

**Bedeutung
des
extrazellulären Polysaccharids Alginat
für die Resistenz aquatischer Stämme von
Pseudomonas aeruginosa
gegenüber Chlor**

Dipl.-Biol. Susanne Grobe

Dissertationen 1996

**Berichte aus dem
Rheinisch-Westfälischen
Institut für Wasserchemie
und Wassertechnologie GmbH**
Institut an der Gerhard-Mercator-Universität - GH Duisburg

Band 17

**Rheinisch-Westfälisches
Institut für Wasserchemie
und Wassertechnologie GmbH**

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. PROBLEMSTELLUNG.....	16
3. MATERIAL.....	19
3.1 Bakterienstämme	19
3.2 Nährmedien.....	25
3.3 Allgemeine Puffer	30
3.4 Andere Lösungen	31
3.5 Chemikalien, Polysaccharide und Enzyme	31
4. METHODEN	34
4.1 Herstellung chlorzehrungsfreier Glasgeräte und Puffer	34
4.2. Mikrobiologische Methoden	34
4.2.1 Bestimmung der Koloniezahl, <i>Escherichia coli</i> und coliformer Bakterien in Trink- und Schwimmbeckenwasser	34
4.2.2 Überprüfung der Nachweismethodik von <i>P. aeruginosa</i>	35
4.2.3 Isolierung von <i>P. aeruginosa</i>	36
4.2.4 Identifizierung von <i>P. aeruginosa</i>	37
4.2.5. Charakterisierung von <i>P. aeruginosa</i>	38
4.2.5.1 Bestimmung des Kolonietyps	38
4.2.5.2 O-Antigen-Typisierung.....	39
4.2.5.3 Qualitativer Nachweis von Enzymaktivitäten	39
4.2.6. Isolierung nichtmucoider Revertanten und Mutanten.....	41
4.2.6.1 Isolierung spontaner Revertanten	41
4.2.6.2 Isolierung chemisch induzierter Mutanten	41
4.2.7 Bestimmung der Bakterieninaktivierung durch Chlor	42
4.2.8 Bestimmung der Bakterieninaktivierung durch Chlorreaktionsprodukte	43
4.2.9 Bakterieller Adhärenztest an n-Hexadekan	44
4.3. Biochemisch-präparative Methoden	45
4.3.1 Reinigung von kommerziellen Algenalginaten	45
4.3.2 Reinigung von bakteriellen Alginaten.....	45
4.3.3 Isolierung der äußeren Membran.....	46
4.3.4 Gewinnung von Ganzzelllysaten zur Lipopolysaccharid-Analyse.....	48
4.3.5 Isolierung von Lipopolysacchariden.....	48

4.4. Chemisch-analytische Methoden	50
4.4.1 Bestimmung von freiem Chlor	50
4.4.2 Bestimmung von gebundenem Chlor	51
4.4.3 Bestimmung von Proteinen	51
4.4.4 Bestimmung von Acetylgruppen	52
4.4.5 Bestimmung von Uronsäuren	52
4.4.6 Bestimmung von 2-Keto-3-desoxyoctonat in Lipopolysaccharid	53
4.4.7 Bestimmung von Kohlenhydraten	54
4.4.8 Bestimmung von reduzierenden Zuckern	54
4.4.9 Bestimmung des Äquivalentgewichts von Alginat	55
4.4.10 Bestimmung von leicht flüchtigen halogenierten Kohlenwasserstoffen	55
4.4.11 Bestimmung von gesamt gebundenem organischen Halogen	56
4.4.12 Saure Totalhydrolyse und Dünnschichtchromatographie von Alginaten	56
4.5. Chemisch-präparative Methoden	57
4.5.1 Chemische Acetylierung von Algenalginat	57
4.5.2 Chemische Acetylierung von bakteriellem Alginat	57
4.5.3 Deacetylierung von Alginaten	58
4.5.4 Herstellung von chlorbehandeltem Bakterienalginat	58
4.6. Physikalisch-analytische Methoden	58
4.6.1 Infrarotspektroskopie von Alginaten	58
4.6.2 ¹ H-NMR-Spektroskopie von Alginaten	59
4.6.3 Bestimmung von Kationen durch Atomabsorptionsspektrometrie	59
4.6.4 Viskosimetrie	60
4.7. Chromatographische Methoden	61
4.7.1 Anionenaustauschchromatographie von Alginaten	61
4.7.2 Gelfiltration von Alginaten	62
4.8. Gelelektrophoretische Methoden	63
4.8.1 Analytische SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen	63
4.8.2 Analytische SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Lipopolysacchariden	66
4.9 Bindung von Alginaten an n-Hexadekan	69
5. ERGEBNISSE	70
5.1. Übersicht über die Isolierung von <i>P. aeruginosa</i> an aquatischen Standorten	70
5.1.1 Überprüfung einiger herkömmlicher Nachweismethoden zur Isolierung von <i>P. aeruginosa</i>	70
5.1.1.1 Flüssigkeitsanreicherung mit Malachitgrün-Bouillon	71
5.1.1.2 Agarnährböden als primäre Isolierungsmedien	72
5.1.1.3 Modifizierung von Pseudomonas-Isolierungs-Agar	74

