Medizin

Christian Lehmann

Charakterisierung des Bakterienisolates C1 aus Cystodytes dellechiajei

Diplomarbeit

Diplom.de

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek:

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek: Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über http://dnb.d-nb.de/ abrufbar.

Dieses Werk sowie alle darin enthaltenen einzelnen Beiträge und Abbildungen sind urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsschutz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlages. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen, Auswertungen durch Datenbanken und für die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronische Systeme. Alle Rechte, auch die des auszugsweisen Nachdrucks, der fotomechanischen Wiedergabe (einschließlich Mikrokopie) sowie der Auswertung durch Datenbanken oder ähnliche Einrichtungen, vorbehalten.

Copyright © 2004 Diplomica Verlag GmbH
ISBN: 9783832479466

http://www.diplom.de/e-book/223189/charakterisierung-des-bakterienisolates-c1-aus-cystodytes-dellechiajei

Christian Lehmann

Charakterisierung des Bakterienisolates C1 aus Cystodytes dellechiajei

Diplom.de

Christian Lehmann

Charakterisierung des Bakterienisolates C1 aus Cystodytes dellechiajei

Diplomarbeit
Universität Regensburg
Fachbereich Biologie
Abgabe Januar 2004

Diplom.de

Diplomica GmbH
Hermannstal 119k
22119 Hamburg

Fon: 040 / 655 99 20
Fax: 040 / 655 99 222

agentur@diplom.de
www.diplom.de

ID 7946

ID 7946
Lehmann, Christian: Charakterisierung des Bakterienisolates C1 aus Cystodytes dellechiajei
Hamburg: Diplomica GmbH, 2004
Zugl.: Universität Regensburg, Universität, Diplomarbeit, 2004

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, des Vortrags, der Entnahme von Abbildungen und Tabellen, der Funksendung, der Mikroverfilmung oder der Vervielfältigung auf anderen Wegen und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten. Eine Vervielfältigung dieses Werkes oder von Teilen dieses Werkes ist auch im Einzelfall nur in den Grenzen der gesetzlichen Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes der Bundesrepublik Deutschland in der jeweils geltenden Fassung zulässig. Sie ist grundsätzlich vergütungspflichtig. Zuwiderhandlungen unterliegen den Strafbestimmungen des Urheberrechtes.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Die Informationen in diesem Werk wurden mit Sorgfalt erarbeitet. Dennoch können Fehler nicht vollständig ausgeschlossen werden, und die Diplomarbeiten Agentur, die Autoren oder Übersetzer übernehmen keine juristische Verantwortung oder irgendeine Haftung für evtl. verbliebene fehlerhafte Angaben und deren Folgen.

Diplomica GmbH
http://www.diplom.de, Hamburg 2004
Printed in Germany

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG 1
Auf der Suche nach Naturstoffen 1
Die Ozeane – eine blaue Schatzkammer? 4
Marine Biotechnologie – Probleme, Ausblicke und Hoffnungen 8
Charakterisierung des Bakterienisolates C1 10

II. MATERIAL UND METHODEN 11
1. Bezugsquellen 11
1.1 Chemikalien 11
1.2 Enzyme und Reaktionskits 13
1.3 Geräte 14
1.4 Verbrauchsmaterial und Sonstiges 15
2. Organismen 16
3. Nährmedien und Kulturbedingungen 17
3.1 Kulturbedingungen 17
3.2 Zusammensetzung der Medien 17
3.2.1 Allgemeine Lösungen 17
3.2.2 Marine Broth 2216 (MB) 18
3.2.3 Minimalmedien für C1 19
3.2.4 Polymermedien für C1 20
3.2.5 Medien mit verschiedenen Kohlenstoff-Zusätzen 20
3.2.6 M88-4d/5-Kulturmedium 21
3.2.7 Luria-Bertani (LB)-Medium 21
3.2.8 Biolog Universal Growth (BUG)-Agar 21
3.2.9 Todd-Hewitt-Broth 22
3.2.10 M9-Medium 22
3.3 Herstellung der Medien 23
4. Gewinnung von Reinkulturen 23
4.1 Ausstrichverfahren 23
4.2 Verdünnungsreihen 24
4.3 Zellvereinzelung mit der Laserpinzette 24
5. Herstellung von Dauerkulturen 25
5.1 Glycerinkulturen 25
5.2 Roti-Store-Kryokulturen 25
5.3 Lagerung über Flüssigstickstoff 25
6. Sterilisation 26
7. Mikroskopie 26
7.1 Phasenkontrastmikroskopie 26
7.2 Fluoreszenzmikroskopie 26
7.3 Rasterelektronenmikroskopie 27
8. Wachstumsbestimmung 28

