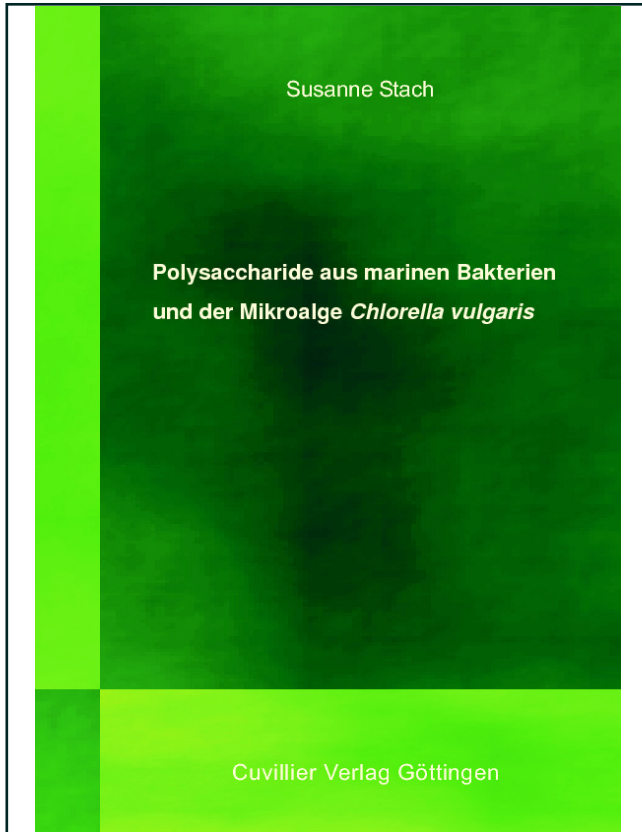




Susanne Stach (Autor)

Polysaccharide aus marinen Bakterien und der Mikroalge *Chlorella vulgaris*



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/2578>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

1 Einleitung

1.1 Marine oligotrophe Bakterien

Marine oligotrophe Bakterien sind Mikroorganismen, die unter extremen Lebensbedingungen existieren können. Durch ihre Anpassung an Kälte und niedrige Nährstoffkonzentrationen von nur 1-15 mg Kohlenstoff / Liter sind sie in der Lage, auch in den Polarregionen produktiv zu sein. Sie wurden als die dominante Population über dem Gunnerus- und Astrid-Rücken im Antarktischen Ozean nachgewiesen (s. Abb. 1-1). Durch Anreicherungskulturen in Dialysekammern oder in Doppelpetrischalen-Fließkulturen konnten kälteadaptierte Bakterien aus den Polarregionen isoliert und kultiviert werden. Die taxonomische Charakterisierung der Mikroorganismen erfolgt anhand des Fettsäuremusters und der 16S rRNA Gensequenz [1].

