

Isolierung und Charakterisierung von
Bakterien aus Meeressedimenten
und ihr Potential zur Produktion von
antimikrobiellen Peptiden und
Polyketiden

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von
Katrín Kleinschmidt

Kiel 2012

Referent: Prof. Dr. Johannes F. Imhoff

Koreferent: Prof. Dr. Peter Schönheit

Tag der mündlichen Prüfung: 25.09.2012

Zum Druck genehmigt: 25.09.2012

gez. Prof. Dr. Lutz Kipp, Dekan

Inhaltsverzeichnis

I	Zusammenfassung	1
II	Abstract	3
III	Einleitung	5
III.1	Naturstoff-Forschung	5
III.2	Peptide	8
III.3	Polyketide	10
III.4	Sekundärmetabolit-Gencluster	12
III.4.1	Nicht-ribosomale Peptidsynthetasen (NRPS)	12
III.4.2	Polyketidsynthetasen (PKS)	14
III.5	Produktvorhersage bei Sekundärmetabolit-Genclustern	16
IV	Ziel dieser Arbeit	18
V	Material und Methoden	21
V.1	Probennahme der Sedimente	21
V.2	Bearbeitung der Sedimentproben	23
V.2.1	Verwendete Medien zur Kultivierung	23
V.2.2	Kultivierung und Konservierung der Bakterien Stämme	25
V.3	Molekularbiologische Arbeiten	26
V.3.1	DNA Extraktion	26
V.3.2	Identifizierung der Bakterien über Sequenzierung des 16S rDNA Gens	26
V.3.3	Nachweis von nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS)	27
V.3.4	Nachweis von Polyketidsynthetasen (PKS)	28
V.3.5	Gelelektrophorese	30
V.4	Anzucht und Extraktion von Bakterienkulturen	31
V.4.1	Anzucht von Bakterien in Flüssigkulturen	31
V.4.2	Extraktion von Kulturansätzen in 100 ml und 200 ml Maßstab	31
V.4.3	Extraktion von Kulturansätzen in 5 L und 10 L Maßstab	31
V.5	Aktivitätstests	32
V.5.1	Antimikrobielle Aktivität	32
V.5.2	Enzymassays	34
V.5.3	Zellkulturbasierte Assays	35
V.6	Chromatographische Messung	36
V.6.1	Messung der Extrakte mit der HPLC und dem MS	36
V.6.2	Fraktionieren der Extrakte mit der präparative HPLC	36
V.6.3	Aminosäureanalyse im GC/MS	36
V.6.4	Bestimmung der D/L-Konfiguration von Aminosäuren mit der HPLC/ELSD	37

V.7	Genomsequenzierung	38
VI	Kapitel	40
VI.1	Isolierung und Kultivierung von marinen Sediment-assoziierten Bakterien und ihr Potential zur Wirkstoffproduktion	40
VI.2	Stammspezifische Metabolitproduktion von <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Stämmen aus unterschiedlichen Meeresgebieten	63
VI.3	Chemische und genomische Untersuchungen zum Potential der Wirkstoffproduktion des <i>Bacillus</i> sp. Isolates gtP20b	82
VI.4	Chemische und genomische Untersuchungen zum Wirkstoffpotential des <i>Streptomyces</i> sp. Isolates C42 sowie Isolierung eines neuen nicht-ribosomalen Peptides	95
VII	Allgemeine Diskussion und Ausblick	113
VII.1	Kultivierung von marinen Bakterien zur Gewinnung neuer Wirkstoffproduzenten	113
VII.2	Neue Methoden zur Induzierung der Produktion und Identifizierung von Wirkstoffen	114
VIII	Literaturliste	117
IX	Danksagung	138
X	Anhang	139

I Zusammenfassung

Die Suche nach neuen Wirkstoffen ist in der heutigen Zeit aufgrund vermehrter Resistenzbildung gegen bekannte Antibiotika wichtiger denn je. Marine Mikroorganismen rücken dabei als Quelle neuer Wirkstoffe immer mehr in den Fokus. Diese Arbeit zeigt das aussichtsreiche Potential von marinen Sediment-assoziierten Bakterien zur Wirkstoffproduktion. Indem diese Bakterien aus verschiedenen, zum Teil vorher noch nicht untersuchten Standorten isoliert und kultiviert wurden, konnte ein großer Pool an potentiellen Kandidaten zur Wirkstoffproduktion geschaffen werden. Mit molekularbiologische Methoden, wie einem PCR-basiertem Screening mit spezifischen Primern für nicht-ribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) und Polyketidsynthetasen (PKS), sowie biologische Aktivitätstests mit ausgewählten Testorganismen konnte die Auswahl an Stämmen für weitere Arbeiten schnell und effizient eingegrenzt werden. Ausgewählte Isolate wurden chemischen und chromatographischen Analysen unterzogen um ihre Sekundärmetabolite zu identifizieren.

Von den in dieser Arbeit untersuchten Bakterien enthielten über 50 % mindestens ein Sekundärmetabolit-Gencluster einer nicht-ribosomalen Peptidsynthetase oder Polyketidsynthase und/oder wiesen antimikrobielle Aktivität gegen die Testorganismen auf. Insbesondere traf dies auf die Gram-positiven Bakterien der Gattungen *Actinobacteria* und *Firmicutes* zu.; aus diesen beiden Phyla wurden Stämme zur detaillierten Bearbeitung ausgesucht.

Ausgewählt wurden Vertreter von *Bacillus amyloliquefaciens* aus unterschiedlichen Sedimenten aufgrund ihrer Aktivitätsspektren und vorhandenen Sekundärmetabolit-Gencluster. Alle *B. amyloliquefaciens* Isolate inhibierten moderat bis stark mindestens zwei Testorganismen. Neun (von zehn) Isolate wiesen NRPS und/oder PKS Gencluster auf. Wie ein Vergleich der Metabolitspektren zeigte, produzierten diese Stämme verschiedene antimikrobiell wirksame nicht-ribosomale Lipopeptide (Substanzklassen der Surfactine, Iturine und Fengycine) sowie zwölf bislang nicht identifizierte Substanzen. Welche Substanzklasse der nicht-ribosomalen Lipopeptide produziert wurden war zum Teil stammspezifisch und herkunftsunabhängig. Der Vergleich zeigt, dass es sich auch lohnt in Stämmen, die auf der 16S rDNA Ebene eine hohe Similarität ($\geq 99,5$ %) haben nach neuen Metaboliten zu suchen.

Als weiteres Isolat wurde gtP20b (*Bacillus* sp.) ausgewählt. Der Rohextrakt von diesem Stamm inhibierte moderat bis stark die Testorganismen *Xanthomonas campestris* und *Candida glabrata* und zeigte im PCR-basierten Screening Gencluster für nicht-

ribosomale Peptidsynthetasen. Durch die Kultivierung von gtP20b in vier verschiedenen Medien wurden acht bekannte nicht-ribosomale Lipopeptide (Substanzklasse der Iturine, Surfactine und Fengycine), als auch sechs unbekannte Sekundärmetabolite detektiert. Das Genom dieses Stammes wurde komplett sequenziert um auch auf genetischer Ebene einen Einblick in das Potential zur Wirkstoffproduktion zu erhalten und die im Labor produzierten Metabolite mit den auf dem Genom enthaltenen Genclustern zu vergleichen. Für alle produzierten nicht-ribosomalen Lipopeptide konnten passende Gencluster identifiziert werden. Zusätzlich wurden bisher unbekannte Polyketidsynthase-Gencluster gefunden, deren Produkte noch identifiziert werden müssen.

Neben dem *Bacillus*-Isolat (gtP20b) zeigte auch ein *Streptomyces*-Isolat (C42) Hinweise auf eine vielversprechende Wirkstoffproduktion. Sekundärmetabolit-Gencluster von NRPS und PKS I konnten nachgewiesen werden, ebenso wie eine Inhibierung des Testorganismus *Candida glabrata*. In der chemischen und chromatographischen Auswertung der Metabolite konnte die Produktion von zwei bekannten Sphingolipiden und zwei unbekanntem Peptiden gezeigt werden. Mit Hilfe von HPLC/ELSD und GC/MS Analysen wurde die Aminosäuren und Konfigurationen des Peptides m/z 898,9 ermittelt. Von den acht enthaltenen Aminosäuren liegen fünf in der D-Konfiguration vor. Der Einbau von Aminosäuren in der D-Konfiguration in Mikroorganismen ist bislang nur über spezielle NRPS-Domänen bekannt. Dieses unbekanntes Peptid wird damit über eine nicht-ribosomale Peptidsynthetase synthetisiert. Bislang konnten, aufgrund des hohen GC-Gehaltes nur 60 % des Genoms sequenziert werden. Aber bereits auf diesem Teil wurden neun bekannte NRPS und PKS Gencluster sowie einige unbekannte Sekundärmetabolit-Gencluster identifiziert. Die genaue Anzahl unbekannter Gencluster kann erst festgestellt werden, wenn das Genom vollständig sequenziert, assembliert und annotiert ist. Dieser Stamm scheint jedoch eine vielversprechende Quelle für weitere neue Wirkstoffe zu sein.

Wie diese Arbeit zeigt, kann das Potential von Bakterien zur Wirkstoffproduktion durch die Kombination mikrobiologischer und molekularbiologischer Methoden gut erfasst werden. Im ersten Schritt werden Bakterien aus marinen Sedimenten isoliert und kultiviert. Um dann im zweiten Schritt Metabolite chemisch zu analysieren und ausgesuchte Genome zu sequenzieren. Neue Bakterien-Isolate aus marinen Sedimenten zeigen stammspezifische Unterschiede in der Metabolitproduktion und wiesen so bereits bekannte Bakterien-Taxa als vielversprechende Wirkstoffproduzenten aus.

II Abstract

As microbial resistance against known antibiotics increases, the search for new chemical structures becomes more important. Especially marine bacteria are of particular research interest as natural product producer. To further assess the potential marine bacteria from different sediments were isolated, cultivated and analyzed with chemical and biomolecular methods. To bypass the limitations of existing methods for natural product discovery the search for alternative strategies e.g. genome-based strategies, is necessary. For example PCR-based screening with special primers is a fast and efficient possibility to assess the potential of a species to produce natural products. It can therefore be used to select isolates for further tests.

Over 50% of the investigated isolates (especially *Actinobacteria* and *Firmicutes*) contained gene clusters for non-ribosomal peptid synthetases (NRPS) or polyketid synthetases (PKS) and/or show antimicrobial activity against some test organisms. Of these isolates the representatives of *Bacillus amyloliquifaciens* were chosen and their natural product production was compared to each other. The investigation of equal taxa from different habitats is not common. Nine (out of ten) *Bacillus amyloliquifaciens* isolates had secondary metabolite gene clusters and showed differences in the production of natural products. A location-independent production of different antimicrobial non-ribosomal lipopeptides (substance classes of surfactin, iturin and fengycin) and twelve unknown substances could be shown. This demonstrates that bacteria of the same taxon (16sRNA similarity $\geq 99,5\%$) are a viable source for the search of new substances.

Especially the taxa *Bacillus* and *Streptomyces* are known as good natural product producer. Two isolates were chosen (gtP20b *Bacillus* sp. and C42 *Streptomyces* sp.) and the metabolites and genomes were analyzed. The crude extract from isolate gtP20b inhibited the test organisms *Xanthomonas campestris* and *Candida glabrata* and it could detect gene clusters for NRPS with PCR. It produces non-ribosomal lipopeptides (substance classes iturine, surfactine and fengycine) as well as six unknown substances in culture. The genome sequencing revealed known NRPS gene clusters as well as unknown gene clusters for PKS and NRPS/PKS hybrid. The detected lipopeptides of isolate gtP20b were assigned to annotated NRPS gene clusters. The other putative gene cluster of PKS and hybrid systems contain a potential for novel natural products. The identification of these unknown gene cluster is still in progress.

The isolate C42 (*Streptomyces* sp.) was selected due to inhibiting to *Candida glabrata* and NRPS and PKS gene clusters detected during PCR. Two sphingolipids and two new unknown non-ribosomal peptides were identified with chemical and chromatographic methods. With HPLS/MS and GC/MS the identity and configuration of the eight amino acids of peptide m/z 898.9 was detected. The peptide m/z 898.9 contains D-alanine, D-phenylalanine, L-valine, D-valine, D-leucine, L- (allo) isoleucine and D- (allo) isoleucine. Amino acids with the D-configuration can only be incorporated into peptides with specially NRPS domains. This proves that the new peptide m/z 898.9 is synthesized with non-ribosomal synthetases. Approximately 60 % of the genome from C42 have been sequenced. The genome included a number of known and unknown NRPS and PKS gene clusters with putative products that could not be produced in the lab.

This work shows that the combination of cultivation and genome-based methods allows to take advantages of biosynthetic potential of marine bacteria. New isolates of known bacteria taxa from marine sediments show strain specific distinctions in the natural product production and are good producers for natural products.

III Einleitung

III.1 Naturstoff-Forschung

Naturstoffe werden seit langer Zeit von der Menschheit als Wirkstoffe genutzt und vielfältig eingesetzt. Naturstoffe sind organische Verbindungen, die von Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen produziert werden (Nuhn, 1997). Ein erster Meilenstein in der Naturstoff-Forschung war die Isolierung des Morphins aus dem Schlafmohn *Papaver somniferum* Anfang des 19. Jahrhunderts. Dieses wird auch heute noch aus dem Schlafmohn isoliert und in der Schmerztherapie eingesetzt (Heilmann, 2007).

Neben der Isolierung von Naturstoffen aus Pflanzen werden insbesondere Bakterien und Pilze als Produzenten untersucht. Zurzeit gibt es >230.000 niedermolekulare Naturstoffe wovon rund 20 % aus Mikroorganismen isoliert wurden (CRC, Dictionary of Natural Products, Version 19:2, 2010). Naturstoffe beinhalten eine große strukturelle Vielfalt wie Aminoglycoside, Makrolide, Peptide, Polyketide, Terpene, Nucleoside und Coumarine (Rokem et al., 2007). Diese werden in Form von Antibiotika, Virostatika, Cytostatika, Insektiziden und Biopestiziden wie Herbiziden eingesetzt. Dabei repräsentieren Antibiotika die industriell wichtigste Gruppe der Naturstoffe (Rokem et al., 2007) und machen den drittgrößten Markt im Arzneimittelsektor aus (Holzgrabe, 2004). Rund 250 Antibiotika auf Naturstoffbasis werden zurzeit kommerziell genutzt und erwirtschaften einen Gewinn von US\$ 25 Milliarden/Jahr (Rokem et al., 2007). Mit der Entdeckung des Penicillins im Schimmelpilz *Penicillium chrysogenum* (vormals *Penicillium notatum*) durch Alexander Fleming (1928) konnten erstmals Infektionen, die durch Grampositive Bakterien ausgelöst werden, geheilt werden. Damit hatte die Ära der Antibiotika begonnen. Selman Waksman definierte Anfang 1940 Antibiotika als „chemische Substanzen, die von einem Mikroorganismus gebildet werden und andere Mikroorganismen in ihrem Wachstum hemmen oder diese sogar töten.“

Mehr als 75 % aller antibakteriellen Wirkstoffe und etwa 50 % aller Antitumorsubstanzen sind entweder Naturstoffe oder Naturstoffderivate (Newman et al., 2003). Viele Leitstrukturen von Wirkstoffen sind ausgehend von Naturstoffen synthetisiert. Die synthetisch hergestellten Naturstoffe haben einige Vorteile gegenüber chemischen Synthetika, von denen bislang ca. 5 Mio. Strukturen bekannt sind (Abel et al., 2002; Boldi, 2004; Newman and Cragg, 2007). Sie unterliegen einer biologischen Evolution und ergänzen Synthetika bei der Besetzung des strukturchemischen Raumes. Daher sind sie deutlich häufiger biologisch aktiv (Bode and Müller, 2005). Bislang ist, mit der Antitumorsubstanz Nevaxar (zugelassen 2005), nur ein einziges vollsynthetisches Antitumor-

Medikament auf dem Markt (Newman and Cragg, 2007). Diese steht im Gegensatz zu den sechs marinen Naturstoffen, die alleine in den letzten Jahren als Medikamente zugelassen wurden (Tabelle 1).

Aufgrund von Antibiotika-resistenten und multiresistenten Krankheitserregern steigt der Bedarf an neuen Wirkstoffen immer mehr an (Walsh, 2003b). Dies ist eine Folge von zu häufigem Einsatz von Antibiotika, aber auch oftmals nicht konsequenter Einnahme. Bereits weniger als 10 Jahre nach Einführung des Penicillins (1940) zeigte der Krankenhauskeim *Staphylococcus aureus* erste Resistenzen (Palumbi, 2001; Walsh, 2003a). Und auch gegen Vancomycin, welches wirksam gegen Methicillin resistente *Staphylococcus aureus* Stämme war, sind Resistenzstämme bekannt (Kresken et al., 2001). Bei der erfolgreichen Behandlung von Infektionskrankheiten spielt daher das Auffinden neuer Wirkstoffe eine wichtige Rolle (Heilmann, 2007). Aber die Entdeckung von neuen Leitstrukturen ist schwierig und es erfolgt häufig nur eine Verbesserungen der Pharmakokinetik und -dynamik der Wirkstoffe. Einzig durch die Einführung des ersten Oxazolidinons, dem Linezolid, ist seit langem eine neue Strukturklasse entwickelt worden (Holzgrabe, 2004). Linezolid ist wirksam gegen viele, bereits resistente, Gram-positive Erreger wie beispielsweise Methicillin- und Vancomycin- resistente Stämme von *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis*. Linezolid ist als Arzneimittel zugelassen und hemmt die Initiation der Proteinbiosynthese an der 30S Untereinheit die mRNA und die N-Formyl-met-tRNA (Brauers, 2001; Holzgrabe, 2004) (www.clinicaltrials.gov, Stand Mai 2012).

Als vielversprechende Quelle für neue Wirkstoffe haben sich marine Organismen, insbesondere Bakterien und Pilze gezeigt (Debnath et al., 2007; Holzgrabe, 2004; Imhoff et al., 2011). Viele Substanzen deren Produzenten marinen Mikroorganismen sind, befinden sich in den klinischen Phasen und werden für ihren Einsatz in verschiedene Anwendungsfelder geprüft oder sind schon als Medikamente zugelassen (Tabelle 1). Vor allem die Substanzklassen der Peptide und Polyketide scheinen ein hohes Potential für den Einsatz als Medikamente zu haben. Von 18 in den verschiedenen klinischen Phasen befindlichen Wirkstoffen zählen alleine fünf zu diesen beiden Substanzklassen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Naturstoffe aus marinen Organismen in klinischen Phasen. Modifiziert nach <http://marinepharmacology.midwestern.edu/clinipipeline.htm> (Stand Mai 2012) (Gerwick and Moore, 2012; Mayer et al., 2010).

Klinischer Status	Substanz	Quelle (Produzent)	Strukturklasse	wirksam gegen
<u>zugelassenes</u>	Cytarabine, Ara-C	Schwamm (Bakterium)	Nucleosid	Krebs
<u>Medikament</u>	Vidarabine, Ara-A	Schwamm (Bakterium)	Nucleosid	Viren
	Ziconotide	Kegelschnecke	Peptid	Schmerz
	Trabectedin	Tunicata (Bakterium)	Alkaloid	Krebs
	Eribulin Mesylate	Schwamm (Bakterium)	Macrolid	Krebs
	Brentuximab Vedotin	Mollusca (Cyanobakterium)	Ergänzender Antikörper	Krebs
<u>Phase III</u>	Plitidepsin	Tunicata (Bakterium)	Depsipeptid	Krebs
<u>Phase II</u>	DMXBA	Wurm	Alkaloid	Schizophrenie
	Plinabulin	Pilz	Diketopiperazin	Krebs
	Elisidepsin	Mollusca (Bakterium)	Depsipeptid	Krebs
	Zalypsis	Nudibranchia (Bakterium)	Alkaloid	Krebs
	PM01183	Tunicata (Bakterium)	Alkaloid	Krebs
	CDX-011	Mollusca (Cyanobakterium)	Ergänzender Antikörper	Krebs
Phase II abgeschlossen	Bryostatin I	Bryozoe (Bakterium)	Polyketid	Krebs
<u>Phase I</u>	PM060184	Schwamm	k.A.	Krebs
	SGN-75	Mollusca (Cyanobakterium)	Ergänzender Antikörper	Krebs
	ASG-5ME	Mollusca (Cyanobakterium)	Ergänzender Antikörper	Krebs
	Marizomib (Salinosporamid A)	Bakterium	Beta-Lactone- gamma-Lactam	Krebs

Legende: k.A. Keine Angaben

III.2 Peptide

Peptide sind 6-100 Aminosäuren große, bei neutralem pH positive geladenen, amphipathische Moleküle (Hancock, 1997). Sie weisen vielfältige Aktivitäten gegen Bakterien, Pilze, Viren, Hefen und Protozoen auf (antimikrobielle Peptide, AMP) (Aley et al., 1994; Giuliani et al., 2007). Bislang sind über 800 AMP's bekannt (Giuliani et al., 2007). Sie kommen vom Prokaryoten bis zum Menschen in fast allen Klassen des Lebens vor und spielen in der Abwehrreaktion gegen Mikroorganismen eine große Rolle (Boman, 1995). Von Bakterien produzierte AMP's werden weltweit z.B. als Antibiotika, Pflanzenschutzmittel oder in der Kosmetik eingesetzt (Gordon et al., 2005; Hancock and Chapple, 1999).

In Mikroorganismen können antimikrobielle Peptide über zwei Synthesewege gebildet werden. Zum einen über die Proteinbiosynthese an Ribosomen und zum anderen über nicht-ribosomale Peptidsynthetasen. Letztere sind großen Multienzymkomplexe, die gleichzeitig Matrize und Biosynthesemaschine darstellen (Doekel and Marahiel, 2001). Durch den Einbau von nicht-proteinogene Aminosäuren weisen nicht-ribosomale Peptide eine größere strukturelle Diversität, im Vergleich zu ribosomal gebildeten Peptiden, auf (Hancock and Chapple, 1999; Schwarzer et al., 2003). Auch durch Modifikationen wie Methylierung, Acylierung und Glycosilierung die durch diese Synthetasen eingebaut werden, wird eine höhere Diversität erreicht. Bislang sind mehr als 300 verschiedene Seitenketten bekannt, die in nicht-ribosomale Peptide eingebaut werden können (Hancock and Chapple, 1999).

Antimikrobielle Peptide haben zwei wichtige Eigenschaften, die sie zu interessanten Substanzen, für die Suche nach neuen Therapeutika, machen. Zum einen ist die Resistenzentwicklung gegenüber AMP's gering. Zum anderen können sie selektiv toxisch auf Gram-positive oder Gram-negative Zellen, durch den unterschiedlichen Zellwandaufbau, wirken (Peschel and Sahl, 2006). Hauptwirkort von antimikrobiellen Peptiden bei Prokaryoten ist die Zellwand. Die Zellwand bei Gram-positiven Bakterien besteht aus ca. 25 Schichten Peptidoglykan und muss einen 5-fach höheren Zelldruck (2,5 MPa) aushalten als in Gram-negativen Bakterien. In Gram-negativen Bakterien besteht die Zellwand dagegen nur aus 1-2 Schichten Peptidoglykan auf der noch eine äußere Membran, aus Lipopolysacchariden und Phospholipiden, aufliegt. Die Lipopolysaccharide verleihen der Membranoberfläche einen stark hydrophilen Charakter. Durch Einlagerungen von Calcium- und Magnesium-Ionen wird die negative Ladung der Zellmembran teilweise kompensiert, was zur Stabilisierung erheblich beiträgt. Auf

Grund dessen besitzen Gram-negative Bakterien eine natürliche Resistenz gegenüber lipophilen Verbindungen zu denen auch viele Antibiotika gehören (Fuchs 2007, Allgemeine Mikrobiologie, 8. Auflage).

Antimikrobielle Peptide wirken innerhalb weniger Minuten und haben vielfältige Wirkweise. Das bakterielle produzierte Glycopeptid Vancomycin und das Lipoglycopeptid Teicoplanin inhibieren die Zellwandsynthese von Gram-positiven Bakterien (Kahne et al., 2005). Vancomycin bildet mit dem endständigen L-Lysin-D-Alanin-D-Alanin Rest des Murein einen Komplex und blockiert somit die Quervernetzung von neuen N-Acetylglucosamin und N-Acetylmureinsäure Molekülen (Barna and Williams, 1984; Chatterjee and Perkins, 1966; Parenti, 1988). Neben der Inhibierung von verschiedenen Schritten der Zellwandsynthese kann auch die intakte Membran von AMP's zerstört werden. Positiv geladene Peptide wie z.B. Polymyxin B und E (produziert von *Bacillus polymyxa*), wechselwirken mit der negativ geladenen Oberfläche des Mikroorganismus und bilden bei ausreichender Konzentration Kanäle, so dass die Membran durchlässig wird (Bals, 2000; Feingold et al., 1974; Kahne et al., 2005). Aufgrund des unterschiedlichen Zellwandaufbaus von Mikroorganismen sind Polymyxine häufig unwirksam gegen Gram-positive Bakterien. Polymyxin E, eingesetzt unter dem Namen Colimycin, wirkt z.B. gegen den Gram-negative Krankheitserreger *Pseudomonas aeruginosa*. Das Lipopeptide Daptomycin dringt ebenfalls in die Membran ein, bindet in Anwesenheit von Calcium-Ionen an die anionischen Seiten der Lipopolysaccharide und bildet dort Kanäle (Jensen et al., 1987). Die Zellmembran wird damit durch die ein- oder austretenden Ionen depolarisiert (Straus and Hancock, 2006). Durch solche Kanäle können auch antimikrobielle Peptide in das Cytosol gelangen und dort mit Molekülen wie DNA, RNA oder Proteinen wechselwirken und so deren Synthesen inhibieren. Rifamycine hemmen die RNA Polymerase in Mycobakterien und Gram-positiven Bakterien (Giuliani et al., 2007). Gramicidin S dagegen weist eine sehr gute Aktivität sowohl gegen Gram-negative als auch Gram-positive Bakterien sowie dem Pilz *Candida albicans* auf (Khodursky and Cozzarelli, 1998; Mitscher, 2005). Einige Peptide können Endotoxine z.B. Lipid-A Komponente der Lipopolysaccharidschicht von Gram-negativen Bakterien, binden und inaktivieren (Mitscher, 2005).

Viele AMP's sind seit Jahrzehnten bekannt. Um neue wirksame Peptide aufzufinden, werden mehrere Ansätze verfolgt. Zum einen werden bekannte Peptide zur Veränderung der Toxizität und besseren Bioverfügbarkeit chemisch modifiziert. So wurden die bereits bioaktiven Streptogramine (bekannt seit 1950) verändert, um sie wasserlöslicher zu machen und so ihre Aufnahme zu verbessern. Durch diese Modifikation haben die

semisynthetischen Streptogramine die klinische Phase III gegen Gram-positive Bakterien erfolgreich durchlaufen (Bals, 2000).

Der zweite Ansatz ist die genetische Manipulation von Modulen in nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen. Durch einen Austausch in einem Modul der ersten Synthetase von Surfactin (SrfA-A) wurde der Einbau von Leucin durch ein Ornithin ersetzt. Dadurch wurde eine Konformationsänderungen des Surfactins erhalten und die Wirksamkeit wurde erhöht (Hancock and Chapple, 1999).

Als dritte Methode werden Peptide als Matrize für Synthesen genutzt. Durch verschiedene Ringgrößen, unterschiedliche Ladungen, veränderte hydrophobe Eigenschaften oder andere Aminosäuren wurden z.B. eine Reihe von Varianten von Gramicidin S hergestellt. Diese wiesen eine höhere Selektivität, und damit bessere Wirksamkeit für Bakterienzellen als für Säugetierzellen, auf (Schneider et al., 1998).

III.3 Polyketide

Polyketide sind vielfältige Naturstoffe zu denen Polyether, Polyene, Polyphenole, Makrolide und Endiine gehören. Polyketide werden über Multienzymkomplexe, die Polyketidsynthasen (PKS), synthetisiert (Kondejewski et al., 1996). Grundbausteine jedes Polyketides sind Acetat und Propionat, die ähnlich der Fettsäuresynthese miteinander verknüpft werden. Polyketide werden vor allem von Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze und Cyanobakterien produziert und dienen als Pigmente, Virulenzfaktoren, Boten- oder Abwehrstoffe sowie für den Menschen als Quelle für Therapeutika (Du and Lou, 2010). Sie werden vielfach als Antibiotika, Antiimmunsuppressiva, Antiparasitika, Cytostatika und als Cholesterin-Senker eingesetzt (Hertweck, 2009).

Einige Beispiele für die Vielfalt der bakteriell produzierten Polyketide sollen hier genannt werden. Ein bekannter NRPS/PKS Hybrid ist das Salinisporamid A. Dieses wird von dem obligat marinen Bakterium *Salinispora tropica* produziert und ist ein starker Proteasominhibitor und Antitumorwirkstoff (O'Hagan and Collie, 1991). Ebenfalls cytotoxische Eigenschaften haben Bryostatin I, Anthracycline (Hildebrand et al., 2004), Onnamid (Oki, 1977) und Saliniketal A und B (Piel et al., 2004) die alle von marinen Bakterien produziert werden. Bryostatin I wird von dem bislang nicht kultivierbarem Symbiont *Candidatus Endobugula sertula* produziert und hat die klinische Phase II abgeschlossen (Feling et al., 2003; Gulder and Moore, 2010) (<http://clinicaltrials.gov>, Stand Mai 2012).

Neben diesen cytotoxischen Substanzen sind auch eine Reihe von Polyketiden als Antibiotika bekannt. Der marine Tiefseestamm *Verrucosispora* sp. produziert eine Reihe

von polycyclischen Polyketiden, unter anderem auch Abyssomycin C, dessen Target die Hemmung der p-Aminobenzoat Biosynthese ist (Williams et al., 2007). Ein weiteres bakteriostatisches Polyketid ist das Enterocin, welches von *Streptomyces maritimus* produziert wird (Fenical and Jensen, 2006). Verschiedene Tetracycline inhibieren die mikrobielle Proteinbiosynthese, indem sie die Verbindung der tRNA mit der ribosomalen Untereinheit verhindern. Damit sind die Tetracycline gute Inhibitoren von Gram-positiven sowie Gram-negativen Bakterien als auch den parasitär lebenden Mycoplasmen und Rickettsien (Cheng et al., 2007). Aus einem *Micromonospora* sp. Stamm (isoliert aus einer Sedimentprobe) wurden die Marinomycine A-D isoliert. Diese Makrolide bilden eine neue Klasse der Polyketide. Ihr Wirkspektrum reicht von der Inhibierung verschiedener Melanomzellen bis zu Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* und Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium* Stämmen (Chopra and Roberts, 2001). Zwittermycin A, aus *Bacillus cereus*, ist ein hoch funktionalisiertes Antimykotikum. Es inhibiert das Wachstum von dem phytopathogenen Oomyceten *Phytophthora medicaginis* und schützt so z.B. Alfalfa, Tabak und Gurken vor dessen Befall (Kwon et al., 2006). Ein Beispiel eines anti-anthelmintisch wirkenden Polyketides ist das Macrolid Avermectin, welches aus *Streptomyces avermectin* isoliert wurde (He et al., 1994). Mit all diesen Beispielen zeigt sich die große Vielfalt der Polyketide und deren Anwendungsbereiche.

III.4 Sekundärmetabolit-Gencluster

Die Anordnung von Genen für die Biosynthese von Wirkstoffen erfolgt auf dem bakteriellen Genom in Sekundärmetabolit-Genclustern. Solche Sekundärmetabolit-Gencluster sind in den letzten Jahren immer mehr Ziele für Untersuchungen zur Wirkstoffproduktion in Mikroorganismen geworden (Ikeda et al., 1999). Insbesondere die Gencluster für nicht-ribosomale Peptidsynthetase und Polyketidsynthetasen spielen bei der Entdeckung von neuen Wirkstoffen eine große Rolle.

III.4.1 Nicht-ribosomale Peptidsynthetasen (NRPS)

Nicht-ribosomale Peptidsynthetasen sind multifunktionale Enzymkomplexe mit einer Größe von 100-1700 kDa (Marahiel et al., 1997), die gleichzeitig Matrixe und Biosynthesemaschine darstellen (Marahiel et al., 1997). Durch nicht-ribosomale Peptidsynthetasen kann eine höhere Diversität an Moleküle synthetisiert werden, die durch die Ribosomen nicht oder nur unter hohem energetischen Aufwand synthetisiert werden können (Doekel and Marahiel, 2001). Bekannte nicht-ribosomale Peptide wie Penicillin G, Cephamycin C und Vancomycin werden seit langem als Antibiotika eingesetzt (Schwarzer et al., 2003).

NRPS sind aus Modulen aufgebaut, die aus insgesamt ca. 1000 Aminosäuren bestehen (Fischbach and Walsh, 2006). Module wiederum bestehen aus unterschiedlichen Domänen. Jedes Modul enthält als Minimum drei Domänen: Die Adenylierungs (A)-, die Peptidyl-Carrier-Protein (PCP oder T)- und die Kondensations (C)- Domäne (Fischbach and Walsh, 2006) (Abbildung 1). Die Module können modular oder iterativ genutzt werden.

Die A- Domäne (Größe ca. 550 Aminosäuren) ist für die spezifische Substraterkennung und die ATP-abhängige Aktivierung zum energiereichen (Amino-)Acyl-Adenylat verantwortlich (Fischbach and Walsh, 2006). Das aktivierte Substrat wird durch die PCP-Domäne (Größe ca. 80 AS) an die nächste Domäne weitergegeben. Durch die C- Domäne (Größe ca. 450 AS) werden die verschiedenen aktivierten Substrate durch eine Peptidbindung miteinander verknüpft und so das Produkt verlängert (Stachelhaus et al., 1999). Auf diese Weise ist jedes Modul für die Kettenverlängerung des Produktes um eine Aminosäure verantwortlich (Ehmann et al., 2000). Durch die terminal an der letzten C- Domäne lokalisierten TE-Domäne (Größe ca. 250 AS) wird das fertige Molekül abgespalten (Schwarzer and Marahiel, 2001) (Abbildung 2).

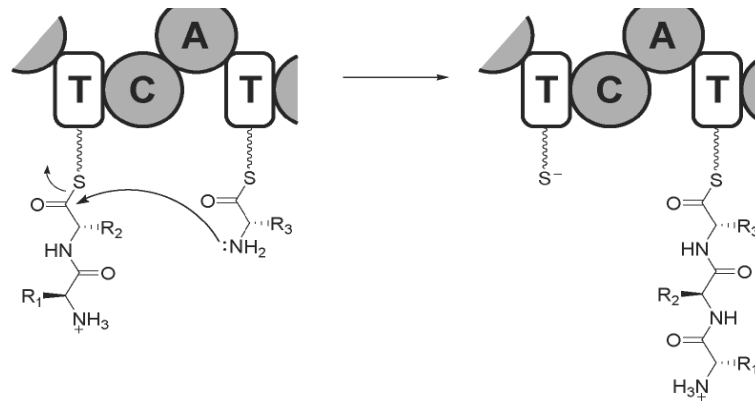


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Minimal-Moduls einer modularen NRPS (Mootz et al., 2002).

Nicht-ribosomale Peptide zeichnen sich besonders durch ihre strukturelle Vielfalt aus. Diese wird durch Modifikationen des Moleküls mit zusätzlichen ungewöhnlichen Domänen gewährleistet (Sieber and Marahiel, 2005). Solche Domänen können eine Epimerisierungs (E)- Domäne sein, die für eine Racemisierung des enzymgebundenen (Amino-)Acyl-Adenylat zur D-konfigurierten α -Aminosäure verantwortlich ist. Ebenso kommen eine N- oder C- Methylierung durch eine Methyltransferase- Domäne, sowie eine N- Formylierung durch eine Formyltransferase (F)- Domäne vor. Die Heterozyklisierung der Seitenketten wird durch die Zyklisierungs (Cy)- Domäne gewährleistet. Diese Domäne ersetzt in den entsprechenden Modulen die C- Domäne, sodass aus einem linearen ein ringförmiges Molekül wird (Walsh et al., 2001). Durch die Ringstrukturen und Modifikationen sind die Peptide besonders stabil (Walsh et al., 2001). Mit Hilfe von diesen und weiteren Domänen können einige hundert verschiedene Aminosäuren eingebaut und modifiziert werden (Sieber and Marahiel, 2005).

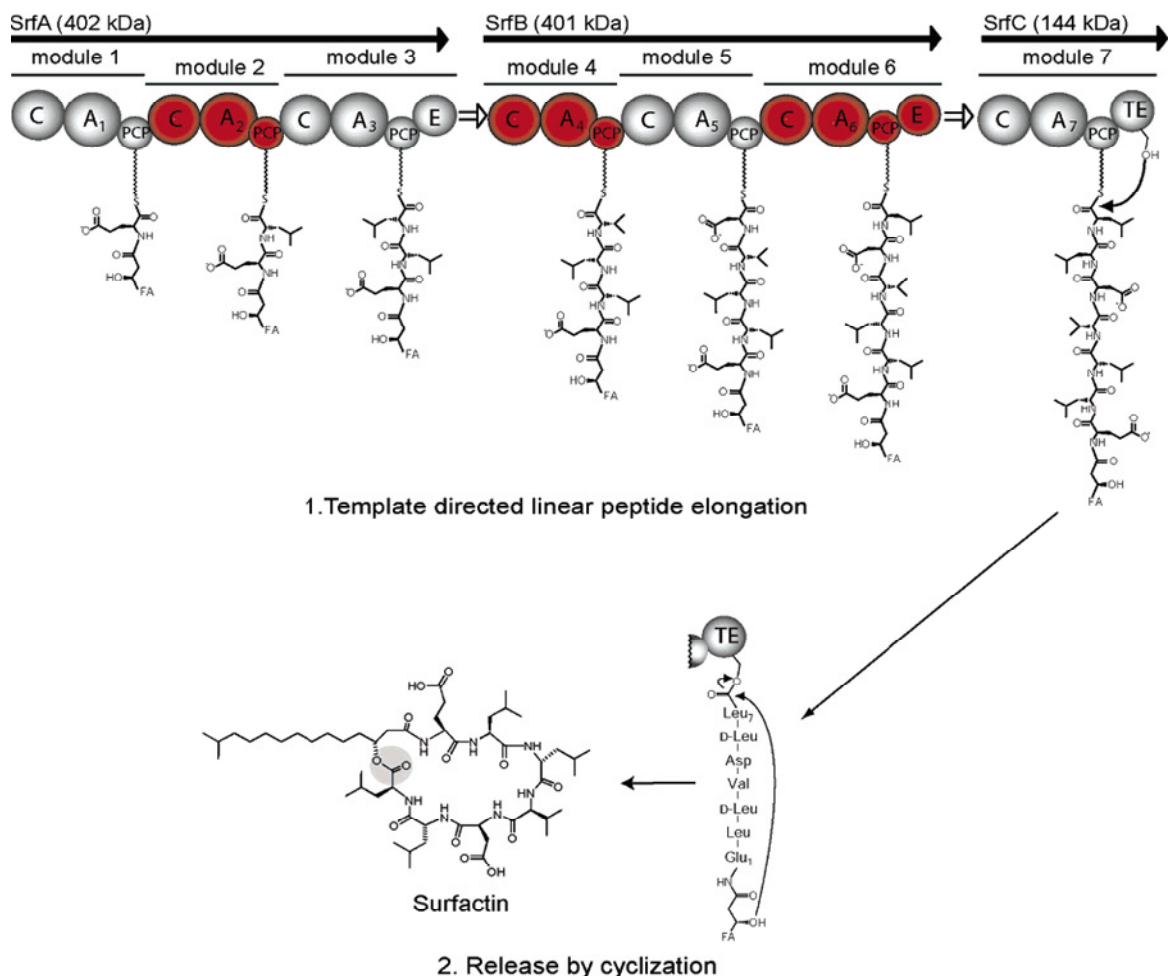


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Surfactin Synthese. Das Peptid wird von drei NRPS synthetisiert (Sieber and Marahiel, 2003).

Die A-Domäne hat, aufgrund ihrer Substratspezifität, besondere Aufmerksamkeit erfahren. So fanden Wissenschaftler heraus, dass alle A-Domänen eine 30-60 % Similarität der Aminosäuresequenz aufweisen (Doekel and Marahiel, 2001). Teile der A-Domäne sind besonders konservativ, so dass eine Vorhersage der putativ eingebauten Aminosäuren bei modularen Systemen möglich ist (Turgay et al., 1992). Durch einen Vergleich der Aminosäuresequenz von 154 A-Domänen konnten die 10 Aminosäuren der Binde-tasche, die für die Substraterkennung verantwortlich sind, identifiziert werden. Die ersten neun Aminosäuren variieren je nach Substrat und Domäne während die zehnte Aminosäure immer Lysin ist (Challis et al., 2000; Stachelhaus et al., 1999).

III.4.2 Polyketidsynthasen (PKS)

Polyketidsynthasen (PKS) sind, ebenso wie nicht-ribosomale Peptidsynthetasen, multi-funktionelle Enzyme, die aus Modulen und Domänen aufgebaut sind (Challis et al., 2000). Polyketidsynthasen werden in drei Typen eingeteilt, die alle auch in Bakterien vorkommen. Typ I ist ein einziges großes Enzym und besteht aus Modulen, die entwe-

der modular oder iterativ genutzt werden. Sie produzieren Makrolide, Polyether und Polyene wie z.B. Erythromycin (Makrolidantibiotikum), Rapamycin und Epothilone (Du and Lou, 2010; Schwarzer and Marahiel, 2001). Polyketidsynthasen vom Typ II bestehen aus mehreren Enzymen, arbeiten nur iterativ und produzieren polycyclische aromatische Moleküle wie z.B. das Breitbandantibiotikum Tetracyclin (Ginolhac et al., 2004) (Abbildung 3). Polyketidsynthasen III kommen ebenfalls nur iterativ vor und sind für die Produktion von z.B. Germicidin verantwortlich (Chopra and Roberts, 2001; Du and Lou, 2010; Fischbach and Walsh, 2006; Walsh and Fischbach, 2010).

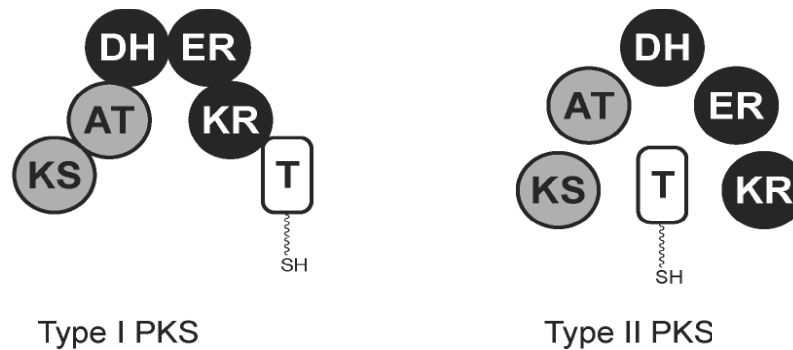


Abbildung 3: Schematischer Aufbau einer iterativen Polyketidsynthase I und II (Song et al., 2006).

PKS nutzen im Gegensatz zu den NRPS nur zwei Biosynthesebausteine die miteinander verknüpft werden, Acetat und Propionat. Die Module bestehen, wie in NRPS, mindestens aus drei Domänen. Die Acyltransferase (AT) besteht aus ca. 350 Aminosäuren und wird durch ein aktiviertes Substrat wie Malonyl oder Methylmalonyl-CoA geladen. Das Acyl-Carrier-Protein (ACP oder T, 80-100 AS) ist für die Weitergabe an die Ketosynthase (KS, 450 AS) verantwortlich. Diese katalysiert die Verlängerung des Polyketids. Die KS-Domäne besitzt hoch konservierte Bereiche die in dem molekularbiologischen Nachweis für Polyketidsynthasen als Target für spezifische Primer dienen (Fischbach and Walsh, 2006). Durch eine Thioesterase (TE)- Domäne wird das fertige Produkt von der Polyketidsynthase entlassen (Lopez, 2004) (Abbildung 4).

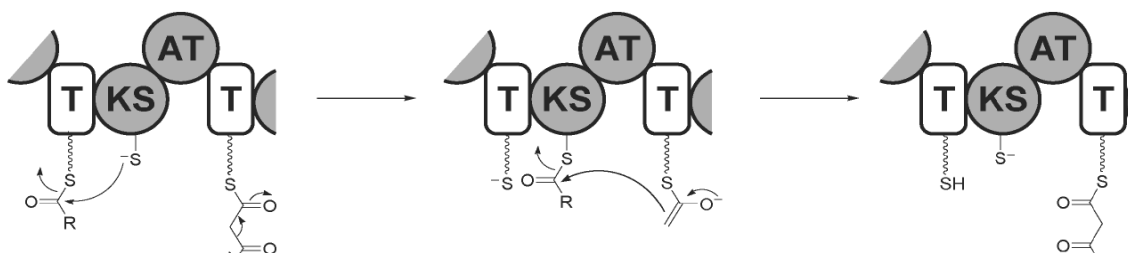


Abbildung 4: Schematischer Aufbau einer modularen Polyketidsynthase (Hopwood, 1997; Katz, 1997).

Die hohe strukturelle Vielfalt wird, im Gegensatz zu NRPS, nicht durch unterschiedliche Substrate hervorgerufen, sondern nur durch die Reduktion, Hydrolytation und Gly-

colysierung der Ketogruppen (Fischbach and Walsh, 2006). Diese Reaktionen werden durch die Ketoreductase (KR)-, Dehydratase (DH)- und Enoylreductase (ER)- Domäne katalysiert.

Neben den klassischen NRPS und PKS gibt es auch NRPS/PKS Hybride wie das Rapamycin, das von *Streptomyces hygroscopicus* produziert wird (Hopwood, 1997). Kendomycin, produziert von *Streptomyces violaceoruber*, wird durch ein PKS I/III Hybrid katalysiert. Bei solchen Systemen werden Domänen aus beiden Enzymsystemen genutzt, um ein Molekül zu synthetisieren.

III.5 Produktvorhersage bei Sekundärmetabolit-Genclustern

Durch die Sequenzierung kompletter Genome ist die Möglichkeit unbekannter Sekundärmetabolit-Gencluster zu finden, die für neue bioaktive Substanzen codieren, stark angestiegen. Mit einem als 'Genome Mining' bekannten Verfahren wird die genomische Information genutzt um neue Prozesse, Zielmoleküle und Produkte zu identifizieren. Besonders NRPS und PKS-Gencluster sind in den Focus für solche Untersuchungen gerückt (Schwecke et al., 1995).

Alle modular aufgebauten NRPS und PKS folgen einer logischen Reihenfolge beim Einbau der Substrate, so dass eine Vorhersage des Produktes bei modularen Systemen möglich ist. Durch konservierte Bereiche der A-Domänen in NRPS und der KS-Domäne in PKS kann eine Vorhersage der eingebauten Substrate und so auch eine putative Produktvorhersage erfolgen (Challis, 2008). Bei repetitiven PKS I Systemen ist aufgrund der verringerten Modulanzahl von nur jeweils einer AT-, KS-, ACP- und TE-Domäne ebenfalls eine Produktvorhersage möglich. In dieser KS-Domäne ist, neben der Information welches Substrat genutzt wird, auch gespeichert, wie oft dies geschieht. Bei iterativen Systemen, dem Ausfall von Module oder beim Einbau von Modifikationen ist die Vorhersage des Produktes jedoch schwierig (Challis et al., 2000; Stachelhaus et al., 1999).

Beispiele für erfolgreiche Vorhersagen von Produkten beider Genclustersysteme gibt es einige. Eine erfolgreiche Identifizierung eines Produktes einer repetitiven, modularen PKS I ist Salinilactam A. Salinilactam A wird durch ein 80 kb großes PKS I Gencluster in *Salinispora tropica* CNB-440 produziert (Challis, 2008). Mit Hilfe von 'Genome Mining' konnte das unbekannte NRPS/PKS Hybrid-Gencluster *pksX* aus *Bacillus* spp. dem antibakteriell wirksamen Bacillaen zugeordnet werden (Udwary et al., 2007). Ebenfalls durch eine Strukturvorhersage konnte das Produkt des *cch* Clusters (Coelichin) entdeckt werden. Es zeigte sich, dass das Produkt des NRPS-Genclusters eventuell

Eisen bindet und somit eine Rolle im Eisentransport spielt. Durch veränderte Kulturbedingungen konnte das nicht-ribosomale Peptid Coelichin aus *Streptomyces coelicolor* isoliert werden (Challis, 2008). Ein weiteres nicht-ribosomales Peptid wurde durch ‘Genome Mining’ in *Pseudomonas fluorescens* gefunden. Dabei handelt es sich um Orfamid A, ein Leucin-reiches Lipopeptid, welches moderat antifungal gegen den Krankheitserreger *Candida albicans* wirkt (Challis and Ravel, 2000).

Durch diese Beispiele zeigt sich, dass auch immer mehr Genom-basierte Methoden bei der Suche nach neuen Wirkstoffen erfolgreich sind und damit in den Fokus der Wirkstoff-Forschung rücken.

IV Ziel dieser Arbeit

Mit dieser Arbeit sollte das Potential zur Wirkstoffproduktion von Bakterien aus marinen Sedimenten erfasst werden. Dazu wurden neben der Isolierung eine Reihe von kultivierungsabhängigen, molekularbiologischen und chemischen Methoden sowie biologischen Aktivitätstests herangezogen. Die heterotrophen Bakterien stammten aus 12 verschiedenen Meeresgebieten, inklusive noch nicht untersuchte Standorte, und gehörten unterschiedlichsten Taxa an. Die Isolierung, Kultivierung und die Einschätzungen zum Potential zur Wirkstoffproduktion von marinen Sediment-assoziierten Bakterien verschiedener Gebiete wurden bislang, in diesem Umfang, noch nicht durchgeführt.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse wurden in vier separaten Kapiteln mit eigener Einleitung, Ergebnissteil und Diskussion beschrieben. Der für alle Kapitel fast identische Material- und Methodenteil wird im Vorfeld aufgeführt. Im Anschluss der einzelnen Kapitel erfolgt eine abschließende Diskussion der Methoden, der Ergebnisse hinsichtlich der Bedeutung von Bakterien aus Meeressedimenten für die Wirkstoffproduktion und möglichen weiteren Arbeiten.

Kapitel 1: Isolierung und Kultivierung von marinen Sediment-assoziierten Bakterien und ihr Potential zur Wirkstoffproduktion

In diesem Kapitel wird die Isolierung, Kultivierung und Identifizierung, mittels 16S rDNA Sequenzierung, von marinen heterotrophen Bakterien aus verschiedenen Sedimentproben beschrieben. Die Einschätzungen zum Potential zur Wirkstoffproduktion erfolgte bei den Isolaten durch molekularbiologische (Nachweis von Sekundärmetabolit-Genclustern wie NRPS und PKS) und chromatographische Methoden (chemische Analyse und teilweise Identifizierung der Metabolite) sowie biologischen Aktivitätstests. Auf Grundlage der hier erzielten Ergebnisse konnten besonders vielversprechende Isolate und Taxa zur näheren Charakterisierung ausgewählt werden. Diese werden in den nächsten Kapiteln beschrieben.

Kapitel 2: Stammspezifische Metabolitproduktion von *Bacillus amyloliquefaciens* Isolaten aus unterschiedlichen Meeresgebieten

Die in dieser Arbeit isolierten zehn *Bacillus amyloliquefaciens* Stämme wurden auf die Existenz von Sekundärmetabolit-Genclustern, die biologischen Aktivitäten ihrer Rohextrakten und die produzierten Metabolite hin untersucht. Terrestrische Vertreter von *Bacillus amyloliquefaciens* wurden in vorherigen Studien als vielversprechende Wirkstoffproduzenten, besonders für anti-phytopathogene Substanzen, identifiziert. Eine Untersuchung von marinen Isolaten dieser Art aus unterschiedlichen Meeressedimenten wurde bislang –soweit bekannt– noch nicht durchgeführt. Daher standen die Frage nach Variationen innerhalb der Metabolitspektren, der Aktivitätsspektren der Rohextrakte sowie ein Vergleich der Metaboliten von *B. amyloliquefaciens* Vertreter aus terrestrischen Quellen im Vordergrund.

