

Friedrich-Schiller-Universität Jena

Chemisch-Geowissenschaftliche Fakultät

Institut für Geowissenschaften



seit 1558

Detektion der Siderophorenproduktion durch *Streptomyces mirabilis* P16-B1 in schwermetallkontaminierten Böden mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie

Masterarbeit
zur Erlangung des akademischen Grades
Master of Science (M. Sc.)
im Studiengang Biogeowissenschaften

Betreuer: Prof. Dr. Erika Kothe

Dr. Christian Dimkpa

Annekatriin Voit (B. Sc.)

Rosenweg 16

07554 Pölzig

Jena, 17. August 2009

Erstgutachter: Frau Prof. Dr. Erika Kothe
Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Georg Büchel

Inhaltsverzeichnis

Selbstständigkeitserklärung	I
Danksagung	II
Zusammenfassung.....	III
Abstract.....	IV
Abkürzungen	V
1. Einleitung	1
1.1. Eisen als essentielles Element der Bakterienernährung	1
1.2. Siderophoren als Chelatbildner zur Eisenaufnahme	2
1.3. Eisen- und schwermetallreiche Habitate	5
1.4. Testorganismus <i>Streptomyces mirabilis</i> P16-B1	7
1.5. Nachweis von Sekundärmetaboliten durch Elektrospray-Ionisations- Massenspektrometrie	8
1.6. Zielstellung	10
2. Material und Methoden.....	11
2.1. Verwendete Materialien.....	11
2.2. Probennahme.....	12
2.3. Stammkonservierung des Testorganismus	13
2.4. Indikation der Siderophorenproduktion in flüssigem Medium	14
2.5. Indikation der Siderophorenproduktion auf CAS-Agar-Platten	15
2.6. Detektion des Siderophorentyps	16
2.7. Test auf Rückgewinnung hydroxamater Siderophoren aus Boden	17
2.8. Bodeninkubation	17
2.9. Bearbeitung der Subplot-Bodenproben	18
2.10. Probenextraktion als Vorbereitung auf die ESI-MS Messung.....	18
2.11. Quantifizierung des DFOE Gehalts	19

3.	Ergebnisse	20
3.1.	Siderophorenproduktion durch <i>Streptomyces mirabilis</i> P16-B1	20
3.2.	Zurückgewinnung von hydroxamaten Siderophoren aus Boden	26
3.3.	Siderophorenproduktion durch <i>Streptomyces mirabilis</i> P16-B1 in schwermetallhaltigem Boden	27
3.4.	Vergleich der Siderophorengehalte der Subplot- Bodenproben vor und nach der Inokulation	33
4.	Diskussion	38
5.	Literaturverzeichnis	44

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie Zitate kenntlich gemacht habe.

Ich habe die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form keinem anderen Prüfungsausschuss vorgelegt.

Pölzig, den 17. August 2009

Annekatriin Voit

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mich während der letzten 12 Monate gefordert, unterstützt und manchmal auch ertragen haben.

Vor allem möchte ich Frau Prof. Dr. Erika Kothe für die Bereitstellung des Themas danken, sowie für viele Anregungen und ergiebige Diskussionen.

Weiterer Dank gilt Herrn Dr. Aleš Svatoš vom Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, welcher mir geholfen hat die massenspektrometrischen Untersuchungen so effizient wie möglich zu gestalten und mir Hilfestellung gab, wenn immer ich welche benötigte.

Ganz besonderer Dank gilt Dr. Christian Dimkpa, welcher mir in vielen Stunden den Einstieg in die Thematik näher gebracht hat und mir unter anderem in Fragen des Versuchsaufbaus mit Rat und Tat zur Seite stand.

Desgleichen besonderer Dank gilt Dr. Ravi Kumar Maddula, der mir und meinen massenspektrometrischen Analysen in vielen nervenaufreibenden Stunden und Tagen unter die Arme griff, auch wenn seine Arbeitszeit sowie seine eigene Freizeit darunter gelitten haben.

Ebenfalls danken möchte ich Eileen Schütze, die mir so manches Mal geholfen hat und Martin Reinecke, welcher mir den nötigen Zugang verschafft hat, um effizient im Labor und am PC arbeiten zu können. Im selben Atemzug gilt mein Dank sämtlichen Mitarbeitern, Diplomanden, Doktoranden und Post-Docs im mikrobiologischen Institut sowie am Max-Planck-Institut, welche mir bei Fragen jederzeit Rede und Antwort standen.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Dank auch an meine Freunde richten, ganz besonders Franzi H., welche mit mir sowohl analysierten und über den „wissenschaftlichen Alltag“ diskutierten als auch für Abwechslung davon sorgten.

Widmen möchte ich diese Masterarbeit meinen lieben Eltern, die meine Höhen und Tiefen hautnah erleben „durften“ und die es mir ermöglichen auch weiterhin meinen Weg zu gehen. Ohne deren Unterstützung wäre diese Masterarbeit nicht möglich gewesen.

Zusammenfassung

Um die limitierte Bioverfügbarkeit von Eisen unter aeroben Bedingungen zu kompensieren haben Mikroorganismen die Fähigkeit, Siderophoren zu produzieren. Eisen kann so mittels Siderophor-Eisen-Komplexen assimiliert werden.

Ein *Streptomyces*-Isolat aus dem ehemaligen deutschen Uranbergbauggebiet bei Ronneburg, Thüringen, wurde auf seine Siderophorenproduktion hin untersucht. Hierfür wurden mikrobiologische Verfahren ebenso wie Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) verwendet. Die modifizierte CAS-Agar-Plattenmethode sowie CAS-Flüssiglösung konnten bei *Streptomyces mirabilis* P16-B1 Siderophorenproduktion nachweisen. Die Nachweismethoden bestätigten die Fähigkeit des Stammes, Hydroxamate zu bilden, widerlegten im Gegenzug aber die Möglichkeit zur catecholaten Siderophorenproduktion. Durch ESI-MS wurde festgestellt, dass der Testorganismus 3 Hydroxamate produziert, nämlich Desferrioxamin E (DFOE), Desferrioxamin B (DFOB) und Coelichelin (Cch). Zusätzlich konnten die zugehörigen Eisenkomplexe nachgewiesen werden, Ferrioxamin E (FOE), Ferrioxamin B (FOB) und Ferricoelichelin (Fe-Cch). In eisenarmen Flüssigmedium wurden wesentlich mehr Siderophoren durch *Streptomyces mirabilis* P16-B1 gebildet als in schwermetallhaltigen Böden.

Um unter natürlichen Bedingungen im Boden messen zu können, war es notwendig, die Rückfindungsrate von Siderophoren zu bestimmen. Aus einem sandigen Testboden konnten lediglich etwa 30 % der zugefügten Siderophoren zurückgewonnen werden, was hauptsächlich auf die hohe Adsorption der Siderophoren an die Bodenpartikel zurückzuführen ist.

Die geringe Rückfindungsrate erschwert Messungen direkt im Boden. Tatsächlich zeigten Untersuchungen mit Bodenproben vor und nach einer Inokulation mit *Streptomyces acidiscabies* E13 und Mykorrhiza kaum signifikante Unterschiede.

Abstract

To compensate limited bioavailability of iron under aerobic conditions microorganisms are able to produce siderophores. In this way iron can be assimilated through siderophore-iron-complexes.

A *Streptomyces*-isolate from the former German uranium mining area near Ronneburg, Thuringia, was tested for its siderophore production. Therefore microbiological methods were used as well as Electrospray-Ionization-Mass-Spectrometry (ESI-MS). The modified CAS-agar-plate-method and CAS-liquid-assay solution could prove siderophore production of *Streptomyces mirabilis* P16-B1.

The reference methods confirmed the strain's ability to produce hydroxamate siderophores but in return they disproved the possibility for catecholate siderophore production. Through ESI-MS it could be proved that test organism produces 3 hydroxamate siderophores, namely Desferrioxamine E (DFOE), Desferrioxamine B (DFOB) and Coelichelin (Cch). Additionally the related iron species Ferrioxamine E (FOE), Ferrioxamine B (FOB) and Ferricoelichelin (Fe-Cch) could be verified. In iron deficient liquid medium substantial more siderophores were produced by *Streptomyces mirabilis* P16-B1 than in heavy metal containing soil.

To investigate soil under natural conditions, it was necessary to determine the recovery rate of siderophores. From a sandy test soil entirely almost 30 per cent of added siderophores could be recovered, which is mainly based on the high adsorption of soil particles.

The low recovery rate complicates the investigation direct in soil. Actually investigations with soil samples before and after an inoculation with *Streptomyces acidiscabies* E13 and mycorrhiza showed no significant differences.

Abkürzungen

Gew. %	Gewichtsprozent
Mol/l	Mol pro Liter
km	Kilometer
g/t	Gramm pro Tonne
cm	Zentimeter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
µl	Mikroliter
°C	Grad Celsius
g	Gramm
mmol	Millimol
rpm	Umdrehungen pro Minute
ml	Milliliter
mg	Milligramm
nm	Nanometer
wt/vol	Masse pro Volumen
vol/vol	Volumen pro Volumen
NA	Nutrientagar
MM9	eisenarmes Flüssigmedium
<i>Aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
<i>Aqua bidest.</i>	doppelt destilliertes Wasser
AM	Actinomyceten Minimalmedium
CAS	Chromazurool- S
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
SCF	Siderophoren-haltiges Kulturfiltrat
Abb.	Abbildung
Tab.	Tabelle
usw.	und so weiter
bzw.	beziehungsweise
z. B.	zum Beispiel
u. a.	unter anderem

d. h.	das heißt
<i>et al.</i>	und weitere
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
DFOE	Desferrioxamin E
FOE	Ferrioxamin E
DFOB	Desferrioxamin B
FOB	Ferrioxamin B
Cch	Coelichelin
Fe-Cch	Ferricoelichelin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FUR	Ferric Uptake Regulator Protein

1. Einleitung

1.1. Eisen als essentielles Element der Bakteriernahrung

Eisen ist eines der Hauptelemente in der Erdkruste, mit einer Häufigkeit, welche bei 1 bis 6 Gew. % liegt (HOLMSTRÖM *ET AL.*, 2004). Nichtsdestotrotz ist die Bioverfügbarkeit unter aeroben Bedingungen eingeschränkt, da Eisen mit Luftsauerstoff oxidiert wird (ESSEN *ET AL.*, 2006). Eisen existiert unter physiologischen Bedingungen in zwei stabilen Oxidationsstufen, als Fe(II) und Fe(III). Eisen als essentielles Element ist am Sauerstofftransport in den Zellen sowie am Transport von Elektronen in den Cytochromen der Atmungskette beteiligt. Es ist das Zentralatom des Co-Faktors Häm *b* in Myoglobin und Hämoglobin. Zur Oxidation organischer Substanz werden eisenhaltige Proteine sowie Eisen-Schwefel-Cluster benötigt.

Aerobe Mikroorganismen benötigen Eisen ebenfalls für eine Vielzahl von Funktionen wie beispielsweise für die Reduktion von Sauerstoff um ATP zu produzieren. Im Gegensatz zu höheren Organismen können sie ihren Eisenbedarf nicht durch die Nahrungsaufnahme decken, sie müssen Eisen aus dem sie umgebenden Nährmedium aufnehmen. Um ihren Energiebedarf zu decken und ein optimales Wachstum zu gewährleisten, benötigen Mikroorganismen 10^{-7} mol/l Eisen (NEILANDS, 1995). Unter anaeroben (reduzierenden) Bedingungen liegt Eisen in Form von Fe(II)-Ionen vor, welche in ihren Verbindungen gut wasserlöslich sind. Unter aeroben Bedingungen hingegen fällt, ab einem pH-Wert größer als zwei, Eisen als Fe₂O₃ aus. Die Konzentration an Fe(III)-Ionen liegt bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 bei ca. 10^{-18} mol/l und stellt somit einen wachstumslimitierenden Faktor dar (NEILANDS, 1995).

Aufgrund dieser umgebungsbedingten Beschränkungen besitzen die meisten Pilze und Bakterien die Fähigkeit, sogenannte Siderophore zu bilden. Diese machen es möglich, das reichlich vorhandene, aber im Wesentlichen nicht verfügbare Eisen bioverfügbar zu machen und Stress durch Eisenmangel zu vermeiden. Daher bietet die Fähigkeit zur Siderophorenproduktion einen selektiven Wachstumsvorteil.

1.2. Siderophoren als Chelatbildner zur Eisenaufnahme

Siderophoren, aus dem griechischen Eisenträger, sind Chelatliganden und besitzen eine sehr hohe Affinität zu Fe(III)-Ionen (NEILANDS, 1984). Ihre Funktion besteht in der Mobilisierung, dem Transport und der Speicherung von Eisen. Die Stoffgruppe der Siderophoren umfasst rund 200 Oligopeptide sowie andere molekulare Strukturen. Aerobe Bakterien, Pilze und Pflanzenwurzeln synthetisieren mindestens einen Siderophorentyp und geben ihn an das sie umgebende Medium ab. Siderophoren besitzen ein geringes Molekulargewicht von 300 bis 2.000 Dalton (KAIM & SCHWEDERSKI, 2005) und binden spezifisch Eisen, indem sie Komplexe bilden. Infolgedessen wird, wie schematisch in Abb. 1 dargestellt, das meist essentielle Eisen verfügbar für die Mikroorganismenzelle, indem sie die eisenhaltigen Siderophoren über spezielle Transportsysteme wieder aufnehmen (NEILANDS, 1995).

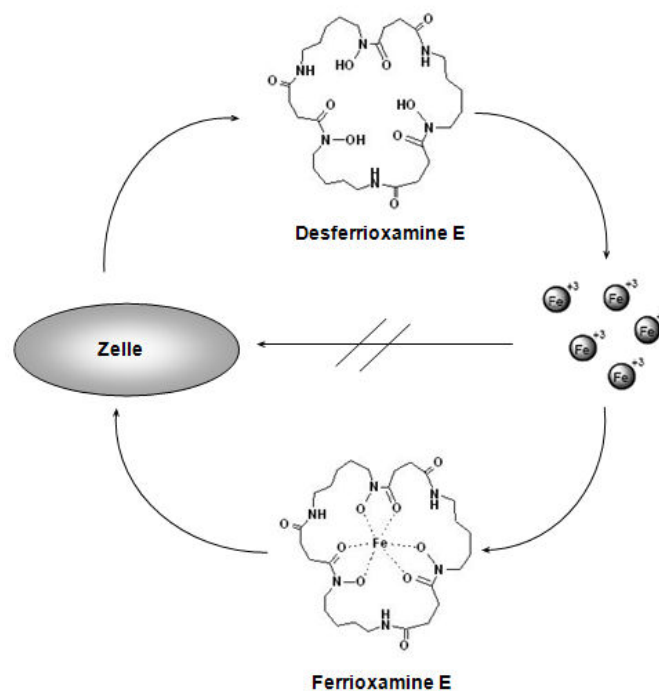


Abb. 1 Beispiel für den Transport von Eisen (III) in eine Zelle mit Hilfe eines Siderophors
(verändert nach FERNANDEZ, 2002)

Die Chelatbildung des Eisens erfolgt über funktionelle Gruppen. Nach STINTZI *ET AL.* (2000) werden die Siderophor-Eisen-Komplexe durch Siderophor-Rezeptorproteine an der Außenmembran Gram-negativer Mikroorganismen spezifisch gebunden und Energie über weitere Proteine für den Transport über die äußere und innere

Membran zur Verfügung gestellt. Ein weiterer wichtiger Bestandteil des Eisentransport ist der Austausch von Ionen zwischen zwei Siderophoren, welcher an der Zelloberfläche stattfindet. Die gebundenen Eisenionen werden von Eisen-Siderophor-Komplexen an eisenfreie Siderophore, welche an Rezeptoren gebunden sind, transferiert. Hierdurch wird die Aufnahmerate an Eisen sowie die Konzentration an eisenfreien Siderophoren erheblich erhöht (STINTZI *ET AL.*, 2000). In Abb. 2 wird dieser vermutete „Shuttle-Transport“ modellhaft anhand der Zellwand eines Gram-negativen Mikroorganismus dargestellt. Nichtsdestotrotz ist der Mechanismus des Eisentransport über Siderophore bei Gram-positiven Bakterien noch weitgehend unbekannt.