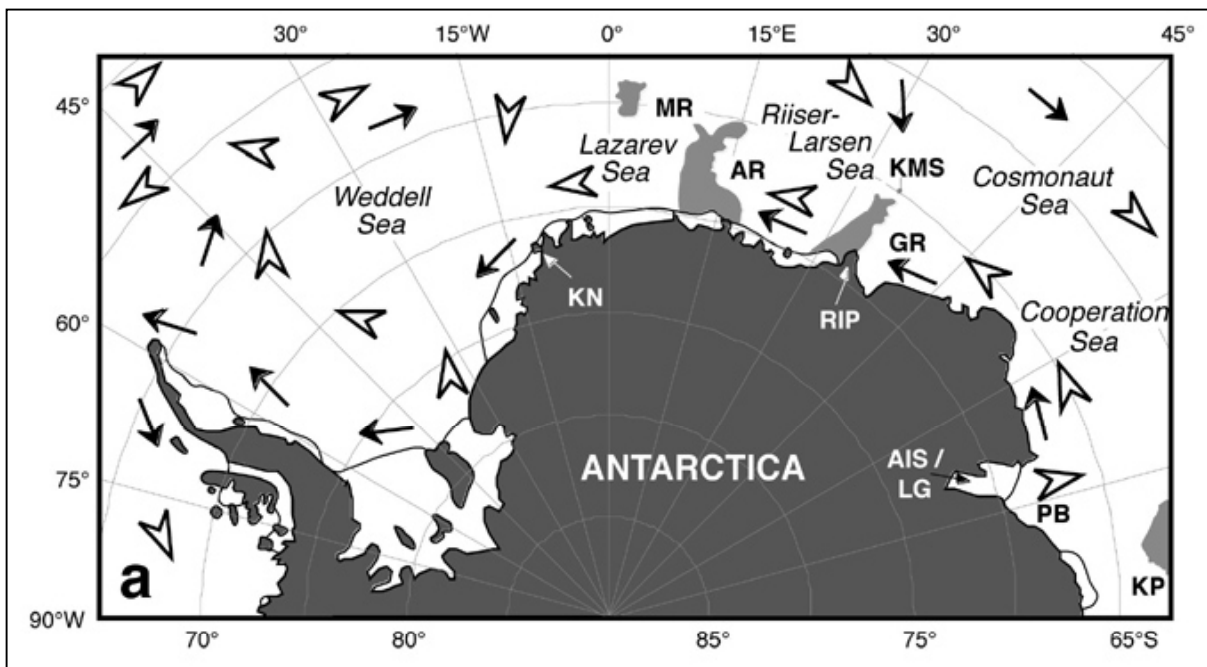


Abb. 1-1 Antarktiskarte [2]. AR = Astridrücken, GR = Gunnerusrücken

1.1.1 ANT 60b / ANT 4a

Die Bakterienstämme *ANT 60b* und *ANT 4a* sind auf Expeditionen in der antarktischen See neben 73 weiteren isoliert worden [3]. Sie gehören zwei unterschiedlichen Clustern an, welche nur gemein haben, dass es sich um unpigmentierte Prokaryonten handelt. *ANT 60b* (s. Abb. 1-2) gehört zum Cluster E, während *ANT 4a* dem Cluster D zuzuschreiben ist.



Abb. 1-2 *ANT 60b (Alteromonas stellipolaris sp. nov.)* nach Anfärbung mit 1% Uranylacetat in 0.4%iger Saccharoselösung unter dem Elektronenmikroskop [4]

Der Unterschied besteht in der Fettsäurezusammensetzung, welche prozentual in Tab. 1-1 dargestellt ist.

Tab. 1-1 Fettsäurezusammensetzung von Cluster D und E in % [3]

Fettsäure	Cluster D	Cluster E	Fettsäure	Cluster D	Cluster E
10:0	1.0 – 3.1	ND	10:0 3OH	ND	0.0 – 2.3
12:0	ND	1.5 – 3.4	11:0 3OH	ND	0.0 – 2.2
14:0	ND	TR	12:0 3OH	7.7 – 15.6	0.7 – 13.0
15:0	ND	0.0 – 4.2	12:1 3OH	ND	TR
16:0	9.0 – 14.1	10.5 – 18.4	13:0 iso	ND	TR
17:0	ND	0.0 – 5.2	12:0 iso 3OH	ND	0.0 – 2.1
18:0	0.0 – 5.7	0.0 – 3.3	17:0 10 methyl	ND	0.0 – 8.3
15:1 ω8c	ND	0.0 – 3.0	18:0 10 methyl	ND	TR
17:1 ω8c	ND	2.9 – 12.5	16:0 N alcohol	ND	0.0 – 3.2
18:1 ω7c	35.1 – 51.3	15.4 – 21.7	16:1 ω7c alcohol	ND	0.0 – 4.1
17:0 cyclo	0.0 – 5.7	ND	Summe 1	ND	0.0 – 4.6
19:0 cyclo ω8c	0.0 – 13.0	ND	Summe 2	17.7 – 27.4	23.5 – 35.0

ND: nicht detektierbar

TR: nur in Spuren nachweisbar

Summe 1: Schließt Kombinationen von 12:0 Aldehyd, 16:0 iso 1 und 14:0 3OH ein.

Summe 2: Schließt 15:0 iso 2OH, 16:1 ω7c oder beide ein.

Die Analyse der 16S rRNA Gensequenz des Cluster E – Cluster D wurde nicht weiter untersucht – ergab, dass das monotrich begeißelte Stäbchenbakterium *ANT 60b* zur Gattung *Alteromonas stellipolaris* (s. Abb. 1-3) gehört, welche wiederum eine Unterklasse der γ -Proteobakterien darstellt [4].

