



**Anpassung von
Phaeobacter inhibens DSM 17395
an unterschiedliche N:P-Verhältnisse**

Von der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften der
Carl von Ossietzky Universität Oldenburg zur Erlangung des
Grades einer

**Doktorin der Naturwissenschaft
– Dr. rer. nat. –**

angenommene Dissertation von

Hanna Sibyll Ruppertsberg
geb. am 10. Juli 1988 in Ulm

Oldenburg, Dezember 2017

Die Untersuchungen für die vorliegende Doktorarbeit wurden von November 2014 bis April 2017 an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Rabus
2. Gutachter: PD. Dr. Bert Engelen

Tag der Disputation: 20.12.2017

Zusammenfassung

Heterotrophe Bakterien des marinen Lebensraumes spielen eine wichtige Rolle in den globalen Kreisläufen von Kohlenstoff, Stickstoff und Phosphor, und tragen maßgeblich zur Remineralisierung organischen Materials bei.

Eine abundante Gruppe des marinen Bakterioplanktons bilden die *Roseobacter*, die in den temperaten und polaren Regionen der Weltmeere zu finden sind. Ein Vertreter dieser Gruppe ist *Phaeobacter inhibens*, ein obligat aerob, stäbchenförmiges, Gram-negatives Bakterium, welches sich durch ein großes Substratspektrum und eine Vielzahl an gebildeten Sekundärmetaboliten auszeichnet.

In der vorliegenden Dissertation wurde *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 hinsichtlich seiner Anpassung an unterschiedliche N:P-Verhältnisse in definiertem Seewassermedium untersucht. Dazu wurden Prozess-kontrollierte Wachstumsexperimente in Bioreaktoren unter N- und P-Limitation durchgeführt. Diese zeigten zum einen, dass unter N-Limitation, der externe Stickstoff innerhalb der ersten Stunden des Wachstums aufgenommen, intern gespeichert und über die Zeit abgebaut wird, zum anderen, dass die P-Limitierung zu den vierfachen Erträgen hinsichtlich optischer Dichte, Biotrockenmassekonzentration und CO₂-Produktion führt.

Neben den mikrobiologischen Experimenten wurden kolorimetrische Assays zur Konzentrationsbestimmung von NH₄⁺ und PO₄³⁻ mittels Mikroplatten-Leser entwickelt und etabliert. Diese Assays wurden benötigt um das hohe Probenaufkommen aus den Wachstumsexperimenten zu bewältigen.

Somit konnte gezeigt werden, dass *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 die Aufnahme von Ammonium vom Wachstum entkoppelt, um rasch interne (Stickstoff-) Speicher aufzubauen. Unter Bedingungen der P-Limitation wird das Phosphat kontinuierlich abgebaut, Wachstum ist weiterhin möglich. Es wurden Hinweise auf die Bildung von PHB gefunden. Insgesamt zeigten sich deutliche physiologische Anpassungen an die verschiedenen Kultivierungsbedingungen. Stehen Ammonium und Phosphat zur Verfügung werden diese schnell aufgenommen und gespeichert, möglicherweise als Ausdruck eines Wettbewerbsvorteils im marinen Habitat.

Abstract

Marine heterotrophic bacteria contribute to global primary production by playing a key role in the cycling of the nutrients carbon, nitrogen and phosphorus.

An important group of marine bacterioplankton is built by the very abundant *Roseobacters*, who are distributed all over the climatic areas of the global oceans. One member is *Phaeobacter inhibens*, an obligate aerobic, rod shaped, gram-negative bacterium, exhibiting a broad spectrum of substrates and produced secondary metabolites.

In this study, *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 was analyzed in terms of its adaption to different N:P ratios in defined seawater media. For this purpose, process-controlled growth experiments in bioreactors under N- and P-limiting conditions were performed. It was demonstrated that N-limitation leads to a rapid uptake of external nitrogen in the first hours of growth, and building of an internal N-storage, which is degraded later on. P-limitation showed 4-fold yields concerning optical density, cellular dry weight and CO₂-production. Next to the microbial experiments, colorimetric assays for the determination of NH₄⁺- and PO₄³⁻-concentrations via microplate reader were invented and established to handle the high emergence of substrate samples.

All in all, this work showed that *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 prioritized the rapid uptake of external nitrogen and building of an internal N-storage. Growth under P-limiting conditions is still possible, first evidence has shown the building of a PHB-storage. These results indicate adaption strategies to a varying environment: available nitrogen and phosphorus are taken up as fast as possible in the required amount, and managed intern, avoiding the loss of nutrients and outcompeting opponents.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	i
Tabellenverzeichnis	ii
Abkürzungsverzeichnis	iii
1.1. Kreislauf der Elemente	1
1.1.1. Der Kohlenstoffkreislauf	2
1.1.2. Der Stickstoffkreislauf	3
1.1.3. Der Phosphorkreislauf	5
1.1.4. N:P-Verhältnisse und Limitation	7
1.1.5. Ammonium und Phosphat als Nährstoffe	9
1.2. Die <i>Roseobacter</i> -Gruppe	12
1.2.1. Der Modelorganismus <i>Phaeobacter inhibens</i>	14
1.3. Systembiologie: Definition und Geschichte	16
1.3.1. Methoden der Proteomik	21
1.3.1.1. Gelbasierte Proteinauftrennung	23
1.3.1.2. Quantitative Darstellung	24
1.3.1.3. Methoden der Proteinidentifizierung	24
1.4. Prozess-kontrollierte Kultivierung in Bioreaktoren	26
1.4.1. Charakterisierung bakteriellen Wachstums	28
1.5. Experimentelles Design der Dissertation	32
2. Material und Methoden	34
2.1. Organismus	34
2.2. Medium	34
2.3. Kultivierung von <i>Phaeobacter inhibens</i> DSM 17395	35
2.3.1. Vorkulturen und Versuche in Erlenmeyerkolben	35
2.3.2. Prozess-kontrollierte Kultivierung in Bioreaktoren	36
2.3.3. Auswertung der Prozessdaten	37
2.4. Probenahmen und Aufarbeitung	38
2.4.1. Substratproben	38
2.4.2. Biotrockenmasse und Elementaranalyse	40
2.4.3. Durchflusszytometrie	41
2.5. Proteomik	42
2.5.2. Extrazelluläres Proteom	42
2.5.3. Zelluläres Proteom	42
2.5.4. Gel-basierte Proteinanalyse	43

2.5.5. Densitometrische Analyse mit der QuantityOne Software	43
2.6. Metabolomik	44
2.6.2. Probenahme des intrazellulären Metaboloms	44
2.6.3. Extrazelluläres Metabolom	44
2.7. Ernten für Transkriptomik	44
3. Ergebnisse und Diskussion	45
3.1. Physiologie des Wachstums	46
3.1.2. Mannitol als C-Quelle	46
3.1.2. Wachstumsexperimente im Bioreaktor	48
3.2. Densitometrische Analyse des Proteoms	55
3.4. Biologische Varianz	61
3.5. Etablierung der NH_4^+ und PO_4^{3-} Bestimmung mittels MPR	64
4. Zusammenfassung und Ausblick	69
5. Referenzen	71
6. Anhang	80
6.4. Material und Methoden	80
6.4.2. Zusammensetzung der Medien	80
6.4.3. Densitometrische Auswertung der SDS-PAGEs	80
6.4.4. MATLAB Skript zur Prozessauswertung	81
6.5. Ammonium-und Phosphat-Bestimmung	85
6.6. Wachstumskurven der Massenanzuchten	86
6.7. Proteomik	89
Erklärung	101
Danksagung	102
Publikationen	103

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verbindung zwischen mikrobieller Schleife und der marinen Nahrungskette.	1
Abbildung 2: Der marine Kohlenstoffkreislauf.	3
Abbildung 3: Der marine Stickstoffkreislauf.	4
Abbildung 4: Terrestrischer Phosphorkreislauf.	5
Abbildung 5: Mariner Phosphorkreislauf.	6
Abbildung 6: Die marine N:P-Balance der Weltmeere nach Arrigo (2005).	8
Abbildung 7: Darstellung des Glutamin-Synthetase (GS)/ Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase (GOGAT)-Stoffwechselweges (abgewandelt von Reizer, 2003).	10
Abbildung 8: Der PO_4^{3-} -Transport.	11
Abbildung 9: Der Modelorganismus <i>P. inhibens</i> DSM 17395.	14
Abbildung 10: Überblick über die verschiedenen Subjekte der „OMICs“-Technologien.	19
Abbildung 11: Schema zu den Methoden der subzellulären Fraktionierung nach Koßmehl et al. (2013).	22
Abbildung 12: Schematische Darstellung eines Rührkesselreaktors	27
Abbildung 13: Halblogarithmische Darstellung einer bakteriellen Wachstumskurve.	28
Abbildung 14: Halblogarithmische versus arithmetische Darstellung von Wachstumskurven.	29
Abbildung 15: Bestimmung der Übergänge zwischen den Wachstumsphasen anhand der Wachstumskurve.	30
Abbildung 16: Graphische Bestimmung der Wachstumsraten anhand der Wachstumskurve.	31
Abbildung 17: Wachstumskurven der Experimente zur Anpassung von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 in SWM an verschiedenen N:P-Verhältnisse und C-Quellen.	46
Abbildung 18: Wachstumsexperimente mit <i>P. inhibens</i> DSM 17395 in SWM mit Mannitol als C-Quelle und verschiedenen N:P-Verhältnissen.	49
Abbildung 19: Dynamik der Elementarzusammensetzung [%] von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 bei Wachstum in SWM mit Mannitol und definierten NH_4^+ -und PO_4^{3-} -Konzentrationen.	52
Abbildung 20: Dynamik des zellulären N:C Verhältnis von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 bei Wachstum in SWM mit Mannitol und definierten NH_4^+ -und PO_4^{3-} -Konzentrationen.	53
Abbildung 21: Softwarebasierte Auswertung der SDS-PAGE Gele des Proteoms der Wachstumsexperimente hinsichtlich des Vergleichs über die Wachstumsphasen.	55
Abbildung 22: Softwarebasierte Auswertung der SDS-PAGE Gele des Proteoms der Wachstumsexperimente hinsichtlich des Vergleichs der Zustände.	56
Abbildung 23: Intensitätsanalyse prominenter SDS-PAGE Banden.	57
Abbildung 27: Passgenauigkeit der Massenanzuchten.	62
Abbildung 28: Vergleich der biologischen Replikate auf Ebene der Membran- und extrazellulären Proteine.	63
Abbildung 29: Modifizierte Berthelot-Reaktion nach Krom (1980). A: Als Eingangsreaktion reagiert Ammonium im alkalischen Milieu zunächst zu Ammoniak, dann mit Hypochlorid zum Monochloramin. B: Nitroprussid-katalysierte Farbreaktion des Monochloramins mit Salicylat.	64
Abbildung 30: Vergleich der ursprünglichen und der modifizierten Methoden zur kolorimetrischen Bestimmung von NH_4^+ und PO_4^{3-} anhand von Standards in SWM (aus Ruppertsberg et al., 2017).	65
Abbildung 31: Statistische Auswertung von Kalibrierung und Reproduzierbarkeit der Ammonium- (NH_4^+ ; links) und Phosphat- (PO_4^{3-} ; rechts) Bestimmung mittels MPR.	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich der Wachstumsexperimente von <i>P. inhibens</i> DSM 17395.	47
Tabelle 2: Vergleich der Wachstumsphasen und -raten der Kultivierung von <i>P. inhibens</i> DSM 17395.	48
Tabelle 3: Übersicht der stöchiometrischen Parameter von <i>P. inhibens</i> DSM 17395.	51
Tabelle 4: Vergleich der Verbrauchs-(NH ₄ ⁺ , Mannitol, O ₂) und Bildungsraten (CO ₂) von <i>P. inhibens</i> DSM 17395.	51
Tabelle 5: Proteine der Phospholipidsynthese nach Zech et al. (2013 a,b) und Koßmehl et al. (2013).	59
Tabelle 6: Vergleich der physiologischen Parameter der Massenanzuchten von <i>P. inhibens</i> DSM 17395.	61

Abkürzungsverzeichnis

2D-DIGE	Zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese
2OG	2-Oxoglutarat
μ	Wachstumsrate [h^{-1}]
$A_{620 \text{ nm}}$	Absorption bei 620 nm
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BN	Blue Native
BTM	Biotrockenmassen [g L^{-1}]
C	Kohlenstoff
CM	Cytoplasmamembran
CP	Cytoplasmatische Proteine
DIN	Gelöster anorganischer Stickstoff (engl. <i>dissolved inorganic nitrogen</i>)
DIP	Gelöster anorganischer Phosphor (engl. <i>dissolved inorganic phosphorus</i>)
DOC	Gelöster organischer Kohlenstoff (engl. <i>dissolved organic carbon</i>)
DOM	Gelöste organische Substanzen (engl. <i>dissolved organic matter</i>)
DON	Gelöster organischer Stickstoff (engl. <i>dissolved organic nitrogen</i>)
DOP	Gelöster organischer Phosphor (engl. <i>dissolved organic phosphorus</i>)
ED-Weg	Entner-Doudoroff
EP	Extrazelluläre Proteine
ESI	Elektrospray Ionisierung
exp	Exponentielle Wachstumsphase
GS/GOGAT	Glutamin-Synthetase/Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
lin	Lineare Wachstumsphase
LOD	Nachweisgrenze (engl. <i>limit of detection</i>)
LOQ	Bestimmungsgrenze (engl. <i>limit of quantification</i>)
MALDI	Matrix-Assistierte Laser-Desorption Ionisierung
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
MP	Mit Membranproteinen angereicherte Fraktion
MPR	Mikroplattenleser (engl. <i>microplate reader</i>)
MS	Massenspektrometrie
N	Stickstoff in Ammonium
N:P	Ammonium zu Phosphat Verhältnis
n.b.	nicht bestimmbar (Unter Nachweis-/Bestimmungsgrenze) /nicht bestimmt
OD	Optische Dichte
$OD_{600\text{nm}}$	Optische Dichte bei 600 nm gemessen
OD_{max}	Maximale Optische Dichte
OM	Äußere Membran (engl. <i>outer membrane</i>)
P	Phosphor in Phosphat
PAGE	Polyacrylamide Gelelektrophorese
PBS	phosphat-gepufferter Kochsalzlösung
PHB	Polyhydroxybuttersäure
Pi	Phosphat
PN	Partikulärer Stickstoff
POC	Partikulärer organischer Kohlenstoff (engl. <i>particulate organic carbon</i>)
PON	Partikulärer organischer Phosphor (engl. <i>particulate organic nitrogen</i>)
PP	Periplasmatische Proteine
Pp	Partikulärer Phosphor
QCO_2	CO_2 -Bildungsrate
QO_2	O_2 -Aufnahmerate
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SP	Lösliche Proteine (engl. <i>soluble proteins</i>)
STR	Rührkesselreaktor (engl. <i>stirred-tank reactor</i>)
SWM	(künstliches) Seewassermedium
TCA	Trichloressigsäure
TDA	Tropodithiatsäure
TOF	Flugzeitanalyse (engl. <i>time of flight</i>)

1. Einleitung

1.1. Kreislauf der Elemente

Das gesamte Leben und alle dazugehörigen Prozesse sind auf organische Verbindungen und Reaktionen dieser zurückzuführen. Organische Verbindungen und ihre Einzelbausteine sind in globalen Kreisläufen aus (Bio-)Synthese und Zersetzung, kontinuierlichen Transformationen unterworfen. Dabei stellen die Elemente Kohlenstoff, Sauerstoff und Wasserstoff, sowie Stickstoff, Phosphor und Schwefel als sogenannte Makroelemente die Grundbausteine aller organischen Verbindungen dar. Wichtige biologische Makromoleküle sind Proteine und Lipide, oder auch DNA und RNA, aus denen sich wiederum alle Zellstrukturen, Gewebe, Organe und letztendlich Organismen aufbauen. Die globalen Kreisläufe der einzelnen Elemente stehen miteinander in Abhängigkeit. Mikroorganismen spielen dabei eine zentrale Rolle (Azam und Malfatti 2007). Durch Assimilation gelöster (an-)organischer Verbindung und der Synthese von Makromolekülen, bzw. deren Remineralisierung werden Nährstoffe dem Nahrungsnetz zugeführt (s. Abb. 1). Diesen Prozess bezeichnet man als mikrobielle Schleife (Azam et al. 1993; Kirchmann 2000; Anderson und Ducklow 2001).

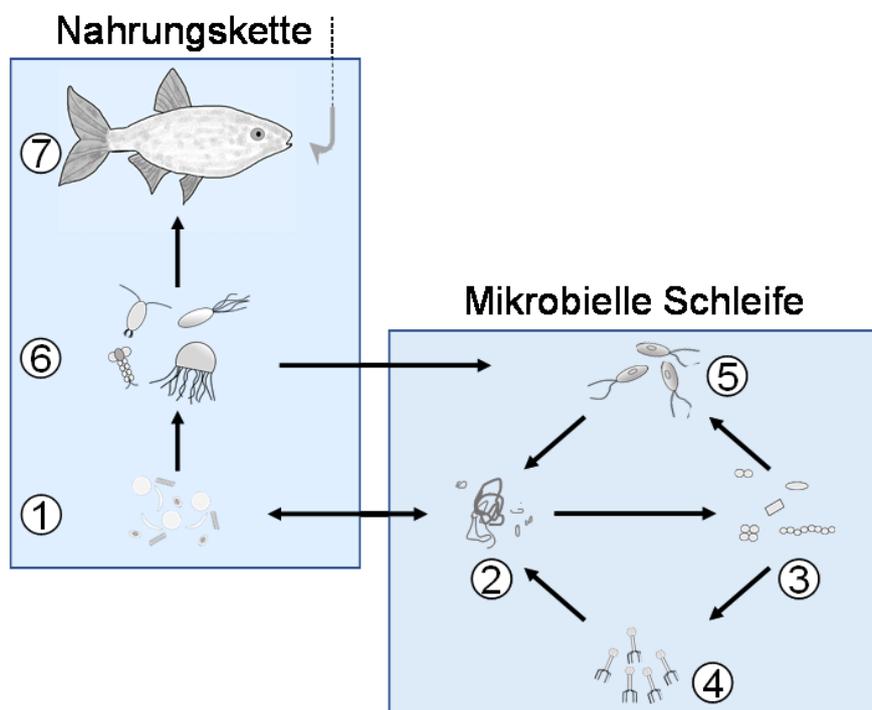


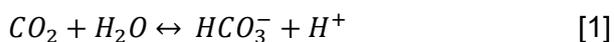
Abbildung 1: Verbindung zwischen mikrobieller Schleife und der marinen Nahrungskette. Durch die Exkretion und Lyse von Phytoplankton (1), Protozoen (5) und heterotropher Bakterien werden gelöste organische Substanzen (DOM; 2) freigesetzt. DOM wird durch Bakterien aufgenommen und zu Biomasse umgesetzt. Bakterien dienen Protozoen als Nahrung, die wiederum über Zooplankton (6) in die Nahrungskette aufgenommen werden und somit Nährstoffe von einer trophischen Ebene in die nächst höhere (7) übertragen. Viren (4) führen bei Bakterien zur Zellyse und somit Freisetzung von DOM.

1.1.1. Der Kohlenstoffkreislauf

Kohlenstoff (C) stellt prozentual den höchsten Anteil der Elementarzusammensetzung der globalen Biomasse dar. Atmosphärischer C, liegt in Form von Kohlenstoffdioxid (CO₂) oder als toxisches Kohlenstoffmonoxid (CO) vor, beides sind bekannte treibhauswirksame Gase.

CO₂ wird durch autotrophe Organismen fixiert, zunächst in Glukose und nachfolgend in Biomasse umgewandelt (Primärproduktion). In der marinen Umwelt geschieht dies in der Lichtdurchfluteten euphotischen Zone, maßgeblich durch Phytoplankton. Durch Sekretion oder Zelltod wird der Kohlenstoff als gelöster oder partikulärer organischer C (DOM; engl. *dissolved organic matter*, bzw. POC; engl. *particulate organic carbon*) abgegeben. DOM, in Form von Aggregaten, Partikeln oder toter Biomasse, wird durch Bakterien und Zooplankton aufgenommen und abgebaut (mikrobielle Schleife) (Azam et al. 1994; Anderson und Ducklow 2001). Zooplankton dient wiederum als Nahrung für größere Organismen, wie Fische, welche ihrerseits CO₂ produzieren. POC sinkt relativ schnell in die aphotische Zone ab, wo dieser nur zu einem geringen Anteil dem Pelagial durch bakteriellen Abbau wieder zugeführt werden kann, der größere Teil sedimentiert (Iversen und Ploug 2010) (Abb. 2B).

Neben der Aufnahme von CO₂ durch fotosynthetisch aktive Organismen, dienen die Ozeane durch ein Puffersystem mit ihrer großen Oberfläche bzw. Volumen als größter CO₂-Speicherort. Wird CO₂ in Wasser gelöst entsteht in einer Gleichgewichtsreaktion Hydrogencarbonat [1]. Carbonat wird in die Schale von Organismen, wie zum Beispiel Kieselalgen, eingebaut und sedimentiert letztendlich als Calciumcarbonat. Die Entfernung des Carbonats verschiebt somit die Gleichgewichtsreaktion hin zur Aufnahme von CO₂ (Gattuso et al. 1998) (Abb. 2A).



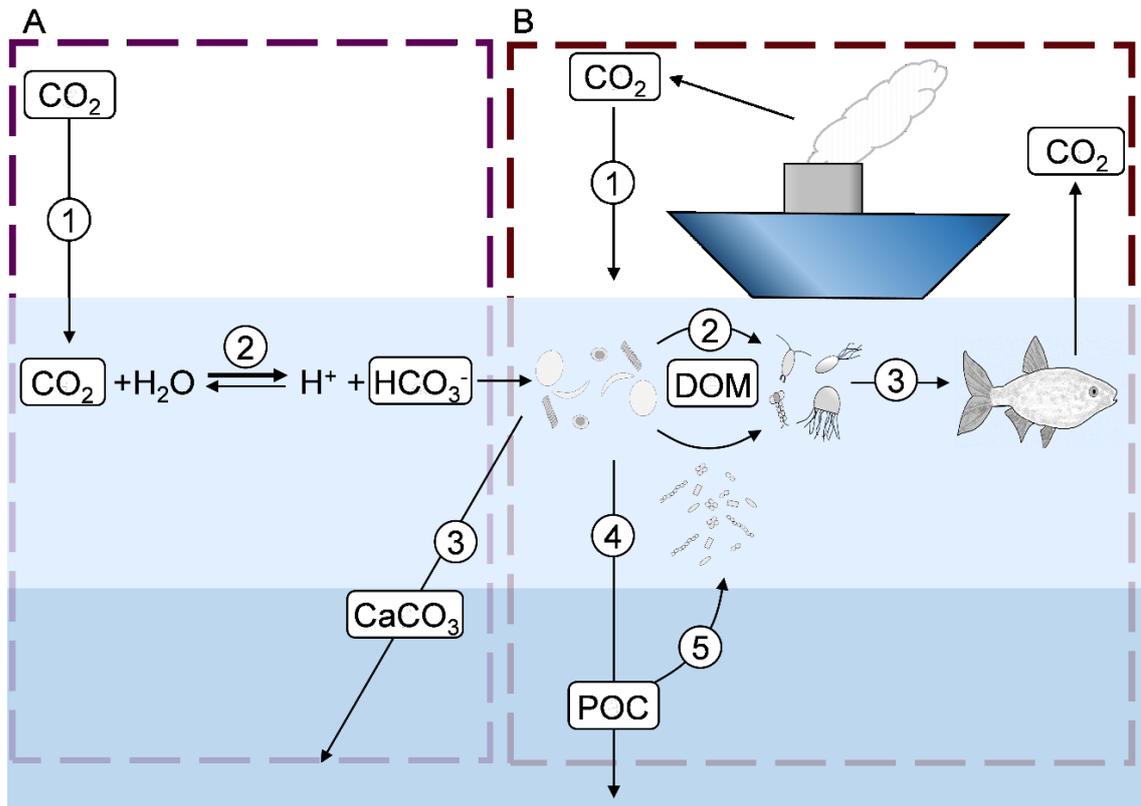


Abbildung 2: Der marine Kohlenstoffkreislauf wird aufgeteilt in den anorganischen C-Kreislauf (A) und die biologische C-Pumpe (B). A: CO_2 wird im Wasser gelöst (1) und steht in einem Gleichgewicht (2) mit Hydrogencarbonat (HCO_3^-). Hydrogencarbonat wird von einigen Phytoplanktonspezies in die Kalkschale, bestehend aus Calciumcarbonat (CaCO_3), eingebaut und sedimentiert beim Absterben (3). B: CO_2 wird in der euphotischen Zone (hellblau) durch fotosyntheseaktives Phytoplankton fixiert und entweder als DOM oder POC freigesetzt. DOM wird durch die mikrobielle Schleife und Zooplankton aufgenommen (2) und in höhere trophische Ebenen übertragen (3). POC sinkt in die aphotische Zone (dunkelblau) ab (4) und wird zum einen durch die mikrobielle Schleife dem DOM zugeführt (5), zum anderen sedimentiert.

1.1.2. Der Stickstoffkreislauf

Stickstoff (N) ist einer der wichtigsten Nährstoffe und findet sich in vielen Bausteinen von Biomolekülen, z.B. Nucleotiden, Aminosäuren oder Aminozucker wieder. Ein Mangel von N begrenzt das Wachstum, was sich in den Ozeanen unmittelbar auf die Primärproduktion und somit auf die globale CO_2 -Bilanz auswirkt (Holtappels et al. 2009). Neben der Zuführung von partikulärem (PN) oder gelöstem organischem und anorganischem N (PON: engl. *particulate organic nitrogen*; DON: engl. *dissolved organic nitrogen*; DIN: engl. *dissolved inorganic nitrogen*: Ammonium, Nitrat, Nitrit) durch Zuflüsse ins Meer, wird molekularer Stickstoff (N_2) von N_2 -fixierenden Bakterien (Cyanobakterien) aus der Atmosphäre gebunden und steht so Phytoplankton und heterotrophen Bakterien als DIN und DON zur Verfügung. Durch heterotrophe Herbivore und Primärzersetzer werden DON und NH_4^+ der Nahrungskette zugeführt (Zehr und Ward 2002). Neben dem trophischen Transfer von DON in der Nahrungskette (Kirchmann 2000), spielen mikrobielle Abbauprozesse auch beim Verlust von N eine tragende Rolle. In anoxischen Zonen wird durch Denitrifikation

Nitrat zu N_2 reduziert um Energie zu gewinnen. In Sauerstoffminimum Zonen wird durch anaerobe Ammoniumoxidation (kurz. Anammox) NH_4^+ zu N_2 oxidiert um Energie für die CO_2 -Fixierung zu erlangen (Holtappels et al. 2009). Durch Vermischung, Advektion und Diffusion, sowie durch Migration von Diatomeen, kann PON zwischen den Schichten transferiert, recycelt und so dem trophischen Nährstofftransfer zugeführt werden (Zehr und Ward 2002; Moore und Villareal 1996).

Wird PON in der Wassersäule nicht zu NH_4^+ recycelt, sedimentiert er in tiefere Zonen ab und kann so nicht mehr von nitrifizierenden Bakterien abgebaut werden. Im Sediment wird er durch dort angesiedelte Bakteriengemeinschaften weiter umgewandelt. (Abb.3)

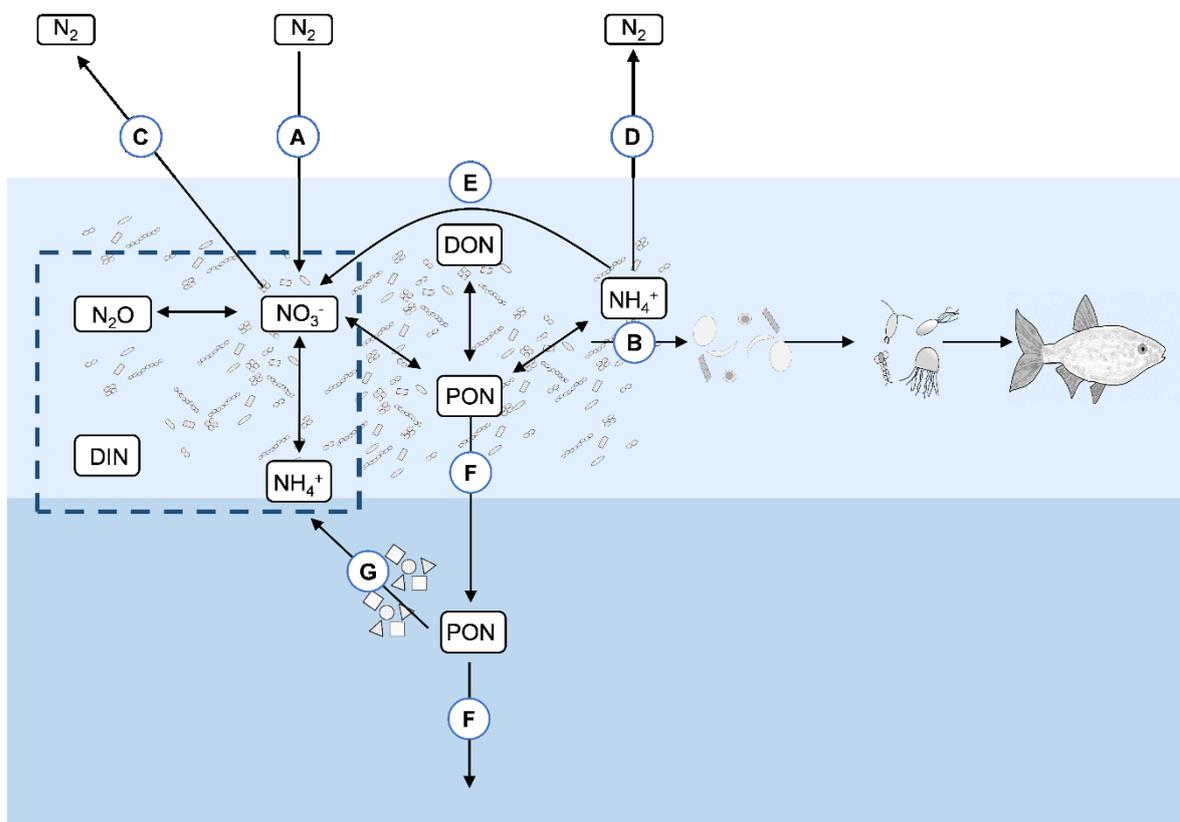


Abbildung 3: Der marine Stickstoffkreislauf. A: N_2 -Fixierung. B: Durch Primärzersetzer werden DIN (NH_4^+ , NO_3^- und N_2O) und DON der Nahrungskette zugeführt. C: Bei der Denitrifikation werden NO_3^- zu N_2 (gasförmig) reduziert, dieser entweicht in die Atmosphäre. D: Die anaerobe Ammoniumoxidation führt zum Verlust von NH_4^+ durch Oxidation zu N_2 . E: Recycling und Regeneration von PON zu DON, NH_4^+ und NO_3^- . F: Verlust von PON durch Sedimentation. G: Vermischung, Advektion und Diffusion, sowie Migration von Diatomeen führt teilweise zur Rückführung von PON in den Kreislauf. (hellblau: euphotische Zone; dunkelblau: aphotische Zone).

1.1.3. Der Phosphorkreislauf

Phosphor (P) zählt, wie N, zu den wichtigen Nährstoffen und ist in vielen Makrobausteinen enthalten. Außerdem repräsentiert verestertes Phosphat in Form von ATP eine Art Energiewährung für alle lebenden Organismen (Filippelli 2008). Die meisten wichtigen Schritte der Fotosynthese und Stoffwechselwege sind um P arrangiert (Westheimer 1987). Da P im Gegensatz zu N und C keine stabile Gasphase hat, kann er nur durch wässriges Milieu transportiert werden. Wie Filippelli zusammenfasst „*In summary, there is not much phosphorus around, it does not travel and it is not readily bioavailable*“ (Filippelli 2008). In der belebten Natur, wie auch im marine Habitat stellt P einen limitierenden Faktor dar (Filippelli 2002; Malfatti 2014).

Da eine Fixierung aus der Atmosphäre wegfällt, beginnt der P-Kreislauf an Land (Abb. 4). Der natürliche Phosphorkreislauf startet damit, dass Pflanzen über ihre Wurzeln, durch die mit ihnen in Symbiose stehenden Mykorrhiza, den gelösten anorganischen Phosphor aus dem Boden aufnehmen. Durch Verwesung von Organismen wird wiederum Hydrogenphosphat (H_2PO_4^-) aus organisch gebundenem Phosphor frei (Bucher 2007; Filippelli 2008).

Dieser wird, zusammen mit partikulärem (PP) oder gelöstem organischen/anorganischem P (DOP; engl. *dissolved organic phosphorus*; DIP; engl. *dissolved inorganic phosphorus*), welcher durch Erosion, Verwitterung oder anthropogene Einflüsse freigesetzt wurde (Pattin und McLaughlin, 2007; Filippelli 2008), über Flüsse in die Meere geleitet (Abb. 5).

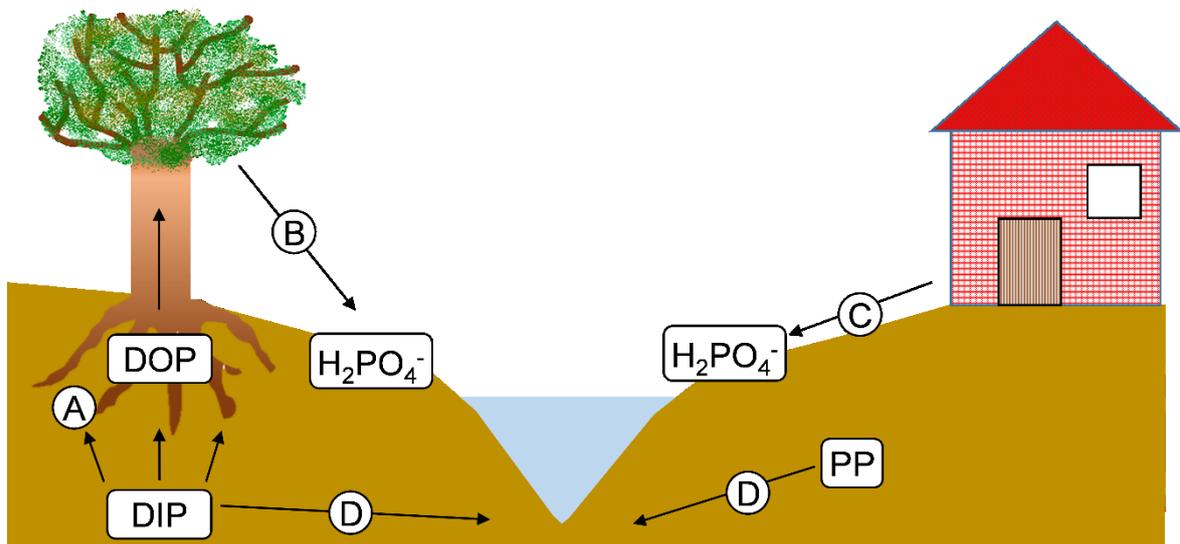


Abbildung 4: Terrestrischer Phosphorkreislauf. A: Pflanzen können durch Mykorrhiza gelösten anorganischen Phosphor (DIP) aufnehmen und als organischen Phosphor binden. B: Durch Verwesung von Pflanzenteilen wird Hydrogenphosphat (H_2PO_4^-) frei. C: Anthropogen eingebrachtes (Hydrogen-) Phosphat wird in Grundwasser und Flüsse geleitet. D: Durch Erosion und Verwitterung gelangen DIP und partikulärer Phosphor (PP) in die Gewässer.

Partikulärer Phosphor geht hier dem marinen Kreislauf durch Sedimentation verloren. DIP und DOP werden schnell durch Phytoplankton aufgenommen und folgen einem Kreislauf von Transformierung und Recycling ähnlichen dem des DOM (s. Kohlenstoffkreislauf) (Paytan und McLaughlin 2007a, b; Filippelli 2008). Durch die schnelle Aufnahme in den Oberflächengewässern herrscht hier eine niedrige P Konzentration, welche in den Tiefen mit zunehmendem Alter des Wassers wieder steigt (Filippelli 2008).

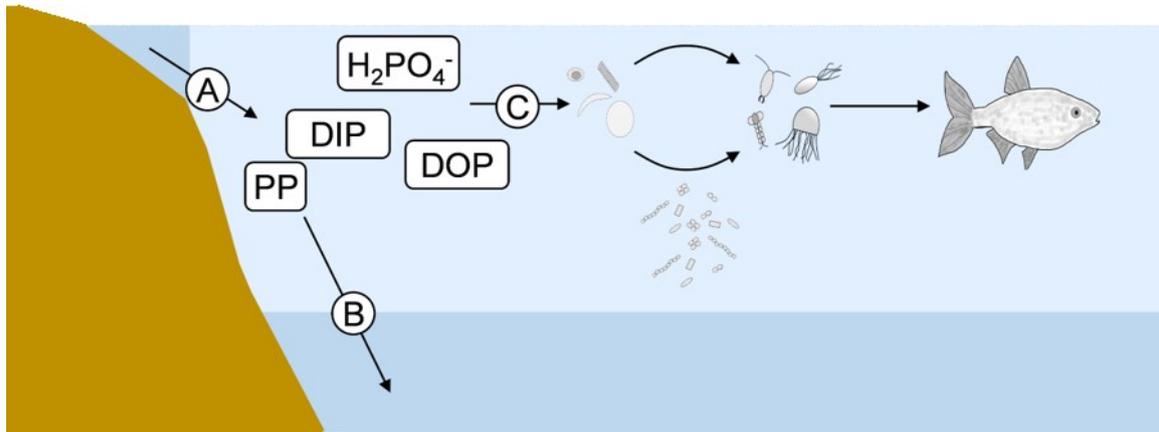


Abbildung 5: Mariner Phosphorkreislauf. A: Partikulärer (PP), anorganisch (DIP) und organisch (DOP) gelöster Phosphor und (Hydrogen-)Phosphat (H_2PO_4^-) werden über Zuflüsse (graublau) ins Meer geleitet. B: PP sedimentiert in die aphotische Zone (dunkelblau) und wird dem biologischen Kreislauf entzogen. C: DIP, DOP und H_2PO_4^- werden von heterotrophen Bakterien und Phytoplankton aufgenommen und durchlaufen die trophischen Ebenen der Nahrungskette in der euphotischen Zone (hellblau).

1.1.4. N:P-Verhältnisse und Limitation

Wie bereits in den vorhergegangenen Kapiteln beschrieben, stehen die Kreisläufe für C, N und P miteinander in Verbindung. In der marinen Primärproduktion spiegelt sich dies im zellulären N:P-Verhältnis wieder. Bereits 1934 beschrieb Alfred Redfield, dass es einen engen Zusammenhang zwischen der Chemie des Meeres und der elementaren Zusammensetzung des Planktons gibt. So postulierte er, dass das C:N:P-Verhältnis im marinen Habitat im Mittelwert 106:16:1 beträgt, was durch zahlreiche Studien belegt wurde (Arrigo 2005). Das so genannte Redfield-Verhältnis wird oft zur Definition von N- und P-Limitation verwendet:

$N:P < 16$ wird als N-Limitierung betrachtet; $N:P > 16$ steht für eine P-Limitation

(Downing 1997; Geider und La Roche 2002).

Elser und Hasset beschrieben 1994, dass Phytoplankton im Süßwasser höhere zelluläre N:P-Verhältnisse aufweist, als marines Phytoplankton, wohingegen die Elementarzusammensetzung marinen Zooplanktons ein höheres N:P-Verhältnis als Zooplankton in Süßwasser aufweist (Elser und Hasset 1994). Downing veröffentlichte 1997 einen Datensatz, der ein durchschnittliches marines N:P-Verhältnis von 37 darlegt (Downing 1997). Zudem wurde beobachtet, dass die N:P-Verhältnisse in der Tiefsee und marinen Sedimenten sehr niedrig sind, was auf die zügige Sedimentation von P zurückzuführen sein kann (Downing und McCauley 1992; Downing 1997). Dagegen wurde ein starker Anstieg des N:P-Verhältnisses in Küstennähe, vorwiegend in oligotrophen Gewässern nachgewiesen, was auf die Aktivität von N_2 -Fixierern schließen lässt (Capone und Carpenter 1982; Smith und Veeh 1989; Downing 1997).

Betrachtet man die gesamten marinen Elementarkreisläufe stellt sich ein globales Gleichgewicht des N:P-Verhältnisses ein (Arrigo 2005; Abb. 6). Wobei C, N und P dem marinen Kreislauf auf verschiedensten Wegen zugeführt werden. In eutrophen Gewässern mit hoher Primärproduktion wird eine große Menge an DOM gebildet; Beim Absinken wird dieses durch die mikrobielle Schleife unter O_2 -Verbrauch abgebaut. Dadurch entstehen Sauerstoffminimumzonen, die eine Voraussetzung für N_2 -bildende Prozesse wie Anammox und Denitrifikation bieten. Durch das Entweichen von N_2 in die Atmosphäre, sinkt das N:P-Verhältnis mit zunehmender Tiefe, es kommt zur N-Limitation. Durch Advektion und Diffusion, kommt es zum Aufstieg N-armen Tiefenwassers. In oligotrophen Gewässern führt dies zur N_2 -Fixierung durch Organismen wie Cyanobakterien. Das N:P-Verhältnis steigt, es herrscht P-Limitation vor. (Arrigo 2005)

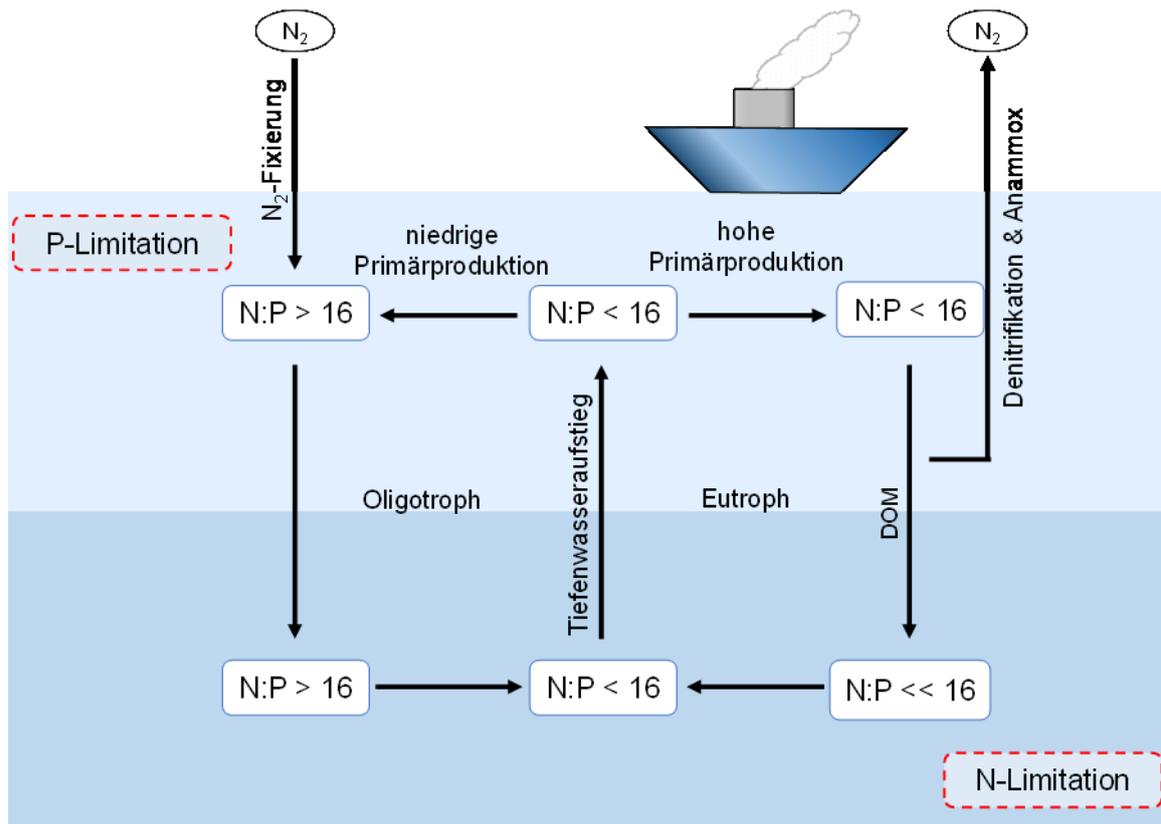


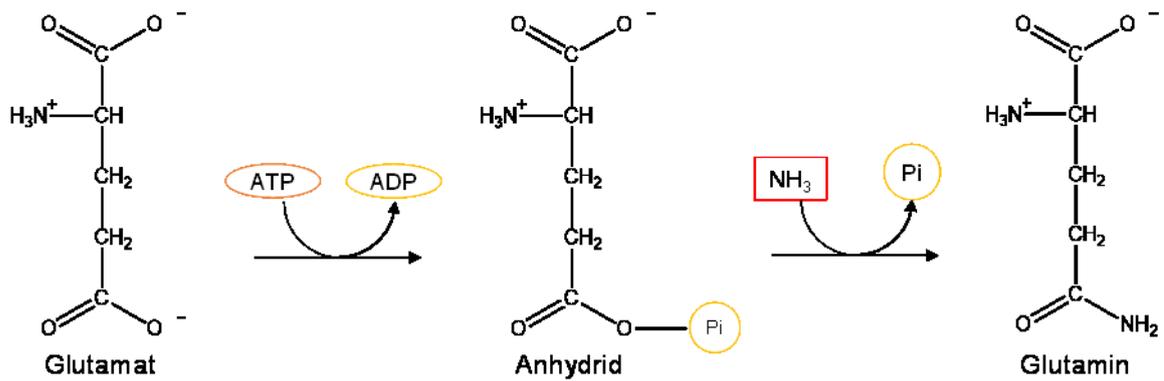
Abbildung 6: Die marine N:P-Balance der Weltmeere nach Arrigo (2005). Aufsteigendes Tiefenwasser ist stickstoffarm ($N:P < 16$, N-Limitation). In eutrophen Gewässern führt dies zu hoher Primärproduktion in der euphotischen Zone (hellblau), produzierte gelöste organische Substanzen (DOM) sedimentieren in die aphotische Zone (dunkelblau) und werden unter O_2 -Verbrauch abgebaut. O_2 -Mangel führt zu Prozessen wie Denitrifikation und Anammox, bei denen N_2 freigesetzt wird. In nährstoffarmen oligotrophen Gewässern mit niedriger Primärproduktion werden N_2 -Fixierer aktiv, das N:P-Verhältnis der produzierten DOM steigt ($N:P > 16$, P-Limitation).

