



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Identifizierung von Antibiotika-produzierenden  
Endophyten aus Pflanzen von Naturwaldstandorten“

Verfasserin

Maja Pleško

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2011	
Studienkennzahl lt. Studienblatt:	A441
Studienrichtung lt. Studienblatt:	Genetik-Mikrobiologie
Betreuerin / Betreuer:	Ao. Prof. Dr. Angela Witte Doz. DI Dr. Angela Sessitsch



## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen jenen bedanken, ohne die, die vorliegende Arbeit, nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt Dr. Angela Sessitsch für die Überlassung des interessanten Diplomarbeitsthemas und die Korrektur dieser Arbeit, sowie Prof. Angela Witte für die wissenschaftliche Unterstützung und die Begleitung in der Schlussphase meines Studiums.

Und allen Kollegen des Bioresources Institutes für die freundliche Aufnahme und Unterstützung während dieser Arbeit, möchte ich danken.

An dieser Stelle denke ich natürlich an meine „padruga“ Mimi und gemeinsame Freude und Leid während des Studiums. Hvala Mimi.

Meinem Mann und meinem Sohn gilt besonderer Dank, für die Kraft, die sie mir immer gegeben haben. Hvala Sweety, hvala Andrej.

Ich möchte mich besonders bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium in Wien ermöglicht haben und immer für mich da waren. Hvala mama, hvala tata, bez vas sve ovo ne bi bilo moguće.

# Inhaltverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	7
<b>Abstract</b> .....	9
<b>1 Einleitung</b> .....	11
1.1 Endophyten .....	12
1.2 Actinobakterien .....	14
1.2.1 Morphologie und Physiologie der Actinobakterien .....	14
1.2.2 Taxonomie und Phylogenie der Actinobakterien .....	15
1.3 Streptomyceten .....	15
1.3.1 Regulierung der Sekundermetaboliten-Produktion bei Streptomyceten .....	18
1.3.2 Induktion des Sekundärmetabolismus in Streptomyceten .....	21
1.3.3 Biotechnologische Bedeutung der Streptomyceten .....	23
1.4 Antibiotika .....	24
1.4.1 Antibiotika-Gruppen und Wirkungsmechanismen .....	25
1.4.2 Rolle der Antibiotika und Antibiotikaresistenzen in der Natur .....	27
<b>2 Ziele dieser Arbeit</b> .....	30
<b>3 Materialien</b> .....	31
3.1 Chemikalien .....	31
3.2 Puffer, Lösungen und Medien .....	31
3.2.1 Allgemeine Puffer und Lösungen .....	31
3.2.2 Lysispuffer und Lösungen .....	32
3.2.3 Lösungen und Standards für Agarose-Gelelektrophorese .....	32
3.2.4 Antibiotika- und Induktionslösungen .....	33
3.3 Nährmedien für endophytischen Bakterien-Isolate .....	34
3.3.1 Nährmedien für Indikator-Stämme .....	36
3.4 Mikroorganismen .....	36
3.4.1 Endophytische Isolate .....	36
3.4.2 Indikator-Stämme .....	37
3.5 Primer .....	37

3.6 Molekularbiologische Kits .....	38
3.7 Technische Geräte .....	38
3.8 Öffentlich zugängliche Software .....	38
<b>4 Methoden</b> .....	<b>39</b>
4.1 Probennahme .....	39
4.2 Isolierung der endophytischen Actinobakterien .....	40
4.2.1 Reinkultur-Herstellung .....	42
4.3 Kultivierungsbedingungen .....	43
4.3.1 Streptomyceten .....	43
4.3.2 Mit <i>Streptomyces</i> -assoziierte Stämme .....	44
4.3.3 Indikator-Stämme .....	44
4.4 Isolierung genomischer DNA aus endophytischen Bakterien-Isolaten ...	45
4.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	45
4.5.1 Amplifizierung von 16S rRNA-Genen .....	46
4.5.2 Amplifizierung von <i>rpoB</i> -Genen .....	47
4.6 DNA Analyse mittels Agarose-Gelelektrophorese (AGE) .....	49
4.7 Aufreinigung von PCR Produkten .....	49
4.8 DNA Sequenzierung .....	50
4.9 Sequenzanalyse .....	50
4.9.1 Schnellanalyse von Sequenzen .....	51
4.9.2 Berechnung eines phylogenetischen Baumes mittels ARB .....	51
4.10 Screening auf antagonistische Wirkung von endophytischen Isolaten .	52
4.10.1 Agardiffusionstest .....	52
4.10.2 Überstand-Test .....	53
4.10.3 Gellan-gum-Overlay-Test .....	54
4.10.4 Dualkultur-Agar-Test .....	55
4.11 Experiment über Cross-Spezies Induktion .....	55
<b>5 Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>58</b>
5.1 Isolierung und Kultivierung von endophytischen Actinobakterien .....	58
5.2 Isolierung der genomischen DNA und Analyse der PCR-Produkte .....	60
5.3 Schnellanalyse von Sequenzen mittels BLAST .....	62

5.4 Phylogenetische Analyse mittels ARB .....	68
5.5 Screening auf antagonistische Wirkung von endophytischen Isolaten ..	74
5.6 Cross-Spezies Induktion .....	82
<b>6 Schlussdiskussion .....</b>	<b>84</b>
<b>7 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>85</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>91</b>

## Zusammenfassung

Endophytische Actinobakterien werden als potentielle Quelle neuer Spezies und Produzenten neuer Naturstoffe mit möglichen Anwendungen in der Medizin, Agrikultur und Industrie angesehen. Ihre wachstums- und gesundheitsfördernden Wirkungen auf Wirtspflanzen, aber auch ihre antimikrobielle- und Antitumor-Wirkstoffe stehen im Mittelpunkt vieler Studien und Diskussionen.

Die Zahl der multiresistenten Pathogenen steigt rasch und somit auch der Bedarf an neuen Antibiotika. Einer der Wege, um neue antimikrobielle Wirkstoffe zu entdecken führt über das Erforschen von besonderen ökologischen Nischen (gegeben durch unterschiedliche Nährstoffversorgung, mikrobielle Diversität in Böden und verschiedenen endophytisch besiedelten Pflanzen) und der Entwicklung neuer Isolations- und Kultivierungsmethoden für endophytische Bakterien.

Die Ziele dieser Arbeit waren endophytischen Actinobakterien aus Pflanzen von Naturwaldreservaten – Merkenstein und Stampftal - zu isolieren und zu identifizieren und ihre antimikrobielle Wirkung zu untersuchen. Für diese zwei Standorte war aus früheren Studien bekannt, dass es sich um Sonderstandorte mit extrazonaler Vegetation handelt in deren steinigem Böden und Actinobakterien als am stärksten vertretene bakterielle Gemeinschaft (49%) hervortreten.

Als gutes Isolierungsmedium hat sich das nährstoffarme Gellan gum herausgestellt, da Actinobakterien aufgrund ihrer Eigenschaften Filamente zu bilden so einen selektiven Vorteil gegenüber anderen Endophyten erzielen konnten. So wurden aus 21 Pflanzen 98 endophytischen Bakterien isoliert.

Mittels PCR-Amplifizierung von 16S-rRNA und RNA-Polymerase  $\beta$ -Untereinheit (*rpoB*) Genen wurden 62 Isolate als *Streptomyces sp.* und 36 Isolate als andere Bakterien, vorwiegend *Bacillus sp.* identifiziert. Die anschließende phylogenetische Analyse von *Streptomyces-rpoB*-Gen-Sequenzen suggeriert, dass es sich bei einer Gruppe von Isolaten möglicherweise um neue Stämme handelt; dies bleibt allerdings noch zu klären.

In einem Agardiffusionstest wurden *Streptomyces*-Isolate auf ihre antibiotische Wirkung gegen *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Erwinia carotovora odorifera*, *Fusarium oxysporum* und *Candida albicans* getestet. In diesen Versuchen wurden zweierlei Nährstoffzusammensetzungen sowie drei Stimulationsstoffe miteinbezogen. Mehr als 50% der *Streptomyces*-Isolate zeigten eine antimikrobielle Wirkung gegen Gram-positive Bakterien, wobei die meisten gegen *Bacillus subtilis* aktiv sind. Es bestätigte sich ein klarer Zusammenhang zwischen Nahrungsknappheit und Sekundärmetaboliten-Produktion. Es wurde auch der Einfluss von Stimulationsstoffen auf die Aktivierung bzw. Inhibierung der Antibiotika-Produktion beobachtet.

Ein Ko-Kultivierungsversuch von *Streptomyces*-Isolaten mit anderen Bakterien (mit Streptomycceten-assoziierte Isolate) verdeutlichte den Einfluss der biologischen Konkurrenz auf die Produktion von Signalmolekülen und die Fähigkeiten der bakteriellen Zelle auf diese Signale spezifisch zu antworten.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass Endophyten, insbesondere Streptomycceten, eine potenzielle Quelle neuer Antibiotika darstellen. Es ist aber weiterhin wichtig an den molekularen Mechanismen, die zur Expression von Sekundärmetaboliten Genclustern führen zu forschen, da durch Expression von „cryptic“ Genclustern neue metabolische Signaltransduktionswege entdeckt werden können.

## Abstract

Endophytic actinobacteria are possible sources of new species and potential producers of new natural products that could find their application in medicine, agriculture and industry. There are already many studies that discuss the positive effects of actinobacteria on growth and health of the plants, as well as the antimicrobial and antitumor activity of the active agents derived from these endophytes.

The number of the multiresistant pathogens increases constantly and so does the demand for new antibiotics. One of the ways to find new antimicrobial agent is to explore specific ecological niche (defined through different nutrient supply, microbial diversity in the soil and several endophytes-colonized plants) and to develop new methods for the isolation and the cultivation of the endophytic bacteria.

The aim of this study was to isolate and to identify endophytic actinobacteria from the plants collected at Merkenstein and Stampftal, natural forest reserves in Austria and to test their antimicrobial activity. On these two locations, as previous studies have shown, the actinobacteria are the most abundant bacterial community (49%).

Nutrient-poor Gellan gum has shown to be very good isolation media for actinobacteria due to their ability to form filaments, which worked for them as a selective advantage in compare to other endophytes. In this way 98 endophytic bacteria were isolated from 21 plants.

PCR amplification of the 16S-rRNA and RNA-polymerase  $\beta$ -subunit (*rpoB*) genes identified 62 isolates as *Streptomyces sp.* and 36 isolates as other bacteria, predominantly *Bacillus sp.* Furthermore, phylogenetic analysis of the *Streptomyces-rpoB*-gen-sequence suggested that one group of isolates is presumably new species. However, this assumption remains to be further explored.

Possible antibiotic activity of *Streptomyces* isolates against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Erwinia carotovora odorifera*, *Fusarium*

*oxysporum* and *Candida albicans* was evaluated using agar diffusion test. In these experiments were used two different nutrient compositions as well as three stimulating substances. More than 50% of *Streptomyces* isolates have shown antimicrobial activity against gram-positive bacteria, the majority being active against *Bacillus sp.* The clear correlation was noticed between food shortage and secondary metabolite production as well as the effect of the stimulating substances on activation or inhibition of antibiotic production.

Additional co-cultivation experiment of *Streptomyces* isolates with other bacteria (with *Streptomyces*- associated isolates) illustrated the influence of biological competition on the production of signal molecules and the ability of bacterial cells to create specific answer to these signals.

In summary, in presented study we have demonstrated that endophytes, especially *Streptomyces*, are potential sources of new antibiotics. However, it is of great importance to research further and to understand molecular mechanisms that lead to expression of secondary metabolites genclusters, because through expression of “cryptic” genclusters new metabolic signal transduction pathways can be discovered.

## 1 Einleitung

Manche Actinobakterien zeichnen sich dadurch aus, dass sie eine enge Beziehung mit Pflanzen eingehen, indem sie das innere Pflanzengewebe besiedeln. Innerhalb der Ordnung *Actinomycetales* sind sowohl endophytische als auch Pflanzenpathogene Spezies bekannt (Coombs et al., 2003). Endophytische Actinobakterien sind als potentielle Quelle neuer Spezies und neuer bioaktiver Naturstoffe von medizinischer und kommerzieller Bedeutung relativ unerforscht (Qin et al., 2009). Seit Anfang Neunzigerjahren beschäftigen sich viele unabhängige Forscher-Gruppen damit, neue endophytische *Actinobacteria*-Spezies zu isolieren und zu charakterisieren. Bisher wurden sie in verschiedenen Pflanzenfamilien und Spezies nachgewiesen. Darüber hinaus konnte ihre weite Verbreitung durch das innere Pflanzengewebe festgestellt werden (Fialho de Olivera et al., 2010). Die endophytischen Actinobakterien wurden sowohl aus Agrarpflanzen (Weizen, Mais, Reis, Tomaten, Kartoffeln, Karotten) als auch aus wilden Pflanzen isoliert (Qin et al., 2009). Weiter zeigten die Studien, dass *Streptomyces* spp. die dominierende Gattung unter endophytischen Actinobakterien ist (Bascom-Slack et al., 2009). Egal ob durch direkte positive Effekte auf die Wirtspflanze (z.B. Nitrogen-Fixierung, enzymatische, antimikrobielle und antifungale Aktivitäten, Pflanzenwachstum Förderung) oder indirekt als potentielle Produzenten neuer Antibiotika und anderer bioaktive Stoffe, nehmen die endophytische Actinobakterien immer mehr an Bedeutung in moderner Medizin, Agrikultur und Industrie zu.

Bei der Pflanzenauswahl zur Isolation von Endophyten sollten folgende Kriterien bedacht werden:

- von Pflanzen, die in Bereichen großer Pflanzendiversität wachsen erwartet man dass sie auch größere Endophyten Diversität beherbergen,
- Pflanzen die in speziellen Habitaten wachsen, besonders solche die durch schlechte Umweltbedingungen spezielle Überlebensfähigkeiten entwickelt haben,
- Pflanzen die von durch Pathogene infizierte Pflanzen umgeben sind und keine Krankheitssymptome zeigen,

- Pflanzen, die bereits für medizinische Anwendungen genutzt werden,
- Pflanzen die gewisse Relikte Fundorte bewohnen (Yu et al., 2010).

In dieser Arbeit wurde die Diversität und antimikrobielle Aktivität von endophytischen Actinobakterien aus wilden und heimischen Pflanzen von zwei Sonderstandorten in Österreich untersucht – Merkenstein und Stampfltal. Es handelt sich um Naturwaldreservate in Niederösterreich mit einer natürlichen Vegetation die nicht bewirtschaftet werden. Beide Standorte haben ähnliche Bodentypen und Vegetation. Es handelt sich um steinige Böden (Rendzic leptosol, Dolomiten) wo extreme Bedingungen, wie Nahrungsknappeheit und Trockenheit herrschen. Die Bodeneigenschaften haben eine extrazonale Vegetation hervorgerufen so überwiegen an diesen Standorten Schwarzkieferwälder (*Pinus nigra* Arnold) (sonst wären Buchenwälder). In Bezug auf mikrobielle Diversität in diesen Böden sind die Actinobakterien mit 49%, die am stärksten vertretene bakterielle Gemeinschaft, gefolgt von *α-Proteobakteria* (20%) und *Holophaga/ Acidobakterium* (12%). Die Tatsache, dass die Actinobakterien dominieren überrascht nicht, da diese Bakterien gute Überlebensstrategien entwickelt haben. Sie bilden Filamente zur besseren Nährstoffversorgung sowie Sporen als Dauerstadien und erzielen somit einen adaptiven Vorteil gegenüber anderen Bakterien wenn extreme Überlebensbedingungen herrschen (Hackl et al., 2004).

## 1.1 Endophyten

Die Definition des Begriffes „Endophyten“ umfasst sowohl Bakterien als auch die Pilze und Algen (Wilson, 1995; Stone et al., 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wird er jedoch nur auf Bakterien verwendet.

Endophyten sind Mikroorganismen, welche in gesundem Pflanzengewebe etabliert sind, ohne im Wirt erkennbare Symptome oder Schäden zu verursachen (Wilson, 1995; Sieber, 2002). Diese Arten der Assoziationen sind in der Natur weit verbreitet. Endophyten wurden in einer Vielfalt von Pflanzenarten gefunden und können in allen Pflanzenteilen (Wurzel, Blätter, Knolle, Sprossachse, Samen, Frucht) vorkommen (Petrini et al., 1992; Hallmann et al., 1997). Für eine

effiziente Besiedlung des inneren Pflanzengewebes ist Biofilmbildung auf dem Sämling und/oder in der Rhizosphäre wichtig (Danhorn and Fuqua, 2007). Jedoch im Vergleich zu oberirdischen Pflanzenabschnitten, die Wurzel weist eine höhere Besiedlung durch Endophyten auf (Rosenblueth et al., 2004). Endophytischelebende Bakterien besiedeln hauptsächlich den interzellulären Raum und nur selten den intrazellulären Raum und Leitgewebe der Pflanze (Reinhold-Hurek and Hurek, 1998). Sie liegen in einer breiten taxonomischen Vielfalt vor. Es wurden bereits über 129 Spezies aus inneren Pflanzengewebe isoliert (Hallmann et al., 1997). In der letzten Zeit beschäftigen sich viele Studien mit den Wechselwirkungen endophytischen Bakterien und ihrer Wirtspflanzen. Es können grundsätzlich zwei Typen von diesen Wechselwirkungen unterschieden werden: latente Pathogenität und/oder Mutualismus. Endophytischer Mutualismus ist durch wachstums- und gesundheitsfördernde Wirkung gekennzeichnet (Schulz, 2006). Die Wuchsteigerung der Wirtspflanze kann einerseits an der endophytischen Produktion von Sekundärstoffen und Hormonen beruhen (Brown, 1974; Burr et al., 1984). Andererseits durch Endophyten kann auch eine erhöhte Phosphataufnahme (Kavimandan and Gaur, 1971) und Stickstofffixierung ermöglicht werden (Tran Van et al., 2000). Da endophytische Bakterien und Phytopathogene ähnliche ökologischen Nischen besetzen, liegt die Rolle der Endophyten im Schutz der Wirtspflanze vor Phytopathogenen. Dieser Schutz erfolgt durch direkte Wechselwirkung der endophytischen Produktion von Sekundärstoffen mit antimikrobiellen und antimykotischen Aktivitäten (van Loon et al., 1998). Infolge dieser Sekundärstoffproduktion mit pharmakologisch interessanten Eigenschaften, werden Endophyten immer mehr auf bisher unbekannte Verbindungen hin untersucht (Schulz et al., 2006).

## 1.2 Actinobakterien

Actinobakterien stellen die artenreichste Klasse unter den Bakterien dar. Es handelt sich um Gram-positive Bakterien mit hohem GC-Gehalt. In Bezug auf Morphologie, physiologische und metabolische Eigenschaften sowie Lebensweise und Taxonomie stellen die Actinobakterien eine äußerst vielseitige Gruppe von Prokaryoten dar (Ventura et al., 2007).

### 1.2.1 Morphologie und Physiologie der Actinobakterien

Actinobakterien wurden früher als Actinomyceten („Strahlenpilze“) bezeichnet. Diese Bezeichnung beruhte auf morphologischen Beobachtungen verschiedener Gattungen. Die verzweigten Hyphen bilden das charakteristische Myzelium, die entstehenden Kolonien auf Agar-Platten ähneln denen von Pilzen. Jedoch weisen die Actinobakterien eine hohe morphologische Diversität auf, die von Kokkoide (z.B. *Micrococcus*) oder kokkoide Stäbchen (z.B. *Arthrobacter*) bis zu verzweigten Hyphen (z.B. *Nocardia* spp.) und Substrat- und Luftmyzelium mit Sporen (z.B. *Streptomyces*) reicht (Ventura et al., 2007). Die Sporen der Actinobakterien unterscheiden sich deutlich von Endosporen der Bazillen oder Clostridien. Sie sind extrem Austrocknungs- aber nur wenig Hitzenresistent, manche bilden so genannten Sporengeißeln aus oder sind von einer hydrophoben Hülle umgeben. Eine klassische Gram-Färbung ergibt nicht immer ein eindeutiges Ergebnis, jedoch entspricht der Zellwandaufbau der Actinobakterien dem eines Gram-positiven Bakteriums.

In Hinblick auf ihre physiologischen Eigenschaften sind bei Actinobakterien vielseitige Lebensweisen zu beobachten. Es wurden pathogene (z.B. *Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp., *Tropheryma* spp., *Corynebacterium* spp. und *Propionibacterium* spp.), Boden- (z.B. *Streptomyces* spp.) und Gastrointestinaltrakt-Bewohner (z.B. *Bifidobacterium* spp.) gefunden. Darüberhinaus sind Pflanzen- (z.B. *Leifsonia* spp.) und Stickstofffixierende-Symbionten (z.B. *Frankia*) bekannt (Ventura et al., 2007). In den meisten Lehrbüchern werden Actinobakterien als aerobe Saprophyten dargestellt. Es

wurden aber sowohl strikte Anaerobier als auch fakultativ anaerobe und microaerophile Arten beschrieben (Lechevalier and Lechevalier, 1967).

### **1.2.2 Taxonomie und Phylogenie der Actinobakterien**

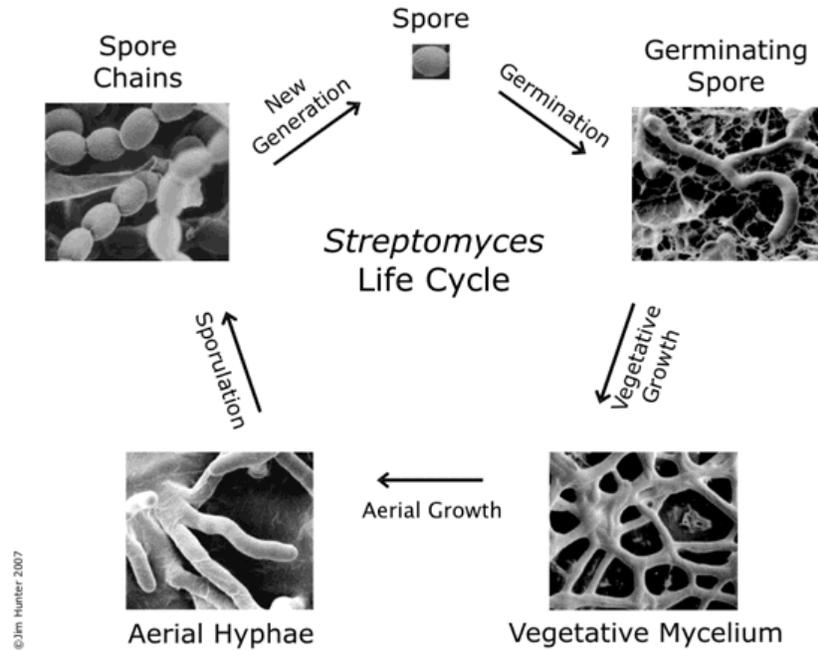
Mit 5 Ordnungen und 39 Familien ist die Klasse *Actinobacteria* eine der artenreichsten taxonomischen Einheiten innerhalb der Domäne *Bacteria* (Ventura et al., 2007). Ein wichtiges molekulares Unterscheidungsmerkmal von Gram-positiven Bakterien ist der molare GC-Gehalt in der genomischen DNA. Bei Actinobakterien liegt er in der Regel über 50% (Stackebrandt et al., 1997), wobei die höchsten GC-Werte mit 63-78% in der Gattung *Actinomyces* festgestellt wurden (Madigan et al., 2000). Actinobakterien haben eine einzigartige molekulare Synapomorphie: eine homologe Insertion von etwa 100 Nukleotiden zwischen den Helices 54 und 55 der 23S rRNA (Roller et al., 1994). Die Definition der taxonomischen Einheit der Klasse *Actinobacteria* wurde erst 1997 von Stackebrandt und Kollegen etabliert. Die Zugehörigkeit einer Spezies zur Klasse der Actinobakterien wird durch eine 16S rDNA / rRNA-Sequenzähnlichkeit von >80% und das Vorhandensein signifikanter Nukleotide in der 16S rDNA / rRNA: ein A an der Position 906 und entweder ein A oder ein C an der der Position 955, definiert (Stackebrandt et al., 1997). Die starke kommerzielle Interesse an dieser Gruppe und ihre physiologische Vielseitigkeit führten zu einer Überklassifizierung. So wurden z.B. mehr als 500 Streptomyceten- und 300 Mycobakterien-Spezies publiziert. Allerdings wurde die Anzahl der Mycobakterien-Spezies auf 35 anerkannte reduziert (Krsek et al., 2000).