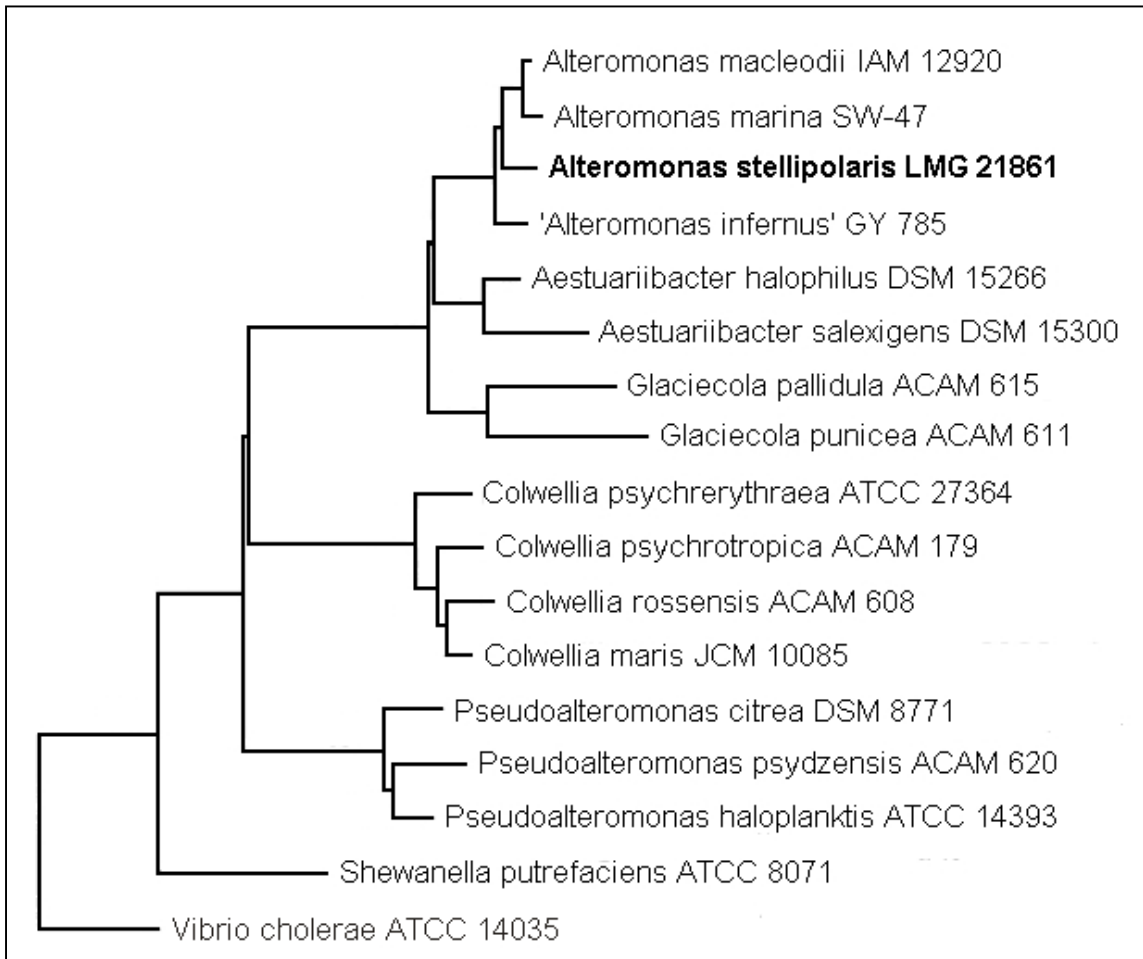


Abb. 1-3 Nachbarschafts-Dendrogramm der phylogenetischen Beziehung zwischen *Alteromonas stellipolaris* und verwandten marinen, chemoheterotrophen γ -Proteobakterien [4]

Eine Besonderheit dieser γ -Proteobakterien ist die Ausbildung von Knospen [4], wie es bisher nur für Hefen und Stämme der α -Proteobakterien beobachtet worden ist [5]. Da es sich bei beiden Unterklassen um Bakterien handelt, die in marinen und polaren Umgebungen beheimatet sind, scheint die Bildung von Knospen eine allgemeine Strategie zur Vergrößerung des Oberfläche/Volumen-Verhältnisses zu sein, welches eine effizientere Substrataufnahme in oligotropher Umgebung ermöglicht [6].