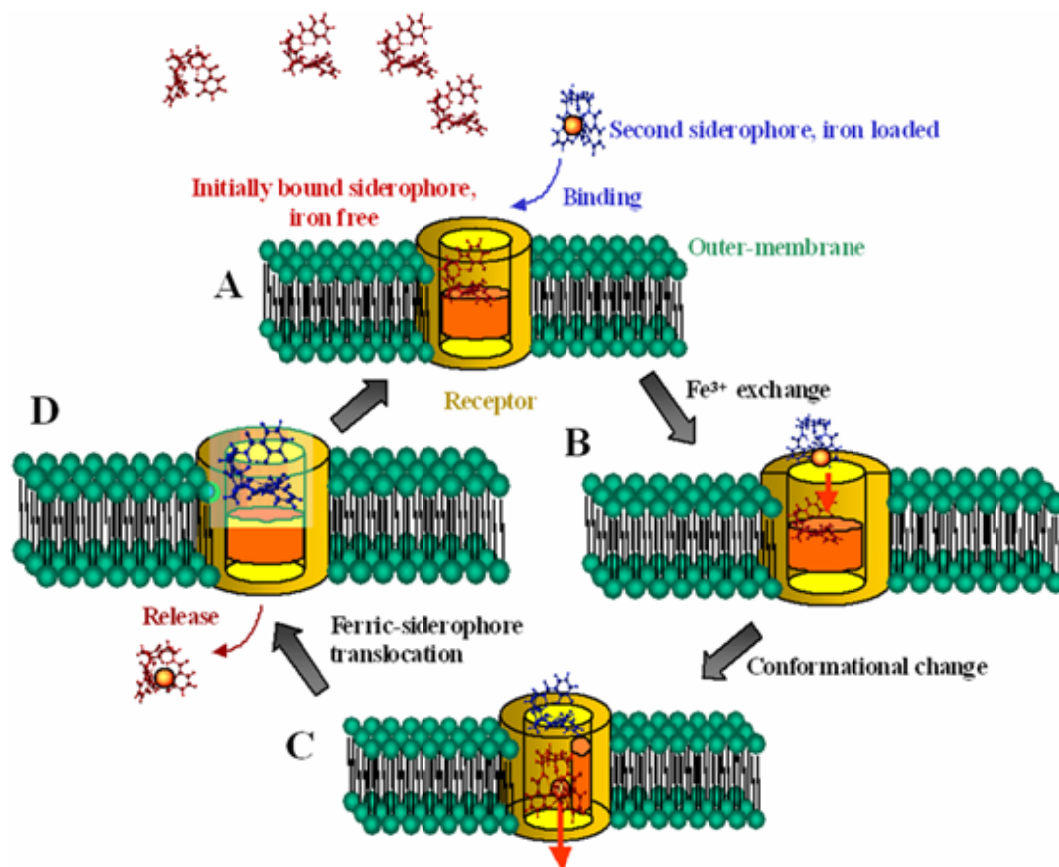


Abb. 2 Modell des Siderophor- Eisen- Austausches über einen Shuttlemechanismus in Gram-negativen Bakterien (STINTZI *ET AL.*, 2000)

Die dominierenden, funktionellen Gruppen der Siderophore sind Hydroxamate (wie Ferrioxamin und Ferrichrome), Catecholate (Enterobaktinen) und Phenolate

(NEILANDS, 1981), sowie Carboxylate und Hydroxycarboxylate, wobei Hydroxamate und Phenolate vorherrschen. So konnten beispielsweise Hydroxamate bereits in Pilzen, Hefen und verschiedenen Bakterien nachgewiesen werden (MILLER *ET AL.*, 1985). Sie besitzen die höchste Affinität zu Eisen mit Komplexbildungskonstanten bis zu $K_f \approx 10^{32}$ (KAIM & SCHWEDERSKI, 2005).

Wichtige Hydroxamate sind Desferrioxamin E (DFOE), Desferrioxamin B (DFOB) und Coelichelin (Cch). Die zugehörigen Siderophor-Eisen-Komplexe werden Ferrioxamin E (FOE), Ferrioxamin B (FOB) und Ferri-Coelichelin (Fe-Cch) genannt (Abb. 3).

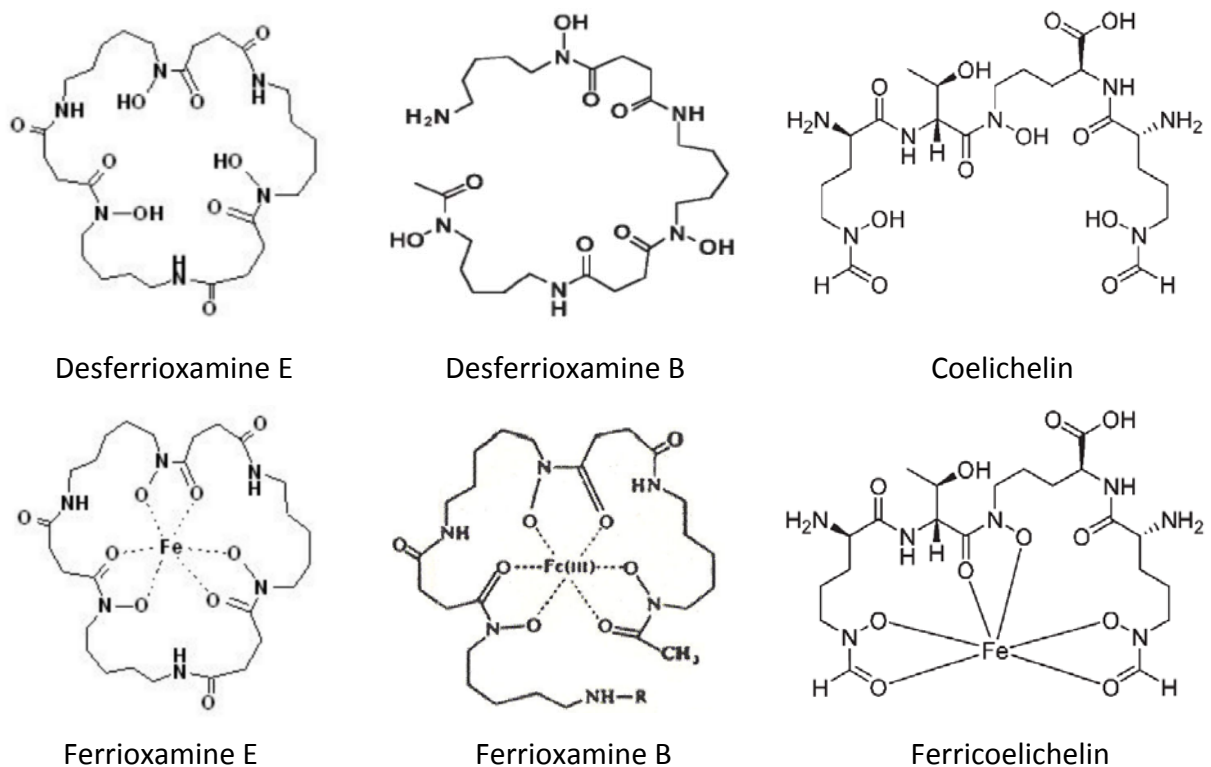


Abb. 3 Strukturen hydroxamater Siderophoren von *Streptomyces spec.*

Ein sogenanntes FUR-Protein, kurz für **F**erric **U**ptake **R**egulator Protein, reguliert die Biosynthese von Siderophoren. Es ist ein von Fe(II) aktiviertes Regulationsprotein. Als Dimer bindet es bei einem Überangebot an Eisen in der Zelle je ein Eisenion als Co-Faktor pro Monomer (BAGG & NEILANDS, 1987). Diese Eisenbindung verursacht eine Konformationsänderung des Proteins (COY & NEILANDS 1991). Infolgedessen bindet es nun an die Promotorregion von Genen, welche für Siderophorenproduktion notwendige Gene exprimieren und reprimieren deren Bildung.

1.3. Eisen- und schwermetallreiche Habitate

Exzessiv durchgeführter Bergbau geht u. a. mit Acid Mine Drainage einher, dem Einbringen von sauren Grubenabwässern in den Boden. Infolgedessen reichern sich Schwermetalle, wie Nickel und Eisen im Boden sowie im Bodenwasser an. Ein solcher Standort wurde in der vorliegenden Masterarbeit untersucht. Das Untersuchungsgebiet „Gessenwiese“ befindet sich in der Bergbaufolgelandschaft des ehemaligen ostthüringischen Uranbergbaugesbietes, welches sich in das Ronneburger und das Seelingstädter Revier gliedert. Das Untersuchungsgebiet gehörte zum Ronneburger Revier und liegt etwa 10 km östlich von Gera in Thüringen (Abb. 4).

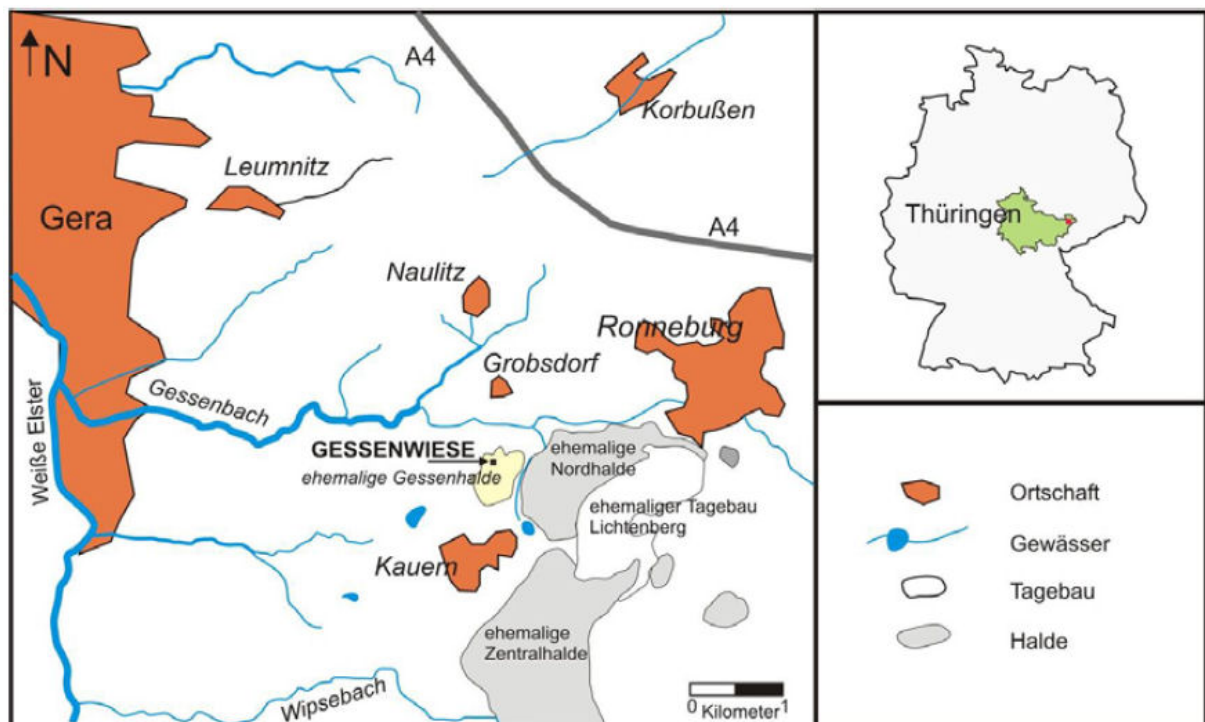


Abb. 4 Regionalgeologische Karte (GRAWUNDER, 2006)

Die Sowjetisch- Deutsche Aktien Gesellschaft (SDAG) Wismut baute in den Jahren 1946 bis 1990 in Ostthüringen und Sachsen 231.000 Tonnen Uran (WISMUT, 2009) ab, was sie zum drittgrößten Uranproduzenten nach den USA und Kanada machte. Der Uranerzabbau erfolgte sowie untertägig in Schächten als auch übertägig, wie beispielsweise in dem 1 km breiten und 2 km langen Tagebau Lichtenberg

(WISMUT, 2009). Die Erzaufarbeitung (Urangehalt >300 g/t Gestein) wurde nach 1960 im Yellow Cake in Seelingstädt durchgeführt (GELETNEKY, 2002). Zusätzlich dazu wurde im Jahr 1972 die Laugungsanlage Gessen errichtet um zusätzliche Mengen an Uran aus Armerzen (Urangehalt <300 g/t Gestein) zu gewinnen. Es wurden schwefelsaure Grubenwässer sowie konzentrierte Schwefelsäure verwendet, welche in einem Kreislaufsystem über die Halde geleitet wurden, sich mit Uran anreicherten und dann über ein Drainagesystem in ein Auffangbecken flossen. Hierin konnte das Uran schließlich abgetrennt werden. Zum 31. 12. 1990 wurde die Uranerzförderung eingestellt und die staatseigene Wismut GmbH, welche vom Bundesministerium für Wirtschaft und Arbeit gegründet wurde, übernahm das Gebiet um eine Sanierung vornehmen zu können. Hierfür wurden von der Bundesrepublik Deutschland 6,2 Milliarden Euro bereitgestellt (WISMUT, 2009). Die Gessenhalde gehörte durch ihr erhöhtes Säurepotential zu den kontaminiertesten Bereichen des Ronneburger Reviers. Aus diesem Grund begann bereits im Jahr 1990 die Umlagerung der Gessenhalde, welche in die tiefsten Bereiche des Tagebaurestloches Lichtenberg verbracht wurde. Nach MEIBNER (2007) erfolgte der Abtrag des Haldenkörpers bis zu den anstehenden glazialen Sedimenten, welche während der Elstereiszeit gebildet wurden. Die entstandene Aufstandsfläche wurde in den Jahren 1997 bis 2000 mit Mineralboden als Auftragssubstrat abgedeckt (WISMUT, 2009).

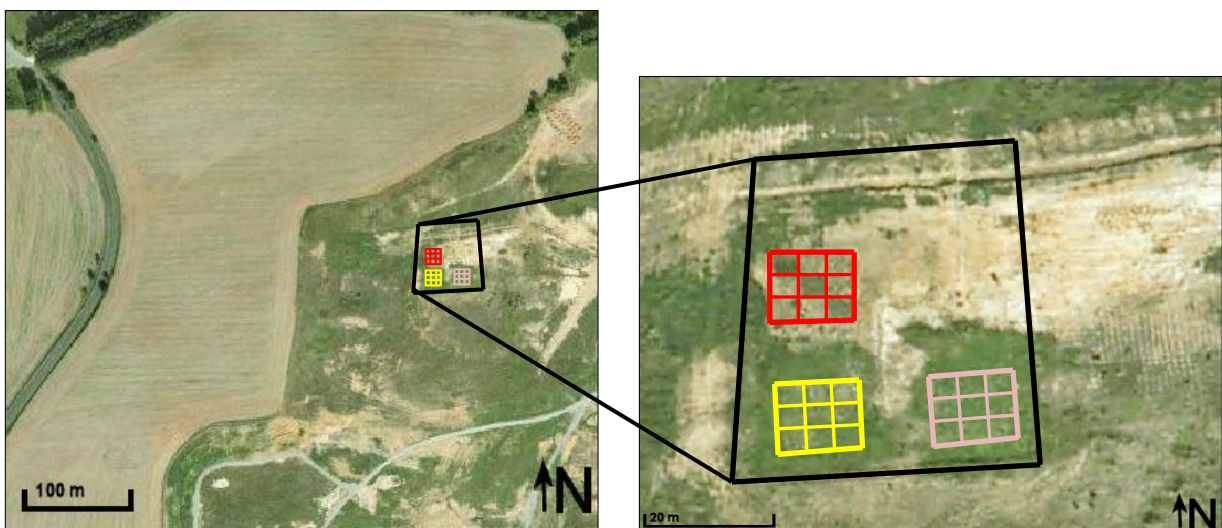


Abb. 5 Satellitenbild (GOOGLE EARTH, 2009)

Legende: ■ Mutterboden ■ Kompost ■ Kontrolle

Auf der teilweise lückenhaft abgedeckten Fläche wurde im Jahr 2004 durch die Friedrich-Schiller-Universität Jena das Testfeld „Gessenwiese“ eingerichtet. Es dient zur Durchführung von Untersuchungen zu hydrogeologischen, geochemischen sowie mikrobiologischen Prozessen und liegt zwischen Ronneburg, Grobsdorf und Kauern. Auf dem Testfeld sind u. a. drei Großplots zu je 20 m * 20 m, die sich jeweils erneut in 9 Subplots aufteilen (Abb. 5).

Hier wird unter verschiedenen Ausgangsbedingungen sowie Behandlung mit Mikroorganismen die Aktivität des Pflanzenwachstums untersucht. Auf einen der Großplots wurde Mutterboden aufgetragen, ein anderer erhielt einen Auftrag aus Kompost. Die 5 cm mächtige Auflage wurde aufgetragen und in den Boden eingearbeitet. Der dritte Großplot blieb als Kontrolle ohne Auflage. Das Ziel dieser Bearbeitung war die Untersuchung der Bioremediation, d.h. des Abbaus bzw. die Immobilisierung von Schadstoffen durch die Pflanzen (NEAGOE *ET AL.*, 2005). Zusätzlich wird durch regelmäßige Beimpfung mit Mykorrhiza und *Streptomyces acidiscabies* E13 der Einfluss auf das Pflanzenwachstum und die Mikroorganismengesellschaft untersucht (SCHINDLER, 2006).

1.4. Testorganismus *Streptomyces mirabilis* P16-B1

Streptomyzeten bilden die Familie der *Streptomycetaceae* und sind Gram-positive, aerobe *Aktinomyceten* mit hohem Guanin & Cytosin-Gehalt der Desoxyribonukleinsäure (DNA). Die Gattungen dieser Familie sind *Streptomyces*, *Kitasatospora* und *Streptacidophilus*, wobei erstere mit über 500 beschriebenen Arten die größte Gruppe bildet (WILLIAMS *ET AL.*, 1989). Sie kommen meist in Böden vor, können aber auch in aquatischen Lebensräumen gefunden werden, bilden stark verzweigte Myzelien und besitzen einen Hyphendurchmesser von 0,5 bis 2 µm (MADIGAN *ET AL.*, 2003). Wichtige Unterscheidungsmerkmale sind charakteristische Farben der Sporen und Myzelien sowie weitere physiologische, genetische und morphologische Kriterien, welche den jeweiligen Stamm erkennen lassen. Streptomyzeten haben einen sehr effizienten oxidativen Metabolismus und sind in der Lage diverse sekundäre Metabolite wie beispielsweise verschiedene Antibiotika und sogenannte Geosmine zu bilden, welche für den typischen „Erdgeruch“ verantwortlich zeichnen.

Der Testorganismus für diese Arbeit war *Streptomyces mirabilis* P16-B1, welcher aus einer Bakteriengesellschaft im Untersuchungsgebiet isoliert werden konnte (SCHMIDT *ET AL.*, 2007).