Kapitel 3: Chemische und genomische Untersuchungen zum Potential der Wirkstoffproduktion des *Bacillus* sp. Isolates gtP20b

Bacillus Stämme zeigen bereits ihr Potential zur Wirkstoffproduktion und sind als sichere Organismen in biotechnologischen Verfahren vielfach eingesetzt. Die stammspezifischen Unterschiede zur Sekundärmetabolit-Produktion (siehe auch Kapitel 2) und die genomischen Unterschiede machen aber weiterhin einzelne Stämme zu vielversprechenden Kandidaten. Daher wurde in diesem Kapitel das *Bacillus* sp. Isolat gtP20b aus einem Sediment des Indischen Ozeans eingehend untersucht. In den vorangegangenen Untersuchungen war Isolat gtP20b auf Grund der biologischen Aktivität und dem Nachweis eines NRPS Genclusters aufgefallen. Neben Kultivierungsversuchen zur Steigerung und Veränderung der Metabolitproduktion sowie der chemischen Auswertung der produzierten Metabolite wurde das Genom dieses Stammes vollständig sequenziert. Dadurch konnten Einblicke in das genomische Potential dieses Stammes zur Wirkstoffproduktion erhalten werden und ein Vergleich der im Labor produzierten Metabolite mit den putativen Genclustern/Produkten konnte erfolgen.

Kapitel 4: Chemische und genomische Untersuchungen zum Wirkstoffpotential des *Streptomyces* sp. Isolates C42 sowie Isolierung eines neuen nicht-ribosomalen Peptides

Eine weitere interessanten Gruppe von Wirkstoffproduzenten ist die der Streptomyce-ten. Ein in dieser Arbeit isolierter *Streptomyces* sp. Stamm C42 zeigte in dem PCR-basierten Screening Hinweise für NRPS und PKS I sowie eine Inhibierung des Testorganismus *Candida glabrata*. Durch Kultivierungsversuchen mit verschiedenen Medien konnte die Produktion eines unbekanntes Peptides induziert werden. Die Isolierung und nähere Charakterisierung des Peptides stand daher in diesem Kapitel im Vordergrund. Die Sequenzierung des Genoms brachte Aufschluss über das genomische Potential zur Wirkstoffproduktion, insbesondere zu den Multienzymen NRPS und PKS. Durch die Verwendung beider Methoden, der kulturabhängigen Produktion von Metaboliten und der Sequenzierung des Genoms, konnte eine Abschätzung über noch unbekanntes Sekundärmetabolit-Gencluster und deren mögliche Produkte erfolgen.

V Material und Methoden

V.1 Probennahme der Sedimente

Die Grundlage für die Isolierung von Vertretern möglichst vieler verschiedener Bakterien-Taxa bildeten Sedimentproben aus unterschiedlichen Meeresgebieten. Die Proben wurden zwischen 1998 und 2010 auf Forschungsfahrten und Tauchgängen genommen (Tabelle 2). Die Expeditionen zu elf marinen Gebieten für die Probennahme wurden von den Forschungsschiffen des Geomar | Helmholtz-Zentrum für Ozeanforschung (Kiel) und der Universität Hamburg durchgeführt und umfassten alle Weltmeere außer dem Pazifik. Von den elf Expeditionen wurden Proben aus 18 unterschiedlichen Stationen für die Kultivierung von Bakterien ausgewählt. Darunter sind acht Stationen mit Probenstandorten tiefer als 1000 m. Unter den insgesamt 29 Proben sind 21 Sedimentproben, eine Probe von der Oberfläche eines Probenahmeegerätes (T-Logger) und eine Muschelfuss-Probe (Tabelle 2). Auf den Forschungsschiffen wurden folgende Geräte für die Sedimentprobennahme verwendet: Multicorer, Schwerelot, TV-Greifer, Remote Operate Vehicle und Gravity Corer. Die Proben wurden in sterile Gefäße überführt und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C (Probennahme vor 2007) bzw. 4 °C (Probennahme 2007-2010) gelagert.

Die Isolierung von Sediment-assoziierten Bakterien war schon häufig erfolgreich und ist ein vielversprechender Ansatz um Bakterien für die Wirkstoffproduktion zu gewinnen. Einige Wirkstoffe aus marine Bakterien aus dem Atlantik, der Ostsee, der Nordsee dem Mittelmeer, dem Indischen Ozean und dem Atlantik sind isoliert und identifiziert worden (Abdel-Mageed et al., 2010; Bister et al., 2004; Gärtner et al., 2011a; Hawas et al., 2009; Hughes et al., 2009b; Mitova et al., 2008; Romero et al., 1997). Aus Sediment-assoziierten Bakterien aus dem Bereich der Arktis und Antarktis sind nach unserem Wissen noch keine Wirkstoffe identifiziert worden. Aber auch die Sedimente, aus denen schon Wirkstoffe isoliert worden sind, haben ein noch nicht abzuschätzendes Potential von neuen Bakterien, die unbekannte Substanzen produzieren können. Daher ist die Isolierung von marinen Sediment-Bakterien auch weiterhin ein aussichtsreicher Ansatz, um neue Wirkstoffe zu isolieren.

Tabelle 2: Stationsdaten der untersuchten Sedimente.

Jahr	Fahrt	Gebiet	Koordinaten	Station	Sediment- probe (cm)	Wasser- tiefe (m)	Bezeich- nung
1998	Sonne 130	Indischer Ozean	23°33. N/65°19. E	281-MC	0-1	1274	G
1998	Sonne 130	Indischer Ozean	24°51. N/65°57. E	309-MC	0-2	608	P
1999	Meteor 44/4	Östl. Mittelmeer (Urania)	35°00. N/21°00. E	294 MUC	0-5	3457	I
2001	Sonne 155	Bransfieldstraße	62°19. S/57°27. W	11-SL	0-1	1059	L
2001	Sonne 155	Bransfieldstraße	62°19. S/57°27. W	11-SL	435	1059	S
2001	Sonne 155	Bransfieldstraße	62°19. S/57°27. W	33-MUC	0-1	1043	N
2001	Sonne 155	Bransfieldstraße	62°19. S/57°27. W	37-SL	0-5	1040	O
2001	Sonne 155	Bransfieldstraße	62°96. S/60°65. W	50-MUC	0-1	163	A
2001	Alkor 156	Gotlandbecken	57°17. N/20°07. E	AL 93	0-1	240	C
2001	Alkor 156	Gotlandbecken	57°17. N/20°07. E	AL 93	95-100	240	F
2002	ARK XVIII/1a	Dänemarkstraße	64°37. N/31°41. W	012-2 MUC	0-1	2402	E und II
2003	ARK XIX/4a	östliche Grönlandsee	76°08. N/13°06. W	487-1 MUC	0-1	236	M
2003	ARK XIX/4a	östliche Grönlandsee	74°18. N/13°06. W	586-1 MUC	0-1	75	B
2005	Meteor M64/1	Lilliputfeld	4°48. S/12°22. W	132 GTV	0-4	66	K
2005	Meteor M64/2	Logatchev Hydrothermalfeld	14°45. N/44°58. W	232 ROV	A	3000	T
2005	Meteor M64/2	Logatchev Hydrothermalfeld	14°45. N/44°58. W	263 ROV	B	3005	Q
2005	Sonne 185	Timorgraben	12°00. S/122°00. E	18488-4	0-1	555	D
2006	MS Merian 03/2	Logatchev Hydrothermalfeld	14°45. N/44°58 W	GC 946	5	3000	R
2006	MS Merian 03/2	Logatchev Hydrothermalfeld	14°45. N/44°58 W	GC 946	95	3000	Y
2007	Meteor 73/2	Mittelmeer (Panarea)	15°1. N/38°61. E	891	0-1	75	J
2007	Meteor 73/2	Mittelmeer (Panarea)	15°06. N/38°37. E	907	0-4	66	H
2007	Meteor 73/2	Mittelmeer (Panarea)	15°06. N/38°37. E	907	20	66	H
2007	Meteor 73/2	Mittelmeer (Panarea)	15°06. N/38°37. E	907	35	66	H
2008	Littorina	Ostsee (Kattegat)	25°30. N/ 21°36. E	1 Kern 1	0-1	34	U
2008	Littorina	Ostsee (Kattegat)	25°30. N/ 21°36. E	1 Kern 2	0-1	34	V
2010	Tauchgang	Ostsee (Strande)	54°26. N/10°10. E	Muschel- schalengrund	0-1	1	X
2010	Tauchgang	Ostsee (Strande)	54°26. N/10°10. E	Sandboden	0-1	1	W
2010	Tauchgang	Ostsee (Strande)	54°26. N/10°10. E	Anoxische Kuhle	0-1	5	Z
2010	Tauchgang	Ostsee (Strande)	54°26. N/10°10. E	Schlickgrund	0-1	5	XX

Legende: MC oder MUC: Multicorer, SL: Schwerelot, GTV: TV-Greifer, ROV: Remote Operate Vehicle, GC: Gravity Corer;

A: Byssusfäden einer Muschel, B: Oberfläche eines Temperatur Loggers

V.2 Bearbeitung der Sedimentproben

Um eine möglichst große Vielfalt an Bakterien-Taxa zu isolieren, wurden verschiedene Methoden zur Probenbearbeitung benutzt. Ein Teil jeder Sedimentprobe wurde ohne Vorbehandlung direkt auf Agarplatten ausplattiert. Dazu wurden die eingefrorenen Sedimentproben aufgetaut, jeweils 1 g entnommen und in 5 ml steril filtriertem und autoklaviertem Nordseewasser (30 PSU) suspendiert. Verdünnungen von 10^0 bis 10^{-3} wurden hergestellt und jeweils 100 μ l auf die verschiedenen Medien ausplattiert. Die Platten wurden bei 28 °C für 4-8 Wochen inkubiert.

Neben diesem direktem Ausplattieren der Sedimente wurden ebenfalls von allen Proben ein Teil mit einer Hitzetrocknung vorbehandelt. Die Trocknung diente zur Anreicherung von Gram-positiven Bakterien bzw. anderen Actinomyceten als Streptomyceten (Nonomura and Ohara, 1969) und zur Abtötung aller Bakterien die keine Sporen bilden. Es wurde jeweils 1 g Sediment in eine Petrischale gegeben und für 5-8 Wochen bei 28 °C im Exsikator getrocknet. Dem Exsikator wurde Silica Orange Trocknungskügelchen hinzugefügt, um eine schnellere Trocknung zu erreichen. Nach dem Trocknen wurden die Sedimente in sterile Papierschiffchen überführt und für 1 h bei einer Temperatur von 120 °C inkubiert. Danach wurden die Sedimente in 20 ml steril filtriertem und autoklaviertem Nordseewasser (30 PSU) suspendiert und für 1 h bei 22 °C geschüttelt. 200 μ l dieser Lösung wurde auf die jeweiligen Medien ausplattiert (10^0 bis 10^{-3}) und bei 28 °C für 4-8 Wochen inkubiert.

V.2.1 Verwendete Medien zur Kultivierung

Als Nährboden für die zu isolierenden heterotrophen Bakterien dienten sowohl nährstoffreiche als auch nährstoffarme Medien. Durch die Medienauswahl sollte ein möglichst breites Spektrum an Bakterien aus unterschiedlichsten Taxa gewonnen werden. In vorherigen Studien zeigte sich, dass besonders nährstoffarme Medien zur Isolierung von vielen verschiedenen Bakterien-Taxa geeignet sind (Gontang et al., 2007; Köpke et al., 2005). Die Sedimentproben aus dem Kattegatt und aus Strande (beides Ostsee) wurden auf den Medien CN, SGCY, TSB und Haferflockenmedium inkubiert. Die Sedimentproben aus allen anderen Gebieten wurden auf die Medien TM, GYM30, M4 und HW0,01 % ausplattiert.

Nährstoffreiche Medien

Tropic Marine Medium (TM), modifiziert nach ZoBell (ZoBell, 1941)

1 g	Pepton aus Sojabohnenmehl
5 g	Hefe-Extrakt
15 g	Agar
30 g	Tropic Marine Meersalz

ad 1 L Aqua dest.

pH 7,03

GYM30, modifiziert nach dem Medium 65 der DSMZ Braunschweig

4 g	Glucose
4 g	Hefe-Extrakt
4 g	Malz-Extrakt
2 g	CaCO ₃
15 g	Agar
30 g	Tropic Marine Meersalz

ad 1 L Aqua dest.

pH 7,2

CN Medium, nach MP Biomedicals

2 g	Casein
4 g	Natriumpropionat
0,1 g	Magnesium Sulfat
0,1 g	Asparagin
0,5 g	Di-Kaliumphosphat
0,001 g	Eisensulfat
5 g	Glycerol
15 g	Agar

ad 1 L Ostseewasser (10 PSU)

pH 8,1 ± 0,2

SGCY Medium

10 g	Stärke
5 g	Glucose
4 g	Caseine
4 g	Hefe
1 g	CaCO ₃
15 g	Agar

ad 1 L Ostseewasser (10 PSU)

TSB Medium (Difco 0370-17)

30 g	TSB (Tryptic Soy Broth)
10 g	Tropic Marine Salz
15 g	Agar

ad 1 L Aqua dest.

pH 7,3 ± 0,2

Nährstoffarme Medien

M4, (Mincer et al., 2002)

2 g Chitin
18 g Agar
ad 1 L Nordseewasser (30 PSU)
pH 7,5

Haferflockenmehl Medium, modifiziert nach Küster (Küster, 1959)

20 g Haferflockenmehl
15 g Agar
3 ml Spurenelementlösung
ad 1 L Ostseewasser (10 PSU)
pH 7,2

HW 0,01%, (Muscholl-Silberhorn et al., 2008)

0,1 g Hefe-Extrakt
15 g Agar
ad 1 L Nordseewasser (30 PSU)
pH 7,6

V.2.2 Kultivierung und Konservierung der Bakterien Stämme

Die auf den Medien gewachsenen Bakterienkulturen wurden mehrfach auf frischen Platten vereinzelt, bis eine Reinkultur vorlag. Diese wurde durch eine optische Kontrolle überprüft. Von solchen Reinkulturen wurde die DNA mittels des Precellys Kits isoliert. Durch eine 16S rDNA Gen Sequenzierung wurde auch molekularbiologisch überprüft, ob eine Reinkultur vorlag und die Identifizierung der Reinkulturen mittels Blastn (Altschul et al., 1990) durchgeführt. Erst danach wurde von jeder Kultur eine Rückstellprobe angelegt. Alle identifizierten Isolate wurden mit dem Cryobanksystem von MastDiagnostics in flüssigem Stickstoff (-80 °C) eingefroren und in der Stammdatenbank der Abteilung Marine Mikrobiologie hinterlegt.

Eine Übersicht über die weiteren Arbeiten, die mit den Bakterien erfolgten, ist in Abbildung 5 zu sehen. Nachdem die isolierten Bakterien identifiziert waren wurden sie in einem PCR-basierten Screening auf Sekundärmetabolit-Gencluster hin untersucht. In den darauffolgenden Aktivitätstests wurden die Rohextrakte der Isolate gegen ein Panel von Mikroorganismen getestet. Vielversprechende Extrakte wurden einer chemischen Analyse unterzogen, um Informationen über die produzierten Metabolite zu erhalten.

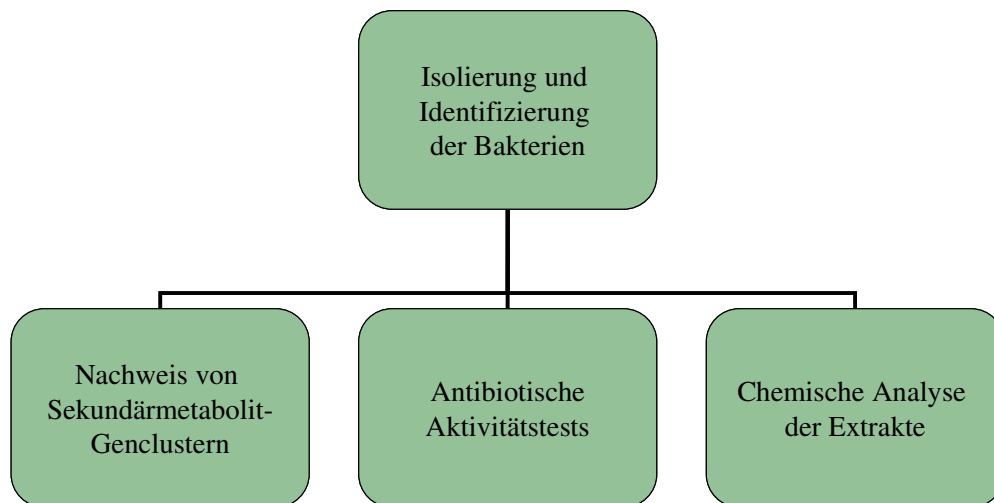


Abbildung 5: Ablauf über die Arbeiten mit den Bakterien aus den Meeressedimenten.

V.3 Molekularbiologische Arbeiten

V.3.1 DNA Extraktion

Die DNA Extraktion von Reinkulturen erfolgte mit dem Precellys-Glas-Kit 0,5 mm und einer Zelmühle für den Zellaufschluss. Dazu wurden 400 µl DNA-freies Wasser und eine Impfüse des Zellmaterials in das Precellys Vial gegeben und für 6 Minuten bei 30 Umdrehungen/s in der Zelmühle geschüttelt. Anschließend wurde das Vial für 10 Minuten bei 8000 g zentrifugiert. Die DNA, die sich in dem Überstand befand, wurde in sterile Eppendorfgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Bei Isolaten, deren Zellen durch das Precellys-Glas-Kit nicht aufgeschlossen werden konnten, wurde das DNeasy[®] Blood&Tissue Kit verwendet.

V.3.2 Identifizierung der Bakterien über Sequenzierung des 16S rDNA Gens

Das PCR-Protokoll wurde nach Moeseneder et al. (1999) modifiziert. Der Denaturierungsschritt in dem hier verwendeten Protokoll wurde um 1 °C erniedrigt und der letzte Elongationsschritt ausgelassen. Für die Amplifizierung des 16S rDNA Gens wurden puReTaq[™] Ready-To-Go[™] PCR Beads verwendet. Als Primer wurden Eub27F (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3') und Univ1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') eingesetzt. Das amplifizierte 16S rDNA-Genfragment hat eine erwartete Länge von ca. 1500 bp. Die PCR- und Cycler- Parameter sind in den Tabelle 3 und Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 3: PCR-Parameter der Amplifikation des 16S rDNA Gens.

Zusatz	Volumen (µl)	Konzentration
Primer Eub27f	1	10 pmol/µl
Primer Univ1942r	1	10 pmol/µl
DNA-Template	1	
DNA-freies Wasser	22	

Tabelle 4: Cycloparameter der PCR zur Amplifikation des 16S rDNA Gens.

Funktion	Temperatur (°C)	Dauer (sec)	Zyklen
Denaturierung	92	120	1
Amplifikation	55	30	30
	72	30	
	92	30	
	10	∞	
Kühlung	10	∞	

Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte mit der Methode von Sanger am Institut für Klinische Molekularbiologie des Universitätsklinikums Kiel. Die Sequenzen wurden mit den Datenbanken EMBL Nucleotid Datenbank und dem darauf befindlichen Tool Blastn (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) abgeglichen und der nächst verwandte Typstamm ermittelt. Mit der List of Prokaryotes wurde dieser dann als Typstamm bestätigt (<http://www.bacterio.cict.fr/>).

V.3.3 Nachweis von nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS)

Für die Suche nach nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen wurden spezifische Primer verwendet, die Teile der konservierten Abschnitte der A-Domänen amplifizieren.

Primerpaar A2f und A3r

Das PCR-Protokoll für die Amplifikation von Teilen der A-Domäne wurde nach Martens et al. modifiziert (Martens et al., 2007). Es wurde zunächst eine Gradienten-PCR durchgeführt, um optimale Amplifikationsparameter zu erhalten. Für die Amplifikation wurden die in der Literatur beschriebenen Primer A2f (5'-AAG GCN GGC GSB GCS TAY STG CC-3') und A3r (5'-TTG GGB IKB CCG GTS GIN CCS GAG GTG-3') verwendet. Als Positivkontrolle diente DNA von *Pseudomonas sp.* (DSM 50117) und als Negativkontrolle wurde DNA-freies Wasser eingesetzt. Die erwartete Fragmentlänge des PCR-Produktes betrug ca. 300 bp. In Tabelle 5 und Tabelle 6 sind die Parameter der PCR aufgeführt.

Tabelle 5: PCR-Parameter für die Amplifikation von Teilen der A-Domäne von NRPS.

Zusatz	Volumen (µl)	Konzentration
Primer A2f	1	10 pmol/µl
Primer A3r	1	10 pmol/µl
Reaktionspuffer	2,5	
dNTPs	1	2,5 µmol
Taq Polymerase	1	5 U
DNA-Template	3	
DNA-freies Wasser	15,5	

Tabelle 6: Cyclerparameter für die Amplifikation von Teilen der A-Domäne von NRPS.

Funktion	Temperatur (°C)	Dauer (sec)	Zyklen
Denaturierung	95	120	1
Amplifikation	95	60	39
	68	60	
	70	120	
	70	420	
Kühlung	10	∞	

V.3.4 Nachweis von Polyketidsynthasen (PKS)

Polyketidsynthase I (PKS I)

Das Protokoll für die Amplifikation von Fragmenten der Ketosynthase und Methyl-Malonyl-CoA Transferase von PKS I wurden teilweise modifiziert (Ayuso-Sacido and Genilloud, 2005). Als Primer wurden K1f (5`-TSA SGT CSA ACA TCG GBC A-3`) und M6r (5`-CGC AGG TTS CSG TAC CAG TA-3`) eingesetzt, die Teile der Ketosynthase und der Methyl-Malonyl-CoA Transferase amplifizieren (Abbildung 6). Die erwartete Fragmentlänge betrug 1200-1400 bp. Als Positivkontrolle wurde DNA von *Streptomyces clavuligerus* (DSM 738) und als Negativkontrolle DNA-freies Wasser verwendet. In den Tabelle 7 und Tabelle 8 sind die verwendeten PCR-Parameter zusammengefasst.

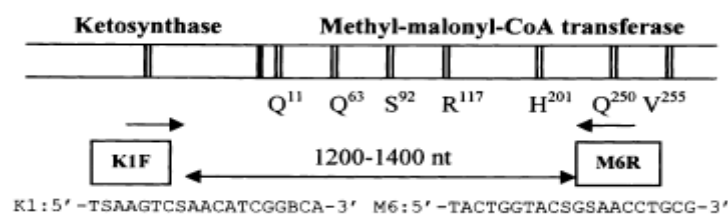


Abbildung 6: Bindungsstelle der Primer K1F und M6R auf der Ketosynthase und Methyl-Malonyl-CoA Transferase Domänen der Polyketidsynthase I (Ayuso-Sacido and Genilloud, 2005).

Tabelle 7: PCR-Parameter für die Amplifikation der KS-Domäne der PKS I.

Zusatz	Volumen (µl)	Konzentration
Primer K1f	1	10 pmol/µl
Primer M6r	1	10 pmol/µl
Reaktionspuffer	2,5	
dNTPs	1	2,5 µmol
Taq Polymerase	1	2,5 U
DMSO	2,5	
DNA-Template	5	
DNA-freies Wasser	11	

Tabelle 8: Cyclerparameter für die Amplifikation der KS-Domäne der PKS I.

Funktion	Temperatur (°C)	Dauer (sec)	Zyklen
Denaturierung	95	300	1
Amplifikation	95	30	35
	55	120	
	72	240	
	72	600	
	72	600	
Kühlung	10	∞	

Polyketidsynthese II (PKS II)

Das Protokoll für die Amplifikation für Teile der Ketosynthese der PKS II wurde nach Metsä-Ketelä modifiziert (Metsä-Ketelä et al., 1999). Als Primer wurden 945f (5'-TSG CST GCT TCG AYG CSA TC-'3) und 945r (5'-TGG AAN CCG CCG AAB CCG CT-'3) eingesetzt. Die Primer amplifizieren sowohl Teile der Untereinheit α als auch der Untereinheit β der Ketosynthese Domäne (KS) (Abbildung 7). Die erwartete Fragmentlänge des PCR Produktes betrug ca. 600 bp. In den Tabelle 9 und Tabelle 10 sind die PCR Parameter zusammengefasst. Als Positivkontrolle wurde DNA von *Streptomyces achromogenes* (DSM 40789) und als Negativkontrolle DNA-freies Wasser eingesetzt.



Abbildung 7: Bindungsstelle der Primer 945F und 945R auf der Ketosynthese (KS) Domäne der Polyketidsynthese II (Metsä-Ketelä et al., 1999). ACP: Acyl-Carrier-Protein.

Tabelle 9: PCR-Parameter für die Amplifikation der KS-Domäne der PKS II.

Zusatz	Volumen (µl)	Konzentration
Primer 945f	1	50pmol/µl
Primer 945r	1	50pmol/µl
Reaktionspuffer	2,5	
dNTPs	1	2,5µmol
Taq Polymerase	1	3,5 U
DMSO	2,5	
DNA-Template	5	
DNA-freies Wasser	11	

Tabelle 10: Cyclerparameter für die Amplifikation der KS-Domäne der PKS II.

Funktion	Temperatur (°C)	Dauer (sec)	Zyklen
Denaturierung	96	120	1
Amplifikation	96	60	32
	59,5	120	
	73	90	
	73	510	
Kühlung	10	∞	

Zur Überprüfung der amplifizierten Fragmente, wurden 18 Amplifikate von nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen, acht Amplifikate der Polyketidsynthase I und drei von der Polyketidsynthase II sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte am Institut für Klinische Molekularbiologie des Universitätsklinikums Kiel. Die Sequenzen wurden mit dem Tool Blastx (Basic Local Alignment Search Tool) der Datenbank NCBI abgeglichen (Altschul et al., 1990).

V.3.5 Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Amplifikate wurden alle PCR Produkte auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen und bei 200 mV für 20 Minuten laufen gelassen. Die Anfärbung der DNA-Moleküle erfolgte mit dem nicht-cytotoxischen und nicht-mutagenen Farbstoff GelGreenTM. Er interkaliert schon in der geringen Konzentration von 1:10000 mit der DNA, so dass diese unter UV-Licht fluoresziert. Der Farbstoff wurde vor dem Aufkochen des Agarosegels hinzugeben.

V.4 Anzucht und Extraktion von Bakterienkulturen

V.4.1 Anzucht von Bakterien in Flüssigkulturen

Zum Animpfen von Flüssigkulturen wurden die Bakterien aus der Cryobank-Sammlung aufgetaut und auf einer Agarplatte des jeweiligen Anzuchtmediums angezogen. Daraus wurden 100 ml Schüttelkulturen unter Verwendung von 300 ml Erlenmeyerkolben angeimpft. Diese dienten nach 24 h Inkubation bei 28 °C und 125 rpm zum Animpfen der Großansätze. Großansätze wurden, wenn nicht anders beschrieben, für 1 Woche bei 28 °C und 125 rpm inkubiert.

V.4.2 Extraktion von Kulturansätzen in 100 ml und 200 ml Maßstab

Um einen ersten Überblick über die biologische Aktivität und produzierten Metabolite zu bekommen, wurden 304 Isolate in 100 ml bzw. 200 ml Kulturansätzen angeimpft. Die Anzucht der Isolate erfolgte in dem jeweiligen Wachstumsmedium (TM, GYM30). Eine genaue Übersicht der Medien und Isolate findet sich im Anhang.

Die Extraktion der Zellen und des Kulturüberstandes erfolgte zusammen. Die Kultur wurde im Verhältnis 1:1 mit Ethylacetat aufgefüllt und mit dem Ultra-Turax T25 (mind. 30 s lang/13000 Umdrehungen) homogenisiert. Das Homogenisat wurde in einen Scheidetrichter überführt und gut durchgemischt. Die wässrige Phase wurde verworfen und die Lösungsmittel-Phase (Extraktphase) mit 50 ml Milli-Q Wasser gewaschen, um Zellbestandteile zu entfernen. Anschließend wurde die Ethylacetat-Phase in einen Rundkolben überführt und mittels des Rotationsverdampfers getrocknet.

Der getrockneten Extrakt wurde in 1 ml 100 % Methanol aufgenommen, durch einen 0,2 µm Filter filtriert, in HPLC-Vials überführt und bis zu weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

V.4.3 Extraktion von Kulturansätzen in 5 L und 10 L Maßstab

Bei Isolaten, die ein interessantes Metabolitmuster aufwiesen, wurden Kulturen von 5 oder 10 Litern angezogen. Dieses erfolgte bei *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* (gtP20b) in GYM30, TSB, SGCY und Hafermehlmedium, bei *Streptomyces* sp. (C42) in CN Medium und bei *Bacillus amyloliquefaciens* (gtH22, gtH2, gtH1, M2, C4, C5, B45, D21a, gtK5 und gtI11) in TM und GYM30 Medium.

Die Zellen und der Kulturüberstand wurden separat extrahiert. Dabei stellte sich heraus, dass sich die Sekundärmetabolite, bei allen untersuchten Stämmen, in größerer Menge immer in den Zellen befanden. Deshalb wurden nur noch die Zellen weiterbearbeitet und der Überstand verworfen.

Die Zellen wurden zuerst abzentrifugiert und das Frischgewicht bestimmt. Das Zellpellet wurde mit 100 % Methanol versetzt, mit dem Ultra Turax homogenisiert und unter gelegentlichem Schütteln für 2 h bei 22 °C stehen gelassen. So wurde gewährleistet, dass möglichst viele Metabolite aus den Zellen in das Lösungsmittel Methanol übergehen. Danach wurde die Suspension bei 10000 rpm für 13 min abzentrifugiert und der Überstand durch einen Faltenfilter filtriert. Der Extrakt wurde in einen vorher leer gewogenen Rundkolben aufgefangen und mit dem Rotationsverdampfer einrotiert. Nach dem vollständigen Entfernen des Methanols wurde der Rundkolben erneut gewogen, um die Menge des getrockneten Extraktes zu ermitteln. Dieser wurde in 5-10 ml 100 % Methanol aufgenommen, im Ultraschallbad behandelt und die Suspension erneut zentrifugiert (10 min bei 10000 rpm), um sämtliche Zellbestandteile zu entfernen. Der Überstand wurde in einem kleinen Spitzkolben (das Leergewicht wurde vorher bestimmt) einrotiert und der trockene Kolben erneut gewogen. Der trockene Extrakt wurde in 2 ml 100 % MeOH in einem Eppendorfgesäß aufgenommen und abzentrifugiert. In dem Eppendorfgesäß blieb das Fett zurück, welches ebenfalls gewogen wurde und zur Berechnung des Gewichtes des Rohextraktes mit einbezogen wurde. Der Überstand wurde in HPLC-Vials überführt und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

V.5 Aktivitätstests

Um aus den 348 Bakterien-Isolaten die Auswahl einzugrenzen, wurden die Wirkungen von 304 Rohextrakten gegen ausgewählte Testorganismen untersucht. Reinsubstanzen wurden erweiterten Bioaktivitätstests wie den Enzymassay und den cytotoxischen Testungen unterzogen.

V.5.1 Antimikrobielle Aktivität

Die Bioaktivitätstests wurden nach Lang et al. 2007 modifiziert (Lang et al., 2007). In den Tests wurde die Hemmung der Extrakte auf das Wachstum von verschiedenen Mikroorganismen getestet. Es wurden sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Mikroorganismen in den Testsystemen verwendet:

Prokaryotische Testorganismen:

nicht-pathogene Mikroorganismen

Bacillus subtilis (DSM 347): Häufiges Gram-positives Bakterium.

Staphylococcus lentus (DSM 6672): Gram-positives Bakterium.

Human-pathogene Mikroorganismen

Escherichia coli (DSM 6897): Verursacht Harnwegsinfektionen beim Menschen (Madigan et al., 2009).

Staphylococcus epidermidis (DSM 20044), *Staphylococcus aureus* (DSM 20231): Bedeutende Krankenhauskeime, rufen bei immunschwachen Menschen Infektionen der Schleimhäute hervor (Madigan et al., 2009).

Pseudomonas aeruginosa (DSM 50071): Bedeutender opportunistischer Krankenhauskeim (Kozlova et al., 1989).

Pseudomonas fluorescens (DSM 50090): Krankenhauskeim, infiziert Patienten mit geschwächtem Immunsystem z.B. über Wunden, Atemwege und Harnwege (Madigan et al., 2009).

Propionibacterium acnes (DSM 1897): Besiedelt die Haut vom Menschen und ist dort für Infektionen verantwortlich z.B. Akne (Eady and Ingham, 1994).

Phytopathogenen Mikroorganismen

Xanthomons campestris (DSM 2405): Erreger der nekrotischen Adernschwärze bei Reis, Kohl und Weizen (Madigan et al., 2009).

Erwinia amylovora (DSM 50901): Ruft Feuerbrand, vor allem bei Kernobst, hervor (Vanneste, 2000).

Ralstonia solanacearum (DSM 9544): Verursacher der Ringfäule und Schleimkrankheit bei Nachtschattengewächsen (Madigan et al., 2009).

Pseudomonas syringae (ATCC 19310): Phytopathogener Keim, befällt die Blätter von Rübenarten und Getreide und ruft die Blattfleckenkrankheit hervor (Madigan et al., 2009).

Eukaryotische Testorganismen

Candida glabrata (DMS 6425): Hefepilz, der fakultativ pathogen ist und bei immunschwachen Menschen Infektionen in den Schleimhäuten von Mund und Rachen sowie der Verdauungsorgane hervorruft (Fidel Jr et al., 1999).

Septoria tritici (BASF): Pilz, verantwortlich für die Blattdürre bei Weizen und Gräsern (Smith, 1988).

Phytophthora infestans (BASF): Eipilz, ruft die Knollenfäule bei Nachtschattengewächsen z. B. Kartoffeln hervor (Smith, 1988).

Die Bioaktivitätstests wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt und die Hemmung des Extraktes auf den jeweiligen Testorganismus geprüft. In metabolisch aktiven Zellen

wird durch die Dehydrogenaseaktivität das Reagenz Resazurin (blau) zu Resorufin (rosa) umgesetzt. Durch die Umsetzung verändert sich die Fluoreszenz welche bei 560 nm_{Ex} und 590 nm_{Em} mit dem Mikrotiterplatten Reader (Tecan) gemessen wird.

V.5.2 Enzymassays

Reinsubstanzen wurden auf ihre Wirksamkeit gegen fünf klinisch relevante Enzyme getestet.

Acetylcholinesterase (AChE): Dieses Enzym gilt als therapeutisches Target zur Behandlung z.B. von Morbus Alzheimer. Für den Nachweis der AChE Aktivität wurde das künstliche Substrat Acetylthiocholin verwendet. Dieses wird in Acetat und Thiocholin gespalten. Das entstehende Thiocholin reagiert mit Dithiobisnitrobenzoat zu 5-Thio-2-nitrobenzoat, welches eine gelbe Farbe hat und dessen Extinktion bei 412 nm bestimmt werden kann (Birman, 1985; Ellman and Courtney, 1961). Bei einer Hemmung des Enzyms wurde das Reagenz farblos und es wurde keine Extinktion gemessen. Als Positivkontrolle für eine Inhibition diente 0,1 µM Huperzine (Alkaloid).

Protein Tyrosin Phosphatase 1B (PTB1B): Ist ein therapeutisches Target für die Behandlung von Fettleibigkeit, Diabetes Typ 2 und Krebs. Für den Nachweis von PTP1B Inhibitoren wurde das Kit Biomol Green™ PTP1B Tyrosine Phosphatase Drug Discovery Kit verwendet (Fa.Biomol AK822-0001). Die Protein Tyrosin Phosphatase (PTP1B) dephosphoryliert das Phosphopeptid EGFR(988-998) (Zhang et al., 1993). Das entstehende *ortho*-Phosphat wird kolorimetrisch mit Hilfe von Malachitgrün und Ammoniummolybdat bei 620 nm gemessen. Als Positivkontrolle wurde RK-682 (isoliert aus *Streptomyces* sp.) eingesetzt.

HIV-1 Reverse Transkriptase (HIV-1-RT): Ist ein therapeutisches Target zur Behandlung von Aids. Die Hemmung der HIV-1-RT wurde mit dem Reverse Transcriptase Assay Kit (Boehringer Mannheim, Kat.-Nr. 1468120) nach Eberle und Seibl bestimmt (Eberle and Seibl, 1992). Die Enzymaktivität wurde kolorimetrisch mit ABTSR-Reagenz (2,2'-Azino-di-(3-Ethylbenzthiazoline Sulfonate) bei $\lambda = 405$ nm mit dem Mikrotiterplatten Reader bestimmt. Als Positivkontrolle wurde in jeder Testreihe 10 µM Foscarnet (Virostatikum) getestet.

Glycogen Synthase Kinase (GSK-3 β): Dieses Enzym dient als ein therapeutisches Target für die Behandlung von Diabetes Typ 2, neurodegenerativen Erkrankungen, manischen Depressionen und Krebs. In dem Test wird ein Substrat (Peptid GPHRSTPESRAAV)+ATP zu einem Produkt (Peptid GPHRS(_p)TPES(_p)RAAV)-+ADP. Bei einer Inhibition der GSK-3 β wird das ATP-Molekül nicht dephosphoryliert.

Somit kann ATP mit Luciferin unter Katalyse der Luciferase zu Oxyluciferin umgesetzt werden. Die Lumineszenz im Luminometer (Mikrotitersystem) wird für 0,1 s gemessen (Baki et al. 2007). Für den Nachweis von ATP wurde das Kinase-Glo Luminescent Kinase Assay Kit der Fa. Promega (V3772) verwendet.

Phosphodiesterase (PDE4): Ist ein therapeutisches Target zur Behandlung von Asthma und chronischen Entzündungen. Der Test beruht auf dem gleichen Testprinzip wie der Glycogen Synthase Kinase (GSK-3 β) (Baroja et al., 1999; Smith et al., 2005). Als Nachweiskit wurde das PDELIGHT™ HTS cAMP Phosphodiesterase Kit (Fa. Lonza) genutzt.

V.5.3 Zellkulturbasierte Assays

Die Bestimmung der antiproliferativen Wirkung von Reinsubstanzen gegen eukaryotische Zelllinien erfolgte mit dem CellTiterBlue® Cell Viability Assay (Fa. Promega) gemäß den Anweisungen des Herstellers. Die zu testende Reinsubstanz wurde in Konzentration von 10 μ M und 50 μ M eingesetzt. Der Test wurde mit folgenden Zelllinien durchgeführt:

KIF5 humane Fibroblasten: Erhalten von dem Kieler Institut für experimentelle Tumorforschung, Abteilung Prof. Dr. Kalthoff, Sektion molekulare Onkologie

NIH-3T3 Maus-Fibroblasten: Erhalten von der Abteilung Lebensmittelwissenschaften, Abteilung von Prof. Dr. Rimbach, Agrar- und Ernährungswissenschaftliche Fakultät, CAU Kiel

HT-29 kolorektale Adenokarzinomzellen: Erhalten von der DSMZ, Braunschweig (ACC 299)

HepG2 humane Leberzellkarzinomzelllinie: Erhalten von der DSMZ, Braunschweig (ACC 180)

Grundlage dieses Testsystems ist der Umsatz des blauen Redoxfarbstoff Resazurin zum rosafarbenen, fluoreszierenden Resorufin. Diese Umwandlung erfolgt in metabolisch aktiven Zellen durch ihre Dehydrogenaseaktivität. Jeder Test wurde in einer 96-Well Mikrotiterplatte in Duplikaten durchgeführt. Für jede Probe wurde ein dreifaches Replikat angesetzt. Als Positivkontrolle wurde 12,5 μ M Tamoxifen, ein Medikament gegen Mammakarzinome, eingesetzt. Nach 24 h Inkubation der Zellen mit dem Extrakt wurde 20 μ l des CellTiterBlue-Reagenz in jedes Well pipettiert. Nach 2 h Inkubation bei 37 °C erfolgte die Ermittlung der Fluoreszenzwerte mittels Mikrotiterplattenreader bei 560 nm_{ex} und 590 nm_{em}.

V.6 Chromatographische Messung

V.6.1 Messung der Extrakte mit der HPLC und dem MS

Es standen zur chromatographischen Auswertung eine HPLC (high pressure liquid chromatographie) mit Diodenarraydetektor (DAD) sowie ein daran angeschlossenes Massenspektrometer (MS) bzw. ein Evaporation Light Scattering Detector (ELSD) zur Verfügung. Die Rohextrakte wurden mit einer reverse Phase Monolith Phenomenex Onyx C18 Säule aufgetrennt. Das Säulenmaterial besteht aus Kieselgelpartikeln, an die kovalent Octadecylsilan (ODS, C18) gebunden ist. Je unpolarer eine Substanz ist, desto stärker wird sie von der Oberfläche der Partikel festgehalten. Als Laufmittel diente ein Wasser/Acetonitril (ACN) Gemisch (angesäuert mit 0,01 % Ameisensäure) mit einem Gradienten von 0 min: 5 % ACN; 4 min: 60 % ACN; 6 min: 100 % ACN; 6,8 min: 100 % ACN; 7 – 8,2 min: 5 % ACN und einem Fluss von 1 ml/min.

Die erhaltenen Massen zu den einzelnen Substanzpeaks wurden mit Hilfe des Programms DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltoniks GmbH) und den Datenbanken Dictionary of Natural Products 19.2 (CRC Press), Amarine 8.0 (ChemFinder Ultra) und Norine (Nonribosomal Database) (Caboche et al., 2008) ausgewertet. Es erfolgte ein Vergleich der Massen, der UV/Vis Spektren und der Polaritäten (Retentionszeiten).

Die Extrakte, die eine Substanz mit einer bislang unbekannte Masse aufwiesen, wurden weiter bearbeitet. Um Reinsubstanzen zu erhalten, wurden die Rohextrakte fraktioniert.

V.6.2 Fraktionieren der Extrakte mit der präparative HPLC

Die Rohextrakte wurden mit der präparativen HPLC/DAD und einem Fraktionssammler fraktioniert. Als Säule diente eine Phenomenex Gemini-NX C18. Die Überprüfung der Reinheit der Fraktionen erfolgte mit der HPLC/MS.

Wenn die gewünschten Fraktionen noch keine Reinheit >99 % hatten, wurde erneut mittels der HPLC/ELSD und zwei weiteren Säulen aufgereinigt. Dazu diente eine Monolith Säule mit einer nachfolgenden C18-Säule um eine bessere Auftrennung zu erhalten. Als Laufmittel diente ein Wasser/Acetonitril Gemisch (1:1), angesäuert mit 0,01 % Ameisensäure mit folgendem Gradienten: 0 min: 30 % ACN; 5 min: 35 % ACN; 20 min: 100 % ACN; 24 min: 100 % ACN. Der Fluss betrug 10 ml/min.

V.6.3 Aminosäureanalyse im GC/MS

Diese Methode diente zur Identifizierung von Aminosäuren in Peptiden. Die Trennung und Messung der Aminosäuren erfolgt im Gaschromatographen/Massenspektrometer (Agilent Technologies 7890A und 5975C) je nach Polarität und Dampfdruck. Als mobi-

le Phase wurde das Inertgas Wasserstoff mit einem Fluss von 3 ml/min verwendet. Die Säule hatte eine Länge von 30 m und war mit einem 0,25 µm Polyorganosiloxane Film als stationäre Phase beschichtet. Durch die Beschichtung mit einem relativ dünnen Film, kann die Säule ohne wesentliches Bluten bis in die oberen Temperaturbereiche gefahren werden.

Als Probe wurde 300 µg Reinsubstanz (Peptid m/z 898,8) eingesetzt. Als Aminosäurestandards wurden 100 µg von allen 22 proteinogenen Aminosäuren eingesetzt. Durch eine saure Hydrolyse wurde das Peptid in die einzelnen Aminosäuren zersetzt. Dazu wurden zu der Probe 200 µl 6 M HCl gegeben und für 48 h bei 110 °C inkubiert. Danach wurden die Aminosäurestandards und die zu untersuchende Substanz mit Stickstoff wieder getrocknet. Die trockene Substanz wurde in 50 µl Tetrahydrofuran (THF) gelöst und mit 50 µl N-Methyl-N-(tert-butyldimethylsilyl)trifluoroacetamide) (MTBSTFA) zur Derivatisierung versetzt und für 1 h bei 40 °C inkubiert. Durch die Derivatisierung mit MTBSTFA werden die Aminosäuren thermostabiler, die Flüchtigkeit wird verbessert und die Nachweisgrenze ist niedriger. Mit 0,1 µl Trifluoressigsäure (TFA) wurde die Lösung angesäuert und 1 µl davon in den Gaschromatographen eingespritzt. Die Säule wurde in einem 32 minütigen Gradienten bis zu 250 °C erhitzt. Die Fragmentierungen und die Massen der Aminosäuren werden durch das nachgeschaltete Massenspektrometer ermittelt.

Nach Messung der Standards und der Reinsubstanz konnten in der Probe die einzelnen Aminosäuren mittels der Datenbank NIST MS Search 2.0 identifiziert werden. Die Datenbank vergleicht die Fragmentierungsmuster und Massen in der Probe mit denen der Aminosäurestandards und identifiziert so die Aminosäurezusammensetzung der Peptide.

V.6.4 Bestimmung der D/L-Konfiguration von Aminosäuren mit der HPLC/ELSD

Die Bestimmung der Konfiguration der Aminosäuren wurde nach Lang et al. modifiziert (Lang et al., 2008). Um die Konfiguration der Aminosäuren in dem Peptid m/z 898,8 zu bestimmen, musste dieses erst hydrolisiert werden. Dazu wurden 300 µg des getrockneten Peptides mit 200 µl 6 M HCL für 48 h bei 110 °C inkubiert. Danach wurde die Salzsäure mit Stickstoff wieder getrocknet. Die nun trockene Probe wird erneut in 200 µl MilliQ durch Wärme und Ultraschall gelöst. Die L-Aminosäurestandards wurden auf 50 mM eingewogen und ebenfalls in MilliQ gelöst. Es wurden 40 µl Probenlösung zu einer 50 µl 0,5 % L-FDVA (1-Fluoro-2,4-Dinitrophenyl-5-L-Valine-Amide) Derivatisierungsreagenz gegeben. Je 40 µl von den L-Aminosäurestandards

wurden zu 50 µl 0,5 % L-FDVA bzw. zu dem Enantiomer 50 µl 0,5 % D-FDVA Lösung gegeben. Danach wurden 10 µl NaHCO₃ (1 M) hinzugeben und für 40 °C für 1 h inkubiert. Durch Zugabe von 10 µl HCL (1 M) wurde die Reaktion wieder gestoppt. Die Flüssigkeit wurde erneut mit Stickstoff ausgeblasen. Die nun trockene Probe und Aminosäurestandards wurde erneut in 200 µl DMSO:MilliQ (1:1) gelöst und 20 µl wurden in die HPLC/ELSD eingespritzt. Als Laufmittel diente ein Wasser/Acetonitril Gemisch (1:1), angesäuert mit 0,01 % Ameisensäure, mit folgendem Gradienten: 0 min: 30 % ACN; 10 min: 35 % ACN; 25 min: 70 % ACN; 27 min: 100 % ACN; 32 min: 100 % ACN; 35 min: 30 % ACN und 40 min: 30 % ACN. Der Lösungsmittelfluss betrug 1 ml/min.

Zu einer Trennung der derivatisierten D- und L- Aminosäuren wurde eine reverse Phase C8-Säule verwendet. Diese Säule ist ebenfalls mit Kieselgel gepackt, an die kovalent Octadecylsilan gebunden sind, hierbei stehen acht Kohlenstoffatome für die kovalente Bindung mit der Probe bereit. Die Aminosäuren mit D- oder L- Konfiguration binden unterschiedlich lange an die Säule und trennen sich so auf. Durch einen Vergleich der Retentionszeiten der in der Probe enthaltenen Aminosäuren und den Aminosäurestandards können die Konfigurationen der in der Probe befindlichen Aminosäuren bestimmt werden (Harada et al., 1996).

Mit dieser Methode wurde auch die Konformation des Peptidgrundgerüsts bestimmt. Das Derivatisierungsreagenz FDVA kann sich nur an ein lineares Peptid anlagern, weil nur hier endständige freie Gruppen vorliegen. Durch diese Anlagerung würde sich die Retentionszeit verschieben gegenüber dem Peptid ohne Derivatisierungsreagenz. Bei einem cyclischen Peptid würde sich trotz Derivatisierung keine Veränderung der Retentionszeit einstellen. Das Peptid wurde also wie oben beschrieben mit FDVA inkubiert, derivatisiert und in der HPLC/ELSD gemessen.

V.7 Genomsequenzierung

Zur Sequenzierung wurden die Isolate C42 (*Streptomyces* sp.) und gtP20b (*Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*) ausgewählt. Die Genome der Isolate C42 und gtP20b wurden, aufgrund der vielversprechenden Metabolitmuster, ihrer Amplifikate in dem PCR-basierten Screening für PKS I und NRPS bzw. nur NRPS und ihrer Bioaktivitäten sequenziert.

Die Sequenzierung dieser zwei Genome erfolgte an dem James D. Watson Institute of Genome Science & Institut of Crop Science der Zhejiang Universität in Hangzhou, China. Die Genome wurden mit dem Solexa GA II von Illumina sequenziert.

In Kooperation mit Dr. Abhishek Kumar (Prof. Kempken, Abteilung Botanische Genetik und Molekularbiologie, Universität Kiel) wurden die Reads assembliert. Die Assemblierung der Reads erfolgte mit dem Programm Velvet (Zerbino and Birney, 2008). Die Annotation und Identifizierung von speziellen Sekundärmetabolit-Genclustern wie NRPS und PKS erfolgte mit der Software antiSMASH (Medema et al., 2011) und dem NCBI Tool Blast (Altschul et al., 1990). Beide Tools suchen nach Similaritäten zwischen der Vergleichssequenz und den in den Datenbanken hinterlegten Sequenzen. Bei antiSMASH erfolgt vor dem Sequenzvergleich allerdings eine Annotation von Open Reading Frames (ORF). Damit ist gewährleistet, dass nur komplette Gene und keine Genfragmente detektiert werden. Der Vorteil bei der Suche mit Blast ist allerdings, dass man auch bei contigs <1 kb Informationen über mögliche Sekundärmetabolit-Gencluster erhält, bei denen die antiSMASH Suche aufgrund des fehlenden ORFs fehlgeschlagen ist. Um alle Vorteile der Tools zu nutzen wurden sie beide angewandt.

VI Kapitel

VI.1 Isolierung und Kultivierung von marinen Sediment-assoziierten Bakterien und ihr Potential zur Wirkstoffproduktion

Einleitung

Der Ozean ist ein noch größtenteils unerforschter Lebensraum und die Entdeckung von neuen Bakterien-Taxa aber auch die Untersuchung von bekannten Bakteriengruppen ist ein vielversprechender Ansatz, neue Wirkstoffe zu finden (Jeong et al., 2006). Marine Bakterien haben sich in den Ozeanen eine Vielzahl von Lebensräumen erschlossen und kommen sowohl in der Wassersäule, den Sedimenten, als auch in Assoziation mit Makroorganismen vor (Fenical, 1993). Eine Vielzahl von Untersuchungen zum Wachstum und zur Adaption mariner Bakterien in An- und Abwesenheit von Salzen wurde durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass obligat und fakultativ halophile Bakterien im Meer vertreten sind (Jensen et al., 1991; Korinek, 1927; Stanier, 1941). Jensen et al. bewiesen, dass sowohl Wachstum als auch Biomasseproduktion von marin-isolierten Aktinomycceten besser bei Zugabe von Salz zum Medium sind (Jensen et al., 1991). In der hier vorgelegten Arbeit wird die Bezeichnung marin für den marinen Ursprung eines Isolates verwendet.