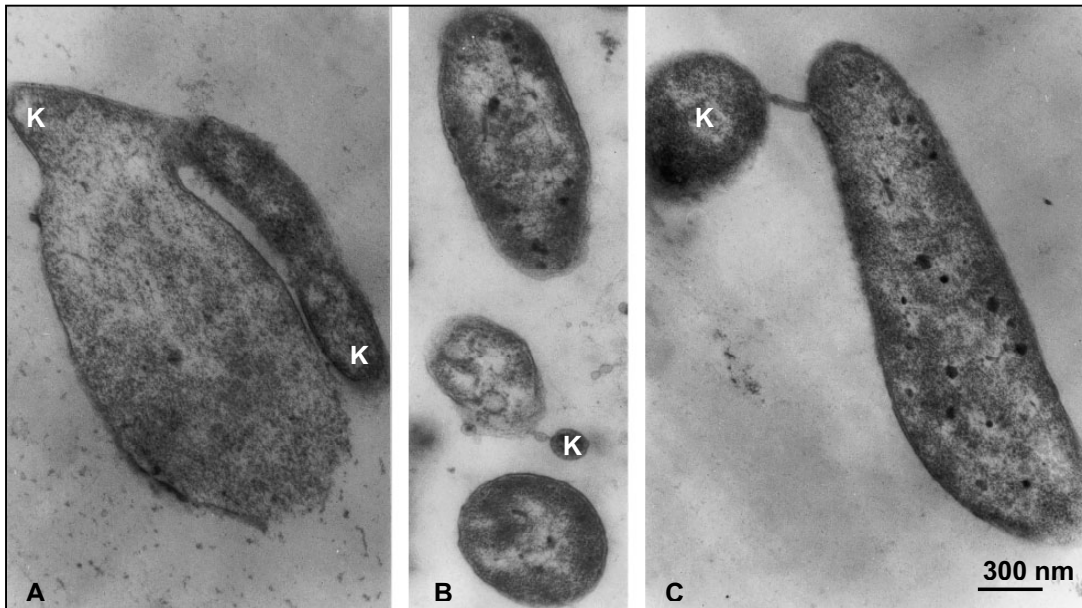


Abb. 1-4 Knospenbildung (K) von Stämmen der Gattung *Alteromonas stellipolaris* sp. nov nach Anfärbung mit Bleicitrat und 1% Uranylacetat unter dem Elektronenmikroskop [4]

1.1.2 Biofilme

Die bevorzugte Lebensform von Mikroorganismen ist der Biofilm, welcher sich ubiquitär an Grenzflächen ausbildet (s. Tab. 1-2). In der Umwelt gibt es daher praktisch keine Bereiche, die nicht von Mikroorganismen besiedelt sind oder besiedelt werden können.

Tab. 1-2 Biofilme an Grenzflächen [7]

Grenzfläche	Beispiele für das Vorkommen von Biofilmen
Feste Oberfläche / Flüssigkeit	Auf untergetauchten Felsen und Steinen, in Gewässersedimenten, auf Innenwandungen von Wasserleitungen und Wasserbehältern, auf Schiffsrümpfen, auf medizinischen Prothesen, auf Kathetern, auf lebenden Geweben (Wasserpflanzen, Epithelgewebe von Mensch und Tier), auf Zähnen
Feste Oberfläche / Luft (oft zeitweise in Kontakt mit Flüssigkeiten)	Biologischer Rasen in Tropfkörperanlagen, in Böden, Bakterienkolonien auf Agarnährböden, Flechten
Flüssigkeit / Luft	Schwimmschichten an der Oberfläche von Gewässern, von Wasser in Speicherbehältern usw.
Flüssigkeit / Flüssigkeit	Kohlenwasserstoff abbauende Biofilme an Öl / Wasser - Grenzflächen

Die Entstehung von Biofilmen basiert prinzipiell auf der Anheftung (Adhäsion) von Mikroorganismen an eine Anwuchsoberfläche (das Substratum), der Vermehrung zu Mikrokolonien und deren Zusammenwachsen zu Biofilmen. Diese erreichen keine unbegrenzte Dicke, sondern es spielt sich ein Gleichgewicht zwischen Neubildung und Ablösung des Biofilms ein (s. Abb. 1-5).