8.1 Thoma-Zählkammer ... 28
8.2 Optische Dichte ... 28
8.3 Lebendkeimzahlbestimmung ... 29
9. DNA-Isolierung ... 29
9.1 Isolierung von Gesamt-DNA ... 29
9.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* ... 30
9.3 Gelelektrophorese ... 30
10. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ... 32
10.1 Standard-PCR-Ansatz ... 32
10.2 16S rDNA-Amplifikation ... 32
10.3 gyrB-Teilamplifikation ... 33
10.4 Reinigung von PCR-Produkten ... 34
11. Klonierung von PCR-Produkten ... 34
11.1 Ligation ... 35
11.2 Elektroporation ... 35
11.3 Blau-Weiss-Screening ... 35
11.4 Restriktionsverdau und Gelelektrophorese ... 36
12. Phylogenetische Analyse von C1 ... 36
12.1 Sequenzierung von 16S rDNA und gyrB ... 36
12.2 Online-Alignment mit FASTA3 ... 38
12.3 Stammbaumerstellung mit ARB ... 38
13. Stoffwechselphysiologische Untersuchungen ... 39
13.1 Verwertung verschiedener Polymerstoffe ... 39
13.2 Verwertung verschiedener Kohlenstoff-Quellen ... 39
13.2.1 Mikrotiterplatten (BIOLOG-System) ... 39
13.2.2 Flüssigkultur-Ansätze ... 40
13.3 Sensitivität gegenüber Antibiotika ... 40
13.4 Katalasenachweis ... 41
13.5 Gram-Färbung ... 41
14. Produktion biologisch aktiver Substanzen ... 42
14.1 Gewinnung des Überstandes stationärer C1-Kulturen ... 42
14.2 Antibiotische Aktivität im C1-Überstand ... 42
14.2.1 Schicht-Methode ... 42
14.2.2 Plättchen-Methode ... 43
14.2.3 Stanz-Methode ... 43
14.3 Bildung von Autoinduktoren ... 43
15. Verarbeitung von *Cystodytes dellechiajei*-Lebendproben ... 44
15.1 Gewinnung von Mazeraten und Überständen ... 44
15.2 Herstellung von Kryoschnitten ... 44
15.3 Konservierung ... 45
16. Färbungen mit Fluoreszenzfarbstoffen ... 45
16.1 DAPI-Färbungen ... 45
16.2 Lebend-Tot-Färbungen mit BacLight™ ... 46

16.3 Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) ... 46
16.3.1 Vorbereitung der Objektträger ... 46
16.3.2 Puffer und Lösungen ... 47
16.3.3 Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide ... 49
16.3.4 Bestimmung der Hybridisierungsbedingungen ... 50
16.3.5 Fixierung der Zellen ... 51
16.3.6 Hybridisierung ... 51
17. Computerprogramme, Textverarbeitung und Internetresourcen ... 52