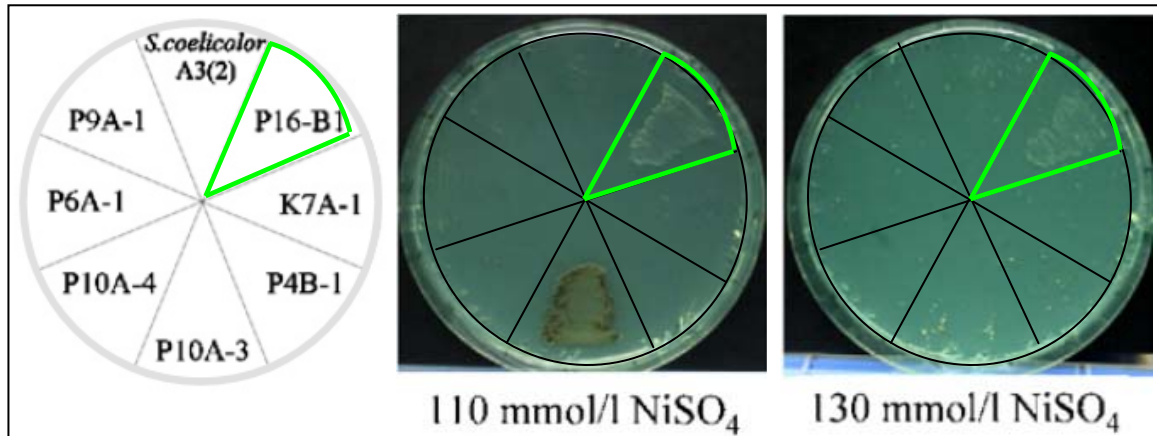


Abb. 6 Wachstum von *Streptomyces*-Isolaten auf Platten mit verschiedenen Nickelgehalten
(verändert nach SCHMIDT *ET AL.*, 2007)

Die Bachufer des Gessenbachs sind durch eine übermäßig hohe Konzentration an Schwermetallen charakterisiert, wodurch die dort lebenden Organismen spezielle Mechanismen entwickelt haben um zu überleben. *Streptomyces mirabilis* P16-B1 zeichnet sich vor allem durch eine sehr hohe Toleranz gegen Nickel aus, welche bis zu einer Konzentration von 130 μmol bestand (Abb. 6).

1.5. Nachweis von Sekundärmetaboliten durch Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie

Die Methode der Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) wurde durch John Bennett Fenn im Jahr 2002 ursprünglich für die Analyse von Makromolekülen entwickelt. Das Besondere hierbei ist die Erzeugung von Ionen für die massenspektrometrische Analyse mittels Elektrospray.

Die zu analysierende Lösung wird durch eine durchschnittlich 0,1 mm dünne geladene Metallkapillare in ein starkes elektrisches Feld unter Atmosphärendruck gesprüht (Abb. 7).

Der Elektrospray Prozess kann in drei wesentliche Stadien geteilt werden: Tropfenformation an der Kapilarspitze, Minderung der Tropfenmenge durch

Evaporation des Lösungsmittels und erneuter Tropfenzerfall in sehr kleine, hoch geladene Tropfen und schließlich der Produktion der Ionen in der Gasphase (GASKELL, 1997; KERBARLE & TANG, 1993).

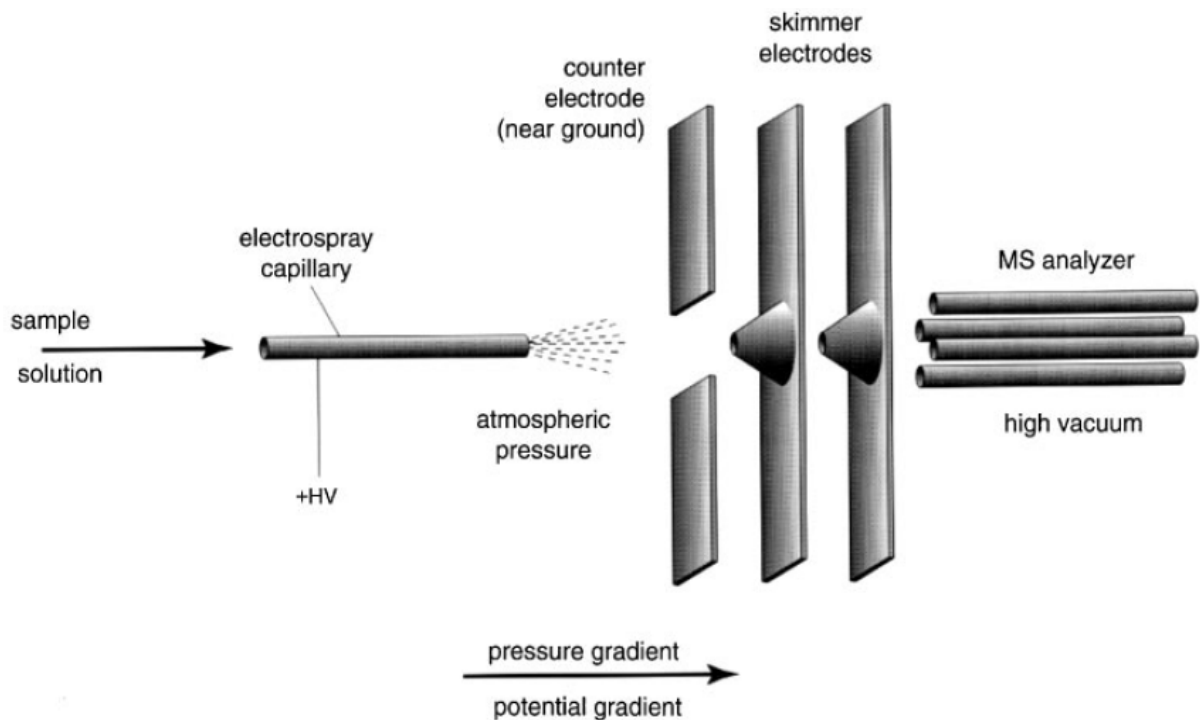


Abb. 7 Wichtige Bestandteile des Elektrospray- Prinzips (GASKELL, 1997)

Die Aerosolbildung wird durch ein angelegtes Potential an der Spitze der Kapillare sowie eine zusätzliche Elektrode bewirkt. Die Aerosoltröpfchen haben einen Durchmesser von maximal 10 μm . Das neutrale Lösungsmittel wird durch ein neutrales Stickstoff Trägergas, welches zusätzlich hilft, den Analyten zu atomisieren, evaporiert. Nach vollständiger Ionisierung des Analyten wird das Lösungsmittel entfernt und die entstandenen Ionen durch ein Loch im Zentrum einer weiteren Elektrode zum Massenspektrometer für die Analyse transferiert (FENN ET AL., 1990,). Während der letzten Jahrzehnte wurden mehrere Techniken und Methoden entwickelt um Siderophorenproduktion zu untersuchen. ESI-MS ist eine Möglichkeit Siderophore sowie beladene Moleküle zu erfassen und quantitativ zu bestimmen.

1.6. Zielstellung

Die Zielstellung dieser Masterarbeit kann in zwei Bereiche eingeteilt werden.

Zum einen wurde schwermetallhaltiger Boden aus der ehemaligen Uranbergbaulandschaft in Ronneburg untersucht. Hierbei wurden Proben auf dem Testfeld „Gessenwiese“ der Friedrich-Schiller-Universität Jena genommen. Das Augenmerk hierbei lag auf dem Vergleich der Siderophorengehalte vor und nach einer Inokulation mit *Streptomyces acidiscabies* E13. Im Hinblick darauf wurde geprüft, inwieweit es grundsätzlich möglich ist Hydroxamate aus Boden zurückzugewinnen, welcher mit Eisen angereichert bzw. in seinem Urzustand belassen wurde.

Zum anderen wurden Untersuchungen mit dem Testorganismus *Streptomyces mirabilis* P16-B1 durchgeführt. Es galt herauszufinden, ob *Streptomyces mirabilis* P16-B1 generell die Fähigkeit besitzt, Siderophoren zu produzieren und welchen Typs diese sind. Weiterhin wurde getestet, ob dieser Organismus Siderophoren in kontaminierten Böden synthetisiert.

Die modifizierte CAS-Agar-Plattenmethode (MILAGRES *ET AL.*, 1999) und die Methode der CAS-Flüssiglösung (ALEXANDER & ZUBERER, 1991) konnten dem qualitativen Nachweis von Siderophoren dienen. Die Detektion des Siderophorentyp wurde mit Hilfe einer Modifikation des Čsaky bzw. Arnow Assays durchgeführt, welche durch TOKALA *ET AL.* (2002) beschrieben wurde. Zur genauen Identifizierung metallgeladener Siderophoren diente Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Materialien

Reagenz	Strukturformel	Hersteller
Agar		Serva, Heidelberg
Ammoniumchlorid	NH ₄ Cl	VEB, GDR
Borsäure	H ₃ BO ₃	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	CaCl ₂	VEB, GDR
Caseinhydrolysat; Casamino Acids		Roth, Karlsruhe
Catechol; Brenzcatechin	C ₆ H ₆ O ₂	Acros, Geel, Belgien
Cetyltrimethylammoniumbromid	CTAB	Roth, Karlsruhe
Chromazurol S; CAS	C ₂₃ H ₁₆ O ₉ Cl ₂ S	Sigma-Aldrich, München
Dikaliumhydrogenphosphat	K ₂ HPO ₄ ,	Merck, Darmstadt
Desferrioxamin E	C ₂₇ H ₄₈ N ₆ O ₉	EMC Microcollections, Tübingen
Eisen(III)chlorid	FeCl ₃	Merck, Darmstadt
Eisen(II)sulfat	FeSO ₄ *7 H ₂ O	Fisher, Loughborough, UK
Essigsäure; Ethansäure	C ₂ H ₄ O ₂	Roth, Karlsruhe
Ethylacetat	C ₄ H ₈ O ₂	Roth, Karlsruhe
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	Roth, Karlsruhe
Glycerin; Propantriol	C ₃ H ₈ O ₃	Serva, Heidelberg
Hydroxylamin	H ₃ NO	Merck, Darmstadt
Jod	I ₂	VEB, GDR
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	KOH	Merck, Darmstadt
Kupfersulfat	CuSO ₄ *5 H ₂ O	Merck, Darmstadt
L-Asparagin Monohydrat		Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	MgSO ₄ *7 H ₂ O	Fisher, Loughborough, UK
Mangan(II)sulfat	MnSO ₄ *H ₂ O	Merck, Darmstadt

Mannitol	$C_6H_{14}O_6$	Merck, Darmstadt
1-Naphthylamin	$C_{10}H_9N$	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	NaCl	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	NaOH	Merck, Darmstadt
Natriummolybdat	$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	Ferak, Berlin
Natriumnitrit	$NaNO_2$	VEB, GDR
Nickelchlorid	$NiCl_2$	Fisher, Loughborough, UK
2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid; MES Puffer		Merck, Darmstadt
Nutrientagar; dehydrated NA		Difco Laboratories, Detroit, USA
Piperazine-N,N-bis[2-ethanesulfonic acid]; PIPES Puffer		Merck, Darmstadt
Salzsäure	HCl	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure	H_2SO_4	Roth, Karlsruhe
Sulfanilsäure	$C_6H_7NO_3S$	Merck, Darmstadt
Tri- Natriumarsenit	Na_3AsO_2	Merck, Darmstadt
Zinksulfat	$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	Merck, Darmstadt

2.2. Probennahme

Die Bodenproben P9908-1, P9908-2 und P9908-3 wurden im September 2008 an drei Standorten in der Nähe des Testfeldes der Universität Jena in Ronneburg, Thüringen genommen. Die genauen Lokationen sind Abb. 8 zu entnehmen. Die Kontrollprobe P9908-K stammt von einem Getreidefeld in der Ortslage Pölzig, welche sich in ca. 20 km Entfernung von Gera, Thüringen befindet. Die Proben wurden in den ersten 10 cm genommen.

Im April 2009 wurde eine zweite Probennahme durchgeführt. Hierbei wurden Mischproben der einzelnen Subplots des Testfeldes genommen (Abb. 8). Wie ersichtlich ist, beschränkte sich die Probennahme auf die drei ursprünglichen Plots,

da sich die, im Herbst 2008 neu angelegten Plots noch in der Aufbauphase befanden.

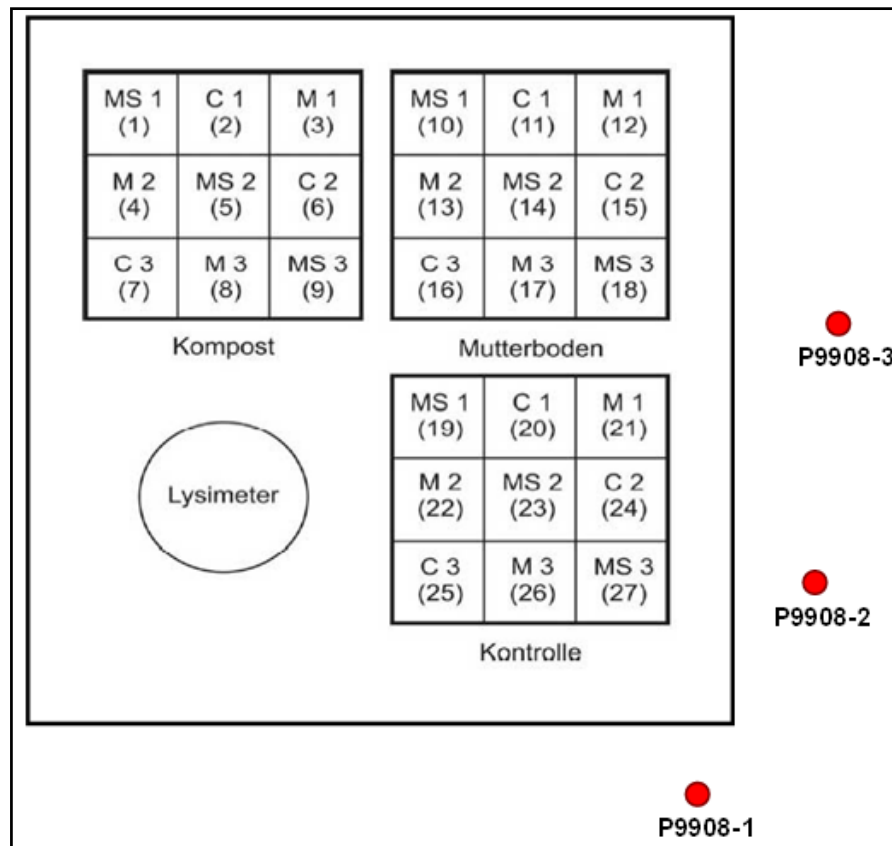


Abb. 8 Lage der einzelnen Subplots und der Probennahmestellen

MS ... Mykorrhiza und *S. acidiscabies* E13

M ... Mykorrhiza

C ... Kontrolle (ohne Inokulation)

Am 15. Mai 2009 fand die erneute Inokulation der Subplots statt. Nach etwa einer Woche wurden erneut Mischproben der einzelnen Subplots genommen. Die Proben wurden jeweils in stabilen Plastikbeuteln bei 4°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

2.3. Stammkonservierung des Testorganismus

Um eine Stammlösung des Testorganismus für weitere Tests zu erhalten war eine Stammkonservierung mit *Streptomyces mirabilis* P16-B1 Zellen nötig. Hierfür wurden je 20 µl Sporensuspension auf Actinomyceten Minimalmedium (AM) ausplattiert und

für 4 Tage bei 28 °C inkubiert. Da *Streptomyces mirabilis* P16-B1 Zellen eine hohe Resistenz gegen Nickel besitzen wurde das AM-Medium (0,25 g L.-Asparagin Monohydrat, 0,325 g K₂HPO₄, 0,1 g MgSO₄*7 H₂O, 0,005 g FeSO₄*7 H₂O, 5 g Glucose and 8 g Agar) mit 200 mmol Nickelchlorid angereichert, was eine Selektierung gewährleistete. Die gewachsenen Sporen wurden mit sterilem *Aqua dest.* und einer Lanzettadel vom Agar gelöst, auf Hafermehlplatten übertragen und für 2 Wochen bei 28 °C inkubiert. Folglich wurden die Zellen mit einer Lanzettadel und sterilem *Aqua dest.* abgeschwemmt und anschließend auf sterile Wattefilter aufgebracht. Die filtrierte Sporenlösung wurde für 10 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert (Heraeus Instrument, Megafuge 1.0 R, Osterode). Das Pelett wurde anschließend 2-mal in 20 %igem Glycerin steril gewaschen, resuspendiert, zu je 200 µl in Eppendorf Tubes aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Als Kontrolle der Stammkonservierung wurde eine Verdünnungsreihe angefertigt um eine Lebendzellzahlbestimmung durchzuführen.

2.4. Indikation der Siderophorenproduktion in flüssigem Medium

Eine Sporensuspension von *Streptomyces mirabilis* P16-B1 wurde für 5 Tage in einem eisenarmen Flüssigmedium (MM9), 1991 beschrieben in ALEXANDER UND ZUBERER, bei 28 °C unter Schütteln inkubiert. Das Medium wurde wie folgt hergestellt. 30,24 g PIPES wurden in 750 ml Salzlösung (0,3 g KH₂PO₄, 0,5 g NaCl, 1 g NH₄Cl) gelöst, der pH auf 6,8 eingestellt bis die Lösung klar wurde und auf 900 ml mit Wasser aufgefüllt. Weiterhin wurde eine Spurenelementlösung hergestellt (in 70 ml Wasser: 2 g Glucose, 2 g Mannitol, 493 mg MgSO₄*7 H₂O, 11 mg CaCl₂, 1,17 mg MnSO₄*H₂O, 1,4 mg H₃BO₃, 0,04 mg CuSO₄*5 H₂O, 1,2 mg ZnSO₄*7 H₂O, 1 mg Na₂MoO₄*2 H₂O) und zusammen mit der Pufferlösung bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert. 30 ml einer 10 %igen Casamino acids wurde bei 0,22 µm steril filtriert und die drei Lösungen wurden vereinigt. Je 100 ml des Mediums wurden in sterile und mit 6 M HCl gewaschene 500 ml Kolben gegeben und ca. 1 ml der hergestellten Sporensuspensionen hinzugegeben. Das Hinzugeben von HCl diente der vollständigen Entfernung restlichen Eisens. Die Inkubation erfolgte für 4 Tage bei 28°C unter konstantem Schütteln. Während der Inkubationszeit wurden jeweils nach 24 h, 72 h und nach 96 h etwa 4 ml des Kulturüberstandes abgenommen. Je 3 ml

wurden für spätere massenspektrometrische Untersuchungen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Je $0,5\text{ ml}$ wurden bei 4000 rpm zentrifugiert und mit $0,5\text{ ml}$ flüssiger Chromazurol-S (CAS) Lösung gemischt (ALEXANDER & ZUBERER, 1991). Die Lösung wurde wie folgt hergestellt. Unter ständigem Rühren und geringer Wärmezufuhr wurden $21,9\text{ mg}$ CTAB in 25 ml Wasser gelöst. $1,5\text{ ml}$ einer $1\text{ mM FeCl}_3 \cdot 6\text{ H}_2\text{O}$ Lösung in 10 mM HCl wurden mit $7,5\text{ ml}$ einer 2 mM CAS Lösung gemischt und dann unter Rühren zu der CTAB Lösung gegeben. Zusätzlich dazu wurde eine Lösung aus $9,76\text{ mg MES}$ Puffer in 50 ml Aqua dest. hergestellt ($\text{pH } 5,6$ mit 50% iger KOH), alles zusammengefügt und auf 100 ml aufgefüllt. Nach 2 Stunden Inkubation der Überstände mit der flüssigen CAS-Lösung unter Lichtabschluss wurde die Absorption bei 630 nm gemessen (Spektrophotometer Genesys 10 UV, Thermo Electron Corp.).

