiler Mixturen von Bakterien. Von besonderem Interesse ist dagegen der Einfluss einzelner

oder kombinierter Verbindungen in definierter Konzentration. So zeigten erste Analysen den konzentrationsabhängigen Einfluss von Indol, Dimethyldisulfid und 2-Phenylethanol auf das Wachstum von *A. thaliana*. (Kai et al. 2010, Blom et al. 2011, Wenke et al. 2012). Auch der Einfluss auf Pathogene von Pflanzenwurzeln oder das Wachstum von *A. thaliana* durch anorganische Verbindungen wie Cyanwasserstoff oder Ammoniak konnte nachgewiesen werden (Voisard et al. 1998, Kai et al. 2010).

1.3 Die Gattung *Serratia*

Die Bakterien-Gattung *Serratia* zählt zu den Gram-negativen γ -Proteobakterien der Familie der Enterobacteriaceae. Es sind peritrich begeißelte, fakultativ lebende Anaerobier, die ubiquitär in/auf der Erde, im Wasser, auf/an Pflanzen und Tieren als auch den Menschen zu finden sind (Grimont & Grimont 2006). Der bekannteste Vertreter ist *Serratia marcescens*, der durch Besiedelung von Nahrungsmittel als „blutiges“ Phänomen in den 70er-Jahren für Aufsehen sorgte, oder in medizinischen und militärischen Experimenten als ABC-Waffen und Markierungsorganismus eingesetzt wurde. Es ist ein opportunistisches Pathogen, dass u.a. Pneumonia und Meningitis auslösen kann (zusammengefasst in Mahlen 2011). Bis heute gehören 15 Spezies der Gattung *Serratia* an: *S. entomophila* (1988), *S. ficaria* (1979), *S. fonticola* (1979), *S. glossinae* (2010), *S. grimesii* (1983), *S. liquefaciens* (1931), *S. marcescens* subsp. *marcescens* (1823), *S. marcescens* subsp. *sakuensis* (1998), *S. nematodiphila* (2009), *S. odorifera* (1978), *S. plymuthica* (1896), *S. proteamaculans* (1919), *S. quinivorans* (1982), *S. rubidaea* (1940), und *S. ureilytica* (2005) (zusammengefasst in Mahlen 2011). Weiterhin publizierten Marin-Manzano (2012) die Entdeckung von zwei Isolaten aus Insekten, die im Vergleich zu anderen sequenzierten *Serratia*-Spezies eine außergewöhnlich reduzierte Genom-Größe besitzen. Sie ordneten beide Isolate einer neuen Spezies innerhalb der Gattung *Serratia* mit dem Namen *S. symbiotica* ein.

Allgemein ist die Gattung *Serratia*, durch die Produktion von einer Vielfalt an sekundären Metaboliten, als Modellorganismus bekannt (Fender et al. 2012). Schon ihr charakteristischer Phänotyp mit rosafarbenen oder roten Kolonien weist auf die Produktion der Pigmente Prodigiosin und Pyrimin. Prodigiosin (2-methyl-3-amyl-6-methoxyprodigiosin) ist ein gut untersuchtes, nicht diffusionsfähiges, wasserunlösliches Pigment, das an die Zellwand bindet und farbige Kolonien hervorruft. Es wird durch die Kondensation von 2-Methyl-3-amyl-pyrrol und 4-Methoxy-2-2'-bipyrrol-5-carboaldehyd gebildet (Williams 1973). In der Literatur ist Prodigiosin als antibakterielle und antifungische Verbindung mit negativen Eigenschaften gegen Malaria und gegen Protozoen bekannt. Pyrimin ist ein wasserlösliches, pinkes Pigment, welches

Eisen-Ionenferrous (L-2(2-Pyridyl)-delta'-pyrrolin-5-carboxylic acid) enthält (Grimont & Grimont 2006). Weiterhin wurde die Produktion von β -Carotin in einem *S. marcescens*-Isolat gefunden (Wang et al. 2012). Neben diesen Pigmenten sind weitere Sekundär-Metabolite wie das Breitband-Beta-Laktam-Antibiotikum Carbapenem (1-carbapen-2-em-3-carboxylic acid) bekannt (zusammengefasst in Fineran et al. 2005), dessen Synthese durch die Mechanismen von Quorum-Sensing mit dem Signalmolekül N-Acyl-Homoserin-Lacton (N-AHL) kontrolliert werden. Kürzlich wurden zusätzlich diverse Polyketide und Polyketid-Synthase Gene in verschiedenen *Serratia*-Spezies gefunden, wie Oocydin A, welches eine biologische Aktivität gegen Oomyceten aufweist (Matilla et al. 2012) oder Althiomycin, ein Ribosomen inhibierendes Antibiotikum (Gerc et al. 2012). Weiterhin wurden drei Breitband-Antibiotika entdeckt, deren Strukturen den Zeaminen ähneln. Hinter der Biosynthese wird ein einzigartiges Zusammenspiel zwischen sekundären Lipiden und sekundären Metaboliten vermutet (Masschelein et al. 2013). Zusätzlich zu der Produktion von Pigmenten und Antibiotika ist vor allem das antagonistische Potential vieler *Serratia*-Spezies gegen Pflanzen pathogene Pilze wie *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* oder *Verticillium dahliae* bekannt, welches auf die Produktion von Chitinasen zurückzuführen ist. Der positive Einfluss diverser *Serratia*-Spezies auf verschiedene Pflanzen wurde vielfach gezeigt (Chanway et al. 1989, Zhang et al. 1996b). Das führte dazu, dass Rhizobakterien wie *S. plymuthica* HRO-C48 bereit kommerziell als Biocontrol-Organismen angezogen werden (RhizoStar®, E-nema GmbH, Raisdorf, Deutschland) und in der Landwirtschaft eingesetzt werden (Müller et al. 2008).

Die Gattung *Serratia* produziert außerdem eine Vielzahl an flüchtigen Sekundären-Metaboliten. Bereits 1978 beschrieben Grimont et al. die Spezies *S. odorifera* mit einem charakteristischen Geruch und publizierten die Gattung *Serratia* 1985 als Produzenten eines kartoffelartigen Geruchs, der durch Pyrazine hervorgerufen wird. Untersuchungen verschiedener Rhizobakterien zeigten, dass *Serratia odorifera* 4Rx13 ein komplexes Profil von ca. 100 flüchtigen Verbindungen emittiert (Kai et al. 2010). *S. plymuthica* 4Rx13 wurde aus der Rhizosphäre von *Brassica napus* isoliert und emittiert neben anorganischen Verbindungen wie Kohlenstoffdioxid

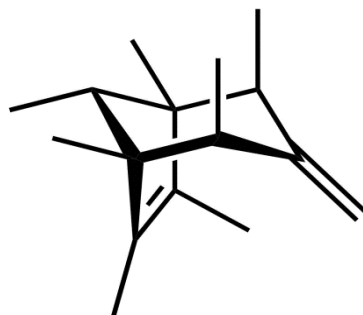


Abbildung 1-1: Sodorifen

(Kai & Piechulla 2010) oder Ammoniak organische Volatile wie Methanol, 2-Phenylethanol oder Dimethyldisulfid. Auffällig wurde eine Hauptverbindung detektiert, dessen Emission ca. 45 % des gesamten Profils ausmachte (Kai et al. 2010). Diese Verbindung wies im Massenspektrum eine ungewöhnliche Fragmentierung bei m/z 134, 135 und 136 auf, deren Struktur durch NMR-Analysen aufgeklärt wurde. Die Struktur weist auf einen polymethylierten Bicyclus aus 16 Kohlen- und

26 Wasserstoffatomen auf und besitzt ein Molekulargewicht von 218,2055 g/mol. Die Struktur konnte mittels chemischer Synthese verifiziert werden und erhielt den chemischen Namen 1,2,4,5,6,7,8-Heptamethyl-3-bicyclo[1,2,3]oct-6-en und den Trivialnamen Sodorifen (von Reuß et al. 2010). Die ungewöhnliche Struktur ließ bisher keine Schlüsse bezüglich der Biosynthese von Sodorifen zu. Auch die biologische und ökologische Funktion dieser neuartigen Verbindung konnten bisher nicht aufgeklärt werden.

1.4 Zielstellung

Die neuartige und ungewöhnliche Verbindung Sodorifen bildete mit dem Bakterium *Serratia odorifera* 4Rx13 den Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. Dabei war vor allem die unbekannte Biosynthese von Interesse. Für Hinweise auf zugrundeliegende Stoffwechselwege sollte eine kombinierte Strategie aus physiologischen und genomischen Analysen verfolgt werden.

Die physiologischen Untersuchungen sollten mit Hilfe von Fütterungsexperimenten mit *S. odorifera* 4Rx13 auf Zusammenhänge zwischen verwendete Substrate und der Sodorifen-Emission weisen. Mögliche Vorstufen könnten dabei Informationen über beteiligte bekannte Stoffwechselwege liefern oder auf unbekannte Stoffwechselreaktionen hindeuten.

Weiterhin sollte eine Genom-Analyse mit *S. odorifera* 4Rx13 erfolgen. Grundlage dafür sollte die Sequenzierung des Genoms und die daraus resultierenden offenen Leserahmen mit einer ersten Funktionszuweisung darstellen. Vergleichende Genom-Analysen mit nicht-Sodorifen-produzierenden Spezies sollten auf potentielle Kandidatengene weisen. Mit Hilfes eines etablierten Mutagenese-Systems sollte daraufhin der Einfluss der Kandidatengene auf die Sodorifen-Emission hin getestet werden.

Neben der Biosynthese war vor allem auch die biologische und ökologische Relevanz von Sodorifen von Interesse. Es sollte der Frage nachgegangen werden, welche *Serratia*-Spezies Sodorifen emittieren und ob die Sodorifen-Produzenten einem Habitat zugeordnet werden können. Für diese Analysen standen diverse Spezies und Isolate verschiedener Habitate zur Verfügung, die auf die Sodorifen-Emission hin untersucht werden sollten. Zusätzlich sollte der phylogenetische Hintergrund überprüft werden und in einen Zusammenhang mit der Sodorifen-Emission gebracht werden. Weiterhin sollte der Einfluss von Volatilen emittiert durch *Serratia*-Spezies auf das Wachstum von *Arabidopsis thaliana*, im Besonderen auf verschiedene Akzessionen, analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Organismen und Plasmide

2.1.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 2-1 angegeben.

Tabelle 2-1: Wildtyp-Bakterien. SCAM (*strain collection of antagonistic microorganisms*, Abteilung Mikrobiologie, Universität Rostock, Deutschland), DSMZ (Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Leibniz Institut, Braunschweig, Deutschland), NIOO-KNAW (*Netherlands Institute of Ecology*).

Gattung	Spezies	Isolat	Herkunft
<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	B2g	SCAM
<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	L13-6-12	SCAM
		3Re-2-7	SCAM
<i>Serratia</i>	<i>fonticola</i>	V5906	Institut für medizinische Mikrobiologie, Universität Rostock, DE
	<i>grimesii</i>	3BZ-10	Institut für medizinische Mikrobiologie, Universität Rostock, DE
	<i>liquefaciens</i>	B5319	Institut für medizinische Mikrobiologie, Universität Rostock, DE
	<i>marcescens</i>	V11694	Institut für medizinische Mikrobiologie, Universität Rostock, DE
		Db11	Centre d'Immunologie, FR
	<i>plymuthica</i>	AS9	Schwedische Universität für Agrarwirtschaft, Uppsala, SE
		PRI-2C	NIOO-KNAW, Wageningen NL
		3Re4-18	SCAM
		HRO-C48	SCAM
	<i>odorifera</i>	4Rx13	SCAM
	DSM 4582	DSMZ	
	<i>proteamaculans</i>	568	Brookhaven National Laboratory, NY, USA
	<i>rubidaea</i>	V3095	Institut für medizinische Mikrobiologie, Universität Rostock, DE
		CC12/12	Leibniz-Institut Großbeeren/Erfurt, DE
<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	2P3-18a	SCAM
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	R3089	SCAM
	<i>rhizophila</i>	P69	SCAM

2.1.2 Pflanzen

Für die vorliegenden Analysen wurden 24 verschiedene Akzessionen von *Arabidopsis thaliana* durch die Arbeitsgruppe von Detlef Weigel (Max - Planck Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen, Deutschland) bereitgestellt. Tabelle 2-2 gibt einen Überblick über Namen und Herkunft der einzelnen Akzessionen.

Tabelle 2-2: *Arabidopsis thaliana* Akzessionen mit dem dazugehörigen Ursprung.

Akzession	Ursprung
Ak-1	Achkarren, DE
Bay-0	Bayreuth, DE
Bch-3	Buchen, DE
C24	Unbekannte Herkunft
Col-0	Columbia, MO
Cvi	Kapverdische Inseln
Est-1	Estland, EST
Fr-2	Frankfurt, DE
Got-1	Göttingen, De
IS-1	Isenburg, De
Hr-5	Unbekannte Herkunft, Groß Britannien
Kin-0	Kendaville, MI
KI-0	Kaiserslautern, DE
Ler	Landsberg, DE
M7323S	Unbekannte Herkunft
MS-0	Moskau, RU
Nc-1	Ville-en-Vermois, FR
Nd-1	Niederlenz, DE
Nok-1	Noordwijk, NL
Nw-1	Neuweilnau, De
Shadara	Pamiro Alay, TJ
Van-0	Vancouver, BC

2.1.3 Rekombinante Plasmide und Vektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und Vektoren wurden in **Tabelle 2-3** zusammengefasst.

Tabelle 2-3: Plasmide und Vektoren

Plasmid	Host	Größe	Eigenschaften	Herkunft
pRed/ET	<i>E. coli</i> HS 996	9,270 kb	Tet ^r , Red α , Red β , Red γ , RecA	Gene Bridges, Heidelberg, DE
pFRT	<i>E. coli</i> HC 100	3,4 kb	FRT-PKG-gb2-neo-FRT <i>cassette</i>	Gene Bridges, Heidelberg, DE

2.1.4 Verwendete Oligonukleotide

Gen-name, Schmelztemperatur und Sequenzinformation der verwendeten Oligonukleotide (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) sind in Tabelle 2-4 aufgelistet worden.

Tabelle 1-4: Oligonukleotide mit dazugehöriger Sequenz.

Name	Gen-Name	Richtung	T _m (°C)	Sequenz (5' → 3')
29.1	pRed/ET	sense	55	TGA GCA GGA CAA TGA ATC CTG
29.2	pRed/ET	antisense	55	ACC GGT GCA AAC CTC AGC AAG
23.1	Sod_c02280 +FRT-PGK-gb2-neo- FRT	sense	59	GAT TGA GCA AGG TAC ACA CTA TTT TAC CGG TGT CCC CTG CTC TTA TTT AAA ATT AAC CCT CAC TAA AGG GCG
23.2	Sod_c02280 +FRT-PGK-gb2-neo- FRT	antisense	59	CGT TTG AGG CCA GTA CGT AGT GGG TTT CAT CGC GAG CAA TAA CTT CAT TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCT C
26.1	Sod_c02280	sense	59	GAT TAA CGT CCG CGA TTT TG
26.2	Sod_c02280	antisense	59	GAG CGA ATG TTG GAG GAC ATT
25.1	Sod_d00970 +FRT-PGK-gb2-neo- FRT	sense	59	CAC TAC TGT CGT TAA TGG CGG TCT GTT GCG ATT TCG CCC GTT GTA TGG CGA ATT AAC CCT CAC TAA AGG GCG
25.2	Sod_d00970 +FRT-PGK-gb2-neo- FRT	antisense	59	GCT ACT GCT CGA CGG CGG AAA AAT GCT GGC TTT CGG CCC GAC GTC ACA GGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCT C
28.1	Sod_d00970	sense	61	GTC GTT AAT GGC GGT CTG GTT
28.2	Sod_d00970	antisense	61	CGC TGC TAA TGC TCA CTC TG
34.2	Sod_d00970	antisense	65	CTG CCG CAG GAT ATT GAA CT
33.1	FRT-PGK-gb2-neo- FRT	sense	65	CGA GAC TAG TGA GAC GTG CTA C
33.2	FRT-PGK-gb2-neo- FRT	antisense	65	TAT CAG GAC ATA GCG TTG GCT ACC

2.2 Nährmedien und Anzucht der Organismen

2.2.1 Nährmedien für Bakterien

Nährbouillon II (NBII - Medium, SIFIN)			
Caseinpepton		3,5	g
Fleischpepton		2,5	g
Gelatinepepton		2,5	g
Hefeextrakt		1,5	g
NaCl		5	g
dH ₂ O	ad	1000	ml
pH 7,2 ± 0,2			

Luria-Bertani (LB – Medium)			
Bactotrypton		10	g
Hefeextrakt		5	g
NaCl		10	g
dH ₂ O	ad	1000	ml
pH 7,0 (NaOH)			
SOC - Medium			
Bactotrypton		20	g
Hefeextrakt		5	g
NaCl		0,58	g
KCl		0,18	g
pH 7,0 (NaOH)			
dH ₂ O		975	ml
MgCl ₂ (2 M)		5	ml
Glucose (1 M)		20	ml
100 x SSE – Ionenlösung (Angle et al., 1991)			
MgCl ₂ x 6 H ₂ O		19	g
NH ₄ NO ₃		20	g
KH ₂ PO ₄		2	g
dH ₂ O	ad	1000	ml
SSE - Medium			
L(+)-Arabinose		1	g
CaSO ₄ x 2H ₂ O		0,64	g
SSE-Ionenlösung		10	ml
dH ₂ O		985	ml
pH 10 (KOH 1: NaOH 8)			
HEPES Puffersubstanz		1,19	g
EDDHA ferric		4,35	mg
10 x Salze für Minimal - Medien (Davis und Mingioli, 1950)			
K ₂ HPO ₄		70	g
KH ₂ PO ₄		30	g
Natriumcitrat		5	g
MgSO ₄		1	g
(NH ₄) ₂ SO ₄		10	g
dH ₂ O	ad	1000	ml
Minimal - Medien			
Salze für Minimal - Medien		100	ml
je Aminosäure in Kombination		20	mM
oder			
je Aminosäure im Einzelnen		55	mM
oder			
je organische Säure, Glucose, Pyruvat oder Acetat in Kombination oder im Einzelnen		55	mM

dH ₂ O	ad	1000	ml
-------------------	----	------	----

Das Soil - Solution - Äquivalent Medium (SSE - Medium) als auch die Minimal - Medien wurden sterilfiltriert eingesetzt. Das Minimal - Medium wurde entweder mit einer Kombination aus Aminosäuren (20 mM je Aminosäure, Roth, Karlsruhe, Deutschland) oder mit Einzelsubstanzen (55 mM je organischer Säure, Glucose, Pyruvat, Acetat, oder Aminosäure) versetzt. Bei Verwendung von organischen Säuren oder Acetat wurde der pH - Wert mit NaOH auf pH 6,2 eingestellt. Zusätzlich kamen [¹³C] - isotopenmarkierte Substrate zum Einsatz. Diese wurden von der Firma Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (MA, USA) bezogen und für die Fütterungsversuche im Verhältnis 20 % markiert zu 80 % unmarkiert verwendet.

Für die Herstellung von Festmedien wurden 15g/l Agar - Agar (Roth, Karlsruhe, Deutschland) zugesetzt. Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Medien bei 121 °C und 1 bar mindestens 21 min autoklaviert.

Medienzusätze

Die Lösungen wurden als Stammlösung angesetzt, sterilfiltriert und in Form von Aliquots bei -20 °C gelagert.

Antibiotikum	Endkonzentration	Firma
Tetracyclin	12 µg/ml	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kanamycin	10 µg/ml	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

2.2.2 Kultivierung der Bakterien

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in Form von Reinheitsausstrichen, Vor - und Hauptkulturen sowie ausplattierten Kulturen auf Festmedium. Langfristig wurden die Bakterien in Stammhaltung aufbewahrt.

Stammhaltung

Für die Stammhaltung wurden die Bakterien bis zur exponentiellen Phase in einer Vorkultur mit NB - oder LB - Medium angezogen. In einem Gemisch aus 500 µl Kultur und 500 µl entsprechendem Medium gemischt mit 50 % [v/v] Glycerin (Roth, Karlsruhe, Deutschland) konnten die Bakterien bei -70 °C gelagert werden. Ein Reinheitsaustrich der Langzeitkonserve auf entsprechendem Medium wurde bis zu 4 Wochen bei 4 °C gehalten.

Reinheitsausstrich

Aus einer Stammhaltung wurde mit einer ausgeglühten Impföse ein Reinheitsausstrich auf das jeweilige Festmedium ausgestrichen und bei 30 °C über Nacht inkubiert.

Anzucht in Vorkulturen

15 ml Sarstedt Röhren wurden mit 6 ml des jeweiligen Mediums unter sterilen Bedingungen gefüllt. Anschließend konnte das Medium mit einer Einzelkolonie eines Reinheitsausstriches unter zur Hilfenahme einer ausgeglühten Impföse inokuliert werden. Mit Ausnahme der *E. coli* Isolate wurden die Bakterien über Nacht bei 30 °C und 170 rpm angezogen. Wenn nicht anders vermerkt, wurden die *E. coli* Isolate bei 37 °C und 170 rpm kultiviert.

Anzucht in Hauptkulturen

100 ml jeweiliges Medium wurden in 500 ml Shikane Kolben überführt und mit 0,5 - 6 ml einer Vorkultur beimpft. Mit Ausnahme der *E. coli* Isolate wurden die Bakterien über Nacht bei 30 °C und 170 rpm kultiviert. Wenn nicht anders vermerkt, wurden die *E. coli* Isolate bei 37 °C und 170 rpm angezogen.

2.2.3 Nährmedien für Pflanzen

½ Murashige & Skoog Medium (1/2 MS-Medium, Murashige & Skoog 1962)			
Saccharose		10	g
Plant Agar (Duchefa)		8	g
dH ₂ O	ad	885	ml

Das vorläufige Medium wurde bei 121 °C und 1 bar mindestens 21 min autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca 50 °C wurden für 1 Liter Medium folgende Lösungen steril zugeführt.

Lösung A		50	ml
Lösung B		50	ml
Lösung C		2,5	ml
Lösung D		2,5	ml
Lösung E		6,25	ml
Lösung F		6,25	ml

Lösung A			
NH ₄ NO ₃		16,5	g
KNO ₃		19	g
CaCl ₂ *2H ₂ O		5,86	g
dd H ₂ O	ad	1000	ml

Lösung B			
MgSO ₄ *7H ₂ O		3,7	g
KH ₂ PO ₄		1,7	g
dd H ₂ O	ad	1000	ml

Lösung C			
H ₃ BO ₃		0,124	g
MnSO ₄ *H ₂ O		0,338	g
ZnSO ₄ *7H ₂ O		0,172	g
Stockpuffer		10	ml
dd H ₂ O	ad	100	ml

Stockpuffer Lösung C			
KJ		0,166	g
NaMoO ₄ *2H ₂ O		0,05	g
CuSO ₄ *5H ₂ O		0,005	g
CoCl ₂ *6H ₂ O		0,005	g
dd H ₂ O	ad	100	ml

Lösung D			
Na ₂ -EDTA		0,746	g
FeSO ₄ *7H ₂ O		0,557	g
dd H ₂ O	ad	100	ml

Lösung E			
Meso-Inositol		1	g
dd H ₂ O	ad	100	ml

Lösung F			
Glycin		0,04	g
Nicotinsäure		0,01	g
Vitamin B ₆		0,01	g
Vitamin B ₁		0,002	g
dd H ₂ O	ad	100	ml

Die Lösungen A - F wurden sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

2.2.4 Kultivierung der Pflanzen

Oberflächensterilisation der Samen

Für die Versuche wurden die Samen von *A. thaliana* wie folgt oberflächensterilisiert. Die in einen 1,5 ml Reaktionsgefäß überführten Samen wurden unter sterilen Bedingungen mit 1 ml 70 %igem [v/v] Ethanol versetzt, und 2 min intensiv in der Lösung geschüttelt. Nach Abpipettieren des

Überstandes wurden die Samen mit 1 ml 5 %iger [w/v] Ca-Hypochlorid-Lösung mit 0,005 % [v/v] Triton überdeckt. Das Reaktionsgefäß wurde 5 min stark geschüttelt und der Überstand abpipettiert. Als letzten Schritt wurden die Samen mit autoklaviertem dH₂O gespült.

Anzucht der Pflanzen auf Erde

Die Samen von *A. thaliana* wurden auf einem Erdgemisch aus 1/3 Vermikulit (Deutsche Vermiculite Dämmstoffe GmbH, Sprockhövel, Deutschland) und 2/3 Pflanzenerde bei 100 E m⁻² s⁻¹ (16 h / 8 h Tag / Nacht Rhythmus), 22 ± 2 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 ± 10 % bis zur Samenbildung angezogen. Die geernteten Samen konnten anschließend im Kühlschrank zur weiteren Verwendung aufbewahrt werden.

Anzucht der Pflanzen in Petrischalen

Die sterile Anzucht der Pflanzen erfolgte in Petrischalen mit ½ MS Medium. Dafür wurden die oberflächensterilisierten Samen auf dem Medium ausgelegt und bei 100 E m⁻² s⁻¹ (16 h / 8 h Tag / Nacht Rhythmus), 22 ± 2 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 ± 10 % kultiviert. Die Petrischalen wurden dabei entweder horizontal hingelegt oder vertikal hingestellt.

2.3 Bestimmung der physiologischen Parameter

2.3.1 Wachstumsbestimmung der Bakterien

Messung der optischen Dichte

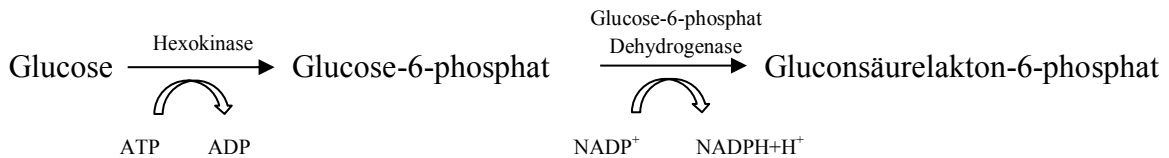
Die Gesamtzellzahl und das bakterielle Wachstum in den Flüssigkulturen wurde durch die Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm photometrisch gegen den entsprechenden Blindwert (nicht inokuliertes Nährmedium) dokumentiert (Ultraspex 2000, Pharmacia Biotech).

Bestimmung der Lebendzellzahl

Zusätzlich zu der optischen Dichte wurde die Lebendzellzahl einer Bakterienkultur ermittelt. Dafür wurden die Kulturen in 0,9 %iger [w/v] NaCl - Lösung verdünnt, auf Festmedium aufgetragen und für 24 h bei 30 °C kultiviert. Die Auswertung der Kolonie - Anzahl gab unter Berücksichtigung der verwendeten Verdünnungen Auskunft über das Wachstum der Kulturen.

2.3.2 Bestimmung der Glucose Konzentration

Die Konzentration an Glucose im Medium von Bakterienkulturen kann mit Hilfe eines spezifischen, optisch - enzymatischen Enzymtests nach Warburg nachgewiesen werden. Dabei wird, wie in folgender Reaktion dargestellt ist, die ATP - abhängige Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-phosphat mit anschließender Oxidation zu Gluconsäurelakton-6-phosphat genutzt:



Das entstehende zusätzliche Absorptionsmaximum von NADPH+H⁺ während der Oxidation verhält sich proportional zur Glucose Konzentration. Mit der Extinktion vor und nach Zugabe der Enzyme kann die Konzentration an Glucose mit der enzymatischen Reaktion berechnet werden. Dafür wurden 2 ml der zu untersuchenden Bakterienkultur entnommen, 2 min bei 11.000 rpm zentrifugiert und der Überstand für die Analyse entnommen. Folgender Reaktionsansatz wurde für die Analyse verwendet:

Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 940 µl)	
0,2 M Tris-HCl + 0,002 M MgSO ₄ (pH 7,6)	900 µl
NADP ⁺ (44 mg/ml) + ATP (96 mg/ml)	20 µl
Überstand der zu untersuchenden Probe	10 µl
Hexokinase/Glucose-6-phosphat Dehydrogenase Enzymmix	10 µl

Das Salzsäure - Magnesiumsulfat - Gemisch mit NADP⁺, ATP und dem Überstand der zu untersuchenden Probe wurden vermengt. Von diesem Gemisch erfolgte eine photometrische Blindwert - Bestimmung bei 340 nm. Mit Zugabe der Hexokinase und Glucose-6-phosphat Dehydrogenase wurde die Enzymreaktion gestartet. Das Gemisch inkubierte 5 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Extinktion erneut bei 340 nm ermittelt und die Glucose Konzentration nach folgender Formel berechnet:

$$c = \frac{\Delta A * V * MW}{d * v * \epsilon}$$

ΔA = Extinktion Leerwert – Extinktion des Reaktionsansatzes

V = Volumen des Reaktionsansatzes

v = Volumen der Probe

$d = \text{Schichtdicke der Küvette}$

$\varepsilon = \text{Extinktionskoeffizient für NADH (340 nm)} 6,3 \text{ l} * \text{mmol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$

$MW_{\text{Glucose}} = 180 \text{ mg/mmol}$

Die Abnahme der Glucose Konzentration im Medium einer Bakterienkultur konnte mit Bestimmung der Glucose Konzentration im Verlauf der Kultivierung und Zeit (0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 15 h, 20 h, 24 h, 48 h, 72 h) untersucht werden.

2.3.3 Bestimmung des pH-Wertes

Der pH-Wert von Flüssig - und Festmedien als auch Flüssigkulturen wurde mittels pH - Papier der Firma Macherey - Nagel (Düren, Deutschland) bestimmt.

2.3.4 Bestimmung der pflanzlichen Frischmasse

Für die Frischmasse - Bestimmung wurden die in den Petrischalen kultivierten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit einer Pinzette aus dem Agar entfernt. Im Anschluss wurden die Stängel und Blätter gepoolt und die Masse mit einer Feinwaage (Satorius, Göttingen, Deutschland) analysiert.

2.3.5 Bestimmung der Wurzellänge

Die Länge der Primärwurzel von *Arabidopsis thaliana* wurde mit einem Lineal von Stängelende bis zur Wurzelspitze gemessen.

2.4 Co - Kulturen - Testsystem

Der Einfluss bakterieller Volatile auf das Wachstum von *Arabidopsis thaliana* wurde in einem Co - Kulturen - Testsystem (Wenke et al., 2012 a) untersucht. In zweigeteilten Petrischalen wurde ein Kompartiment mit 15 ml Festmedium für die Bakterienkultivierung und das gegenüberliegende Kompartiment mit 15 ml $\frac{1}{2}$ MS Medium für die Pflanzenanzucht befüllt. Die Samen von *A. thaliana* wurden oberflächensterilisiert (siehe 2.2.4) und auf das aufgelockerte Pflanzenmedium entlang des Mittelsteiges der zweigeteilten Petrischale ausgelegt. Anschließend wurden die Samen in den mit Parafilm abgedichteten Petrischalen für 3 Tage bei 4 °C stratifiziert. Das Auskeimen der Samen erfolgte bei $100 \text{ E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (16 h / 8 h Tag / Nacht Rhythmus),

22 ± 2 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 ± 10 % für weitere 3 Tage. Nach der Keimung wurden die Keimlinge so selektiert, dass 10 subjektiv gleich wachsende Pflanzen über den gesamten Mittelsteg verteilt auf dem Agar verblieben. Parallel dazu wurde eine Vorkultur mit Bakterien in entsprechendem Medium angesetzt. Nach 24 h erfolgte eine Wachstumsbestimmung der Bakterien (siehe 2.3.1) und anschließend wurden 50 µl der Suspension, linienförmig entlang des Mittelsteges im zweiten Kompartiment, auf entsprechendes Medium der Bakterien aufgetragen. Somit beträgt das Alter der *Arabidopsis* Keimlinge sieben Tage zum Startpunkt der Co-Kultivierung. Die Auswertung erfolgte am Tag 10 der Co - Kultur mit einer fotografischen Dokumentation, Auswertung der pflanzlichen Frischmasse (siehe 2.3.4) und Bestimmung des pH - Wertes beider Medien (siehe 2.3.3) relativ zu Petrischalen mit Kontrollpflanzen ohne bakterielle Co - Kultivierung. Zur Bestimmung der Wurzellänge wurden die Petrischalen vertikal, mit dem Kompartiment der Bakterien nach oben, aufgestellt, um ein unbegrenztes Wachstum der Pflanzenwurzeln zu ermöglichen. Die Auswertung der Wurzellänge erfolgte an Tag 7 der Co - Kultur relativ zu den Kontrollpflanzen ohne bakterielle Co - Kultivierung.

2.5 Bestimmung von Ammoniak

Ammoniak (NH₃) kann mit Hilfe der Nessler - Reaktion nachgewiesen werden (Nessler, 1856). Während der Reaktion reagieren Ammoniak und Ammoniumverbindungen mit Kaliumtetraiodomercurat (II), so dass ein rot - brauner Farbkomplex, ein schwerlösliches Iodid des Kations der Millionschen Base, entsteht. Die Quantofix - Ammonium - Teststäbchen (Macherey - Nagel, Düren, Deutschland) können nach Hersteller Angaben semi - quantitativ Ammonium - Ionen in wässrigen Lösungen nachweisen. Das Stäbchen besitzt eine Reaktionsfläche von 0,5 x 0,5 cm, die 3,5 mg Kaliumtetraiodomercurat enthält. Die Reaktion wird mit Wasser gestartet und Natronlauge gestoppt.

2.5.1 Qualitativer Nachweis von Ammoniak

Analog dem Co - Kulturen - Testsystem wurden die Bakterien zur Analyse in Vorkulturen mit entsprechendem Medium angezogen und nach Wachstumsbestimmung linienförmig in einem Kompartiment einer zweigeteilten Petrischale auf Festmedium appliziert (siehe 2.4). Anstelle der Anzucht von *Arabidopsis thaliana* blieb das zweite Kompartiment bis zum Zeitpunkt der NH₃ - Analyse leer. Die Petrischalen wurden anschließend komparabel zum Co - Kulturen - Testsystem kultiviert. Zum Zeitpunkt der Analyse (nach 6 h, 12 h, Tag 1 - 10 alle 24 h) wurde mit einem Skalpell ein Schlitz in den Bereich der Petrischale geschnitten, der das leere Kompartiment

nach außen abgrenzt. Dieser Schlitz diente dem Einführen des Teststäbchens sowie einer Mikroliterspritze. Der Start der Nessler - Reaktion erfolgte durch das Tropfen von 10 µl H₂O auf das Teststäbchen. Nach 30 sec wurde die Reaktion mit 10 µl 28 %-iger [v/v] Natronlauge gestoppt. Der Farbumschlag wurde fotografisch dokumentiert und mit Hilfe einer ebenfalls fotografisch aufgezeichneten Eichreihe unterschiedlicher NH₃ - Konzentrationen (0,5 µmol, 1 µmol, 2,5 µmol, 5 µmol, 10 µmol, 50 µmol in 5ml H₂O) (Roth, Karlsruhe, Deutschland) quantifiziert.

2.6 Funktionelle Bioassays

2.6.1 Co - Kulturen - Testsystem mit Phosphorsäure

In dreigeteilten Petrischalen wurden in ein Kompartiment 10 ml des jeweiligen Bakterienmediums und in das zweite Kompartiment 10 ml ½ MS - Medium gefüllt. Das dritte Kompartiment blieb zunächst leer. *Arabidopsis thaliana* Samen wurden oberflächensterilisiert (siehe 2.2.4) und in 3 Reihen (von der Mitte der Petrischale zum Petrischalenrand) ausgelegt. Die Stratifikation wie auch das Auskeimen der Samen erfolgte analog der Präparation fürs Co - Kulturen Testsystem (siehe 2.4). Die Keimlinge wurden daraufhin subjektiv nach Vitalität und Größe selektiert, so dass in der ersten Reihe (zur Mitte der Petrischale) eine Pflanze, in der zweiten Reihe (folgend zum Petrischalenrand) drei und in der dritten Reihe fünf Pflanzen für den Versuch verwendet wurden. Parallel dazu wurde eine Vorkultur mit Bakterien in entsprechendem Medium angelegt (siehe 2.2.2). Anschließend an die Wachstumsbestimmung der Bakterienkultur (24 hpi, siehe 2.3.1) erfolgte die punktförmige Applikation von 50 µl der Suspension in der Mitte des Bakterienmedium enthaltenden Kompartimentes. Zusätzlich wurde in das dritte Kompartiment 5 ml 0,85 %-ige [v/v] Phosphorsäure gefüllt. Die Auswertung erfolgte mit einer fotografischen Dokumentation, Bestimmung der pflanzlichen Frischmasse (siehe 2.3.4) und Ermittlung des pH - Wertes beider Medien (siehe 2.3.3) nach 10 Tagen Co - Kultivierung.

2.6.2 Wachstum von *Arabidopsis thaliana* unter Einfluss von Ammoniaklösung

Entsprechend dem Co - Kulturen - Testsystem (siehe 2.4) wurden *A. thaliana* Samen oberflächensterilisiert, stratifiziert, kultiviert und selektiert. Um den Einfluss von Ammoniak auf das Wachstum der Pflanzen zu testen, blieb das zweite Kompartiment unbehandelt. Zum Zeitpunkt 0 wurde es mit 5 ml Ammoniaklösung (0,5 µmol; 1 µmol; 2,5 µmol; 5 µmol; 10 µmol, 50 µmol) gefüllt. 10 Tage später wurden die Petrischalen fotografisch dokumentiert, die pflanzliche Frischmasse bestimmt und der pH - Wert des Mediums (siehe 2.3.3) definiert.

2.6.3 Wachstum von *Arabidopsis thaliana* unter unterschiedlichen pH - Bedingungen

Arabidopsis thaliana Samen wurden analog zum Co - Kulturen - Testsystem (siehe 2.4) oberflächensterilisiert, auf $\frac{1}{2}$ MS Medium ausgelegt, stratifiziert und zum Auskeimen bei $100 \mu\text{m E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (16 h / 8 h Tag / Nacht Rhythmus), $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von $50 \pm 10 \%$ für weitere 3 Tage kultiviert. Abweichend wurden die Keimlinge zum Zeitpunkt 0 auf $\frac{1}{2}$ MS Medium mit einem durch NaOH justierten pH - Wert von pH 5 - 9 transferiert. Die Auswertung erfolgte 10 Tage später mit einer fotografischen Dokumentation, Bestimmung der pflanzlichen Frischmasse (siehe 2.3.4) und Überprüfung des pH - Wertes des Mediums (siehe 2.3.3).

2.7 Gaschromatographische - massenspektrometrische Analyse der organischen, flüchtigen Verbindungen

Das VOC - Profil der Bakterien wurde mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) analysiert.

2.7.1 Adsorption der flüchtigen Analyte mittels VOC-Sammelsystem und SPME

Die Adsorption der bakteriellen, organischen Volatile erfolgte zum einen mit einem VOC -Sammelsystem und zum anderen mit Hilfe der Festphasen - Mikroextraktion.

VOC - Sammelsystem

Das VOC - Sammelsystem nach Kai et al. (2010) wurde so modifiziert, dass zum einen sensitivere VOC -Profile erstellt werden konnten, und zum anderen die Anreicherung einzelner Volatile möglich war. Dafür wurde ein 500 ml Erlenmeyerkolben durch 2 Öffnungen an den Seiten erweitert. Des Weiteren wurde der Hals des Kolbens mit einem Schliff versehen, so dass der Erlenmeyerkolben mit einem, ebenfalls geschliffenen Glasstopfen verschlossen werden konnte (**Abb. 2-1**). In dem Erlenmeyerkolben befanden sich 100 ml des zu analysierenden Bakterienmediums. Ein konstanter Luftstrom wurde durch eine Membran-Pumpe mit einem Luftstrom von 0,5 l/min durch einen Aktivkohlefilter und einen Wattefilter in die obere seitliche Öffnung des Erlenmeyerkolbens gesogen. Die bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ in den Luftraum des Erlenmeyerkolbens emittierten volatilen Verbindungen des Mediums wurden über die untere seitliche Öffnung des Kolbens über eine Glassäule geleitet.

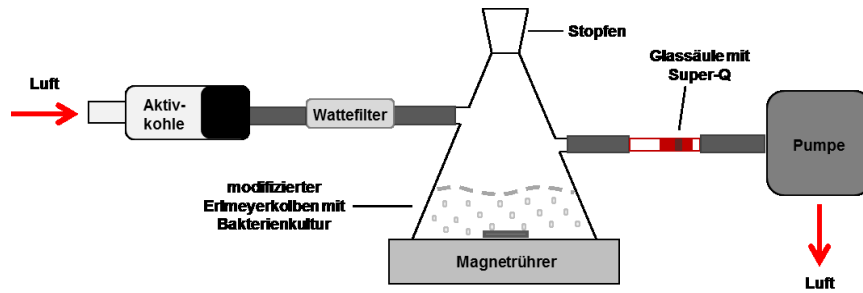


Abbildung 2-1: Modifiziertes VOC - Sammelsystem nach Kai et al. (2010).

Diese Glassäule war mit, in zwei Watteschichten eingelagertes SuperQ Material (50 mg, Alltech, Deerfield) gefüllt. SuperQ fungierte hierbei als Adsorptionsmatrix. Die Volatilen des Mediums wurden 24 h an dieser Säule gesammelt und anschließend erst mit 200 μ l und dann mit 100 μ l Dichlormethan (Roth, Karlsruhe, Deutschland) und Nonylacetat (5 ng / 10 μ l, Roth, Karlsruhe, Deutschland) als internen Standard mit Hilfe einer Saugkolben-Messpipette eluiert. Parallel dazu wurde eine bakterielle Vorkultur mit dem jeweiligen Medium angelegt (siehe 2.2.2). Mit Hilfe der optischen Dichte wurde das Medium im VOC - Sammelsystem mit einem definierten Volumen der Vorkultur angeimpft. Der Versuch startete mit einer konditionierten Säule und einer auf OD₆₀₀ von 0,005 eingestellten Bakteriensuspension (siehe 2.3.1). Die Rührung während der Analyse wurde durch einen Magnetprüher (MR Hei-Mix L, Heidolph) gewährleistet, der mit Hilfe eines Magneten im Erlenmeyerkolben die Kultur mit 250 rpm vermischte. Nach unterschiedlichen Zeitintervallen (24 - 96 h) wurden die adsorbierten Volatile erneut eluiert und das Bakterienwachstum mit der Zunahme der Lebendzellzahl definiert. Die im Eluat gelösten Verbindungen konnten anschließend in einem GC aufgetrennt und mit einem daran gekoppelten MS analysiert werden.

Festphasen - Mikroextraktion

Die Adsorption von bakteriellen Volatilen mittels Festphasen - Mikroextraktion (*solid phase micro extraction*, SPME) erfolgte im Luftraum eines Untersuchungsgefäßes an einer mit Polydimethylsiloxan (100 μ m, PDMS;) beschichteten Faser (Supelco, Bellefonte, PA). Das Untersuchungsgefäß, ein steriler 500 ml Schikanekolben, wurde mit 100 ml des jeweiligen Bakterienmediums befüllt. Zum Start der Versuche wurde das Bakterienmedium auf eine OD₆₀₀ von 0,005 inokuliert. In 24 h Intervallen wurden 5 ml der Kultur entnommen und in ein Glasreagenzröhrchen mit Schraubverschluss (13 ml, 10 x 1,5 cm, Schott) überführt. In dem Schraubdeckel wurde ein Loch (1 mm Durchmesser) eingearbeitet, welches der Einführung der Mikroliterspritze und der zuvor konditionierten SPME - Faser diente (Tabelle 2.5). Mit der Mikroliterspritze wurde Nonylacetat (10 ng / 5 μ l bzw. 20 ng / 5 μ l) als interner Standard auf die

zu untersuchende Suspension gegeben. Die in den Luftraum des Glasreagenzröhrchens emittierten Volatile der Bakterien wurden innerhalb einer Stunde Inkubation bei 30 °C an die PDMS - Faser gebunden. Zusätzlich wurde das Wachstum der Bakterien mit Zunahme der Lebendzellzahl (siehe 2.3.1) bestimmt. Die extrahierten Volatile wurden unmittelbar nach Inkubation mittels GC/MS-Technik thermisch desorbiert und analysiert.

2.7.2 GC/MS - Analyse

Im Anschluss an die Extraktion aus dem Luftraum der bakteriellen Kulturen wurden die Volatile mit dem Gaschromatographen - Massenspektrometer QP 5000 von Shimadzu (Duisburg, Deutschland) analysiert. Über den Injektor und einer Glaskapillare gelangten die verdampften Analyten mit Helium als Trägergas und mobile Phase auf eine 60 m lange Quarzglas - Kapillarsäule, die mit (Diphenyl) (Dimethyl)polysiloxan und einem 5 %igen Phenylgruppenanteil (DB05) als stationäre Phase verkleidet war. Die aufgetrennten Verbindungen wurden anschließend im Massenspektrometer durch Elektronenionisation (EI) ionisiert. Die Selektion der entstandenen Fragmente nach ihrem Masse/Ladungs - Verhältnis erfolgte in einem Quadrupol-Massenanalysator. Die detektierten Massen wurden mit der Software Lab-Solution (Shimadzu, Duisburg, Deutschland) digitalisiert und ausgewertet.