1.1.5. Ammonium und Phosphat als Nährstoffe

Die meisten heterotrophen Bakterien favorisieren Ammonium (NH_4^+) als Stickstoffquelle (Reitzer 2003) und decken damit rund 35-60% des bakteriellen N-Bedarfs in den Ozeanen (Tupas et al. 1994). NH_4^+ diffundiert in seiner deprotonierten Form (NH_3) in die Zellen (Simon und Gutknecht 1980; Walter und Gutknecht 1986; Kim et al. 2012), lediglich bei niedrigen Konzentrationen im zellulären Umfeld, kommt es zur aktiven Aufnahme über Ammoniumtransporter, z.B. Proteine der Amt-Familie (Boussiba et al. 1984 ; Loqué und von Wirén 2004; Andrade und Einsle 2007; Kim et al. 2012).

Da die aktive NH_4^+ -Aufnahme energieaufwändig ist, wird diese im Falle der N-Limitation über einen Rückkopplungsmechanismus gesteuert, der den minimalen N-Level hält, welcher für das Wachstum benötigt wird. So beschreiben Minsu Kim und sein Team, dass *E. coli* zunächst durch NH_4^+ -Assimilation den internen N-Speicher auffüllt indem Glutamin und Glutamat über den Glutamin-Synthetase-/Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase (GS/GOGAT) - Stoffwechselweg (Abb. 7) gebildet werden (Reizer 2003). Dadurch wird der Ammoniumtransporter AmtB über die Bindung des Regulatorproteins GlnK deaktiviert. Im Falle einer Limitation wird die NH_2 -Gruppe vom Glutamat abgespalten und in die Biomasseproduktion eingebunden, dabei entsteht freies 2-Oxoglutarat, durch welches GlnK von AmtB abgespalten und somit den Transporter aktiviert (Kim et al. 2012).

Glutamin-Synthetase (GS)



Glutamin-2-Oxoglutarat(2OG)-Aminotransferase (GOGAT)

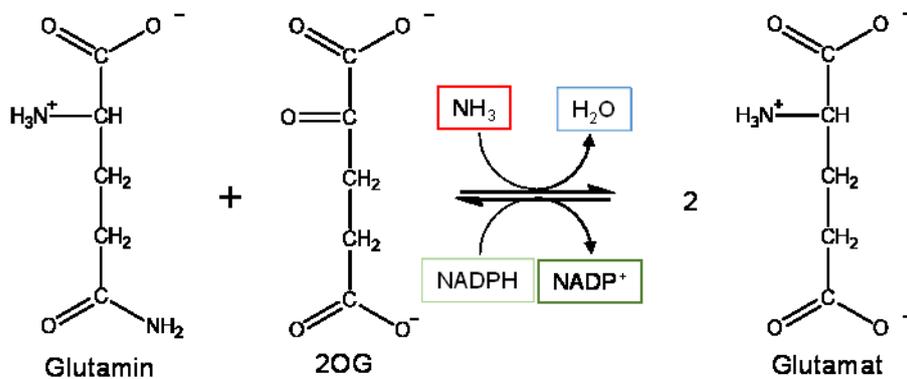


Abbildung 7: Darstellung des Glutamin-Synthetase/Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase (GS /GOGAT) - Stoffwechselweges (abgewandelt von Reizer, 2003). Durch die GS wird Glutamat zu Glutamin umgewandelt. Zunächst wird die sekundären Carboxyl-Gruppe des Glutamats durch Phosphorylierung unter ATP-Verbrauch aktiviert. Im zweiten Schritt wird die Phosphat-Gruppe durch eine Amino-Gruppe substituiert. Glutamin wird mit 2-Oxoglutarat (2OG) unter NADPH-Oxidation zu Glutamat umgewandelt (GOGAT).

Phosphat (PO_4^{3-}) dient als Quelle für anorganischen Phosphor. Für verschiedene heterotrophe Bakterien ist nachgewiesen, dass die Aufnahme von PO_4^{3-} biphasisch über zwei verschiedene Aufnahmesysteme erfolgt (Willsky et al. 1973; Loewendorf et al. 1973; Burns und Beever 1979; Jansson 1988). Beide Transportsysteme sind K^+ -abhängige Symporter, unterscheiden sich aber in ihren weiteren Funktionen (Abb. 8).

Über das konstitutive Pit-System wird PO_4^{3-} zwischen der Zelle und ihrer Umgebung ausgetauscht, es hat eine niedrige PO_4^{3-} -Affinität und wird über die protonenmotorische Kraft angetrieben (Russell und Rosenberg 1980). Bei PO_4^{3-} -Überschuss kommt es zur aktiven Exkretion von PO_4^{3-} aus dem inneren Speicher durch das Pit-System, wobei die Aufnahme weiterläuft (Rosenberg et al. 1977, 1982, Russell und Rosenberg 1980).

Bei P-Limitation wird das Pst-System aktiviert. Es handelt sich um einen hoch PO_4^{3-} -affinen ABC-Transporter. Der Pst-Transporter ist ein membranständiges Protein, welches PO_4^{3-} bindet und so in Mangelsituationen die P-Konzentration um das 100-fache steigern kann (Willsky und Malamy 1976).

In der Zelle wird aufgenommenes PO_4^{3-} durch Substratkettenphosphorylierung bzw. Elektronentransport auf ADP übertragen und steht so in Form von ATP der Zelle als Energieträger und P-Donor zur Verfügung.

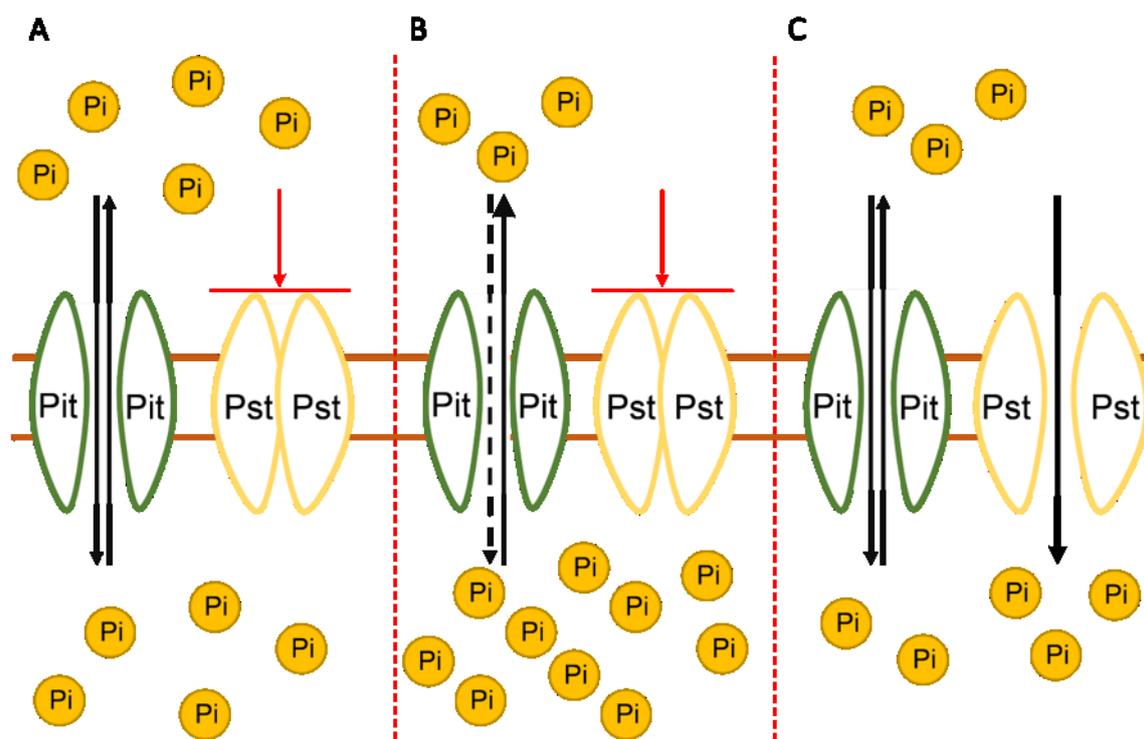


Abbildung 8: Der PO_4^{3-} -Transport. A: Bei einer ausgeglichenen PO_4^{3-} -Konzentration im Medium transportiert das Pit-System PO_4^{3-} in beide Richtungen, während das Pst-System deaktiviert ist. B: Bei PO_4^{3-} -Überschuss wird PO_4^{3-} vermehrt über das Pit-System ausgeschleust, die Aufnahme wird dennoch aufrechterhalten. Das Pst-System ist deaktiviert. C: Bei PO_4^{3-} -Limitation nimmt das Pst-System aktiv PO_4^{3-} auf.

1.2. Die *Roseobacter*-Gruppe

Marines Bakterioplankton setzt sich vor allem aus α - und γ -*Proteobakterien*, sowie *Flavobakterien* und Vertreter der *Bacteroidetes* zusammen. Die Zusammensetzung ändert sich sowohl saisonal als auch geographisch (Giovannoni und Stingl 2005; Simon 2017). Eine Untergruppe der α - *Proteobakterien* fällt hier durch ihre ubiquitäre Verbreitung und Abundanz auf, nämlich die zu den *Rhodobacterales* zählenden *Roseobacter*-Gruppe. Ihre Vertreter sind von Küstenregionen bis zum offenen Ozean, in tropischen und auch in Polarregionen zu finden (z.B. Buchan et al. 2005; Luo und Moran 2014; Billerbeck et al. 2016; Simon et al. 2017). Sie kommen sowohl freischwimmend, wie auch im Sediment, partikelassoziiert und in kommensalen Beziehungen mit Phyto- und Zooplankton, Invertebraten und Vertebraten vor (z.B. Buchan et al. 2005; Wagner-Döbler und Biebl 2006; Luo und Moran 2014). Die *Roseobacter* machen in einigen küstennahen Ökosystemen rund 20%, sowie in den Oberflächengewässern der offenen See rund 3-5% der bakteriellen Gemeinschaft aus (Moran et al. 2007; Luo und Moran 2014).

Die ersten beiden *Roseobacter*-Isolate wurden 1991 von Tsuneo Shiba beschrieben: *Roseobacter litoralis* und *Roseobacter denitrificans*. Beide Stämme wurden von marinen Algen isoliert und produzieren das pink farbige α -Bakteriochlorophyll, welches namensgebend für die *Roseobacter* ist (Shiba 1991).

Bis heute konnten über 50 Isolate der *Roseobacter*-Gruppe Genom-sequenziert werden (Luo und Moran 2014). Es sind 41 Abstammungslinien mit über 89% Sequenzähnlichkeit auf 16S rRNA-Ebene bekannt. Diese wurden in 13 Gattungen eingeteilt mit Sequenzunterschieden von maximal 4% (Buchan et al. 2005; Wagner-Döbler und Biebl 2006; Brinkhoff et al. 2008). Teilweise bestehen die Gattungen aus nur einer Spezies, aber nicht aus mehr als 5, deren Unterscheidung auf Grund sehr hoher Sequenzähnlichkeit (teilweise 99%) eine Herausforderung darstellt. Darüber hinaus führt die physiologische und genetische Diversität zu häufigen Reklassifizierung und Neueinteilung (Brinkhoff et al. 2008).

Die größte Untergruppe der *Roseobacter*-Gruppe, deren globale Verteilung systematisch untersucht wurde ist das DC5-80-3-Cluster, auch als *Roseobacter Cluster Affiliated* (RCA) bezeichnet (Selje et al. 2004; Wagner-Döbler und Biebl 2006; Brinkhoff et al. 2008). Die RCA-Mitglieder sind strikt pelagisch, machen 10% aller Bakterien im Nordpolarmeer aus (Malmstrom et al. 2007) und können in Küstenregionen, wie zum Beispiel der deutschen Bucht 20-22% der Gesamtbakterienpopulation betragen (Brinkhoff et al. 2008; Voget et al. 2015; Kanukollu et al. 2016; Billerbeck et al. 2016).

Die Roseobacter zeichnen sich durch große Genome mit einem hohen G+C Gehalt (60% \pm 4%) aus (Luo und Moran 2014) und sind mit wenigen Ausnahmen marin oder hypersalin (z.B. Labrenz et al. 2005; Martinez-Checa et al., 2005). Die meisten Vertreter sind moderat halophil oder halotolerant (z.B. Petursdottir und Kristjansson 1997; Pujalte et al. 2005), sowie mesophil bis psychrophil (z.B. Gosink et al. 1997; Brinkhoff et al. 2008). Sie zeichnen sich durch eine große Diversität hinsichtlich Physiologie und Morphologie, sowie durch hohe Anpassungsfähigkeit aus. Die Vielfalt der StoffwechsellLeistungen und innerer Regelkreise erklärt ihren Erfolg in der Vielzahl mariner Habitats und Besetzung spezieller Nischen (Buchan et al. 2005; Wagner-Döbler und Biebl 2006; Brinkhoff et al. 2008; Luo und Moran 2014). Dies wird gestützt durch die Verfügbarkeit von Plasmiden verschiedener Größen, auf denen ökologisch relevante Funktionen, wie z.B. aerobe anoxische Photosynthese, Flagellenbildung oder die Produktion des Antibiotikums Tropodithiolsäure (TDA) codiert sind und über horizontalen Gentransfer zwischen den Spezies übertragen werden können (Swingley et al. 2007 ; Moran et al. 2007; Trautwein et al. 2016; Petersen und Wagner-Döbler 2017).

Roseobacter tragen verschiedene Sensormechanismen um ihre Umgebung wahrnehmen und mit ihr interagieren zu können (Moran et al. 2007; Ziesche et al. 2015). Daher kommen sie als freischwimmende Einzelzellen, Aggregate und auch in Biofilmen vor. In oligotrophen Gewässern können sie in nährstoffangereicherte Aggregaten mit unnatürlich hohen Substratkonzentrationen leben (Swingley et al. 2007; Moran et al. 2007). Indem die marinen Roseobacter mutualistisch, probiotisch oder pathogen mit den höheren Organismen in ihrer Umgebung interagieren, spielen sie eine große Rolle bei vielen biogeochemischen Prozessen (z.B. Luo und Moran 2014; Ziesche et al. 2015). Durch die Bildung von Metaboliten und den Abbau niedermolekularer Verbindungen tragen sie in der mikrobiellen Schleife einen wichtigen Beitrag zu den marinen Elementarkreisläufen (Buchan et al. 2005; Wagner-Döbler und Biebl 2006; Kanukollu et al. 2016).

1.2.1. Der Modelorganismus *Phaeobacter inhibens*

Phaeobacter inhibens ist ein marines heterotrophes Bakterium und Mitglied der *Roseobacter*-Gruppe. Es ist obligat aerob, mit stäbchenförmigen, Gram-negativen Zellen, weist ein großes Substratspektrum von Zuckern bis hin zu proteinogenen Aminosäuren auf (z.B. Zech et al. 2013a, b; Drüppel et al. 2014; Wiegmann et al. 2014) und vermag etliche Sekundärmetabolite zu bilden (z.B. Martens et al. 2007; Geng et al. 2008, 2010; Berger et al. 2011). Es kommt als Einzelzellen vor, bildet im Verlauf des Wachstums aber Ketten und Aggregate aus (Abb. 9) (Segev et al. 2015).

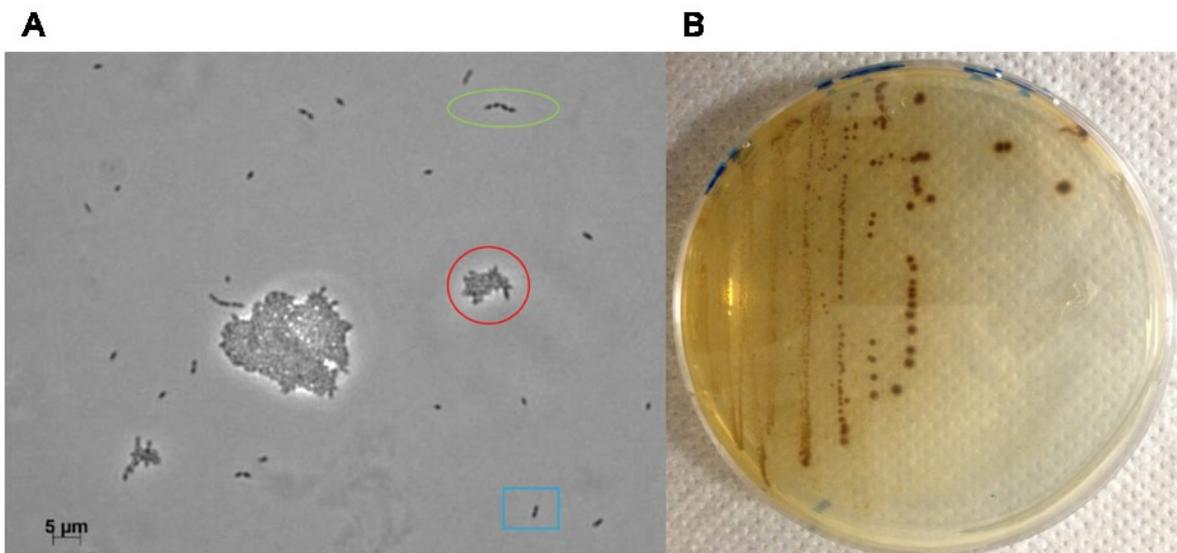


Abbildung 9: Der Modelorganismus *P. inhibens* DSM 17395. A: Lichtmikroskopische Aufnahme (1000-fache Vergrößerung) einer Kultur in Seewassermedium. Die morphologische Vielfalt zeigt sich in Einzelzellen (blauer Kasten), Ketten (grüne Ellipse) und Aggregate (roter Kreis). B: Wachstum auf MB-Agar, deutlich zu erkennen sind die braun gefärbten Kolonien.

Vertreter der Gattung *Phaeobacter* wurden aus verschiedenen Habitats weltweit isoliert (Dogs et al. 2013): deutsches Wattenmeer, südliche Nordsee (Brinkhoff et al. 2004), Ostküste Südkoreas (Bhattarai et al. 2006), Changjiang Estuar (Sekiguchi et al. 2002), und vielen weiteren Standorten, über alle Ozeane hinweg verteilt (z.B. Giebel et al. 2009; D'Alvise et al. 2012).

Der Stamm *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 wurde ursprünglich als *Roseobacter gallaeciensis* DSM 17395 (Ruiz-Ponte et al. 1998) beschrieben und erst als *Phaeobacter gallaeciensis* DSM 17395 (Martens et al. 2006), später als *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 reklassifiziert (Buddruhs et al. 2013).

P. inhibens DSM 17395 besitzt neben dem Chromosom drei Plasmide (65 kb, 78 kb und 262 kb) auf denen unterschiedliche Funktionen codiert sind (Petersen 2012; Buddruhs et al. 2013; Trautwein et al. 2016). Das größte Plasmid trägt z.B. die Gene zur Produktion der antibiotisch wirksamen Tropodithiätsäure (TDA), welche in Komplexbildung mit Eisen zu einer bräunlichen Färbung der Kultur führt. Diese Eigenschaften waren namensge-

bend: „*Phaeos*“ aus dem griechischen für „braun“, „inhibens“ auf Grund der inhibierenden Wirkung von TDA auf verschiedene marine Bakterien und Algen (Martens et al. 2006; D’Alvise et al. 2012; Trautwein et al. 2015;). Das kleinste Plasmid trägt die Gene für Quorum Sensing und Biofilmbildung (Petersen 2012; Trautwein et al. 2016). Dies befähigt *P. inhibens* zum Beispiel die Alge *Ulva australis* zu besiedeln und darüber hinaus durch die Produktion von TDA andere Bakterien auszukonkurrieren (Rao et al. 2006). Eine weitere Symbiose tritt *P. inhibens* mit der Mikroalge *Emiliania huxleyi* ein: in einer mutualistischen Phase dient die TDA Produktion dem Schutz der Alge gegen schädliche Bakterien. Ist jedoch die Algenblüte erreicht, wird *P. inhibens* parasitisch und bildet ein als Roseobacti-zid bezeichnetes Algizid, welches die Alge abtötet und dadurch Nährstoffe freisetzt (Seyedasadost et al. 2011a, b; Wang et al. 2016). In Fischfarmen und Aquakulturen werden Stämme des *P. inhibens* auf Grund ihrer probiotischen Eigenschaften eingesetzt (z.B. Prado et al. 2009; D’Alvise et al. 2012; Grotkjær et al. 2015).

Als heterotrophes marines Bakterium ist *P. inhibens* einer dynamischen Umwelt mit wechselndem Nährstoffangebot und limitierenden Bedingungen ausgesetzt (Arrigo 2005), eine schnelle Regelung der Stoffwechsellleistungen ist daher unabkömmlich (Kjellenberg et al. 1987). Während bekannte Modellorganismen wie *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* beim Eintritt in die stationäre Phase die Enzyme des Zentralstoffwechsels hinunterfahren (Rahman et al. 2008; Bernhardt et al. 2003), behält *P. inhibens* deren Abundanz bei und tritt in eine Art „stand-by“ Modus, der es ermöglicht sofort auf die Zufuhr von Nährstoffen zu reagieren (Zech et al. 2009). Dies macht *P. inhibens* DSM 17395 zum idealen Modellorganismus für physiologische Experimente zur Untersuchung verschiedener Perturbationen im marinen Lebensraum. Hinzu kommt die Verfügbarkeit des vollständig sequenzierten Genoms (Thole et al. 2012) und eine relativ einfach Kultivierbarkeit (Zech et al. 2009; Brinkhoff et al. 2008).

1.3. Systembiologie: Definition und Geschichte

Der Begriff Systembiologie ist weitestgehend selbsterklärend: Die Untersuchung der Biologie eines Systems bzw. die systematische Untersuchung der Biologie eines Organismus. Dabei ist das Ziel durch die holistische Untersuchung eines zellulären Netzwerkes oder eines Modellorganismus, mit all seinen Fähigkeiten und Interaktionen ein umfassendes Verständnis seiner Funktion zu erlangen und zu verstehen, wie es sich in die Umwelt bzw. in die zelluläre Organisation strukturierter Gesellschaften einfügt (Nurse und Hayles 2011; Arkin und Schaffner 2011).

Wichtige Handwerkszeuge der Systembiologie sind physiologische, sowie molekularbiologische Methoden zum Erwerb von Daten, sowie darüber hinaus die auf diesen Daten basierende bioinformatische Modellierung. In letzterem liegt auch die Schwierigkeit, denn die Modellierung von (inter- und intra-) zellulären Prozessen, wie beispielsweise Stoffaufnahme, Stoffwechselwege, und Zellkommunikation ist sehr komplex. Im Gegensatz zur Modellierung von physikalischen Phänomenen, spielen in der Biologie jede Menge an redundanten Funktionen eine wichtige Rolle, die auf den ersten Blick nicht immer als notwendig, ökonomisch und effektiv erscheinen, aber die Entwicklung in der Evolution wieder spiegeln (Jacob 1977; Saunders und Ho 1976; Nurse und Hayles 2011).

Basis für die Modellierung ist eine umfassende Datenlage, welche (möglichst) alle funktionellen Prozesse der Zelle beinhaltet. Die Evolution der Systembiologie geht somit auch mit der Entwicklung der methodischen Vielfalt, die vor allem in den letzten Jahrzehnten zugenommen hat, einher (Arkin und Schaffner 2011).

Die Geschichte der Systembiologie beginnt etwa vor 100 Jahren. Einer der Ersten, der die Biologie in einen systematischen Zusammenhang setzte war D'Arcy Thompson (1917). Er beschrieb, dass die Funktion und die Form biologischer Prozesse durch physikalische Anforderungen und mechanische Gesetze bestimmt wird (Arkin und Schaffner 2011). Ende der 1930er führte Walter Cannon den Begriff der „Homöostase“ ein, er beobachtete, dass die Form und Funktion nicht nur durch äußere Umstände bestimmt wird, sondern, dass Organismen selbst auf diese reagieren, indem sie ihre physiologischen Parameter auf konstantem Niveau halten (Cannon 1929; Arkin und Schaffner 2011). Bis in die 1960er wurden Hypothesen über die Zusammenhänge von Netzwerken und zentrale Mechanismen aufgestellt (Rosenblueth et al. 1943; Waddington 1977), die durch molekularbiologische Erkenntnisse untermauert wurden.

In den 90er Jahren verbessert eine breite Palette an neuen molekularbiologischen und analytischen Methoden die Effizienz von Genmanipulation und die Messung von Zellkomponenten. Einer der wichtigsten technologischen Fortschritte war die Einführung des Internets, durch welches eine hoch effiziente und schnelle Verbreitung von Daten möglich wurde, was den Grundstein für die Systembiologie, wie sie heute untersucht wird, setzte (Arkin und Schaffner 2011).

Mit Beginn des neuen Jahrtausends verlagerte sich der Fokus von der Betrachtung der Moleküle auf die Erforschung ganzer Netzwerke, da erkannt wurde, dass ein lebender Organismus nicht nur auf der molekularen Basis verstanden werden kann, sondern im Gesamten betrachtet werden muss, um alle Funktionen und Dysfunktionen verstehen zu können (Arkin et al. 1997; Barabasi und Oltvai 2004; Bruggeman und Westerhoff 2006). Um die Komplexität erfassen zu können ist ein systematischer Ansatz von Nöten, so wie er bislang hauptsächlich in Mathematik und Physik, oder der Biochemie angewandt wurde. In der Biologie bis dato nur in der Ökologie genutzt, um zum Beispiel Nahrungsnetze zu verstehen, aber nicht um ein tiefergehendes Verständnis molekularer Zusammenhänge zu erlangen (Kholodenko und Westerhoff 2004 ; Bruggeman und Westerhoff 2006). Bis zum Jahre 2010 fördern weitere Fortschritte in den Messtechniken die Durchführung umfangreicher Experimente, es werden immer mehr Parameter und Bedingungen messbar. Darüber hinaus steigt die Anzahl an sequenzierten Organismen und der Vergleich über phylogenetische Verzweigungen hinweg wird möglich (Arkin und Schaffner 2011). Je mehr Daten generiert werden, desto größer wird das Verständnis der Netzwerke und somit entwickeln sich weitere Methoden zur Auswertung, wie zum Beispiel das Biclustering (Cheng und Church 2000), und neue methodische Ansätze, die die Genomik mit Metabolomik und Proteomik ergänzen, und so die Möglichkeit schaffen eine Beziehung zwischen Biomolekülen und ökologischen Netzwerken aufzuzeigen (Zhou et al. 2010).

Die Systembiologie hat sich zu einem interdisziplinären Feld entwickelt, in dem Biologen verschiedenster Fachgebiete, mit Mathematikern und Biochemikern, Physikern und Informatikern zusammenarbeiten müssen, um sich den Herausforderungen zu stellen, die die Systembiologie mit sich bringt. Dazu zählt die umfassende Charakterisierung des Organismus auf molekularer Ebene, sowie die Betrachtung räumlich-zeitlicher Änderungen und letztendlich der Komplettanalyse der molekularen Antwort auf externe und interne Einflüsse des Systems, um all dies in ein Model zu integrieren, welches Vorhersagen über die Reaktionen (z.B. die molekulare Antwort) macht (Bruggeman und Westerhoff 2006).

Es haben sich zwei grundsätzliche Herangehensweisen etabliert: Zum einen die Top-Down, zum anderen die Bottom-Up Systembiologie.

Bei der Top-Down Systembiologie legen sogenannte „OMICs“-Technologien den Grundstein. Es wird mit der Messung von genomweiten experimentellen Daten (Top) begonnen und mit der Betrachtung molekularer Interaktionen (Bottom) beendet. Die Stärke dieses Ansatzes liegt in der vollständigen und unvoreingenommenen Betrachtung des Systems ausgehend von Genom und Transkriptom, über Proteom und Metabolom, bis hin zur Betrachtung der Interaktionen und des Fluxoms (Westerhoff und Palsson 2004; Zhang et al. 2010).

Die Bottom-Up Systembiologie beginnt im Gegensatz dazu, mit der Formulierung jedes einzelnen Prozesses der Teil eines Systems ist, um eine Vorhersage über das Verhalten dieses zu treffen, mit dem Ziel Modelle von Stoffwechselwegen zu erstellen und diese in das große Ganze zu integrieren. Sie basiert auf experimentellen Studien zu Kinetik und Biochemie von Enzymen und der Sammlung der Daten von Zellantworten auf interne und externe Störungen, sowie der Konstruktion eines Modells, welches auf diesen Daten basiert, um das experimentelle Design für weitere Studien zu verfeinern (Bruggeman und Westerhoff 2006).

Die Systembiologie hat unter anderem das Ziel, die gesamten biologischen Funktionen, die auf verschiedenen Ebenen der biologischen Organisation ausgeprägt sind, zu erfassen (Nurse und Hayles 2011). Als Werkzeuge dafür haben sie die so genannten „OMICs“-Technologien etabliert. Teilgebiete der Biologie, welche sich damit befassen die Gesamtheit des zellulären Metabolismus und die Antwort auf Umweltreize aufzuklären tragen daher dieses Suffix, welches sich von dem Sanskrit-Wort „om“ für „Vollkommenheit und Fülle“ ableitet (Yadav 2007). Die Entwicklungen verschiedener Technologien führte im letzten Jahrzehnt zur Etablierung verschiedener „OMICs“-Forschungsfelder, wie der Transkriptomik, der Proteomik, Metabolomik und weiterer, die sich zum Beispiel mit molekularen Interaktionen und Dynamik von Molekülen auseinandersetzen (Zhang et al. 2010; Fiehn 2002; Singh und Nagaraj 2006; Kandpal et al. 2009). Im besten Fall können alle diese Technologien sich ergänzen und ermöglichen es die Komplexität eines biologischen Systems zu charakterisieren, denn der Expressionslevel eines Genes alleine sagt nichts über die Abundanz und Lokalisierung gebildeter Proteine, deren biologische Aktivität und ihrer funktionellen Beziehung zu Metaboliten aus (Gygi et al. 1999). Im systembiologischen Sinne steht also ein Multi- „OMICs“-Ansatz, welcher die heterogenen Informationen der verschiedenen Datensätze integriert, um auf möglichst vielen Ebenen eine Vorhersage über die Reaktion auf eine Aktion machen zu können (Zhang et al. 2010).

Alle „OMICs“-Technologien (Abb. 10) haben drei Hauptmerkmale (Zhang et al. 2010):

Es handelt sich stets um Hochdurchsatzverfahren, die Daten gesteuert, holistisch und nach dem top-down-Prinzip erfassen. Dazu kommt die Annahme, dass der zelluläre Metabolismus als „Integriertes System“ angesehen wird, nicht als Sammlung verschiedener Einzelteile zusammengesetzt aus Informationen der Beziehungen zwischen vielen gemessenen molekularen Spezies (Ishii und Tomita 2009). Es werden großen Datenmengen generiert, die statistische und computerbasierte Auswertung erfordern.

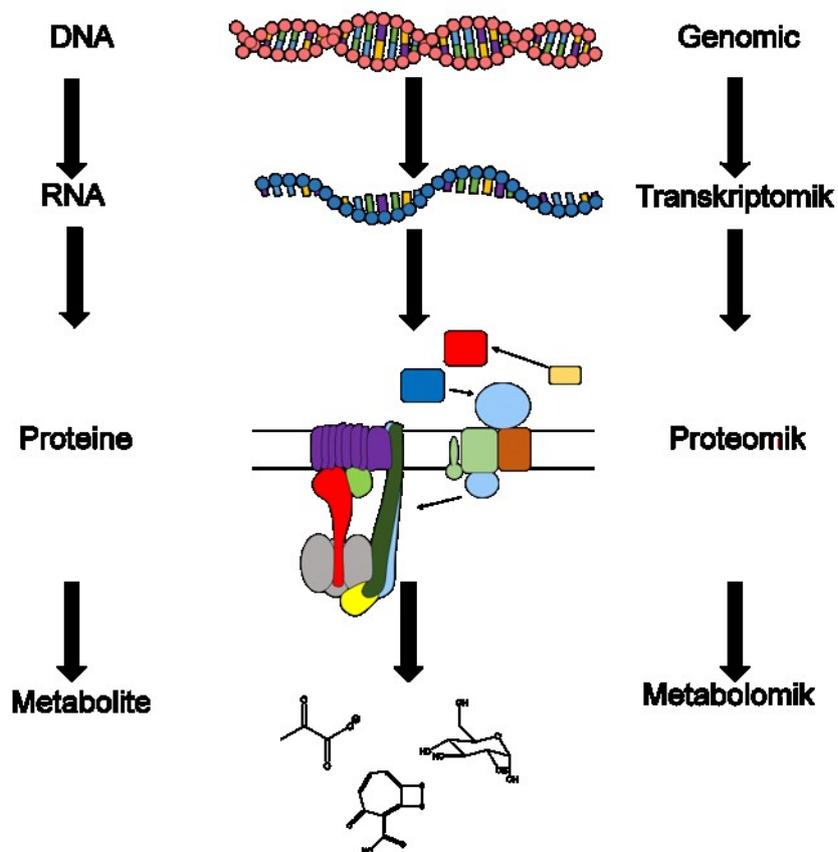


Abbildung 10: Überblick über die verschiedenen Subjekte der „OMICs“-Technologien.

Der wohl bekannteste „OMICs“-Ansatz ist die Genomik. Die in Jahrzehnten aufgebaute gute Datenlage, durch die Sequenzierung der DNA vieler Organismen, ermöglicht, durch die technisch automatisierte Genannotation und vergleichender Genomanalysen, die Funktion von auf DNA kodierten Genen vorherzusagen. So können Genomstrukturen, biologische Stoffwechselwege, sowie metabolische und regulatorische Netzwerke rekonstruiert werden (Schoolnik 2001; Ward und Fraser 2005; Sharan und Ideker 2006 ; Cardenas und Tiedje 2008; Rocha 2008)

Die Transkriptomik bestimmt die Genexpression auf globaler Ebene in dem alle vorkommenden RNA Moleküle, die so genannten Transkripte, quantitativ gemessen werden (Zhang et al. 2010; McLean 2013). Im Gegensatz zur DNA, welche statisch in jedem Organismus vorliegt, werden die Transkripte dynamisch gebildet und schnell abgebaut, worin auch die methodische Herausforderung der Transkriptomik liegt (Ye et al. 2001; Horak und Snyder 2002). Als Analysemethoden stehen zum Beispiel die Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (Stedtfeld et al. 2008) oder genomweite Microarrays zur Verfügung (Kagnoff und Eckmann 2001).

Das Proteom beschreibt die Zusammensetzung aller Proteine einer Zelle. Bedenkt man, dass Proteine die katalytisch-wirksamen Akteure der Zelle sind, und dieser gewissermaßen zum Leben erwecken, kommt der Proteomik eine herausragende Rolle in der Systembiologie zu (Graham et al. 2007; Zhang et al. 2010). Das Proteom beinhaltet nicht nur die Beschreibung intrazellulärer Aktivitäten, sondern auch die Betrachtung von Biomarkern, die als Indikatoren für den Zellstatus (z.B. Stress, Apoptose, Ruhestadien) stehen (McLean 2013). Die Methodenvielfalt der Proteomik hat sich über die letzten Jahrzehnte stetig weiterentwickelt, das folgende Kapitel wird einen Überblick geben.

Im Bereich der Metabolomik wird mittels verschiedener chromatographischer und spektrometrischer Methoden die Diversität niedermolekularer Verbindungen quantitativ untersucht (Zhang et al. 2010). Intra- und extrazelluläre Metabolite sind die funktionellen Einheiten der Zelle und ihre Konzentration steht im direkten Zusammenhang mit genetischen und physiologischen Änderungen (Raamsdonk et al. 2001). Die Messung endo- und exogener Metabolite dient der Entschlüsselung von Stoffwechselwegen. Eine tiefere Analyse und Modellierung der Dynamik von Metaboliten mittels Isotopenmarkierung wird im Rahmen der Fluxomik untersucht (Förster et al. 2002; Toya et al. 2007; Ishii und Tomita 2009; Zhang et al. 2010).

1.3.1. Methoden der Proteomik

Die Methoden der Proteomik gliedern sich in mehrere Bereiche: Zellaufschluss und differenzielle Extraktion der Proteine, Auftrennung, Digitalisierung und Quantifizierung, und die Identifizierung. Welche Methoden angewandt werden, hängt von der Art der Proben und der wissenschaftlichen Fragestellung ab. Liegt der Fokus auf der Darstellung von Komplexen, müssen die Proteine im nativen Zustand extrahiert und aufgetrennt werden (Wittig et al. 2006; Wöhlbrand et al. 2016). In der Metaproteomik, bei der die Proben direkt aus der Umwelt stammen, und sehr komplex sind, müssen je nach Herkunft der Proben, die Aufschlussmethoden variiert werden: Aus Sedimentproben werden die Proteine anders extrahiert, als bei durch Filtration von Meerwasser gewonnene Proben (z.B. Wöhlbrand et al. 2017). Bei Umweltproben ist die Proteinmenge zudem oft sehr gering, sodass sich hier Ansätze anbieten, bei denen die Proteine in Lösung enzymatisch verdaut und aufgetrennt werden, um Verluste zu minimieren (Wöhlbrand et al. 2013; Wöhlbrand et al. 2017).

Proteine können vollkommen verschiedenen Aufgaben und Eigenschaften besitzen, die ihre subzelluläre Lokalisierung bestimmen (Košmehl et al. 2013). Membranproteine (MP), z.B. Transporter für Stoffaufnahme und -exkretion, die in der Cytoplasma - (CM) und äußeren (OM; engl. *outer membrane*) Membran zu finden sind und sich durch hydrophobe Eigenschaften auszeichnen. Lösliche Proteine (SP; engl. *soluble proteins*) sind im Cytoplasma (CP) und Periplasma (PP) zu finden. Extrazelluläre Proteine (EP) werden von der Zelle ausgeschieden. Košmehl (2013) beschreibt verschiedene Methoden um die subzelluläre Fraktionierung des Proteoms von *P. inhibens* vollumfänglich zu erzielen (Abb. 11).

Um zelluläre Proteine zu extrahieren, können Zellen mechanisch oder chemisch aufgeschlossen werden. Mechanische Varianten sind: (i) French Press (French und Milner 1955), bei dem die Zellen durch die Scherkräfte bei plötzlicher Dekompression aufgeschlossen werden, (ii) Bead Beater (z.B. FastPrep-24™ 5G Instrument, MP Biomedicals, Santa Ana, Kalifornien, USA; Wöhlbrand et al., 2017) oder (iii) Grinding kit (GE Healthcare Life Science; Zech et al. 2011), bei welchen die Reibung zwischen kleinen Kügelchen zum Aufbrechen der Zellen führt, oder (iv) Ultraschall (Saranya et al. 2014). Bei chemischen Verfahren können Detergenzien oder Lösungsmittel, wie SDS (Sodiumdodecylsulfat) oder Trifluoroethanol (Wang et al. 2005 ; Wöhlbrand et al. 2017) zum Einsatz kommen. Extrazelluläre Proteine können z.B. durch Fällung mit Trichloressigsäure (TCA; engl. *trichloroacetic acid*) gewonnen werden (Košmehl et al. 2013).