2.5. Indikation der Siderophorenproduktion auf CAS-Agar-Platten

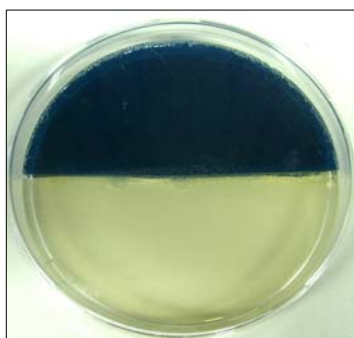


Abb. 9 un- inokulierte
CAS Agar Platte

Um die Siderophorenproduktion in festen Medien zu testen wurde die modifizierte CAS-Agar-Methode, erstmals 1999 beschrieben durch MILAGRES *ET AL.*, verwendet. 60 mg CAS , gelöst in 50 ml Aqua dest. , wurden mit 10 ml einer $1\text{ mM FeCl}_3 \cdot 6\text{ H}_2\text{O}$ in 10 mM HCl Lösung gemischt. $72,9\text{ mg CTAB}$ wurden unter konstantem Rühren und geringer Wärmezufuhr in 40 ml Aqua dest. gelöst, zu der CAS-Lösung hinzugegeben und bei $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 15 Minuten autoklaviert. Zusätzlich dazu wurden 1 l Nutrientagar ($23\text{ g dehydrated NA}$, DIFCO, Detroit) sowie 750 ml einer Pufferlösung, bestehend aus 15 g Agar , $30,24\text{ g PIPES}$ und 12 g einer 50% igen NaOH Lösung autoklaviert ($\text{pH } 6,8$). Nach dem Abkühlen wurden die CAS- sowie die Pufferlösung durch vorsichtige Zugabe vereinigt. Petrischalen wurden mit jeweils 30 ml der blauen Agarlösung befüllt, nach dem Festwerden der Lösung in zwei Hälften geteilt und mit je $15\text{ ml Nutrientagar}$ aufgefüllt (Abb. 9). In Folge dessen wurden $3\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ große mit der jeweiligen Bakterienart bewachsene Agarblöcke auf die Hälfte des Nutrientagars gesetzt mit etwas 5 mm Abstand zu der blauen Plattenhälfte. Die Inkubation erfolgte bei $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ in der Dunkelheit für vier Wochen.

2.6. Detektion des Siderophorentyps

Der CAS Assay gibt keinen Aufschluss über den Typ der Siderophoren, die produziert wurden. Hierfür benötigt man einen Kulturüberstand, welcher dann für folgende Tests herangezogen werden kann. Hydroxamate Siderophoren können mit Hilfe des Čsaky Assays nachgewiesen werden (TOKALA ET AL., 2002).

Um hydroxamate Siderophoren zu detektieren wurden jeweils 0,5 ml Kulturüberstand und un- inokuiertes MM9 Medium mit 0,5 ml 6M H₂SO₄ gemischt und bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert. Weiterhin wurde 1 ml 1 %ige (wt/vol) Sulfanilsäure in 30 %iger (vol/vol) Essigsäure und 0,5 ml 1,3 %iges (vol/vol) Jod in 30 %iger (vol/vol) Essigsäure vereinigt und zu den abgekühlten Proben gegeben. Nach 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Jod durch Zugabe von 1 ml 2 %iger (wt/vol) Na₃AsO₂ Lösung eliminiert. 1 ml 1-Naphthylamin-Lösung (0,3 % [wt/vol] in 30 % Essigsäure [vol/vol]) wurde hinzugegeben und das Volumen auf 10 ml mit *Aqua dest.* aufgefüllt. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 526 nm gemessen. 100 µmol Hydroxylamin dienten als Kontrolle.

Arnow's Assay zur Detektion von Catechol-Siderophoren basiert auf der Tatsache, dass Catechol in Kombination mit salpetriger Säure eine gelbe Farbe ergibt. In Anwesenheit von überschüssiger Natronlauge geht das Gelb in eine orange-rote Farbe über. Un-inokuiertes Medium und Reagenzien wurden als Kontrollen herangezogen, Catechol diente als Positivkontrolle. Folgende Schritte wurden durchgeführt, wobei nach jedem Schritt gemischt wurde. Zu 1 ml Kulturüberstand, sowie Kontrollen wurde 1 ml 0,5 M HCl gegeben, wobei die Mischung farblos blieb. Danach wurde 1 ml Nitrite-Molybdate Reagenz (10 g Natriumnitrit, 10 g Natriummolybdat) hinzugefügt, welches sich in Anwesenheit von Catecholaten gelb verfärbte. Zur vollständigen Überprüfung wurde 1 ml 1M NaOH hinzugegeben, wobei sich Catecholathaltige Lösungen pink bis tief rot anfärbten. Nachdem alle Bestandteile gemischt worden waren, wurde das Volumen auf 5 ml aufgefüllt und die Lösungen standen 5 Minuten bei Raumtemperatur, damit sich die Farbveränderung gänzlich einstellen konnte. Die Absorption wurde bei 526 nm gemessen.

2.7. Test auf Rückgewinnung hydroxamater Siderophoren aus Boden

Um zu testen, welche Konzentration von Siderophoren aus mit Eisen angereicherten Böden zurückgewonnen werden kann, wurde ein sandiger Boden auf Rückgabe getestet. Hierfür wurden zum einen 50 g des Testbodens mit 81,6 µmol einer Siderophorenlösung versetzt. Zum anderen wurden 50 g Boden mit derselben Menge an Eisen sowie Siderophorenlösung vermischt. Als Kontrolle diente die Siderophorenlösung selbst. Die Proben wurden auf pH 8 eingestellt, 30 Minuten geschüttelt und anschließend 60 Minuten bei 4°C inkubiert. Der Überstand wurde bei 14000 g für 10 Minuten zentrifugiert, steril filtriert und anschließend je 0,5 ml mit derselben Menge an CAS-Flüssiglösung für 2 Stunden inkubiert. Die Absorption wurde bei 630 nm gemessen.

2.8. Bodeninkubation

Um die Siderophorenproduktion in kontaminiertem Boden durch *Streptomyces mirabilis* P16-B1 zu untersuchen wurde wie folgt vorgegangen. Je 30 g autoklavierter Boden (121 °C, 15 Minuten) wurde in einer Petrischale mit *Streptomyces mirabilis* P16-B1 Zellen, in *Aqua dest.* bzw. MM9 Medium, beimpft und bei 28 °C für 3 Wochen inkubiert. Als Kontrolle diente autoklavierter Boden, welcher mit *Aqua dest.* bzw. MM9 Medium auf die gleiche Weise inkubiert wurde (3 Wochen, bei 28 °C) sowie unbehandelter autoklavierter Boden als Blindwert.

Nach der Inkubationszeit wurde der Boden mit 30 ml *Aqua dest.* für 30 Minuten geschüttelt und anschließend für 60 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation bei 14000 g (Mikro 200R, Hettich Zentrifugen) wurde der Überstand steril filtriert (0,22 µm) und geteilt (POWELL ET AL., 1980). Etwa 10 ml des Filtrates wurde für die späteren massenspektrometrischen Untersuchungen bei -20 °C gelagert. Das restliche Filtrat wurde für 2 Stunden in der Vakuumzentrifuge (DNA 110, Thermo Savant) konzentriert. Anschließend wurde das Filtrat in 2 ml *Aqua dest.* resuspendiert. Das angelegte Vakuum und gleichzeitig die starke Schwerkraft durch die Zentrifugation erniedrigten den Siedepunkt und das Extrakt wurde am Boden des Tubes gehalten, wodurch Verspritzen beim Sieden vermieden werden

konnte. Nach einer Inkubation mit einer entsprechenden Menge CAS-Flüssiglösung für zwei Stunden im Dunkeln wurde die Absorption bei 630 nm gemessen.

2.9. *Bearbeitung der Subplot-Bodenproben*

Auf dem Testfeld Gessenwiese wurden vor und nach der Inokulation jeweils 27 Proben genommen. Je 25 g der genommenen Bodenproben wurden mit 25 ml *Aqua dest.* 30 Minuten bei 4 °C geschüttelt und anschließend für 60 Minuten inkubiert. Der Überstand wurde für 10 Minuten bei 14000 g zentrifugiert, steril filtriert und bei -20 °C für die spätere massenspektrometrische Analyse aufbewahrt.

2.10. *Probenextraktion als Vorbereitung auf die ESI-MS Messung*

Je 0,5 ml der flüssigen Proben wurden mit derselben Menge an Ethylacetat für 10 Minuten auf einem Vortex gemischt, um die zu messenden Komplexe zu extrahieren (DERTZ ET AL., 2006). Anschließend wurde die obere organische Phase abgenommen und in ein sauberes Eppendorf Tube gegeben. Dieser Vorgang wurde mit der anorganischen Phase dreimal wiederholt und die organischen Phasen vereinigt. Um überschüssiges Restwasser in der Probe zu entfernen, welches den Peak stören würde, wurde Magnesiumsulfat hinzugegeben, bis weiße Flocken ausfielen. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 14000 g wurde der Überstand abgenommen und in ein sauberes Eppendorf Tube überführt. Schließlich wurde das Extrakt für etwa 45 Minuten in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Je nach erwartetem Siderophorengehalt wurde das Extrakt in 1 ml, 500 µl bzw. 100 µl resuspendiert. Die Proben wurden in kleine Probenfläschchen überführt und in den Sampler der ESI-MS gestellt. Das verwendete Massenspektrometer war ein "Thermoscientific Linear Ion Trap Mass Spectrometer", gekoppelt mit einer Elektrospray-Ionisationsquelle (Thermoscientific LTQ XL, Deutschland). Das verwendete Lösungsmittel bestand aus Acetonitril und *Aqua dest.*, welche in verschiedenen Konzentrationen, je nach Zeitpunkt der Analyse vorhanden waren (Abb. 10). Die Auftrennung erfolgte über eine Säule zur Gradientenelution (reversed-phase), welche mit einer Vorsäule gekoppelt wurde sowie Acetonitril und *Aqua dest.* als Reagenzien. Die endverschlossene Säule hatte einen Innendurchmesser von 2,1 mm und eine Länge

von 10 cm. Das auftrennende Substrat war Kieselgel (Korngröße: 3,5 µm) mit einer Porengröße von 100 Å (WATERS, Deutschland).

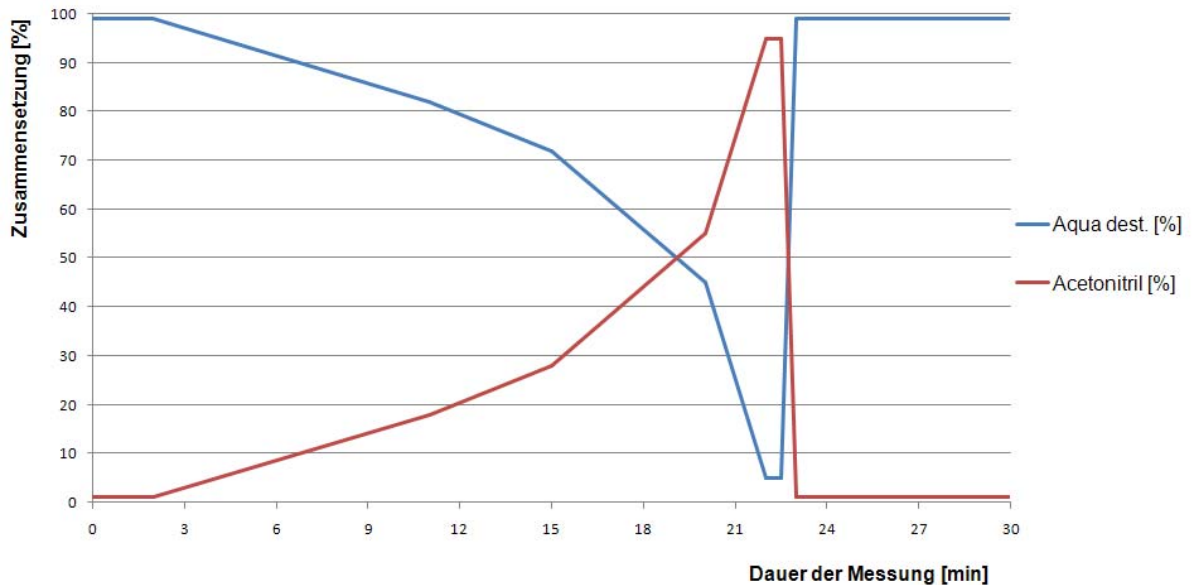


Abb. 10 Lösungsmittelzusammensetzung während der ESI- MS Messung

2.11. Quantifizierung des DFOE Gehalts

Hochreines DFOE diente als Ausgangspunkt, um den Gehalt an DFOE und FOE in den Proben, welche von *Streptomyces mirabilis* P16-B1 beeinflusst wurden, zu quantifizieren. Das DFOE wurde erst in 20 µl warmen Wasser gelöst und schließlich mit 800 µl Methanol auf 1 ml aufgefüllt um eine Stammlösung mit 1 mg/ ml DFOE herzustellen. Anschließend wurde mit Methanol auf 100 µmol/ml DFOE verdünnt und schließlich Konzentrationen von 1 µmol/ml; 2,5 µmol/ml; 5 µmol/ml; 10 µmol/ml und 20 µmol/ml hergestellt.

Um die Stammlösung für FOE herzustellen, wurde ähnlich vorgegangen mit dem Unterschied, dass zu der 100 µmol/ml Lösung 200 µmol FeCl₃ gegeben wurden. Die gemessenen Lösungen für die Standardkurven waren 0,1 µmol/ml; 0,5 µmol/ml; 1 µmol/ml; 5 µmol/ml und 10 µmol/ml. Zusammen mit den zu quantifizierenden Proben wurden die Lösungen anschließend mittels ESI-MS gemessen um eine Eichgrade zu erstellen.

3. Ergebnisse

3.1. Siderophorenproduktion durch *Streptomyces mirabilis* P16-B1

Die Fähigkeit zur Siderophorenproduktion von *Streptomyces mirabilis* P16-B1 wurde durch die CAS-Agar-Platten-Methode getestet. Nach 7 bis 9 Tagen konnte eine Verfärbung nachgewiesen werden (Abb. 11). Die Farbreaktion von blau zu orange in der CAS-Agarhälfte resultiert aus einer Komplexveränderung des CAS-Eisen-CTAB-Komplex, welche durch die Anwesenheit von Siderophoren hervorgerufen wurde. Da Nutrientagar nur sehr wenig Eisen enthält produzieren die Mikroorganismen Siderophoren und Eisen aus dem Medium bzw. der Agarhälfte aufzunehmen. Da diese eine wesentlich höhere Affinität für Eisen hat, wird es aus dem Komplex entfernt, was die Farbveränderung des CAS-Indikators bewirkt.

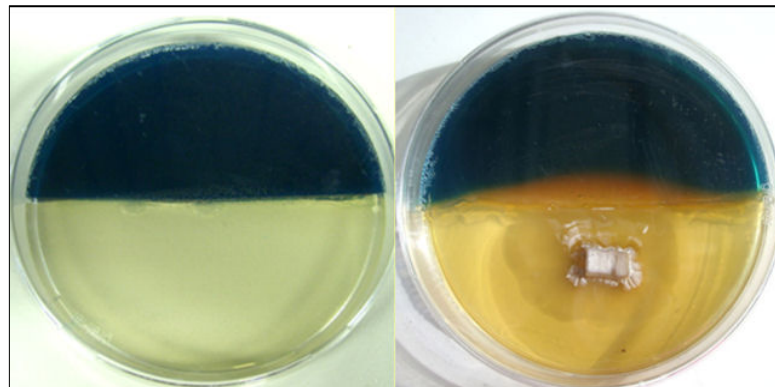


Abb. 11 un-inokulierte und inokulierte CAS-Agar-Platte nach 4 Wochen Inkubation mit *Streptomyces mirabilis* P16-B1

Da also quantitativ das Vorhandensein von Siderophoren in *Streptomyces mirabilis* P16-B1-Kulturen gezeigt werden konnte, sollte der Typ der gebildeten Siderophoren bestimmt werden. Dazu wurde nach 5 Tagen Inkubation von *Streptomyces mirabilis* P16-B1 in eisenarmen Flüssigmedium der Überstand auf die Anwesenheit von Hydroxamaten (Čsaky Assay) getestet (Tab. 1). Unter den gegebenen Versuchsbedingungen produzierte der Testorganismus weniger als 100 μmol Hydroxamate.

Tab. 1 Gemessene Absorptionen eines Kulturüberstandes von *Streptomyces mirabilis* P16-B1 und die dazu berechneten Gehalte an hydroxamaten Siderophoren

	R1 [A]	R2 [A]	R3 [A]	MW [A]	Gehalt [$\mu\text{mol/ml}$]
Standard	1,584	1,603	1,556	1,581	100
Kulturüberstand	1,277	1,402	1,358	1,346	85,11

Zusätzlich wurden nach 24 h, 72 h und 96 h je 1 ml des Kulturüberstands genommen, welche zum einen mit CAS-Flüssiglösung inkubiert und gemessen und zum anderen mit ESI-MS getestet wurden.