5.1.2 Vorkommen von <i>P. aeruginosa</i> an aquatischen Standorten.....	76
5.2. Charakterisierung der isolierten <i>P. aeruginosa</i>-Umweltstämme.....	79
5.2.1 Kolonietypbestimmung.....	79
5.2.2 Wachstum und Schleimbildung in Abhängigkeit von der Zusammensetzung verschiedener Agarnährmedien	81
5.2.3 Reaktionen im API 20 NE-System.....	84
5.2.4 Bildung von extrazellulären Enzymen, Hämolyisin und Pigmenten	87
5.2.5 Serogruppenhäufigkeit	89
5.2.6 Zusammensetzung des extrazellulären Materials mucoider und nichtmucoider Umweltstämme	91
5.3. Charakterisierung der Alginate von <i>P. aeruginosa</i>-Umweltstämmen.....	94
5.3.1 Reinigung der bakteriellen Alginate	94
5.3.2 Identifizierung und Charakterisierung der bakteriellen Alginate.....	98
5.4. Bakterizide Wirkung von Chlor auf Umweltstämme von <i>P. aeruginosa</i>.....	108
5.4.1 Überleben von mucoiden <i>P. aeruginosa</i> -Umweltstämmen und davon abgeleiteten spontanen nichtmucoiden Revertanten in Gegenwart von Chlor	108
5.4.2 Überleben von chemisch induzierten nichtmucoiden Mutanten des mucoiden <i>P. aeruginosa</i> - Umweltstammes SG41 in Gegenwart von Chlor	117
5.4.3 Überleben von nichtmucoiden <i>P. aeruginosa</i> -Umweltstämmen in Gegenwart von Chlor	121
5.4.3 Konzentrations-, zeit- und pH-Wert-abhängige Wirkung von Chlor auf <i>P. aeruginosa</i>	124
5.4.4 Überleben von <i>P. aeruginosa</i> in realen chlorhaltigen Trink- und Schwimmbeckenwässern....	128
5.4.5.Rolle der Alginatschleimbildung für das Überleben von <i>P. aeruginosa</i> -Umweltstämmen in Gegenwart von Chlor	132
5.4.5.1 Überleben von <i>P. aeruginosa</i> in Abhängigkeit von der Schleimbildung nach Chloreinwirkung	132
5.4.5.2 Überleben von <i>P. aeruginosa</i> nach Alginatschleimentfernung in Gegenwart von Chlor .	133
5.4.6 Rolle der Acetylgruppen im Alginat für das Überleben von <i>P. aeruginosa</i> in Gegenwart von Chlor	135
5.4.6.1 Chemische Acetylierung von Alginaten	135
5.4.6.2 Überleben von <i>P. aeruginosa</i> in Gegenwart von acetylgruppenhaltigen und -freien Alginaten nach Chloreinwirkung	140
5.4.7 Wirkung von möglichen Reaktionsprodukten auf das Überleben von <i>P. aeruginosa</i>	141
5.5. Charakterisierung der Reaktion von Chlor mit Alginaten.....	143
5.5.1 Veränderung des viskosimetrischen Verhaltens von bakteriellem Alginat in Gegenwart von Chlor	143
5.5.2 Veränderungen der physikalischen und chemischen Eigenschaften der Alginate nach Chloreinwirkung	151

5.6. Veränderung der Struktur der Zelloberfläche von <i>P. aeruginosa</i> in Gegenwart von Chlor ...	158
5.6.1 Hydrophobizitätsveränderung der Zelloberfläche von <i>P. aeruginosa</i> in Abhängigkeit vom Alginatschleim nach Chloreinwirkung	159
5.6.2 Veränderung des Proteinprofils der äußeren Membran von <i>P. aeruginosa</i> in Abhängigkeit vom Alginatschleim nach Chloreinwirkung	163
5.6.3 Veränderung des Lipopolysaccharidmusters von <i>P. aeruginosa</i> in Abhängigkeit vom Alginatschleim nach Chloreinwirkung	169
6. DISKUSSION	177
7. ZUSAMMENFASSUNG	207
8. LITERATURVERZEICHNIS	209