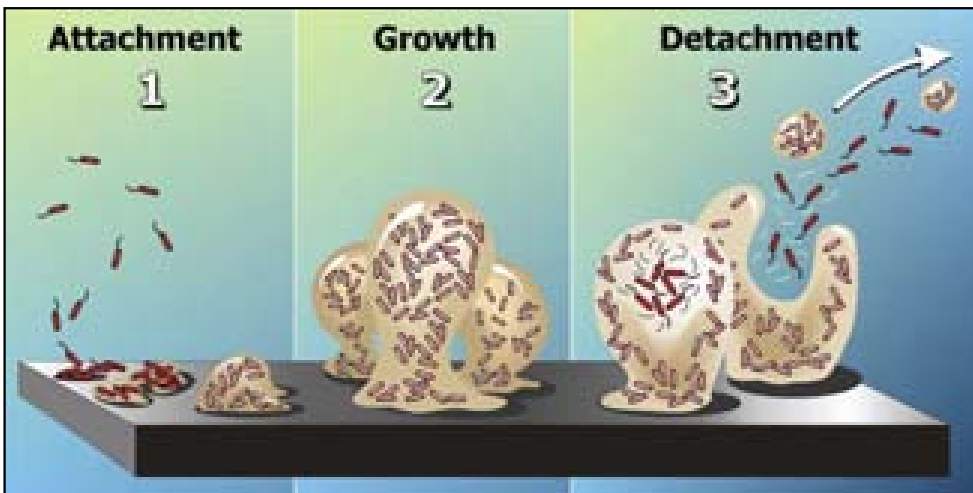


Abb. 1-5 Bildung eines Biofilms [8]

Allen Biofilmen ist gemeinsam, dass sie von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) zusammengehalten werden. Der Zusammenhalt der EPS-Matrix beruht jedoch nicht auf kovalenten Bindungen, sondern auf schwachen physikalisch-chemischen Wechselwirkungen (Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals-Kräften und elektrostatische Wechselwirkungen). Die Bildung dieser EPS ist eine generelle Fähigkeit von Mikroorganismen, sowohl von prokaryontischen (Bakterien, Archaeen) als auch von eukaryontischen (Algen, Pilze) (s. Tab. 1-3). Dabei handelt es sich um einen stark viskosen Schleim, der von den Bakterien ausgeschieden wird. Geesey [9] definierte EPS als „extrazelluläre polymere Substanzen biologischen Ursprungs, die an der Bildung mikrobieller Aggregate beteiligt sind“. Die Abkürzung EPS wird hingegen auch verwendet für „extrazelluläre Polysaccharide“, „Exopolysaccharide“ oder „Exopolymere“.

Tab. 1-3 Vorkommen von Biofilmen [10]

Parameter	Vorkommen
Temperaturbereich	Von -5°C (in kalten Salzquellen) bis $+120^{\circ}\text{C}$ (in heißen Quellen am Meeresboden)
pH-Bereich	Von pH 0 (<i>Thiobacillus thiooxidans</i>) bis pH 13 (<i>Plectonema nostocorum</i> , in Natronseen)
Redoxpotential	Gesamter Wasser-Stabilitätsbereich: von -450 mV (methanogene Bakterien) bis $+850\text{ mV}$ (Eisenbakterien); Biofilme auf Elektroden
Druck	Bis 1000 bar (barophile Bakterien auf dem Meeresgrund)
Salzgehalt	Wachstum in hochreinem Wasser (Pharma- und Elektronikindustrie) bis zu nahezu gesättigter Salzlösung (halophile Bakterien im Toten Meer)
Nährstoffangebot	Von $10\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}\ \text{C}_{\text{org}}$ (Trinkwasser) bis zum Leben auf oder in C-Quellen
Strahlenbelastung	Biofilme auf UV-Lampen, radioaktiven Bestrahlungseinheiten, in Kernkraftwerken
Biozide	Biofilme in Desinfektionsmittel-Leitungen

Neben Polysacchariden sind jedoch auch Lipide, Phospholipide, Glykolipide, Glykoproteine und Proteine zugegen, so dass die EPS-Definition von Wingender *et al.* [11] am zutreffendsten ist. Sie bezeichnen EPS als „außerhalb der Zelle liegende organische Makromoleküle in mikrobiellen Aggregaten (extrazelluläre polymere Substanzen)“.

1.2 Extrazelluläre polymere Substanzen (EPS)

1.2.1 Funktion und Verwendung

Die EPS bieten den Biofilmorganismen die Möglichkeit zur Bildung von stabilen Mikrokonsortien. Diese synergistischen Gemeinschaften sind in der Lage, komplexe Substrate abzubauen und sich entscheidend an den Selbstreinigungsprozessen in Böden, Sedimenten und Gewässern zu beteiligen [12]. Durch die Anheftung an Oberflächen und die daraus folgende Entstehung verschiedener Lebensräume auf kleinstem Raum werden mikrobielle Umsetzungen von anorganischen und organischen Verbindungen erleichtert. Außerdem besitzt die EPS-Matrix sorptive Eigenschaften und kann daher Nährstoffe akkumulieren. Diese Fähigkeit ist gerade in nährstoffarmer Umgebung sehr vorteilhaft. Weiterhin stellen die EPS eine Schutzbarriere für die Mikroorganismen dar, wodurch sich deren Toleranz gegenüber Bioziden, Schwermetallen, organischen Schadstoffen, hydraulischen Belastungen, pH-Schwankungen und osmotischem Stress erhöht. Durch die Zusammenlagerung vieler Mikroorganismen bildet sich ein Pool genetischer Informationen mit der Möglichkeit zum Gentransfer [13].