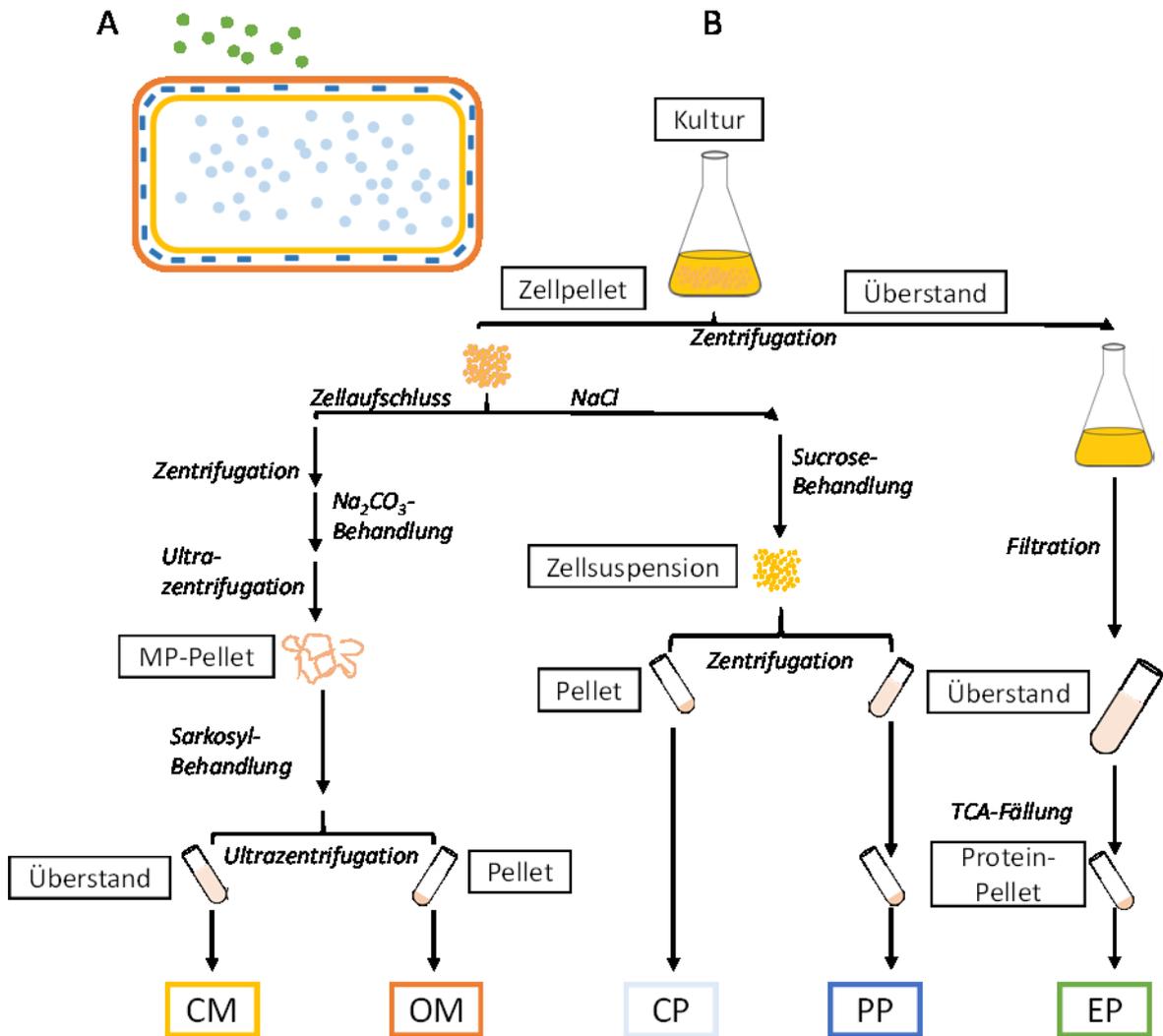


Abbildung 11: Schema zu den Methoden der subzellulären Fraktionierung nach Koßmehl et al. (2013). A: Schematische Darstellung der Lokalisierung von Proteinen in einer Zelle. Orange: Cytoplasmamembran mit Proteinen (CM); Rot: äußere Membran mit Proteinen (OM); Hellblau: cytoplasmatische Proteine (CP); Dunkelblau: periplasmatische Proteine (PP); Grün: extrazelluläre Proteine (EP). B: Fließschema der Methoden zur Gewinnung der verschiedenen Proteinfraktionen.

Sollen unterschiedliche zelluläre oder physiologische Zustände (Zech et al. 2011; Drüppel et al. 2014; Wiegmann et al. 2014) miteinander verglichen werden, bietet sich die Auftrennung der Proteinsuspensionen über elektrophoretische Methoden und eine densitometrische Analyse der digitalisierten Gelbilder an. Die Proteine können aus dem Gel extrahiert, enzymatisch verdaut und mittels Massenspektrometrie identifiziert werden.

1.3.1.1. Gelbasierte Proteinauftrennung

Die Basis der gelbasierten Proteinauftrennung bildet die so genannte PAGE, kurz für Polyacrylamide-Gelelektrophorese. Polyacrylamid wird bei der Polymerisation von monomeren Acrylamid gebildet. Die Reaktion wird durch den Radikalstarter Ammoniumpersulfat initiiert, welcher durch Tetramethylethylendiamin aktiviert wird. Durch die Verwendung von Acryl-Bisacrylamid entstehen Quervernetzungen, und somit Poren, deren Größe von der Konzentration des Acryl-Bisacrylamid abhängt. Wird ein Proteinextrakt auf ein Gel aufgetragen und eine elektrische Spannung angelegt, beginnen die Proteine durch das Gel zu wandern. Ihre Geschwindigkeit hängt dabei von der Proteingröße und ihrer Ladung ab.

Es gibt verschiedene Varianten der PAGE. Eine der wohl bekanntesten ist die SDS-PAGE, bei der das Gel, der Lauf- und Ladepuffer SDS enthalten. SDS legt sich um das Polypeptidrückgrat eines Proteins im Verhältnis 1:4, trennt die Quartärstrukturen auf, und überlagert durch seine negative Ladung die Eigenladung des Proteinmoleküls (Lottspeich und Zorbas 1998; Wöhlbrand et al. 2013).

Bei der eindimensionalen SDS-PAGE wird ein diskontinuierliches Elektrophorese System verwendet: Hierbei ist das Gel unterteilt in Sammel- und Trenngel. Im Sammelgel herrschen, im Vergleich zum Trenngel, eine niedrigere Acrylamidkonzentration und ein niedrigerer pH. Neben SDS sind noch Chloridionen und die Aminosäure Glycin im Laufpuffer enthalten. Im Sammelgel liegt der pH-Wert nahe des isoelektrischen Punktes des Zwitterions Glycin, wodurch dieses eine geringere elektrische Mobilität als Chloridionen hat. Die elektrische Mobilität der mit SDS beladenen Proteine ist geringer als die des Chlorids, dennoch höher als die des Glycins. Wird eine Spannung an das Gel angelegt, wandern alle Ionen mit der gleichen Geschwindigkeit (Isotachophorese), was zum so genannten Stapeleffekt führt. Alle Proteine wandern an einer Front bis zum Eintritt in das Trenngel, hier führt die pH Änderung zur Ladung des Glycins, dieses überholt dadurch die Proteinfront und löst den Stapeleffekt auf. Durch die geringere Porengröße wandern die Proteine im Trenngel langsamer und werden der molekularen Masse nach aufgetrennt.

Sollen native Proteinkomplexe ihrer Größe nach aufgetrennt werden, bietet sich die blue native (BN)-PAGE an. Hierbei wird dem nativ aufgeschlossenen Proteinextrakt (Wittig et al. 2006; Sunderhaus et al. 2007) und dem Kathodenpuffer der anionische Farbstoff Coomassie Brilliant Blau zugegeben. Dieser bindet an die basischen Seitenketten der Proteine und addiert eine negative Ladung. Im Unterschied zur SDS-PAGE herrscht im Trenngel ein Acrylamid-Gradient, dementsprechend werden die Poren des Gels im Verlaufe immer kleiner, wodurch ein größeres Spektrum von Proteingrößen aufgetrennt werden kann.

Bei eindimensionalen Gelelektrophoresen besteht die Problematik, dass hinter den Proteinbanden oft nicht nur eine Proteinsorte zu finden ist, sondern mehrere Proteine gleicher molekularer Masse versteckt sind. Um dem zu entgehen bieten sich zwei (oder mehr) dimensionale Systeme an. So lassen sich beispielsweise die BN und die SDS-PAGE zum 2D BN-/SDS-PAGE System verbinden (Wittig et al. 2006; Wöhlbrand et al. 2016). Hierbei werden in der ersten Dimension native Proteinkomplexe ihrer molekularen Masse nach und im Anschluss in einer zweiten Dimension mittels SDS-PAGE in ihre Untereinheiten aufgetrennt.

Eine weitere Methode ist die zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese (2D-DIGE), bei der die Proteine in der ersten Dimension mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) nach dem isoelektrischen Punkt und in der zweiten Dimension nach Molekulargewicht aufgetrennt werden. 2D-DIGE hat sich in den letzten 20 Jahren als Standard für gelbasierte Analyse für Abundanzänderungen in Proteinprofilen löslicher Proteinfractionen entwickelt (Rabus et al. 2010; Wöhlbrand et al. 2013; Strijkstra et al. 2016). Durch Markierung der Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen vor der Elektrophorese, kann die Proteinabundanz verschiedene Zustände miteinander verglichen und quantitativ ausgewertet werden.

1.3.1.2. Quantitative Darstellung

Für die Digitalisierung und Auswertung können die Gele entweder mit Coomassie Brilliant Blau (Neuhoff et al. 1988) oder Silber (Chevallet et al. 2006) gefärbt werden. Wird das Gelbild mittels eines Densitometers digitalisiert können die Muster von Banden (1D) und Spots (2D) quantitativ über die Abundanz und qualitativ über Intensitäten, mittels verschiedener Programme miteinander verglichen werden. Für den Vergleich von Spuren und Banden auf 1D Gelen kann z.B. das Softwarepaket QuantityOne[®] (BioRad GmbH, Hercules, Kalifornien, USA) verwendet werden. Für den Vergleich von Spots auf 2D Gelen eignet sich PDQuest[®] (BioRad GmbH), die Analyse und Auswertung von 2D-DIGE Gelen wird z.B. mittels DeCyder 2D[®] (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) durchgeführt, die es ermöglicht Spots dreidimensional darzustellen und Falschfarbenbilder zu erstellen.

1.3.1.3. Methoden der Proteinidentifizierung

Die Identifizierung der Proteine wird mit Hilfe von Massenspektrometrie durchgeführt. Da Proteine sehr groß sind, können sie nicht direkt massenspektrometrisch untersucht werden. Durch enzymatischen Verdau werden Proteine in definierte Peptide gespalten. Am häufigsten wird das Enzym Trypsin verwendet, dies spaltet Peptidbindungen C-terminal vor Arginin oder Lysin-Resten (Shevchenko et al. 1996). Man unterscheidet zwischen In-Gel- und In-Lösung-Verdau. Bei ersterem werden prominente Gelspuren, Banden oder

Spots ausgeschnitten und so aufgearbeitet, dass sämtliche Reste von Ionen, Farbstoffen und Detergenzien entfernt sind. Beim In-Lösung-Verdau, meist bei Shotgun-Ansätzen verwendet, wird das Proteingemisch nicht zuvor gelelektrophoretisch aufgetrennt, sondern direkt enzymatisch verdaut (Wöhlbrand et al. 2013).

Um die erzeugten Peptide mittels Massenspektrometrie (MS) analysieren zu können, müssen sie zuvor ionisiert werden. Es gibt zwei gängige Ionisierungsmethoden: die Elektrospray Ionisierung (ESI) und die Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung (MALDI).

Bei der ESI werden die Peptide über eine Nadel in einem elektrisch geladenen Feld versprüht und so positiv geladen. Die positiv geladenen Peptide werden durch einen Quadrupol als Ionenstrahl gebündelt und in eine Ionenfalle geleitet, wo sie gesammelt und anschließen über ein MS hinsichtlich des Masse-zu-Ladung (m/z)-Verhältnisses vermessen werden. Durch Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) können die Peptide zusätzlich fragmentiert werden, um die Peptidsequenz zu bestimmen. Die Peptidsequenz kann beispielsweise mittels BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ausgewertet werden.

Bei der MALDI wird das Peptidgemisch in eine organische Matrix eingebettet und im Hochvakuum einem kurzwelligen Laser-Impuls ausgesetzt. Dadurch werden die Peptide verdampft und gelangen in die Gasphase, in der ein elektrostatisches Feld angelegt ist, in welchem der Protonenübergang auf die Peptide stattfindet. Die Peptidionen werden in einem Flugzeitmassenspektrometer (TOF; engl. *time of flight*) analysiert. Das TOF misst die Flugzeit der Ionen im Vakuum, woraus das m/z -Verhältnis berechnet werden kann. Mittels TOF/TOF-MS/MS werden die Peptide fragmentiert und im Anschluss kann die Peptidsequenz wie oben beschrieben bestimmt und ausgewertet werden.

Welche Analysemethode für die Identifizierung der Proteine verwendet wird, hängt von der Komplexität der Probe ab. Weniger komplexe Proben (z.B. 2D Spots) können mittels MALDI-TOF(/TOF)-MS/MS analysiert werden. Bei komplexen Proben (1D Banden, Shotgun) wird zunächst eine Flüssigkeitschromatographie über eine Säule mit einer nano Matrix (nanoLC) durchgeführt. Durch eine niedrige Flussrate und hohen Druck werden die Proteine von störenden Verunreinigungen abgetrennt und aufkonzentriert. Auf die nanoLC kann die Analyse mit ESI-MS/MS folgen (z.B. Wiegmann et al. 2014; Drüppel et al. 2014; Wöhlbrand et al. 2016). Bei hoch komplexen Proben, wie in der Metaproteomik, kann die nanoLC neben einem ESI-MS auch einem MALDI-TOF/TOF-MS/MS vorangeschaltet werden (Wöhlbrand et al. 2017): Die Probe wird über nanoLC aufgetrennt und an einen Fraktionssammler weitergeleitet, dieser mischt die Fraktionen mit der Matrix und spottet diese auf das Taget welches dann mittels MALDI-TOF/TOF-MS/MS vermessen wird.

1.4. Prozess-kontrollierte Kultivierung in Bioreaktoren

Für Kultivierungsexperimente mit Bakterien in Flüssigkulturen, können auf verschiedene Weise durchgeführt werden. Man unterscheidet zwischen kontinuierlicher und diskontinuierlicher Kultivierung. Bei der kontinuierlichen Kultivierung wird steriles frisches Medium, in gleichem Maße zugeführt, wie Kulturbrühe abgeführt, wodurch ein konstantes Zellstadium erreicht werden kann (Chemostat). Bei der diskontinuierlichen Kultivierung, auch Batch-Kultivierung genannt, wird kein frisches Medium zugesetzt oder Kulturbrühe abgeführt. In diesem geschlossenen System vermehren sich die Bakterien über unterschiedliche Wachstumsphasen hinweg bis hin zur Absterbephase, die durch z.B. Nährstoff- oder Sauerstoffmangel ausgelöst werden kann. Batch-Kulturen können in Flaschen oder Schüttelkolben (Erlenmeyer) durchgeführt werden, diese sind allerdings im Volumen stark begrenzt und beeinflusst von der Umgebungstemperatur. Der pH-Wert kann nur über Puffer in bestimmten Bereichen gehalten werden und eine Untersuchung der Gasbildung ist nicht praktikabel. Für die Durchführung großrahmiger Experimente, wie in der Systembiologie erforderlich, eignet sich die Kultivierung in Prozess-kontrollierten Rührkesselbioreaktoren (STR; engl. *stirred-tank reaktor*).

Ein STR besteht aus einem Doppelwandglasgefäß und einem abdichtenden Deckel. Über einen an das Doppelwandgefäß angeschlossenen Kryostaten wird die Temperatur kontrolliert. Der Deckel ist mit einer Rührwelle mit verschiedenen Rührern, verschiedenen Sonden, einem Probenahmesystem, zur sterilen Probenentnahme, sowie Zuläufen für Korrekturflüssigkeiten und Medien ausgestattet. Hinzu kommen Anschlüsse für gefilterte Zuluft und Abluft. (Abb. 12)

Das ganze STR-System ist an eine computergesteuerte Masterkontrolleinheit angeschlossen, die den gesamten Prozess regelt und aufzeichnet. Über einen Schwebekörperdurchlaufmesser wird der Luftstrom geregelt, welcher in den Bioreaktor, über einen ringförmigen Gasverteiler vom Boden ausgehend in das Medium geleitet wird. Durch Regelung der Rührgeschwindigkeit wird der Sauerstoffgehalt dem Verbrauch im Medium angepasst und die Kulturflüssigkeit durchmischt. Das Abgas wird über einen Abgaskühler an ein Massenspektrometer weitergeleitet und analysiert. Sollen Metabolite aus der Abluft analysiert werden, kann auch ein Gassammelrohr zwischengeschaltet werden. pH-Änderungen werden mittels Korrekturlösungen (Säure: HCl; Base: NaOH) geregelt. Mit Hilfe einer Level-Sonde wird Schaumbildung registriert und durch kontrollierte Zugabe von Antischaum reguliert. (Chmiel 2001)

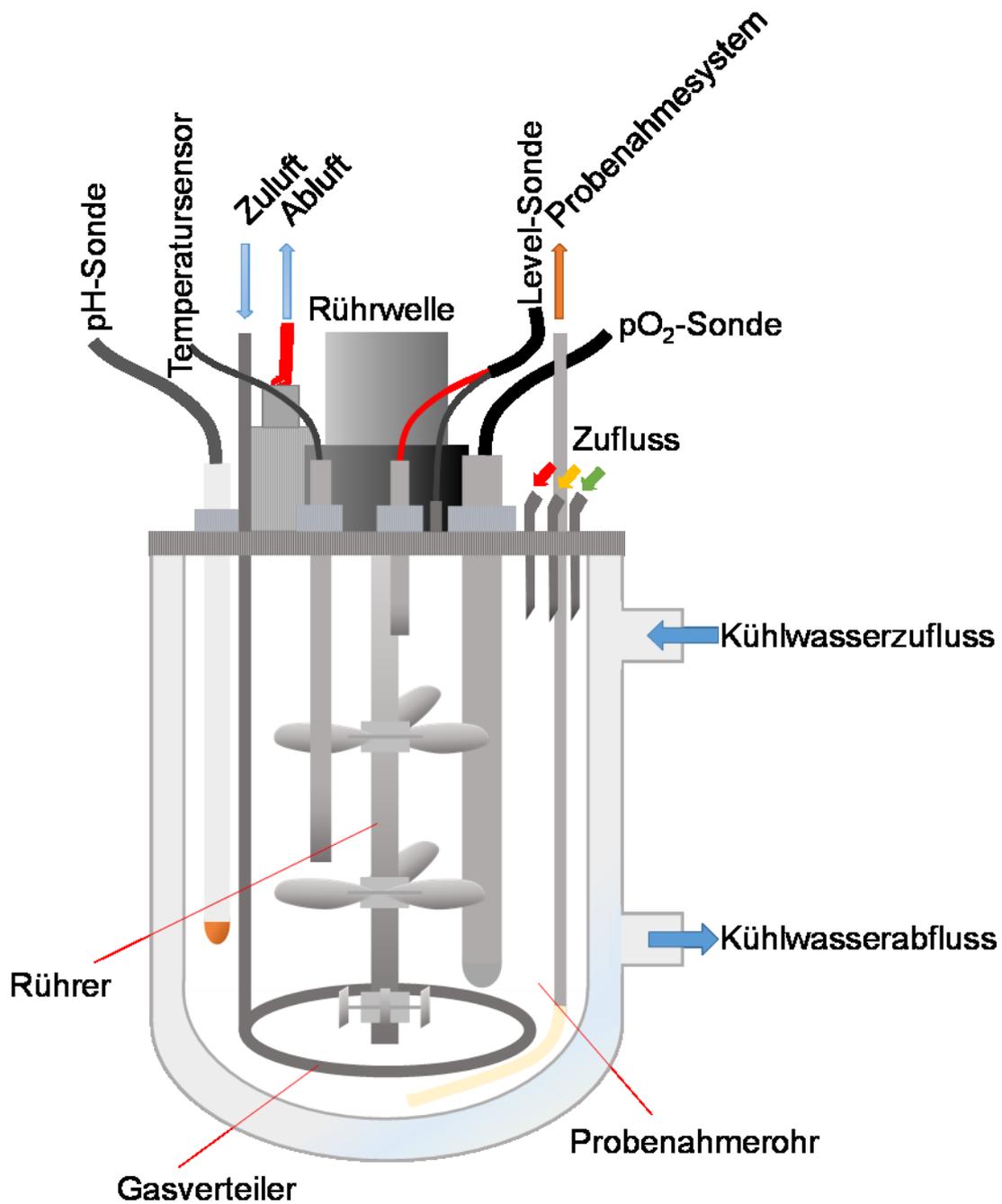


Abbildung 12: Schematische Darstellung eines Rührkesselreaktors (STR) bestehend aus einem Doppelwandglasgefäß und einem Edelstahldeckel. Über Kühlwasserzu/-abfluss wird die Temperatur geregelt. Gefilterte Zuluft wird über den ringförmigen Gasverteiler in das Medium geleitet. Durch den Rührer wird die Kulturflüssigkeit gemischt und O₂ verteilt. Über den Temperatursensor, sowie die pH-, pO₂- und Levelsonde werden Daten aufgenommen und an die Masterkontrolleinheit weitergeleitet, die alles registriert und ggf. die Regulation des Parameters einleitet. Über das Probenahmerohr werden Proben steril entnommen. Das Abgas wird über einen Abgaskühler aus dem STR durch einen Filter zum Massenspektrometer geleitet und analysiert.

1.4.1. Charakterisierung bakteriellen Wachstums

Zur Charakterisierung bakteriellen Wachstums werden verschiedene Parameter bestimmt um Aussagen über Wachstumsphase, Wachstumsraten und Substratverbrauch treffen zu können. Man unterscheidet bei der Prozess-kontrollierten Kultivierung zwischen online und offline Messungen. Unter online Messungen versteht man die Bestimmung bestimmter Parameter direkt innerhalb des Prozesses, wie zum Beispiel die Abgasanalyse, pO_2 - und pH-Messung über interne Sonden. Zu den offline bestimmten Parametern gehören z.B. die optische Dichte (OD), die Zellzahl, sowie die Substratkonzentration. Offline bedeutet in diesem Fall, dass die entnommene Probe über ein externes Gerät (z.B. mittels Fotometer, Mikroskopie oder HPLC) analysiert wird.

Die verschiedenen Wachstumsphasen können graphisch ermittelt werden, in dem zum Beispiel die OD oder die Zellzahl über die Zeit aufgetragen wird. Bakteriellies Wachstum teilt sich ein in die Anlaufphase (Lag-Phase), die exponentielle Wachstumsphase (Log-Phase), die stationäre Phase, in der Erhaltungsstoffwechsel durchgeführt wird, und die Absterbephase (Abb.13). (Fuchs und Schlegel 2006)

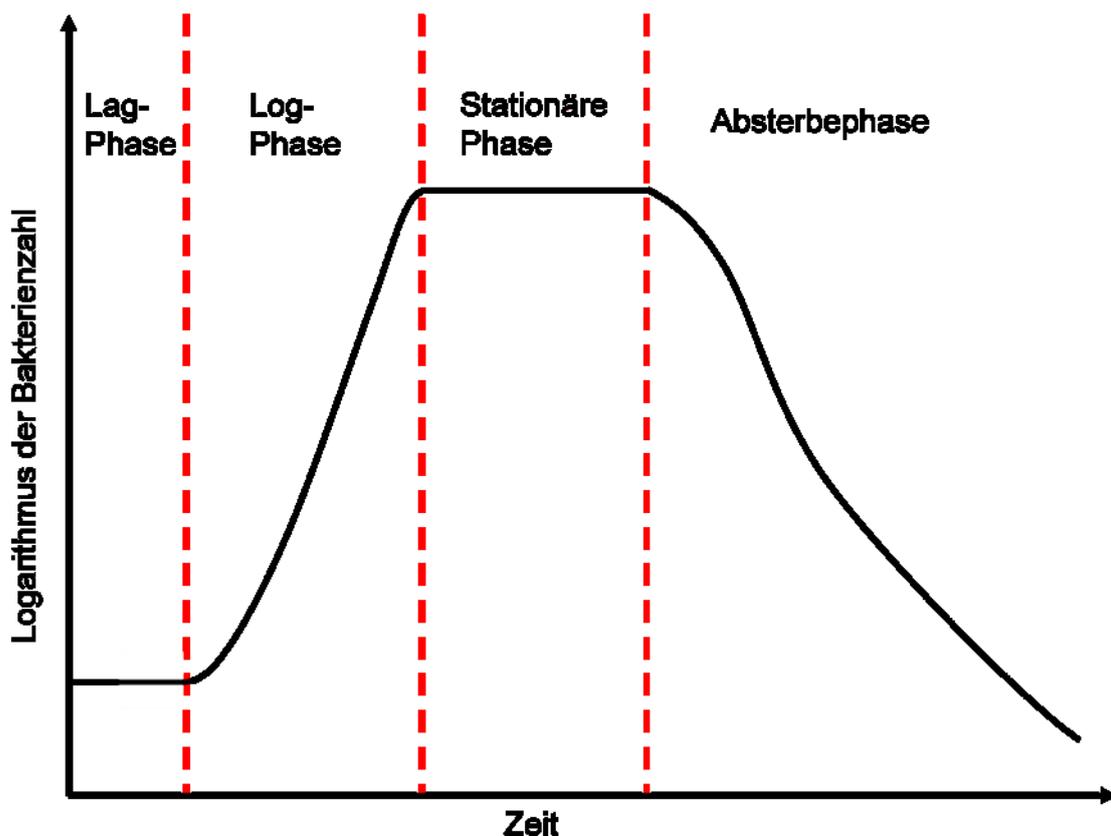


Abbildung 13: Halblogarithmische Darstellung einer bakteriellen Wachstumskurve. Der Logarithmus der Bakterienzahl (bestimmt durch Zellzahl oder Optische Dichte) wird gegen die Zeit aufgetragen (schwarze Linie). Die rot-gestrichelten Linien zeigen die Übergänge zwischen den verschiedenen Phasen des Wachstums an.

Kommt es zu einer Limitation, wird vom exponentiellen in lineares Wachstum (Lin-Phase) umgestellt, man spricht von biphasischem Wachstum. Stellt man den Graphen halblogarithmisch dar (Abb. 14A), ist der linearen Abschnitt die Log-Phase, bei der linearen Darstellung dagegen stellt dies die Lin-Phase dar (Abb. 14B).

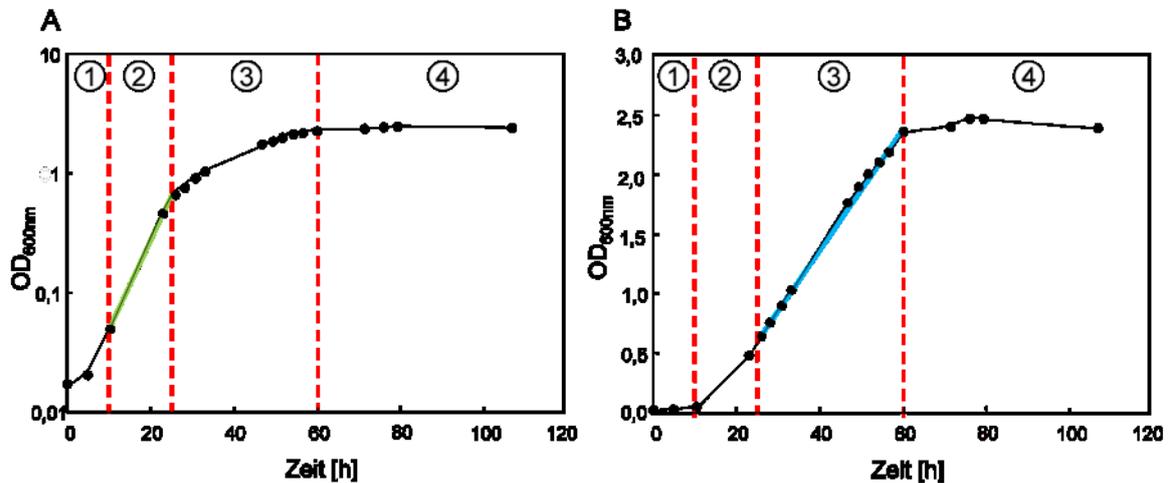


Abbildung 14: Halblogarithmische versus arithmetische Darstellung von Wachstumskurven. Erläuterung der Wachstumsphasen anhand von Wachstumskurven von *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 in SWM mit 11 mM Glucose, 60 mM Ammonium und 0.03 μ M Phosphat. 1: Lag-Phase; 2: Log-Phase; 3: Lin-Phase; 4: stationäre Phase. A: Halblogarithmische Darstellung, grüne Linie zeigt die Regressionsgerade der exponentiellen Wachstumsphase. B: Lineare Darstellung, blaue Linie zeigt die Regressionsgerade der linearen Wachstumsphase.

Mathematisch werden die Übergänge zwischen den Wachstumsphasen durch die Schnittpunkte der verlängerten Regressionsgeraden mit z.B. der Geraden durch OD_{min} (Übergang von Lag- in Log-Phase) bestimmt (Abb. 15A). Das Ende der Log-Phase ist dementsprechend am Schnittpunkt der Regressionsgeraden der Log- und Lin-Phase (Abb. 15B). Der Beginn der Stationären Phase ist der Schnittpunkt zwischen der Regressionsgeraden der Lin-Phase und OD_{max} (Abb. 15C).

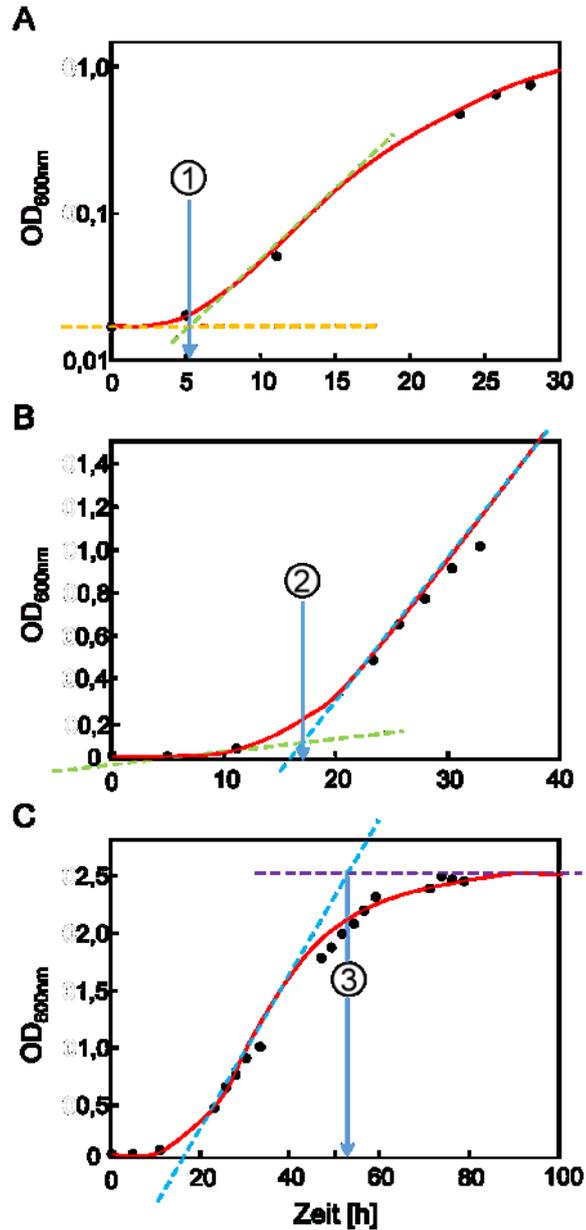


Abbildung 15: Bestimmung der Übergänge zwischen den Wachstumsphasen anhand der Wachstumskurve von *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 in SWM mit 11 mM Glucose, 60 mM Ammonium und 0.03 μ M Phosphat. A: Halblogarithmische Darstellung der Anfangsphase. B: Ausschnitt der ersten 40h (linear aufgetragen). C: Darstellung der gesamten Kurve (linear aufgetragen). 1: Übergang von der Lag- in die Log-Phase; 2: Übergang von der Log- in die Lin-Phase; 3: Übergang in die stationäre Phase. Blaue Pfeile kennzeichnen den Übergang. Orange: Gerade durch OD_{min}; Grün: Regressionsgerade der Log-Phase; Blau: Regressionsgerade der Lin-Phase; Lila: Gerade durch OD_{max}.

Die Wachstumsraten lassen sich graphisch aus der Steigung m der Regressionsgeraden für die Log- bzw. die Lin-Phase entnehmen (Abb.16). Wird die Funktion halblogarithmisch aufgetragen, ist die Funktionsgleichung [2] der Regressionsgeraden für die Log-Phase wie folgt:

$$y = b \cdot e^{m \cdot x} \quad [2]$$

mit b als Konstante und m als Steigung.

Wird die Funktion linear aufgetragen, hat die Funktionsgleichung [3] der Regressionsgeraden für die Lin-Phase folgende Form:

$$y = m \cdot x - b \quad [3]$$

mit b als Y-Achsenabschnitt und m als Steigung.

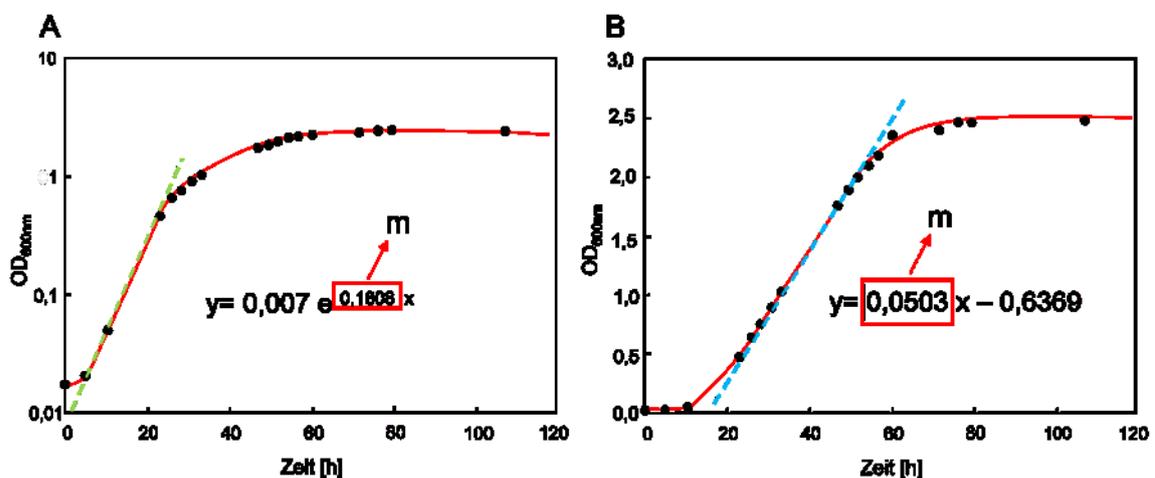


Abbildung 16: Graphische Bestimmung der Wachstumsraten anhand der Wachstumskurve von *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 in SWM mit 11 mM Glucose, 60 mM Ammonium und 0.03 μ M Phosphat. A: Bestimmung der Wachstumsrate μ_{exp} aus der Steigung m der Regressionsgeraden (grün) der Log-Phase. B: Bestimmung der Wachstumsrate μ_{lin} aus der Steigung m der Regressionsgeraden (blau) der Lin-Phase.

Mathematisch lässt sich die exponentielle Wachstumsrate μ_{exp} aus der folgenden Gleichung [4] berechnen:

$$\mu_{exp} = \frac{LN\left(\frac{OD(t+1)}{OD(t)}\right)}{(t+1)-t} \quad [4]$$

Die lineare Wachstumsrate μ_{lin} berechnet sich aus dem Differentialquotient der Änderung der OD über die Änderung der Zeit [5]:

$$\mu_{lin} = \frac{\Delta OD}{\Delta t} = \frac{OD(t+1)-OD(t)}{(t+1)-t} \quad [5]$$

1.5. Experimentelles Design der Dissertation

Bei der Kultivierung des Modelorganismus *P. inhibens* DSM 17395 in SWM mit 11 mM Glucose und definierter Zugabe von NH_4^+ und PO_4^{3-} konnte ein Einfluss des N:P-Verhältnisses auf das Wachstumsverhalten in Erlenmeyerkulturen dokumentiert werden. Für über 415 verschiedene Konzentrationen wurde das Wachstumsverhalten bestimmt. In weiterführenden Experimenten wurden sechs verschiedene Konzentrationsverhältnisse stöchiometrisch detaillierter untersucht. Dazu wurde in engen regelmäßigen Abständen die $\text{OD}_{600\text{nm}}$ bestimmt, sowie Proben zur Konzentrationsbestimmung von Glukose, NH_4^+ und PO_4^{3-} entnommen. Zu definierten Zeitpunkten ($\text{OD}_{1/2\text{max}}$ und OD_{max}) wurde Biomasse für weitere Analysen (z.B. Elementar- und Biomassezusammensetzung, extrazelluläre Proteine (EP) und Durchflusszytometrie) entnommen und ein mathematisches Modell erstellt. Die Ergebnisse wurden 2017 von Trautwein et al. veröffentlicht und bilden die Basis dieser Dissertation, in welcher *P. inhibens* DSM 17395 in Bioreaktoren auf SWM mit zwei verschiedenen N:P-Verhältnissen kultiviert werden soll, um die vorangegangenen Experimente durch umfassende Analysen hin zu einer systembiologischen Untersuchung zu ergänzen.

Da *P. inhibens* DSM 17395 in Bioreaktoren mit Glucose als alleiniger C-Quelle nicht ausreichend reproduzierbar wächst, wurde stattdessen der Zuckeralkohol D-Mannitol verwendet, der eine ähnliche Struktur wie Glukose besitzt, allerdings an Stelle der Aldehydfunktion eine Hydroxid-Gruppe aufweist.

Das experimentelle Vorgehen dieser Dissertation gliederte sich in drei Teile:

Erstens, vergleichende Wachstumsversuche in Erlenmeyerkolben um die Vergleichbarkeit des Wachstums von *P. inhibens* DSM 17395 in SWM mit Glukose (Trautwein et al. 2017), bzw. Mannitol unter den ausgewählten N:P-Verhältnissen zu überprüfen.

Der zweite Teil beinhaltete die physiologische und stöchiometrische Betrachtung des Wachstums von *P. inhibens* DSM 17395 in Bioreaktoren in SWM mit den N:P-Verhältnissen 1:1 (0.5 mM N und 0.5 mM P) sowie 1:267 (8 mM N und 0,03 mM P), um Stickstoff- bzw. Phosphorlimitierung darzustellen (Downing 1997; Geider und La Roche 2002).

Im dritten Teil wurden Massenanzuchten zu ausgewählten Kultivierungszeitpunkten durchgeführt, um Biomasse für Untersuchung auf molekularbiologischer Ebene zu erhalten.

Darüber hinaus wurden neben den zuvor genannten Experimenten Methoden zur Konzentrationsbestimmung von NH_4^+ und PO_4^{3-} entwickelt und etabliert. Diese wurden unter dem Titel „Photometric determination of ammonium and phosphate in seawater medium using a microplate reader“ veröffentlicht (Ruppersberg et al. 2017).

2. Material und Methoden

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungen sind von analytischem Reinheitsgrad.

2.1. Organismus

Phaeobacter inhibens DSM 17395 wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) bereitgestellt und wird seit 2007 in unserem Labor als Modellorganismus für marine Umweltbakterien untersucht. Ein von der DSMZ stammendes Lyophilisat von *P. inhibens* DSM 17395 wurde erneut im Januar 2015 in Bacto Marine Broth Medium, welches Pepton (5 g L^{-1}) sowie Hefeextrakt (1 g L^{-1}) (DIFCO 2216; DIFCO, Lawrance, KS, USA) enthält, revitalisiert und kultiviert. Daraus wurden Glycerinkulturen für alle folgenden Versuche hergestellt. Die Glycerinkulturen wurden in flüssigem N_2 schockgefroren und bei -81°C gelagert.

2.2. Medium

Für die Wachstumsexperimente von *P. inhibens* DSM 17395 mit unterschiedlichen Ammonium und Phosphat Konzentrationen wurde definiertes Mineralmedium, auch künstliches Seewassermedium (SWM) genannt, verwendet. Die Zusammensetzung wurde von Zech et al. (2009) beschrieben. Allerdings wurde in den Versuchen dieser Dissertation an Stelle von Glucose, D-Mannitol in der gleichen Konzentration (2 g L^{-1}) als einzige Quelle organischen Kohlenstoffs verwendet.

Für die Herstellung des Mediums wurden zunächst die Bestandteile der Salzlösung eingewogen (Tab. S1) und autoklaviert. Für die Stabilisierung des pH-Wertes während des Wachstums wurde ein Carbonat-Puffersystem verwendet. Das Carbonat (NaHCO_3 , Merck), wie auch die Stammlösungen zum Einstellen der Konzentrationen von Ammonium (NH_4Cl , Merck), Phosphat (KH_2PO_4 , Merck) und Mannitol (D-Mannitol, Merck) und die Spurenelementlösung (Tab. S1), wurde separat eingewogen und autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Salzlösungen wurden die entsprechenden Volumina der Stammlösungen unter sterilen Bedingungen zugegeben und vermischt. Anschließend wurde mit sterilem Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt. Das Medium wurde bei 4°C gelagert und vor dem Kultivieren auf Raumtemperatur erwärmt.

2.3. Kultivierung von *Phaeobacter inhibens* DSM 17395

2.3.1. Vorkulturen und Versuche in Erlenmeyerkolben

Für die Versuche in Erlenmeyerkolben und Bioreaktoren wurde *P. inhibens* DSM 17395 über drei Passagen in Erlenmeyerkolben mit Schikanen und mit verschiedenen Volumina an SWM (Zech et al. 2009) an die ausgewählten N:P-Verhältnissen angepasst. Dabei war der erste Schritt stets eine Verdünnungsreihe mit 5 Stufen (10^{-1} bis 10^{-5}) von 13,5 mL mit den festgelegten Konzentrationen von 2 mM NH_4^+ und 0,03 mM PO_4^{3-} , welche dazu diente verbliebenes Glycerin und Spuren aus dem Marine Broth Medium zu entfernen. Aus der höchsten angewachsenen Verdünnung (i.d.R. 10^{-4} oder 10^{-5}) wurde nach 72 Stunden die erste (50 mL) und daraus nach 48 Stunden die zweite Vorkultur (250 mL) der Anpassung mit der angestrebten N/P-Konzentration auf eine $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ von ~ 0.02 angeimpft um das Kulturvolumen hochzuskalieren. Die Hauptkulturen (in 250 mL Erlenmeyerkolben oder 1,5 L Bioreaktoren, jeweils mind. in Triplikaten) wurden nach 16-24 h (Je nach N:P-Verhältnis) aus einer aktiv wachsenden Vorkultur ($\text{OD}_{600 \text{ nm}} \approx 0,3-0,5$) wiederum auf eine Start-OD von $\sim 0,02$ inokuliert.

Alle Erlenmeyerkolben wurden bei 28 °C im Brutraum auf Orbitalschüttlern mit 100 rpm (CH-4103, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) inkubiert. Das Wachstum wurde regelmäßig über die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm ($\text{OD}_{600 \text{ nm}}$; UVmini-1240 UV-Vis Spectrophotometer; Shidmadzu, Japan) dokumentiert. Die Reinheit aller Kulturen wurde mikroskopisch untersucht (Axiostar; Zeiss, Göttingen, Germany) und durch Ausstreichen auf Marine Broth Agar Platten verifiziert.

2.3.2. Prozess-kontrollierte Kultivierung in Bioreaktoren

Die Kultivierung in Bioreaktoren wurde in 2 L Doppelmantel Bioreaktoren der Firma Infors (Labfors II; Infors HAT, Bottmingen, Schweiz) mit 1,5 L Arbeitsvolumen unter Umgebungsdruck durchgeführt. Die Bioreaktoren waren mit Sensoren für pH-Wert (405 DPAS-SC; Mettler-Toledo, Urdorf, Schweiz), Temperatur (PT-100; Infors), pO_2 (InPro6899; Mettler-Toledo) und Füllstandskontrolle (Eigenbau), sowie einem System zur sterilen Probenentnahme ausgestattet. Über die Masterkontrolleinheit (UDDC; Infors) konnten vier Bioreaktoren parallel betrieben werden, um bis zu vier biologische Replikate mit gleichen Kultivierungsparametern zu generieren. Die zu regulierenden Parameter waren eine konstante Temperatur von 28 °C, ein pH-Wert von $7,2 \pm 0,2$ und $pO_2 > 35\%$. Für die automatische pH-Korrektur wurden sterile HCl (0,5 M) und NaOH (0,25 M) verwendet. Die Schaumbildung wurde durch Zugabe von 2%-iger Antischaum-Lösung (Sigma-Aldrich, St. Lois, MO USA) verringert. Die Prozessdaten wurden online aufgenommen (IRIS NT; V.49, Infors), als Excel-Datei exportiert und mittels Microsoft Excel und MATLAB ausgewertet.