III. ERGEBNISSE ... 54
1. Das Isolat C1 aus *Cystodytes dellechiajei* (Della Valle, 1877) ... 54
2. Untersuchungen zur Morphologie ... 56
2.1 Zellmorphologie ... 56
2.1.1 Phasenkontrastmikroskopie ... 56
2.1.2 Rasterelektronenmikroskopie ... 58
2.2 Koloniemorphologie ... 59
3. Entwicklung eines Minimalmediums ... 61
4. Stoffwechselphysiologische Untersuchungen ... 63
4.1 Polymerverwertung und Nachweis von Exoenzymen ... 63
4.2 Kohlenstoff-Verwertung ... 64
4.2.1 BIOLOG-Mikrotiterplatten ... 64
4.2.2 Flüssigkultur-Ansätze ... 66
4.3 Sensitivität gegenüber Antibiotika ... 66
4.4 Katalasetest ... 67
4.5 Gram-Färbung ... 67
5. Produktion biologisch aktiver Substanzen ... 67
5.1 Antibiotische Wirksamkeit des Überstandes ... 67
5.2 Bildung von Autoinduktoren ... 68
6. Phylogenetische Analyse ... 70
6.1 16S rDNA-Analyse ... 70
6.2 gyrB-Analyse ... 71
7. Phylogenetic Staining ... 73
7.1 Staining von Reinkulturen ... 73
7.2 Staining von Mischkulturen ... 74
7.3 Staining von Mazeraten ... 76
7.4 Staining von Isolaten aus *C. dellechiajei* ... 77
7.5 Staining von Kryoschnitten ... 78
8. Weitere qualitative und quantitative Untersuchungen ... 80
8.1 C1-Nachweis außerhalb *C. dellechiajei* ... 80
8.2 „C1-Dominanz“ ... 80
8.3 16S rDNA-Sequenzierung eines Isolates aus *C. dellechiajei* ... 81

IV. DISKUSSION **83**
1. Morphologie **83**
2. Stoffwechsel **85**
3. Biologisch aktive Substanzen **87**
4. Phylogenetische Analyse **88**
4.1 16S rDNA-Sequenzvergleich 88
4.2 gyrB-Sequenzvergleich 90
5. C1 und *C. dellechiajei* **91**
6. Vorschlag zur Beschreibung einer neuen Art **95**

V. ZUSAMMENFASSUNG **96**
VI. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS **97**
VII. LITERATURVERZEICHNIS **100**
VIII. ANHANG **108**
Sequenz der 16S rDNA des Isolates C1 ..... **108**
gyrB-Teilsequenz des Isolates C1 ..... **109**
Alternativer Stammbaum: Neighbor-Joining mit Bacterial Filter **110**
Alternativer Stammbaum: Maximum-Parsimony ohne Filter **111**
16S rRNA-Sekundärstruktur von *E. coli* **112**

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

III/1: Beschaffung der Tierproben 54
III/2: *Cystodytes dellechiajei* 55
III/3: verschiedene Wachstumsphasen von C1 57
III/4: Lebend-Tot-Färbung mit BacLight™ 58
III/5: REM: C1 exponentielles Wachstum 58
III/6: REM: C1 stationäre Phase 59
III/7: unterschiedliche Koloniemorphologien von C1 60
III/8: Wachstumskurven 62
III/9: C-Verwertung auf BIOLOG-Mikrotiterplatten 65
III/10: Überstandhemmtest 68
III/11: Bildung von Autoinduktoren 69
III/12: Phylogenet. Stammbaum: Neighbor Joining o. Filter 71
III/13: FISH: C1-Reinkultur 74
III/14: FISH: C1-*E. coli*-Mischkultur 75
III/15: FISH: C1-CJ11049-Mischkultur 75
III/16: FISH: *C. dellechiajei*-Mazerat 76
III/17: FISH: Isolat MW3 aus Meerwasser 78
III/18: FISH+DAPI: Kryoschnitte v. *C. dellechiajei* 79
III/19: C1 16S rDNA-Sequenzvariationen 82
VIII: Phylogenet. Stammbaum: Neighbor Joining mit Bac. Filter 110
VIII: Phylogenet. Stammbaum: Max. Parsimony ohne Filter 111
VIII: 16S rRNA-Sekundärstruktur von *E. coli* 112

I. EINLEITUNG

Auf der Suche nach Naturstoffen

Schon immer hat sich der Mensch auf die Natur verlassen, um seine Bedürfnisse in Sachen Nahrung, Transport, Unterkunft, Kleidung und nicht zuletzt Arzneien zu befriedigen und dadurch sein Leid bei Erkrankungen und Verletzungen mit natürlichen Heilmitteln zu lindern. Tausende Jahre wurde das Wissen über die Heilkraft bestimmter Pflanzen oder Mineralien überliefert und durch Beobachten und Experimentieren ausgeweitet. Diese Erkenntnisse stellten allerdings nur ein Erfahrungsgut dar, ohne jemals kritisch überprüft zu werden. Viel später erst wurde versucht, auch den theoretischen Hintergrund einer Arzneimitteltherapie zu bedenken und somit gezielt nach Wirkstoffen zu suchen – die Pharmakologie war geboren. So forderte Theoprastus Bombastus von Hohenheim, genannt Paracelsus (1493-1541 n. Chr.), als erster die Kenntnis der aktiven Substanz in einem verordneten Mittel und wehrte sich damit gegen die unsinnigen, ja tödlichen Stoffgemische mittelalterlicher Medizin, die auf den antiken Lehren von Hippokrates (460-370 v. Chr.) und Galen (129-200 n. Chr.) beruhten (Lüllmann & Mohr, 1990).