### **1.3 Streptomyceten**

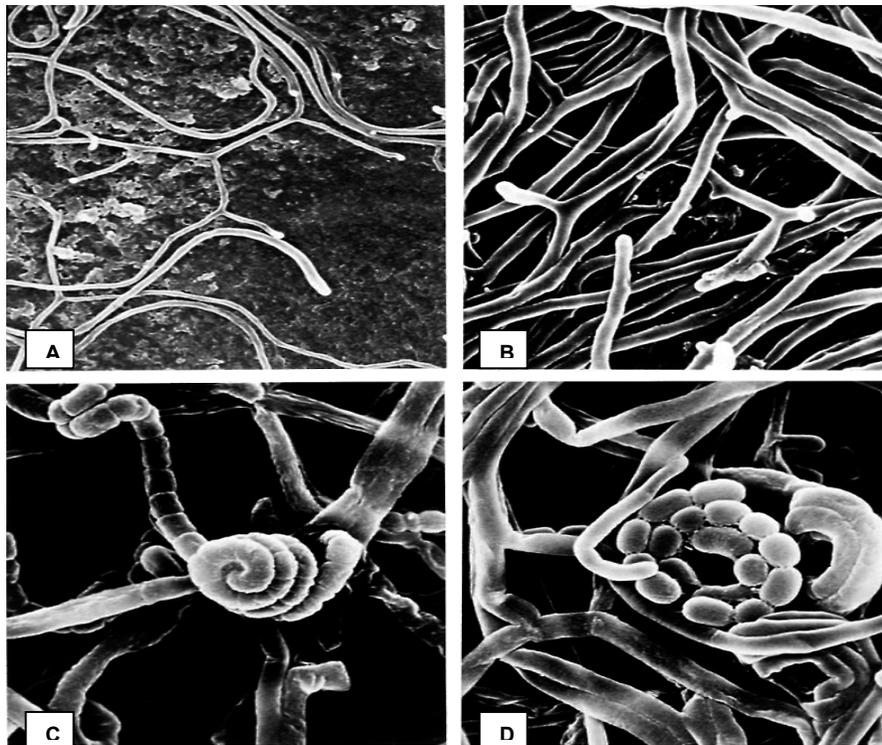
Wir alle kennen den typischen Geruch frisch aufgebrochener Erde genauso wie den Begriff „Antibiotikum“. Doch was haben der Erdgeruch und Antibiotika gemeinsam? Der Erdgeruch beruht auf Geosminen, Stoffwechselprodukten der Streptomyceten. Mit bis zu  $10^9$  Zellen pro Gramm Erde sind Streptomyceten

dominierende Organismen in diesem Ökosystem. Mehr als Hälfte aller bekannten Antibiotika werden von Streptomyceten produziert.

Die Gattung *Streptomyces* gehört zu den filamentösen *Actinobacteria* und umfasst über 500 Arten (Madigan et al., 2000). Die den Pilzen ähnliche Lebensweise war lange der Grund warum man diese Prokaryonten als „Actinomyceten“ bezeichnete. Während sich die meisten Bakterien durch Zweiteilung fortpflanzen, besteht Streptomyceten Lebenszyklus aus drei Stadien. Ausgehend von einer keimenden Arthrospore entwickelt sich unter günstigen Lebensbedingungen im Substrat ein Netz aus verzweigten Hyphen, das Substratmyzel. Dieses dient zur Nährstofferschließung und somit dem vegetativen Wachstum. Wenn die Nährstoffe in der Umgebung verbraucht sind, erfolgt die autolytische Abbau des Substratmyzels und die Streptomycetenkolonie beginnt eine zweite Art des Myzels zu bilden, so genanntes Luftmyzel, dessen Hyphen in die Luft ragen und eine mehrfache Genomkopie enthalten. Durch Einstellung des Wachstums schnüren sich am Luftmyzel die Exosporen (Conidien) ab, die dann zum Überdauern einer Hungerphase und zur Verbreitung dienen. Die Sporen enthalten eine einfache Kopie des Genom (Hopwood, 2007). Die Verbreitung der Sporen wird durch Wind oder Wasser und Arthropoden unterschützt (Locci, 1989).



**Abb. 1:** Lebenszyklus eines myzelartig wachsenden Streptomyceten (Quelle: Kieser et al., 2000).



**Abb. 2:** EM-Aufnahme von vier Stadien in der Entwicklung einer *Streptomyces lividans* Kolonie. A) frühe vegetative Hyphen. B) reifes Substratmyzel beginnt Luftzweige zu produzieren. C) Lufthyphen beginnen zu sporulieren. D) reife Sporen-Ketten (Quelle: Hopwood, 2007).

### 1.3.1 Regulierung der Sekundärmetabolitenproduktion bei Streptomyceten

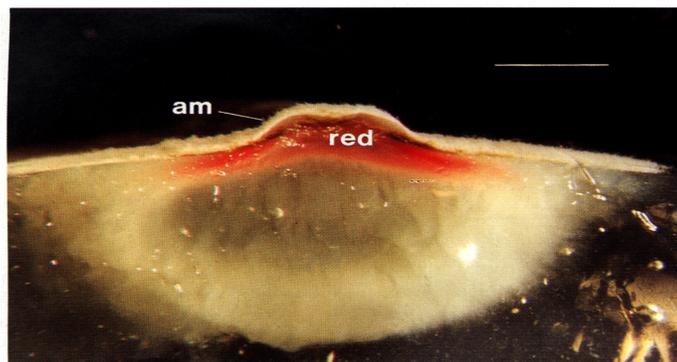
Naturstoffe, als biologisch aktive Wirkstoffe finden eine breite Anwendung nicht nur in der Medizin und Pharmazie, sondern auch in der Landwirtschaft. Die meisten dieser Wirkstoffe sind pflanzlicher Herkunft, jedoch steigt die Bedeutung und Interesse an Mikroorganismen als Produzenten immer mehr. Alle mikrobiellen Wirkstoffe gehören zur Gruppe Sekundärmetaboliten. Diese Stoffe sind für das Leben und die Vermehrung der ausscheidenden Zelle nicht essentiell, aber vermögen eventuell einen selektiven Vorteil im natürlichen Habitat (Krsek et al., 2000). Die mikrobiellen Sekundärmetabolite werden hauptsächlich dann synthetisiert wenn es zur Veränderungen im primären Metabolismus der Zelle kommt, z.B. durch Nahrungsknappheit (Madigan et al., 2000). Seit 1950 sind bereits 20.200 mikrobielle Sekundärmetabolite, mit einer Aktivität *in vitro*, entdeckt worden; 48% davon wurden aus Actinomyceten isoliert (Marinelli, 2007). Zu den mikrobiellen Sekundärmetaboliten gehören: Antibiotika, Toxine, Pigmente, Effektoren der ökologischen Competition und Symbiose, Enzyminhibitoren, Immunmodulatoren, Anti-Tumor-Substanzen, Rezeptor-Antagonisten und -Agonisten, Pheromone und wachstumsfördernde Stoffe. Ihre Biosynthesegene liegen meistens als Genclusters auf der chromosomalen DNA angeordnet vor. Sekundärmetabolismus wird dann eingeschaltet, wenn Nährstoffe verbraucht sind, wenn Wachstumsrate sinkt und/oder durch Stimulationsstoffe induziert wird. Bei diesen Ereignissen entstehen Signalmoleküle welche in die Signaltransduktionskaskade eingreifen und in weiterer Folge chemische (Sekundärmetabolismus) und morphologische (Morphogenese) Differenzierung regulieren. Signalmoleküle binden an regulatorische Proteine (Repressoren welche bei guter Nähstoffversorgung und hoher Wachstumsrate Sekundärmetabolismus unterdrücken) und inhibieren ihre Wirkung. In der Regulation des Sekundärmetabolismus können mehrere regulatorische Ebenen unterschieden werden:

- Nährstoffverfügbarkeit/ Wachstumsrate/ Stimulationsstoffe aktivieren sgn. „Mastergene“ die sowohl Sekundärmetabolismus als auch Morphogenese regulieren;

- Die Gene auf dem zweiten Niveau können entweder Sekundärmetabolismus oder Morphogenese regulieren, aber nicht beides;
- Auf der nächsten Ebene sind Gene die Entstehung von einzelnen Sekundärmetaboliten-Gruppen steuern;
- Die Gene auf der vierten regulatorischen Ebene sind für Bildung spezifischen Sekundärmetaboliten-Gruppen zuständig;
- Auf der letzten, fünften Ebene befinden sich die Gene welche individuelle Biosynthesewege von Sekundärmetaboliten regulieren (Demain, 1998).

Streptomyceten sind das Paradigma eines sekundärmetabolitenproduzierenden Organismus. Sie produzieren eine Vielfalt chemisch unterschiedlicher Klassen von Sekundärmetaboliten (Hopwood, 2007).

Die Produktion von Antibiotika als typischen Sekundärmetaboliten erfolgt in der stationären Wachstumsphase und wird von vielen Faktoren beeinflusst. Zum Beispiel kann Nährstoffmangel das An- oder Abschalten von Signaltransduktionskette veranlassen, die in weiterer Folge eine Umschaltung vom vegetativen Wachstum auf Zelldifferenzierung und Sporenbildung bewirken (Madigan et al., 2000). Chater und Merrick brachten 1979 die Hypothese ein, dass Antibiotika-Synthese im Wesentlichen kein offensives sondern defensives Geschehen ist. Nämlich, die Nährstoffe, die durch Abbau von Substratmyzel entstehen und zur Bildung von Luftmyzel dienen, können viele motile Bakterien anlocken. Um sich zu schützen scheidet *Streptomyces*-Kolonie das Antibiotikum aus. Kompetitive Bakterien werden getötet und als Nährstoffe zur Sporenentwicklung verwertet (Chater and Merrick, 1979; by Hopwood 2007).



**Abb. 4:** Querschnitt durch eine *Streptomyces coelicolor* Kolonie. Die reifen vegetativen Hyphen im Zentrum der Kolonie produzieren das rote Antibiotikum (red); am =aerial mycelium (Quelle: Hopwood, 2007).

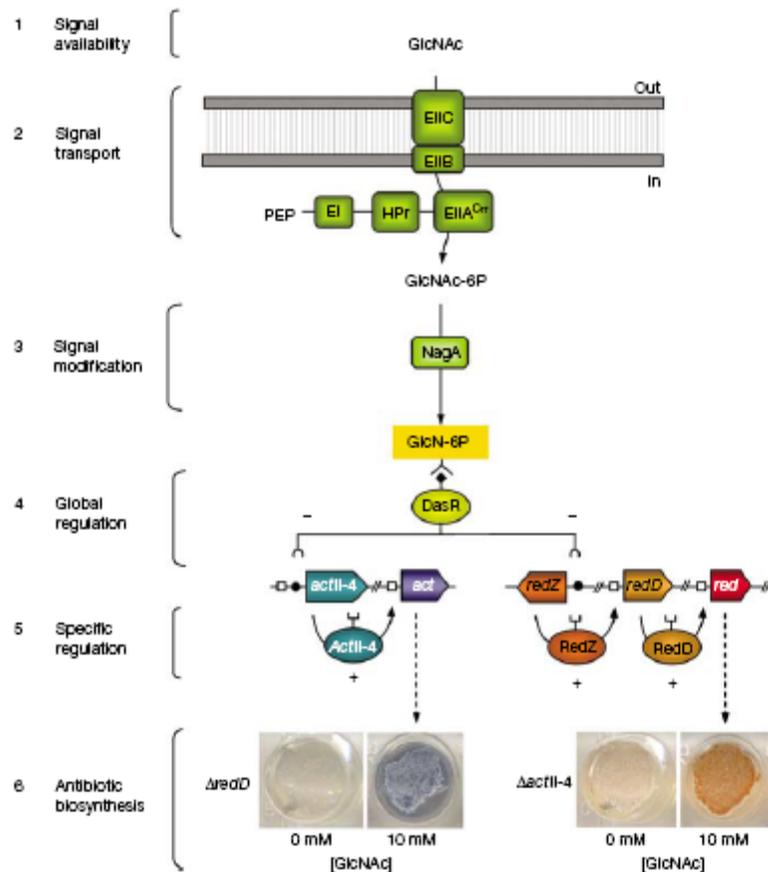
Streptomyceten haben eine enorme genetische Kapazität zur Produktion neuer Naturstoffe. Mit nur einer bekannten Ausnahme, sind Gene für einzelne Sekundärmetaboliten in Genclustern angeordnet (Bibb, 2005). *Streptomyces coelicolor* A(3)2 ist das meiststudierte und das Modellorganismus unter den Streptomyceten. Sein Genom wurde 2002 sequenziert, und 7825 Genen kodieren in mehr als 20 Genclustern bekannte oder potentielle Sekundärmetaboliten (Bentley et al., 2002). Im Jahr darauf wurden im Genom von *Streptomyces avermitilis* (ca. 9000 KBp) 30 Genclustern für Sekundärmetaboliten-Produktion, identifiziert (Ikeda et al., 2003). Die meisten dieser Genclustern sind durch Signaltransduktionkaskade spezifische Gene reguliert. Manche dieser regulatorischen Gene werden auch zur Bildung von Luftmyzel und Sporen benötigt (Chater, 2003; Elliot, 2004). Guanosintetraphosphat (ppGpp) und Guanosinpentaphosphat (pppGpp) werden bei Nährstoffmangel als Signalmoleküle gebildet. Bei herrschendem Stickstoffmangel wird ppGpp Synthase (RelA) zur Antibiotika-Produktion in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) benötigt (Chakraburttty et al., 1997). Fast alle Streptomyceten produzieren  $\gamma$ -Butyrolactone. A-Faktor (2-isocapryloyl-3R-hydroxymethyl- $\gamma$ -butyrolacton) aus *Streptomyces griseus*, spielt eine Rolle als extrazelluläres Signal sowohl zur morphologischen Differenzierung als auch zur Antibiotika-Synthese (Kato et al., 2004). Die Synthese der  $\gamma$ -Butyrolactone ist wahrscheinlich Antwort auf ein noch unbekanntes physiologisches Signal (vielleicht Nahrungsknappheit) (Bibb, 2005). 2004 wurde in *Streptomyces natalensis* ein neuer extrazellulärer Induktor zur Antibiotikasyntese identifiziert; PI Faktor (2,3-diamino-2,3-bis(hydroxymethyl)-1,4-butanediol), welcher die Produktion von Fungizid Primaricin stimuliert (Recio et al., 2004). Viele Proteine die in Streptomyceten die Sekundärmetaboliten-Signaltransduktionkaskaden regulieren gehören der SARP Familie der transkriptionellen Aktivatoren (Wietzorrek et al., 1997). CcaR in *Streptomyces clavuligerus* weist eine typische

SARP-Domäne auf und reguliert Biosynthese von Cephامycin C und Clavulansäure (Santamarta, 2002). Ein regulatorisches Protein mit pleiotropischer Wirkung, AfsR, wurde In *Streptomyces coelicolor* identifiziert (Horinouchi, 2003). Die Funktion vieler Sekundärmetaboliten ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch weiß man dass sie in der natürlichen Umgebung einen adaptiven Vorteil für ihre Produzenten gewähren. So überrascht es nicht, dass bei der Regulierung der Sekundärmetabolitenproduktion, Diversität und Komplexität von Streptomyceten die entscheidende Rolle spielen.

### 1.3.2 Induktion des Sekundärmetabolismus in Streptomyceten

Es war schon immer eine Herausforderung für alle Streptomyceten-Forscher, eine wichtige Frage zu klären: „ Welche Kontrollmechanismen verbinden chemische Differenzierung und Antibiotikasyntese mit dem Beginn der morphologischen Differenzierung? “. 2008 veröffentlichten Sebastian Rigali und Kollegen die erste komplette Signaltransduktionskaskade vom Nährstoffstatus-Wahrnehmung bis morphologischer Differenzierung und Antibiotikaproduktion (Rigali et al., 2008). Sie zeigten dass N-Acetylglucosamin eine wichtige Rolle als Signal zur Antibiotika-Syntese in manchen *Streptomyces*-Arten spielt. N-Acetylglucosamin (GlcNAc) kommt im Peptidoglycan vom Grampositiven Bakterien vor und ist ein Monomer des Naturpolymers Chitin. Durch autolytische Zersetzung von Substratmyzel kommt es zur Akkumulation von GlcNAc. Ein membranassoziertes Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferasesystem (PEP-PTS) transportiert es in das Zytoplasma. Dabei wird GlcNAc zu N-Acetylglucosamin-6-phosphat (GlcNAc-6P) phosphoryliert und in weitere Folge durch N-Acetylglucosamin Deacetylase (NagA) zu Glucosamin-6-phosphat (GlcN-6P) deacetyliert. GlcN-6P interagiert mit dem transkriptionellen Repressor DasR, verhindert seine Bindung an DNA und ermöglicht somit die Transkription von *act* und *red* Genclusters. Die Antibiotika Undecyprodigiosin (Red, das rote) und Actinorhodin (Act, das blaue) werden synthetisiert (Abbildung 5) (Rigali et al., 2008). Ebenso interessant ist, dass Streptomyceten scheinbar unterscheiden können ob GlcNAc aus Chitin stammt (im Überfluss ist) oder durch Hydrolyse der

eigenen Zellwand (Hungersignal) zu den Zellen gelangt (Colson et al., 2008). Da Streptomycceten-Genom viele unentdeckte Sekundärmetaboliten-Signalwege enthält, lässt diese Kenntnis über GlcNAc viele Strategien zur Aktivierung neuer Signalwege vermuten.



**Abb. 5:** Modell einer GlcNAc-abhängigen Signaltransduktionskaskade in Streptomycceten. Um stimulatorische Wirkung des GlcNAc auf Antibiotika-Produktion zu visualisieren wurden *Streptomycces coelicolor* Mutanten M511 (defekt in Act-Synthese) und M510 (defekt in Red-Synthese) (Quelle: Rigali et al., 2008).

Ein alternativer Weg zur Induktion der Antibiotikaproduktion wäre eine „Cross-Spezies“ vermittelte Induktion. Nämlich Wettbewerb zwischen kompetitiven Bakterien um knappe Ressourcen im gemeinsamen Habitat kann die chemische Interaktionen hervorrufen die dann Sekundärmetabolismus und Biosynthese von

spezifischen Antibiotika einleiten (Spragg et al., 1998). Erfolgreiche Versuche gab es bereits: Ko-Kultivierung von Streptomyceten und Pathogenen wie *Staphylococcus aureus*, induzierte bei Streptomyceten die Synthese von spezifischen Antibiotika gegen dieses Pathogen (A Veera Ravi et al., 2010).

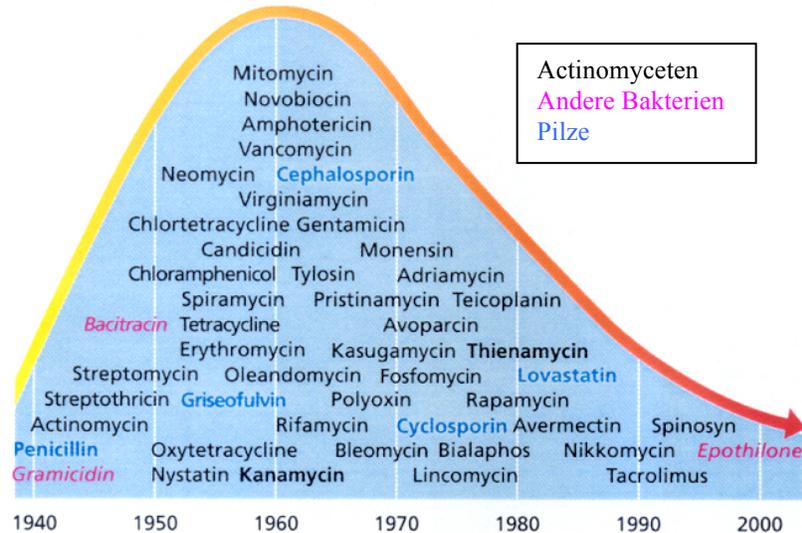
### 1.3.3 Biotechnologische Bedeutung der Streptomyceten

Aus kommerzieller Sicht stellen die Streptomyceten eine sehr wichtige Gruppe von Mikroorganismen dar. Sie produzieren eine erstaunliche Vielzahl an Sekundärmetaboliten mit antibiotischen, antiviralen, herbiziden, antifungalen, antitumoralen und wachstumsfördernden Wirkungen (Chater and Hopwood, 1993). Von über 10000 bekannter Antibiotika, werden mehr als 70% von Streptomyceten produziert (Lazzarini et al., 2000). Bereits 1944 wurde von Schatz und Waksman aus einer Kultur von *Streptomyces griseus* das Antibiotikum Streptomycin isoliert (Hopwood, 2007).

Die bedeutsamsten Antibiotikaproduzenten unter Streptomyceten sind: *Streptomyces avermitilis* (Avermectine) (Hotson, 1982), *Streptomyces coelicolor* (Actinorhodin, Methylenomycin, Undecylprodigiosin, CDA (Ca<sup>2+</sup>-abhängiges Antibiotikum)) (Adamidis and Champness, 1992), *Streptomyces griseus* (Streptomycin, Actinomycin, Novoniocin), *Streptomyces antibioticus* (Actinomycine), *Streptomyces aureofaciens* (Aureomycin, Tetracyclin), *Streptomyces erythreus* (Erythromycine), *Streptomyces fradiae* (Neomycin B), *Streptomyces griseoflavus* (Novobiocin), *Streptomyces venezuelae* (Chloramphenicol) (Herder, 1994). *Streptomyces griseoviridis* wird als Biofungizid gegen *Fusarium oxysporum* eingesetzt (Mohammadi, 1994).

Durch ihre Eigenschaften der Umsetzung und des Abbaus von natürlichen Polymeren, nehmen die Streptomyceten eine große Bedeutung an dem Stoffkreislauf am natürlichen Standort. Als Produzenten einer Vielzahl an hydrolytischen Exoenzymen sind Streptomyceten wichtige Biodegradenten (McCarthy und Williams, 1992). Ihr Substratspektrum ist sehr breit und umfaßt Cellulose, Chitin, Lignin, Keratin, Pektin, Stärke und Xylan (Goodfellow, 1988).

Selbst Gummistoffe und Plastik können von Streptomycceten abgebaut werden (Pommer und Lorenz, 1986).



**Abb. 6:** Entdeckung der wichtigen Antibiotika und anderer Naturstoffe. Die Zahl der neuentdeckten Naturstoffe sinkt in den letzten Jahren (Quelle: Hopwood 2007).

Obwohl Streptomycceten seit 1950 intensiv isoliert und gescreent wurden, ihr vielfältiges Sekundärmetabolismus, stellt immer noch eine potentielle Quelle neuer Naturstoffe dar. Viele unerforschte Habitats und Entwicklung neuer Isolations- und Kultivierungsmethoden versprechen die Entdeckung neuer Spezies. Durch Expression von „cryptic“ Genclustern können neue enzymatische und metabolische Signaltransduktionswege entdeckt werden (Marinelli, 2007).

### 1.4 Antibiotika

Da eines der Ziele dieser Arbeit Screening der endophytischen Isolate auf Antibiotikaproduktion war, werde ich an dieser Stelle die Antibiotika-Hauptgruppen und Wirkungsmechanismen sowie einen ökologischen Aspekt der Antibiotika und Antibiotikaresistenzen erwähnen.

### **1.4.1 Antibiotika-Gruppen und Wirkungsmechanismen**

“ Als Antibiotika bezeichnet man Stoffe, die von Bakterien, Pilzen, aber auch voll synthetisch, erzeugt werden und die in geringen Konzentrationen das Wachstum von Mikroorganismen (Bakterien) hemmen (Bakteriostase) oder diese abtöten (Bakterizidie).” (Ackermann, 2009).

Aufgrund des Wirkortes lassen sich Antibiotika in 5 verschiedene funktionellen Gruppen einteilen:

- Hemmung der Zellwandbiosynthese,
- Steigerung der Permeabilität der Zytoplasmamembran,
- Hemmung der Proteinsynthese,
- Hemmung des Nukleinsäuren-Metabolismus,
- Hemmung von Stoffwechselfvorgängen/ Antimetaboliten.