Zuluft und Abgas wurden durch 0,2 μm Sterilfilter (Midisart 200; Sartorius, Göttingen, Germany) zu- bzw. abgeführt, wobei der Luftstrom (5 L h^{-1}) mittels Schwebekörperdurchflussmessern (V100-80; Vögtlin Instruments, Aesch, Schweiz) an jedem Bioreaktor manuell eingestellt und durch einen ringförmigen Gasverteiler vom Boden des Reaktorgefäßes ins Medium eingeleitet wurde. Der Sauerstoff wurde mittels zweier Rushton-Turbinen und eines Schiffschrauben-Rührers mit 300-350 Upm verteilt. Das Abgas wurde über einen Abgaskühler (Infors), welcher an einen Kryostaten (Julabo, Seelbach, Deutschland) angeschlossen war, auf 10 °C abgekühlt. Abgas und Zuluft wurden über Metallrohre (2,06 mm Durchmesser) von den Bioreaktoren zum Quadrupol-Massenspektrometer (GAM200; In-Process Instruments, Bremen, Deutschland) geleitet und online auf O_2 , CO_2 , N_2 und Ar analysiert. Die Probenahme des Gases wurde über eine Mehrfachportventilbaugruppe kontrolliert und in Intervallen von 10 min durchgeführt. Das Kalibriergas setzte sich wie folgt zusammen:

(in % v/v) $19,99 \pm 0,40 O_2$, $10,0 \pm 0,2 CO_2$, und 70,0 Ar (Air Liquide, Krefeld, Deutschland).

Die Datenerfassung erfolgte mit der Quadstar 32bit Software[®] von InProcess Instruments, Bremen. Die Daten wurden als ASCII-Dateien exportiert und mittels MATLAB Software ausgewertet.

2.3.3. Auswertung der Prozessdaten

2.3.3.1. Physiologische Daten

Die Daten der Messung der OD_{600 nm} wurden handschriftlich dokumentiert und in Excel-Dateien eingelesen. Zum Erstellen von Wachstumskurven wurden die Werte der OD über die Zeit [h] aufgetragen. Für gemessene Replikate wurden Mittelwert und Mittelwertabweichung angegeben. Die Wachstumsraten wurden mit folgenden Formeln berechnet:

$$\mu_{\text{exp}} = \frac{\text{LN}\left(\frac{\text{OD}(t+1)}{\text{OD}(t)}\right)}{(t+1)-t} \quad [6]$$

für die exponentielle Wachstumsphase und

$$\mu_{\text{lin}} = \frac{\Delta \text{OD}}{\Delta t} = \frac{\text{OD}(t+1) - \text{OD}(t)}{(t+1) - t} \quad [7]$$

für die lineare Wachstumsphase.

Die Verbrauchsrate des Substrats wurden mit den gleichen Formeln berechnet, an Stelle der OD wurden die Werte der jeweiligen Substratkonzentration eingesetzt.

Der Ertrag [g mol⁻¹] wurde aus Biotrockenmasse [g] pro verbrauchtem Substrat/O₂ bzw. gebildetem CO₂ [mol] berechnet.

2.3.3.2. Abgasanalytik

Die mit der Quadstar 32bit[®] Software von InProcess Instruments erfassten Daten wurden als ASCII-Dateien exportiert und zunächst in Microsoft Excel importiert und aufgearbeitet. Anschließend wurden die Daten mit MATLAB ausgewertet.

Die Zu- und Abluft wurden über die Zeit interpoliert, die gemessene Zuluft als Basislinie gesetzt und von der Abluft abgezogen. Durch Einbeziehen des sich durch Probeentnahme und Zugabe von Korrekturlösungen ändernden Reaktorvolumens wurden die Konzentrationen, sowie die Raten von O₂- Verbrauch (QO₂), CO₂-Produktion (QCO₂) und der Respirationskoeffizient RQ basierend auf folgenden Gleichungen (van der Aar et al. 1989) berechnet und über die Zeit integriert (MATLAB Auswertungsskript s. Anhang).

$$QO_2 = \frac{O_{2in} \times F_{in}}{100} - \frac{O_{2out} \times F_{out}}{100} \quad [8]$$

$$QCO_2 = \frac{CO_{2in} \times F_{in}}{100} - \frac{CO_{2out} \times F_{out}}{100} \quad [9]$$

$$RQ = \left| \frac{QCO_2}{QO_2} \right| \quad [10]$$

mit O₂ bzw. CO₂ in % und dem Luftstrom F [L h⁻¹].

2.4. Probenahmen und Aufarbeitung

Sämtliche Proben wurden steril über das Probenahmesystem entnommen. Dabei wurde stets darauf geachtet zuvor etwa 2 mL an Vorlauf zu verwerfen. Je nach Bestimmung wurden die Proben, mit zuvor sauberen und sterilen Messzylindern ausgelitert und auf autoklavierte/sterilisierte Gefäße, wie z.B. Zentrifugenbecher, in verschiedenen Größen verteilt und weiterbearbeitet.

2.4.1. Substratproben

Die Analysen von Mannitol, NH_4^+ und PO_4^{3-} , sowie DOC wurden stets mit zellfreiem Überstand durchgeführt. Dieser wurde entweder aus der Probenahme von Biomasse übernommen, oder durch sterile Entnahme von etwa 8 mL Kulturflüssigkeit und Zentrifugation (15 min bei 4 °C mit 28.500 x g) gewonnen und anschließend auf 2 mL Eppendorf Reaktionsgefäße aufgeteilt. Proben für die Bestimmung von NH_4^+ wurden zudem mit 10 µL 0,1 M HCl angesäuert.

2.4.1.1. DOC

DOC wie von Zecht et al. (2013b) beschrieben, durch Verbrennung bei hohen Temperaturen (850 °C) in Kopplung mit nicht dispersiver Infrarotdetektion mit einem Multi NC TOC Instrument (Analytik Jena, Jena, Deutschland) in der AG Organische Geochemie Universität Oldenburg bestimmt.

2.4.1.2. Mannitol

Die Konzentration von Mannitol wurde mittels HPLC Analyse bestimmt. Dafür wurde eine UltiMate 3000 Rapid Separation LC von ThermoFischer (Germering, Deutschland) verwendet, welche mit einer temperaturkontrollierten (75 °C) Eurokat Trennungssäule (8 x 300 mm, 5 µm Korngröße; Knauer, Berlin, Deutschland) und mit einem Refraktionsindexdetektor (RI-101; Shodex, München, Deutschland) ausgestattet ist. Die Kalibrierung wurde mit einem in Wasser gelösten Mannitol-Standard (von 0,01 bis 15 mM) durchgeführt, wobei eine 5 mM Schwefelsäure als Eluent diente und die Retentionszeit bei etwa 12,5 min lag. Mit der Chromeleon-Software® (Version 7.1, Thermo Fisher Scientific) wurde das Chromatographiesystem gesteuert und die Ergebnisse ausgewertet

Die Proben wurden vor der HPLC-Analyse 1:2 verdünnt und steril filtriert.

2.4.1.3. Phosphat und Ammonium

Die Konzentrationen von NH_4^+ und PO_4^{3-} wurden nach Ruppertsberg et al. (2017) mit spezifischen kolorimetrischen Assays im Mikroplattenleser (MPR; engl. *microplate reader*; FLUOstar OPTIMA; BG Labtech GmbH, Ortenberg, Deutschland) bestimmt.

Für die Bestimmung von NH_4^+ wurde die Kalibrierung mit einem NH_4^+ -Standard (NH_4Cl in ammoniumfreiem SWM) mit Konzentrationen von 0 bis 200 μM durchgeführt. Auf einer Mikroplatte wurden zur Bestimmung je 60 μL Probe/Standard in Triplikaten vorgelegt anschließend wurden erst 100 μL Salicylat-Lösung und dann 80 μL Hypochlorit-Lösung zugegeben. Schließlich wurde das Ganze geschüttelt und 15 min bei 35 °C im MPR inkubiert.

Die Kalibrierung für die PO_4^{3-} -Bestimmung wurde mit einem PO_4^{3-} -Standard (KH_2PO_4 in phosphatfreiem SWM) mit Konzentrationen von 0 bis 1000 μM durchgeführt. Auf einer Mikroplatte wurden zur Bestimmung je 120 μL Probe/Standard in Triplikaten vorgelegt, anschließend wurde erst die Ascorbat-Lösung der Zink/Ammoniummolybdat-Lösung zugegeben, gut gemischt und anschließend 250 μL jeder Probe zugesetzt. Schließlich wurde das Ganze geschüttelt 30 min bei 35 °C im MPR inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Absorption bei 620 nm ($A_{620 \text{ nm}}$) bestimmt. Die Daten wurden zur Auswertung in Excel importiert.

Das genaue Protokoll der Durchführung von Kalibrierung, Etablierung und Validierung der Assays ist der Beschreibung in Ruppertsberg et al. (2017) zu entnehmen.

2.4.2. Biotrockenmasse und Elementaranalyse

Für die Analyse der zellulären Elementarzusammensetzung und für die stöchiometrische Berechnung auf Basis von Biotrockenmasse, wurden Zellen geerntet, indem ein definiertes Volumen Kulturflüssigkeit steril entnommen und zentrifugiert (15 min, bei 4 °C und 28.500 x g) wurde. Der zellfreie Überstand wurde verworfen (oder für Substratanalyse verwendet) und das Zellpellet einmal in einem 50 mM Ammonium-Acetat-Puffer gewaschen. Nach dem Waschen wurde das Zellpellet in 200-400 µL Ammonium-Acetat-Puffer resuspendiert, in ein trockengewogenes Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und bis zur Gewichtskonstanz bei 60 °C im Trockenschrank inkubiert. Anhand des Trockengewichts und des definierten Volumens wurde die Biotrockenmassenkonzentration BTM [g L^{-1}] berechnet.

Die Elementarzusammensetzung (C, H, N und S) der Zellen wurde mit dem Vario EL cube (Elementar Analysesysteme, Hanau, Deutschland), in der AG Organische Geochemie Universität Oldenburg, bestimmt (siehe auch Zech et al., 2013b). Der Sauerstoffanteil wurde durch Abzug der Anteile von C, H und N, sowie des Ascheanteils von 12,03% (enthält S- und P-Anteil) nach Battley (1995) berechnet.

2.4.3. Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrische Bestimmung des DNA-, Protein- und PHB- Gehalts, wurden 1,8 mL Kulturflüssigkeit mit 200 µL 10 % (v/v) Formaldehyde-Lösung versetzt und die Zellen 1 h bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (15 min, bei 4 °C und 28.500 x g), der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS; 145 mM NaCl, 8mM Na₂HPO₄, 1,4 mM NaH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen und anschließend in 1:1 PBS/Ethanol bei -21 °C gelagert.

Die fixierten Zellen wurden 1:150 mit PBS verdünnt und entweder mit SYBR green I (für DNA; Molecular Probes, Eugene, OR, USA), Flamingo (für Proteine; Bio-Rad, München, Deutschland), oder Nile red (für PHB; Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland) gefärbt. Die Färbung mit Nile red (Endkonzentration 5 µg mL⁻¹) für die PHB-Analyse wurde bei Raumtemperatur für 30 min im Dunkeln durchgeführt. Bei hohen Konzentrationen wurden die Proben vor der Analyse ein weiteres Mal 1:2 mit PBS verdünnt.

Die Messungen wurden mit einem FACSCalibur Flowcytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) durchgeführt, als Standard wurden fluoreszierende Latexbeads (Pink oder gelbgrün; Molecular Probes) den Proben zugesetzt.

Insgesamt wurden 70.000 Events pro Messung aufgenommen, jede Probe wurde in Triplikaten gemessen. Die Daten wurden mit CellQuest Pro[®] (Becton Dickinson) aufgenommen und vorausgewertet. Anschließend wurden die Daten manuell kontrolliert und für jede Probe die Kernpopulation (85 – 90% aller Events) bestimmt um den Einfluss morphologischer Änderungen (Aggregatbildung) zu verringern (Trautwein, Rabus et al. persönliche Mitteilung).

2.5. Proteomik

2.5.2. Extrazelluläres Proteom

Die mit extrazellulären Proteinen angereicherte Fraktion (EP) wurde durch Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) nach Koßmehl et al. (2013) gewonnen. Dazu wurden 100-200 mL zellfreier Überstand steril filtriert, mit Erntepuffer (100 mM Tris HCl, 5 mM MgCl₂ x 6H₂O, pH 7,5) auf 225 mL aufgefüllt und mit 25 mL 100% (w/v) TCA versetzt, um eine Endkonzentration von 10% (w/v) TCA zu erhalten. Nach 12-16 Stunden Inkubationszeit im Zentrifugenbecher bei 4 °C wurden die Proteine abzentrifugiert (1h, 4 °C, 17.700 x g) und 5- bis 7-mal mit 1 mL hochreinem Ethanol gewaschen (15 min, 4 °C, 20.000 x g). Das Proteinpellet wurde getrocknet und anschließend je nach Pelletgröße mit 250 bis 400 µL Solubilisierungspuffer (SP; 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4% (w/v) CHAPS, 30 mM Tris, pH 8,0) resuspendiert. Unlösliche Bestandteile wurden mit einer weiteren Zentrifugation (15 min, 20.000 x g, 20 °C) abgetrennt, der Überstand in ein frisches Eppendorf Reaktionsgefäß überführt, schockgefroren in flüssigem N₂ und bei -80 °C gelagert.

Der Proteingehalt wurde mittels Bradford Assay (BioRad) bestimmt.

2.5.3. Zelluläres Proteom

Für das zelluläre Proteom wurde 1 L Kulturflüssigkeit abzentrifugiert (15 min, 9.000 x g, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde erst mit 200 mL Erntepuffer gewaschen, anschließend in 7 mL Erntepuffer resuspendiert und auf vier 2 mL Eppendorf Reaktionsgefäße (1/2 OD_{max} und OD_{max}), bzw. in 2.5 mL resuspendiert und auf 3 Eppendorf Reaktionsgefäße aufgeteilt (OD_{exp}). Die Zellen wurden abzentrifugiert (15 min, 20 000 x g, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Die mit Membranproteinen angereicherte Fraktion (MP) wurde nach Koßmehl et al. (2013) aufgeschlossen. Dazu wurde das Zellpellet vorsichtig aufgetaut und in 1 mL Membranlysepuffer (100 mM Tris HCl, 2 mM MgCl₂, 10 % (v/v) Glycerin, 0,5 mM DTT) resuspendiert und mit 25 µL DNase I (Serva) versetzt. Die Zellen wurden mittels French Press aufgeschlossen (3 x 900 psi) und die Zellreste abzentrifugiert (10 min, 4 °C und 6.000 x g). Der Überstand wurde in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Im weiteren Verlauf wurde der Überstand in 35 mL eiskalte Carbonat-Lösung (100 mM Na₂CO₃) gegeben und 1h im Eisbad gerührt. Danach wurde die Lösung auf vier 10 mL Ultrazentrifugationsröhrchen aufgeteilt und die MP mittels Ultrazentrifugation (1 h, 4 °C und 200.000 x g) gefällt. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets in je 500 µL Membranlysepuffer resuspendiert, je zwei Proteinlösungen in einem 1 mL Ultrazentrifugations-

röhrchen kombiniert und ein weiteres Mal zentrifugiert (1 h, 4 °C und 104.000 x g). Der Überstand wurde wiederum verworfen und die Proteinpellets in je 300 µL 1% SDS-Lösung (Sodiumdodecylsulfat) gelöst, in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, 20 °C und 6 000 x g) die unlöslichen Bestandteile entfernt. Die Proteinlösung wurde in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Der Proteingehalt wurde mittels des RCDC Protein Assay Kit von BioRad bestimmt.

2.5.4. Gel-basierte Proteinanalyse

Mittels 1D SDS-PAGE wurden extrazelluläre und Membranproteine (5 µg Protein je in Duplikaten) nach ihrem molekularen Gewicht aufgetrennt. Dazu wurden Gele mit 20 cm Länge, 1,0 mm Dicke und 12% Acrylamid-Anteil im Trenngel verwendet. Für die Elektrophorese wurde die Protean II ci-Elektrophoresekammer und Netzteil (BioRad) genutzt. Mit einem Kryostaten (F10, Julabo, Seelbach (Schutter), Deutschland) wurde die Temperatur auf 14 °C geregelt. Als Größenmarker wurde der SERVER Triple Color Protein Standard III aufgetragen.

Die Proteine wurden mit phosphorsäuriger Methanol-Lösung im Gel fixiert und mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt (Wöhlbrand et al., 2016). Anschließend digitalisiert (GS-800 Calibrated Densitometer, Bio-Rad) und mit dem Softwarepaket QuantityOne[®] (Version 4.6.9.; BioRad) ausgewertet.

2.5.5. Densitometrische Analyse mit der QuantityOne Software

Die Auswertung mit dem Softwarepaket QuantityOne[®] verlief wie folgt. Die SDS-PAGE wurde unter Verwendung eines Rotfilters einscannt (GS-800 Calibrated Densitometer, Bio-Rad). Im Anschluss wurde das Gelbild gedreht und ggf. gespiegelt. Mit dem Werkzeug *Backgroundbox* wurde der Hintergrund abgezogen und die Parameter für die Belichtungs- und Kontrasteinstellungen so eingestellt, dass alle Banden gut erkennbar waren.

Proteinspuren und Banden wurden automatisch detektiert (Tab. S2) und manuell nachgearbeitet, indem falsche Banden (z.B. am Gel Rand) entfernt und nicht erkannte Banden hinzugefügt wurden. Anhand der definierten Markerbanden wurden die detektierten Banden automatisch abgeglichen und gegebenenfalls korrigiert. Die Daten wurden als txt-Datei exportiert und mit Excel ausgewertet.

Prominente Banden, die über ein Gel miteinander verglichen werden sollten, wurden mit dem Werkzeug *Volume Rec* großzügig markiert, wobei darauf geachtet wurde, dass die Fläche der zu vergleichenden Banden gleich gewählt wurde. Die Daten wurden als txt-Datei exportiert und mit Excel ausgewertet.

Für den Abgleich der zusammengehörenden Replikate wurde eine quantitative Ähnlichkeitsmatrix erstellt bei der nur die quantitative Position der detektierten Banden gewertet wurde. Für den Vergleich über verschiedenen Zeitpunkte und Zustände wurde eine Clusteranalyse nach der Ward's Methode (Ward 1963) durchgeführt, beides mit Gewichtung der Position und der Intensität der Banden.

2.6. Metabolomik

2.6.2. Probenahme des intrazellulären Metaboloms

Um Zellmaterial für die Analyse des zellulären Metaboloms zu erhalten wurden 500 mL Kulturflüssigkeit zentrifugiert (15 min, 9.000 x g, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet einmal mit eiskalter 3,7% (w/v) NaCl-Lösung gewaschen. Das gewaschene Pellet wurde wiederum in 3 mL eiskalter 3,7% (w/v) NaCl-Lösung resuspendiert und auf zwei 2 mL Eppendorf Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10 min, 20.000 x g, 4 °C), der Überstand verworfen, das Pellet in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.6.3. Extrazelluläres Metabolom

Für die Analyse des extrazellulären Metaboloms wurden zweimal 2 mL zellfreier Überstand steril filtriert (0,2 µM, z.B. Midisart 200), in flüssigem N₂ schockgefroren und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

2.7. Ernten für Transkriptomik

Um Zellmaterial für die Analyse des Transkriptoms zu erhalten wurden 500 mL Kulturflüssigkeit zentrifugiert (15 min, 9.000 x g, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 3,5 mL RNeasy Protect Cell Reagent® (Qiagen, Hilden, Deutschland) resuspendiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend auf zwei 2 mL Eppendorf Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10 min, 20.000 x g, 4 °C), der Überstand verworfen, das Pellet in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3. Ergebnisse und Diskussion

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse, die im Rahmen der Promotion erlangt wurden dargestellt und diskutiert.

Um Wachstum mit Glucose und D-Mannitol vergleichen zu können, wurden physiologische Wachstumsexperimente in Erlenmeyerkolben mit SWM und drei verschiedenen N:P-Verhältnissen durchgeführt. Dabei wurden Wachstumskurven aufgenommen und die Biotrockenmassekonzentration bestimmt.

Für zwei ausgewählte N:P-Verhältnisse wurden anschließend detaillierte Wachstumsexperimente in Prozess-kontrollierten Bioreaktoren durchgeführt. Hierbei wurde in regelmäßigen Abständen Proben für die Bestimmung der physiologischen Parameter (z.B. OD_{600nm} und Substratverbrauch) entnommen. Bei etwa ein Viertel, ein halb, dreiviertel und OD_{max} wurden darüber hinaus Proben für Biotrockenmasse und Elementaranalyse entnommen. Zudem wurde bei OD_{max} der DNA-, PHB- und Proteingehalt über Durchflusszytometrie bestimmt.

In weiteren Bioreaktorkultivierungen wurden zu drei Zeitpunkten, deren Auswahl auf der Analyse der Wachstumsexperimente beruhte, Massenzuchten für die molekularbiologische Folgeuntersuchung durchgeführt.

Neben diesen Experimenten wurden Methoden zur Konzentrationsbestimmung von NH_4^+ und PO_4^{3-} entwickelt und etabliert (Ruppersberg et al. 2017).

3.1. Physiologie des Wachstums

3.1.2. Mannitol als C-Quelle

Die stöchiometrisch detaillierten Experimente dieser Arbeit bauen auf vorangegangenen Kultivierungsexperimenten mit einer großen Zahl unterschiedlicher N:P-Verhältnisse auf (Trautwein et al. 2017). Zunächst wurde durch Kultivierungsexperimente mit *P. inhibens* DSM 17395 in Erlenmeyerkolben mit SWM und drei verschiedenen N:P-Verhältnisse (267:1, 17:1 und 1:1) ausgeschlossen, dass sich das Wachstumsverhalten durch den Wechsel der C-Quelle ändert. Hierzu wurde jeweils in Triplikaten mit Glukose und Mannitol (beide 11 mM) kultiviert. Es wurden Wachstumskurven aufgezeichnet und die Biotrockenmassenkonzentrationen (BTM [mg L^{-1}]) bestimmt.

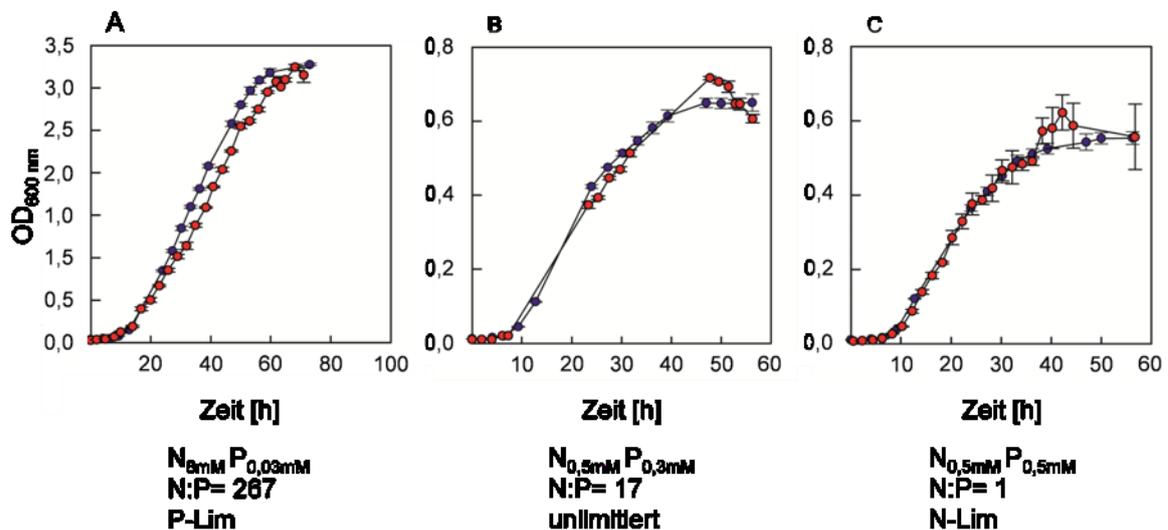


Abbildung 17: Wachstumskurven der Experimente zur Anpassung von *P. inhibens* DSM 17395 in SWM an verschiedenen N:P-Verhältnisse und C-Quellen. A: 8 mM NH_4^+ , 0,03 mM PO_4^{3-} , N:P= 267/P-Limitation; B: 0,5 mM NH_4^+ , 0,03 mM PO_4^{3-} , N:P=17/nicht limitiert. C: 0,5 mM NH_4^+ , 0,5 mM PO_4^{3-} , N:P=1/N-Limitation. rot: Glukose; blau: Mannitol.

Abbildung 17 zeigt die auf der $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ basierenden Wachstumskurven. Der Wachstumsverlauf der Experimente mit Mannitol als C-Quelle stimmen nahezu vollkommen mit denen mit Glukose als Substrat überein. Die Inkubationsdauer unterschied sich um maximal zwei Stunden, die anderen berechneten Parameter glichen einander und können auf die biologische Varianz zurückgeführt werden (Tab.1). Die Lag-Phase war nach fünf bis acht Stunden abgeschlossen. Die Log-Phase dauerte im Falle der P-Limitation mit 12 Stunden und einer Wachstumsrate von $0,17 \pm 0,08 \text{ h}^{-1}$ (Glukose) bzw. $0,18 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ (Mannitol) am längsten. In den beiden anderen Fällen dauerte die Log-Phase maximal sechs Stunden, wobei die Wachstumsrate mit $0,34 \pm 0,00 \text{ h}^{-1}$ (Glukose) bzw. $0,28 \pm 0,00 \text{ h}^{-1}$ (Mannitol), und $0,22 \pm 0,08 \text{ h}^{-1}$ (Glukose) bzw. $0,21 \pm 0,08 \text{ h}^{-1}$ (Mannitol), etwas höher war. Bei allen Varianten konnte die lineare Wachstumsphase in zwei Phasen mit verschiedenen Wachstumsraten (μ_{Lin1} und μ_{Lin2}) eingeteilt werden, was auf mehrfache Limitation vor dem

Eintritt in die stationäre Phase hindeutete (Harpole et al. 2011). Die BTM unterschied sich im Falle der N-Limitation stark zwischen der Kultivierungen mit Glukose bzw. Mannitol. Schwankungen von mehr als 20% können nicht mehr als biologische Variabilität betrachtet werden und könnten durch technische Fehler erklärt werden. Da insgesamt die Übereinstimmung der Wachstumskurven, -raten und -phasen gegeben ist, wurde Mannitol als Substrat für die nachfolgenden Experimente ausgewählt.

Tabelle 1: Vergleich der Wachstumsexperimente von *P. inhibens* DSM 17395 in SWM mit unterschiedlichen N:P-Verhältnissen auf Glukose (G) bzw. Mannitol (M). Angegeben sind Inkubationsdauer, Zeitpunkte des Eintritts in die unterschiedlichen Wachstumsphasen, und Wachstumsraten (μ), sowie maximale optische Dichte (OD_{max}) und Biotrockenmassekonzentration zum Zeitpunkt OD_{max} (BTM_{max})

	N_{8mM} P_{0,03mM}		N_{0,5mM} P_{0,03mM}		N_{0,5mM} P_{0,5mM}	
N:P	267		16		1	
Limitation	P		Keine		N	
C-Quelle	G	M	G	M	G	M
Inkubationsdauer [h]	71	73	56	56	57	56
Log-Phase [h]	8	9	6	6	5	6
μ_{exp}	0,17 ± 0,08	0,18 ± 0,02	n.b.	0,191 ± 0,09	0,22 ± 0,08	0,21 ± 0,08
Lin-Phase						
Lin1 [h]	20	~20	~12	13	12	13
μ_{Lin1}	0,07 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,022 ± 0,006	0,023 ± 0,004	0,020 ± 0,004	0,020 ± 0,001
Lin2 [h]	53	53	28	27	26	27
μ_{Lin2}	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,017 ± 0,006	0,012 ± 0,001	0,014 ± 0,007	0,014 ± 0,00
stationäre Phase	68	~60	~48	47	38	36
OD_{max}	3,20 ± 0,09	3,30 ± 0,01	0,71 ± 0,01	0,65 ± 0,01	0,62 ± 0,05	0,55 ± 0,02
BTM_{max} [mg L⁻¹]	826,4 ± 39,0	843,3 ± 1,7	176,0 ± 10,4	217,5 ± 0,8	130,0 ± 2,9	229,2 ± 2,5

3.1.2. Wachstumsexperimente im Bioreaktor

Für die Experimente zur Charakterisierung der Physiologie des Wachstums von *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 in SWM mit Mannitol im Prozess-kontrollierten Bioreaktor wurden die beiden N:P-Verhältnisse ausgewählt, die eine Limitierung aufweisen. Im Folgenden werden sie als N:P-Verhältnis 1 (N-Limitation; $N_{0,5\text{mM}} P_{0,5\text{mM}}$) und N:P-Verhältnis 2 (P-Limitation; $N_{8\text{mM}} P_{0,03\text{mM}}$) bezeichnet.

Die Kultivierungsdauer betrug 37 bzw. 60 Stunden und wurde beim Eintritt in die stationäre Phase, welche durch den Rückgang der CO_2 -Produktion gekennzeichnet ist, beendet (Zech et al., 2013). Nach einer kurzen Lag-Phase folgte eine exponentielle Phase mit einer Wachstumsrate von ca. $0,15 \text{ h}^{-1}$, welche unter N-Limitation im Vergleich zur P-Limitation (4 Stunden) halb so lange (2 Stunden) anhielt. Die lineare Phase verlief über 28 bzw. 34 Stunden und konnte wie in den Vorexperimenten, in zwei Phasen mit unterschiedlichen Wachstumsraten eingeteilt werden. Die mittlere Wachstumsrate μ_{Lin1} der N-Limitation betrug $0,024 \pm 0,004 \text{ h}^{-1}$, μ_{Lin2} betrug etwa die Hälfte. Unter P-Limitation betrug μ_{Lin2} noch zweidrittel von μ_{Lin1} (Tab. 2).

Der Zeitpunkt des Eintritts in die lineare Wachstumsphase korrelierte im Falle des N:P-Verhältnisses 1 mit dem vollständigen Verbrauch des NH_4^+ im Medium und deutet auf eine erste Limitierung durch Stickstoff hin (Abb. 18).

Tabelle 2: Vergleich der Wachstumsphasen und -raten der Kultivierung von *P. inhibens* DSM 17395 in SWM mit Mannitol und definierten NH_4^+ - und PO_4^{3-} -Konzentrationen. Angegeben sind die Inkubationsdauer, die Dauer der unterschiedlichen Wachstumsphasen, sowie die Wachstumsraten $[\mu]$, die maximale OD (OD_{max}) und die Biotrockenmassekonzentrationen (BTM) zu den verschiedenen Erntezeitpunkten.

	N-Limitation	P-Limitation
N:P	1	267
Inkubationsdauer [h]	37	60
Lag-Phase [h]	2	4
Log-Phase [h]	~9	20
μ_{exp}	$0,17 \pm 0,03$	$0,13 \pm 0,02$
Lin-Phase [h]	~28	34
μ_{Lin1}	$0,024 \pm 0,004$	$0,068 \pm 0,006$
μ_{Lin2}	$0,013 \pm 0,003$	$0,044 \pm 0,001$
stationäre Phase	37	58
OD_{max}	$0,67 \pm 0,01$	$2,79 \pm 0,12$
BTM [mg L^{-1}]		
$\text{OD}_{1/4\text{max}}$	$77,5 \pm 17,5$	$139,2 \pm 16,3$
$\text{OD}_{1/2\text{max}}$	$92,5 \pm 7,5$	$313,3 \pm 26,7$
$\text{OD}_{3/4\text{max}}$	$117,5 \pm 52,5$	$469,2 \pm 25,8$
OD_{max}	$144,5 \pm 4,5$	$655,8 \pm 28,2$

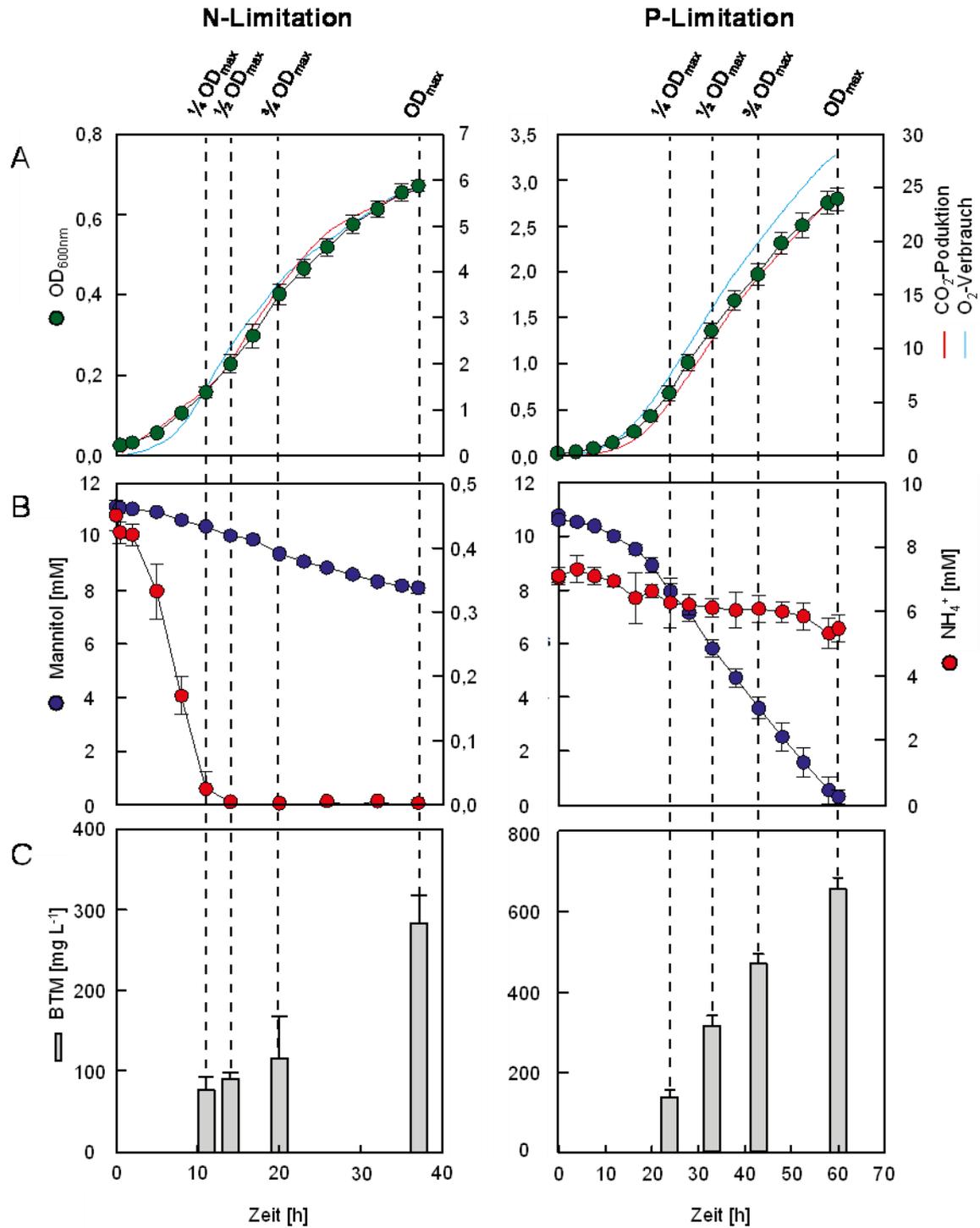


Abbildung 18: Wachstumsexperimente mit *P. inhibens* DSM 17395 in SWM mit Mannitol als C-Quelle und verschiedenen N:P-Verhältnissen. Links: N-Limitation, Rechts: P-Limitation. A: Darstellung der Wachstumskurven. B: Substratverbrauchs. C: Biotrockenmassekonzentration zu den verschiedenen Erntezeitpunkten.

Die maximale OD_{600nm} des N:P-Verhältnis 2 betrug etwa den 4-fachen Wert, der des NP-Verhältnis 1, was sich auch in der BTM, dem O_2 -Verbrauch und der CO_2 -Produktion, bzw. QO_2 und QCO_2 , widerspiegeln (Tab. 3 und 4). Die gute Korrelation zwischen OD_{600nm} , O_2 -Verbrauch und CO_2 -Produktion konnte auch bei anderen Kultivierungsexperimenten mit *P. inhibens* DSM 17395 beobachtet werden (Zech et al., 2013).

Die Startkonzentrationen für Mannitol wichen maximal 2% von der Zielkonzentration ab, für die erste N:P-Konzentration schwankte die Startkonzentration von NH_4^+ um 10% und von PO_4^{3-} um 16%. Bei der zweiten N:P-Konzentration lag die NH_4^+ -Startkonzentration 12% unter der Zielkonzentration, die PO_4^{3-} - Startkonzentration jedoch im angestrebten Bereich. Am Ende der Kultivierung war kein NH_4^+ (N-Limitation), bzw. kein PO_4^{3-} (P-Limitation) mehr nachweisbar (unter Nachweisgrenze). Im Falle des zweiten N:P-Verhältnisses wurde das Mannitol nahezu verbraucht, was auf eine C-Limitierung hindeuten könnte. Durch die Bestimmung des DOC-Gehalts konnte nachgewiesen werden, dass im Medium noch löslicher organischer C vorhanden war, eine C-Limitierung somit nicht gegeben ist (Tab. 3).

Der Ertrag [$g\ mol^{-1}$] pro verbrauchtem O_2 und produziertem CO_2 ist bei beiden N:P-Verhältnissen gleich, im Falle der P-Limitation war der Ertrag pro verbrauchtem Mannitol um ein Drittel und NH_4^+ um ganze 50% höher als bei der N-Limitation. Bei PO_4^{3-} -Überschuss konnte kein Ertrag berechnet werden, da der Verbrauch nicht nachweisbar war (Tab. 3).

Unter N-Limitation stiegen die Verbrauchsraten von NH_4^+ , Mannitol und Sauerstoff bis $\frac{1}{2} OD_{max}$. Danach war das externe NH_4^+ verbraucht. Die Rate des Mannitolverbrauchs hat ihr Maximum bei $\frac{3}{4} OD_{max}$ und flacht zu OD_{max} hin ab. Ebenso hat die CO_2 -Bildungsrate dort ihr Maximum und stagniert beim Eintritt in die stationäre Phase (37 h). Die O_2 -Verbrauchsrate ist zu Beginn deutlich niedriger, bei $\frac{1}{2} OD_{max}$ erhöht, gegen Ende der Kultivierung passen QO_2 und QCO_2 zueinander. Erhöhte CO_2 -Werte können durch Ausgasen von CO_2 aus dem Carbonat-Puffer in Folge von Säurezugabe bei der pH-Korrektur, zustande gekommen sein. Auch die Änderung der externen Luftfeuchtigkeit und Temperatur können einen Effekt auf die Abgasmessung haben (Van der Aar et al. 1989).

Im N:P-Verhältnis 2 war die maximale Aufnahmerate von NH_4^+ bereits bei $\frac{1}{4} OD_{max}$ erreicht und stagnierte von dort an. Zu diesem Zeitpunkt waren 23% des externen NH_4^+ aufgenommen. Die Mannitol-Verbrauchsrate schwankt um $0,25\ [h^{-1}]$ und halbiert sich zu OD_{max} hin. Die CO_2 -Bildungs- und O_2 -Verbrauchsraten stimmen überein, was sich in einem RQ von $1,05 \pm 0,05$ bei OD_{max} ausdrückt.

Tabelle 3: Übersicht der stöchiometrischen Parameter von *P. inhibens* DSM 17395 beim Wachstum in SWM mit Mannitol als C-Quelle und definierten NH_4^+ - und PO_4^{3-} -Konzentrationen. Aufgelistet sind auch der Substrat- und O_2 - Verbrauch, die CO_2 -Produktion, sowie die zugehörigen Erträge.

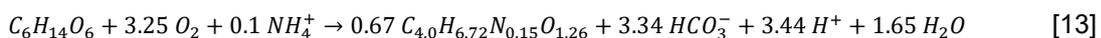
	N-Limitation	P-Limitation
N:P	1	267
Startkonzentration [mM]		
Mannitol	11,13 ± 0,04	10,79 ± 0,10
NH_4^+	0,45 ± 0,02	7,10 ± 0,16
PO_4^{3-}	0,42 ± 0,01	0,030 ± 0,003
Endkonzentration [mM]		
Mannitol	8,10 ± 0,20	0,28 ± 0,027
NH_4^+	n.b.	5,47 ± 0,042
PO_4^{3-}	0,40 ± 0,01	n.b.
DOC	48,60 ± 1,20	33,040 ± 10,50
Verbrauch [%]		
Mannitol	27	97
NH_4^+	100	23
PO_4^{3-}	5	100
Abgasanalytik		
O_2 -Verbrauch [mM]	5,86 ± 0,29	28,00 ± 3,39
CO_2 -Produktion [mM]	5,78 ± 0,23	23,96 ± 2,78
Ertrag [g/mol]		
C	48,0 ± 3,1	62,4 ± 10,8
N	324,1 ± 21,1	478,1 ± 59,5
P	n.b.	$2,3 \cdot 10^4 \pm 1,9 \cdot 10^4$
O_2	24,7 ± 1,1	24,1 ± 6,2
CO_2	25,0 ± 0,8	28,0 ± 4,3

Tabelle 4: Vergleich der Verbrauchs- (NH_4^+ , Mannitol, O_2) und Bildungsraten (CO_2) von *P. inhibens* DSM 17395 bei Wachstum in SWM mit verschiedenen N:P-Verhältnissen.

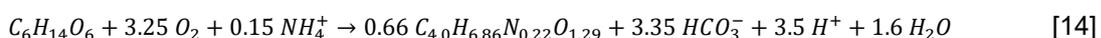
	N-Limitation				P-Limitation			
	NH_4^+ [h ⁻¹]	Mannitol [h ⁻¹]	QO_2 [h ⁻¹]	QCO_2 [h ⁻¹]	NH_4^+ [h ⁻¹]	Mannitol [h ⁻¹]	QO_2 [h ⁻¹]	QCO_2 [h ⁻¹]
$\frac{1}{4} \text{OD}_{\text{max}}$	0,029 ± 0,013	0,040 ± 0,017	0,082 ± 0,021	0,143 ± 0,002	0,092 ± 0,122	0,246 ± 0,014	0,522 ± 0,006	0,460 ± 0,006
$\frac{1}{2} \text{OD}_{\text{max}}$	0,048 ± 0,004	0,078 ± 0,043	0,288 ± 0,014	0,172 ± 0,018	0,019 ± 0,016	0,263 ± 0,007	0,523 ± 0,031	0,545 ± 0,015
$\frac{3}{4} \text{OD}_{\text{max}}$	-0,001 ± 0,001	0,167 ± 0,015	0,202 ± 0,010	0,234 ± 0,005	-0,009 ± 0,042	0,229 ± 0,023	0,447 ± 0,034	0,429 ± 0,003
OD_{max}	-0,002 ± 0,003	0,037 ± 0,019	0,063 ± 0,021	0,051 ± 0,008	-0,078 ± 0,217	0,117 ± 0,117	0,324 ± 0,004	0,308 ± 0,003

Für die Aufstellung der stöchiometrischen Gleichungen wurde die mittlere elementare Zusammensetzung von OD_{max} auf C_4 normiert woraus sich folgende theoretische Gleichungen ergeben (F.13/F.14)

für N-Limitation



für P-Limitation



Der Grad der Reduktion, der sich aus dem Verhältnis des verbrauchten Mannitols zu dem gebildeten CO_2 ergibt, liegt bei 4.90 (N-Limitation) bzw. 4.89 (P-Limitation). Die Ähnlich-

keit zeigt, dass das N:P- Verhältnis keinen Einfluss auf den Grad des Mannitol-Abbaus hat.