Der Siderophorengehalt nach der Inkubation mit CAS-Flüssiglösung für zwei Stunden im Dunkeln wurde mit Hilfe einer erstellten Standardkurve folgendermaßen berechnet (Abb. 12).

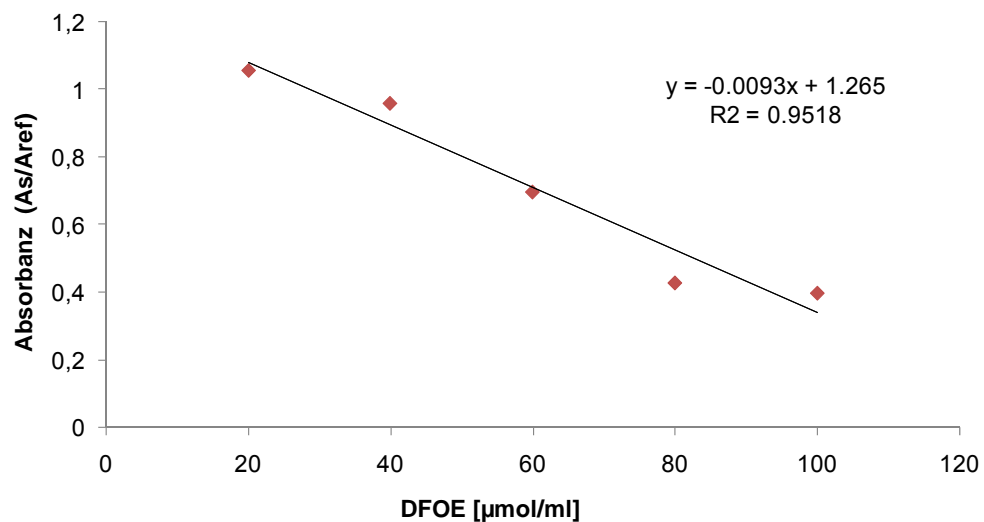


Abb. 12 Standardkurve zur DFOE Berechnung mit Hilfe der CAS-Flüssiglösung

$$y = \frac{\text{Absorption der Probe (a/s)}}{\text{Absorption der Referenz (a/ref)}}$$

$$\text{mit } a/\text{ref} = 1,015$$

Die berechneten Siderophorenkonzentrationen sind Tab. 2 zu entnehmen. Der Gesamtsiderophorengehalt stieg während des Wachstums erheblich an. Nach 24 h

war er noch so gering, dass er nicht mittels CAS-Flüssiglösung detektiert werden konnte. Bereits 48 h später lag er bei etwa 72 $\mu\text{mol/ml}$ und weitere 24 h später war er im Durchschnitt auf 77 $\mu\text{mol/ml}$ gestiegen.

Tab. 2 Mittels CAS-Flüssiglösung berechnete Siderophorengehalte nach 24 h, 72 h und 96 h Inkubation von *Streptomyces mirabilis* P16-B1 in MM9 Medium

	a/s [A]	y	SCF [$\mu\text{mol/ml}$]
24h_1	1,923	1,895	-67,70
24h_2	1,871	1,843	-62,19
24h_3	1,915	1,887	-66,85
72h_1	0,632	0,623	69,07
72h_2	0,621	0,612	70,23
72h_3	0,546	0,538	78,18
96h_1	0,56	0,552	76,70
96h_2	0,497	0,490	83,37
96h_3	0,612	0,603	71,19

Die Anwesenheit von Catecholaten wurde ebenso mit dem Kulturüberstand getestet, wobei Catechol als Standard diente. Die Produktion von Catecholaten konnte nicht nachgewiesen werden. Der Kulturüberstand (P16), un- inokuliertes Medium (MM9; MM9+Fe) sowie eine Probe mit zugefügtem Eisen (P16+Fe) zeigten weder eine gelbe Farbe in Verbindung mit zugegebener salpetriger Säure noch eine pinke Farbe nach der Zugabe von NaOH. Lediglich Catechol zeigte die erwartete Farbreaktion (Abb. 13).

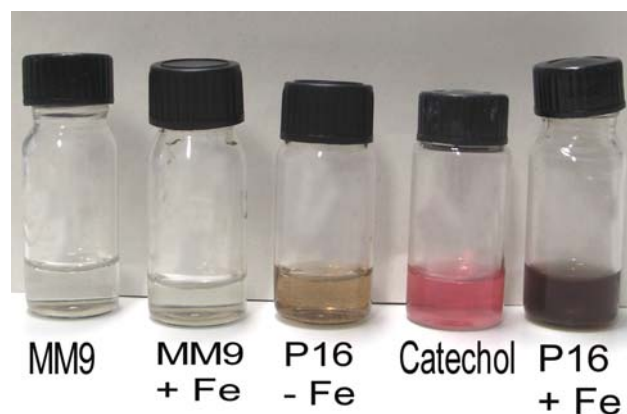


Abb. 13 Test auf catecholaten Siderophoren

Über die quantitative Messung und der Bestimmung des Typs der Siderophoren hinaus war interessant, welche Hydroxamate produziert wurden, was mit Hilfe von ESI-MS bestimmt werden konnte (Tab. 3).

Tab. 3 Mittels ESI-MS bestimmte Siderophorengehalte nach 24 h, 72 h und 96 h Inkubation von *Streptomyces mirabilis* P16-B1 in MM9 Medium

Probe	DFOE			FOE		
	AA	STABW	STD Fehler	AA	STABW	STD Fehler
P16 24h	13.807			10.629		
	16.749			10.050		
	10.968	2.890,65	1.668,92	12.320	1.179,52	681,00
P16 72h	8.105.495			772.415		
	7.747.123			996.662		
	7.968.844	180.860,99	104.420,14	18.521	512.413,03	295.841,80
P16 96h	1.527.001			240.303		
	1.501.895			207.167		
	114.361.500			9.364.162		
	107.008.080			10.790.079		
	1.515.823	59.851.301	26.766.315,5	231.544	5.419.010,71	2.423.455,26

Probe	DFOB			FOB		
	AA	STABW	STD Fehler	AA	STABW	STD Fehler
P16 24h	4.437			524.854		
	3.178			565.891		
		890,25	513,98	572.324	25.751,44	14.867,60
P16 72h	3.066			118.621		
	1.414			148.240		
	3.287	1023,56	590,95	139.641	15.237,39	8.797,31
P16 96h				264.379		
	2.500			248.097		
	2.967			425.009		
				138.216		
		330,22	147,68	237.126	103.332,574	46.211,73

Probe	Cch			Fe-Cch		
	AA	STABW	STD Fehler	AA	STABW	STD Fehler
P16 24h	6.005			13.774		
	6.281			18.192		
	6.124	138,44	79,93	24.843	5.571,91	3.216,95
P16 72h	76.499					
	86.142					
	93.066	8.320,60	4.803,90			
P16 96h	59.782			107.905		
	51.804			106.569		
	94.330			38.555		
	49.532			91.133		
	55.936	18.343,5743	8.203,49	97.404	28.651,29	12.813,25

Die Analyse des Kulturüberstandes ergab, dass vor allem ein hoher Gehalt an DFOE gebildet wurde. DFOB, FOB und Cch waren nur sehr gering vorhanden. Generell stiegen die Hydroxamatkonzentrationen mit der Zeit an (Abb. 14.).

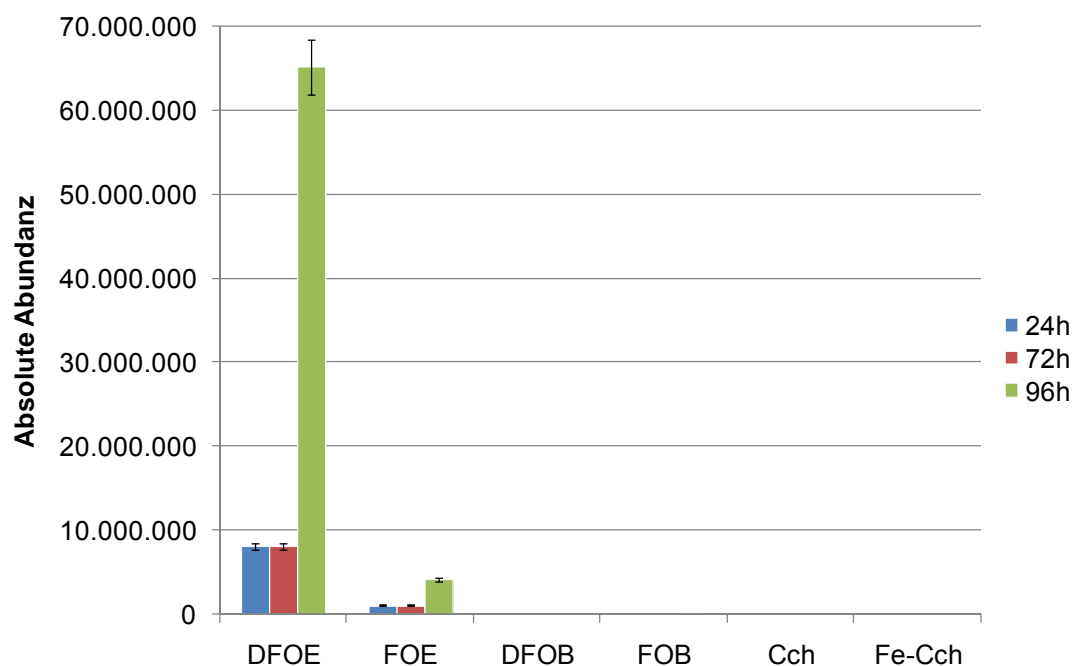


Abb. 14 Siderophorengehalt des Überstandes von *S. mirabilis* P16-B1 nach 24 h, 72 h und 96 h Inkubation in MM9 Medium

Zur Bestimmung der DFOE- und FOE-Konzentration mit Hilfe von ESI-MS wurden mit hochreinem DFOE folgende Eichgraden erstellt (Abb. 15).

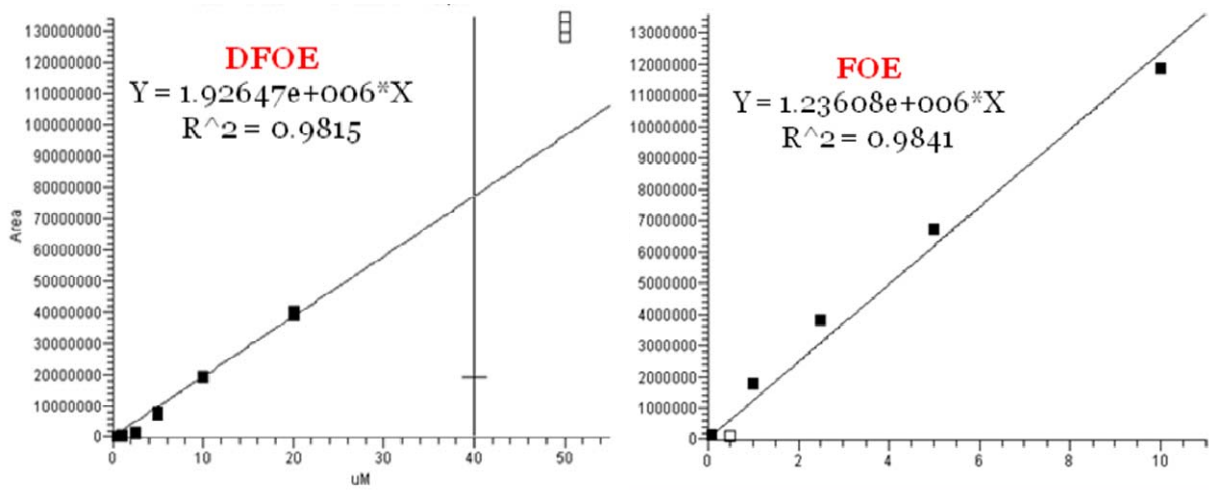


Abb. 15 Eichgraden zur Bestimmung des DFOE und FOE Gehaltes mittels ESI- MS

Tab. 4 Berechnete DFOE und FOE Konzentrationen nach 24 h, 72 h und 96 h Inkubation in MM9 Medium

Zeit [h]	DFOE			FOE		
	MW [µmol/ml]	STABW [µmol/ml]	STD Fehler [µmol/ml]	MW AA [µmol/ml]	STABW [µmol/ml]	STD Fehler [µmol/ml]
24	0,0237	0,0108	0,0062	0,0144	0,0022	0,0013
72	12,5748	0,7074	0,4084	1,6253	0,0211	0,0122
96	44,7310	6,1352	3,5422	2,5192	0,1495	0,0863

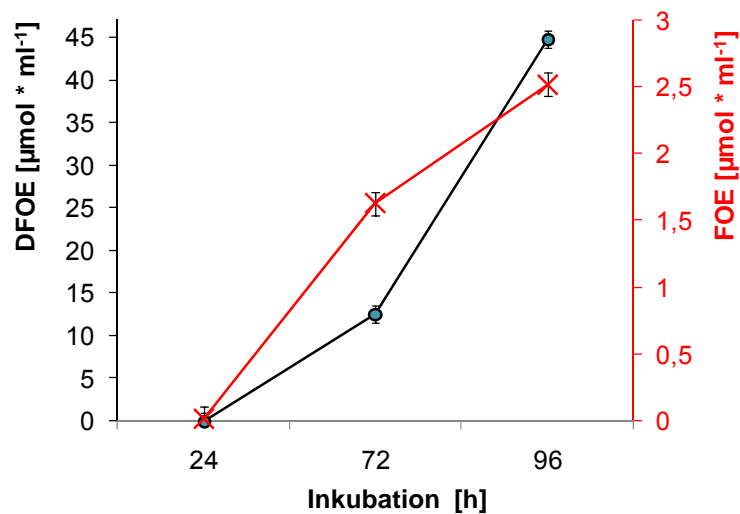


Abb. 16 Berechnete DFOE und FOE Konzentrationen nach 24 h, 72 h und 96 h Inkubation von *Streptomyces mirabilis* P16-B1 in MM9 Medium

Die Analyse der Proben zeigte, dass Siderophore während des Wachstums gebildet wurden, sodass die Konzentrationen erheblich anstiegen (Tab. 4). Lagen sie nach 24 h noch bei 0,024 $\mu\text{mol/ml}$ (DFOE) und 0,014 $\mu\text{mol/ml}$ (FOE) waren sie 48 h später bereits auf 12,575 $\mu\text{mol/ml}$ (DFOE) und 1,625 $\mu\text{mol/ml}$ (FOE) angestiegen und schließlich nach insgesamt 96 h Inkubation konnte eine Konzentration von 44,731 $\mu\text{mol/ml}$ (DFOE) und 2,519 $\mu\text{mol/ml}$ (FOE) festgestellt werden (Abb. 16).

3.2. Zurückgewinnung von hydroxamaten Siderophoren aus Boden

Ein sandiger Testboden wurde auf Rückgewinnung hydroxamater Siderophore getestet. Dazu wurden definierte Siderophorenkonzentrationen von 81,6 μmol (-Fe) zugesetzt, wobei eine Probe mit derselben Menge an Eisen inkubiert wurde (+Fe). Als Standard diente eine gegebene Siderophorenlösung (SCF). Es zeigte sich, dass nur ca. 30 % der zugesetzten Siderophoren aus dem Boden zurückgewonnen werden konnte (Tab. 5). Zusätzlich hinzugegebenes Eisen resultierte in einer negativen Gehaltsberechnung, verringerte also die Rückfindungsrate nochmal erheblich. Die Absorption der Kontrolllösung ergab 77,18 μmol , also 94 % des realen Gehaltes, sodass der Verlust nicht mit generellen methodischen Schwierigkeiten erklärt werden kann.

Tab. 5 Zurückgewonnene Siderophorengehalte aus sandigen Testböden

	R1 ^{a)} [A]	cSCF ^{b)} [$\mu\text{mol/ml}$]	R2 [A]	cSCF [$\mu\text{mol/ml}$]	R3 [A]	cSCF [$\mu\text{mol/ml}$]	MW [$\mu\text{mol/ml}$]
Fe-	1,043	25,53	1,058	23,94	1,051	24,68	24,72
Fe+	1,437	-16,21	1,465	-19,18	1,251	3,493	-10,63
SCF	0,528	80,09	0,536	79,24	0,603	72,14	77,16

a) ... gemessene Absorbanz

b) ... berechneter Siderophorengehalt

3.3. Siderophorenproduktion durch *Streptomyces mirabilis* P16-B1 in schwermetallhaltigem Boden

Um die Siderophorenproduktion in schwermetallbelasteten Böden zu untersuchen, wurde die Siderophoren aus unbehandelten und mit *Streptomyces mirabilis* P16-B1 inkubierten Bodenproben mit *Aqua dest.* gelöst und massenspektrometrisch analysiert (Tab. 6).

Tab. 6 Mittels ESI-MS gemessene Siderophorengehalte in den unbehandelten Bodenproben

Probe	DFOE AA	FOE AA	DFOB AA	FOB AA	Cch AA	Fe-Cch AA
P9908-1			59.796			
P9908-2	433.326	1.882.276				
P9908-3	100.536	584.839			48.872	
P9908-K	16.532.932	260.016.967	5.093.387	136.460.100	71.496	945.843

In den unbehandelten Bodenproben fand sich vor allem ein hoher Gehalt an DFOE und FOE hingegen nur ein geringer Teil an DFOB, FOB, Cch und Fe-Cch (Abb. 17).