VOC - Sammelsystem

Die Flüssiginjektion eines Eluates erfolgte durch den Autosampler des GC/MS - Gerätes. 1 µl wurde automatisch in den Injektor injiziert und mit den in Tabelle 2-5 aufgelisteten Parametern analysiert.

Tabelle 2-5: verwendete Parameter zur Analyse eines Eluates des VOC - Sammelsystems

Funktion	Analyse
Sampling Time	2 min
Injection Temperature	200 °C
Interface Temperature	300 °C
Control Mode	ohne Split (1 µl Injektion)
Column Inlet Pressure	123, 1 kPa
Column Flow	1,1 ml/min
Linear Velocity	27,2 cm/sek
Split Ratio	10
Total Flow	16,1 ml/min
Temperature Program	35 °C 2 min halten, mit 10 °C/min bis 280 °C, halten 15 min
Program Zeit	41,50 min
Aquisition Mode	Scan 41-280 m/z
Detector Voltage	1,3 kV

Trashhold	1000
Intervall	0,5 sec
Solvetn Cut Time	7,5 min

Festphasen - Mikroextraktion

Mit Hilfe eines manuellen SPME - Halters wurde die SPME - Faser vor jeder Analyse 1 h bei 250 °C Injektionstemperatur konditioniert. Die im Injektor desorbierten Substanzen wurden durch ein kurzes Reinigungsprogramm entfernt (**Tabelle 2-6: Konditionierung**). Die Konditionierung wurde vor jeder VOC-Sammlung anhand einer Blindmessung geprüft (Parameter Analyse, Tabelle 2-6). Im Anschluss erfolgte die Inkubation der SPME - Faser im Luftraum der zu untersuchenden Probe. Unmittelbar nach der Inkubation wurden die adsorbierten Analyte im Injektor des GC thermisch desorbiert und folgend analysiert (Parameter Analyse, **Tabelle 2-6**).

Tabelle 2-6: verwendete Parameter zur Analyse flüchtiger Verbindungen mittels SPME - HS - GC/MS

Funktion	Konditionierung	Analyse
Sampling Time	-	5 min
Injection Temperature	250 °C	250 °C
Interface Temperature	300 °C	300 °C
Control Mode	ohne Split	ohne Split
Column Inlet Pressure	123, 1 kPa	123, 1 kPa
Column Flow	1,1 ml/min	1,1 ml/min
Linear Velocity	27,2 cm/sek	27,2 cm/sek
Split Ratio	10	10
Total Flow	60 ml/min	16 ml/min
Temperature Program	35 °C 5 min halten, mit 15 °C/min bis 280 °C, halten 15 min	35 °C 5 min halten, mit 10 °C/min bis 280 °C, halten 15 min
Programm Time	21,33 min	44,50 min
Aquisition Mode	-	Scan 41-280 m/z
Detector Voltage	-	1,3 kV
Treshold	1000	1000
Intervall	0,5 sek	0,5 sek
Solvent Cut time	-	7,5 min

2.7.3 Bestimmung der flüchtigen Analyte

Die qualitative und quantitative Auswertung der mittels GC/MS aufgenommenen Daten erfolgte mit der Software „Lab Solution“ von Shimadzu.

Identifizierung

Für die Identifikation der Verbindungen wurden mehrere Kriterien berücksichtigt. Zum einen wurden die Ähnlichkeiten der einzelnen EI-Massenspektren mit den in der Spektralbibliothek NIST107 aufgeführten EI-Massenspektren geprüft. Anschließend erfolgte die Berechnung der Retentionsindices (RI) und der Vergleich mit Retentionsindices aus freizugänglichen Datenbanken (Pherobase, Pubchem).

$$RI = 100m + 100 \frac{\log t_x - \log t_N}{\log t_M - \log t_N}$$

m = Anzahl der C – Atome des größeren Alkans

t = Retentionszeit

x = zu untersuchender Peak

N = größeres Alkan

M = kleineres Alkan

Bestätigt wurden die Ergebnisse durch die Analysen der Massenspektren und Retentionsindices von Referenzsubstanzen. Diese wurden zum Teil käuflich erworben (Sigma, Roth) oder synthetisiert (Wittko Francke, Universität Hamburg, Deutschland).

Qualitative Analyse

Für die qualitative Analyse wurden sowohl die Peaks nicht berücksichtigt, die im Medium oder der Blindmessung (siehe 2.7.2) detektiert wurden, als auch Peaks deren Intensität/Peakfläche unter TIC 10.000 aufwies.

Quantitative Analyse

Ausgewählte Daten der SPME - HS - GC/MS Analyse wurden semi-quantitativ analysiert. Dafür wurde die Verbindung von Interesse mit dem mitgeführten Standard (Nonylacetat) normalisiert und relativ zu einem definierten Bezugswert berechnet.

2.8 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.8.1 Isolierung chromosomaler DNA aus Bakterien

Die Isolation chromosomaler DNA aus Bakterien erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin® Tissue-Kits der Firma Macherey - Nagel (Düren, Deutschland). Die Durchführung erfolgte nach den beigefügten Herstellerangaben für Bakterien.

2.8.2 Isolierung von Plasmiden

Mehrere Protokolle der Plasmid - Isolation wurden für *E. coli* und verschiedene *Serratia*-Spezies angewendet. Allen gemein ist die Anzucht der Bakterien in Vorkulturen mit LB - oder NBII - Medium (siehe 2.2.2).

Plasmid-Minipräparation aus *E. coli* und *Serratia* sp.

1. Zentrifugation von 2 ml einer Vorkultur (3000 x g, 10 min, 4 °C)
2. Suspension des Zellpellets in 0,3 ml Puffer PMini 1
3. Zugabe von 0,3 ml Puffer PMini 2, Mischen durch mehrmaliges invertieren und Inkubation für 5 min bei RT
4. Zugabe von 0,3 ml Puffer PMini 3, Mischen durch mehrmaliges invertieren
5. Zentrifugation (16000 x g, 20 min, 4 °C)
6. Zentrifugation des Überstandes (16000 x g, 10 min, 4 °C)
7. Zugabe von 0,8 Vol. Isopropanol zu dem Überstand, Zentrifugation (16000 x g, 30 min, 4 °C)
8. Waschen mit 0,5 ml eiskaltem Ethanol (80 % [v/v], reinst)
9. Trocknen des Pellets bei RT
10. Resuspension des Pellets in 10 µl H₂O_{dest.}

Puffer PMini 1

Tris-HCl	50	mM
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	10	mM
RNase A (10 mg/ml)	100	µg/ml
pH 8,0; Lagerung bei 4 °C		

Puffer PMini 2

SDS (10 % [w/v])	1	% [v/v]
NaOH (10 M)	200	mM
Lagerung bei RT		

Puffer PMini 3

K-Acetat	3	M
pH 5,5 (Eisessig)		

Plasmid - Minipräparation aus *E. coli* und *Serratia* sp. mittels KIT

Die Isolation von *low* als auch *high copy* Plasmiden aus *E. coli* und *Serratia* sp. mittels NucleoSpin® Plasmid - Kit der Firma Macherey - Nagel (Düren, Deutschland) erfolgte nach Protokoll des Herstellers für Gram - negative Bakterien. Ein wesentlicher Bestandteil des Protokolls ist die Methodik der alkalischen Lyse und das Binden der Plasmid - DNA an einer Säule mit einer Silika Membran.

Plasmid - Midipräparation von *E. coli* und *Serratia* sp. mittels KIT

Für größere Konzentrationen an Plasmid - DNA als auch größeren *high* und *low copy* Plasmiden (≤ 300 kbp) wurde das NucleoBond® Xtra Midi Kit der Firma Macherey - Nagel (Düren, Deutschland) herangezogen. Es beruht auf dem Prinzip der NaOH/SDS Lyse. Für die Anwendung wurden die Bakterien zunächst in einer Vorkultur und anschließend in einer Hauptkultur (siehe 2.2.2) mit 300 ml Kulturvolumen angezogen. Die weitere Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

2.8.3 PCR - Techniken

Spezifische Fragmente genomischer DNA als auch Plasmid DNA wurden mit der Polymerase - Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) amplifiziert. Dafür wurden die PCR-Maschinen von Biometra (Göttingen, Deutschland) und Hybaid (Ulm, Deutschland) verwendet. Die *Annealing* Temperatur (x) richtete sich nach den eingesetzten Primern (siehe Tabelle 2.3). Wenn nicht anders vermerkt, richtete sich die Elongationszeit (y) nach der erwarteten Amplifikat Größe (für 1 kb 1 min).

Standard PCR

Für die Standard PCR wurde isolierte DNA (siehe 2.9.1) oder Plasmid - DNA (siehe 2.9.2) als *Template* verwendet. Weiterhin kam die *High Fidelity* Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) für lange Amplifikate (> 3 kb) zur Anwendung. Folgende PCR-Ansätze und PCR-Programme wurden damit durchgeführt:

PCR Ansatz für die *High Fidelity* Polymerase

<i>Template</i>	2,5	µl
HF - Puffer mit MgCl ₂ (1,5 mM)	5	µl
dNTPs (10 mM) Fermentas	1	µl
Forward Primer (10 pmol/µl)	2	µl
Reverse Primer (10 pmol/µl)	2	µl
<i>High Fidelity</i> Polymerase (2,5 U/µl)	0,5	µl
H ₂ O	37	µl

PCR Programm für die *High Fidelity* Polymerase

Denaturierung	2 min	94 °C	} 10 Zyklen
Denaturierung	15 sek	94 °C	
<i>Annealing</i>	30 sek	x	
Elongation	y	68 °C	} 20 Zyklen
Denaturierung	15 sek	94 °C	
<i>Annealing</i>	30 sek	x	
	3 min + 5 sek pro Zyklus	68 °C	
Elongation	7 min	68 °C	
Elongation	∞	10 °C	

Kolonie PCR

Eine Bakterienkolonie wurde in 50 µl dH₂O aufgenommen, 8 min bei 90 °C erhitzt und 3 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 30 µl dH₂O resuspendiert. Für die Reaktion wurde die Taq – Polymerase I (überexprimiert, Abteilung Biochemie, Universität Rostock) benutzt und im folgenden Ansatz und PCR - Programm mit *Template* aus einer Kolonie verwendet:

Kolonie PCR Ansatz

<i>Template</i>	2,5	µl
PCR - Puffer ohne MgCl ₂ (10 x, Fermentas)	5	µl
MgCl ₂ (25 mM)	3	µl
dNTPs (10 mM) Fermentas	1	µl
Forward Primer (10 pmol/µl)	2	µl
Reverse Primer (10 pmol/µl)	2	µl
Taq-Polymerase I	1	µl
H ₂ O	33,5	µl

PCR Programm

Denaturierung	2 min	94 °C	} 30 Zyklen
Denaturierung	30 sek	94 °C	
<i>Annealing</i>	x	y	
Elongation	1 min	72 °C	} 30 Zyklen
Elongation	7 min	72 °C	
	∞	10 °C	

Mutagenese PCR

Die Mutagenese PCR erfolgte mit Plasmid DNA und einer F-530S Phusion® - Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) mit 3'→5' - *proofreading* - Exonukleaseaktivität. Folgender PCR –Ansatz wurde mit folgendem PCR – Programm angewendet:

PCR Ansatz für die Phusion® Polymerase			
<i>Template</i>		1	µl
Pfu - Puffer (5 x)		10	µl
dNTPs (10 mM) Fermentas		1	µl
Forward Primer (10 pmol/µl)		1	µl
Reverse Primer (10 pmol/µl)		1	µl
Phusion® DNA-Polymerase F-530S (2 U/µl)		1,5	µl
H ₂ O		34,5	µl

PCR Programm für die Phusion® Polymerase			
Denaturierung	30 sek	98 °C	} 30 Zyklen
Denaturierung	10 sek	98 °C	
<i>Annealing</i>	30 sek	x	
Elongation	90 sek	72 °C	
Elongation	10 min	72 °C	
	∞	10 °C	

2.8.4 Trennung von Nukleinsäuren

Die Trennung von DNA erfolgte mit der horizontalen Agarosegelelektrophorese in Agargel - Minikammer (Biostep, Jahnstorf, Deutschland). Dabei wird das Prinzip der Wanderung von geladenen Teilchen im elektrischen Feld genutzt. Die Wanderung richtet sich nach der Größe der geladenen DNA -Fragmente, der Stromstärke und Agarosekonzentration. 1 %ige [w/v] Agarose (Duchefa, Haarlem, Niederlande) wurde mit 1 x TAE - Puffer versetzt und in der Mikrowelle bis zur Lösung erhitzt. Nach Abkühlen erfolgte die Zugabe von 0,005 % [v/v] Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe, Deutschland). Die DNA - Proben wurden zur Visualisierung mit 0,2 Vol. Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels eingefüllt. Zusätzlich wurde zur Größenbestimmung ein Marker (Gene Ruler™, 1 kb DNA Ladder, 0,5 µg/µl, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) mitgeführt. In der Agarosegel-Kammer mit 1 x TAE Lauf - Puffer erfolgte die Auftrennung bei 60 - 70 V und 40 - 90 min. In der Photodokumentationsanlage konnte die DNA unter UV - Licht visualisiert werden.

50 x TAE - Puffer		
Tris-HCl	2	M
NaAc	1	M
EDTA	0,005	M
pH 8,0		
6 x Ladepuffer		
50 x TAE - Puffer	2,4	ml
Glycerin	12	ml
ddH ₂ O	5,6	ml
Bromphenolblau	2	Zahnstocherspitze
Xylencyanol	1	Zahnstocherspitze
Orange G	1	Zahnstocherspitze

2.8.5 Reinigung von Nukleinsäuren

Für die Aufreinigung oder Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarosegelen wurde das NucleoSpin® Gel und PCR Aufreinigungskit der Firma Macherey - Nagel (Düren, Deutschland) verwendet. Das Protokoll wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.9 DNA-Transfer in *Serratia*-Spezies

Bakterielle Zellen sind in der Lage unter definierten Bedingungen unterschiedliche Formen der DNA (Plasmide, linearisierte DNA) aufzunehmen. Diese Eigenschaft kann mit unterschiedlichen Methoden (chemische Transformation, Elektrotransformation) unterstützt werden.

2.9.1 Herstellung elektrokompetenter *Serratia plymuthica*-Zellen

Für den DNA - Transfer mittels Elektroporation wurden die bakteriellen Zellen von *Serratia plymuthica* 4Rx13 nach unterschiedlichen Protokollen vorbereitet. Beiden Durchführungen gemein sind das Ansetzen einer Vorkultur in LB - Medium unter Berücksichtigung einer Verwendung von Antibiotika (siehe 2.2.2).

Herstellung elektrokompetenter Zellen nach dem Quick & Easy *E.coli* Gene Deletion Kit (Gene Bridges)

Diese Methode bereitet in kurzer Zeit und in kleinen Volumina die Zellen auf die direkt anschließende Elektroporation vor.

1. Transfer von 40 μ l der Vorkultur zu 1,4 ml frisches Medium (gegebenenfalls mit Antibiotikum)
2. Inkubation bei 30 °C oder 37 °C und \sim 1000 rpm bis $OD_{600} \sim 0,3$
3. Zentrifugation für 20 sek, 11.000 rpm und 4 °C
4. Suspension durch Auf- und Abpipettieren des Zellpellets in 1 ml eisgekühltem ddH₂O
5. Zentrifugation für 20 sek, 11.000 rpm und 4 °C
6. Suspension durch Auf- und Abpipettieren des Zellpellets in 1 ml eisgekühltem ddH₂O
7. Zentrifugation für 20 sek, 11.000 rpm und 4 °C
8. Resuspension des Zellpellets in 30 μ l eisgekühltem ddH₂O
9. Lagerung auf Eis

Herstellung elektrokompenter Zellen nach Untergasser (2008), mod.

Dieses Protokoll bereitet große Bakterienvolumina auf die Elektroporation vor, die bei - 70 °C gelagert werden können und eignet sich vor allem für den nachfolgende Transfer großer Plasmide (> 15 kb).

1. Animpfen einer Hauptkultur (300 ml) mit LB - Medium ohne Antibiotika
2. Inkubation bei 30 °C oder 37 °C, 170 rpm bis OD_{600} 0,4 - 0,5
3. Inkubation der Kultur auf Eis für 15 min
4. Verteilung der Kultur auf 6 x 50 ml vorgekühlte Sarstedt - Röhren
5. Zentrifugation für 20 min, bei 3500 g und 4 °C
6. Resuspension der Pellets mit 40 ml eisgekühltem ddH₂O
7. Zentrifugation für 20 min, bei 5000 g und 4 °C
8. Resuspension der Pellets mit 40 ml eisgekühltem ddH₂O
9. Zentrifugation für 20 min, bei 5000 g und 4 °C
10. Resuspension der Pellets in 5 ml eisgekühlter 8,7 % iger [v/v] Glycerollösung
11. Poolen von 2 Sarstedt - Röhren und Vermengen mit 35 ml Glycerollösung
12. Zentrifugation für 20 min, bei 5000 g und 4 °C
13. Resuspension in 2 ml Glycerollösung
14. Aliquotieren von 40 μ l
15. Lagerung bis zur Verwendung bei - 70 °C

2.9.2 Elektroporation

Bakterielle Zellen werden durch das Anlegen eines elektrischen Feldes dazu angeregt Fremd - DNA aufzunehmen (Dower et al., 1988). Dafür wurden die vorbereiteten Zellen auf Eis aufgetaut und 39,5 μ l in ein vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 0,5 μ l zu transferierender

DNA auf Eis vermengt. Diese Suspension wurde anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit 0,2 cm Elektrodenabstand (Paqlab, Erlangen, Deutschland) überführt. Als Kontrolle dienten Suspensionen ohne zu transferierende DNA. Die Elektroporation erfolgte mit dem GenePulser™II (Bio-Rad Laboratories, München). Dabei wurden eine Spannung von 1350 V und/oder 2500 V, ein Widerstand von 200 Ω und/oder 600 Ω und eine Kapazität von 25 μ F gewählt. Die Suspension wurde danach in 500 μ l vorgewärmtes SOC - Medium aufgenommen und 4 h bei 30 °C bzw. 37 °C und 1000 rpm inkubiert. Anschließend wurden 50 μ l und 100 μ l der Kultur auf LB - Medium mit Antibiotikum ausplattiert und bei 30 °C bzw. 37 °C inkubiert.

2.10 Ortsspezifische Mutagenese nach dem „Quick & Easy E. coli Gene Deletion Kit“ (Gene Bridges), mod.

Für das gezielte Ausschalten ausgewählter Gene wurde das *Quick & Easy E. coli Gene Deletion Kit* der Firma Gene Bridges (Heidelberg, Deutschland) erstmalig für *Serratia plymuthica* 4Rx13 angewendet und modifiziert. Das Produkt eines Gens wird dabei durch die gezielte Insertion einer Antibiotika Resistenzkassette mittels homologer Rekombination verändert. Dieser knock - out führt zum Funktionsverlust des zu untersuchenden Gens. Das Kit macht sich dabei das Red/ET System (Zhang et al., 1998) zur Nutze, wobei 2 Hilfsplasmide (pRed/ET und pFRT) dabei Anwendung fanden. *S. plymuthica* 4Rx13 Zellen wurden zunächst für einen DNA - Transfer vorbereitet (siehe 2.9.1) und anschließend mit pRed/ET elektroporiert (siehe 2.9.2). Auf dem Plasmid pRed/ET codieren verschiedene Rec und Red Proteine unter denen das Protein RepA temperatursensitiv ist. Deshalb erfolgte nach der Elektroporation jeder Inkubationsschritt bei 30 °C. Potentielle Klone wurden mit pRed/ET spezifischen und *S. plymuthica* 4Rx13 spezifischen Primern (siehe Tabelle 2.3) mittels Kolonie-PCR (siehe 2.8.3) überprüft. Parallel dazu wurde mit individuell entwickelten Primern und dem Hilfsplasmid pFRT als *Template* eine Mutagenese PCR (siehe 2.8.3) durchgeführt. Der Forward Primer besitzt 50 Nukleotide am 5`- Ende, die homolog zu einem ausgewählten Bereich des Zielgens sind. Es folgen 22 Nukleotide am 3`- Ende, die spezifisch für die FRT-PGK-gb2-neo-FRT Kassette des Hilfsplasmids pFRT sind. Diese Kassette codiert für eine Neomycin Resistenz mit einer Kreuzreaktion für eine Kanamycin Resistenz. Der Reverse Primer setzt sich ebenfalls aus 50 homologen Nukleotiden des Zielgens am 3`-Ende und 23 spezifischen Nukleotiden der Resistenz Kassette am 5`- Ende zusammen. Die PCR Reaktion erfolgte mit der Phusion® Polymerase (siehe 2.8.3). Das amplifizierte Produkt wurde anschließend mittels Gelelektrophorese (siehe 2.8.4) sichtbar gemacht, aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert (siehe 2.8.5). *S. plymuthica* 4Rx13 Zellen mit pRed/ET wurden für

eine weitere Elektroporation vorbereitet (siehe 2.9.1). Während der Anzucht der Zellen wurde die Expression der Proteine, die auf pRed/ET kodieren bei unterschiedlichen optischen Dichten (siehe 2.2.2, OD₆₀₀ 0,1 - 0,3) mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,3 % – 0,8 %) an L-Arabinose (Roth, Karlsruhe, Deutschland) induziert. Daraufhin erfolgte die weitere Inkubation bei 37 °C bis OD₆₀₀ 0,3 - 0,62. Nach Vorbereitung der Zellen wurden die Zellen mit dem linearen, aufgereinigten PCR - Amplifikat mit der FRT-gb2-neo-FRT Kasette und den homologen Bereichen zum Zielgen elektroporiert (siehe 2.9.2). Die Homologe Rekombination erfolgte während 4 - 5 h Inkubation bei 37 °C und 1000 rpm. Nach Selektion auf Kanamycin haltigem Medium, wurden potentielle Mutanten mittels Kolonie - PCR (siehe 2.8.3) verifiziert.

2.11 Genom-Analyse von *Serratia plymuthica* 4Rx13

Die Sequenzierung von *Serratia plymuthica* 4Rx13 erfolgte mit dem Roche 454-FLX-System (Roche 454 Life Science, Mannheim, Deutschland) in Kooperation mit dem Göttinger Labor für Genom-Analyse (Göttingen, Deutschland). Mit zwei Viertel Spuren eines Sequenzierlaufes wurden 274'102 Einzelreads mit insgesamt 93,8 Mb erzeugt. Die Assemblierung der Daten erfolgte mit der Software Newbler Assembler und ergab 41 Contigs (>500 bp). Parallel dazu wurde eine Fosmid-Bank mit einer Insertgröße von ca. 35 kb angelegt und dessen Enden der Klone mittels Sanger-Technologie ansequenziert. Diese wurden mit Pregap prozessiert und in Gap4 (Stadenpackage, Bonfield et al. 1995) auf die vorhandenen 454 Contigs gejoint. Durch die aufeinander verweisenden Reads der Fosmidsequenzen konnte eine Reihenfolge der Contigs erstellt werden. Der Lückenschluss erfolgte mittels PCR basierenden Techniken (*primer walking* und kombinatorische PCR's) und anschließender Sanger-Sequenzierung der resultierenden Produkte. Das geschlossene Genom ist 5,362674 Megabasen groß und besteht aus einem Chromosom und Plasmid. Es besitzt einen G/C-Gehalt von 56,16 %. Mit Hilfe der Software YACOP wurden die offenen Leserahmen (*open reading frame* - ORF) vorhergesagt. Diese wurden mit der Software ERGO (Heiko Liesegang, G2L Göttingen, Deutschland) initial automatisch annotiert. Diese Analysen ergaben 4876 funktionelle ORF's.

3. Ergebnisse

Bakterien produzieren eine Vielzahl an Sekundärmetaboliten, die in flüchtige und nicht flüchtige Verbindungen eingeteilt werden können. Die Vielfalt und Eigenschaften der flüchtigen Substanzen sind bisher wenig erforscht. So sind von den ca. 10^7 - 10^9 Bakterien-Genera (Curtis et al. 2002, Dykhuizen 1998) bisher erst etwa 300 Mikroorganismen als Produzenten von ca. 800 Volatilen dokumentiert worden (Effmert et al. 2012). Vor allem die Bakteriengattung *Serratia* und dessen neuartiges Volatil Sodorifen rückten in den Fokus der Wissenschaft. Ziel der Arbeit war es einerseits Hinweise zur Biosynthese dieses ungewöhnlichen Naturstoffs Sodorifen zu erhalten (3.1) und andererseits den Einfluss bakterieller Volatile auf *Arabidopsis thaliana* zu untersuchen (3.2).

3.1. Analysen zur Biosynthese von Sodorifen

Bereits 1985 beschrieben Grimont et al. die Gattung *Serratia* 1985 als Produzenten flüchtiger Verbindungen. Detaillierte Analysen von *Serratia odorifera* 4Rx13 ergaben weiterhin ein umfangreiches Spektrum an Volatilen (Kai et al. 2010). Zu dem komplexen Profil zählen organische Verbindungen mit zahlreichen schwefelhaltigen Substanzen (Methanthiol, Dimethyldisulfid, Dimethyltrisulfid), Alkoholen (Methanol, Ethanol, 2-Phenylethanol), putativen Terpenen (Ocimen, Terpeneol) sowie anorganische Verbindungen mit Kohlenstoffdioxid und Ammoniak. Weiterhin konnte die Emission von Ethylen, Blausäure und Stickstoffmonoxid ausgeschlossen werden (Kai et al. 2010). Auffällig zeichnete sich in dem Profil flüchtiger Verbindungen eine dominante Hauptkomponente ab. Dabei handelt es sich um eine neuartige Verbindung mit dem Namen Sodorifen. Dessen einzigartige Struktur ($C_{16}H_{28}$) wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Wittko Francke (Universität Hamburg, Deutschland) aufgeklärt und mittels Synthese verifiziert (von Reuß et al. 2010). Die Verteilung der Emission dieser ungewöhnlichen organischen Verbindung innerhalb der Bakteriengattung *Serratia*, die zugrunde liegende Biosynthese als auch deren Funktion sind jedoch unbekannt.

3.1.1 Verteilung der Sodorifen-Emission innerhalb der Gattung *Serratia*

3.1.1.1 Emission volatiler Verbindungen verschiedener *Serratia*-Spezies

Die Emission volatiler Verbindungen verschiedener *Serratia*-Spezies wurde auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede hin detailliert untersucht. Unter gleichen Wachstumsbedingungen wurden *S. plymuthica* AS9 (Neupane et al. 2012), *S. proteamaculans* 568 (Taghavi et al. 2009),

S. odorifera DSM 4582 (Grimont et al. 1978) und *S. marcescens* Db11 (Flyg et al. 1980) im VOC-Sammelsystem analysiert, die Chromatogramme ausgewertet und mit dem Profil von *S. odorifera* 4Rx13 verglichen. Die Emission der Volatile wurde für unterschiedliche Wachstumsintervalle untersucht. Kai et al. (2010) zeigten, dass *Serratia odorifera* 4Rx13 mit kurzer lag-Phase in die exponentielle Phase übergeht und nach ca. 12 h in die stationäre Phase eintritt. Im Zeitintervall 24 - 48 h befinden sich die Zellen dann in der späten stationären Phase. Die Wachstumskurven der fünf untersuchten Spezies weisen mit Hilfe der untersuchten Zeitpunkte einen annähernd gleichen Wachstumsverlauf mit vergleichbaren Zellzahlen auf (**Abb. 3-1 F**). Dagegen zeigen die Profile der verschiedenen *Serratia*-Spezies visuell qualitativ und quantitativ Unterschiede (**Abb. 3-1 A-E**). **Tabelle 1 (Anhang)** gibt eine Übersicht der detektierten und identifizierten Verbindungen wieder. Die Anzahl der Verbindungen unterscheidet sich unter vergleichbaren Wachstumsbedingungen von Spezies zu Spezies. Insgesamt wurde über den Untersuchungszeitraum bei *Serratia odorifera* 4Rx13 mit 74 Peaks die größte Anzahl an Verbindungen detektiert. Das Emissionsmaximum wurde dabei in der späten stationären Phase mit 68 Volatilen aufgezeichnet, von denen 55 Verbindungen über den gesamten Untersuchungszeitraum emittiert wurden. Es folgt *S. marcescens* Db11 mit insgesamt 21 Verbindungen, von denen ebenfalls in der Analyse der späten stationären Phase 16 Verbindungen das Emissionsmaximum darstellen. Neun Volatile konnten davon bis zum Versuchsende durchweg detektiert werden. Bei *S. proteamaculans* 568 wurden ebenfalls in beiden Wachstumsintervallen zusammen 21 Volatile aufgezeichnet. Jedoch wurde das Maximum mit 18 Verbindungen in der exponentiellen Wachstumsphase ermittelt. Davon wurden 13 Verbindungen dieses Spektrums ebenfalls in der späten stationären Phase gefunden. *S. odorifera* DSM4582 und *S. plymuthica* AS9 zeigten mit zwölf Verbindungen die geringste Anzahl. Bei den zuletzt genannten Bakterien-Spezies wurde in der exponentiellen Phase das Maximum mit zwölf und zehn Verbindungen erreicht. Neun Volatile wurden dabei von *S. odorifera* DSM 4582 von 0 - 48 h detektiert. Bei *S. plymuthica* AS9 konnten sieben Verbindungen detektiert werden.

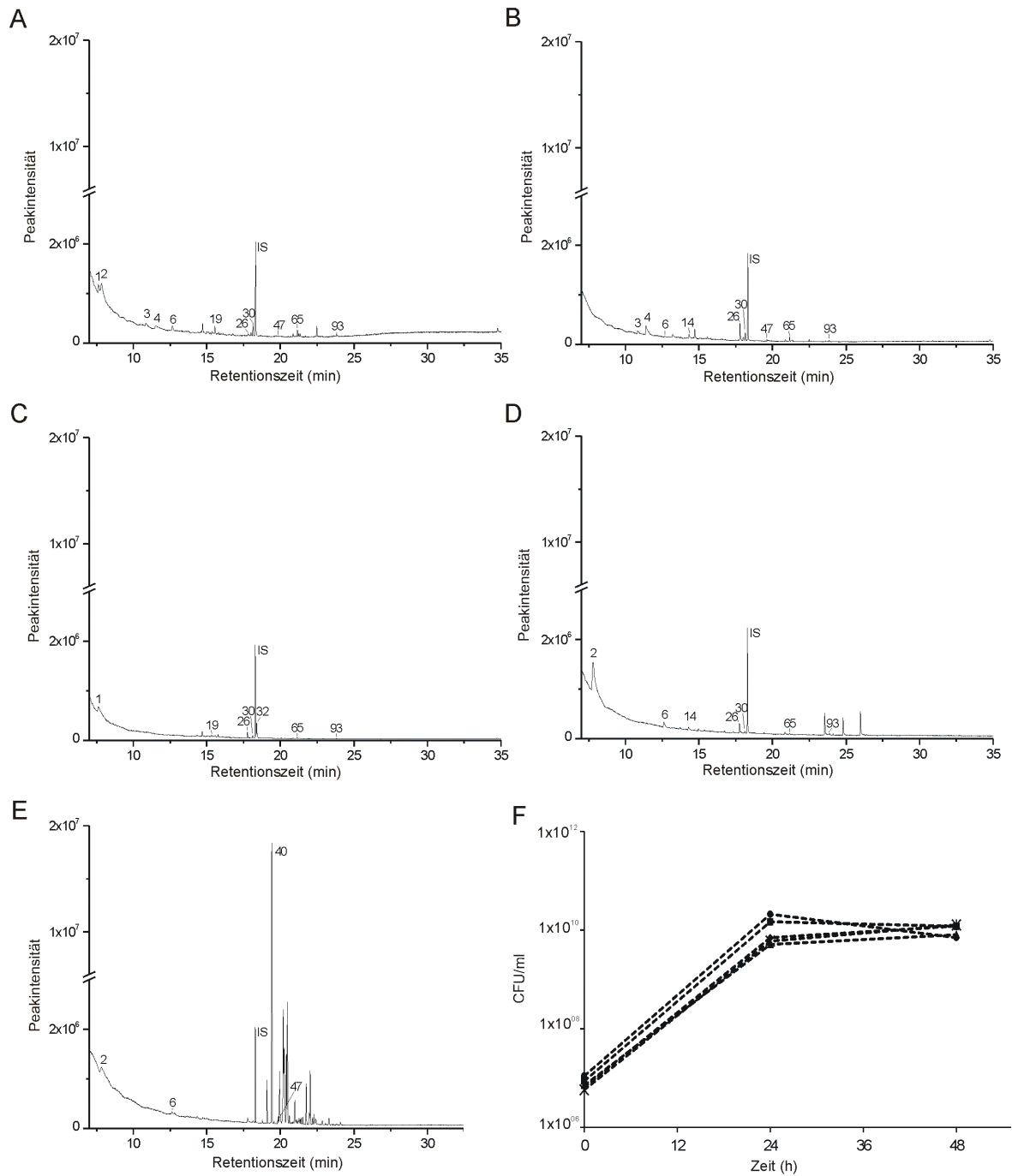


Abbildung 3-1: Ausgewählte Volatilen-Spektren und dazugehörige Wachstumskurven verschiedener *Serratia*-Spezies. Headspace-Volatile wurden von *S. proteamaculans* 568 (A), *S. marcescens* Db11 (B), *S. odorifera* DSM 4582 (C), *S. plymuthica* AS9 (D) und *S. odorifera* 4Rx13 (E) mit dem VOC-Sammelsystem von 0-24h in NB-Medium kultiviert. Die flüchtigen Verbindungen adsorbierten an Super-Q und wurden mittels GC/MS analysiert. Die Identifizierung der Volatile erfolgte durch den Vergleich der EI-Massenspektren, der Retentionszeiten und der Retentionsindices mit verschiedenen Datenbanken (Nist107, Pherobase, PubChem) und Vermessung der jeweiligen Referenzsubstanzen: Peak #1 (3-Methylbutanol), #2 (Dimethyldisulfid), #3 (2-Heptanon), #4 (2,3-Dimethylpyrazin), #6 (Dimethyltrisulfid), #14 (1-Octanol), #18 (2-Phenylethanol), #19 (Phenylacetone), #22 (2-Decanon), #26 (1-Decanol), #30 (2-Undecanon), #32 (Indol), #40 (Sodorifen), #47 (2-Dodecanon), #65 (2-Tridecanon), #93 (2-Pentadecanon), IS (interner Standard). (F) Parallel zu der VOC-Analyse wurde das Wachstum der Kulturen mit Bestimmung der Zellzahl (CFU/ml) im Verlauf der Zeit (h) ermittelt. *S. proteamaculans* 568 (--■), *S. marcescens* Db11 (--◆), *S. odorifera* DSM4582 (--▲), *S. plymuthica* AS9 (--●), *S. odorifera* 4Rx13 (--×).

Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte mit Hilfe von Vergleichsdatenbanken (NIST107-1998, Pherobase, Pubchem), den Retentionindices und Vermessung von Reinsubstanzen (**Tabelle 3-1**). Insgesamt werden die Spektren von Schwefelverbindungen, Alkoholen und Ketonen dominiert. Während Verteilung aller volatiler Verbindungen von *S. marcescens* Db11, *S. proteamaculans* 568, *S. odorifera* DSM 4582 und *S. plymuthica* AS 9 sich ähneln, hebt sich das Profil von *S. odorifera* 4Rx13 deutlich ab. Neben neun identifizierten Volatilen tritt insbesondere die Verbindung Sodorifen (# 40) und dessen potentielle Isomere hervor (**Abb. 3-1 E**).

Tabelle 3-1: Identifizierte volatile Verbindungen verschiedener *Serratia*-Spezies. Die im Headspace an Super-Q adsorbierten Volatile von *Serratia proteamaculans* 568, *Serratia marcescens* Db11, *Serratia odorifera* DSM4582, *Serratia plymuthica* AS9, *Serratia odorifera* 4Rx13 wurden mittels GC/MS analysiert und durch Vergleich der EI-Massenspektren, der Retentionszeiten und des Retentionsindex (RI) mit Vergleichsdatenbanken identifiziert und anschließend durch Vermessung der Reinsubstanzen bestätigt. In die Analyse wurden ausschließlich Verbindungen einbezogen, die in 2-3 unabhängig durchgeführten Messungen detektiert wurden. Hellgrau hinterlegtes x : Verbindung detektiert, - : Verbindung nicht detektiert, dunkelgrau hinterlegte Verbindungen: bei allen untersuchten *Serratia*-Spezies detektiert, rosa hinterlegte Verbindung: das neuartige Volatil Sodorifen.

Peak	Verbindung	RI	<i>S. proteamaculans</i> 568	<i>S. marcescens</i> Db11	<i>S. odorifera</i> DSM 4582	<i>S. plymuthica</i> AS9	<i>S. odorifera</i> 4Rx13
1	3-Methylbutanol		x	-	x	-	-
2	Dimethyldisulfid	749	x	-	-	x	x
3	2-Heptanon	899	x	x	x	-	-
4	2,3-Dimethylpyrazin	932	x	x	-	-	x
6	Dimethyltrisulfid	987	x	x	-	x	x
14	1-Octanol	1076	-	x	-	x	-
18	2-Phenylethanol	1125	x	x	x	-	x
19	Phenylacetone	1142	x	x	x	-	x
22	2-Decanon	1197	-	x	-	-	-
26	1-Decanol	1276	x	x	x	x	-
30	2-Undecanon	1297	x	x	x	x	x
32	Indol	1314	-	-	x	-	-
40	Sodorifen	1374	-	-	-	-	x
47	2-Dodecanon	1400	x	x	-	-	x
65	2-Tridecanon	1501	x	x	x	x	x
93	2-Pentadecanon	1705	x	x	x	x	x
	Anzahl der Verbindungen		21	21	12	12	74
	Anzahl der identifizierten Verbindungen		12	12	9	7	10

In dem Profil von *S. proteamaculans* 568 wurden zwölf Verbindungen identifiziert. Darunter befinden sich die Schwefelverbindungen Dimethyldisulfid (# 2) und Dimethyltrisulfid (# 6). Weiterhin wurden die Alkohole 3-Methylbutanol (# 1), 2-Phenylethanol (# 18) und 1-Decanol (# 26) als auch die Ketone 2-Heptanon (# 3), Phenylacetone (# 19), 2-Undecanon (# 30), 2-Dodecanon (# 47), 2-Tridecanon (# 65) und 2-Pentadecanon (# 93) identifiziert (zusammengefasst in **Tabelle 3-1**). Im Spektrum von *S. marcescens* Db11 konnte nur Dimethyltrisulfid (# 6) als Schwefelverbindung gezeigt werden. Zusätzlich wurden die Alkohole 1-Octanol (# 14), 2-Phenylethanol (# 18) und 1-Decanol (# 26) und eine Reihe an C₂-methylierten Ketonen (C₈, C₁₀-C₁₃, C₁₅) als auch Phenylacetone (# 19) nachgewiesen. Insgesamt wurden zwölf Volatile bei *S. marcescens* Db11 identifiziert. In den Chromatogrammen von *S. odorifera* DSM

4582 wurden neun Verbindungen identifiziert. Dazu zählen Alkohole 3-Methylbutanol (# 1), 2-Phenylethanol (# 18) und 1-Decanol (# 26) als auch die Ketone 2-Heptanon (# 3), Phenylacetone (# 19), 2-Undecanon (# 30), 2-Tridecanon (# 65) und 2-Pentadecanon (# 93). Zusätzlich fiel das stickstoffhaltige Indol (# 32) als Hauptverbindung auf. Interessanterweise konnten keine Schwefelverbindungen von *S. odorifera* DSM 4582 detektiert werden. Bei der Spezies *S. plymuthica* AS9 konnten sieben Peaks identifiziert werden. Dabei handelt es sich um die Schwefelverbindungen Dimethyldisulfid (# 2) und Dimethyltrisulfid (# 6), die Alkohole 1-Octanol (# 14) und 1-Decanol (# 26) und die Ketone 2-Undecanon (# 30), 2-Tridecanon (# 65) und 2-Pentadecanon (# 93).

Ein Vergleich der Emission volatiler Verbindungen zeigt, dass alle untersuchten *Serratia*-Spezies in den Profilen drei Verbindungen gemeinsam haben, die methylierten Ketone 2-Undecanon (# 30), 2-Tridecanon (# 65) und 2-Pentadecanon (# 93). Mit Ausnahme von *S. odorifera* 4Rx13 zeigten alle weiteren untersuchten *Serratia*-Spezies die gemeinsame Emission von vier Volatilen: 1-Decanol (# 14), 2-Undecanon (# 17), 2-Tridecanon (# 23) und 2-Pentadecanon (# 28). Besonders auffällig ist, dass die außergewöhnliche Verbindung Sodorifen nur von *Serratia odorifera* 4Rx13 emittiert wird.

3.1.1.2 Phylogenetischer Stammbaum und Verwandtschaft der Sodorifen-Produzenten

Nach diversen VOC-Analysen verschiedenster Rhizobakterien (Kai et al. 2007), konnte Sodorifen bisher ausschließlich bei der Bakterien Gattung *Serratia* detektiert werden. Weiterhin konnte die Emission von Sodorifen nicht in den Analysen mit *S. proteamaculans* 568, *S. marcescens* Db11, *S. odorifera* DSM 4582 und *S. plymuthica* AS9 nachgewiesen werden.

Tabelle 3-2: Sodorifen-Emission analysierter *Serratia*-Spezies und -Isolate. + Sodorifen-Emission, - keine Sodorifen-Emission, * (Marco Kai, z.T. unveröffentlicht), 1-3 wurden innerhalb dieser Arbeit analysiert.

Gattung	Spezies	Isolat	Sodorifen Emission
	<i>fonticola</i>	V9506	-*
	<i>liquefaciens</i>	B5319	-*
	<i>marcescens</i>	V11694	-*
		Db11	-*
	<i>plymuthica</i>	AS9	- ¹
<i>Serratia</i>		3Re-4-18	+*
		HRO-C48	+*
		PRI-2C	- ²
	<i>odorifera</i>	4Rx13	+*
		DSM 4582	-*
	<i>proteamaculans</i>	568	-*
	<i>rubidaea</i>	V3095	-*
		CC12/12	- ³

Insgesamt wurden 14 Isolate mittels VOC-Sammelsystem und GC/MS bezüglich der Sodorifen-Emission untersucht (**Tabelle 3-2**). Dabei konnte Sodorifen bei drei Isolaten (3Re-4-18, HRO-C48, 4Rx13) zwei verschiedener Spezies (*S. odorifera*, *S. plymuthica*) detektiert werden. Bei allen anderen untersuchten Isolaten konnten im Gaschromatogramm zur erwarteten Retentionszeit keine für Sodorifen charakteristischen Molekül- oder Fragmentationen (m/z) detektiert werden. Um noch einen umfangreicheren Überblick über die Verteilung der Sodorifen-Produzenten innerhalb der Gattung *Serratia* zu erhalten, wurden weitere Spezies und Isolate untersucht. Derzeitig zählen 15 Spezies mit zwei Subspezies zu der Gattung *Serratia* (Mahlen, 2011, Manzano-Marin et al. 2012).