#### **Hemmung der Zellwandbiosynthes**

Diese Antibiotika blockieren auf unterschiedliche Weise den Aufbau der Bakterienzellwand. Durch das Binden von Antibiotikum an die bakterieneigene Transpeptidase wird die terminale Verknüpfung linearer Glykopeptide unterbunden ( $\beta$ -Lactam-Antibiotika: Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme, Monobactame und Clavulansäure). Glykopeptide wie Vancomycin und Teicoplanin verhindern die Quervernetzung des Murein-Gerüsts. Bei gramnegativen Bakterien sind Glykopeptide unwirksam, da ihre Zellwand nur zu etwa 10% aus Murein besteht. Manche wiederum blockieren die Synthese von N-Acetylmuraminsäure in dem sie ihr katalytisches Enzym irreversibel hemmen (Fosfomycin).

#### **Steigerung der Permeabilität der Zytoplasmamembran**

Hierbei wird die Funktion der Zellmembran als osmotische Schranke durch Steigerung der Permeabilität irreversibel geschädigt. Zu dieser Gruppe gehören Polymyxine (Colistin) und Antimykotika (Nystatin und Amphotericin B). Grampositive Bakterien (mit Ausnahme von Proteus-Arten) sind resistent gegen dieser Antibiotika-Gruppe.

#### **Hemmung der Proteinsynthese**

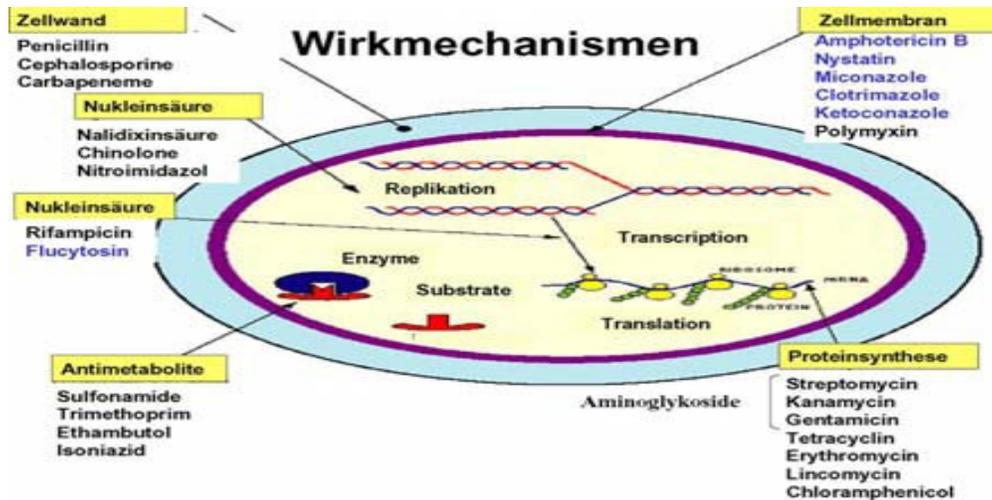
Hier unterscheidet man grundsätzlich 2 Gruppen von Antibiotika: jene, die an 30 S und jene die an 50 S Ribosomen-Untereinheit binden. Eine irreversible Bindung an 30 S ribosomale Untereinheit konnte für Aminoglykoside (Tobramycin, Amikacin, Hygromycin B) und Tetracycline gezeigt werden. Diese Antibiotika verringern die Affinität der Bindungsstelle für Aminoacyl-t-RNA, was Fehler während der Translation hervorruft und zur Synthese von unfunktionellen Proteinen führt. Um zu den Ribosomen der Gram-negativen Bakterien zu gelangen, muss das Antibiotikum zuerst durch Porin-Kanäle der äußeren Zellmembran passiv diffundieren und dann durch die innere Membran aktiv aufgenommen werden. An die 50 S ribosomale Untereinheit binden Makrolide, Lincosamide und Chloramphenicol. Sie beeinflussen die Translokation indem sie Aktivität von Peptidyltransferase hemmen.

### **Hemmung des Nukleinsäuren-Metabolismus**

Diese Gruppe wird auch Gyrasehemmer (Aminocoumarine wie Novobiocin und Quinolone wie Ciprofloxacin) genannt, da sie die Topoisomerase II (DNA-Gyrase) und Topoisomerase IV inhibieren. Das wirkt bakterizid auf Mikroorganismen, weil die DNA-Replikation und Transkription gestört werden. RNA-Polymerase wird durch Rifampicin gehemmt; so bleibt die Initiation der RNA-Synthese aus.

### **Hemmung von Stoffwechselfvorgängen/ Antimetaboliten**

Sulfonamide und Trimethoprim greifen in der Tetrahydrofolsäure-Synthese ein. Sulfonamide verdrängen p-Aminobenzoessäure, welche als Vorstufe zum Aufbau von bakterieller Dihydrofolsäure dient. Das blockiert die Synthese von Tetrahydrofolsäure und in Folge wird auch die Synthese von Thymin und Purin beeinträchtigt. Der genaue Angriffspunkt von Trimethoprim ist das Enzym Dihydrofolatreduktase, das für die Umwandlung von Dihydrofolsäure in Tetrahydrofolsäure verantwortlich ist (Ackermann, 2009).



**Abb. 7:** Funktionelle Antibiotika-Gruppen. Blau = Antimykotika. (Quelle: Heide, 2007).

Weiter kann zwischen zwei Gruppen, den chemischen ( $\beta$ -Lactam, Peptid-Antibiotika, Glykopeptide, Lipopeptide, Aminocoumarine, Tetracycline, Makrolide, Lincosamide, Fluoroquinolone, Oxazolidinone, Sulfonamide, Nitroimidazole usw.) und biosynthetischen (Polyketide, nichtribosomale Peptide und Aminosäurederivate, Oligosaccharide usw.) Antibiotika unterschieden werden.

#### 1.4.2 Rolle der Antibiotika und Antibiotika-Resistenzen in der Natur

Wenn wir „das Antibiotikum“ als Begriff erwähnen, dann denken wir automatisch an Arzneistoffe die uns helfen verschieden bakterielle Infektionen zu bekämpfen. Es sind bereits viele Naturstoffe mit antimikrobieller Wirkung isoliert worden aber auch zahlreiche synthetische Stoffe finden immer mehr Anwendung in der Therapie. Die Mechanismen wie diese Stoffe pathogene Mikroorganismen bekämpfen sind auch weitgehend aufgeklärt worden, doch ihre genaue Wirkungsweise im natürlichen Habitat ist noch nicht vollständig geklärt. Seit dem Beginn der „Antibiotikaära“ in die Vierziger Jahre, lag das Hauptinteresse der Chemischen- und Pharmaindustrie in erster Linie diese Stoffe zu isolieren, identifizieren und ihre Anwendung in der Therapie zu determinieren. Dies führte dazu, dass die chemische Diversität, biosynthetische Gene sowie Synthesewege dieser Naturprodukte großteils völlig entschlüsselt sind. Die Frage über ihrer primären Funktion in dem produzierenden Mikroorganismus und ihrer Rolle in

der mikrobiellen Ökologie blieb bis heute unklar. Im natürlichen Habitat herrscht ständige Konkurrenz um knappe Ressourcen; eine Hypothese besagt, dass diese Naturstoffe ihren Produzenten einen Vorteil gewähren, indem sie die kompetitiven Mikroorganismen verdrängen. Die antibiotikaproduzierenden Mikroorganismen besitzen von Natur aus die Resistenzgene als Selbstschutzmechanismus. Die Beobachtung, dass viele Bakterien in den natürlichen (sogar scheinbar antibiotikafreien) Habitaten ähnliche Spektren von Resistenzen aufweisen, spricht für diese Theorie (O'Brien und Wright., 2011). Bei Antibiotikaproduzenten kann zwischen drei Resistenzmechanismen unterschieden werden: Inaktivierung des Antibiotikums, Efflux des Antibiotikums und Modifizierung des Angriffspunkts. Das „Resistom“ ist in der Natur sehr verbreitet und vermutlich sehr alt. Die meisten Antibiotikaresistenzen wurden durch horizontalen Gentransfer zwischen taxonomisch unterschiedlichen Bakterien erworben. Die phylogenetische Analyse mancher Resistenzgene deutet darauf hin, dass das genetische Material für heutige Resistenzen noch lange vor „Antibiotikaära“ selektiert und verbreitet wurde. Das best dokumentierte Beispiel sind  $\beta$ -Lactamasen, Enzyme die  $\beta$ -Lactam Ring spalten und so die Resistenz gegen  $\beta$ -Lactam Antibiotika verleihen. Es kann zwischen zwei unterschiedlichen, nicht verwandten  $\beta$ -Lactamase-Gruppen (Serin- und Metallo- $\beta$ -Lactamase) unterschieden werden. Strukturbasierte Phylogenie konnte ihre Evolution rekonstruieren werden und zeigen, dass beide Gruppen vor mehr als zwei Milliarden Jahre entstanden (Aminov, 2009).

Die Konzentrationen, die im Labor oder in einer Antibiotikatherapie eingesetzt werden, sind deutlich höher als in der Natur von einem Mikroorganismus produziert werden können. Es ist bereits gezeigt worden, dass Antibiotikakonzentration, die keinen Einfluss auf das Zellwachstum hat, die Expression vieler Gene beeinflussen kann. Dies lässt vermuten dass diese hoch bioaktiven Sekundärmetaboliten nicht nur die Rolle der chemischen Abwehr erfüllen, sondern auch in der Zell-Zell-Kommunikation und physiologischer Differenzierung als Signalmoleküle dienen können (O'Brien und Wright., 2011).

In der letzten Dekade, stößt die einst erfolgreiche Antibiotikatherapie immer mehr an ihre Grenzen. Die Zahl der multiresistenten pathogenen Keime steigt rasch (Methicillinresistenter *Staphylococcus aureus*, Vancomycinresistenter *Enterococcus*, multi-drug-resistenter *Mycobacterium tuberculosis*, Gram-negative pathogene der respiratorischen Systems). Die Antwort auf Frage, *warum* bestimmte Mikroorganismen Antibiotika produzieren, das Verständnis über ihrer präzise Rolle in dem mikrobiellen Ökosystem und über evolutionären und ökologischen Prozessen welche die Resistenzen entstehen lassen, kann uns dabei helfen die Mechanismen und Quellen der klinischen Resistenzen zu klären und wenn möglich unter Kontrolle zu halten.

**Tabelle 1:** Antibiotika-Gruppen, Angriffspunkte und Resistenzmechanismen. PBP = Penicilin-Binde-Protein (Quelle: Walsh, 2003).

Antibiotika	Angriffspunkt	Resistenzmechanismus
<b>Zellwand</b>		
β-Lactam	Transpeptidase/ Transglykosylase (PBPs)	β-Lactamase, PBP Mutante
Vancomycin Teicoplanin	D-Ala-D-Ala Terminus in Peptidoglykan und in Lipid II	Reprogramierung von D-Ala-D-Ala in D-Ala-D-Lac oder D-Ala-D-Ser
<b>Proteinsynthese</b>		
Erythromycin	Peptidyltransferase/ Ribosomen	rRNA-Methilierung/ Efflux
Tetracycline	Peptidyltransferase	Antibiotika Efflux
Aminoglykoside	Peptidyltransferase	Antibiotika Modifizierung
Oxazolidinone	Peptidyltransferase	Unbekannt
<b>DNA-Replikation/ Reparatur</b>		
Fluoroquinolone	DNA-Gyrase	Gyrase-Mutationen

## 2 Ziele dieser Arbeit

Die primären Ziele dieser Arbeit waren Isolierung, Identifizierung und Determinierung der antimikrobiellen Eigenschaften der endophytischen Actinobakterien aus Pflanzen von zwei Naturwaldreservaten in Niederösterreich. Wie Hackl et al., 2004 herausfanden sind die Böden an diesen Sonderstandorten sehr *Actinobacteria*-reich (50%). An Anlehnung daran wurde eine erfolgreiche Besiedlung der Pflanzen durch Actinobakterien vermutet.

Es sollten die optimale Isolierungsmedien sowie Kultivierungsbedingungen für endophytische Actinobakterien gefunden werden. Um Erstselektion bei der Isolierung zu gewährleisten sollte ein Nährstoffarmesmedium ausgewählt werden, da dieses für die Actinobakterien (aufgrund ihrer Überlebensstrategien) einen Vorteil bieten würde.

Weiters sollten die endophytischen Isolate mittels PCR-Amplifizierung von phylogenetischen Genmarkern (16S-rRNA bzw. *rpoB*-Gene) identifiziert werden. Durch Erstellung des Stammbaumes sollte ihre Verwandtschaft zu bisher veröffentlichten Bakterien-Spezies festgestellt werden.

Viele Studien belegen, dass endophytische Actinobakterien die potenziellen Produzenten von Naturwirkstoffen sind. Ein großes Interesse bestand noch darin, die antimikrobielle Wirkung dieser endophytischen Isolate zu untersuchen. Dabei sollte die Auswirkung von unterschiedlichen Nährstoffverhältnissen sowie verschiedenen Stimulationsstoffen auf Antibiotikaproduktion betrachtet werden.

Da viele Isolate, die aus denselben Pflanzen stammen, sehr eng miteinander assoziiert waren, ergab sich im Laufe der Studie die Möglichkeit den Einfluss der biologischen Konkurrenz, zwischen bakteriellen Spezies welche die gleiche ökologische Nische besetzen (in diesem Fall dieselbe Pflanze), auf Produktion von Sekundärmetaboliten zu testen.

## 3 Materialien

### 3.1 Chemikalien

Alle, im Rahmen dieser Arbeit, verwendeten Laborchemikalien und Medienbestandteile wurden im höchsten erhältlichen Qualitätgrad von Merck (Darmstadt, D), Difco (Lawrence, USA), Sigma (St. Louis, USA) und Fluka (Buch, CH) bezogen. Enzyme und Oligonukleotide wurden von Invitrogen (Carlsbad, USA), New England Bio Labs (Beverly, USA) und Promega (Madison, USA) bezogen.

### 3.2 Puffer, Lösungen und Medien

Alle Puffer, Lösungen und Medien wurden mit zweifach entsalztem und filtriertem Wasser (weiter als ddH<sub>2</sub>O) hergestellt. Sterilisation erfolgte in einem Wasserdampfhochdruckautoklaven für 20 Minuten bei 120°C und einem atmosphären Überdruck. Hitzelabile Substanzen wurden sterilfiltriert (Sterilfilter, 0,22 µm Porengröße, Rotilabo-Spritzenfilter, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D). Zur Einstellung des pH-Wertes wurden HCl- und NaOH-Lösung der entsprechenden Normalität verwendet.

#### 3.2.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

##### 0,9% NaCl Lösung

NaCl	9 g/L
------	-------

##### SE-Puffer (Saline-EDTA-Puffer)

NaCl	0,15 M	30 ml/L
EDTA	0,1 M	200 ml/L
ddH <sub>2</sub> O		ad 1000 ml
pH 8,0 einstellen		

### **20% SDS-Lösung**

SDS (sodium dodecyl sulfate)	200 g/L
ddH <sub>2</sub> O	900 ml
auf 68°C erhitzen	
pH 7,2 einstellen	
mit ddH <sub>2</sub> O auf 1000 ml auffüllen	

### **5% Natriumhypochlorit (NaOCl)**

NaOCl (10% Lösung)	500 ml/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (10 %)	500 ml/L
pH 7.0 mit 5 M HCl einstellen	

## **3.2.2 Lysispuffer und Lösungen**

### **Lysozymlösung (10 mg/ml)**

Lysozym	250 mg	
Glycerol	50 %	25 ml

### **1% Proteinase K Lösung**

HEPES	10 mM	50 µl
CaCl <sub>2</sub>	1 mM	10 µl
Glycerol	50%	4940 µl
Proteinase K		50 mg

15 Minuten bei 37°C resuspendieren

## **3.2.3 Lösungen und Standards für Agarose-Gelelektrophorese**

### **TBE-Puffer**

10 x TBE

Tris	890 mM	162 g/L
Borsäure	890 mM	27,5 g/L

	EDTA	20 mM	9,3 g/L
	ddH <sub>2</sub> O		ad 1000 ml
	pH 8,3-8,7		
1 x TBE			
	10 x TBE		100 ml/L
	ddH <sub>2</sub> O		ad 1000 ml

#### **6 x DNA-Auftragspuffer**

	Bromphenolblau	0,5 mg/ml
	Glycerol	30% (w/v)

#### **Ethidiumbromid-Lösung**

	Stammlösung	10 mg/ml
--	-------------	----------

#### **DNA-Längenstandards**

100 bp DNA Leiter (GeneRuler 100bp DNA Ladder, Fermentas (Vilnius, Litauen)  
 Lambda DNA/ *Hind* III, Fermentas (Vilnius, Litauen).

#### **3.2.4 Antibiotika- und Induktionslösungen**

Antibiotika-Stammlösungen wurden sterilfiltriert und bei -20°C gelagert. Die entsprechende Menge der Stammlösung wurde dem Medium nach Autoklavieren und Abkühlen bei ≤ 60°C zugegeben. Die Induktionslösungen wurden immer unmittelbar vor der Anwendung frisch hergestellt und sterilfiltriert.

#### **Cyclohexamide-Stammlösung**

	Cyclohexamide	50 mg/ml
--	---------------	----------

in 100% Methanol lösen  
 mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml verwenden.

#### **Ampicilin-Stammlösung**

	Ampicilin (Na-Salz)	100 mg/ml
--	---------------------	-----------

in ddH<sub>2</sub>O lösen

mit einer Endkonzentration von 120 µg/ml verwenden.

### **Kanamycin-Stammlösung**

Kanamycin 100 mg/ml

in ddH<sub>2</sub>O lösen

mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml verwenden.

### **Streptomycin-Stammlösung**

Streptomycin (Sulfat-Salz) 50 mg/ml

In ddH<sub>2</sub>O lösen

Mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml verwenden.

### **N-Acetylglucosamin-Lösung (7,5 mM)**

N-Acetylglucosamin 1,65 mg/ml

in ddH<sub>2</sub>O lösen.

### **N-Acetylmuraminsäure-Lösung (7,5 mM)**

N-Acetylmuraminsäure 2,19 mg/ml

in ddH<sub>2</sub>O lösen.

### **D-Glucosamin-6-Phosphat-Lösung (7,5 mM)**

D-Glucosamin-6-Phosphat 1,95 mg/ml

in ddH<sub>2</sub>O lösen.

## **3.3 Nährmedien für endophytische Bakterien-Isolate**

### **PBS**

PBS-Stammlösung

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 35,6 g/L

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 27,6 g/L  
1 X PBS  
NaCl 7,6 g/L  
PBS-Stammlösung 50 ml/L  
ddH<sub>2</sub>O ad 1000 ml  
pH 7,2 – 7,4.

**TSA (10%)**

TSA 3 g/L  
ddH<sub>2</sub>O ad 1000 ml

**R2A-Agar (modifiziert)**

R2A 9,1 g/L  
ddH<sub>2</sub>O ad 1000 ml

**Gellan gum**

Gelzan 20 g/L  
Hefeextrakt 0,02 g/L  
ddH<sub>2</sub>O ad 1000 ml

**YEME – 1/10 Saccharose (modifiziert)**

Hefeextrakt 3 g/L  
Bacto Peptone 5 g/L  
Malzextrakt 3 g/L  
Glucose 10 g/L  
Saccharose 34 g/L  
ddH<sub>2</sub>O ad 1000 ml

**TSB (Tryptic-Soja-Bouillon)**

TSB 30 g/L  
ddH<sub>2</sub>O ad 1000 ml

### 3.3.1 Nährmedien für Indikator-Stämme

#### Nutrient Broth (bzw. Agar)

NB	8 g/L
(Agar	15 g/L)
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

#### Luria-Bertani (LB) Medium (bzw. Agar)

Trypton	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	10 g/L
(Agar	15 g/L)
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

#### Czapek-Dox-Agar

Czapek-Dox	35 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
Agar	15 g/L
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

## 3.4 Mikroorganismen

### 3.4.1 Endophytische Isolate

In dieser Arbeit wurde mit 98 endophytischen Isolaten aus 7 verschiedenen Pflanzen gearbeitet. Die Pflanzen wurden an 2 Standorten entnommen. Bei 62 Isolaten handelt es sich um Streptomyceten, diese Isolate sind mit den Nummern 21-189 bezeichnet. Weitere 36 Isolate waren sehr eng mit Streptomyceten

assoziiert und ließen sich schwer von ihnen trennen (im folgenden assoziierte); sie sind mit den entsprechenden Nummern (entspricht der Nummer mit der *Streptomyces*-Isolat bezeichnet ist) und dem Buchstabe „B“ bezeichnet (21B-118B).

### 3.4.2 Indikator-Stämme

Zur Bestimmung der antimikrobiell wirksamen Streptomyceten wurden folgende Mikroorganismen als biologische Indikatoren verwendet:

<b>Organismus</b>	<b>Herkunft/Stammnummer</b>
<i>Bacillus subtilis</i>	Stammsammlung der Abteilung Bioresources (Austrian Institute of Technology), DSM 10
<i>Escherichia coli</i>	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), DSM 30083
<i>Erwinia carotovora subsp. odorifera</i>	DSMZ, DSM 22556
<i>Candida albicans</i>	DSMZ, DSM 11225
<i>Fusarium oxysporum</i>	Stammsammlung von Dr. Trognitz (AIT)
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSMZ, DSM 3463

### 3.5 Primer

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Sigma Aldrich (Steinhausen, D) hergestellt.