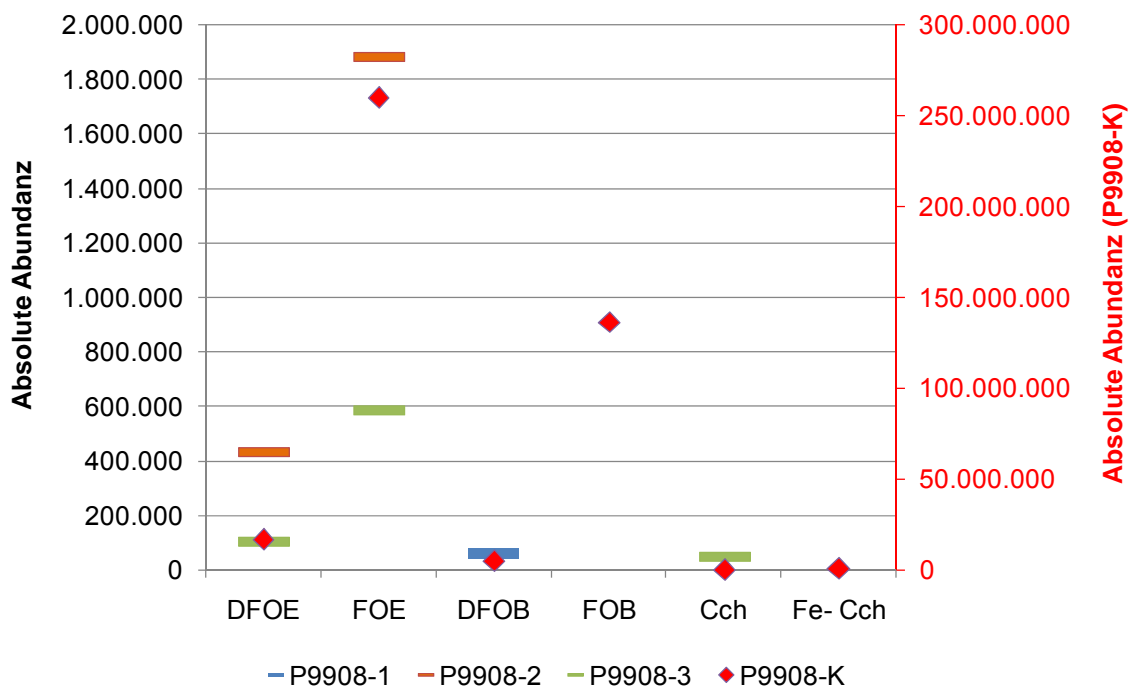


Abb. 17 Mittels ESI-MS gemessene Siderophorengehalte in den unbehandelten Bodenproben

Trotz der relativ gleichen Probenahmestelle sind die drei Bodenproben sehr unterschiedlich. Probe P9908-2 beinhaltet wesentlich mehr DFOE und FOE, wobei in Probe P9908-1 nur ein geringer Anteil an DFOB nachgewiesen werden konnte. Probe P9908-3 war die einzige der Proben, in der Cch messbar war. In der Kontrollprobe P9908-K, welche außerhalb des Einzugsgebietes der Bergbauregion genommen wurde, fanden sich alle Siderophoren, auf die untersucht wurden. Die absoluten Abundanzen waren bedeutend höher (bis zu 100-mal so hoch), als bei den anderen Bodenproben.

Die mit *Streptomyces mirabilis* P16-B1 für drei Wochen inkubierten Bodenproben wurden ebenso mit *Aqua dest.* extrahiert und ein Teil mit CAS-Flüssiglösung inkubiert, allerdings konnte kein Unterschied zwischen den Kontrollen und den Proben beobachtet werden. Der andere Teil wurde mit ESI-MS analysiert (Tab. 7).

Tab. 7 Mittels ESI-MS gemessene Siderophorengehalte in den behandelten Bodenproben

Probe	DFOE			FOE		
	AA	STABW	STD Fehler	AA	STABW	STD Fehler
BP Blank MM9						
BP Blank H ₂ O						
BP+P16+MM9						
				684		
BP+P16+H ₂ O				5.856		
				5.189		
				2.126	1989,13	1148,42
Auto BP						
	16.702					

Probe	DFOB			FOB		
	AA	STABW	STD Fehler	AA	STABW	STD Fehler
BP Blank MM9	2.678			8.674		
	2.501					
	2.299	189,63	109,49	6.808	1319,46	761,79
BP Blank H ₂ O				6.531		
				1.281		
				4.767	2671,65	1542,48
BP+P16+MM9				131.139		
	2.156			142.089		
	2.195	27,58	15,92	130.383	6551,14	3782,30
BP+P16+H ₂ O	150.847			165.363		
				175.036		
	166.366	10973,59	6335,61	74.349	55550,26	32071,96
Auto BP				67.575		
				64.196		
				63.857	2055,73	1186,88

Probe	Cch			Fe-Cch		
	AA	STABW	STD Fehler	AA	STABW	STD Fehler
BP Blank MM9						
BP Blank H ₂ O						
	1.786					
BP+P16+MM9	744			2.476		
				836	1159,66	669,53
BP+P16+H ₂ O				1.721		
				524		
				4.514	2047,51	1182,13
Auto BP	16.640					
	17.245					
	21.231	2494,38	1440,13			

In den mit *Streptomyces mirabilis* P16-B1 inkubierten Proben konnte vor allem ein hoher Gehalt an DFOB und FOB festgestellt werden, wobei diese bei der Inkubation mit *Aqua dest.* am höchsten waren. Auffällig aber ist, dass der Peak für DFOE und Cch bei dem ausschließlich autoklavierten Boden höher war, als bei den inkubierten Proben (Abb. 18).

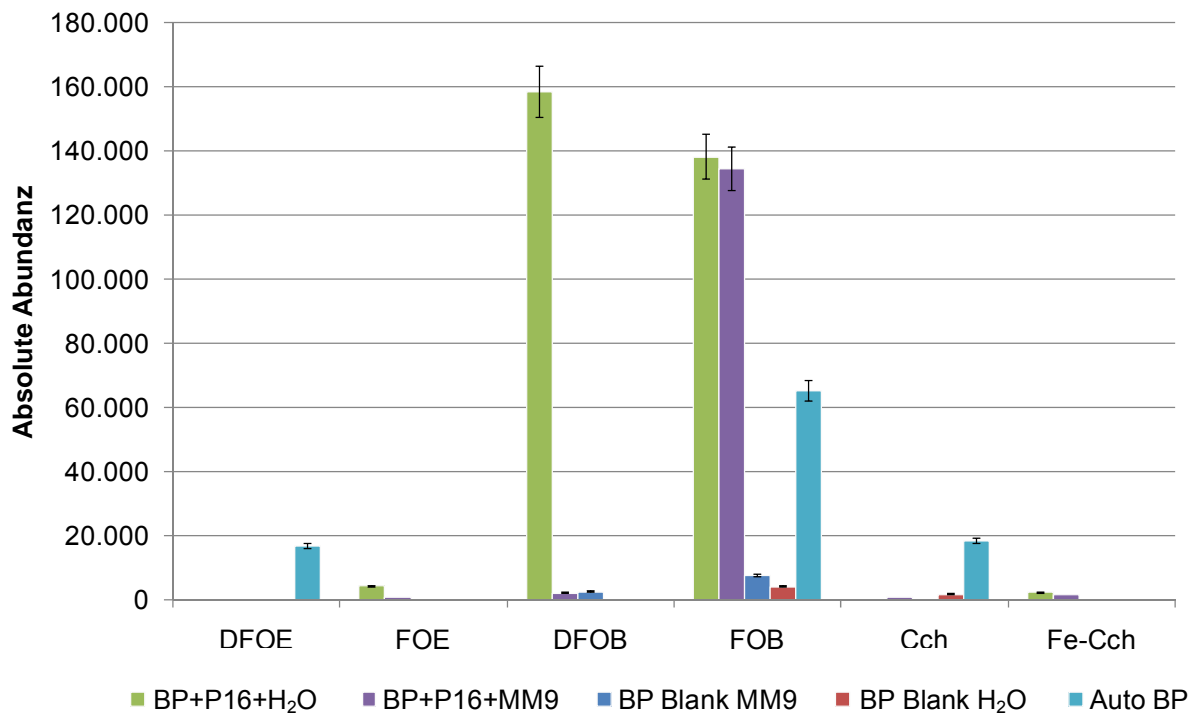


Abb. 18 Mittels ESI-MS bestimmter Siderophorengehalt in den behandelten Bodenproben und Kontrollen

BP+P16+ H₂O ... Bodenprobe + *S. mirabilis* P16-B1 und *Aqua dest.*

BP+P16+MM9 ... Bodenprobe + *S. mirabilis* P16-B1 und MM9

BP Blank MM9 ... Bodenprobe + *Aqua dest.*

BP Blank H₂O ... Bodenprobe + MM9

Auto BP ... autoklavierte Bodenprobe

Die Quantifizierung der DFOE und FOE Konzentration bestätigte dieses Ergebnis (Abb. 19). Der DFOE Gehalt in der autoklavierten Bodenprobe war um ein zehnfaches höher als in den restlichen Proben. Weiterhin war die Konzentration an FOE in sämtlichen Proben um eine Zehnerpotenz höher als die Konzentration an DFOE (Tab. 8).

Tab. 8 Berechnete DFOE und FOE Konzentrationen in den behandelten Bodenproben

Probe	DFOE			
	Konzentration [$\mu\text{mol/ml}$]	MW [$\mu\text{mol/ml}$]	STABW	STD Fehler
BP+P16+H ₂ O	0,000429			
	0,001256			
	0,000924	0,000870	0,000416	0,000240
BP+P16+MM9	0,000787			
	0,000645			
	0,000420	0,000617	0,000185	0,000107
BP Blank H ₂ O	0,000783			
	0,000601			
	0,000508	0,000630	0,000140	0,000081
BP Blank MM9	0,001202			
	0,000603			
	0,000583	0,000796	0,000352	0,000203
Auto BP	0,000784			
	0,001841			
	0,002239	0,001621	0,000752	0,000434

Probe	FOE			
	Konzentration [$\mu\text{mol/ml}$]	MW [$\mu\text{mol/ml}$]	STABW [$\mu\text{mol/ml}$]	STD Fehler [$\mu\text{mol/ml}$]
BP+P16+H ₂ O	0,011148			
	0,013000			
	0,008000	0,010716	0,002528	0,001459
BP+P16+MM9	0,003256			
	0,006000			
	0,004000	0,004419	0,001419	0,000819
BP Blank H ₂ O	0,000553			
	0,002000			
	0,001000	0,001184	0,000741	0,000428

Probe	FOE			
	Konzentration [$\mu\text{mol/ml}$]	MW [$\mu\text{mol/ml}$]	STABW [$\mu\text{mol/ml}$]	STD Fehler [$\mu\text{mol/ml}$]
BP Blank MM9	0,000290			
	0,001000			
Auto BP	0,001000	0,000763	0,000410	0,000237
	0,00167			
	0,001000			
	0,001500	0,000889	0,000673	0,000389

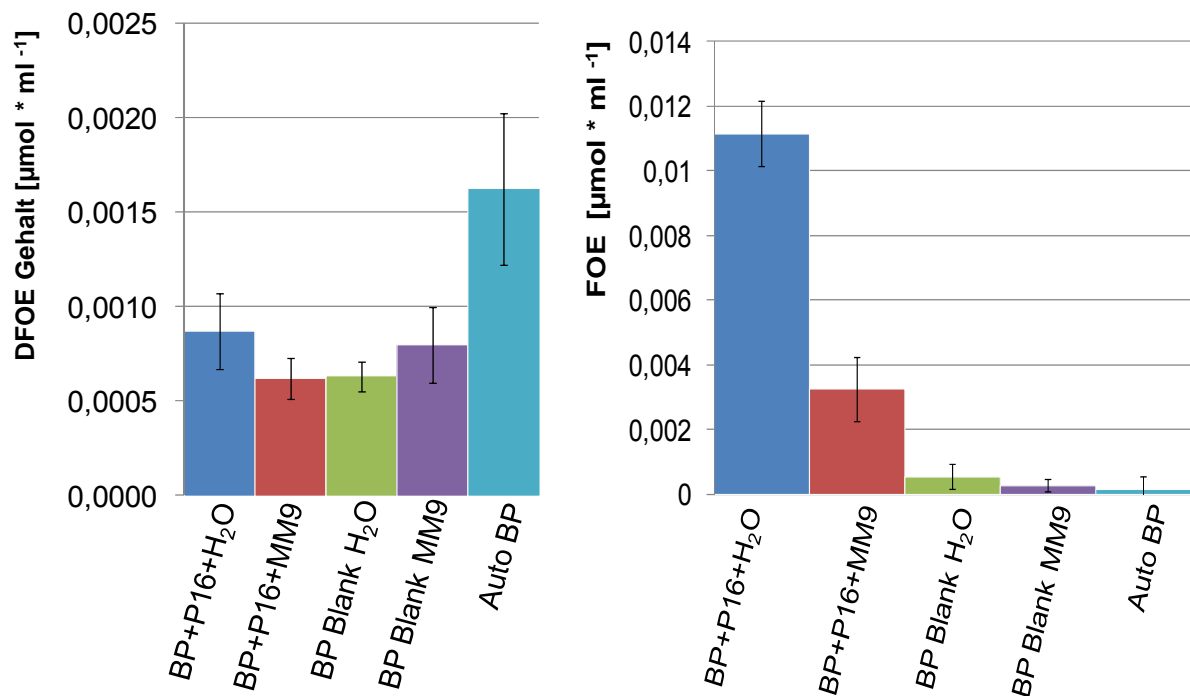


Abb. 19 Berechnete DFOE und FOE Konzentrationen in den behandelten Bodenproben und Kontrollen

BP P16 H₂O ... Bodenprobe + *S. mirabilis* P16-B1 und *Aqua dest.*

BP P16 MM9 ... Bodenprobe + *S. mirabilis* P16-B1 und MM9

BP Blank MM9 ... Bodenprobe + *Aqua dest.*

BP Blank H₂O ... Bodenprobe + MM9

Auto BP ... autoklavierte Bodenprobe

3.4. Vergleich der Siderophorengehalte der Subplot-Bodenproben vor und nach der Inokulation

Die Subplots des Testfelds „Gessenwiese“, welches u. a. zur Untersuchung des Pflanzenwachstums dient, werden in regelmäßigen Abständen mit Mykorrhiza und *Streptomyces acidiscabies* E13 beimpft. Um die Gehalte der Siderophoren in den Subplot-Bodenproben zu vergleichen, wurden die Proben vor und eine Woche nach der Inokulation auf identische Weise behandelt, eine Bodenlösung hergestellt und schließlich extrahiert für die anschließende ESI-MS Messung (Tab. 9). Die Analyse lieferte unterschiedliche Ergebnisse (Abb. 20 - Abb. 22).

Generell ist zu sehen, dass verschiedenere Hydroxamate vor der Inokulation detektiert werden konnten als danach, wobei vor allem in den Subplots mit Mutterboden die Intensitäten höher waren. So sind beispielsweise die Gehalte in den Subplots mit Mykorrhiza und *S. acidiscabies* E13 (MS) Beimpfung sowie in dem Kontrollplot (Kt) als auch in dem Plot mit Mutterboden (Mb) um ein mehrfaches höher als nach der Inokulation. In den Kompostplots (Kp) kann dieses Bild nicht bestätigt werden, da hier in den MS Plots die Peaks vor der Inokulation geringer sind als danach. Die Subplots des Kontrollplots zeigten z. T. geringere Peaks als die Plots mit Mutterboden und Kompost.

In allen Proben konnte Cch, hingegen in keiner Probe DFOB und FOB festgestellt werden. Teilweise konnte ein Peak von Fe-Cch festgestellt werden. Die Hydroxamatgehalte zeigten sich z. T. vor der Inokulation (Kt C1, Kp C1, Kp M1, Kp C2) z. T. danach (Kt M1, Kp M2, Kp M3, Kp MS3, Mb M2, Mb C3) oder bei beiden Proben (Mb MS2, Mb M3). Alle anderen Proben zeigten keine Peaks für Fe-Cch. DFOE Peaks konnten nur vor der Inokulation festgestellt werden (Kt C3, Kt M3, Kt MS3, Kt MS2, Kp M1, Kp M2, Kp C2, Mb MS2, Mb C3, Mb M3 Mb MS3). Der höchste Peak (Cch) zeigte sich in einer Probe des Plots mit Mutterboden. Auffällig hierbei ist allerdings, dass der Hydroxamatgehalt auf einem Subplot erschien, welcher nicht inokuliert wurde und somit nur als Kontrolle diente.

Da in dem Testfeldboden generell auch andere Schwermetalle, wie beispielsweise Nickel und Cadmium enthalten sind, wurde die Analyse auch auf andere Siderophor-Komplexe erweitert. Obwohl solche Komplexe mit hoher Wahrscheinlichkeit im Boden vorhanden sind, konnten keinerlei Gehalte mittels ESI-MS nachgewiesen

werden. Alles in allem konnte kein Muster festgestellt werden um den Unterschied zwischen den Siderophoregehalten vor und nach der Inokulation zu charakterisieren.