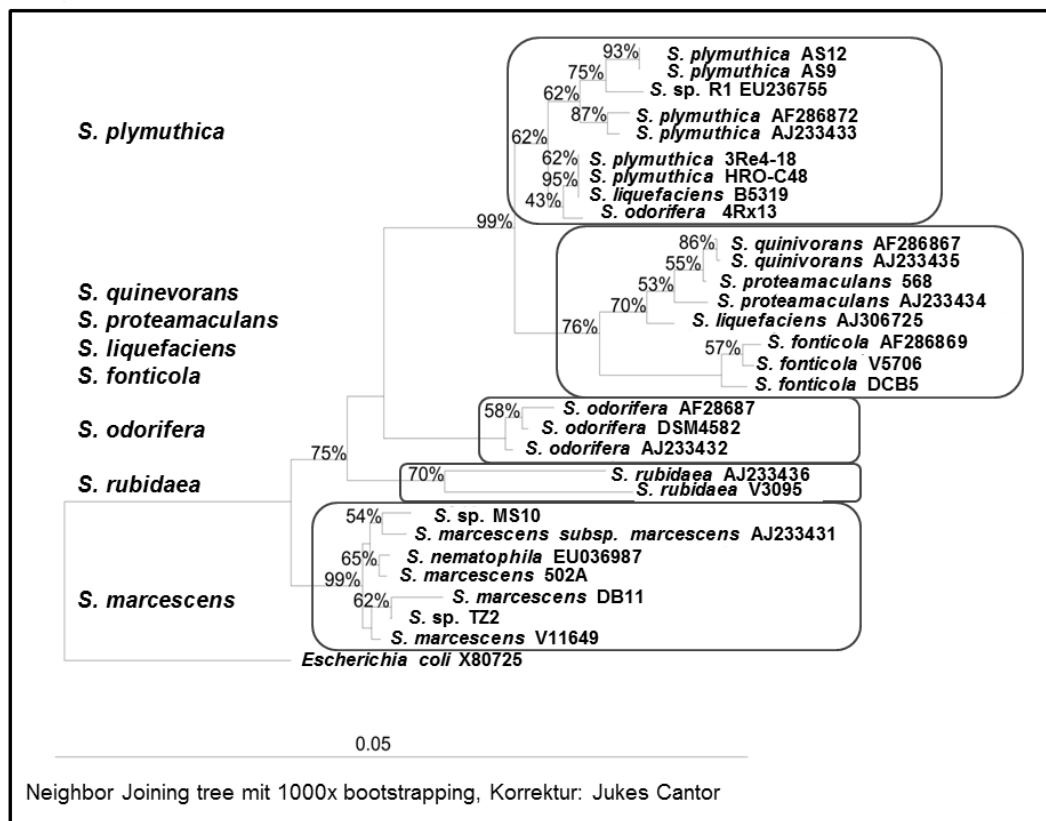


Abbildung 3-2: Phylogenetischer Stammbaum der Gattung *Serratia*. Der phylogenetische Stammbaum (*neighbor joining tree*) basiert auf der Analyse der 16S-rRNA und wurde mit der Software ARB erstellt. *E. coli* wurde als Außengruppe herangezogen. Schwarze Kästen umranden einzelne Cluster innerhalb des Stammbaums.

Die Speziesbezeichnungen der analysierten Isolate wurden zunächst entsprechend der Literatur übernommen. Um eindeutig die verwandtschaftlichen Beziehungen darstellen zu können, wurde diese mittels 16S-rRNA Sequenz-Analyse überprüft. Dafür erfolgte eine DNA-Isolation der getesteten *Serratia*-Stämme (mit Ausnahme von *S. rubidaea* CC12/12 und *S. plymuthica* PRI-2C). Die Sequenzierung der 16S-rRNA wurde in Kooperation mit dem Göttinger Labor für Genomanalyse der Universität Göttingen (Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Mit den Sequenzen und der Software ARB (Ludwig et al. 2004) wurde daraufhin ein phylogenetischer

Stammbaum erstellt (**Abb. 3-2**). Zusätzlich wurden weitere veröffentlichte 16S-rRNA-Sequenzen verschiedener *Serratia*-Spezies aus der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) mit in ARB verarbeitet. Der Stammbaum zeigt 5 Gruppen, in denen neun der elf untersuchten Isolate ihrer Spezies-Bezeichnung zugeordnet wurden. Auffällig ist, dass die Isolate 4Rx13 und B5319 nicht ihrer bisherigen Klassifizierung gruppieren, sondern in der Gruppe *S. plymuthica* eingeordnet sind. Da sich die weiteren Arbeiten auf den Stamm 4Rx13 konzentrieren wird von *S. plymuthica* 4Rx13 (ehemals *S. odorifera* 4Rx13) die Rede sein. Das Isolat B5319 wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht, weshalb der Name *S. liquefaciens* nicht geändert wird.

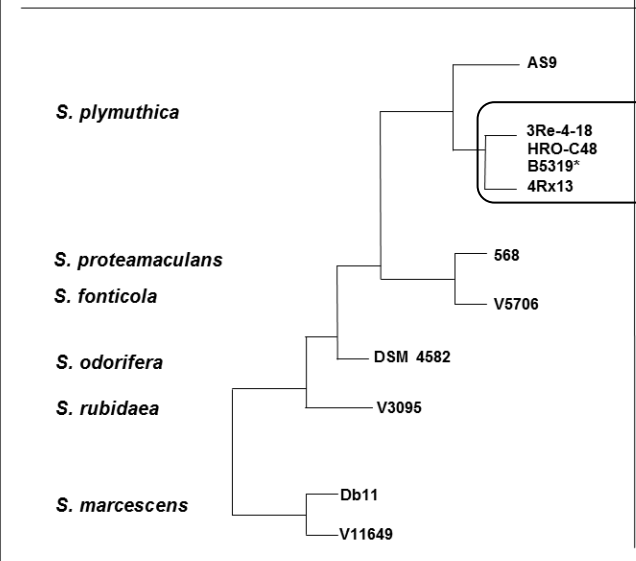
A Verwandschaftliche Beziehung der analysierten <i>Serratia</i> -Isolate	B Sodorifen-Emission	C Herkunft der Isolate
	-	Samen von <i>Brassica napus</i> (Schweden)
<i>S. plymuthica</i>	+	Endorhiza von <i>Solanum tuberosum</i> (Deutschland) Rhizosphäre von <i>Brassica napus</i> (Deutschland) Mensch Rhizosphäre von <i>Brassica napus</i> (Deutschland)
<i>S. proteamaculans</i>	-	Wurzelendophyt von <i>Populus</i> sp. (USA)
<i>S. fonticola</i>	-	Mensch
<i>S. odorifera</i>	-	Mensch (Sputum)
<i>S. rubidaea</i>	-	Mensch
<i>S. marcescens</i>	-	Spontane Mutante von Db10 (<i>Drosophila</i> sp.)
	-	Mensch

Abbildung 3-3: Sodorifen-Emission und verwandschaftliche Beziehung untersuchter Spezies und Isolate innerhalb der Gattung *Serratia*. Dargestellt wird (A) die Verwandtschaft elf untersuchter *Serratia*-Spezies und Isolate, (B) die Sodorifen-Emission, die mittels VOC-Sammelsystem und GC/MS analysiert wurde und (C) der Herkunft der untersuchten *Serratia*-Isolate. + Sodorifen-Emission; - keine Sodorifen-Emission; schwarze Umrandung: Sodorifen-Produzenten. * *S. liquefaciens*

Sodorifen-Produzierer und Nicht-Produzierer wurden dem *Serratia*-Stammbaum gegenüber gestellt (**Abb. 3-3 A und B**). Daraus wird ersichtlich, dass nur innerhalb der Gruppe *S. plymuthica* Sodorifen-Produzenten zu finden sind (**Abb. 3-3, schwarzer Kasten**). Dabei handelt es sich um die Gruppe mit den Isolaten 4Rx13, 3Re4-18 und HRO-C48, wobei *S. liquefaciens* B5319 eine Ausnahme bildet. *S. plymuthica* AS9 als auch alle anderen getesteten *Serratia*-Isolate zeigten unter vergleichbaren Bedingungen keine Sodorifen-Emission und bilden die Gruppe der Nicht-Produzenten. Unter den zuletzt genannten befinden sich viele Isolate, die humanen Ursprungs sind

(Abb. 3-3 C). Wohingegen alle Sodorifen-Produzenten von Pflanzen in Deutschland (Mecklenburg-Vorpommern) isoliert wurden.

3.1.2 Genom-Analyse von *Serratia plymuthica* 4Rx13

Die Genom-Analyse bietet großes Potential, die an der Emission von Sodorifen beteiligten Gene zu erforschen und wichtige Hinweise auf die zugrundeliegende Biosynthese der neuartigen Struktur zu erhalten.

3.1.2.1 Genom-Sequenzierung von *S. plymuthica* 4Rx13

In Kooperation mit dem Göttinger Labor für Genomanalyse (Göttingen, Deutschland) wurde das Genom von *S. plymuthica* 4Rx13 mittels Pyrosequenzierung mit dem Roche 454-FLX-System (Roche 454 Life Science, Mannheim, Deutschland) analysiert (Thürmer et al. 2009, Genome Project ID 42253). Das geschlossene Genom ist 5,362674 Megabasen groß, besteht aus einem Chromosom (Abb. 3-4) und einem Plasmid (Abb. 3-5). Es besitzt einen G/C-Gehalt von 56,16 % und 4876 funktionelle offene Leserahmen (*open reading frame* - ORF).

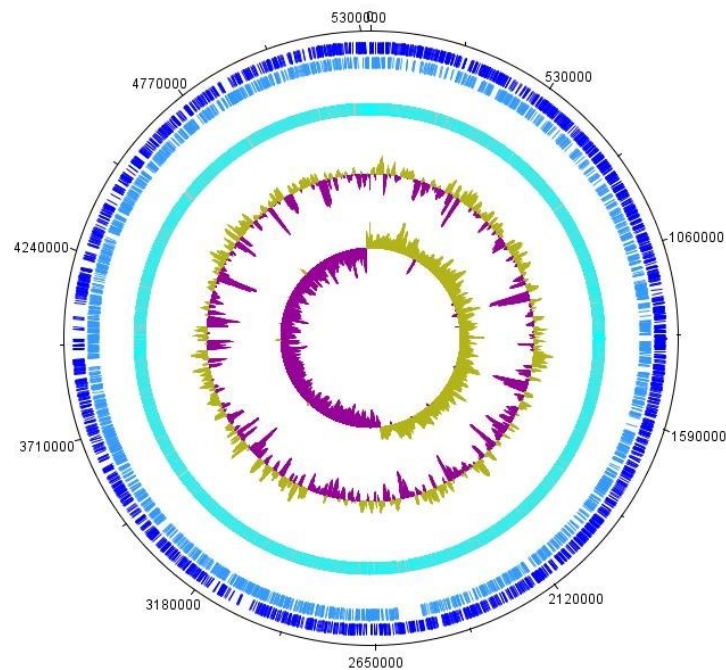


Abbildung 3-4: Genom-Karte des Chromosoms von *Serratia plymuthica* 4Rx13. Ringanordnung von außen nach innen: 1. Ring: Genom-Position (bp), 2. Ring: Strang mit ORFs in *sense*-Orientierung (dunkelblau) und *antisense*-Orientierung (hellblau), 3. Ring: kompletter Strang, 4+5. Ring: G/C-Gehalt (hellgrau: G, dunkelgrau: C).

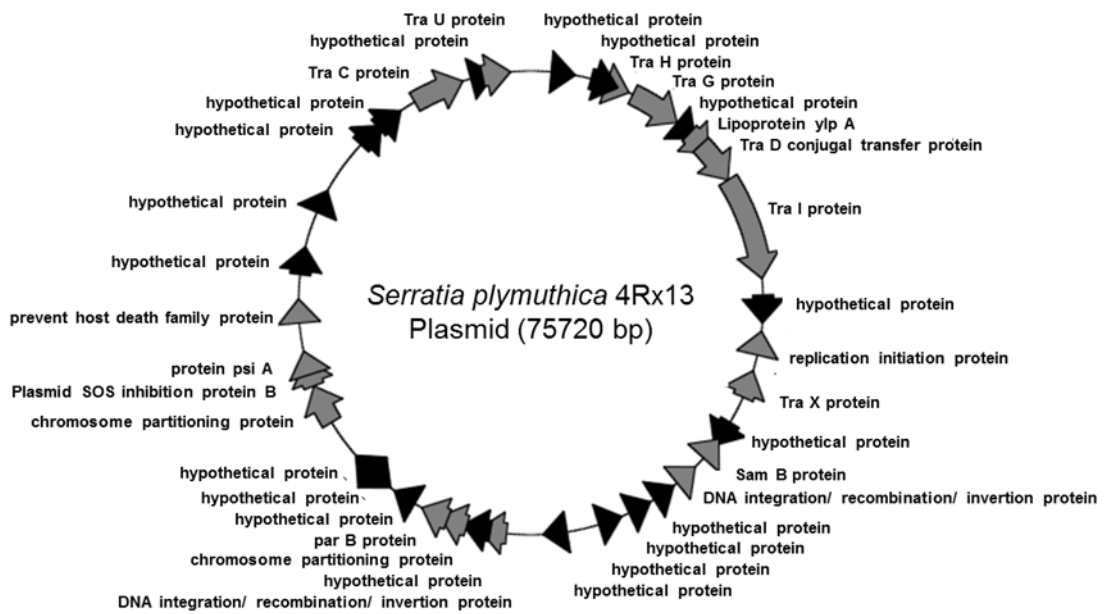


Abbildung 3-5: Plasmid-Karte von *Serratia plymuthica* 4Rx13. Die offenen Leserahmen des 75,72 kb großen Plasmids von *S. plymuthica* 4Rx13 sind in Form von Pfeilen mit Funktionszuweisung nach automatischer Annotation entsprechend ihrer Position angeordnet. Pfeil im Uhrzeigersinn: Leserahmen in *sense*-Orientierung, Pfeil gegen den Uhrzeigersinn: Leserahmen in *antisense*-Orientierung, schwarzer Pfeil: hypothetische Proteine, grauer Pfeil: erste Funktionszuweisung.

3.1.2.2 Vergleichende Genom-Analysen innerhalb der *Serratia*-Spezies

Ein Genom-Vergleich von *S. plymuthica* 4Rx13 als Sodorifen-Produzent mit anderen *Serratia*-Spezies als Nicht-Produzenten kann bereits erste Hinweise auf die an der Sodorifen-Emission beteiligten bzw. nicht beteiligten Gen-Regionen geben. Dafür wurde zunächst eine Analyse mit Plasmiden vorgenommen. Bei allen elf untersuchten *Serratia*-Spezies konnte Plasmid-DNA nachgewiesen werden (**Abb. 3-6**). Demnach besitzen alle drei Sodorifen-Produzenten mindestens ein Plasmid, das für die Produktion von Sekundärmetaboliten in Frage kommen könnte.

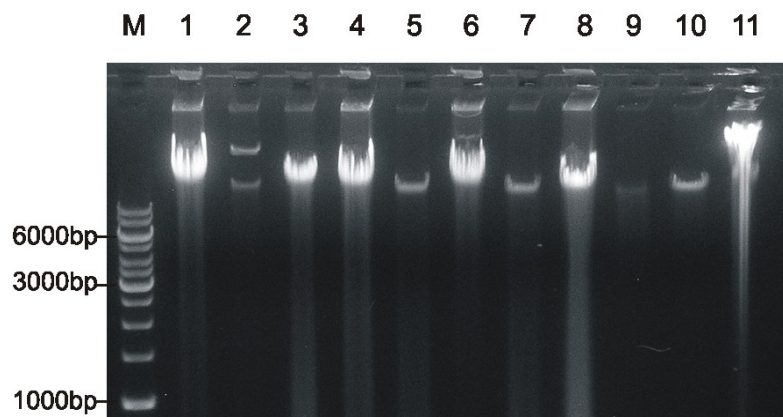


Abbildung 3-6: Nachweis von Plasmid-DNA verschiedener *Serratia*-Spezies. M: Marker (1kb-Leiter, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland), Spur 1: *S. marcescens* Db11, Spur 2: *S. proteamaculans* 568, Spur 3: *S. marcescens* V11649, Spur 4: *S. odorifera* DSM 4582, Spur 5: *S. plymuthica* AS9, Spur 6: *S. liquefaciens* B5319, Spur 7: *S. plymuthica* HRO-C48, Spur 8: *S. plymuthica* 3Re-4-18, Spur 9: *S. plymuthica* 4Rx13, Spur 10: *S. fonticola* V5906, Spur 11: *S. rubidaea* V3095.

Weiterhin wurden die Genome aller bis dato vollständig sequenzierten und in NCBI veröffentlichten *Serratia*-Spezies (*S. proteamaculans* 568, *S. marcescens* Db11, *S. odorifera* DSM 4582, *S. plymuthica* AS9 und *S. plymuthica* PRI-2C) mit *S. plymuthica* 4Rx13 verglichen (**Tabelle 3-3**). Dabei variieren die Genomgröße als auch der G/C-Gehalt zwischen den verschiedenen Spezies und Isolaten wenig.

Tabelle 3-3: Übersicht der Genom-Sequenzierung verschiedener *Serratia*-Spezies. Die Genomgröße, der G/C-Gehalt als auch die Anzahl der Plasmide wurde den Isolaten der untersuchten *Serratia*-Spezies gegenübergestellt.

Gattung	Spezies	Isolat	Genomgröße (Mb)	G/C-Gehalt (%)	Anzahl Plasmide
<i>Serratia</i>	<i>plymuthica</i>	4Rx13	5,36	56,20	1
		AS9	5,44	55,96	≥1
		PRI-2C	5,39	55,67	≥1
	<i>odorifera</i>	DSM4582	5,13	56,10	≥1
	<i>marcescens</i>	Db11	5,11	59,51	3
	<i>proteamaculans</i>	568	5,5	55,00	1

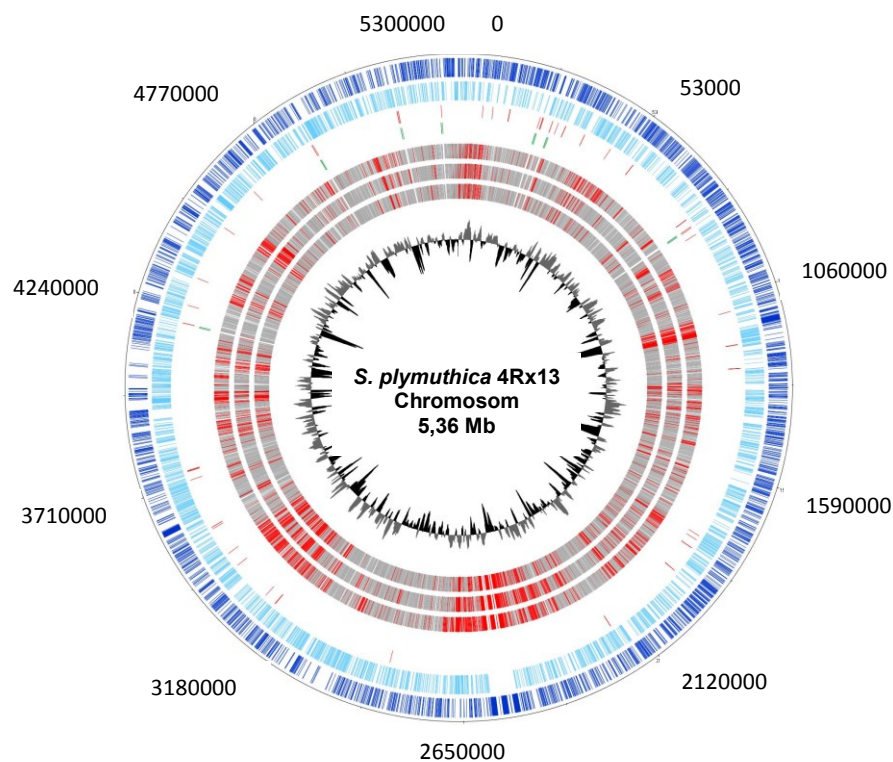


Abbildung 3-7: BiBlast des Genoms von *Serratia plymuthica* 4Rx13 mit verschiedenen *Serratia*-Spezies. Ringanordnung von außen nach innen: 1. Ring Strang mit ORF's in *sense*-Richtung (dunkel blau) und *antisense*-Richtung (hell blau), 3. Ring BiBlast gegen *S. proteamaculans* 568, 4. Ring BiBlast gegen *S. marcescens* Db11, 5. Ring BiBlast gegen *S. odorifera* DSM 4582 (grau: Core-Genom, rot: Pan-Genom), 6. Ring: Position der r-RNA's, 6. Ring G/C-Gehalt (hellgrau: G, dunkelgrau: C).

Ein detaillierter Vergleich der Genome wurde durch einen bidirektionellen Blast mittels BiBaG durchgeführt (Antje Wollherr, G2L, Göttingen, Deutschland) und das Pan-Genom als auch das

Core-Genom bestimmt (**Abb. 3-7**). Die Sequenzen wurden von den bis dato in NCBI frei zugänglichen, vollständig sequenzierten Genomen der *Serratia*-Spezies und unter Berücksichtigung, dass nur *S. plymuthica* 4Rx13 ein Sodorifen-Produzent ist, mit Hilfe von 6 E-Value Bereichen verglichen. Je mehr sich ein E-Value dem Wert 0 nähert, desto mehr Ähnlichkeiten weisen die zu vergleichenden Sequenzen auf. Die Anzahl an gleichen oder sehr ähnlichen offenen Leserahmen mit einem E-Value zwischen e^{-120} und 0 (Needleman-Wunsch-Identität, NW - Identität 90 - 100 %) spiegelt die Verwandtschaftsverhältnisse des phylogenetischen Stammbaums mittels 16S-rRNA wider (**Tabelle 3-4 A**). So hat *S. plymuthica* 4Rx13 unter den genannten Bedingungen 3213 orthologe ORF's mit *S. plymuthica* AS9. *S. proteamaculans* 568 folgt der Verwandtschaft weiter mit 2816 ORF's. Dagegen sind *S. marcescens* Db11 (2585 ORF's) und *S. odorifera* DSM4582 (2334 ORF's) phylogenetisch anhand der 16S-rRNA am weitesten von *S. plymuthica* 4Rx13 entfernt und zeigen auch im Gesamt-Genom-Vergleich die geringsten Parallelen mit *S. plymuthica* 4Rx13. Auffällig ist, dass *S. plymuthica* PRI-C2 trotz gleicher Spezies-Bezeichnung nur 2299 ORF's im Genomvergleich mit *S. plymuthica* 4Rx13 gemeinsam hat.

Tabelle 3-4: Biblast-Auswertung von *Serratia plymuthica* 4Rx13 mit sequenzierten *Serratia*-Spezies. Mit Hilfe der BiBlast-Software (Antje Wollherr, G2L Göttingen) wurden die Sequenzen der offenen Leserahmen (*open reading frame*; ORF) von *S. plymuthica* 4Rx13 jeweils mit den Sequenzen von *S. plymuthica* AS9 (*S. pl.* AS9), *S. plymuthica* PRI-2C (*S. pl.* PRI-2C), *S. odorifera* DSM4582 (*S. odo.* DSM 4582), *S. marcescens* Db11 (*S. mar.* Db11) und *S. proteamaculans* 568 (*S. protea.* 568) verglichen. Dabei wurde zum einen (**A**) die Anzahl gleicher ORF's mit einem E-Value > -100 und einer Needleman-Wunsch-Prozentidentität (NW-Identität) $> 70\%$ und (**B, C**) die Anzahl der ORF's, die für *S. plymuthica* 4Rx13 einmalig (E-Value $e^{-20}-1$ und NW-Identität 0-20%) sind untersucht. Dunkelgrau hinterlegt: ORF's, die für ein Polyketid-Synthase-Cluster (PKS-Cluster) codieren; hellgrau hinterlegt: ORF's, die auf dem Plasmid von *S. plymuthica* 4Rx13 lokalisiert sind, weiß: alle restlichen Gene, die für *S. pl.* 4Rx13 einmalig sind.

A	<i>S. pl.</i> AS9	<i>S. pl.</i> PRI-2C	<i>S. odo.</i> DSM4582	<i>S. mar.</i> Db11	<i>S. protea.</i> 568
<i>S. pl.</i> 4Rx13	3213	2299	2334	2585	2816
B	<i>S. pl.</i> AS9	<i>S. pl.</i> PRI-2C	<i>S. odo.</i> DSM4582	<i>S. mar.</i> Db11	<i>S. protea.</i> 568
<i>S. pl.</i> 4Rx13	312				
C	ORF's				
312 einmalige Gene in <i>S. pl.</i> 4Rx13 im Vergleich zu <i>S. pl.</i> AS9, <i>S. pl.</i> PRI-2C, <i>S. odo.</i> DSM 4582, <i>S. mar.</i> Db 11, <i>S. protea.</i> 568	15 hypothetical protein polyketide biosynthesis enoyl-CoA hydratase beta-ketoacyl synthase PpsB:phenolphthiocerol synthesis polyketide synthase malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase				PKS-Cluster
	11 hypothetical protein YlpA:lipoprotein ylpA, precursor Rep:replication initiation protein TraX:protein TraX				Plasmid

SamB:protein SamB
 chromosome partitioning protein
 ParB:chromosome partitioning protein ParB
 prevent-host-death family protein

165 hypothetical protein
 18 transcriptional regulatory protein
 9 transporter
 2 aspartate aminotransferase
 2 S-type pyocin domain-containing protein
 2 fimbrial protein

porin
 FimA:type-1 fimbrial protein, A chain
 xenobiotic compound monooxygenase A subunit
 phospholipid/glycerol acyltransferase
 short-chain dehydrogenase/reductase SDR
 tetratricopeptide TPR_2 repeat protein
 L-idonate 5-dehydrogenase
 ABC transport subunit protein
 transketolase 1
 TolC family type I secretion outer membrane protein
 QueC1:queuosine biosynthesis protein QueC
 outer membrane protein
 cell divisionFtsK/SpoIIIE domain-containing protein
 putative DNA thiolation protein; putative phage protein
 rare lipoprotein A
 YbgT:cyd operon protein YbgT
 CstA1:carbon starvation protein CstA
 2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase
 sulfite reductase subunit alpha
 hemolysin
 RpmH:50S ribosomal protein L34
 RpmJ:50S ribosomal protein L36
 L-lysine 2,3-aminomutase
 multidrug transmembrane resistance signal peptide protein
 penicillin-binding protein 1C
 DNA integration/recombination/inversion protein
 HNH endonuclease domain protein
 pyocin S2 immunity protein
 glucose-methanol-choline oxidoreductase
 CstA2:carbon starvation protein CstA
 terminase, small subunit
 NinG prophage family protein
 putative amidohydrolase
 putative fimbrial chaperone
 putative exported protein
 putative cytoplasmic protein
 putative cytoplasmic protein
 putative NADP-dependent quinone oxidoreductase
 putative P-loop ATPase
 putative ABC-type spermidine/putrescine transport system protein
 putative phosphatidylserine synthase
 putative dioxygenase
 putative hydrolase protein
 putative cytosine deaminase
 putative endoribonuclease
 putative creatininase
 putative FAD/FMN-containing dehydrogenase
 putative multidrug transporter membrane\ATP- binding component
 putative short-chain dehydrogenase/reductase

	putative phosphopantetheinyl transferase putative cysteine desulfurase putative transmembrane protein
--	---

Werden alle Sequenzen aller untersuchten Genome miteinander verglichen, ergeben sich 312 von 4668 offenen Leserahmen bei *Serratia plymuthica* 4Rx13, die geringste Ähnlichkeiten (E-Value > e^{-20} , 0 - 20 % NW-Identität) mit den offenen Leserahmen der Nicht-Sodorifen-Produzenten aufweisen (**Tabelle 3-4 B, C**). Darunter befinden sich 191 offene Leserahmen ohne Funktionszuweisung (*hypothetical protein*). Unter den *S. plymuthica* 4Rx13 spezifischen offenen Leserahmen finden sich auch die Leserahmen, die für ein Polyketidsynthese-Cluster (PKS-Cluster) codieren. Das Produkt des PKS-Clusters Oocydin A konnte mit einer antifungalen und anti-oomycetische Funktion von Martilla et al. 2012 aufgeklärt werden. Zusätzlich finden sich in der Analyse 18 von 36 offenen Leserahmen, die auf dem Plasmid liegen und keinerlei Ähnlichkeit zu den anderen sequenzierten *Serratia*-Spezies aufweisen. Dazu zählen elf offene Leserahmen, die für hypothetische Proteine codieren. Zudem fällt auf, dass sechs von sieben offenen Leserahmen, die für Proteine des Tra-Systems codieren mit großer Ähnlichkeit (E-Value: e^{-120} - 0, NW - Identität 90 - 100 %) bei *S. odorifera* DSM4582 vorliegen. Aus der Gesamt-Genom- und Plasmid-Analyse verbleiben nach Ausschluss der für hypothetische Proteine codierenden offenen Leserahmen des PKS-Clusters 176 Gene, die für hypothetische Proteine codieren und neben anderen als Kandidatengene für eine *knock-out* Strategie zur Aufklärung des Sodorifen-Biosynthese-Weges in Frage kommen.

3.1.2.3 Etablierung eines *knock-out* Systems für *S. plymuthica* 4Rx13

Das gezielte Ausschalten von Genen ermöglicht einen Funktions-Nachweis an der Beteiligung von Stoffwechselwegen (Zhao et al. 2004, Li et al. 2006). Dabei kann ein *knock-out* u.a. durch die Insertion von Fremd-DNA erfolgen (Winians et al. 1985). Auf Grundlage der Genomsequenzierung und des „Quick and Easy *E. coli* Gene Deletion Kits“ (Gene Bridges, Heidelberg, Deutschland) wurde ein *knock-out* System für *S. plymuthica* 4Rx13 etabliert. Zunächst wurden dafür 2 Kandidatengene (Sod_d00970 und Sod_c02280) ausgewählt. Beide Gene codieren nach automatischer und manueller Annotation für hypothetische Gene, die nach der BiBlast-Analyse (**Tabelle 3-4 C**) einmalig in *S. plymuthica* 4Rx13 auftreten.

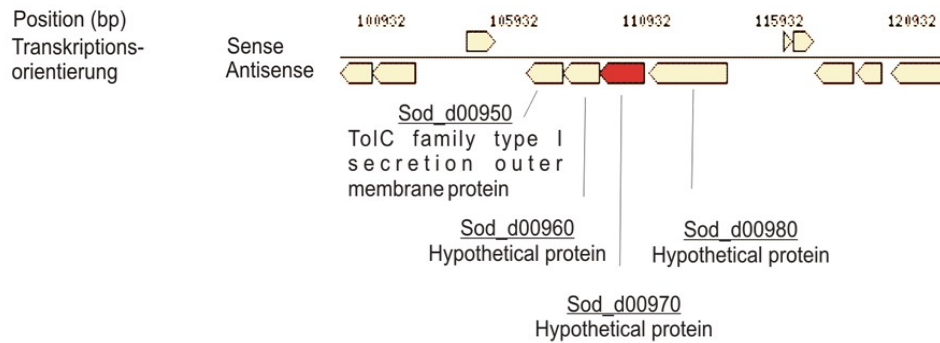


Abbildung 3-8: Schematischer Genomausschnitt mit Sod_d00970 von *Serratia plymuthica* 4Rx13. Literarisierte genetische Karte, in der offene Leserahmen (Pfeile), die Transkriptionsorientierung (*sense* oder *antisense*) und die Position (bp) angegeben sind. Rot gekennzeichnet ist der offene Leserahmen von Sod_d00970 (roter Pfeil, *antisense*), der nach automatischer Annotation für ein hypothetisches Gen codiert und einmalig in *S. plymuthica* 4Rx13 vorkommt. Sod_d00970 wird von offenen Leserahmen flankiert, die ebenfalls für hypothetische Proteine codieren (Sod_d00960 und Sod_d00980).

Zusätzlich liegen beide Gene in einem Bereich mit Genen, die in gleicher Transkriptionsorientierung angeordnet sind (*antisense*-Orientierung für Sod_d00970 und *sense*-Orientierung für Sod_c02280) und ein Gen-Cluster bilden könnten, das an der Sodorifen-Emission beteiligt sein könnte (**Abb. 3-8 und 3-9**). In diesen potentiellen Clustern befinden sich zudem weitere offene Leserahmen, die für hypothetische Gene codieren und einmalig unter den untersuchten *Serratia*-Spezies sind.

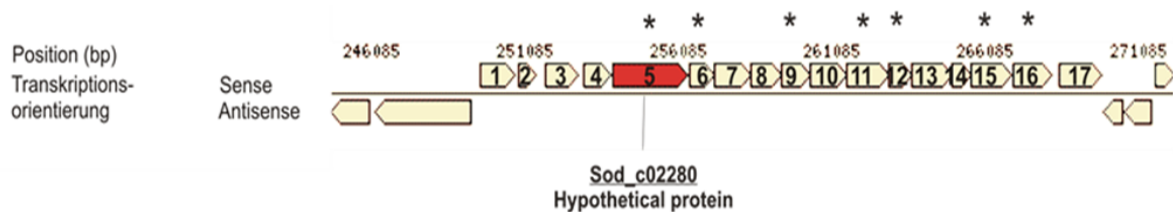


Abbildung 3-9 Schematischer Genomausschnitt mit Sod_c02280 von *Serratia plymuthica* 4Rx13. Linerisierte genetische Karte, in der offene Leserahmen (Pfeile), die Transkriptionsorientierung (*sense* oder *antisense*) und die Position (bp) angegeben sind. Roter Pfeil: Kandidatengen Sod_c02280. Automatische Annotation der offenen Leserahmen: 1 (Sod_c02240, *transcriptional repressor*), 2 (Sod_c02250, *transcriptional regulatory protein*), 3 (Sod_c02260, *putative ABC-type spermidine/putrescine transport system protein*), 4 (Sod_c02270, *phosphoenolpyruvate phosphomutase*), 5 (Sod_c02280, *hypothetical protein*), 6 (Sod_c02290, *hypothetical protein*), 7 (Sod_c02300, *2-aminoethylphosphonate-pyruvate transaminase I*), 8 (Sod_c02310, *putative oxidoreductase*), 9 (Sod_c02320, *hypothetical protein*), 10 (Sod_c02330, *aspartate aminotransferase*), 11 (Sod_c02340, *hypothetical protein*), 12 (Sod_c02350, *hypothetical protein*), 13 (Sod_c02360, *aspartate aminotransferase*), 14 (Sod_c02370, *putative phosphatidylserine synthase*), 15 (Sod_c02380, *hypothetical protein*), 16 (Sod_c02390, *hypothetical protein*), 17 (Sod_c02400, *transcriptional regulatory protein*). * *hypothetical proteins*.

Das „Quick and Easy *E. coli* Gene Deletion Kit“ beruht auf der homologen Rekombination eines Inserts mit einer Antibiotikaresistenz. Dafür wurden *S. plymuthica* 4Rx13-Zellen mit einem Kulturvolumen von 300 ml zunächst nach einem Protokoll von Untergasser (2008) für die Elektroporation von großen Plasmiden vorbereitet. Das 9270 bp große Hilfsplasmid pRed/ET von Gene Bridges wurde bei 2500 V, 200 Ω und 25 μ F mittels BioRad Gene Pulser II (München,

Deutschland) in *S. plymuthica* 4Rx13 elektroporiert. Daraufhin erfolgte ein Screening auf Medium mit Tetrazyklin, dessen Gen auf dem pRed/ET-Plasmid lokalisiert ist. Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR und Plasmid spezifischen Primern überprüft. Spur 2 des Agarosegels in **Abb. 3-10 A** zeigt deutlich das Amplifikat einer *S. plymuthica* 4Rx13-Kolonie mit pRed/ET spezifischen Primern. Als Ausschluss für Kontaminationen und als positive Kontrolle wurden organismenspezifische Primer für dieselbe *S. plymuthica* 4Rx13-Kolonie mitgeführt (**Abb. 3-10 A**, Spur 3). Weiterhin repräsentiert das Amplifikat mit denselben Primern für pRed/ET in *E. coli* HS 100 eine positive Kontrolle für das Hilfsplasmid (**Abb. 3-10 A**, Spur 1). Als negative Kontrolle diente eine PCR mit pRed/ET spezifischen Primern und mit Wasser elektroporierten *S. plymuthica* 4Rx13-Zellen, die auf Antibiotika-freiem Medium gewachsen waren (**Abb. 3-10 A**, Spur 4).

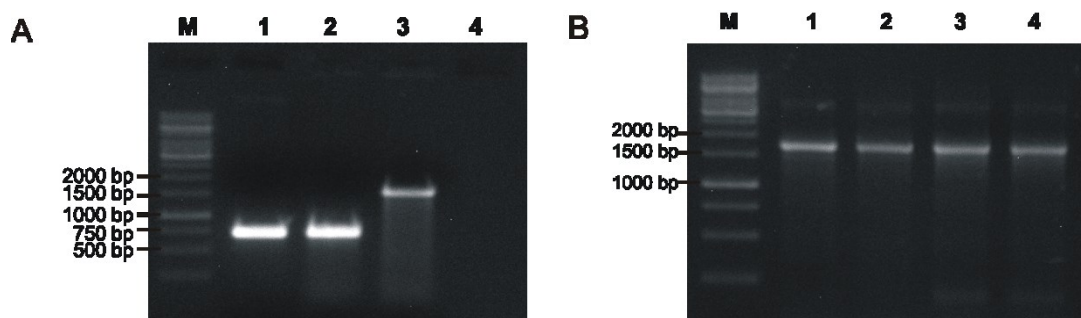


Abbildung 3-10: PCR-Amplifikate zur Vorbereitung der homologen Rekombination mit *Serratia plymuthica* 4Rx13. (A) PCR-Amplifikate eines plasmidspezifischen Bereiches von pRed/ET nach Elektroporation in *S. plymuthica* 4Rx13. M: Marker (1kb-Leiter, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland), Spur 1: pRed/ET in *E. coli* HS 100 (700 bp, positiv Kontrolle), Spur 2: pRed/ET in *S. plymuthica* 4Rx13 (700 bp), Spur 3: organismenspezifisches Gen von *S. plymuthica* 4Rx13 (positiv Kontrolle, 1700 bp), Spur 4: kein pRed/ET in *S. plymuthica* 4Rx13 (negativ Kontrolle). (B) PCR der FRT-PKG-gb2-neo-Kassette mit homologen Bereichen zu *S. plymuthica* 4Rx13-Genen. M: Marker (1kb-Leiter, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland), Spur 1: FRT-PKG-gb2-neo-Kassette mit homologen Bereichen zu dem Gen Sod_d00970 (1800 bp), Spur 2: FRT-PKG-gb2-neo-Kassette mit homologen Bereichen zu dem Gen Sod_c02280 (1800 bp), Spur 3: FRT-PKG-gb2-neo-Kassette mit homologen Bereichen zu dem Gen Sod_c00950 (1800 bp), Spur 4: FRT-PKG-gb2-neo-Kassette mit homologen Bereichen zu dem Gen Sod_j00300 (1800 bp).

Parallel zu der Elektroporation von pRed/ET wurden PCR-Amplifikate mit homologen Bereiche zu den Zielgenen Sod_d00970 und Sod_c02280 aus *S. plymuthica* 4Rx13 und einer Antibiotika-Resistenzkassette hergestellt. Dafür wurde ein weiteres Hilfsplasmid, die FRT-PKG-gb2-neo-FRT-Kassette (1700 bp), dass u.a. das Antibiotika-Resistenz-Gen Neomycin enthält, verwendet. Neomycin und Kanamycin bilden eine Kreuzreaktion. Für den Nachweis durch PCR wurden 72-73 bp lange Primer verwendet, von denen 50 Nukleotide homolog zum Zielgen von *S. plymuthica* 4Rx13 und 22-23 Nukleotide homolog zur FRT-Kassette sind. **Abb. 3-10 B**, Spur 1-4 zeigen Amplifikate (1800 bp), die der Größe der FRT-PKG-gb2-neo-FRT-Kassette inklusive der homologen Bereiche der Kandidatengene entsprechen. Für die anschließende Transformation von *S. plymuthica* 4Rx13-pRed/ET mit den 1,8 kb PCR-Produkten wurde auf das

Protokoll des „Quick and Easy *E. coli* Gene Deletion Kit“ zurückgegriffen. Zusätzlich wurden die Enzyme der homologen Rekombination, deren Gene auf dem Hilfsplasmid pRed/ET lagen, in *S. plymuthica*-Kulturen mit 10 %iger Arabinose induziert. Die Elektroporation erfolgte mit den linearen PCR-Amplifikaten der FRT-PKG-gb2-neo-FRT-Kassette und den homologen Bereichen des Zielgens. Die Kulturen wurden daraufhin auf Kanamycin-haltigem Medium ausgestrichen und kultiviert. Mittels PCR wurden potentiell positive Klone überprüft und anschließend phänotypisch als auch genotypisch verifiziert (4Rx13::d00970 **Abb. 3-11**, 4Rx13::c02280 **Abb. 3-12**). Phänotypisch wurde das Wachstum der Mutante im Vergleich zum Wildtyp im Verlauf der Zeit analysiert (**Abb. 3-11 A**). Der Wildtyp und die Mutante 4Rx13::d00970 gehen etwa gleich schnell von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase über. Dabei werden vergleichbare OD₆₀₀-Werte erreicht. Für die genotypische Verifizierung wurde zum einen die Stabilität der Mutation im Verlauf des Wachstums als auch die korrekte Insertion in das Kandidatengen überprüft (**Abb. 3-11 B und C**).

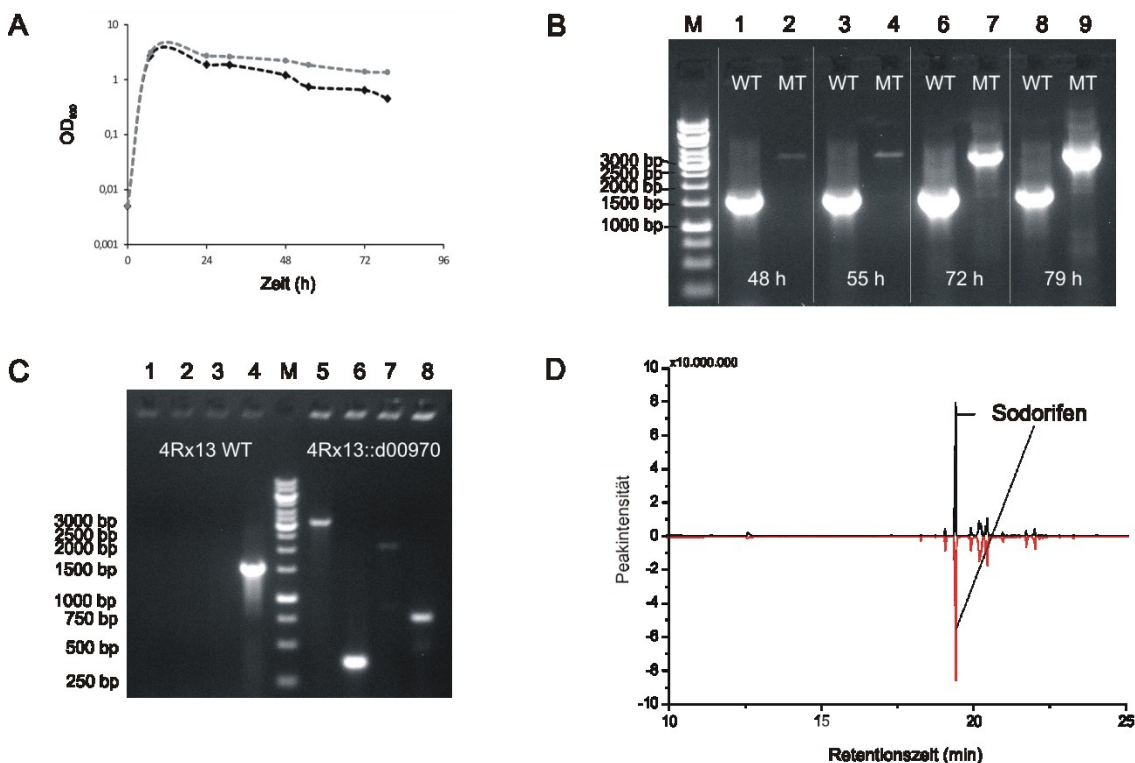


Abbildung 3-11: Verifikation der Mutante *Serratia plymuthica* 4Rx13::d00970 im Vergleich zum Wildtyp. (A) Wachstum der Mutante (graue Linie) im Vergleich zum Wildtyp (schwarze Linie) durch Messung der optischen Dichte (OD₆₀₀) im Verlauf der Zeit (n=2). (B) Amplifikat des Gens Sod_{d00970} der Mutante mit Insert (3400bp, MT) im Vergleich zum Wildtyp ohne Insert (1700bp, WT) im Verlauf der Zeit (1kb-Leiter, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). (C) Amplifikate spezifischer Primerkombinationen: Spur 1-4 *S. plymuthica* 4Rx13 Wildtyp ohne Insert, Spur 5-8 *S. plymuthica* 4Rx13::d00970 mit Insert, Spur 4+5 Amplifikat für das gesamte Gen Sod_{d00970}, Spur 1+6 Amplifikat mit spezifischen sense-Primer für das Gen Sod_{d00970} und antisense-Primer spezifisch für das Insert, Spur 2+7 Amplifikat mit spezifischen Primern für den Bereich des Inserts im Gen Sod_{d00970}, Spur 3+8 Amplifikat mit spezifischen sense Primer für das Insert und spezifischen antisense Primer für das Gen Sod_{d00970} (1kb-Leiter, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). (D) Chromatogramm zeigt die Emission der Volatile vom Wildtyp (schwarze Linie) im gespiegelten Vergleich zur Mutante (rote Linie) nach 48 stündigem Wachstum auf NB-Medium (n=2).