In marinen Sedimenten leben im Durchschnitt 10^9 Zellen/ml. Davon bilden bei der Kultivierung im Labor weniger als 1 % Kolonien auf Agarplatten (Amann et al., 1995; Rappe and Giovannoni, 2003). Um nun unbekannte Metabolite zu entdecken, wird nicht nur verstärkt nach neuen Bakterien-Taxa gesucht, sondern es werden auch an spezielle Lebensräume angepasste Vertreter bekannter Taxa untersucht.

Marine Bakterien sind einer Vielzahl an exogene Einflüsse wie z.B. hohen Salzgehalten, Temperaturschwankungen, mit zunehmender Wassertiefe steigendem hydrostatischen Druck oder sehr sauren Umgebungen ausgesetzt. Solche Parameter können ein Grund für die Fülle und Komplexität der Metabolite sein, die sie produzieren (Lam, 2006). Dass marine Bakterien immer mehr an Bedeutung gewinnen, zeigt die Identifizierung von rund 660 neue Substanzen (1997-2008) aus marinen Bakterien (Debnath et al., 2007; Gulder and Moore, 2009; Lam, 2006; Mayer et al., 2010). Besonders marine Aktinobakterien haben mit 40 % einen großen Anteil und sind eine außergewöhnlich gute Quellen für die Suche nach pharmazeutisch relevanten neuen Substanzen (Olano et al., 2009; Williams, 2009).

In Bakterien werden Wirkstoffe durch den Sekundärmetabolismus produziert. Die Produktion von Sekundärmetaboliten unterliegt mehreren Faktoren die durch unterschiedli-

che Signale ausgelöst werden. Nährstofflimitation, wie von Stickstoff, Phosphat und Glucose (Chater and Bibb, 1997; Demain, 1998; Demain and Fang, 1995) aktiviert eine Reihe von Prozessen unter anderem auch die Antibiotikaproduktion (Katz and Demain, 1977; Marahiel et al., 1997). Physiologischer Stress (Hobbs and Humphries, 1995), Signalmoleküle wie γ -Butyrolactone oder Wachstumsraten (Chater and Hopwood, 1993) haben ebenfalls einen Einfluss auf die Antibiotikaproduktion. Sekundärmetabolite dienen Bakterien unter anderem zur Zell-Zell Kommunikation, zur Regulation von Adaptions- und Differenzierungsprozessen, zur chemischen Verteidigung gegenüber Konkurrenten oder als Vorteil im Wettbewerb um Nährstoffe z.B. Siderophore unter Eisenlimitation (Debnath et al., 2007; May et al., 2002).

Die Produzenten bioaktiver Wirkstoffe schützen sich selber vor der antimikrobiellen Wirkung ihrer Substanz durch verschiedene Mechanismen. Mit Hilfe von speziellen Pumpen können Antibiotika wie Penicillin, Cephalosporin und Chloramphenicol aus der Zelle gepumpt werden, sodass kein kritischer Schwellenwert erreicht wird und der Produzent selber keinen Schaden nimmt (Smith et al., 1967). Ebenfalls wird die Antibiotikaproduktion an einen Feedbackmechanismus gekoppelt, damit innerhalb der Zelle kein kritischer Schwellenwert erreicht wird (Demain, 1974). Ein weiterer Mechanismus ist die Inaktivierung oder zeitweiligen Umwandlung in weniger aktive Formen der Wirkstoffe durch Enzyme. Beispielsweise inaktiviert *Bacillus colistinus* das antimikrobiell wirksame Colistin durch eine Colistinase (Ito et al., 1966). Allgemein sind Produzenten von Antibiotika von Natur aus gegen ihre eigenen Substanzen in einem höheren Maß resistent als nicht-produzierende Bakterien. Nystatin-produzierende Stämme von *Streptomyces nousei* werden erst bei 2000 U/ml Nystatin gehemmt. Nicht-produzierende *Streptomyces nousei* Stämme werden schon mit 20 U/ml Nystatin inhibiert (Dolezilova et al., 1965). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch für Streptomycin (Woodruff, 1966) und Ristomycin (Trenina and Trutneva, 1966).

Die Isolierung von Wirkstoffen aus marinen Bakterien wurde bereits erfolgreich durchgeführt. Dabei wurden Sedimentproben aus verschiedenen Meeresgebieten untersucht und eine Vielzahl an Wirkstoffen isoliert (Tabelle 11).

Tabelle 11: Wirkstoffe von Bakterien die aus verschiedenen Meeresgebieten isoliert wurden.

Isolierungsort	Substanz	Wirkung	Referenz
Mittelmeer	Essramycin	antibakteriell	(El-Gendy et al., 2008)
Mittelmeer	Levantilide A und B	cytotoxisch	(Gärtner et al., 2011b)
Mariannengraben	Dermacozine	cytotoxisch	(Abdel-Mageed et al., 2010)
Japanische Bucht	Abyssomycin C	antibakteriell, Inhibition der PABA Biosynthese	(Bister et al., 2004)
Kalifornische Küste	Lynamycin	antibakteriell	(McArthur et al., 2008)
Bahamas	Ammosamide A und B	cytotoxisch	(Hughes et al., 2009b)
Ayu-Trough	Streptokordine	cytotoxisch	(Jeong et al., 2006)
Chinesische Bucht	Chinikomycine A und B	cytotoxisch	(Li et al., 2005)
Nordsee	Mansouramycin	cytotoxisch	(Hawas et al., 2009)

Neben diesen Substanzen ist insbesondere noch Salinosporamid A zu erwähnen. Salinosporamid A wurde aus *Salinospora* sp. CNB 392 aus einem nicht näher definierten Tiefseesediment isoliert und ist ein Proteasom-Inhibitor. Diese Substanz ist die erste von einem obligat marinen Actinomyceten, die in der klinischen Phase I erfolgreich gegen multiple Myelome, Lymphome, Leukämie und Tumore getestet wurde (Feling et al., 2003; Lam, 2006; Mayer et al., 2010).

Ein großer Vorteil von Wirkstoffen, die im marinen Milieu gebildet werden, ist ihre gute Wirksamkeit. Sie werden an das marine Milieu abgegeben und schnell durch das Umgebungswasser verdünnt. Dadurch müssen sie schon in geringen Konzentrationen wirksam sein, um ihren Produzenten einen Vorteil zu bringen (Haefner, 2003). Diese Effektivität ist auch beim Einsatz von Wirkstoffen für den Menschen von Vorteil.

Um die Diversität, ökologische Rolle und Produktion von Sekundärmetaboliten von marinen Bakterien abschätzen zu können, sind Kultivierungsstudien essentiell. Kultivierungsversuche zu speziellen Bakteriengruppen wie den Actinomyceten gibt es einige (Bull et al., 2005; Gontang et al., 2007; Stach and Bull, 2005; Stach et al., 2003). Aber zur Kultivierung von unterschiedlichste Gruppen heterotropher Bakterien aus verschiedenen marinen Sedimenten sind bislang nur wenige Studien bekannt (Süß et al., 2004).

Diese Kapitel soll einen Überblick zum Vorkommen von Sekundärmetabolit-Genclustern, der Produktion von Substanzen sowie deren biologischen Aktivität in marinen heterotrophen Bakterien geben. Dabei standen Proben aus unterschiedlichsten Meeresgebieten, unter anderem auch der Antarktis und Arktis aus denen bislang noch keine Wirkstoffproduzenten isoliert worden sind, zur Verfügung.

Ergebnisse

Isolierung und Identifizierung der Bakterien

Mit Hilfe der Kultivierung und Isolierung von Sediment-assoziierten Bakterien, aus insgesamt 12 verschiedenen Meeresgebieten, konnten 348 Bakterien in Reinkultur gewonnen werden. Diese 348 Isolate, wurden auf Basis phylogenetischer Daten der 16S rDNA sequenziert und 33 verschiedenen Gattungen zugeordnet. Dabei zeigte sich, dass mit 81 % der Großteil der Isolate (282) zu der Gattung *Bacillus* gehört. Zu den Gattungen *Staphylococcus* (3 %) und *Streptomyces* (2 %) gehörten mit 9 bzw. 7 Isolaten weit weniger Vertreter an. Die übrigen 50 Isolate (14 %) verteilten sich auf 30 verschiedene Gattungen und machten damit jeweils weniger als 1 % des Gesamtpools aus und sind in der Abbildung nur in die jeweiligen Phyla aufgeteilt (Abbildung 8, Tabelle 12).

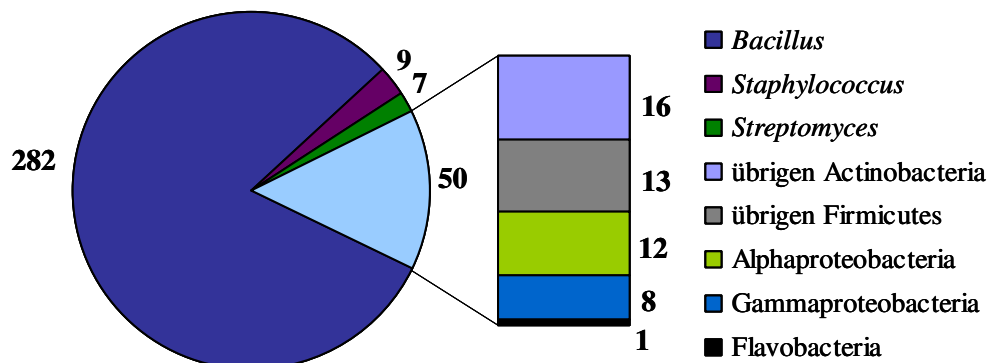


Abbildung 8: Anzahl der isolierten Gattungen und Phyla.

Die Sedimente wurden unterschiedlichen Vorbehandlungen mit oder ohne Hitzetrocknung unterzogen (siehe Material und Methoden). Aus den Sedimenten ohne Vorbehandlung durch Hitzetrocknung, konnten 229 Bakterien-Isolate (66 %) gewonnen werden. Aus den Sedimenten mit Vorbehandlung durch Hitzetrocknung wurden 119 Isolate (34 %) erhalten. Die Isolate aus den Sedimenten ohne Vorbehandlung gehörten zu den Phyla *Actinobacteria* (8,4 %), *Alphaproteobacteria* (4,7 %), *Firmicutes* (83 %), *Flavobacteria* (0,4 %) und *Gammaproteobacteria* (3,5 %) und konnten in insgesamt 32 Gattungen mit 69 verschiedenen Arten eingeteilt werden (Tabelle 12). Die Isolate aus den Sedimenten mit Vorbehandlung durch Hitzetrocknung wurden den *Actinobacteria* (3,4 %), *Alphaproteobacteria* (0,8 %) und den *Firmicutes* (95,8 %) zugeordnet. Mit insgesamt 28 Arten verteilt auf acht Gattungen ist die Anzahl der Arten wesentlich geringer als aus den Sedimenten ohne Vorbehandlung. Durch die Hitzetrocknung konnte zwei neue Actinomyceten Taxa, *Kocuria* und *Micrococcus*, gewonnen werden die ohne Vorbehandlung nicht auftraten. Unabhängig von der Vorbehandlung waren die Vertreter

des Phyla *Firmicutes* dominant vertreten und die gewonnenen Arten aus dieser Gattung unterschieden sich nicht zwischen den beiden Behandlungen (Tabelle 12).

Die Zugehörigkeit der Isolate zum nächst verwandten Typstamm erfolgte bei einer Similarität $\geq 97\%$ (Stackebrandt and Goebel, 1994).

Tabelle 12: Phylogenetische Zuordnung der Bakterien-Isolate aus den Sedimentproben.

Phyla	Gattungen	ohne Vorbehandlung durch Hitzetrocknung	mit Vorbehandlung durch Hitzetrocknung
		Anzahl Arten (Isolate)	Anzahl Arten (Isolate)
<i>Actinobacteria</i>	<i>Streptomyces</i>	3 (7)	-
	<i>Dietzia</i>	1 (1)	-
	<i>Agrococcus</i>	1 (2)	1 (1)
	<i>Demetria</i>	1 (1)	-
	<i>Rhodococcus</i>	1 (1)	-
	<i>Micromonospora</i>	1 (1)	-
	<i>Nocardioides</i>	1 (1)	-
	<i>Knoellia</i>	1 (1)	-
	<i>Microbacter</i>	1 (2)	-
	<i>Salinibacter</i>	1 (1)	-
	<i>Microterricola</i>	1 (1)	-
	<i>Kocuria</i>	-	1 (2)
	<i>Micrococcus</i>	-	1 (1)
	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Erythrobacter</i>	1 (1)
<i>Hyphomonas</i>		1 (1)	-
<i>Paracoccus</i>		3 (4)	1 (1)
<i>Rhodobacter</i>		2 (2)	-
<i>Sphingomonas</i>		1 (1)	-
<i>Thalassiospira</i>		1 (1)	-
<i>Hoeflea</i>		1 (1)	-
<i>Firmicutes</i>		<i>Bacillus</i>	30 (172)
	<i>Halobacillus</i>	1 (1)	1 (1)
	<i>Paenibacillus</i>	3 (5)	-
	<i>Planococcus</i>	1 (1)	-
	<i>Terribacillus</i>	1 (4)	-
	<i>Staphylococcus</i>	2 (6)	2 (3)
	<i>Salinicoccus</i>	1 (1)	-
	<i>Flavobacteria</i>	<i>Maribacter</i>	1 (1)
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Cobetia</i>	1 (1)	-
	<i>Halomonas</i>	1 (3)	-
	<i>Microbulbifer</i>	1 (1)	-
	<i>Shewanella</i>	1 (2)	-
	<i>Vibrio</i>	1 (1)	-
Gesamt		69 (229)	28 (119)

Dieser Pool an marinen Bakterien wurde für die Suche nach neuen Sekundärmetaboliten genutzt. Zunächst wurden molekularbiologische Untersuchungen zum Nachweis von Genclustern wie NRPS und PKS bei allen Isolaten durchgeführt. Die biologischen Aktivitäten von 304 Extrakten wurden mit Hilfe eines Testpanels von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien sowie einer Hefe festgestellt. Eine chromato-

graphische/chemische Auswertung mittels HPLC/MS der produzierten Metabolite erfolgte von 56 ausgewählten Extrakten (Abbildung 9).

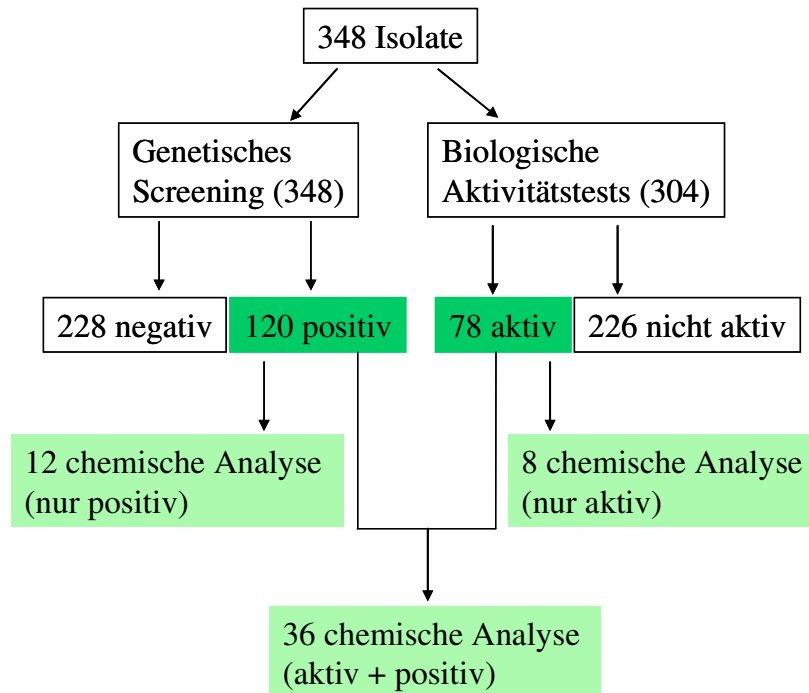


Abbildung 9: Arbeitsschritte und Zusammenfassung der Ergebnisse.

Nachweis von Sekundärmetabolit-Genclustern

Alle 348 Isolate wurden mit Hilfe einer PCR und spezifischen Primern, auf die Existenz von Sekundärmetabolit-Genclustern der nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) und der Polyketidsynthetasen (PKS) I und II, hin untersucht.

Die verwendeten Primer ermöglichten die Detektion von mindestens einem Sekundärmetabolit-Gencluster in rund 35 % der Isolate (120). In 79 % der 'positiven' Isolate (94) konnte mit der verwendeten Nachweismethodik eines der gesuchten Sekundärmetabolit-Genfragment gefunden werden. In 18 % der Isolate (22) konnten darüber hinaus zwei verschiedene Gencluster detektiert werden und in 3 % konnten Amplifikate für alle drei Gencluster erhalten werden (Abbildung 10).

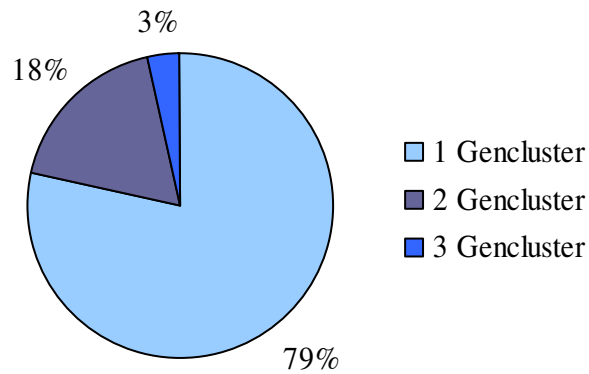


Abbildung 10: Prozentuale Verteilung der Anzahl der NRPS, PKS I und PKS II Gencluster von den 348 Isolaten.

Von den positiven Isolaten zeigten 69 % nur Amplifikate für NRPS (83 Isolate z.B. gtP20b *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*), 7 % nur für PKS I (acht Isolate) und 3 % nur für PKS II (drei Isolate) (Abbildung 11). Hinweise für die Existenz von nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen und Polyketidsynthetasen I fanden sich in zehn Isolaten: *Bacillus firmus* (gtS4, gtD4), *Paracoccus aminophilus* (gtY2), *Rhodobacter sphaeroides* (W9), *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* (U6b), *Bacillus licheniformis* (gtD70, gtG6), *Streptomyces sampsonii* (X23), *Streptomyces* sp. (C42) und *Kocuria himachalensis* (gtR3). NRPS und PKS II konnten in neun Isolaten detektiert werden: *Micromonospora aurantiaca* (C16), *Streptomyces sampsonii* (W25), *Bacillus aerophilus* (W19, W26b-1), *Bacillus amyloliquefaciens* (gtH22), *Nocardioides basaltis* (J1), *Bacillus simplex* (B44), *Rhodococcus yunnanensis* (N2) und *Dietzia psychrocaliphila* (Q2b). In drei Isolaten konnten Polyketidsynthetasen I und II detektiert werden: *Hyphomonas jannaschiana* (W6), *Bacillus licheniformis* (gtP20a) und *Paracoccus marinus* (R1b). In 3 % der Isolate wurden Hinweise auf die Existenz von allen drei Sekundärmetabolit-Genclustern gefunden (Abbildung 10). *Paracoccus marinus* (R2), *Streptomyces sampsonii* (W25a), *Sphingomonas panni* (V12) und *Halomonas denitrificans* (W17).

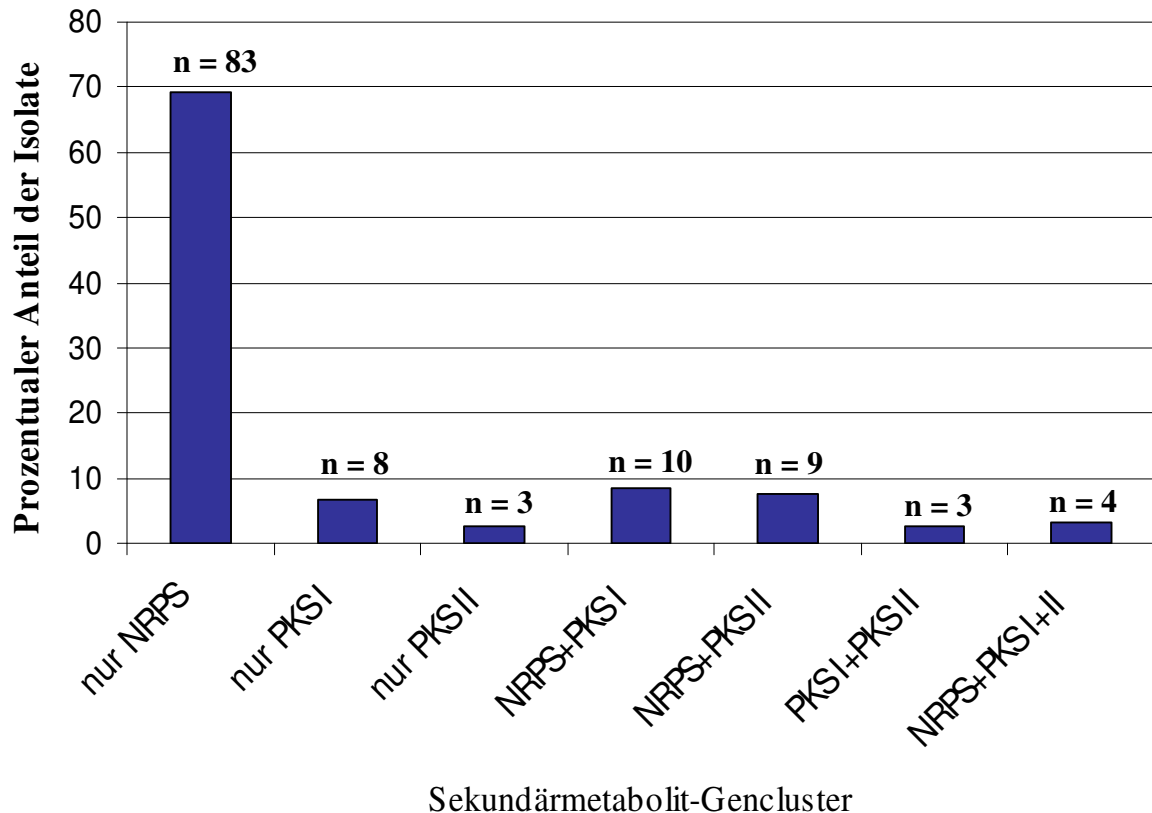


Abbildung 11: Nachweis von Sekundärmetabolit-Genclustern in den Isolaten.

Zur Überprüfung der Spezifität der Primer wurde die Positivkontrollen und 18 Amplifikate für nicht-ribosomale Peptidsynthetasen, acht Amplifikate für Polyketidsynthetasen I und drei Amplifikate für Polyketidsynthetasen II sequenziert. Die übrigen 65 Amplifikate für NRPS wiesen mehrere Banden in dem Agarosegel auf und konnten somit nicht sequenziert werden. Dies lag an der Amplifikation von mehreren A-Domänen in den Isolat.

Den acht Amplifikaten der Polyketidsynthese I und den drei Amplifikate der Polyketidsynthese II konnte keine Sequenz zugeordnet werden, da die gewonnene Sequenzinformation aus mehreren Sequenzen bestand und dadurch nicht lesbar war. Da die Reinheit der Kulturen überprüft wurde (siehe Material und Methoden) liegt der Grund dieser nicht auswertbaren Sequenzen in der Amplifikation von mehreren Bereichen verschiedener KS-Domänen.

Nach einem Datenbankabgleich mit dem Tool Blastx von NCBI konnten den 18 Sequenzen A-Domänen nicht-ribosomaler Peptidsynthetasen zugeordnet werden (Tabelle 13). Die Amplifikate der A-Domänen wiesen Similaritäten zwischen 75 % und 99 % mit der nächst verwandten Sequenz auf. In den Isolaten C12, C2, C10, C40, H5 und III wurde Sequenzen zu dem Peptid Bacillibactin identifiziert. Die Isolate B1 und gtH21

enthielten Gene für die Plipastatin-Synthetase. In den Isolaten gtD4, gtG6, D32, P4 und G2 konnten Gene für die Lichenysin-Synthetase detektiert werden. Isolat B8 enthielt Gene für die Polymyxin-Synthetase. Unspezifische Sequenzinformationen zu nicht näher identifizierten nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen fanden sich in den Isolaten gtB26, gtR3, C16 und J3 (Tabelle 13).

Tabelle 13: Sequenzierte Amplifikate für nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen.

Isolat	nächster Verwandter (16S)	Nächste verwandte Gensequenz / Stamm	Similarität (%)
C12	<i>Agrococcus lahaulensis</i>	<u>Bacillibactin (DhbF)</u> / <i>Bacillus licheniformis</i>	99
B1	<i>Bacillus atrophaeus</i>	<u>Plipastatin Synthetase</u> / <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	75
gtD4	<i>Bacillus firmus</i>	<u>Lichenysin Synthetase</u> / <i>Bacillus licheniformis</i>	92
C2	<i>Bacillus licheniformis</i>	<u>Bacillibactin (DhbF)</u> / <i>Bacillus licheniformis</i>	99
C10	<i>Bacillus licheniformis</i>	<u>Bacillibactin (DhbF)</u> / <i>Bacillus licheniformis</i>	99
C40	<i>Bacillus licheniformis</i>	<u>Bacillibactin (DhbF)</u> / <i>Bacillus licheniformis</i>	95
H5	<i>Bacillus licheniformis</i>	<u>Bacillibactin (DhbF)</u> / <i>Bacillus licheniformis</i>	95
II1	<i>Bacillus licheniformis</i>	<u>Bacillibactin (DhbF)</u> / <i>Bacillus licheniformis</i>	98
gtG6	<i>Bacillus licheniformis</i>	<u>Lichenysin Synthetase</u> / <i>Bacillus licheniformis</i>	96
D32	<i>Bacillus licheniformis</i>	<u>Lichenysin (LchAA)</u> / <i>Bacillus licheniformis</i>	93
P4	<i>Bacillus licheniformis</i>	<u>Lichenysin Synthetase</u> / <i>Bacillus licheniformis</i>	97
G2	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	<u>Lichenysin (LchAA)</u> / <i>Bacillus licheniformis</i>	82
gtH21	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	<u>Surfactin / Plipastatin Synthetase</u> / <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	88
gtB26	<i>Kocuria himachalensis</i>	<u>putative Peptid synthetase</u> / <i>Arthrobacter</i> sp.	94
gtR3	<i>Kocuria himachalensis</i>	<u>putative Peptid synthetase</u> / <i>Arthrobacter</i> sp.	94
C16	<i>Micromonospora aurantiaca</i>	<u>Adenylierungsdomäne</u> / <i>Pseudomonas fluorescens</i>	87
B8	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	<u>Polymyxin Synthetase</u> / <i>Paenibacillus polymyxa</i>	89
J3	<i>Paracoccus haeundaensis</i>	<u>Adenylierungsdomäne</u> / <i>Paracoccus denitrificans</i>	82

Aktivitätstests

Von den Rohextrakten der Isolate wurden insgesamt 304 auf eine Hemmung gegen vier Testorganismen überprüft. Als Testorganismen wurden *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus lentus*, *Candida glabrata* sowie *Xanthomonas campestris* eingesetzt.

Eine Wachstumshemmung gegen mindestens einen Testorganismen zeigte sich in insgesamt 78 Rohextrakten (26 %). Gram-positive als auch Gram-negative Testorganismen wurden gleich häufig durch die Rohextrakte inhibiert. Die Zahl der Extrakte, die die

Hefe *Candida glabrata* hemmten, ist etwas geringer als gegen die prokaryotischen Testorganismen (Abbildung 12).

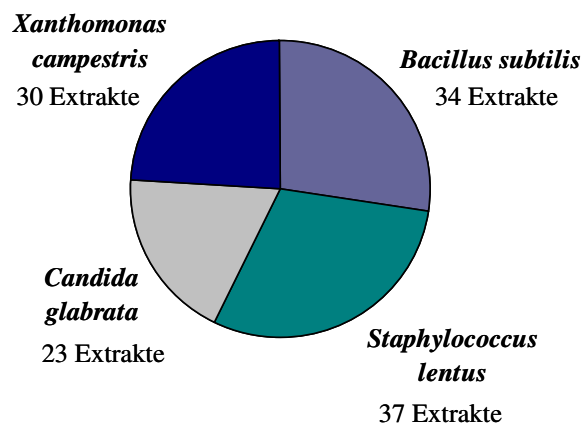


Abbildung 12: Aktivitätsspektren der Rohextrakte.

Insgesamt inhibierten 14 Isolate (zehn *Firmicutes* und vier *Actinobacteria*) ausschließlich das Wachstum von *Candida glabrata*. Eine Inhibierung nur von Gram-positiven Bakterien zeigte sich in 31 Isolaten (27 *Firmicutes*, je ein *Gamma-* und *Alphaproteobacteria*, zwei *Actinobacteria*). Die alleinige Inhibierung von Gram-negativen Bakterien zeigten dagegen 12 Isolate (zehn *Firmicutes*, zwei *Gammaproteobacteria*).

Am häufigsten wurde mit 47 Isolaten (60 %) nur ein Testorganismus gehemmt. In 18 Isolate (23 %) zeigte sich eine Hemmwirkung gegen zwei Testorganismen. Eine Inhibierung gegen drei Testorganismen wiesen die Rohextrakte von sieben Isolaten (9 %) auf. Von diesen sieben Isolaten stammten sechs aus der Ostsee (W14a/W19 *Bacillus aerophilus*, W11 *Bacillus pumilus*, W18/X22 *Streptomyces sampsonii* und XX15 *Rhodobacter ovatus*) und ein Isolat aus dem Mittelmeer (gtH2 *Bacillus amyloliquefaciens*). Die Rohextrakte der Isolate gtH22 und gtI11 (*Bacillus amyloliquefaciens*) aus dem Mittelmeer, gtU17 und X14b (*Bacillus licheniformis*) sowie C4 (*Bacillus amyloliquefaciens*) aus der Ostsee und M2 (*Bacillus amyloliquefaciens*) aus der Grönlandsee hemmten das Wachstum von allen vier Testorganismen (Abbildung 13).

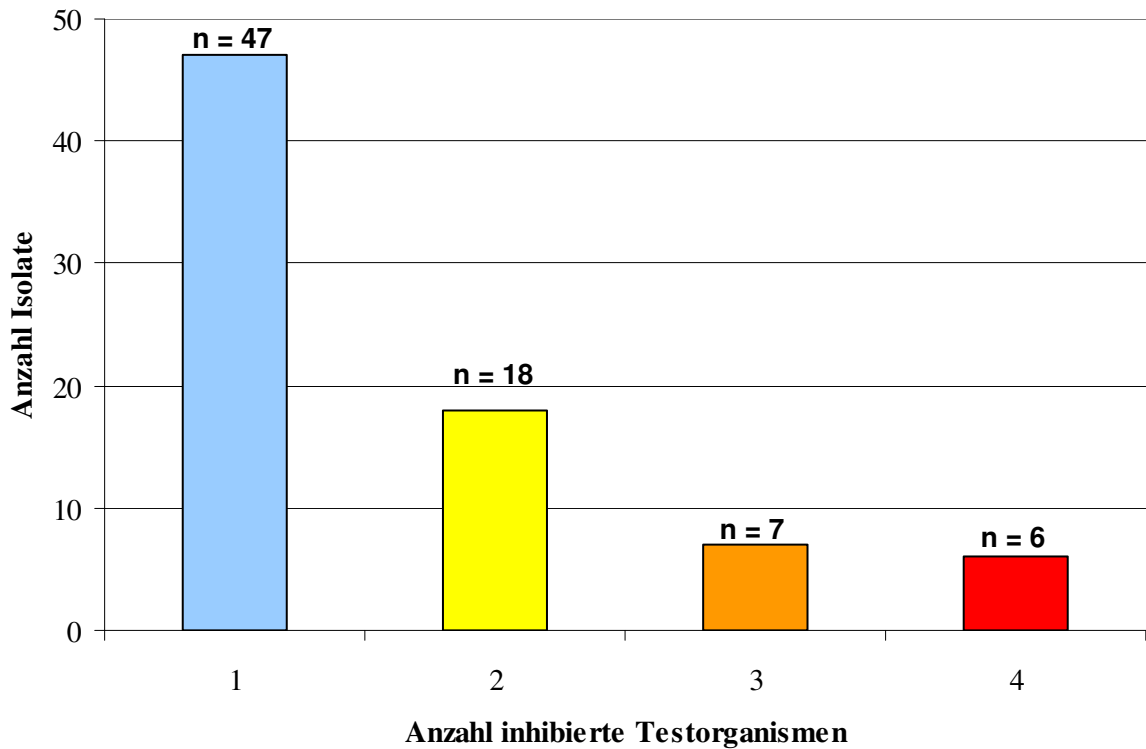


Abbildung 13: Anzahl bioaktiver Rohextrakte, die einen oder mehrere Testorganismen hemmten.

Ein Großteil der aktiven Isolate (mit 64 Bakterien; 81 %) gehörte der Familie der *Firmicutes* an. Davon waren 62 Isolate der Gattung *Bacillus* zugeordnet. Zu dem Phylum *Actinobacteria* gehörten neun bioaktive Isolate (12 %). Die übrigen bioaktiven Isolate verteilten sich jeweils mit zwei (3 %) bzw. drei (4 %) Isolaten auf die *Alpha-* bzw. *Gammaproteobacteria* (Abbildung 14). Eine ausführliche Darstellung der Aktivitätsspektren der Isolate ist in Tabelle 14 gezeigt.

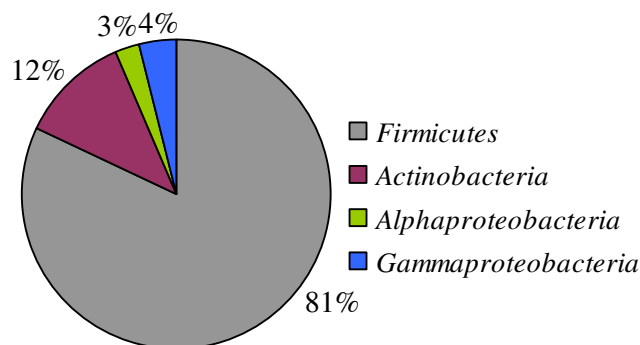


Abbildung 14: Verteilung der bioaktiven Isolate auf vier verschiedene Phyla.

Tabelle 14: Biologische Aktivitätsspektren der Isolate. Alle Isolate wiesen zu ihrem nächsten Typstamm eine Similarität $\geq 99\%$ auf. Blau: Hemmung eines Testorganismus, Gelb: zwei, orange: drei, rot: vier.

Isolat	nächster Verwandter >99 %	<i>B. subtilis</i> (DSM 347)	<i>S. lentus</i> (DSM 6672)	<i>C. glabrata</i> (DSM 6425)	<i>X. campestris</i> (DSM 2405)
B3	<i>Bacillus licheniformis</i>	0	0	23	0
C42	<i>Streptomyces</i> sp.	0	0	37	0
P1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	0	0	0	24
B45	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0	0	0	95
B47	<i>Bacillus idriensis</i>	0	0	29	0
H16	<i>Bacillus bataviensis</i>	0	0	0	24
J2	<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	0	0	30	0
II1	<i>Bacillus licheniformis</i>	0	0	20	0
D14	<i>Bacillus licheniformis</i>	0	28	0	0
gtM6	<i>Bacillus boroniphilus</i>	0	78	0	0
gtM7	<i>Bacillus boroniphilus</i>	0	48	0	0
gtG4a	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	0	0	0	48
gtP21	<i>Bacillus vallismortis</i>	0	90	0	0
gtB23a	<i>Bacillus firmus</i>	0	0	32	0
A1	<i>Bacillus licheniformis</i>	0	0	28	0
D21a	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0	0	0	96
N1	<i>Bacillus novalis</i>	0	0	22	0
gtA9	<i>Bacillus aquimaris</i>	0	0	25	0
gtP20b	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	0	0	0	99
I6a	<i>Streptomyces coelicolor</i>	0	0	20	0
gtP23	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	0	22	0	0
gtM12	<i>Bacillus boroniphilus</i>	0	38	0	0
B8	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	0	27	0	0
D23	<i>Demetria terragena</i>	25	0	0	0
B12	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	0	46	0	0
gtC3	<i>Bacillus firmus</i>	0	28	0	0
gtC2	<i>Bacillus boroniphilus</i>	100	0	0	0
U2	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	95	0	0	0
U1	<i>Bacillus simplex</i>	26	0	0	0
W25	<i>Streptomyces sampsonii</i>	0	0	41	0
gtU20	<i>Bacillus licheniformis</i>	0	0	48	0
W10	<i>Bacillus vallismortis</i>	0	0	0	94
W1	<i>Halomonas denitrificans</i>	0	0	0	66
XX13	<i>Cobetia marina</i>	0	0	0	45
Z13	<i>Bacillus licheniformis</i>	0	0	0	51
W25a	<i>Streptomyces sampsonii</i>	0	0	84	0
W4	<i>Bacillus aerophilus</i>	100	0	0	0
Z10	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	0	28	0	0
Z9	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	0	0	0	26
XX14a	<i>Bacillus licheniformis</i>	0	22	0	0
XX14b	<i>Microterricola viridarii</i>	0	64	0	0
X9	<i>Bacillus licheniformis</i>	0	0	0	20
U7	<i>Bacillus licheniformis</i>	0	45	0	0
X20	<i>Bacillus licheniformis</i>	0	69	0	0
XX9	<i>Bacillus cereus</i>	0	60	0	0
gtU19	<i>Bacillus simplex</i>	24	0	0	0
X11	<i>Bacillus licheniformis</i>	0	78	0	0

Fortsetzung Tabelle 14: Aktivitätsspektren der Isolate. Alle Isolate wiesen zu ihrem nächsten Typstamm eine Similarität $\geq 99\%$ auf. Blau: Hemmung eines Testorganismus, Gelb: zwei Testorganismen, orange: drei Testorganismen, rot: vier Testorganismen.

Isolat	nächster Verwandter $>99\%$	<i>B. subtilis</i> (DSM 347)	<i>St. lentus</i> (DSM 6672)	<i>C. glabrata</i> (DSM 6425)	<i>X. campestris</i> (DSM 2405)
D43	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	100	99	0	0
C10	<i>Bacillus licheniformis</i>	26	0	0	74
gtK5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	91	0	0	97
gtH21	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	0	0	0	22
C8	<i>Bacillus marisflavi</i>	67	44	0	0
gtR4	<i>Bacillus vallismortis</i>	78	65	0	0
gtH24	<i>Bacillus vallismortis</i>	100	100	0	0
P21	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	0	99	50	0
gtH1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	50	0	0	93
X14a	<i>Bacillus licheniformis</i>	0	0	75	0
gtV3	<i>Bacillus vallismortis</i>	71	0	0	70
U4	<i>Bacillus licheniformis</i>	100	0	0	90
W16	<i>Streptomyces sampsonii</i>	100	0	0	93
Z12	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	0	22	0	80
XX16	<i>Thalassospira lucentensis</i>	74	71	0	0
U8	<i>Bacillus licheniformis</i>	43	82	0	0
W23	<i>Bacillus licheniformis</i>	81	77	0	0
X12	<i>Shewanella colwelliana</i>	79	64	0	0
gtH2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	69	46	0	100
W14a	<i>Bacillus aerophilus</i>	89	96	0	81
W11	<i>Bacillus pumilus</i>	90	94	0	70
X23	<i>Streptomyces sampsonii</i>	78	0	35	96
W19	<i>Bacillus aerophilus</i>	100	90	0	90
W18	<i>Streptomyces sampsonii</i>	100	23	86	0
XX15	<i>Rhodobacter ovatus</i>	86	85	0	46
gtH22	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100	57	52	100
M2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	74	76	72	92
gtI11	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	89	86	64	90
C4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	77	85	60	91
gtU17	<i>Bacillus licheniformis</i>	89	93	42	76
X14b	<i>Bacillus licheniformis</i>	100	100	30	74

Um die biologischen Aktivitäten der Rohextrakte den produzierten Metaboliten zuzuordnen, wurden über 50 Rohextrakte mit der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC-DAD) und dem Massenspektrometer (MS) chromatographisch ausgewertet. Von den ausgewählten Isolaten waren 36 (64 %) gegen mindestens einen Testorganismen in dem vorangegangenen Bioaktivitätsscreening wirksam und wiesen Amplifikate für NRPS und/oder PKS auf. Die übrigen 20 Isolate waren entweder nur antibiotisch aktiv oder besaßen nur Sekundärmetabolit-Gencluster. Durch diese Auswahl sollte sichergestellt werden, dass die Isolate auch Sekundärmetabolite produzieren, die bioaktiv sind und/oder über besondere Multienzymkomplexe wie NRPS oder PKS gebildet werden.

Chromatographische Auswertung der Metabolite

Eine Vielzahl an Peaks konnte in 48 der 56 untersuchten Isolate (86 %) detektiert werden. Dies lässt auf eine Sekundärmetabolit-Produktion schließen. Bei den übrigen acht Isolaten ließ sich keine Produktion von Metaboliten anhand von Peaks in den Chromatogrammen feststellen.

Bakterien gleicher Arten zeigten zum Teil sehr ähnliche Metabolitspektren z.B. Isolat B45, gtH22 und gtK5 (alle *Bacillus amyloliquefaciens*). Interessanterweise produzierten Isolate gleichen Taxons aber auch sehr unterschiedliche Metabolitspektren z.B. Isolat D43 und gtP20b (*Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*) oder Isolate H5 und U5a (*Bacillus licheniformis*). Dies weist deutlich auf stammspezifische Substanzprofile von Vertretern gleicher Gruppen aus verschiedenen Standorten hin. Auch zeigten Isolate mit unterschiedlichen Metabolitspektren (verschiedene Substanzpeaks) ähnliche Bioaktivitäten und Isolate mit ähnlichen Metabolitspektren zeigten keine Übereinstimmungen in den Bioaktivitäten (Tabelle 13, Tabelle 15).

Einige der produzierten Metabolite wurden identifiziert und anhand der spezifischen Massen, der UV/Vis Absorption und der, aufgrund ihrer Polarität auftretenden, Retentionszeit ihrer Substanzklasse zugeordnet. So wurden in 30 Isolaten (63 %) Substanzen, die zu der Familie der Iturine gehören (wie z.B. Iturin A und C sowie Bacillomycin D/F/L), detektiert (Tabelle 15). Die Iturin-Produzenten gehörten hauptsächlich der Gattung *Bacillus* an. Diese Gattung ist bekannt für die Produktion von Iturinen und deren Derivate (Arguelles-Arias et al., 2009; Koumoutsi et al., 2004; Kunst et al., 1997). Aber auch zwei Isolate der Gattung *Streptomyces* (W16 und X23), ein *Halomonas* Isolat (W1) sowie ein *Agrococcus* Isolat (C12) zeigten eine Iturin-Produktion. In diesen vier Isolaten erfolgte auch der Nachweis für NRPS Gencluster. Die Substanzklasse der Iturine wird durch NRPS oder NRPS/PKS Hybridsysteme gebildet und ist hämolysierend, antifungal und teilweise antibiotisch wirksam (Besson et al., 1984; Chen et al., 2007).

Durch die Amplifikation von NRPS und PKS konnten schon in 28, von den 30 Isolaten die Iturine produzierten, Gene für entsprechende Sekundärmetabolit-Gencluster detektiert werden. Isolate die Iturine produzierten, aber in denen keine Amplifikate für NRPS oder PKS nachgewiesen werden konnten, waren U5a (*Bacillus licheniformis*) und V11 (*Bacillus licheniformis*). Dies war in soweit ungewöhnlich, da elf weitere Vertreter von *Bacillus licheniformis* Amplifikate für NRPS und/oder PKS zeigten.

Sechs Vertreter der Gattung *Bacillus* (B1, U5a, gtV21, U20, V11 und W26b-1) und ein *Agrococcus* Isolat (C12) produzierten Iturine zeigten aber in den Bioaktivitätstestungen keine Inhibierung der Testorganismen, so wie es eigentlich auf Grund der antifungalen

und antimikrobiellen Aktivitäten der Iturine zu erwarten gewesen wäre. Dies könnte an einer geringeren Konzentration der Substanzen in den Rohextrakten liegen.

Es wurden vier Isolate ohne Anzeichen einer Metabolitproduktion identifiziert die in den vorangegangenen Tests Wachstumshemmungen gegen die Mikroorganismen aufwiesen. Diese vier Isolate waren D23 (*Demetria terragena*), gtG4a (*Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*), P21 (*Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*) und XX13 (*Cobetia marina*) (Tabelle 15). Weitere Isolate der Gattung Art *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* (D43, gtH21, gtP20b und U2) wiesen allerdings eine Metabolitproduktion mit biologischen Aktivitäten auf, so dass auch hier wieder eine stammspezifische Metabolitproduktion zu vermuten ist.

Tabelle 15: Übersicht über die 56 chromatographisch untersuchten Rohextrakte.

Isolat	nächster Verwandter	Metabolite	identifiziert	weitere	bioaktiv	NRPS	PKS I	PKS II
W9	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	+	-	+	-	-	+	-
V12	<i>Sphingomonas panni</i>	+	-	+	-	+	+	+
gtY2	<i>Paracoccus aminophilus</i>	-	-	-	-	+	+	-
W1	<i>Halomonas denitrificans</i>	+	Iturine	+	+	+	-	+
W17	<i>Halomonas denitrificans</i>	+	-	+	-	+	+	-
XX13	<i>Cobetia marina</i>	-	-	-	+	+	-	-
W14a	<i>Bacillus aerophilus</i>	+	Iturine	+	+	+	-	+
W19	<i>Bacillus aerophilus</i>	+	-	+	+	+	-	-
W4	<i>Bacillus aerophilus</i>	+	Iturine	+	+	+	-	+
W26b-1	<i>Bacillus aerophilus</i>	+	Iturine	+	-	+	-	-
C4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+	Iturine	+	+	+	-	-
gtH22	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+	Iturine	+	+	+	-	+
M2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+	Iturine	+	+	+	-	-
B45	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+	-	+	+	+	-	-
D21a	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+	-	+	+	+	-	-
gtK5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+	-	+	+	+	-	-
gtI11	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+	-	+	+	-	-	-
C5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+	-	+	+	+	-	-
gtH1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+	Iturine	+	+	+	-	-
gtH2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+	Iturine	+	+	+	-	-
B1	<i>Bacillus atrophaeus</i>	+	Iturine	+	-	+	-	-
H16	<i>Bacillus bataviensis</i>	+	-	+	+	-	-	-
B3	<i>Bacillus licheniformis</i>	+	Iturine	-	+	+	-	-
II1	<i>Bacillus licheniformis</i>	+	Iturine	-	+	+	-	-
H5	<i>Bacillus licheniformis</i>	-	-	-	-	+	-	-
X14b	<i>Bacillus licheniformis</i>	+	-	+	+	+	-	-
U4	<i>Bacillus licheniformis</i>	+	Iturine	-	+	+	-	-
U5a	<i>Bacillus licheniformis</i>	+	Iturine	+	-	-	-	-
gtV21	<i>Bacillus licheniformis</i>	+	Iturine	+	-	+	-	-
U20	<i>Bacillus licheniformis</i>	+	Iturine	+	-	+	-	-
X14a	<i>Bacillus licheniformis</i>	+	Iturine	+	+	+	-	-
gtU17	<i>Bacillus licheniformis</i>	+	Iturine	+	+	+	-	-
gtU20	<i>Bacillus licheniformis</i>	+	Iturine	+	+	+	-	-
V11	<i>Bacillus licheniformis</i>	+	Iturine	+	-	-	-	-
Z13	<i>Bacillus licheniformis</i>	+	Iturine	-	+	+	-	-
W11	<i>Bacillus pumilus</i>	+	Iturine	+	+	+	-	-
U1	<i>Bacillus simplex</i>	+	-	+	+	+	-	-

Fortsetzung Tabelle 15: Übersicht über die 56 chromatographisch untersuchten Rohextrakte.

Isolat	nächster Verwandter	Metabolite	identifiziert	weitere	bioaktiv	NRPS	PKS I	PKS II
D43	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	+	-	+	+	-	-	-
gtH21	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	+	Iturine	+	+	+	-	-
gtP20b	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	+	Iturine	+	+	+	-	-
gtG4a	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	-	-		+	+	-	-
P21	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	-	-		+	+	-	-
U2	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	+	Iturine	+	+	+	-	-
gtV3	<i>Bacillus vallismortis</i>	+	Iturine	+	+	+	-	-
W10	<i>Bacillus vallismortis</i>	+	Iturine	+	+	+	-	-
B8	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	+	-	+	+	+	-	-
W14	<i>Paenibacillus lautus</i>	-	-		-	+	-	-
V7	<i>Salinicoccus halodurans</i>	-			-	+	-	-
C42	<i>Streptomyces</i> sp.	+	-	+	+	+	-	+
W25	<i>Streptomyces sampsonii</i>	+	-	+	+	+	-	-
W16	<i>Streptomyces sampsonii</i>	+	Iturine	+	+	+	-	-
W18	<i>Streptomyces sampsonii</i>	+	-	+	+	+	-	+
W25a	<i>Streptomyces sampsonii</i>	+	-	+	+	+	+	-
X23	<i>Streptomyces sampsonii</i>	+	Iturine	+	+	+	+	-
D23	<i>Demetria terragena</i>	-	-		+	-	-	-
C12	<i>Agrococcus lahaulensis</i>	+	Iturin	-	-	+	-	-

Iturine: verschiedene Iturin-Derivate

Diskussion

Kultivierung und Isolierung von heterotrophen Sediment-assoziierten Bakterien

Kultivierungsversuche von marinen Bakterien sind wichtig, um Aussagen über eine stoffwechselphysiologische Produktion von Sekundärmetaboliten machen zu können. Aber die Kultivierung von marinen Bakterien ist mit einigen Schwierigkeiten verbunden. Nur 0,01 %-1 % der Zellen in den Sedimenten formen sichtbare Kolonien auf Agarplatten (Amann et al., 1995; Rappe and Giovannoni, 2003; Rehnstam et al., 1993). Dabei enthält 1 ml Sediment im Ozean im Durchschnitt 10^9 Zellen (Liu et al., 2010). Um diese Diskrepanz zu verringern, wurden etliche Studien mit unterschiedlichen Parametern zur Kultivierung durchgeführt. Durch geringe Substratkonzentrationen in Kultivierungsmedien konnten größere Erfolge bei der Kultivierung von verschiedenen marinen Sediment-assoziierten Bakterien erhalten werden (Köpke et al., 2005; Süß et al., 2004).

Durch die Kombination von nährstoffreichen und nährstoffarmen Kultivierungsmedien sowie unterschiedlichen Vorbehandlungen der Sedimente konnten in dieser Arbeit 348 Isolate gewonnen werden, welchen insgesamt fünf Phyla zugeordnet wurden. Durch die Auswahl der Medien hatten auch langsam wachsende Bakterien wie z.B. *Streptomyces* (auf nährstoffarmen Medien), gegenüber schneller wachsende *Bacillus* Stämmen eine Chance, Kolonien zu bilden. Der Großteil der Isolate gehörte zu den Gram-positiven Gattungen *Firmicutes* und *Actinobacteria*. Weit weniger Isolate wurden den *Alpha-*, *Gammaproteobacteria* und den *Flavobacteria* zugeordnet. Innerhalb der *Firmicutes* zählten 81 % zu der Gattung *Bacillus*. Die *Bacillus*-Isolate waren unabhängig von der Vorbehandlung den gleichen Arten zuzuordnen. Innerhalb der *Actinobacteria* war die Gattung *Streptomyces* mit den meisten Isolaten vertreten.