Betrachtet man die BTM, ist eine gute Korrelation zur OD_{600nm} zu erkennen. So ist bei OD_{max} die BTM des N:P-Verhältnisses 2 ebenfalls mehr als vierfach höher als beim ersten N:P-Verhältnis. Vergleicht man die BTM bei OD_{max} (0.67 ± 0.01) des ersten Verhältnisses, korreliert diese mit der BTM des zweiten Verhältnisses bei $\frac{1}{4} OD_{max}$ (0.68 ± 0.08) (Tab. 2).

Die gesammelte Biotrockenmasse wurde für eine Elementaranalyse zur Bestimmung der CHNS(O)-Zusammensetzung genutzt. Bei N-Limitierung wurden ähnliche C-Werte für $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$ und sowie OD_{max} beobachtet. In der ersten Hälfte der Kultivierung lag der C-Gehalt bei etwa 45% und erhöhte sich in der zweiten Hälfte um etwa 10%. Der N-Gehalt lag in der ersten Hälfte im Mittel bei 8% und verringert sich nahezu auf ein Drittel zu OD_{max} hin. Der H-Gehalt schwankt zwischen 5 und 7,5%, der S-Gehalt ist erwartungsgemäß gering (< 1%). Der O-Gehalt betrug zunächst im Mittel 28,5% und sank im Laufe der Kultivierung um mehr als 4%. Das zweite N:P-Verhältnis zeigt bis $\frac{3}{4} OD_{max}$ einen Anstieg des C- und eine Abnahme des O-Gehalts in 10%-Stufen. Dies bestätigt, dass keine C-Limitierung auftritt, ansonsten sollte der C-Gehalt der Zellen abnehmen (Chan et al., 2012). Der H-Gehalt steigt auf bis zu 11,8%, fällt aber zu OD_{max} wieder auf 7,5%. Der N-Gehalt ist von Anfang an geringer als im ersten N:P-Verhältnis und fällt zu OD_{max} hin um mehr als die Hälfte von 6,4% auf unter 3% (Abb.19).

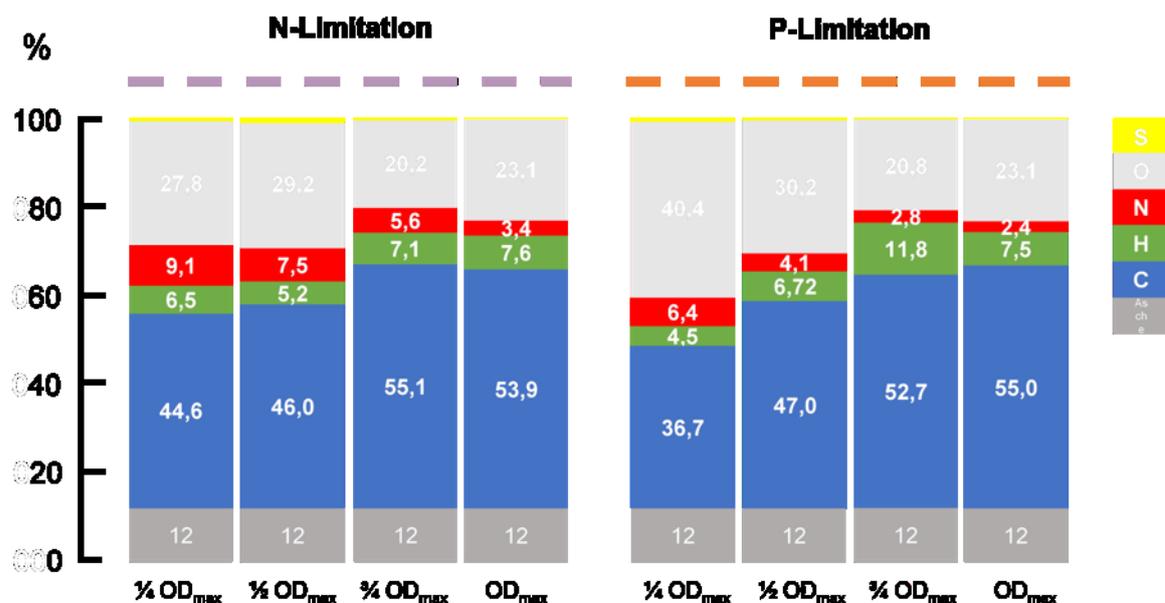


Abbildung 19: Dynamik der Elementarzusammensetzung [%] von *P. inhibens* DSM 17395 bei Wachstum in SWM mit Mannitol und definierten NH_4^+ - und PO_4^{3-} -Konzentrationen. Blau: Kohlenstoff. Grün: Wasserstoff. Rot: Stickstoff. Grau: Sauerstoff. Gelb: Schwefel. Dunkelgrau: Asche Anteil.

Das N:C-Verhältnis hat sein Maximum (0,17 bzw. 0,15) bei beiden N:P-Verhältnissen in der exponentiellen Phase, bzw. bei $\frac{1}{4}$ OD_{max}. Im Falle der N-Limitierung nimmt über die Zeit hinweg das N:C-Verhältnis kontinuierlich ab, bei OD_{max} beträgt das N:C-Verhältnis 0,05. Bei der P-Limitierung ist dieser Wert bereits bei der $\frac{1}{2}$ OD_{max} Ernte erreicht.

Werte um 0,06 beim Eintritt in die stationäre Phase von *P. inhibens* bei Wachstum in definiertem SWM wurde durch Trautwein et al. (unveröffentlicht, persönliche Mitteilung) beobachtet. Es zeigte sich, dass das N:P-Verhältnis dabei keine Rolle spielt (Abb. 20).

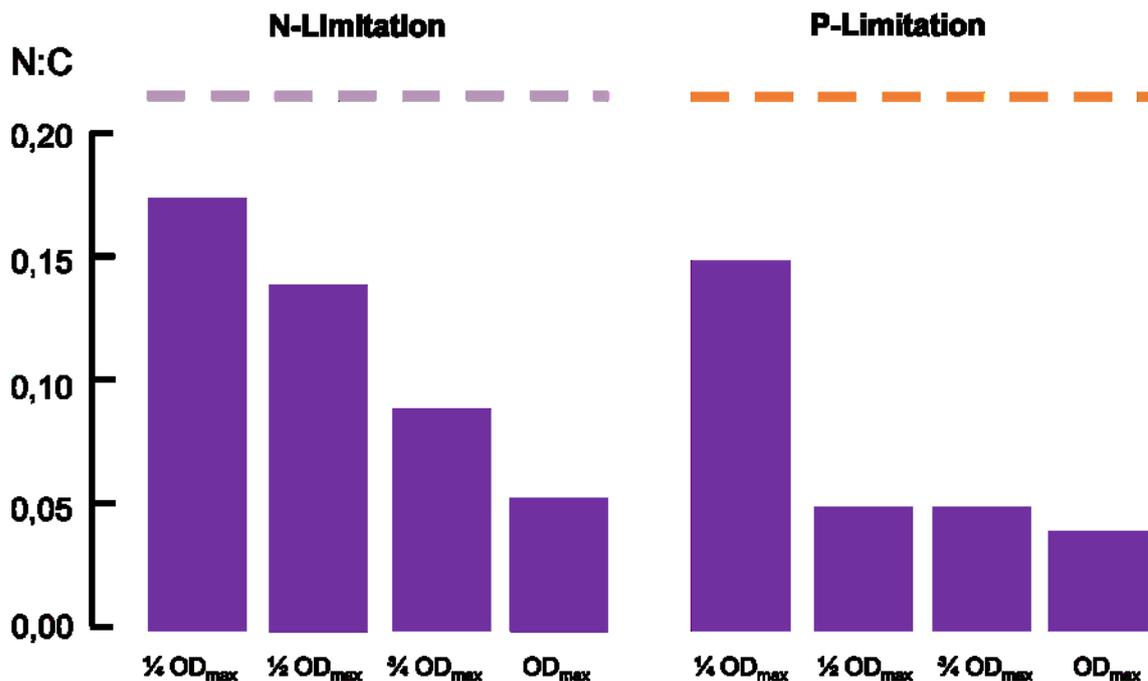


Abbildung 20: Dynamik des zellulären N:C Verhältnis von *P. inhibens* DSM 17395 bei Wachstum in SWM mit Mannitol und definierten NH₄⁺- und PO₄³⁻-Konzentrationen.

Die Aufnahme von externem NH₄⁺ erfolgte unter N-Limitation (0.5 mM) innerhalb der ersten 15 Stunden, bis kein externes NH₄⁺ mehr im Kulturüberstand nachweisbar war. Bei NH₄⁺-Überschuss (8 mM) erfolgte die Aufnahme der ersten 0,5 mM ebenfalls in diesem Zeitrahmen (bis 16,5 h), danach flachte die Aufnahme ab und stagnierte nach der Aufnahme von etwa 1,7 mM. Das N:C Verhältnis spiegelte die NH₄⁺-Aufnahme wieder. Dies deutet ein, vom Wachstum unabhängiges, Auffüllen eines internen N-Speichers an. Über die folgende Wachstumszeit wird dieser langsam aufgebraucht, das N:C Verhältnis sinkt. Dieses Verhalten ist unabhängig davon, ob eine N-Limitierung vorliegt oder nicht. Für Cyanobakterien und einige weitere Mikroorganismen (z.B. *E.coli*) sind interne Speicher in Form von Cyanophycin, einem stickstoffhaltigem Biopolymer, bekannt (Berg et al. 2000; Neumann et al. 2005; Füser und Steinbüchel 2007; Chen 2012). Die Gene für deren Bildung weist *P. inhibens* jedoch nicht auf. Für marines Plankton ist eine N-Speicherung in

Form von DNA, RNA und Proteinen, bzw. in Metaboliten wie z.B. Aminosäuren bekannt (Sylvan et al. 1984; Pedersen und Borum 1996). Eine Erhöhung der relativen Konzentration dieser Makromoleküle ist für *P. inhibens* unter N-Limitierung ebenfalls beobachtet worden (Trautwein, Rabus et al., persönlich Mitteilung). Die Durchflusszytometrie zeigte, dass in der N-Limitation bei OD_{max} der DNA-Gehalt 1,8-höher war als unter P-Limitation. Dagegen ist der PHB (Polyhydroxybuttersäure)-Gehalt unter P-Limitation um das Dreifache erhöht und der Proteingehalt mehr als doppelt so hoch wie unter N-limitierten Bedingungen. Dies lässt die für Plankton beobachteten Speichermethoden auch für *P. inhibens* relevant erscheinen.

3.2. Densitometrische Analyse des Proteoms

Für die OMICs-Analysen wurden drei Zeitpunkte ausgewählt: Neben dem Eintritt in die stationäre Phase (OD_{max}) und die Mitte der Wachstumsphase ($\frac{1}{2} OD_{max}$), wurde der dritte Zeitpunkt so gewählt, dass er vor dem Eintritt in die N-Limitierung lag. Dies war bei einer OD_{600nm} von etwa 0,15 (OD_{exp}) gegeben, was als Parameter für die entsprechende Ernte beim zweiten N:P-Verhältnis gewählt wurde.

Für alle Zustände wurden Membranproteine (im Weiteren als MP bezeichnet) extrahiert und extrazelluläre Proteine (im Weiteren als EP bezeichnet) gefällt und wie bereits beschrieben aufgearbeitet (Kößmehl et al. 2013). Je in Duplikaten wurden diese über SDS-PAGEs aufgetrennt und mit dem Softwarepaket QuantityOne[®] hinsichtlich Densitometrie und einer Clusteranalyse analysiert.

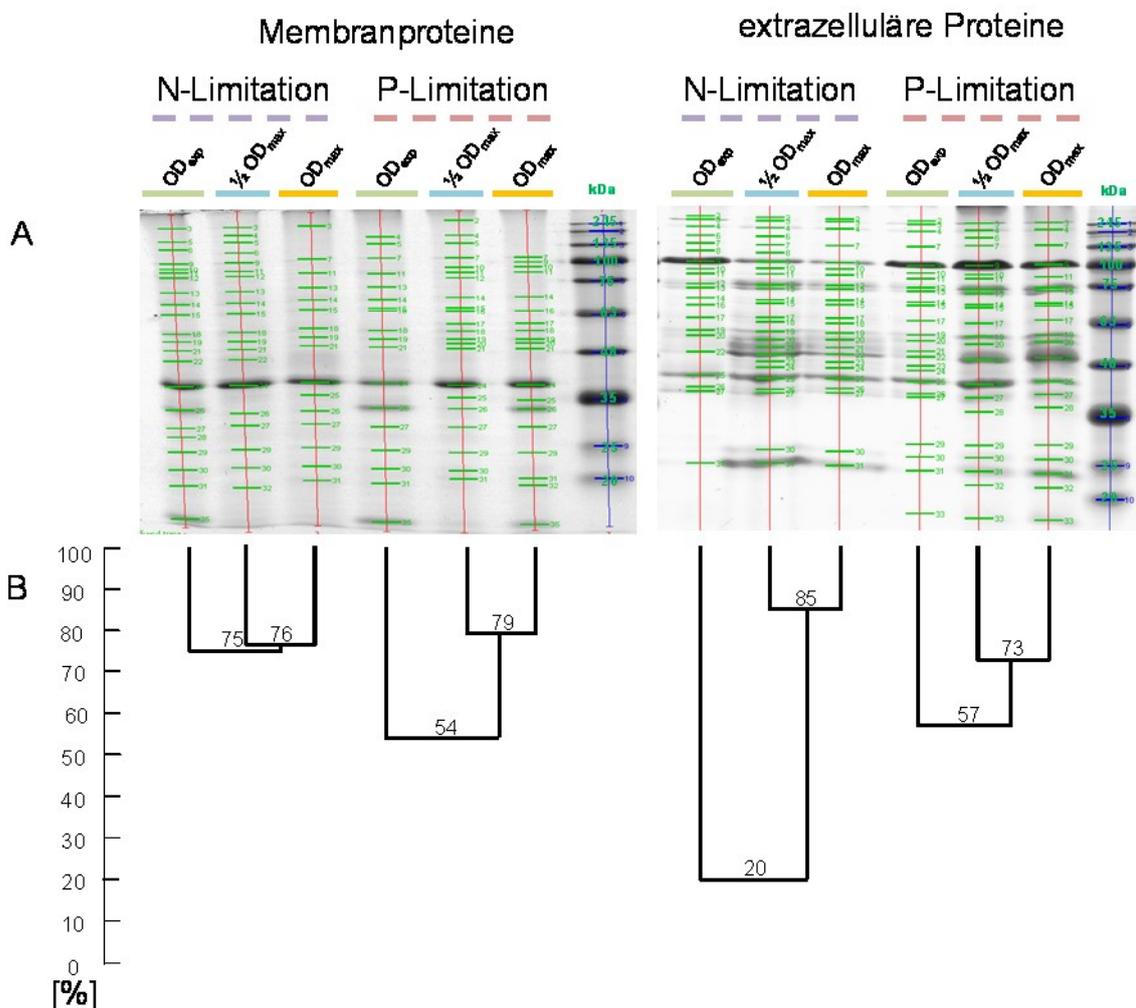


Abbildung 21: Softwarebasierte Auswertung der SDS-PAGE Gele des Proteoms der Wachstums-experimente hinsichtlich des Vergleichs über die Wachstumsphasen. Links: Membranproteine. Rechts: Extrazelluläre Proteine. A: Gelbilder repräsentieren unterschiedliche N:P-Verhältnisse mit ihren zugehörigen Wachstumsphasen. B: Clusteranalyse nach der Ward-Methode.

Die Clusteranalyse zeigt, dass bei der Betrachtung des Bandenmusters der beiden N:P-Verhältnisse, sowohl in den MP, wie auch in den EP jeweils $1/2 OD_{max}$ und OD_{max} ein gemeinsames Cluster und der Zustand in der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{exp}) einen Nebencluster bildeten. Das Bandenmuster von $1/2 OD_{max}$ und OD_{max} überschneit sich in allen Varianten um minimal 73%, maximal um 85% (Abb. 21).

Der Unterschied zwischen OD_{exp} zu den beiden anderen Zuständen war in der EP-Fraktion der N-Limitation am größten, zugleich dort in der MP-Fraktion am geringsten. Die Unterschiede zwischen der MP- und EP-Fraktion der P-Limitation sind generell sehr gering. Dies deutet insgesamt an, dass sich die exponentielle Wachstumsphase bei beiden N:P-Verhältnissen am meisten voneinander unterscheidet. (Abb. 21).

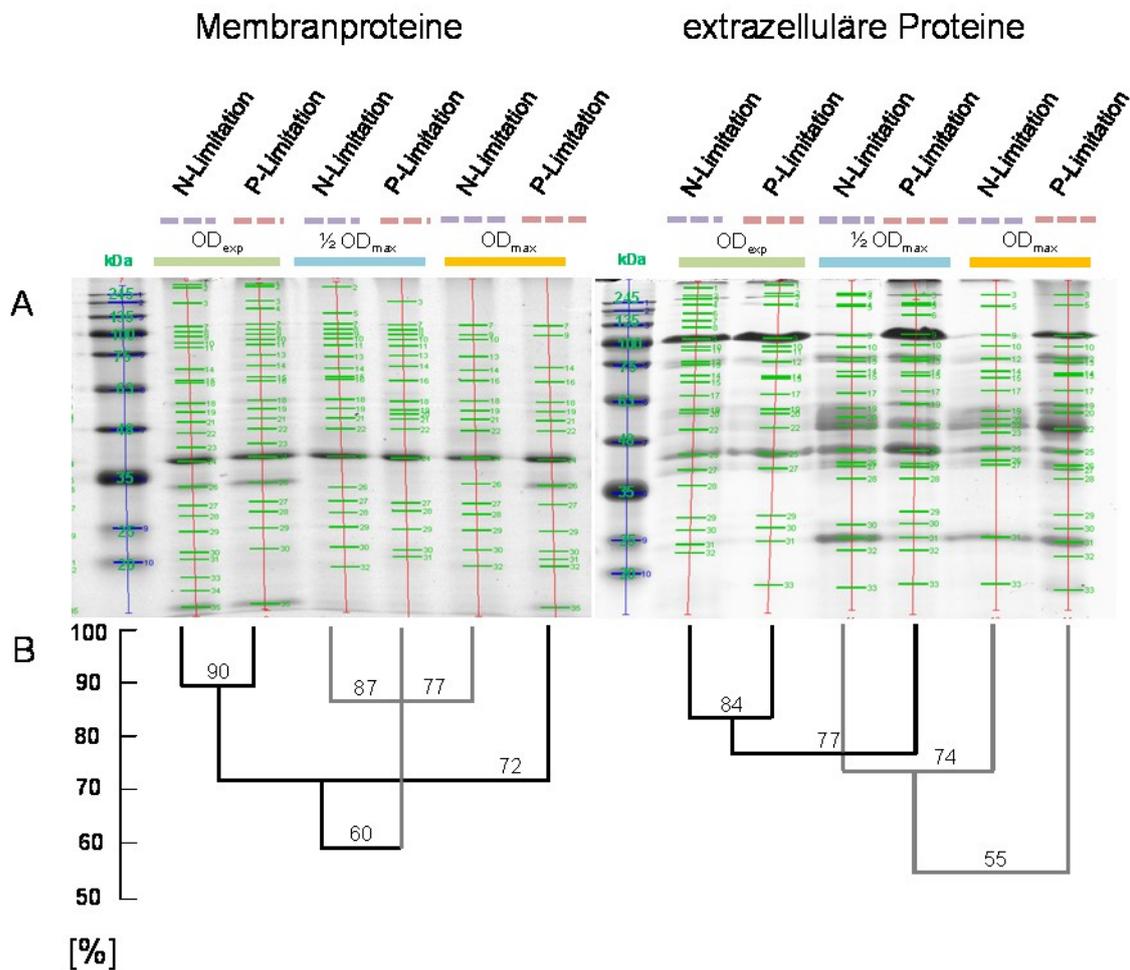


Abbildung 22: Softwarebasierte Auswertung der SDS-PAGE Gele des Proteoms der Wachstumsexperimente hinsichtlich des Vergleichs der Zustände. Links: Membranproteine. Rechts: extrazelluläre Proteine. A: Gelbilder repräsentieren pro Wachstumsphase die beiden getesteten N:P-Verhältnisse. B: Clusteranalyse nach der Ward-Methode.

Dies bestätigt auch der Vergleich der Bandenmuster der gleichen Zustände der N:P-Verhältnisse miteinander. Sowohl in den MP, als auch in den EP bilden beide N:P-Verhältnisse einen Cluster bei OD_{exp} mit 90 bzw. 84% Ähnlichkeit, welches sich bei 60 bzw. 55% von den anderen Zuständen abspaltet. Bei den MP bildet die OD_{max} -Probe, bei den EP die $1/2 OD_{max}$ -Probe, der P-Limitation einen Außenarm. Die jeweils drei anderen bilden gemeinsam ein Untercluster mit mindestens 77, bzw. 55% Ähnlichkeit (Abb. 22). Dies deutet darauf hin, dass das Proteom in der exponentiellen Phase, d.h. während des unlimitierten Wachstums, vom N:P-Verhältnis unbeeinflusst ist.

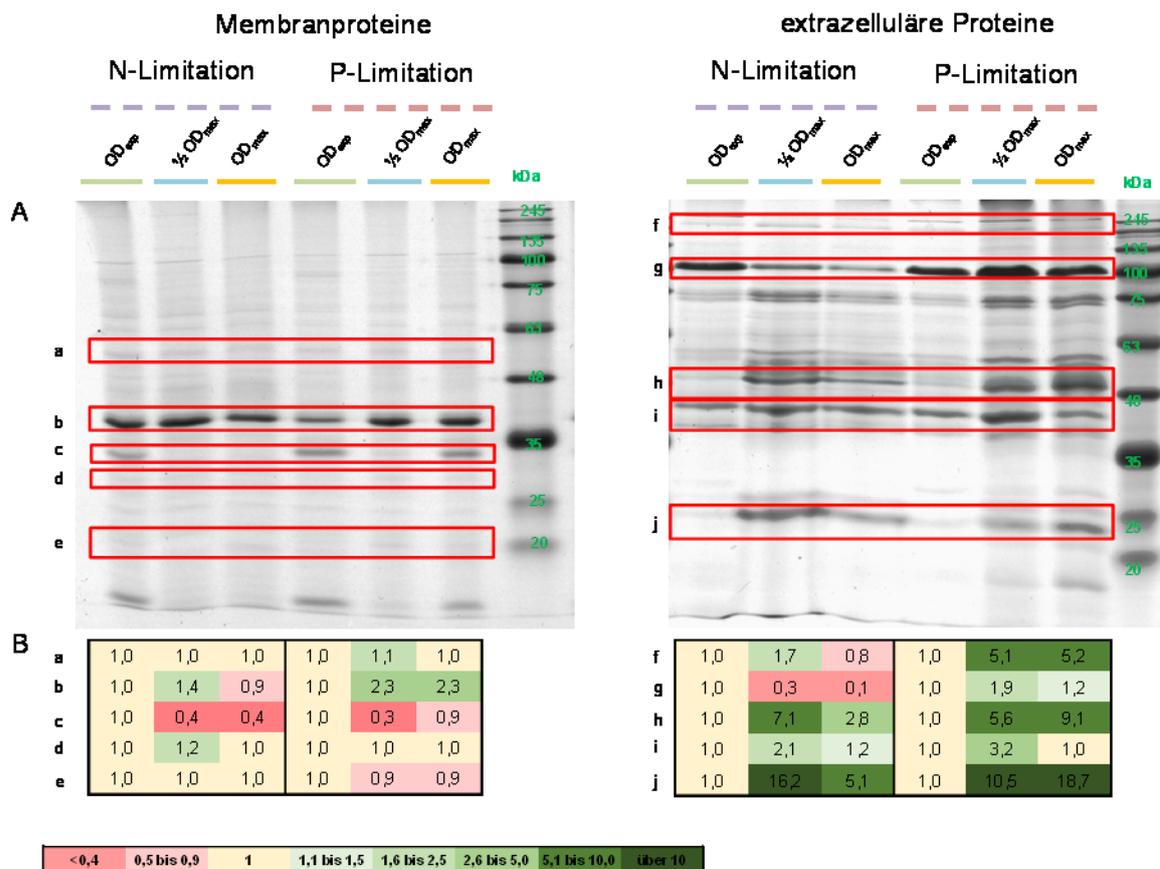


Abbildung 23: Intensitätsanalyse prominenter SDS-PAGE Banden. Links: Membranproteine. Rechts: extrazelluläre Proteine. A: Gelbild mit markierten Banden (Rot) für die Intensitätsbestimmung. B: Fold Change der Intensitätswerte.

Die Bandenmuster beider N:P-Verhältnisse in Abhängigkeit von der Wachstumsphase densitometrisch analysiert (Abb. 23). Es wurden je fünf prominente Banden ausgewählt (MP: a-e; EP: f-j).

Die MP-Bande a (~56 kDa) weist über die Zeit und zwischen den Zuständen keine erwähnenswerte Änderung der Intensität auf. Koßmehl et al. (2013) konnten Proteine dieser Größenordnung in der Cytoplasmamembran nachweisen: PstA (PGA1_c15760; 58,59 kDa) und PstC (PGA1_c15770; 52,02 kDa). Diese Proteine bilden vermutlich das Pst-Transportsystem, welches von *E. coli* bei P-Limitation zum Einsatz kommt (Willsky und

Malamy 1976). Ihr Molekulargewicht könnte dem der apparenten Bande a entsprechen, da aber kein Unterschied zwischen den Zuständen und N:P-Verhältnissen zu erkennen ist, kann hierüber ohne massenspektrometrische Identifizierung keine eindeutige Aussage getroffen werden. Ebenfalls wurde in dieser Größenordnung eine transmembrane Glutamat-Synthetase (PGA1_c32410; 54,02 kDa) und eine Aminotransferase (PGA1_c20300; 41,31 kDa) bei Koßmehl et al. (2013) identifiziert. Dies könnte ein Hinweis auf die Speicherung von Stickstoff über den Glutamin-Synthetase (GS)/ Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase (GOGAT)-Weg (Reizer 2003) geben.

MP-Bande b (~40 kDa) fällt deutlich durch die hohe Intensität auf, wobei kein differentielles Muster in Abhängigkeit von der Zeit erkennbar ist. Nur bei OD_{exp} des zweiten N:P-Verhältnisses ist die Intensität etwas geringer. Das Genom von *P. inhibens* DSM 17395 enthält homologe Gene mit zum Ammonium-Transportsystem AmtB von *E. coli* (Hazen et al. 2012; Thole et al. 2012), z.B. das 46,41 kDa große Protein PGA1_c29410, sowie das 40,91 kDa große PGA1_c14730. Deren Molekulargewicht könnte dem Bereich der Bande b entsprechen.

Auffallend ist zudem die Bande c (~30 kDa) welche bei beiden N:P-Verhältnissen jeweils bei OD_{exp} deutlich erkennbar ist und bei $1/2 OD_{max}$ nicht auftritt, bei der P-Limitation jedoch bei OD_{max} wieder deutlich vorhanden ist. Dies manifestiert sich in der Clusteranalyse (Abb. 21 und 22). Wiegmann et al. (2014) konnte für den Abbau von Mannitol drei spezielle transmembrane ABC-Transporter, welche alle eine Größe um 30 kDa aufweisen, in der Membranfraktion identifizieren (e.g. PGA1_c28060, 34,77 kDa). Zudem wurden in dieser Arbeit zwei Permeasen (PGA1_c13190, 30,63 kDa und PGA1_c13200, 31,59 kDa), sowie das ATP-Bindeprotein *SmoK* (PGA1_c13180, 36,42 kDa) identifiziert.

Phospholipide sind ein wichtiger Bestandteil der Zellmembran. Sie bestehen aus einem hydrophilen, phosphathaltigen Kopf und einem lipophilen Schwanz bestehend aus Fettsäureketten. Unter P-Limitation wurde für Cyanobakterien und eukaryotisches Phytoplankton nachgewiesen, dass Phospholipide gegen Schwefel-, bzw. Stickstoffhaltige Lipide ausgetauscht werden können (Van Mooy et al. 2009; Carini et al. 2015). Die Synthese von Phospholipiden wird hier also durch die externe P-Konzentration beeinflusst. Proteine der Phospholipidsynthese (Zech et al. 2013a, b; Koßmehl et al. 2013), die alle in der MP-Proteinfraktion zwischen 20 und 50 kDa (z.B. Banden d und f) zu finden sein könnten (Tab. 5), sollten daher ebenfalls reguliert sein.

Tabelle 5: Proteine der Phospholipidsynthese nach Zech et al. (2013 a,b) und Koßmehl et al. (2013).

Protein	Gen	Funktion	Molekulargewicht [kDa]
PGA1_c16100		Putative cardiolipin synthetase	52,46
PGA1_c03860	<i>plsB</i>	Glycerol-3-phosphate acyltransferase, PlsB-like	52,37
PGA1_c11250	<i>plsX</i>	Fatty acid/phospholipid synthesis protein	38,85
PGA1_c14460		Putative phosphatidylserine decarboxylase	32,39
PGA1_c15560		Acyltransferase domain-containing protein	31,89
PGA1_c03520	<i>plsC1</i>	1-Acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	27,49
PGA1_c02890	<i>pgsA</i>	CDP-diacylglycerol-glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase	25,15
PGA1_c29610	<i>pmtA</i>	Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase	23,09
PGA1_c03010	<i>plsY</i>	Glycerol-3-phosphate acyltransferase	20,73

Da bei *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 eine N-Speicherung in Form der Makromoleküle RNA, DNA und Proteine, sowie in Form von Aminosäure und anderen Metaboliten vermutet wird, müssten die Proteine für deren Synthesen ebenfalls nachweisbar sein. Proteine zur Aminosäuresynthese für zum Beispiel die verzweigten N-haltigen Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Lysin konnten, unter N-Limitation, von Trautwein, Rabus et al. (persönliche Mitteilung) in der MP-Fraktion identifiziert werden.

In den EP fällt auf, dass bei beiden N:P-Verhältnissen die Intensität einiger Banden deutlich über die Zeit zunimmt. Dabei fällt vor allem die Bande g (ca. 100 kDa) ins Auge: Hierbei könnte es sich um ein *RTX*-ähnliches Protein (kurz für *repeats-in-toxin*; Satchell, 2007) handeln, was an dieser Stelle beim Wachstum mit Glukose identifiziert werden konnte (PGA1_c26140, 116,01 kDa; Zech et al. 2013a) und auch bei *Ruegeria pomeroyi*, einem weiteren Mitglied der *Roseobacter*-Gruppe, auftritt (Christie-Oleza et al. 2010). *RTX*-Proteine wirken aktiv gegen prokaryotische und eukaryotische Zellen und dienen somit dazu sich gegen die Konkurrenz durch anderer Organismen zu behaupten (Satchell 2007). Bei beiden N:P-Verhältnissen im Zustand OD_{exp} hat diese Bande nahezu die gleiche Intensität. Bei der N-Limitation nimmt sie über die Zeit ab, bei der P-Limitation nimmt sie zu. Die leichte Intensitätsabnahme zu OD_{max} könnte auf den Wachstumszustand zurückgeführt werden: Ist die Probe schon vergleichbar spät in der stationären Phase genommen worden, kann bereits der Abbau des Proteins durch gebildete Proteasen eingesetzt haben. Proteasen wie beispielsweise PGA1_c21610 (53,20 kDa) oder PGA1_c36250 (45,40 kDa), könnten hinter den Banden um 50 kDa (h) liegen (Koßmehl et al. 2013). Deren Intensität nimmt ebenfalls über die Zeit zu und könnte diese Annahme bestätigen. In der N-Limitation könnte die Abnahme der Bandenintensität mit Abbau der Proteine zur Rückgewinnung von Stickstoff zusammenhängen. Zudem wird vermutet, dass im Falle der N-Limitation die Abundanz der *RTX*-Proteine an den externen NH₄⁺-Gehalt und das hohe N:C-Verhältnis gebunden ist um den internen N-Speicher vor Prädatoren zu schützen.

Bei Trautwein, Rabus et al. (persönliche Mitteilung) konnten unter N-limitierenden Bedingungen weitere Proteine, die den *RTX-ähnlichen* Proteinen zugeordnet werden können, im hochmolekularen Bereich (z.B. PGA1_262p01140, 173,40 kDa) und zwischen 30 und 50 kDa (Bereich i und j, z.B. PGA1_262p00640, 37,13 kDa und PGA1_262p01050, 31,82 kDa) gefunden werden.

Bei Zech et al. (2013a) wurde bei einem Molekulargewicht von ca. 200 kDa, was der apparenten Bande f entsprechen könnte, das nicht charakterisierte Protein PGA1_c17490 identifiziert. Die Banden i (~45 kDa) und j (~23 kDa) weisen ebenfalls eine deutliche Intensitätszunahme über die Zeit auf. Im Rahmen der Untersuchung des Mannitol-Abbaus durch *P. inhibens* konnten Wiegmann et al. (2014) bei ca. 50 kDa ein extrazelluläres Zucker-Bindeprotein (PGA1_c13210), sowie einige weitere Proteine diesen Molekulargewichts nachweisen. Für eine genauere Interpretation müssten die Proteine jedoch identifiziert werden. Spezifische Proteine für den Mannitol-Abbau (z.B. Mannitol-2-dehydrogenase (PGA1_c13160) und Fructokinase (PGA1_c28020)) wurden in der löslichen Fraktion mittels 2D-DIGE nachgewiesen.

3.4. Biologische Varianz

Um genügend Biomasse für die molekularbiologischen Analysen zu generieren, wurden zu jedem Erntezeitpunkt mindestens drei Bioreaktoren parallelen betrieben und vollständig geerntet. Die Biomasse wurde anschließend für die unterschiedlichen Analysen aufgeteilt. Für jeden Reaktor wurden bis zum Zeitpunkt der Ernte regelmäßig die OD bestimmt und Substratproben entnommen. Dadurch können alle biologischen Replikate mit der ursprünglichen Wachstumskurve verglichen werden (Tab. 6 und Tab. S3/S4).

Die Kultivierungszeiten für die 1/2 OD_{max} und OD_{max} Ernten unterscheiden sich um maximal ± 1,5 Stunden zu den Wachstumskurven. Bei beiden N:P-Verhältnissen war eine OD_{600nm} von 0,15 nach 11 bzw. 12 Stunden erreicht. Bei den Massenanzuchten verschob sich dies in beiden Fällen um 4 Stunden nach hinten, was auf eine verlängerte Lag-Phase zurückgeht. Auch wenn die Startkonzentrationen der Substrate zwischen den Kultivierungen schwanken (max. ± 12 %), stimmt der jeweilige Verbrauch mit dem in der Wachstumskurve überein (Tab. 6). Die BTM weicht dagegen deutlicher von der Wachstumskurve ab, besonders bei Probenahmen zu Zeitpunkten mit niedriger OD, war der relative Fehler mit 16,5 bis 18,5% recht hoch (Abb. 27).

Tabelle 6: Vergleich der physiologischen Parameter der Massenanzuchten von *P. inhibens* DSM 17395 in SWM mit Mannitol als C-Quelle und definierten NH₄⁺- und PO₄³⁻-Konzentrationen (c).

N:P Limitation	N _{0.5mM} P _{0.5mM}			N _{8mM} P _{0.03mM}		
	OD _{exp}	OD _{1/2max}	OD _{max}	OD _{exp}	OD _{1/2max}	OD _{max}
Kultivierungszeit [h]	15	17	39	16	33	61.5
Wachstumsrate [h⁻¹]						
μ _{exp}	0.14 ± 00.05	0.16 ± 0.01	0.15 ± 00.06	0.10 ± 0.03	0.13 ± 00.03	0.13 ± 00.01
μ _{Lin}	-	-	0.013 ± 0.001	-	0.065 ± 0.005	0.056 ± 0.005
OD _{max}	0.15 ± 00.00	0.34 ± 0.00	0.66 ± 00.04	0.15 ± 0.01	1.27 ± 00.03	2.44 ± 0.12
BTM [mgL⁻¹]	60.00 ± 10.00	n.b.	270.00 ± 50.00	40.00 ± 0.00	420.00 ± 30.00	580.00 ± 20.00
C_{start} [mM]						
Man	10.83 ± 0.03	11.04 ± 0.08	11.32 ± 00.08	12.31 ± 0.28	11.18 ± 0.07	10.88 ± 0.44
NH ₄ ⁺	0.48 ± 0.01	0.44 ± 0.02	0.47 ± 00.01	7.55 ± 0.44	7.09 ± 0.17	8.55 ± 0.44
PO ₄ ³⁻	0.46 ± 0.02	0.48 ± 0.13	0.46 ± 00.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00
C_{ende} [mM]						
Man	9.89 ± 0.07	9.82 ± 0.13	8.18 ± 0.31	11.53 ± 0.18	6.55 ± 0.13	2.00 ± 0.59
NH ₄ ⁺	n.b.	n.b.	n.b.	7.04 ± 0.24	6.45 ± 0.36	5.86 ± 0.41
PO ₄ ³⁻	0.46 ± 0.01	0.40 ± 0.03	0.45 ± 0.01	n.b.	n.b.	n.b.
Verbrauch [%]						
Man	9 ± 1	11 ± 1	28 ± 2	6 ± 1	41 ± 1	82 ± 5
NH ₄ ⁺	99	100	100	9 ± 2	13 ± 1	25 ± 10
PO ₄ ³⁻	<1	<1	<1	n.b.	100	100

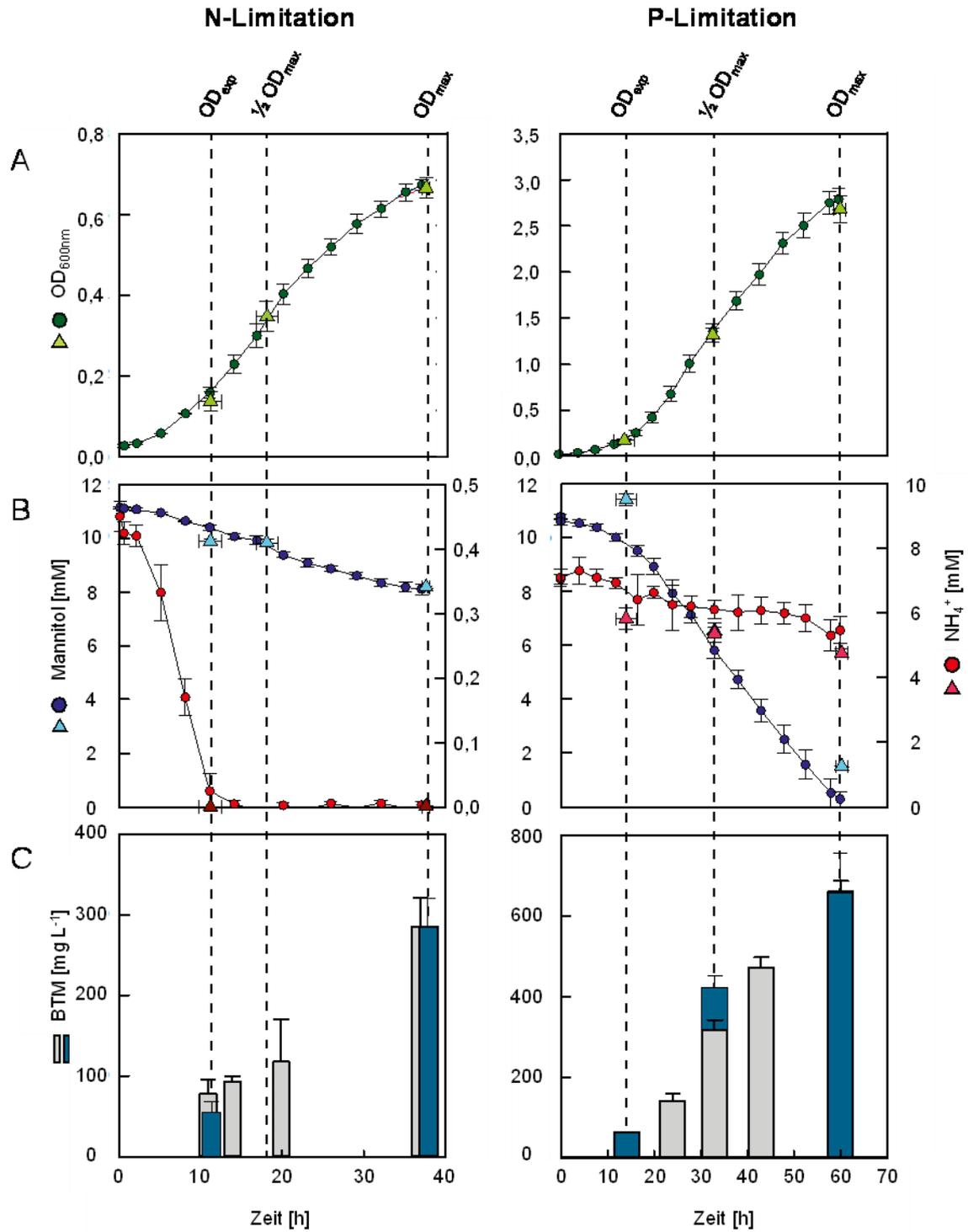


Abbildung 24: Passgenauigkeit der Massenanzuchten (Dreiecke) bzgl. der detaillierten Wachstumskurven (Punkte) von *P. inhibens* DSM 17395 in SWM mit Mannitol und unterschiedlichen N:P-Verhältnissen. Links: N-Limitation. Rechts: P-Limitation. A: Wachstumskurven. B: Substratverbrauchs. C: BTM für die Wachstumskurve (grau) und die Massenanzuchten (Cyan).

Jeweils zwei biologische Replikate wurden für die proteomische Auswertung ausgewählt und aufgearbeitet. Die beiden Replikate wurden zum Vergleich nebeneinander über eine SDS-PAGE aufgetrennt, digitalisiert und mit dem Softwarepaket QuantityOne[®] ausgewertet. Für die MP waren die Replikate sehr ähnlich. Im N:P-Verhältnis 1 unterschieden sich die Bandenmuster um maximal eine Bande, im N:P-Verhältnis 2 um höchstens ± 2 Banden (Abb. 28). Die Ähnlichkeitsmatrix zeigte, dass sich die Duplikate in ihrem Bandenmuster im ersten N:P-Verhältnis mit mindestens 95%, im zweiten mit mindestens 78% gleichen. Schwankungen können auf die niedrige aufgetragene Proteinmenge (5 μ g) zurückgeführt werden, welche durch die niedrigen Konzentrationen der Proteinextrakte maximal auftragbar war.

In der Fraktion der EP liegen die Unterschiede zwischen den Replikaten von der Anzahl der Banden bei maximal ± 3 Banden, da die Detektion der Banden aufgrund von Schlieren und teilweise übermäßig intensiven, bzw. überladenen Banden, schwer war. Die Ähnlichkeitsmatrix, welche sich nicht nur an der Anzahl der detektierten Banden orientiert, sondern die Intensität mit in Betracht zieht, zeigt über alle Replikate hinweg eine Ähnlichkeit von 88 - 100% (Abb. 28). Betrachtet man beide Gele, so ist eine biologische Varianz von höchstens 22% zwischen den Duplikaten gegeben, eine biologische Varianz von 20% ist für 2D-DIGE Analysen von *P. inhibens* DSM 17395 dokumentiert (Zech et al. 2011).