Die Stabilität der Insertion konnte im Verlauf des Wachstums bis 79 h nach Inokulation im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden. Weiterhin erfolgte die Überprüfung der korrekten Insertion mittels FRT-PKG-gb2-neo-FRT-Kassette spezifischen und genspezifischen Primern. Diese Primer-Kombinationen wurden für den Wildtyp als auch die Mutante angewendet (**Abb. 3-11 C**). In der Mutante konnten alle erwarteten DNA-Fragmente amplifiziert und nachgewiesen werden (Spur 5: 3,4 kb, Spur 6: 300 bp, Spur 7: 750bp), wohingegen bei dem Wildtyp keine Amplifikate mit Insert spezifischen Primern vervielfältigt werden konnten (Spur 1-3). Spur 4 zeigt das Wildtyp-Gen mit 1,7 kb. Analoge Versuche wurden mit dem Wildtyp und der Mutante *S. plymuthica* 4Rx13::c02280 durchgeführt. Abschließend wurden die emittierten Volatile der Mutanten *S. plymuthica* 4Rx13::d00970 und 4Rx13::c00280 im Vergleich zum Wildtyp im VOC-Sammelsystem an Super-Q adsorbiert und im GC/MS analysiert (**Abb. 3-11 D und 3-12**).

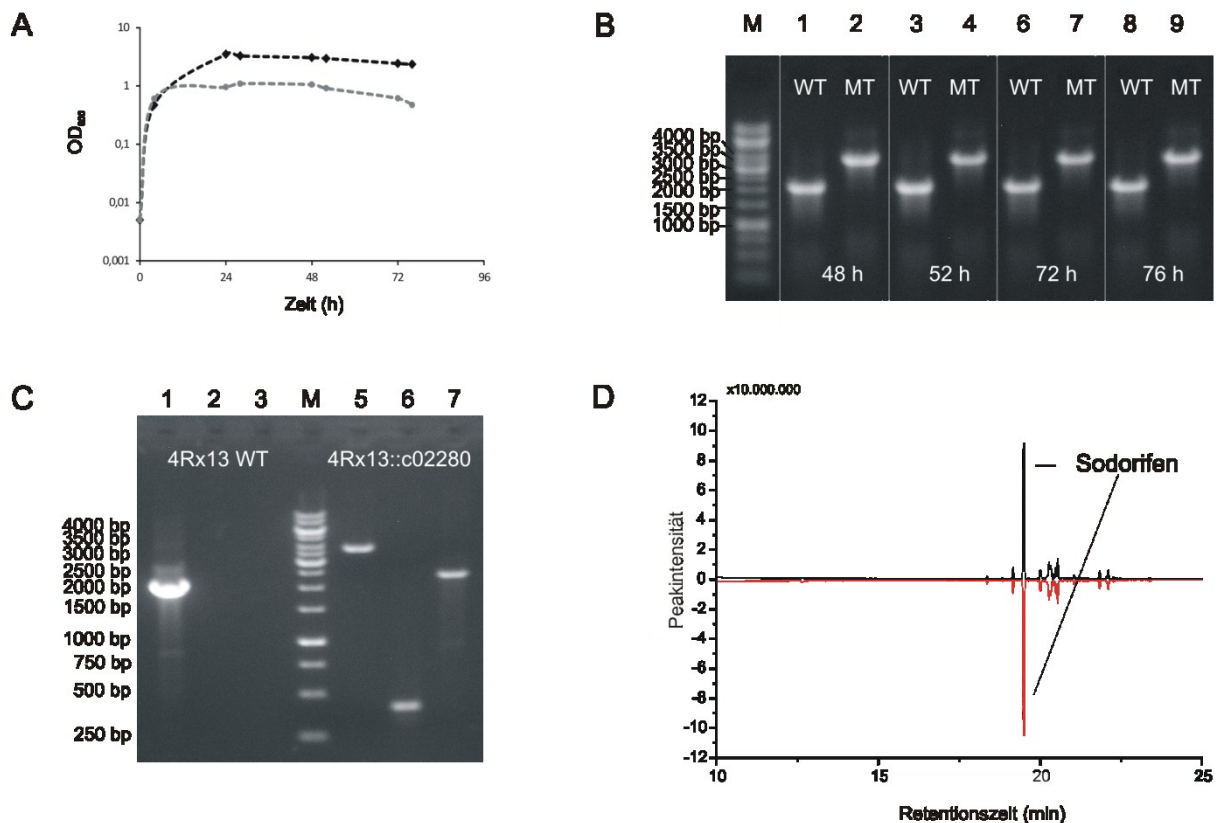


Abbildung 3-12: Verifikation der Mutante *Serratia plymuthica* 4Rx13::c02280 im Vergleich zum Wildtyp. (A) Wachstum der Mutante (graue Linie) im Vergleich zum Wildtyp (schwarze Linie) durch Messung der optischen Dichte (OD₆₀₀) im Verlauf der Zeit (n=2). (B) Amplifikat des Gens Sod_c02280 der Mutante mit Insert (3920bp, MT) im Vergleich zum Wildtyp ohne Insert (2120bp, WT) im Verlauf der Zeit (1kb-Leiter, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). (C) Amplifikate spezifischer Primerkombinationen: Spur 1-3 *S. plymuthica* 4Rx13 Wildtyp ohne Insert, Spur 5-7 *S. plymuthica* 4Rx13::c02280 mit Insert, Spur 1+5 Amplifikat für das gesamte Gen Sod_c02280, Spur 2+6 Amplifikat mit spezifischen sense-Primer für das Gen Sod_c02280 und antisense-Primer spezifisch für das Insert, Spur 3+7 Amplifikat mit spezifischen sense Primer für das Insert und spezifischen antisense Primer für das Gen Sod_c02280 (1kb-Leiter, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). (D) Chromatogramm zeigt die Emission der Volatile mit Sodorifen in NB-Medium nach 48h vom Wildtyp (schwarze Linie) im gespiegelten Vergleich zur Mutante (rote Linie) (n=2).

Dabei war kein Unterschied in dem Profil und im Besonderen in der Emission von Sodorifen zwischen Wildtyp und Mutanten zu erkennen. Mit diesen Experimenten wurde gezeigt, dass diese Gene keinen Einfluss auf die Emission von Sodorifen bei *Serratia plymuthica* 4Rx13 haben und somit als Biosynthese-Gene ausgeschlossen werden können.

3.1.3 Physiologische Untersuchungen der Sodorifen-Emission

Zusätzlich zu den oben aufgeführten Experimenten und Analysen könnten physiologische Untersuchungen weitere Hinweise über die Biosynthese von Sodorifen geben. Stehen Bakterien unterschiedliche Substrate zur Verfügung, kann der Primär- und Sekundärstoffwechsel entsprechend adaptiert werden (Gottschalk, 1979), so dass die Sodorifen-Emission mit unterschiedlich guten Substraten variieren könnte. Der Fokus der folgenden Untersuchungen lag in der Fütterung verschiedener Kohlenstoffquellen, da die Struktur von Sodorifen ausschließlich aus Kohlenstoff und Wasserstoff besteht (von Reuß et al. 2010).

3.1.3.1 Fütterungsversuche mit verschiedenen Kohlenstoffquellen

Mit Hilfe der SPME-GC/MS-Technik wurde der Einfluss verwendeter Kohlenstoffquellen auf die Emission von Sodorifen hin untersucht. Dafür wurde die Emission von *S. plymuthica* 4Rx13 relativ zu dem Kontrollmedium NB nach 24 h berechnet. Zusätzlich wurden die Zellzahlen zu jedem Untersuchungszeitpunkt analysiert. Insgesamt wurden das Komplexmedium NB, NB mit verschiedenen Glucose-Konzentrationen, ein Minimalmedium mit Glucose, verschiedene organische Säuren und verschiedene Aminosäure-Kombinationen oder organischen Säuren mit Aminosäuren im Kultivierungszeitraum von 0 - 72 h getestet (zusammengefasst in Tabelle 2 Anhang). Zunächst wurde die Sodorifen-Emission im Vergleich mit dem peptidhaltigen Komplexmedium NB und Minimalmedien bestehend aus Salzen und verschiedenen Aminosäure-Kombinationen analysiert (**Abb. 3-13**). Vier Aminosäure-Kombinationen führten zu einer höheren Sodorifen-Emission als in dem Komplexmedium. Mit His+Lys+Met, Ala+His+Met und Ala+Met+Thr wurden nach 48 h zwischen 27 und 116 % mehr Sodorifen detektiert als die maximale Emission mit Komplexmedium nach 24 h ergeben hatte. Vor allem die Kombination Ala+Met+Thr zeigt bereits nach 24 h durchschnittlich 50 % weniger Sodorifen als in NB nach 24 h. Nach 48 h liegt die Emission in dem Aminosäure-haltigem Medium durchschnittlich 116 % höher als bei NB-Medium nach 24 h, wohingegen die Emission in peptidhaltigem Medium nach 24 h sinkt. Die Kombinationen Ala+Cys+His, Glu+Met+Thr oder Iso+Leu+Val zeigten eine geringere bis gar keine Sodorifen Emission. Weiterhin wies die 2er-Kombination Ala+Met (20 mM je AS) nach 24 h eine 82 %ige Steigerung der Sodorifen Emission im Vergleich zum Komplexmedium (NB) auf, wohingegen bei Ala+Pro als auch Met+Thr nur sehr wenig Sodorifen

beobachtet wurde. Mit Alanin (55 mM) als einzige Kohlenstoffquelle konnte nach 48 h 40 % Sodorifen detektiert werden, was fast die Hälfte der Emission im Komplexmedium darstellt. Mit Methionin (55 mM) als alleinige Kohlenstoffquelle konnte keine Emission von Sodorifen verzeichnet werden. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in ausgewählten Kombinationen vor allem mit Alanin, Histidin, Methionin und Threonin relativ zu NB-Medium hohe Emissionen von Sodorifen detektiert werden konnten. Zu erwähnen ist, dass keine Korrelation zwischen Zellzahlen und Sodorife-Emission nachgewiesen werden konnte (**Tabelle 2 Anhang**).

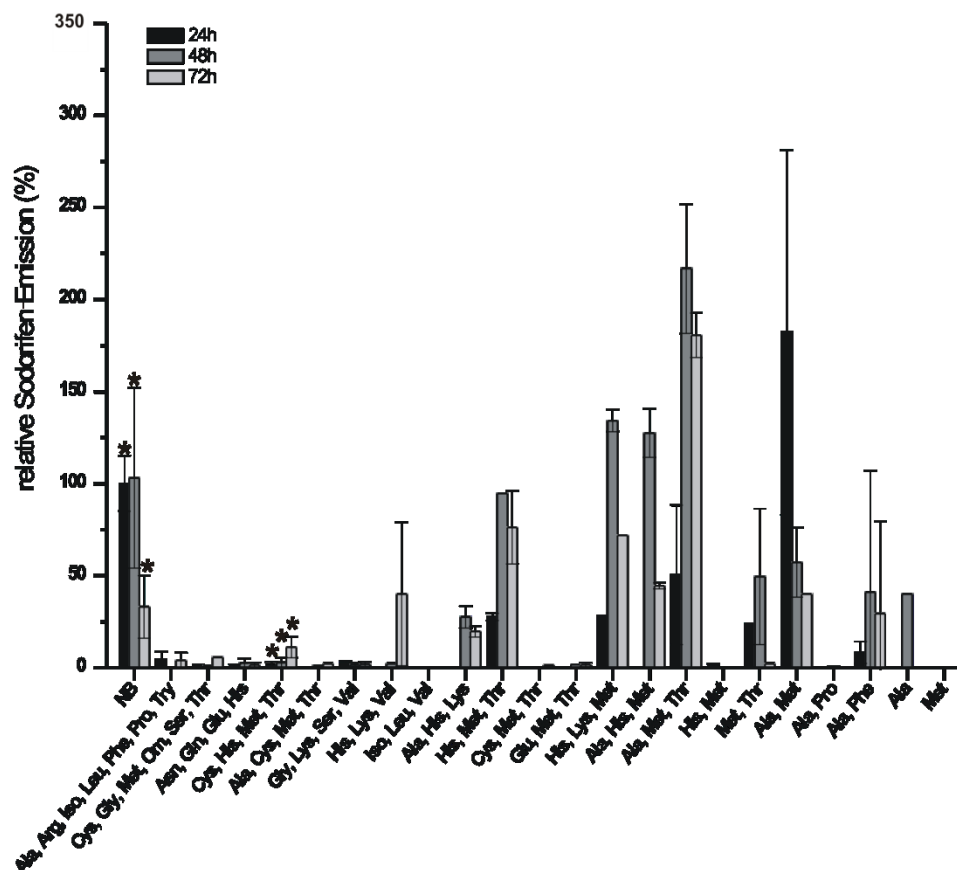


Abbildung 3-13: Sodorifen-Emission in Abhängigkeit vom Aminosäure-Angebot. *Serratia plymuthica* 4Rx13 wurde in Medium mit unterschiedlicher Zusammensetzung an Aminosäuren kultiviert. Nach 24h (schwarze Balken), 48h (dunkelgraue Balken) und 72h (hell graue Balken) wurden die Ansätze mittels SPME-Technik beprobt und GC/MS analysiert. Die Emission wurde anschließend relativ zu der detektierten Peakarea von Sodorifen nach 24h mit Komplexmedium (NB) bestimmt. Standardbalken mit *: Standardabweichung (n=3); Standardbalken ohne *: Differenz zum Mittelwert (n=2); kein Standardbalken (n=1).

Neben den Aminosäuren wurden weitere Kohlenstoffquellen getestet. Dabei wurde zunächst in die Sodorifen-Emission im Komplexmedium (NB; Kontrolle) mit dem Davis-Minimal-Medium mit Glucose (DMG; 55 mM) verglichen.

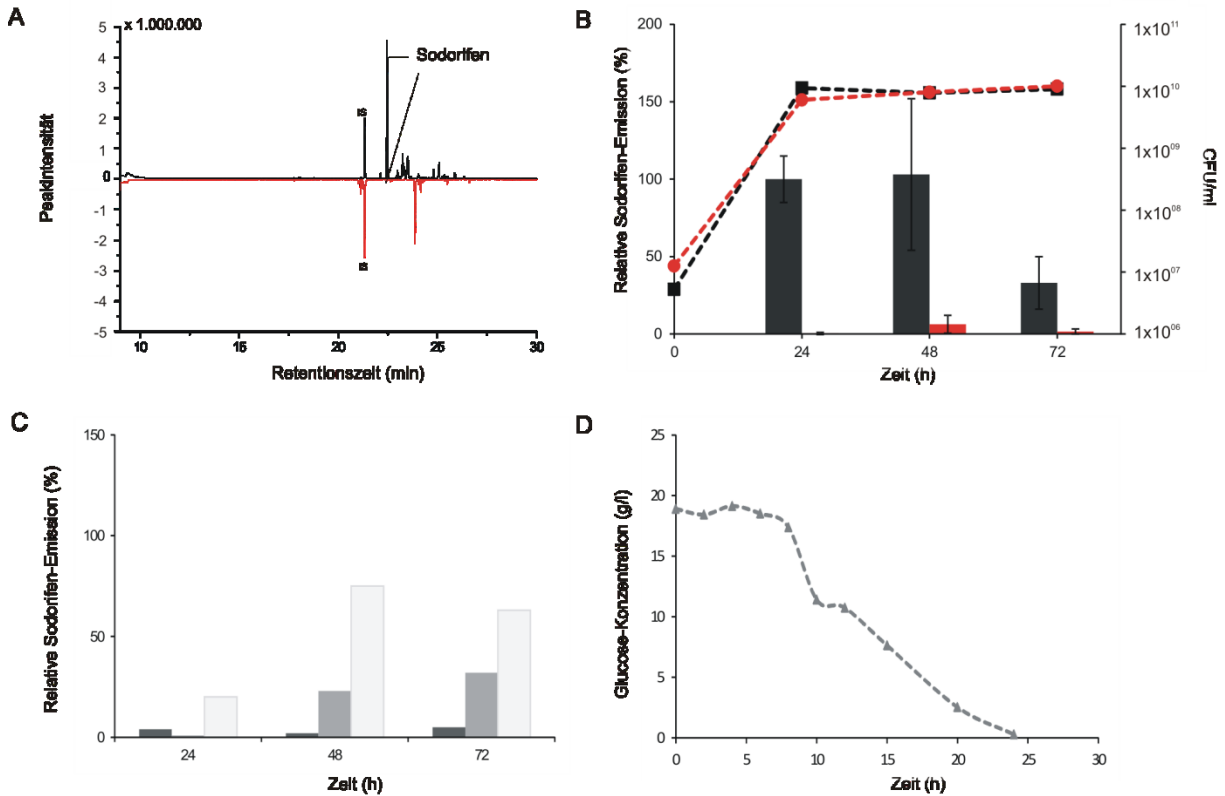


Abbildung 3-14: Sodorifen-Emission von *Serratia plymuthica* 4Rx13 in Abhängigkeit vom Glucose-Angebot.

(A) Chromatogramm einer SPME-GC/MS-Analyse nach 24 h Kultivierung der Bakterien in NB (schwarzer Kurvenverlauf) und in DMG-Medium (gespiegelter roter Kurvenverlauf). (B) Sodorifen-Emission und Lebendzellzahlen im Verlauf des Wachstums in NB (schwarz) und DMG-Medium (rot). Nach 24 h, 48 h und 72 h wurden 5 ml der Kulturen mittels SPME-GC/MS analysiert, die Sodorifen-Emission relativ zu der Emission in NB-Medium nach 24h berechnet. Das Wachstum wurde durch Bestimmung der Lebendzellzahl (CFU) dokumentiert. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=5-10) dar. (C) Sodorifen-Emission im Verlauf des Wachstums in NB + 10 mM (weiß-grau), + 50 mM (hellgrau), + 100 mM (dunkelgrau) Glucose. Nach 24 h, 48 h und 72 h wurden 5 ml der Kulturen mittels SPME-GC/MS analysiert und die Sodorifen-Emission relativ zu der Emission in NB-Medium nach 24h ausgewertet (n=1). (D) Die Glucose-Konzentration des Mediums wurde von einer *S. plymuthica* 4Rx13 Kultur (NB + 100 mM Glucose) mittels optisch-enzymatischen Test im Verlauf des Wachstums analysiert (n=1). IS (interner Standard).

Neben der Anzahl an detektierten, flüchtigen Verbindung (NB Medium 32 Verbindungen, DMG Medium 17 Verbindungen) unterschied sich auch die Emission von Sodorifen (**Abb. 3-14 A**, detaillierte Auswertung Abbildung 2, Tabelle 3 im Anhang). Mit Glucose als Kohlenstoffquelle wurde im Vergleich zum Kontrollmedium zu allen Messzeitpunkten bei vergleichbaren Zellzahlen weniger Sodorifen detektiert als im proteinhaltigen Komplexmedium (**Abb. 3-14 B**). Um den Einfluss von Glucose genauer zu untersuchen, wurden dem NB-Medium unterschiedliche Konzentrationen an Glucose (10 mM, 50 mM, 100 mM) zugefügt (**Abb. 3-14 C**). Der Verbrauch der Glucose (NB + 100 mM) während des Wachstums mit *S. plymuthica* 4Rx13 (0 - 72 h) wurde mit Hilfe eines optisch-enzymatischen Tests bestimmt. Bereits nach 24 h konnte keine Glucose im Medium der Bakterienkultur gemessen werden (n=3). Eine weitere detaillierte Analyse erfolgte in den ersten 24 h der Bakterienkultur und ergab die tendenzielle Abnahme der Glucose Konzentration gegen 0 g/l bis 24 h (**Abb. 3-14 D**).

Zusätzlich zu den Nährstoffversuchen mit Aminosäuren und Glucose wurden Pyruvat 55 mM) und die Carbonsäuren des Zitrat-Zyklus (jeweils 55 mM und pH 6,2) als Kohlenstoffquelle eingesetzt (Abb. 3-15).

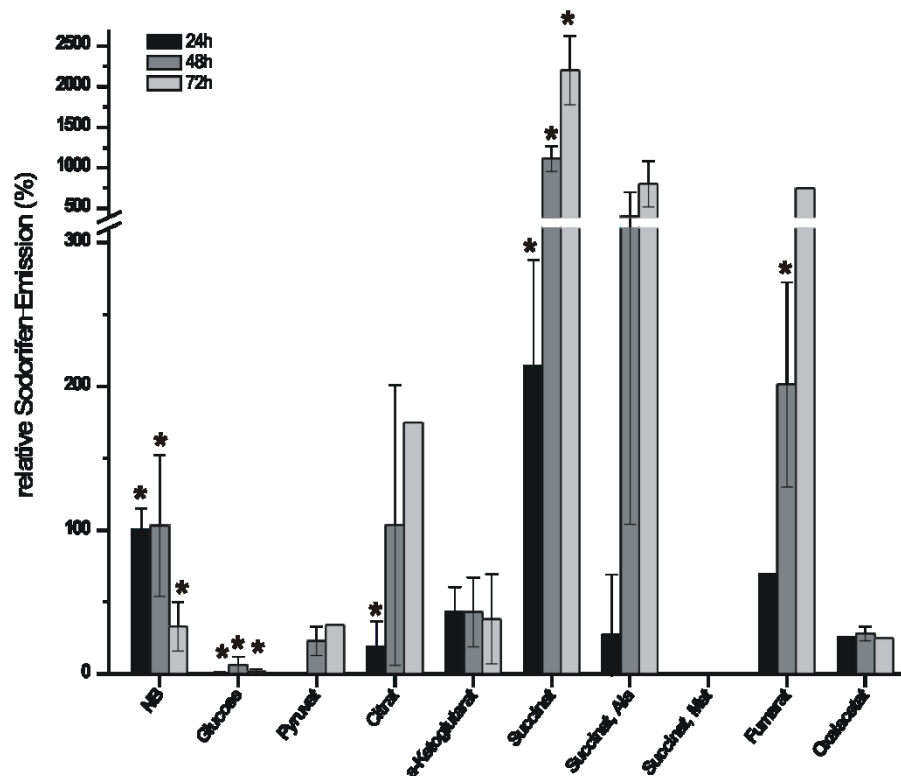


Abbildung 3-15: Sodorifen-Emission in Abhängigkeit von verschiedenen Kohlenstoffen. *Serratia plymuthica* 4Rx13 wurde in Medium mit Glucose, Pyruvat, Carbonsäuren oder Carbonsäuren in Kombination mit einer Aminosäure kultiviert. Das nach 24h (schwarze Balken), 48h (dunkelgraue Balken) und 72h (hellgraue Balken) an der SPME-Faser adsorbierte Sodorifen wurde mittels GC/MS analysiert und die Emission relativ zu der detektierten Peakarea von Sodorifen nach 24h mit Komplexmedium (NB) bestimmt. Standardbalken mit *: Standardabweichung (n=3); Standardbalken ohne *: Differenz zum Mittelwert (n=2); kein Standardbalken n=1.

Mit Pyruvat, Oxalacetat und α -Ketoglutarat (Abb. 3-15) wurden zu allen Messzeitpunkten weniger als die Hälfte der Sodorifen-Emission detektiert als im Kontroll-Medium (NB). Nach 72 h konnte mit Citrat im Medium ca. 75 % mehr Sodorifen detektiert werden. Gesteigert wurde diese Emission mit Fumarat als Kohlenstoffquelle, nach 72 h wurde 7-mal so viel Sodorifen analysiert. Das Emissionsmaximum der Fütterungsexperimente wurde jedoch mit Succinat erreicht. Nach 48 h Kultivierung der Bakterien wurde durchschnittlich das 10-fache und nach 72h das 20-fache an Sodorifen mittels SPME-GC/MS aufgezeichnet als beim Wachstum auf NB-Medium. Mit Zugabe der Aminosäure Alanin (20 mM) in das Medium mit Succinat (55 mM, pH 6,2) reduzierte sich die Emission gegenüber Succinat ohne Alanin etwa um die Hälfte. Wurde dem Medium mit Succinat die Aminosäure Methionin zugefügt, konnte dagegen kein Sodorifen

detektiert werden. Mit Malat, Propionate und Acetat als Kohlenstoffquelle erfolgte trotz der Einstellung des pH-Wertes auf pH 6,2 kein Wachstum. Die Zugabe von Malat und Propionat in eine 24 h Batchkultur (DMG Medium) ermöglichte zwar das Zellwachstum, aber auch hier konnte kein Sodorifen nachgewiesen werden. Demnach konnte in den bisherigen Analysen mit Succinat als Kohlenstoffquelle im Medium von *S. plymuthica* 4Rx13 die höchste Sodorifen-Emission detektiert werden. Parallel zu den Analysen, wurde randomisiert der pH-Wert der Bakterienprobe mit Hilfe von pH-Papier analysiert (Tabelle 2 im Anhang). In dem Kontrollmedium NB veränderte sich der pH-Wert der Bakterien-Kultur innerhalb der ersten 24 h von pH 6,3 bis 8,1. Diese pH-Veränderung war nicht im DMG-Medium (geringe Sodorifen-Emission) als auch mit Ala+ Met oder Fumarat als Kohlenstoffquelle (starke Sodorifen-Emission) zu beobachten.

3.1.3.2 Fütterungsversuche mit ^{13}C -markierten Substraten

Die Kernspinresonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance spectroscopy* - NMR spectroscopy) ermöglicht die Strukturaufklärung von Molekülen wie Sodorifen. Dabei wird die Eigenschaft des magnetischen Momentes u.a. von ^{13}C -Atomen genutzt (Breitmaier, 2012). Durch die Fütterung ^{13}C -markierter Substrate im Medium von Bakterienkulturen kann der Einbau der markierten Atome in die Stoffwechselprodukte von Bakterien analysiert werden, die Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden Stoffwechselwege zulassen (Gao et al. 1998). Das Substrat Succinat führte als Kohlenstoffquelle im Medium von *S. plymuthica* 4Rx13 zur bisher stärksten detektierten Emission von Sodorifen. Mit Hilfe von NMR-Analysen sollte der Einbau von $[1,4-^{13}\text{C}_2]$ -Succinat und $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ -Succinat ins Sodorifen-Molekül untersucht werden. Die Bakterien wurden mit 55 mM Succinat (20% markiert / 80 % unmarkiert) als Kohlenstoffquelle im VOC-Sammelsystem angezogen und die Volatile mit Sodorifen an einer Super-Q Matrix von 24 - 72 h adsorbiert. Nach Elution mit D_6 -Benzol wurden drei Eluate jedes markierten Substrates zunächst mittels GC/MS vermessen und dann in Kooperation mit den Naturstoffchemikern Wittko Francke (Universität Hamburg, Deutschland) und Stephan von Reuß (ehemals Cornell Universität, USA; aktuell MPI Jena, Deutschland) mit breitband-entkoppelter ^{13}C -NMR analysiert und ausgewertet.

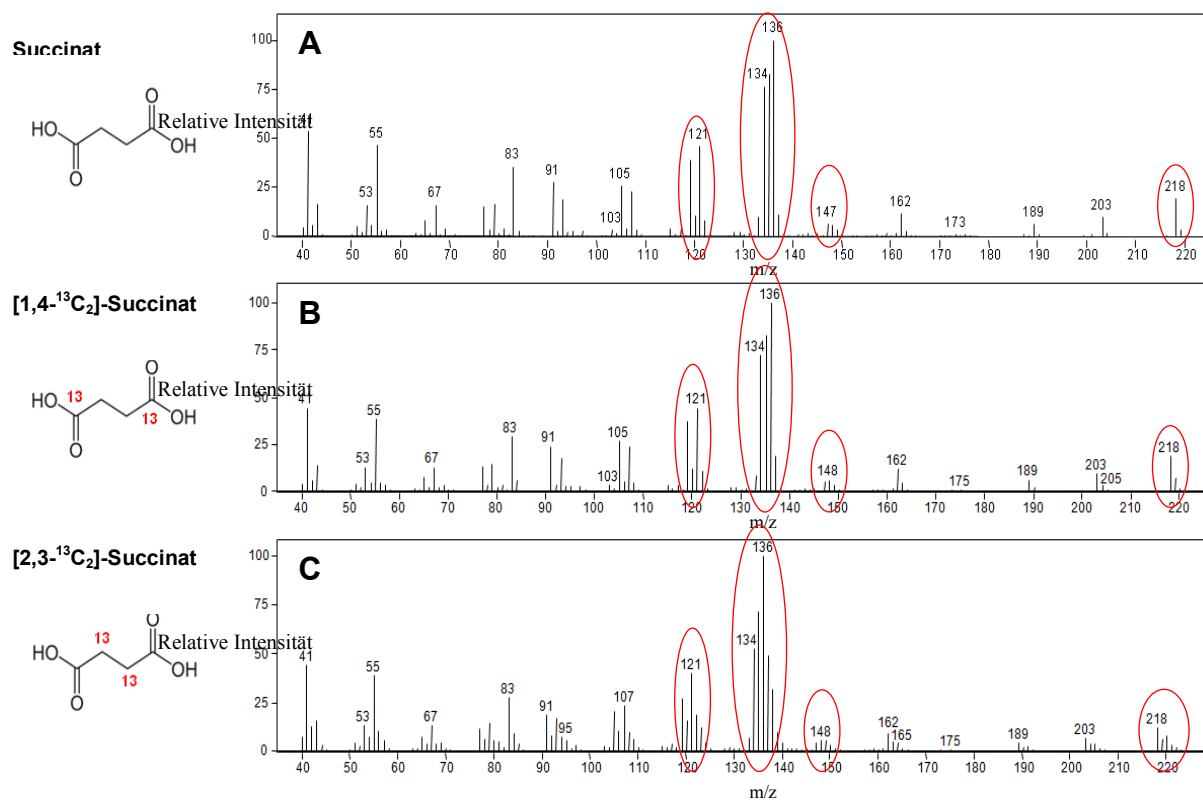


Abbildung 3-16: GC/MS-Spektren von Sodorifen. *Serratia plymuthica* 4Rx13 wurde in Medium mit unmarkiertem Succinat (A) und markiertem [¹³C₂]-Succinat (B, C) im VOC-Sammelsystem kultiviert. Die Adsorption der Volatile an der Super-Q Matrix erfolgte im Wachstumsintervall zwischen 24-72h. Die Volatile wurden mit D₆-Benzol eluiert und mittels GC/MS analysiert. Die EI-Massenspektren von Sodorifen wurden einander gegenüber gestellt. EI-Massenspektren A: Kontrolle unmarkiertes Sodorifen, B: [¹³C₂]-Sodorifen nach Einbau von [1,4-¹³C₂]-Succinat, C [¹³C₂]-Sodorifen nach Einbau von [2,3-¹³C₂]-Succinat. Rote Kreise: exemplarische Unterschiede zwischen den verwendeten Substraten.

Die GC/MS - Analysen der bakteriellen Kulturen mit dem markierten Succinat zeigen einen erfolgreichen Einbau der ¹³C-Atome ins Sodorifen Molekül (Abb. 3-16). Mit unmarkiertem Succinat weist Sodorifen einen Massenpeak von 218 auf. Zusätzlich ist durch das natürlich vorkommende ¹³C-Atom M+1+ zu erkennen (Abb. 3-16 A). Dagegen zeigt dieses Fragment in den Massenspektren von Sodorifen mit markiertem Succinat eine höhere relative Intensität. Weiterhin ist mit Fütterung von [1,4-¹³C₂]-Succinat M+2+ und mit [2,3-¹³C₂]-Succinat M+4+ zu erkennen (Abb. 3-16 B und C). Im Vergleich zur unmarkierten Kontrolle finden sich zusätzliche Massen bei der Masse 136 des Pentamethyl-Rings als auch bei den Massen 105, 121, 147 und 203 wieder. Insgesamt zeigt ein Vergleich der Massenspektren mit den verschiedenen markierten Succinat-Substraten eine größere Anzahl zusätzlicher Fragmente in Sodorifen mit [2,3-¹³C₂]-Succinat als mit [1,4-¹³C₂]-Succinat. Dieses Ergebnis spiegelt sich ebenfalls in den NMR-Spektren wider (Abb. 3-17). Mit [2,3-¹³C₂]-Succinat (Abb. 3-17 B) sind deutlich mehr Signale im Sodorifen sichtbar als mit [1,4-¹³C₂]-Succinat (Abb. 3-17 A).

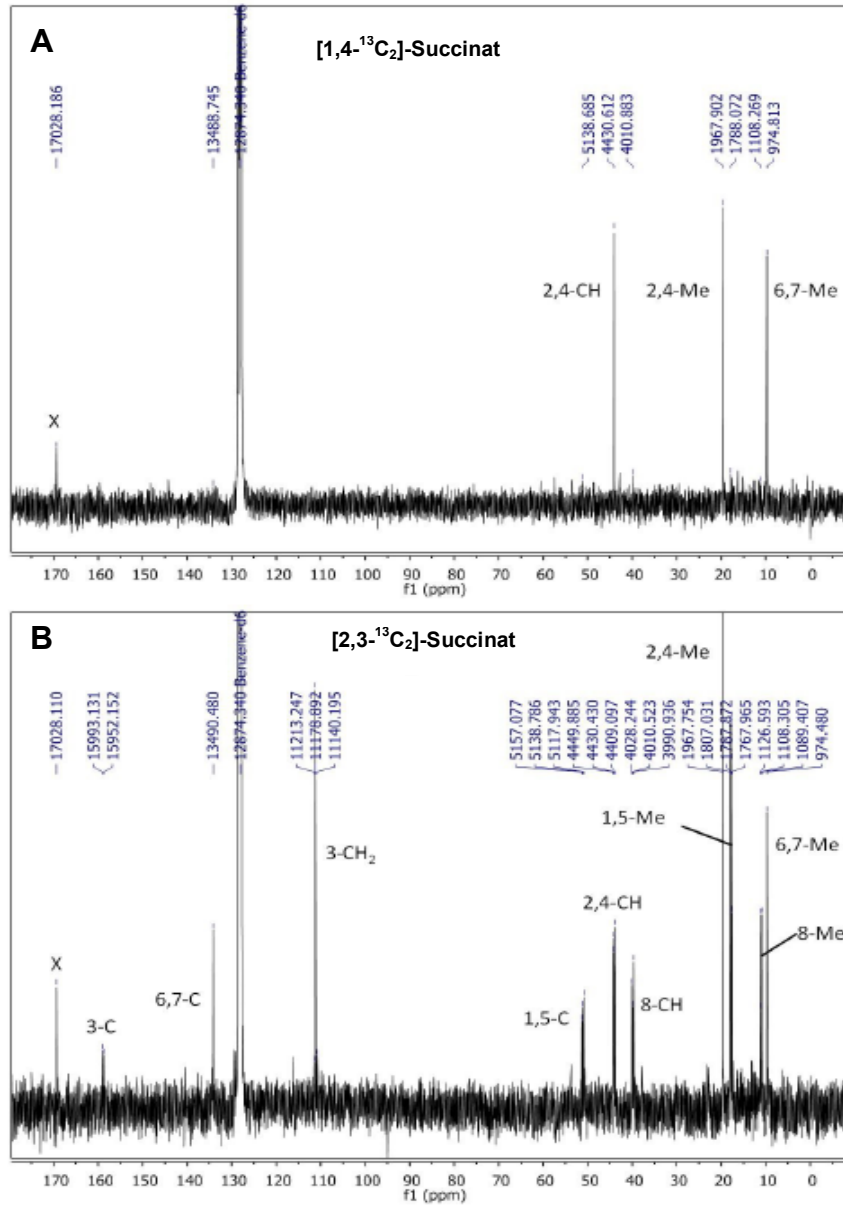


Abbildung 3-17: ^{13}C -NMR-Spektren von Sodorifen. *Serratia plymuthica* 4Rx13 wurde in Medium mit markiertem $[^{13}\text{C}_2]$ -Succinat im VOC-Sammelsystem kultiviert. Die Adsorption der Volatile an der Super-Q Matrix erfolgte im Wachstumsintervall zwischen 24-72h mit anschließender Elution durch D_6 -Benzol. Die Eluate wurden mittels breitbandentkoppelter ^{13}C -NMR (100 MHz) analysiert und der Einbau von $[1,4-^{13}\text{C}_2]$ -Succinat (**A**) und $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ -Succinat (**B**) in Sodorifen analysiert. x : interner Standard, horizontale Bezeichnung: Kohlenstoffposition in Sodorifen. (Erstellt von S. v. Reuß).

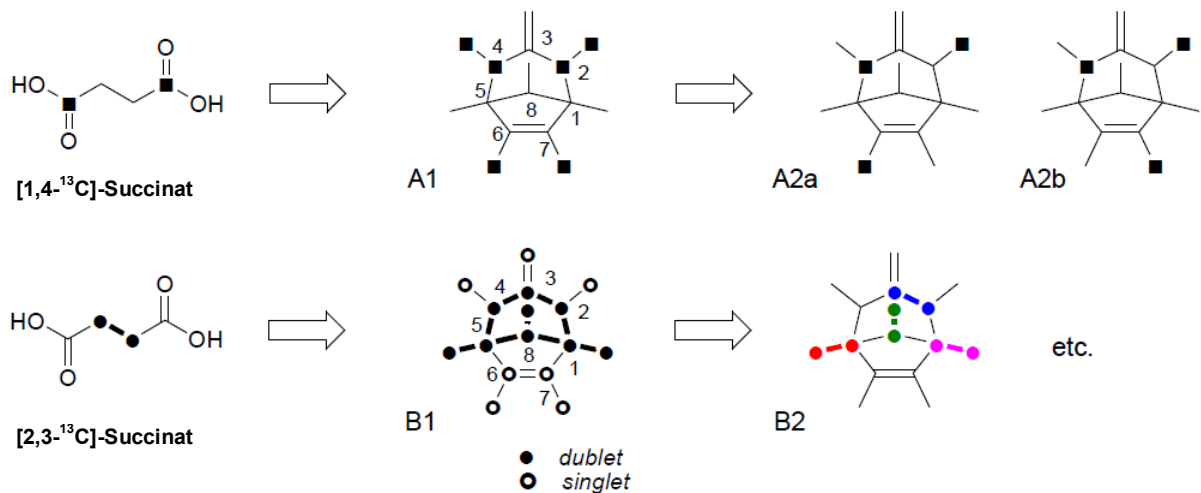


Abbildung 3-18: Schematische Interpretation der ^{13}C -NMR-Spektren von Sodorifen. Links: gefütterte Kohlenstoffquellen ($[1,4-^{13}\text{C}_2]$ -Succinat, $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ -Succinat), Mitte: Zusammenfassung aller Kohlenstoff Positionen, die durch ^{13}C -markiert sind (A1, B1), Rechts: mögliche Einbau-Konstellationen der ^{13}C -Atome in Sodorifen (A2a, A2b, B2), 1-8: Anzahl und Position der Kohlenstoff-Atome von Sodorifen; schwarzes Kästchen: Position des markierten Kohlenstoff-Atoms (^{13}C) von $[1,4-^{13}\text{C}_2]$ -Succinat; schwarzer Kreis: Position des markierten Kohlenstoff-Atoms (^{13}C) von $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ -Succinat; nicht gefüllter Kreis: Singulett-Signal im ^{13}C -NMR-Spektrum; gefüllter Kreis: Duplett-Signal im ^{13}C -NMR-Spektrum. (Erstellt von S. v. Reuß)

Die Signale der NMR-Spektren mit $[1,4-^{13}\text{C}_2]$ -Succinat können folgenden Kohlenstoffpositionen in Sodorifen zugeordnet werden: 2/4-CH, 2/4-CH₃ und 6/7-CH₃ (Abb. 3-18 A1). Weiterhin sind in dem Spektrum nur Singulett-Signale und keine Duplett-Signale zu sehen, so dass von einem Einbau entweder an Position 2- oder 4-CH und 2- oder 4-CH₃ ausgegangen wird (Abb 3-18 A2a und A2b). Das NMR-Spektrum mit $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ -Succinat zeigt einen Einbau der markierten ^{13}C -Atome an jeder Kohlenstoffposition in Sodorifen (Abb. 3-18 B1). Dabei konnten Singulett-Signale den Positionen 2/4-CH₃, 3-CH₂, 6/7-C und 6/7-CH₃ und Duplett-Signale 3-C, 1/5-C, 1/5-CH₃, 2/4-CH, 8-CH und 8-CH₃ zugeordnet werden. Die Duplett-Signale erscheinen durch den gekoppelten Einbau von $^{13}\text{C}_2$ -Einheiten aus $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ -Succinat. Diese Duplett-Signale weisen auf den Einbau mehrerer $^{13}\text{C}_2$ -Einheiten in Sodorifen: 1- $[^{13}\text{C}-^{13}\text{CH}_3]$ und/oder 5- $[^{13}\text{C}-^{13}\text{CH}_3]$, 2,3- $[^{13}\text{CH}-^{13}\text{C}]$ und 8- $[^{13}\text{CH}-^{13}\text{CH}_3]$. In beiden Spektren ist auffällig, dass ein Einbau an Position 2/4-CH, 2/4-CH₃ und 6/7-CH₃ durch beide Substrate $[1,4-^{13}\text{C}_2]$ -Succinat und $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ -Succinat in Sodorifen erfolgt. Weiterhin wurde $[\text{U}-^{13}\text{C}_4]$ -Succinat gefüttert und der Einbau in Sodorifen analysiert. Die NMR-Spektren zeigen keine Unterschiede in den Signalen zwischen dem Einbau von $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ -Succinat und $[\text{U}-^{13}\text{C}_4]$ -Succinat (Abb. 3-19 B und C).

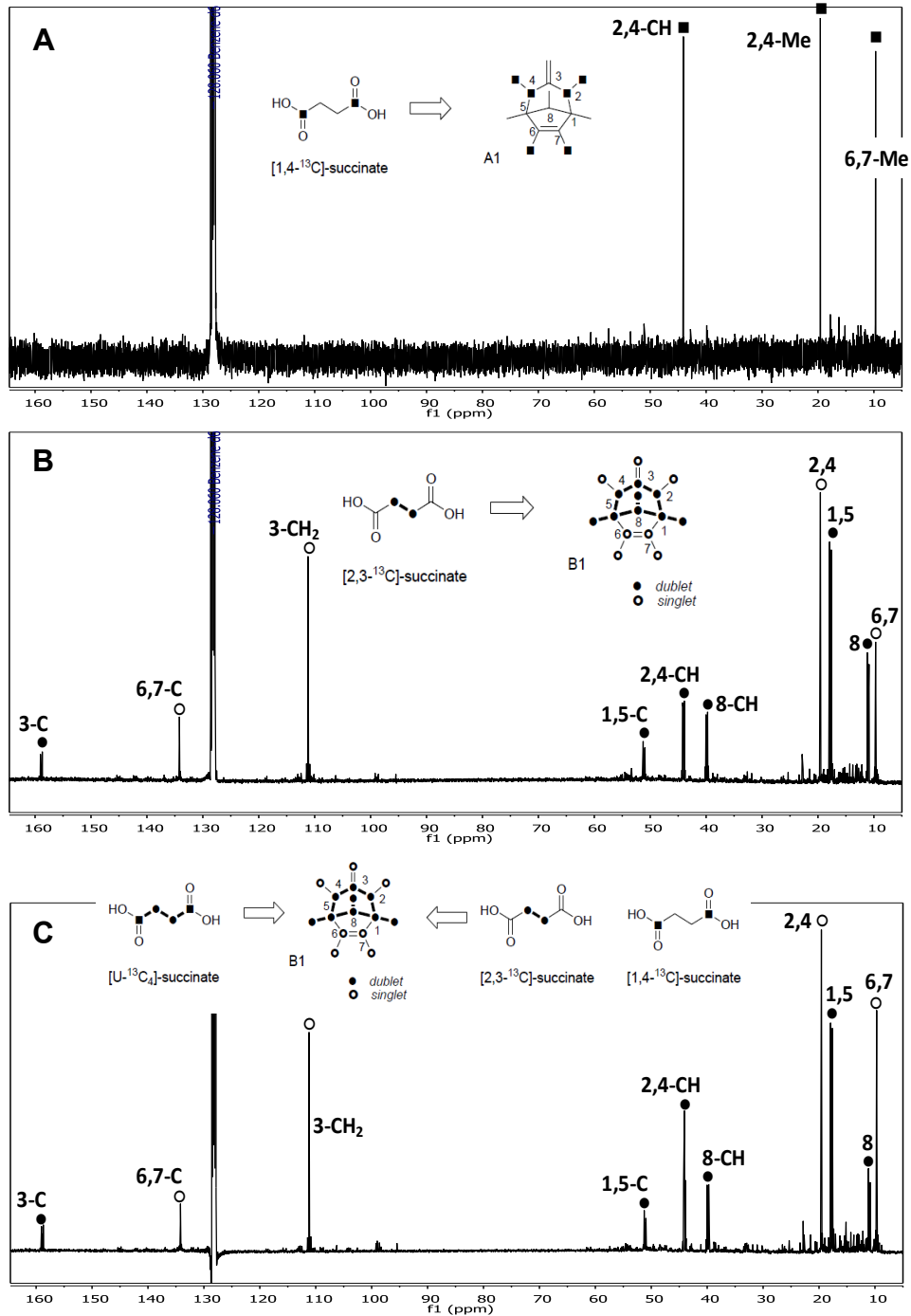


Abbildung 3-19: ^{13}C -NMR-Spektren von Sodorifen. *Serratia plymuthica* 4Rx13 wurde in Medium mit $[^{13}\text{C}]$ -Succinat im VOC-Sammelsystem kultiviert. Die Adsorption der Volatile an der Super-Q Matrix erfolgte im Wachstumsintervall zwischen 24-72h mit anschließender Elution durch D_6 -Benzol. Die Eluate wurden mittels breitband-entkoppelter ^{13}C -NMR (100 MHz) analysiert und der Einbau von $[1,4-^{13}\text{C}_2]$ -Succinat (A), $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ -Succinat (B) und $[U-^{13}\text{C}_4]$ -Succinat (C) in Sodorifen im Vergleich analysiert. Die Interpretation der Signale ist zusätzlich schematisch in den Spektren eingefügt. Links: gefütterte Kohlenstoffquellen ($[1,4-^{13}\text{C}_2]$ -Succinat, $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ -Succinat), Mitte: Zusammenfassung aller Kohlenstoff Positionen, die durch ^{13}C -markiert sind (A1, B1), 1-8: Anzahl und Position der Kohlenstoff-Atome von Sodorifen, schwarzes Kästchen: Position des markierten Kohlenstoff-Atoms (^{13}C) von $[1,4-^{13}\text{C}_2]$ -Succinat, schwarzer Kreis: Position des markierten Kohlenstoff-Atoms (^{13}C) von $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ -Succinat, nicht gefüllter Kreis: Singulet-Signal im ^{13}C -NMR Spektrum, gefüllter Kreis: Duplett-Signal im ^{13}C -NMR-Spektrum, horizontale Peakbezeichnung: Position in Sodorifen. (Erstellt von S. v. Reuß)

Zusätzlich zur Adsorption von Sodorifen an Super-Q mit anschließender Elution und NMR-Analyse, wurde der verbleibende Bakterienkultur zentrifugiert und der Überstand mittels $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HSQC (*heteronuclear single quantum correlation*) und HMBC (*heteronuclear multiple bond correlation*) analysiert. Dabei wurden folgende markierte Verbindungen aus dem Zitrat-Zyklus detektiert: Succinat, Citrat, Fumarat, Pyruvat und Acetat. Weiterhin konnte Valine-Carbamid detektiert werden, dessen Isotopenmuster vergleichbare Fragmente mit Sodorifen zeigte. Einen Zusammenhang zwischen der Valin-Biosynthese, deren Intermediaten und der Sodorifen-Biosynthese ist zu postulieren. Insgesamt zeigen die Fütterungsversuche mit ^{13}C -markiertem Succinat, dass die Carboxylgruppen von Succinat an 4 C-Positionen der Methylgruppen von Sodorifen und 2 C-Positionen im Cyclohexyl-Ring eingebaut werden können. Das 2te und 3te Kohlenstoffatom vom Succinat ist dagegen in allen Kohlenstoffpositionen zu finden. 9 C-Positionen weisen dabei auf einen gekoppelten Einbau beider C-Atome hin, die vor allem den Cyclohexyl Ring von Sodorifen bilden. Ein Einbau von C_4 -Einheiten kann ausgeschlossen werden und lässt den Einbau von C_2 - und C_3 -Einheiten zu. Die Ergebnisse mit nicht markierten Substraten lassen zusammen mit den Analysen des Bakterienüberstandes der markierten Kulturen das Szenario zu, dass die Kohlenstoffatome vom Succinat zunächst in dem Aminosäure-Metabolismus verstoffwechselt und letztendlich während der Biosynthese in Sodorifen eingebaut werden.