Tab. 9 Mittels ESI-MS gemessene Siderophoregehalte der Subplot-Bodenproben

	Prä- Inokulation						Post- Inokulation						
	Kontrollplot												
	DFOE	FOE	DFOB	FOB	Cch	Fe-Cch	DFOE	FOE	DFOB	FOB	Cch	Fe-Cch	
	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	
MS 1					2.878							707	
C 1					4.792							1.559	
M 1		698			3.448							1.536	651
M 2					4.630	1.036						442	
MS 2					4.225							448	
C 2					3.363							1.191	
C 3		885										68	
M 3												385	
MS 3					3.107							373	
	Plot mit Mutterboden												
MS 1					7.407							828	
C 1					9.803							772	
M 1					656							740	
M 2					9.954							1.181	351
MS 2	2.265				8.504	1.653						872	734
C 2					6.940							840	
C 3					5.583		504					950	878
M 3	973				14.233	2.332						730	568
MS 3	1.117				18.402							959	
	Plot mit Kompost												
MS 1					735							892	
C 1					15.165	465						748	
M 1	742				16.365	2.273						864	
M 2	1.127				27.660							929	589
MS 2					714							838	
C 2	1.398				26.162	1.245						1.250	
C 3					10.677							873	
M 3					10.291							945	1.427
MS 3					439							1.474	645

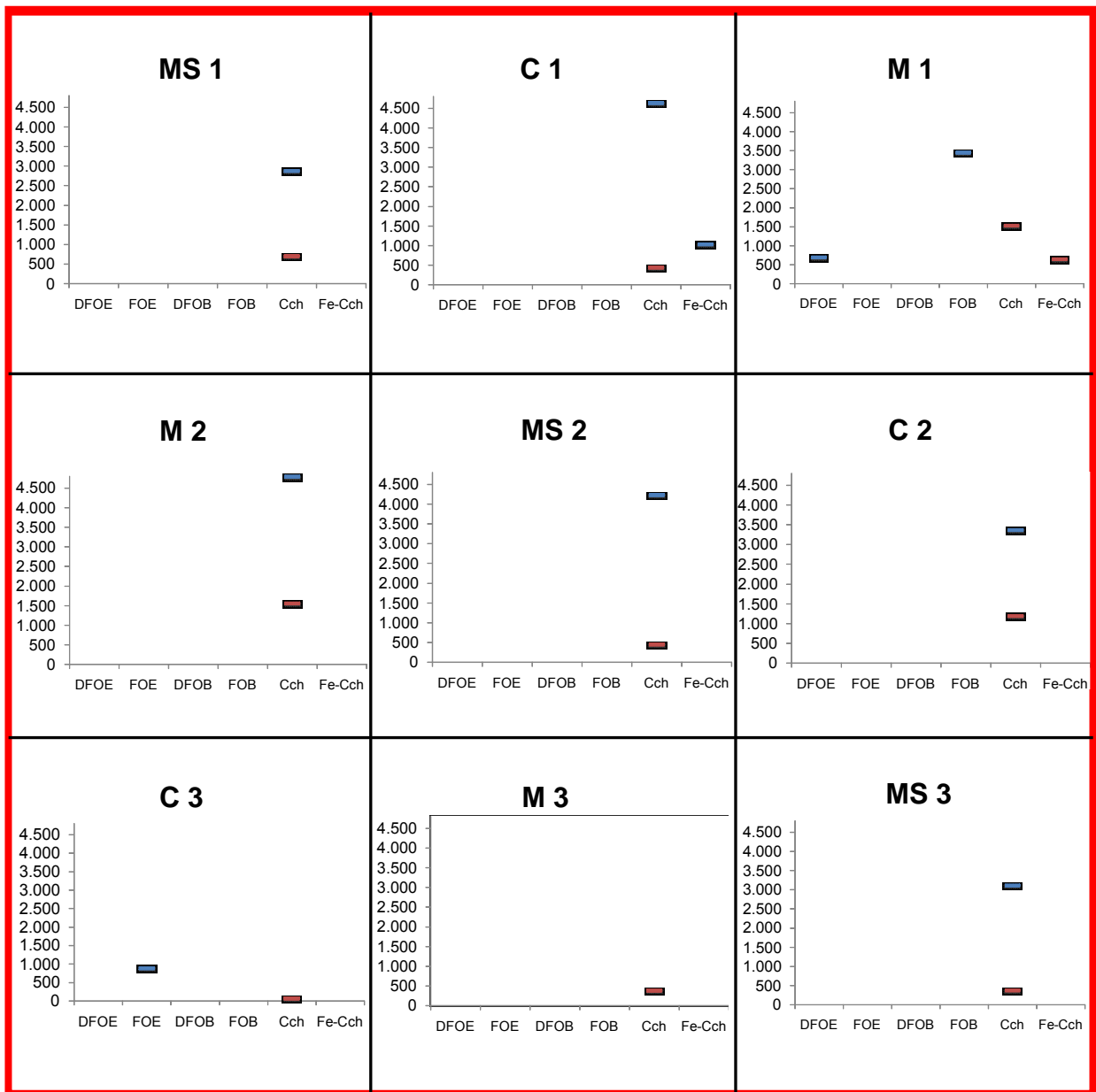


Abb. 20 Siderophorengehalte in den Subplot- Bodenproben des Kontrollplots vor und nach der Inokulation

- der Inokulation
- nach der Inokulation

MS ... Mykorrhizza und *S. acidiscabies* E13

M ... Mykorrhizza

C ... Kontrolle

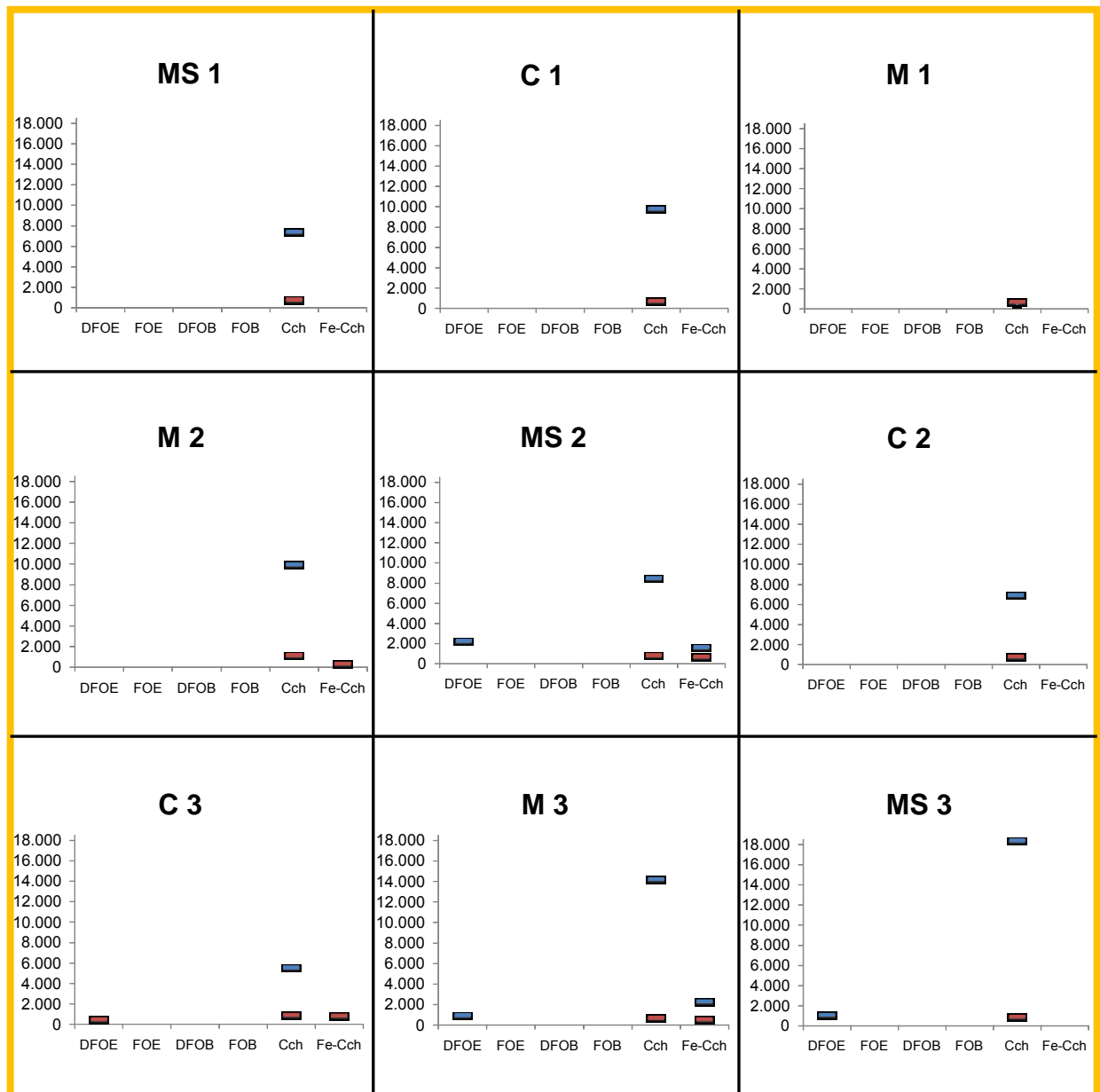


Abb. 21 Siderophorengehalte in den Subplot- Bodenproben des Plots mit Mutterboden vor und nach der Inokulation

- vor der Inokulation
- nach der Inokulation

MS ... Mykorrhizza und *S. acidiscabies* E13

M ... Mykorrhizza

C ... Kontrolle

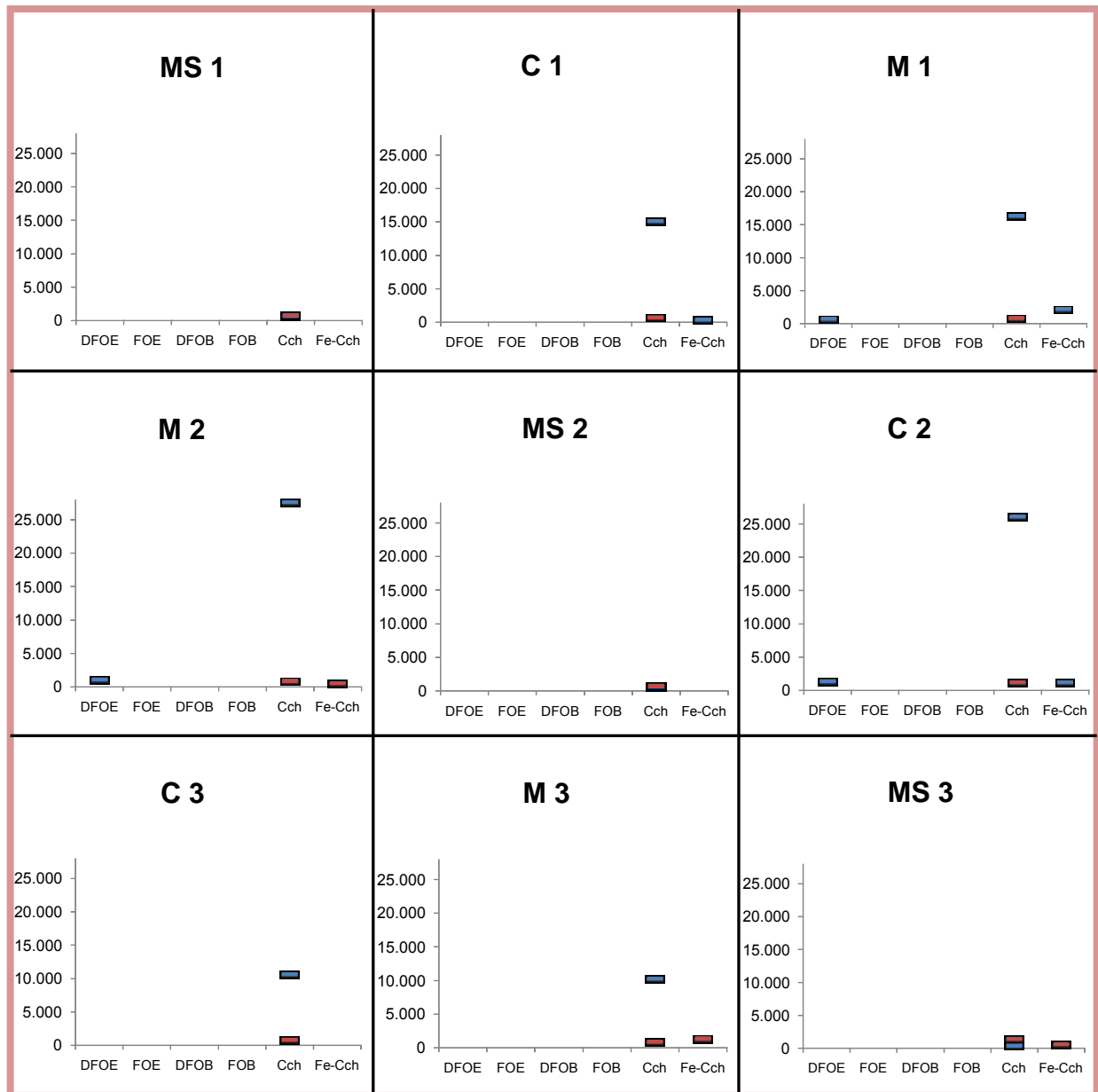


Abb. 22 Siderophorengehalte in den Subplot- Bodenproben des Plots mit Kompost vor und nach der Inokulation

- vor der Inokulation
- nach der Inokulation

MS ... Mykorrhizza und *S. acidiscabies* E13

M ... Mykorrhizza

C ... Kontrolle

4. Diskussion

Um die limitierte Bioverfügbarkeit von Eisen unter aeroben Bedingungen zu kompensieren haben Mikroorganismen die Fähigkeit Siderophore zu produzieren. Eisen kann so mittels Siderophor-Eisen-Komplexen assimiliert werden. Die Wichtigkeit der Siderophore im Ökosystem ist dahingehend unbestritten. So haben Untersuchungen mit Kuhbohnepflanzen gezeigt, dass Hydroxamate zum Pflanzenwachstum beitragen und zusätzlich Nickelstress entgegen wirken können, da sie die Aufnahme von toxischem Nickel in die Pflanze durch Bildung von Komplexen verringern (DIMKPA ET AL., 2008a). Siderophore können zeitgleich mit Auxinen, also Wachstumsregulatoren, durch Streptomyzeten gebildet werden. Sie behindern Schwermetalle wie Aluminium, Cadmium und Nickel dabei die Auxinbildung zu hemmen, indem sie Metall-Komplexe bilden (DIMKPA ET AL., 2008b).

ESI-MS zur Bestimmung von Siderophorgehalten konnte bereits sowie für Kulturüberstände (DIMKPA ET AL., 2008a) als auch für Extraktionen aus Boden (ESSEN ET AL., 2006) erfolgreich angewendet werden. Nichtsdestotrotz gibt es noch keine Analysen über die Anwendung von ESI-MS zur Siderophorendetektion auf schwermetallhaltigem Boden.

Untersuchungen über die Arten der Siderophore, welche von *Streptomyces*-Spezies gebildet werden, wurden bereits beschrieben u. a. durch IMBERT ET AL. (1995), YAMANAKA ET AL. (2005) sowie DIMKPA ET AL. (2008a). Das Verhalten der Spezies *Streptomyces mirabilis* P16-B1 bezgl. seiner Fähigkeit zur Siderophorenproduktion wurde bisher allerdings noch nicht dargestellt.

Dieser Testorganismus wurde aus einem schwermetallbelasteten Gebiet isoliert und zeigte eine übermäßig hohe Toleranz gegen die dort verbreiteten Schwermetalle, vor allem gegen Nickel und Zink (SCHMIDT ET AL., 2007). Um in Konzentrationen höher als 100 mmol/l Nickel und Zink wachsen zu können, werden dem Organismus Resistenzmechanismen abverlangt, welche andere nicht aufweisen können. Solch angepasste Mikroorganismen können eine wichtige Rolle im Umweltschutz und in der damit zusammenhängenden Bioremediation von schwermetallbelasteten Flächen spielen (HAFERBURG, 2007). Je mehr über diese Organismen bekannt ist, desto

besser kann man Strategien entwickeln, wie man sie zu eben genannten Zwecken einsetzen kann. Ziel dieser Arbeit war daher herauszufinden welche Fähigkeiten *Streptomyces mirabilis* P16-B1 besitzt Siderophoren zu produzieren.

Unter den experimentellen Bedingungen produzierte *Streptomyces mirabilis* P16-B1 in eisenarmem Flüssigmedium hydroxamate Siderophoren, während der Test auf Catecholate negativ war. Die generell produzierten Hydroxamate sind DFOE, FOE, DFOB, FOB, Cch sowie Fe-Cch, wobei hauptsächlich DFOE und FOE produziert wurden.

Eine Beprobung des Kulturüberstandes nach 24 h, 72 h und 96 h Inkubation ergab einen starken Anstieg der gesamten produzierten Siderophoren von anfangs sehr geringen Gehalten, welche durch die CAS-Flüssiglösung nicht detektierbar waren zu durchschnittlich 72 μmol und schließlich 77 μmol (Abb. 23).

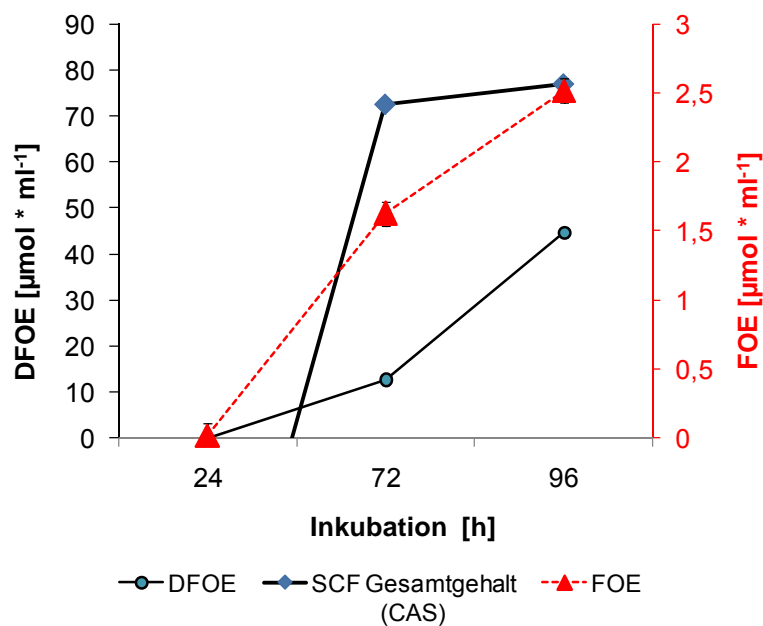


Abb. 23 Mittels CAS-Flüssiglösung und ESI-MS berechneter DFOE und FOE Gehalt in Kulturüberstand von *Streptomyces mirabilis* P16-B1

Die Quantifizierung der DFOE und FOE Konzentration mittels ESI-MS ergab ebenfalls einen erheblichen Anstieg von 0,024 μmol (DFOE) und 0,014 μmol (FOE) auf 12,575 μmol (DFOE) und 1,625 μmol (FOE) und schließlich nach insgesamt 96 h Inkubation auf 44,731 μmol (DFOE) und 2,519 μmol (FOE). Der Unterschied zwischen der berechneten Konzentration mittels CAS-Flüssiglösung und der ESI-MS

Bestimmung lässt sich dadurch erklären, dass die CAS-Flüssiglösung auf den Gesamtgehalt an Siderophoren sensibilisiert ist. Die bestimmten Konzentrationen mittels ESI-MS hingegen wurden nur auf DFOE und FOE bezogen.