Aus der Vorbehandlung durch Hitzetrocknung resultierte die Isolierung einer verminderten Anzahl von Bakterien (119) von nur sieben Gattungen im Gegensatz zu 229 Isolaten und 31 Gattungen ohne Hitzetrocknung. Durch die Vorbehandlung mit Hitze sollten die Sporen in den Sedimenten aktiviert werden, das Wachstum von *Actinomyce-ten* die nicht-*Streptomyces* sind, begünstigt werden (Nonomura and Ohara, 1969) sowie Bakterien die keine Sporen bilden abgetötet werden. Die Isolierung von zusätzlichen Aktinomyce-ten, die nicht zur Gattungen *Streptomyces* zählten, konnte durch die Gattungen *Kocuria* und *Micrococcus* gezeigt werden. Ebenfalls einen zusätzliche Isolierung durch Hitzebehandlung der Sedimente von Bakterien der Gattungen *Marmicola* und *Micromospora* konnte in einer weiteren Studie beobachtet werden (Gärtner, 2011). Dies zeigt, dass schon durch unterschiedliche Vorbehandlungen der Sedimente eine veränderte Zusammensetzung der isolierten Bakterien zu erreichen ist.

Die Dominanz innerhalb der Sediment-assoziierten Bakterien, unabhängig von der Vorbehandlung, lag eindeutig bei den Gram-positiven Bakterien (3/4 der Isolate). In früheren Kultivierungsstudien wurde der Anteil der Gram-positiven Bakterien auf nur 5 % in den Sedimenten geschätzt (ZoBell, 1946). Später wurde das Vorkommen von Gram-positiven Bakterien, besonders der *Actinobacteria*, in marinen Sedimenten stark nach oben korrigiert (Jensen et al., 2005; Maldonado et al., 2005). Kultivierungsstudien zeigten, dass neben der Gattung *Streptomyces* auch die Gattungen *Micromonospora* und *Nocardioides* häufige Vertreter in den Sedimenten sind (Colquhoun et al., 1998b; Colquhoun et al., 1998a; Maldonado et al., 2005). Die zweite große Gruppe der Gram-positiven Bakterien, neben den *Actinobacteria* sind die *Firmicutes* innerhalb denen die Gattung *Bacillus* in marinen Sedimenten mit vielen verschiedenen Arten vertreten (D'Hondt et al., 2004; Gontang et al., 2007; Ivanova et al., 2010). Die Isolierung und

Identifizierung von Gram-positiven Bakterien aus dem Sediment vor Palau zeigte, dass 65,6 % zu den *Actinobacteria* und 34,4 % zu der Gattung *Bacillus* gehörten (Gontang et al., 2007). Durch die Verwendung von Mangelmedien in der Studie konnten Kontaminanten und schneller wachsende Bakterien unterdrückt werden und so das Wachstum von seltenen Gram-positiven Bakterien unterstützt werden. Eine Studie zu Bakterien aus Tiefsee-Sedimenten aus dem Mittelmeer veröffentlichte Gärtner et al. (2011a). Mehr als die Hälfte (52 %) zählten zu den *Firmicutes*, 32 % zu den *Actinobacteria* und 15 % zu den *Alpha*-, und *Gammaproteobacteria* (Gärtner et al., 2011a). Eine ähnliche Verteilung der Isolate fand sich auch in den, in dieser Arbeit untersuchten, marinen Sedimenten. Dies zeigt, dass mit den in dieser Arbeit genutzten Kultivierungsparametern ein vergleichbares Ergebnis zu anderen Studien in Bezug auf die kultivierbaren Bakterien-Taxa geschaffen werden konnten.

Ein direkter Vergleich der Ergebnisse von diesen unterschiedlichen Studien ist nur teilweise möglich, da die meisten Ergebnisse aus Kultivierungsstudien einzigartig, aufgrund der verschiedenen Methoden, Medien und Kultivierungsparameter, sind (Köpke et al., 2005). Nichts desto trotz zeigen sich in allen vorher genannten Studien, dass Gram-positive Bakterien in Kultivierungs-abhängigen Studien die dominanten Vertreter sind. Die in dieser Arbeit untersuchten Sedimente stammten hauptsächlich aus den Schichten von 0-30 cm. Einige wenige Sedimente stammten aus Schichten ≥ 95 cm. Eine kultivierungsabhängige Studie zu verschiedenen Sedimentschichten aus der Nordsee zeigte, dass es einen phylogenetischen Schicht in den Schichten gibt (Köpke et al., 2005). Eine höhere Diversität an phylogenetischen Gruppen war in den Oberflächensedimenten zu finden. Dabei zeigte sich, dass vor allem Bakterien der *Proteobacteria* eher in den Oberflächensedimenten und Bakterien der *Firmicutes* eher in den tieferen Schichten zu finden waren (Köpke et al., 2005). Eine Verringerung der Diversität mit zunehmender Sedimenttiefe zeigte sich auch im Zuge des Ocean Drilling Programmes (ODP). Dort wurden 14 Standorte aus dem Pazifik, Atlantik und Mittelmeer beprobt. Dabei zeigte sich, dass in 500 m Sedimenttiefe nur noch 3 % der an der Oberfläche befindlichen Bakterien vorhanden waren. In Sedimenttiefen >500 m sinkt das bakterielle Vorkommen nicht noch weiter ab (Parkes et al., 2000). In den, in dieser Arbeit beprobten Sedimentschichten konnte kein Unterschied bezüglich der isolierten phylogenetischen Gruppen festgestellt werden. Auch zwischen dem Oberflächensediment und der Sedimenttiefe 435 cm, einer Probe aus der Bransfieldstraße, zeigte sich keine Veränderung in der Diversität. Möglicherweise wiesen die beprobten Tiefen noch zu ähnliche physikalische

und biologische Parameter am Standort auf, sodass sich keine signifikante Veränderung der Zusammensetzung der Bakterien ergab.

Bewertung des Wirkstoffpotentials der marinen Sediment-assoziierten Bakterien

Nachweis von Sekundärmetabolit-Genclustern

Durch das PCR-basierte Screening mit spezifischen Primern nach Sekundärmetabolit-Genclustern wurden in 30 % der Isolate Amplifikate für nicht-ribosomale Peptidsynthetasen erhalten. Es konnten in allen isolierten phylogenetischen Gruppen (außer *Flavobacteria*) Amplifikate für solche Sekundärmetabolit-Gencluster gefunden werden. Diese Isolate zählten hauptsächlich zu den *Firmicutes* und *Actinobacteria* sowie einige wenige zu den *Alphaproteobacteria* und *Gammaproteobacteria*. Der Nachweis von Polyketidsynthetasen I und II erfolgte in 7 % bzw. 5 % der Isolate.

Durch Studien, vor allem zu *Actinobacteria* ist deren enormes Potential zur Produktion von Wirkstoffen durch diese Multienzyme belegt worden. Pathom-aree et al. (2006) isolierten *Actinobacteria* aus dem Mariannengraben und fanden in 68 % Gene für NRPS, in 13 % Gene für PKS I und in einem *Micromonospora* Stamm Gene für PKS II (Pathom-aree et al., 2006). Die fünf untersuchten *Streptomyces* Isolate waren die einzigen, die sowohl Amplifikate für NRPS als auch PKS I zeigten (Pathom-aree et al., 2006). In einer anderen Studie wurden Sediment-assoziierte Gram-positive Bakterien aus der Nordsee auf NRPS und PKS I untersucht. Von den isolierten *Actinobacteria* und *Firmicutes* enthielten 21 % bzw. 14 % Gene für NRPS. In keinem Stamm wurden Gene für PKS I gefunden (Martens, 2005). Nicht nur in diesen beiden Studien sondern auch die hier erhaltenen Ergebnissen zeigen wieder die herausragende Stellung von *Actinobacteria* und *Firmicutes* zur Wirkstoffproduktion über diese speziellen Multienzyme (Bentley et al., 2002; Donadio et al., 2007; Gontang et al., 2010; Ikeda et al., 2003; Nett et al., 2009).

Durch die Sequenzierung von 18 NRPS Amplifikaten in dieser Studie wurden Informationen zu den A-Domänen der Gencluster erhalten und gleichzeitig die Funktionalität der ausgewählten Primer bewiesen. Aussagen über mögliche Produkte der NRPS Gencluster können nur bedingt getroffen werden, da die sequenzierten Produkte nur einen kleinen Teil des gesamten Clusters ausmachen. Bei den nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen amplifizieren die jeweiligen Primer nur ca. 300 bp der A-Domäne. Die A-Domäne ist für die Substraterkennung verantwortlich und Teile davon sind konservativ, so dass eine Vorhersage der Aminosäuren möglich ist (Challis et al., 2000; Stachelhaus

et al., 1999). Aber um Aussagen über mögliche Produkte treffen zu können, ist die Sequenzierung von alle beteiligten Domänen und somit des gesamten Genclusters vonnöten. Erst dann ist mit Hilfe von 'Genome Mining' eine Produktvorhersage erfolgreich wie es z.B. bei Coelichin (Challis and Ravel, 2000), Haloduracin (McClerren et al., 2006) oder Orfamid A der Fall war (Gross et al., 2007).

Die Anwesenheit von einem oder mehreren NRPS oder PKS Genclustern muss aber nicht zwangsläufig zum Nachweis eines entsprechenden Metabolits in dem Kulturansatz führen, wie es auch in dieser Arbeit bei sieben Isolaten (je ein *Alpha-* und *Gammaproteobacteria* sowie fünf *Firmicutes*) der Fall war. Vielmehr können es auch Hinweise für frühere Produktionswege von Sekundärmetaboliten oder 'stille' Gencluster sein, die unter den in dieser Studie verwendeten Kultivierungsbedingungen nicht expremiert wurden. Auch negative Ergebnisse in der PCR schließen die Produktion von nicht-ribosomalen Peptiden und Polyketiden nicht aus (siehe Isolate U5a und V11 beide *Bacillus licheniformis*). Die verwendeten Primer sind durch einen Sequenzvergleich von bislang identifizierten Produkten entstanden und amplifizieren möglicherweise noch völlig unbekannte A-Domänen und KS-Domänen nicht. Auch die verwendeten PCR-Parameter können einen Einfluss auf das Ergebnis haben, denn sie müssen nicht für jede A- Domäne bzw. KS-Domäne optimal sein. Damit ist es möglich, dass weitaus mehr Bakterien noch NRPS- und PKS-Gencluster enthalten, die mit den heute üblichen Methodenparametern noch nicht detektiert werden. Das zeigt die herausragende Stellung von marinen Sediment-assoziierten Bakterien, Substanzen über diese Multienzymkomplexe zu bilden.

Bestimmung der biologischen Aktivitäten

Mit Hilfe eines Testpanels konnte in 78 Isolaten eine inhibitorische Wirkung gegen mindestens einen Testorganismus festgestellt werden. Die Inhibierung von Gram-positiven Bakterien war häufiger als gegen Gram-negative Bakterien oder der Hefe. Dies liegt an den unterschiedlichen Beschaffenheiten der Zellwände von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien. Die Inhibierung von Gram-positiven Bakterien ist generell häufiger als die von Gram-negativen Bakterien, da die Inhibierung der Zellwandsynthese der erste Angriffspunkt für Antibiotika ist. Gram-positive Bakterien haben eine dickere Mureinschicht und die Bindung der Peptidoglycanschicht wird bei der Zellteilung gehemmt. In Gram-negativen Bakterien besteht die Zellwand nur aus 1-2 Schichten Peptidoglykan auf der noch eine äußere Membran, aus Lipopolysacchariden und Phospholipiden, aufliegt. Die Lipopolysaccharide verleihen der Membranoberflä-

che einen stark hydrophilen Charakter. Durch Einlagerungen von Calcium- und Magnesium-Ionen wird die negative Ladung der Zellmembran teilweise kompensiert, was zu Stabilisierung erheblich beiträgt. Auf Grund dessen besitzen Gram-negative Bakterien eine natürliche Resistenz gegenüber lipophilen Verbindungen zu denen auch viele Antibiotika gehören (Fuchs 2007, Allgemeine Mikrobiologie, 8. Auflage).

Der Großteil der bioaktiven Isolate zählte zu den Phyla *Firmicutes* (81 %) und *Actinobacteria* (12 %). So zeigten sechs *Bacillus* spp. Isolate als einzige eine Hemmwirkung gegen alle vier Testorganismen. In vorherige Studien weisen Vertreter der Gram-positiven Bakterien ein besonders vielfältiges Wirkspektrum auf. Martens (2005) untersuchte Gram-positive Bakterienstämme aus Nordseesedimenten. Durch einen Agardiffusionstest gegen Stämme aus demselben Habitat konnten sowohl bioaktiv wirksame *Actinobacteria* sowie *Firmicutes* Isolate identifiziert werden (Martens, 2005). Besonders Vertreter dieser beiden Taxa erweisen sich immer wieder als Produzenten für Substanzen mit einem vielfältigem Wirkspektrum (Baltz, 2008; Olano et al., 2009; Wiener, 1996; Williams, 2009). Dies konnte auch durch die hier isolierten Bakterien gezeigt werden.

Chromatographische Auswertung der produzierten Metabolite

Die Produktion von einer Vielzahl an Metaboliten konnten in 48 Rohextrakten nachgewiesen werden. Alle diese Isolate zeigten auch Amplifikate für mindestens eines der drei Gencluster. In sieben Isolaten konnte trotz Amplifikat eines Sekundärmetabolit-Genclusters keine Metabolitproduktion festgestellt werden. Dies zeigt, dass wenn durch ein PCR-basiertes Screening Gencluster gefunden wurden, häufig auch Metabolite gebildet werden und weist den PCR-basierten Nachweis von Sekundärmetabolit-Genclustern, als effiziente Methode aus, um eine schnelle Auswahl von Bakterien für eine weitere Bearbeitung zu treffen.

Bei näherer Betrachtung der produzierten Metabolite zeigte sich, dass 30 Isolate Substanzen aus der Klasse der Iturine produzierten. Die Produktion von Lipopeptiden aus der Substanzklasse der Iturine war sowohl in *Firmicutes*, *Actinobacteria* als auch in *Gammaproteobacteria* häufig zu finden. Iturine wie z.B. Iturin A und C sowie Bacilloylmycin D/F/L sind typische Sekundärmetabolite der *Firmicutes* insbesondere der Gattungen *Bacillus* und *Paenibacillus* (Arguelles-Arias et al., 2009; Chen et al., 2007; Chung et al., 2000; Donadio et al., 2007; Hofemeister et al., 2004). Die Produktion von Iturinen von Stämmen der *Actinobacteria* (siehe Isolat W16 und X23) und *Gammapro-*

teobacteria (siehe Isolat W1 und C12) ist nach unserem Wissen bislang noch nicht belegt worden.

Iturine werden über die Multienzymkomplexe NRPS und NRPS/PKS Hybridsysteme gebildet (Arguelles-Arias et al., 2009; Chen et al., 2007; Koumoutsi et al., 2004). Iturin A und C haben eine antifungale Wirkung gegen viele phytopathogene Mikroorganismen (Maget-Dana and Peypoux, 1994). Bacillomycin D hat vor allem eine Hemmungswirkung gegen *Candida* spp. Stämme (Moyne et al., 2001; Tabbene et al., 2011). Die Rohextrakte in denen Iturin-Derivate vorhanden waren zeigten in den biologischen Aktivitätstests eine entsprechende Hemmwirkung gegen *Candida glabrata*. Die Inhibierung der antibakteriellen Teststämme ist wahrscheinlich auf die nicht-identifizierten Substanzen und eventuelle Synergien zwischen den Metaboliten zurückzuführen.

Neben den inhibitorischen Wirkweisen ist auch ein positiver Einfluss auf die Biofilmbildung, Schwärmen und Zellaufteilung für verschiedene Derivate der Iturine beschrieben worden (Hofemeister et al., 2004; Leclere et al., 2006). In diesen vielfältigen Funktionen liegen möglicherweise die Gründe für die häufige Produktion von Metaboliten der Substanzklasse der Iturine auch in einer axenischen Kultur.

Die Auswahl der hier genutzten Methoden konnte ein umfassendes Bild der isolierten Bakterien in Hinblick auf ihr Potential zur Wirkstoffproduktion schaffen. Über 50 % der isolierten marinen Bakterien aus verschiedensten Sedimenten zeigten vielversprechende Hinweise auf eine Wirkstoffproduktion. Damit konnte gezeigt werden, dass neue marine Bakterien-Isolate von bereits bekannte, unterschiedlichen Taxa eine vielversprechende Quelle für Wirkstoff-Produzenten sind.

VI.2 Stammspezifische Metabolitproduktion von *Bacillus amyloliquefaciens* Stämmen aus unterschiedlichen Meeresgebieten

Einleitung

Mit der Isolierung von 348 Bakterien aus verschiedenen marinen Gebieten wurden zehn *Bacillus amyloliquefaciens* Isolate gewonnen (siehe Kapitel V.1). Diese wurden in diesem Kapitel detailliert chemisch, molekularbiologisch sowie aktivitätsspezifisch auf ihre Sekundärmetabolite untersucht.

Marine Vertreter von *B. amyloliquefaciens* wurden bislang nach unserem Wissen mit Hilfe von Kultivierungsstudien nur selten isoliert und das Wissen um ihre Sekundärmetabolite ist daher noch gering (Chen et al., 2010; Siefert et al., 2000). Dagegen sind die Metabolite terrestrisch isolierter *B. amyloliquefaciens* Stämme gut untersucht (Arguelles-Arias et al., 2009; Benitez et al., 2010; Chen et al., 2007; Lee et al., 2007; Wang et al., 2002). Sie spielen eine wichtige Rolle in der biologischen Kontrolle von phytopathogenen Pilzen und Bakterien (Arguelles-Arias et al., 2009). Durch die Produktion von Polyketiden (wie z.B. Difficidin, Macrolactin), nicht-ribosomalen Lipopeptiden (wie z.B. Iturin A, Surfactin und Fengycin) und NRPS/PKS Hybriden (wie z.B. Bacillaene, Bacillomycin) und deren diversen biologischen Aktivitäten wird das Wachstum von phytopathogenen Pilzen und Bakterien inhibiert (Chen et al., 2006; Koumoutsi et al., 2004). Mit Hilfe dieser Substanzen ist die Ko-Kultivierung von *Bacillus amyloliquefaciens* und Nutzpflanzen eine gute Alternative zu chemischen Pestiziden gegen die viele phytopathogene Bakterien und Pilze bereits Resistenzen ausgebildet haben. Ein weiterer Vorteil des Einsatzes von diesen Substanzen ist die pestizidfreie Herstellung von Nahrung für den Menschen (Arguelles-Arias et al., 2009; Ongena and Jacques, 2008).

Neben den inhibierenden Eigenschaften haben Iturine und Surfactine einen positiven Einfluss auf die Bildung von Biofilmen (Bais et al., 2004), das Schwärmen von Zellen sowie die Zellstreuung und Aufteilung (Hofemeister et al., 2004; Kinsinger et al., 2003; Leclere et al., 2006). Die Isolierung all dieser Sekundärmetabolite erfolgte bislang hauptsächlich aus terrestrisch isolierten *Bacillus amyloliquefaciens* (Arguelles-Arias et al., 2009; Chen et al., 2007). Die Isolierung eines Wirkstoffes aus dem marinen *B. amyloliquefaciens* SH-B10 Stamm (Isolierung aus dem südlichen Chinesischen Meer) wurde bisher nur für Fengycin in einer Studie gezeigt (Chen et al., 2010).

Durch die Sequenzierung von einzelnen Genen und ganzen Genomen von *Bacillus amyloliquefaciens* wurden die Gencluster der bioaktiven Sekundärmetabolite identifiziert.

Das Genom von *B. amyloliquefaciens* GAI (isoliert von den Wurzeln von Erdbeeren) enthielt vier Gencluster für NRPS (Surfactin, Iturin A, Fengycin und Bacillibactin) sowie drei Gencluster für PKS (Macrolactin, Bacillaene und Difficidin), die auch unter Kulturbedingungen expremiert werden. Ein weiteres, nicht expremiertes Gencluster wurde für Bacilysin identifiziert (Arguelles-Arias et al., 2009). Dieselben Gencluster wurden auch in dem Genom von *B. amyloliquefaciens* FZB42 (Accession Nr. CP000560) entdeckt (Chen et al., 2007). Bei der Annotation zeigte sich, dass >8 % des Gesamtgenoms Gene für Produkte enthält, die nicht über Ribosomen gebildet werden und für Antibiotika und Siderophore codieren (Chen et al., 2007). Dieser Anteil ist damit höher als man bislang von anderen *Bacillus* spp. wie z.B. *Bacillus subtilis* str168 (Accession Nr. CM000487.1) kannte (4 % des Genoms) (Kunst et al., 1997).

Bacillus amyloliquefaciens ist phänotypisch und auf genomischer Ebene recht ähnlich zu *Bacillus subtilis* und weist auch eine Reihe von spezifischen Genen auf, die variabel sind. Solche variablen Gene dienen unter anderem zur Antibiotikasythese (Arguelles-Arias et al., 2009; Chen et al., 2006; Chen et al., 2007; Schneider et al., 2007). Earl et al. (2007) untersuchten 17 verschiedene *Bacillus subtilis* Stämme, die auf 16S rDNA Ebene zu 99 % miteinander verwandt waren und verglichen ihre genomische Diversität. Dabei zeigte sich, dass rund 1/3 der *Bacillus subtilis* str168 spezifischen Gene variabel sind (Earl et al., 2007). Diese Gene codierten unter anderem für die Antibiotika- und Zellwandsynthese als auch für Sporulationsprozesse (Earl et al., 2007). Diese Arbeit zeigte, dass obwohl die Stämme auf 16S rDNA Ebene zur gleichen Art gehören, durchaus ein enormer Teil ihrer Sekundärmetabolit-Gene verschieden sein können.

Daraus ergab sich die Frage, ob sich dieses Bild auch bei einer Gegenüberstellung von Kultivierungsansätzen mehrere *Bacillus amyloliquefaciens* Stämmen zeigt. Ein Vergleich von zehn Isolaten, aus sechs Sedimentproben unterschiedlicher Standorte, der gleichen Art wurde für *Bacillus amyloliquefaciens* nach unserem Wissen bislang noch nicht durchgeführt und ist eine gute Möglichkeit eine Bewertung hinsichtlich des Potentials zur Wirkstoffproduktion zu geben. Ebenfalls sollten die produzierten Sekundärmetabolite von marinen Stämmen dieser Art mit den von terrestrischen *Bacillus amyloliquefaciens* Stämmen verglichen werden.

Ergebnisse

Isolierung und Identifizierung der Bakterien

Insgesamt konnte durch die Isolierung von Bakterien aus verschiedenen Sedimenten 282 *Bacillus* Isolate gewonnen werden. Davon wurden zehn Isolate dem nächst verwandten Typstamm *Bacillus amyloliquefaciens* (DSM 7^T) (Accession Nr. AB255669) zugeordnet. Diese stammten aus sechs verschiedenen Meeresgebieten und wurden in Wassertiefen von 66-3500 m entnommen (Abbildung 15). Durch einen Datenbankabgleich der 16S rDNA Sequenzen mit dem Tool Blastn von NCBI zeigten die Isolate eine Similarität von $\geq 99,5\%$ zum nächst verwandten Typstamm (Tabelle 16). Dies wurde durch eine Maximum Likelihood Stammbaumberechnung bestätigt (Abbildung 15).

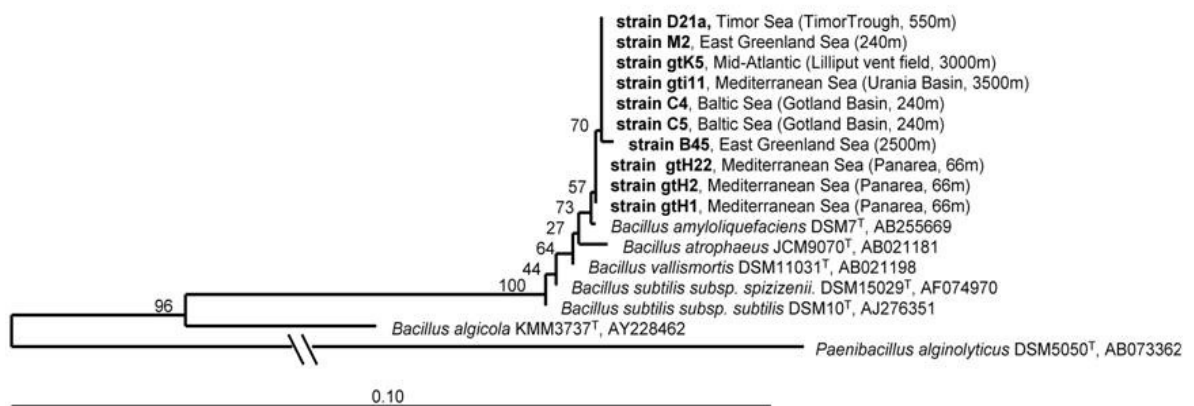


Abbildung 15: Maximum Likelihood Baum der *Bacillus amyloliquefaciens* Isolate. Die Berechnung des Baums wurde mit phyML durchgeführt mit 100 Bootstrap Wiederholungen.

Es konnten vier *B. amyloliquefaciens* Isolate (gtI11, gtH1, gtH2 und gtH22) aus dem Mittelmeer gewonnen werden. Davon stammten drei von dem Probenahmeort Panarea (gtH1, gtH2, gtH22) und ein Isolat von dem Standort Urania (gtI11). Jeweils zwei Isolate (B45, M2 und C4, C5) stammten aus dem östlichen Grönlandbecken und aus dem Gotlandbecken (Ostsee). Aus der Sedimentprobe vom Mittelatlantischen Rücken (Lilliput Südfeld) (Isolat gtK5) und dem Timorbecken (Isolat D21a) wurde je ein *B. amyloliquefaciens* Isolat gewonnen (Tabelle 16). Die zehn Isolate wurden in verschiedenen Kulturmedien angezogen und die Zellen extrahiert. Die DNA wurde für den Nachweis von Biosynthesegenen und die Rohextrakte für chemische und aktivitätsspezifische Untersuchungen genutzt.

Tabelle 16: Herkunft der Sedimentproben und die Verwandtschaft der Isolate zu *Bacillus amyloliquefaciens* (DSM 7^T).

Isolat	Gebiet	Similarität (%)
D21a	Timor Graben	99,7
M2	östliches Grönlandbecken	99,7
gtK5	Südfeld Lilliput	99,6
gtI11	Urania	99,8
C4	Gotlandbecken	99,8
C5	Gotlandbecken	99,8
B45	östliches Grönlandbecken	99,5
gtH22	Panarea	99,8
gtH2	Panarea	99,8
gtH1	Panarea	99,8

Nachweis von Sekundärmetabolit-Genclustern

Mit spezifischen Primern, die in der PCR eingesetzt wurden, fanden sich Hinweise für Sekundärmetabolit-Gencluster wie NRPS, PKS I + II in den *B. amyloliquefaciens* Isolaten. Dabei zeigte sich, dass neun von zehn untersuchten Isolaten Amplifikate der erwarteten Fragmentlänge von ca. 300 bp für nicht-ribosomale Peptidsynthetasen aufwiesen (Abbildung 16). Mit dem Primerpaar K1f und M6r konnten keine Amplifikate für die Polyketidsynthase I erhalten werden. Somit gibt es keine Hinweise auf die Existenz von PKS I in den zehn *B. amyloliquefaciens* Isolaten. Für die Polyketidsynthase II konnte einzig in dem Isolat gtH22 ein positives Amplifikat erhalten werden (Tabelle 17).

**Abbildung 16:** Agarose Gelbild für die Amplifikationen der A-Domäne einer NRPS der *B. amyloliquefaciens* Isolate. Roter Kreis: Amplifikat mit ca.300 bp.

Tabelle 17: Übersicht über die *B. amyloliquefaciens* Stämme bezüglich Bioaktivität und das Vorkommen von NRPS, PKS I und PKS II.

Isolat	bioaktiv	NRPS	PKS I	PKS II
D21a	+	+	-	-
M2	+	+	-	-
gtK5	+	+	-	-
gtI11	+	-	-	-
C4	+	+	-	-
C5	+	+	-	-
B45	+	+	-	-
gtH22	+	+	-	+
gtH2	+	+	-	-
gtH1	+	+	-	-

Aktivitätstests

Die Rohextrakte der zehn *B. amyloliquefaciens* Stämme wurden in einem Mikrotiterplattentest auf ihre Inhibierung gegen neun Testorganismen getestet. Dabei zeigte sich, dass alle Extrakte eine inhibierende Wirkung auf das Wachstum von *Xanthomonas campestris* und *Ralstonia solanacearum* hatten. Neun der Extrakte wirkten gegen mindestens drei der Testorganismen hemmend (Tabelle 18). Diese neun Isolate stammten aus sechs verschiedenen Meeresgebieten. Besonders auffällig war die Inhibierungen durch die Rohextrakte der Isolate gtH22, C4, M2 und gtI11. Diese zeigten gegen alle Testorganismen eine moderate bis starke Inhibierung. Aber auch die Isolate D21a, gtK5, B45 und gtH1 hemmten 5-7 der Testorganismen. Einzig das Isolat C5 wies mit nur zwei Hemmungen gegen *Xantomonas campestris* und *Ralstonia solanacearum* ein geringeres Wirkspektrum auf als die übrigen acht *Bacillus amyloliquefaciens* Isolate (Tabelle 18).

Tabelle 18: Inhibition (%) der Rohextrakte der *Bacillus amyloliquefaciens* Isolate gegen ausgewählte Testorganismen, Anzucht in GYM30 Medium. MAR: Mittelatlantische Rücken

Herkunftsort	Testorganismus									
	Timorgraben	Grönlandsee			Ostsee		MAR	Mittelmeer		
	D21a	M2	B45	C4	C5	gtK5	gtI11	gtH22	gtH2	gtH1
<i>Bacillus subtilis</i>	-	74	-	77	-	91	89	100	69	50
<i>Escherichia coli</i>	-	100	-	83	-	-	99	68	-	49
<i>Staphylococcus lentus</i>	-	76	-	85	-	-	86	57	46	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	96	99	90	96	-	92	99	97	-	98
<i>Candida glabrata</i>	-	72	-	60	-	-	64	52	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i>	89	98	73	96	-	69	98	94	-	94
<i>Xanthomonas campestris</i>	96	92	95	91	98	97	90	100	100	93
<i>Erwinia amylovora</i>	98	93	99	63	-	85	93	95	-	89
<i>Ralstonia solanacearum</i>	83	77	96	64	30	73	75	75	53	63

Metabolitproduktion in Abhängigkeit der Herkunft der Produzentenstämme:

Isolate des gleichen Herkunftsortes, wie z.B. M2 und B45 aus dem östlichen Grönlandbecken, oder C4 und C5 aus dem Gotlandbecken können sehr unterschiedliche Inhibierungsmuster aufweisen. Dagegen zeigten die Isolate gtH22 und gtH1 aus dem Mittelmeer (Panarea) Ähnlichkeiten in der Stärke der Inhibierungen aber Unterschiede in der Anzahl der Inhibierung und im Inhibierungsmuster (Tabelle 18). Auch wiesen Isolate wie gtI11 (Urania, östliches Mittelmeer) und C4 (Gotlandbecken, Ostsee) aus unterschiedlichen Standorten ähnliche Inhibierungen in Art, Anzahl und Stärke auf. Dies zeigt, dass die Metabolite unabhängig vom Herkunftsort des Isolates produziert werden.

Metabolitproduktion in Abhängigkeit des Kultivierungsmediums:

Die Rohextrakte der Isolate M2, gtI11, C4 und C5 aus dem Kultivierungsmedium TM zeigte ein sehr unterschiedliches Inhibierungsmuster gegenüber den Rohextrakten aus dem Kultivierungsmedium GYM30. Die Rohextrakte der Isolate M2, gtI11 und C4 aus dem TM Medium wiesen wesentlich weniger und schwächere Inhibitionen gegen die Testorganismen auf. Der Rohextrakt des Isolates C5 (TM) inhibierte keinen der Testorganismen, im Gegensatz zu dem Rohextrakt aus GYM30 Medium, der das Wachstum von *Xanthomonas campestris* (DSM 2405) und *Ralstonia solanacearum* (DSM 9544) hemmte (Tabelle 18 und Tabelle 19).

Somit zeigte sich, dass das GYM30 Medium besser für eine Metabolitproduktion der *Bacillus amyloliquefaciens* Isolate geeignet ist.

Tabelle 19: Inhibition (%) der Rohextrakte der *Bacillus amyloliquefaciens* Isolate gegen ausgewählte Testorganismen, Anzucht in TM Medium.

Herkunftsort	Grönlandsee	Mittelmeer	Ostsee	
Testorganismus	M2	gtI11	C4	C5
<i>Bacillus subtilis</i>	93	76	55	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-
<i>Staphylococcus lentus</i>	-	28	39	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	-	-
<i>Candida glabrata</i>	-	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i>	-	-	-	-
<i>Xanthomonas campestris</i>	-	97	72	-
<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	-	-
<i>Ralstonia solanacearum</i>	-	-	-	-

Chromatographische Auswertung der Metabolitmuster

Die Metabolitmuster der zehn *Bacillus amyloliquefaciens* Isolate wurden mittels HPLC/MS chromatographisch ausgewertet. Neun der Isolate (außer Isolat C5; Anzuchtmedium GYM30) produzierten Lipopeptide wie die der Fengycine (z.B. Plipastatin) (Abbildung 17a-j). Diese werden durch nicht-ribosomale Peptidsynthetasen gebildet (Koumoutsi et al., 2004) und haben eine starke Wirkung gegen viele phytopathogene Pilze (Maget-Dana et al., 1992; Vanittanakom et al., 1986). In ebenfalls neun Isolaten (außer D21a) wurden verschiedene Analoga des Heptapeptides Lichenysin G, aus der Substanzklasse der Surfactine detektiert. Die verschiedenen Lichenysin Analoga unterscheiden sich in ihrer Anzahl der Methylgruppen in den lipophilen Seitenketten (Berrue et al., 2009). Sie werden ebenfalls über nicht-ribosomale Peptidsynthetasen gebildet und sind antibakteriell wirksam (Rodrigues et al., 2006). Die Isolate gtH22, gtH1, gtH2, M2, gtI11 und C4 produzieren neben den Fengycinen und Surfactinen auch Derivate aus der Substanzklasse der Iturine wie z.B. Bacillomycin D und Iturin A. Diese Peptide werden durch einen NRPS/PKS Hybriden Enzymkomplex gebildet und wirken hämolytisch und antifungal. Einzig in den Isolaten B45 und gtK5 wurde das Polyketid Macrolactin detektiert. Dieses wird von einer Polyketidsynthase I produziert. Das Chromatogramm des Isolates D21a zeigte die Produktion von Fengycinen und eine Reihe bislang unidentifizierter Substanzen. Ebenfalls konnten in den Chromatogrammen von M2, D21a und C5 (GYM30) einige Substanzen bislang noch nicht identifiziert werden (Abbildung 17 d, g und h, Peak A-G).

Die Anzucht von vier Isolaten (gtI11, C4, M2 und C5) im TM Medium ergab, gegenüber dem GYM30 Medium, einige wenige Unterschiede in der Metabolitproduktion. Das Isolat C4 zeigte genau dasselbe Metabolitmuster, mit der Produktion von Fengycin, Plipastatin, Lichenysin G, Bacillomycin D und Iturin A, in beiden Medien. Isolat gtI11 produzierte in dem TM Medium nur Plipastatin und Lichenysin G (Abbildung 18a). Im Gegensatz dazu wurden in dem GYM30 Medium noch Fengycin und verschiedene noch nicht identifizierte Metabolite detektiert (Abbildung 17e). Ein ähnliches Bild zeigt sich bei dem Isolat M2. In beiden Medien wurden Lichenysin G, Fengycin und Plipastatin produziert, aber in dem GYM30 Medium noch zusätzlich bislang nicht identifizierte Metabolite, die in dem TM Medium nicht produziert wurden (Abbildung 17g und Abbildung 18c). Das Isolat C5 zeigt die Produktion von unterschiedlichen Metaboliten in den beiden Medien. Iturin A und Bacillomycin D, sowie eine nicht identifizierte Substanz (Abbildung 18 d, Peak H) wurden in dem TM Medium produziert. Lichenysin G

und eine andere nicht identifizierte Substanz (Peak G) wurden in dem GYM30 Medium produziert (Abbildung 17h).

Es zeigte sich, dass die Isolate, obwohl sie aus unterschiedlichen Sedimentproben/ Meeresgebieten stammen, eine Vielzahl ähnlicher Metabolite wie z.B. die Substanzen aus den Klassen der nicht-ribosomalen Lipopeptide, produzieren. Durch einen Vergleich mit Wirkstoff-Datenbanken konnten einige der Metabolite in ihre Substanzklassen eingeteilt werden. Die exakten Strukturen der Substanzen konnten nicht bestimmt werden, da sich die verschiedenen Derivate nur durch minimale Variationen in den Seitenketten oder einen Aminosäureaustausch unterscheiden und dadurch keine Unterschiede in der HPLC/MS Messung zeigten. Um eine genaue Identifizierung zu gewährleisten müsste eine Strukturaufklärung mittels NMR erfolgen, welche aber auf Grund von zu wenig produzierter Reinsubstanz nicht realisierbar war.

Tabelle 20: Identifizierte Metabolite in den *Bacillus amyloliquefaciens* Isolaten. Die Peak-Bezeichnungen finden sich in den Abbildungen 17 a-j und 18 a-d wieder. n.i.: nicht identifiziert

Peak	M+[H+]	Substanz	Wirksamkeit	Referenz
1	1464,9	Fengycin	antifungal	(Vanittanakom et al., 1986)
2	1492	Plipastatin	antifungal	(Umezawa et al., 1986)
3	994,8	Lichenysin G	antibakteriell	(Rodrigues et al., 2006)
4	1008,8	Lichenysin G	antibakteriell	(Rodrigues et al., 2006)
5	1022,8	Lichenysin G	antibakteriell	(Rodrigues et al., 2006)
6	1036,9	Lichenysin G	antibakteriell	(Rodrigues et al., 2006)
7	1031,7	Bacillomycin D	hämolytisch, antifungal	(Peypoux et al., 1984; Tabbene et al., 2011)
8	1045,7	Bacillomycin D	hämolytisch, antifungal	(Peypoux et al., 1984; Tabbene et al., 2011)
9	1476,3	Fengycin	antifungal	(Vanittanakom et al., 1986)
10	1043,7	Iturin A	hämolytisch, antifungal	(Besson et al., 1984)
11	1057,8	Iturin A	hämolytisch, antifungal	(Besson et al., 1984)
12	1071,8	Iturin A	hämolytisch, antifungal	(Besson et al., 1984)
13	403	Macrolactin	hämolytisch, antifungal	(Schneider et al., 2007)
A	685,6	n. i.		
B	699,6	n. i.		
C	713,6	n. i.		
D	727,6	n. i.		
E	695,7	n. i.		
F	709,6	n. i.		
G	678,0	n. i.		
H	943,2	n. i.		

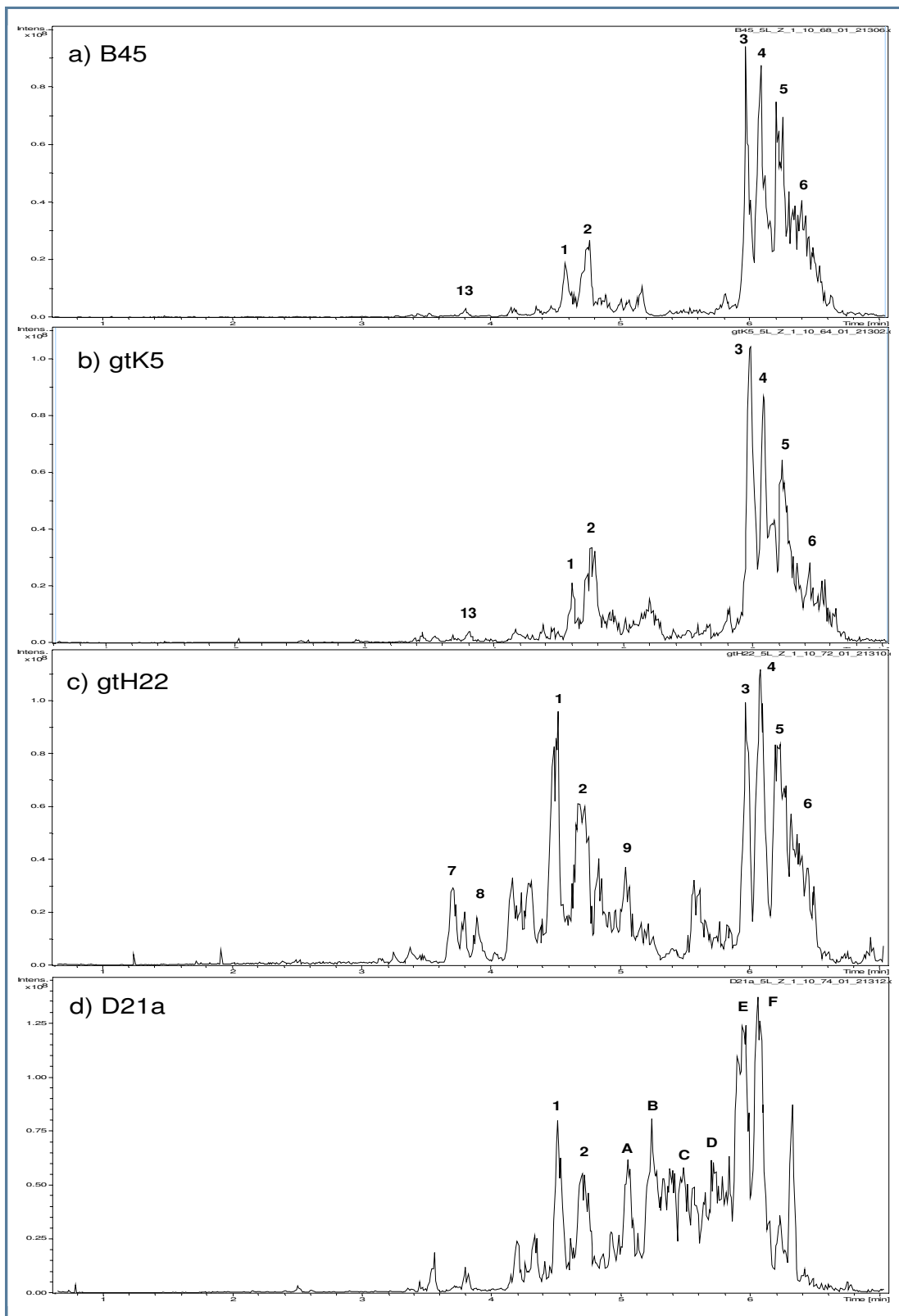
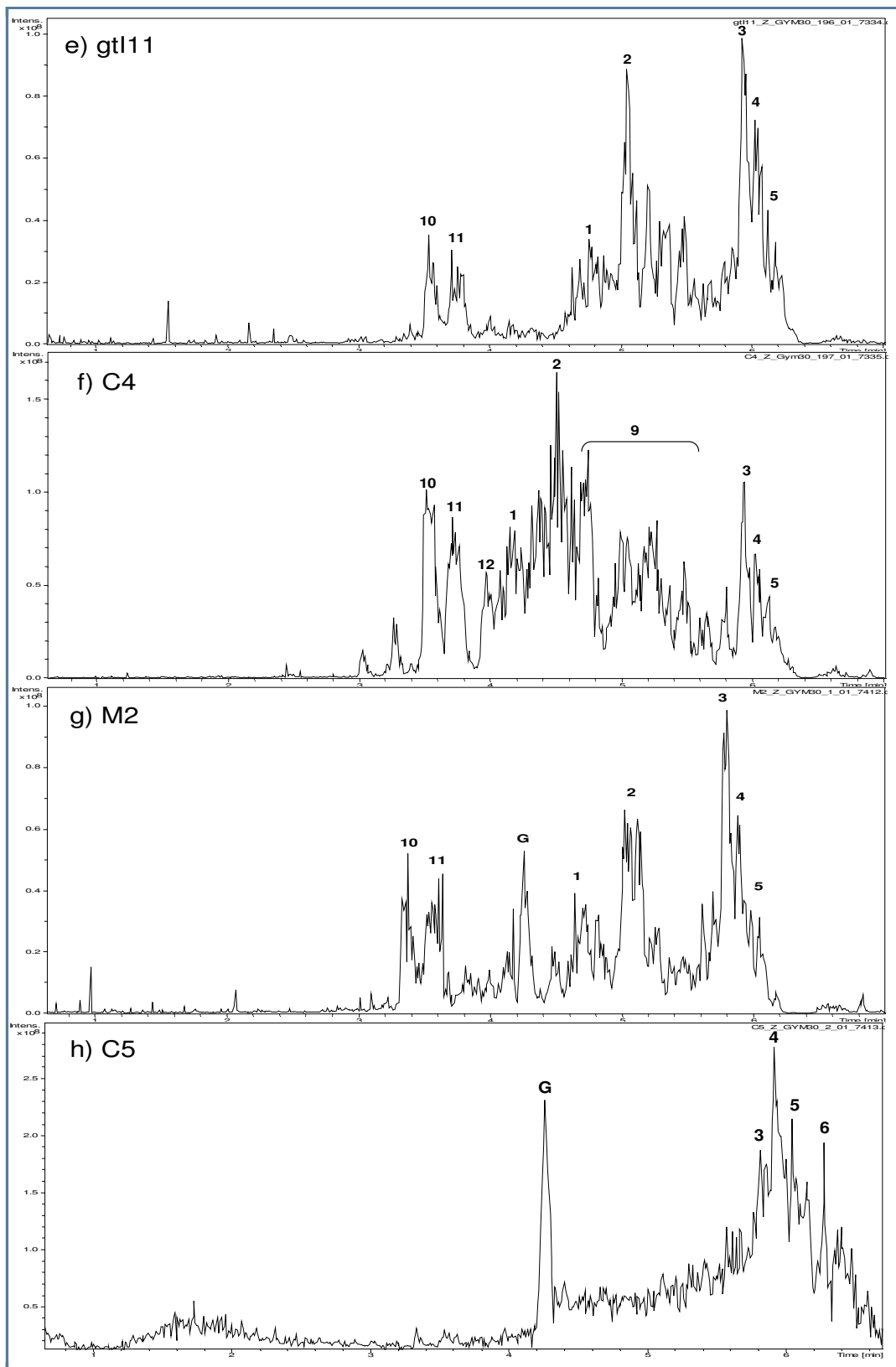
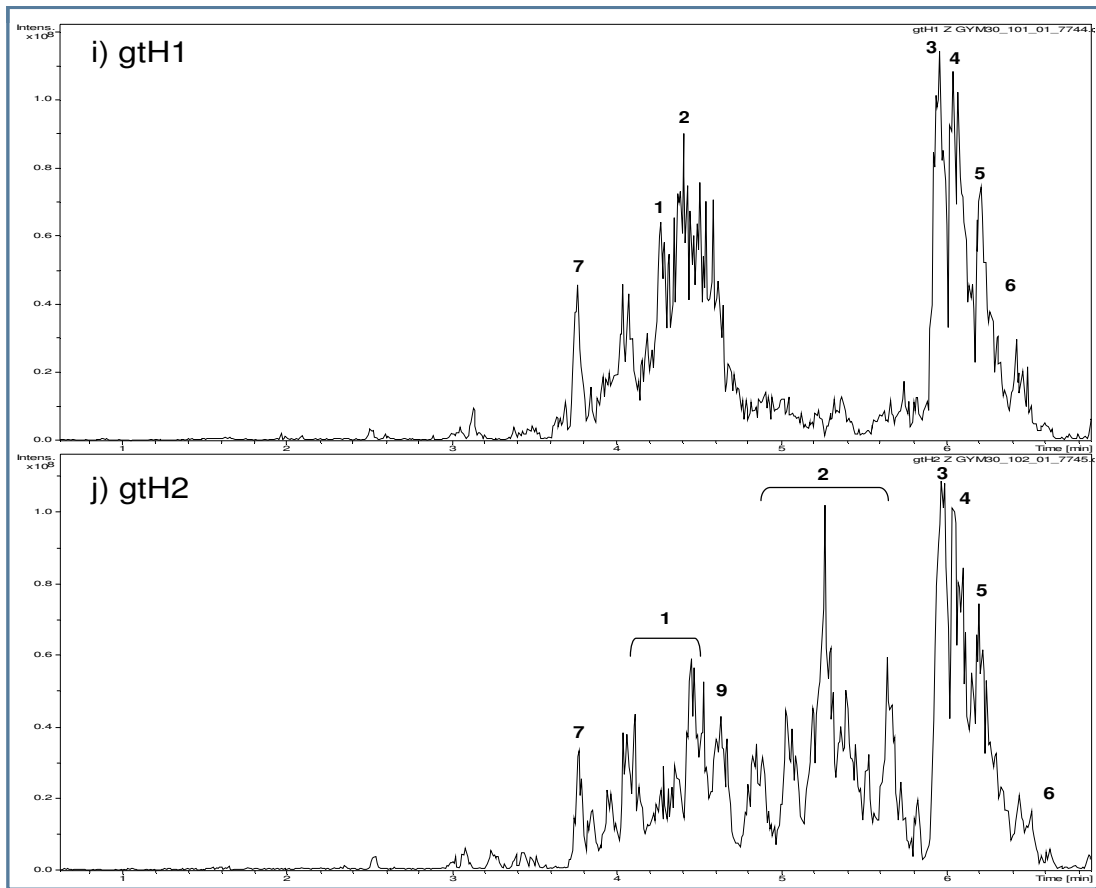


Abbildung 17: Base Peak Chromatogramme der *B. amyloliquefaciens* Isolate, Anzucht in GYM30 Medium.



Fortsetzung Abbildung 17: Base Peak Chromatogramme der *B. amyloliquefaciens* Isolate, Anzucht in GYM30 Medium.



Fortsetzung Abbildung 17: Base Peak Chromatogramme von zwei *B. amyloliquefaciens* Isolaten, Anzucht in GYM30 Medium.

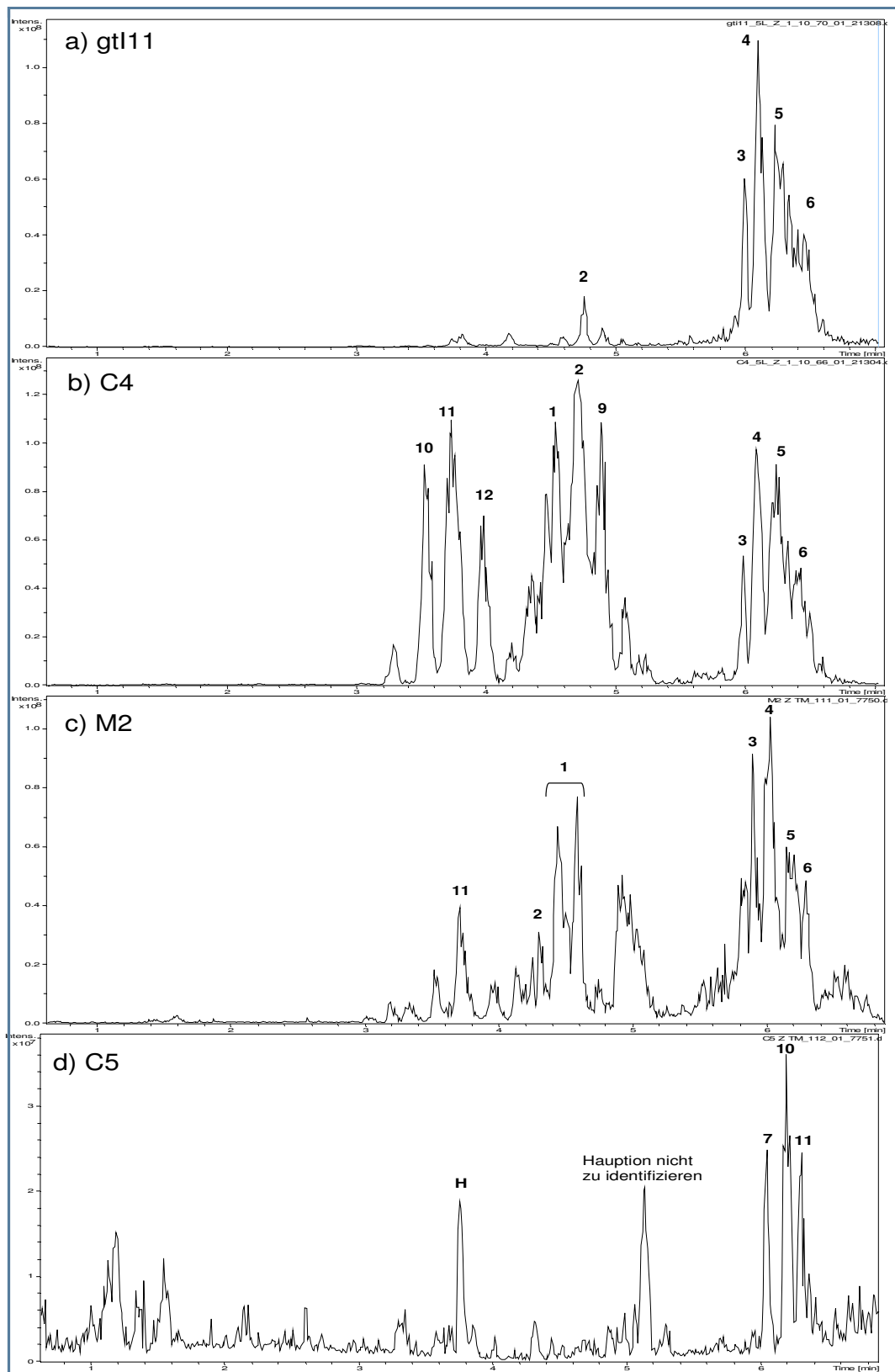


Abbildung 18: Base Peak Chromatogramme von vier *B. amyloliquefaciens* Isolaten, Anzucht in TM Medium.