3.1.4 Sodorifen-Emission unter ökologisch relevanten Nährstoffbedingungen

Neben der Biosynthese ist die Funktion von Sodorifen für das Bakterium als auch dessen Umwelt von Interesse. Da alle bisherigen Untersuchungen unter artifiziellen Nährstoffbedingungen erfolgten, wurde ein Medium zur Anzucht der Bakterien verwendet, dessen Nährstoffgehalt die im Boden vorkommenden Nährstoffbedingungen imitieren. Die Nährstoff-Konzentrationen entsprechen lehmhaltiger Erde mit einem neutralen pH - Wert, was auf die bevorzugten Standortbedingungen von *Brassica napus*, dem Isolationsursprung von *Serratia plymuthica* 4Rx13 (Berg et al. 2002), zutrifft. In dem erdähnlichen Medium (*soil solution equivalent* Medium, SSE-Medium, Angle et al. 1991) wurde *S. plymuthica* 4Rx13 im VOC-Sammelsystem angezogen und die Volatile an einer Super-Q Matrix von 0 - 48 h adsorbiert. Nach Elution mit Lösungsmittel wurde das Eluat mittels GC/MS analysiert und ausgewertet. Das VOC-Profil zeigt neben weiteren Verbindungen einen Peak, der eindeutig Sodorifen zuzuordnen ist (**Abb. 3-2, # 1**), so dass geschlussfolgert wird, dass *S. plymuthica* 4Rx13 in dem erdähnlichen Medium Sodorifen synthetisiert und emittiert.

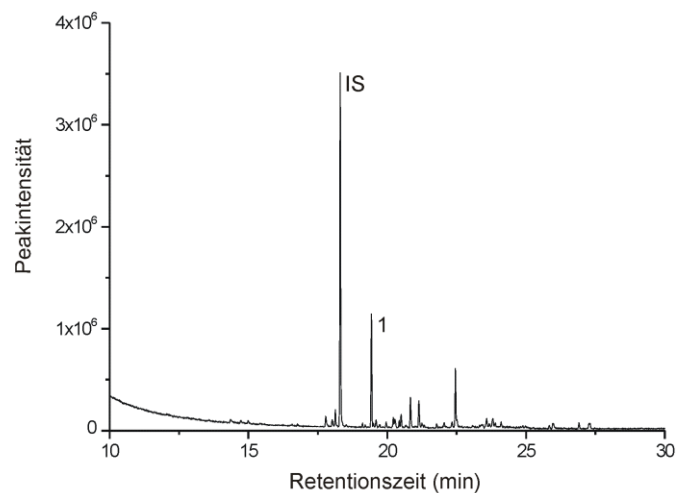


Abbildung 3-20: VOC-Profil von *Serratia plymuthica* 4Rx13 mit soil solution equivalent-Medium (SSE-Medium). *S. plymuthica* 4Rx13 wurde in soil solution equivalent-Medium (SSE, Angle et al. 1991) im VOC-Sammelsystem kultiviert und die emittierten Volatile an der Super-Q Matrix adsorbiert. Das Eluat wurde anschließend mittels GC/MS analysiert und Sodorifen nach Co-Injektion mit der Reinsubstanz identifiziert. IS: interner Standard, Peak 1: Sodorifen.

3.2 Einfluss bakterieller Volatile auf das Wachstum von *Arabidopsis thaliana*

Der inhibitorische Einfluss bakterieller Volatile auf das Wachstum von *Arabidopsis thaliana* Col-0 wurden von Vespermann et al. (2007) gezeigt. Detaillierte Untersuchungen auf physiologischer, transkriptioneller und metabolischer Ebene zeigten die Auswirkungen dieser Interaktion auf *A. thaliana* (Wenke et al. 2012 a, b). Die Ergebnisse dieser Analysen führten zu den Fragestellungen, ob sich einerseits dieser Einfluss zwischen *A. thaliana*-Akzessionen unterscheidet und sich die Pflanzen von dem biotischen Einfluss der bakteriellen Volatile regenerieren können und andererseits welche aktiv wirkenden Verbindungen der Bakterien diesen Einfluss induzieren.

3.2.1 Einfluss bakterieller Volatile auf verschiedene *A. thaliana*-Akzessionen

Die Gen-Expression von *A. thaliana* wurde während der Co-Kultivierung mit *S. plymuthica* HRO-C48 mit Hilfe von Micro-Array-Analysen zu definierten Zeitpunkten untersucht (Wenke et al. 2012). Ein *in silico* Vergleich der durch bakterielle Volatile induzierten Gen-Expression mit Datensätzen von *A. thaliana*-Akzessionen zeigte deutliche Expressionsunterschiede verschiedener Gene, die nicht genauer definiert wurden (Katrin Wenke, Universität Rostock, Deutschland, nicht veröffentlicht). Zusätzlich ist in der Literatur der Einfluss abiotischer sowie biotischer Faktoren auf das Wachstum von natürlich vorkommenden Pflanzen-Akzessionen beschrieben (Koornneef et al. 2004, Hasdai et al. 2006, Carmo et al. 2007, Bouchabke et al. 2008).

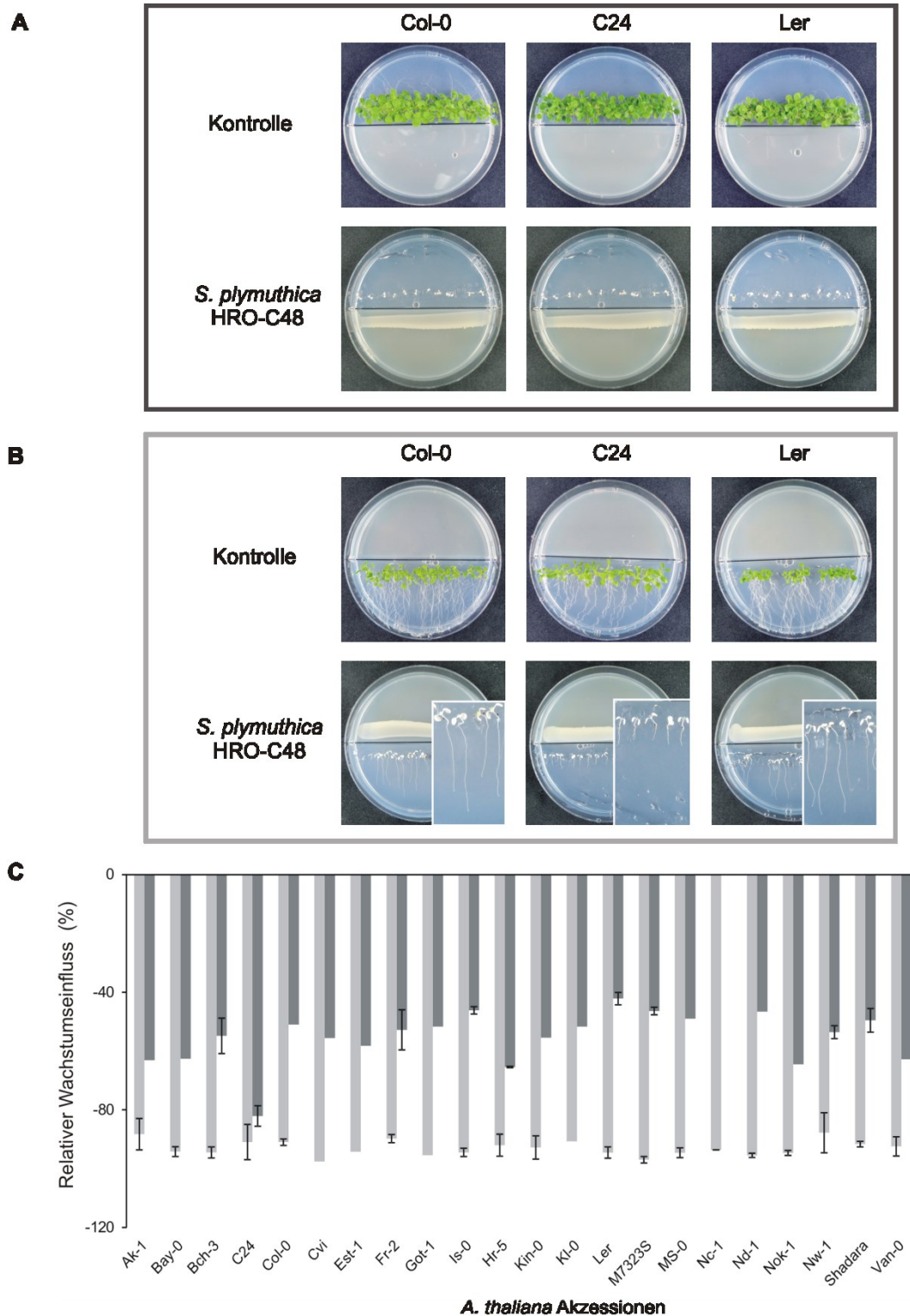


Abbildung 3-21: Einfluss bakterieller Volatile auf das Wachstum von *Arabidopsis thaliana*-Akzessionen. Die oberirdische Frischmasse (Tag 10, **A**) und die Primärwurzellänge (Tag 5, **B**) wurden nach Co-Kultivierung von *Serratia plymuthica* HRO-C48 und 22 Akzessionen von *A. thaliana* bestimmt und relativ mit den entsprechenden Kontrollen ohne Einfluss bakterieller Volatile (0 %) verglichen (**C**). Dunkelgrauer Balken: Wurzellänge (Mittelwerte \pm Differenz zum Mittelwert mit $n=2$ mit 2 Parallelen); hellgrauer Balken: oberirdische Frischmasse (Mittelwerte \pm Standardabweichung mit $n=3$ mit 2-5 Parallelen). Achkarren/DE Ak-1, Bayreuth/DE Bay-0, Buchen/DE Beh-3, Coimbra/PT C24, Columbia/MO Col-0, Kapverdische Inseln Cvi, Estland/EE Est-1, Frankfurt/DE Fr-2, Göttingen/DE Got-1, Isenburg/DE IS-1, Großbritannien/unbekannte Herkunft Hr-5, Kendaville/MI Kin-0, Kaiserslautern/DE Kl-0, Landsberg/DE Ler, unbekannte Herkunft M7323S, Moskau/RU MS-0, Ville en Vermois/France Nc-1, Niederlenz/DE Nd-1, Noordwijk/NL Nok-1, Neuweilnau/DE Nw-1, Pamiro Alay/TJ Shadara, Vancouver/BC Van-0.

Da bakterielle Volatile als biotische oder abiotische Umweltfaktoren für Pflanzen angesehen werden können, wurden 22 ausgewählte Akzessionen in kompartimentierten Petrischalen mit *Serratia plymuthica* HRO-C48 in Co-Kultur getestet. Der Einfluss der bakteriellen Volatile auf das Wachstum der Pflanzen wurde 10 Tagen nach Inokulation der Bakterien anhand der oberirdischen Frischmasse und der Länge der Primärwurzeln untersucht. Bei allen getesteten Akzessionen wurde eine Wachstumsinhibition der Blätter und Stängel zwischen 88 % und 97 % relativ zu den entsprechenden Kontrollpflanzen dokumentiert (**Abb. 3-21 A und C**). Weiterhin waren keine phänotypischen Unterschiede zwischen den Akzessionen erkennbar. Ein ähnliches Ergebnis zeigt die Auswertung der Wurzellänge, die von allen Akzessionen relativ zu den Kontrollpflanzen inhibiert wurde (**Abb. 3-21 B und C**). Der negative Einfluss der bakteriellen Volatile variierte zwischen 50 % und 65 %, Ausnahmen dazu waren Ler mit 42 % und C24 mit 82 %. Abgesehen von diesen beiden Ausnahmen, konnte kein signifikant unterschiedlicher Einfluss der bakteriellen Volatile auf das Wachstum der verschiedenen *A. thaliana*-Akzessionen verzeichnet werden

3.2.2 Regeneration von *A. thaliana* nach Einfluss bakterieller Volatile

Die flüchtigen Verbindungen von *Serratia plymuthica* HRO-C48 führten in Co-Kultur mit *A. thaliana* bereits nach 3 Tagen zu merklichen phänotypischen Veränderungen, die in den folgenden Tagen zu deutlichen Chlorosen führten (Wenke et al. 2012). Es sollte der Frage nachgegangen werden, zu welchem Zeitpunkt der Co-Kultur nach Entfernung der bakteriellen flüchtigen Verbindungen sich die Pflanzen wieder erholen können. Deshalb wurden die Bakterien und damit der Einfluss der bakteriellen Volatile zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Co-Kultivierung mit *A. thaliana* (nach 24 h - 72 h) entfernt. Danach kultivierten die Pflanzen weiter bis Tag 6 ehe die oberirdische Frischmasse relativ zu den Kontrollen bestimmt wurde (**Abb. 3-22**). Je später der Agar mit den Bakterien entfernt wurde und je länger die Pflanzen den bakteriellen Volatilen ausgesetzt waren, desto stärker wurde das Pflanzenwachstum negativ beeinträchtigt (bis 88,61 %) und chlorotische Symptome wurden sichtbar (**Abb. 3-22 A und B**). Bereits 48 h Co-Kultivierung führte zu irreversiblen Wachstumsschäden der Pflanzen. Waren die Pflanzen den Volatilen von *S. plymuthica* dagegen nur kurzzeitig ausgesetzt (≤ 34 h), konnte kein signifikanter Einfluss auf das Wachstum (3,89 %) und den Phänotyp der Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollen ermittelt werden. Somit entscheidet die Zeitspanne, den die Pflanzen den bakteriellen Volatilen in diesen Experimenten ausgesetzt sind, über die Vitalität und das weitere Wachstum der Pflanzen.

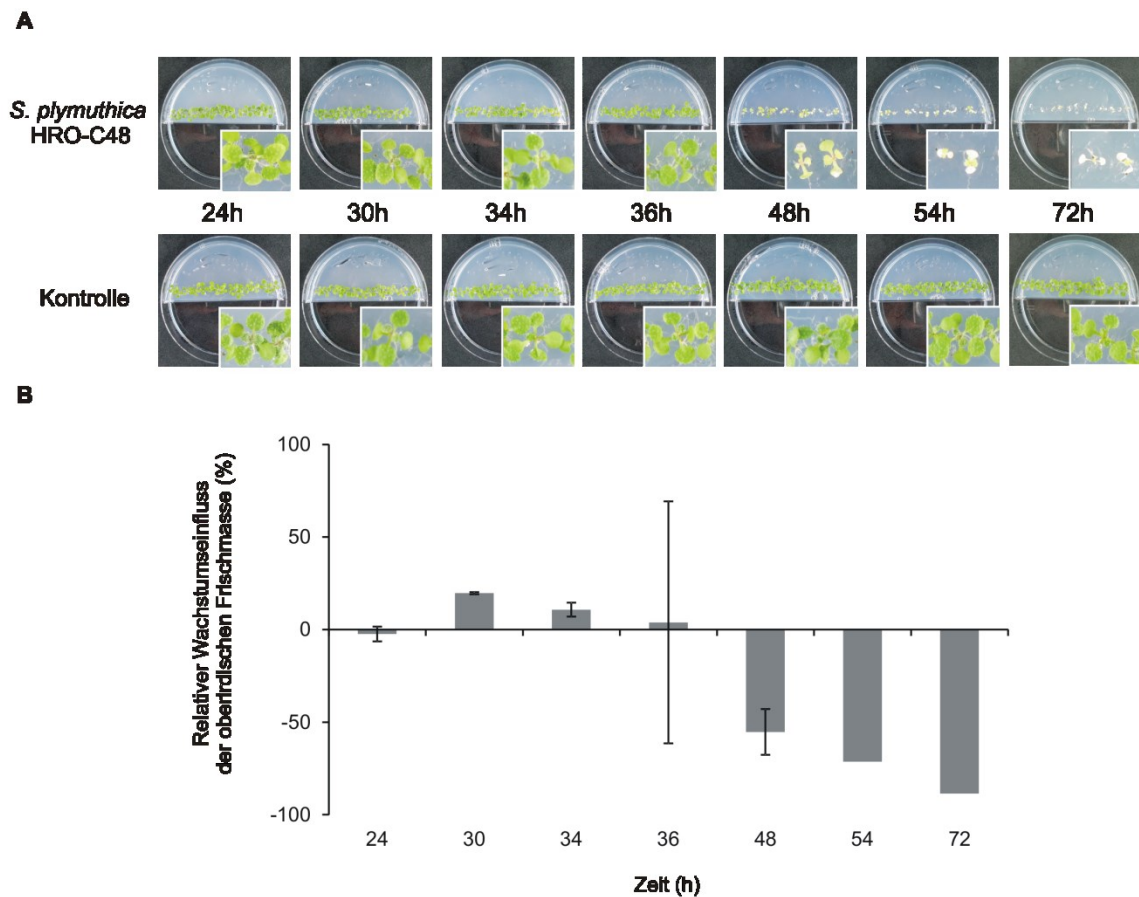


Abbildung 3-22: Regenerierung von *Arabidopsis thaliana* nach Entfernen der Bakterien und Entlüften der emittierten Volatile. Die Co-Kulturrückführung von *A. thaliana* Col-0 und *Serratia plymuthica* HRO-C48 wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (24 - 72 h nach Inokulation) gestoppt, indem die Bakterien mit den emittierten Volatilen entfernt wurden. *A. thaliana* wurde bis Tag 6 weiter kultiviert. In Abhängigkeit der getesteten Zeiträume wurden phänotypische Veränderungen der Pflanzen (A, obere Reihe) fotografisch erfasst und mit den Kontrollen (A, untere Reihe) verglichen. Die oberirdische Frischmasse wurde relativ zu den Kontrollen ohne Einfluss von Bakterien (0 %) bestimmt und im Diagramm (B) aufgetragen. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=3 mit 2-5 Parallelen) dar.

3.2.3 Emission von bakteriellen anorganischen Volatilen und deren Einfluss auf *Arabidopsis thaliana*

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass bakterielle Volatile einen vergleichbar negativen Einfluss auf das Wachstum verschiedener *Arabidopsis thaliana*-Akzessionen haben und dass deren qualitative und quantitative Emission vom Nährstoffangebot der Bakterien reglementiert wird. Dementsprechend sollte überprüft werden, welchen Einfluss diese unterschiedlichen Profile von *Serratia plymuthica* 4Rx13 bedingt durch unterschiedliche Substrate, auf das Wachstum von *A. thaliana* haben kann. Dabei wurde der Fokus auf aktive volatile Einzelverbindungen gelegt.

3.2.3.1 Einfluss bakterieller Volatile auf das Wachstum von *A. thaliana* bei unterschiedlichen Nährstoffbedingungen

Verschiedene Profile flüchtiger Verbindungen von *S. plymuthica* 4Rx13 wurden in Dual-Kultur-Experimenten mit *A. thaliana* Col-0 in kompartimentierten Petrischalen durchgeführt. Dabei wurde für die Kultivierung der Bakterien ein Komplexmedium (NB) und ein synthetisches Medium mit Glucose (DMG) verwendet. Der Einfluss der bakteriellen Volatile auf das Wachstum der Pflanzen wurde zum einen nach 10-tägiger Co-Kultivierung mit der oberirdischen Frischmasse und zum anderen nach 5 Tagen Co-Kultivierung mit der Wurzellänge relativ zu den Kontrollpflanzen bestimmt und fotografisch dokumentiert (Abb. 3-23).

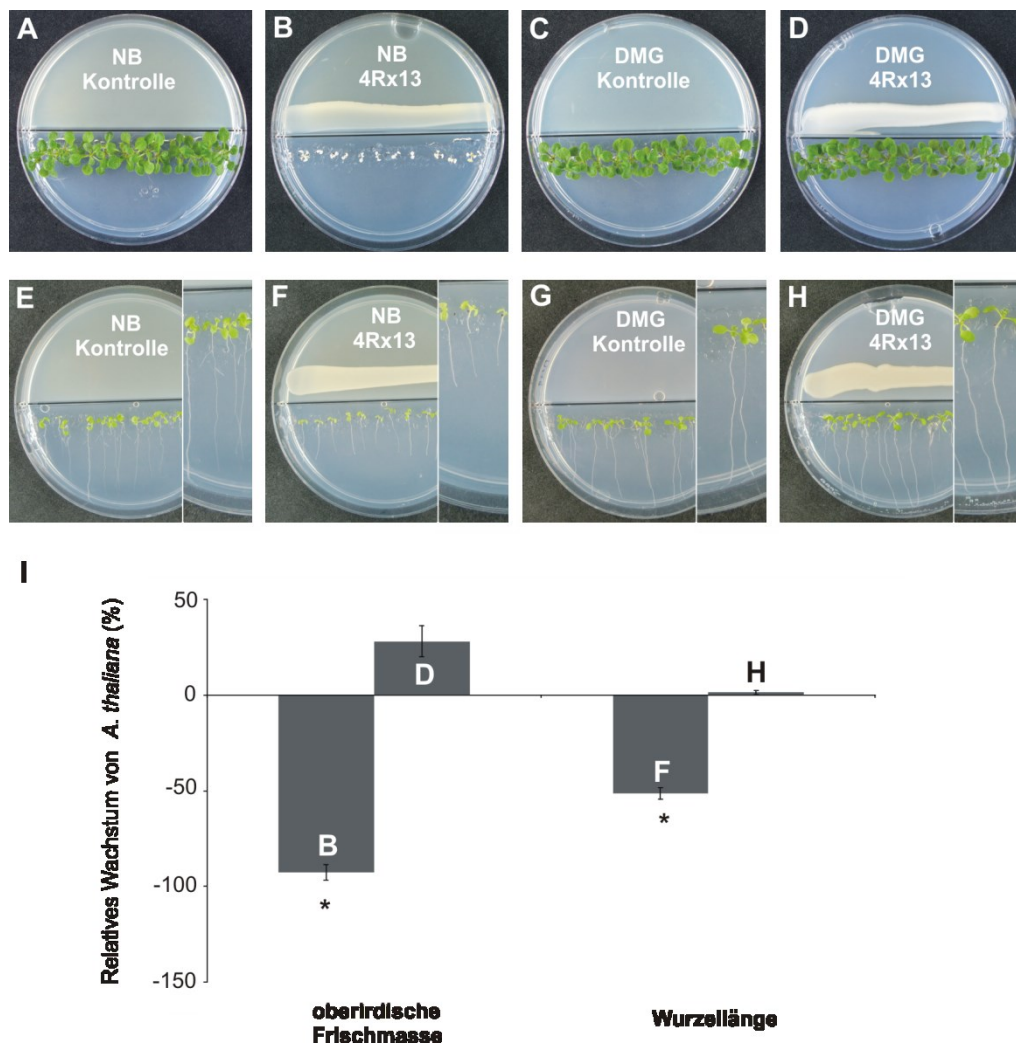


Abbildung 3-23: Co-Kultur-Experimente mit *Serratia plymuthica* 4Rx13 und *Arabidopsis thaliana*. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte mit NB (B, F) und DMG (D, H) Medium. Nach Inokulation und Start der Versuche wurden phänotypische Veränderungen sowie die oberirdische Frischmasse (B, D) nach 10 Tagen und die Primärwurzellänge (F, H) nach 5 Tagen relativ zu den entsprechenden Kontrollen ohne Einfluss der Bakterien (0%; A, C, E, G) bestimmt und im Diagramm aufgetragen (I). Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=3$ mit 2-5 Parallelen) dar. Die Sternchen weisen auf die Signifikanz der Daten mit NB-Medium im Vergleich zum DMG-Medium (* $P < 0,01$) hin.

Mit Hilfe dieser Parameter zeigten sich signifikant unterschiedliche Effekte auf *A. thaliana*, wenn Bakterien auf verschiedenen Nährstoffangeboten wuchsen. Mit Kultivierung auf Komplexmedium führten die bakteriellen Volatile zu einem chlorotischen Phänotyp der Pflanzen und einer signifikanten Inhibition (92 %) der Frischmasse an Stängel und Blättern (**Abb. 3-23 A, B, I**). Demgegenüber hatte der Gebrauch des synthetischen Mediums mit Glucose einen unauffällig positiven Effekt auf das Wachstum der Pflanzen (28 %) zur Folge (**Abb. 3-23 C, D, I**). Diese Tendenz spiegelt sich ebenfalls in der Auswertung der Wurzellänge wider. Bei Inkubation der Bakterien auf Komplexmedium inhibierten die bakteriellen Volatile die Primärwurzeln der Pflanzen bis zu 54 % (**Abb. 3-23 E, F, I**). Dagegen hatten die emittierten Volatile bei Verwendung des synthetischen Mediums nahezu keinen Einfluss (2 %) auf den Phänotyp oder die Länge der Primärwurzeln (**Abb. 3-23 G, H, I**). Während der Fütterungsexperimente bezüglich der Sodorifen-Emission zeigte sich in der Kultivierung der Bakterien eine pH-Wert Veränderung des Mediums (**Tabelle 2 im Anhang**).

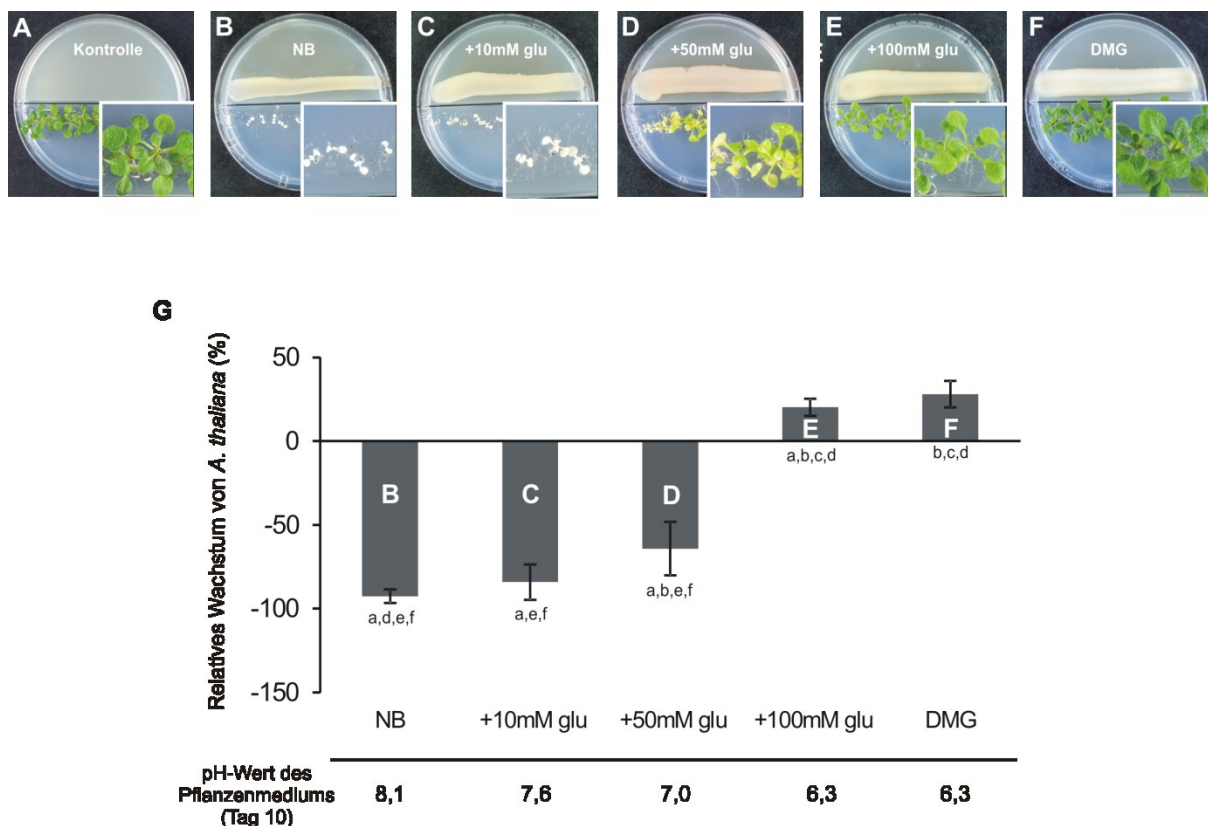


Abbildung 3-24: Co-Kultur-Experimente mit *Serratia plymuthica* 4Rx13 und *Arabidopsis thaliana* in Abhängigkeit von Glucose im bakteriellen Medium. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte auf NB-Medium (**B**), mit 10mM (**C**), 50mM (**D**) oder 100mM (**E**) Glucose und DMG-Medium (**F**). 10 Tage nach Inokulation der Bakterien wurde die oberirdische Frischmasse relativ zu den entsprechenden Kontrollen ohne Einfluss von Bakterien (0%, **A**) bestimmt und dem pH-Wert des Pflanzenmediums gegenübergestellt (**G**). Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=3$ mit 2-5 Parallelen) dar. NB(Nährbouillon)-Medium; DMG (Davis-Mingioli-Glucose)-Medium. a-f weisen auf die Signifikanz der Daten mit $p<0,05$ im Vergleich zu (a) der entsprechenden Kontrolle, (b) zu NB-Medium, (c) zu NB +10mM Glucose, (d) zu NB+50mM Glucose, (e) zu NB+100mM Glucose und (f) zu DMG-Medium hin.

Diese Parameter wurden auf das Wachstum von *A. thaliana* in Dual-Kultur-Experimenten detailliert untersucht. Dafür wurden unterschiedliche Konzentrationen an Glucose (+10 mM, +50 mM, +100 mM) einem Komplexmedium (NB) zugeführt und in kompartimentierten Petrischalen mit *A. thaliana* 10 Tage co-kultiviert. Der Einfluss der bakteriellen Volatile auf das Wachstum der Pflanzen wurde anhand der oberirdischen Frischmasse relativ zu den entsprechenden Kontrollen bestimmt (**Abb. 3-24 G**). Mit steigender Glucose-Konzentration ist eine Abnahme des inhibitorischen Effektes zunehmend sichtbar und die bakteriellen Volatile von *S. plymuthica* 4Rx13 lassen positives Wachstum von *A. thaliana* erkennen (**Abb. 3-24 A-F**). Dabei unterscheiden sich die Effekte nicht nur signifikant zu den jeweiligen Kontrollen ohne Bakterien, sondern auch zu den mitgeführten Kontrollen des Komplexmediums ohne Glucose und dem synthetischen Medium mit Glucose (**Abb. 3-24 G**). Weiterhin ist mit steigender Glucose-Konzentration im Medium der Bakterien eine Abnahme der Chlorose an Blätter und Stängel bis hin zu einem unauffälligen Phänotyp (**Abb. 3-24 E**) der Pflanzen zu erkennen. Es fällt auf, dass der pH-Wert des Pflanzenmediums ohne Einfluss von Bakterien bei pH 6,3 liegt. Nach 10 Tagen Co-Kultivierung mit *S. plymuthica* auf Komplexmedium ist ein pH-Wert von 8,1 messbar. Mit steigender Glucose-Konzentration sinkt der pH-Wert bis pH 6,3 (**Abb. 3-24 G**). Die Abnahme des inhibitorischen Effektes der bakteriellen Volatile auf das Wachstum von *A. thaliana* korreliert somit einerseits mit der Abnahme des pH-Wertes des Pflanzenmediums und andererseits mit der steigenden Glucose-Konzentration im Medium von *S. plymuthica*.

3.2.3.2 Korrelation zwischen NH₃-Emission und pH-Wert-Veränderung

Es wurde spekuliert, dass die pH-Wert-Veränderung der Medien in den Co-Kultur-Experimenten auf die Emission basischer Verbindungen zurück zu führen sein könnte, da aus der Literatur bekannt ist, dass *Serratia plymuthica* 4Rx13 Ammoniak (NH₃) als anorganische Verbindung emittiert (Kai et al. 2010). Die Entwicklung des pH-Wertes des Pflanzenmediums und die Emission von Ammoniak wurden in kompartimentierten Petrischalen simultan zu den Co-Kultur-Analysen mit *A. thaliana* im Verlauf der Zeit beobachtet (**Abb. 3-25 A und C**). Der pH-Wert veränderte sich innerhalb der ersten 36 Stunden nach Inokulation der Bakterien von pH 6,3 langsam in den basischen Bereich, erreichte sein Maximum am Tag 5 mit pH 7,5 und blieb in diesem Bereich konstant bis zum Versuchsende (Tag 10). Zusätzlich wurde der pH-Wert auf dem Komplexmedium der Bakterien gemessen, der mit pH 8,1 ebenfalls im basischen Bereich lag. Die pH-Werte der Kontrollen mit Bakterien- und Pflanzenmedium waren bis zum Versuchsende gegenüber den pH-Werten zu Versuchsbeginn unverändert. Zeitgleich zu der pH-Analyse wurde die Emission von Ammoniak durch *S. plymuthica* auf Komplexmedium mit Hilfe der Nessler-Reaktion und einer mit Ammoniak-Lösung erstellten Eichreihe (Anhang: Ammoniak-Eichreihe)

im Verlauf der Zeit untersucht (**Abb. 3-25 A und B**). Es ist zu beobachten, dass die pH-Wert-Veränderung der Medien parallel mit steigender Ammoniak-Emission erfolgt. Bereits 12 h nach Inokulation der Bakterien konnte eine Ammoniak-Konzentration von $0,25 \mu\text{mol}$ im gegenüberliegenden Kompartiment der Petrischale gemessen werden, was dem Standort der Pflanzen entspricht. Diese Konzentration stieg bis $4,16 \mu\text{mol}$ am Tag 5 und sank langsam bis $2,5 \mu\text{mol}$ am Tag 10. In der mitgeführten Kontrolle mit Medium war bis Versuchsende kein Farbumschlag und somit kein Ammoniak detektierbar.

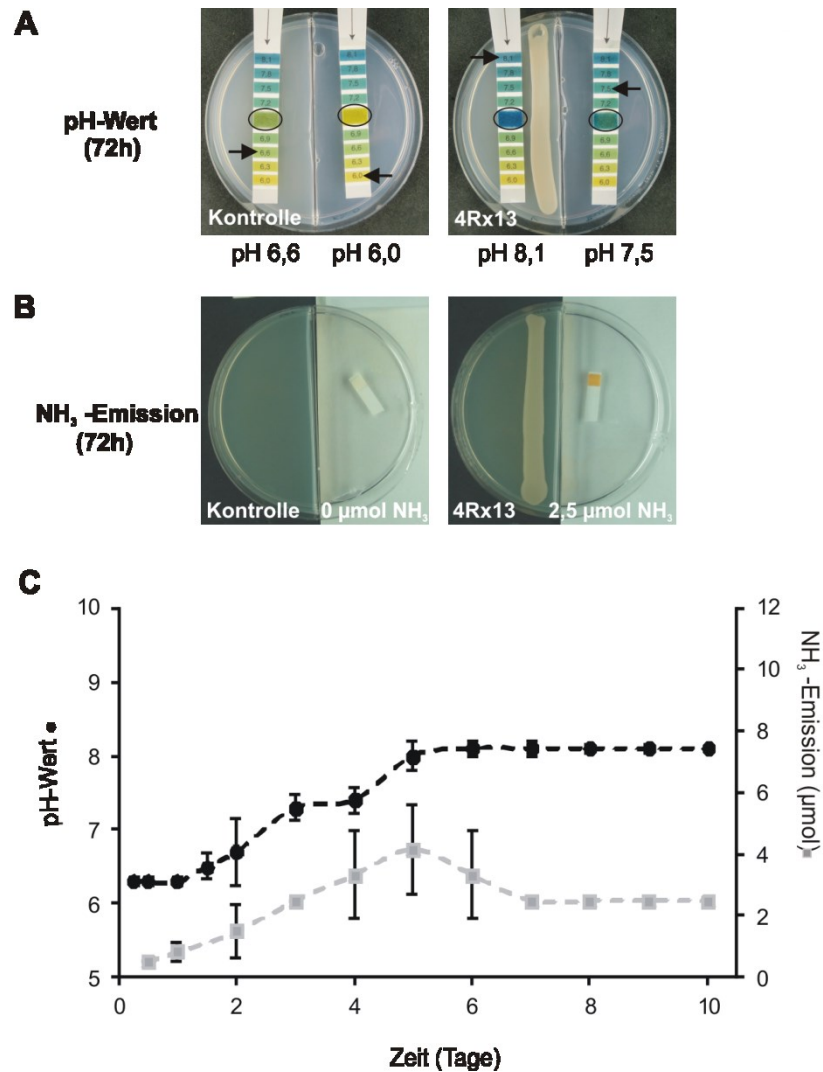


Abbildung 3-25: NH₃-Emission und pH-Wert des Medium von *Serratia plymuthica* 4Rx13 im Verlauf der Zeit. Entsprechend der Co-Kultur-Experimente kultivierte *S. plymuthica* 4Rx13 in einem Kompartiment zwei-geteilter Petrischalen. Die NH₃-Emission wurde mittels Nessler-Reaktion gemessen und der pH-Wert bis Tag 10 des Pflanzenmediums bestimmt (C). Die Fotos zeigen exemplarisch die pH-Wert Veränderung der Medien (A, rechts) und den Anstieg der NH₃-Emission (B, rechts) nach 72h im Vergleich zu den Kontrollen (A+B, links). Der gemessene pH-Wert ist mit schwarzen Kreisen hervorgehoben und entspricht dem mit Pfeilen markierten Wert auf dem pH-Papier. Die emittierte NH₃-Konzentration wurde mit Hilfe einer Eichreihe (Anhang: Ammoniak-Eichreihe) definiert. Die Messpunkte stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=3 mit 2 Parallelen) dar.

3.2.3.3 Einfluss von NH_3 -Lösung auf das Wachstum von *A. thaliana*

Kai et al. (2010) zeigte, dass hohe Konzentrationen an NH_3 -Lösung einen negativen Effekt auf das Wachstum von *A. thaliana* haben können. In der publizierten Versuchsreihe wurde die NH_3 -Lösung dabei zu Beginn des Experiments einmalig appliziert. Die Konzentration der Ammoniak-Lösung nimmt im Verlauf der Zeit in dem offenen System der Petrischalen jedoch nachweislich ab (Weise, 2008), wohingegen die Bakterien kontinuierlich Ammoniak emittieren (siehe Abb. 3-26). Somit sollte das Experiment optimiert werden, indem der Einfluss täglich applizierter Ammoniak-Lösung (0,5 μmol - 50 μmol) folglich auf das Wachstum von *A. thaliana* getestet wurde. Die Versuchsauswertung erfolgte entsprechend den Co-Kultur-Experimenten mit Bestimmung der oberirdischen Frischmasse der Pflanzen (Tag 10) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (H_2O) und der Überprüfung des pH-Wertes des Pflanzenmediums (Abb. 3-26 G).

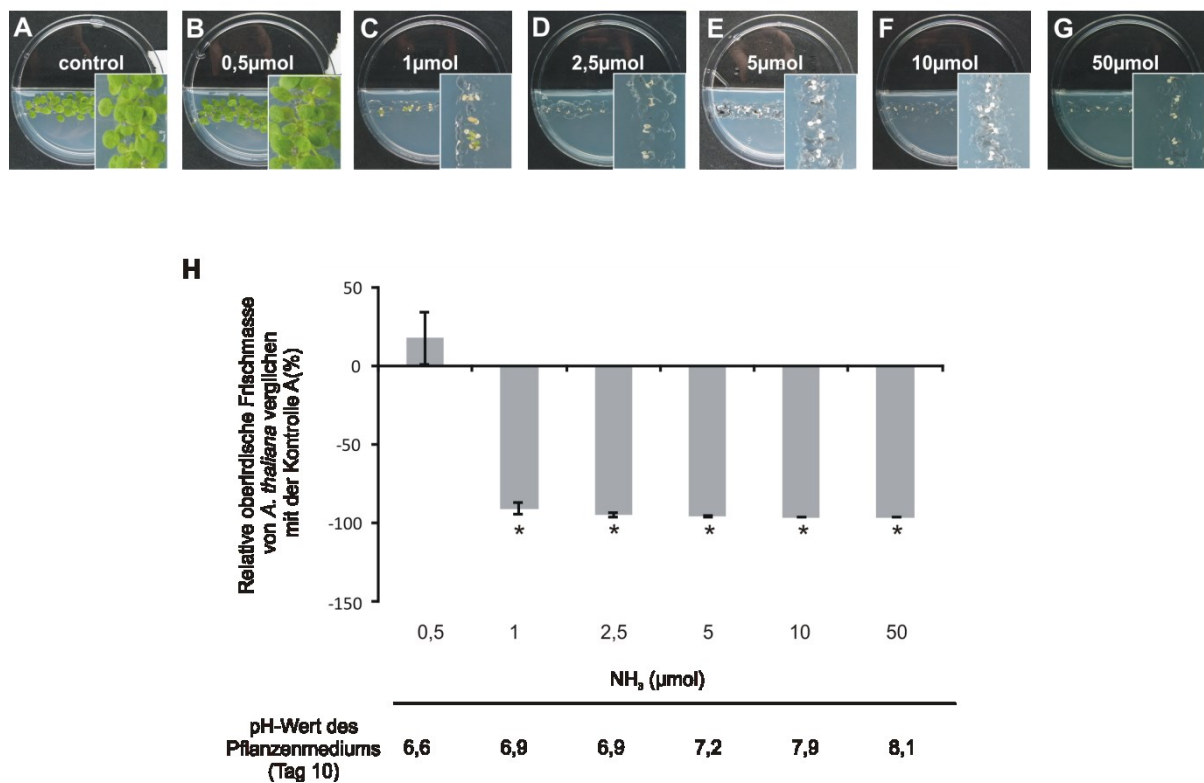


Abbildung 3-26: Einfluss von Ammoniak auf das Wachstum von *Arabidopsis thaliana*. Entsprechend der Co-Kultur-Experimente wurde *A. thaliana* kultiviert und unterschiedliche Mengen an NH_3 -Lösung (0,5-50 μmol) ausgesetzt. Phänotypische Unterschiede (B-G) als auch die oberirdische Frischmasse wurden relativ zu der Kontrolle ohne Einfluss von Ammoniak (0%, A) am Tag 10 ausgewertet und dem pH-Wert des Pflanzenmediums gegenüber gestellt (H). Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=3 mit 7 Parallelen) dar. Die Sternchen weisen auf die Signifikanz der Daten mit im zur Kontrolle A (* $P < 0,01$) hin.