#### 16S rRNA-Gen-Primer:

8F	5` AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG 3`
1512R	5` GGC TAC CTT GTT ACG ACT T 3`
797R	5` GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT 3`

#### *rpoB*-Gen-Primer:

SRPOF1	5`-TCG-ACC-ACT-TCG-GCA-ACC-GC- 3`
SRPOR1	5`-TCG-ATC-GGG-CAC-ATG-CGG-CC- 3`

### 3.6 Molekularbiologische Kits

UltraClean Microbial DNA Isolation Kit	MoBio (Carlsbad, USA)
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Deutschland GmbH

### 3.7 Technische Geräte

Biometra T3 Thermocycler Whatman Biometra (Göttingen, D)  
BIORAD Software Gel Doc 2000 BIORAD (Hercules, USA)  
Eppendorf Centrifuge 5415 R Eppendorf AG (Hamburg, D)  
FastPrep Bio101 Thermo Savant Qbiogen (Carlsbad, USA)  
Gel Doc 2000 UV BIORAD (Hercules, USA)  
Inkubator WTE BINDER GmbH (Tuttlingen, D)  
Ultra Turrax Typ TP 18110 IKA (Staufen, D)  
Laborautoklav tuttner 5075 EL (Traun, A)  
NanoDrop peQlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, D)  
pH Meter Metrohm 744 Metrohm (D)  
Pipetten Eppendorf (Hamburg, D)  
Schüttler EB Edmund Bühler (Hechingen, D)  
Spectrophotometer BioTek Synergy Mx (Winooski, USA)  
Sterilbank Holten Lamin Air (Allerod, N)  
Techne Dri-Block heater (Stone Staffordshire, UK)  
Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA)

### 3.8 Öffentlich zugängliche Software

Name	Adresse
BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
ClustalW	<a href="http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html">http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html</a>
GenBank	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/</a>

## 4 Methoden

### 4.1 Probennahme

Die Proben wurden an zwei Standorten, Merkenstein und Stampfltal, während zwei unabhängigen Expeditionen, die im May 2008 stattgefunden haben, entnommen. Als Versuchspflanzen wurden typische Pflanzenarten für diese Standorte ausgewählt, wobei einige auch für ihre medizinische Bedeutung bekannt sind. Die Pflanzen samt Wurzeln wurden sorgfältig ausgegraben (ausgenommen Schwarzkiefer), in verschließbare, sterile Plastikbeutel eingepackt und ins Labor gebracht. Es wurden insgesamt 21 Versuchspflanzen gesammelt:

#### Merkenstein

*Viscum laxum*  
*Viscum laxum (alt)*  
Moos (moospolster)  
*Scorzonera austriaca*  
*Carex humilis*  
*Amelanchier ovalis*  
*Pinus nigra (Nadeln)*  
*Pinus nigra (stem)*  
*Erica herbacea*  
*Thymus praecox subsp. praecox*  
*Teucrium montanum*

#### Stampfltal

*Erica herbacea*  
*Scorzonera austriaca*  
*Euphorbia saxatilis*  
Moos  
Moospolster  
*Sesleria varia*  
*Thymus praecox*  
*Amelanchier ovalis*  
Moos (langfasrig)  
*Teucrium montanum*



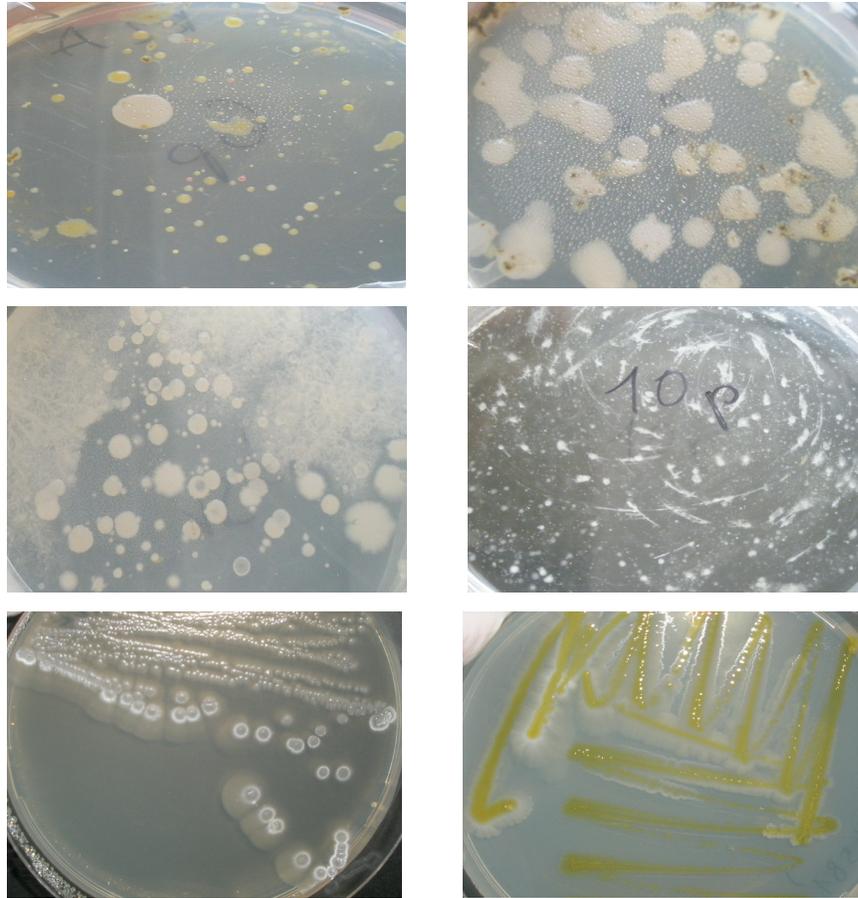
**Abb. 8:** Pflanzen aus denen die meisten Endophyten isoliert wurden. Von oben nach unten und von links nach rechts: MpMe – Moospolster, Merkenstein; TeuMe – *Teucrium montanum*, Merkenstein; ScMe - *Scorzonera austriaca*, Merkenstein; ErMe – *Erica herbacea*, Merkenstein; MoSt – Moos (langfasrig), Stampfltal; TeuSt – *Teucrium montanum*, Stampfltal. (Photos: E. Hackl, AIT, Bioresources).

## 4.2 Isolierung der endophytischen Actinobakterien

Um die endophytischen Bakterien aus den Pflanzen zu isolieren, wurde zunächst eine Oberflächensterilisation der Pflanzen durchgeführt. Die Pflanzen wurden für 5 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen, Wurzeln zusätzlich vorsichtig gebürstet. Anschließend wurden die Pflanzen in 2 L 0,5 % NaOCl für 10 min geschwenkt, dann 3 Mal mit sterilem Wasser gewaschen, danach für 5 min in 70 % Ethanol gelegt und erneut 3 Mal mit sterilem Wasser gewaschen. Um Sterilität zu prüfen, wurden die Pflanzen auf 10 % TSA-Platten gepresst und

2 Tage bei 28°C inkubiert. Proben die kein bakterielles Wachstum zeigten, wurden weiter zur Isolierung von Endophyten verwendet. Hierzu wurde nährstoffarmes Medium ausgewählt, um Actinobakterien einen Vorteil zu sichern und somit andere endophytische Bakterien zu verdrängen.

Nach der Oberflächensterilisation wurde das Pflanzengewebe in kleine Stücke geschnitten und in 50 ml Falcon-Röhrchen gefüllt mit 15 ml 4°C - temperiertes-PBS-Medium transferiert und anschließend mit Hilfe des Ultraturrax für 2-3 Minuten auf Eis mazeriert. Jeweils 200 µl des Mazerats wurde mit der Drigalski-Spatel auf Gellan Gum ausplattiert und bei 30°C so lange inkubiert bis das bakterielle Wachstum erkennbar wurde (3-5 Tage). Das Medium wurde mit Cyclohexamid versetzt, um das Wachstum von Pilzen zu unterdrücken. Die Platten wurden unter Vergrößerung untersucht; aufgrund Filamentbildung wurden bakterielle Kolonien ausgesucht, für die man annahm, dass es sich um Actinobakterien handelt und mit Hilfe einer 0,80 x 50 mm Injektionskanüle (STERICAN, Braun, Melsung, D) auf neue Gellan Gum Platten überimpft. Die Platten wurden für weitere 5-7 Tage bei 30°C inkubiert bis die Sporulation sichtbar war. Trotz nährstoffarmen Verhältnissen wuchsen auf den Platten auch verschiedene andere Bakterien; manche von denen waren sehr eng mit den Actinobakterien assoziiert und ließen sich sehr schwer in Reinkultur trennen. Diese Isolate wurden als assoziierte Stämme bezeichnet und ebenfalls in weitere Versuche einbezogen.



**Abb. 9:** Agarplatten nach Inkubation mit Pflanzen-Mazeraten . Verschiedene Pflanzen-Mazerate zeigten unterschiedliches Endophyten-Wachstum. Die letzten zwei Platten zeigen *Actinobacteria*-Isolate die schon in die Reinkultur genommen wurden, erschienen aber immer wieder mit noch einer Bakterienkultur zusammen (assoziiertes Stamm). (Photos: B. Nikolic und M. Plesko, AIT, Bioresources).

#### 4.2.1 Reinkultur-Herstellung

Viele der isolierten Actinobakterien wiesen auch nach wiederholten Trennungsschritten immer noch eine Mischkultur auf, so wurde über Sporen-Inokulation eine Reinkultur hergestellt. Hierzu wurden eine Woche alte Actinobakteria-Sporen, die auf Gellan Gum wuchsen, mit einer Pipettenspitze in 100 µl 0,001% Triton X-100 aufgenommen, gut durchmischt und 20 µl davon wurde mit der Drigalski-Spatel auf Gellan gum Nährmedium ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von 4-5 Tagen bei 30°C wurden einzelne Kolonien mit sterilen Pipettenspitzen auf Gellan gum übertragen und in Reinkultur genommen. Die so gewonnene Kultur wurde in 20 % Glycerol bei - 80°C archiviert.

## 4.3 Kultivierungsbedingungen

### 4.3.1 Streptomyceten

#### Zur Isolierung der genomischen DNA

Die Streptomyceten wurden aus dem Glycerolstock mit sterilen Zahnstochern auf Gellan gum Nährmedium ausgestrichen. Inkubation erfolgte bei 30°C für 5-7 Tage. Mit sterilem Skalpell wurde etwas Bakterienkultur zur DNA Isolierung entnommen.

#### Zur Stimulation der Antibiotikaproduktion

Hierzu wurden zwei verschiedene Wachstumsbedingungen ausgewählt: nährstoffarmes Festmedium (Gellan gum) gegenüber einem nährstoffreichen Flüssigmedium (YEME), wobei im zweiten Fall durch längere Inkubationszeiten versucht wurde, die Nährstoffe zu verbrauchen und so die optimale Bedingungen für Antibiotikaproduktion zu schaffen. Zusätzlich wurde die Antibiotikaproduktion mit drei verschiedenen Induktionsstoffen stimuliert; als Kontrolle wurde immer eine nicht-induzierte Serie gezüchtet.

Für das Wachstum auf Gellan gum Nährmedium wurden Petrischalen mit 6 cm Durchmesser verwendet. Mit Hilfe sterilen Zahnstochern wurden einzelne Streptomyceten-Kolonien in die Mitte des Nährmediums inokuliert, mit Parafilm verschlossen und zunächst 5 Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Induktion mit N-Acetylglucosamin bzw. N-Acetylmuraminsäure bzw. D-Glucosamin-6-Phosphat in einer Konzentration von 1,65 mg/ml. Induktionsstoffe wurden sowohl tropfenweise um die Kolonie herum als auch unter der Kolonie appliziert. Die Streptomyceten wurden für weitere 48h bei 30°C inkubiert. Anschließend erfolgte Screening auf Antibiotikaproduktion. Die Wachstumsbedingungen für Screening gegen *Fusarium oxysporum* unterscheiden sich von den restlichen insofern, dass eine Kombination aus zwei Nährmedien auf einer Petrischale (Ø 6 cm) verwendet wurde. Zuerst wurde Nähragar in die Petrischale gegossen, nach dem Verfestigen wurde ein Loch in der Mitte des Nähragars ausgestanzt und mit heißem Gellan gum Medium

aufgefüllt. Die Streptomyceten wurden dann auf Gellan gum inokuliert und weiter wie oben beschrieben inkubiert und induziert.

Im zweiten Fall wurde 4 ml YEME-Medium mit Streptomycetensporen beimpft. Die Inkubation erfolgte in Glaseprouvetten bei 30°C in einem Schüttler mit 200 U/min. Hierfür wurden zwei Inkubationszeiten festgelegt: 7 Tage, wobei zur Stimulation der Antibiotikaproduktion dem Medium nach 5 Tagen N-Acetylglucosamin in Konzentration von 1,65 mg/ml zugegeben wurde; und 21 Tage, ohne Stimulation mit N-Acetylglucosamin. Nach erfolgtem Wachstum wurde die Kultur zentrifugiert (7.000 x g, 10 min, 4°C). Der Kulturüberstand wurde dann sterilfiltriert (Porengröße 0,45 µm) und bis zum Einsetzen bei -20°C aufbewahrt.

#### **4.3.2 Mit *Streptomyces*-assoziierte Stämme**

Diese Stämme wurden sowohl für DNA Isolierung als auch für Stimulation der Antibiotikaproduktion in einem nährstoffreichen Flüssigmedium kultiviert. Anzucht erfolgte in 5 ml TSB-Medium in Glaseprouvetten bei 30°C in einem Schüttler mit 200 U/min. Nach 5 Tagen Inkubation wurde 1 ml Kultur für DNA Isolierung entnommen, restliche Kultur wurde mit N-Acetylglucosamin in Konzentration von 1,65 mg/ml induziert und für weitere 2 Tage inkubiert. Die Kultur wurde zentrifugiert (7.000 x g, 10 min, RT), Kulturüberstand sterilfiltriert (Porengröße 0,45 µm) und bis zum Einsetzen bei -20°C aufbewahrt.

#### **4.3.3 Indikator-Stämme**

Die meisten der Indikator-Stämme wurden für Antibiotikaproduktions Screening in NB-Medium angezüchtet. 10 ml NB-Medium wurde mit Zellen aus Kolonien einer Agarplatte beimpft und über Nacht in einem Schüttler mit 150 U/min bei entsprechender Temperatur inkubiert (*Erwinia carotovora odorifera* bei 28°C, *Candida albicans* bei 30°C, *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* bei 37°C, *Bacillus subtilis* bei 41°C.). Je nach Testverfahren wurde so gewonnene Kultur entsprechend weiter verwendet. Für Anzucht von *Fusarium oxysporum* wurde Czapek-Dox-Agar verwendet: geringe Menge Hyphen von *Fusarium*

*oxysporum* wurden mit Hilfe einer Pinzette auf Agarplatte gelegt und bei Raumtemperatur so lange inkubiert bis die ganze Agarplatte mit Hyphen bedeckt war. So gewonnene Kultur wurde im Testverfahren eingesetzt.

#### **4.4 Isolierung genomischer DNA aus endophytischen Bakterien-Isolaten**

Die DNA-Extraktion aus Streptomyceten erfolgte mittels UltraClean Microbial DNA Isolation Kit, wobei das entsprechende Protokoll etwas modifiziert wurde. Die Zellen wurden mechanisch (FastPrep) und chemisch lysiert. Die auf Gellan gum gewachsene Kultur wurde mit 100 µl Saline-EDTA und 10 µl Lysozyme Stammlösung versetzt. Nach einer Inkubation von 45 min bei 37°C (dazwischen öfters vortexen) wurde 2,5 µl 1% Proteinase K und 3 µl 20% SDS zugefügt, gemischt durch klopfen und bei 55°C für 30 min erneut inkubiert. Der Mischung wurde erneut 3 µl 20% SDS zugefügt und für weitere 30 min bei 55°C inkubiert. Das Ganze wurde dann über Nacht bei -20°C eingefroren. Am nächsten Tag wurde auf Eis aufgetaut, mit 100 µl Phenol-Chloroform-Isoamyl Alkohol versetzt und in Microbead Rörchen (vom Kit) transferiert. Weiter erfolgte Extraktion nach Anleitungen des Herstellers.

Für die Gewinnung der genomischen DNA aus assoziierten Stämmen wurde 1,5 ml Kultur 10 min bei RT und 10.000 rpm zentrifugiert. Die daraus resultierenden Pellets wurden mit 10 µl Lysozyme Stammlösung und 300 µl Bead Solution (vom Kit) versetzt und über Nacht bei -20°C eingefroren. Am nächsten Tag wurde der Mischung 100 µl Phenol-Chloroform-Isoamyl Alkohol zugefügt, in Microbead Rörchen (vom Kit) transferiert. Weitere Extraktionsschritte erfolgten laut UltraClean Microbial DNA Isolation Kit Protokoll.

Die DNA-Konzentration wurde mit Nanodrop-Spektrometer gemessen.

#### **4.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

PCR ist eine molekularbiologische Methode, mit der es möglich ist einen bestimmten DNA-Abschnitt durch wiederholte Synthesezyklen *in vitro* zu amplifizieren. Eine PCR benötigt: DNA-Template, die Ziel-Sequenz enthält, zwei kurze Oligonukleotide (Primer) im Überschuss, die den zu amplifizierenden DNA-

Abschnitt auf beiden Seiten flankieren, hitzestabile DNA-Polymerase, die 3`-Enden der Primer verlängert, Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), um eine komplementäre Kopie der Ziel-DNA synthetisieren zu können und Pufferlösungen, um die Reaktion zu stabilisieren.

Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten:

- Denaturierung: Doppelsträngige Template-DNA wird auf über 90°C erhitzt um Stränge zu trennen.
- Annealing: Durch Erniedrigung der Temperatur kommt es zur spezifischen Hybridisierung der Primer an die einzelsträngige Template-DNA. Durch den Primerüberschuss wird verhindert, dass die getrennte DNA-Stränge wieder miteinander hybridisieren.
- Elongation: Die DNA-Polymerase verlängert 3`-Enden der Primer; so entsteht wieder eine doppelsträngige DNA, die zur Template-DNA komplementär ist. Dieser Schritt wird bei Temperaturoptimum der verwendeten Polymerase durchgeführt.

#### 4.5.1 Amplifizierung von 16S rRNA-Genen

Ein Standard-PCR-Ansatz für die Amplifizierung der 16S-rRNA-Gene ist in der Tabelle 3 gezeigt. Verwendete Primer und PCR-Temperaturprofil sind in der Tabelle 2 und Tabelle 4 abgebildet. Bei jeder PCR-Reaktion wurden eine Positiv- und eine Negativkontrolle durchgeführt.

**Tabelle 2:** Verwendete Primer zur Amplifizierung der 16S rRNA-Gene.

Primer	Sequenz	Ta	Referenz
8F	5`AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG 3`	55°C	(Sorkin et al. 2001)
1512R	5`GGC TAC CTT GTT ACG ACT T 3`	55°C	(Sorkin et al. 2001)

**Tabelle 3:** Reaktionsansatz (für 50 µl PCR-Reaktion).

Komponente	Menge (µl)
Taq Polymerase Puffer (10x)	5
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2
dNTP Mix (je 2,5 mM)	5
Forward Primer (1,5 µM)	5
Reverse Primer (1,5 µM)	5
DMSO (5 % final)	2
BSA (10 mg/ml)	1
Template DNA	1
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,25
ddH <sub>2</sub> O	23,75

**Tabelle 4:** Temperaturverlauf für Durchführung einer 16S rRNA-Gen-PCR.

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (min:s)	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	3:0	1x
Denaturierung	95	0:45	25x
Annealing	55	0:30	
Elongation	72	2:0	
Finale Elongation	72	10:0	1x
Pause	4	∞	1x

#### 4.5.2 Amplifizierung von *rpoB*-Genen

Für eine genauere phylogenetische Untersuchung der *Streptomyces* spp. wurden partiellen Sequenzen von RNA-Polymerase  $\beta$ -Untereinheit Genen (*rpoB*) analysiert (Kim et al., 2004). Reaktionsmischung, PCR-Programm und verwendeten Primer sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst.

**Tabelle 5:** Reaktionsansatz (für 50 µl PCR-Reaktion).

Komponente	Menge (µl)
Taq Polymerase Puffer (10x)	5
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	3
dNTP Mix (je 2,5 mM)	5
Forward Primer (1,5 µM)	5
Reverse Primer (1,5 µM)	5
DMSO (5 % final)	2
BSA (10 mg/ml)	1
Template DNA	1
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,25
ddH <sub>2</sub> O	23,75

**Tabelle 6:** Verwendete Primer zur Amplifizierung der rpoB-Gene.

Primer	Sequenz	Ta	Referenz
SRPOF1	5` TCG ACC ACT TCG GCA ACC GC 3`	60°C	(Kim et al., 1999)
SRPOR1	5` TCG ATC GGG CAC ATG CGG CC 3`	60°C	(Kim et al., 1999)

**Tabelle 7:** Temperaturverlauf für Durchführung einer rpoB-Gen-PCR.

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (min:s)	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	3:0	1x
Denaturierung	95	0:30	30x
Annealing	60	0:30	
Elongation	72	0:45	
Finale Elongation	72	5:0	1x
Pause	4	∞	1x

#### **4.6 DNA Analyse mittels Agarose-Gelelektrophorese (AGE)**

AGE ist eine Technik zur qualitativen Überprüfung von Nukleinsäuren. DNA-Moleküle besitzen, aufgrund ihres Phosphatrückgrades, eine negative Nettoladung, so wandern sie im elektrischen Feld in Richtung Anode. Die elektrophoretische Trennung erfolgt in wesentlichen nach Unterschieden in der Molekülgröße und Molekülform. Um aufgetrennte DNA-Moleküle sichtbar zu machen werden Hilfsstoffe wie Ethidiumbromid (EtBr) verwendet. EtBr interkaliert zwischen den Basen des DNA-Doppelhelices und verändert dabei seine Absorptionseigenschaften. Bei Anregung mit ultraviolettem Licht leuchten die Stellen im Agarosegel an denen sich DNA-Moleküle befinden, hell auf. Das Agarosegel wird durch Aufkochen von Agarose in einem Puffer (z.B. TBE) hergestellt, wobei die Konzentration der Agarose im Puffer von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente abhängt. Die zu analysierende DNA-Probe wird zunächst mit Auftragspuffer versetzt (enthält Bromphenolblau als Frontmarker und Glycerin zur Erhöhung der Proben-Dichte).

Zur Analyse von 16S rRNA-Gen- bzw. rpoB-Gen-PCR-Produkten wurde ein Gel aus 1% Agarose in 1x TBE-Puffer verwendet. EtBr-Konzentration betrug 0,5 µg/ml. Die DNA-Proben wurden 5:1 mit 6x Auftragspuffer versetzt und in die Taschen des Gels gefüllt. Zur Abschätzung der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wird im Gel ein DNA-Längenstandard mitgelaufen. Die elektrophoretische Trennung, erfolgte je nach Größe der DNA-Fragmente, zwischen 30 und 60 Minuten bei 120 V. Mit UV-Licht wurde die DNA im Gel sichtbar gemacht und mit dem Gel-Dokumentationssystem erfasst.

#### **4.7 Aufreinigung von PCR Produkten**

Die PCR-Produkte enthalten, außer DNA, auch noch Primer, dNTPs, Salze, Proteine, die in weiteren Anwendungen von DNA oft stören können. So wurde die DNA von anderen Komponenten der PCR mittels High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) getrennt. Die Aufreinigung erfolgte nach Anweisungen des Herstellers.

#### 4.8 DNA Sequenzierung

Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde von der Firma AGOWA (<http://www.agowa.de/>) durchgeführt. Hierfür wurde jeweils 20 µl des aufgereinigten PCR-Produkts und 10 µl der entsprechenden Primer-Stammlösung (für 16S rRNA-Gen-Analyse 797R Primer; für *rpoB*-Gen-Analyse SRPOF1 und SRPOR1) nach AGOWA geschickt. Die verwendeten Primer sind in der Tabelle 8 angeführt.

**Tabelle 8:** Primer für Sequenzierreaktionen.

Primer	Sequenz	Ta	Referenz
797R	5' GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT 3'	60°C	(Nadkarni et al., 2002)
SRPOF1	5' TCG ACC ACT TCG GCA ACC GC 3'	60°C	(Kim et al., 1999)
SRPOR1	5' TCG ATC GGG CAC ATG CGG CC 3'	60°C	(Kim et al., 1999)

Die Sequenzdaten wurden von der AGOWA-Homepage heruntergeladen und weiter bearbeitet und analysiert.

#### 4.9 Sequenzanalyse

Die erhaltenen Sequenzinformationen sind in ab1.-Dateiformat angegeben und wurden im BioEdit Sequenzanalyse-Programm (Version 5.0.9; T. Hall, 1999; Fa. Ibis Therapeutics, Carlsbad, USA) ausgeführt und im Chromatogramm überprüft und gegebenenfalls editiert. Bei der Analyse des *rpoB*-Gens wurden, die mit dem SRPOF1- erhaltenen Sequenzen, mit den SRPOR1-erhaltenen Sequenzen, verglichen (SRPOR1-Sequenz èReverse Complement èAlignment) und gegebenenfalls manuell korrigiert. Anschließend wurde eine Liste der Konsensussequenzen in FASTA-Format erstellt.

#### **4.9.1 Schnellanalyse von Sequenzen**

Die erste grobe Einschätzung der Identität und Phylogenie von sequenzierten DNA erfolgte im BLAST-Datensuchprogramm (basic local alignment search tool; Altschul et al. 1990; Madden et al. 1996; Ma et al. 2002). Die Sequenzen in FASTA-Format wurden in das BLAST geladen. Das Programm durchsucht verschiedene Datenbanken nach verwandten Sequenzen und listet diese entsprechend ihrer Homologie auf.

#### **4.9.2 Berechnung eines phylogenetischen Baumes mittels ARB**

Die vergleichende Analyse der Sequenzdaten und Erstellung eines phylogenetischen Baumdiagrammes erfolgten über ARB Software Paket (lat. „arbor“ = „Baum“). Bei dem von Wolfgang Ludwig und Kollegen entworfenen Paket handelt es sich um eine Sammlung von verschiedenen Programmen und Anwendungen, welche die Erstellung und Verwaltung der Sequenz-Datenbanken sowie Verwandtschaftsanalysen und Berechnung phylogenetischer Stammbäume ermöglichen (Ludwig et al., 2004).