Das Isolat gtH22 wurde, auf Grund der starken Inhibierungseigenschaften und vielfältigen Metabolite, die es in dem Anzuchtmedium GYM30 produzierte, exemplarisch für weitere Medienversuche ausgewählt. Durch die Medienvariationen konnte die Produktion von bekannten als auch bislang nicht identifizierten Substanzen in dem Isolat gtH22 induziert werden. Als bekannte Substanzen wurden Fengycine (wie Plipastatin), Sufactine (wie Lichenysin G) und Iturine (wie Bacillomycin D) produziert. Ferner konnten in dem Hafermehl-, SGCY- und TSB Medium vier bislang unbekannte Metabolite detektiert werden (Abbildung 19 b-d, Peak I-L).

Die Identifizierung der unbekannte Metabolite stellte sich als schwierig heraus. Zu den detektierten Massen wurden bei einem Datenbankabgleich mehrere Treffer erhalten. Die UV/Vis Spektren und die Polarität gaben ebenfalls keinen Aufschluss über eine eindeutige Identität der Metabolite. Eine Aufreinigung der einzelnen Metabolite war nicht realisierbar, da die Metabolite zu ähnliche Retentionszeiten für eine Trennung hatten und für eine Aufreinigung in zu geringen Mengen produziert wurden. Im zeitlichen Rahmen der Promotion war es nicht mögliche, weitere Versuche zur Substanzgewinnung und Identifizierung durchzuführen.

Tabelle 21: Identifizierte Metabolite aus dem Isolat gtH22, Anzucht in vier verschiedenen Kulturmedien. Die Peak- Nummern finden sich in der Abbildung 19 a-d wieder. n. i.: nicht identifiziert

Peak	m/z	Medium	Substanz	Referenz
1	1464,9	Hafermehl	Fengycin	(Vanittanakom et al., 1986)
2	1492	CN, Hafermehl, SGCY, TSB	Plipastatin	(Umezawa et al., 1986)
3	994,8	SGCY, TSB	Lichenysin G	(Rodrigues et al., 2006)
4	1008,8	CN, Hafermehl, SGCY, TSB	Lichenysin G	(Rodrigues et al., 2006)
5	1022,8	CN, Hafermehl, SGCY, TSB	Lichenysin G	(Rodrigues et al., 2006)
6	1036,9	CN, Hafermehl, SGCY, TSB	Lichenysin G	(Rodrigues et al., 2006)
7	1031,7	Hafermehl	Bacillomycin D	(Peypoux et al., 1984)
8	1045,7	Hafermehl, TSB	Bacillomycin D	(Peypoux et al., 1984)
9	1476,3	CN, Hafermehl, SGCY	Fengycin	(Vanittanakom et al., 1986)
I	1040,8	n. i.		
J	991,9	n. i.		
K	1043,0	n. i.		
L	659,0	n. i.		

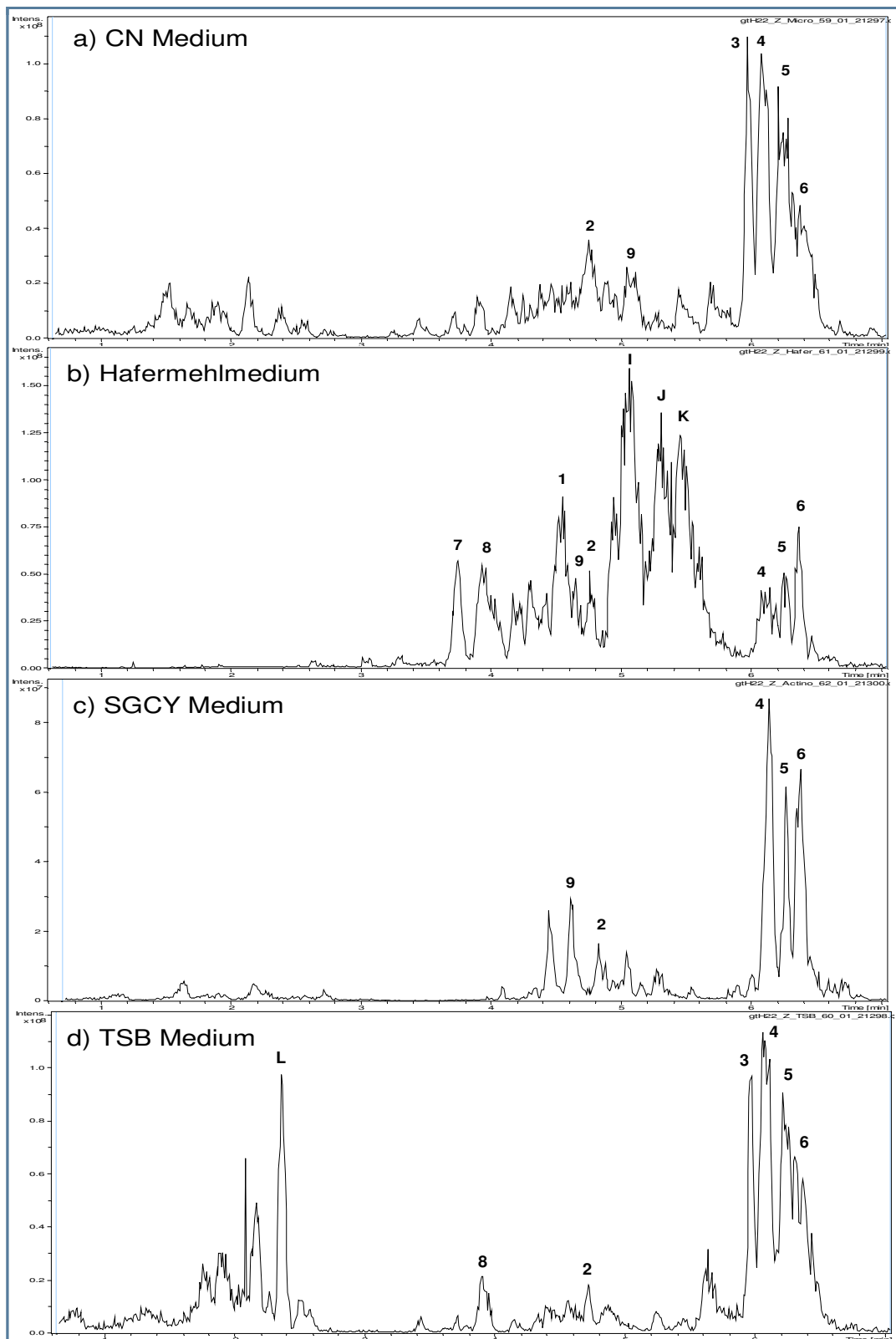


Abbildung 19: Base Peak Chromatogramme des Isolates gH22 in vier verschiedenen Kulturmedien.

Diskussion

Bewertung des Wirkstoffpotentials mariner *Bacillus amyloliquefaciens* Stämme

Die hier untersuchten zehn *Bacillus amyloliquefaciens* Stämme zeigten unabhängig vom Herkunftsort ein variables Bild was die Substanzen, die Bioaktivitäten und die Existenz von Sekundärmetabolit-Genclustern wie NRPS und PKS anbelangt. Es scheint, dass die Produktion von Sekundärmetaboliten eher stammspezifischen Parametern unterliegt.

In neun der zehn *Bacillus amyloliquefaciens* Isolate konnten nicht-ribosomale Peptid-synthetasen und in einem Isolat (gtH22) zusätzlich noch eine Polyketidsynthase I, nachgewiesen werden. Damit zeigt sich, dass auch marine *B. amyloliquefaciens* Stämme diese Multienzyme enthalten und dadurch vielversprechende Wirkstoffproduzenten sind. Bislang war die Existenz dieser Gencluster nur durch Genomsequenzierungen von terrestrischen *B. amyloliquefaciens* Stämmen belegt worden (Arguelles-Arias et al., 2009; Chen et al., 2007). Es zeigte sich, dass ein nicht unbeträchtlicher Teil (>8,5 % bei 3,9 Mb Genomgröße) in dem Stamm FZB42 für die Produktion von Antibiotika und Siderophoren über diese Multienzyme codiert (Chen et al., 2007). In den terrestrischen Stämmen GAI und FZB42 wurden jeweils bislang vier Gencluster für NRPS annotiert die auch expremiert werden: Surfactin, Iturin A, Fengycin und Bacillibactin (Arguelles-Arias et al., 2009). Insgesamt zwei expremierte Gencluster wurden für Polyketidsynthasen und ein NRPS/PKS Hybrid Cluster identifiziert und charakterisiert: Macrolactin, Difficidin und Bacillaene (Arguelles-Arias et al., 2009; Chen et al., 2006; Chen et al., 2007; Schneider et al., 2007).

Die Produktion von verschiedenen Substanzklassen von nicht-ribosomalen Lipopeptiden wie Surfactin, Fengycin und Iturin konnten in allen zehn *B. amyloliquefaciens* Isolaten gezeigt werden. Somit scheint ein Großteil der NRPS-Gencluster, aus terrestrischen Stämme bekannt, auch in marinen *B. amyloliquefaciens* Stämmen vorhanden zu sein und auch expremiert zu werden. Die marinen Stämme produzierten zeitgleich in einem Kulturansatz die gleichen Metabolite, die bereits für terrestrische Stämme identifiziert wurden. Einzig das Lipopeptid Fengycin wurde auch schon aus dem marinen *B. amyloliquefaciens* SH-B10 isoliert (Chen et al., 2010). Die Produktion von nicht-ribosomalen Lipopeptiden aus den drei Hauptsubstanzklassen ist typisch für *Bacillus* spp. (Katz and Demain, 1977; Koumoutsi et al., 2004; Pyoung II et al., 2010; Roongsawang et al., 2002). Welche Substanzklasse und Analoga produziert wurden unterscheidet sich zwischen den hier untersuchten Isolaten teilweise stark und ist dabei unabhängig vom Herkunftsort der Isolate.

Die Substanzen aus der Klasse der Surfactine sind moderat antimikrobiell wirksam. Ihre Hauptaktivitäten sind die Hämolyse von Zellen (Rodrigues et al., 2006), Biofilmbildung (Bais et al., 2004) aber auch die Inhibierung der Biofilmbildung anderer Bakterien-Taxa (Mireles et al., 2001). Lichenysin ist ein Analogon von Surfactin und hat chelatbildende Eigenschaften (Grangemard et al., 2001). Fengycine dagegen hemmen filamentöse Pilze aber keine Hefen oder Bakterien (Roongsawang et al., 2010). Diese amphipathischen Lipopeptide agieren in der Grenzphase zwischen Zellmembranen und extrazellulärem Kompartiment (Giuliani et al., 2007).

Das einzige Polyketid (PKS I), ein Macrolactin, wurde von zwei Isolaten (B45 und gtK5) produziert. Diese zeigten allerdings keine Amplifikate für PKS I in der PCR. Macrolactine sind in *Bacillus amyloliquefaciens* Stämmen weit verbreitet, kommen allerdings nicht in dem Typstamm *Bacillus amyloliquefaciens* DSM7^T vor (Schneider et al., 2007). Sie zeigen sowohl eine cytotoxische Wirkung gegen Hautkrebszellen (B16-F10), Herpes simplex als auch einen Schutzmechanismus von Lymphoblasten gegen HIV, indem es die Replikation des Virus inhiert (Gustafson et al., 1989; Jaruchoktaweechai et al., 2000).

Ein Fehlen von NRPS oder PKS Genamplifikaten schließen die Produktion von nicht-ribosomalen Peptiden oder Polyketiden nicht aus. Zu dem Isolat gtI11 konnten keine Amplifikate für NRPS gewonnen werden, aber in dem Kulturansatz wurden nicht-ribosomale Lipopeptide detektiert. Diese Diskrepanz kann unter anderem an den verwendeten Primern oder nicht ausreichend DNA in der Probe liegen. Ein Fehlen eines zugehörigen Gens in einem PCR-basierten Screening zeigte sich auch in dem terrestrischen Stamm *B. amyloliquefaciens* LBM5006. Hier wurde in dem Kulturansatz Surfactin identifiziert, aber kein dazugehöriges Gen detektiert (Benitez et al., 2010).

Das Isolat gtH22 zeigte dagegen ein Amplifikat für PKS I aber keine Produktion eines Polyketids in den Kulturansätzen. Die Anwesenheit von einem oder mehreren dieser Gencluster muss nicht unbedingt die Produktion eines entsprechenden Metabolits in dem Kulturansatz zur Folge haben. Vielmehr kann es auch Hinweise für nicht mehr aktive Produktionswege von Sekundärmetaboliten sein oder auf ein ‚stilles‘ Gencluster hinweisen. Handelt es sich um ein ‚stilles‘ Gencluster kann durch Veränderungen der Kultivierungsparameter oder einer heterologen Expression eventuell das Produkt dieses PKS I Genclusters erhalten werden. Durch solche ‚stillen‘ Gencluster ist die Kapazität von Bakterien zur Metabolitproduktion um einiges höher als bisher angenommen (Wenzel and Müller, 2005).

Insgesamt hatten die zehn Isolate ein hohes Potential sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien zu hemmen. Die Rohextrakte von allen zehn Isolaten waren gegen mindestens zwei Testorganismen (*Xanthomonas campestris* und *Ralstonia solanacearum*) aktiv. Es wurden Gram-positive und Gram-negative Bakterien gleich häufig in ihrem Wachstum inhibiert. Die Inhibierung von *Xanthomonas campestris* wurde für terrestrische *B. amyloliquefaciens* Stämme bereits belegt (Wulff et al., 2002). Die Isolate, die alle neun Testorganismen hemmten, produzierten sowohl Surfactine, Fengycine und Iturine (Isolate gtH22, gtI11 und C4) oder Fengycin, Surfactine, Iturine und eine bislang unbekannt Substanz (Isolat M2, Peak G). Diese breite antibakterielle Aktivität kann durch die Iturine wie Bacillomycin D (Roongsawang et al., 2010) oder durch die bislang unbekannt Substanzen ausgelöst worden sein. Möglich sind auch synergistische Effekte der Substanzen auf Grund dessen diese vielfältigen Bioaktivitäten auftreten. Synergismus ist zwischen Surfactin, welches keine antifungale Aktivität hat und Iturin A beobachtet worden. Werden diese beiden Substanzen zusammen gebildet wird die antifungale Aktivität von Iturin A verstärkt (Maget-Dana et al., 1992). Ebenfalls haben Bacillomycin und Fengycin synergistische Effekte in Bezug auf phytopathogenen Pilze in der Rhizosphäre (Koumoutsis et al., 2004).

Die Inhibierung der Hefe *Candida glabrata* kann in dem Isolat gtH22 durch Bacillomycin D und in den Isolaten C4, M2 und gtI11 durch Iturin A hervorgerufen worden sein. Das antifungal wirksame Bacillomycin D wird allerdings auch in den Isolaten gtH1 und gtH2 produziert die keine Inhibierung von *C. glabrata* zeigten. In gtH1 und gtH2 hat ein Analogon von Bacillomycin D eine lipophile Seitenkette aus 14 Kohlenstoff. In gtH22 besteht die lipophile Seitenkette aus 15 Kohlenstoffresten. Darin könnte der Unterschied in den Inhibierungseigenschaften der Isolate liegen. Tabbene et al. (2011) isolierten aus *Bacillus subtilis* B38 drei verschiedenen Bacillomycin D ähnliche Peptide mit Seitenketten von 14-16 Kohlenstoff. Diese wiesen je nach Kohlenstoffkettenlänge unterschiedlich starke Hemmungen von *Candida albicans* auf. Je länger die Kohlenstoffkette war, desto stärker war die hämolytische und antifungale Wirkung. Das Peptid mit der C16-Seitenkette hemmte *Candida albicans* in lethalen Konzentrationen vergleichbar mit dem Antimycotikum Amphotericin B (Tabbene et al., 2011).

Medienvariationen zur Induzierung von unterschiedlichen Metabolitproduktionen

Die Anzucht von vier Isolaten (M2, gtI11, C4 und C5) in einem zweiten Kulturmedium (TM) zeigte keine große Veränderung in der Metabolitproduktion. Die biologischen Aktivitäten waren allerdings wesentlich geringer, als die der Rohextrakte aus dem Medium GYM30. Eventuell werden die Metabolite in geringerer Konzentration produziert und sind daher nicht mehr so wirksam. Auch ist ein antagonistischer Effekt der Substanzen z.B. in dem Extrakt von Isolat C5 (Peak H), möglich wie es schon für andere Peptide beschrieben worden ist (Ulvatne et al., 2001). Die bislang nicht identifizierten Substanzen könnten die antimikrobielle Wirkung der Iturine unterdrücken.

Da das Isolat gtH22 in der Produktion von Lipopeptiden und den dadurch auftretenden Bioaktivitäten sehr vielversprechend aussah, wurde es in vier weiteren Medien angezogen (CN, Hafermehl, SGCY und TSB Medium). Auch hier zeigte sich in allen Medien die Produktion von Bacillomycin D (Iturin), Plipastatin (Fengycin) und Lichenysin G (Surfactin). In dem Hafermehl- und TSB-Medium wurden, jeweils andere, zusätzliche nicht identifizierte Metabolite produziert (Peak I-L). Deren weitere Identifizierung steht noch aus und können so noch vielversprechende Wirkstoffe enthalten.

Insgesamt war die Kultivierung mit unterschiedlichen Medien zur Induzierung von unbekanntem Metaboliten erfolgreich.

Die in dieser Arbeit untersuchten *Bacillus amyloliquefaciens* Isolate produzierten herkunftsunabhängig verschiedene Arten von Sekundärmetaboliten. In allen Kulturansätzen konnte die Produktion von nicht-ribosomalen Lipopeptiden gezeigt werden. Die Gene, dieser häufig gegen phytopathogene Mikroorganismen eingesetzten Substanzen, sind in den hier untersuchten marinen *Bacillus amyloliquefaciens* Stämmen ebenso wie in den terrestrischen Stämmen GAI und FZB42 vorhanden und werden auch transkribiert. Die Teile des Genoms mit diesen Genclustern scheinen relativ konservativ zu sein und wenigen Mutationen zu unterliegen, sodass eine Produktion auch unter Laborbedingungen häufig ist. Durch die Produktion von bislang unbekanntem Substanzen zeigt sich die Variabilität in der Sekundärmetabolitproduktion von marinen *Bacillus amyloliquefaciens* Stämmen. Diese Unterschiede könnten mit den unterschiedlichen Bedingungen am Standort zur Probennahme zusammenhängen. Parameter wie Sauerstoffgehalt, Temperatur, Druck, Nährstoffe aber auch Konkurrenz mit anderen Bakterien um Nährstoffe und Lebensraum haben Einfluss auf die Metabolitproduktion. Möglicherweise haben diese biologischen und physiologischen Parameter am Standort noch nachhaltig

Einfluss auf das Expressionsmuster von Genen auch im Labor. Die Produktion von nicht identifizierten Substanzen in marinen *Bacillus amyloliquefaciens* Stämmen machen diese, trotz ausführlicher Untersuchung von terrestrischen Vertretern, zu vielversprechenden Wirkstoffproduzenten, deren weitere Bearbeitung erfolversprechend ist.

VI.3 Chemische und genomische Untersuchungen zum Potential der Wirkstoffproduktion des *Bacillus* sp. Isolates gtP20b

Einleitung

Bislang umfasst die Gattung *Bacillus* über 250 verschiedene Arten (List of Prokaryotes, J.P. Euzéby, Mai 2012). Bekannteste Vertreter dieser Gattung sind *Bacillus subtilis* (Cohn, 1872), *Bacillus amyloliquefaciens* (Priest et al., 1987), *Bacillus pumilus* (Gottheil, 1901) und *Bacillus licheniformis* (Weigmann, 1898), welche alle zuerst als terrestrische Bodenbakterien beschrieben worden sind. Viele verschiedene *Bacillus* Arten wie z.B. *B. marinus*, *B. badius*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. firmus*, *B. lentus*, *B. amyloliquefaciens* und *B. pumilus* sind mittlerweile aber auch aus dem marinen Milieu isoliert worden und sind dort häufige Vertreter (Ivanova et al., 1992; Ivanova et al., 2010; Siefert et al., 2000).

Einige Arten aus der Gattung *Bacillus* wie z.B. *B. subtilis* sind attraktive Organismen für die Anwendung in der Industrie. Mit ihren hohen Wachstumsraten, ihrer Kapazität zur Sekretion von Proteinen ins Medium und ihr Status als nicht-pathogener Organismus werden sie vielfach verwendet (Kunst et al., 1997). Ihre Produkte werden sowohl als Antibiotika, Vitamine, Chemikalien, Biopestizide oder als Enzyme in Lebensmitteln eingesetzt (Schallmey et al., 2004). Bereits auf dem Markt als Antibiotika eingesetzt sind zwei nicht-ribosomal gebildete Peptide. Bacitracin, welches die Zellwand von Gram-positiven Bakterien wie Staphylokokken und Enterokokken zerstört, wird von *Bacillus subtilis* produziert und als Wundheilmittel und Futtermittelzusatz eingesetzt (Johnson et al., 1945; Renneberg, 2007). *Bacillus polymyxa* produziert Polymyxin E, welches als Antibiotikum unter dem Namen Colimycin eingesetzt wird. Es ist wirksam gegen Gram-negative Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* und findet Anwendung als Inhalationsmittel beim Menschen gegen Lungeninfektionen (Jensen et al., 1987).

Die Produktion von Sekundärmetaboliten unterliegt mehreren Faktoren, die durch unterschiedliche Signale ausgelöst werden. Nährstoffmangel aktiviert eine Reihe von Prozessen, wie Sporulation, Motilität und Antibiotikaproduktion (Katz and Demain, 1977; Piggot and Coote, 1976). *Bacillus brevis* und *Bacillus subtilis* produzieren die Peptidantibiotika Tyrocidin, Gramicidin S und Surfactin welche gegen nah verwandte Arten antibakterielle Wirkung haben. Die Genexpression hierfür wird unter Nährstoffmangel aktiviert (Katz and Demain, 1977). Als Quorum Sensing Molekül dient das antibakteriell wirksame Peptid Subtilin. Dieses wird von *Bacillus subtilis* A1/3 als Pheromon in Abhängigkeit der Zelldichte und als Antwort in der Wachstumsphase produziert. Durch

die Produktion von Subtilin verschafft sich *Bacillus subtilis* A1/3 einen Selektionsvorteil gegenüber Konkurrenten, muss sich aber gleichzeitig vor der eigenen Substanzwirkung schützen (Stein, 2005). Dies kann über einen Konzentrationsmechanismen mit speziellen Pumpen oder inaktiven Vorstufen geschehen. Die Produktion von Vorstufen war bislang für die Substanzklasse der nicht-ribosomalen Peptide und Polyketide nicht bekannt. In *Xenorhabdus nematophila* ist dies für das Antibiotikum Xenocoumacin und in *E. coli* für das NRPS/PKS Hybrid Colibactin, bewiesen worden. Die Vorstufen dieser Peptide werden erst durch eine Membran gebundene D-Asparagin spezifische Peptidase aktiviert und danach aus der Zelle ausgeschleust (Dubois et al., 2011; Reimer et al., 2011).

Viele Wirkstoffe wurden und werden noch durch Kultivierungsversuchen identifiziert. Eine alternative Strategie bietet die Sequenzierung kompletter bakterieller Genome, wodurch es seit einiger Zeit möglich ist, das Potential zur Wirkstoffproduktion einzelner Bakterien auf genomischer Ebene abzuschätzen und so auch Gene bzw. Gencluster für bislang nicht-produzierte Metabolite zu identifizieren. Zurzeit sind über 45 *Bacillus* Genome komplett sequenziert und mehr als doppelte so viele sind noch in Bearbeitung (<http://genomesonline.org/cgi-bin/GOLD/bin/gold.cgi>, Mai 2012). Das Genom des Referenzorganismus *B. subtilis* str168 war das erste Genom eines Gram-positiven Bakteriums welches komplett sequenziert wurde (Barbe et al., 2009; Kunst et al., 1997). Bei der Annotation zeigte sich, dass in dem Genom von *B. subtilis* str168 (Größe 4,2 Mb) rund 4-5 % der Gene für die Antibiotika-Produktion codieren (Stein, 2005). Diese Gene sind in großen Multienzymkomplexen wie z.B. nicht-ribosomale Peptidsynthetasen und Polyketidsynthetasen zusammengefasst (Kunst et al., 1997). Durch die Vielzahl an bereits bekannten Wirkstoffen und die ergänzenden Möglichkeiten zur Entdeckung neuer Substanzen haben *Bacillus* Arten ein hohes Potential zur Produktion neuer wirksamer Substanzen.

Auf Grund der Ergebnisse zur biologischen Aktivität und dem Nachweis von NRPS Genclustern mittels PCR wurde das Isolat gtP20b, dessen nächst verwandter Typstamm auf 16S rDNA Ebene *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* war, näher bearbeitet. Neben Kultivierungsversuchen und der chemischen Auswertung der Metabolite wurde zusätzlich das Genom des Isolates gtP20b vollständig sequenziert. Damit sollten bekannte Genclustern den produzierten Substanzen zugeordnet werden, aber auch sogenannte 'stille' Gencluster sollten identifiziert werden, um deren mögliche Produkte vorhersagen zu können.

Ergebnisse

Isolierung und Identifizierung des Bakteriums

Die Sedimentprobe, aus der das Isolat gtP20b stammt, wurde mit einem Multicorer im indischen Ozean bei 608 m Wassertiefe genommen. Aus den Proben des Indischen Ozeans konnten insgesamt sieben Isolate gewonnen werden, die als nächsten verwandten Typstamm *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*^T (DSM 15029) (Nakamura et al., 1999), mit einer 99-100 % Similarität, hatten. Daraus wurde das Isolat gtP20b (Similarität 99,6 %) zur näheren Bearbeitung ausgewählt.

Nachweis von Sekundärmetabolit-Genclustern

Die PCR mit spezifischen Primern für nicht-ribosomale Peptidsynthetasen ermöglichte die Amplifikation von DNA Genfragmenten der gewünschten Länge (roter Kreis). Weder für Polyketidsynthetasen I noch für Polyketidsynthetasen II wurden Amplifikate erhalten.

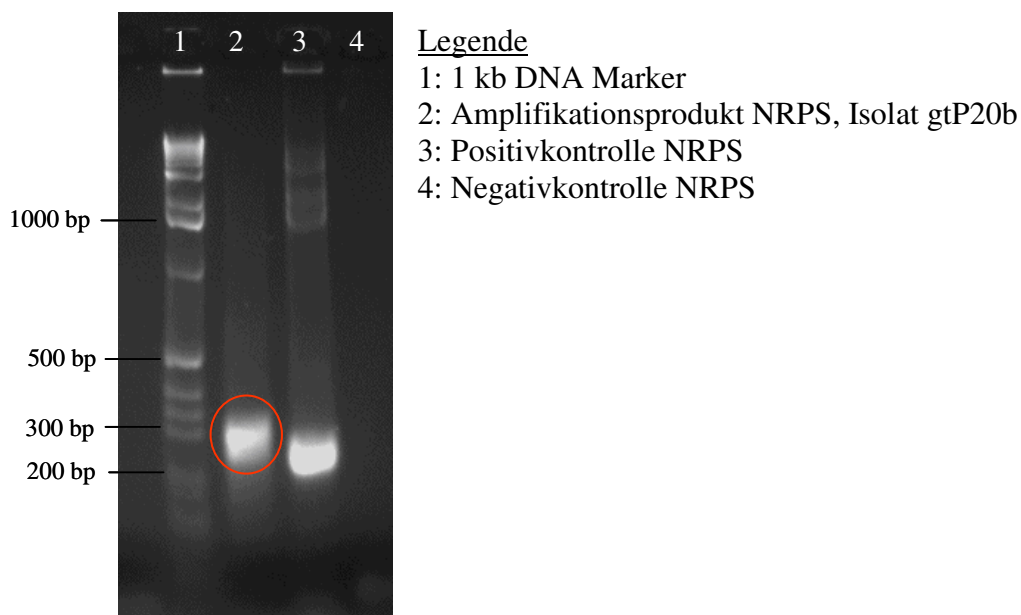


Abbildung 20: Amplifikation von Fragmenten der A-Domäne von nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen des Isolates gtP20b.

Aktivitätstests

Alle Rohextrakte der vier getesteten Medien (GYM30, Hafermehlmedium, SGYC, TSB) hemmten das Wachstum des phytopathogenen Bakteriums *Xanthomonas campestris*. Ferner zeigten die Rohextrakte des Hafermehl-, SGYC- und TSB Mediums eine Inhibierung des Wachstums von *Candida glabrata* (Tabelle 22). Die Teststämme *B. subtilis* und *E.coli* wurden in keinem der Ansätze inhibiert.

Tabelle 22: Inhibierung der Testorganismen (%) durch vier verschiedene Rohextrakte des Isolates gtP20b.

Medium	Testorganismen			
	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>X. campestris</i>	<i>C. glabrata</i>
GYM30	0	0	99	0
Hafermehlmedium	0	0	26	58
SGYC	0	0	92	64
TSB	0	0	28	56

Chromatographische Auswertung der Metabolite

Die Chromatogramme der HPLC-Messung zeigten, dass in allen vier Medien verschiedene Derivate von Lichenysin G gebildet wurden (Tabelle 23, Abbildung 21 a-d). Diese antibakteriellen Heptapeptide gehören zu der Substanzklasse der Surfactine und unterscheiden sich in der Anzahl der Methylgruppen in ihren lipophilen Seitenketten (Berrue et al., 2009; Rodrigues et al., 2006). In dem Kultivierungsmedium GYM30 wurde neben einem Fengycin-Derivat drei bislang nicht-identifizierte Metabolite detektiert (Abbildung 21a, Peak A-C). Ebenso wies das Hafermehlmedium drei nicht identifizierte Metabolite auf (Abbildung 21d, Peak D-F). Weiter wurde in den Medien TSB und SGYC verschiedene Derivate von Iturin A und Bacillomycin F (beides Analoga der Iturin Substanzklasse) gebildet. Diese haben hämolytische und antifungale Eigenschaften (Besson et al., 1984; Peypoux et al., 1985).

Tabelle 23: Identifizierte Metabolite produziert von dem Isolat gtP20b. Die Peak- Bezeichnungen finden sich in den Abbildungen 21a-d wieder. n. i.: nicht identifiziert

Peak	m/z	Medium	Substanz	Wirkung	Referenz
1	994,8	GYM30	Lichenysin G	antibakteriell	(Rodrigues et al., 2006)
2	1008,8	GYM30, SGCY	Lichenysin G	antibakteriell	(Rodrigues et al., 2006)
3	1022,8	GYM30, TSB, Hafermehl, SGCY	Lichenysin G	antibakteriell	(Rodrigues et al., 2006)
4	1036,9	GYM30, Hafermehl, SGCY	Lichenysin G	antibakteriell	(Rodrigues et al., 2006)
5	1476,3	GYM30	Fengycin	antifungal	(Vanittanakom et al., 1986)
6	1071,8	TSB	Iturin A	hämolytisch, antifungal	(Besson et al., 1984)
7	1085,3	TSB, SGCY	Bacillomycin F	hämolytisch, antifungal	(Peypoux et al., 1985)
8	1099,3	TSB, SGCY	Bacillomycin F	hämolytisch, antifungal	(Peypoux et al., 1985)
A	424,2	n. i.			
B	407,2	n. i.			
C	439,2	n. i.			
D	701,2	n. i.			
E	677,3	n. i.			
G	703,3	n. i.			

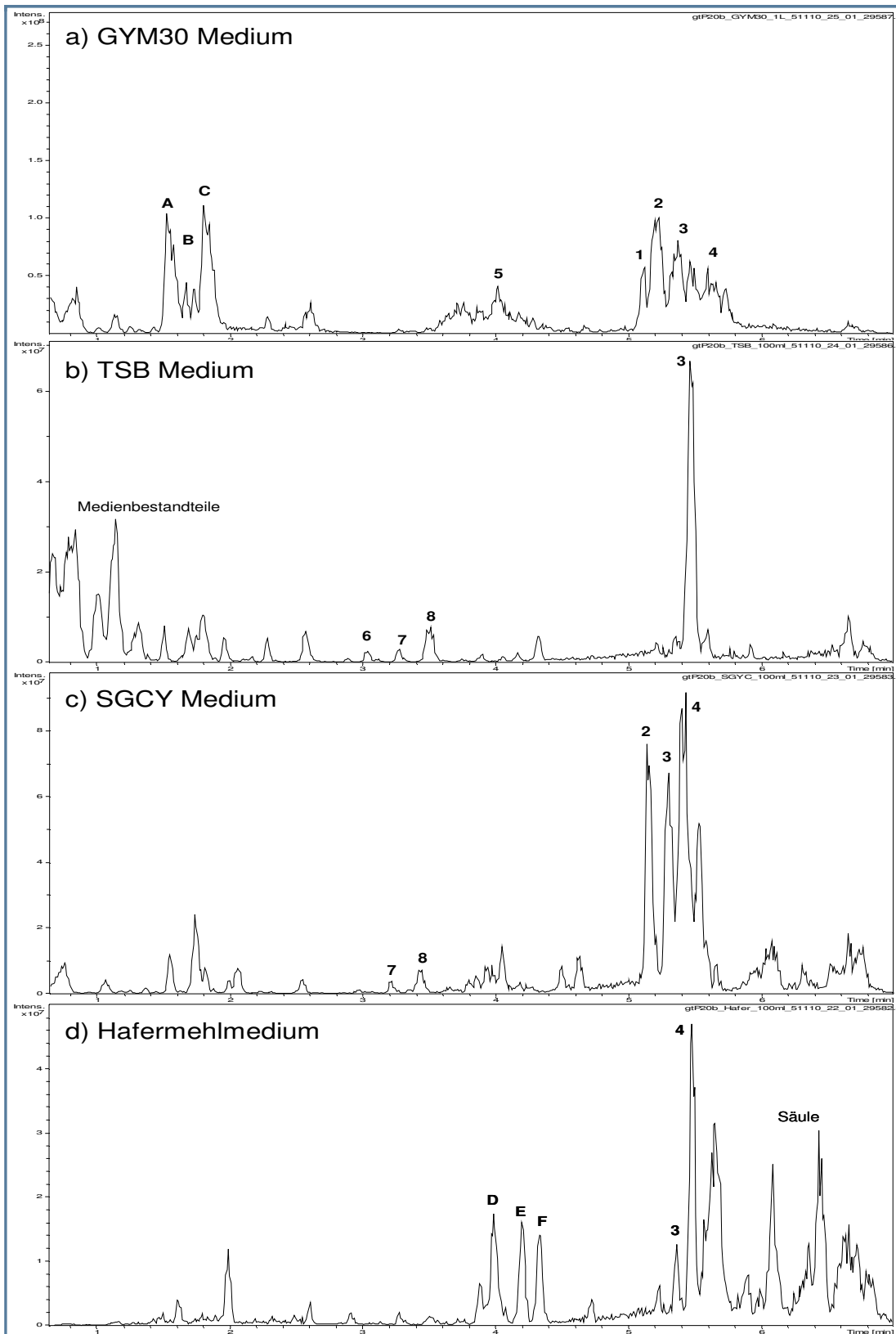


Abbildung 21: Base Peak Chromatogramme des Isolates gP20b, nach Kultivierung für sieben Tage in 5L Kultur.

Genomsequenzierung

Die Sequenzierung des Genoms des Isolates gtP20b sollte ein umfassendes Bild des Potentials zur Wirkstoffproduktion ermöglichen. Die erhaltenen Sequenzen des Genoms wurden insbesondere nach potentiellen Genclustern für NRPS und PKS durchsucht.

Das Draftgenom enthielt 4,18 Mb, dies entspricht ca. 99 % des gesamten Genoms. Dieses enthielt 4331 Open Reading Frames (ORFs), 77 tRNAs und 30 rRNAs. Der GC-Gehalt betrug 44,8 % (Fan et al., 2011a). Das Draftgenom enthielt 395 Contigs mit einem N50-Wert von 49205 bp und einem L50-Wert von 27. N50 und L50 sind Maße für die Qualität eines Draftgenoms. Sie werden bestimmt indem man alle Contigs der Größe nach sortiert und deren Länge aufaddiert, beginnend mit dem Größten. L50 entspricht dabei dem Contig mit welchem die Summe 50 % der Gesamtlänge erreicht. N50 ist die Länge dieses Contigs. Je kleiner L50 und größer N50 sind, desto besser ist die Qualität des Drafts.

Die Software antiSMASH wurde genutzt um ORFs vorherzusagen und diese mit Datenbanken für NRPS- und PKS- Genclustern zu vergleichen. Auf zehn Contigs konnten damit 17 ORFs bekannten als auch unbekanntem Genclustern zugeordnet werden. Insgesamt gehörten drei Gencluster zu Polyketidsynthasen. Keines dieser Gencluster konnte einem spezifischen Produkt zugeordnet werden. Sie wurden nur als putative Polyketidsynthasen annotiert. Lediglich eine Typ III PKS konnte als putative Chalcone Synthase identifiziert werden (Tabelle 24). Die übrigen zwei PKS Gencluster zeigten eine 91 % Similarität zu nicht weiter identifizierten Polyketidsynthasen aus *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*. In den Kulturansätzen konnten keine Produktion von PKS Produkten festgestellt werden.

Für nicht-ribosomale Peptidsynthetasen sind fünf Gencluster identifiziert worden. Eine Zuordnung zu möglichen Produkten konnte für alle erfolgen. So wurden Similaritäten von 90-95 % zu Genclustern für Iturin A, Bacillomycin D, Plipastatin (zwei Gencluster) und Fengycin gefunden (Tabelle 25). Für alle diese Gencluster konnten in den Kulturansätzen Substanzen oder Analoga identifiziert werden. Für die zwei annotierten NRPS/PKS Hybrid Systeme konnte keine Produktvorhersage erfolgen (Tabelle 26). Es ist aber wahrscheinlich, dass mindestens ein Hybridsystem in die Produktion von Bacillomycin F involviert ist, welches in den Kulturansätzen identifiziert wurde.

Bei dem Abgleich aller contigs mit einer bekannten A-Domäne und dem Tool Blastx, sowie abschließendem Abgleich der Treffer mit der non-redundante Protein-Datenbank (nr) von NCBI fanden sich, neben den Genclustern die mit der Software antiSMASH entdeckt wurden, auch noch Teile des NRPS-Genclusters für das Siderophor Bacillibac-

tin. Diese Diskrepanz liegt den unterschiedlichen Vorgehensweisen der beiden Tools (Blast und antiSMASH) zugrunde. Die Software antiSMASH annotiert zuerst auf der Vergleichsequenz ORF Regionen, bevor überhaupt nach Sekundärmetabolit-Genclustern gesucht wird. Damit ist diese Methode nicht geeignet für contigs <1 kb. Auf sehr kleinen contigs können sich allerdings noch wichtige Informationen über vorhandene Gencluster befinden, wie es bei Bacillibactin der Fall war. Daher ist es bei Genomsequenzierungen, bei denen die Sequenz nicht komplett assembliert ist, wichtig beide Methoden zu verwenden.

Tabelle 24: PKS Gencluster identifiziert auf dem Genom des Isolates gtP20b.

Contig	ORF	Domänen	Blastx	Similarität (%)	nächster Verwandter	AS	Accession Nr.
66	29	cMT, ACP, KS, ACP, KS, trans AT, ACP, TE	Polyketid Synthase	91	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> ATCC 6633	2543	ZP_06873411.1
33	8	-	KR Domäne	91	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> TU-B-10	4565	YP_004877340.1
	9	-	KR Domäne	92	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> TU-B-10	4267	YP_004877341.1
75	43	-	putative Chalcone Synthase	95	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> Ro-NN-1	385	AEP91223

Tabelle 25: NRPS Gencluster identifiziert auf dem Genom von Isolat gtP20b.

Contig	ORF	Domänen	Blastx	Similarität (%)	nächster Verwandter	AS	Accession Nr.
22	1	A (Tyr), PCP, E	Plipastatin Synthetase	90	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	1186	AEW31022
	2	C, A (Ile), PCP, TE	Plipastatin Synthetase	93	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str 168	1289	NP_389712
	10	A	AMP-binding Protein	95	<i>B. subtilis</i> Bsn 5	548	YP_004203759
64	2	A (Tyr), PCP, E, C, A(Asn), PCP, E, C, A(Gln), PCP, C, A(Pro), PCP, C	Iturin A Synthetase B	91	<i>B. amyloliquefaciens</i> DSM 7	5360	YP_003920508.1
89	82	C, A (Thr), PCP, TE	Bacillomycin D Synthetase	92	<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	1154	YP_001421410
90	1	A (Val), PCP, TE	Plipastatin Synthetase	92	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	1172	AEW31021
136	1	A (Orn), PCP, E	Fengycin Synthetase	91	<i>B. subtilis</i>	1184	ACX47458

Tabelle 26: Hybrid NRPS/PKS Gencluster identifiziert auf dem Genom von dem Isolat gtP20b.

Contig	ORF	Domänen	Blastx	Similarität (%)	nächster Verwandter	AS	Accession Nr.
25	6	Pk	Polyketid Synthase	55	<i>P. dentritiformis</i> C454	2517	ZP_09675078
	7	AT (Mal)	Polyketid Synthase	57	<i>B. pumilus</i> ATCC 7061	1508	ZP_03054477.1
	8	A (Asn)	NRPS	48	<i>B. pumilus</i> SARF 032	889	YP_001485888
	9	AT (Mal)	beta-ketoacyl-Synthase	44	<i>P. dentritiformis</i> C454	3031	ZP_09675075.1
	17	A (Gln)	NRPS subunit	52	<i>B. pumilus</i> ATCC 7061	1498	ZP_03054519.1
31	66	PCP, TE	AS-Adenylation	98	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> TU-B-10	562	Yp_004878696.1

Legende Tabelle 24-26:

Pk: Polyketidsynthase; AT: Acetyltransferase; A: Adenylierungsdomäne; PCP: Peptidyl-Carrier-Protein; TE: Thioesterase; ACP: Acyl-Carrier-Protein; KS: Ketosynthase; E: Epimerisierungsdomäne; C: Condensationsdomäne; AS: Aminosäuren

Diskussion

Untersuchungen zum Wirkstoffpotential des Isolates gtP20b

Durch die Nutzung von molekularbiologischen Methoden wie dem Nachweis mit spezifischen Primern für bestimmte Gencluster wurde ein erster Eindruck über das Potential des Isolates gtP20b zur Wirkstoffproduktion erhalten. Die Amplifikation für Fragmente von nicht-ribosomale Peptidsynthetasen war erfolgreich. Dass die Gene von solchen Multienzymkomplexe auch expremiert werden, wurde durch Kultivierungsansätze bestätigt. Die Produktion von nicht-ribosomalen Lipopeptide wie Lichenysin G, Iturin A und Fengycin sowie Bacillomycin F (ein NRPS/PKS Hybridkomplex) konnte gezeigt werden. In dem PCR-basierte Screening konnte allerdings keine Hinweise auf Polyketidsynthasen gefunden werden. Dies hätte der Fall sein müssen, da ein NRPS/PKS Hybrid System für Bacillomycin F expremiert wird und das dazugehörige Gencluster in dem Genom vorhanden sein müsste.

Die Produktion von nicht-ribosomalen Lipopeptide, besonders der drei Substanzklassen Iturin, Surfactin und Fengycin, ist in vielen *Bacillus* spp. Stämmen häufig vertreten (Koumoutsis et al., 2004; Ongena and Jacques, 2008; Roongsawang et al., 2010; Stein, 2005) (Pyoung II et al., 2010). Lichenysin ist ein antibakterielles Heptapeptid und die verschiedenen Analoga unterscheiden sich in der Anzahl der Methylgruppen der lipophilen Seitenketten (Grangemard et al., 1999). Durch die antibakterielle Wirkung ist dieses Peptid verantwortlich für die Hemmung des phytopathogenen Bakteriums *Xanthomonas campestris* in dieser Studie. Das amphipathische Lichenysin hat chelatbildende Eigenschaften und kann sich in antimikrobielle Membranen einlagern und diese porös machen (Grangemard et al., 2001). In den Medien GYM30 und SGCY wurden

vier bzw. drei bekannte Lichensin G Derivate produziert. Daraus resultierte eine starke Inhibierung (>90 %) von *X. campestris* in den Aktivitätstests. Die Inhibierung der Hefe *Candida glabrata* wurde durch, das in TSB und SGCY produziertem Bacillomycin F hervorgerufen. Tabbene et al. (2011) zeigten, dass die aus *Bacillus subtilis* B38 isolierten Analoga von Bacillomycin D eine starke Hemmwirkung gegen die humanpathogenen Hefe *Candida albicans* haben (Tabbene et al., 2011). Für diese antifungale Hemmwirkung spielt die Länge der Kohlenstoffkette der lipophilen Seitenkette eine große Rolle. Bacillomycin D hat 14 Kohlenstoffreste in der lipophilen Seitenkette (Peypoux et al., 1984) und Bacillomycin F, welches in den hier durchgeführten Kulturansätzen produziert wurde, 15 Kohlenstoffreste (Peypoux et al., 1985). Sowohl 14, 15 als auch 16 Kohlenstoffe in der lipophilen Seitenkette in Analoga von Bacillomycin D haben eine antifungale Wirkung gegen *Candida albicans* (Tabbene et al., 2011). Solche Lipopeptide haben vermutlich eine wichtige Funktion im Habitat und verschaffen dem Produzenten einen Selektionsvorteil. Ebenfalls schützen sie, durch die biologische Kontrolle von phytopathogenen Pilzen und Bakterien in der Rhizosphäre, Pflanzenoberflächen vor deren Befall (Danhorn and Fuqua, 2007; Maget-Dana et al., 1992). Doch nicht nur im Pflanzenschutz sind diese Lipopeptide einsetzbar. *Bacillus pumilus* SP21 produziert verschiedenen Surfactin-Analoga, die eine Reihe von vielversprechenden Wirkungen wie die Hemmung des human-pathogenen Bakteriums *Salmonella enterica* aufweisen (Mireles et al., 2001). Das Surfactin-Analogon Amicoumacin A ist aktiv gegen Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* Stämme und so ein wichtiges Antibiotikum gegen diesen human-pathogenen Keim. In dem Hafermehlmedium und GYM30 wurden jeweils noch drei bislang nicht identifizierte Substanzen produziert (Abbildung 21a,d, Peak A-F). Diese könnten in dem Rohextrakt des Hafermehlmediums für die moderate Inhibierung des Wachstums von *Candida glabrata* verantwortlich sein und möglicherweise neue Wirkstoffe darstellen die es noch zu identifizieren gilt.

Genomsequenzierung

Mit der vollständigen Sequenzierung des Genoms konnten Informationen zu Sekundärmetabolit-Genclustern erhalten werden. Für fünf vorhergesagt NRPS Gencluster konnten in den Kulturansätzen die exakten Substanzen oder Substanz-Analoga identifiziert werden. Für Lichenysin G, welches in den Kulturansätzen produziert wurde, konnte kein entsprechendes Gencluster bei der Analyse des Genoms nachgewiesen werden. Wahrscheinlich gehört das nicht weiter identifizierte AMP-Bindungsprotein zu dem Lichenysin G Gencluster. Zu dem NRPS-Gencluster von Bacillibactin (Siderophor) konnte in den Kulturansätzen keine Substanz identifiziert werden. Bacillibactin wird von *Bacillus* spp. Stämmen unter Eisenlimitation in die Umwelt exkretiert. Es bindet Eisen (III) aus der Umgebung und wird in die Produzentenzelle zurück transportiert (Dertz et al., 2006; May et al., 2001). Offenbar lagen in den hier verwendeten Kultivierungsmedien kein Eisenmangel für den Stamm gtP20b vor.

Für die zwei NRPS/PKS Hybrid Systeme konnte keine Produktvorhersage erfolgen. Möglicherweise ist eines dieser Hybridsysteme in die Produktion von Bacillomycin F involviert. Ein Produkt einer Polyketidsynthese wurde in keinem, in dieser Studie verwendeten Kulturansätze, identifiziert. Wohingegen mindestens ein PKS Gencluster bei der Genomannotation identifiziert wurde.

Die Annotation von Genen für die Antibiotikaproduktion wurde schon bei der ersten Genomsequenzierung eines Gram-positiven Bakteriums, *Bacillus subtilis* str 168, durchgeführt. Bei diesem Stamm zeigte sich, dass ca. 4-5 % des Genoms für große Multienzymkomplexe wie NRPS und PKS codieren (Barbe et al., 2009; Kunst et al., 1997). Von dem Genom des Stammes *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 codieren sogar ca. 8,5 % für Antibiotika und Siderophore die nicht über Ribosomen synthetisiert werden (Chen et al., 2007). Eine Genomannotation von *B. amyloliquefaciens* FZB42 zeigte fünf nicht-ribosomale Peptidsynthetasen, die aus *Bacillus subtilis* str168 bekannt waren. Darunter waren NRPS Gencluster für Surfactin, Bacillibactin, Bacilysin, Fengycin und ein putatives Peptid (Chen et al., 2007). Weitere Gencluster, für Bacillomycin D (NRPS/PKS Hybrid), Macrolactin, Difficidin und Bacillaene (alle PKS), wurden in dem Stamm FZB42 identifiziert (Chen et al., 2006; Chen et al., 2007). Diese Gencluster sind ebenfalls in *Bacillus subtilis* str 168 vorhanden, aber durch eine Mutation der Phosphatheiny Transferase werden Bacillomycin D, Macrolactin, Difficidin und das putative Peptid nicht expremiert (Chen et al., 2007).

Das Vorkommen der oben genannten Genclustern zeigte sich auch bei einem Genomvergleich von neun *Bacillus* spp. Stämmen (fünf verschiedene Arten). Gencluster für Bacillibactin-ähnliche Siderophore, Lichenysin (Substanzklasse Surfactin), Mycosubtilin (Substanzklasse Iturin) und verschiedene Iturin-Derivate waren in allen neun Genomen vorhanden (Donadio et al., 2007). Es scheint, dass Sekundärmetabolit-Gencluster wie z.B. für Surfactin, Fengycin und Iturin (Bacillomycin) häufig in *Bacillus* spp. Stämmen (wie auch in dem Isolat gtP20b), vorkommen und somit nicht stammspezifisch sind. Die identifizierten Gencluster in dem Isolat gtP20b sind ortholog zu schon annotierten Genclustern und stammten vorwiegend aus nah verwandten Stämmen wie *Bacillus subtilis* bzw. subsp. *subtilis* oder *spizizenii*, *B. amyloliquefaciens* und *B. pumilus* aber auch von *Peanibacillus dentritiformis*.