Um zu testen, wie sich *Streptomyces mirabilis* P16-B1 in schwermetallhaltigen Böden verhält, musste erst geklärt werden inwieweit es möglich ist Siderophoren aus eisenhaltigen Böden zurückzugewinnen. Hierzu diente ein sandiger Testboden, der mit einer gegebenen Siderophorenlösung inkubiert und anschließend wieder extrahiert wurde. In etwa 30 % der zugefügten hydroxamaten Siderophoren konnten aus dem Testboden zurückgewonnen werden. Zusätzlich zugegebenes Eisen resultierte in einem Mangel an detektierbaren Siderophoren durch die CAS-Flüssiglösung. Von der Kontrolllösung konnte nach der Inkubation ebenfalls nicht die gesamte Menge bestimmt werden, sondern nur etwa 94 % (Abb. 24).

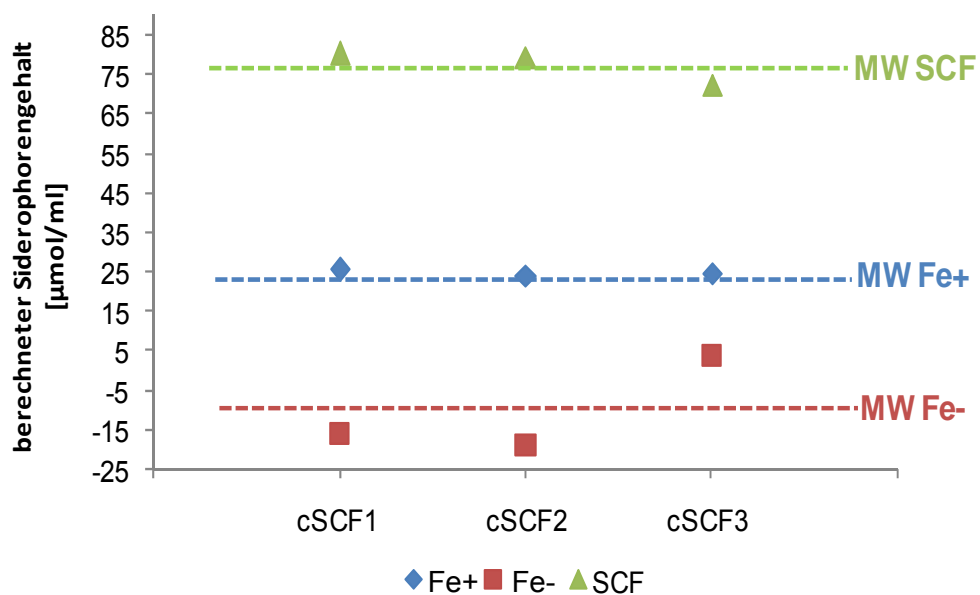


Abb. 24 Zurückgewonnene Siderophorengehalte aus einem sandigen Testboden

Die Zurückgewinnung hydroxamater Siderophoren ist zum einen beeinflusst durch die Adsorption an Bodenpartikel und zum anderen durch die Interaktion mit Metallionen. Eisen scheint nachweislich den Siderophorennachweis stark zu beeinflussen. Es ist davon auszugehen, dass der Gehalt an anderen Schwermetallen ebenfalls zu ähnlichen Folgen führt. Dies wiederum stellt ein wichtiges Problem bei der Rückgewinnung von Siderophoren aus schwermetallhaltigen Böden dar. Eine

weitere Ursache für die Testergebnisse könnte die eingeschränkte Sensitivität der CAS-Flüssiglösung für sehr geringe Siderophorenkonzentrationen sein.

Die Lösung des Testbodens wurde nicht massenspektrometrisch analysiert, was in zukünftigen Untersuchungen allerdings erwogen werden sollte, um eine höhere Genauigkeit zu erreichen. Außerdem sollte geprüft werden, ob die Inkubationszeit Einfluss auf die Rückgewinnungsrate hat sowohl während der Inkubation mit *Aqua dest.* als auch mit der CAS-Flüssiglösung. Unter Umständen ist es nötig die Dauer zu verlängern, beispielsweise über Nacht zu inkubieren, um die Farbreaktion des CAS-CTAB-Eisen-Komplexes vollständig abzuwarten und schließlich zu detektieren.

In den Bodenproben, welche in direkter Nähe zu dem Biodiversitätstestfeld genommen wurden, konnte vor allem ein sehr hoher Gehalt an DFOE und FOE detektiert werden, aber auch DFOB, FOB, Cch und Fe-Cch waren in geringer Menge vorhanden und lieferten einen Peak im Massenspektrum. Nichtsdestotrotz waren die Hydroxamatgehalte unter den Bodenproben sehr unterschiedlich. So konnte nur in Probe P9908-1 DFOB und in Probe P9908-3 Cch festgestellt werden, die dazugehörigen Eisen-Spezies fehlten jedoch. Diese Unterschiede in der Zusammensetzung könnten an der Bodenbeschaffenheit selbst liegen. Probe P9908-1 war eher sandig, die Proben P9908-2 und P9908-3 eher tonig bis sandig. Wie oben bereits erwähnt ist die Zurückgewinnung der Siderophoren abhängig von der Adsorption an Bodenpartikel, welche in tonigen Böden höher ist als in sandigen. Die Kontrollprobe P9908-K beinhaltet augenscheinlich mehr Eisen, was dazu führte, dass mehr Siderophor-Eisen-Komplexe gebildet wurden, was die wesentlich höheren Hydroxamatgehalte erklärt.

Die mit *Streptomyces mirabilis* P16-B1 inkubierten Bodenproben wurden massenspektrometrisch untersucht und es ergab sich, dass vor allem ein hoher DFOB und FOB Gehalt vorherrschte, wobei die Peaks am höchsten für die mit *Aqua dest.* und dem Testorganismus inkubierte Probe waren. Bis heute ist ungeklärt wie *Streptomyces mirabilis* P16 -B1 fähig ist in *Aqua dest.* zu wachsen, ohne zugegebene Nährstoffe. Das zweithöchste Signal lieferte die Inkubation mit MM9 Medium, zumindest für FOB. Die Quantifizierung zeigte eine Konzentration von

0,00058 µmol/ml DFOE 0,011 µmol/ml FOE in der Probe mit *Aqua dest.* und 0,00051 µmol/ml DFOE, 0,003 µmol/ml FOE in der MM9 Probe.

Eine Auffälligkeit war, dass die Peaks des reinen autoklaviertem Boden zum Teil höher ausfielen als in den inkubierten Proben, was einen starken Widerspruch darstellt, da der Gehalt ansteigen und nicht abfallen sollte. Die ebenfalls durchgeführte Quantifizierung der DFOE und FOE Konzentration ergab das gleiche Bild. In der autoklavierten Bodenprobe fand sich ein um ein zehnfaches höherer DFOE Gehalt als in den restlichen Proben, was sich allerdings durch den Standardfehler, welcher bei 0,000434 µmol/ml liegt, etwas revidieren lässt. Die berechnete FOE Konzentration hingegen lag, wie erwartet, weit unter der Konzentration in den inkubierten Proben. Dennoch stellt es ein Paradoxon dar, welches geklärt werden sollte.

Unter Umständen wäre ein Grund hierfür die relativ geringe DFOE Konzentration, da nicht nur die Standardfehler statistisch relevant sind, sondern auch die Nachweisfähigkeit der berechneten Standardkurve. Diese ist mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9815$ sehr zuverlässig, dennoch gilt diese Zuverlässigkeit nur für die Konzentrationen, welche zwischen den Ausgangskonzentrationen liegen. Die hierfür geringste genutzte Konzentration war 0,1 µmol/ml DFOE, alle Konzentrationen, die darunter liegen verlieren an Genauigkeit. Einen weiteren Grund könnte die Inhomogenität des Bodens darstellen, d. h. wenn als Ausgangsprobe ein etwas sandigerer Bodenabschnitt als für die Probe zur Inkubation genutzt wird, könnte die Konzentration bereits um wenige Mikromol und die damit verbundene Peak-Intensität ansteigen, was die Analysen der Proben P9908-1, P9908-2 und P9908-3 gezeigt haben.

Eine weitere Zielstellung dieser Masterarbeit war herauszufinden, ob und in welchem Ausmaß die Inokulation der Subplots auf dem Testfeld Einfluss auf die Siderophorenkonzentration hat. Die durchgeführten Analysen zeigten aber keinerlei Muster, welches Aufschluss über den Unterschied zwischen den Siderophoregehalten vor und nach der Inokulation geben könnte.

Aufgrund technischer Schwierigkeiten konnten die Proben des Testfeldes, welche vor und nach der Inokulation genommen wurden, nicht zusätzlich quantifiziert

werden. Da die Peaks der Subplot- Bodenproben der einzelnen Siderophorengehalte relativ gering waren, wäre eine Quantifizierung unter identischen Bedingungen nicht zuverlässig. Sie würde sehr niedrige Konzentrationen ergeben, welche höchstwahrscheinlich bei weitem nicht dem wahren Werten entsprächen.

Die Quantifizierung mittels ESI-MS beruht auf der Integration der Peaks, welche zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Analyse auftreten und die entsprechende Massenzahl haben. Die Peaks müssen eine relativ hohe Intensität haben, da sonst die Quantifizierung an Genauigkeit verliert. Nach DIMKPA ET AL. (2008a) produziert *Streptomyces acidiscabies* E13 in eisenarmen Flüssigmedium viel Cch, was die Hydroxamatgehalte auf den inokulierten Subplots erklären würde im Gegenzug aber in Widerspruch zu den Kontrollen ohne Inokulation steht, bei denen ebenfalls Peaks auftauchten. Der Gehalt an Fe-Cch lag immer unter dem Gehalt der eisenfreien Spezies, was ebenfalls mit den Ergebnissen von DIMKPA ET AL. (2008a) übereinstimmt, da hier beschrieben wurde, dass Cch relativ zu den anderen Siderophoren verhältnismäßig geringe Gehalte an Metallen bindet.

Nichtsdestotrotz scheint die Adsorption der Siderophoren an die Tonminerale des Bodens extrem hoch zu sein, was die geringen Peaks erklären würde. Wie bereits erwähnt, ist der Testfeldboden sehr inhomogen, was ebenfalls zu Schwankungen in der Siderophorenkonzentration führen könnte. Hydroxamate sind mit einer Komplexbildungskonstante von bis zu $K_f \approx 10^{32}$ (KAIM & SCHWEDERSKI, 2005) sehr stabil, d. h. es ist unwahrscheinlich, dass sie bereits nach kurzer Zeit zerfallen und so nicht mehr detektierbar sind.

Um den Einfluss der Inokulation des Testfeldes näher zu untersuchen, sollte eine Möglichkeit gefunden werden die Siderophoren von den Bodenpartikeln zu lösen. Eine Möglichkeit wäre eventuell eine Behandlung mit Ultraschall um die Partikel voneinander zu trennen. Eine weitere Möglichkeit wäre die Azidifikation der Bodenlösung, um die Interaktion zwischen den Metallionen in den Lösungen zu erschweren. Zusätzlich dazu sollten die Bodenproben getrocknet, gemahlen und gesiebt werden, was unter Umständen ein Haften an Bodenpartikeln vermindern könnte.

5. Literaturverzeichnis

- ALEXANDER, D.B., ZUBERER, D.A. (1991): Use of chrome azurol S reagents evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol. Fertil. Soils*, 39-45.
- BAGG, A., NEILANDS, J.B. (1987): Molecular Mechanism of Regulation of Siderophore-Mediated Iron Assimilation. *Microbiol. Rev.*, 509-518.
- COY, M. & NEILANDS, J. B. (1991): Structural dynamics and functional domains of the Fur protein. *Biochemistry*. 8201-8210.
- DERTZ, E.A., STINTZI, A., RAYMOND, K.N. (2006): Siderophore-mediated iron transport in *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 1087–1097.
- DIMKPA, C., SVATOŠ, A., MERTEN, D., BÜCHEL, G., KOTHE, E. (2008a): Hydroxamate siderophores produced by *Streptomyces acidiscabies* E13 bind nickel and promote growth in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) under nickel stress. *Can. J. Microbiol.*, 163-172.
- DIMKPA, C., SVATOŠ, A. DABROWSKA, P., SCHMIDT, A., BOLAND, W., KOTHE, E. (2008b): Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces spp.*. *Chemosphere*, 19–25.
- ESSEN, S.A., BYLUND, D., HOLMSTRÖM, S.J.M., MOBERG, M., LUNDSTRÖM, U.S. (2006): Quantification of hydroxamate siderophores in soil solutions of podzolic soil profiles in Sweden. *BioMetals*, 269–282.
- FENN, J.B., MANN, M., MENG, C.K., WONG, S.F., Whitehouse, C.M. (1990): Electrospray ionization-principles and practice. *Mass spectrometry reviews*, 37-70.

-
- FERNANDEZ, D.U. (2002): Strukturaufklärung der Siderophore und massenspektrometrische Untersuchung eines ihrer Rezeptorproteine von *Pseudomonas fluorescens* G173. Doktorarbeit. Universität Köln.
- GASKELL, S. J. (1997): Electrospray: Principles and Practice. *J. Mass Spectrom.*, 677-688.
- GELETNEKY, J. (2002): Hydrogeologische/Hydrologische Untersuchung einer Prä-Flutungssituation am Beispiel des Gessentales, ehemaliges ostthüringisches Uranbergbauggebiet. Dissertation. Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- GRAWUNDER, A. (2006): Erstellen eines konzeptionellen geologisch-hydrologischen Modells des Testfeldes "Gessenwiese" im ehemaligen ostthüringischen Uranbergbauggebiet. Diplomarbeit. Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- HAFERBURG, G. (2007): Studies on heavy metal resistance of bacterial isolates from a former uranium mining area. Doktorarbeit. Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- HOLMSTRÖM, S.J.M., LUNDSTRÖM, U.S., FINLAY, R.D., VAN HEES, P.A.W. (2004): Siderophores in forest soil solution. *Biogeochem.*, 247–258.
- IMBERT, M., BÉCHET, M., BLONDEAU, R. (1995): Comparison of the marine siderophores produced by some species of *Streptomyces*. *Curr. Microbiol.*, 129-133.
- KAIM, W., SCHWEDERSKI, B. (2005): Bioanorganische Chemie, Zur Funktion chemischer Elemente in Lebensprozessen, 4. Auflage, Vieweg und Teubner Verlag, Wiesbaden.
- KERBARLE, P., TANG, L. (1993): From ions in solution to ions in the gas phase, *Anal. Chem.*, 972A-986A.

-
- MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. (2003): Brock Mikrobiologie. Spektrum, Heidelberg.
- MILAGRES, A.M.F., MACHUCA, A., NAPOLEÃO, D. (1999): Detection of Siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. J. Microbiol. Methods, 1-6.
- MEIßNER, S. (2007): Tiefenaufgelöste biogeochemische Charakterisierung einer geochemischen Barriere im ehemaligen Uranbergbauegebiet Ostthüringen. Diplomarbeit. Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- NEAGOE, A., EBENA, G., CARLSSON, E. (2005): The effect of soil amendments on plant performance in an area affected by acid mine drainage. Chemie der Erde, 115- 129.
- NEILANDS, J.B. (1981): Microbial iron compounds. Ann. Rev. of Biochem.,715-731.
- NEILANDS, J.B. (1984): Methodology of siderophores. Struct. Bond., 1–24.
- NEILANDS, J. B. (1995): Minireview Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds J. Biol. Chem., 26723–26726.
- POWELL, P. E., CLINE, G. R., REID, C.P.P. (1980): Occurrence of hydroxamate siderophore iron chelators in soils. Nature, 833-834.
- SCHINDLER, F. (2006): Untersuchungen zur mikrobiellen Aktivität und Diversität im Bereich des schwermetallbelasteten Testfelds „Gessenwiese“. Magisterarbeit. Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- SCHMIDT, A., HAFERBURG, G., SCHMIDT, A., Lischke, U., Merten, D., Gherghel, F., Büchel, G., Kothe, E. (2007): Heavy metal resistance to the extreme: *Streptomyces* strains from a former uranium mining area. Chemie der Erde-Geochemistry, doi:10.1016/j.chemer.2007.11.002.

-
- STINTZI, A.; BARNES, C.; XU, J.; RAYMOND, K. N. (2000): Microbial Iron Transport via a Siderophore Shuttle: A Membrane Ion Transport Paradigm. Proc. Natl. Acad. Sci., 10691-10696.
- TOKALA, R.K., STRAP, J.L., JUNG, C.M., CRAWFORD, D.L., SALORE, M.H., DEOBALD, L.A., BAILEY, J.F., MORRA, M.J. (2002): Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *S. lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). Appl. Environ. Microbiol., 2161-2171.
- WILLIAMS, S.T., BERGEY, D.H., HOLT, J.G. (1989): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 4. Williams & Wilkins, Baltimore.
- WISMUT GMBH: URL:
[http://www.wismut.de/sanierung/nlr_projekte.php?jahr=&nummer=50
&ansicht=detail](http://www.wismut.de/sanierung/nlr_projekte.php?jahr=&nummer=50&ansicht=detail) (letzter Zugriff: 28.07.2009)].
- YAMANAKA, K., OIKAWA, H., OGAWA, H., HOSONO, K., SHINMACHI, F., TAKANO, H., SAKUDA, S., BEPPU, T., UEDA, K. (2005): Desferrioxamine E produced by *Streptomyces griseus* stimulates growth and development of *Streptomyces tanashiensis*. Microbiol., 2899–2905.