Bei den biochemischen Modifikationen in kälteangepassten Mikroorganismen spielen spezielle Proteine in der EPS-Matrix eine wichtige Rolle. Die eine Sorte der sogenannten Kälteschockproteine (Cold shock proteins, CSP) verhindert das Gefrieren der Zellflüssigkeit, indem sie durch Wechselwirkung mit Kristallisationskeimen deren induktive Wirkung unterdrückt. Die anderen CSP wirken als sehr effektive Kristallisationskeime und gewährleisten dadurch ein schnelles und damit weitgehend schadloses Einfrieren des Zellinneren. Nach dem Auftauen ist die betroffene Zelle dann wieder funktionstüchtig [14]. Eine weitere Gruppe von Proteinen verhindert die Zerstörung der Zelle durch in der Umgebung gebildete Eiskristalle. Um den externen Kristallisationsprozess zu stoppen, werden diese sogenannten Frostschutzproteine (Antifrost protein, AFP) von der Zelle nach außen abgegeben [15]. Ein weiteres Merkmal der Kälteanpassung ist die erhöhte Membranfluidität der Zellwände. Die Acylketten der Membranlipide sind im Vergleich zu denen mesophiler Artgenossen kürzer, verzweigter und besitzen einen höheren Sättigungsgrad. Außerdem bestehen Unterschiede in der Isomerenverteilung. Diese strukturellen Veränderungen bewirken, dass die Membran bei tieferen Temperaturen in einem gewissermaßen fluiden Zustand verbleibt, der für die Transportfunktionen Voraussetzung ist. Die Membran eines Mesophilen würde in der Kälte bereits in einen gelartigen Zustand übergegangen sein, in dem kein Austausch von Substraten mehr stattfindet [16].

Die Polysaccharide, die einen großen Anteil der EPS ausmachen, stellen bislang den am besten untersuchten Bereich der EPS dar [17]. Sie sind, wie einige andere Polymere auch, in der Lage, ein Vielfaches ihres Eigengewichtes an Wasser in Form von Gelen zu binden. Durch die Rückhaltung von Wasser schützen die EPS vor einer möglichen Austrocknung. Weiterhin wird auch die Fixierung und Stabilisierung extrazellulärer Enzyme in der Biofilmmatrix ermöglicht. Das Adsorptionsvermögen der Biofilme und ihre enorme Stabilität haben Vor- und Nachteile. So ist die hohe Stabilität der Biofilme in Bioreaktoren von großem Vorteil, da die Bakterien dadurch im Reaktor verbleiben und nicht ausgespült werden. Die unerwünschte Ausbildung mikrobieller Beläge wird als Biofouling bezeichnet. Biofouling tritt in allen Wasser führenden Systemen auf und kann so zu erheblichen Problemen führen. Ein klassisches Beispiel dafür ist der Bewuchs von Schiffsrümpfen, der zu Geschwindigkeitseinbußen führt und damit Mehraufwendungen für Treibstoff nach sich zieht. In Reinstwasseranlagen können Biofilme zur Beeinträchtigung von Gewinnung, Aufbereitung, Transport, Lagerung und Nutzung von Wasser beitragen und somit auch eine Verschlechterung der Wasserqualität hervorrufen. Bei der Papierherstellung kommt es durch die adhäsiven Eigenschaften der EPS zu einer Akkumulation von Fasern, wodurch die gefürchteten „Schleimzapfen“ entstehen [12]. Ihre Bekämpfung bereitet immense Probleme, da große Mengen umweltbelastender Chemikalien eingesetzt werden müssen. Die Adhäsionskraft der EPS kann außerdem die Verwitterung von Baustoffen beschleunigen.