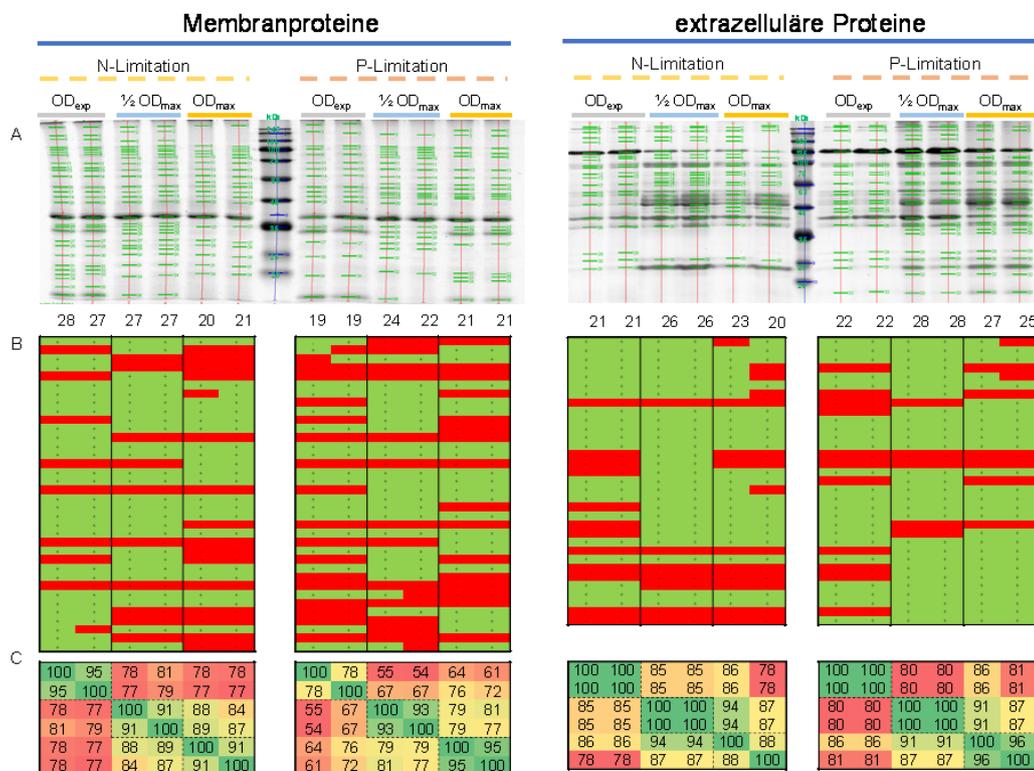


Abbildung 25: Vergleich der biologischen Replikate auf Ebene der Membran- und extrazellulären Proteine. A: das Gelbild mit eingezeichneten abgeglichenen Banden und Anzahl der detektierten Banden. B: Bandenreport; grün: Bande, rot: keine Bande. C: Ähnlichkeitsmatrix mit %-Angaben der Überschneidung der Bandenmuster.

3.5. Etablierung der NH_4^+ und PO_4^{3-} Bestimmung mittels MPR

Im Rahmen der vielen Experimente entstand ein hohes Aufkommen an Substratproben. Im Gegensatz zu der Messung der Konzentration von Zuckern (z.B. Glukose und Mannitol) und anderen C-Quellen mit einer HPLC mit Autosampler, war bisher in unserem Labor keine Hochdurchsatzmethode zur Bestimmung der Konzentrationen von NH_4^+ und PO_4^{3-} in SWM verfügbar. Um effizient möglichst viele Proben analysieren zu können, wurden zwei neue Assays zur kolorimetrischen Konzentrationsbestimmung von NH_4^+ und PO_4^{3-} in SWM mittels Mikroplattenleser (engl. *Microplate reader*: MPR) etabliert und validiert (Ruppersberg et al. 2017). Diese basieren auf den Methoden von Baethgen und Alley (1989) für die NH_4^+ -Bestimmung in Böden und DruECKes et al. (1995) für die Bestimmung von anorganischem PO_4^{3-} .

Das ursprüngliche Protokoll zur Bestimmung von NH_4^+ nach Baethgen und Alley (1989) basiert auf einer modifizierten Berthelot-Reaktion (Krom 1980) bei der an Stelle von Phenol, welches oft in der Bestimmung von NH_4^+ zum Einsatz kommt (Searle 1984), Salicylat mit Monochloramin, unter Nutzung von Nitroprussid als Katalysator, zu einem blauen Farbkomplex reagiert. Das Monochloramin entsteht in einer vorangehenden Reaktion von Hypochlorid mit dem NH_4^+ der Probe in alkalischem Milieu (Pym und Milham 1976) (Abb. 30).

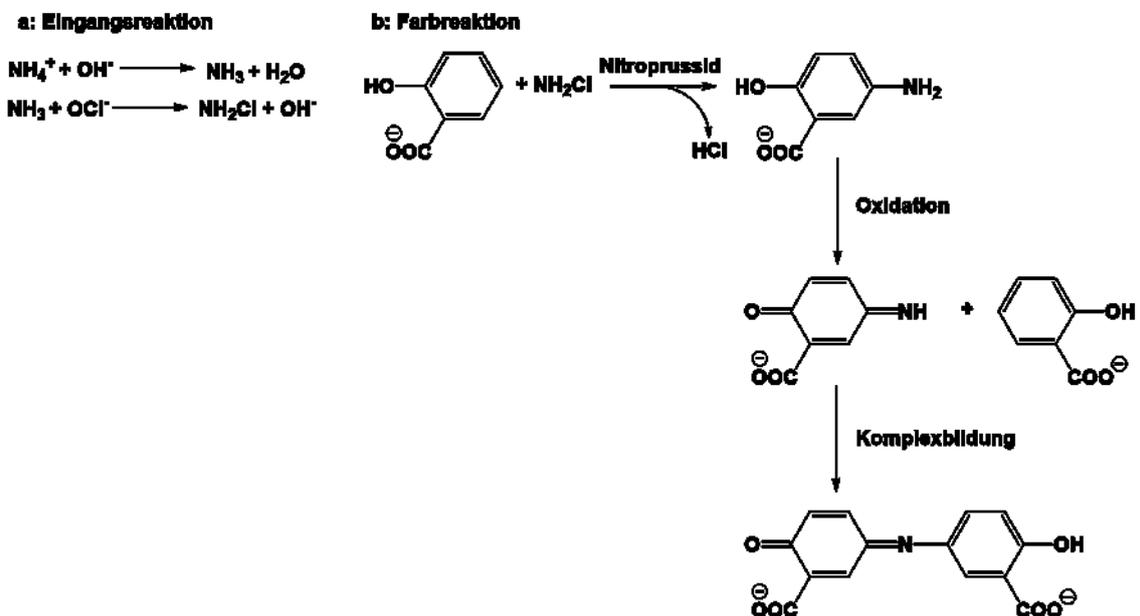
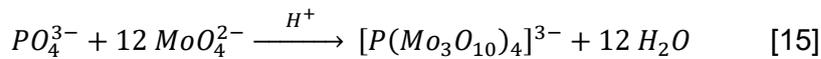


Abbildung 26: Modifizierte Berthelot-Reaktion nach Krom (1980). A: Als Eingangsreaktion reagiert Ammonium im alkalischen Milieu zunächst zu Ammoniak, dann mit Hypochlorid zum Monochloramin. B: Nitroprussid-katalysierte Farbreaktion des Monochloramins mit Salicylat.

Die Bestimmung von PO_4^{3-} nach Druectes et al. (1995) basiert auf der Bildung eines blauen Phosphomolybdat-Komplexes bei der Reaktion von PO_4^{3-} mit Ammoniummolybdat (Yuan et al. 2008).



Für die Bestimmung der NH_4^+ - und PO_4^{3-} -Konzentrationen in den Proben mussten beide Assays auf die Anwendung mit SWM und geringem Probevolumen in verschiedenen Schritten angepasst werden. Für die einzelnen Anpassungsschritte wurde als „Blank“ SWM mit 11 mM Glukose oder Mannitol als C-Quelle und $0,2 \text{ g L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$ für das NH_4^+ -Assay, bzw. $0,25 \text{ g L}^{-1} \text{NH}_4\text{Cl}$ für das PO_4^{3-} -Assay, verwendet. Als Proben, bzw. später als Standard wurden Stammlösungen aus in SWM gelöstem KH_2PO_4 bzw. NH_4Cl verwendet und mit SWM entsprechend verdünnt, um verschiedener Konzentrationsstufen zu erhalten.

Zunächst wurde diesen Proben mit den Ausgangsmethoden getestet (Tab. S3), wobei bei beiden Tests zunächst keine differenzierte Farbreaktion zwischen den Konzentrationsstufen zu erkennen war (Abb. 31).

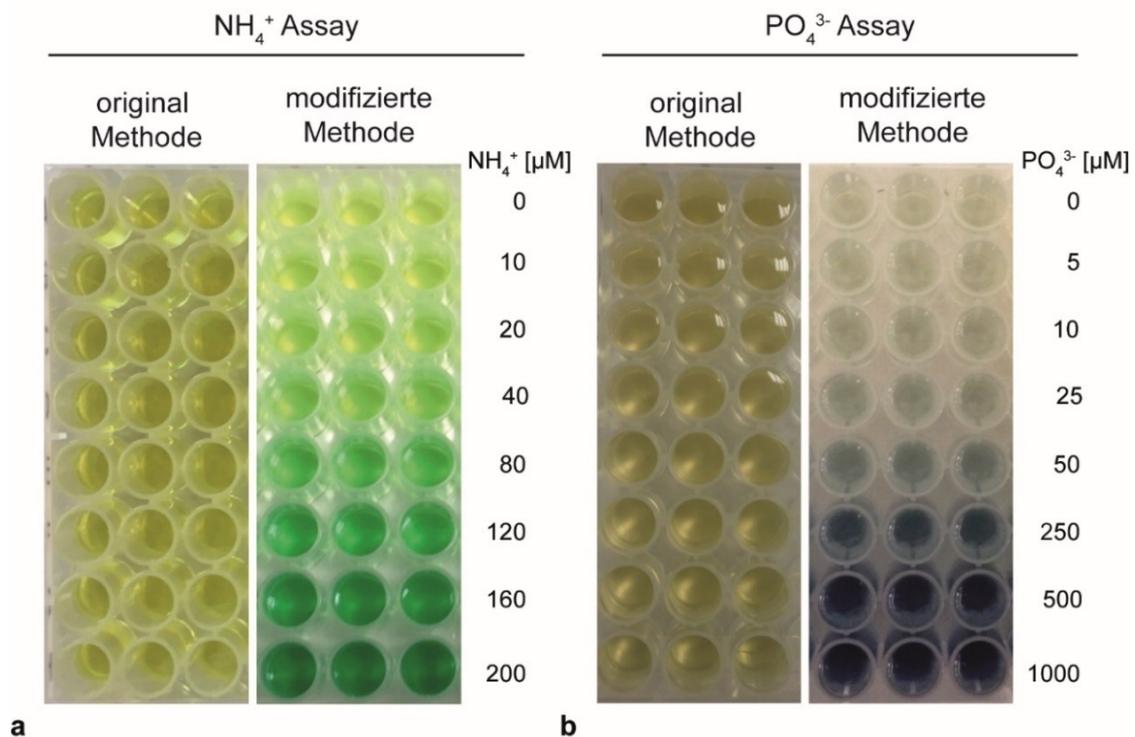


Abbildung 27: Vergleich der ursprünglichen und der modifizierten Methoden zur kolorimetrischen Bestimmung von NH_4^+ und PO_4^{3-} anhand von Standards in SWM (aus Ruppertsberg et al., 2017).

Die Anpassung des NH_4^+ - Assays erfolgte in drei Schritten. Im ersten Schritt wurde an den Konzentrationen des Natriumsalicylats (6,8 auf 15,0% (w/v)) und Natriumnitroprussids (von 0,003 auf 0,17% (w/v)), sowie der Natriumhypochlorid-Lösung (Reagenz 2; von 5,25 auf 6,5% (v/v)) variiert, was jedoch zu keinem messbaren Unterschied führte. In Kombination mit einer schrittweisen Erhöhung des Probenvolumens (von 20 bis zu 60 μL) und einer Erhöhung der Temperatur (von 25 auf 37 °C), konnte die Inkubationszeit von 45 auf 15 min reduziert werden. Eine Erhöhung des pH-Wertes führte lediglich zu einer höheren Intensität, aber nicht zu einer besseren Differenzierung zwischen den Konzentrationen, wie ursprünglich erwartet wurde.

Mit dem modifizierten Protokoll wurde mittels 10-Punkt-Kalibrierungen eine Nachweisgrenze (LOD, engl. *Limit of detection*; Armbruster et al. 2008) von 14 μM und eine Bestimmungsgrenze (LOQ, engl. *Limit of quantification*; Armbruster et al. 2008) von 36 μM bestimmt. Der Linearitätsbereich reicht bis 200 μM mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,988. Die Methode wurde mit einem Küvettenassay nach Chaney und Marbach (1962), welches auf der Berthelot-Reaktion mit Phenol beruht, verglichen. Dieses erwies sich zwar in niedrigen Konzentrationsbereichen aufgrund der niedrigeren Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (LOD = 1,8 μM ; LOQ = 5,1 μM) als genauer. Allerdings sprechen das deutlich geringere Arbeitsvolumen (60 μL vs. 1 mL), die kürzere Inkubationszeit (15 min vs. 1h) und die Vermeidung des giftigen Phenols als Edukt und o-Chlorophenol als Nebenprodukt, sowie der deutlich größere Probendurchsatz im MPR für die neu entwickelte Methode.

Um das PO_4^{3-} -Assay von Drucekes et al. (1995) auf die Messung von SWM Proben anzupassen, waren mehr Änderungsschritte nötig. Erst eine Änderung des Mischungsverhältnisses der Reagenzien (von 1+4 auf 2+3), führte zu einer Farbreaktion. Um eine differenzierte Färbung zu erhalten, wurde die Zugabe von Antimontartrat getestet (Murphy und Riley 1962), dies führte zu keiner Besserung. Eine pH-Erniedrigung von 5 auf 4, sowie eine Änderung des Probevolumens (von 30 auf 120 μL) und des Volumens von Reagenz A (von 125 auf 250 μL) endeten in differenzierten Farbabstufungen zwischen 10 und 1000 μM PO_4^{3-} . Allerdings war die Färbung nicht wie von Drucekes et al. (1995) beschrieben nach 10 min für mehrere Stunden stabil. Der Langzeittest zeigte, dass bei einer Ascorbat-Konzentration von 10% (w/v) erst nach etwa drei Stunden eine stabile Färbung eintritt. Zudem beeinflusste eine starke Hintergrundfärbung durch die Oxidation überschüssigen Ascorbats die PO_4^{3-} -Bestimmung speziell bei niedrigen Konzentrationen. Die Ascorbat-Konzentration wurde auf 2.5% (w/v) reduziert, dadurch verringerte sich die Hintergrundfärbung deutlich und die Inkubationszeit verkürzte sich auf 30 min, bis eine konstante Färbung eintrat.

Mit dem neuen Protokoll war eine Linearität von 10 bis 1000 $\mu\text{M PO}_4^{3-}$ mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,9999 gegeben. Mittels 10-Punkt-Kalibrierung konnte eine Nachweisgrenze von 13,3 μM und eine Bestimmungsgrenze von 50,3 μM festgelegt werden. Es gibt zwar Methoden, welche in niedrigen Konzentrationsbereichen sensitivere Ergebnisse liefern, allerdings basieren diese meist auf methodisch sehr aufwändigen Probenvorbereitungen und dem Gebrauch von karzinogenen, bzw. mutagenen Chemikalien, wie Malachitgrün (Baykov et al. 1988 ; Conigrave und Morris 1998; Geladopoulos et al. 1991 ; Culp und Beland 1996 ; Rao 1995 ; Srivastava et al. 2004) oder Rhodamin B (Debruyne 1983). Meines Wissens nach, existieren keine Studien, in welchen diese Methoden mit salzhaltigen (z.B. marine) Proben getestet wurden. Phosphat-Nachweise und vor allem die Quantifizierung in salzhaltigen Proben gestalten sich bekannter Weise als schwierig (Broberg und Pettersson 1988).

Um eine statistische Auswertung über die Stabilität und Reproduzierbarkeit der beiden Assays durchführen zu können, wurden die Daten von je 30 8-Punkt-Kalibrierungen und 1.263 NH_4^+ -, sowie 916 PO_4^{3-} -Proben, welche in technischen Triplikaten gemessen wurden, gesammelt. Die Steigungen variieren maximal $\pm 10\%$ um die der 10-Punkt-Kalibrierung. Der Variationskoeffizient (CV) liegt für die NH_4^+ - Bestimmung bei 0,025 mit einem Interquartilsabstand (IQA) von 0,025, für die Messung von PO_4^{3-} bei 0,042 mit einem IQA von 0,075. Diese niedrigen Werte zeigen, dass beide Verfahren robuste und reproduzierbare Daten liefern (Abb. 32).

Die entwickelten Farbassays erweisen sich als nutzerfreundliche und sehr gut reproduzierbare Methoden zur Bestimmung der Ammonium- und Phosphatkonzentration von SWM-Proben im Hochdurchsatzverfahren.

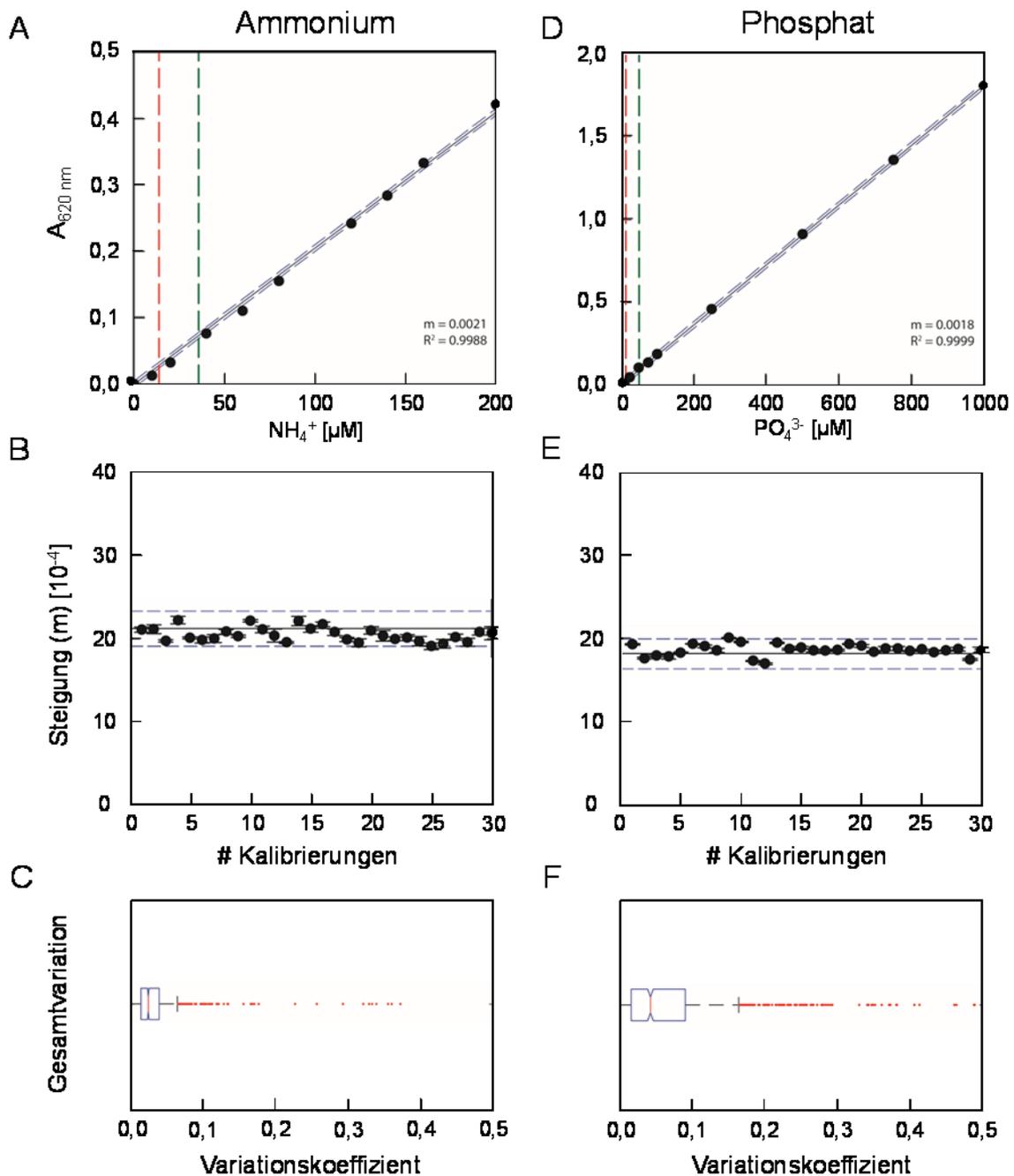


Abbildung 28: Statistische Auswertung von Kalibrierung und Reproduzierbarkeit der Ammonium- (NH_4^+ ; links) und Phosphat- (PO_4^{3-} ; rechts) Bestimmung mittels MPR übernommen von Ruppertsberg et al. (2017). A,D: 10-Punkt-Kalibrierung (schwarze Punkte); schwarze Linie: Regressionsgerade; blaue Linie: $\pm 1\%$ Abweichung; rote Linie: Nachweisgrenze; grüne Linie: Bestimmungsgrenze Geradengleichung und Korrelationskoeffizient R^2 sind gegeben. B,E: Reproduzierbarkeit gezeigt durch gesammelte Steigungen von 8-Punkt-Kalibrierungen (schwarze Punkte) bei Messungen von biologischen Proben; schwarze Linie: Steigung der 10-Punkt-Kalibrierung mit $\pm 10\%$ Abweichung (blaue Linien). C,F: Variationskoeffizient der Bestimmung biologischer Replikate der Kultivierung von *P. inhibens* DSM 17395 gemessen in Triplikaten; roter Boxplot: Median; blaue Boxen: 25. bis 75. Quantil der meisten Werte; rote Markierungen: Verteilung übriger Werte und Ausreißer.

4. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Dissertation wurden Kultivierungsexperimente mit dem marinen Bakterium *Phaeobacter inhibens* DSM17395 hinsichtlich der physiologischen und molekularbiologischen Anpassung auf zwei limitierende N:P-Verhältnisse durchgeführt. Als Vertreter der Roseobacter, einer Gruppe mariner Bakterien, die erfolgreich vielfältige marine Lebensräume besiedelt, ist *P. inhibens* darauf ausgerichtet seinen Stoffwechsel schnell an ein sowohl qualitativ als auch quantitativ wechselndes Substratspektrum anzupassen (Zech et al. 2009 und 2013ab; Wiegmann et al. 2014; Drüppel et al. 2014).

Stickstoff und Phosphor stellen neben Kohlenstoff, Sauerstoff, Wasserstoff und Schwefel, die Grundbausteine aller organischen Verbindungen dar. Im marinen Lebensraum sind diese sogenannten Nährstoffe sehr begehrt und eine Limitierung dieser wirkt sich direkt auf die Primärproduktion und somit auf alle globalen Kreisläufe aus. Bereits 1934 postulierte Alfred Redfield, dass das Verhältnis von Stickstoff zu Phosphor eine zentrale Rolle spielt und in einem globalen marinen Gleichgewicht steht (Arrigo 2005). Die von den meisten Mikroorganismen favorisierten Stickstoff- und Phosphorquellen sind Ammonium (NH_4^+) und Phosphat (PO_4^{3-}).

In zahlreichen Kultivierungsexperimenten mit *P. inhibens* DSM 17395 in Erlenmeyerkolben mit definiertem Seewassermedium mit verschiedenen N:P-Verhältnissen konnte auf Basis von Wachstumskurven ein physiologisches Model erstellt werden (Trautwein et al. 2017). Dabei wurde beobachtet, dass unter N-limitierenden Bedingungen *P. inhibens* innerhalb der ersten Stunden des Wachstums das gesamte externe NH_4^+ aufnimmt und einen intrazellulären Speicher in Form von Makromolekülen wie RNA, DNA, Proteinen und PHB anlegt, welcher über die Zeit abgebaut wird (Trautwein, Rabus et al., persönliche Mitteilung).

Diese Studie ergänzt diese Ergebnisse mit physiologischen Experimenten in Prozesskontrollierten Bioreaktoren bei denen auch Biomasse für molekularbiologische Untersuchungen generiert wurde. Durch die Prozesskontrolle konnten unter Anderem online die CO_2 -Produktion und der O_2 -Verbrauch analysiert und so Erntezeitpunkte bestimmt werden.

Es wurden zwei N:P-Verhältnisse so gewählt, dass zum einen die N-Limitation (N:P = 1:1), zum anderen P-Limitation (N:P= 267:1) untersucht werden konnten. In den physiologischen Experimenten wurde deutlich, dass die N-Limitation einen starken Effekt auf das Wachstum hat. Die Kultivierungszeit bis zum Eintritt in die stationäre Phase betrug nur zweidrittel im Vergleich zur P-Limitation. Die maximale OD, Biotrockenmassekonzentration

on sowie O₂-Verbrauch und CO₂-Produktion waren unter P-Limitation um Vierfache erhöht. Eine Gemeinsamkeit zeigte sich lediglich im N:C-Verhältnis der Elementarzusammensetzung. Bei etwa 1/4 OD_{max} hatte es sein Maximum bei etwa 0.16 und sank bis OD_{max} auf um 0.05. Dies deutet darauf hin, dass *P. inhibens* auch unter P-Limitierung einen internen N-Speicher aufbaut, der über die Zeit abgebaut wird, unabhängig davon, ob überschüssiges extrazelluläres NH₄⁺ verfügbar ist. Mittels Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass zwar unter N-Limitierung der DNA-Gehalt beim Eintritt in die stationäre Phase doppelt so hoch war wie unter P-Limitierung, hierbei jedoch der PHB- und Proteingehalt doppelt, bzw. dreifach erhöht war. Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 zu Beginn seines Wachstums zunächst die Priorität auf die Aufnahme externen Stickstoffs legt, um interne (Stickstoff-) Speicher aufzubauen. Nach dieser vom Wachstum entkoppelten Stickstoff-Aufnahme entscheiden die weiteren Umstände, wie das Wachstum verläuft. In der P-Limitation ist ein Wachstum möglich, auch wenn kein Phosphat mehr nachweisbar ist und noch N-Reserven vorhanden sind.

Beides deutet auf Anpassungsstrategien an eine wechselnde Umwelt hin: Stehen Stickstoff und Phosphat zur Verfügung werden diese so schnell und so viel wie benötigt aufgenommen und intern verwaltet, um einen Verlust der Nährstoffe zu vermeiden und die Konkurrenz auszuspielen. Die zentralen Stoffwechselwege aufrecht zu erhalten dient ebenfalls als Überlebensstrategie von *P. inhibens*, um in einer wechselnden Umwelt unmittelbar auf die Zufuhr von Nährstoffen reagieren zu können (Zech et al. 2009).

Die densitometrische Analyse des Proteoms ergab für beide Zustände, dass sich dieses von OD_{exp} zu 1/2 OD_{max} sowohl in der extrazellulären als auch der Membranfraktion am meisten ändert. Eine Identifizierung prominenter Banden könnte Aufschluss über die qualitativen Änderungen und weitere Ansätze zur Interpretation liefern. Eine umfassende Proteom-Analyse, zu welcher auch quantitative Vergleiche der Zustände mittels 2D-DIGE möglich, sowie ein Shotgun-Ansatz zur Bestimmung des Gesamtproteoms, gehören, würden diese Studie komplettieren. Um den OMICS-Ansatz zu vervollständigen, wäre eine Analyse des Metaboloms und Transkriptoms interessant. Die Proben für beide Ansätze wurden im Rahmen der Prozess-kontrollierten Wachstumsexperimente bereits generiert und sollen in Zusammenarbeit mit externen Partner analysiert werden. Dies könnte die Regulationsmechanismen der Ammonium- und Phosphataufnahme weiter aufschlüsseln. Experimente zur Bestimmung der Schwellenwertkonzentrationen in Kombination mit Lipidomik könnte eine weitere spannende Thematik sein.

5. Referenzen

- Ammerman JW, Hood RR, Case DA, Cotner JB (2003) Phosphorus deficiency in the Atlantic: An emerging paradigm in oceanography *Eos. Transactions American Geophysical Union* 84:165-170
- Anderson TR, Ducklow HW (2001) Microbial loop carbon cycling in ocean environments studied using a simple steady-state model. *Aquatic Microbial Ecology* 26:37-49
- Andrade SL, Einsle O (2007) The *Amt/Mep/Rh* family of ammonium transport proteins. *Molecular Membrane Biology* 24:357-365 doi:10.1080/09687680701388423
- Arkin AP, Schaffer DV (2011) Network news: innovations in 21st century systems biology. *Cell* 144:844-849 doi:10.1016/j.cell.2011.03.008
- Arkin AP, Shen P, Ross J (1997) A test case of correlation metric construction of a reaction pathway from measurements. *Science* 277:1275-1279
- Armbruster DA, Pry T (2008) Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *The Clinical Biochemistry Reviews* 29:S49
- Arrigo KR (2005) Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature* 437:349
- Azam F, Malfatti F (2007) Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews Microbiology* 5:782-791 doi:10.1038/nrmicro1747
- Azam F, Smith DC, Steward GF, Hagström Å (1993) Bacteria-organic matter coupling and its significance for oceanic carbon cycling. *Microbial Ecology* 28:167-179
- Baethgen WE, Alley MM (1989) A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digests *Communications in Soil. Science and Plant Analysis* 20:961-969 doi:10.1080/00103628909368129
- Barabasi AL, Oltvai ZN (2004) Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nature Reviews Genetics* 5:101-113 doi:10.1038/nrg1272
- Battley EH (1995) An apparent anomaly in the calculation of ash-free dry weights for the determination of cellular yields. *Applied and Environmental Microbiology* 61:1655-1657
- Baykov AA, Evtushenko OA, Avaeva SM (1988) A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Analytical Biochemistry* 171:266-270
- Berg H, Ziegler K, Piotukh K, Baier K, Lockau W, Volkmer-Engert R (2000) Biosynthesis of the cyanobacterial reserve polymer multi-L-arginyl-poly-L-aspartic acid (cyanophycin). *The FEBS Journal* 267:5561-5570
- Berger M, Neumann A, Schulz S, Simon M, Brinkhoff T (2011) Tropodithietic acid production in *Phaeobacter gallaeciensis* is regulated by *N*-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *Journal of Bacteriology* 193:6576-6585 doi:10.1128/JB.05818-11
- Bernhardt J, Weibezahn J, Scharf C, Hecker M (2003) *Bacillus subtilis* during feast and famine: visualization of the overall regulation of protein synthesis during glucose starvation by proteome analysis. *Genome Research* 13:224-237
- Bhattarai HD, Lee YK, Cho KH, Lee HK, Shin HW (2006) The study of antagonistic interactions among pelagic bacteria: a promising way to coin environmental friendly antifouling compounds. *Hydrobiologia* 568:417-423 doi:10.1007/s10750-006-0220-2
- Billerbeck S et al. (2016) Biogeography and environmental genomics of the *Roseobacter*-affiliated pelagic CHAB-I-5 lineage. *Nature Microbiology* 1:16063 doi:10.1038
- Boussiba S (1989) Ammonia uptake in the alkalophilic cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Plant and cell physiology* 30:303-308
- Brinkhoff T, Bach G, Heidorn T, Liang L, Schlingloff A, Simon M (2004) Antibiotic production by a *Roseobacter* clade-affiliated species from the German Wadden Sea and its antagonistic effects on indigenous isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 70:2560-2565

- Brinkhoff T, Giebel HA, Simon M (2008) Diversity, ecology, and genomics of the *Roseobacter* clade: a short overview. *Archives of Microbiology* 189:531-539 doi:10.1007/s00203-008-0353-y
- Broberg O, Pettersson K (1988) Analytical determination of orthophosphate in water. *Hydrobiologia* 170:45-59
- Bruggeman FJ, Westerhoff HV (2007) The nature of systems biology. *Trends in Microbiology* 15:45-50 doi:10.1016/j.tim.2006.11.003
- Buchan A, Gonzalez JM, Moran MA (2005) Overview of the marine *Roseobacter* lineage. *Applied and Environmental Microbiology* 71:5665-5677 doi:10.1128/AEM.71.10.5665-5677.2005
- Bucher M (2007) Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist Journal* 173:11-26 doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01935.x
- Buddhuhs N et al. (2013) Molecular and phenotypic analyses reveal the non-identity of the *Phaeobacter gallaeciensis* type strain deposits CIP 105210T and DSM 17395. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63:4340-4349 doi:10.1099/ijs.0.053900-0
- Burns DJ, Beever RE (1979) Mechanisms controlling the two phosphate uptake systems in *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology* 139:195-204
- Cannon WB (1929) Homeostasis. *Physiological Reviews* 4:399-431
- Capone DG, Carpenter EJ (1982) Nitrogen fixation in the marine environment. *Science* 217:1140-1142
- Cardenas E, Tiedje JM (2008) New tools for discovering and characterizing microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnology* 19:544-549 doi:10.1016/j.copbio.2008.10.010
- Carini P et al. (2015) SAR11 lipid renovation in response to phosphate starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112:7767-7772 doi:10.1073/pnas.1505034112
- Chaney AL, Marbach EP (1962) Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical Chemistry* 8:130-132
- Chen R (2012) Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnology Advances* 30:1102-1107 doi:10.1016/j.biotechadv.2011.09.013
- Cheng Y, Church GM (2000) Biclustering of expression data. *Intelligent Systems for Molecular Biology Vol 2000*. pp 93-103
- Chevallet M, Luche S, Rabilloud T (2006) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature Protocols* 1:1852 doi:10.1038/nprot.2006.288
- Chmiel H (2011) *Bioprozesstechnik*. Springer-Verlag,
- Christie-Oleza JA, Armengaud J (2010) In-depth analysis of exoproteomes from marine bacteria by shotgun liquid chromatography-tandem mass spectrometry: the *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 case-study. *Marine Drugs* 8:2223-2239 doi:10.3390/md8082223
- Conigrave AD, Morris MB (1998) A 96-well plate assay for the study of calmodulin-activated Ca²⁺-pumping ATPase from red-cell membranes. *Biochemical Education* 26:176-181
- Culp SJ, Beland FA (1996) Malachite green: a toxicological review. *Journal of the American College of Toxicology* 15:219-238
- D'Alvise PW, Lillebo S, Prol-Garcia MJ, Wergeland HI, Nielsen KF, Bergh O, Gram L (2012) *Phaeobacter gallaeciensis* reduces *Vibrio anguillarum* in cultures of microalgae and rotifers, and prevents vibriosis in cod larvae. *PLoS One* 7:e43996 doi:10.1371/journal.pone.0043996
- Debruyne I (1983) Inorganic phosphate determination: Colorimetric assay based on the formation of a rhodamine B-phosphomolybdate complex. *Analytical Biochemistry* 130:454-460

- Dogs M et al. (2013) Genome sequence of *Phaeobacter inhibens* type strain (T5(T)), a secondary metabolite producing representative of the marine *Roseobacter* clade, and emendation of the species description of *Phaeobacter inhibens* Standards. *Genomic Sciences* 9:334-350 doi:10.4056/sigs.4448212
- Downing JA (1997) Marine nitrogen: phosphorus stoichiometry and the global N: P cycle. *Biogeochemistry* 37:237-252
- Downing JA, McCauley E (1992) The nitrogen: phosphorus relationship in lakes. *Limnology and Oceanography* 37:936-945
- Drueckes P, Schinzel R, Palm D (1995) Photometric microtiter assay of inorganic phosphate in the presence of acid-labile organic phosphates. *Analytical Biochemistry* 230:173-177 doi:10.1006/abio.1995.1453
- Drüppel K et al. (2014) Pathways and substrate-specific regulation of amino acid degradation in *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 (archetype of the marine *Roseobacter* clade). *Environmental Microbiology* 16:218-238 doi:10.1111/1462-2920.12276
- Elser JJ (1994) A stoichiometric analysis of the zooplankton-phytoplankton interaction in marine and freshwater ecosystems. *Nature* 370:21
- Fiehn O (2002) Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* 48:155-171 doi:10.1023/a:1013713905833
- Filippelli GM (2002) The global phosphorus cycle. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 48:391-425 doi:10.2138/rmg.2002.48.10
- Filippelli GM (2008) The global phosphorus cycle: past, present, and future. *Elements* 4:89-95 doi:10.2113/gselements.4.2.89
- Filippelli GM, Ruttengerberg KC (1997) Phosphorous cycling and sedimentation in marine and freshwater systems. *Marine Geology* 139:1-4
- Förster J, Gombert AK, Nielsen J (2002) A functional genomics approach using metabolomics and in silico pathway analysis. *Biotechnology and Bioengineering* 79:703-712
- Fuchs G, Schlegel H-G (2006) *Allgemeine Mikrobiologie: Begründet von Hans-Günter Schlegel*. Georg Thieme Verlag,
- Fürch T, Preusse M, Tomasch J, Zech H, Wagner-Döbler I, Rabus R, Wittmann C (2009) Metabolic fluxes in the central carbon metabolism of *Dinoroseobacter shibae* and *Phaeobacter gallaeciensis*, two members of the marine *Roseobacter* clade. *BMC Microbiology* 9:1-11 doi:10.1186/1471-2180-9-209
- Gattuso J-P, Frankignoulle M, Wollast R (1998) Carbon and carbonate metabolism in coastal aquatic ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29:405-434
- Geider R, La Roche J (2002) Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *European Journal of Phycology* 37:1-17 doi:10.1017/s0967026201003456
- Geladopoulos TP, Sotiroudis TG, Evangelopoulos AE (1991) A malachite green colorimetric assay for protein phosphatase activity. *Analytical biochemistry* 192:112-116
- Geng H, Belas R (2010) Molecular mechanisms underlying roseobacter-phytoplankton symbioses. *Current Opinion in Biotechnology* 21:332-338 doi:10.1016/j.copbio.2010.03.013
- Geng H, Bruhn JB, Nielsen KF, Gram L, Belas R (2008) Genetic dissection of tropodithietic acid biosynthesis by marine roseobacters. *Applied and Environmental Microbiology* 74:1535-1545 doi:10.1128/AEM.02339-07
- Giebel HA, Brinkhoff T, Zwisler W, Selje N, Simon M (2009) Distribution of **Roseobacter** RCA and SAR11 lineages and distinct bacterial communities from the subtropics to the Southern Ocean. *Environmental Microbiology* 11:2164-2178 doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01942.x
- Giovannoni SJ, Stingl U (2005) Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature* 437:343-348 doi:10.1038/nature04158

- Gosink JJ, Herwig RP, Staley JT (1997) *Octadecabacter arcticus* gen. nov., sp. nov., and *O. antarcticus*, sp. nov., Nonpigmented, Psychrophilic Gas Vacuolate Bacteria from Polar Sea Ice and Water. *Systematic and Applied Microbiology* 20:356-365 doi:10.1016/s0723-2020(97)80003-3
- Graham RL, Graham C, McMullan G (2007) Microbial proteomics: a mass spectrometry primer for biologists. *Microbial Cell Factories* 6:26 doi:10.1186/1475-2859-6-26
- Grotkjaer T, Bentzon-Tilia M, D'Alvise P, Dourala N, Nielsen KF, Gram L (2016) Isolation of TDA-producing *Phaeobacter* strains from sea bass larval rearing units and their probiotic effect against pathogenic *Vibrio* spp. in *Artemia* cultures. *Systematic and Applied Microbiology* 39:180-188 doi:10.1016/j.syapm.2016.01.005
- Gygi SP, Rochon Y, Franz A, Aebersold R (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular and Cellular Biology* 19:1720-1730
- Harpole WS et al. (2011) Nutrient co-limitation of primary producer communities. *Ecology Letters* 14:852-862 doi:10.1111/j.1461-0248.2011.01651.x
- Hazen TH et al. (2012) Draft genome sequences of the diarrheagenic *Escherichia coli* collection. *Journal of Bacteriology* 194:3026-3027 doi:10.1128/JB.00426-12
- Holtappels M, Lam P, Kuypers MMM (2009) Der Stickstoffkreislauf im Ozean. *BIOspektrum*:368-[364pp]
- Horak CE, Snyder M (2002) Global analysis of gene expression in yeast. *Functional and Integrative Genomics* 2:171-180 doi:10.1007/s10142-002-0065-3
- Ishii N, Tomita M (2009) Multi-omics data-driven systems biology of *E. coli*. In: *Systems biology and biotechnology of Escherichia coli*. Springer, pp 41-57
- Iversen MH, Ploug H (2010) Ballast minerals and the sinking carbon flux in the ocean: carbon-specific respiration rates and sinking velocity of marine snow aggregates. *Biogeosciences* 7:2613-2624 doi:10.5194/bg-7-2613-2010
- Jacob F (1977) Evolution and tinkering. *Science* 196:1169-1166
- James P (1997) Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Quarterly reviews of biophysics* 30:279-331
- Jansson M (1988) Phosphate uptake and utilization by bacteria and algae. *Hydrobiologia* 170:177-189
- Kagnoff MF, Eckmann L (2001) Analysis of host responses to microbial infection using gene expression profiling. *Current Opinion in Microbiology* 4:246-250
- Kandpal R, Saviola B, Felton J (2009) The era of 'omics unlimited. *Biotechniques* 46:351-352, 354-355 doi:10.2144/000113137
- Kanfer J, Kennedy EP (1964) Metabolism and function of bacterial lipids II. Biosynthesis of phospholipids in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 239:1720-1726
- Kanukollu S et al. (2016) Distinct compositions of free-living, particle-associated and benthic communities of the *Roseobacter* group in the North Sea. *FEMS Microbiology Ecology* 92 doi:10.1093/femsec/fiv145
- Kholodenko BN, Westerhoff HV (2004) *Metabolic engineering in the post genomic era*. ISBN:0-9545232-2-9. Oxford: Horizon Bioscience.
- Kim M, Zhang Z, Okano H, Yan D, Groisman A, Hwa T (2012) Need-based activation of ammonium uptake in *Escherichia coli*. *Molecular Systems Biology* 8:616 doi:10.1038/msb.2012.46
- Kirchman DL (2000) Uptake and regeneration of inorganic nutrients by marine heterotrophic bacteria. *Microbial Ecology of the Oceans*:261-288
- Kjelleberg S, Hermansson M, Marden P, Jones GW (1987) The transient phase between growth and nongrowth of heterotrophic bacteria, with emphasis on the marine environment. *Annual Reviews in Microbiology* 41:25-49
- Koßmehl S, Wöhlbrand L, Drüppel K, Feenders C, Blasius B, Rabus R (2013) Subcellular protein localization (cell envelope) in *Phaeobacter inhibens* DSM 17395. *Proteomics* 13:2743-2760 doi:10.1002/pmic.201300112