Die Grundlage für Streptomyces-*rpoB*-basierenden Baum bildeten 352 bp lange DNA-Fragmente. *rpoB*-Gen-Sequenzen wurden in das ARB-Programm importiert. Vor der Berechnung des Stammbaumes wurde die ARB-Datenbank aktualisiert. Es wurde nach allen bisher veröffentlichten Streptomyces-*rpoB*-Sequenzen gesucht, wobei die Länge der Sequenz berücksichtigt wurde. Die Sequenzeinträge wurden von der NCBI Homepage (National Center for Biotechnology Information) heruntergeladen und in das ARB-Programm importiert. Anschließend wurden die Sequenzen so zueinander ausgerichtet, dass homologe Basen untereinander liegen (Alignment). Das Alignment („Fast Aligner“) wird vom Programm automatisch vorgenommen, jedoch eine zusätzliche manuelle Korrektur ist meist notwendig. Zur Erstellung eines Baumdiagrammes stehen in ARB verschiedene Kalkulationsmethoden zur Auswahl (Neighbor-Joining, Fitch, Maximum-Parsimony, Maximum-Likelihood); zur Berechnung des *rpoB*-basierenden Baumes wurde Distanzmatrixmethode (Neighbor-Joining, NJ) verwendet (Saitou and Nei, 1987). Im Vergleich zu den

anderen Verfahren erfordert dieser die geringste Zeit- und Rechenaufwand, es muss aber berücksichtigt werden, dass in die Baumtopologie nicht die Sequenzen selbst sondern paarweise abgeleitete Distanzwerte einbezogen werden. Bei dieser Methode wird aus den verwendeten Sequenzdaten zunächst eine Distanzmatrize erstellt. Die Sequenzen mit der geringsten Distanz werden zu einer Gruppe zusammengefasst und im nächsten Schritt als eine Sequenz betrachtet. Nachdem eine neue Sequenz hinzugefügt wird, erfolgt neue Berechnung der Distanzmatrix. Dieser Vorgang wird fortgesetzt bis alle Sequenzen erfasst sind. Die ausgerechneten Distanzwerte werden in phylogenetische Abstände umgerechnet, dabei korrelieren die Astlängen des berechneten Baumes mit phylogenetischen Abständen. Bei der Erstellung des *rpoB*-basierenden Baumes wurde ein Konservierungsfiler (schließen hochvariable Sequenzpositionen aus, und minimieren so ihren Einfluss auf die Sequenzanalysen) eingesetzt.

#### **4.10 Screenig auf antagonistische Wirkung von endophytischen Isolaten**

##### **4.10.1 Agardiffusionstest**

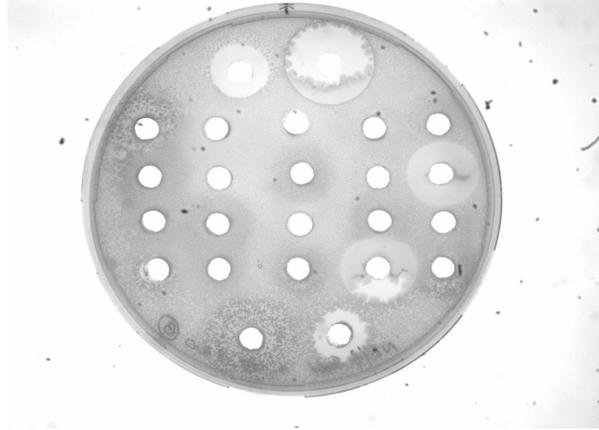
Bei dem Agardiffusionstest (auch als Plattendiffusionstest oder Hemmhofstest bezeichnet) handelt es sich um ein mikrobiologisches Testverfahren, bei dem sich zu untersuchende biologische Substanzen durch Diffusion in einem Agarmedium ausbreiten. Dieser Test findet breite Anwendung bei den Untersuchungen sowohl von wachstumsfördernden (Vitamine, Aminosäuren) als auch von wachstumshemmenden Stoffen (Antibiotika, Toxine). Hierzu werden auf feste Nährmedien, die Mikroorganismen als biologische Indikatoren enthalten, die Testsubstanzen aufgebracht, bei Temperaturoptimum des Testorganismus bebrütet und anschließend auf Trübung (Wachstum) bzw. klare Zonen (Hemmungshof) untersucht und ausgewertet. Die zu untersuchende Substanzen können auf verschiedene Weise auf vorbereitete Agarplatten appliziert werden: in die Löcher gefüllt, getrocknet auf einem Filterpapier auf

Agarplatte gelegt oder in kleine Metallzylinder pipettiert und auf die Platte aufgesetzt.

Bei der Suche nach antimikrobiell wirksamen *Streptomyces*-Isolaten wurden drei verschiedene, für diese Arbeit modifizierte und optimierte Plattendiffusionsverfahren verwendet: Überstand-, Gellan-gum-Overlay- und Dualkultur-Agar-Test. Bei jedem Test wurde eine positive (entsprechendes Antibiotikum) und eine negative Kontrolle (nur Indikator-Stamm auf entsprechendem Nährmedium) mitgeführt.

#### **4.10.2 Überstand-Test**

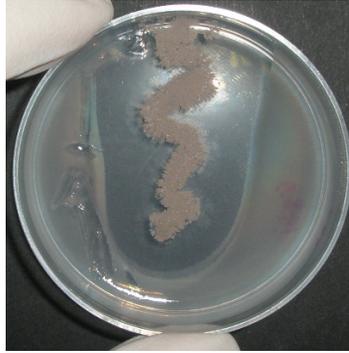
Mittels dieser Methode wurden *Streptomyces*- als auch Kulturüberstände von assoziierten Stämmen auf Antibiotikaproduktion getestet. Die Gewinnung der Kulturüberstände ist in Kapiteln 4.3.1 und 4.3.2 beschrieben. Zur Vorbereitung der Agarplatten wurde 1 L Nähragar (auf 50°C kalibriert) mit 3 ml einer Übernachtskultur des Indikator-Stamms (Anzuchtbedingungen siehe Kapitel 4.3.3) beimpft und in die 14 cm Durchmesser Petrischalen gegossen. Nach dem Festwerden wurden mit der verkehrten Seite einer 1 ml Volumen Pipettenspitze die Löcher im Agar ausgestanzt und die Agar- Plättchen vorsichtig mit einer 0,80 x 50 mm Injektions-Kanüle (STERICAN, Braun, Melsung, D) herausgefischt. Die so entstandene Löcher wurden mit 200 µl Kulturüberstand gefüllt und die Platten über Nacht bei entsprechendem Temperaturoptimum inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Test-Auswertung: der Hemmungshof wurde je nach Durchmesser als schwach (+)/ mittel (++)/ stark (+++) bewertet. Die Ergebnisse wurden in einer Tabelle dokumentiert.



**Abb. 10:** Kulturüberstand-Test. Eine NB-Agar-Platte die *B. subtilis* als Indikator-Stamm enthält.

#### 4.10.3 Gellan-gum-Overlay-Test

Dieses Verfahren wurde ausschließlich für *Streptomyces*-Isolate angewendet. Eine Woche alte, auf Gellan gum Nährmedium gezüchtete *Streptomyces*-Kolonie (siehe auch Kapitel 4.3.1) setzte man direkt in den Test ein. Hierzu wurde eine Übernacht-Indikator-Kultur zuerst bei 5.000 rpm und RT für 5 min abzentrifugiert; Pellet wurde in 5 ml zweifach konzentriertes NB-Medium aufgenommen und für weitere 2 Stunden in einem Schüttler mit 200 U/min bei entsprechender Temperatur inkubiert. 200 µl so gewonnener Indikatorkultur wurde mit der Drigalski-Spatel auf Gellan gum (um die *Streptomyces*-Kolonie) als Deckschicht ausplattiert. Hier ist zu bemerken, dass das Ausplattieren mit großer Vorsicht durchzuführen war. Keine Berührung der *Streptomyces*-Kolonie war wichtig, da sich sonst die Sporen sehr rasch über die ganze Platte ausbreiten. Anschließend wurden die Platten beim Temperaturoptimum der Indikator-Kultur inkubiert. Inkubationszeit betrug, je nach Testorganismus, zwischen 24 und 48 Stunden, bis eine optimale Trübung bzw. einen Hemmungshof zu beobachten war; wobei es bei *Erwinia carotovora odorifera* und *Candida albicans* Schwierigkeiten gab. So wurden bei der Auswertung von diesem Test nur 3 Indikator-Stämme berücksichtigt: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Bacillus subtilis*.



**Abb. 11:** *Streptomyces*-Kultur auf Gellan gum. Overlay ist *B. subtilis*-Kultur.

#### **4.10.4 Dualkultur-Agar-Test**

Dieser Test wurde zur Bestimmung von antifugaler Aktivität der *Streptomyces*-Isolate gegen *Fusarium oxysporum* verwendet. In den Kapiteln 4.3.1 und 4.3.3 ist ausführliche Beschreibung wie die Testplatten vorbereitet wurden. Zur Test-Durchführung wurde die *Fusarium oxysporum* Kultur samt Nährmedium in 5 x 5 mm Stücke mit sterilem Skalpell geschnitten und mit Hilfe einer Pinzette auf Nährmedium um die *Streptomyces*-Kolonie platziert (4 Stückchen pro Platte). Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und so lange bei RT inkubiert bis die *Fusarium oxysporum* Kultur bei der Negativkontrolle die ganze Platte bedeckt hat. Kriterium für die Aktivitätsbewertung war die Länge und die Richtung der Ausbreitung von *Fusarium*-Hyphen.

#### **4.11 Experiment über Cross-Spezies Induktion**

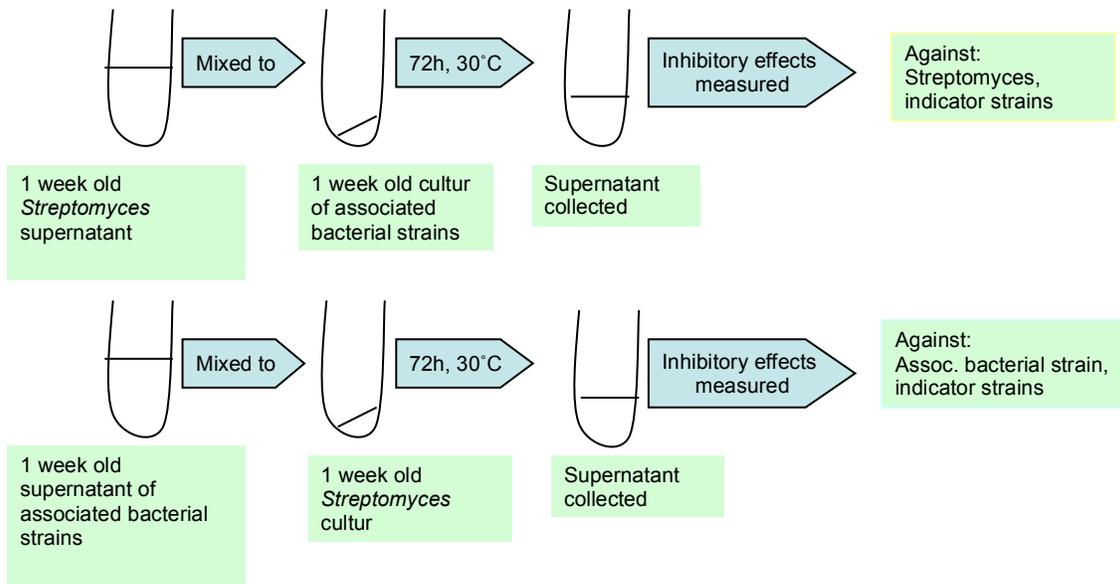
Wie bereits erwähnt, kann die Konkurrenz zwischen Bakterien um gemeinsamen Habitate und knappe Ressourcen die Biosynthese von spezifischen Antibiotika hervorrufen. In dieser Arbeit ergab sich, zur alternativen Stimulation der Antibiotikaproduktion, die Tatsache, dass mit vielen *Streptomyces*-Isolaten verschiedene Bakterien gemeinsam isoliert wurden. Diese Paare wurden in das Experiment einbezogen, wobei als Induktions-Stoffe die Kulturüberstände dienten. Die Streptomyceten wurden in 4 ml YEME-Medium angezogen. Inkubation erfolgte in Glasseprouvetten bei 30°C in einem Schüttler mit 150 U/min für 7 Tage. Die Kultur wurde zentrifugiert (7.000 x g, 10 min, 4°C), Kulturüberstand sterilfiltriert (Porengröße 0,45 µm) und sofort weiter im Versuch

verwendet. Zur Anzucht und Überstandgewinnung von assoziierten Stämmen galten die gleiche Bedingungen mit der Ausnahme, dass anstatt YEME- TSB-Medium verwendet wurde. Die dadurch gewonnene Überstände wurden zur Stimulation der Antibiotikaproduktion eingesetzt, und weiters auf Anwesenheit von Antibiotika überprüft.

Es wurden zwei Induktions-Möglichkeiten durchgeführt:

- Induktion von Streptomyceten durch ihr assoziiertes Paar: Hierzu wurden Streptomyceten im Kulturüberstand vom ihren assoziierten Stamm für 3 Tage bei 30°C in einem Schüttler mit 150 U/min kultiviert. Die Kultur wurde 10 min bei 7.000 x g und 4°C zentrifugiert, Kulturüberstand sterilfiltriert (Porengröße 0,45 µm) und seine antimikrobielle Wirkung gegen assoziierten Stamm, *Staphylococcus aureus* und *Bacillus subtilis* getestet (mittels Plattendiffusionstest, siehe Kapitel 4.10.2).
- Induktion von assoziierten Bakterien-Isolaten durch ihr *Streptomyces*-Paar: Hier, im Gegensatz zu oberen, diente *Streptomyces*-Kulturüberstand als Stimulationsagens. Die Kultivierungsbedingungen waren sonst gleich. So gewonnener Kulturüberstand wurde auf antagonistische Wirkung gegen *Streptomyces*, *Staphylococcus aureus* und *Bacillus subtilis* getestet.

In der Abbildung 12 ist der Ablauf des Versuchs schematisch dargestellt.

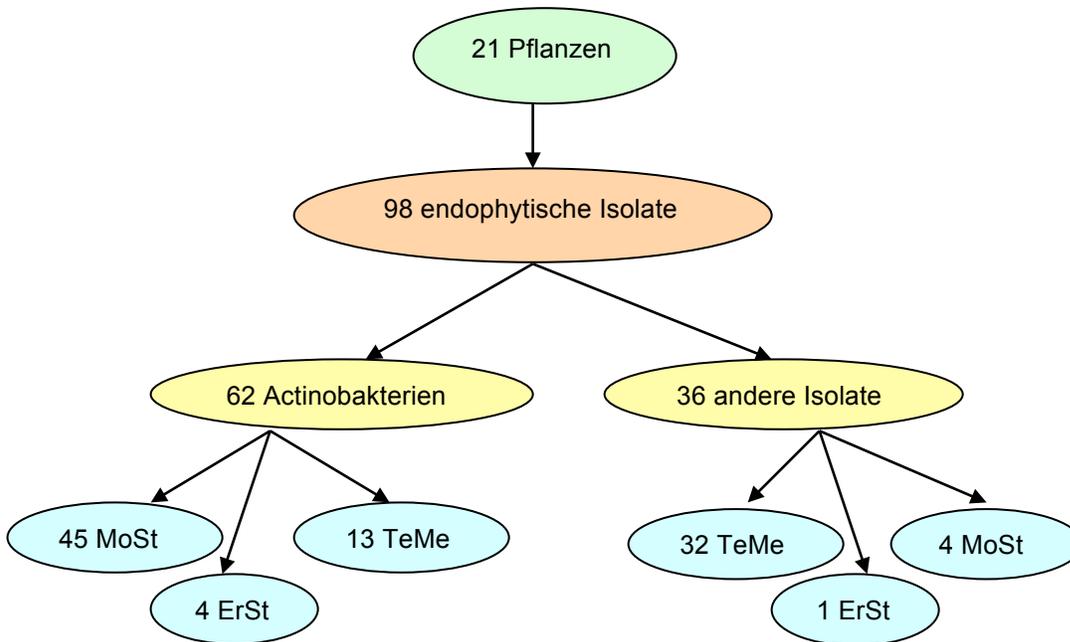


**Abb. 12:** Cross-Spezies Induktion. Versuch Ablauf.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Isolierung und Kultivierung von endophytischen Actinobakterien

Mit bereits beschriebener Isolierungsmethode wurden aus 21 Pflanzen 98 endophytische Bakterien isoliert. Davon sind 62 als Actinobakterien und 36 als andere, vorwiegend *Bacillus sp.*, identifiziert worden. Von 62 Actinobakterien stammen 45 aus Moos (vom Standort Stampftal), 13 aus *Teucrium montanum* (vom Standort Merkenstein) und 4 aus *Erica herbacea* (vom Standort Stampftal). Die meisten restliche 36 Bakterienisolate wurden aus *Teucrium montanum* vom Standort Merkenstein (32 Isolate) isoliert; vom Standort Stampftal stammen 4 Isolate, davon 3 aus Moos und 1 *Erica herbacea*. Eine schematische Darstellung ist in der Abbildung 13 gezeigt.



**Abb. 13:** Die meisten endophytischen Isolate stammen aus Moos und *Teucrium montanum*.

Die meisten Endophyten in dieser Arbeit stammen also aus 2 Pflanzenarten, aus Moos (49) und *Teucrium montanum* (45), wobei sehr zu erwähnen ist, dass 32 Nicht-*Streptomyces* Stämme aus *Teucrium montanum* isoliert wurden.

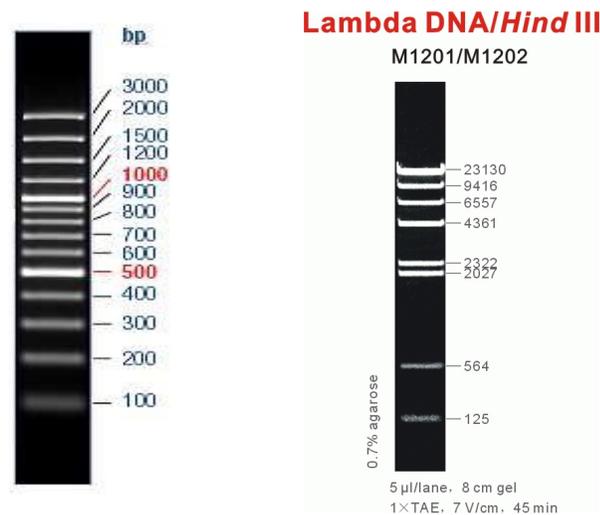
Wie bereits erwähnt (siehe Kapittel 1) ist die mikrobielle Diversität in Böden an diesen 2 Standorten durch einen Anteil von 50% an actinobakteriellen Gemeinschaften geprägt. Da es sich um Sonderstandorte handelt (wo extreme Bedingungen, wie Trockenheit und steinige Böden, herrschen) haben Actinobakterien bezüglich Nährstoffversorgung und Überleben (aufgrund Filamente- und Sporen-Bildung) einen selektiven Vorteil gegenüber anderen mikrobiellen Gemeinschaften erzielt. Die Besiedlung der Pflanzen durch Actinobakterien ist scheinbar auch erfolgreich, so haben sie sich neue ökologische Nischen erobert und ihr Überleben gesichert. Ob ihre Wechselwirkungen mit diesen Pflanzen mutualistisch sind, ob die Heilwirkung mancher dieser Pflanzen auch auf Actinobakterien-Sekundäremetaboliten beruht, bleibt zu klären.

Bei der Kultivierung von endophytischen Isolaten wurden zwei verschiedene Nährstoffverhältnisse ausprobiert: nährstoffreiches Flüssigmedium wie YEME gegenüber nährstoffarmen Festmedium wie Gellan gum. Dabei wurde deutlicher Einfluss der Kultivierungsmethode auf Streptomyceten-Sporulation sowie auf Konkurrenz mit anderen Bakterien beobachtet. Auf Gellan gum sporulierten Streptomyceten bereits nach 5-7 Tagen, während das im YEME-Medium erst nach zwei Wochen passierte. Es ist allerdings interessant zu erwähnen den Einfluss von Zahnstocher im Flüssigmedium auf das Wachstum und Sporulation von Streptomyceten: nämlich in Anwesenheit von Zahnstocher wuchsen die Streptomyceten hauptsächlich entlang des Holzes, zeigten ein deutlich besseres und schnelleres Wachstum und sporulierten dementsprechend auch schneller und das vorwiegend an dem Teil des Holzes welcher an der Oberfläche des Medium liegt und somit bessere Aeration hat. Bei der Kultivierung auf Gellan gum, im Gegenteil zu YEME, bewies sich auch der Streptomyceten-Vorteil gegenüber kompetitiven Bakterien (assoziierte), so wuchsen die assoziierten Stämme erst nach dem die Streptomyceten sporuliert haben (durch das Zersetzen des vegetativen Myzeliums werden zusätzliche Nährstoffe freigesetzt, welche sowohl von Streptomyceten als auch von kompetitiven Bakterien eingeschlossen werden können). Sporulation bei Streptomyceten kann als ein

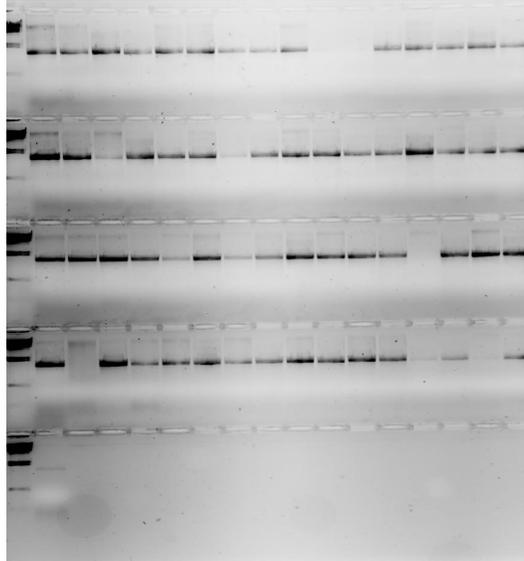
Zeichen für Beginn der Sekundärmetaboliten-Produktion betrachtet werden, so wurde die Kultivierung auf Gellan gum als Methode der Wahl zur Stimulation der Antibiotikaproduktion.

## 5.2 Isolierung der genomischen DNA und Analyse der PCR-Produkte

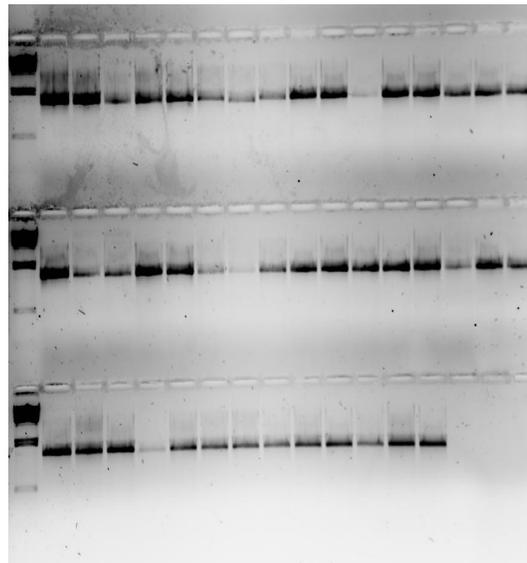
Die Konzentration der aus endophytischen Isolaten isolierten DNA wurde am NanoDrop Spektrometer vermessen und die Werte wurden in einer Tabelle vermerkt. Die Qualität der isolierten DNA wurde nicht durch Agarosegelelektrophorese überprüft, jedoch wurde die gemessene Konzentration bei der Amplifizieren von DNA in den PCR-Reaktionen berücksichtigt, wobei pro PCR-Reaktion 50-100 ng DNA eingesetzt wurde. Nach der Amplifizierung von 16S- und *rpoB*-Genen mit entsprechenden Primern (siehe Kapitell 4.5.1, 4.5.2) wurde der Erfolg von PCR-Reaktionen durch gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte auf einem 1%-igen 1 X TBE Agarosegel überprüft (4.6). Hierzu wurde 10 µl der PCR-Produkte mit 2 µl 6 x Auftragspuffer versetzt und auf das Gel geladen. Als Längenstandard wurde 5 µl GeneRuler 100 bp Plus bzw. 5 µl Lambda DNA / Hind III DNA Ladder verwendet.