Tab. 1-4 Biologische Funktionen von EPS [12]

Funktion	Bedeutung
Adhäsion an Oberflächen	- Bildung von Primärbiofilmen und Mikrokolonien - Voraussetzung für weitere Biofilm-Entwicklung
Aggregation von Zellen, Bildung von Flocken und Biofilmen	- Immobilisierung von Zellen - Ermöglichung hoher Zelldichte
Räumliche Struktur von Biofilmen	- Vermittlung von mechanischer Stabilität - Entwicklung von Mikrokonsortien - Bildung von Konzentrationsgradienten - Rückhaltung extrazellulärer Enzyme - Wechselwirkung Polysaccharide / Enzyme - Verhindert Verlust lysierter Zellbestandteile - Konvektiver Stofftransport durch Kanäle - Erleichterung von horizontalem Gentransfer - Matrix für Zell-Zell-Kommunikation
Schutzbarriere	- erhöhte Toleranz der Organismen gegenüber Bioziden, Schwermetallen und organischen Schadstoffen - Schutz gegen Radikale - Schutz gegen Phagozytose bei Infektionen - Schutz von extrazellulären Enzymen durch Komplexbildung
Rückhaltung von Wasser	- Verhinderung von Austrocknen
Sorption exogener organischer Stoffe, anorganischer Ionen sowie (a)biotischer Partikel	- Nährstoff-Akkumulation in oligotropher Umgebung - Akkumulation von Schwermetallen und Xenobiotika

Bakterielle EPS werden heute in großem Umfang biotechnologisch gewonnen. Aufgrund ihrer biologischen Aktivität können manche EPS in der Medizin eingesetzt werden – als Anti-Tumor-Wirkstoffe (β -D-Glucane), in der Augen- und Gelenkchirurgie (Hyaluronsäure) und bei der Wundbehandlung (EPS von *Escherichia coli* K4 und K5) [12]. Hauptsächlich werden jedoch die physikalischen Eigenschaften der EPS ausgenutzt. Durch ihre Wirkung als Emulsions-, Suspensions- bzw. Schaumstabilisatoren und Gelbildner werden sie in großem Umfang in der Lebensmittelproduktion verwendet. Xanthan und Alginate dienen beispielsweise als Dickungsmittel, wobei ersteres auch wegen seines Wasserbindevermögens in der Kosmetikindustrie eingesetzt wird. Das hohe Adsorptionsvermögen für gering konzentrierte Substrate ist Voraussetzung für die Verwendung von EPS in der Abluftreinigung, wo Biofilter seit vielen Jahren zum Stand der Technik bei der Eliminierung von organischen Schadstoffen gehören. Einige EPS werden für die Erhöhung der Viskosität technischer Fluide genutzt, zum Beispiel von Bohrspülflüssigkeiten. Eine Reihe von Organismen bildet EPS, die sich als Biotenside eignen. Neu ist die Entwicklung von EPS, die als Klebstoffe verwendet werden können [12].

Tab. 1-5 Nutzung von bakteriellen EPS als Wertstoffe [12,18]

Eigenschaften	Nutzung	Polymer
<i>Biologisch</i>	Anti-Tumor-Wirkstoffe Augen- und Gelenkchirurgie Heparin-Analoga Wundbehandlung	β -D-Glucane Hyaluronsäure EPS von <i>E. coli</i> K5 EPS von <i>E. coli</i> K4 und K5
<i>Chemisch</i>	Enzymsubstrate Oligosaccharid-Präparate	Curdlan (β -D-1,3-Glucan, DP bis >400) Pullulan (α -D-1,6-Glucan, $M_w = 10000 - 400000$)
<i>Physikalisch</i>		
Dickungsmittel und Stabilisator	<u>Lebensmittelproduktion</u> Milch und Milchprodukte, Mayonnaisen, Dressings, Bratsaucen, Konserven <u>Papier- und Textilindustrie</u> Druckfarben und Tinte <u>Kosmetik / Körperpflege</u> Zahnpasta	Xanthan ($M_w = 2 - 15 \times 10^6$)
	<u>Lebensmittelproduktion</u> Speiseeis, Mayonnaisen, Salatdressings, Milchdesserts, Kuchencremes, Pralinenfüllungen, Tiefkühlkost <u>Kosmetik / Körperpflege</u> Cremes, Zahnpasta, Haarfixative, Prothesenhaftcreme	Alginate ($M_w \sim 200000$)
Faserverstärkung	Akustische Membranen	Bakterielle Cellulose
Hydratisierung	Kosmetika, Pharmazeutika	Hyaluronsäure
Tensid	Tertiäre Erdölförderung	Emulsan

Nachfolgend sind die Strukturen von einigen bakteriellen extrazellulären polymeren Substanzen aufgeführt.