- Krom MD (1980) Spectrophotometric determination of ammonia: a study of a modified Berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. *Analyst* 105:305 doi:10.1039/an9800500305
- Labrenz M, Lawson PA, Tindall BJ, Collins MD, Hirsch P (2005) *Roseisalinus antarcticus* gen. nov., sp. nov., a novel aerobic bacteriochlorophyll a-producing alpha-proteobacterium isolated from hypersaline Ekho Lake, Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:41-47 doi:10.1099/ijs.0.63230-0
- Loqué D, von Wirén N (2004) Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. *Journal of Experimental Botany* 55:1293-1305 doi:10.1093/jxb/erh147
- Lottspeich F, Zorbach H (1998) *Bioanalytik*. Heidelberg: Spektrum.
- Luo H, Moran MA (2014) Evolutionary ecology of the marine *Roseobacter* clade. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 78:573-587 doi:10.1128/MMBR.00020-14
- Malfatti F, V. Turk, T. Tinta, P. Mozetic, M. Manganelli, T. J. Samo, J. A. Ugalde, N. Kovač, M. Stefanelli, M. Antonioli, S. Fonda-Umani, P. Del Negro, B. Cataletto, A. Hozic, N. Ivošević Denardis, V. Žutić, V. Svetličić, T. Mišić Radić, T. Radić, D. Fuks, and F. Azam (2014) Microbial mechanisms coupling carbon and phosphorus cycles in phosphorus-limited northern Adriatic Sea. *Science of the Total Environment* 470-471:1173-1183 doi:10.1016/j.scitotenv.2013.10.040
- Martens T et al. (2007) Bacteria of the *Roseobacter* clade show potential for secondary metabolite production. *Microbial Ecology* 54:31-42 doi:10.1007/s00248-006-9165-2
- Martens T, Heidorn T, Pukall R, Simon M, Tindall BJ, Brinkhoff T (2006) Reclassification of *Roseobacter gallaeciensis* Ruiz-Ponte et al. 1998 as *Phaeobacter gallaeciensis* gen. nov., comb. nov., description of *Phaeobacter inhibens* sp. nov., reclassification of *Ruegeria algicola* (Lafay et al. 1995) Uchino et al. 1999 as *Marinovum algicola* gen. nov., comb. nov., and emended descriptions of the genera *Roseobacter*, *Ruegeria* and *Leisingera*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56:1293-1304 doi:10.1099/ijs.0.63724-0
- Martínez-Checa F, E. Quesada, M. J. Martínez-Cánovas, I. Llamas, and V. Bajar (2005) *Palleronia marisminoris* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium belonging to the 'Alphaproteobacteria', isolated from a saline soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:2525-2530 doi:10.1099/ijs.0.63906-0
- McLean TI (2013) "Eco-omics": a review of the application of genomics, transcriptomics, and proteomics for the study of the ecology of harmful algae. *Microbial Ecology* 65:901-915 doi:10.1007/s00248-013-0220-5
- Moore JK, Villareal TA (1996) Size-ascent rate relationships in positively buoyant marine diatoms. *Limnology and Oceanography* 41:1514-1520
- Moran MA et al. (2007) Ecological genomics of marine *Roseobacters*. *Applied and Environmental Microbiology* 73:4559-4569 doi:10.1128/AEM.02580-06
- Murphy J, Riley JP (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 27:31-36
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9:255-262
- Neumann K, Stephan DP, Ziegler K, Huhns M, Broer I, Lockau W, Pistorius EK (2005) Production of cyanophycin, a suitable source for the biodegradable polymer polyaspartate, in transgenic plants. *Plant Biotechnology Journal* 3:249-258 doi:10.1111/j.1467-7652.2005.00122.x
- Nurse P (2008) Life, logic and information. *Nature* 454:424-426
- Nurse P, Hayles J (2011) The cell in an era of systems biology. *Cell* 144:850-854 doi:10.1016/j.cell.2011.02.045

- Paytan A, McLaughlin K (2007a) The oceanic phosphorus cycle. *Chemical reviews* 107:563-576
- Paytan A, McLaughlin K (2007b) Phosphorus in our Waters. *Oceanography* 20:200-206
- Pedersen MF, Borum J (1996) Nutrient control of algal growth in estuarine waters. Nutrient limitation and the importance of nitrogen requirements and nitrogen storage among phytoplankton and species of macroalgae. *Marine Ecology progress series*:261-272
- Petersen J, Brinkmann H, Bunk B, Michael V, Pauker O, Pradella S (2012) Think pink: photosynthesis, plasmids and the *Roseobacter* clade. *Environmental Microbiology* 14:2661-2672 doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02806.x
- Petersen J, Wagner-Döbler I (2017) Plasmid Transfer in the Ocean - A Case Study from the *Roseobacter* Group. *Frontiers in Microbiology* 8:1350 doi:10.3389/fmicb.2017.01350
- Petursdottir SK, Kristjánsson JK (1997) *Silicibacter lacuscaerulensis* gen. nov., sp. nov., a mesophilic moderately halophilic bacterium characteristic of the Blue Lagoon geothermal lake in Iceland. *Extremophiles* 1:94-99
- Prado S, Montes J, Romalde JL, Barja JL (2009) Inhibitory activity of *Phaeobacter* strains against aquaculture pathogenic bacteria. *International Microbiology* 12:107
- Pujalte MJ, Macian MC, Arahall DR, Ludwig W, Schleifer KH, Garay E (2005) *Nereida ignava* gen. nov., sp. nov., a novel aerobic marine alpha-proteobacterium that is closely related to uncultured *Prionitis* (alga) gall symbionts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:631-636 doi:10.1099/ijs.0.63442-0
- Pym RVE, Milham PJ (1976) Selectivity of reaction among chlorine, ammonia, and salicylate for determination of ammonia. *Analytical Chemistry* 48:1413-1415
- Raamsdonk LM et al. (2001) A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nature Biotechnology* 19:45
- Rabus R, Trautwein K, Wöhlbrand L (2014) Towards habitat-oriented systems biology of "*Aromatoleum aromaticum*" EbN1 *Applied Microbiology and Biotechnology* 98:3371-3388
- Rahman M, Hasan MR, Shimizu K (2008) Growth phase-dependent changes in the expression of global regulatory genes and associated metabolic pathways in *Escherichia coli*. *Biotechnology letters* 30:853-860
- Rao D, Webb JS, Kjelleberg S (2005) Competitive interactions in mixed-species biofilms containing the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Applied and Environmental Microbiology* 71:1729-1736 doi:10.1128/AEM.71.4.1729-1736.2005
- Rao D, Webb JS, Kjelleberg S (2006) Microbial colonization and competition on the marine alga *Ulva australis*. *Applied and Environmental Microbiology* 72:5547-5555 doi:10.1128/AEM.00449-06
- Redfield AC (1934) On the proportions of organic derivatives in a sea water and their relation to the composition of plankton. *James Johnstone Memorial Volume*:177-192
- Reitzer L (2003) Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. *Annual Review of Microbiology* 57:155-176 doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.090820
- Rocha EP (2008) The organization of the bacterial genome. *Annual Review of Genetics* 42:211-233 doi:10.1146/annurev.genet.42.110807.091653
- Rosenberg H, Gerdes RG, Chegwidan K (1977) Two systems for the uptake of phosphate in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 131:505-511
- Rosenberg H, Russell LM, Jacomb PA, Chegwidan K (1982) Phosphate exchange in the pit transport system in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 149:123-130
- Rosenblueth A, Wiener N, Bigelow J (1943) Behavior, Purpose and Teleology. *Philosophy of Science* 10 (1):18-24
- Ruiz-Ponte C, Cilia V, Lambertl C, Nicolasi JL (1998) *Roseobacter gallaeciensis* sp. nov., a new marine bacterium isolated from rearings and collectors of the scallop *Pecten maximus*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48:537-542

- Ruppersberg HS, Goebel MR, Kleinert SI, Wünsch D, Trautwein K, Rabus R (2017) Photometric determination of ammonium and phosphate in seawater medium using a microplate reader. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 27:73-80
- Russell LM, Rosenberg H (1980) The nature of the link between potassium transport and phosphate transport in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal* 188:715-723
- Saranya N, Devi P, Nithiyantham S, Jeyalaxmi R (2014) Cells disruption by ultrasonication. *BioNanoScience* 4:335-337 doi:10.1007/s12668-014-0149-2
- Satchell KJ (2007) MARTX, multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin toxins. *Infection and Immunity* 75:5079-5084 doi:10.1128/IAI.00525-07
- Saunders PT, Ho MW (1976) On the Increase in Complexity in Evolution. *Journal of Theoretical Biology* 63:375-384
- Schoolnik GK (2001) The accelerating convergence of genomics and microbiology. *Genome biology* 2:1-2
- Searle PL (1984) The Berthelot or indophenol reaction and its use in the analytical chemistry of nitrogen. A review *Analyst* 109:549-568
- Segev E, Tellez A, Vlamakis H, Kolter R (2015) Morphological Heterogeneity and Attachment of *Phaeobacter inhibens*. *PLoS One* 10:e0141300 doi:10.1371/journal.pone.0141300
- Sekiguchi H et al. (2002) Bacterial distribution and phylogenetic diversity in the Changjiang estuary before the construction of the Three Gorges Dam. *Microbial Ecology* 43:82-91
- Senior PJ, Beech GA, Ritchie GAF, Dawes EA (1972) The role of oxygen limitation in the formation of poly- β -hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. *Biochemical Journal* 128:1193-1201
- Seyedsayamdost MR, Carr G, Kolter R, Clardy J (2011a) Roseobactin: small molecule modulators of an algal-bacterial symbiosis. *Journal of the American Chemical Society* 133:18343-18349 doi:10.1021/ja207172s
- Seyedsayamdost MR, Case RJ, Kolter R, Clardy J (2011b) The Jekyll-and-Hyde chemistry of *Phaeobacter gallaeciensis*. *Nature Chemistry* 3:331-335 doi:10.1038/nchem.1002
- Sharan R, Ideker T (2006) Modeling cellular machinery through biological network comparison. *Nature Biotechnology* 24:427
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels: *Analytical Chemistry* 68:850-858
- Shiba T (1991) *Roseobacter litoralis* gen. nov., sp. nov., and *Roseobacter denitrificans* sp. nov., aerobic pink-pigmented bacteria which contain bacteriochlorophyll a. *Systematic and Applied Microbiology* 14:140-145
- Simon M (2017) Das Bakterioplankton – Riese und Regulator im marinen Stoffumsatz. In: Hempel G, Bischof K, Hagen W (eds) *Faszination Meeresforschung: Ein ökologisches Lesebuch*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 85-102. doi:10.1007/978-3-662-49714-2_8
- Simon SA, Gutknecht J (1980) Solubility of carbon dioxide in lipid bilayer membranes and organic solvents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 596:352-358
- Singh OV, Nagaraj NS (2006) Transcriptomics, proteomics and interactomics: unique approaches to track the insights of bioremediation Briefings in functional genomics and proteomics 4:355-362 doi:10.1093/bfpg/eli006
- Smith SV, Veeh HH (1989) Mass balance of biogeochemically active materials (C, N, P) in a hypersaline gulf Estuarine, Coastal and Shelf. *Science* 29:195-215
- Srivastava S, Sinha R, Roy D (2004) Toxicological effects of malachite green. *Aquatic toxicology* 66:319-329
- Stedtfeld RD et al. (2008) Development and experimental validation of a predictive threshold cycle equation for quantification of virulence and marker genes by high-

- throughput nanoliter-volume PCR on the OpenArray platform. *Applied and Environmental Microbiology* 74:3831-3838 doi:10.1128/AEM.02743-07
- Strijkstra A et al. (2016) High performance CCD camera system for digitalisation of 2D DIGE gels. *Proteomics* 16:1975-1979 doi:10.1002/pmic.201500385
- Sunderhaus S, Eubel H, Braun H-P (2007) Two-dimensional blue native/blue native polyacrylamide gel electrophoresis for the characterization of mitochondrial protein complexes and supercomplexes *Mitochondria*. *Practical Protocols*:315-324 doi:https://doi.org/10.1007/978-1-59745-365-3_23
- Swingley WD et al. (2007) The complete genome sequence of *Roseobacter denitrificans* reveals a mixotrophic rather than photosynthetic metabolism. *Journal of Bacteriology* 189:683-690 doi:10.1128/JB.01390-06
- Sylvan JB, Dortch Q, Nelson DM, Maier Brown AF, Morrison W, Ammerman JW (2006) Phosphorus limits phytoplankton growth on the Louisiana shelf during the period of hypoxia formation. *Environmental Science & Technology* 40:7548-7553
- Thole S et al. (2012) *Phaeobacter gallaeciensis* genomes from globally opposite locations reveal high similarity of adaptation to surface life. *The ISME Journal* 6:2229-2244 doi:10.1038/ismej.2012.62
- Toya Y et al. (2007) Direct measurement of isotopomer of intracellular metabolites using capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry for efficient metabolic flux analysis *Journal of chromatography A* 1159:134-141
- Trautwein K et al. (2017) Non-Redfield, nutrient synergy and flexible internal elemental stoichiometry in a marine bacterium. *FEMS Microbiology Ecology* 93 doi:10.1093/femsec/fix059
- Trautwein K et al. (2016) Native plasmids restrict growth of *Phaeobacter inhibens* DSM 17395: Energetic costs of plasmids assessed by quantitative physiological analyses. *Environmental Microbiology* 18:4817-4829 doi:10.1111/1462-2920.13381
- Tupas LM, Koike I, Karl DM, Holm-Hansen O (1994) Nitrogen metabolism by heterotrophic bacterial assemblages in Antarctic coastal waters. *Polar Biology* 14:195-204
- Van der Aar PC, Stouthamer AH, Van Verseveld HW (1989) Possible misconceptions about O₂ consumption and CO₂ production measurements in stirred microbial cultures. *Journal of Microbiological Methods* 9:281-286
- Van Mooy BA et al. (2009) Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity. *Nature* 458:69-72 doi:10.1038/nature07659
- Voget S et al. (2015) Adaptation of an abundant *Roseobacter* RCA organism to pelagic systems revealed by genomic and transcriptomic analyses. *The ISME Journal* 9:371-384 doi:10.1038/ismej.2014.134
- Waddington GH (1977) Stabilisation in systems: Chreods and epigenetic landscapes. *Futures* 9:139-146
- Wagner-Döbler I, Biebl H (2006) Environmental biology of the marine *Roseobacter* lineage. *Annual Review of Microbiology* 60:255-280 doi:10.1146/annurev.micro.60.080805.142115
- Walter A, Gutknecht J (1986) Permeability of small nonelectrolytes through lipid bilayer membranes. *Journal of Membrane Biology* 90:207-217
- Wang H et al. (2005) Development and evaluation of a micro-and nanoscale proteomic sample preparation method. *Journal of Proteome Research* 4:2397-2403
- Wang R, Gallant E, Seyedsayamdost MR (2016) Investigation of the Genetics and Biochemistry of Roseobacticide Production in the *Roseobacter* Clade Bacterium *Phaeobacter inhibens*. *MBio* 7:e02118 doi:10.1128/mBio.02118-15
- Ward JH (1963) Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association* 58:236-244
- Ward N, Fraser CM (2005) How genomics has affected the concept of microbiology. *Current Opinion in Microbiology* 8:564-571 doi:10.1016/j.mib.2005.08.011

- Westerhoff HV, Pálsson BO (2004) The evolution of molecular biology into systems biology. *Nature Biotechnology* 22:1249
- Westheimer F (1987) Why nature chose phosphates. *Science* 235:1173-1178 doi:10.1126/science.2434996
- Wiegmann K, Hensler M, Wöhlbrand L, Ulbrich M, Schomburg D, Rabus R (2014) Carbohydrate catabolism in *Phaeobacter inhibens* DSM 17395, a member of the marine *Roseobacter* clade. *Applied and Environmental Microbiology* 80:4725-4737
- Wilkins MR et al. (1996a) From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology* 14:1
- Wilkins MR, Sanchez J-C, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL (1996b) Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 13:19-50 doi:10.1080/02648725.1996.10647923
- Willisky GR, Bennett RL, Malamy MH (1973) Inorganic phosphate transport in *Escherichia coli*: involvement of two genes which play a role in alkaline phosphatase regulation. *Journal of Bacteriology* 113:529-539
- Willisky GR, Malamy MH (1976) Control of the synthesis of alkaline phosphatase and the phosphate-binding protein in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 127:595-609
- Wittig I, Braun HP, Schagger H (2006) Blue native PAGE *Nature Protocol* 1:418-428 doi:10.1038/nprot.2006.62
- Wöhlbrand L, Ruppertsberg HS, Feenders C, Blasius B, Braun HP, Rabus R (2016) Analysis of membrane-protein complexes of the marine sulfate reducer *Desulfobacula toluolica Tol2* by 1D blue native-PAGE complexome profiling and 2D blue native-/SDS-PAGE. *Proteomics* 16:973-988 doi:10.1002/pmic.201500360
- Wöhlbrand L, Trautwein K, Rabus R (2013) Proteomic tools for environmental microbiology--a roadmap from sample preparation to protein identification and quantification. *Proteomics* 13:2700-2730 doi:10.1002/pmic.201300175
- Wöhlbrand L et al. (2017) Complementary Metaproteomic Approaches to Assess the Bacterioplankton Response toward a Phytoplankton Spring Bloom in the Southern North Sea. *Frontiers in Microbiology* 8:442 doi:10.3389/fmicb.2017.00442
- Ye RW, Wang T, Bedzyk L, Croker KM (2001) Applications of DNA microarrays in microbial systems. *Journal of Microbiological Methods* 47:257-272
- Yuan J-H, Wang C, Yu M-J, Li J (2008) Tris [3, 3'-(p-phenylenedimethylene) diimidazol-1-ium] bis (phosphatododecamolybdate). *Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online* 64:m831-m831
- Zech H, Echtermeyer C, Wöhlbrand L, Blasius B, Rabus R (2011) Biological versus technical variability in 2-D DIGE experiments with environmental bacteria. *Proteomics* 11:3380-3389 doi:10.1002/pmic.201100071
- Zech H et al. (2013a) Dynamics of amino acid utilization in *Phaeobacter inhibens* DSM 17395. *Proteomics* 13:2869-2885 doi:10.1002/pmic.201200560
- Zech H et al. (2013b) Adaptation of *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 to growth with complex nutrients. *Proteomics* 13:2851-2868 doi:10.1002/pmic.201200513
- Zech H et al. (2009) Growth phase-dependent global protein and metabolite profiles of *Phaeobacter gallaeciensis* strain DSM 17395, a member of the marine *Roseobacter*-clade. *Proteomics* 9:3677-3697 doi:10.1002/pmic.200900120
- Zehr JP, Ward BB (2002) Nitrogen cycling in the ocean: new perspectives on processes and paradigms. *Applied and Environmental Microbiology* 68:1015-1024 doi:10.1128/aem.68.3.1015-1024.2002
- Zhang W, Li F, Nie L (2010) Integrating multiple 'omics' analysis for microbial biology: application and methodologies. *Microbiology* 156:287-301 doi:10.1099/mic.0.034793-0
- Zhou J, Deng Y, Luo F, He Z, Tu Q, Zhi X (2010) Functional molecular ecological networks. *MBio* 1 doi:10.1128/mBio.00169-10
- Ziesche L et al. (2015) Homoserine lactones, methyl oligohydroxybutyrates, and other extracellular metabolites of macroalgae-associated bacteria of the *Roseobacter*

6. Anhang

6.4. Material und Methoden

6.4.2. Zusammensetzung der Medien

Tab. S 1: Einwaagevorschrift für Salzwassermedium. A: Salzlösung. B: Carbonat-Puffer. C: Spurenelemente. D: Stammlösungen.

Lösung	Chemikalie	Einwaage [L ⁻¹]	Zugabe pro L Medium	
A Salze	Na ₂ SO ₄	4,00 g		
	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	3,00 g		
	KCl	0,50 g		
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,15 g		
	NaCl	20,00 g		
B Puffer	NaHCO ₃	0,19 g		
C Spurenelemente	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	2,10 g		
	Titriplex-III [Na ₂ EDTA]	5,20 g		
	H ₃ BO ₄	30,00 mg		
	MnCl ₂ · 6 H ₂ O	100,00 mg		
	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	190,00 mg	1,5 mL	
	NiCl ₂ · 6 H ₂ O	24,00 mg		
	CuCl ₂ · 2 H ₂ O	2,00 mg		
	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	144,00 mg		
	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	36,00 mg		
	HCl [25 %]	13,00 mL		
Stock-Lösungen	Chemikalie	Konz. [M]	Zugabe pro L Medium	
D C-Stamm	D-Mannitol	1,1	10,0 mL	
	N-Stamm	NH ₄ Cl	1,0	75,0 µL bzw. 12,0 mL
	P-Stamm	KH ₂ PO ₄	0,5	1,5 mL bzw. 88,2 µL

6.4.3. Densitometrische Auswertung der SDS-PAGEs

Tab. S 2: Parameter zur automatisierten Bandendetektion.

Parameter	Wert
Sensitivität	452,6
Breite	4,4
Minimale Dichte	0,1
Filter	2,7
Bandenschulter	1,3
Bandengröße	7,0

6.4.4. MATLAB Skript zur Prozessauswertung

Contents

- Auswertung von Prozessdaten MANNP
- load data (adjust filepath!)
- calculation reactorvolume and titrationvolumes
- meanvalues(offgasanalytic)
- interpolation (offgasanalytic)
- parameter offgasanalytic
- calculations offgasanalytic
- interpolation (growth analytics)
- max rates for plotting (matrix [V])
- normalization
- plot data
- Save data

Auswertung von Prozessdaten MANNP

```
clear all
close all
clc
```

***** PRESS F5 TO RUN THE ANALYSIS OF YOUR DATA Please check for
projectname and offsetvalues *****

```
path = uigetdir;      % folder selection for Data
userpath(path);      % setting path as "current folder"
```

load data (adjust filepath!)

```
O = importdata('Versuch_Offgas.txt','\t',1,0);      % data from offgas t [h], xOG [-],
xCG [-], xAr [-]
S = importdata('Versuch_Supplyair.txt','\t',1,0);   % data from offgas t [h], xOGin [-]
, xCGin [-], xAr [-]
P = importdata('Versuch_Prozessdaten.txt','\t',1,0); % data from IRIS t [h], FnG [l/h],
VS [ml], VBase [ml], VAcid [ml], VL [ml], pH [-], Temp [°C],
A = importdata('Versuch_Analytic.txt','\t',1,0);    % data from Analytic t [h], OD [AU
],cXL [g/l], cPL [g/l], A398 [AU]

% offgasdata

t1      = O.data(:,1);      % time in [h] (offgas)
xOG      = O.data(:,3);      % O2 mol-fraction xOGout in [-]
xCG      = O.data(:,5);      % CO2 mol fraction xCGout in [-]
xAr      = O.data(:,4);      % Ar mol-fraction xArout in [-]
xN      = O.data(:,2);      % N mol-fraction xNout in [-]

t2      = S.data(:,1);      % Zeit in [h] (Zuluft)
xOGin    = S.data(:,3);      % O2 mol-fraction xOGin in [-]
xCGin    = S.data(:,5);      % CO2 mol fraction xCGin in [-]
xArin    = S.data(:,4);      % Ar mol-fraction xArin in [-]
xNin     = S.data(:,2);      % N mol-fraction xNin in [-]
```

```

% offgasdata

t1m      = mean(reshape(t1,5,[]));
t1m      = t1m';
xOGm     = mean(reshape(xOG,5,[]));
xOGm     = xOGm';
xCGm     = mean(reshape(xCG,5,[]));
xCGm     = xCGm';
xArm     = mean(reshape(xAr,5,[]));
xArm     = xArm';
xNm      = mean(reshape(xN,5,[]));
xNm      = xNm';

% supplyair

t2m      = mean(reshape(t2,5,[]));
t2m      = t2m';
xOGinm   = mean(reshape(xOGin,5,[]));
xOGinm   = xOGinm';
xCGinm   = mean(reshape(xCGin,5,[]));
xCGinm   = xCGinm';
xArinm   = mean(reshape(xArin,5,[]));
xArinm   = xArinm';
xNinm    = mean(reshape(xNin,5,[]));
xNinm    = xNinm';

```

interpolation (offgasanalytic)

syntax interp1: $y_i = \text{interp1}(x, Y, x_i)$

```

% offgas

xOGi     = interp1(t1m, xOGm, t3);
xCGi     = interp1(t1m, xCGm, t3);
xAri     = interp1(t1m, xArm, t3);
xNi      = interp1(t1m, xNm, t3);

% supplyair

xOGini   = interp1(t2m, xOGinm, t3);
xCGini   = interp1(t2m, xCGinm, t3);
xArini   = interp1(t2m, xArinm, t3);
xNini    = interp1(t2m, xNinm, t3);

% analytics

%ODi     = interp1(t4, OD, t3);
%cSLi    = interp1(t4, cSL, t3);

%%Moving Average
%AV=tsmovavg(x,'s',windowsize,1)
%'s'=einfacher gleitender mittelwert
%1 weil eine Spalte 2 wäre Zeile
windowsize=10;           %5 Werte rechts und links betrachtend
xOGinav=tsmovavg(xOGini,'s',windowsize,1);
xOGav=tsmovavg(xOGi,'s',windowsize,1);

```

parameter offgasanalytic

```
MO2 = 31.9988;           % MO2 in [g/mol]
MCO2 = 44.0095;         % MCO2 in [g/mol]
VnM = 24.41;           % VnM in [l/mol]
% xOGoff = 0.00086835;   % Offset xOG in [-]
% xCGoff = 0.0000490;   % Offset xCG in [-]
```

calculations offgasanalytic

```
% xOGini = xOGini+xOGoff;           % x
OG mit Offset
% xCGini = xCGini+xCGoff;           % x
OG mit Offset

QO2max = (FnG*1000)./(VnM*VL);       % QO2
max in [mmol/(lh)]
QCO2max = (FnG*1000)./(VnM*VL);     % QCO
2max in [mmol/(lh)]

QO2 = QO2max.*(((xOGini.*(1-xCGi))-xOGi.*(1-xCGini))./(1-xOGi-xCGi)); % QO2
in [mmol/(lh)]
QCO2 = QCO2max.*((-xCGini.*(1-xOGi))+xCGi.*(1-xOGini))./(1-xOGi-xCGi); % QCO
2 in [mmol/(lh)]
%Offestkorrektur wegen Carbonat für O2 Rate
QO2off = QO2-min(QO2);
QO2 = QO2off;

RQ = (QCO2)./(QO2);                 % RQ
in [-]

QO2R = QO2max.*(xOGini-xOGi.*(xArini./xAri)); % QO2
in [mmol/(lh)] nach Berechnung Reiner mit Ar
QCO2R = QCO2max.*(xCGi.*(xArini./xAri))-xCGini; % QCO
2 in [mmol/(lh)] nach Berechnung Reiner mit Ar
%Offestkorrektur wegen Carbonat für CO2 Rate
QO2Roff = QO2R-min(QO2R);
QO2R = QO2Roff;

% getting rid of NaN
% X1(any(isnan(X1),2),:) = [];

% integration for cO2, cCO2, mO2 and mCO2

for i=4:a(1,1)
cO2(4,1) = 0;
cO2(i,1) = cO2(i-1)+QO2(i)*(t3(i)-t3(i-1)); % cO2 in [mmol/l]
end

mO2 = (cO2.*VL); % mO2 in [mmol]

for i=4:a(1,1)
cCO2(4,1) = 0;
cCO2(i,1) = cCO2(i-1)+QCO2(i)*(t3(i)-t3(i-1)); % cCO2 in [g]
end

mCO2 = (cCO2.*VL); % mCO2 in [mmol]
```

```

RQ2    = (mCO2)./(mO2);                                % RQ in [-]

% iN = 15;                                             % Länge des Filters
% QO2a = filter(ones(1,iN)/iN, 1, QO2);
% QCO2a = filter(ones(1,iN)/iN, 1, QCO2);

```

interpolation (growth analytics)

syntax `interp1:yi = interp1(x,Y,xi)`

```

b = size(OD);                                         % size of analytic data array (OD as example)

QO2i    = interp1(t3, QO2, t4);                       % QO2 in [mmol/(lh)] (for reaction rates interpolation on t4)
QCO2i   = interp1(t3, QCO2, t4);                     % QCO2 in [mmol/(lh)] (for reaction rates interpolation on t4)
mO2i    = interp1(t3, mO2, t4);                       % mO2 in [mmol] (for reaction rates interpolation on t4)
mCO2i   = interp1(t3, mCO2, t4);                     % mCO2 in [mmol] (for reaction rates interpolation on t4)
VALi    = interp1(t3, VAL, t4);                       % VAL in [ml] (for reaction rates interpolation on t4)
VLI     = interp1(t3, VL, t4);                       % VL in [l] (for reaction rates interpolation on t4)

```

Save data

```

header = {'t3 [h]' 'QO2 [mM/h]' 'QCO2 [mM/h]' 'mO2 [mmol]' 'mCO2 [mmol]'...
          'RQ [-]' 'cO2 [mM]' 'cCO2 [mM]' 'OGinav' 'OGav'};
% file header for results

K(:,1) = t3;
K(:,2) = QO2;
K(:,3) = QCO2;
K(:,4) = mO2;
K(:,5) = mCO2;
K(:,6) = RQ;
K(:,7) = cO2;
K(:,8) = cCO2;
K(:,9) = xOGinav;
K(:,10) = xOGav;

fname = 'matlab_offgasrates.txt';                    % create data file
fmt = repmat('%s\t ', 1, length(header));           % reading in header
fmt(end:end+1) = '\n';
fid = fopen(fname, 'w');
fprintf(fid, fmt, header{:});
fclose(fid);
dlmwrite(fname,K, '-append', 'roffset',1, 'delimiter', '\t'); % adding data to file

```


6.6. Wachstumskurven der Massenanzuchten

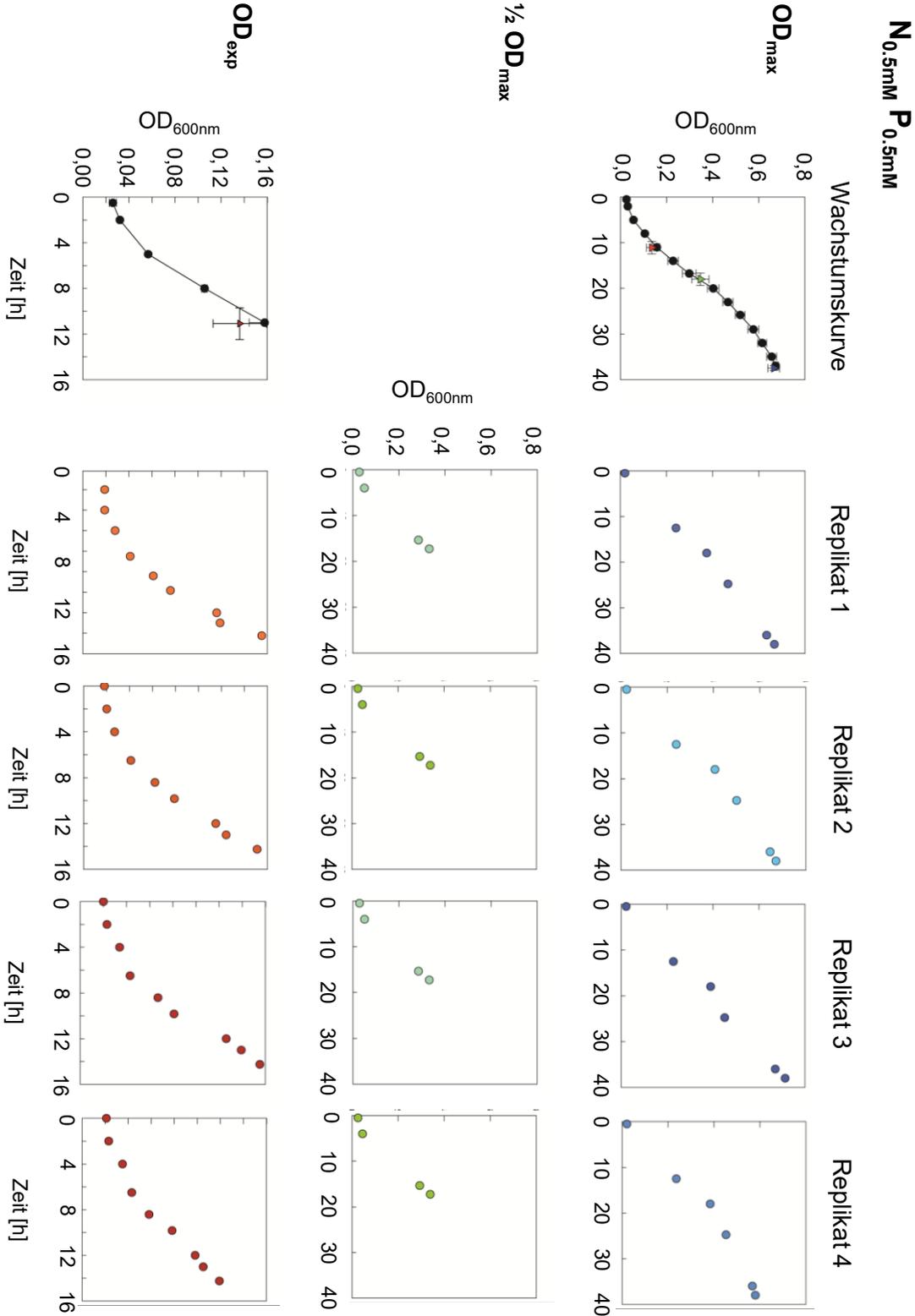


Abbildung S 1: Wachstumskurven der biologischen Replikate für das 1. N:P-Verhältnis.

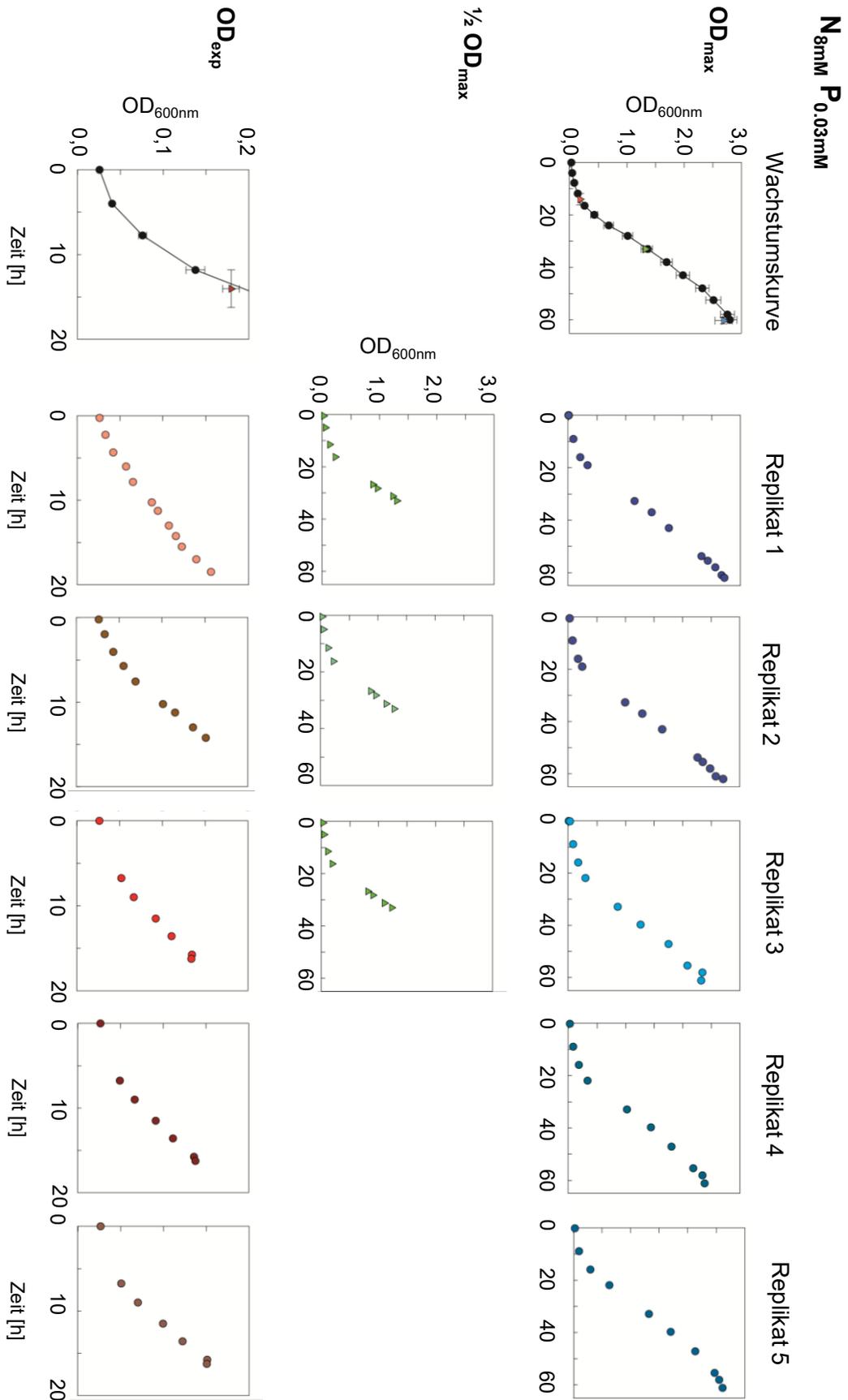


Abbildung S 2: Wachstumskurven der biologischen Replikate für das 2. N:P-Verhältnis.

Tab. S 4: Übersicht der Ernteparameter der Massenanzuchten

N _{0,5 mM} P _{0,5 mM} N:P=1												
Versuchsbezeichnung: b												
Ernte OD _{max}												
Reaktor Nr.	OD _{Start}	OD _{Ende}	Mannitol _{Start} [mM]	Mannitol _{Ende} [mM]	NH ₄ ⁺ _{Start} [mM]	NH ₄ ⁺ _{Ende} [mM]	PO ₄ ³⁻ _{Start} [mM]	PO ₄ ³⁻ _{Ende} [mM]	μ _{exp} [h ⁻¹]	μ _{in} [h ⁻¹]	BTM [g L ⁻¹]	Kultivierungs-dauer [h]
F1	0.02	0.67	11.25	7.78	0.44	u.NG	0.45	0.45	0.145	0.01	0.22	38
F2	0.02	0.67	11.23	7.94	0.45	u.NG	0.45	0.47	±0.055	3±0.001	0.31	38
F3	0.02	0.71	11.46	7.94	0.49	u.NG	0.46	0.46			0.28	38
F4	0.02	0.58	11.33	8.72	0.47	u.NG	0.42	0.44			0.33	38
Versuchsbezeichnung: c												
Ernte OD _{μ2max}												
Reaktor Nr.	OD _{Start}	OD _{Ende}	Mannitol _{Start} [mM]	Mannitol _{Ende} [mM]	NH ₄ ⁺ _{Start} [mM]	NH ₄ ⁺ _{Ende} [mM]	PO ₄ ³⁻ _{Start} [mM]	PO ₄ ³⁻ _{Ende} [mM]	μ _{exp} [h ⁻¹]	μ _{in} [h ⁻¹]	BTM [g L ⁻¹]	Kultivierungs-dauer [h]
F1	0.03	0.34	10.91	9.69	0.46	u.NG	0.49	0.44	0.169	x	n.b.	17.25
F2	0.03	0.33	11.10	9.69	0.41	u.NG	0.49	0.42	±0.004		n.b.	17.25
F3	0.02	0.35	11.01	9.87	0.45	u.NG	0.45	0.43			n.b.	17.25
F4	0.02	0.34	11.13	10.03	0.46	u.NG	0.49	0.45			n.b.	17.25
Versuchsbezeichnung: d												
Ernte OD _{exp}												
Reaktor Nr.	OD _{Start}	OD _{Ende}	Mannitol _{Start} [mM]	Mannitol _{Ende} [mM]	NH ₄ ⁺ _{Start} [mM]	NH ₄ ⁺ _{Ende} [mM]	PO ₄ ³⁻ _{Start} [mM]	PO ₄ ³⁻ _{Ende} [mM]	μ _{exp} [h ⁻¹]	μ _{in} [h ⁻¹]	BTM [g L ⁻¹]	Kultivierungs-dauer [h]
F1	0.02	0.155	10.80	9.97	0.49	(0.002) u.BG	0.47	0.47	0.142 ±0.045	x	0.08	15
F2	0.02	0.151	10.80	9.79	0.46	(0.006) u.BG	0.46	0.46			0.05	15
F3	0.02	0.155	10.87	9.92	0.49	(0.007) u.BG	0.43	0.44			0.05	15
N _{0,5 mM} P _{0,5 mM} N:P=267												
Versuchsbezeichnung: bb bzw. bd												
Ernte OD _{max}												
Reaktor Nr.	OD _{Start}	OD _{Ende}	Mannitol _{Start} [mM]	Mannitol _{Ende} [mM]	NH ₄ ⁺ _{Start} [mM]	NH ₄ ⁺ _{Ende} [mM]	PO ₄ ³⁻ _{Start} [mM]	PO ₄ ³⁻ _{Ende} [mM]	μ _{exp} [h ⁻¹]	μ _{in} [h ⁻¹]	BTM [g L ⁻¹]	Kultivierungs-dauer [h]
F1	0.02	2.72	11.17	1.53	6.45	5.86	(0.02) u.BG	n.b.	0.116 ±0.060	0.057 ±0.007	0.67	62
F3	0.02	2.71	11.01	1.47	7.16	5.54	(0.02) u.BG	n.b.			0.88	62
F1	0.02	2.32	11.38	2.88	7.95	6.47	(0.02) u.BG	n.b.			0.55	61.2
F2	0.02	2.38	10.22	2.88	9.20	5.73	(0.02) u.BG	n.b.			0.59	61.2
F4	0.02	2.61	11.04	1.25	8.49	5.39	(0.02) u.BG	n.b.			0.61	61.2
Versuchsbezeichnung: c												
Ernte OD _{μ2max}												
Reaktor Nr.	OD _{Start}	OD _{Ende}	Mannitol _{Start} [mM]	Mannitol _{Ende} [mM]	NH ₄ ⁺ _{Start} [mM]	NH ₄ ⁺ _{Ende} [mM]	PO ₄ ³⁻ _{Start} [mM]	PO ₄ ³⁻ _{Ende} [mM]	μ _{exp} [h ⁻¹]	μ _{in} [h ⁻¹]	BTM [g L ⁻¹]	Kultivierungs-dauer [h]
F1	0.02	1.30	11.28	6.74	6.92	6.05	(0.03) u.BG	n.b.	0.126 ±0.030	0.065 ±0.005	0.46	33
F3	0.02	1.28	11.07	6.47	7.00	6.51	(0.03) u.BG	n.b.			0.42	33
F4	0.02	1.23	11.18	6.44	7.34	6.31	(0.02) u.BG	n.b.			0.38	33
Versuchsbezeichnung: dd												
Ernte OD _{exp}												
Reaktor Nr.	OD _{Start}	OD _{Ende}	Mannitol _{Start} [mM]	Mannitol _{Ende} [mM]	NH ₄ ⁺ _{Start} [mM]	NH ₄ ⁺ _{Ende} [mM]	PO ₄ ³⁻ _{Start} [mM]	PO ₄ ³⁻ _{Ende} [mM]	μ _{exp} [h ⁻¹]	μ _{in} [h ⁻¹]	BTM [g L ⁻¹]	Kultivierungs-dauer [h]
F1	0.03	0.152	12.00	11.25	7.68	7.23	(0.035) u.BG	n.b.	0.095 ±0.031	x	0.02	16.25
F2	0.03	0.134	12.45	11.10	7.27	6.52	(0.02) u.BG	n.b.			0.02	16.25
F3	0.03	0.138	12.20	11.57	7.45	6.68	(0.03) u.BG	n.b.			0.02	16.25
F4	0.03	0.151	12.72	11.76	7.51	7.20	(0.03) u.BG	n.b.			0.02	16.25

6.7. Proteomik

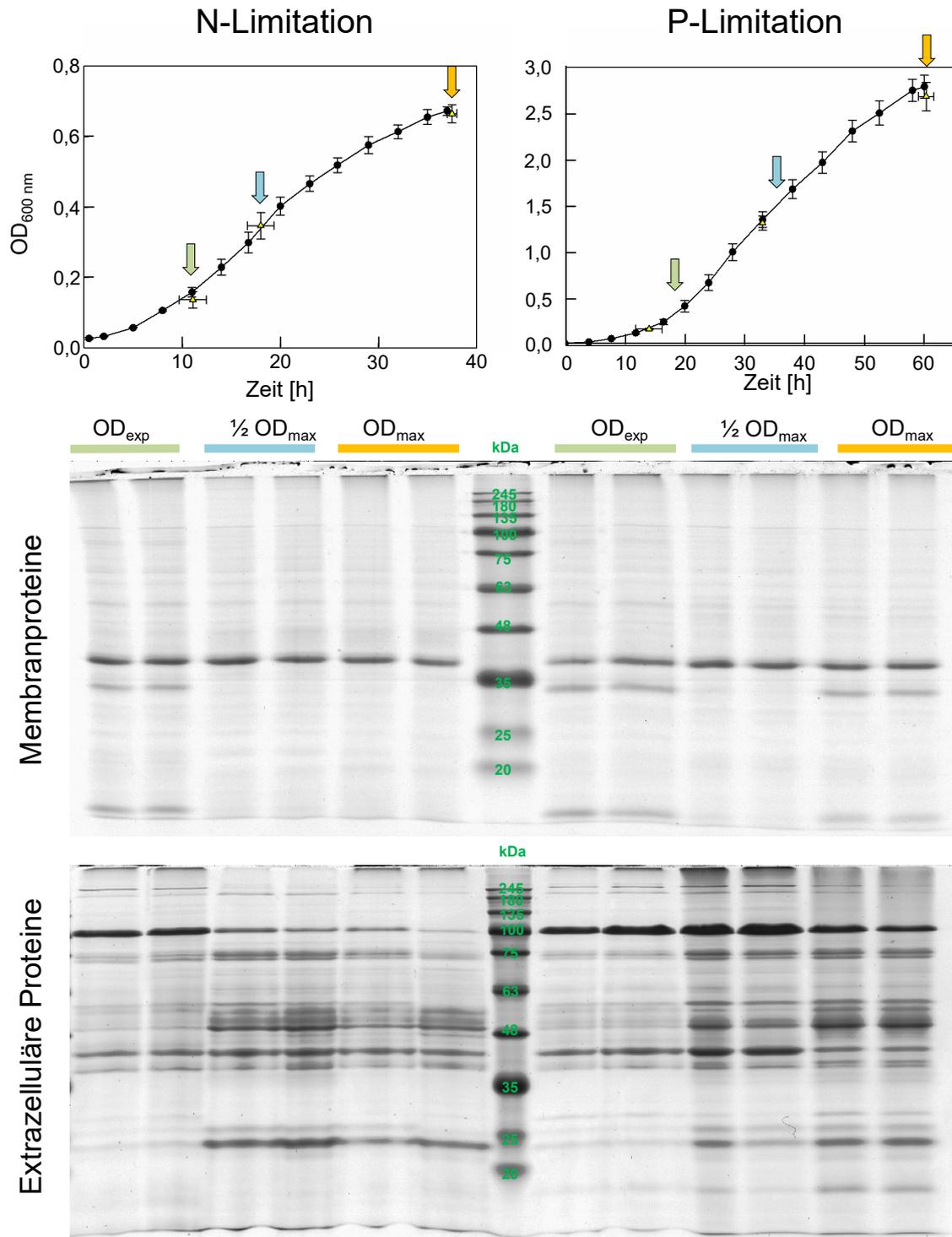


Abbildung S 3: SDS-PAGEs für die Auftrennung der Membran - und extrazelluläre Proteine im Vergleich der biologischen Replikate der N-Limitation und P-Limitation.