Die Arbeiten von Louis Pasteur (1822-1895; siehe Krasner, 1995) und Robert Koch (1843-1910) forcierten die Bemühungen auf der Suche nach antimikrobiellen Substanzen und führten schließlich zur Entwicklung des ersten wirksamen Chemotherapeutikums durch Paul Ehrlich (1854-1915). Das Präparat „606“ („Salvarsan“, Dioxydiamidoarsenobenzol) verschaffte ab 1907 tausenden mit *Treponema pallidum* infizierten Menschen Linderung, wenn auch nicht ohne Nebenwirkungen. Neben Syphillis konnte fortan auch das von Rickettsien verursachte Rückfallfieber kuriert werden (Quelle: http://www.m-ww.de).

Diese Behandlungsmethode wurde erst in den Jahren nach 1940 verdrängt, als der schottische Mediziner und Bakteriologe Alexander Fleming (1881-1955) durch Zufall 1928 eine der bedeutendsten Entdeckungen der modernen Wirkstoffforschung machte: als erster hatte er die antibiotische Effektivität eines Schimmelpilzes gegenüber Mikroorgansimen beobachtet. Eine Verunreinigung in seinen Zuchtschalen – ein Pilz der Gattung *Penicillium* – hemmte das Wachstum von Staphylokokken. Nach dieser Entdeckung war klar, dass die Zukunft der Suche nach Wirkstoffen in der Natur selbst lag. Zum ersten Mal in der Geschichte fahndete man jetzt systematisch nach Naturstoffen, die als Bakterizide, Insektizide, Fungizide und Herbizide Nutzen fanden. Anfänglich handelte es sich dabei vor allem um antibiotisch wirksame Stoffe, die hauptsächlich aus Boden-Mikroorganismen isoliert wurden, wie etwa Aminoglycoside, Rifamycine, Polyene, Tetracycline und Makrolide aus Streptomyceten und Proteine bzw. Peptide aus verschiedenen *Bacillus*-Arten.

Jedoch meist schon kurz nach Einführung eines neuen Antibiotikums traten Resistenzen auf (z. B. Glazer & Nikaido, 1995). Um diesem Verlauf entgegenzuwirken, musste man neue, bisher unbekannte Wirkstoffe gewinnen, was zeitweise gelang (Gibbons, 1992). Völlig neue Leitstrukturen sind freilich seit über 20 Jahren nicht mehr gefunden worden (Wirth, pers. Mitteilung) und mehr als 90 % aller „neu“ entdeckten aktiven Kulturen produzieren schon bekannte Substanzen (Fenical, 1993). Durch die Entwicklung halbsynthetischer Derivate unwirksam gewordener Antibiotika blieben viele multiresistente Keime unter Kontrolle. Momentan jedoch stellen uns Erreger nosokomialer Infektionen vor immer größere Probleme. Vollresistente *Staphylococcus aureus*- und *Enterococcus faecalis*-Stämme können selbst mit Vancomycin, einem der letzten, bis vor kurzem noch effektiven Medikamente, nicht mehr behandelt werden (Gottlieb, 2003 bzw. Ben et al., 1996). Hoffnung gibt hier das sogenannte Ascochital, ein Antibiotikum aus dem marinen Ascomycet *Kirschsteinothelia maritima* (Kusnick et al., 2002), gegen das bislang noch keine resistenten Staphylokokken-Stämme aufgetreten sind (Dorn, 2003; siehe auch Sonderausgabe Trends in Microbiology, 1994, 2(10):341-425: Drug resistance: the new apocalypse).