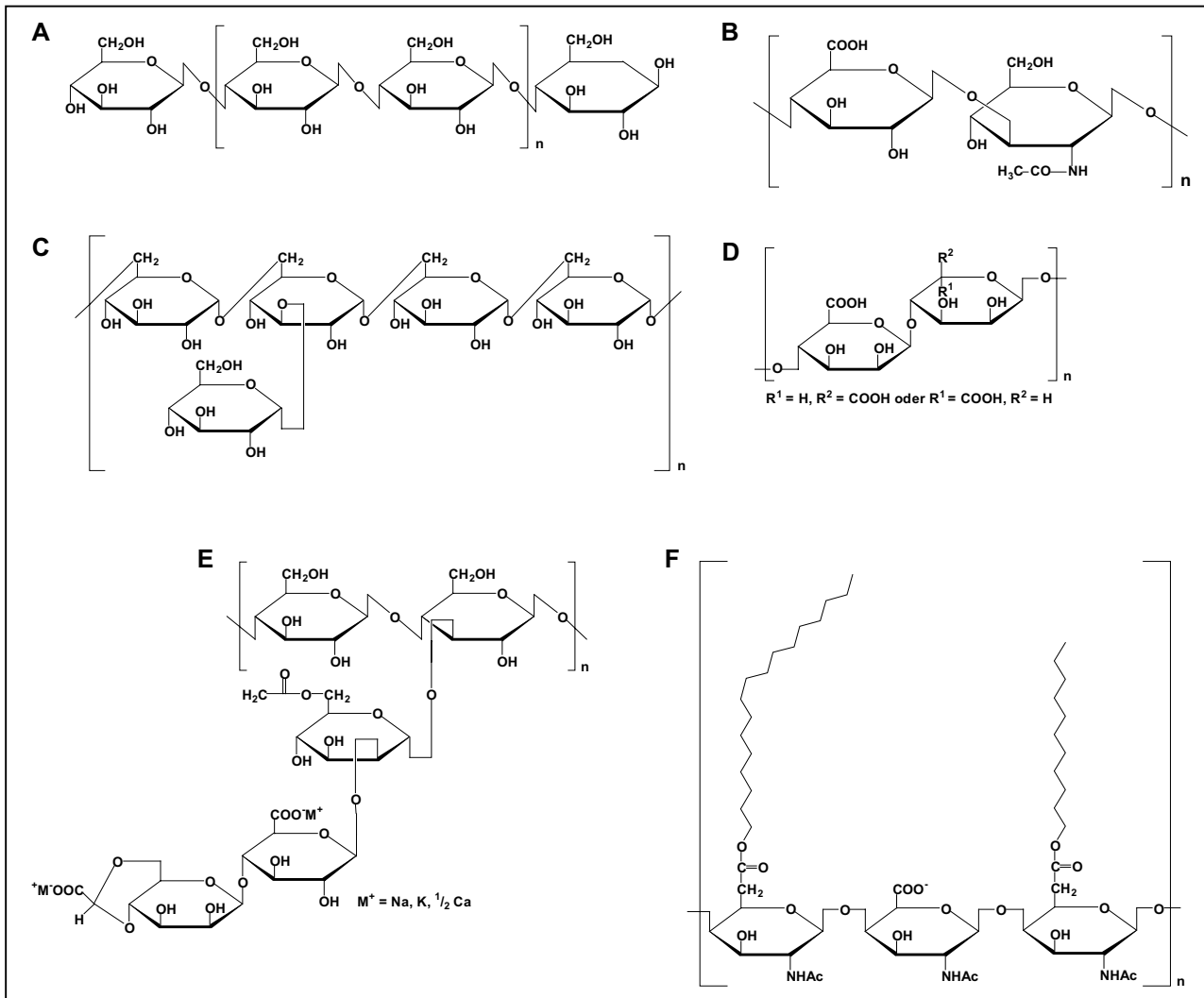


Abb. 1-6 Strukturen einiger extrazellulärer polymerer Substanzen [12]

A) Cellulose, B) Hyaluronsäure, C) Dextran, D) Alginsäure, E) Xanthan, F) Emulsan

1.2.2 Weitere relevante Substanzklassen

Neben den Polysacchariden, welche in 1.2.1. aufgeführt sind, gibt es noch weitere Substanzen, welche zur Gruppe der EPS gehören. Die wichtigsten werden im Folgenden genannt.

a) Glykoproteine

Glykoproteine sind Makromoleküle, bei denen Oligosaccharide an eine Proteinkette gebunden ist. Je nach Bindungsart wird zwischen *N*- und *O*-Glykanen unterschieden.