Mit der niedrigsten Konzentration von 0,5 μmol täglich applizierter Ammoniak-Lösung wiesen die Pflanzen einen unauffälligen Phänotyp mit einer nicht signifikanten Wachstumspromotion von

18 % auf. Ein signifikant inhibitorischer Effekt auf die Frischmasse der Pflanzenstängel und -blätter (> 90 %) war ab einer Konzentration von 1 μmol täglich applizierter NH_3 -Lösung mit chlorotischen Symptomen sichtbar (**Abb. 3-26 C und H**). Dabei erreichte das Pflanzenmedium einen Wert von pH 6,9. Mit steigender Konzentration an NH_3 -Lösung stieg ebenfalls der pH-Wert des Pflanzenmediums (> pH 8,1).

3.2.3.4 Einfluss des pH-Wertes auf das Wachstum von *A. thaliana*

Neben dem Effekt täglich applizierter NH_3 -Lösung wurde der Einfluss des pH-Wertes im Pflanzenmedium von *A. thaliana* analog zu den Co-Kultur-Experimenten mit 4 Tage alten Setzlingen untersucht, die auf Pflanzenmedium mit unterschiedlichen pH-Werten (5 - 9) pikiert wurden. Gemäß den vorangegangenen Versuchen wurde nach 10 Tagen Kultivierung das Wachstum der Pflanzen bestimmt und der pH-Wert des Mediums überprüft (**Abb. 3-27**).

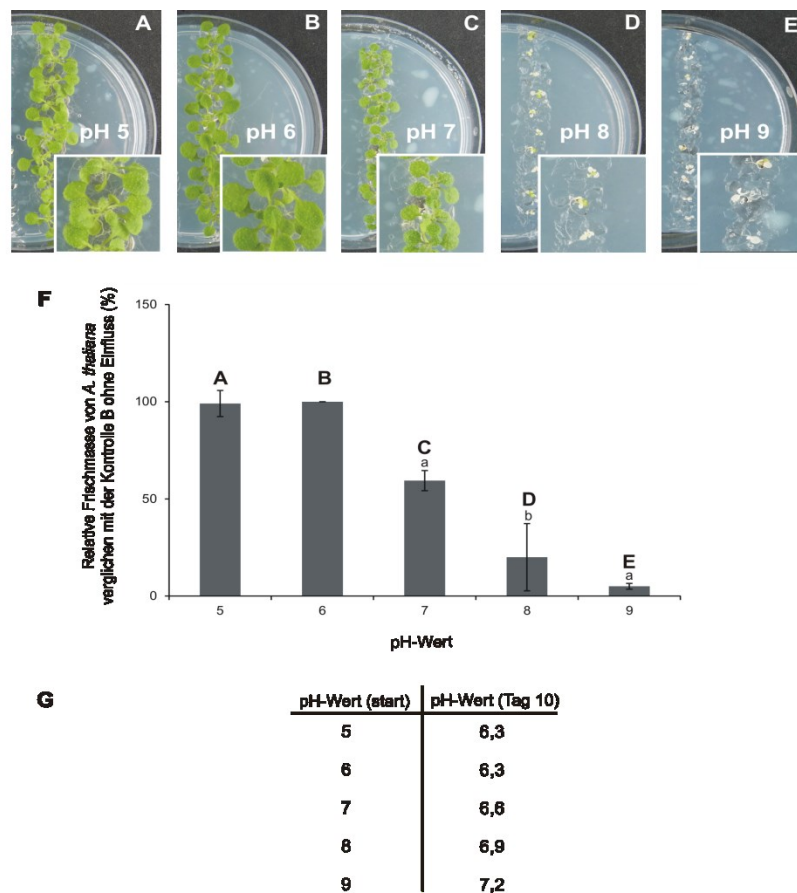


Abbildung 3-27: pH-Wert abhängiges Wachstum von *Arabidopsis thaliana*. Unter den Bedingungen der Co-Kultur-Experimente wurden Keimlinge von *A. thaliana* auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium mit unterschiedlichen pH Werten (pH 5-9, **A-E**) pikiert. Nach 10 Tagen wurde die oberirdische Frischmasse relativ zu der Kontrolle B (100%) bestimmt (**F**) und der pH-Wert des Pflanzenmediums überprüft (**G**). Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=3 mit 5-7 Parallelen) dar. a und b weisen auf die Signifikanz der Daten mit $p < 0,05$ (a) und $p < 0,01$ (b) im Vergleich zu der Kontrolle A hin.

Die relative oberirdische Frischmasse verringerte sich (99 % - 5 %) mit steigendem pH-Wert des Mediums und war, verglichen mit der Kontrolle (pH 6), ab pH 7 signifikant niedriger (59 %) (**Abb. 3-27 F**). Ein Phänotyp mit chlorotischen Symptomen war ab pH 8 mit einer relativen Frischmasse von +20 % zu beobachten. Die Überprüfung des pH-Wertes am Ende des Experiments zeigte im Vergleich zum Versuchsbeginn zum Teil deutliche Unterschiede. Die Pflanzenmedien mit pH 6 und 7 veränderten sich wenig und wiesen am Ende des Versuches einen Wert von pH 6,6 auf. Je basischer der pH-Wert zu Versuchsbeginn war, desto stärker veränderte sich der Wert im Verlauf des Experimentes. So konnte bei dem Pflanzenmedium mit pH 9 am Ende ein Wert von pH 7,2 ermittelt werden.

3.2.3.5 Verwendung von Phosphorsäure zur Bindung von Ammoniak

Ein Einfluss von Ammoniak auf den pH - Wert des Pflanzenmediums und das Wachstum der Pflanzen konnte in den vorangegangenen Experimenten gezeigt werden. Weiterhin wurde untersucht, ob das volatile Gemisch der Bakterien in Abwesenheit von Ammoniak einen Einfluss auf das Wachstum der Pflanzen haben kann. Phosphorsäure wurde in dreigeteilten Petrischalen als Bindungskomponente von Ammoniak in ein drittes Kompartiment während zu der Co-Kultivierung von *S. plymuthica* 4Rx13 und *A. thaliana* hinzugezogen. Nach 10 Tagen zeigte *A. thaliana* eine Wachstumspromotion der oberirdischen Frischmasse von 14 % (**Abb. 3-28 C und E**) relativ zu den Pflanzen, die in Abwesenheit von Bakterium und Phosphorsäure wuchsen (**Abb. 3-28 A**). Dabei veränderte sich der Phänotyp der Pflanzen mit dem Standort innerhalb des Kompartimentes in der Petrischale. Je dichter die Pflanzen an das Kompartiment mit den Bakterien grenzten, desto ausgeprägter war ein chlorotischer Phänotyp zu erkennen. Näherte sich dagegen der Standort der Pflanzen dem Kompartiment der Phosphorsäure, so wurde der Phänotyp gegenüber der Kontrolle unauffälliger. In Abwesenheit der Phosphorsäure als Ammoniak-Adsorbens, war nach 10 Tagen Co-Kultivierung mit *S. plymuthica* und *A. thaliana* eine signifikante Wachstumsinhibition der oberirdischen Blätter und Stängel von 70 % zu verzeichnen (**Abb. 3-28 B und E**). Der Einfluss der Phosphorsäure wurde zusätzlich in Abwesenheit des Bakteriums simultan auf das Wachstum von *A. thaliana* getestet und zeigte eine nicht signifikante Wachstumspromotion von 15 %. Neben der Frischmasse der Pflanze wurde der pH-Wert auf dem Pflanzenmedium mit pH-Papier überprüft. Das Pflanzenmedium zeigte in Abwesenheit von Bakterium und Phosphorsäure einen neutralen pH 6,3 (**Abb. 3-28 A**). Nach Co-Kultivierung der Pflanzen mit Bakterium war ein basischer pH 7,5 (**Abb. 3-28 B**) zu verzeichnen. In Anwesenheit der Phosphorsäure, der Bakterien und der Pflanze änderte sich der pH-Wert des Pflanzenmediums von der Seite der Bakterien (pH 7,2) bis zur Seite der Phosphorsäure (pH 6,3; **Abb. 3-28 C**).

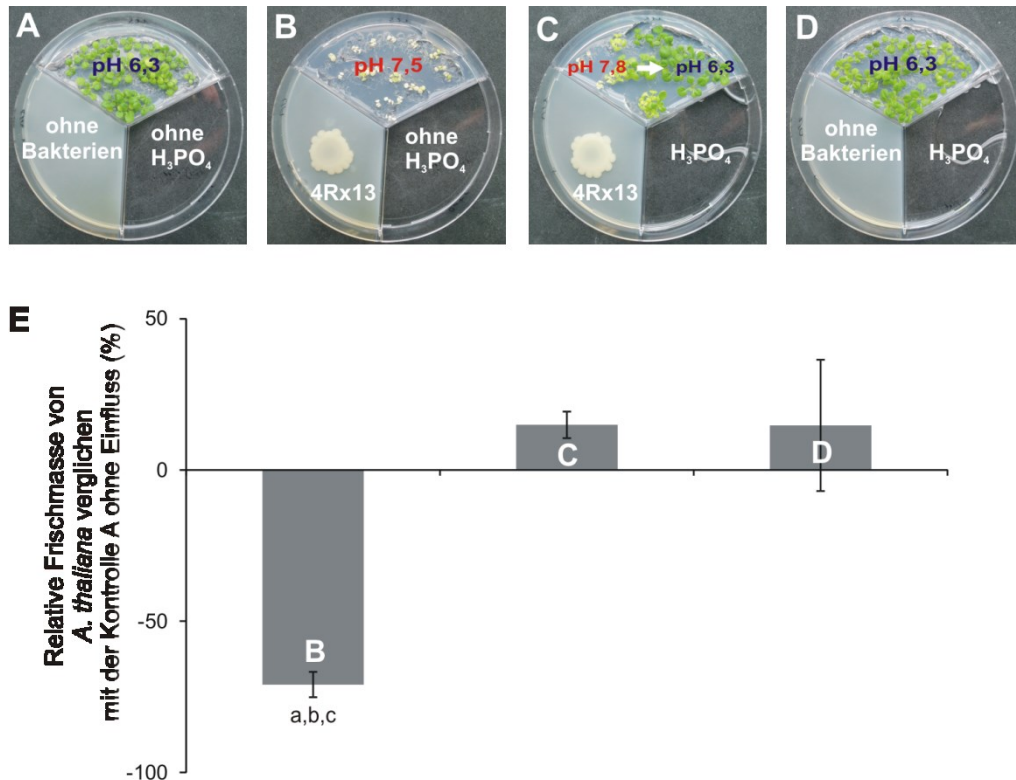


Abbildung 3-28: Co-Kultur-Experimente von *Serratia plymuthica* 4Rx13 und *Arabidopsis thaliana* unter Einfluss von Phosphorsäure als NH₃-Adsorbens. In 3-geteilten Petrischalen wurde Phosphorsäure der Co-Kultivierung von *S. plymuthica* 4Rx13 und *A. thaliana* hinzugezogen. Phänotypische Unterschiede von *A. thaliana* (C) wurden gegenüber der Positiv-Kontrolle ohne Phosphorsäure (B) und den Negativ-Kontrollen ohne Phosphorsäure und Bakterium (A) und ohne Bakterium (D) nach 10 Tagen dokumentiert. Die oberirdische Frischmasse der Pflanzen wurde relativ zu A ohne Einfluss von Bakterien (0%, E) ermittelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=3 mit 5 Parallelen) dar. a-c weist auf die Signifikanz der Daten mit $p < 0,01$ im Vergleich zu A (a), C (b) und D (c) hin. Der pH-Wert wurde zusätzlich auf dem Pflanzenmedium überprüft.

Der chlorotische Phänotyp der Pflanzen korreliert bei Inkubation mit *S. plymuthica* und Phosphorsäure mit den ermittelten basischen pH-Werten des Pflanzenmediums von der Seite der Bakterien zu der Seite der Phosphorsäuren.

3.2.3.6 NH₃-Emission und pH-Wert-Veränderung verschiedener Rhizobakterien

Die Emission von Ammoniak und dessen Einfluss auf den pH - Wert des Pflanzenmediums wurden analog zu den Analysen von *S. plymuthica* 4Rx13 mit weiteren Rhizobakterien in geteilten Petrischalen getestet (Abb. 3-29 C). Nach 72h Kultivierung zeigte sich ebenfalls eine Korrelation zwischen beiden Parametern. Je höher die Ammoniak Emission der Bakterien, desto basischer der pH-Wert des Pflanzenmediums. *Pseudomonas fluorescens* L13-6-12, *P. trivialis* 3Re-2-7, *Serratia plymuthica* 4Rx13, *S. plymuthica* HRO-C48, *S. plymuthica* 3Re-4-18 und *Stenotrophomonas maltophilia* R3089 wiesen eine Ammoniak-Emission von 2,5 μmol mit einem pH-Wert 7,5 - 7,65 auf (Abb. 3-29 A-C). *Stenotrophomonas rhizophila* P69 emittierte die höchste

NH_3 -Konzentration von 5 μmol und hatte den höchsten gemessenen basischen pH-Wert (pH 7,8) des Pflanzenmediums zur Folge. Die geringste Ammoniak-Emission wurde bei *Bacillus subtilis* B2g (1 μmol) und *Staphylococcus epidermidis* 2P3-18a (0,5 μmol) detektiert. Die Inkubation mit diesen Bakterien führte zu keiner Veränderung des pH - Wertes auf Pflanzenmedium. Zusammengefasst emittieren die Isolate, die in Co-Kultur einen negativen Einfluss auf das Wachstum von *A. thaliana* haben, hohe Konzentrationen an Ammoniak, was mit einer pH-Veränderung des Pflanzenmediums einhergeht.

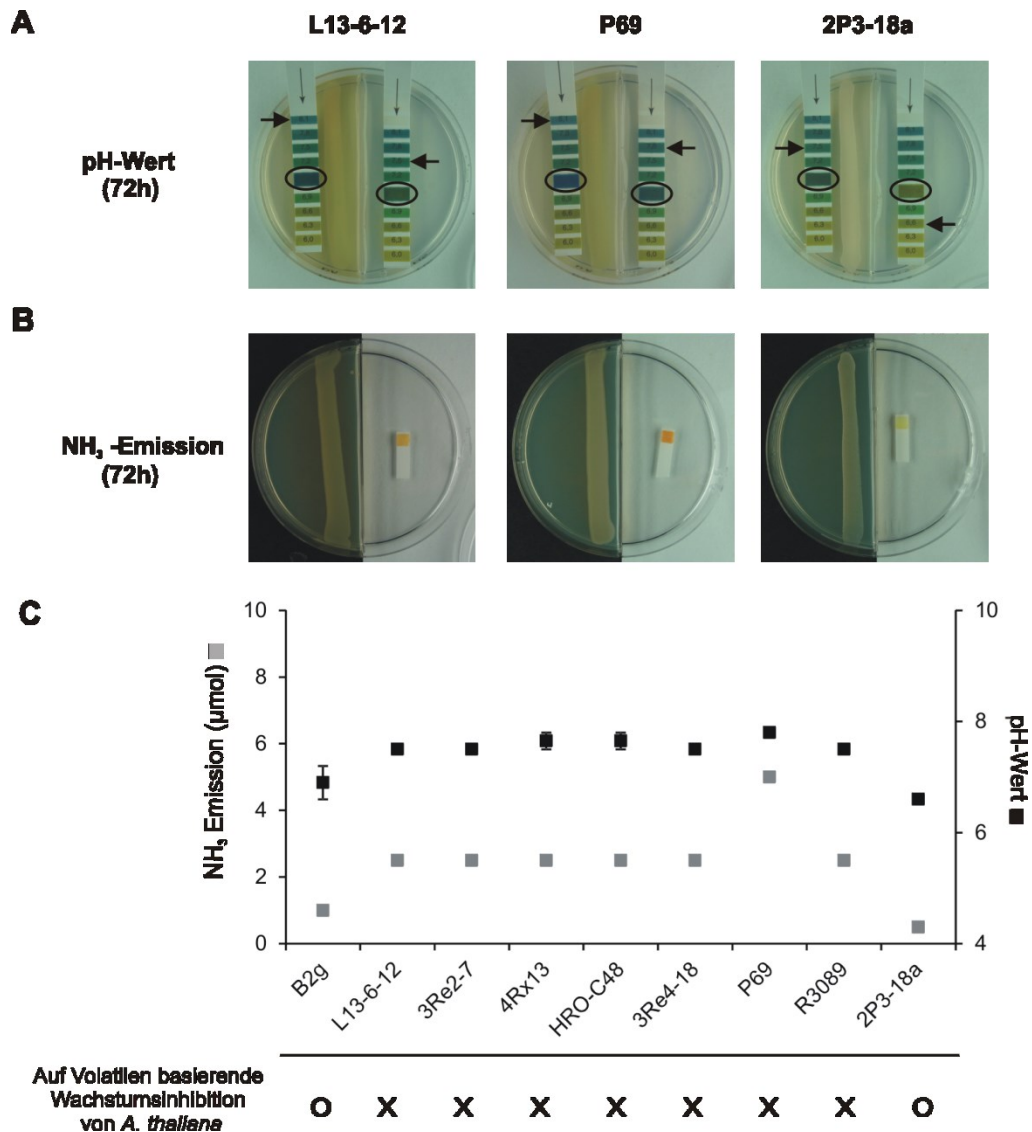


Abbildung 3-29: NH_3 -Emission und pH-Werte im Medium verschiedener Rhizobakterien. Die Emission von NH_3 , die daraus resultierende pH-Wert-Veränderung und der Korrelation der Wachstumsinhibition von *A. thaliana* (Kai et al. 2007) wurde entsprechend der Co-Kultur-Experimente bei verschiedenen Rhizobakterien untersucht. Die NH_3 -Emission wurde mittels Nessler-Reaktion gemessen und der pH-Wert des Pflanzenmediums bestimmt (C). Die Fotos zeigen exemplarisch die unterschiedlichen pH-Wert-Veränderungen (A) und die NH_3 -Emission (B) von *P.f.* L13-6-12, *St.m.* P69 und *St.e.* 2P3-18a nach 72h. Der gemessene pH-Wert ist mit schwarzen Kreisen hervorgehoben und entspricht, den mit Pfeilen markierten Wert auf dem pH-Papier. Die emittierte NH_3 -Konzentration wurden mit Hilfe einer Eichreihe (Anhang: Ammoniak-Eichreihe) definiert. Die Messpunkte stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=3$ mit 2 Parallelen) dar. B2g *Bacillus subtilis*, L13-6-12 *Pseudomonas fluorescens*, 3Re2-7 *P. fluorescens*, 4Rx13 *Serratia plymuthica*, C48 *S. plymuthica*, 3Re4-18 *S. plymuthica*, P69 *Stenotrophomonas rhizophila*, R3089 *St. maltophilia*, 2P3-18a *Staphylococcus epidermidis*

4. Diskussion

Im Fokus dieser Arbeit standen detaillierte Analysen volatiler Verbindungen der Bakterien-Gattung *Serratia*. Das beinhaltet auf der einen Seite die Verteilung und Biosynthese der ungewöhnlichen Struktur Sodorifen als auch den Einfluss der Volatile auf die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*.

4.1 Emission volatiler organischer Verbindungen verschiedener *Serratia*-Spezies

Bakterien konkurrieren und interagieren in ihren jeweiligen Habitaten mit den verschiedensten Organismen, z.B. anderen Bakterien-Spezies, Pilzen, Pflanzen, Tieren und Insekten, um Lebensraum, Nährstoffe und den Erhalt ihrer Art (Hibbing et al. 2010). Dabei können sekundäre Metabolite (spezialisierte Metabolite) wirksame Agenzien darstellen, die auch als Transport- und Signalmoleküle während der Symbiose zwischen verschiedenen Organismen oder als Hormone agieren können (Demain & Fang 2000). Sekundär-Metabolite werden als Moleküle definiert, die im Gegensatz zu Primärmetaboliten, nicht für das Wachstum der Organismen essentiell sind (Brakhage 2013). Eine Vielfalt an sekundären Metaboliten wird u.a. von der Bakterien-Gattung *Serratia* produziert, die in der Wissenschaft dadurch zum einen Modellorganismus geworden ist (Fender et al. 2012). Diese Gattung ist durch ubiquitär vorkommende γ -Proteobakterien gekennzeichnet, die fakultativ anaerob leben und peritrich begeißelt sind (Mahlen 2011). Zu den bekannten Sekundärmetaboliten dieses Genus zählen u.a. die gut untersuchten Verbindungen Prodigiosin (Williams 1973), Pyrimin (Grimont & Grimont 2006), Carbapenem (Fineran et al. 2005) als auch die Polyketide Oocydin A (Martilla et al. 2012) und Althiomycin (Gerc et al. 2012). Weiterhin konnte eine Vielzahl an flüchtigen sekundären Verbindungen detektiert werden, die sich durch ein niedriges Molekulargewicht, einen hohen Dampfdruck und einer niedrigen Siedetemperatur auszeichnen (Rowan, 2011). Grimont & Grimont (1985) beschrieben die Gattung *Serratia* bereits als Produzenten eines kartoffelartigen Geruchs, der durch Pyrazine hervorgerufen wird. Kai et al. (2010) führten weitere detaillierte Untersuchungen mit *Serratia plymuthica* 4Rx13 (ehemals *S. odorifera* 4Rx13) hinsichtlich der Emission volatiler Verbindungen mit Hilfe verschiedenster Techniken (u.a. GC/MS, PTR/MS) durch. Dabei konnten etwa 100 Verbindungen im Luftraum des auf NB-Medium wachsenden Bakteriums detektiert werden, zu denen Schwefelverbindungen wie Dimethyldisulfid oder Dimethyltrisulfid, Alkohole wie Methanol und 2-Phenylethanol und anorganische Verbindungen wie Kohlenstoffdioxid und Ammoniak gehören.

Weiterhin wurde das neuartige Volatil Sodorifen entdeckt, dessen Struktur mittels Synthese bestätigt wurde (von Reuß et al. 2010).

Die Verteilung der verschiedenen emittierten Substanzklassen sollte weiterhin innerhalb der Gattung *Serratia* untersucht und für mögliche ökologische Zusammenhänge ihrem Habitat gegenübergestellt werden. Dafür wurden die volatilen organischen Verbindungen von 4 verschiedenen *Serratia*-Spezies unterschiedlicher Habitats (*S. plymuthica* AS9 - Samen von *Brassica napus*, *S. proteamaculans* 568 - Wurzelendophyt aus *Populus* sp., *S. odorifera* DSM4582 - Mensch, *S. marcescens* Db11 - *Drosophila* sp.) detailliert mittels VOC-Sammelsystem und GC/MS analysiert und mit dem Rhizobakterium *S. plymuthica* 4Rx13 (isoliert von *Brassica napus*) verglichen. Während der Analyse wurden weiterhin die Zellzahlen bestimmt. Diese zeigten, dass alle untersuchten *Serratia*-Spezies im Verlauf der Versuche etwa gleich schnell gleiche Zellzahlen erreichen, was durch detaillierte Wachstumskurven (Lange, unveröffentlicht) bestätigt werden konnte. Ein vergleichbares Wachstum der Bakterien ist Voraussetzung für vergleichende Analysen der Emission volatiler Verbindungen.

Bei den bisher eindeutig identifizierten Verbindungen der untersuchten *Serratia*-Spezies handelt es sich um sieben Ketone, vier Alkohole, zwei Schwefelverbindungen, ein Pyrazin, Indol und Sodorifen. Im Allgemeinen ist bei Bakterien die Emission von Ketonen weit verbreitet (zusammengefasst in Effmert et al. 2012 und in der Datenbank für mikrobielle Volatile DOVE-MO). So wurde die Emission von 2-Heptanon von *Phormidium* spp., *Pseudomonas* spp., *Rivularia* spp., *Streptomyces* spp., *Tolyphotrix distorta*, *Xanthomonas* spp. und *Serratia* spp., Phenylaceton von *Streptomyces* spp. und *Klebsiella* spp., 2-Decanon von *Phormidium* spp., *Rivularia* spp., und *Tolyphotrix* spp., 2-Undecanon von den Spezies *Bacillus*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Stigmatella*, *Streptomyces* und *Xanthomonas*, 2-Dodecanon von Spezies der Eisbakterien, *Serratia* und *Xanthomonas*, 2-Tridecanon von Eisbakterien, *Phormidium* spp., *Plectonema* spp., *Pseudomonas* spp., *Rivularia* spp., *Tolyphotrix* spp. and *Xanthomonas* spp., und 2-Pentadecanon von Eisbakterien und *Xanthomonas* spp. dokumentiert (Effmert et al. 2012). Die Produktion von aliphatischen Alkoholen und Ketonen erfolgt häufig während der Fettsäurebiosynthese (Schulz & Dickschat, 2007, Forney & Markovetz, 1971). Ein Vergleich der Profile ergab, dass nur drei Verbindungen bei allen hier untersuchten *Serratia*-Spezies detektiert werden konnten: die methylierten Ketone 2-Undecanon, 2-Tridecanon und 2-Pentadecanon. Über die biologische und ökologische Funktion der Emission von bakteriellen Ketonen wird dagegen noch spekuliert. So diskutierten Bruce et al. (2004) 2-Undecanon als antifungale Verbindung, wohingegen kürzlich publizierte Arbeiten eine geringe Wachstumspromotion (15 %) auf den Pilz *Rhizoctonia solani* zeigten (Weise et al. 2012). Auch in den Arbeiten von Fernando et al. (2005) konnte das Myzelwachstum und die Sclerotienbildung

von *Sclerotinia sclerotiorum* alleinig durch 2-Undecanon und 2-Dodecanon nicht gehemmt werden.

In den Analysen der Emission volatiler Verbindungen konnten neben den Ketonen Alkohole detektiert werden, von denen der aromatische Alkohol 2-Phenylethanol bei vier von fünf *Serratia*-Isolaten detektiert wurde. Die Emission von 2-Phenylethanol ist auf den Shikimat-Stoffwechselweg oder die Transaminierung von Phenylalanin zurückzuführen (Etschmann et al. 2002). Es ist eins der weit verbreitetsten aromatischen Volatile, die von Bakterien wie z.B. *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Nannocystis* sp. und *Strptomyces* sp emittiert werden (Effmert et al. 2012). Bioassays mit dieser Verbindung zeigten eine konzentrationsabhängige Wachstumsinhibition von *Arabidopsis thaliana* (Wenke et al. 2012) als auch eine antimikrobielle Wirkung auf *E. coli*, *Ralstonia solanacearum* und andere Bakterien (Lilly & Brewer 1953, Zhu et al. 2011).

Sehr oft wird 2-Phenylethanol auch in Kombination mit schwefel- und/oder stickstoffhaltigen Verbindungen produziert (Schulz & Dickschat 2007). So konnten in vier von fünf Profilen der untersuchten *Serratia*-Spezies die Schwefelverbindungen Dimethyldisulfid und Dimethyltrisulfid detektiert werden. Diemethyldisulfid zeigte ebenfalls in Bioassays eine konzentrationsabhängige Wachstumsinhibition von *Arabidopsis thaliana* (Kai et al. 2010).

Die Emission des stickstoffhaltigen Pyrazins, welches bisher als charakteristisch für die Gattung *Serratia* beschrieben wurde (Gallois & Grimont 1985, *Serratia* spp., Bruce et. al. 2004, *S. marcescens*, Gu et al. 2007), konnte nur bei drei von fünf *Serratia* Isolaten analysiert werden. Auch in den Arbeiten von Ercolini et al. (2009) mit einem *S. proteamaculans*-Isolat konnte neben einer Vielzahl an Verbindungen kein Pyrazin nachgewiesen werden. Dies kann darauf hinweisen, dass die Emission von Pyrazinen in der Gattung *Serratia* nicht wie beschrieben charakteristisch ist, die verwendeten Wachstumsbedingungen keine Produktion und/oder Emission von Pyrazinen ermöglichten oder die Emission unter dem Detektionslimit der verwendeten Techniken lag. Literatur-Recherchen ergaben zudem, dass Pyrazine von einer Vielzahl von Bakterien wie z.B. *Xanthomonas* sp., *Saccharomyces* sp., *Bacillus* sp., oder *Carnobacterium* sp. emittiert werden (Effmert et al. 2012, DOVE-MO) und dadurch nicht mehr als charakteristisches Merkmal zur Identifizierung der Gattung *Serratia* genutzt werden können. Im Allgemeinen wird Pyrazinen eine antimikrobielle und antifungale Eigenschaften zugesprochen (Laurenco et al. 2012).

Das Volatil Indol, bekannt als Hauptverbindung von *Escherichia coli* als auch *Enterobacter*- und *Klebsiella*-Spezies (Schulz & Dickschat, 2007), wurde in den Analysen bei *S. odorifera* DSM 4582 detektiert. Es ist nach intensiver Literaturrecherche die bisher erste Dokumentation der Indol-Produktion innerhalb der Gattung *Serratia*. Die Applikation von Indol ergab eine konzentrationsabhängige Wachstumsbeeinflussung auf *A. thaliana* (Blom et al. 2011).

Der Vergleich der Emission der verschiedenen *Serratia*-Isolate zeigte, dass ferner verwandte Isolate (*S. protamaculans* 568 und *S. marcescens* Db11 mit 15 gemeinsamen Verbindungen) mehr Gemeinsamkeiten hinsichtlich der Emission volatiler Verbindungen aufweisen als nahverwandte Isolate (*S. plymuthica* 4Rx13 und *S. plymuthica* AS9 mit fünf gemeinsamen Verbindungen). Wird der Isolationsort den Ergebnissen gegenübergestellt, ergibt sich aus den bisherigen Daten der hier untersuchten *Serratia*-Spezies keine Korrelation zwischen der Emission von Volatilen, der phylogenetischen Verwandtschaft und dem Habitat. Um jedoch genauere Zusammenhänge erkennen und Aussagen treffen zu können, müssten weitere Isolate verschiedener *Serratia*-Spezies und verschiedenen Ursprungs hinsichtlich der Emission von Volatilen im Detail untersucht werden. Das könnte mit einer *principal component*-Analyse (PCA) erfolgen, bei der eine mögliche Korrelation zwischen bakteriellen Volatilen, verschiedenen Spezies und deren Ursprung verdeutlicht werden würde. Dabei sollten nicht nur die Anzahl und Art der Verbindungen, sondern auch die Quantitäten der einzelnen Volatile in die Untersuchungen einbezogen werden.

4.2 Das Volatil Sodorifen

4.2.1 Sodorifen-Emission innerhalb der Gattung *Serratia*

In den vergleichenden Analysen flüchtiger Verbindungen der verschiedenen *Serratia*-Spezies hob sich besonders auffällig das Spektrum von *S. plymuthica* 4Rx13 ab. Nur bei diesem Isolat konnte die ungewöhnliche Hauptverbindung Sodorifen detektiert werden. Sodorifen ist ein polymethylierter Bicyclus, der ausschließlich aus Kohlen- und Wasserstoff besteht und den chemischen Namen 1,2,4,5,6,7,8-Heptamethyl-3-methylenbicyclo[3.2.1]oct-6-en trägt. Die Struktur wurde mittels Synthese verifiziert (Reuß et al. 2010), doch die zugrunde liegende Biosynthese als auch die biologische und ökologische Funktion dieser Verbindung sind bisher unbekannt (Kai et al. 2010). Das Profil von *S. plymuthica* 4Rx13 ist neben der Hauptverbindung zusätzlich von potentiellen Sodorifen-Isomeren überlagert, was sich auch in der im Vergleich zu den anderen untersuchten *Serratia*-Spezies großen Anzahl detektierter Verbindungen widerspiegelt.

Analysen volatiler Verbindungen verschiedenster Bakterien ergaben, dass das Volatil Sodorifen ausschließlich in der Bakterien-Gattung *Serratia* detektiert werden konnte (Kai et al. 2007). Deshalb wurde das Vorkommen der Sodorifen-Emission innerhalb dieser Gattung detaillierter mit 13 verschiedenen *Serratia*-Isolaten unterschiedlicher Habitat untersucht.

Parallel dazu wurde von diesen Isolaten ein phylogenetischer Stammbaum basierend auf der 16S-rRNA in Kooperation mit dem Göttinger Labor für Genomanalyse (G2L, Göttingen, Deutschland) erstellt. Der phylogenetische Stammbaum ergab, dass das unter dem Namen *Serratia odorifera*

4Rx13 von Berg et al. 2002 publizierte Isolat in einer Klade von *S. plymuthica*-Isolaten gruppierte. Zusätzlich erwies der Gesamt-Genom-Vergleich mit Hilfe einer BiBlast-Software größere Ähnlichkeiten zwischen dem Isolat 4Rx13 und *S. plymuthica* AS9 (3213 ORF's mit NW > 70 % und E-Value > -100) als zwischen dem damals bezeichneten *S. odorifera*. 4Rx13 und *S. odorifera* DSM4582 (2334 ORF's mit NW > 70 % und E-Value > -100) auf. Proteom-Analysen mit dem Isolat 4Rx13 und *S. odorifera* DSM4582 zeigten weiterhin große Unterschiede in den 2D-Gelen zwischen den untersuchten Isolaten (Domik 2012). Auf Grund dieser Ergebnisse wurde das Isolat 4Rx13 umbenannt in *S. plymuthica* 4Rx13. Das Isolat B5319 gruppierte ebenfalls in der Klade der *S. plymuthica*-Isolate und nicht der Bezeichnung entsprechend in der Klade von *S. liquefaciens*. Da keine weiteren detaillierten Analysen mit diesem Stamm erfolgten, wurde der Name *S. liquefaciens* B5319 in dieser Arbeit zunächst jedoch beibehalten. Literatur-Recherchen zeigten, dass es insbesondere in der Gattung *Serratia* in den letzten Jahrzehnten immer wieder zu Umbenennungen und Neuklassifizierungen gekommen ist (Breed & Breed 1924, Martinec & Kocur 1961, Grimont et al. 1978, Ashelford et al. 2002). Dies hängt vor allem auch mit den entwickelten Techniken und den daraus resultierenden Erkenntnissen zusammen. Wurden die Bakterien anfangs anhand morphologischer Merkmale klassifiziert, erfolgten später chemotaxonomische Analysen. In den letzten Jahren wurde vermehrt die Sequenzierung der DNA für die Bestimmung eines Isolates herangezogen. Charakteristische kondensierte Bereiche wie die 16S-rRNA, *multi locus sequence typing* (MLST) - Analysen mit mehreren Haushaltsgenen bis hin zu vergleichenden Untersuchungen des kompletten Genoms bilden heute meist die Grundlage für phylogenetische Stammbaum-Analysen von Bakterien (zusammengefasst in Maiden 2006, Schleifer 2009). Von 1823 bis 2010 wurden 14 verschiedene Spezies in die Gattung eingeteilt: *S. entomophila* (1988), *S. ficaria* (1979), *S. fonticola* (1979), *S. glossinae* (2010), *S. grimesii* (1983), *S. liquefaciens* (1931), *S. marcescens* subsp. *marcescens* (1823), *S. marcescens* subsp. *sakuensis* (1998), *S. nematodiphila* (2009), *S. odorifera* (1978), *S. plymuthica* (1896), *S. proteamaculans* (1919), *S. quinivorans* (1982), *S. rubidaea* (1940), und *S. ureilytica* (2005) (zusammengefasst in Mahlen 2011). Zusätzlich wurden 2012 zwei ungewöhnliche Endosymbionten mit reduzierter Genomgröße, *S. symbiotica* SAP und SCc, als neue Spezies in der Gattung *Serratia* definiert (Manzano-Marin et al. 2012). Die verwandtschaftlichen Verhältnisse zwischen den untersuchten *Serratia*-Isolaten dieser Arbeit decken sich mit den in der Vergangenheit publizierten phylogenetischen 16S-rRNA Stammbäumen (Dauga et al. 1990, Mahlen 2011).

Die umfassende Suche nach Sodorifen-Produzenten ergab in der Gattung *Serratia*, dass nur bei drei von 13 Isolaten das neuartige Volatil Sodorifen mittels GC/MS detektiert werden konnte. Diese drei Isolate gruppieren in der Klade der Spezies *S. plymuthica* und heben sich mit einer

Ausnahme (*S. liquefaciens* B5319) von einer weiteren Subklade innerhalb der Spezies *S. plymuthica* von den Nicht-Produzenten ab. Dabei fällt auf, dass alle Sodorifen-Produzenten von Pflanzen (*Brassica napus* und *Solanum tuberosum*) in Mecklenburg-Vorpommern (Deutschland) isoliert wurden und nur die Ausnahme *S. liquefaciens* B5319 aus einem anderem Habitat, dem Menschen, stammt. Andere *S. plymuthica* Isolate, die ebenfalls einen Pflanzen assoziierten Ursprung haben (*S. plymuthica* AS9 von *Brassica napus*), aber nicht aus Mecklenburg-Vorpommern stammen und nicht in der Produzenten-Subklade zu finden sind, emittierten auch kein Sodorifen. Über die Sodorifen-Produzenten ist bekannt, dass die Stämme 4Rx13 und 3Re-4-18 von Versuchsfeldern der Universität Rostock in Biestow, Mecklenburg-Vorpommern, Deutschland (Satower-Strasse) isoliert wurden, die jahrelang mit *Brassica*-Arten kultiviert wurden (G. Berg, mündliche Aussage). Dabei wurde *S. plymuthica* 4Rx13 aus der Rhizosphäre von *Brassica napus* isoliert und *S. plymuthica* 3Re-4-18 aus der Endorhiza von *Solanum tuberosum* (Berg 2002). Über *S. plymuthica* HRO-C48 liegt dagegen nur die Information vor, dass der Stamm aus der Rhizosphäre von *Brassica napus* von einem Feld in der Nähe von Rostock, Mecklenburg-Vorpommern, Deutschland ist (G. Berg, mündliche Aussage). Auf Grund dessen, dass die Biosynthese, der Ursprung und die Evolution als auch die biologische und ökologische Funktion von Sodorifen unbekannt sind, kann nur spekuliert werden, ob sich *S. plymuthica*-Isolate an das Habitat von *Brassica*-Arten in der Umgebung von Rostock, Deutschland adaptiert haben und somit die Fähigkeit der Sodorifen-Emission lokal z.B. durch horizontalen Gen-Transfer mit anderen Organismen erhalten haben. Die Adaption von Bakterien an neue Bedingungen und Einflüsse in der Umwelt durch horizontalen Gentransfer konnte bereits u.a. von Heuer & Smalla (2012) gezeigt werden. Zufällige Mutationen mit oder ohne Genduplikationen als auch durch eigene Tranposasen könnten ebenfalls zu einen neuen Stoffwechselweg oder der Modifikation eines bekannten Stoffwechselwegs wie der Biosynthese von Sodorifen geführt haben.

Die Fähigkeit der Sodorifen-Emission könnte in dem Habitat ein Vorteil gegenüber anderen Organismen (Bakterien, Pilze, Nematoden) und dadurch zur Verbreitung in der Umgebung geführt haben. Hinweise zu diesen Hypothesen könnten unter der Voraussetzung, dass erste Gene des Biosyntheseweges aufgedeckt wurden, Analysen mit Metagenom-Datenbanken ergeben (Daniel 2005). Zudem würden weitere Isolationen von *Serratia*-Spezies aus der Rhizosphäre von Feldern in der Umgebung von Rostock (Deutschland) zeigen, wie weit die Fähigkeit der Sodorifen-Emission verbreitet ist und möglicherweise Korrelationen mit der Bodenbeschaffenheit (verwendete Düngemittel usw.) oder weiteren im Habitat gefundenen Organismen erlauben.

Neben den Spekulationen bezüglich des Ursprungs der Sodorifen-Emission bleibt offen, ob Sodorifen in der Rhizosphäre von den Bakterien tatsächlich emittiert wird. Hinweise dafür ergaben Analysen mit *S. plymuthica* 4Rx13 kultiviert in einem erdähnlichen Medium

(*soil solution equivalent* - SSE Medium, Angle et al. 1991), bei denen die Emission von Sodorifen dokumentiert wurde. Dieses Medium simuliert die Ionenkonzentrationen eines lehmhaltigen Bodens, der auch der bevorzugte Standort von *Brassica napus* ist. VOC-Analysen von *S. plymuthica* 4Rx13 kultiviert in Erde könnten diesen Hinweis bekräftigen.

In ersten Bioassay-Untersuchungen mit verschiedenen Konzentrationen an Sodorifen in direktem und indirektem Kontakt mit *Arabidopsis thaliana* konnte kein Wachstumseinfluss nachgewiesen werden (Kai et al. 2010, Weise unveröffentlicht). Es bleibt daher zu diskutieren, ob die Emission von Sodorifen lokal an den Wurzeln von *B. napus* oder *S. tuberosum* einen Einfluss haben könnte. Auch erste Vorversuche mit den Pilzen *Rhizoctonia solani* und *Sclerotinium sclerotium* zeigten keinen Wachstumseinfluss (Weise, unveröffentlicht). Dennoch ist nicht auszuschließen, dass Sodorifen unter den Bedingungen des Habitats von *Brassica*-Arten einen Einfluss auf die dort lebenden Pilze haben kann. Auch eine antibakterielle Wirkung von Volatilen emittiert durch Bakterien der Gattung *Geobacillus* wurde bereits vermutet (Ren et al. 2010) und könnte für Sodorifen zutreffen. Die Emission flüchtiger Fettsäuren durch die Spezies *Veilonella* und *Bacteroides* führten zur Wachstumsregulation bei den enteropathogenen Spezies *Salmonella*, *Escherichia* und *Pseudomonas* (Wrigley 2004). Weiterhin konnten bakterielle Volatile (Dimethyldisulfid) emittiert von *Pseudomonas fluorescens* und *Serratia plymuthica* auch als *quorum-sensing quenching* Moleküle nachgewiesen werden (Chernin et al. 2011). Es ist nicht auszuschließen, dass Sodorifen ähnliche Mechanismen in Bakterien auslösen kann. Analysen mit Krebszell-Linien und Sodorifen ergaben wiederum einen konzentrationsabhängigen negativen Wachstumseinfluss (Harms, 2009). Daher wäre es denkbar, dass Sodorifen eine Wirkung auf tierische Zellen haben könnte. Bioassays mit Protozoen aus der Rhizosphäre könnten Aufschluss darüber geben. Ein synergistischer Effekt mit anderen Volatilen, die von *S. plymuthica* aber auch anderen Organismen emittiert werden, ist ebenfalls denkbar. Neben den direkten Wachstumseinflüssen auf andere Organismen ist auch die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, dass es als Infochemikalie einen indirekten Einfluss auf die Interaktion zwischen anderen Bakterien und/oder anderen Organismen haben kann. Kai et al. (2010) spekulierten, das Sodorifen ($C_{16}H_{26}$) als reduzierte Substanz auch als Kohlenstoffspeicher für sich oder andere Organismen dienen könnte. Fütterungsversuche mit chemisch synthetisiertem Sodorifen könnten diese Vermutungen bekräftigen. Alle genannten möglichen Funktionen könnten vor allem mit Sodorifen-negativen Mutanten analysiert werden, wofür die Aufklärung der Biosynthese von Sodorifen eine Grundlage darstellt.

4.2 Biosynthese von Sodorifen

Neben der nicht bekannten Funktion der ungewöhnlichen flüchtigen Verbindung Sodorifen gab es bisher auch keinerlei Hinweise auf dessen Biosynthese (Kai et al. 2010). Um Informationen über die zugrunde liegenden Stoffwechselwege zu erhalten, wurden in dieser Arbeit zwei Ansätze verfolgt. Zum einen wurde eine Genom-Analyse von *S. plymuthica* 4Rx13 durchgeführt, was die Grundlage für weitere molekularbiologische Arbeiten darstellt und zum anderen wurden physiologische Untersuchungen mit Hilfe unterschiedlicher Nährstoffangebote realisiert.

4.2.2.1 Genom-Analysen

In Kooperation mit dem Göttingen Genomics Laboratory (G2L, Göttingen, Deutschland) wurde das komplette Genom von *Serratia plymuthica* 4Rx13 mittels 454-Pyrosequenzierung analysiert (NCBI, Project ID 41022, Thürmer et al. 2009). Die Sequenzierungen und anschließenden Bearbeitungen ergaben ein 5,36 Mb großes Chromosom mit einem G/C-Gehalt von 56,16 % und 4876 offenen Leserahmen. Nach automatischer Annotation erfolgte die manuelle Annotation bei 30 % der offenen Leserahmen mit Hilfe diverser Datenbanken. Die Daten der Genomgröße als auch der G/C-Gehalt reihen sich in die Bereiche der Ergebnisse anderer vollständig sequenzierter *Serratia*-Spezies (Genomgröße: 3,1 - 3,5 Mb, G/C-Gehalt: 55 - 56,2 %) ein (NCBI).