Earl et al. (2007) untersuchten 17 verschiedene *Bacillus subtilis* Stämme und verglichen ihre genomische Diversität. Alle Stämme hatte auf 16S rRNA Ebene eine >99,8 % Similarität, zeigten aber bei der DNA/DNA Hybridisierung nur eine Similarität von 58-69 % (Nakamura et al., 1999). Es zeigte sich, dass rund 1/3 der *Bacillus subtilis* str168 spezifischen Gene variabel sind. Diese Gene codierten unter anderem für die Antibiotika- und Zellwandsynthese als auch für Sporulationsprozesse (Earl et al., 2007). Diese Arbeit zeigte, dass obwohl die Stämme auf 16S rDNA Ebene zur gleichen Art gehörten, durchaus ein enormer Teil ihrer Gene variabel sein können. Durch diese Diversität der Gene für die Sekundärmetabolit-Produktion ist *B. subtilis* so anpassungsfähig an verschiedene Lebensräume und Bedingungen. Diese Variabilität zeigte sich auch in einer weiteren Studie. Zeigler et al. verglich mit dem 'Genome-to-Genome Distance Calculator' (Auch et al., 2010) die Genome von *Bacillus subtilis* str 168, *Bacillus subtilis* W23 und dem aus dieser Arbeit stammende *Bacillus* sp. gtP20b. Dabei zeigte sich, dass die Anzahl der gleichen Gene von Isolat gtP20b zu str168 (78,4 %) als auch zu W23 (80,8 %) ähnlich ist (Zeigler, 2011). Die Variabilität von ein Fünftel der Gene zeigt, dass auch sehr nah verwandte Arten Unterschiede in Genen für den Sekundärmetabolismus aufweisen können und so eine Bearbeitung lohnenswert ist.

Durch die umfassende Bearbeitung des Isolates gtP20b konnte die Produktion von neuen Substanzen in der Kultivierung gezeigt werden und auch durch die Genomsequenzierung wurden bislang noch nicht näher charakterisierte, nicht transkribierte NRPS und PKS Gencluster entdeckt. Eine weitere Untersuchung der unbekanntenen Substanzen und der Gencluster ist daher notwendig um deren Produkte zu identifizieren. Nur nach einer vollständigen Identifizierung der Gencluster (bezüglich Größe, enthaltene Domänen,

GC-Gehalt des Gencluster) könnten diese heterolog in einen geeigneten Wirt eingebracht und dort expremiert werden. Die daraus resultierenden Produkte könnten völlig neue Strukturen und Aktivitäten aufweisen und so ein wichtiger Schritt in Richtung eines neuen Wirkstoffes sein.

VI.4 Chemische und genomische Untersuchungen zum Wirkstoffpotential des *Streptomyces* sp. Isolates C42 sowie Isolierung eines neuen nicht-ribosomalen Peptides

Einleitung

Von den durch die Isolierung gewonnenen marinen Bakterien gehörten 23 Isolate zu den *Actinobacteria* (Kapitel V.1). *Actinobacteria* sind vor allem aus dem terrestrischen Habitat bekannt und die Frage nach der Existenz von marinen *Actinobacteria* gab lange Zeit Anlass zu Spekulationen. Der Beweis, dass *Actinobacteria* im marinen Milieu nicht nur als dormante Sporen vorliegen, die durch den Eintrag aus dem terrestrischen Milieu stammen, ist mit der Isolierung von obligat marine Arten wie z.B. *Rhodococcus marinonascens* (Helmke and Weyland, 1984) oder *Salinospora* (Jensen et al., 2005; Maldonado et al., 2005; Mincer et al., 2002) erbracht worden. Neben der salzabhängigen metabolischen Aktivität in Kultivierungsversuchen zeigten Untersuchungen auch, dass Hybridisierungssignale aus einer marinen Probe von stoffwechselaktiven *Streptomyces* sp. Zellen stammten (Moran et al., 1995).

Actinobacteria produzieren über 2/3 der bekannten Antibiotika. Davon werden rund 80 % von der Gattung *Streptomyces* produziert (Kieser et al., 2000). Diese Gattung ist mit über 600 Arten die größte Gruppe der *Actinobacteria* (List of Prokaryotes, J.P. Euzéby, Mai 2012). Sie sind GC-reiche (60-80 %) (Wright and Bibb, 1992), Gram-positive Bakterien die Endosporen bilden und ubiquitär vorkommen (Kieser et al., 2000; Mayfield et al., 1972). Besonders Vertreter marin-isolierter *Streptomyces* spp. sind, neben den *Micromonospora* und einigen anderen Gattungen der *Actinobacteria*, aufgrund der Vielzahl an Sekundärmetabolit-Genclustern die Hauptproduzenten von Antibiotika (Berdy, 2005; Gontang et al., 2010). Sie sind eine einzigartige Quelle an antitumoralen, antimikrobiellen oder cytotoxischen Wirkstoffen (Bibb, 2005).

Antibiotika werden von Streptomyceten in der Übergangsphase vom vegetativen Wachstum zur Sporulation gebildet und unterliegen damit der Wachstumsrate (Chater and Hopwood, 1993). Ebenso haben Signalmoleküle wie γ -Butyrolactone (Horinouchi and Beppu, 1994), physiologischer Stress (Hobbs and Humphries, 1995) oder Nährstofflimitation von Stickstoff, Phosphat oder Glucose einen Einfluss (Chater and Bibb, 1997; Demain, 1998; Demain and Fang, 1995). Durch die Produktion von Antibiotika verschafft sich der Produzent Selektionsvorteile. Mit Ko-Kultivierung und nacheinander folgende Kultivierungen auf Agarplatten konnte bewiesen werden, dass *Streptomyces* sp. Antibiotika produziert, um das Wachstum von *Bacillus subtilis* zu inhibieren (Wiener, 1996). Die Produktion dieser Antibiotika verhindert das Wachsen von *Bacillus*

subtilis und gibt so dem *Streptomyces* sp. Stamm die Möglichkeit, selbst Kolonien zu bilden und die vorhandenen Nährstoffe zu nutzen (Wiener, 1996).

Eine Vielzahl an antibakteriell wirksamen Antibiotika, produziert von terrestrischen Streptomyceten sind bereits bekannt und werden auch als Antibiotika eingesetzt. Vancomycin (Störung der Zellwandsynthese), Bleomycin (Inhibierung der DNA Replikation), Actinomycin (Inhibition der Transkription) sowie Streptomycin (Inhibierung der Translation) sind nur einige Beispiele dafür (Zahner and Maas, 1972). Aber auch Wirkstoffe, isoliert aus marinen Streptomyceten, sind identifiziert. Essramycin, isoliert aus einem marinen Sediment-assoziierten Streptomyceten, wirkt hemmend gegen das Wachstum von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien (El-Gendy et al., 2008). Ebenfalls aus einem marinen Streptomyceten isoliert wurde Cyclomarin A. Dieses cyclische Peptid enthält ungewöhnliche Aminosäuren (Hinweise auf eine Produktion durch NRPS) und wirkt entzündungshemmend (Renner et al., 1999). Die aus einem marinen *Streptomyces* sp. isolierten Ammosamide A+B (Pyrroloquinoline Alkaloide) weisen cytotoxische Aktivität gegen humane Darmkrebszellen auf (Hughes et al., 2009a). Ebenfalls cytotoxische Wirkung, allerdings gegen HeLa Zellen, zeigen Phaeochromycine F-H. Diese Polyketide werden von einem marinen *Streptomyces* sp. DSS-18 (isoliert aus einer Pazifikprobe) produziert (Li et al., 2008).

In Streptomyceten sind die Gene für Antibiotika häufig in Genclustern auf dem Genom angeordnet. Die relativ großen Genome von *Streptomyces* spp. (8-10 Mb) enthalten teilweise über 20 Antibiotika-Gencluster (Hopwood, 2006; Nett et al., 2009). Besonders die Multienzymkomplexe die für nicht-ribosomale Peptide und Polyketide codieren sind von großem Interesse. Die darüber produzierten Substanzen weisen eine hohe strukturelle Diversität und vielfältige Wirkungsweisen auf. Solche Gencluster machen bei *Streptomycetaceae*, *Micromonospraceae* und *Pseudonocardiaceae* dabei mehr als 5 % der codierenden Bereiche aus (Nett et al., 2009). Zurzeit sind über 15 Genome von *Streptomyces* spp. komplett sequenziert. Über 30 Genomprojekte sind noch unvollständig und werden bearbeitet (<http://genomesonline.org/cgi/bin/GOLD/bin/gold.cgi>, Mai 2012). Die ersten sequenzierten *Streptomyces* Genome waren die von *S. avermitilis* (Ikeda et al., 2003) und *S. coelicolor* A1/3 (Bentley et al., 2002). Auf diesen Genomen konnten eine Vielzahl an unbekanntem NRPS und PKS Genclustern annotiert, sowie die Struktur ihrer Produkte aufgeklärt werden (Challis, 2008; Corre and Challis, 2009; Donadio et al., 2007). Aus diesen beiden Stämmen waren durch Kulturversuche bislang nur vier bzw. drei Naturstoffe bekannt. Durch die Genomsequenzierung zeigte sich, dass insgesamt 20 bzw. 25 Gencluster für Sekundärmetabolite vorhanden sind (Bentley

et al., 2002; Ikeda et al., 2003). Mit diesen Informationen konnte die Isolierung von zwei neuen Substanzen aus *S. coelicolor* A 1/3 erfolgen (Barona-Gomez et al., 2004; Lautru et al., 2005). Dabei handelt es sich um das Produkt des *cch* Genclusters welches bislang unbekannt war. Durch die Identifizierung der Domänen in dem Gencluster konnte eine Strukturvorhersage des Produktes erfolgen. Dabei zeigte sich, dass die Substanz möglicherweise Eisen bindet und so ein wichtiges Siderophor für *S. coelicolor* A 1/3 ist. Mit diesem Wissen wurden die Kultivierungsparameter angepasst, was letztendlich in der Isolierung von Coelichelin resultierte (Challis and Ravel, 2000). Eine weitere Substanz die durch 'Genome Mining' in *Streptomyces coelicolor* A1/3 identifiziert wurde ist Germicidin. Durch die Aufklärung des zugehörigen *sco7221* ORFs konnte Germicidin als das Produkt einer Polyketidsynthese III charakterisiert werden. Germicidin hemmt die Keimung von Streptomyceten Sporen und verschafft damit dem Produzenten einen Selektionsvorteil (Challis, 2008; Song et al., 2006).

All diese vorherigen Studien weisen Streptomyceten als besonders vielversprechende Wirkstoffproduzenten aus. Mit der Kombination von Kultivierung und Genomsequenzierung sollte ein umfassendes Bild des Potentials zur Sekundärmetabolit-Produktion eines ausgewählten *Streptomyces* sp. (Isolat C42) erhalten werden, um eventuell neue Wirkstoffe zu isolieren.

Ergebnisse

Isolierung und Identifizierung des Isolates C42

Das Isolat C42 stammte aus einer Sedimentprobe aus dem Gotlandbecken (240 m Wassertiefe). Nach Analyse der 16S rDNA Gensequenz wurde das Isolat C42 den nächst verwandten Typstämmen *Streptomyces champavatii* (DSM 40841)^T mit einer Similarität von 99,52 % und *Streptomyces sampsonii* (NRRL B-5682)^T mit einer 99,59 % Similarität zugeordnet. Neben diesem Isolat stammten sechs weiteren *Streptomyces* Isolaten aus der Ostsee.

Nachweis von Sekundärmetabolit-Genclustern

In dem Isolat C42 konnte der Nachweis für die Existenz von nicht-ribosomalen Peptid-synthetasen erfolgen. Das Amplifikationsprodukt hatte die erwartete Größe von ca. 300 bp. Für Polyketidsynthasen I konnte ebenfalls ein Amplifikationprodukt (Größe 1200-1400 bp) erhalten werden (Abbildung 22). Die doppelte Bande in der Amplifikation der PKS I resultieren aus dem eingesetzten Primerpaar (K1f und M6r). Gene für eine Polyketidsynthese II wurden nicht nachgewiesen.

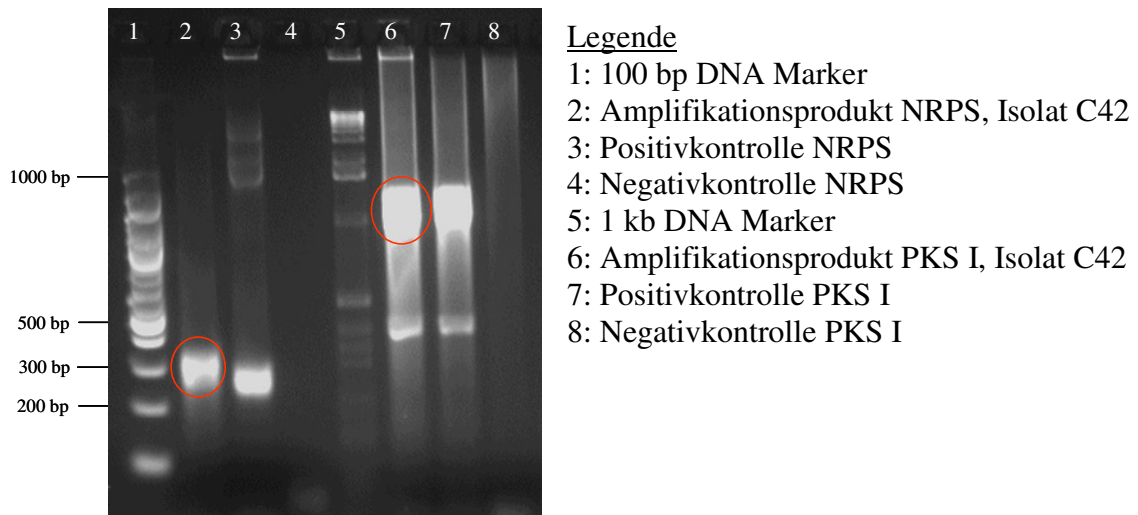


Abbildung 22: Amplifikationsprodukte zu Sekundärmetabolit-Genclustern in dem Isolat C42. Rote Kreise: erwartete Banden der jeweiligen Gencluster

Aktivitätstests

In den Bioaktivitätstests gegen neun Testorganismen wurde eine Hemmung um 37 % des fakultativ human-pathogenen Pilzes *Candida glabrata* beobachtet. Gram-positive sowie Gram-negative Bakterien wurden nicht gehemmt.

Mit einer Bioaktivitäts-geleiteten Fraktionierung konnten 11 Fraktionen, mit unterschiedlich starken Hemmungen gegen das Wachstum von *Candida glabrata*, identifiziert werden. Die Substanzen mit einer antifungalen Wirkung konnten durch die Fraktionen nicht eindeutig identifiziert werden, da die Fraktionen mehrere Peaks enthielten. Die dazu benötigten Mengen (>2 mg) an Reinsubstanzen zur Strukturaufklärung und damit eindeutigen Identifizierung konnte im Rahmen der Dissertation nicht gewonnen werden.

Chromatographische Auswertung der Metabolite

Die chromatographische Auswertung der Metabolite des Rohextraktes (CN-Medium) wurde mit einer HPLC-DAD/MS analysiert und durch einen Datenbankabgleich identifiziert. Das Isolat C42 produzierte vier Metabolite (Abbildung 23, Tabelle 27). Zwei Substanzen wurden als bereits bekannt identifiziert. Durch Messung des ^1H NMR-Spektrums konnte die Struktur der Substanz mit der Masse 454,4 aufgeklärt werden. Es handelt sich um Tetradecyl-sn-Glycerol-Phosphorylcholin. Dieses gehört zu den Sphingolipiden, welche unter anderen Bestandteile von Plasmamembranen sind und auch eine Rolle in der Differenzierung und Adhäsion von Zellen spielen (Muralidhar et al., 2003). Tetradecyl-sn-Glycerol-Phosphorylcholin wurde zuerst aus der Hydrozoe *Solanderia secunda* isoliert und zeigte dort hämolytische Aktivität (Fusetani et al., 1986). Das Me-

tabolit mit der Masse 452,5 ist, aufgrund von HPLC/MS Ergebnisse, vermutlich 1,2-cyclisch Acetal-Typ sn-Glycerol Phosphoethanolamin (Tanaka et al., 2000). Es wurde zuerst aus der Seeanemone *Actiniogeton* sp. isoliert, ist strukturell sehr ähnlich zu Tetradecyl-sn-Glycerol-Phosphorylcholin und zählt auch zu den Sphingolipiden (Abbildung 24).

Als bislang unbekannt eingeordnet wurden zwei weitere Substanzen mit den Massen 898,9 und 912,9 (Tabelle 27). Durch das Fragmentierungsmuster in den HPLC-DAD/MS Chromatogrammen konnte festgestellt werden, dass es sich bei beiden Substanzen um Peptide handelt.

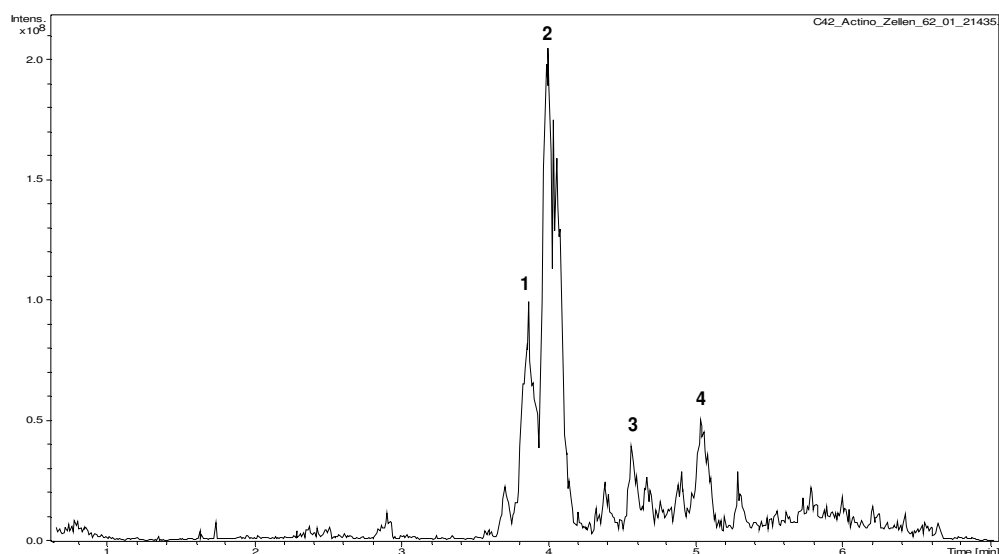


Abbildung 23: Base-Peak Chromatogramm des Isolates C42, Anzucht in CN-Medium.

Tabelle 27: Produzierte Metabolite von dem Isolat C42.

Peak	m/z	Substanz	Referenz
1	898,9	Peptid	bislang nicht beschrieben
2	912,9	Peptid	bislang nicht beschrieben
3	452,5	1,2-cyclisch Acetal-Typ sn-Glycerol Phosphoethanolamin	(Tanaka et al., 2000)
4	454,4	Tetradecyl-sn-Glycerol-Phosphorylcholin	(Fusetani et al., 1986)

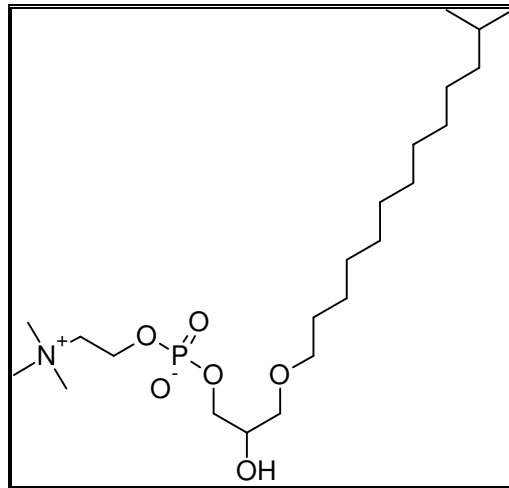


Abbildung 24: Struktur des Metabolites m/z 454,4, Tetradecyl-sn-Glycerol-Phosphorylcholin (Fusetani et al., 1986).

Durch Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe zur kulturabhängigen Produktion der Peptide mit der Masse 912,9 und 898,9 wurden die optimalen Kulturbedingungen festgestellt. Mit der Anzucht des Isolates C42 in vier verschiedenen Kulturmedien konnte das CN-Medium als optimales Produktionsmedium ohne Zugabe von Salz identifiziert werden (Abbildung 25 und Abbildung 26). Die beiden Peptide werden auch mit Salz (1-4 %) im Medium produziert, allerdings wird dadurch die Produktion von anderen Substanzen wie z.B. Polyene, zur gleichen Retentionszeit, angeregt (Abbildung 26). Die Absorption der Peptide im UV/Vis Bereich ist sehr schwach, weswegen sie in dem UV/Vis Chromatogramm nicht deutlich zu sehen sind. Einzig die Peptidbindungen absorbieren in dem Bereich von 220 nm. In dem Base Peak Chromatogramm des Massenspektrometers sind die dazugehörigen Massen von m/z 898,9 und m/z 912,9 jedoch eindeutig zu identifizieren.

Eine weitere Produktionssteigerung, zum CN-Medium ohne Salz, wurde durch die Zugabe von 1 ml/L Spurenelementlösung erreicht (Chromatogramm nicht gezeigt). Durch eine Zeitreihe wurde der optimale Erntezeitpunkt nach drei Tagen festgelegt (Abbildung 27).

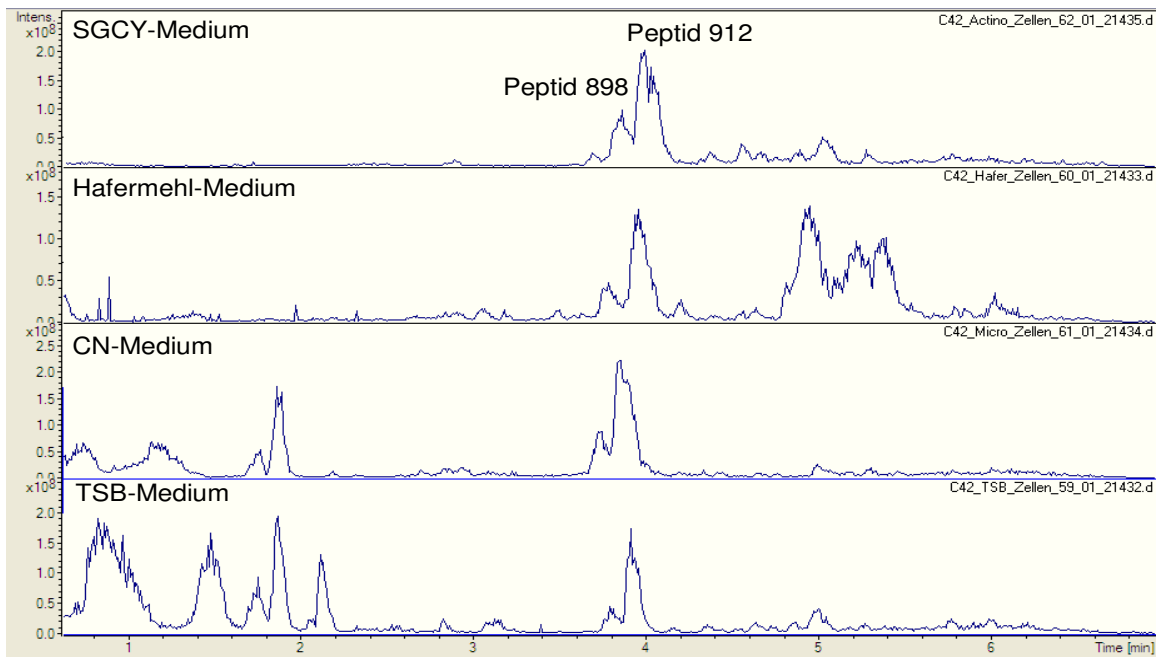


Abbildung 25: Base Peak Chromatogramme der vier verschiedenen Kultivierungsmedien des Isolates C42.

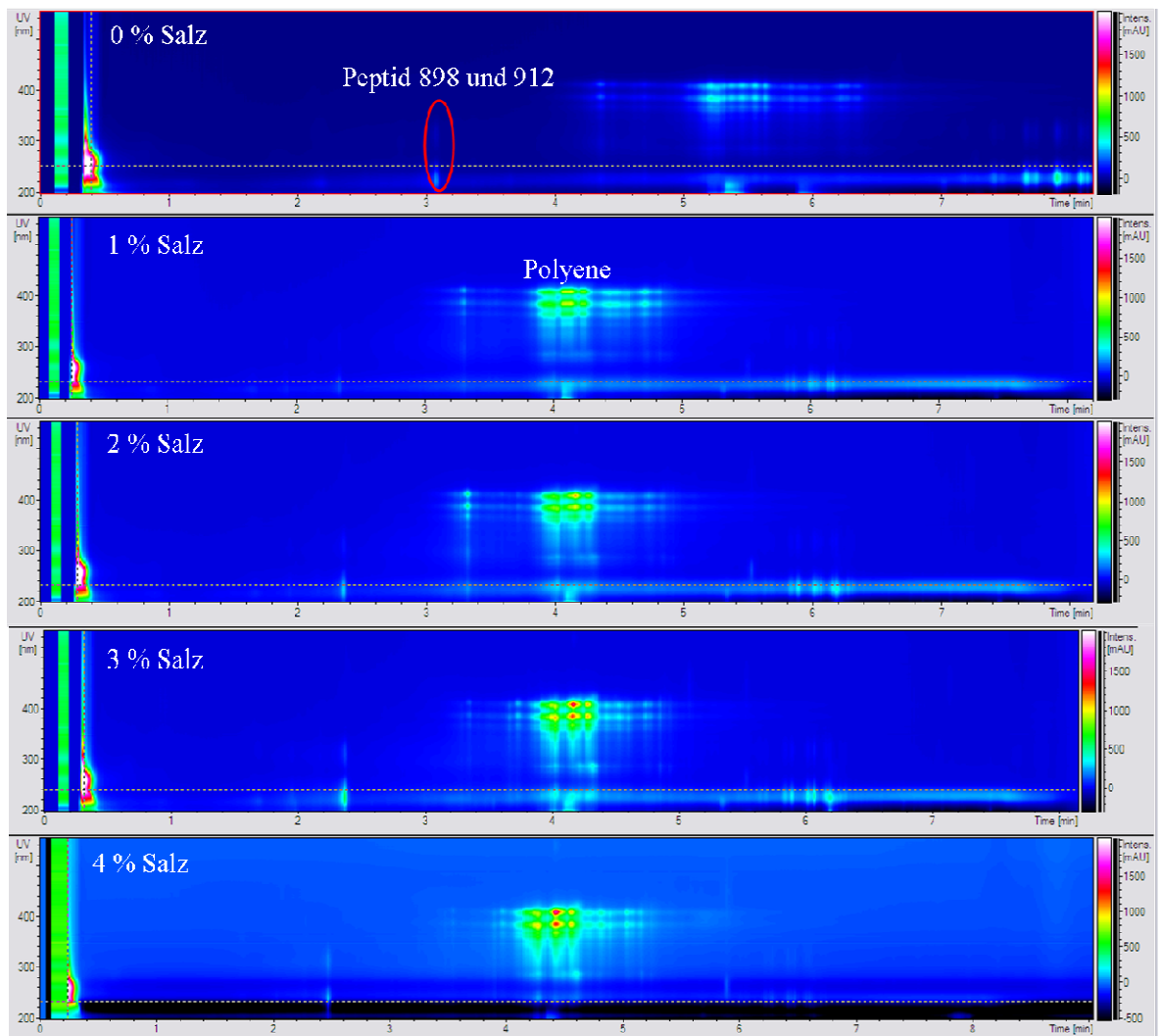


Abbildung 26: UV/Vis Chromatogramme des Rohextraktes nach Kultivierung in CN-Medium mit verschiedenen Salzgehalten.

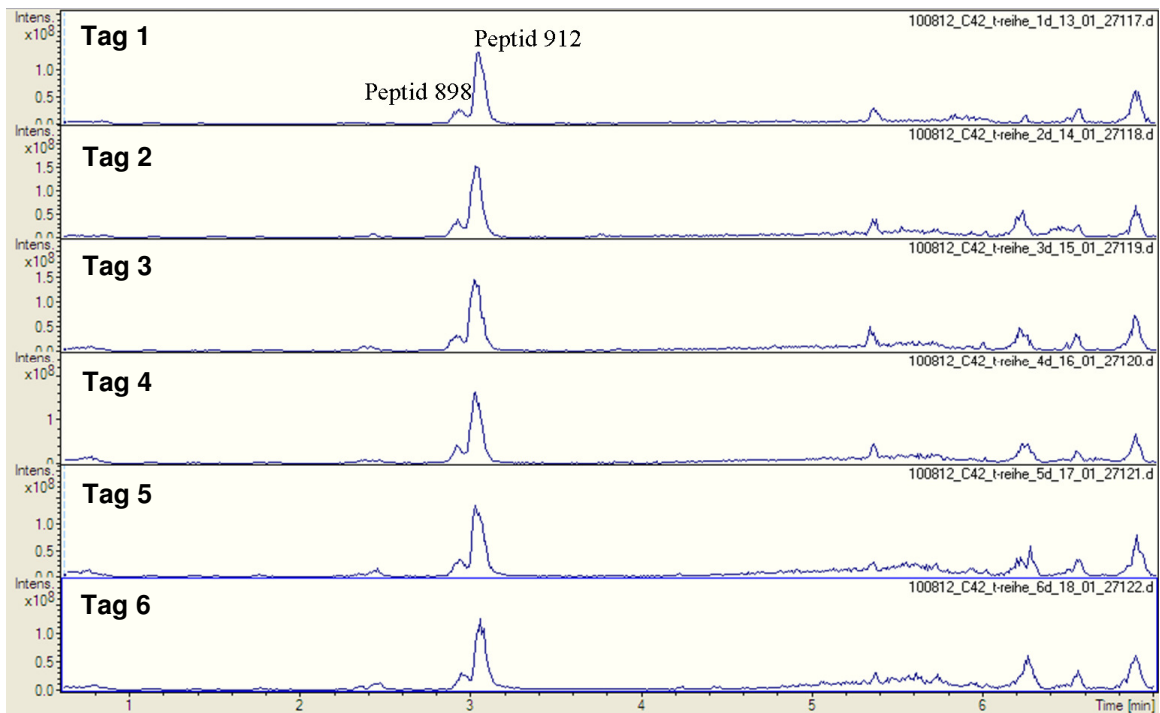


Abbildung 27: Base Peak Chromatogramme zu einer Zeitreihe des Isolates C42. Kultivierung in CN-Medium.

Peptid m/z 898,9

Durch einen Kultivierungsansatz im 50 L Maßstab, die Extraktion und die darauffolgenden Fraktionierungen konnten ca. 1,5 mg Reinsubstanz des Peptides m/z 898,9 gewonnen werden. Diese wurden für die nähere Charakterisierung des Peptides und den Tests zu biologischen Aktivitäten eingesetzt.

Analysen zur Strukturaufklärung und Aktivitätstest zu dem Peptid m/z 912,9 wurden in unserer Arbeitsgruppe ebenfalls durchgeführt (Baumann et al. in prep.). Die Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten ebenfalls erwähnt.

Biologische Aktivität des Peptides m/z 898,9

Die inhibitorische Aktivität des Peptides m/z 898,9 wurde gegen eine Reihe von prokaryotischen und eukaryotischen Testorganismen sowie Enzymen und Zelllinien untersucht (siehe Abschnitt IV Material und Methoden).

Bei einer Konzentration von 27,5 μM konnte keine Inhibition des Wachstums der mikrobiellen Teststämmen festgestellt werden. Ebenso konnte in den Enzymassays keine Inhibierung durch das Peptid m/z 898,9 gezeigt werden.

In den cytotoxischen Tests wurde das Peptid m/z 898,9 mit einer Konzentration von 50 μM und 100 μM eingesetzt. Es konnte keine Inhibierung der Krebszelllinien festgestellt werden.

Das Peptid m/z 912, 9 hatte ebenfalls in den vorher genannten Testsystemen keine Wirkung. Damit weisen die beiden Peptide in unseren Testsystemen keine Aktivitäten auf und die Testung gegen weitere Testorganismen, Zelllinien oder Enzyme ist zu überlegen.

Aminosäureanalyse des Peptides m/z 898,9 im GC/MS

Durch die Messung in der HPLC-DAD/MS wurde festgestellt, dass es sich bei der Substanz um ein Peptid mit vermutlich acht Aminosäurenresten handelt. Von dem Peptid m/z 898,9 wurden 300 µg Reinsubstanz, wie im Abschnitt IV beschrieben, hydrolysiert und mit MTBSTFA derivatisiert. Ebenso wurden 20 proteinogenen L- α -Aminosäuren mit einer Konzentration von 100 µg derivatisiert. Die Auftrennung und Verdampfung des Peptides m/z 898,9 und der Aminosäurestandards erfolgte mit dem Gaschromatographen. Durch das Massenspektrometer konnten die einzelnen Aminosäuren detektiert werden. Mit der Datenbank NIST MS Search 2.0 wurden die Peaks identifiziert.

Das GC Chromatogramm zeigte über die gesamte Laufzeit einige Peaks (Abbildung 28). Alle Peaks vor 22 Minuten und nach 30 Minuten sind dem Laufmittel Tetrahydrofuran und dem Derivatisierungsreagenz MTBSTFA (und eventuelle Verbindungen der beiden) zuzuordnen.

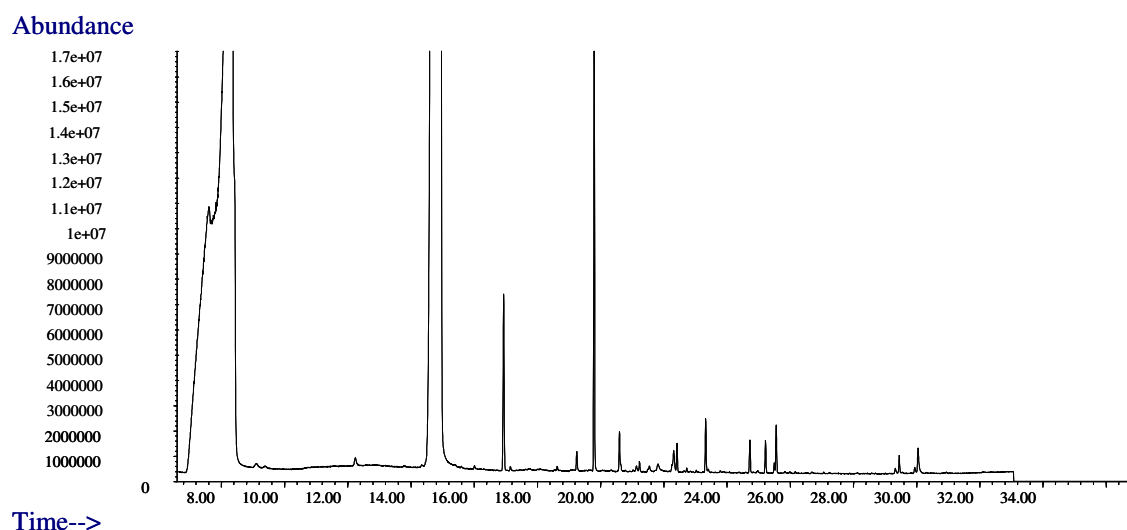


Abbildung 28: GC Chromatogramm des Peptides m/z 898,9.

In der Retentionszeit zwischen 23-30 Minuten befinden sich die Peaks der Aminosäuren der Probe. Es konnten fünf Aminosäuren mit Hilfe der AS-Standards und der NIST MS 2.0 Datenbank identifiziert werden. Die identifizierten Aminosäuren waren Leucin, Isoleucin, Alanin, Valin und Phenylalanin (Abbildung 29).

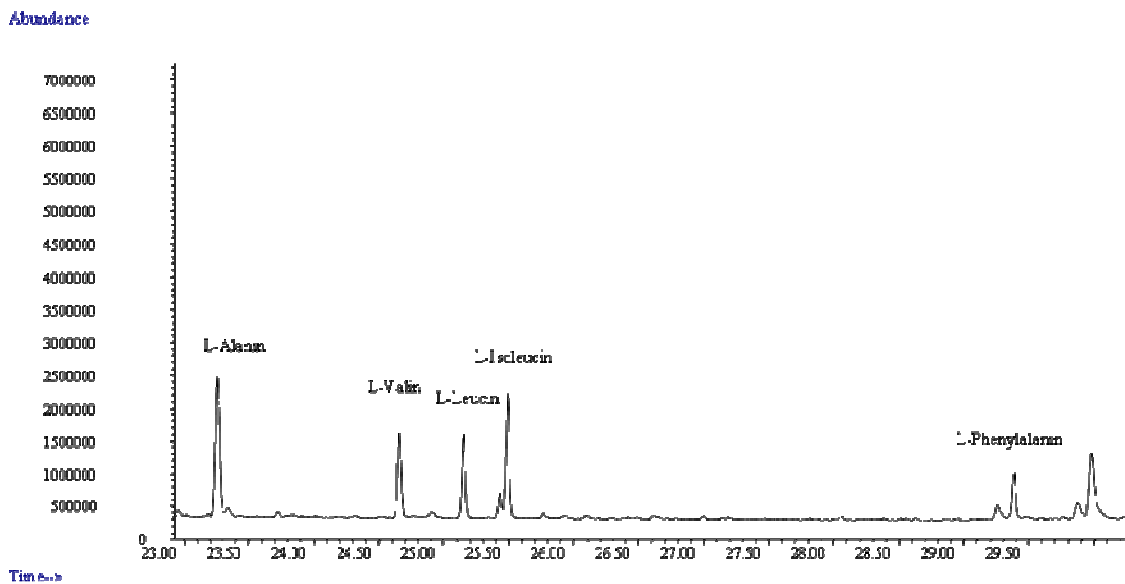


Abbildung 29: Ausschnitt des GC-Chromatogrammes (23-30 Minuten) des Peptides m/z 898,9 mit den identifizierten Aminosäuren.

Als Beispiel für die Identifizierung der Aminosäuren ist das GC/MS Chromatogramm von L-Alanin gezeigt. Der Aminosäurestandard L-Alanin (gelb) wird bei einer Retentionszeit von 23,3 Minuten detektiert (Abbildung 30). Der Peak, der durch das Alanin in der Probe (schwarz) ausgelöst wird, ist wesentlich geringer in der Intensität als die des Standards, aber es ist eine klare Überlagerung der beiden Peaks zu sehen der den Peak in der Probe eindeutig als Alanin identifiziert. Die übrigen Peaks in dem Chromatogramm sind dem Lösungsmittel Tetrahydrofuran und dem Derivatisierungsreagenz MTBSTFA zuzuordnen.

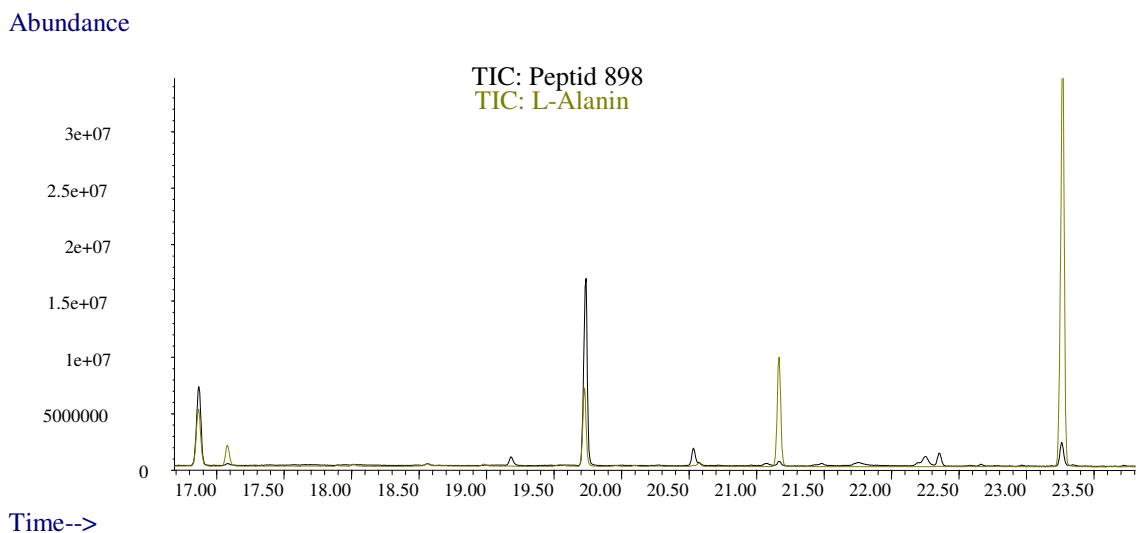


Abbildung 30: GC/MSChromatogramm des Peptides m/z 898,9 und dem Aminosäurestandard L-Alanin. TIC: Total Ion Current. Gelb: L-Alanin, schwarz: Peptid m/z 898,9.

Messung der Konfiguration der Aminosäuren in Peptid m/z 898,9

Die Bestimmung der D/L Konfigurationen der Aminosäuren erfolgte in der HPLC/DAD-ELSD. Durch einen Vergleich der Retentionszeiten der Aminosäuren aus dem Peptid und der Standardamino­säuren konnten die jeweilige Konfiguration ermittelt werden.

Es zeigte sich, dass acht auftretenden Peaks in der Probe des Peptides m/z 898,9 einer L- oder D- Aminosäure zugeordnet werden konnte. Es ergaben sich drei Aminosäuren die in der L-Konfiguration und fünf Aminosäuren die in der D-Konfiguration vorliegen. In dem Peptid m/z 898,9 liegt die Aminosäure Alanin in der D-Konfiguration vor (Abbildung 31). Die Retentionszeiten der Probe und des Standards überschneiden sich bei 14,3 Minuten. Die Aminosäure Lysin liegt in dem Peptid m/z 898,9 in der L-Konfiguration vor (Abbildung 32). Es zeigt sich bei einer Retentionszeit von 20,3 Minuten, dass Phenylalanin in dem Peptid in der D-Konfiguration eingebaut ist (Abbildung 33). Valin liegt sowohl in der L- als auch D-Konfiguration vor (Abbildung 34). Wie in Abbildung 35 zu sehen ist, enthält das Peptid ein L-Leucin. Durch die Messung zur Konfigurationsbestimmung mit der HPLC/DAD konnte nicht unterschieden werden, ob Isoleucin oder das Diastereomer allo-Isoleucin in dem Peptid m/z 898,9 vorliegt. Die Retentionszeiten dieser beiden Aminosäuren in L- und D-Konfiguration unterscheidet sich nicht. Es zeigte sich aber, dass eine Aminosäure in L-Konfiguration und zwei Aminosäuren in D-Konfiguration in dem Peptid m/z 898 vorhanden sind (Abbildung 36 und Abbildung 37). Die zwei Peaks bei den Retentionszeiten 17,7 und 17,8 Minuten sind dem Derivatisierungsreagenz FDVA zuzuordnen (Abbildung 38).

Daraus ergibt sich eine Aminosäurezusammensetzung in dem Peptid m/z 898,9 von D- α -Alanin, L- α -Lysin, D- α -Phenylalanin, L- α -Valin, D- α -Valin, D- α -Leucin und L- α -Isoleucin/allo-Isoleucin und D- α -Isoleucin/allo-Isoleucin. Die Reihenfolge der Aminosäuren kann mit dieser Messung nicht bestimmt werden. Dazu müsste eine Strukturaufklärung mit Hilfe von verschiedenen NMR Spektren erfolgen. Die Bestimmung der Aminosäuren des Peptids m/z 912,9 ergab ein sehr ähnliches Bild. Die Aminosäurezusammensetzung unterscheidet sich nur in einem Austausch von Valin (in Peptid m/z 898,9) zu Leucin (in Peptid m/z 912,9).

Bei der Messung zur Bestimmung der Konformation des Peptides zeigte sich, dass es sich um eine cyclische Struktur handelt (Daten nicht gezeigt). Das Peptid konnte nicht mit dem Reagenz D-FDVA derivatisieren, weil keine endständigen Gruppen vorhanden

waren, was auf ein cyclisches Peptid schließen lässt. Das Peptid m/z 912,9 liegt ebenfalls in der cyclischen Konformation vor.

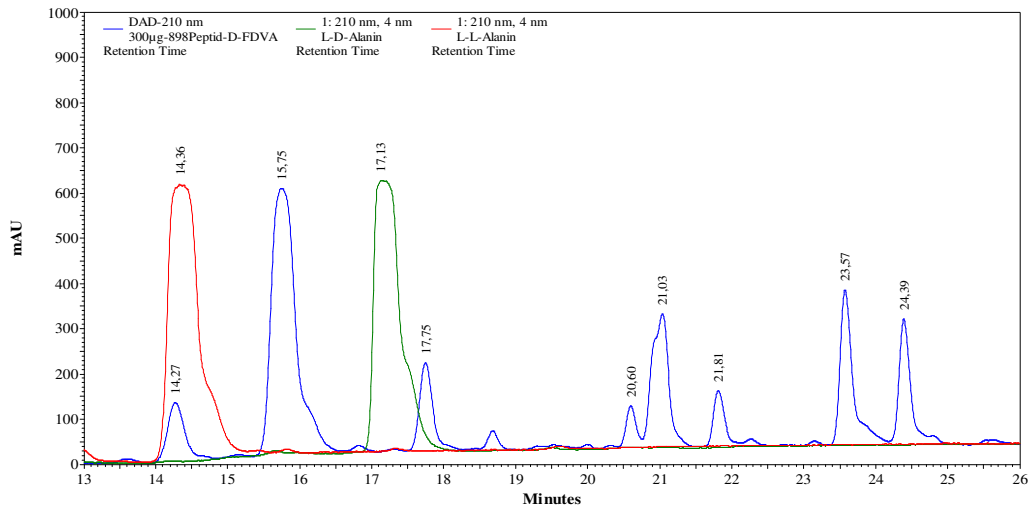


Abbildung 31: DAD (210 nm) Chromatogramm des Peptides m/z 898,9 im Vergleich mit L- α -Alanin und D- α -Alanin.

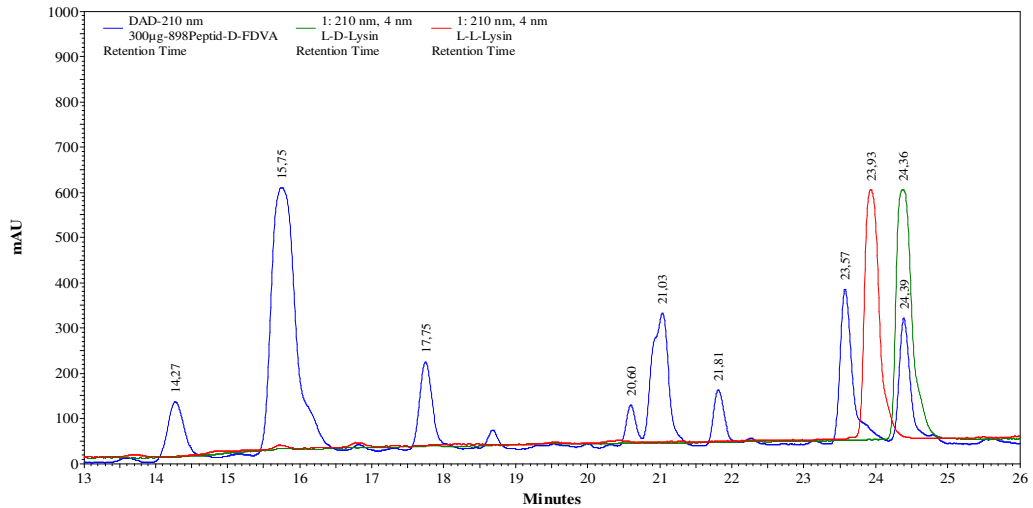


Abbildung 32: DAD (210 nm) Chromatogramm des Peptides m/z 898,9 im Vergleich mit L- α -Lysin und D- α -Lysin.

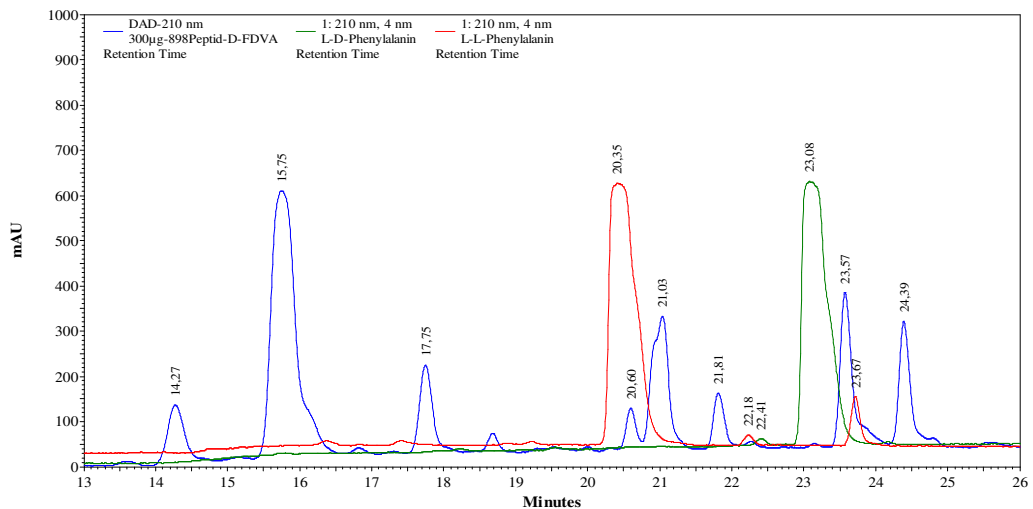


Abbildung 33: DAD (210 nm) Chromatogramm des Peptides m/z 898,9 im Vergleich mit L- α -Phenylalanin und D- α -Phenylalanin.

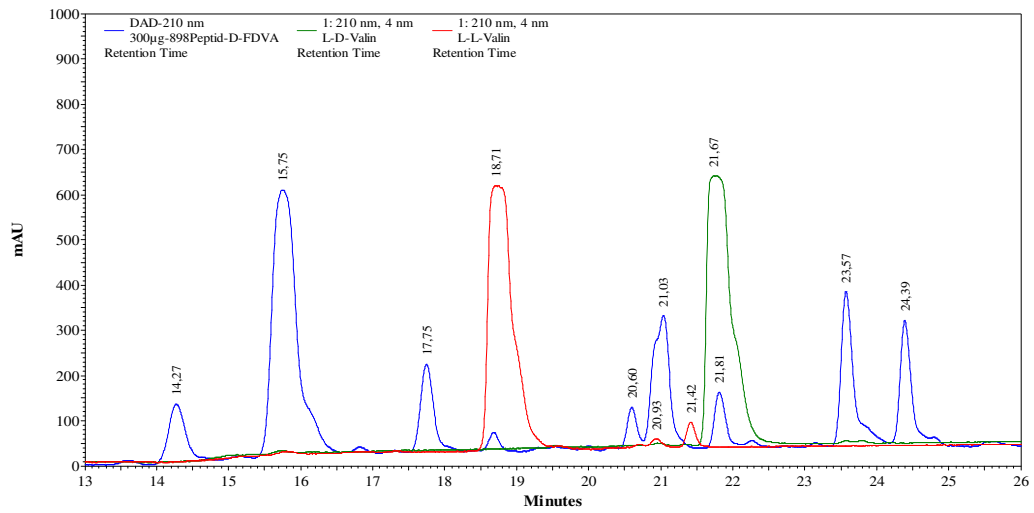


Abbildung 34: DAD (210 nm) Chromatogramm des Peptides m/z 898,9 im Vergleich mit L- α -Valin und D- α -Valin.