Tab. S 5: SDS-PAGE Membranproteine 1: Vergleich der Replikate Teil 1

Lane Nr.	Probe	Banden Nr.	Banden Typ	Molekulargewicht [kDa]	Lane Nr.	Probe	Banden Nr.	Banden Typ	Molekulargewicht [kDa]	Lane Nr.	Probe	Banden Nr.	Banden Typ	Molekulargewicht [kDa]						
1	N _{0,5min} P _{0,5min} OD _{1/2max} Replikata	1		176,129	2	N _{0,5min} P _{0,5min} OD _{1/2max} Replikat b	1		176,129	3	N _{0,5min} P _{0,5min} OD _{1/2max} Replikata	1		176,129						
		2		132,277			2		151,018			2		151,018						
		3		122,673			3		132,277			3		132,277						
		4		96,941			4		122,673			4		122,673						
		5		88,428			5		96,941			5		96,941						
		6		82,748			6		88,428			6		88,428						
		7		77,227			7		82,748			7		82,748						
		8		69,841			8		77,227			8		77,227						
		9		66,04			9		69,841			9		69,841						
		10		65,236			10		66,04			10		66,04						
		11		57,564			11		65,236			11		65,236						
		12		54,295			12		57,564			12		57,564						
		13		50,717			13		54,295			13		54,295						
		14		47,095			14		50,717			14		50,717						
		15		39,37			15		47,095			15		47,095						
		16		33,406			16		39,37			16		39,37						
		17		29,356			17		33,406			17		33,406						
		18		27,352			18		29,356			18		29,356						
		19		24,593			19		27,352			19		27,352						
		20		21,565			20		24,593			20		24,593						
		21		20,593			21		21,565			21		21,565						
		22		15,15			22		20,593			22		19,584						
		4	N _{0,5min} P _{0,5min} OD _{1/2max} Replikat b	1				151,018	5			N _{0,5min} P _{0,5min} OD _{1/2max} Replikat a	1		309,139	6	N _{0,5min} P _{0,5min} OD _{1/2max} Replikat b	1		114,012
				2				132,277					2		151,018			2		96,941
				3				114,012					3		132,277			3		108,428
				4				82,748					4		114,012			4		82,748
				5				69,841					5		88,428			5		66,04
				6				66,04					6		82,748			6		64,422
				7				65,236					7		77,227			7		60,188
				8				64,422					8		66,04			8		57,564
				9				57,564					9		65,236			9		54,295
				10				54,295					10		64,422			10		52,612
				11				50,717					11		60,188			11		50,717
				12				39,37					12		57,564			12		39,37
				13				33,406					13		54,295			13		35,889
14				29,356	14		52,612	14			33,406									
15				24,593	15		50,717	15			29,356									
16				21,565	16		39,37	16			24,593									
17				20,593	17		35,889	17			20,593									
18				15,15	18		33,406	18			19,584									
					19		31,565	19			15,15									
					20		29,356	20												
					21		24,593	21												
					22		21,565	22												
					31		20,593	31												
					32		19,584	32												
					33		15,15	33												
					34			34												
					35			35												

Tab. S 6: SDS-PAGE Membranproteine 1: Vergleich der Replikate Teil 2

Lane Nr.	Probe	Banden Nr.	Banden Typ	Molekulargewicht [kDa]	Lane Nr.	Probe	Banden Nr.	Banden Typ	Molekulargewicht [kDa]	Lane Nr.	Probe	Banden Nr.	Banden Typ	Molekulargewicht [kDa]						
8	N _{8min} P _{0,03mM} OD _{1/2max} Replikata	1		350,331	9	N _{9min} P _{0,03mM} OD _{1/2max} Replikat b	1		350,331	10	N _{10min} P _{0,03mM} OD _{1/2max} Replikata	1		309,139						
		2		309,139			2		309,139			2		132,277						
		3		176,129			3		176,129			3		114,012						
		4		114,012			4		151,018			4		104,225						
		5		104,225			5		114,012			5		96,941						
		6		96,941			6		104,225			6		88,428						
		7		88,428			7		96,941			7		82,748						
		8		82,748			8		88,428			8		69,841						
		9		66,04			9		82,748			9		66,04						
		10		65,236			10		69,841			10		65,236						
		11		64,422			11		66,04			11		64,422						
		12		57,564			12		65,236			12		57,564						
		13		54,295			13		64,422			13		54,295						
		14		50,717			14		57,564			14		50,717						
		15		47,095			15		54,295			15		47,095						
		16		43,011			16		50,717			16		39,37						
		17		39,37			17		47,095			17		33,406						
		18		33,406			18		43,011			18		29,356						
		19		29,356			19		39,37			19		27,352						
		20		27,352			20		33,406			20		24,593						
		21		24,593			21		29,356			21		21,565						
		22		21,565			22		27,352			22		19,584						
		23		20,593			23		24,593			23								
		24		18,32			24		21,565			24								
		25		16,832			25		19,584			25								
		26		15,15			26		15,15			26								
		11	N _{11min} P _{0,03mM} OD _{1/2max} Replikat b	1				176,129	12			N _{12min} P _{0,03mM} OD _{1/2max} Replikata	1		114,012	13	N _{13min} P _{0,03mM} OD _{1/2max} Replikat b	1		114,012
				2				114,012					2		96,941			2		96,941
				3				104,225					3		88,428			3		88,428
				4				96,941					4		69,841			4		69,841
				5				88,428					5		66,04			5		64,422
				6				82,748					6		64,422			6		64,422
				7				69,841					7		57,564			7		57,564
				8				66,04					8		54,295			8		54,295
				9				64,422					9		50,717			9		50,717
10				57,564	10		47,095	10			47,095									
11				54,295	11		39,37	11			39,37									
12				50,717	12		33,406	12			33,406									
13				47,095	13		29,356	13			29,356									
14				39,37	14		27,352	14			27,352									
15				39,37	15		24,593	15			24,593									
16				29,356	16		21,565	16			21,565									
17				27,352	17		19,584	17			19,584									
18				24,593	18			18												
19				21,565	19			19												
20				20,593	20			20												
21				176,129	21			21												

Tab. S 7: SDS-PAGE extrazelluläre Proteine 1: Vergleich der Replikate Teil 1

Lane Nr.	Probe	Banden Nr.	Banden Typ	Molekulargewicht [kDa]	Lane Nr.	Probe	Banden Nr.	Banden Typ	Molekulargewicht [kDa]	Lane Nr.	Probe	Banden Nr.	Banden Typ	Molekulargewicht [kDa]						
2	N _{0,5mM} P _{0,5mM} OD _{1/2max} Replikat a	1	1	314,105	3	N _{0,5mM} P _{0,5mM} OD _{1/2max} Replikat b	1	1	314,105	4	N _{0,5mM} P _{0,5mM} OD _{1/2max} Replikat a	1	1	314,105						
		2	2	278,197			2	2	278,197			2	2	278,197						
		3	3	221,19			3	3	221,19			3	3	221,19						
		4	4	164,769			4	4	164,769			4	4	164,769						
		5	5	140,634			5	5	140,634			5	5	140,634						
		6	6	102,769			6	6	102,769			6	6	102,769						
		7	7	92,621			7	7	92,621			7	7	92,621						
		8	8	85,023			8	8	85,023			8	8	85,023						
		9	9	74,354			9	9	74,354			9	9	74,354						
		10	10	73,081			10	10	73,081			10	10	73,081						
		11	11	69,513			11	11	69,513			11	11	69,513						
		12	12	67,386			12	12	67,386			12	12	67,386						
		13	13	63,436			13	13	63,436			13	13	63,436						
		14	14	58,316			14	14	58,316			14	14	58,316						
		15	15	56,317			15	15	56,317			15	15	56,317						
		16	16	50,596			16	16	50,596			16	16	50,596						
		17	17	43,406			17	17	43,406			17	17	43,406						
		18	18	39,42			18	18	39,42			18	18	39,42						
		19	19	28,707			19	19	28,707			19	19	28,707						
		20	20	26,314			20	20	26,314			20	20	26,314						
		21	21	23,851			21	21	23,851			21	21	23,851						
		5	N _{0,5mM} P _{0,5mM} OD _{1/2max} Replikat b	1			1	314,105	6			N _{0,5mM} P _{0,5mM} OD _{1/2max} Replikat a	1	1	278,197	7	N _{0,5mM} P _{0,5mM} OD _{1/2max} Replikat b	1	1	314,105
				2			2	278,197					2	2	278,197			2	2	278,197
				3			3	221,19					3	3	221,19			3	3	221,19
				4			4	164,769					4	4	164,769			4	4	164,769
				5			5	140,634					5	5	140,634			5	5	102,769
				6			6	102,769					6	6	102,769			6	6	92,621
				7			7	92,621					7	7	92,621			7	7	85,023
				8			8	85,023					8	8	85,023			8	8	74,354
				9			9	74,354					9	9	74,354			9	9	73,081
				10			10	73,081					10	10	73,081			10	10	69,513
11	11			69,513	11	11	69,513	11		11	67,386									
12	12			67,386	12	12	67,386	12		12	64,055									
13	13			65,812	13	13	63,436	13		13	63,436									
14	14			64,495	14	14	64,495	14		14	58,316									
15	15			64,055	15	15	56,317	15		15	56,317									
16	16			63,436	16	16	53,151	16		16	53,151									
17	17			58,316	17	17	50,596	17		17	50,596									
18	18			56,317	18	18	48,356	18		18	48,356									
19	19			53,151	19	19	46,443	19		19	46,443									
20	20			50,596	20	20	43,406	20		20	43,406									
21	21			48,356	21	21	39,42	21		21	39,42									
22	22			46,443	22	22	26,314	22		22	26,314									
23	23			43,406	23	23	23,851	23		23	23,851									
24	24			39,42	24	24		24		24										
25	25			26,314	25	25		25		25										
26	26			23,851	26	26		26		26										

Tab. S 8: SDS-PAGE extrazelluläre Proteine 1: Vergleich der Replikate Teil 2

Lane Nr.	Probe	Banden Nr.	Banden Typ	Molekulargewicht [kDa]	Lane Nr.	Probe	Banden Nr.	Banden Typ	Molekulargewicht [kDa]	Lane Nr.	Probe	Banden Nr.	Banden Typ	Molekulargewicht [kDa]						
9	N _{term} P _{0,0,0,0} M OD _{1/2max} Replikata	1		314,105	10	N _{term} P _{0,0,0,0} M OD _{1/2max} Replikata b	1		314,105	11	N _{term} P _{0,0,0,0} M OD _{1/2max} Replikata	1		314,105						
		2		278,197			2		278,197			2		278,197						
		3		221,19			3		221,19			3		221,19						
		4		140,634			4		140,634			4		140,634						
		5		102,769			5		102,769			5		102,769						
		6		74,354			6		74,354			6		74,354						
		7		73,081			7		73,081			7		73,081						
		8		69,513			8		69,513			8		69,513						
		9		67,386			9		67,386			9		67,386						
		10		64,055			10		64,055			10		64,055						
		11		58,316			11		58,316			11		58,316						
		12		56,317			12		56,317			12		56,317						
		13		53,151			13		53,151			13		53,151						
		14		50,596			14		50,596			14		50,596						
		15		48,356			15		48,356			15		48,356						
		16		46,443			16		46,443			16		46,443						
		17		43,406			17		43,406			17		43,406						
		18		39,42			18		39,42			18		39,42						
		19		28,707			19		28,707			19		28,707						
		20		26,314			20		26,314			20		26,314						
		21		23,851			21		23,851			21		23,851						
		22		17,626			22		17,626			22		17,626						
		12	N _{term} P _{0,0,0,0} M OD _{1/2max} Replikata b	1				314,105	13			N _{term} P _{0,0,0,0} M OD _{1/2max} Replikata	1		314,105	14	N _{term} P _{0,0,0,0} M OD _{1/2max} Replikata b	1		314,105
				2				278,197					2		278,197			2		278,197
				3				221,19					3		221,19			3		221,19
				4				184,769					4		140,634			4		140,634
				5				140,634					5		102,769			5		102,769
				6				102,769					6		88,461			6		88,461
				7				92,621					7		85,023			7		85,023
				8				85,023					8		74,354			8		74,354
				9				74,354					9		73,081			9		73,081
				10				73,081					10		69,513			10		69,513
				11				69,513					11		67,386			11		67,386
12				67,386	12		64,055	12			64,055									
13				64,055	13		58,316	13			58,316									
14				63,436	14		56,317	14			56,317									
15				58,316	15		53,151	15			53,151									
16				56,317	16		50,596	16			50,596									
17				53,151	17		48,443	17			48,443									
18				50,596	18		43,406	18			43,406									
19				43,406	19		40,302	19			40,302									
20				40,302	20		39,42	20			39,42									
21				39,42	21		37,759	21			37,759									
22				37,759	22		36,138	22			36,138									
23				36,138	23		28,707	23			28,707									
24				28,707	24		26,314	24			26,314									
25				26,314	25		23,851	25			23,851									
26				23,851	26		22,004	26			22,004									
27				22,004	27		17,626	27			17,626									
28				17,626	28			28												

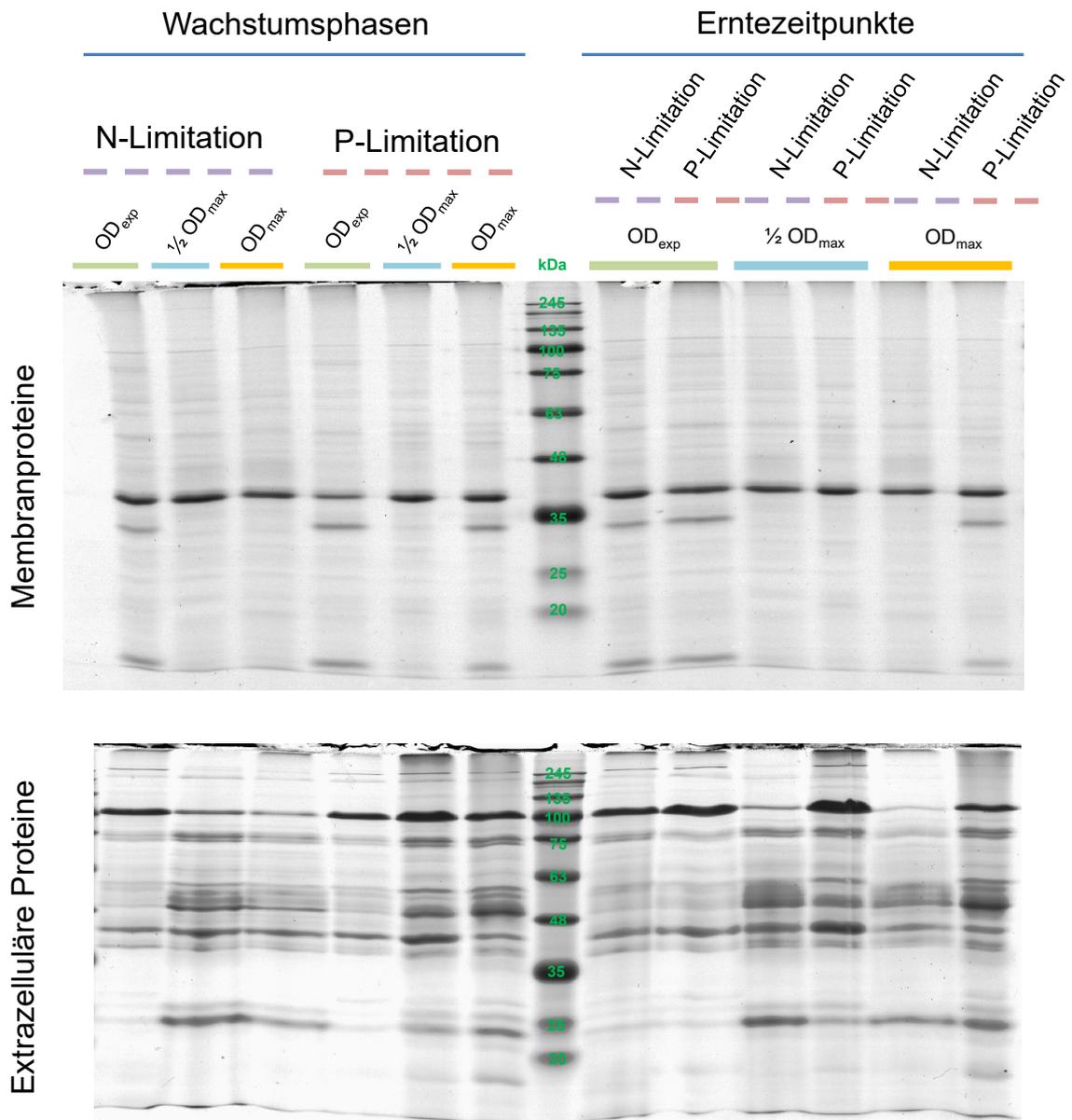


Abbildung S 4: SDS-PAGEs für die Auftrennung der Membran und extrazelluläre Proteine im Vergleich über die Wachstumsphasen und der Erntezeitpunkte der beiden N:P-Verhältnisse.

Tab. S 9: SDS-PAGE Membranproteine 2 Teil 1: Vergleich über Zeit

Lane Nr.	Probe	Banden Nr.	Banden Typ	Molekulargewicht [kDa]	Lane Nr.	Probe	Banden Nr.	Banden Typ	Molekulargewicht [kDa]	Lane Nr.	Probe	Banden Nr.	Banden Typ	Molekulargewicht [kDa]
1	N _{mem} P _{0,5min} OD _{10max} Replikat a	1		311,516	2	N _{mem} P _{0,5min} OD _{10max} Replikat a	1		311,516	3	N _{mem} P _{0,5min} O _{max} Replikat a	1		311,516
		2		176,827			2		176,827			2		176,827
		3		153,789			3		153,789			3		153,789
		4		113,448			4		113,448			4		113,448
		5		104,041			5		104,041			5		104,041
		6		97,291			6		97,291			6		97,291
		7		90,16			7		90,16			7		90,16
		8		82,2			8		82,2			8		82,2
		9		73,418			9		73,418			9		73,418
		10		69,058			10		69,058			10		69,058
		11		65,08			11		65,08			11		65,08
		12		57,637			12		57,637			12		57,637
		13		53,592			13		53,592			13		53,592
		14		50,372			14		50,372			14		50,372
		15		46,03			15		46,03			15		46,03
		16		31,843			16		31,843			16		31,843
		17		26,666			17		26,666			17		26,666
		18		24,927			18		24,927			18		24,927
		19		24,258			19		24,258			19		24,258
		20		22,168			20		22,168			20		22,168
		21		21,246			21		21,246			21		21,246
		22		19,698			22		19,698			22		19,698
		23		17,935			23		17,935			23		17,935
		24		17,382			24		17,382			24		17,382
		25		16,869			25		16,869			25		16,869
		26		16,213			26		16,213			26		16,213
		27		14,905			27		14,905			27		14,905
		28		13,76			28		13,76			27		13,76
4	N _{mem} P _{0,5min} OD _{10max} Replikat a	1		311,516	5	N _{mem} P _{0,5min} OD _{10max} Replikat a	1		311,516	6	N _{mem} P _{0,5min} OD _{10max} Replikat a	1		311,516
		2		217,423			2		113,448			2		113,448
		3		137,085			3		97,291			3		104,041
		4		113,448			4		90,16			4		97,291
		5		104,041			5		82,2			5		90,16
		6		97,291			6		73,418			6		82,2
		7		90,16			7		69,058			7		73,418
		8		82,2			8		65,08			8		69,058
		9		73,418			9		60,769			9		65,08
		10		69,058			10		57,637			10		60,769
		11		65,08			11		53,592			11		57,637
		12		57,637			12		50,372			12		53,592
		13		53,592			13		46,03			13		50,372
		14		50,372			14		31,843			14		46,03
		15		46,03			15		24,927			15		31,843
		16		31,843			16		22,168			16		24,927
		17		26,666			17		21,246			17		22,168
		18		24,927			18		19,698			18		21,246
		19		24,258			19		17,935			19		19,698
		20		23,487			20		17,382			20		17,935
		21		22,168			21		16,869			21		16,213
		22		21,246			22		16,213			22		17,935
		23		20,747			23		14,905			23		16,213
		24		19,698			24		13,76			24		14,905
		25		17,935			25					25		13,76
		26		16,213			26					26		
		27		14,905			27					27		
		28		13,76			28					28		
		29					29					29		
		30					30					30		
		31					31					31		
		32					32					32		
		33					33					33		
		34					34					34		
		35					35					35		
		36					36					36		

Tab. S 10: SDS-PAGE Membranproteine 2 Teil 2 Vergleich der N:P-Verhältnisse

Lane Nr.	Probe	Banden Nr.	Banden Typ	Molekulargewicht [kDa]	Lane Nr.	Probe	Banden Nr.	Banden Typ	Molekulargewicht [kDa]	Lane Nr.	Probe	Banden Nr.	Banden Typ	Molekulargewicht [kDa]						
8	N _{0,5min} P _{0,5min} OD _{1/4max} Replikat b	1		311,516	9	N _{0,5min} P _{0,03min} OD _{1/4max} Replikat b	1		311,516	10	N _{0,5min} P _{0,5min} OD _{1/2max} Replikat b	1		311,516						
		2		217,423			2		176,827			2		176,827						
		3		113,448			3		113,448			3		113,448						
		4		104,041			4		104,041			4		104,041						
		5		90,16			5		90,16			5		90,16						
		6		82,2			6		82,2			6		82,2						
		7		73,418			7		73,418			7		73,418						
		8		69,058			8		69,058			8		69,058						
		9		65,08			9		65,08			9		65,08						
		10		57,637			10		57,637			10		57,637						
		11		53,592			11		53,592			11		53,592						
		12		50,372			12		50,372			12		50,372						
		13		46,03			13		46,03			13		46,03						
		14		41,843			14		41,843			14		41,843						
		15		37,927			15		37,927			15		37,927						
		16		34,258			16		34,258			16		34,258						
		17		30,698			17		30,698			17		30,698						
		18		27,168			18		27,168			18		27,168						
		19		24,213			19		24,213			19		24,213						
		20		21,246			20		21,246			20		21,246						
		21		18,382			21		18,382			21		18,382						
		22		15,76			22		15,76			22		15,76						
		11	N _{0,5min} P _{0,03min} OD _{1/2max} Replikat b	1				217,423	12			N _{0,5min} P _{0,5min} OD _{max} Replikat b	1		217,423	13	N _{0,5min} P _{0,03min} OD _{max} Replikat b	1		217,423
				2				176,827					2		176,827			2		176,827
				3				113,448					3		113,448			3		113,448
				4				104,041					4		104,041			4		104,041
				5				97,291					5		97,291			5		97,291
				6				90,16					6		90,16			6		90,16
				7				82,2					7		82,2			7		82,2
				8				73,418					8		73,418			8		73,418
				9				69,058					9		69,058			9		69,058
				10				65,08					10		65,08			10		65,08
				11				60,769					11		60,769			11		60,769
				12				57,637					12		57,637			12		57,637
				13				53,592					13		53,592			13		53,592
				14				50,372					14		50,372			14		50,372
15				46,03	15		46,03	15			46,03									
16				41,843	16		41,843	16			41,843									
17				37,927	17		37,927	17			37,927									
18				34,258	18		34,258	18			34,258									
19				30,698	19		30,698	19			30,698									
20				27,168	20		27,168	20			27,168									
21				24,213	21		24,213	21			24,213									
22				21,246	22		21,246	22			21,246									
23				18,382	23		18,382	23			18,382									
24				16,213	24		16,213	24			16,213									
25				14,213	25		14,213	25			14,213									
26				12,469	26		12,469	26			12,469									
27				11,168	27		11,168	27			11,168									
28				10,168	28		10,168	28			10,168									
29				9,382	29		9,382	29			9,382									
30				8,689	30		8,689	30			8,689									
31				8,069	31		8,069	31			8,069									
32				7,513	32		7,513	32			7,513									
33				7,013	33		7,013	33			7,013									
34				6,569	34		6,569	34			6,569									
35				6,168	35		6,168	35			6,168									
36				5,769	36		5,769	36			5,769									

Tab. S 11: SDS-PAGE extrazelluläre Proteine 2 Teil 1: Vergleich über Zeit

Lane Nr.	Probe	Banden Nr.	Banden Typ	Molekulargewicht [kDa]	Lane Nr.	Probe	Banden Nr.	Banden Typ	Molekulargewicht [kDa]	Lane Nr.	Probe	Banden Nr.	Banden Typ	Molekulargewicht [kDa]						
2	N _{0,5mM} P _{0,5mM} OD _{12max} Replikat a	1		302,44	3	N _{0,5mM} P _{0,5mM} OD _{12max} Replikat a	1		302,44	4	N _{0,5mM} P _{0,5mM} OD _{max} Replikat a	1		302,44						
		2		264,923			2		264,923			2		264,923						
		3		206,287			3		206,287			3		206,287						
		4		160,886			4		160,886			4		160,886						
		5		137,748			5		137,748			5		137,748						
		6		121,286			6		121,286			6		121,286						
		7		101,822			7		101,822			7		101,822						
		8		90,693			8		90,693			8		90,693						
		9		84,367			9		84,367			9		84,367						
		10		74,22			10		74,22			10		74,22						
		11		72,815			11		72,815			11		72,815						
		12		69,285			12		69,285			12		69,285						
		13		66,941			13		66,941			13		66,941						
		14		63,09			14		63,09			14		63,09						
		15		57,841			15		57,841			15		57,841						
		16		55,822			16		55,822			16		55,822						
		17		49,904			17		49,904			17		49,904						
		18		42,914			18		42,914			18		42,914						
		19		39,871			19		39,871			19		39,871						
		20		38,829			20		38,829			20		38,829						
		21		23,544			21		23,544			21		23,544						
		5	N _{0,5mM} P _{0,03mM} OD _{12max} Replikat a	1				302,44	6			N _{0,5mM} P _{0,03mM} OD _{12max} Replikat a	1		302,44	7	N _{0,5mM} P _{0,03mM} OD _{max} Replikat a	1		302,44
				2				264,923					2		264,923			2		264,923
				3				206,287					3		206,287			3		206,287
				4				137,748					4		137,748			4		137,748
				5				101,822					5		101,822			5		101,822
				6				90,693					6		90,693			6		90,693
				7				84,367					7		84,367			7		84,367
				8				74,22					8		74,22			8		74,22
				9				72,815					9		72,815			9		72,815
				10				69,285					10		69,285			10		69,285
11				66,348	11		66,348	11			66,348									
12				63,09	12		63,09	12			63,09									
13				57,841	13		57,841	13			57,841									
14				55,822	14		55,822	14			55,822									
15				52,811	15		52,811	15			52,811									
16				49,904	16		49,904	16			49,904									
17				47,537	17		47,537	17			47,537									
18				45,849	18		45,849	18			45,849									
19				42,914	19		42,914	19			42,914									
20				39,871	20		39,871	20			39,871									
21				38,829	21		38,829	21			38,829									
22				27,852	22		27,852	22			27,852									
23				26,141	23		26,141	23			26,141									
24				23,544	24		23,544	24			23,544									
25				17,548	25		17,548	25			17,548									

Tab. S 12: SDS-PAGE extrazelluläre Proteine 2 Teil 2 Vergleich der N:P-Verhältnisse

Lane Nr.	Probe	Banden Nr.	Banden Typ	Molekulargewicht [kDa]	Lane Nr.	Probe	Banden Nr.	Banden Typ	Molekulargewicht [kDa]	Lane Nr.	Probe	Banden Nr.	Banden Typ	Molekulargewicht [kDa]
9	N _{0,5mM} P _{0,5mM} OD _{1/2max} Replikat b	1		404,607	10	N _{max} P _{0,03mM} OD _{1/4max} Replikat b	1		404,607	11	N _{0,5mM} P _{0,5mM} OD _{1/2max} Replikat b	1		302,44
		2		302,44			2		302,44			2		264,923
		3		264,923			3		264,923			3		206,287
		4		206,287			4		206,287			4		192,659
		5		160,886			5		160,886			5		101,822
		6		137,748			6		137,748			6		90,693
		7		121,286			7		121,286			7		84,367
		8		101,822			8		74,22			8		74,22
		9		90,693			9		69,285			9		69,285
		10		84,367			10		68,348			10		68,348
		11		74,22			11		63,09			11		63,09
		12		72,815			12		57,841			12		57,841
		13		69,285			13		55,822			13		55,822
		14		68,348			14		49,904			14		49,904
		15		63,09			15		42,914			15		42,914
		16		57,841			16		38,829			16		39,871
		17		55,822			17		38,829			17		38,829
		18		49,904			18		27,852			18		35,376
		19		42,914			19		26,141			19		26,141
		20		38,829			20		23,544			20		23,544
		21		35,376			21		17,548			21		21,405
		22		27,852			22		17,548			22		17,548
		23		26,141			23					23		
		24		23,544			24					24		
		25		21,405			25					25		
12	N _{5mM} P _{0,03mM} OD _{1/2max} Replikat b	1		264,923	13	N _{0,5mM} P _{0,03mM} OD _{max} Replikat b	1		264,923	14	N _{5mM} P _{0,03mM} OD _{max} Replikat b	1		264,923
		2		206,287			2		192,659			2		192,659
		3		192,659			3		101,822			3		101,822
		4		160,886			4		90,693			4		90,693
		5		101,822			5		74,22			5		74,22
		6		90,693			6		69,285			6		72,815
		7		74,22			7		68,348			7		69,285
		8		72,815			8		63,09			8		68,348
		9		69,285			9		57,841			9		63,09
		10		68,348			10		55,822			10		57,841
		11		63,09			11		49,904			11		55,822
		12		57,841			12		47,537			12		49,904
		13		49,904			13		42,914			13		49,904
		14		42,914			14		39,871			14		42,914
		15		39,871			15		38,829			15		39,871
		16		38,829			16		23,544			16		38,829
		17		35,376			17		17,548			17		35,376
		18		27,852			18					18		27,852
		19		26,141			19					19		26,141
		20		23,544			20					20		23,544
		21		21,405			21					21		21,405
		22		17,548			22					22		17,548

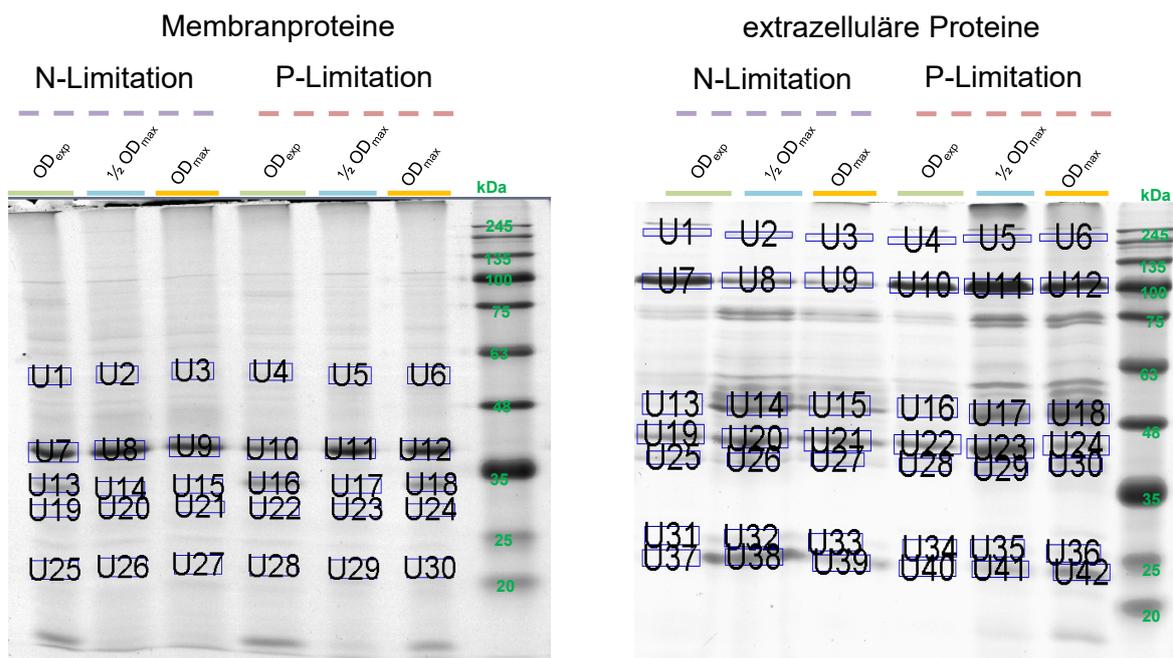


Abbildung S 5: Densitometrische Auswertung der SDS-PAGE Gele der Membran- und der extrazellulären Proteine.

Tab. S 13: Aufstellung der Intensitätsanalyse passen zu den Banden in Abbildung S5.

Membranproteine					extrazelluläre Proteine				
Bande	# der Pixel	Breite [mm]	Höhe [mm]	Intensität [OD mm ⁻²]	Bande	# der Pixel	Breite [mm]	Höhe [mm]	Intensität [OD mm ⁻²]
U1	3420,0	6,0	2,3	3,5	U1	1911,0	9,3	0,8	2,2
U2	3420,0	6,0	2,3	3,5	U2	1911,0	9,3	0,8	3,6
U3	3420,0	6,0	2,3	3,4	U3	1911,0	9,3	0,8	1,7
U4	3420,0	6,0	2,3	2,9	U4	1911,0	9,3	0,8	1,7
U5	3420,0	6,0	2,3	3,0	U5	1911,0	9,3	0,8	8,9
U6	3420,0	6,0	2,3	2,9	U6	1911,0	9,3	0,8	9,1
U7	4592,0	7,1	2,6	22,6	U7	4172,0	9,5	1,8	68,3
U8	4592,0	7,1	2,6	31,7	U8	4172,0	9,5	1,8	17,4
U9	4592,0	7,1	2,6	21,1	U9	4172,0	9,5	1,8	7,5
U10	4592,0	7,1	2,6	10,6	U10	4172,0	9,5	1,8	61,9
U11	4592,0	7,1	2,6	24,5	U11	4172,0	9,5	1,8	116,2
U12	4592,0	7,1	2,6	23,9	U12	4172,0	9,5	1,8	75,9
U13	3270,0	6,9	1,9	6,7	U13	4752,0	8,4	2,3	4,9
U14	3270,0	6,9	1,9	2,9	U14	4752,0	8,4	2,3	34,4
U15	3270,0	6,9	1,9	2,8	U15	4752,0	8,4	2,3	13,4
U16	3270,0	6,9	1,9	9,0	U16	4752,0	8,4	2,3	5,9
U17	3270,0	6,9	1,9	2,3	U17	4752,0	8,4	2,3	33,4
U18	3270,0	6,9	1,9	8,3	U18	4752,0	8,4	2,3	53,8
U19	2650,0	6,7	1,6	2,3	U19	5220,0	9,2	2,3	14,5
U20	2650,0	6,7	1,6	2,7	U20	5220,0	9,2	2,3	30,6
U21	2650,0	6,7	1,6	2,4	U21	5220,0	9,2	2,3	17,6
U22	2650,0	6,7	1,6	1,9	U22	5220,0	9,2	2,3	13,4
U23	2650,0	6,7	1,6	1,9	U23	5220,0	9,2	2,3	43,0
U24	2650,0	6,7	1,6	1,9	U24	5220,0	9,2	2,3	13,4
U25	4095,0	6,7	2,5	2,4	U25	2760,0	7,3	1,5	8,1
U26	4095,0	6,7	2,5	2,4	U26	2760,0	7,3	1,5	12,7
U27	4095,0	6,7	2,5	2,3	U27	2760,0	7,3	1,5	7,3
U28	4095,0	6,7	2,5	2,2	U28	2760,0	7,3	1,5	4,9
U29	4095,0	6,7	2,5	2,0	U29	2760,0	7,3	1,5	13,0
U30	4095,0	6,7	2,5	2,0	U30	2760,0	7,3	1,5	12,1
					U31	3776,0	7,5	2,0	0,4
					U32	3776,0	7,5	2,0	4,6
					U33	3776,0	7,5	2,0	1,7
					U34	3776,0	7,5	2,0	0,1
					U35	3776,0	7,5	2,0	4,4
					U36	3776,0	7,5	2,0	5,3
					U37	3720,0	7,9	1,9	1,6
					U38	3720,0	7,9	1,9	25,2
					U39	3720,0	7,9	1,9	8,0
					U40	3720,0	7,9	1,9	1,0
					U41	3720,0	7,9	1,9	10,2
					U42	3720,0	7,9	1,9	18,0

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Außerdem versichere ich, dass ich die allgemeinen Prinzipien wissenschaftlicher Arbeit und Veröffentlichung, wie sie in den Leitlinien guter wissenschaftlicher Praxis an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg festgelegt sind, befolgt habe.

Ort, Datum

Hanna Sibyll Ruppertsberg

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir diese Arbeit und mein Studium ermöglicht und mich stets unterstützt haben.

Zunächst gilt mein Dank Herrn Professor Dr. Ralf Rabus, der mir die Möglichkeit gab im Rahmen seiner Arbeitsgruppe meine bisherigen Abschlussarbeiten und diese Dissertation zu erarbeiten. Vielen Dank für die interessante Aufgabenstellung und die Bereitstellung optimaler Arbeitsbedingungen.

PD. Dr. Bert Engelen und Professor Dr. Heinz Wilkes danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Ein ganz besonderer Dank geht an die Mitglieder meiner Arbeitsgruppe, die mir über die letzten Jahre stets unterstützend, im guten Austausch miteinander, zur Seite standen.

Vielen Dank Daniel, für die unzähligen gemeinsamen Nachtschichten, für die Hilfe bei der Vorbereitung und Durchführung „unserer“ Experimente. Vielen Dank, dass du mich in die Welt der Bioreaktoren eingeführt hast! Bei Marvin und Jannes möchte ich mich für die gemeinsame Zeit und die unzähligen Diskussionen, eure Ideen und Ratschläge bedanken.

Danke euch, Uwe, Christina und Sabine, dafür, dass ihr mir immer unter die Arme gegriffen habt, wenn irgendwo eine Hand fehlte oder irgendeine Messung, sei es an der HPLC oder dem MPR, gemacht werden musste. Und natürlich für die kulinarischen Verköstigungen zwischendurch.

Vielen Dank, Lars Wöhlbrand und Kathleen Trautwein, für die Unterstützung bei der Einarbeitung in die Thematik, der Planung und Auswertung der Experimente. Vielen Dank, dass ihr mir die Proteomik und die Kultivierung von Mikroorganismen nähergebracht habt.

Danke an Maren und Svea für die gemeinsame Arbeit an den Assays für die N- und P-Bestimmung.

Zudem möchte ich mich bei der Deutschen Forschungsgesellschaft für die Möglichkeit der Arbeit im Rahmen des Sonderforschungsbereichs *Roseobacter* und der Teilnahme an der zugehörigen Graduiertenschule bedanken. Vor allem bei Ferdinand Esser für die stete Hilfe und sein offenes Ohr.

Zu guter Letzt, gilt mein Dank meinen Freunden und meiner Familie. Jeder von euch hat seinen Beitrag zum Gelingen meines Studiums und meiner Doktorarbeit geleistet. Ohne euch wäre dies nicht möglich gewesen.

Danke, Manni, dass du immer für mich da bist, wenn ich dich brauche.

Publikationen

- Ruppersberg HS**, Goebel MR, Kleinert SI, Wünsch D, Trautwein K, Rabus R (2017) Photometric Determination of Ammonium and Phosphate in Seawater Medium Using a Microplate Reader. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* Vol.27, pp.73-80, 2017.
- Trautwein K, Feenders C, Hulsch R, **Ruppersberg HS**, Strijkstra A, Kant M, Vagts J, Wünsch D, Michalke B, Maczka M, Schulz S, Hillebrand H, Blasius B, Rabus R (2017) Non-Redfield, nutrient synergy, and flexible internal elemental stoichiometry in a marine bacterium. *FEMS Microbiology Ecology*, 93.
- Trautwein K, Will SE, Hulsch R, Maschmann U, Wiegmann K, Hensler M, Michael V, **Ruppersberg H**, Wünsch D, Feenders C, Neumann-Schaal M, Kaltenhäuser S, Ulbrich M, Schmidt-Hohagen K, Blasius B, Petersen J, Schomburg D, Rabus R (2016) Native plasmids restrict growth of *Phaeobacter inhibens* DSM 17395. Energetic costs of plasmids assessed by quantitative physiological analyses: Plasmid costs in DSM 17395. *Environmental Microbiology*, Vol.18, pp.4817-4829.
- Wöhlbrand L, Wemheuer B, Feenders, C, **Ruppersberg HS**, Hinrichs C, Blasius B, Daniel R, Rabus R (2017) Complementary metaproteomic approaches to assess the bacterioplankton response towards a phytoplankton spring bloom in the southern North Sea. *Frontiers Microbiology eCollection*.
- Wöhlbrand L, **Ruppersberg HS**, Feenders C, Blasius B, Braun HP, Rabus R (2016) Analysis of membrane-protein complexes of the marine sulfate reducer *Desulfobacula toluolica* Tol2 by 1D blue native-PAGE complexome profiling and 2D blue native-/SDS-PAGE. *Proteomics* Vol.16(6), pp.973-988.