Neben dem bakteriellen Chromosom konnte zusätzlich ein 75 kb großes Plasmid mit 36 offenen Leserahmen nachgewiesen werden. Weitere Analysen ergaben, dass alle in dieser Arbeit untersuchten *Serratia*-Isolate inklusive den Sodorifen-Produzenten mindestens ein Plasmid besitzen. Dies könnte auf einen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein eines Plasmides und der Sodorifen-Biosynthese hindeuten, da im Allgemeinen Plasmide dafür bekannt sind die genetischen Informationen für Moleküle des sekundären Metabolismus zu tragen (Demain & Fang 2000). Das Plasmid von *S. plymuthica* 4Rx13 weist nach manueller Annotation Hinweise auf 11 offene Leserahmen, die für Tra-Gene codieren. Bei einem F-ähnlichen Transfersystem von Bakterien sind häufig eine große Anzahl sogenannter Tra-Genen involviert (zusammengefasst in Zatyka & Thomas 1998). Das Vorhandensein von 11 potentiellen Tra-Genen weist demnach auf ein F-ähnliches Plasmid hin, das leicht in das bakterielle Chromosom von *S. plymuthica* 4Rx13 als auch in andere Spezies integriert werden kann. Zusätzlich befinden sich nach manueller Annotation 18 offene Leserahmen auf dem Plasmid, denen keine bekannte Funktion zugeordnet werden konnte (hypothetische Proteine). Diese sind über das ganze Plasmid mit unterschiedlicher Transkriptionsorientierung verteilt. Darunter finden sich drei offene Leserahmen, die für hypothetische Proteine codieren und ohne größere Lücken dieselbe Transkriptionsorientierung aufweisen. Dabei könnte es sich um ein potentielles Gen-Cluster handeln, dass theoretisch für

mehrere Enzyme des Biosyntheseweges von Sodorifen in Frage kommen könnte. Zusätzlich sind weitere vier hypothetische Proteine zu finden, die ebenfalls dieselbe Transkriptionsorientierung haben und theoretisch ebenso für die Biosynthese von Sodorifen in Frage kommen. Diese Leserahmen werden jedoch durch größere Bereiche unterbrochen und möglicherweise nicht transkribiert. Festzuhalten ist, dass von den 18 Leserahmen auf dem Plasmid, die für hypothetische Proteine codieren, 11 Leserahmen keinerlei Sequenzidentität zu den anderen vollständig sequenzierten *Serratia*-Isolaten, die alle zu den Nicht-Sodorifen-Produzenten zählen, aufweisen. Um eindeutige Aussagen darüber treffen zu können, ob Plasmid-codierende Gene bei der Sodorifen-Synthese beteiligt sind, müssten weitere Untersuchungen erfolgen. Versuche, in denen das Plasmid mit Hilfe diverser chemischer und physikalischer Methoden aus *S. plymuthica* 4Rx13 eliminiert werden sollte, scheiterten bisher (Magnus 2012). Auch erste Versuche das Plasmid von *S. plymuthica* 4Rx13 umgekehrt in einen nicht-Sodorifen-produzierenden *Serratia*-Stamm zu transformieren, waren bisher erfolglos (Magnus 2012). Transkriptionsanalysen mit *S. plymuthica* 4Rx13 mittels reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) könnten Hinweise geben, ob die auf dem Plasmid codierten Gene, die z.B. keine Funktionszuweisung haben, unter den Bedingungen bei denen Sodorifen emittiert wird, überhaupt transkribiert werden. Zusätzlich könnte bei den weiteren Sodorifen-Produzenten *S. plymuthica* HRO-C48 und *S. plymuthica* 3Re-4-18, dessen Genomsequenzen nicht vorliegen, mit Hilfe von spezifischen Primern überprüft werden, ob die Gene des *S. plymuthica* 4Rx13 Plasmids detektiert werden können. Auch die Sequenzierung der Plasmide der Stämme HRO-C48 und 3Re-4-18 könnte eindeutig zeigen, inwiefern sich die Sequenzen der Plasmide der Sodorifen-Produzenten ähneln und ein Zusammenhang mit der Sodorifen-Emission zulassen. Den tatsächlichen Beweis, ob Gene des Plasmids an der Biosynthese von Sodorifen beteiligt sind, könnten letztendlich knock-out Mutanten erbringen.

Um weitere Hinweise auf potentielle Gen-Regionen zu erhalten, die an der Sodorifen-Biosynthese beteiligt sein könnten, wurde das Genom von *S. plymuthica* 4Rx13 mit den Sequenzen der bis dato vollständig sequenzierten, in NCBI frei zugänglichen, nicht-Sodorifen-produzierenden Stämme *S. proteamaculans* 568, *S. marcescens* Db11, *S. odorifera* DSM4582, *S. plymuthica* AS9 und *S. plymuthica* PRI-2C verglichen. Diese Analysen ergaben, dass die Sequenzen von 312 offenen Leserahmen wenig bis keine Identität (E-Value e^{-20} -1 und NW-Identität 0-20 %) zu den anderen *Serratia*-Spezies aufweisen. Unter der Annahme, dass die *Serratia*-Spezies, bei denen kein Sodorifen detektiert werden konnte, keine Gene für die Sodorifen-Biosynthese besitzen, sind diese 312 offenen Leserahmen potentielle Kandidatengene, die weiter analysiert werden sollten. Darunter befinden sich u.a. die 11 offenen Leserahmen, die auf dem Plasmids lokalisiert sind, als auch 19 offene Leserahmen, die für ein Polyketid (PKS-Cluster) codieren.

Die Arbeitsgruppe von Jörn Piel (ETH Zürich, Schweiz) entdeckte anhand von Sequenzvergleichen, dass dieses PKS-Cluster ebenfalls im Genom von *Dickeya dadantii* zu finden ist. Analysen ergaben, dass Sodorifen nicht bei der Kultivierung von *Dickeya dadantii* detektiert werden konnte (Weise, Anhang: Rohdaten GCMS Files). Weiterhin zeigten Software-basierende Struktur-Vorhersagen des Polyketids, dass sich diese nicht mit der Struktur von Sodorifen deckt (mündliche Aussage von Jörn Piel, ETH Zürich, Schweiz). Kürzlich publizierten Martilla et al. (2012) die Biosynthese als auch das Produkt Oocydin A für das PKS-Cluster von *S. plymuthica* 4Rx13, welches zusätzlich in *Serratia marcescens* MSU97 gefunden wurde und eine antifungale und anti-oomycetische Funktion besitzt. Somit können die offenen Leserahmen des PKS-Clusters nicht in Zusammenhang mit der Biosynthese von Sodorifen gebracht werden. Unter der Annahme, dass die Biosynthese der ungewöhnlichen Struktur neuartige und unbekannte Stoffwechselwege beinhaltet, kommen abzüglich der offenen Leserahmen des Plasmids und der Gene des PKS-Clusters 165 offene Leserahmen für die Produktion von Sodorifen in Betracht. Nach automatischer Annotation codieren diese offenen Leserahmen hypothetische Proteine, die an unbekanntem Stoffwechselwegen beteiligt sein könnten. Besonders interessant sind potentielle Cluster von offenen Leserahmen, die für hypothetische Proteine codieren, da vermutlich mehrere Enzyme an der Biosynthese von Sodorifen beteiligt sind, dessen Gene im Genom dicht beieinander lokalisiert sein könnten. Zusätzlich finden sich eine Reihe weiterer offener Leserahmen mit einer ersten Funktionszuweisung, die manuell überprüft werden müssen und bisher nicht als Kandidatengene ausgeschlossen werden können. Vergleichende Transkriptions- als auch Proteomanalysen unter Sodorifen-produzierenden und nicht-Sodorifen-produzierenden Bedingungen oder zwischen produzierenden und nicht-produzierenden Bakterienstämmen könnte die Anzahl an Kandidatengenen, die einen Einfluss auf die Biosynthese von Sodorifen haben, einengen. Dabei würden vor allem auch Gene in den Vordergrund treten, die eine erste Funktionszuweisung erhalten haben und bisher noch in keinen Zusammenhang mit der Emission von Sodorifen aufgefallen sind. Die Beteiligung jedes Kandidatengens an der Sodorifen-Biosynthese könnte dann folglich durch knock-out Mutanten überprüft werden. Dafür wurde ein System nach dem „Quick and Easy *E. coli* Gene Deletion Kit“ (Gene Bridges, Heidelberg, Deutschland) für *S. plymuthica* 4Rx13 etabliert. Innerhalb dieser Arbeit wurden zwei ausgewählte Kandidatengene (Sod_d00970 und Sod_c02280), die für hypothetische Proteine codieren, nach der BiBlast-Analyse im Vergleich zu den anderen nicht-Sodorifen-produzierenden Stämmen nur bei *S. plymuthica* 4Rx13 vorkommen und in einem potentiellen Cluster auf dem Chromosom in einer Transkriptionsorientierung lokalisiert sind analysiert. Diese potentiellen Cluster beinhalten zusätzlich weitere Leserahmen, die einmalig in *S. plymuthica* 4Rx13 sind. Sod_c02280 fiel zudem in ersten vergleichenden Proteom-Analysen durch das Vorhandensein eines dominanten Spots in

einem unter Sodorifen-produzierenden Bedingungen erstellten 2D-Gel auf, der unter nicht-Sodorifen-produzierenden Bedingungen nicht detektiert werden konnte (Domik & Glocker, persönliche Mitteilung). Die manuelle Annotation als auch die Identifizierung des Spots im 2D-Gel ergaben, dass die Sequenz von Sod_c02280 vermutlich in zwei codierende Bereiche eingeteilt werden muss. Der eine Bereich enthält Domänen für Phosphono-Pyruvat-Decarboxylase und der andere für eine Aspartat-Aminotransferase. Da beide Insertions-Mutanten (4Rx13::d00970 und 4Rx13::c02280) keine sichtbaren Unterschiede in der Emission volatiler Verbindungen inklusive Sodorifen gegenüber dem Wildtyp zeigten, wird ein Einfluss dieser offenen Leserahmen auf die Emission und damit auf die Biosynthese von Sodorifen ausgeschlossen.

Neben der gezielten, gerichteten Mutagenese besteht auch die Möglichkeit der ungerichteten Mutagenese z.B. mittels Transposons, die willkürlich ins Genom integriert werden (zusammengefasst in Mills 1985). Um anschließend die an der Biosynthese von Sodorifen beteiligten Gene zu finden, müsste eine Screening-Methode etabliert werden, bei der sich die nicht-Sodorifen-produzierenden von den Sodorifen-produzierenden Mutanten schnell und leicht unterscheiden ließen. Weiterhin besteht die Möglichkeit mit Hilfe von Transposon-Mutagenese und einer gepoolten Kultur aus daraus resultierenden Klonen, unter Sodorifen-produzierenden und nicht-produzierenden Bedingungen eine gewissen Anzahl an essentiellen Genen über Verdünnungsschritte und Sequenzierung zu detektieren, die entweder in Zusammenhang mit der Sodorifen-Produktion gebracht werden können und damit in die engere Auswahl der Kandidatengene rücken oder ausgeschlossen werden können, was die Anzahl der zu untersuchenden Gene minimieren könnte (modifiziert von Langridge et al. 2009).

Eine andere Strategie findet sich in der Möglichkeit der Expression von *S. plymuthica* 4Rx13-Genen in einem nicht-produzierenden Stamm. Dafür wurde das Genom von *S. plymuthica* 4Rx13 in der Arbeitsgruppe von Jörn Piel (ETH Zürich, Schweiz) in eine Gen-Bibliothek in *E. coli* angelegt. Diese Bibliothek wurde auf die Emission von Sodorifen untersucht. Dabei konnten keine Sodorifen-produzierenden Klone detektiert werden (Marco Kai, persönliche Mitteilung). Das könnte zum einen daran liegen, dass der Bereich der Gene, der für die Biosynthese von Sodorifen codiert, nicht zusammenhängend in einem transformierten *E. coli*-Klon vorlag oder aber *E. coli* weitere für die Emission von Sodorifen notwendige Bedingungen, wie z.B. spezifische Mechanismen und Proteine für den Transport von Sodorifen aus der Zelle raus, nicht besitzt.

4.2.2.2 Stoffwechselphysiologische Untersuchungen

Die erfolgreiche Kombination aus Genom-Analyse und Fütterungsexperimenten konnte bereits bei der Aufklärung des Methylerythritol-Phosphat-Wegs (MEP) zur Synthese von Isoprenoiden bei *E. coli* gezeigt werden (Rodriguez-Concepcion 2004). Weiterhin konnten erste Hinweise auf die Biosynthese von den durch Actinomyceten emittierten Terpenen Geosmin und 2-Methylisoborneol durch Fütterungen mit radioaktiven oder deuterierten Vorstufen gefunden werden (Bentley et al. 1981, Kikuchi et al. 1981, Spitteller et al. 2002). Für die Aufklärung der Biosynthese von Sodorifen wurde dieser Ansatz ebenfalls gewählt, um mit Fütterungsversuchen verschiedener Substrate Hinweise auf die Stoffwechselrichtungen und die notwendigen Enzymklassen zu erhalten.

Zunächst wurden 22 verschiedene Aminosäure-Kombinationen getestet. Insgesamt zeigte sich, dass die Emission von Sodorifen unabhängig von der Anzahl der Kohlenstoffatome der Aminosäuren war. Dies ist beispielsweise an den Fütterungen mit Alanin und Methionin zu erkennen. Mit Ala (C₃) als alleinige Kohlenstoffquelle, konnte Sodorifen detektiert werden, wohingegen mit Met (C₅) keine Sodorifen-Produktion aufgezeichnet werden konnte. Weiterhin brachten verschiedene 3er und 7er Aminosäure-Kombinationen unterschiedliche Sodorifen-Emissionen hervor. So konnte mit einer 3er Kombination (z.B. His+Met+Thr) über den ganzen Untersuchungszeitraum mehr Sodorifen detektiert werden als mit einer 7er oder 4er Kombination (z.B. Ala+Arg+Iso+Leu+Phe+Pro+Thr oder Gly+Lys+Ser+Val). Zusätzlich konnte keine Korrelation zwischen der Emission von Sodorifen und der Emission anderer Volatile (z.B. Schwefelverbindungen) in den Fütterungsexperimenten festgestellt werden, was auf bekannte zugrunde liegende Stoffwechselwege oder Stoffwechselrichtungen hätte weisen können.

Niedrige Emissionen von Sodorifen wurden mit Kombinationen verzeichnet, die die Aminosäuren Arg, Glu, Gln, Gly, Iso, Leu, Orn, Phe, Pro, Ser, Try und Val enthielten. Diese Aminosäuren sind in den Stickstoff-Kreislauf (Arg, Glu, Orn) involviert oder gehören dem Stoffwechsel der verzweigten Aminosäuren (Leu, Iso, Val) als auch dem Glutamat-Stoffwechsel (Glu, Gln, Pro) an (Stryer et al. 2012, Kanehisa & Goto 200, Kanehisa et al. 2012). Eine geringe Sodorifen-Produktion kann auch auf ein geringes Zellwachstum zurückzuführen sein. So zeigt ein Vergleich der Zellzahlen, dass mit gewissen Aminosäure-Kombinationen (z.B. Met+Thr+Cys+Ala) geringere Zellzahlen erreicht wurden und eine geringere Sodorifen-Emission ergaben als mit anderen Kombinationen (z.B. Ala+Thr+Met). Andererseits wurden z.B. in den Kombinationen Met+Thr+Ala gleiche Zellzahlen erreicht wie mit Met+Thr+Glu, doch sehr unterschiedliche Sodorifen-Emission detektiert. Eine eindeutige Korrelation zwischen Wachstum und Zellmasse und der Sodorifen-Emission ist somit nicht zu erkennen.

Auffällig ist, dass alle Kombinationen, die Cystein enthielten (z.B. Ala+Cys+Met+Thr, Cys+His+Met+Thr oder Cys+Met+Thr), zu sehr niedrigen Sodorifen-Emissionen führten. Wurden die gleichen Kombinationen dagegen ohne Cystein gefüttert (z.B. Ala+Met+Thr, His+Met+Thr oder Met+Thr), führte das zu erheblich höheren Emissionen von Sodorifen. Aus der Literatur ist bekannt, dass exogenes Cystein inhibitorisch auf das Wachstum von *E. coli* wirken kann (Kari et al. 1971), was anhand der Zellzahlen für *S. plymuthica* 4Rx13 ebenfalls zutreffen könnte. Dies könnte weiter noch die Aufnahme einiger Aminosäuren aus dem Medium hemmen und dadurch zu einer geringeren Sodorifen-Emission führen.

Eine höhere Sodorifen-Emission als mit dem Kontroll-Medium NB konnte dagegen vor allem mit den Kombinationen His+Lys+Met, Ala+His+Met, Ala+Met+Thr und Ala+Met erzielt werden. Diese Kombinationen enthalten alle Methionin, was auf eine essentielle Aminosäure für die Sodorifen-Biosynthese hinweisen würde. Jedoch konnte mit Methionin als alleinige Kohlenstoffquelle und in Kombination mit Threonin kein bzw. wenig Sodorifen detektiert werden, wohingegen dessen Kombination mit Histidin oder Alanin zu einer höheren Sodorifen-Emission führte. Zusätzlich ist zu erkennen, dass mit den Kombinationen His+Lys+Met und Ala+His+Met etwa gleich hohe Sodorifen-Emissionen detektiert werden konnten. Das weist darauf hin, dass die Aminosäuren Lysin als auch Histidin weniger als Kohlenstoffquelle für die Biosynthese von Sodorifen in Frage kommen. Diese Vermutung wird von den Fütterungen mit der Kombination Ala+His+Lys unterstützt, bei der ähnlich hohe Sodorifen-Emission zu erkennen sind wie im Vergleich mit Ala als alleinige Kohlenstoffquelle. Die Produktion von Sodorifen durch Alanin scheint durch die Zugabe von Methionin unterstützt zu werden.

Weiterhin wäre es auch möglich, dass in einigen Aminosäure-Kombinationen (z.B. Met+Thr) die Kohlenstoffatome (hier Met) zunächst für den Primärstoffwechsel genutzt werden, die in anderen Aminosäure-Kombinationen aufgrund einer weiteren für den Primärmetabolismus leichter zu verstoffwechselnden Aminosäure (z.B. Ala) dann für die Biosynthese von Sodorifen dienen könnten (z.B. Ala+Met).

Generell ist bei den Fütterungsversuchen zu bedenken, dass aufgrund von fehlenden Transportmechanismen einige Aminosäuren nicht oder schlechter von den Zellen aufgenommen werden könnten. Im Allgemeinen werde die Aminosäure-Transportsysteme bei Bakterien zwischen katabole- und anabole Verwertung unterschieden (Marin & Krämer 2009). Zusätzlich ist bekannt, dass nicht alle Bakterien, z.B. *Corynebacterium glutamicum*, uneingeschränkt alle Aminosäuren katabolisieren können, weshalb diese dann häufig exkretiert werden. Bislang konnten bereits eine Reihe an Transportern und Transportsystemen für Aminosäuren in Bakterien nachgewiesen werden. Dazu zählen die Transportsysteme für die sauren Aminosäuren Glutamat und Aspartat, die verzweigten und aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und

Tryptophan als auch für Prolin, Lysin und Methionin (zusammengefasst in Marin & Krämer 2009). Interessanterweise konnten in *C. glutamicum* zwei Aufnahmesysteme für Methionin nachgewiesen werden, von denen das eine den neuen Transporter MetP beinhaltet, der neben Methionin die Aminosäure Alanin akzeptiert und das bisher einzige Alanin-Aufnahmesystem in *C. glutamicum* darstellt (Marin & Krämer 2009). Die Gene für dieses System scheinen in Bakterien häufig vorzukommen und könnten ebenfalls in *S. plymuthica* 4Rx13 vorhanden sein. Ein Transporter, der mit hoher Affinität Methionin und Alanin in die Zellen aufnimmt, würde eine hohe Emission von Sodorifen mit diesen beiden Aminosäuren erklären können.

Insgesamt führten diese Aminosäure-Fütterungen zu keinen eindeutigen Hinweisen der Sodorifen-Biosynthese in *S. plymuthica* 4Rx13, so dass neben den Aminosäuren auch Glucose als Kohlenstoffquelle für die Emission von Sodorifen gefüttert wurde. Zu allen analysierten Zeitpunkten wurde in dem Glucose-Medium mit vergleichbaren Zellzahlen weniger Sodorifen detektiert als im peptidhaltigen Kontrollmedium (NB). Erste Fütterungsversuche mit *S. plymuthica* 4Rx13 in NB-Medium versetzt mit [U-¹³C₆]-D-Glucose ergaben ebenfalls keinen eindeutigen Einbau in das Sodorifen-Molekül (Kai & Reuß, persönliche Mitteilung). Daraus lassen sich 2 Szenarien spekulieren. Zum einen könnten die Aminosäuren im peptidhaltigen NB-Medium eine Vorstufe in der Biosynthese von Sodorifen sein und damit sofort für dessen Produktion zur Verfügung stehen, wohingegen in Medium mit Glucose als Kohlenstoffquelle die Aminosäuren erst im Laufe des Metabolismus synthetisiert werden müssen. Zum anderen könnte es sich um den klassischen „Glucose-Effekt“, der Katabolitrepression handeln (Moses & Judkin, 1968, zusammengefasst in Brückner & Titgemeyer 2002). Solange Glucose als Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht, könnte die Transkription, der für die Biosynthese von Sodorifen relevanten Gene, reprimiert sein. Ist die Glucose innerhalb von 24h verbraucht, würde die Expression der Sodorifen-Biosynthese Gene erfolgen und Sodorifen emittiert werden. Für das Szenario der Katabolitrepression sprechen auch die Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationen an Glucose im Medium der Bakterien. Die Zugabe von steigenden Glucose-Konzentrationen im NB-Medium führte zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Sodorifen-Emission. Je mehr Glucose im Medium war, desto später würde die Expression der für Sodorifen relevanten Gene erfolgen. Die transkriptionelle Regulation der Emission von flüchtigen Thiolverbindungen in *Saccaromyces cerevisiae* durch Katabolitrepression konnte bereits gezeigt werden (Thibon et al. 2008). Auch Deutscher (2008) spekulierte über einen Zusammenhang zwischen der Emission von Volatilen und Katabolitrepression. Mit bekannter Biosynthese könnte die Regulation auf Transkriptions- und Translationsebene genauer in *S. plymuthica* 4Rx13 untersucht werden.

Neben der Hypothese, dass Aminosäuren Vorstufen von Sodorifen sein können, wurde auch ein Terpen hinter der Struktur von Sodorifen vermutet. In den Arbeiten von Kai et al. (2010) wurden

im Profil der Volatile von *S. plymuthica* 4Rx13 bereits Hinweise auf die Emission der Monoterpene β -Myrcen, Ocimen oder Terpeneol gefunden. Daher ist es nicht verwunderlich, dass das Genom von *S. plymuthica* 4Rx13 alle notwendigen Gene für den für Gram-negative Bakterien bekannten Methylerythritol-Phosphat-Weg (MEP) zur Synthese von Terpenen aufweist (Rodich et al. 2001). Fütterungsexperimente mit den für isoprenoide Verbindungen bekannten Vorstufen Acetat (Mevalonat-Weg) oder Pyruvat (MEP-Weg) ergaben jedoch keine bzw. eine niedrige Sodorifen-Emission. Das Wachstum von *S. plymuthica* 4Rx13 auf Pyruvat war vergleichsweise gut wie mit dem Kontrollmedium NB während kein Wachstum der Zellen auf Acetat festgestellt wurde. Fütterungen mit [2-¹³C]-Acetat in NB-Medium ergaben weiterhin keine eindeutigen Einbauergebnisse in das Sodorifen-Molekül (Reuß et al., 2010), so dass eine Sodorifen-Synthese über den Mevalonat-Weg unwahrscheinlich erscheint. Eine mögliche Synthese über den MEP-Weg ist nicht ganz ausgeschlossen und könnte weiterhin mit einem Inhibitor des am MEP-Weg beteiligten Enzyms untersucht werden. So ist Fosmidomycin als spezifischer Inhibitor der 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reducto-Isomerase des MEP-Weges bekannt (Kuzuyama et al. 1998). Auch könnten durch knock-out-Mutanten nachgewiesen werden, ob die Gene des MEP-Weges und anderer bekannter Stoffwechselwege isoprenoider Verbindungen in einem Zusammenhang mit der Biosynthese von Sodorifen stehen.

Da auch die Intermediate des zentralen Stoffwechselzyklus (TCC) für die Beteiligung an der Biosynthese von Sodorifen in Frage kommen, wurden diese Moleküle als mögliche Substrate für die Sodorifen-Biosynthese in *S. plymuthica* 4Rx13 getestet. Dabei zeigte sich, dass mit den Carbonsäuren Citrat, Succinat und Fumarat große Emissionen von Sodorifen detektiert werden konnten. Succinat erzielte sogar die bis dato höchste detektierte Sodorifen-Emission. Mit Oxalacetat, α -Ketoglutarat und Malat wurde dagegen nur wenig bis kein Sodorifen detektiert.

Dabei ist zu beachten, dass bei den Fütterungsversuchen mit den Carbonsäuren als auch Propionat und Acetat der pH-Wert des Medium auf pH 6,2 eingestellt wurde, um ein Wachstum der Bakterien zu ermöglichen. Im Verlauf der Versuche wurde der pH-Wert unter den verschiedenen Kohlenstoffquellen (inkl. Aminosäure-Kombinationen) randomisiert verfolgt. Häufig veränderte sich der pH-Wert in den basischen Bereich z.B. bis pH 8,4. So wurde eine geringe Sodorifen-Emission in Medium mit den Aminosäuren Gly+Lys+Ser+Val als auch mit Pyruvat und Veränderung des pH-Wertes in den basischen Bereich (bis pH 8,1) detektiert während eine hohe Sodorifen-Emission mit Fumarat bei pH 6,3-6,9 festgestellt wurde. Weiterhin ergaben erste Versuche mit gleicher Kohlenstoffquelle (α -Ketoglutarat) und unterschiedlich eingestelltem pH-Werten (pH 6 und pH 7) keinen Unterschied in der Emission von Sodorifen (Weise, unveröffentlicht). Versuche in denen der pH-Wert des Mediums gepuffert ist, könnten weitere Indizien über einen möglichen Einfluss des pH-Wertes auf die Emission von Sodorifen liefern.

Succinat scheint unter allen getesteten Kohlenstoffquellen das geeignetste Substrat für eine hohe Sodorifen-Emission zu sein. McNeil et al. (2012) zeigten in *Serratia*-Spezies erstmals konservierte Gene, die u.a. für das Succinat-Dehydrogenase Protein E codieren, welches für das Wachstum mit Succinat als einzige Kohlenstoffquelle benötigt wird. Weiterhin wurde gezeigt, dass Succinat bei Anaerobiern für den Succinat-Propionat-Stoffwechselweg wichtig ist, bei dem Lactat in Propionat umgewandelt wird und parallel zur Konvertierung von Pyruvat in Succinat führt (Macy et al. 1978). Da die Gattung *Serratia* zu den fakultativ anaeroben Bakterien gehört, wurde unter aeroben Bedingungen Propionat gefüttert, mit dem dennoch kein Sodorifen detektiert werden konnte. In Pflanzen konnte Succinat auch als Vorstufe von Tropan-Alkaloiden nachgewiesen werden (Kalantyr & Tikhonov, 1967).

Als Fazit der bisherigen Fütterungen erscheint Succinat als bisher geeignetstes Substrat für die Biosynthese von Sodorifen von *S. plymuthica* 4Rx13. Dementsprechend sollte mit Hilfe isotopenmarkierter Kohlenstoffe der Einbau in Sodorifen verfolgt werden. Dafür wurde [1,4-¹³C₂]-Succinat und [2,3-¹³C₂]-Succinat an *S. plymuthica* 4Rx13 gefüttert und das gebildete Sodorifen in Kooperation mit den Naturstoffchemikern Wittko Franke (Universität Hamburg, Deutschland) und Stephan v. Reuß (MPI, Jena, Deutschland) mittels NMR-Technik analysiert. Es zeigte sich, dass Kohlenstoffatome beider Substrate in Sodorifen erfolgreich eingebaut wurden. Dabei waren die markierten Carboxylgruppen vom [1,4-¹³C₂]-Succinat in den Methylgruppen von Sodorifen zu finden, was auf starke Reduktionsschritte während der Biosynthese hinweist. Die markierten Kohlenstoffatome des [2,3-¹³C₂]-Succinats konnten dagegen in allen Positionen von Sodorifen gefunden werden. Dies beinhaltet Duplett-Signale, welche durch den zusammenhängenden Einbau der markierten C₂-Einheit entstehen. Zwei mögliche Einbauszenarien für den Cyclohexyl-Ring in Sodorifen können aus den Spektren beider markierter Substrate geschlossen werden. Zum einen kann es zum Einbau von zwei C₃-Einheiten und zwei C₂-Einheiten aus Succinat in Sodorifen kommen oder eine C₄-Einheit und drei C₂-Einheiten führten zur Bildung von Sodorifen. Beide Szenarien unterscheiden sich darin, dass die eingebauten Carboxylgruppen entweder aus einer oder zwei Succinat-Verbindungen stammen. Eine Möglichkeit zwischen diesen Szenarien unterscheiden zu können, bestand in der Analyse des Einbaus von [U-¹³C₄]-Succinat in Sodorifen. Doch zeigten die NMR-Spektren keine Unterschiede in den Signalen zwischen dem Einbau [2,3-¹³C₂]-Succinat und [U-¹³C₄]-Succinat, was wiederum den Einbau einer C₄-Einheit ausschließen würde. Bei den Ergebnissen ist zu berücksichtigen, dass Succinat als einzige Kohlenstoffquelle zur Produktion von Sodorifen zur Verfügung stand, aber nur ein Teil davon (20%) markiert gefüttert wurde. Es ist ebenfalls möglich, dass die markierten Kohlenstoffatome des Succinats im Verlauf der Versuche über den gesamten Metabolismus verteilt wurden und letztendlich über diverse Stoffwechselwege für die Produktion von Sodorifen

verwendet wurden. Zusammengefasst ergeben die bisherigen Fütterungsversuche mit markiertem Succinat alleinig nur wenig eindeutige Aufschlüsse bezüglich der Biosynthese von Sodorifen.

Kornberg (1966) entdeckte neben dem Zitrat-Zyklus, den Glyoxylat-Weg in *E. coli*. Dabei wird aus zwei Molekülen Acetyl-CoA ein Molekül Succinat gebildet. Generell dient der Stoffwechselweg insbesondere Pflanzen und Bakterien dazu aus Fettsäuren bzw. Fettsäure-Abbau Produkten über Succinat und die Gluconeogenese Glucose zu gewinnen (zusammengefasst in Bloch 1952). Im Allgemeinen ist in *Serratia*-Spezies der Zitrat-Zyklus präsent (Green & Williams, 1959), so dass auch in *S. plymuthica* 4Rx13 die Gene für einen vollständigen Zitrat-Zyklus als auch den Glyoxylat-Weg gefunden werden konnten. Zusätzlich zu den Eluaten der isotopenmarkierten Succinat-Versuche wurden die Metabolite im Zellüberstand analysiert. Darin konnten die markierte Intermediate des Zitrat-Zyklus detektiert werden. Daraus lässt sich schließen, dass mit Succinat als Substrat der Zitrat-Zyklus und nicht der Glyoxylat-Weg durchlaufen wird.

Weiterhin wurde [1,2-¹³C₂, 3,4-¹³C₂, 5-¹³C]-Valin Carbamid im Zellüberstand detektiert. Das könnte im Metabolismus durch die Umwandlung von Succinat in Pyruvat entstanden sein. Zwei Pyruvat Moleküle hätten dann über Zwischenschritte Valin bzw. Valincarbamid gebildet (**Abb. 4-1**). Das markierte Carbamid wies weiterhin ein Markierungsmuster auf, das so auch in Sodorifen gefunden wurde und auf eine intramolekulare Methylgruppen-Umlagerung hinweist. Es wäre demnach möglich, dass Valin-Carbamid eine Zwischenstufe in der Sodorifen-Biosynthese darstellt, obwohl keine auffällige Sodorifen-Emission in den Fütterungsversuchen ohne markierte Kohlenstoffatome mit Valin als auch Pyruvat detektiert wurde. Ein Grund dafür könnte eine schlechte oder verzögerte Substrat-Aufnahme der *S. plymuthica* 4Rx13 Zellen oder im Falle von Valin eine ungünstige Kombination mit anderen Aminosäuren, die nicht alleine den Primärstoffwechsel erhalten können, sein. Dies könnte dann zu einer Substrat-Limitierung für die Sodorifen-Biosynthese führen. Aktuelle Fütterungsversuche mit [U-¹³C]-Alanin und [2,3-¹³C₂]-Alanin könnten zum einen Hinweise auf dessen Einbau in Sodorifen ergeben und zusätzlich ermöglichen sie weitere Untersuchungen über einen möglichen Zusammenhang mit [3-¹³C]-Pyruvat und/oder der Synthese von Valin und der Biosynthese von Sodorifen. Erste Daten weisen darauf hin, dass die Kohlenstoffatome aus einer Kombination von aus Alanin, Methionin und Succinat in das Sodorifen-Molekül gelangen könnten, was auf bekannte Stoffwechselwege zurück zu führen sein könnte. Der Zusammenbau der Atome zu dem Molekül Sodorifen scheint weiterhin durch unbekannte Enzyme und möglichen neuen Stoffwechselwege zu erfolgen.

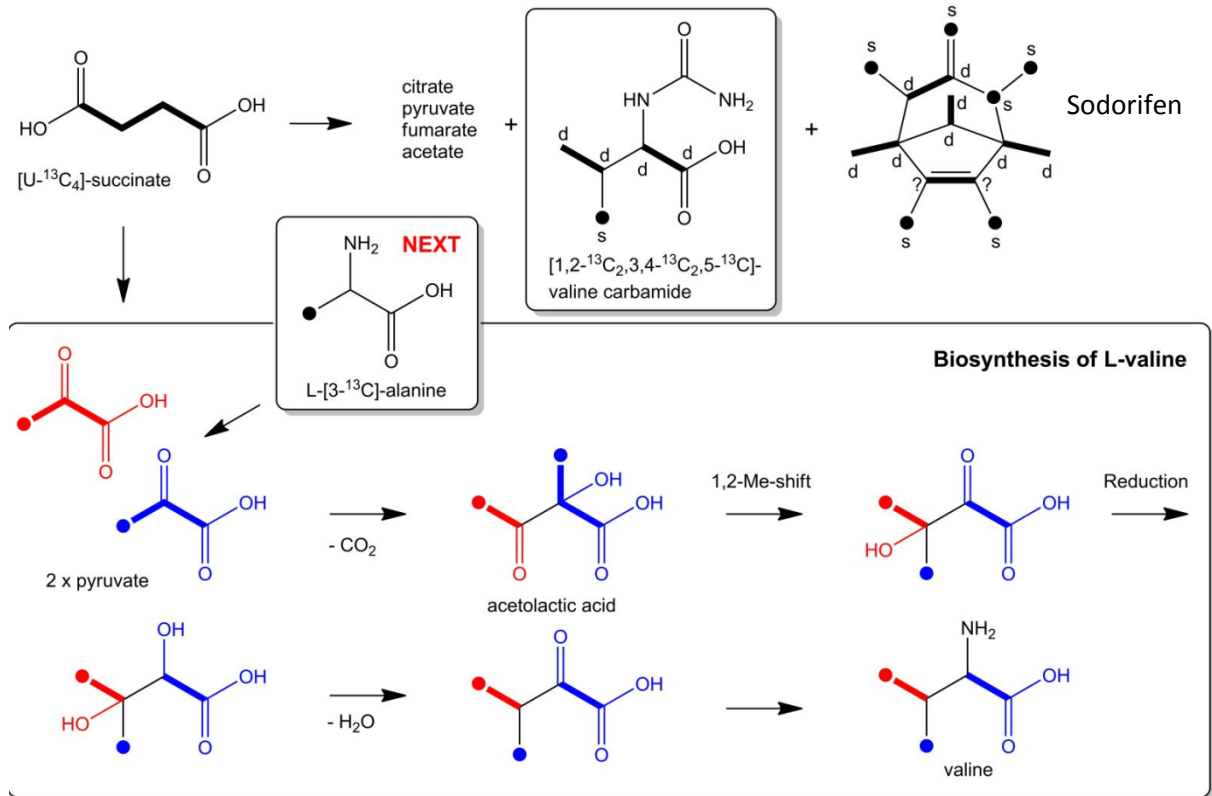


Abbildung 4-1: Stoffwechsel-Szenario von Sodorifen. Reihe oben: In den Fütterungsexperimenten mit *S. plymuthica* 4Rx13 konnten die Kohlenstoff-Atome von [U-¹³C₄]-Succinat in Citrat, Fumarat, Acetat und Pyruvat sowie im Valin Carbamid und Sodorifen detektiert werden. Dabei wurde ein ähnlich markiertes Fragment-Muster in Valin Carbamid und Sodorifen gefunden. **Reihe unten:** Szenario wie aus 2 Molekülen Pyruvat über diverse Reaktionen Valin entstehen kann. D und hervorgehobener Strich: Duplett-Signal, s und gefüllter Kreis: Singulett-Signal.

Auffällig in der Struktur von Sodorifen sind sieben Methylgruppen, die während der Biosynthese durch Methyltransferasen in das Molekül gelangen könnten. Um Hinweise auf diese Vermutungen zu erhalten, wurde [S-¹³CH₃]-Methionin in NB-Medium an *S. plymuthica* 4Rx13 gefüttert (M. Kai, persönliche Mitteilung). Diese ergaben im Massenspektrum einen Einbau von mindestens einer Methylgruppe in Sodorifen (Anhang: MS von Sodorifen mit ¹³C-Methionin, mit Genehmigung von M. Kai). Da der Pentamethylcyclopentadienyl Peak bei m/z 136 nicht angereicht war, kann von Nachmethylierungen in Sodorifen an Kohlenstoff-Position 2, 3 und/oder 4 ausgegangen werden. Diese Positionen wurden ebenfalls von Succinat markiert, doch können die Kohlenstoff-Atome von Succinat über den Zitrat-Zyklus zu Oxalacetat weiter mit Hilfe der Oxalacetat-Decarboxylase zu Pyruvat und dem Serin-Metabolismus, über N-Methyltetrahydrofolat und einer Methioninsynthese ebenfalls im [S-¹³CH₃]-Methionin enden (Kanehisa & Goto 200, Kanehisa et al. 2012, Sauer & Eikmanns 2004, Matthews et al. 1998). Dagegen ergab eine Kombination von Succinat und Methionin in ersten Fütterungsversuchen keine Sodorifen-Emission. Diese Ergebnisse müssen zunächst reproduziert und ein Einfluss durch vermindertes Wachstum ausgeschlossen werden. Sollte sich dieses Ergebnis bestätigen, bleibt zu

spekulieren, ob Methionin in Kombination mit Succinat einen negativen Einfluss auf die Biosynthese von Sodorifen haben kann.

4.3 Einfluss volatiler Verbindungen von *Serratia plymuthica* auf das Wachstum von *Arabidopsis thaliana*

Neben den Analysen der Emission und Biosynthese bakterieller Volatile stellt die biologische Funktion einen weiteren Schwerpunkt in der Forschung dar. Ein Einfluss bakterieller Volatile konnte auf das Wachstum verschiedener Organismen wie den Modellpflanzen *Arabidopsis thaliana* (Ruy et al. 2003, Verpermann et al. 2007, Kai et al. 2010, Blom et al., Wenke et al. 2012a) und *Physcomitrella patens* (Kai et al. 2011), verschiedenen Pilzen wie *Rhizocotonia solani*, *Aspergillus nidulans* oder *Sclerotinium sclerotium* (Kai et al. 2009, Weise et al. 2012) aber auch Protozoen wie *Acanthamoeba castellanii* und *Paramecium caudatum* (Kai et al. 2009) gezeigt werden. Darauf aufbauend war es von Interesse herauszufinden, welche Substanzen der bakteriellen Volatilen-Gemische eine biologische Wirkung auf die Testorganismen ausüben. In einfachen Petrischalen-Bioassays konnten mit einzelnen volatilen Verbindungen wie 2,3-Butandiol, Dimethyldisulfid, 2-Phenylethanol und Indol eine konzentrationsabhängige Wachstumsbeeinflussung auf *A. thaliana* gezeigt werden (Ruy et al. 2004, Kai et al. 2010, Blom et al. 2012, Wenke et al. 2012a) wohingegen die neuartige Verbindung Sodorifen keine Veränderungen auf das Wachstum von *A. thaliana* hatte (Kai et al. 2010). Derartige Versuchsansätze sind jedoch kritisch zu betrachten, da die applizierten Konzentrationen oftmals nicht den emittierten Konzentrationen der Bakterien entsprechen, die Applikation der Verbindungen häufig nur einmalig erfolgt und Bakterien Volatile kontinuierlich emittieren können und auch die Wirkung von genau definierten Mischungsverhältnissen mit anderen Verbindung berücksichtigt werden sollte.

Nach detaillierten Analysen der flüchtigen bakteriellen Verbindungen wurde deutlich, dass sich das Emissions-Profil der Bakterien mit unterschiedlichem Nährstoffangebot verändern kann. Dieser Einfluss hatte auch in den Co-Kulturrexperimenten Auswirkungen auf den Effekt der bakteriellen Volatile mit *A. thaliana*. Mit steigender Glucose-Konzentration im Medium der Bakterien, verringerte sich die Wachstumsinhibition der Pflanzen. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in Co-Kulturrexperimenten mit *Xanthomonas*-Spezies und verschiedenen Pilzen beobachtet werden (Weise et al. 2012). Daraus lässt sich schließen, dass bei Kultivierung der Bakterien auf peptidhaltigem Medium negativ auf *A. thaliana* wirkende Verbindungen emittiert werden könnten, die mit Glucose-haltigem Medium nicht oder nur in geringeren Konzentrationen vorliegen. Weiterhin ist aus den Fütterungsversuchen mit *S. plymuthica* 4Rx13 bekannt, dass sich

der pH-Wert der Medien, in denen die Bakterien kultivieren, verändern kann. Auch in den Co-Kultur-Experimenten veränderte sich der pH-Wert auf den verschiedenen Agar-Medien der Bakterien als auch auf dem Medium der Pflanzen. Dabei zeigte sich, dass je höher die Konzentration an Glucose im Medium der Bakterien war, desto geringer war auch die pH-Wert Veränderung in den Medien beider Organismen. Dies korrelierte mit der Inhibition der Pflanzen. Aus der Literatur ist bekannt, dass Bakterien neben organischen flüchtigen Verbindungen auch anorganische flüchtige Verbindungen emittieren (Schulz & Dickschat 2007). Dazu zählt neben Kohlenstoffdioxid, dem in den Co-Kultur-Experimenten mit abgedichteten kompartimentierten Petrischalen ein positiver Wachstumseffekt auf *A. thaliana* zugesprochen werden kann, auch Ammoniak (Kai & Piechulla 2010, Kai et al. 2010). In ersten Bioassays mit kompartimentierten Petrischalen und zu Beginn der Versuche einmalig applizierter Ammoniak-Lösung konnte eine konzentrationsabhängige Wachstumsinhibition auf *A. thaliana* verzeichnet werden (Kai et al. 2010). Dieser Einfluss wurde weiterhin im Zusammenhang mit der pH-Wert Veränderung in den Co-Kulturen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Ammoniak-Emission mit der pH-Wert Veränderung im Verlauf der Zeit einhergeht. Auf Grund dessen, dass in den Petrischalen bis Versuchsende nahezu konstant Ammoniak detektiert werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass die Bakterien unter den getesteten Bedingungen kontinuierlich Ammoniak emittieren. In weiteren optimierten Versuchen wurde deutlich, dass sowohl Ammoniak-Lösung als auch der basische pH-Wert alleinig den Einfluss der Bakterien auf *A. thaliana* phänotypisch in den Co-Kultur-Experimenten imitieren kann. Um diese These zu unterstützen, wurde Phosphorsäure als Ammoniak-Adsorbens in 3-geteilten Petrischalen mit Co-Kultivierung der Bakterien und Pflanzen angewendet. Mit Anwesenheit von Phosphorsäure konnte der inhibitorische Einfluss von Ammoniak auf *A. thaliana* signifikant verringert werden und die Pflanzen erschienen phänotypisch gleich den Kontroll-Pflanzen ohne Einfluss der Bakterien. Auch der pH-Wert glich dem Wert in den entsprechenden Kontrollen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass viele Rhizobakterien (inklusive *S. plymuthica* HRO-C48) unter den gegebenen Bedingungen in dem Petrischalen-System Ammoniak emittieren und eine pH-Wert Veränderung im Pflanzenmedium auslösen, was mit den Effekten auf die Pflanze in Co-Kultivierung korrelierte. Aus den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass das durch Bakterien emittierte Ammoniak und der ins basische veränderte pH-Wert des Mediums einen Großteil der Wachstumsinhibition der Pflanzen auslöst. Ähnliche Ergebnisse der NH_3 -Emission und pH-Wert Veränderung wurden in dem Petrischalen-System mit *Xanthomonas*-Spezies und verschiedenen Pilzen gezeigt (Weise, unveröffentlicht). Es bleibt zu spekulieren, ob es der alleinige Inhibitor in den Petrischalen-Experimenten ist oder in Kombination mit anderen bekannten und unbekanntem Volatilen synergistisch wirkt.