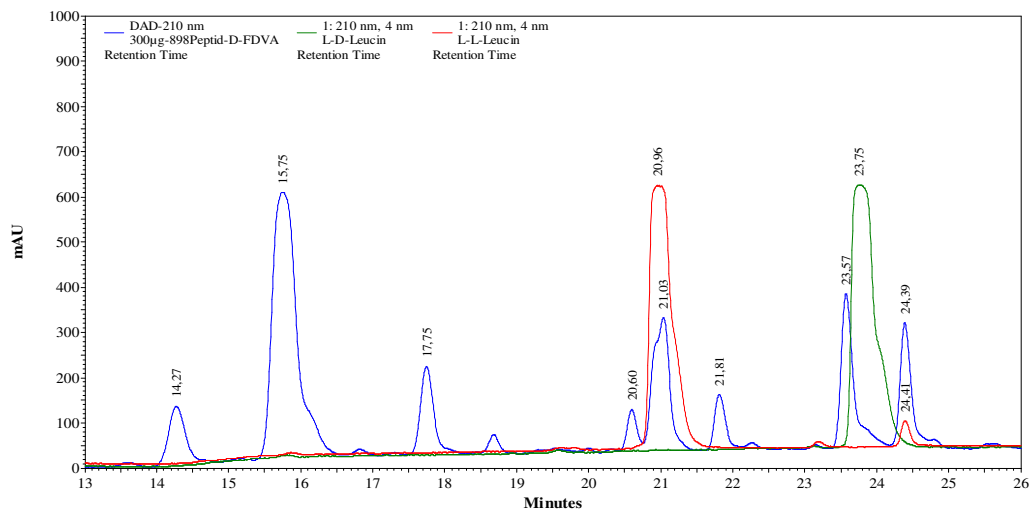


Abbildung 35: DAD (210 nm) Chromatogramm des Peptides m/z 898,9 im Vergleich mit L- α -Leucin und D- α -Leucin.

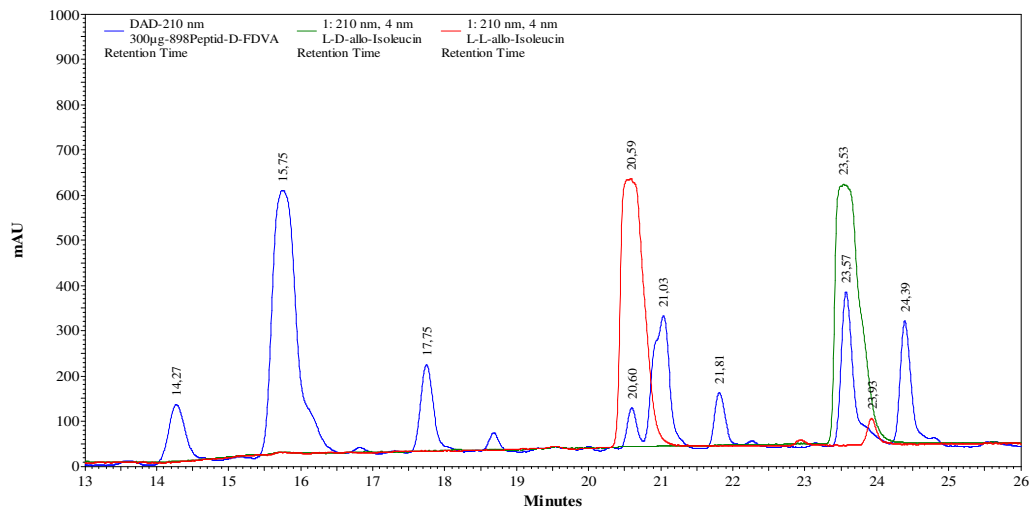


Abbildung 36: DAD Chromatogramm der Aminosäuren des Peptides m/z 898,9 im Vergleich mit L- α -allo-Isoleucin und D- α -allo-Isoleucin.

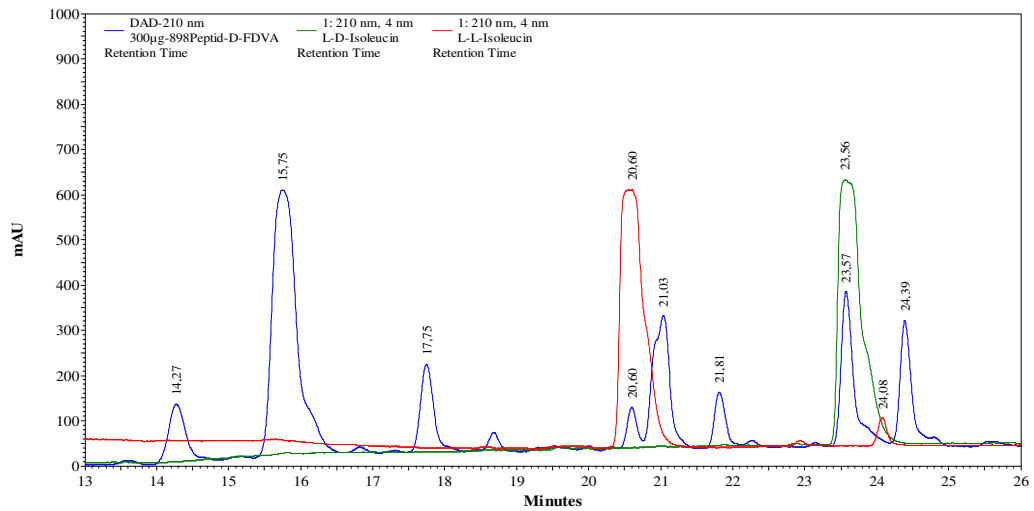


Abbildung 37: DAD (210 nm) Chromatogramm des Peptides m/z 898 im Vergleich mit L- α -Isoleucin und D- α -Isoleucin.

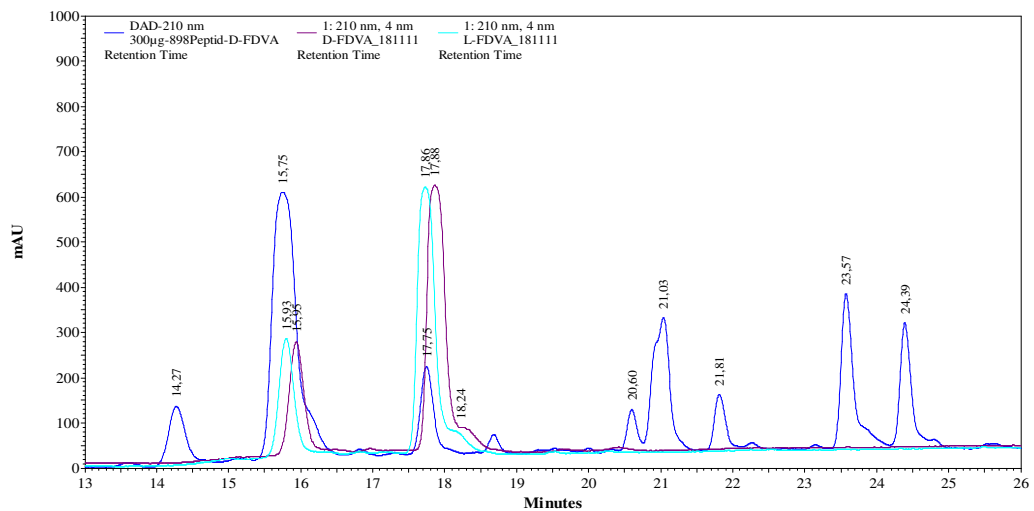


Abbildung 38: DAD (210 nm) Chromatogramm des Peptides m/z 898 im Vergleich mit dem Derivatisierungsreagenz FDVA.

Genomsequenzierung

Eine erste Sequenzierung des Genoms von dem Isolate C42 zeigte eine Größe von 5,26 Mb. Dieses Draftgenom entspricht ca. 60 % des gesamten Genoms. Eine Sequenzierung des kompletten Genoms konnte aufgrund des hohen GC-Gehaltes von 72,5 % bislang nicht erfolgen (Fan et al., 2011b). Das Draftgenom enthielt 17375 Contigs mit einem N50-Wert von 451 und einem L50-Wert von 3074. N50 und L50 sind Maße für die Qualität eines Draftgenoms. Sie werden bestimmt indem man alle Contigs der Größe nach sortiert und deren Längen aufaddiert, beginnend mit dem Größten. L50 entspricht dabei dem Contig mit welchem die Summe 50 % der Gesamtlänge erreicht. N50 ist die Länge dieses Contigs. Je kleiner L50 und größer N50 sind, desto besser ist die Qualität des Drafts. Mit den hier erhaltenen N50 von 451 und L50 von 3074 zeigt sich die geringe Qualität der Sequenzierung (welche ja auch nur 60 % des Gesamtgenoms umfasst).

Mit Hilfe der Software antiSMASH konnte ein Siderophor Gencluster detektiert werden. Ebenfalls fanden sich Hinweise auf die Existenz von Genclustern für nicht näher annotierte PKS I, Enterocin (PKS II) und PKS III (Tabelle 28). Die Anzahl der vorhandenen Gencluster kann nur bestimmt werden, wenn das gesamte Genom sequenziert wurde.

Tabelle 28: Mit antiSMASH identifizierte NRPS- und PKS-Gencluster. n. d.: nicht identifiziert

Contig	Cluster	Blastx	Similarität (%)	nächster Verwandter	AS	Accession Nr.
1743	NRPS	NRPS	61	<i>Streptomyces cattleya</i> NRRL 8057	761	YP_004915251.1
2371	NRPS	Ferritin (Siderophor)	92	<i>Streptomyces ghanaensis</i> ATCC 14672	574	ZP_06582124.1
993	PKS I	modulare PKS I	90	<i>Streptomyces ghanaensis</i> ATCC 14672	843	ZP_06582131.1
1734	PKS III	Dihydroxyphenylacetat Synthase	77	<i>Streptomyces</i> sp. Tu6071	204	ZP_08451720.1
	NRPS	Siderophor	100	<i>Streptomyces albus</i> J1074	275	ZP_06590081.1
	PKS	Germacradienol/ Germacrene D	99	<i>Streptomyces</i> sp. S4	907	ZP_09181893.1
990	PKS II	Enterocin B	95	<i>Streptomyces maritimus</i>	252	AAF81729.1
	PKS II	Enterocin A	97	<i>Streptomyces maritimus</i>	362	AAF81728.1

Bei dem Sequenzvergleich mit dem Tool Blastx und der non-redundanten Protein-Datenbank von NCBI fanden sich weitere Sequenzabschnitte die für NRPS Produkte wie Gramicidin, Surfactin, Actinomycin, Enterocin, Tyrocidin, Thaxtomin und Enterobactin codieren. Diese Sequenzabschnitte sind zum Teil sehr kurz (<1 kb) sodass die Annotation mit antiSMASH (zuerst die Suche nach ORFs und dann der Vergleich mit einer Datenbank nach Sekundärmetabolit-Genclustern) auf diesen Stücken fehlgeschlagen ist. Somit ist es nicht verwunderlich, dass die Suche mit Blast mehr Treffer und damit auch Information für NRPS erzielt hat. Für Polyketidsynthesen fanden sich mit Blastx und der non-redundanten Protein-Datenbank nur unspezifische Treffer.

Diskussion

Untersuchungen zum Wirkstoffpotential des Isolates C42

In dem hier untersuchten Isolat C42 (*Streptomyces* sp.) wurden mittels PCR Ampifikate sowohl für NRPS als auch für PKS I erhalten. Das Vorkommen von solchen Genclustern ist in *Actinobacteria* recht häufig. In einer Studie von Pathom-aree et al. (2006) konnten in 68 % (von 38 Stämmen) der Aktinomyceten aus dem Mariannengraben, Gene für NRPS detektiert werden. In 13 % wurden Gene für PKS I gefunden, aber in keinem Isolat fanden sich Hinweise für PKS II (Pathom-aree et al., 2006). Ein ähnliches Bild zeigte sich auch in dem hier untersuchten Isolat C42.

Durch die Kultivierung des Isolates C42 konnten zwei bislang unbekannte Peptide isoliert werden. Bei einer Konfigurationsanalyse der enthaltenen Aminosäuren zeigte sich, dass in dem Peptid m/z 898,9 fünf Aminosäuren in der D-Konfiguration vorliegen. Das weist auf eine Produktion durch ein NRPS System hin, da der Einbau von D-Aminosäuren bislang nur durch NRPS mit drei verschiedenen Mechanismen bekannt ist (Roongsawang et al., 2010). Mittels Epimerisierungs-Domäne in NRPS werden L-Aminosäuren zu D-Aminosäuren umgebaut. Dies geschieht in bakteriellen NRPS und NRPS/PKS Hybridsystemen. In eukaryotischen Pilzen können D-Aminosäuren durch spezielle Domänen des NRPS-System direkt eingebaut werden. Der dritte Mechanismus beruht auf einer C/E-Domäne. Diese hat sowohl die Kondensations- als auch Epimerisierungseigenschaften und kommt in Aktinomyzeten und Pseudomonaden vor (Balibar et al., 2005).

Neben den zwei bislang unbekanntenen Peptiden wurden verschiedene Sphingolipide in dem Isolat C42 produziert. Es handelt sich um Tetradecyl-sn-Glycerol-Phosphorylcholin und 1,2-cyclischer Acetal-Typ sn-Glycerol Phosphoethanolamin (Fusetani et al., 1986; Tanaka et al., 2000). Sphingolipiden sind unter anderem Bestandteil von Plasmamembranen und spielen auch eine Rolle in der Differenzierung und Adhäsion von Zellen (Muralidhar et al., 2003).

Eine biologische Aktivität konnte dem Peptid m/z 898,9 bislang durch unsere Testsysteme nicht zugeordnet werden. Welche biologische Funktion dieses Peptid für den Produzenten hat ist damit noch nicht geklärt. Aber dass das Peptid einen Nutzen für den Stamm hat ist anzunehmen. Die Produktion von nicht-ribosomalen Peptiden und Polyketiden mit verschiedensten Funktionen ist in Streptomyzeten weit verbreitet. Daptomycin, ein NRPS gebildetes Lipopeptid, wird von *Streptomyces roseosporus* produziert und wirkt hemmend gegen Gram-positive Bakterien (Fischbach and Walsh, 2006). Weitere antibakteriell wirksame Peptide sind Actinomycin (Inhibition der Transkription) (Zahner and Maas, 1972) als auch die NRPS/PKS Hybride Vancomycin (Störung der Zellwandsynthese) und Bleomycin (Inhibierung der DNA Replikation in Krebszellen) (Shen et al., 2001). *S. avermitilis* produziert das Typ I Polyketid Avermectin welches anthelmintische Wirkung hat und sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin eingesetzt wird (Ikeda et al., 1999). Trioxacarcine A-E (PKS), aus einem marinen *Streptomyces* sp. zeigten alle eine Hemmwirkung gegen Gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) und Gram-negative (*Escherichia coli*) Bakterien (Maskey et al., 2004). Weiter weisen die Trioxacarcine A-D eine moderate cytotoxische Wirkung gegen humane Krebszelllinien (Lungen-, Prostata-, Melanomkrebs). Trioxacarcine A

und D inhibieren ebenfalls das Wachstum des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* (Maskey et al., 2004).

Ein Produkt einer Polyketidsynthase konnte in dem Isolat C42 nicht gefunden werden, obwohl der Nachweis für PKS I erfolgen konnte. Möglicherweise ist das Gen oder die Gene, die mit dem Primersystem gefunden wurden, inaktiv (Pathom-aree et al., 2006). Die hier benutzten Kultivierungsparameter enthielten offenbar nicht die richtigen Signale, um die Expression dieser Polyketidsynthase auszulösen. Auch ist es möglich, dass Teile eines nicht mehr aktiven, früheren Polyketidsyntheseweges amplifiziert wurden, der in dem Genom jetzt keine Funktion mehr hat.

Genomsequenzierung

Der hier sequenzierte Stamm C42 weist Teile von sieben identifizierten NRPS- und zwei PKS- Genclustern auf. Diese codieren für Antibiotika wie Gramicidin (Conti et al., 1997), Enterocin (Cheng et al., 2007; Miyairi et al., 1976), Surfactin (Rodrigues et al., 2006) und Tyrocidin (Battersby and Craig, 1952) als auch für Chemotherapeutika wie Actinomycin (Goss and Katz, 1957) sowie Phytotoxine (Thaxtomin) (Fry and Loria, 2002) und Siderophore (wie z.B. Enterobactin) (Raymond et al., 2003). Diese Substanzen sind bereits aus *Streptomyces* spp. und *Bacillus* spp. isoliert worden. Neben diesen bekannten Genclustern gibt es unzählige Fragmente die nicht weiter spezifizierte NRPS und PKS Teile enthalten. Sie werden teilweise zu den schon identifizierten Genclustern gehören, aber auch zu noch nicht bekannten Genclustern. Um mehr über die unbekannt Gencluster zu erfahren, muss das Genom des Stammes C42 komplett sequenziert, die Contigs weiter assembliert und annotiert werden. Die dann vollständige Sequenz könnte mit 'Genome Mining' nach unbekannt Genclustern untersucht werden und die putativen Produkte isoliert (Challis, 2008). 'Genome Mining' wurde schon häufig für eine Identifizierung und Isolierung von Wirkstoffen genutzt. Ein Beispiel eines erfolgreichen 'Genome Mining' ist die Isolierung von Desferrioxamine (wird bei einer Eisenvergiftung verwendet) aus *Streptomyces coelicolor* A 1/3 (Barona-Gomez et al., 2004; Lautru et al., 2005).

Die Produktion von Wirkstoffen über NRPS oder PKS kommt bei Bakterien eher in Genomen >3 Mb vor (Donadio et al., 2007). Die relativ großen Genome von Streptomyceten (8-10 Mb) enthalten teilweise über 20 Antibiotika-Biosynthese-Gencluster (Hopwood, 2006; Nett et al., 2009). Diese Sekundärmetabolit-Gencluster machen bei Arten der Familien *Streptomycetaceae*, *Micromonospraceae* und *Pseudonocardiaceae* dabei mehr als 5 % der codierenden Bereiche aus (Nett et al., 2009; Omura et al., 2001).

Wieviel Prozent des Gesamtgenoms es bei dem Stamm C42 sind, kann erst nach der vollständigen Sequenzierung des Genoms (jetzt nur ca. 60 %) abgeschätzt werden. Es ist aber vermutlich eine ähnliche Anzahl wie in anderen Aktinomyceten. Bei dem ersten sequenzierte Genom eines obligat marinen Aktinomyceten (*Salinispora tropica*) codieren 10 % der Gene (bei einer Genomgröße von 5,18 Mb) für den Sekundärmetabolismus. Darauf enthalten sind mindestens 19 NRPS, PKS I, II, III sowie Hybridsysteme mit noch vielen unbekanntem Genclustern (Udwary et al., 2007). Durch die Sequenzinformation konnten die Gencluster zu den bereits bekannten Produkten charakterisiert werden (wie Salinosporamide, Sporolide und Lyphostatin) weitere Sporolide und sogar ein viertes neues Metabolit konnten durch 'Genome Mining' isoliert werden (Gulder and Moore, 2010).

Durch die Kombination von Kultivierung, chemische Analysen, molekularbiologischen Methoden und der Sequenzierung von 60 % des Genoms zeigte sich das Potentials des Stammes C42 zur Wirkstoffproduktion. Die Isolierung von zwei unbekanntem nicht-ribosomalen Peptiden und das Auffinden von unbekanntem NRPS- und PKS-Genclustern weisen auch den Stamm C42, wie auch weitere *Streptomyces* spp. Stämme, als vielversprechende Wirkstoffproduzenten aus, deren weitere Bearbeitung notwendig ist.

VII Allgemeine Diskussion und Ausblick

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Bakterien aus marinen Sedimenten eine aussichtsreiche Quelle für neue Wirkstoffe darstellen. Durch kultivierungsabhängige Versuche mit Vertretern bekannter Bakterien-Taxa konnte die Variabilität der Produktion von Sekundärmetaboliten gleicher Arten gezeigt werden. Dies zeigt, dass es lohnenswert ist, in auch schon bekannte Bakterien-Taxa nach neuen Substanzen zu suchen. Die Weiterentwicklungen auf dem Gebiet der Genomsequenzierung bieten dabei die Möglichkeit, in relativ kurzer Zeit ein genomisches Bild von einzelnen Stämmen zur Wirkstoffproduktion zu schaffen. Es zeigt sich dabei immer mehr, dass auch bereits gut untersuchte marine Bakterien-Taxa (z.B. *Bacillus* und *Streptomyces*) noch sogenannte 'stille' Gencluster enthalten (Isolat C42, *Streptomyces* sp. und gtP20b, *Bacillus* sp.), die für vielversprechende Substanzen codieren können. Daher müssen verschiedene Methoden wie Kultivierung, molekularbiologische Methoden und Genomsequenzierungen kombiniert werden, um bei der Suche nach neuen Wirkstoffen gegen pathogene Mikroorganismen erfolgreich zu sein.

VII.1 Kultivierung von marinen Bakterien zur Gewinnung neuer Wirkstoffproduzenten

Mit Hilfe von klassischen Kultivierungsansätzen werden fast ausschließlich bekannte Bakterien-Taxa isoliert. Dass diese, ebenso wie neue Bakterien-Taxa, interessante Wirkstoffproduzenten sind, wurde mit dieser Arbeit bewiesen. Durch den Nachweis von Biosynthesegenen kann das Potential zur Wirkstoffproduktion bei bereits untersuchten Bakterien-Taxa besser eingeschätzt werden und entsprechende Stämme schneller selektiert werden. Kultivierungsansätze unter Verwendung verschiedener Medien von Isolat aus drei bekannten Taxa (*Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* und *Streptomyces* sp.) resultierte in einer Vielzahl an bekannten aber auch unbekanntem Sekundärmetaboliten.

Um zukünftig auch unbekanntem Bakterien-Taxa zu isolieren, empfiehlt es sich neue Kultivierungsmethoden hinzuzuziehen. Lewis et al. (2010) kultivierten mit Hilfe einer Diffusionskammer bislang unkultivierbare Mikroorganismen. Diese Mikroorganismen produzierten keine Siderophore und konnten so bei Eisenlimitation nicht wachsen. Durch die Diffusionskammer wurden Nährstoffe zwischen den Mikroorganismen ausgetauscht, ohne dass eine Konkurrenz um Lebensraum auftrat. So profitierten die langsam wachsenden Eisen-limitierten Bakterien gegenüber schneller wachsende und nicht-limitierte Bakterien (Lewis et al., 2010). Dadurch konnten einige wenige neue Arten

kultiviert werden. Die Kultivierung von neuen Bakterien-Taxa mit unbekanntem Potential für die Sekundärmetabolit-Produktion stellt daher ebenso ein wichtiges Feld in der marinen Wirkstoffforschung dar.

Es zeigt sich immer wieder, dass bei der Suche nach neuen Wirkstoffen die Kultivierung von marinen Bakterien eine nicht-ersetzbare Methode ist, um geeignete Produzenten zu entdecken. Denn nur von kultivierten Bakterien können Aussagen über Stoffwechselaktivitäten, produzierten Sekundärmetaboliten und deren möglichen ökologischen Rollen im Habitat getroffen werden (Abel et al., 2002). Nur so kann das Verständnis von Interaktionen zwischen verschiedene Organismen erhöht werden. Dieses Wissen kann dazu genutzt werden, um Signale zur Wirkstoffproduktion besser zu verstehen und diese bei der Induzierung von Wirkstoffen im Labor auch einsetzen zu können.

VII.2 Neue Methoden zur Induzierung der Produktion und Identifizierung von Wirkstoffen

Um aus dem Pool an kultivierten Bakterien geeignete Wirkstoffproduzenten zu selektieren müssen schnelle und effiziente Methoden verwendet werden. Die in dieser Arbeit verwendeten biologischen Aktivitätstest für die Rohextrakte und ein PCR-basiertes Screening nach Sekundärmetabolit-Gencluster zeigten dabei gute Resultate.

Viele Substanzen werden im Labor nicht expremiert und liegen auf sogenannten ‘stillen’ Genclustern auf dem Genom. Solche Gencluster (wie NRPS und PKS), ob expremiert oder nicht, wurden durch die verwendeten Primer im PCR-Screening detektiert und die entsprechenden Isolate somit als vielversprechende Wirkstoffproduzenten ausgewiesen. Die Induzierung dieser ‘stillen’ Gencluster ist daher das Ziel. Um die Expression von ‘stillen’ Genclustern zu erreichen oder deren Produkte vorherzusagen sind mehrere Methoden erfolgversprechend. Dazu zählen beispielsweise externe Signale, Ko-Kultivierung von Mikroorganismen, Epigenetik, Inaktivierung/Aktivierung von Kaskaden-spezifischen Regulatorgenen und ‘Genome Mining’ (Scherlach and Hertweck, 2009). Mit externen Signalen wie eine veränderte Zusammensetzung von Nährstoffen, anderem Wasser, kurzzeitiger UV-Bestrahlung, Zugabe von subinhibitorischen Konzentrationen von Antibiotika (Goh et al., 2002) und Temperatur können Gencluster aktiviert werden und damit die Wahrscheinlichkeit für eine Entdeckung von neuen Substanzen erhöhen. Die Isolierung von Jadomycin B, aus *Streptomyces venezuelae* ISP5230 erfolgte durch eine kurzzeitige Erhöhung der Kultivierungstemperatur von 37 °C auf 42 °C, aber auch durch die Zugabe von Ethanol zum Medium. Jadomycin B

ist ein Inhibitor der Aurora-B Kinase und damit ein vielversprechender Kandidat für die Krebsbehandlung (Doull et al., 1994).

Sekundärmetabolite sind bei Interaktionen zwischen Spezies unterschiedlicher Mikroorganismen beteiligt (Pheromone, symbiontische Assoziationen, Predator-Beute Interaktionen). Daher ist es nicht verwunderlich, dass eine Ko-Kultivierung von zwei Mikroorganismen Auswirkungen auf das Expressionsmuster haben kann. Die Ko-Kultivierung von *Pestalotia* sp. (Pilz) mit einem unbekanntem, Antibiotika-resistentem, marinen Bakterium führte zu der Identifizierung der Pestalone. Diese Produktion zeigte sich nicht, wenn die beiden Mikroorganismen einzeln kultiviert werden. Pestalone wirken gegen Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* und Vancomycin-resistente *Enterococcus faecium* (Cueto et al., 2001). Ein weiterer synergistischer Effekt zeigt sich bei der Ko-Kultivierung von *Pseudomonas aeruginosa* (Produzent) und *Enterobacter* sp. (Inducer). Wenn diese beiden, aus einer marinen Sedimentprobe isolierten Bakterien, zusammen kultiviert werden wird das blaue Pigment Pyocyanin produziert. Pyocyanin ist ein Phenanzin Derivat und im 'Quorum Sensing' involviert (Angell et al., 2006). Mit Hilfe von epigenetischen Methoden, vor allem bei Pilzen wurden ebenfalls neue Sekundärmetabolite entdeckt. Die Transkription bei Pilzgenen ist häufig durch Histon Deacetylierung und DNA Methylierung kontrolliert. In *Aspergillus nidulans* wurde das Gen *hdaA* (für die Histon Deacetylase) inaktiviert und damit zwei Sekundärmetabolit-Gencluster aktiviert (Shwab et al., 2007). Williams et al. (2008) versetzten 12 Pilzkulturen mit unterschiedlichen DNA Methyltransferase und HDAC Inhibitoren in verschiedenen Dosen. Dadurch zeigten elf der Stämme eine Produktion von neuen Substanzen (Williams et al., 2008). Diese Methode ist auch für Bakterien vielversprechend, wurde aber bislang –nach unserem Wissen- nicht veröffentlicht.

Ein anderes Ziel ist die Inaktivierung oder Aktivierung sowie Überexpression von Kaskaden-spezifischen Regulatorgenen, die dann in einer Expression eines stillen Genclusters resultieren. Der Vorteil dieser Methode ist, dass nur ein kleines Gen aktiviert oder in das Genom integriert werden muss. In einem *Streptomyces* sp. Stamm wurde durch die Inaktivierung eines Repressorgens einer Polyketidsynthase II zwei neue Angucycline (UMW 6 und Rabelomycin) erhalten (Metsä-Ketelä et al., 2004).

Eine weitere sehr aussichtsreiche Methode, um die Entdeckung von neuen Substanzen zu erhöhen, ist das 'Genome Mining'. Dazu ist es notwendig, das komplette Genom eines Stammes zu sequenzieren und die darauf befindlichen Gencluster zu annotieren. Durch die Sequenzierung von Genomen zeigte sich, dass Bakterien durch sogenannte 'stille' Gencluster ein weit größeres Potential zur Wirkstoffproduktion haben als bisher

angenommen (Wenzel and Müller, 2005). Dies war auch der Fall bei den beiden in dieser Arbeit sequenzierten Genomen (gtP20b und C42). Beide Isolate wiesen zusätzlich zu bereits bekannten Biosynthesegenen noch putative Gencluster für NRPS und PKS auf, deren Produkte noch nicht bekannt sind. Um Strukturinformationen zu den Produkten dieser Gencluster zu erhalten, gibt es mehrere Methoden. Bei modular aufgebauten NRPS und PKS ist eine Strukturvorhersage möglich, da sie einer logischen Reihenfolge beim Einbau folgen. Wenn die Struktur bekannt ist können Kultivierungs- bzw. Isolierungsparameter (z.B. spezifische Absorption des Produktes) daran angepasst werden. Bei iterativen Systemen und Modifikationen des Produktes ist dies nicht möglich (Challis, 2008).

Durch 'Genome Mining' konnte in einem *Streptomyces aizunensis* Stamm die antifungale Substanz ECO-02301 identifiziert werden. Die Substanz sollte laut Strukturvorhersage eine charakteristische Absorption bei 300 nm haben, woran dann die Isolierung angepasst wurde (McAlpine et al., 2005). Eine weitere Möglichkeit um die Produkte von 'stillen' Genclustern zu erhalten ist die heterologe Expression. Um ein Gen oder Gencluster erfolgreich heterolog zu exprimieren muss der GC-Gehalt des Wirtes mit dem des Original Stammes ähnlich sein (Gustafsson et al., 2004). Bislang sind nur ein paar bakterielle Wirte bekannt: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* und *Escherichia coli* (Wenzel and Müller, 2005). Polyketidsynthasen II haben eine durchschnittliche Größe von <40 kb und können daher mit nur einem Cosmid in einen nah-verwandten Wirt eingebracht werden. Dies wurde bereits bei einigen PKS II Genclustern wie Medermycin (aus *Streptomyces* sp. AM-7161), expremiert in *S. coelicolor* (Ichinose et al., 2003) und Griseorhodin A (aus *Streptomyces* sp. JP95), expremiert in *S. lividans* (Li and Piel, 2002) erfolgreich durchgeführt. Beispiele eines marinen Wirkstoffes der durch heterologe Expression erhalten wurden ist Thiocoralin. Das Gencluster dieses cytotoxischen Thiopeptids stammt ursprünglich aus zwei marinen *Micromonospora* sp. Stämmen und wurde in einem *Streptomyces* sp. Stamm expremiert (Lombo et al., 2006). All diese vielversprechenden Methoden sind Möglichkeiten, die Produkte der unbekannt Gencluster aus den Isolaten gtP20b und C42 zu identifizieren bzw. ihre Bildung zu induzieren. Damit können Substanzen für den biotechnologischen Einsatz verfügbar gemacht werden. Auch unter den vielen, in dieser Arbeit, isolierten Sediment-Bakterien, deren nähere Bearbeitung noch aussteht, sind unter Verwendung der oben erwähnten Methoden aussichtsreiche Kandidaten vorhanden.

VIII Literaturliste

- Abdel-Mageed WM, Milne BF, Wagner M, Schumacher M, Sandor P, Pathom-aree W, Goodfellow M, Bull AT, Horikoshi K, and Ebel R (2010).** Dermacozines, a new phenazine family from deep-sea dermacocci isolated from a Mariana Trench sediment. *Organic & Biomolecular Chemistry* **8**: 2352 - 2362.
- Abel U, Koch C, Speitling M, and Hansske FG (2002).** Modern methods to produce natural-product libraries. *Current Opinion in Chemical Biology* **6**: 453 - 458.
- Aley SB, Zimmerman M, Hetsko M, Selsted ME, and Gillin FD (1994).** Killing of *Giardia lamblia* by cryptdins and cationic neutrophil peptides. *Infection and Immunity* **62**: 5397 - 5403.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, and Lipman DJ (1990).** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403 - 410.
- Amann RI, Ludwig W, and Schleifer KH (1995).** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **59**: 143 - 169.
- Angell S, Bench BJ, Williams H, and Watanabe CMH (2006).** Pyocyanin isolated from a marine microbial population: synergistic production between two distinct bacterial species and mode of action. *Chemistry & Biology* **13**: 1349 - 1359.
- Arguelles-Arias A, Ongena M, Halimi B, Lara Y, Brans A, Joris B, and Fickers P (2009).** *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial Cell Factories* **8**: 63 - 75.
- Auch AF, Klenk HP, and Göker M (2010).** Standard operating procedure for calculating genome-to-genome distances based on high-scoring segment pairs. *Standards in Genomic Sciences* **2**: 142 - 148.
- Ayuso-Sacido A and Genilloud O (2005).** New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microbial Ecology* **49**: 10 - 24.
- Bais HP, Fall R, and Vivanco JM (2004).** Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiology* **134**: 307 - 319.
- Balibar CJ, Vaillancourt FH, and Walsh CT (2005).** Generation of D amino acid residues in assembly of arthrofactin by dual condensation/epimerization domains. *Chemistry & Biology* **12**: 1189 - 1200.
- Bals R (2000).** Antimicrobial peptides and peptide antibiotics. *Medizinische Klinik* **95**: 496 - 502.
- Baltz RH (2008).** Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Current Opinion in Pharmacology* **8**: 557 - 563.

- Barbe V, Cruveiller S, Kunst F, Lenoble P, Meurice G, Sekowska A, Vallenet D, Wang TZ, Moszer I, Medigue C et al. (2009).** From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology* **155**: 1758 - 1775.
- Barna JCJ and Williams DH (1984).** The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. *Annual Reviews in Microbiology* **38**: 339 - 357.
- Baroja ML, Cieslinski LB, Torphy TJ, Wange RL, and Madrenas J (1999).** Specific CD3 association of a phosphodiesterase 4B isoform determines its selective tyrosine phosphorylation after CD3 ligation. *The Journal of Immunology* **162**: 2016 - 2023.
- Barona-Gomez F, Wong U, Giannakopoulos AE, Derrick PJ, and Challis GL (2004).** Identification of a cluster of genes that directs desferrioxamine biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* M145. *Journal of the American Chemical Society* **126**: 16282 - 16283.
- Battersby AR and Craig LC (1952).** The Chemistry of Tyrocidine. I. Isolation and characterization of a single peptide. *Journal of the American Chemical Society* **74**: 4019 - 4023.
- Benitez LB, Velho RV, Lisboa MP, Medina LFD, and Brandelli A (2010).** Isolation and characterization of antifungal peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LBM5006. *Journal of Microbiology* **48**: 791 - 797.
- Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, and Harper D (2002).** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nature* **417**: 141 - 147.
- Berdy J (2005).** Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics* **58**: 1 - 26.
- Berrue F, Ibrahim A, Boland P, and Kerr RG (2009).** Newly isolated marine *Bacillus pumilus* (SP21): a source of novel lipoamides and other antimicrobial agents. *Pure and Applied Chemistry* **81**: 1027 - 1031.
- Besson F, Peypoux F, Quentin MJ, and Michel G (1984).** Action of antifungal peptidolipids from *Bacillus subtilis* on the cell membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Antibiotics* **37**: 172 - 177.
- Bibb MJ (2005).** Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology* **8**: 208 - 215.
- Birman S (1985).** Determination of acetylcholinesterase activity by a new chemiluminescence assay with the natural substrate. *Biochemical Journal* **225**: 825 - 828.
- Bister B, Bischoff D, Stroebele M, Riedlinger J, Reicke A, Wolter F, Bull AT, Zähler H, Fiedler HP, and Süßmuth RD (2004).** Abyssomicin C–A polycyclic antibiotic from a marine *Verrucosisspora* strain as an inhibitor of the p-aminobenzoic acid/tetrahydrofolate biosynthesis pathway. *Angewandte Chemie International Edition* **43**: 2574 - 2576.

- Bode HB and Müller R (2005).** The impact of bacterial genomics on natural product research. *Angewandte Chemie-International Edition* **44**: 6828 - 6846.
- Boldi AM (2004).** Libraries from natural product-like scaffolds. *Current Opinion in Chemical Biology* **8**: 281 - 286.
- Boman HG (1995).** Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annual Review of Immunology* **13**: 61 - 92.
- Brauers J (2001).** Linezolid—Profil eines neuen Antibiotikums. *Chemother Journal* **10**: 1 - 6.
- Bull AT, Stach JEM, Ward AC, and Goodfellow M (2005).** Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **87**: 259 - 276.
- Caboche S, Pupin M, Leclere V, Fontaine A, Jacques P, and Kucherov G (2008).** NORINE: a database of nonribosomal peptides. *Nucleic Acids Research* **36**: D326 - D331.
- Challis GL (2008).** Genome mining for novel natural product discovery. *Journal of Medicinal Chemistry* **51**: 2618 - 2628.
- Challis GL and Ravel J (2000).** Coelichelin, a new peptide siderophore encoded by the *Streptomyces coelicolor* genome: structure prediction from the sequence of its non-ribosomal peptide synthetase. *FEMS Microbiology Letters* **187**: 111 - 114.
- Challis GL, Ravel J, and Townsend CA (2000).** Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chemistry & Biology* **7**: 211 - 224.
- Chater KF and Bibb MJ (1997).** Regulation of bacterial antibiotic production. *Biotechnology Set Second Edition*: 57 - 105.
- Chater KF and Hopwood DA (1993)** *Streptomyces*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Chatterjee AN and Perkins HR (1966).** Compounds formed between nucleotides related to the biosynthesis of bacterial cell wall and vancomycin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **24**: 489 - 494.
- Chen L, Wang N, Wang X, Hu J, and Wang S (2010).** Characterization of two anti-fungal lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* SH-B10. *Bioresource Technology* **101**: 8822 - 8827.
- Chen XH, Koumoutsi A, Scholz R, Eisenreich A, Schneider K, Heinemeyer I, Morgenstern B, Voss B, Hess WR, Reva O et al. (2007).** Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology* **25**: 1007 - 1014.
- Chen XH, Vater J, Piel J, Franke P, Scholz R, Schneider K, Koumoutsi A, Hitzeroth G, Grammel N, Strittmatter AW et al. (2006).** Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. *Journal of Bacteriology* **188**: 4024 - 4036.

- Cheng Q, Xiang L, Izumikawa M, Meluzzi D, and Moore BS (2007).** Enzymatic total synthesis of enterocin polyketides. *Nature Chemical Biology* **3**: 557 - 558.
- Chopra I and Roberts M (2001).** Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **65**: 232 - 260.
- Chung YR, Kim CH, Hwang I, and Chun J (2000).** *Paenibacillus koreensis* sp. nov., a new species that produces an iturin-like antifungal compound. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 1495 - 1500.
- Cohn F (1872).** Untersuchungen über Bakterien. *Beitrag zur Biologie der Pflanzen* **127**.
- Colquhoun JA, Heald SC, Li L, Tamaoka J, Kato C, Horikoshi K, and Bull AT (1998a).** Taxonomy and biotransformation activities of some deep-sea actinomycetes. *Extremophiles* **2**: 269 - 277.
- Colquhoun JA, Mexson J, Goodfellow M, Ward AC, Horikoshi K, and Bull AT (1998b).** Novel rhodococci and other mycolate actinomycetes from the deep sea. *Antonie van Leeuwenhoek* **74**: 27 - 40.
- Conti E, Stachelhaus T, Marahiel MA, and Brick P (1997).** Structural basis for the activation of Phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of Gramicidin S. *Embo Journal* **16**: 4174 - 4183.
- Corre C and Challis GL (2009).** New natural product biosynthetic chemistry discovered by genome mining. *Natural Product Reports* **26**: 977 - 986.
- Cueto M, Jensen PR, Kauffman C, Fenical W, Lobkovsky E, and Clardy J (2001).** Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge. *Journal of Natural Products* **64**: 1444 - 1446.
- D'Hondt S, Jörgensen BB, Miller DJ, Batzke A, Blake R, Cragg BA, Cypionka H, Dickens GR, Ferdelman T, and Hinrichs KU (2004).** Distributions of microbial activities in deep seafloor sediments. *Science* **306**: 2216 - 2221.
- Danhorn T and Fuqua C (2007).** Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Review of Microbiology* **61**: 401 - 422.
- Debnath M, Paul AK, and Bisen PS (2007).** Natural bioactive compounds and biotechnological potential of marine bacteria. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **8**: 253 - 260.
- Demain A (1998).** Induction of secondary metabolism. *International Microbiology* **1**: 259 - 264.
- Demain AL (1974).** How do antibiotic-producing microorganisms avoid suicide? *Annals of the New York Academy of Sciences* **235**: 601 - 612.
- Demain AL and Fang A (1995).** Emerging concepts of secondary metabolism in actinomycetes. *Actinomycetologica* **9**: 98 - 117.

- Dertz EA, Xu JD, Stintzi A, and Raymond KN (2006).** Bacillibactin-mediated iron transport in *Bacillus subtilis*. *Journal of the American Chemical Society* **128**: 22 - 23.
- Doekel S and Marahiel MA (2001).** Biosynthesis of natural products on modular peptide synthetases. *Metabolic Engineering* **3**: 64 - 77.
- Dolezilova L, Spizek J, Vondracek M, Peleckova F, and Vanek Z (1965).** Cycloheximide-producing and Fungicidin-producing Mutants of *Streptomyces noursei*. *Journal of General Microbiology* **39**: 305 .
- Donadio S, Monciardini P, and Sosio M (2007).** Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics. *Natural Product Reports* **24**: 1073 - 1109.
- Doull JL, Singh AK, Hoare M, and Ayer SW (1994).** Conditions for the production of jadomycin B by *Streptomyces venezuelae* ISP5230: Effects of heat shock, ethanol treatment and phage infection. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **13**: 120 - 125.
- Du L and Lou L (2010).** PKS and NRPS release mechanisms. *Natural Product Reports* **27**: 255 - 278.
- Dubois D, Baron O, Cougnoux A, Delmas J, Pradel N, Boury M, Bouchon B, Bringer MA, Nougayrede JP, and Oswald E (2011).** ClbP is a prototype of a peptidase subgroup involved in biosynthesis of nonribosomal peptides. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 35562 - 35570.
- Eady EA and Ingham E (1994).** Propionibacterium acnes-friend or foe? *Reviews in Medical Microbiology* **5**: 163 .
- Earl AM, Losick R, and Kolter R (2007).** *Bacillus subtilis* genome diversity. *Journal of Bacteriology* **189**: 1163 - 1170.
- Eberle J and Seibl R (1992).** A new method for measuring reverse transcriptase activity by ELISA. *Journal of Virological Methods* **40**: 347 - 356.
- Ehmann DE, Trauger JW, Stachelhaus T, and Walsh CT (2000).** Aminoacyl-SNACs as small-molecule substrates for the condensation domains of nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry & Biology* **7**: 765 - 772.
- El-Gendy MMA, Shaaban M, Shaaban KA, El-Bondkly AM, and Laatsch H (2008).** Essramycin: a first triazolopyrimidine antibiotic isolated from nature. *The Journal of Antibiotics* **61**: 149 - 157.
- Ellman GL and Courtney KD (1961).** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* **7**: 88 - 90.
- Fan L, Bo S, Chen H, Ye W, Kleinschmidt K, Baumann HI, Imhoff JF, Kleine M, and Cai D (2011a).** Genome sequence of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* gtP20b, isolated from the Indian Ocean. *Journal of Bacteriology* **193**: 1276 - 1277.

- Fan L, Liu Y, Li Z, Baumann HI, Kleinschmidt K, Ye W, Imhoff JF, Kleine M, and Cai D (2011b).** Draft genome sequence of the marine *Streptomyces* sp. strain PP-C42, isolated from the Baltic Sea. *Journal of Bacteriology* **193**: 3691 - 3692.
- Feingold DS, Hsueh CC, and Sud IJ (1974).** Basis for selectivity of action of polymyxin antibiotics on cell-membranes. *Annals of the New York Academy of Sciences* **235**: 480 - 492.
- Feling RH, Buchanan GO, Mincer TJ, Kauffman CA, Jensen PR, and Fenical W (2003).** Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. *Angewandte Chemie International Edition* **42**: 355 - 357.
- Fenical W (1993).** Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. *Chemical Reviews* **93**: 1673 - 1683.
- Fenical W and Jensen PR (2006).** Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nature Chemical Biology* **2**: 666 - 673.
- Fidel Jr PL, Vazquez JA, and Sobel JD (1999).** *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology Reviews* **12**: 80 - 96.
- Fischbach MA and Walsh CT (2006).** Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chemical Reviews* **106**: 3468 - 3496.
- Fry BA and Loria R (2002).** Thaxtomin A: evidence for a plant cell wall target. *Physiological and molecular plant pathology* **60**: 1 - 8.
- Fusetani N, Yasukawa K, Matsunaga S, and Hashimoto K (1986).** Isolation and identification of three hemolysins from the hydroid *Solanderia secunda* (Inaba). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **83**: 511 - 513.
- Gärtner, A. (2011).** Isolation and characterization of bacteria from the deep sea and their potential to produce bioactive natural products. Christian-Albrechts Universität zu Kiel.
- Gärtner A, Blümel M, Wiese J, and Imhoff JF (2011a).** Isolation and characterisation of bacteria from the Eastern Mediterranean deep sea. *Antonie van Leeuwenhoek* **100**: 421 - 435.
- Gärtner A, Ohlendorf B, Schulz D, Zinecker H, Wiese J, and Imhoff JF (2011b).** Levantilides A and B, 20-membered macrolides from a *Micromonospora* strain isolated from the Mediterranean deep sea sediment. *Marine Drugs* **9**: 98 - 108.
- Gerwick WH and Moore BS (2012).** Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. *Chemistry & Biology* **19**: 85 - 98.
- Ginolhac A, Jarrin C, Gillet B, Robe P, Pujic P, Tuphile K, Bertrand H, Vogel TM, Perriere G, Simonet P et al. (2004).** Phylogenetic analysis of polyketide

synthase I domains from soil metagenomic libraries allows selection of promising clones. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 5522 - 5527.

Giuliani A, Pirri G, and Nicoletto SF (2007). Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Central European Journal of Biology* **2**: 1 - 33.

Goh EB, Yim G, Tsui W, McClure JA, Surette MG, and Davies J (2002). Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 17025 - 17030.

Gontang EA, Fenical W, and Jensen PR (2007). Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 3272 - 3282.

Gontang EA, Gaudencio SP, Fenical W, and Jensen PR (2010). Sequence-based analysis of secondary-metabolite biosynthesis in marine actinobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 2487 - 2499.

Gordon YJ, Romanowski EG, and McDermott AM (2005). A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Current Eye Research* **30**: 505 - 515.

Goss WA and Katz E (1957). Actinomycin formation by *Streptomyces* cultures. *Applied microbiology* **5**: 95 - 102.

Gottheil O (1901). Botanische Beschreibung einiger Bodenbakterien. *Zentralbibliothek für Bakteriologie, Parasitenkrankheiten und Infektionskrankheiten Hygiene Abteilung II* **7**: 680 - 691.

Grangemard I, Bonmatin JM, Bernillon J, Das BC, and Peypoux F (1999). Lichenysins G, a novel family of lipopeptide biosurfactants from *Bacillus licheniformis* IM 1307: Production, isolation and structural evaluation by NMR and mass spectrometry. *The Journal of Antibiotics* **52**: 363 - 373.

Grangemard I, Wallach J, Maget-Dana R, and Peypoux F (2001). Lichenysin. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **90**: 199 - 210.

Gross H, Stockwell VO, Henkels MD, Nowak-Thompson B, Loper JE, and Gerwick WH (2007). The genomisotopic approach: a systematic method to isolate products of orphan biosynthetic gene clusters. *Chemistry & Biology* **14**: 53 - 63.

Gulder TAM and Moore BS (2009). Chasing the treasures of the sea - bacterial marine natural products. *Current Opinion in Microbiology* **12**: 252 - 260.

Gulder TAM and Moore BS (2010). Salinosporamid–Naturstoffe: potente Inhibitoren des 20S–Proteasoms als vielversprechende Krebs–Chemotherapeutika. *Angewandte Chemie* **122**: 9534 - 9556.

Gustafson K, Roman M, and Fenical W (1989). The Macrolactins, a novel class of antiviral and cyto-toxic Macrolides from a deep-sea marine bacterium. *Journal of the American Chemical Society* **111**: 7519 - 7524.

- Gustafsson C, Govindarajan S, and Minshull J (2004).** Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology* **22**: 346 - 353.
- Haefner B (2003).** Drugs from the deep: Marine natural products as drug candidates. *Drug Discovery Today* **8**: 536 - 544.
- Hancock REW (1997).** Peptide antibiotics. *The Lancet* **349**: 418 - 422.
- Hancock REW and Chapple DS (1999).** Peptide antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**: 1317 - 1323.
- Harada K, Fujii K, Hayashi K, Suzuki Yoshitomo M, and Oka H (1996).** Application of-FDLA derivatization to determination of absolute configuration of constituent amino acids in peptide by advanced Marfey's method. *Tetrahedron Letters* **37**: 3001 - 3004.
- Hawas UW, Shaaban M, Shaaban KA, Speitling M, Maier A, Kelter G, Fiebig HH, Meiners M, Helmke E, and Laatsch H (2009).** Mansouramycins A–D, cytotoxic isoquinolinequinones from a marine streptomycete (1). *Journal of Natural Products* **72**: 2120 - 2124.
- He H, Silo-Suh LA, Handelsman J, and Clardy J (1994).** Zwittermicin A, an antifungal and plant protection agent from *Bacillus cereus*. *Tetrahedron Letters* **35**: 2499 - 2502.
- Heilmann J (2007).** Wirkstoffe auf Basis biologisch aktiver Naturstoffe. *Chemie in unserer Zeit* **41**: 376 - 389.
- Helmke E and Weyland H (1984).** *Rhodococcus marinonascens* sp. nov., an actinomycete from the sea. *International Journal of Systematic Bacteriology* **34**: 127 - 138.
- Hertweck C (2009).** The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angewandte Chemie-International Edition* **48**: 4688 - 4716.
- Hildebrand M, Waggoner LE, Liu H, Sudek S, Allen S, Anderson C, Sherman DH, and Haygood M (2004).** bryA:: an unusual modular polyketide synthase gene from the uncultivated bacterial symbiont of the marine bryozoan *Bugula neritina*. *Chemistry & Biology* **11**: 1543 - 1552.
- Hobbs RJ and Humphries SE (1995).** An integrated approach to the ecology and management of plant invasions. *Conservation Biology* 761 - 770.
- Hofemeister J, Conrad B, Adler B, Hofemeister B, Feesche J, Kucheryava N, Steinborn G, Franke P, Grammel N, Zwintscher A et al. (2004).** Genetic analysis of the biosynthesis of non-ribosomal peptide- and polyketide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by *Bacillus subtilis* A1/3. *Molecular Genetics and Genomics* **272**: 363 - 378.
- Holzgrabe U (2004).** Antibiotika-Entwicklung gestern und heute. *Chemotherapie Journal* **13**: 142 - 147.
- Hopwood DA (1997).** Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chemical Reviews* **97**: 2465 - 2497.