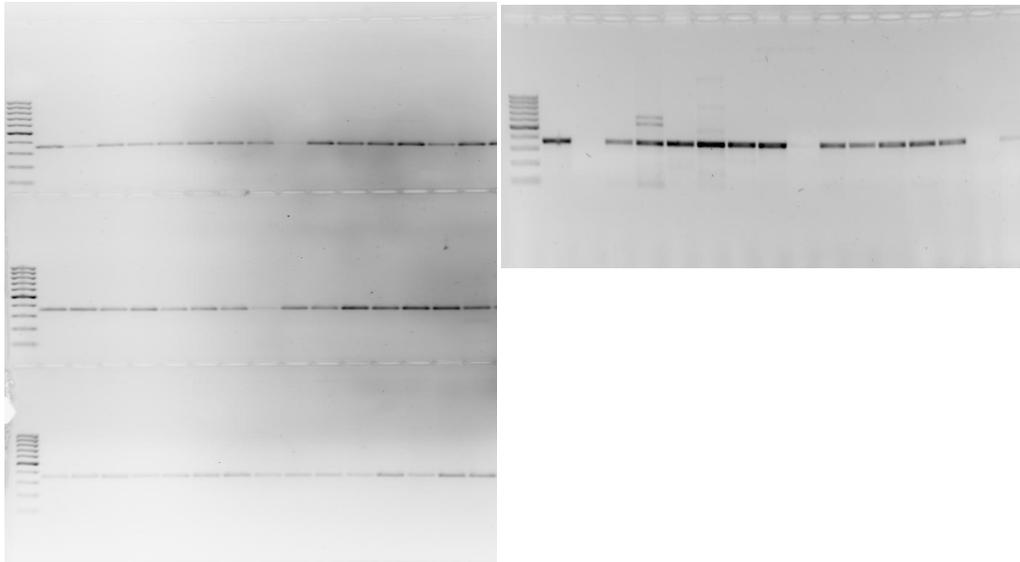
**Abb. 14:** GeneRuler 100 bp Plus und Lambda DNA / *Hind* III DNA Ladder.



**Abb. 15:** AGE der PCR-Produkte von *Actinobacteria*-Endophytenisolate mit 16S-rRNA Primern. Lane 1, Reihe 1-5: Lambda / *Hind* III DNA-Marker; Lane 2-16, Reihe 1-4: endophytische Isolate. Die Bande ist bei ca. 1500 bp sichtbar.



**Abb. 16:** AGE der PCR-Produkte von assoziierten endophytischen Isolatn mit 16S-rRNA Primern. Lane 1, Reihe 1-3: Lambda / *Hind* III DNA-Marker; Lane 1-16, Reihe 1-3: endophytische Isolate. Bande ist bei ca. 1500 bp sichtbar.



**Abb. 17:** AGE der PCR-Produkte von *Streptomyces*-Isolaten mit *rpoB*-Primern. Lane 1, Reihe 1-4: 100 bp DNA-Marker; Lane 1-16, Reihe 1-4: endophytische Isolate. Bande liegt bei ca. 350 bp.

Mit beiden Primerpaaren wurden PCR-Produkte der erwarteten Länge erhalten die anschließend nach Berlin (Firma AGOWA) geschickt wurden, wo 16S-rRNA Produkte mit dem Primer 797R und *rpoB*-Produkte mit SRPOF1 und SRPOR1 sequenziert wurden.

### 5.3 Schnellanalyse von Sequenzen mittels BLAST

Die Sequenzdaten wurden in das Programm „nucleotide blast“ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) geladen und analysiert. Eine Zusammenfassung dieser Analyse ist in den Tabellen 9 und 10 gezeigt. (Die Rohdaten der BLASTn-Analyse sind in den Tabellen 11 und 12 dargestellt).

**Tabelle 9:** Identifizierung der Actinobacteria-Isolate basierend auf Sequenzierung vom ca. 350 bp *rpoB*-Gen-Region.

Identifizierung	Homologie %	Zahl der Isolate
<i>S. avermitilis</i>	95-99	35
<i>S. tauricus</i>	95-97	24
<i>S. ahygroscopicus</i>	96	1
<i>S. cinnamonensis</i>	98	1
<i>S. coelicolor</i>	97	1

Mittels partielle Analyse der 16S-rRNA-Gene wurden alle 62 endophytischen Isolate, für die vermutet wurde dass es sich um Actinobakterien handelt, der Gattung *Streptomyces sp.* zugeordnet; aber es war nicht spezifisch genug um die Art (Spezies) determinieren zu können. In der *Streptomyces* Taxonomy hat sich die 16S rDNA Analyse bereits als wichtige und bedeutende Methode bewiesen (Stackebrandt et al., 1992). Jedoch nur die 16S rDNA Sequenz kann aufgrund interspezifischer Variationen täuschen (Clayton et al., 1995). Analyse der partiellen *rpoB*-Gen (RNA Polymerase  $\beta$ -Untereinheit) Sequenzen hat bestimmte Vorteile in der phylogenetischen Analyse der Gattung *Streptomyces* gegenüber 16S rDNA Analyse: *rpoB* ist "single-copy gene" (16S rDNA dagegen "multi-copy gene"), *rpoB* ist ein Protein-kodierendes Gen und "multiple alignment" der partiellen *rpoB*-Gen Sequenz weist keine "gaps" auf (d.h. dass für die phylogenetische Analyse die ganze Sequenzinformation betrachtet werden kann, was bei 16S rDNA Sequenz nicht der Fall ist) (Kim et al., 2004).

Die BLASTn Analyse der *rpoB*-Gen Sequenzen von *Streptomyces*-Isolaten ergab die höchste Homologie mit 5 *Streptomyces*-Arten, jedoch die morphologische Eigenschaften sowie unterschiedliche antimikrobielle Aktivitäten lassen vermuten dass es sich bei den Isolaten doch um mehrere unterschiedliche *Streptomyces*-Arten handelt. Das wurde mit phylogenetischer Analyse im ARB bestätigt.

**Tabelle 10:** Identifizierung der assoziierten endophytischen Isolate basierend auf Sequenzierung vom ca. 790 bp 16S-rRNA-Gen-Region.

Identifizierung	Homologie %	Zahl der Isolate	Phylogenetische Gruppe
<i>Bacillus sp.</i>	99-100	12	Bacillales
<i>Pseudomonas sp.</i>	99-100	6	Gammaproteobacteria
<i>Burkholderia sp.</i>	99	5	Betaproteobacteria
<i>Paenibacillus sp.</i>	99-100	4	Bacillales
<i>Dyella yeojuensis</i>	98-99	2	Gammaproteobacteria
<i>Rhizobium sp.</i>	98	2	Alphaproteobacteria
<i>Brevundimonas sp.</i>	99	1	Alphaproteobacteria
<i>Lysobacter sp.</i>	97	1	Gammaproteobacteria
<i>Inquillinus ginsengisoli</i>	99	1	Alphaproteobacteria
<i>Pantoea sp.</i>	99	1	Gammaproteobacteria

Wie bereits erwähnt von 36 dieser Isolate stammen 32 aus *Teucrium montanum*, 1 aus *Erica herbacea* und 3 aus Moos. Die meisten assoziierten Stämme wurden als *Bacillus sp.* identifiziert. Interessanterweise wurden alle 12 Bacilluse aus *Teucrium montanum* isoliert. Wenn man bedenkt, dass alle 36 Isolate aus 3 Pflanzenexemplare stammen, so deutet das auf Diversität der mikrobiellen Gemeinschaften, die sich als Endophyte etabliert haben, hin. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden dass nicht alle endophytische Bakterien aus diesen Pflanzen isoliert werden könnten, sei es aufgrund Ausschlusskriterien bei Isolierung oder aufgrund dass viele Mikroorganismen *in vitro* nicht kultivierbar sind.

**Tabelle 11:** BLASTn Analyse der partiellen *rpoB*-Sequenzen von *Actinobacteria*-Isolaten.

Isol.	Erster BLAST-Treffer	Genebank ID	Homologie	Pf/Ort
21	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	286/290 (98%)	TeuMe
22	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	342/352 (97%)	TeuMe
26	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	344/352 (97%)	TeuMe
30	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	344/350 (98%)	TeuMe
31	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	342/353 (97%)	TeuMe
32	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	347/352 (98%)	TeuMe
33	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	342/353 (97%)	TeuMe
36	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	342/356 (96%)	TeuMe
37	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	342/352 (97%)	TeuMe
41	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	345/350 (98%)	TeuMe
50	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	347/352 (98%)	TeuMe
51	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	348/352 (98%)	ErSt
52	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	348/352 (98%)	ErSt
59	<i>S. tauricus</i> strain NRRL B-12497	<a href="#">gb EU621821.1 </a>	345/354 (97%)	MoSt
61	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	344/352 (97%)	MpSt
62	<i>S. ahygroscopicus</i> strain GIM8	<a href="#">gb HM567402.1 </a>	287/296 (96%)	MpSt
63	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	348/352 (98%)	MpSt
66	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	343/352 (97%)	MpSt
68	<i>S. tauricus</i> strain NRRL B-12497	<a href="#">gb EU621821.1 </a>	342/354 (97%)	MpSt
69	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	344/352 (97%)	MpSt
70	<i>S. tauricus</i> strain NRRL B-12497	<a href="#">gb EU621821.1 </a>	342/354 (96%)	MpSt
71	<i>S. tauricus</i> strain NRRL B-12497	<a href="#">gb EU621821.1 </a>	342/354 (96%)	MpSt
72	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	344/352 (97%)	MpSt
74	<i>S. tauricus</i> strain NRRL B-12497	<a href="#">gb EU621821.1 </a>	342/354 (96%)	MpSt
75	<i>S. tauricus</i> strain NRRL B-12497	<a href="#">gb EU621821.1 </a>	340/354 (96%)	MpSt
76	<i>S. cinnamonensis</i> strain DSM 1042	<a href="#">gb FJ652702.1 </a>	322/328 (98%)	MpSt
77	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	343/352 (97%)	MpSt
78	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	349/352 (99%)	MpSt
79	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	349/352 (99%)	MpSt
80	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	349/352 (99%)	MpSt
81	<i>S. tauricus</i> strain NRRL B-12497	<a href="#">gb EU621821.1 </a>	340/356 (96%)	MpSt
82	<i>S. tauricus</i> strain NRRL B-12497	<a href="#">gb EU621821.1 </a>	338/353 (95%)	MpSt
83	<i>S. tauricus</i> strain NRRL B-12497	<a href="#">gb EU621821.1 </a>	340/350 (95%)	MpSt

84	<i>S. tauricus strain NRRL B-12497</i>	<a href="#">gb EU621821.1 </a>	339/354 (95%)	MpSt
89	<i>S. coelicolor A3(2)</i>	<a href="#">emb AL939121.1 </a>	342/352 (97%)	MpSt
90	<i>S. tauricus strain NRRL B-12497</i>	<a href="#">gb EU621821.1 </a>	342/354 (96%)	MpSt
91	<i>S. tauricus strain NRRL B-12497</i>	<a href="#">gb EU621821.1 </a>	339/353 (96%)	MpSt
92	<i>S. avermitilis MA-4680</i>	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	343/352 (97%)	MpSt
93	<i>S. avermitilis MA-4680</i>	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	343/352 (97%)	MpSt
94	<i>S. avermitilis MA-4680</i>	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	340/352 (96%)	MpSt
95	<i>S. tauricus strain NRRL B-12497</i>	<a href="#">gb EU621821.1 </a>	342/354 (96%)	MpSt
99	<i>S. avermitilis MA-4680</i>	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	346/352 (98%)	MoSt
100	<i>S. tauricus strain NRRL B-12497</i>	<a href="#">gb EU621821.1 </a>	339/354 (95%)	MoSt
101	<i>S. avermitilis MA-4680</i>	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	346/352 (98%)	MoSt
102	<i>S. tauricus strain NRRL B-12497</i>	<a href="#">gb EU621821.1 </a>	342/354 (97%)	MoSt
103	<i>S. tauricus strain NRRL B-12497</i>	<a href="#">gb EU621821.1 </a>	339/354 (95%)	MoSt
105	<i>S. tauricus strain NRRL B-12497</i>	<a href="#">gb EU621821.1 </a>	342/354 (96%)	MoSt
107	<i>S. avermitilis MA-4680</i>	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	349/352 (99%)	MoSt
109	<i>S. tauricus strain NRRL B-12497</i>	<a href="#">gb EU621821.1 </a>	342/354 (96%)	MoSt
113	<i>S. tauricus strain NRRL B-12497</i>	<a href="#">gb EU621821.1 </a>	339/354 (95%)	MoSt
114	<i>S. avermitilis MA-4680</i>	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	347/352 (98%)	MoSt
115	<i>S. tauricus strain NRRL B-12497</i>	<a href="#">gb EU621821.1 </a>	342/354 (96%)	MoSt
116	<i>S. avermitilis MA-4680</i>	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	347/352 (98%)	MoSt
118	<i>S. avermitilis MA-4680</i>	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	347/352 (98%)	MoSt
119	<i>S. tauricus strain NRRL B-12497</i>	<a href="#">gb EU621821.1 </a>	342/354 (96%)	MoSt
137	<i>S. avermitilis MA-4680</i>	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	347/352 (98%)	TeuMe
138	<i>S. avermitilis MA-4680</i>	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	346/352 (98%)	TeuMe
142	<i>S. avermitilis MA-4680</i>	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	347/350 (99%)	ErSt
144	<i>S. avermitilis MA-4680</i>	<a href="#">dbj BA000030.3 </a>	334/348 (95%)	ErSt
178	<i>S. tauricus strain NRRL B-12497</i>	<a href="#">gb EU621821.1 </a>	339/354 (95%)	MoSt
185	<i>S. tauricus strain NRRL B-12497</i>	<a href="#">gb EU621821.1 </a>	339/354 (95%)	MoSt
189	<i>S. tauricus strain NRRL B-12497</i>	<a href="#">gb EU621821.1 </a>	338/353 (95%)	ErSt

**Tabelle 12:** BLASTn-Analyse der partiellen 16S-rRNA-Gen Sequenzen von assoziierten Stämmen. \*B – bezeichnet „mit *Streptomyces*-assoziierter Stamm“; die Nummern entsprechen den von *Streptomyces*-Isolat-Paar (z.B. *Streptomyces* 21, Assoziierter-Stamm 21B).

Isol.	Erster BLAST-Treffer	Genebank ID	Homologie	Pf/Ort
21B*	<i>Pantoea vagans</i> C9-1	gb CP002206.1	99%	TeuMe
22B1	<i>Uncultured alpha proteobacterium</i>	gb EF219963.1	99%	TeuMe
23B1	<i>Inquilinus ginsengisoli</i>	dbj AB245352.1	99%	TeuMe
23B2	<i>Demetria terragena</i>	<a href="#">emb FM882229.1 </a>	99%	TeuMe
24B1	<i>Bacillus cereus biovar anthracis str. CI</i>	gb CP001746.1	100%	TeuMe
26B	<i>Burkholderia</i> sp. YEX124	dbj AB558176.1	99%	TeuMe
27B1	<i>Pseudomonas</i> sp. H650	gb EF693764.1	99%	TeuMe
28B1	<i>Bacillus cereus</i> strain ZY-02	gb GU181319.1	100%	TeuMe
30B	<i>Lysobacter</i> sp. BBCT6	gb EF471216.1	97%	TeuMe
30B1	<i>Paenibacillus xylanexedens</i> strain B22a	gb EU558281.1	99%	TeuMe
31B	<i>Bacillus cereus biovar anthracis str. CI</i>	gb CP001746.1	100%	TeuMe
33B	<i>Brevundimonas bullata</i>	emb AJ717390.1	99%	TeuMe
34B	<i>Burkholderia sediminicola</i> strain HU2-65W	gb EU035613.1	99%	TeuMe
34B1	<i>Bacillus circulans</i>	emb FN393823.1	100%	TeuMe
34B2	<i>Pseudomonas</i> sp. BK-L07	<a href="#">gb FJ999623.1 </a>	99%	TeuMe
36B	<i>Dyella yeojuensis</i> strain rif200829	gb FJ527678.1	99%	TeuMe
37B	<i>Paenibacillus humicus</i> strain Pm1	gb GU391497.1	99%	TeuMe
38B1	<i>Burkholderia</i> sp. rif200871	gb FJ527666.1	99%	TeuMe
38B2	<i>Rhizobium</i> sp.	<a href="#">dbj AB069724.1 </a>	98%	TeuMe
39B1	<i>Burkholderia</i> sp. 1Ucecto14	emb FN298906.1	99%	TeuMe
40B1	<i>Bacillus</i> sp. L110	emb AM913958.1	99%	TeuMe
40B2	<i>Dyella yeojuensis</i> strain rif200829	gb FJ527678.1	98%	TeuMe
41B	<i>Bacillus cereus</i> or <i>Bacillus thuringiensis</i>	gb GU991861.1	100%	TeuMe
42B1	<i>Bacillus cereus</i> strain ZY-02	gb GU181319.1	100%	TeuMe
43B1	<i>Bacillus cereus</i> or <i>Bacillus thuringiensis</i>	gb GU181319.1	99%	TeuMe
45B1	<i>Bacillus</i> sp. TP-Snow-C14	gb HQ327123.1	99%	TeuMe
46B1	<i>Bacillus cereus biovar anthracis str. CI</i>	gb CP001746.1	99%	TeuMe
47B1	<i>Bacillus cereus</i> or <i>Bacillus thuringiensis</i>	<a href="#">emb FN433029.1 </a>	99%	TeuMe
48B1	<i>Pseudomonas lutea</i>	dbj AB495128.1	98%	TeuMe
49B1	<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	gb CP002207.1	99%	TeuMe
49B2	<i>Burkholderia</i> sp. 1Ucecto144	emb FN298906.1	99%	TeuMe
50B	<i>Pseudomonas</i> sp. KD2009-30	emb FN645725.1	98%	TeuMe

52B	<i>Pseudomonas graminis</i> strain RMPP6	<a href="#">gb GU396281.1 </a>	100%	ErSt
66B	<i>Paenibacillus</i> sp.	dbj AB046422.1	99%	MpSt
77B	<i>Paenibacillus</i> sp.	emb AM162298.1	99%	MpSt
118B	<i>Pseudomonas poae</i> strain BIHB 730	<a href="#">gb DQ536513.1 </a>	100%	MoSt

#### 5.4 Phylogenetische Analyse mittels ARB

Die partiellen *rpoB*-Gen-Sequenzen wurden in das ARB Programm importiert und mit bisher veröffentlichten *Streptomyces-rpoB*-Gen-Sequenzen verglichen (mit Berücksichtigung der Sequenzlänge). Anschließend wurde ein phylogenetischer Baum berechnet, hierzu wurde Distanzmatrix-Verfahren (Neighbor-Joining) verwendet. Die Astlängen des berechneten Baumes korrelieren mit phylogenetischen Abständen.



Gruppe 1

Gruppe 2

Gruppe 3, 4, 5

Gruppe 6, 7

Gruppe 8

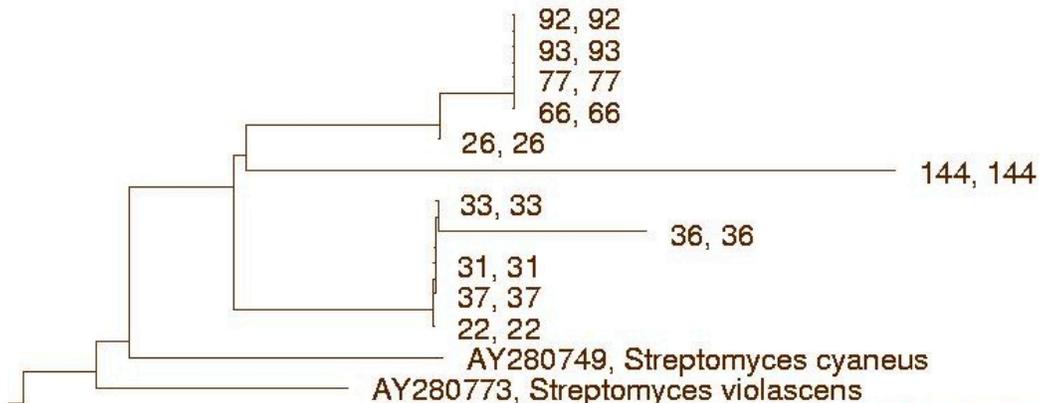
Gruppe 9

5 Outgroup Kitasatospora

**Abb. 18:** Phylogenetischer Baum der *rpoB*-Gen Partiiell-Sequenzen von *Streptomyces*-endophytischen Isolaten. Die Baumberechnung wurde mit Distanzmatrixmethode (Neighbor-Joining, NJ) durchgeführt. *Streptomyces*-Isolate sind mit den Nummern 21-189 versehen.

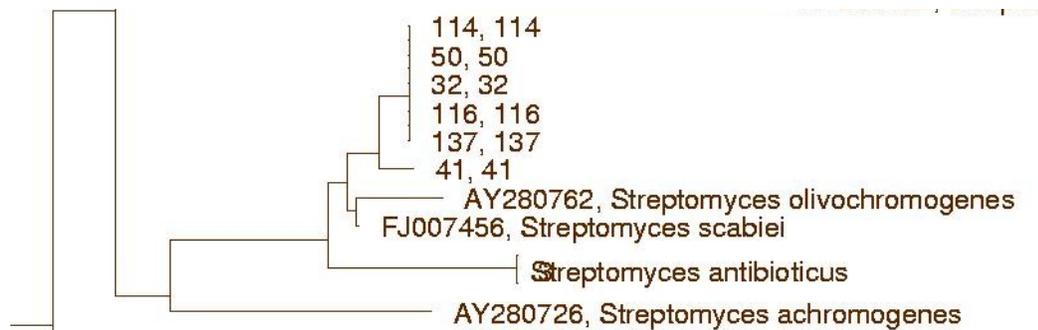
*Streptomyces*-Isolaten könnten aufgrund der phylogenetischen Analyse in neun Gruppen eingeteilt werden:

1. In die Gruppe 1 fallen 11 Isolate, keines der Isolate zeigt eine antimikrobielle Aktivität gegen getesteten Pathogenen. Der nächste Verwandte ist *Streptomyces cyaneus*, bekannt für seine Anthracycline-Antibiotika (Cosmomycin und Ditrisarubicin) welche gegen grampositive Bakterien wirksam sind aber auch eine Antitumor-Wirkung zeigen.



**Abb. 19:** Ausschnitt aus dem *rpoB*-Gen Phylogenetischen Baum. Gruppe 1.

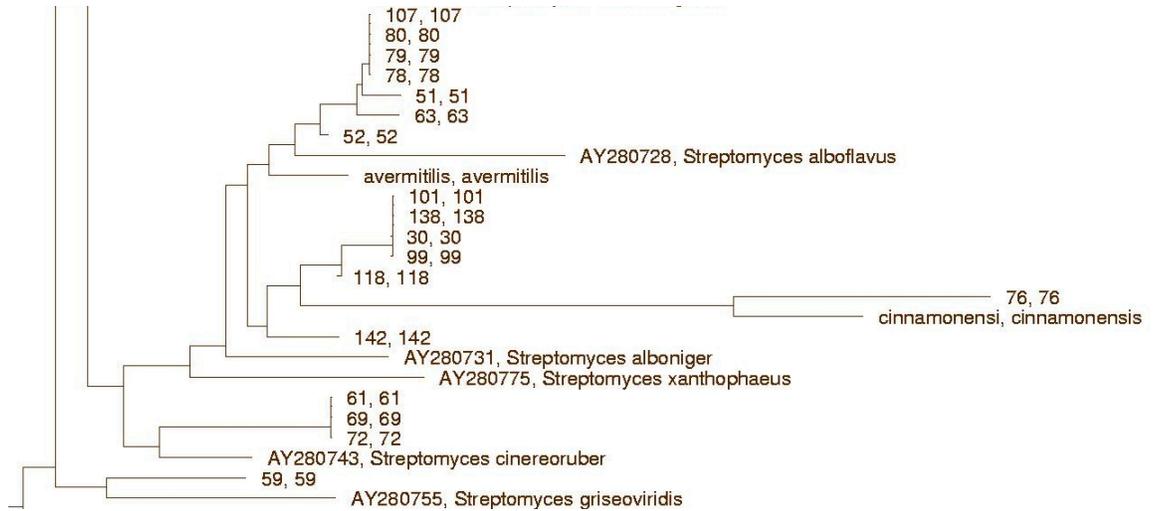
2. Zu der Gruppe 2 gehören 6 Isolate, die eine ähnliche antimikrobielle Aktivität zeigen, nämlich alle sind nur gegen *Bacillus subtilis* aktiv, jedoch zeigen einzelne Isolate abhängig von Kultivierungsbedingungen unterschiedlich starke Wirkung. Die nächsten Verwandte sind *Streptomyces olivochromogenes*, *Streptomyces achromogenes* (produziert eine Vielfalt an Sekundärmetaboliten wie Z.B. Streptozocin das in der Krebstherapie eingesetzt wird, Antibiotika Sarcidin, Rubradirin und Tomaymycin sowie Restriktionsenzyme *SacI*, *SacII*, *SacNI*.)