Die Tatsache, dass Bakterien Ammoniak emittieren ist nicht neu und wurde in diversen Arbeiten beschrieben. Ammoniak spielt im Metabolismus aller Organismen eine zentrale Rolle, da es u.a. als Stickstoff-Quelle für die Synthese von Aminosäuren und Nukleotiden dienen kann (zusammengefasst in Reitzer 2003). Es wird von verschiedensten Bakterien während der Nitrit-Ammonifikation (Simon 2002) oder beim Abbau von Proteinen und Aminosäuren (Kanapka & Kleinberg 1983) produziert. Özugul & Özugul (2007) zeigten, dass Spezies wie *Clostridium*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Morganella*, *Citrobacter* als auch *Klebsiella*, *Listeria*, *Pseudomonas* oder *Salmonella* die Fähigkeit haben eine oder mehrere Aminosäuren zu decarboxylieren und Ammoniak zu produzieren. Neben der Decarboxylierung kann Ammoniak auch durch Desaminierung der Aminosäuren oder durch die hydrolytische Degradation von Harnstoff emittiert werden (Kleiner et al. 1998). In dem Genom von *S. plymuthica* 4Rx13 wurden insgesamt mehr als 40 offene Leserahmen gefunden, die putativ für Ammoniak produzierende Enzyme codieren. Darunter befanden sich diverse Ammoniak Lyasen, Desaminasen, Nitrilasen und Nitrit-Reduktasen. Weiterhin konnte mindestens ein putativer NH_3 -Transporter gefunden werden, was die Emission von NH_3 als auch NH_4^+ in den Luftraum der Petrischale ermöglichen könnte. Es ist weiterhin bekannt, dass die NH_3 -Emission bei verschiedenen Bakterien-Spezies variieren kann und vor allem vom Substrat, der Temperatur und dem pH-Wert abhängig ist.

In der Literatur wurde Ammoniak auch als olfaktorisch wahrnehmbares Signalmolekül von *Bacillus licheniformis* beschrieben, das Biofilm-Formationen und Pigment-Produktion auslöste. *B. licheniformis* besaß demnach die Fähigkeit zur Informationsaufnahme aus der Umwelt und konnte physikalisch darauf reagieren (Nijland & Burgess 2010). Damit wurde zum ersten Mal eine durch flüchtige Verbindungen der Gasphase ausgelöste Reaktion bei Bakterien gezeigt. Weiterhin kann durch Bakterien emittiertes Ammoniak einen Einfluss auf das Antibiotikaresistenz-Spektrum von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien haben (Bernier et al. 2011).

Der Einfluss von Ammoniak auf Pflanzen ist ebenfalls gut beschrieben. Pflanzen können Ammoniak von exogenen Quellen assimilieren oder von anderen stickstoffhaltigen Verbindungen recyceln. So stellen der Glutamin-Synthetase (GS)-Glutamat-Synthase (GOGAT)-Zyklus und die Glutamat-Dehydrogenase (GDH) Stickstoff den Pflanzen für lebensnotwendige Prozesse her. Dadurch wird die zelluläre Ammoniak-Konzentration auf nicht toxischen, niedrigen Level gehalten. Wenn allerdings Ammoniak in hohen Konzentrationen in den Pflanzenzellen akkumuliert, führt dies zu Chlorose der Blätter, niedriger Wurzel/Spross-Rate, erhöhter Wurzelverzweigung und schlechterer Keimungsrate und Keimentwicklung (Britto & Kronzucker 2002). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind vielfältig und beinhalten u.a. die Schädigung des PSII durch eine Entkopplung der Elektronen-Kette, Veränderung des osmotischen Gleichgewichts und des Hormon Haushalts oder Mineralmangel bedingt durch eine

verschlechterte Aufnahme von Kationen (zusammengefasst in Britto & Kronzucker, 2002). Weiterhin ist bekannt, dass NH_3 schnell von pflanzlichen Zellen bei einem hohen externen pH-Wert aufgenommen wird (Kosegarten et al. 1997, Wilson et al. 1998). Daneben konnte bei Pflanzen ein Stimulus durch NH_3 -Behandlung bei hohem pH-Wert nachgewiesen werden, der eine Erhöhung der cytoplasmatischen Kalzium Konzentration hervorrief (Plieth et al. 2000). Kalzium wiederum spielt eine wichtige Rolle in der Signal-Erkennung und Weiterleitung in Pflanzen (zusammengefasst in Plieth et al. 2000). Welcher der möglichen Ammoniak-Effekte in den co-kultivierten *A. thaliana*-Pflanzen erfolgen, wurde hier nicht näher untersucht. Für die Aufnahme externen Ammoniaks über die Blätter (NH_3) oder die Wurzeln (NH_4^+) sind Transporter (AMT) erforderlich. Bisher werden der AMT-Gen Familie in *Arabidopsis thaliana* 5 Gene zugeordnet, die in den Wurzeln exprimiert werden und ein Gen, dessen Expression im Pollen nachgewiesen werden konnte (Loque & von Wiren, 2004; Yuan et al., 2007 und 2009). Nach intensiver Literaturrecherche konnte bisher noch kein Transporter in Blättern nachgewiesen werden, so dass die Aufnahme in höheren Pflanzen vermutlich ausschließlich über die Stomata erfolgt. In den Co-Kultur-Experimenten mit Bakterien und Pflanzen könnte aufgenommenes Ammoniak zu einer Alkalisierung des Zytosols geführt haben. Da die Bakterien kontinuierlich Ammoniak emittieren, würde der intrazelluläre pH-Wert aus dem Gleichgewicht geraten und dadurch zum chlorotischen Phänotyp der in Co-Kultur wachsenden Pflanzen geführt haben. Detaillierte morphologische Analysen von *A. thaliana* co-kultiviert mit *S. plymuthica* HRO-C48 ergaben im Vergleich zu Kontrollpflanzen ohne den Einfluss bakterieller Volatile bereits nach 48 h der Co-Kultivierung ein signifikant vermindertes Wachstum der Blatt- und Wurzellänge (Wenke et al. 2012). Weiterhin konnte ebenfalls nach 48 h der Co-Kultivierung konstant das Stresssignal H_2O_2 mittels Diaminobenzin-Färbung (DAB-Assay) in den Kotyledonen nachgewiesen werden (Wenke et al. 2012). Dieser Zeitpunkt korreliert mit den Ergebnissen des Regenerations-Versuches der Pflanzen. Es wurde beobachtet, dass wenn *A. thaliana* nur 36 h den bakteriellen Volatilen ausgesetzt ist, eine Regeneration phänotypisch erfolgte. Nach 48 h Co-Kultivierung mit den Bakterien wurden zum einen der Einfluss auf die Morphologie als auch die Akkumulation von H_2O_2 in den Pflanzen sichtbar und zum anderen konnten die Pflanzen sich von dem biotischen Einfluss der bakteriellen Volatile nicht mehr erholen. Dieser Zeitpunkt korreliert mit dem Anstieg der Ammoniak-Emission der Bakterien als auch der pH-Wert Veränderung im Medium der Pflanzen. Es ist also denkbar, dass der Einfluss von Ammoniak als auch die Alkalisierung des Pflanzenmediums nach 48 h der Co-Kultur in dem Petrischalen-System nicht mehr reversibel ist.

Dieser Einfluss kann auch auf die Ergebnisse der verschiedenen *A. thaliana* Akzessionen mit *S. plymuthica* HRO-C48 zutreffen. Eine Transkriptom-Analyse von *A. thaliana* Col-0 während der

Co-Kultivierung mit *S. plymuthica* HRO-C48 ergaben im Vergleich zur Kontrolle ohne Bakterien 889 regulierte Gene. Dabei wurden vor allem mehr Gene herunter als hoch reguliert (Wenke et al. 2012a). Viele der regulierten Gene konnten mit abiotischen und biotischen Stressantworten in Zusammenhang gebracht werden. Darunter befanden sich Gene, die für essentielle Rezeptoren der Pathogenabwehr als auch für das pflanzliche Immunsystem codieren (Wenke et al. 2012). *In silico* Analysen dieser Datensätze zeigten weiterhin ein unterschiedlich reguliertes Gen-Profil verschiedener *A. thaliana* Akzessionen gegenüber der analysierten Akzession Col-0 (Wenke, unveröffentlicht). Aus der Literatur ist zusätzlich bekannt, dass *A. thaliana*-Akzessionen, die von verschiedenen Habitaten stammen, unterschiedlich auf abiotische und biotische Faktoren reagieren können (Koorneef et al. 2004, Hasdai et al. 2006, Carmo et al. 2007, Bouchabke et al. 2008). Der Einfluss der bakteriellen Volatile auf die Frischmasse der 22 hier untersuchten Akzessionen unterschied sich jedoch gegenüber dem Einfluss auf die Akzession Col-0 kaum. Nur Akzession C24 und Ler zeigten geringe Unterschiede in der Wurzellänge. Li et al. (2011) zeigten bereits, dass der negative Einfluss von NH_4^+ sich unterschiedlich auf die Frischmasse zwischen *A. thaliana* Col-0 und JA22 auswirken kann. Zum einen kann es daher sein, dass keine der hier getesteten Pflanzen-Akzessionen im Vergleich zu Col-0 Ammoniak-toleranter ist oder aber das die durch die Bakterien emittierten NH_3 -Konzentrationen über dem Schwellenwert der Toleranz jeder Akzession liegen. Lediglich in der Wurzellänge konnte nach Co-Kultivierung ein geringer Unterschied (10 - 20 %) bei den Akzessionen C24 und Ler gegenüber der Kontrolle Col-0 gemessen werden. Über die Habitate der Akzessionen kann nach intensiver Literaturrecherche keine Auskunft gegeben werden. Lediglich der Ort ist bekannt. So stammen C24 aus Coimbra (Portugal), Ler (Polen) und Col-0 aus Columbia (USA) (Micallef et al. 2009). Weiterhin muss diskutiert werden, in wie weit diese Interaktionsexperimente der Dual-Kulturen ökologisch relevant sind. Ammoniak eine nicht unerhebliche Rolle spielen könnte, wenn Bakterien z.B. auf Kadavern oder auf organisch gedüngten Feldern wachsen. Versuche mit Wurzel-Exudaten könnten Hinweise darauf geben, ob die Bakterien, die sich in Biofilmen an den Wurzeln befinden, solche Konzentrationen an Ammoniak emittieren, die zu erheblichen Wachstumsbeeinträchtigungen der Pflanzen führen könnten. Der bisher verwendete Versuchsaufbau stellt ein artifizielles Petrischalen-System dar, bei dem einige Nachteile berücksichtigt werden müssen. Zum Beispiel werden die Bakterien unter artifiziiellen Nährstoff- und Temperatur-Bedingungen mit jungen *A. thaliana*-Keimlingen co-kultiviert. Weitere Hinweise auf artifizielle Effekte zwischen Bakterien und Pflanzen ergaben auch die Versuche mit abgedichteten und nicht abgedichteten Petrischalen. In den abgedichteten Petrischalen akkumulierte von Bakterien emittiertes Kohlenstoffdioxid, welches zu einer Wachstumspromotion der Pflanzen führte (Kai & Piechulla 2010). Allerdings führten die

bisherigen Arbeiten im Petrischalen-System zu ersten Erkenntnissen über den Einfluss von bakteriellen Volatilen mit anderen Organismen (Ryu et al. 2003, Vespermann et al. 2007, Kai et al. 2009, Kai et al. 2010, Blom et al. 2011, Wenke et al. 2012a). Ziel in weiteren Untersuchungen der bakteriellen Volatile und deren ökologische Relevanz müsste es sein, neue Modellsysteme zu etablieren, die von dem bisherigen Wissensstand profitieren.

5. Literaturverzeichnis

Angle J.S., Mc Garth S.P., Chaney R.L. (1991). New culture medium containing ionic concentrations of nutrients similar to concentrations found in the soil solution. *Appl Environ Microbiol* 57:3674-3676.

Ashelford K.E., Fry J.C., Bailey M.J., Day M.J. (2002). Characterization of *Serratia* isolates from soil, ecological implications and transfer of *Serratia proteamaculans* subsp. *quinivora* Grimont et al. 1983 to *Serratia quinivorans* corrig., sp. nov. *Int J Syst Evo Microbio* 52:2281-2289.

Austin B. (1989). A review: Novel pharmaceutical compounds from marine bacteria. *J Appl Bacteriol* 67:461.

Bentley R., Meganathan R. (1981). *FEBS Lett.* 125:220-222.

Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. *Biochemistry*. 5th edition. New York: W H Freeman; 2002. Section 23.5, Carbon Atoms of Degraded Amino Acids Emerge as Major Metabolic Intermediates. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22453/>

Berg G., Roskot N., Steidle A., Eberl L., Zock A., Smalla, K. (2002). Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. *Appl Environ Microbiol* 68: 3328-3338.

Bonfield J.K., Smith K.F., Staden R. (1995). A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Res.* 24, 4992-4999.

Bloch K. (1952). Interrelation ship of lipid and carbohydrate metabolism. *Annu Rev Biochem* 21:273-300.

Blom D., Fabbri C., Eberl L., Weisskopf, L. (2011). Volatile-mediated killing of *Arabidopsis thaliana* by bacteria is mainly due to hydrogen cyanide. *Appl Environ Microbiol* 77: 1000-1008.

Bouchabke O, Chang F., Simon M., Voisin R., Pelletier G., Durand-Tardif M. (2008). Natural variation in *Arabidopsis thaliana* as a tool for highlighting differential drought responses. *PLOS ONE* 3:e1705.

Bu'Lock J.D. (1961). Intermediary Metabolism and Antibiotic Synthesis. *Advances in Applied Microbiology* 3:293-342.

Brakhage A.A. (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature reviews* 11:21-32.

Breed R.S., Breed M.E. (1924). The type species of the genus *Serratia*, commonly known as *Bacillus prodigiosus*. *J Bacteriol* 9:545-557.

- Breitmaier E.** (2012). Vom NMR-Spektrum zur Strukturformel organischer Verbindungen. Wiley Verlag.
- Britto D.T., Kronzucker H.J.** (2002). NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. *J Plant Physiol* 159: 567-584.
- Brückner R., Titgemeyer F.** (2002). Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiology Letters* 209:141-148.
- Bruce A., Verall S., Hackett C.A., Wheatley R.E.** (2004). Identification of volatile organic compounds (VOCs) from bacteria and yeast causing growth inhibition of sapstain fungi. *Holzforschung* 58:193-198.
- Bu'Lock J.D.** (1961). Intermediary Metabolism and Antibiotic Synthesis. *Advances in Applied Microbiology* 3:293-342.
- Carmo L.S.T., Candido E., Campos P.F., Quezado-Duval Al.M., Leonardecz E., Lopes C.A., Quirino B.F.** (2007). Natural variability in *Arabidopsis thaliana* germplasm response to *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. *Filopatol. Bras.* 32:97-103.
- Chanway C.P., Hynes R.K., Nelson L.M.** (1989). Plant-growth promoting rhizobacteria: effects on growth and nitrogen fixation of lentil (*Lens esculenta* Moench) and pea (*Pisum sativum* L.). *Soil Biology and Biochemistry* 21:511-517.
- Chernin L., Toklikishvili N., Ovadis M., Kim S., Ben-Ari J., Khmel I., Vainstein A.** (2011). Quorum sensing quenching by rhizobacterial volatiles. *Environ Microbio Rep* 3:698-704.
- Curtis T.P, Sloan W.T., Scanell J.W.** (2002). Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10494-10499.
- Daniel R.** (2005). The metagenomics of soil. *Nature Reviews Microbiology* 3:470-478.
- Dauga C., Grimont F., Grimont P.A.D.** (1990). Nucleotide sequences of 16S rRNA from ten *Serratia* species. *Res Microbiol* 141:1139-1149.
- Davis und Mingioli, 1950**
- Davies J.** (1990). *Mol. Microbiol.* 4:1227-1232.
- Demain A.L.** (1999). Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 52:455-463.
- Demain A.L., Fang A.** (2000). The natural function of secondary metabolites. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 69:1-39.

- Domik D.** (2012). VOC-Emission und 2D-Gel-Analyse von *Serratia odorifera*. Diplomarbeit Universität Rostock.
- Deutscher J.** (2008). The mechanism of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 11:87-93.
- Dudareva N., Negre .F, Nagegowda D., Orlova I.** (2006). Plant volatiles: Recent advantages and further perspectives. *Science* 25:417-440.
- Dykhuizen D.E.** (1998). Santa Rosalia revisited: Why are there so many species of bacteria? *Anotie Leeuwenhaek* 73:25-33.
- Effmert U., Kalderas J.J., Warnke R., Piechulla B.** (2012). Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. *J Chem Ecol* 36:665-703.
- Ercolini D., Russo F., Nasi A., Ferranti P., Villani F.** (2009). Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential in vitro and in beef. *Appl Environ Micorbiol* 75:1990-2001.
- Fernando W.G., Ramarathnam R., Krishnamoorthy A.S., Savchuk S.C.** (2005). Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biology Biochemistry* 37:955-964.
- Fiddaman P.J., Rossall S.** (1993). The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. *J Appl Bacteriol* 76:119-126.
- Flyg C., Kenne K., Boman H.** (1980). Insect pathogenic properties of *Serratia marcescens*: Phage-resistant mutants with a decreased resistance to *Cecropia* immunity and a decreased virulence to *Drosophila*. *J Gen Microbiol* 120:173-181.
- Forney F.W., Markovetz A.J.** (1971). The biology of methyl ketones. *J. Lipid Res.* 12:383–395.
- Gao S., Moorberry E.S., Steele J.L.** (1998). Use of ¹³C Nuclear magnetic resonance and gas chromatography to examine methionine catabolism by *Lactococci*. *Appl Envir Microbio* 64:4670-4675.
- Gallois A., Grimont P.A.D.** (1985). Pyrazines responsible for the potatolike odor produced by some *Serratia* and *Cedecea* strains. *Appl Environm Microbiol* 50: 1048-1051.
- George P, Gupta A., Gopal M, Thomas L, Thomas G.V.** (2013). Multifarious beneficial traits and plant growth promoting potential of *Serratia marcescens* KiSII and *Enterobacter* sp. RNF 267 isolated from the rhizosphere of coconut palms (*Cocus nucifera* L.). *World J Micobiol Biotechnol* 29(1):109-117.

- Gottschalk G.** (1979). Bacterial Metabolism. Springer Verlag :142.
- Green J.A., Williams R.P.** (1959). Evidence for a tricarboxylic acid cycle in *Serratia marcescens*. Journal of Bacteriology 78 (3) 336-342.
- Grimont P.A.D., Grimont F., Richard C., Davis B.R., Steigerwalt A.G. Brenner D.J.** (1978). Desoxyribonucleic acid relatedness between *Serratia plymuthica* and other *Serratia* species with a description of *Serratia odorifera* sp.nov. (Type strain: ICPB 3995). Int J System Bacteriol 28: 453-463.
- Grimont F., Grimont P.A.D.** (2006). The genus *Serratia*. Prokaryotes 6:219-244.
- Grimont P.A.D., Grimont F., Dulong de Rosnay H.L.C.** (1977). The taxonomy of the genus *Serratia*. J Gen Microbiol 98:39-66.
- Hasdai M., Weiss B., Levi A., Samach A., Porat R.** (2006). Differential responses of Arabidopsis ecotypes to cold, chilling and freezing temperature. Ann Appl Biol 148:113-120.
- Harms I.** (2009). Einfluss flüchtiger bakterieller Metabolite auf tierische Zellen. Diplomarbeit Universität Rostock.
- Haslam E.** (1986). Nat Prod Rep 3:217-249.
- Hertwick C.** (2009). The Biosynthetic Logic of Polyketide Diversity. Angewandte Chemie Int Ed 48:4688-4716.
- Heuer H., Smalla K.** (2012). Plasmids foster diversification and adaptation of bacterial populations in soil. FEMS Microbiol Rev 36:1083-1104.
- Hibbing M.E., Clay F., Parsek M.R., Peterson S.B.** (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. Nat Rev Microbio 8:15-25.
- Ichikawa N., Sasagawa M., Yamamoto M., Komaki H., Yoshida Y., Yamasaki S., Fujita N.** (2013). DoBISCUIT: a database of secondary metabolite biosynthetic gene clusters. Nucleic Acids Research 41:D408-D414.
- Kai M., Piechulla B.** (2009). Plant growth promotions due to rhizobacterial volatiles - an effect of CO₂? FEBS Lett 583: 3473-3477.
- Kai M., Effmert U., Berg G., Piechulla B.** (2007). Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. Arch Microbiol 187: 351-360.
- Kai M., Vespermann A., Piechulla B.** (2008). The growth of fungi and *Arabidopsis thaliana* is influenced by bacterial volatiles. Plant Signal Behav 3: 1-3.

Kai M., Haustein M., Molina F., Petri A., Scholz B., Piechulla B. (2009) Bacterial volatiles and their action potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 81: 1001-1012.

Kai M., Piechulla B. (2010) Impact of volatiles of the rhizobacteria *Serratia odorifera* on the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Signal Behav* 5: 1-3.

Kai M., Crespo E., Cristescu S.M., Harren F.J.M., Piechulla B. (2010). *Serratia odorifera*: analysis of volatile emission and biological impact of volatile compounds on *Arabidopsis thaliana*. *Appl Microbiol Biotechnol* 88: 965-976.

Kanapka J.A., Kleinberg I. (1983). Catabolism of arginine by the mixed bacteria in human salivary sediment under conditions of low and high glucose concentration. *Archs oral Biol* 11: 1007-1015.

Kanehisa M., Goto S., Sato Y., Furumichi M., and Tanabe M. (2012). KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular datasets. *Nucleic Acids Res* 40: D109-D114.

Kanehisa M. & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 28: 27-30.

Kalantyr M.S., Tikhonov Y.B. (1967). Succinic acid as a precursor of the tropane alkaloids. *Chemistry of Natural Compounds* 3(6):331-332.

Kari C., Nagy Z., Kovacs P., Hernadi F. (1971). Mechanism of the growth inhibitory effect of cysteine on *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology* 68:349-356.

Kikuchi T., Kadota S., Suehara H., Nishi A., Tsubaki K. (1981). *Chem Pharm Bull* 29:1782-1784.

Kleiner D., Traglauer A., Domm S. (1998). Does ammonia production by *Klebsiella* contribute to pathogenesis? *Bull Inst Pasteur* 96: 257-265.

Knudsen J., Gershenson J. (2006). The chemical diversity of floral scent. *Biology of Floral Scent* 27-52.

Koorneef M, Alonso-Blanco C., Vreugdenhil D. (2004). Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana*. *Annu Rev Plant Biol* 55:141-72.

Kornberg H.L. (1966) The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *Biochem J* 99:1-11.

Kosegarten H., Grolig F., Wieneke J., Wilson G., Hoffmann B. (1997). Differential ammonia-elicited changes of cytosolic pH in root hair cells of rice and maize as monitored by 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5 (and -6)-carboxyfluorescein-fluorescence ratio. *Plant Physiol* 113: 451-461.

- Kuzuyama T., Shimizu T., Takahashi S., Seto H.** (1998). Fosmidomycin, a specific inhibitor of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in the nonmevalonate pathway of terpenoid biosynthesis. *Tetrahedron Letters* 39:7913-7916.
- Langridge G.C., Phan M.D., Turner D.J., Perkins T.T., Parts L., Haase J., Charles I., Maskell D.J., Peters S.E., Dougan G., Wain J., Parkhill J., Turner A.K.** (2009). Simultaneous assay of every *Salmonella Typhi* gene using one million transposon mutants. *Genome Research* 19:2308-2316.
- Laurenco C., Melo C.I., Bogel-Lukasik R., Lukasik E.** (2012). Solubility Advantage of Pyrazine-2-carboxamide: application of alternative solvents on the way to the future pharmaceutical development. *J Chem Eng Data* 57:1525-1533.
- Li M., Ho P.Y., Yao S., Shimizu K.** (2006). Effect of *sucA* or *sucC* gene knock out on the metabolism on *Escherichia coli* based on gene expression, enzyme activities, intracellular metabolic concentrations and metabolic fluxes by ¹³C-labeling experiments. *Biochemical Engineering Journal* 30:286-296.
- Li B., Weiming S, Yanhua S.** (2011). The differing response of two *Arabidopsis* ecotypes to ammonium are modulated by the photoperiod regime. *Acta Physiol Plant* 33:325-334.
- Lilly B.O., Brewer J.H.** (1953). The selective antibacterial action of phenyl alcohol. *Journal of the American Pharmaceutical Association* 42:6-8.
- Loque D., von Wiren N.** (2004). Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. *J Exp Bot* 55: 1293-1305.
- Macy J.M., Ljungdahl L.G., Gottschalk G.** (1978). Pathway of Succinate and Propionate Formation in *Bacteriodes fragilis*. *Journal of Bacteriology* 134:84-91.
- Magnus N.** (2012). Plasmid Analysen von *Serratia* sp. 4Rx13. Diplomarbeit Universität Rostock.
- Mahlen S.D.** (2011). *Serratia* infections: from military experiments to current practice. *Clin Microbiol Rev* 24:755-791.
- Maiden M.C.J.** (2006). Multilocus Sequence Typing of Bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 60:561-88.
- Manzano-Marin A., Lamelas A., Latorre A.** (2012). Comparative Genomics of *Serratia* spp.: Two paths towards endosymbiotic life. *PLOS ONE* 7:e47274.
- Marin K., Krämer R.** (2009). Import und Export von Aminosäuren in Bakterien. *BioSpektrum* 15:600-604.

- Martilla M.A., Stöckmann H., Leeper F.J., Salmond G.P.C.** (2012). Identification of oocydin A biosynthetic gene clusters. *JBC*
- Martinec T., Kocur M.** (1961). A taxonomic study of the members of the genus *Serratia*. *Intern Bul Bacteriol Nomencl Taxon* 11:73-78.
- Masschelein J., Mattheus W., Gao L.-J., Moons P., van Houdt R., Uytterhoeven B., Lamberigts C., Lescrinier E., Rozenski J., Herdewijn P., Aertsen A., Michiels C., Lavingne R.** (2013). A PKS/NRPS/FAS Hybrid Gene Cluster from *Serratia plymuthica* RVH1 Encoding the Biosynthesis of Three Broad Spectrum, Zeamine-Related Antibiotics. *PLOS ONE* 8 (1):e54143.
- McNeil M., Clulow J., Wilf N., Salmond G., Fineran P.** (2012). EdhE is a conserved protein required for Flavinylation of Succinate Dehydrogenase in Bacteria. *J Boil Chem* 287:18418-18428.
- Medema M.H., Blin K., Cimermancic P., de Jager V., Zakrzewski P., Fischbach M.A., Weber T., Takano E., Breitling R.** (2011). antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Research* 39:W339-W346.
- Metthews R.G., Sheppard C., Goulding C.** (1998). Methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase: biochemistry and molecular biology. *European journal of pediatrics* 157(14):S54-S59.
- Micallef S.A., Shiaris M.P., Colon-Carmona A.** (2009). Influence of *Arabidopsis thaliana* accession on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates. *J Experimental Botany* 60:1729-1742.
- Mills D.** (1985). Transposon mutagenesis and its potential for studying virulence genes in plant pathogens. *Ann Rev Phytopathol* 23:297-320.
- Moses V., Yudkin M.D.** (1968). Catabolite Repression in *Escherichia coli*. *Biochem J* 110:135-142.
- Müller H., Westendorf C., Leitner E., Chernin L., Riedel K., Schmidt S., Eberl L., Berg G.** (2008). Quorum sensing effects in the antagonistic rhizobacterium *Serratia plymuthica* HRO-C48. *FEMS Microbiology Ecology* 67(3):468-478.
- Murashige T., Skoog F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473-497.

- Nessler J.** (1856). Verhalten des Jodquecksilbers zu Ammoniak und eine Reaktion auf Ammoniak. *Chem Central* 34:172-182.
- Neupane S., Högger N., Sadhna A., Lucas S., Han J., Lapidus A., Cheng J.-F., Bruce D., Goodwin L., Pitluck S., Peters L., Ovchinnikova G., Lu M., Han C., Detter J.C., Tapia R., Fiebig A., Land M., Hauser L., Kyrpides N.C., Ivanova N., Pagani I., Klenk H.-P., Woyke T., Finlay R.D.** (2012). Complete genome sequence of the rapeseed plant-growth promoting *Serratia plymuthica* AS9. *Stand Genomic Sci* 6:54-62.
- Nijland R., Burgress J.G.** (2010). Bacterial olfaction. *Biotechnol J* 5: 974-7.
- Özugül F., Özügu, Y.** (2007). The ability of biogenic amines and ammonia production by single bacterial cultures. *Eur Food Res Technol* 225: 385-394.
- Plieth C., Sattelmacher B., Knight M.R.** (2000). Ammonium uptake and cellular alkalization in roots of *Arabidopsis thaliana*: The involvement of cytoplasmic calcium. *Physiol Plant* 110: 518-523.
- Pollak F.C., Berger R.G.** (1996). Geosmin and related volatiles in Bioreactor-Cultured *Streptomyces citreus* CBS 109.60. *Applied and Environmental Microbiology* 62(4):1295-1299.
- Reitzer L.** (2003). Nitrogen Assimilation and global Regulation in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* 57:155-76.
- Ren Y., Strobel G., Sears J., Park M.** (2010). *Geobacillus* sp. a thermophilic soil bacterium producing volatile antibiotics. *Microb Ecol* 60:130-6.
- Ridley C.P., Lee H.Y., Khosla C.** (2008). Evolution of polyketide synthases in bacteria. *PNAS* 105(12):4595-4600.
- Rodich F., Kis K., Bacher A., Eisenreich W.** (2001). The non-mevalonate pathway of isoprenoids: genes, enzymes and intermediates. *Current Opinion in Chemical Biology* 5:535-540.
- Romeo J.T.** (2009). New SPME Guidelines. *J Chem Ecol* 35:1383.
- Rowan D.** (2011). Volatile metabolites. *Metabolites* 1:41-62.
- Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Kloepper, J.W., Pare P.W.** (2004). Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 134: 1017-1026.
- Ryu C.M., Faraf M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Wei H.X., Pare P.W., Kloepper J.W.** (2003). Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *PNAS* 100: 4927-4932.
- Sauer U., Eikmanns B.J.** (2005). The PEP-pyruvate-oxaloacetat node as the swith point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 29:765-794.

- Simon J.** (2002). Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. *FEMS Microbiol Rev* 26: 285-309.
- Schleifer K.H.** (2009). Classification of Bacteria and Archaea: Past, present and future. *Systematic and Applied Microbiology* 32:533-542.
- Schulz S., Dickschat J.S.** (2007). Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Nat Prod Rep* 24:814-842.
- Spiteller D., Jux A., Piel J., Boland W.** (2002). *Phytochemistry* 61:827-834.
- Stall R.E., Hall C.B., Cook A.A.** (1972). Relationship of Ammonia to Necrosis of Pepper Leaf Tissue During Colonization by *Xanthomonas vesicatoria*. *Phytopathology* 62:882-886.
- Staunton J., Weissmann K.J.** (2001). Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat Prod Rep* 18:380-416.
- Taghavi S., Garafola C., Monchy S., Newman L., Hoffman A., Weyens N., Barac T., Vangrosveld J., van der Lelie D.** (2009). Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Appl Environ Microbiol* 75:748-757.
- Thibon C., Marullo P., Claissee O., Cullin C., Dubourdiou D., Tominage T.** (2008). Nitrogen catabolite repression controls the release of volatile thiols by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *FEMS Yeast Research* 8 (7):1076-1086.
- Verhulst N.O., Andriessen R., Groenhagen U., Bukovinszky-Kiss G., Schulz S., Takken W., van Loon J.J.A., Schraa G., Smallegange R.C.** (2010). Differential Attraction of Malaria Mosquitoes to Volatile Blends Produced by Human Skin Bacteria. *PLOS One* 5(12):e15829.
- Vespermann A., Kai M., Piechulla B.** (2007). Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. *Appl Environ Microbiol* 73: 5639–5641.
- Von Reuss S., Kai M., Piechulla B., Francke W.** (2010). Octamethylbicyclo(3.2.1)octadienes from *Serratia odorifera*. *Angewandte Chemie* 122: 2053-2054, 2010, *Angewandte Chemie Int Ed* 49: 2009-2010.
- Wang B., Lin L., Lu L., Chen W.** (2012). Optimization of β -carotene production by a newly isolated *Serratia marcescens* strain. *Journal of Biotechnology* 15 (6).
- Weise T.** (2008). Effekte von *Xanthomonas*- Spezies auf das Wachstum verschiedener Pilze in Abhängigkeit von Glucose. Diplomarbeit Universität Rostock.

- Weise T., Kai M., Gummesson A., Troeger A., Von Reuss S., Piepenborn S., Kosterka F., Sklorz M., Zimmermann R., Francke W., Piechulla B. (2012).** Volatile organic compounds produced by the phytopathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 85-10. *Beilstein J Org Chem* 8: 579-596.
- Weissman K.J. (2009).** Introduction to polyketide biosynthesis. *Methods Enzymol.* 459:3-16.
- Wenke K., Kai M., Piechulla, B. (2010).** Belowground volatiles facilitate interactions between plant roots and soil organisms. *Planta* 231: 499-506.
- Wenke K., Weise T., Warnke R., Valverde C., Wanke D., Kai M., Piechulla B. (2012 a).** Bacterial Volatiles Mediating Information Between Bacteria and Plants. In: Witzany G (ed) *Biocommunication, Signaling and Communication in Plants*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 327-347.
- Wenke K, Wanke D., Kilian J., Berendzen K., Harter K., Piechulla B. (2012).** Volatiles of two growth-inhibiting rhizobacteria commonly engage AtWRKY1 function. *Plant J* 70:445-459.
- Winans S.C., Elledge S.J., Krueger J.H., Walker G.C. (1985).** Site-directed insertion and deletion mutagenesis with cloned fragments in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 161:1219-1221.
- Wilson G.H., Grolig F., Kosegarten H. (1998).** Differential pH restoration after ammonia-elicited vacuolar alkalization in rice and maize root hairs as measured by fluorescence ratio. *Planta* 206: 154-161.
- Yuan L., Loque D., Kojima S., Rauch S., Ishiyama K., Inoue E., Takahashi H., von Wiren N. (2007).** The organization of high affinity ammonium uptake in Arabidopsis roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters. *Plant Cell* 19: 2636-2652.
- Yuan L., Graff L., Loque D., Kojima S., Tsuchuya Y.N., Takahashi H., von Wiren N. (2009).** AtAMT1;4, a pollen-specific high affinity ammonium transporter of the plasma membrane in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 50: 13-25.
- Zatyka M., Thomas C.M. (1998).** Control of genes for conjugative transfer of plasmids and other mobile elements. *FEMS Microbiology Reviews* 21:291-319.
- Zhao J, Tomoya B., Mori H., Shimizu K. (2004).** Effect of zwf gene knockout on the metabolism of *Escherichia coli* grown on glucose or acetate. *Metabolic Engineering* 6:164-174.

Zhang F., Smith D.L. (1996). Inoculation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] with genistein-preincubated *Bradyrhizobium japonicum* or genistein directly applied to soils increases soybean protein and dry matter yield under short season conditions. *Plant and Soil* 179:33-241.

Zhu J., Bean H.D., Kuo Y.M., Hill J.E. (2010). Fast detection of volatile organic compounds from bacterial cultures by secondary electrospray ionization-mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 48:4426-31.

Zhu Y.-J., Zhou H.-T., Hu Y.-H., Tang J.-Y., Su M.-X., Guo Y.-J., Chen Q.-X., Liu B. (2011). Antityrosinase and antimicrobial activities of 2-phenylethanol, 2-phenylacetaldehyde and 2-phenylacetic acid. *Food Chemistry* 124 (1):298-302.

A Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
CFU	colony Forming Units (koloniebildende Einheiten)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
dH ₂ O	destilliertes Wasser
et al.	et alteri (lateinisch: und alle)
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
h	hour(s) (Stunde(n))
HCN	Blausäure
Hg	Quecksilber
H ₂ O	Wasser
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
SPME	Solid Phase Micro Extraction
kg	Kilogramm
kPA	Kilopascal
kV	Kilovolt
l	Liter
log	Logarithmus
Mb	Megabasen
min	Minute
ml	Milliliter (10 ⁻³)
mm	Millimeter
MS	Massenspektromie
MW	Mittelwert
m/z	Masse/Ladung
N	Stickstoff
n	Anzahl der unabhängigen Durchführungen
NA	Nähragar
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NB	Nährbouillon

NIST	National Institute of Standards and Technology
ng	Nanogramm (10^{-9})
NH ₃	Ammoniak
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PGPR	Plant growth promoting rhizobacteria
pH	pH - Wert, negativ dekadischer Logarithmus der Protonenzahl
pv	Pathovar
RI	Retentionsindex
rpm	rounds per minute (Umdrehung pro Minute)
RT	Retentionszeit
s	Sekunde
SCAM	Strain collection for antagonistic microorganisms
sp.	Spezies
spp.	Subspezies
subsp.	Subspezies
STA	Standardabweichung
t	time (Zeit)
Tab.	Tabelle
U	Spannung
USA	United States
VK	Vorkultur
VOCs	volatile organic compounds (flüchtige organische Sekundärmetabolite)
&	und
%	Prozent
°C	Grad Celcius
Ø	Durchschnitt
µ	Mikro (10^{-6})
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

B Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1-1 Sodorifen.
- Abbildung 2-1: Modifiziertes VOC - Sammelsystem nach Kai et al. (2010).
- Abbildung 3-1: Ausgewählte Volatilen-Spektren und dazugehörige Wachstumskurven verschiedener *Serratia*-Spezies.
- Abbildung 3-2: Phylogenetischer Stammbaum der Gattung *Serratia*.
- Abbildung 3-3: Sodorifen-Emission und verwandtschaftliche Beziehung untersuchter Spezies und Isolate innerhalb der Gattung *Serratia*.
- Abbildung 3-4: Genom-Karte des Chromosoms von *Serratia plymuthica* 4Rx13.
- Abbildung 3-5: Plasmid-Karte von *Serratia plymuthica* 4Rx13.
- Abbildung 3-6: Nachweis von Plasmid-DNA verschiedener *Serratia*-Spezies.
- Abbildung 3-7: BiBlast des Genoms von *Serratia plymuthica* 4Rx13 mit verschiedenen *Serratia*-Spezies.
- Abbildung 3-8: Schematischer Genomausschnitt mit Sod_d00970 von *Serratia plymuthica* 4Rx13.
- Abbildung 3-9: Schematischer Genomausschnitt mit Sod_c02280 von *Serratia plymuthica* 4Rx13.
- Abbildung 3-10: PCR-Amplifikate zur Vorbereitung der homologen Rekombination mit *Serratia plymuthica* 4Rx13:
- Abbildung 3-11: Verifikation der Mutante *Serratia plymuthica* 4Rx13::d00970 im Vergleich zum Wildtyp:
- Abbildung 3-12: Verifikation der Mutante *Serratia plymuthica* 4Rx13::c02280 im Vergleich zum Wildtyp.
- Abbildung 3-13: Sodorifen-Emission in Abhängigkeit vom Aminosäure-Angebot.
- Abbildung 3-14: Sodorifen-Emission von *Serratia plymuthica* 4Rx13 in Abhängigkeit vom Glucose-Angebot.
- Abbildung 3-15: Sodorifen-Emission in Abhängigkeit von verschiedenen Kohlenstoffen:
- Abbildung 3-16: GC/MS-Spektren von Sodorifen:
- Abbildung 3-17: ¹³C-NMR-Spektren von Sodorifen.
- Abbildung 3-18: Schematische Interpretation der ¹³C-NMR-Spektren von Sodorifen.
- Abbildung 3-19: ¹³C-NMR-Spektren von Sodorifen:
- Abbildung 3-20: VOC-Profil von *Serratia plymuthica* 4Rx13 mit *soil solution equivalent*-Medium (SSE-Medium).

- Abbildung 3-21:** Einfluss bakterieller Volatile auf das Wachstum von *Arabidopsis thaliana*-Akzessionen.
- Abbildung 3-22:** Regenerierung von *Arabidopsis thaliana* nach Entfernen der Bakterien und Entlüften der emittierten Volatile.
- Abbildung 3-23:** Co-Kultur-Experimente mit *Serratia plymuthica* 4Rx13 und *Arabidopsis thaliana*.
- Abbildung 3-24:** Co-Kultur-Experimente mit *Serratia plymuthica* 4Rx13 und *Arabidopsis thaliana* in Abhängigkeit von Glucose im bakteriellen Medium.
- Abbildung 3-25:** NH₃-Emission und pH-Wert des Medium von *Serratia plymuthica* 4Rx13 im Verlauf der Zeit.
- Abbildung 3-26:** Einfluss von Ammoniak auf das Wachstum von *Arabidopsis thaliana*.
- Abbildung 3-27:** pH-Wert abhängiges Wachstum von *Arabidopsis thaliana*.
- Abbildung 3-28:** Co-Kultur-Experimente von *Serratia plymuthica* 4Rx13 und *Arabidopsis thaliana* unter Einfluss von Phosphorsäure als NH₃-Adsorbens.
- Abbildung 3-29:** NH₃-Emission und pH-Werte im Medium verschiedener Rhizobakterien.
- Abbildung 4-1:** Stoffwechsel-Szenario von Sodorifen.

C Tabellenverzeichnis

- Tabelle 2-1:** Wildtyp-Bakterien.
- Tabelle 2-2:** *Arabidopsis thaliana* Akzessionen mit dem dazugehörigen Ursprung.
- Tabelle 2-3:** Plasmide und Vektoren.
- Tabelle 2-4:** Oligonukleotide mit dazugehöriger Sequenz.
- Tabelle 2-5:** verwendete Parameter zur Analyse eines Eluates des VOC – Sammelsystems.
- Tabelle 2-6:** verwendete Parameter zur Analyse flüchtiger Verbindungen mittels SPME - HS - GC/MS.
- Tabelle 3-1:** Identifizierte volatile Verbindungen verschiedener *Serratia*-Spezies.
- Tabelle 3-2:** Sodorifen-Emission analysierter *Serratia*-Spezies und -Isolate.
- Tabelle 3-3:** Übersicht der Genom-Sequenzierung verschiedener *Serratia*-Spezies.
- Tabelle 3-4:** Biblast-Auswertung von *Serratia plymuthica* 4Rx13 mit sequenzierten *Serratia*-Spezies.

Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe, ohne fremde Hilfe verfasst, keiner außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Teresa Weise

Rostock, den 26.02.2013

F Danksagung

Frau Prof. Dr. Birgit Piechulla danke ich herzlich für die Möglichkeit dieses interessante Thema in ihrer Abteilung bearbeiten zu können. Desweiteren bedanke ich mich für die Möglichkeit an diversen Tagungen teilnehmen zu können und an der Zusammenarbeit mit den Kooperationspartnern mitwirken zu dürfen. Aber vor allem danke ich für die Unterstützung der letzten Monate.

Bei dem Zweiten Gutachter möchte ich mich für die Gutachter-Tätigkeit bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Marco Kai für die Einarbeitung und Übergabe des Themas als auch das Vertrauen, die Unterstützung und Hilfsbereitschaft während der gesamten Zeit. Danke, dass ich von Dir lernen durfte.

Zusätzlich bedanke ich mich bei allen Kooperationspartnern für die gute und produktive Zusammenarbeit an diesem Thema. Besonders hervorheben möchte ich dabei Prof. Wittko Francke, Dr. Stephan von Reuß und Dr. Andrea Thürmer.

Weiterhin möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe der Biochemie bedanken. Ich hätte mir keine bessere Arbeitsgruppe vorstellen können.

Nicht vergessen möchte ich die Arbeitsgruppen der Mikrobiologie und der Pflanzenphysiologie. Danke, für die netten Gespräche, Diskussionen und die Hilfsbereitschaft.

Ein großes Dankeschön geht außerdem an die vielen Diplomanden, Master- und Bachelorstudenten als auch Praktikanten, die ich auf einem Stück ihres Weges begleiten durfte.

Vor allem aber möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, dafür dass ich meinen Weg immer uneingeschränkt gehen konnte und durchweg vor allem moralisch unterstützt wurde.

Letztendlich danke ich Peter für das Verständnis und den Zusammenhalt. Danke, dass wir den Weg gemeinsam gehen.