**Abb. 20:** Ausschnitt aus dem *rpoB*-Gen Phylogenetischen Baum. Gruppe 2.

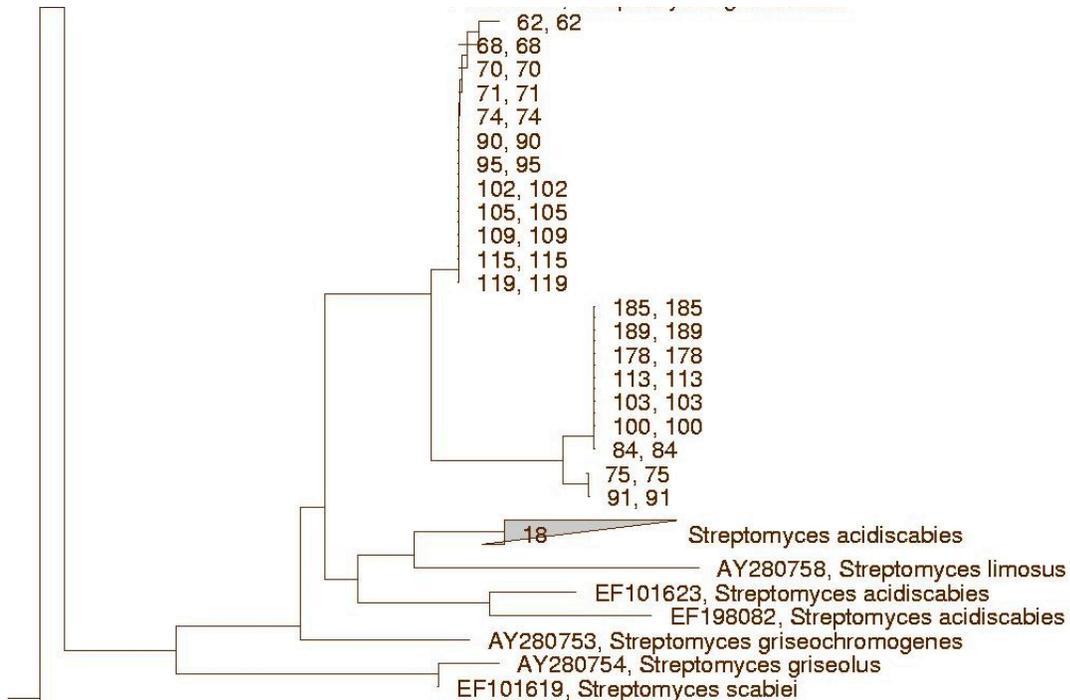
3. In der Gruppe 3 findet man 7 Isolate, die ebenfalls eine sehr ähnliche antagonistische Wirkung gegen *Bacillus subtilis* zeigen. Der nächste Verwandte ist *Streptomyces avermitilis* (produziert Avermectine, Neurotoxine die eine breite Anwendung gegen Nematoden und Milben haben).
4. In die Gruppe 4 fallen 7 Isolate, 6 davon zeigen eine antimikrobielle Wirkung gegen *Bacillus subtilis*, unterschiedlich ausgeprägt (abhängig von Kultivierungsbedingungen); Isolat Nummer 99 zeigt keine Wirkung. Der nächster Verwandte dieser Gruppe ist *Streptomyces alboniger* (produziert Puromycin, ein Nucleosid-Antibiotikum welches gegen einige Amöben, Würmer und Trypanosomen angewendet wird, allerdingst nur in den Experimenten in der Mikrobiologie da es für den Menschen giftig ist), Isolat Nummer 76 zeigt einen weiteren phylogenetischen Abstand zu den restlichen Isolaten dieser Gruppe und sein nächste Verwandte ist *Streptomyces cinnamonensis* (produziert viele Sekundärmetaboliten wie Lanthiopeptin, Lantibiotika, antivirale Wirkstoffe).
5. In der Gruppe 5 sind 4 Isolate, 2 davon zeigen eine Wirkung gegen *Bacillus subtilis* und *Fusarium oxysporum*, 1 Isolat nur gegen *Bacillus subtilis* – ihr nächste Verwandte ist *Streptomyces cinereoruber* (produziert Anthracycline Glykoside Cinerubin A und B welche gegen grampositive Bakterien und Brustkrebs wirksam sind) und Isolat Nummer 59 hat keine Wirkung gezeigt – nächste Verwandte ist *Streptomyces griseoviridis*

(produziert Makrolid-Antibiotika Albocycline, die hauptsächlich gegen *Staphylococcus* spp. wirksam sind).



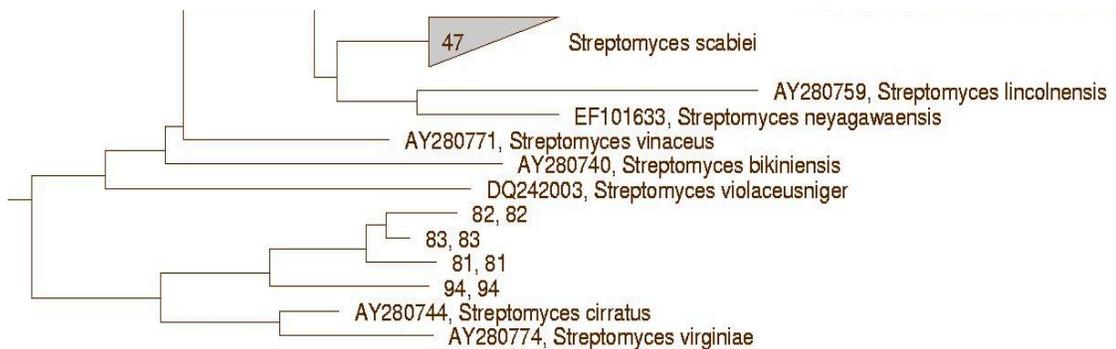
**Abb. 21:** Ausschnitt aus dem *rpoB*-Gen Phylogenetischen Baum. Gruppe 3, Gruppe 4 und Gruppe 5.

6. Die Gruppe 6 ist wahrscheinlich die interessanteste Gruppe da sie phylogenetisch weit von anderen Gruppen und von nächsten Verwandte liegt. Es sind 12 Isolate die bezüglich Antibiotikaproduktion sehr ähnlich sind: bis auf ein Isolat (Nummer 95 – keine Wirkung) zeigen alle sehr starke Aktivität gegen *Bacillus subtilis*.
7. Die Gruppe 7 zählt 9 Isolate und hat ähnliche Position im Stammbaum wie Gruppe 6. Alle Isolate sind unter fast allen Kultivierungsbedingungen stark gegen *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus* wirksam.



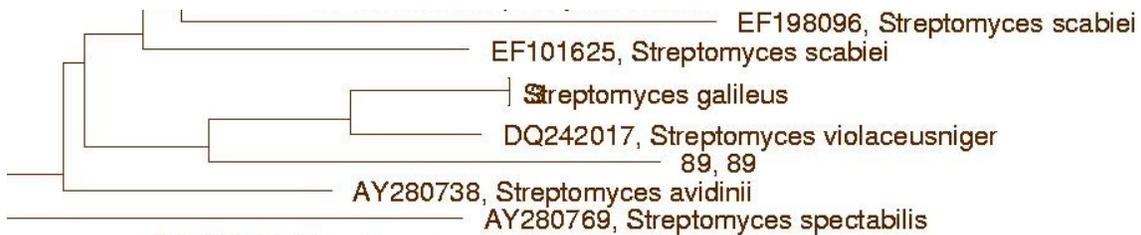
**Abb. 22:** Ausschnitt aus dem *rpoB*-Gen Phylogenetischen Baum. Gruppe 6 und Gruppe 7.

8. In der Gruppe 8 fallen 4 Isolate die bezüglich Antibiotikaproduktion unterschiedlich sind. Ihr nächste Verwandte im Baum ist *Streptomyces cirratus* (produziert zwei Makrolid-Antibiotika, Antibiotikum A 6888X und Cirramycin A, welche gegen sowohl grampositive als auch gramnegative Bakterien sowie gegen Mykoplasmen und Anaerobier wirksam sind).



**Abb. 23:** Ausschnitt aus dem *rpoB*-Gen Phylogenetischen Baum. Gruppe 8.

9. In der Gruppe 9 befindet sich nur Isolat Nummer 89, das schwache antimikrobielle Wirkung gegen *Bacillus subtilis* zeigt. Sein nächster Verwandter im Baum ist *Streptomyces violaceusniger* (produziert das Polyene-Antibiotikum Azalomycin, welches eine antifungale Wirkung hat). (J. Wink, *The Compendium of Actinbacteria*)



**Abb. 24:** Ausschnitt aus dem *rpoB*-Gen Phylogenetischen Baum. Gruppe 9.

Bei den *Streptomyces*-Isolaten welche aufgrund ihrer *rpoB*-Gen Sequenz in die gleiche Gruppe im phylogenetischen Stammbaum fallen und ähnliche antimikrobielle Eigenschaften aufweisen handelt es sich wahrscheinlich um einen Stamm. Dies kann aufgrund der Sequenzanalyse von ITS-Regionen (Internal transcribed spacer) geklärt werden und wurde für weitere Versuche geplant.

### 5.5 Screening auf antagonistische Wirkung von endophytischen Isolaten

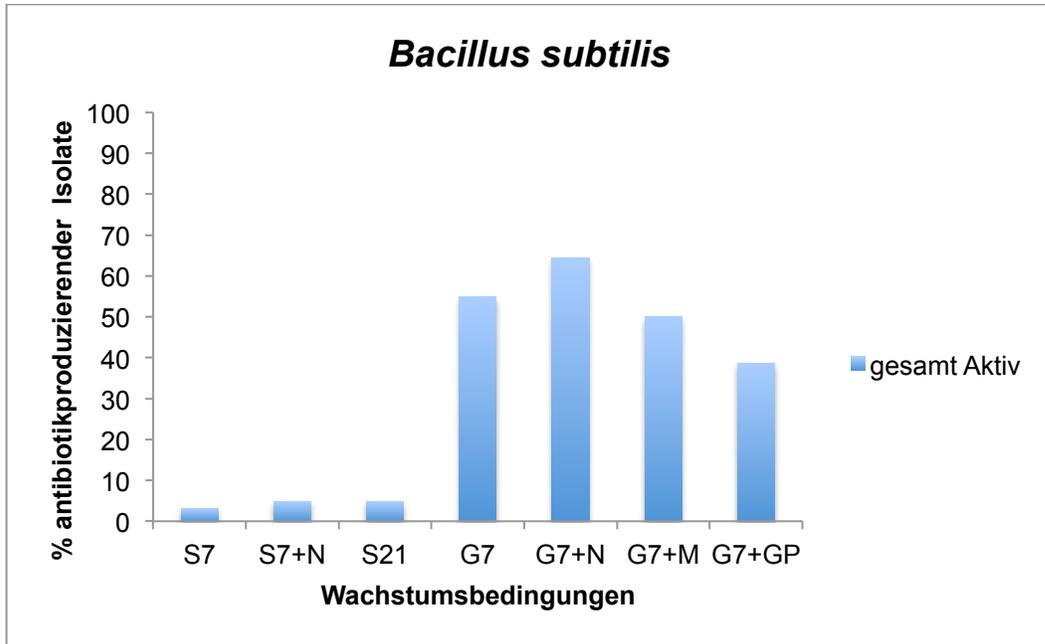
Die 62 endophytische Isolate die als *Streptomyces sp.* identifiziert wurden, wurden mittels 3 Methoden und unter verschiedenen Wachstumsbedingungen auf Antibiotikaproduktion getestet (siehe Kapitel 4.10). In der folgenden Tabelle sind Ergebnisse für drei Indikator-Stämme (*B. subtilis*, *S. aureus* und *F. oxysporum*) zusammengefasst. Die restlichen drei Indikator-Stämme (*E. coli*, *E. carotovora odorifera* und *C. albicans*) sind aus der Tabelle ausgelassen worden da keines der *Streptomyces*-Isolate eine antimikrobielle Wirkung gegen dieser drei Stämme zeigte.

**Tabelle 13:** Antibiotikaproduktion von *Streptomyces*-Isolaten. Durchmesser des Hemmungshofes in cm gemessen: (+) = 0,1-0,5 cm; (++) = 0,5-1 cm; (+++) = über 1 cm. Wachstumsbedingungen und Induktion: (S) = supernatant; (G) = Gellan gum; (N) = N-Acetylglucosamin; (GP) = Glucosamin-6-Phosphat; (M) = N-Acetylmuraminsäure; (7, 21) = Inkubationszeit in Tagen.

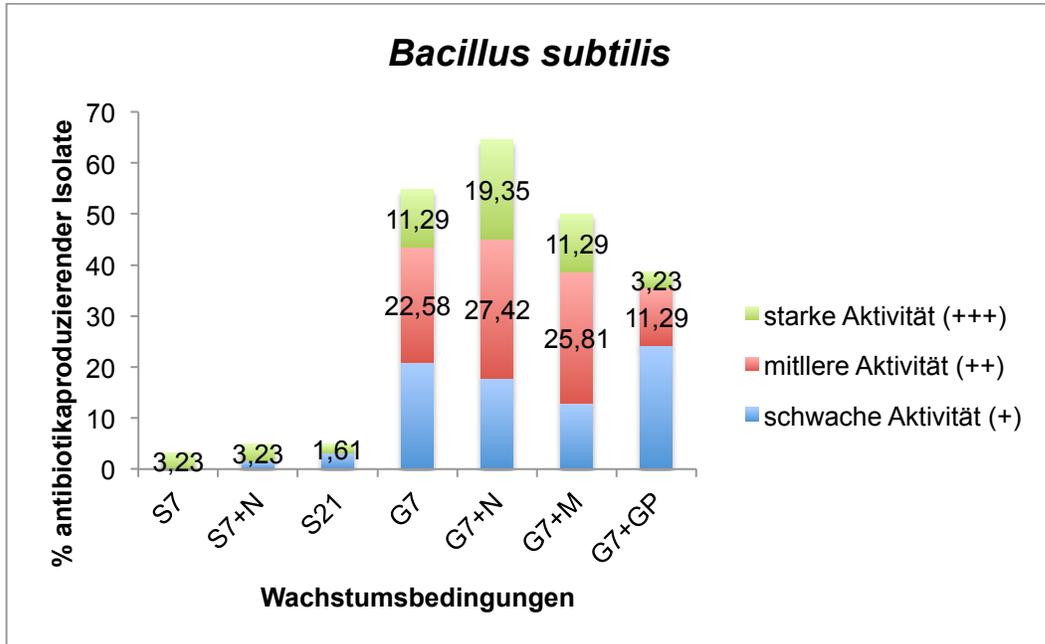
Indikator Stamm		<i>Bacillus subtilis</i>						<i>Staphylococcus aureus</i>					<i>Fus. oxy.</i>		
Wachstums-Bedingungen		S7	S7+N	S21	G7	G7+N	G7+GP	G7+M	S7	S7+N	S21	G7	G7+N	G7+N	
Pflanze/Isolat Nr.															
Teucrium montanum	21	-	-	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	
	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	30	-	-	-	++	++	+-	+++	-	+	-	-	-	+-	-
	31	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	32	-	-	-	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+-
	36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+-
	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	41	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	++	-	+-	-	-	-	-	-	-	-	-
Erica herb.	51	-	-	-	-	++	+	++	-	-	-	-	-	-	
	52	-	-	-	++	++	+	++	-	-	-	-	-	-	-
Moos	59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	61	-	-	-	-	+-	+	+-	-	-	-	-	-	+++	
	62	-	-	-	++	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-
	63	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	68	-	-	-	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	69	-	-	-	-	+	-	+-	-	-	-	-	-	-	-
	70	-	-	-	+++	++	+	++	-	-	-	-	-	-	+
	71	-	+	-	+++	+++	+	++	-	-	-	-	-	-	+
	72	-	-	-	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+++
	74	-	-	-	++	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-
	75	-	-	-	++	+++	-	+-	++	+++	-	+-	+	-	-
	76	-	-	-	-	+-	+	+	-	-	-	-	-	-	+-
	77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	78	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	79	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+-
	80	-	-	-	+	++	+	++	-	-	-	-	-	-	-
	81	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-
	82	-	-	-	-	-	-	++	+-	-	-	-	-	-	-
	83	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+-	+	-
	84	-	-	-	+	++	+++	+++	-	-	-	-	+-	+	-
	89	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
90	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	+-	
91	-	-	-	+++	+++	++	++	-	-	-	-	+-	+	+-	
92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
94	-	-	-	-	-	-	+-	-	-	-	-	-	-	+-	
95	-	-	-	-	+-	-	+-	-	-	-	-	-	-	-	
99	-	-	-	-	-	-	+-	-	-	-	-	-	-	-	
100	-	-	-	++	+++	++	++	-	-	-	-	++	++	+-	

	101	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-
	102	-	-	-	+	+++	-	++	-	-	-	+	-	-
	103	+++	+++	+++	++	+++	++	+	+++	+++	+++	+-	+++	+
	105	-	-	+	+	+++	-	++	-	-	+	-	-	-
	107	-	-	-	+	+	-	++	-	-	-	-	+-	-
	109	-	-	+	++	++	-	++	-	-	-	-	-	-
	113	+++	+++	-	++	++	+++	+	+++	+++	++	+++	+++	-
	114	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-
	115	-	-	-	++	++	-	++	-	-	-	-	-	-
	116	-	-	-	-	++	-	+-	-	-	-	-	-	-
	118	-	-	-	+	+++	++	+++	-	-	-	-	-	-
	119	-	-	-	+++	++	-	+++	-	-	-	-	-	-
<i>Teucri. monta.</i>	137	-	-	-	+	+	-	+-	-	-	-	-	-	-
	138	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-
<i>Erica herb.</i>	142	-	-	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-	++
	144	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
<b>Moos</b>	178	-	-	-	+++	+++	+	++	-	-	-	++	++	+++
	185	-	-	-	+++	+++	+	+++	-	-	-	+	++	+-
	189	-	-	-	+++	+++	+	+++	-	-	-	+-	++	+-

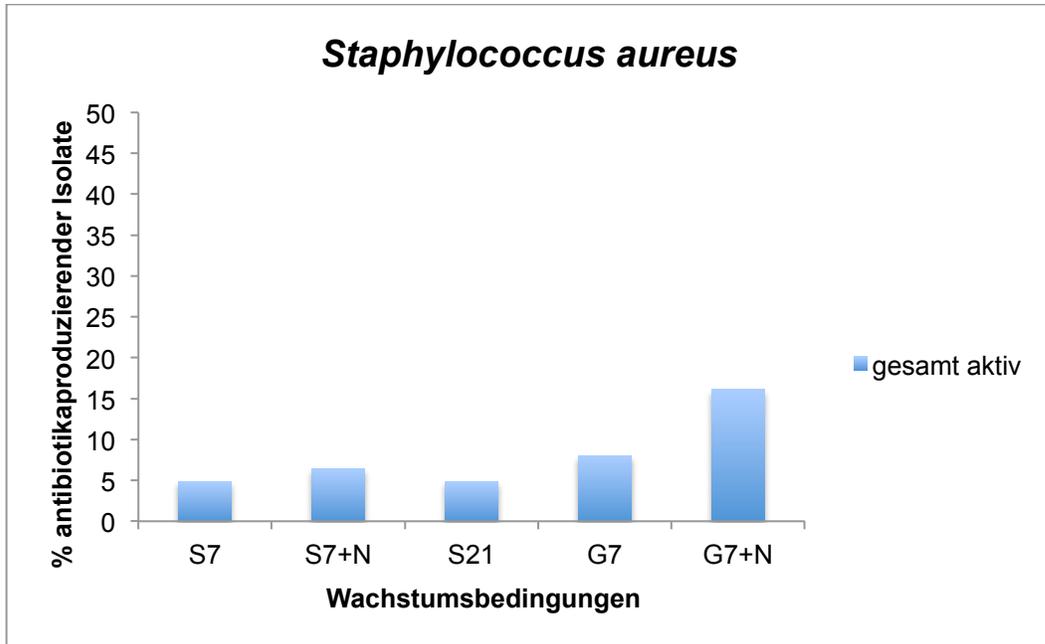
Eine Analyse der Ergebnisse aus der Tabelle 13 verdeutlichte den Einfluss von Kultivierungsbedingungen und Stimulationsstoffen in Streptomyceten auf Aktivierung von Gencluster zur Produktion von Sekundärmetaboliten. Folgende Abbildungen zeigen die Ergebnisse dieser Analyse.



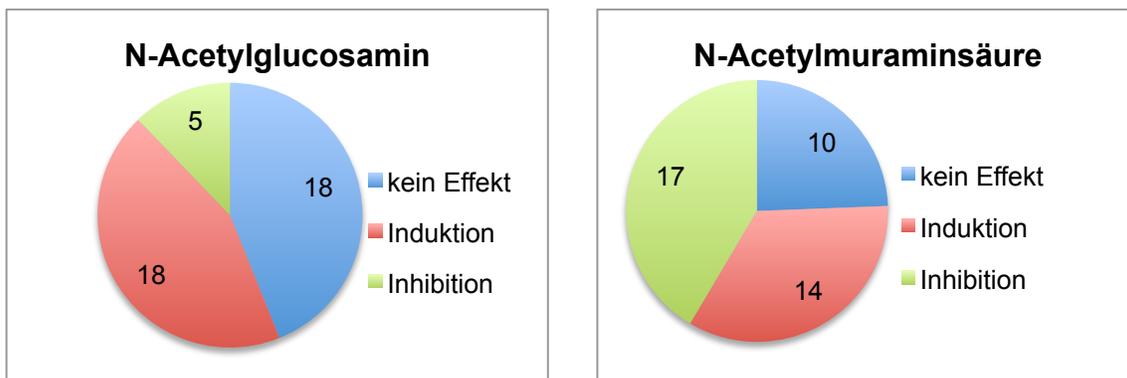
**Abb. 25:** Prozent der antibiotikaproduzierenden *Streptomyces*-Isolate gegen *B. subtilis*. Im Vergleich sind nährstoffreiche vs. nährstoffarme Kultivierungsbedingungen sowie drei Stimulation-Stoffe. Etwa 65% aller Isolate zeigten eine Aktivität wenn sie auf Gellan gum und mit N-Acetylglucosamin kultiviert wurden. (Legende: siehe Tabelle 13).



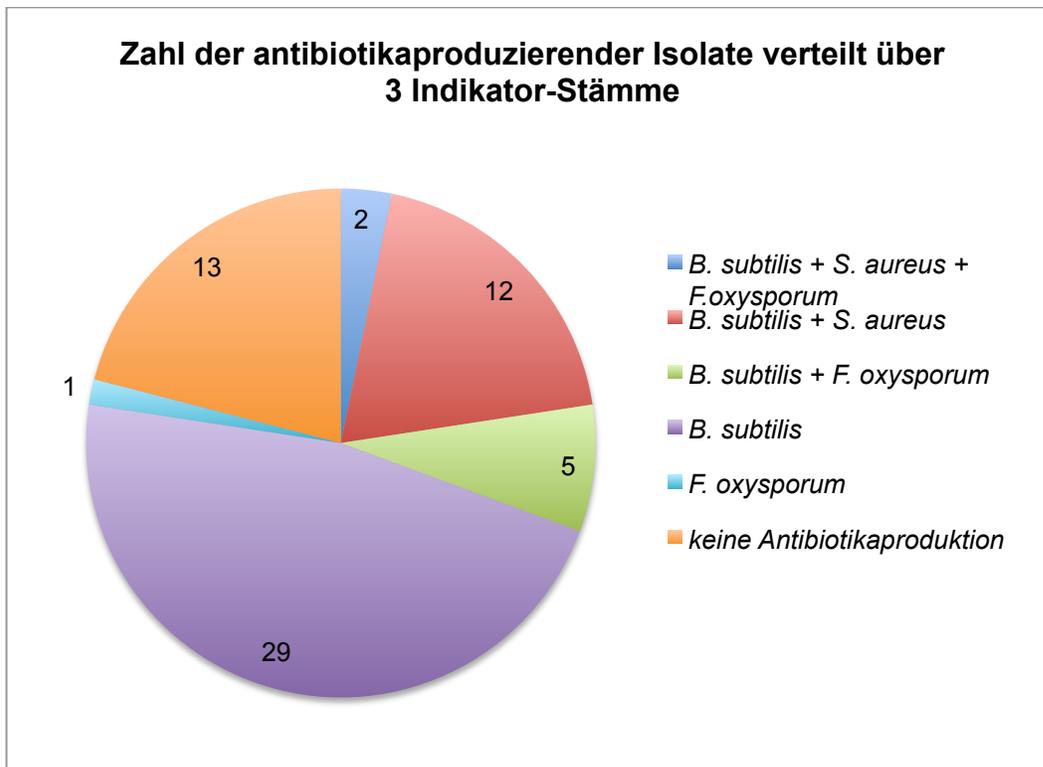
**Abb. 26:** Prozent der antibiotikaproduzierenden *Streptomyces*-Isolate gegen *B. subtilis*. Im Vergleich steht der Durchmesser des Hemmungshofes bezüglich auf Kultivierungsbedingungen und Stimulation-Stoffe. Auf Gellan gum und mit N-Acetylglucosamin steigt die Zahl der mittleren und starken Aktivität.



**Abb. 27:** Prozent der antibiotikaproduzierenden *Streptomyces*-Isolate gegen *S. aureus*. Deutlich weniger Isolate produzierten ein Antibiotikum gegen *S. aureus*, wobei die besten Bedingungen wieder auf Gellan gum mit N-Acetylglucosamin erzielt wurden.



**Abb. 29:** Vergleich zweier Stimulationsstoffe; in die Analyse wurden nur Ergebnisse für *B. subtilis* einbezogen. N-Acetylglucosamin zeigte sich besser in der Induktion der Antibiotikaproduktion; N-Acetylmuraminsäure dagegen zeigte eine vermehrte inhibitorische Wirkung.



**Abb. 28:** Antagonistische Wirkung von *Streptomyces*-Isolaten in Bezug auf drei Indikator-Stämme. Es ist zu bemerken dass meisten Antibiotika gegen *B. subtilis* ausgerichtet sind und dass nur zwei Isolate eine Aktivität gegen aller drei Indikator-Stämme zeigen.

Wie bereits erwähnt besitzen Streptomyceten eine enorme genetische Kapazität zur Produktion von Sekundärmetaboliten. Dies bestätigte sich durch die Experimente die in dieser Arbeit durchgeführt wurden. Mehr als 50% der *Streptomyces*-Isolate produzieren ein Antibiotikum, manche permanent und manche abhängig von Kultivierungsbedingungen und Stimulation, aber das spricht nur dafür wie komplex sind die Signaltransduktionskaskaden welche Sekundärmetaboliten-Gencluster regulieren. Alle diese Antibiotika sind gegen grampositive Bakterien ausgerichtet; das kommt allerdings öfters in der Natur vor, nämlich viele gramnegative Bakterien sind dank der Aufbau ihrer Zellwand resistent gegen Antibiotika die Zellwandbiosynthese hemmen (z. B. Glykoside). Interessanterweise zeigten 65% der *Streptomyces*-Isolate eine antagonistische Wirkung gegen *Bacillus subtilis* wobei viele dieser Isolate bei der Isolierung aus den Pflanzen gerade mit *Bacillus sp.* eng verbunden waren. Dies lässt vermuten,

dass bei diesen Streptomyceten die permanente Konkurrenz im natürlichen Habitat zur Adaptation der Sekundärmetabolitenproduktion geführt hat. Dass darüberhinaus die Nährstoffverfügbarkeit eine entscheidende Rolle bei der chemischen und morphologischen Differenzierung und Aktivierung von Sekundärmetabolismus spielt bewies sich auch in Antibiotikaversuchen, wobei zu bemerken ist dass Gellan gum als nährstoffarmes Kultivierungsmedium für Streptomyceten (im Sinne Antibiotikaproduktion) noch nicht verwendet wurde (Gellan gum ist ein wasserlösliches Polysaccharid welches aus unterschiedlichen Grundeinheiten besteht (Rhamnose, Glucose, Glucuronsäure) und durch aerobe Fermentation der Mikroorganismen *Sphingomonas elodea* produziert wird). Obwohl mit längeren Inkubationszeiten (bis drei Wochen) versucht wurde das nährstoffreiche YEME-Medium zu erschöpfen und so die Antibiotikaproduktion zu aktivieren, es wurde nicht das gleiche Ergebnis wie mit dem Gellan gum erzielt. Die drei verwendeten Stimulation-Stoffe zeigten unterschiedliche Wirkung auf Induktion von Sekundärmetabolismus. Für N-Acetylglucosamin (Bestandteil der Peptidoglykanschicht in der Bakterienzellwand und Monomereinheit des Polymers Chitin) wurde bereits eine positive Wirkung nachgewiesen (Rigali et al., 2008) so bestätigte sich das auch in diesem Experiment. N-Acetylmuraminsäure wurde nach demselben Prinzip ausgewählt (ist genauso Bestandteil des Peptidoglykans), zeigte aber eine unterschiedliche Wirkung in Vergleich zu N-Acetylglucosamin, nämlich mehr inhibitorische. Glucosamin-6-Phosphat ist Teil der Signaltransduktionskaskade für Antibiotikaproduktion welche von Rigali und Kollegen veröffentlicht wurde (siehe Kapitel 1.3.2); es ist ein allosterischer Effektor des transkriptionellen Repressors DasR; jedoch war auch seine Wirkung auf Aktivierung von biosynthetischen Genclustern für Antibiotikaproduktion mehr in Richtung Inhibition. In der Natur steht N-Acetylglucosamin den Streptomyceten in zwei Formen zur Verfügung: aus Zersetzung des Chitins oder aus Hydrolyse der eigenen Zellwand. Es scheint so zu sein dass Streptomyceten unterscheiden können ob es sich dabei um Überschuss oder um ein Hungersignal handelt, da sie nur im zweiten Fall eine morphologische Differenzierung und anschließend Antibiotikaproduktion einschalten (Rigali et al., 2008).

Ob es sich bei den von *Streptomyces*-Isolaten produzierten Antibiotika um neue Naturstoffe handelt bleibt zu klären. *Bacillus subtilis* gehört zwar nicht zu den pathogenen Mikroorganismen, aber es gibt Arten dieser Gattung, z.B. *Bacillus cereus*-Gruppe (*B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*) die Erkrankungen wie Milzbrand und Lebensmittelvergiftungen verursachen können; gegen diese Pathogene werden zwei Antibiotika eingesetzt (Ciprofloxacin, ein synthetisches Produkt und Doxycyclin, ein *Streptomyces*-Sekundärmetabolit). Die nasokomialen Infektionen mit MRSA (Multi-resistenter *Staphylococcus aureus*) nehmen in der letzten Zeit immer mehr zu. Ob die von *Streptomyces*-Isolaten produzierten Antibiotika auch gegen diese Pathogene wirksam sind wäre allerdings interessant zu wissen. Es wurde bereits gezeigt dass zur biologischen Bekämpfung des Pflanzenpathogens *Fusarium oxysporum* (Schimmelpilz welcher Fusariosen und Fusarium-Welke bei Getreide und Mais verursacht) zwei Bakterienstämme, *Pseudomonas fluorescens* und *Serratia marcescens*, eingesetzt werden können (Someya et al., 2007). Ob die *Streptomyces*-Isolate die in Labormaßstab die Verbreitung von *F. oxysporum* erfolgreich gehemmt haben, auch am Feld Anwendung finden können, bleibt eine weitere Fragestellung.

## 5.6 Cross-Spezies Induktion

In diesem Versuch wurden 13 Isolat-Paare (*Streptomyces sp./* Nicht-*Streptomyces sp.*-Isolat welche aus derselben Pflanze und Agar-Platte isoliert wurden) ko-kultiviert. Dies ermöglicht den Einfluss eventueller Stimulationsstoffe des einen Stammes auf Antibiotikaproduktion in anderem Stamm zu testen (genauer Versuchs-Ablauf siehe Kapitel 4.11). Kulturüberstände wurden vor und nach der Inokulierung des Paar-Stammes auf Anwesenheit von Antibiotika getestet. Neun der getesteten Paare stammen aus *Teucrium montanum* und restlichen aus *Erica herbacea* und Moosen. Bei den Nicht-*Streptomyces*-Paaren handelt es sich um *Dyella yeojuensis*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Paenibacillus* und *Pseudomonas sp.* (laut BLASTn Analyse der partiellen 16S rRNA Sequenzen). Getestet wurden Isolate Nr. 21/21B, 26/26B, 30/30B, 31/31B, 33/33B, 36/36B, 37/37B, 41/41B, 50/50B, 52/52B, 66/66B, 77/77B und 118/118B, jedoch zeigte sich nur bei einem Paar ein positives Ergebnis (Tabelle 13). Die negativen Ergebnisse wurden in der Tabelle ausgelassen.

**Tabelle 13:** antimikrobielle Wirkung des Paares 36/36B nach der Ko-Kultivierung. (Su) – supernatant; (d) – day; (7,21) – Inkubationszeit in Tagen. \*36B-Kulturüberstand wurde zur 36-Kultur gemischt. \*\*36-Kulturüberstand wurde zur 36B-Kultur gemischt.

Überstand Aktivität	Indikator-Stamm			
	<i>S. avermitilis</i> (36)	<i>D. yeojuensis</i> (36B)	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
36 (Su21d)		-	-	-
36+36B (Su7d)*		-	-	-
36B (Su7d)	-		-	-
36B+36 (Su21)**	-		-	+

Kulturüberstand des *Streptomyces*-Isolates Nr. 36 induzierte in Stamm 36B (*Dyella yeojuensis*) eine antimikrobielle Wirkung gegen *Staphylococcus aureus*. *Dyella yeojuensis* wurde im Jahr 2006 isoliert und charakterisiert. Es handelt sich um ein gramnegatives, aerobes, motiles, catalase- und oxidase-positives Bakterium. Phylogenetische Analyse der 16S rRNA Gene ergab dass dieser Stamm artverwandt mit *Dyella* spp. (*D. japonica*, *D. koreensis*), *Frateuria*

*aurantia*, *Fulvimonas soli* und *Rhodanobacter* spp. ist (Kim et al., 2006). Bisher wurden bei diesem Stamm keine antimikrobiellen Eigenschaften beschrieben. Die Versuche über Ko-Kultivierung von Streptomyceten mit den Zellen des Pathogens *S. aureus* zeigten schon positive Ergebnisse. Die bakterielle Zelle verfügt über Fähigkeiten die Signalmoleküle – sgn. „Autoinducers“ zu sezernieren, zu erkennen und spezifisch auf diese Signale zu beantworten. Wenn diese Moleküle diffundieren und extrazellulär akkumuliert werden können sie auch mit spezifischen Rezeptorproteinen von anderen Bakterien-Spezies interagieren und so das Sekundärmetabolismus in diesen Organismen hervorrufen (A Veera Ravi et al., 2010).

Dieser Weg der Cross-Spezies vermittelten Induktion des Sekundärmetabolismus öffnet neuer Perspektiven für Entdeckung neuer, bioaktiver Naturstoffe. In diesem Sinne können die Streptomyceten mit ihren vielseitigen morphologischen, physiologischen, und biochemischen Eigenschaften nicht nur als potenziellen Produzenten sondern auch als mögliche biologische Stimulatoren gesehen werden.

## **6 Schlussdiskussion**

In Bezug auf Endophyten, welche in dieser Studie isoliert wurden, bestätigte sich die Vermutung, dass Actinobakterien, die in den Naturwaldreservate-Böden dominieren, auch bei der Pflanzenbesiedlung erfolgreich waren. Die kritischen Punkte um Diversität und Verbreitung von endophytischen Actinobakterien studieren zu können, sind Isolierungs- und Kultivierungsmethoden. Es ist notwendig die optimalen Selektivmedien zu finden um möglichst viele dieser Endophyten kultivierbar zu machen.

Auf der Suche nach neuen Spezies und neuen bioaktiven Stoffen stellen die endophytischen Actinobakterien, insbesondere Streptomyceten, eine versprechende Mikroorganismen-Gruppe dar. Jedoch bleiben viele Fragen wie z.B. ihre präzise Wechselwirkung mit der Wirtspflanze sowie mit den anderen Endophyten unklar.

Die morphologische und chemische Komplexität von Streptomyceten lassen viele Wege der Aktivierung bzw. Inhibierung von Signaltransduktionskaskaden vermuten, die zur Produktion von Sekundärmetaboliten führen, vermuten. Es ist wichtig weiterhin an molekularen Mechanismen die dahinter stecken zu forschen, da auf diese Weise neue Naturstoffe entdeckt werden können.

## 7 Literaturverzeichnis

Adamidis T., and W. Champness (1992). Genetic analysis of *absB*, a *Streptomyces coelicolor* locus involved in global antibiotic regulation. *Journal of Bacteriology* (174): 4622-4628.

Ackermann G. (2009). Antibiotika und Antimykotika. Substanzen, Krankheitsbilder, Erregerspezifische Therapie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.

Altschul, S. F., W. Gish, et al. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* (215): 403-410.

Aminov, R.I. (2009). The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental Microbiology* (11): 2970-2988.

Bascom-Slack, C.A., C. Ma, et al. (2009). Multiple, novel biologically active endophytic actinobacteria isolated from upper Amazonian rainforest. *Microbiolal Ecology* (58): 374-383.

Bentley, S. D., K. F. Chater, et al. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* (417): 141-147.

Bibb, M. (2005). Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current Opinion in Microbiology* (8): 208–215.

Brown, M. E. (1974). Seed and Root Bacterization. *Annual Review of Phytopathology* (12): 181-197.

Burr, T. J., A. Caesar and M. N. Schrolh. (1984). Beneficial Plant Bacteria. *Critical Reviews in Plant Sciences* (2): 1 - 20.

Chakraborty, R. and M.J. Bibb (1997) The *ppGpp* synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. *Journal of Bacteriology* (179): 5854-5861.

Chater, K.F. and D.A. Hopwood (1993). *Streptomyces*. *American Society for Microbiology*: 83-99.

Chater, K.F. and S. Horinouchi (2003): Signalling early developmental events in two highly diverged *Streptomyces* species. *Molecular Microbiology* (48):9-15.

Clayton, R. A., G. Sutton, G., et al. (1995). Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. *International Journal of Systematic Bacteriology* (45): 595–599.

Colson, S., G.P. van Wezel et al. (2008). The chitobiose-binding protein, DasA, acts as a link between chitin utilization and morphogenesis in *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology* (154): 373–382.

Coombs, J. T. and Ch. M.M. Franco, (2003). Isolation and Identification of Actinobacteria from Surface-Sterilized Wheat Roots. *Applied and Environmental Microbiology* (69): 5603-5608.

Danhorn, T. and C. Fuqua, (2007). Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. *Annual Review of Microbiology* (61): 401-422.

Demain, A. L. (1998). Induction of microbial secondary metabolism. *Internat'l Microbiology* (1): 259-264.

Elliot M.A. and N. J. Talbot (2004). Building filaments in the air: aerial morphogenesis in bacteria and fungi. *Current Opinion in Microbiology* (7): 594-601.

Goodfellow M., S. T. Williams and M. Mordarski (1988). Actinomycetes in biotechnology. Academic Press, San Diego.

Hackl, E., S. Zechmeister-Boltenstern, et al. (2004). Comparison of Diversities and Compositions of Bacterial Populations Inhabiting Natural Forest Soils. *Applied and Environmental Microbiology* (70): 5057-5065.

Hallmann, J., A. Quadt-Hallmann, et al. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* (43): 895-914.

Heide, L. (2007). Chemical classes of secondary metabolites Identification and functional analysis of biosynthetic gene clusters. Split Summer School 24-6-06. *Microbial Genomics and Secondary Metabolites*.

Herder (1994). Lexikon der Biologie. Band 8, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.

Hongsheng Yu, H., L. Zhang, et al. (2010). Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research* (165): 437-449.

Horinouchi S. (2003). AfsR as an integrator of signals that are sensed by multiple serine/ threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* (30): 462-467.

Ikeda, H., J. Ishikawa, et al. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnol* (21): 526-531.

Kato, J. Y., I. Miyahisa et al. (2004). A single target is sufficient to account for the biological effects of the A-factor receptor protein of *Streptomyces griseus*. *Journal of Bacteriology* (186): 2206-2211.

Kavimandan, S. K. and A. C. Gaur. (1971). Effect of Seed Inoculation with *Pseudomonas Sp.* On Phosphate Uptake and Yield of Maize. *Current Science* (40): 439-440.

Kieser, T., M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater, and D. A. Hopwood (ed.). (2000). *Practical Streptomyces genetics*. John Innes Centre, Norwich, England.

Kim, B. J., S. H. Lee, et al. (1999). Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *Journal of Clinical Microbiology* (37): 1714–1720.

Kim, B. J., Ch. J. Kim, et al. (2004). Phylogenetic analysis of the genera *Streptomyces* and *Kitasatospora* based on partial RNA polymerase b-subunit gene (*rpoB*) sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (54): 593–598.

Kim, B. J., H. Y. Weon, et al. (2006). *Dyella yeojuensis* sp. nov., isolated from greenhouse soil in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (56): 2079-2082.

Krsek, M., N. Morris, et al. (2000). Actinomycetes. *Encyclopedia of Microbiology* (1): 28-41. Hopwood, D.A. (2007). *Streptomyces in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers*. Oxford University Press, Inc.

Lazzarini, A., L. Cavaletti, et al. (2000). Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* (78): 399-405.

Lechevalier, H. A., and M. P. Lechevalier. (1967). Biology of Actinomycetes. *Annual Review of Microbiology* (21):71-100.

Loon van, L. C., P. A. H. M. Bakker et al. (1998). Systemic Resistance Induced by Rhizosphere Bacteria. *Annual Review of Phytopathology* (36): 453-483.

Ludwig, W., O. Strunk, et al. (2004). ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* (32): 1363-1371.

Ma, B., J. Tromp, et al. (2002). PatternHunter: faster and more sensitive homology search. *Bioinformatics* (18): 440-5.

Madden, T. L., R. L. Tatusov, et al. (1996). Applications of network BLAST server. *Methods in Enzymology* (266): 131-41.

Madigan, M. T., J. M. Martinko, et al. (2000). Brock. Biology of Microorganisms. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice-Hall.

Marinelli, F. (2007). Isolation and screening of secondary metabolite producing microorganisms. Split Summer School 24-6-06. *Microbial Genomics and Secondary Metabolites*.

McCarthy A.J. and S.T. Williams (1992). Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment. A review. *Gene* (115): 173-179.

Mohammadi O. (1994). Commercial development of Mycostop biofungicide, Improving plant productivity with rhizosphere bacteria. Csiro, Adelaide.

O'Briena, J. and D. W.Gerard (2011). An ecological perspective of microbial secondary metabolism. *Current Opinion in Biotechnology* (22): 1-7.

Oliveira de, M. F., M. G. da Silva and S.T. Van Der Sand. (2010). Anti-phytopathogen potential of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of *Streptomyces* sp. R18(6), a potential biocontrol agent *Research in Microbiology* (161): 565-572.

Petrini, O., T. N. Sieber, et al. (1992). Ecology, metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural toxins* (1): 185-196.

Pommer, E.H. and G. Lorenz (1986). The behaviour of polyester and polyether polyurethanes towards microorganisms. Biodeterioration and biodegradation of plastics and polymers. Biodeterioration Society Occasional Publication 1.

Qin, Sh., J. Li, et al. (2009). Isolation, Diversity, and Antimicrobial Activity of Rare Actinobacteria from Medicinal Plants of Tropical Rain Forests in Xishuangbanna, China *Applied and Environmental Microbiology* (75): 6176-6186.

Recio, E., A. Colinas et al. (2004). PI factor, a novel type quorum-sensing inducer elicits pimarin production in *Streptomyces natalensis*. *Journal of Biological Chemistry* (279): 41586-41593.

- Reinhold-Hurek, B. and T. Hurek. (1998). Interactions of Gramineous Plants with Azoarcus Spp. And Other Diazotrophs: Identification, Localization, and Perspectives to Study Their Function. *Critical Reviews in Plant Sciences* (17): 29 - 54.
- Rigali. S., F. Titgemeyer, et al. (2008). Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by Streptomyces. *EMBO Reports* (9): 670-675.
- Roller, C., M. Wagner, et al. (1994). In situ probing of gram-positive bacteria with high DNA G + C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology* (140): 2849-58.
- Rosenblueth, M. and E. Martinez-Romero, (2006). Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* (19): 827-837.
- Saitou, N. and M. Nei (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* (4): 406-25.
- Santamarta, I., A. Rodriguez-Garcia (2002). CcaR is an autoregulatory protein that binds to the ccaR and cefD-cmcl promoters of the cephamycin C-clavulanic acid cluster in *Streptomyces clavuligerus*. *Journal of Bacteriology* (184): 3106-3113.
- Schulz, B. J. E., Ch. J. C. Boyle, Th. N. Sieber. (2006). Microbial root endophytes. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Sieber, T.N. (2002). Fungal root endophytes. In: Waisel, Y., Eshel, A., Kafkafi, U. (Eds.), Plant Roots: The Hidden Half. Marcel Dekker, New York, Basel, pp. 887-917.
- Someya, N., K. Tsuchiya, et al. (2007). Fungal cell wall degrading enzyme-producing bacterium enhances the biocontrol efficacy of antibiotic-producing bacterium against cabbage yellows. *Journal of Plant Diseases and Protection* (114): 108-112.
- Sorkin D. Y., T. P. Tourova et al. (2001). Microbial Thiocyanate Utilization under highly Alkaline conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:528-538.
- Spragg, M.A., M. Bregu et al. (1998). Cross-species induction and enhancement of antimicrobial activity produced by epibiotic bacteria from marine algae and invertebrates, after exposure to terrestrial bacteria. *Letters in Applied Microbiology* (22): 142-146.

Stackebrandt, E., W. Liesack, and D. Witt (1992). Ribosomal RNA and rDNA sequence analyses. *Gene* (115): 255–260.

Stackebrandt, E., F. A. Rainey, and N. L. Ward-Rainey. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov [Review]. *International Journal of Systematic Bacteriology* (47): 479-491.

Stone, J.K., C.W. Becon et al. (2000). An overview of endophytic microbes: endopytism defined. In: Becon, C.W., Jr. JF. White, editors. *Microbial Endophytes*. New York: Marcel Dekker; 2000. p. 3-29.

Trân Van, V., O. Berge, et al. (2000). Repeated Beneficial Effects of Rice Inoculation with a Strain of *Burkholderia Vietnamiensis* on Early and Late Yield Components in Low Fertility Sulphate Acid Soils of Vietnam. *Plant and Soil* (218): 273–284.

Veera Ravi, A.. K.S. Mustafa, et al. (2010). Cross Species Signal Transfer Mediated Induction of Antibiotic Production in Actinomycetes against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Pharmacy Research* 3: 397-400.

Ventura, M., C. Canchaya, et al. (2007). Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiology and molecular biology reviews* (71): 495-548.

Walsh, Ch. (2003). *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*. American Society for Microbiology; 1 edition.

Wietzorrek, A. and M. Bibb (1997). A novel family of proteins that regulates antibiotic production in streptomycetes appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold. *Molecular Microbiology* (25): 1181-1184.

Wilson D. (1995). Endophyte – The evolution of a term and clasification of its use and definition. *Oikos, A Journal of Ecology* (72): 274-276.

Wink, J. *Compedium of Actinobacteria* (<http://www.gbif-prokarya.de/microorganisms/wink.html>).

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Maja (geb. Puljarević) Pleško  
Geburtstag: 10. 09. 1979  
Geburtsort: Gradiška / Bosnien und Herzegowina

### **Ausbildung**

1986 – 1994 Grundschole „Dr. Mladen Stojanović“ /  
Podgradci / BiH  
1994 – 1998 Allgemeines Gymnasium Gradiška / BiH  
1998 – 2002 Studium an der Medizinischen Fakultät,  
Universität Banja Luka / BiH  
2003 – 2005 Fortsetzung des Studiums an der  
Medizinischen Universität Wien  
2005 – 2009 Studium der Biologie an der Formal- und  
Naturwissenschaftlichen Fakultät Wien.  
Studienzweig Genetik und Mikrobiologie  
2009 – 2010 Diplomarbeit am Department Bioresources,  
Austrian Institute of Technology, Seibersdorf