- Hopwood DA (2006).** Soil to genomics: the *Streptomyces* chromosome. *Annual Review of Genetics* **40**: 1 - 23.
- Horinouchi S and Beppu T (1994).** A-factor as a microbial hormone that controls cellular differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Molecular Microbiology* **12**: 859 - 864.
- Hughes CC, MacMillan JB, Gaudencio SP, Fenical W, and La Clair JJ (2009a).** Ammosamides A and B target myosin. *Angewandte Chemie International Edition* **48**: 728 - 732.
- Hughes CC, MacMillan JB, Gaudencio SP, Jensen PR, and Fenical W (2009b).** The ammosamides: structures of cell cycle modulators from a marine-derived *Streptomyces* species. *Angewandte Chemie International Edition* **48**: 725 - 727.
- Ichinose K, Ozawa M, Ito K, Kunieda K, and Ebizuka Y (2003).** Cloning, sequencing and heterologous expression of the medermycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces* sp. AM-7161: towards comparative analysis of the benzoisochromanquinone gene clusters. *Microbiology* **149**: 1633 - 1645.
- Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M, and Omura S (2003).** Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnology* **21**: 526 - 531.
- Ikeda H, Nonomiya T, Usami M, Ohta T, and Omura S (1999).** Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 9509 - 9514.
- Imhoff JF, Labes A, and Wiese J (2011).** Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products. *Biotechnology Advances* **29**: 468 - 482.
- Ito M, Aida T, and Koyama Y (1966).** Studies on the bacterial formation of a peptide antibiotic, colistin. I. On the enzymatic inactivation of colistin by *Bacillus colistinus*. *Agricultural and Biological Chemistry* **30**: 1112 - 1118.
- Ivanova EP, Mikhailov VV, and Andreev LA (1992).** Marine bacilli and some approaches to their identification. *Microbiology Journal* **54**: 27 - 33.
- Ivanova EP, Vysotskii MV, Svetashev VI, Nedashkovskaya OI, Gorshkova NM, Mikhailov VV, Yumoto N, Shigeri Y, Taguchi T, and Yoshikawa S (2010).** Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. *International Microbiology* **2**: 267 - 271.
- Jaruchoktaweechai C, Suwanborirux K, Tanasupawatt S, Kittakoop P, and Menasveta P (2000).** New macrolactins from a marine *Bacillus* sp. Sc026. *Journal of Natural Products* **63**: 984 - 986.
- Jensen PR, Dwight R, and Fenical W (1991).** Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 1102 - 1108.

- Jensen PR, Gontang E, Mafnas C, Mincer TJ, and Fenical W (2005).** Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environmental Microbiology* **7**: 1039 - 1048.
- Jensen T, Pedersen SS, Garne S, Heilmann C, Hoiby N, and Koch C (1987).** Colistin inhalation therapy in cystic fibrosis patients with chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **19**: 831 - 838.
- Jeong SY, Shin HJ, Kim TS, Lee HS, Park S, and Kim HM (2006).** Streptokordin, a new cytotoxic compound of the methylpyridine class from a marine-derived *Streptomyces* sp. KORDI-3238. *The Journal of Antibiotics* **59**: 234 - 240.
- Johnson BA, Anker H, and Meleney FL (1945).** Bacitracin: a new antibiotic produced by a member of the *B. subtilis* group. *Science* **102**: 376 - 377.
- Kahne D, Leimkuhler C, Lu W, and Walsh C (2005).** Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Chemical Reviews* **105**: 425 - 448.
- Katz E and Demain AL (1977).** The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **41**: 449 - 474.
- Katz L (1997).** Manipulation of modular polyketide synthases. *Chemical Reviews* **97**: 2557 - 2576.
- Khodursky AB and Cozzarelli NR (1998).** The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 27668 - 27677.
- Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, and Hopwood DA (2000)** *Practical streptomyces genetics*. The John Innes Foundation Norwich, UK.
- Kinsinger RF, Shirk MC, and Fall R (2003).** Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. *Journal of Bacteriology* **185**: 5627 - 5631.
- Kondejewski LH, Farmer SW, WISHART DS, Kay CM, Hancock REW, and Hodges RS (1996).** Effect of ring size of gramicidin S analogs on structure, antibacterial and hemolytic activity. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 25261 - 25268.
- Köpke B, Wilms R, Engelen B, Cypionka H, and Sass H (2005).** Microbial diversity in coastal subsurface sediments: a cultivation approach using various electron acceptors and substrate gradients. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 7819 - 7830.
- Korinek J (1927).** Ein Beitrag zur Mikrobiologie des Meeres. *Zentrallbibliothek für Bakterien, II Abteilung* **77**: 73 - 79.
- Koumoutsis A, Chen XH, Henne A, Liesegang H, Hitzeroth G, Franke P, Vater J, and Borriss R (2004).** Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in

- Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *Journal of Bacteriology* **186**: 1084 - 1096.
- Kozlova EV, Anisimova LA, and Boronin AM (1989)**. Antibiotic resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from 1979-1984. *Antibiotics and Chemotherapy* **34**: 24 - 28.
- Kresken M, Hafner D, Schmitz FJ, and Wichelhaus TA (2001)**. Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Antibiotika in Deutschland und im mitteleuropäischen Raum. *Bericht über die Ergebnisse einer multizentrischen Studie der Arbeitsgemeinschaft Empfindlichkeitsprüfungen & Resistenzen der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie aus dem Jahre 2003* **2003**.
- Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, Bertero MG, Bessieres P, Bolotin A, Borchert S et al. (1997)**. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249 - 256.
- Küster E (1959)**. Outline of a comparative study of criteria used in characterization of the actinomycetes. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy* **9**: 97 - 104.
- Kwon HC, Kauffman CA, Jensen PR, and Fenical W (2006)**. Marinomycins AD, antitumor-antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus *Marinispora*. *Journal of the American Chemical Society* **128**: 1622 - 1632.
- Lam KS (2006)**. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Opinion in Microbiology* **9**: 245 - 251.
- Lang G, Kalvelage T, Peters A, Wiese J, and Imhoff JF (2008)**. Linear and cyclic peptides from the entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophilus*. *Journal of Natural Products* **71**: 1074 - 1077.
- Lang G, Wiese J, Schmaljohann R, and Imhoff JF (2007)**. New pentaenes from the sponge-derived marine fungus *Penicillium rugulosum*: structure determination and biosynthetic studies. *Tetrahedron* **63**: 11844 - 11849.
- Lautru S, Deeth RJ, Bailey LM, and Challis GL (2005)**. Discovery of a new peptide natural product by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Nature Chemical Biology* **1**: 265 - 269.
- Leclere V, Marti R, Bechet M, Fickers P, and Jacques P (2006)**. The lipopeptides mycosubtilin and surfactin enhance spreading of *Bacillus subtilis* strains by their surface-active properties. *Archives of Microbiology* **186**: 475 - 483.
- Lee SC, Kim SH, Park IH, Chung SY, and Choi YL (2007)**. Isolation and structural analysis of bamylocin A, novel lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* LP03 having antagonistic and crude oil-emulsifying activity. *Archives of Microbiology* **188**: 307 - 312.
- Lewis K, Epstein S, D'Onofrio A, and Ling LL (2010)**. Uncultured microorganisms as a source of secondary metabolites. *Journal of Antibiotics* **63**: 468 - 476.

- Li A and Piel J (2002).** A gene cluster from a marine *Streptomyces* encoding the biosynthesis of the aromatic spiroketal polyketide griseorhodin A. *Chemistry & Biology* **9**: 1017 - 1026.
- Li F, Maskey RP, Qin S, Sattler I, Fiebig HH, Maier A, Zeeck A, and Laatsch H (2005).** Chinikomycins A and B: isolation, structure elucidation, and biological activity of novel antibiotics from a marine *Streptomyces* sp. isolate M045#, 1. *Journal of Natural Products* **68**: 349 - 353.
- Li J, Lu CH, Zhao BB, Zheng ZH, and Shen YM (2008).** Phaeochromycins F–H, three new polyketide metabolites from *Streptomyces* sp. DSS-18. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **4**.
- Liu XY, Ashforth E, Ren BA, Song FH, Dai HQ, Liu M, Wang JA, Xie QO, and Zhang LX (2010).** Bioprospecting microbial natural product libraries from the marine environment for drug discovery. *Journal of Antibiotics* **63**: 415 - 422.
- Lombo F, Velasco A, Castro A, De la Calle F, Brana AF, Sanchez-Puelles JM, Mendez C, and Salas JA (2006).** Deciphering the biosynthesis pathway of the antitumor thiocoraline from a marine actinomycete and its expression in two *Streptomyces* species. *Chembiochem* **7**: 366 - 376.
- Lopez JV (2004).** Naturally mosaic operons for secondary metabolite biosynthesis: variability and putative horizontal transfer of discrete catalytic domains of the epothilone polyketide synthase locus. *Molecular Genetics and Genomics* **270**: 420 - 431.
- Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, and Clark DP (2009)** *Brock biology of microorganisms*. Pearson/Benjamin Cummings.
- Maget-Dana R and Peypoux F (1994).** Iturins, a special-class of pore-forming lipopeptides - biological and physicochemical properties. *Toxicology* **87**: 151 - 174.
- Maget-Dana R, Thimon L, Peypoux F, and Ptak M (1992).** Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie* **74**: 1047 - 1051.
- Maldonado LA, Stach JEM, Pathom-aree W, Ward AC, Bull AT, and Goodfellow M (2005).** Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **87**: 11 - 18.
- Marahiel MA, Stachelhaus T, and Mootz HD (1997).** Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chemical Reviews* **97**: 2651 - 2673.
- Martens, T. (2005).** Untersuchungen auf Sekundarstoffproduktion und physiologische Charakterisierung von marinen heterotrophen Bakterien aus dem deutschen Wattenmeer. Universität Oldenburg.
- Martens T, Gram L, Grossart HP, Kessler D, Müller R, Simon M, Wenzel SC, and Brinkhoff T (2007).** Bacteria of the *Roseobacter* clade show potential for secondary metabolite production. *Microbial Ecology* **54**: 31 - 42.

- Maskey RP, Helmke E, Kayser O, Fiebig HH, Maier A, Busche A, and Laatsch H (2004).** Anti-cancer and antibacterial trioxacarcins with high anti-malaria activity from a marine *Streptomyces* and their absolute stereochemistry. *Journal of Antibiotics* **57**: 771 - 779.
- May JJ, Kessler N, Marahiel MA, and Stubbs MT (2002).** Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 12120 - 12125.
- May JJ, Wendrich TM, and Marahiel MA (2001).** The dhb operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2, 3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 7209 - 7217.
- Mayer A, Glaser KB, Cuevas C, Jacobs RS, Kem W, Little RD, McIntosh JM, Newman DJ, Potts BC, and Shuster DE (2010).** The odyssey of marine pharmaceuticals: A current pipeline perspective. *Trends in Pharmacological Sciences* **31**: 255 - 265.
- Mayfield CI, Williams ST, Ruddick SM, and Hatfield HL (1972).** Studies on the ecology of actinomycetes in soil IV. Observations on the form and growth of streptomycetes in soil. *Soil Biology and Biochemistry* **4**: 79 - 86.
- McAlpine JB, Bachmann BO, Pirae M, Tremblay S, Alarco AM, Zazopoulos E, and Farnet CM (2005).** Microbial genomics as a guide to drug discovery and structural elucidation: ECO-02301, a novel antifungal agent, as an example. *Journal of Natural Products* **68**: 493 - 496.
- McArthur KA, Mitchell SS, Tsueng G, Rheingold A, White DJ, Grodberg J, Lam KS, and Potts BCM (2008).** Lynamincins A–E, Chlorinated Bisindole Pyrrole Antibiotics from a Novel Marine Actinomycete. *Journal of Natural Products* **71**: 1732 - 1737.
- McClerren AL, Cooper LE, Quan C, Thomas PM, Kelleher NL, and Van Der Donk WA (2006).** Discovery and in vitro biosynthesis of haloduracin, a two-component lantibiotic. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 17243 - 17248.
- Medema MH, Blin K, Cimermancic P, de Jager V, Zakrzewski P, Fischbach MA, Weber T, Takano E, and Breitling R (2011).** antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Research* **39**: W339 - W346.
- Metsä-Ketelä M, Salo V, Halo L, Hautala A, Hakala J, Mantsala P, and Ylihonko K (1999).** An efficient approach for screening minimal PKS genes from *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Letters* **180**: 1 - 6.
- Metsä-Ketelä M, Ylihonko K, and Mäntsälä P (2004).** Partial activation of a silent angucycline-type gene cluster from a rubromycin beta producing *Streptomyces* sp. PGA64. *The Journal of Antibiotics* **57**: 502 - 510.

- Mincer TJ, Jensen PR, Kauffman CA, and Fenical W (2002).** Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 5005 - 5011.
- Mireles JR, Toguchi A, and Harshey RM (2001).** *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *Journal of Bacteriology* **183**: 5848 - 5854.
- Mitova MI, Lang G, Wiese J, and Imhoff JF (2008).** Subinhibitory concentrations of antibiotics induce phenazine production in a marine *Streptomyces* sp. *Journal of Natural Products* **71**: 824 - 827.
- Mitscher LA (2005).** Bacterial topoisomerase inhibitors: quinolone and pyridone antibacterial agents. *Chemical Reviews* **105**: 559 - 592.
- Miyairi N, Sakai H, Konomi T, and Imanaka H (1976).** Enterocin, a new antibiotic taxonomy, isolation and characterization. *The Journal of Antibiotics* **29**: 227 - 235.
- Mootz HD, Schwarzer D, and Marahiel MA (2002).** Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *ChemBiochem* **3**: 490 - 504.
- Moran MA, Rutherford LT, and Hodson RE (1995).** Evidence for indigenous *Streptomyces* populations in a marine environment determined with a 16S rRNA probe. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 3695 - 3700.
- Moyne AL, Shelby R, Cleveland TE, and Tuzun S (2001).** Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *Journal of applied microbiology* **90**: 622 - 629.
- Muralidhar P, Radhika P, Krishna N, Rao DV, and Rao CB (2003).** Sphingolipids from marine organisms: a review. *Natural Product Sciences* **9**: 117 - 142.
- Muscholl-Silberhorn A, Thiel V, and Imhoff JF (2008).** Abundance and bioactivity of cultured sponge-associated bacteria from the mediterranean sea. *Microbial Ecology* **55**: 94 - 106.
- Nakamura LK, Roberts MS, and Cohan FM (1999).** Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**: 1211 - 1215.
- Nett M, Ikeda H, and Moore BS (2009).** Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Natural Product Reports* **26**: 1362 - 1384.
- Newman DJ and Cragg GM (2007).** Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products* **70**: 461 - 477.
- Newman DJ, Cragg GM, and Snader KM (2003).** Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products* **66**: 1022 - 1037.

- Nonomura H and Ohara Y (1969).** Distribution of actinomycetes in soil. *Journal of Fermentation Technology* **47**: 463 - 469.
- Nuhn P (1997)** *Naturstoffchemie*.
- O'Hagan D and Collie JN (1991)** *The polyketide metabolites*. Ellis Horwood Chichester, UK.
- Oki T (1977).** New anthracycline antibiotics. *The Japanese Journal of Antibiotics* **30**: 70 - 84.
- Olano C, Mendez C, and Salas JA (2009).** Antitumor compounds from marine actinomycetes. *Marine Drugs* **7**: 210 - 248.
- Omura S, Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Takahashi C, Shinose M, Takahashi Y, Horikawa H, Nakazawa H, and Osonoe T (2001).** Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 12215 - 12220.
- Ongena M and Jacques P (2008).** *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology* **16**: 115 - 125.
- Palumbi SR (2001).** Humans as the world's greatest evolutionary force. *Science* **293**: 1786 - 1790.
- Parenti F (1988).** Glycopeptide antibiotics. *The Journal of Clinical Pharmacology* **28**: 136 - 140.
- Parkes RJ, Cragg BA, and Wellsbury P (2000).** Recent studies on bacterial populations and processes in subseafloor sediments: a review. *Hydrogeology Journal* **8**: 11 - 28.
- Pathom-aree W, Stach JEM, Ward AC, Horikoshi K, Bull AT, and Goodfellow M (2006).** Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles* **10**: 181 - 189.
- Peschel A and Sahl HG (2006).** The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nature Reviews Microbiology* **4**: 529 - 536.
- Peypoux F, Marion D, Maget-Dana R, Ptak M, Das BC, and Michel G (1985).** Structure of bacillomycin F, a new peptidolipid antibiotic of the iturin group. *European Journal of Biochemistry* **153**: 335 - 340.
- Peypoux F, Pommier MT, Das BC, Besson F, Delcambe L, and Michel G (1984).** Structures of bacillomycin-D and bacillomycin-I peptidolipid antibiotics from *Bacillus subtilis*. *Journal of Antibiotics* **37**: 1600 - 1604.
- Piel J, Hui D, Wen G, Butzke D, Platzer M, Fusetani N, and Matsunaga S (2004).** Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 16222 - 16227.

- Piggot PJ and Coote JG (1976).** Genetic aspects of bacterial endospore formation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **40**: 908 - 962.
- Priest FG, Goodfellow M, Shute LA, and Berkeley RCW (1987).** *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**: 69 - 71.
- Pyoung II KIM, Ryu J, Kim YH, and Chi YT (2010).** Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, Fengycin, and Surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **20**: 138 - 145.
- Rappe MS and Giovannoni SJ (2003).** The uncultured microbial majority. *Annual Reviews in Microbiology* **57**: 369 - 394.
- Raymond KN, Dertz EA, and Kim SS (2003).** Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 3584 - 3588.
- Rehnstam AS, Backman S, Smith DC, Azam F, and Hagstrom A (1993).** Blooms of sequence-specific culturable bacteria in the sea. *FEMS Microbiology Letters* **102**: 161 - 166.
- Reimer D, Pos KM, Thines M, Grün P, and Bode HB (2011).** A natural prodrug activation mechanism in nonribosomal peptide synthesis. *Nature Chemical Biology* **7**: 888 - 890.
- Renneberg R (2007)** *Biotechnologie für Einsteiger*. Elsevier, Spektrum Akad. Verl..
- Renner MK, Shen YC, Cheng XC, Jensen PR, Frankmoelle W, Kauffman CA, Fenical W, Lobkovsky E, and Clardy J (1999).** Cyclomarins AC, new antiinflammatory cyclic peptides produced by a marine bacterium (*Streptomyces* sp.). *Journal of the American Chemical Society* **121**: 11273 - 11276.
- Rodrigues L, Banat IM, Teixeira J, and Oliveira R (2006).** Biosurfactants: potential applications in medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **57**: 609 - 618.
- Rokem JS, Lantz AE, and Nielsen J (2007).** Systems biology of antibiotic production by microorganisms. *Natural Product Reports* **24**: 1262 - 1287.
- Romero F, Espliego F, Perez BJ, Garcia QT, Gravalos D, De la Calle F, and Fernandez-Puentes JL (1997).** Thiocoraline, a new depsipeptide with antitumor activity produced by a marine *Micromonospora*. I. Taxonomy, fermentation, isolation, and biological activities. *The Journal of Antibiotics* **50**: 734 - 737.
- Roongsawang N, Thaniyavarn J, Thaniyavarn S, Kameyama T, Haruki M, Imanaka T, Morikawa M, and Kanaya S (2002).** Isolation and characterization of a halotolerant *Bacillus subtilis* BBK-1 which produces three kinds of lipopeptides: bacillomycin L, plipastatin, and surfactin. *Extremophiles* **6**: 499 - 506.

- Roongsawang N, Washio K, and Morikawa M (2010).** Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. *International Journal of Molecular Sciences* **12**: 141 - 172.
- Schallmeyer M, Singh A, and Ward OP (2004).** Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology* **50**: 1 - 17.
- Scherlach K and Hertweck C (2009).** Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. *Organic & Biomolecular Chemistry* **7**: 1753 - 1760.
- Schneider A, Stachelhaus T, and Marahiel MA (1998).** Targeted alteration of the substrate specificity of peptide synthetases by rational module swapping. *Molecular and General Genetics MGG* **257**: 308 - 318.
- Schneider K, Chen XH, Vater J, Franke P, Nicholson G, Borriss R, and Süssmuth RD (2007).** Macrolactin is the polyketide biosynthesis product of the pks2 cluster of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Natural Products* **70**: 1417 - 1423.
- Schwarzer D, Finking R, and Marahiel MA (2003).** Nonribosomal peptides: from genes to products. *Natural Product Reports* **20**: 275 - 287.
- Schwarzer D and Marahiel MA (2001).** Multimodular biocatalysts for natural product assembly. *Naturwissenschaften* **88**: 93 - 101.
- Schwecke T, Aparicio JF, Molnar I, König A, Khaw LE, Haydock SF, Oliynyk M, Caffrey P, Cortes J, and Lester JB (1995).** The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**: 7839 - 7843.
- Shen B, Du L, Sanchez C, Edwards DJ, Chen M, and Murrell JM (2001).** The biosynthetic gene cluster for the anticancer drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 as a model for hybrid peptide/polyketide natural product biosynthesis. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **27**: 378 - 385.
- Shwab EK, Bok JW, Tribus M, Galehr J, Graessle S, and Keller NP (2007).** Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus*. *Eukaryotic Cell* **6**: 1656 - 1664.
- Sieber SA and Marahiel MA (2003).** Learning from nature's drug factories: Nonribosomal synthesis of macrocyclic peptides. *Journal of Bacteriology* **185**: 7036 - 7043.
- Sieber SA and Marahiel MA (2005).** Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: Approaches to new antibiotics. *Chemical Reviews* **105**: 715 - 738.
- Siefert JL, Larios-Sanz M, Nakamura LK, Slepecky RA, Paul JH, Moore ERB, Fox GE, and Jurtshuk J (2000).** Phylogeny of marine *Bacillus* isolates from the Gulf of Mexico. *Current Microbiology* **41**: 84 - 88.

- Smith B, Warren SC, Newton GGF, and Abraham EP (1967).** Biosynthesis of penicillin N and cephalosporin C: Antibiotic production and other features of the metabolism of a *Cephalosporium* sp. *Biochemical Journal* **103**: 877 - 890.
- Smith IM (1988)** *European handbook of plant diseases*. Wiley Online Library.
- Smith PG, Wang F, Wilkinson KN, Savage KJ, Klein U, Neuberger DS, Bollag G, Shipp MA, and Aguiar RCT (2005).** The phosphodiesterase PDE4B limits cAMP-associated PI3K/AKT-dependent apoptosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **105**: 308 - 316.
- Song L, Barona-Gomez F, Corre C, Xiang L, Udvary DW, Austin MB, Noel JP, Moore BS, and Challis GL (2006).** Type III polyketide synthase-ketoacyl-ACP starter unit and ethylmalonyl-CoA extender unit selectivity discovered by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Journal of the American Chemical Society* **128**: 14754 - 14755.
- Stach EM and Bull AT (2005).** Estimating and comparing the diversity of marine actinobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **87**: 3 - 9.
- Stach JEM, Maldonado LA, Masson DG, Ward AC, Goodfellow M, and Bull AT (2003).** Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 6189 - 6200.
- Stachelhaus T, Mootz HD, and Marahiel MA (1999).** The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry & Biology* **6**: 493 - 505.
- Stackebrandt E and Goebel BM (1994).** Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**: 846 - 849.
- Stanier RY (1941).** Studies on marine agar-digesting bacteria. *Journal of Bacteriology* **42**: 527 - 559.
- Stein T (2005).** *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology* **56**: 845 - 857.
- Straus SK and Hancock REW (2006).** Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1758**: 1215 - 1223.
- Süß J, Engelen B, Cypionka H, and Sass H (2004).** Quantitative analysis of bacterial communities from Mediterranean sapropels based on cultivation-dependent methods. *FEMS Microbiology Ecology* **51**: 109 - 121.
- Tabbene O, Kalai L, Ben Slimene I, Karkouch I, Elkahoui S, Gharbi A, Cosette P, Mangoni ML, Jouenne T, and Limam F (2011).** Anti-*Candida* effect of bacillomycin D-like lipopeptides from *Bacillus subtilis* B38. *FEMS Microbiology Letters* **316**: 108 - 114.

- Tanaka R, Ishizaki H, Morita T, Miyahara K, and Noda N (2000).** Evidence for the presence of 1, 2-cyclic acetal type sn-glycero-3-phosphoethanolamines in the sea anemone, *Actiniogeton* sp. *Lipids* **35**: 665 - 671.
- Trenina GA and Trutneva EM (1966).** Use of ristomycin during the selection of active variants of *Proactinomyces fructiferi* var. *ristomycini*. *Antibiotiki* **11**: 770
- Turgay K, Krause M, and Marahiel MA (1992).** Four homologous domains in the primary structure of GrsB are related to domains in a superfamily of adenylate forming enzymes. *Molecular Microbiology* **6**: 529 - 546.
- Udwary DW, Zeigler L, Asolkar RN, Singan V, Lapidus A, Fenical W, Jensen PR, and Moore BS (2007).** Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete *Salinispora tropica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 10376 - 10381.
- Ulvatne H, Karoliussen S, Stiberg T, Rekdal O, and Svendsen JS (2001).** Short antibacterial peptides and erythromycin act synergically against *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **48**: 203 - 208.
- Umezawa H, Aoyagi T, Nishikiori T, Okuyama A, Yamagishi Y, Hamada M, and Takeuchi T (1986).** Plipastatins - new inhibitors of phospholipase-A₂, produced by *Bacillus cereus* Bmg302-Ff67. 1. Taxonomy, production, isolation and preliminary characterization. *Journal of Antibiotics* **39**: 737 - 744.
- Vanittanakom N, Loeffler W, Koch U, and Jung G (1986).** Fengycin - A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *Journal of Antibiotics* **39**: 888 - 901.
- Vanneste JL (2000)** *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI.
- Walsh C (2003a)** *Antibiotics: actions, origins, resistance*. Amer Society for Microbiology.
- Walsh C (2003b).** Where will new antibiotics come from? *Nature Reviews Microbiology* **1**: 65 - 70.
- Walsh CT, Chen H, Keating TA, Hubbard BK, Losey HC, Luo L, Marshall CG, Miller DA, and Patel HM (2001).** Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines. *Current Opinion in Chemical Biology* **5**: 525 - 534.
- Walsh CT and Fischbach MA (2010).** Natural products version 2.0: connecting genes to molecules. *Journal of the American Chemical Society* **132**: 2469 - 2493.
- Wang SL, Shih IL, Liang TW, and Wang CH (2002).** Purification and characterization of two antifungal chitinases extracellularly produced by *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in a shrimp and crab shell powder medium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 2241 - 2248.

- Weigmann H (1898).** Ueber zwei an der Käse- reifung beteiligte Bakterien. *Zentralbibliothek für Bakteriologie, Parasitenkrankheiten und Infektionskrankheiten Hygiene Abteilung II* **4**: 820 - 834.
- Wenzel SC and Müller R (2005).** Recent developments towards the heterologous expression of complex bacterial natural product biosynthetic pathways. *Current Opinion in Biotechnology* **16**: 594 - 606.
- Wiener P (1996).** Experimental studies on the ecological role of antibiotic production in bacteria. *Evolutionary Ecology* **10**: 405 - 421.
- Williams PG (2009).** Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. *Trends in Biotechnology* **27**: 45 - 52.
- Williams PG, Asolkar RN, Kondratyuk T, Pezzuto JM, Jensen PR, and Fenical W (2007).** Saliniketals A and B, bicyclic polyketides from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *Journal of Natural Products* **70**: 83 - 88.
- Williams RB, Henrikson JC, Hoover AR, and Lee AE (2008).** Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. *Organic & Biomolecular Chemistry* **6**: 1895 - 1897.
- Woodruff, H. B. (1966)** The physiology of antibiotic production: the role of the producing organism. *Symp.Soc.Gen.Microbiol*
- Wright F and Bibb MJ (1992).** Codon usage in the G+ C-rich *Streptomyces* genome. *Gene* **113**: 55 - 65.
- Wulff EG, Mguni CM, Mansfeld-Giese K, Fels J, Lübeck M, and Hockenhull J (2002).** Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant pathology* **51**: 574 - 584.
- Zahner H and Maas WK (1972)** *Biology of antibiotics*. Springer-Verlag New York Inc..
- Zeigler DR (2011).** The genome sequence of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* W23: insights into speciation within the *B. subtilis* complex and into the history of *B. subtilis* genetics. *Microbiology* **157**: 2033 - 2041.
- Zerbino DR and Birney E (2008).** Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research* **18**: 821 - 829.
- Zhang ZY, Thieme-Sefler AM, Maclean D, McNamara DJ, Dobrusin EM, Sawyer TK, and Dixon JE (1993).** Substrate specificity of the protein tyrosine phosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**: 4446-4450 .
- ZoBell CE (1941).** Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. *Journal of Marine Research* **4**: 42 - 75.
- ZoBell CE (1946).** Marine microbiology, a monograph on hydrobacteriology. *Bull* **71**: 324 - 342.

IX Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. J.F. Imhoff für die Möglichkeit bedanken, in seiner Arbeitsgruppe meine Arbeit durchzuführen. Er hatte stets eine offene Tür für meine Fragen und Probleme.

Ein ganz besonderer Dank für die Betreuung meiner Arbeit, besonders in der letzten Phase geht an Jutta Wiese. Du hattest während der gesamten Arbeit ein offenes Ohr für mich und standest mir mit Rat und Tat zur Seite.

Heike Baumann möchte ich für die gute Zusammenarbeit in unserem Projekt danken.

Ohne die Unterstützung der zahlreichen Mitglieder unserer Abteilung wären die vier Jahre nicht so schön gewesen. Dank an Bettina, die immer den Überblick behält und die vielen TA's ohne die vieles nicht durchzuführen gewesen wäre. Insbesondere möchte ich Arlette für die Durchführung der Aktivitätstests danken.

Ein unglaublich, großes Dankeschön geht an das wundervolle Bib- und RZ- Team. Insbesondere Barbara und Martin möchte ich für den Cappuccino, den Kuchen, die neuesten News, die vielen Paper (die auf unglaublich schnelle Weise immer den Weg zu mir gefunden haben) und die stetige Unterstützung auch außerhalb der Arbeit danken. Ihr seid die Besten!!!!

Andrea, du weißt dass ich ohne dich und deinen Glauben an meine Arbeit diese Zeilen nicht schreiben würde. Du hast das Zeug zu einem Motivationscoach! Danke für die großartigen und sehr lustigen Jahre!

DANKE, Dirk! Du weißt für was alles.

Meinen Freunden hier und überall verteilt möchte ich dafür danken, dass sie mich stets aufgefangen haben und Entfernungen nichts an Freundschaften ändert!

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, dass sie immer an mich geglaubt haben, obwohl sie nicht wissen woher ich das habe.

X Anhang

Anhang 1: Liste der genutzte Chemikalien.

Chemikalien	Bestellnummer	Hersteller/Bezug
Acetonitril	34851	Sigma-Aldrich
(D+)-Glucose-Monohydrat	1.08342.25	Merck
Agar	212720	Becton, Dickson (BD)
Agarose	840004	Biozym
Ameisensäure	94318-250ML-F	Fluka
Biomol Green™ PTP1B Tyrosine Phosphatase Drug Discovery Kit	AK822-0001	Fa. Biomol
Calciumcarbonat	21060	Fluka
Casein	C8654-500G	Sigma
CellTiterBlue® Cell Viability Assay	G8080	Fa. Promega
Di-Kaliumphosphat	1.051.041.000	Merck
DNA-freies Wasser	95284	Fluka
DNeasy® Blood&Tissue Kit	69506	Qiagen
Eisen (II)-Sulfat Heptahydrat	1.039.650.500	Merck
Ethylacetat	31063	Fluka
GelGreen	41005	Biotium
Glycerin	1.040.922.500	Merck
dNTPs	11.969.064.001	Roche
Hefe-Extrakt	212750	Difco
L- Phenylalanin	4491,1	Roth
L-Arginin	3144,1	Roth
L-Asparagin Monohydrat	HN 23.1	Roth
L-Histidin	3852,1	Roth
L-Tryptophan	4858,1	Roth
Magnesiumsulfat Heptahydrat	1.058.861.000	Merck
Maisstärke		Bauck-Hof
Malz-Extrakt	218630	Difco
Methanol	8402	J.T. Baker
Natriumpropionat	81992	Fluka
PDELIGHT™ HTS cAMP Phosphodiesterase Kit	LT07-600	Fa. Lonza
Pepton aus Sojabohnenmehl	107212,05	Merck
Precellys-Glas-Kit 0,5mm	91-PCS-VK05	PeqLab
Primer		Biomers

Fortsetzung Anhang 1: Liste der genutzte Chemikalien.

Chemikalien	Bestellnummer	Hersteller/Bezug
Puffer	B9004S	BioLabs
puReTaq™ Ready-To-Go™ PCR Beads	27-9558-01	Amersham Biosciences
Reverse Transcriptase Assay Kit	1468120	Boehringer Mannheim
Silica Orange Trocknungskügelchen	P077.1	Roth
Taq Polymerase	M0267L	BioLabs
Tetrahydrofuran	34865	Sigma -Aldrich
Trifluoressigsäure	P088.1	Roth
Tropic Marine Meersalz		Fa. Tropic Marin
Tryptic Marine Soy Broth (TSB)	211771	Becton, Dickson (BD)

Anhang 2: Liste der genutzten Geräte.

Gerät	Typ	Hersteller/Bezug
Autosampler	7693	Agilent Technologies
C18 Säule	EC 250/4.6 Nucleodur Pyramid 5µm	Machery-Nagel
C8 Säule	EC 250/4.6 Nucleodur 100-5	Machery-Nagel
Evaporate Light Scattering Detector (ELSD)	Sedex 80, Sedere LT-ELSD	ERC GmbH
Fraktionssammler	Foxy Jr.	Teledyne ISCO
Gaschromatograph (GC)	7890A GC	Agilent Technologies
GC Säule	DB1301, Länge 30m, Durchmesser 0,32mm	Agilent Technologies
Gemini-NX C18	100*21,20mm, 5 µ, 110A	Phenomenex
High Performance Liquid Chromatographie (HPLC)	LaChrom Elite	VWR/Merck/Hitachi
Massenspektrometer (MS)	Expire 4000	Bruker Daltonics
Massenspektrometer (GC)	5975C inert MSD with Triple-Axis Detector	Agilent Technologies
Mikrotiterplattenreader	Infinite M200	Tecan
Monolith Säule	Onyx C18, 100*3.0 mm	Phenomenex
Rotationsverdampfer	R-210	Büchi
Ultra Turrax	T25 Basic	IKA-Werke
Zellmühle	MM200	Retsch
Zentrifuge	3-18K	Sigma

Anhang 3: Übersichtstabelle über die isolierten Bakterien. +: positiv, n.b.: nicht bestimmt, gt: getrocknet.

Isolat	nächster Verwandter (16S rDNA)	Isolierungs- medium	Bioaktivität	Similarität (%)	NRPS	PKS I	PKS II
B2	<i>Bacillus pumilus</i>	TM		100			
B3	<i>Bacillus licheniformis</i>	TM	+	99	+		
B7	<i>Bacillus simplex</i>	TM		99		+	
B40	<i>Bacillus simplex</i>	GYM30		99			
B43	<i>Bacillus pumilus</i>	GYM30		99		+	
C1	<i>Bacillus decolorationis</i>	TM		94			
C2	<i>Bacillus licheniformis</i>	TM		99	+		
C3	<i>Bacillus licheniformis</i>	TM		99			
C4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	TM	+	99	+		
C11	<i>Bacillus cereus</i>	TM		99			
C42	<i>Streptomyces</i> sp.	GYM30	+	99	+		
C44	<i>Bacillus oleronius</i>	GYM30		95			
D1	<i>Halobacillus karajensis</i>	TM		98		+	
D2	<i>Bacillus firmus</i>	TM		98			
D4	<i>Bacillus marisflavi</i>	TM		95			
D6	<i>Bacillus cereus</i>	TM		99			
D7	<i>Bacillus cereus</i>	TM		99			
D9	<i>Bacillus cereus</i>	TM		99			
D10	<i>Bacillus indicus</i>	TM		98		+	
D11	<i>Bacillus pumilus</i>	TM		99			
D12	<i>Bacillus pumilus</i>	TM		99			
D13	<i>Bacillus firmus</i>	TM		98			
D15	<i>Bacillus pumilus</i>	TM		99			
D42	<i>Bacillus megaterium</i>	GYM30		99			
D43	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	GYM30	+	99			
D44	<i>Bacillus pumilus</i>	GYM30		99			
D45	<i>Bacillus fortis</i>	GYM30		94			
D48	<i>Bacillus cereus</i>	GYM30		99			
D49	<i>Bacillus marisflavi</i>	GYM30		95			
D50	<i>Bacillus arsenicus</i>	GYM30		96			
D51	<i>Bacillus cereus</i>	GYM30		99			
D53	<i>Bacillus idriensis</i>	GYM30		98			
D54	<i>Bacillus simplex</i>	GYM30		99			
D55	<i>Bacillus pumilus</i>	GYM30		99			
Q1a	<i>Erythrobacter seohaensis</i>	GYM30		98	+		
Q2b	<i>Dietzia psychrocaliphila</i>	TM		98	+		+
Q1b	<i>Agrococcus lahaulensis</i>	GYM30		98			
P1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	GYM30	+	98			
B44	<i>Bacillus simplex</i>	GYM30		100	+		+
B1	<i>Bacillus atrophaeus</i>	TM		99	+		
B42	<i>Bacillus simplex</i>	GYM30		99			
C10	<i>Bacillus licheniformis</i>	TM	+	99	+		
B45	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GYM30	+	99			
C43	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	GYM30		99			
C41	<i>Bacillus megaterium</i>	GYM30		99			
G3	<i>Bacillus licheniformis</i>	GYM30		99	+		
C6	<i>Bacillus pumilus</i>	TM		99	+		
C40	<i>Bacillus licheniformis</i>	GYM30		99	+		

Fortsetzung Anhang 3: Übersichtstabelle über die isolierten Bakterien. +: positiv, n.b.: nicht bestimmt, gt: getrocknet.

Isolat	nächster Verwandter (16S rDNA)	Isolierungs- medium	Bioaktivität	Similarität (%)	NRPS	PKS I	PKS II
D8	<i>Bacillus pumilus</i>	TM		99			
B47	<i>Bacillus idriensis</i>	GYM30	+	99			
H16	<i>Bacillus bataviensis</i>	GYM30	+	98			
J2	<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	TM	+	97			
P2	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	GYM30		98			
P3	<i>Bacillus aquimaris</i>	GYM30		99			
P5	<i>Bacillus boroniphilus</i>	GYM30		99			
R2	<i>Paracoccus marinus</i>	GYM30		99	+	+	+
J1	<i>Nocardioides basaltis</i>	TM		99	+		+
K2	<i>Bacillus azotoformans</i>	TM		94			
H1	<i>Bacillus firmus</i>	M4		98			
H8	<i>Bacillus niabensis</i>	TM		98			
H5	<i>Bacillus licheniformis</i>	GYM30		99	+		
II1	<i>Bacillus licheniformis</i>	TM	+	99	+		
H4	<i>Bacillus megaterium</i>	GYM30		100			
M1	<i>Bacillus idriensis</i>	GYM30		99			
M3	<i>Bacillus indicus</i>	TM		98			
F2	<i>Bacillus pumilus</i>	TM		99			
D20	<i>Bacillus badius</i>	GYM30		96			
C48	<i>Bacillus pumilus</i>	GYM30		99			
E1	<i>Knoellia sinensis</i>	HW0.01%		98			+
F1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	GYM30		94			
G2	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	GYM30		98	+		
D3	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	TM		99			
D14	<i>Bacillus licheniformis</i>	TM	+	94			
D47	<i>Bacillus indicus</i>	GYM30		99			
D46	<i>Bacillus megaterium</i>	GYM30		99			
C5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	TM		99	+		
C12	<i>Agrococcus lahaulensis</i>	TM		98	+		
C45	<i>Bacillus megaterium</i>	GYM30		99	+		
gtN14	<i>Bacillus boroniphilus</i>	TM		99			
gtN13	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	TM		99			
gtM5	<i>Bacillus idriensis</i>	TM		99			
gtM6	<i>Bacillus boroniphilus</i>	TM	+	99			
gtO7	<i>Bacillus aerophilus</i>	TM		99			
gtM7	<i>Bacillus boroniphilus</i>	TM	+	99			
gtP20a	<i>Bacillus licheniformis</i>	GYM30		99		+	+
gtG4a	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	GYM30	+	99	+		
gtP21	<i>Bacillus vallismortis</i>	GYM30	+	99			
gtK6	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	GYM30	n.b.	100			
gtB23a	<i>Bacillus firmus</i>	GYM30	+	99			
gtK5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GYM30	+	99	+		
gtA10	<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	GYM30		99			
gtH22	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GYM30	+	99	+		+
gtN12	<i>Bacillus boroniphilus</i>	GYM30	n.b.	99			
gtD70	<i>Bacillus licheniformis</i>	GYM30		99	+	+	
gtN10	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	M4		99			

Fortsetzung Anhang 3: Übersichtstabelle über die isolierten Bakterien. +: positiv, n.b.: nicht bestimmt, gt: getrocknet.

Isolat	nächster Verwandter (16S rDNA)	Isolierungs- medium	Bioaktivität	Similarität (%)	NRPS	PKS I	PKS II
gtH20	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	TM	n.b.	99			
gtH21	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	TM	+	99	+		
gtF13	<i>Bacillus aquimaris</i>	HW0.01%	n.b.	99			
A1	<i>Bacillus licheniformis</i>	TM	+	99			
C8	<i>Bacillus marisflavi</i>	TM	+	99			
D21a	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GYM30	+	99			
H7a	<i>Terribacillus saccharophilus</i>	TM		99			
H7b	<i>Terribacillus saccharophilus</i>	TM		99			
H7c	<i>Terribacillus saccharophilus</i>	TM		99	+		
H9	<i>Bacillus firmus</i>	TM		98			
H10	<i>Bacillus bataviensis</i>	TM		98	+		
I2	<i>Bacillus licheniformis</i>	TM		99	+		
I3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	GYM30		98	+		
K1	<i>Planococcus maitriensis</i>	GYM30		95			+
M2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	TM	+	99			
N1	<i>Bacillus novalis</i>	TM	+	98			
P4	<i>Bacillus licheniformis</i>	GYM30		98	+		
P6	<i>Bacillus firmus</i>	HW0.01%		98			
gtA9	<i>Bacillus aquimaris</i>	GYM30	+	99			
gtA12	<i>Bacillus aquimaris</i>	GYM30		99			
gtB25	<i>Bacillus marisflavi</i>	GYM30		99			
gtD72	<i>Bacillus megaterium</i>	GYM30		97			
gtF16	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	GYM30		99			
gtF17	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	GYM30		99			
gtG5	<i>Bacillus licheniformis</i>	GYM30		99			
gtN11	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	GYM30		99			
gtP22	<i>Bacillus licheniformis</i>	GYM30		99	+		
gtE6	<i>Bacillus licheniformis</i>	TM		99			
gtP20b	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	GYM30	+	99	+		
I6a	<i>Streptomyces coelicolor</i>	TM	+	100			
P8b	<i>Bacillus jeotgali</i>	TM		99			
P8c	<i>Bacillus firmus</i>	TM		98			
B5a	<i>Bacillus arsenicus</i>	TM		96			
gtI13	<i>Bacillus aquimaris</i>	TM		99			
gtF11	<i>Bacillus aquimaris</i>	TM		99			
R1b	<i>Paracoccus marinus</i>	TM		99		+	+
gtN19	<i>Bacillus vallismortis</i>	TM		99			
gtJ2	<i>Bacillus simplex</i>	GYM30		100			
gtR3	<i>Kocuria himachalensis</i>	GYM30		98	+	+	
gtR2	<i>Agrococcus lahaulensis</i>	GYM30		98			
I5b	<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>	GYM30	n.b.	98	+		
gtD71a	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	GYM30		99			
gtG4b	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	GYM30		99	+		
gtI16	<i>Bacillus aquimaris</i>	GYM30		99			
gtP23	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	GYM30	+	100			
gtG6	<i>Bacillus licheniformis</i>	GYM30		99	+	+	
gtL10	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	GYM30		99	+		

Fortsetzung Anhang 3: Übersichtstabelle über die isolierten Bakterien. +: positiv, n.b.: nicht bestimmt, gt: getrocknet.

Isolat	nächster Verwandter (16S rDNA)	Isolierungs- medium	Bioaktivität	Similarität (%)	NRPS	PKS I	PKS II
gtL11	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	GYM30		99			
gtT1	<i>Bacillus firmus</i>	GYM30		98			
gtB20a	<i>Bacillus aquimaris</i>	TM	n.b.	99			
gtI11	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	TM	+	99			
gtM12	<i>Bacillus boroniphilus</i>	TM	+	99			
G1b	<i>Bacillus aquimaris</i>	TM		99		+	
G1a	<i>Bacillus firmus</i>	TM		98			
B5b	<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	TM		99			
gtF21	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	HW 0,01%		99			
P17	<i>Bacillus aquimaris</i>	HW 0,01%		99			
B8	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	TM	+	99	+		
B9	<i>Bacillus idriensis</i>	TM		98			
O1	<i>Bacillus humi</i>	GYM30		98			
H20x1	<i>Terribacillus saccharophilus</i>	GYM30		99			
gtN21	<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	GYM30		99			
gtH23	<i>Bacillus aerophilus</i>	GYM30		99			
C16	<i>Micromonospora aurantiaca</i>	HW 0,01%		99	+		+
gtY2	<i>Paracoccus aminophilus</i>	TM		96	+	+	
gtL15	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	GYM30		99			
gtS3	<i>Micrococcus luteus</i>	GYM30		98	+		
gtS4	<i>Bacillus firmus</i>	M4		98	+	+	
gtS6	<i>Bacillus firmus</i>	M4		98	+		
gtL14	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	HW 0,01%		100	+		
gtO9	<i>Bacillus indicus</i>	HW 0,01%		99			
gtF24	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	TM		99		+	
gtL12	<i>Bacillus firmus</i>	HW 0,01%		98			
gtL13	<i>Bacillus boroniphilus</i>	HW 0,01%		99			
P13	<i>Bacillus aquimaris</i>	HW 0,01%		98		+	
gtF22	<i>Bacillus aquimaris</i>	HW 0,01%		99			
gtF20	<i>Bacillus aquimaris</i>	HW 0,01%		99	+		
gtI22	<i>Bacillus aquimaris</i>	HW 0,01%		98			
gtM9	<i>Bacillus boroniphilus</i>	HW 0,01%		99			
gtR4	<i>Bacillus vallismortis</i>	TM	+	99			
H20	<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	TM		100			
gtG1a	<i>Bacillus firmus</i>	TM		98			
D71b	<i>Bacillus firmus</i>	GYM30		98			
gtO10	<i>Bacillus aerophilus</i>	GYM30		99			
gtO8	<i>Bacillus aerophilus</i>	GYM30		99			
gtE5	<i>Bacillus licheniformis</i>	GYM30		99			
gtH24	<i>Bacillus vallismortis</i>	GYM30	+	99			
gtO5	<i>Bacillus cereus</i>	GYM30		99			
C14	<i>Bacillus aquimaris</i>	HW 0,01%		99			
F12	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	HW 0,01%		99			
D23	<i>Demetria terragena</i>	M4	+	95			
gtO6	<i>Bacillus indicus</i>	M4		99			
gtN15	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	HW 0,01%		99			

Fortsetzung Anhang 3: Übersichtstabelle über die isolierten Bakterien. +: positiv, n.b.: nicht bestimmt, gt: getrocknet.

Isolat	nächster Verwandter (16S rDNA)	Isolierungsmedium	Bioaktivität	Similarität (%)	NRPS	PKS I	PKS II
gtI21	<i>Bacillus aquimaris</i>	HW 0,01%		99			
gtA6	<i>Bacillus firmus</i>	HW 0,01%		98			
gtA7	<i>Bacillus aquimaris</i>	HW 0,01%		99			
gtI20	<i>Bacillus aquimaris</i>	HW 0,01%		99			
gtS5	<i>Halobacillus profundi</i>	M4		99			
gtS1a	<i>Bacillus firmus</i>	M4		98			
M5	<i>Bacillus idriensis</i>	M4		99	+		
P11	<i>Bacillus aquimaris</i>	M4		99	+		
gtI14	<i>Bacillus aerophilus</i>	GYM30		99			
gtH15	<i>Bacillus foraminis</i>	TM		96			
N2	<i>Rhodococcus yunnanensis</i>	HW 0,01%		98	+		+
gtF10	<i>Bacillus aquimaris</i>	M4		99			
H25	<i>Bacillus boroniphilus</i>	TM		99	+		
H24	<i>Bacillus badius</i>	TM	n.b.	97			
B12	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	TM	+	98			
G6	<i>Bacillus pumilus</i>	GYM30	n.b.	99			
H32	<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	GYM30		99	+		
P21	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	GYM30	+	99	+		
I11	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	HW 0,01%		100	+		
gtC3	<i>Bacillus firmus</i>	TM	+	98			
gtD4	<i>Bacillus firmus</i>	TM		99	+	+	
gtM10	<i>Bacillus boroniphilus</i>	HW 0,01%		99			
gtF12	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	HW 0,01%		99			
gtK2	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	TM	n.b.	99			
gtP2	<i>Bacillus endophyticus</i>	TM		99			
gtP1	<i>Bacillus firmus</i>	TM		98			
gtC2	<i>Bacillus boroniphilus</i>	GYM30	+	99			
gtC1	<i>Bacillus firmus</i>	GYM30		98			
D28	<i>Bacillus arsenicus</i>	HW 0,01%		96			
gtD5	<i>Bacillus niabensis</i>	TM		98			
gtH1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GYM30	+	99			
K7	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	TM		99			
B13	<i>Bacillus pumilus</i>	TM		99	+		
gtH2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GYM30	+	99	+		
H2	<i>Bacillus decolorationis</i>	HW 0,01%		98			
gtC5	<i>Bacillus indicus</i>	HW 0,01%		99			
C19	<i>Bacillus aquimaris</i>	HW 0,01%		99			
gtI12b	<i>Bacillus aquimaris</i>	TM		99			
gtA3	<i>Bacillus aquimaris</i>	GYM30	n.b.	99			+
B11	<i>Bacillus simplex</i>	HW 0,01%		99			
gtB1	<i>Bacillus aquimaris</i>	HW 0,01%		99			
P16	<i>Bacillus aquimaris</i>	HW 0,01%		99	+		
N3	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	HW 0,01%		99			
C21a	<i>Bacillus simplex</i>	HW 0,01%		99			
M7	<i>Bacillus simplex</i>	HW 0,01%		99			
gtI25	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	M4		99			
G4	<i>Bacillus aquimaris</i>	M4		99			

Fortsetzung Anhang 3: Übersichtstabelle über die isolierten Bakterien. +: positiv, n.b.: nicht bestimmt, gt: getrocknet.

Isolat	nächster Verwandter (16S rDNA)	Isolierungs- medium	Bioaktivität	Similarität (%)	NRPS	PKS I	PKS II
D32	<i>Bacillus licheniformis</i>	M4		99	+		
gtI12a1	<i>Bacillus aquimaris</i>	TM	n.b.	99			
gtP3	<i>Bacillus licheniformis</i>	GYM30		99	+		
gtB22	<i>Bacillus marisflavi</i>	GYM30	n.b.	99			
gtD1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	GYM30	n.b.	99			
gtT9	<i>Bacillus firmus</i>	GYM30	n.b.	98	+		
G8	<i>Bacillus pumilus</i>	GYM30	n.b.	99			
C22	<i>Bacillus simplex</i>	HW 0,01%		99			
H21a	<i>Bacillus megaterium</i>	HW 0,01%		100	+		
gtO2	<i>Bacillus aerophilus</i>	HW 0,01%		99			
H14	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	HW 0,01%		99			
gtH26	<i>Bacillus humi</i>	HW 0,01%	n.b.	98			
I8	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	HW 0,01%	n.b.	100			
J3	<i>Paracoccus haeundaensis</i>	HW 0,01%	n.b.	99	+		
gtB26	<i>Kocuria himachalensis</i>	M4	n.b.	98	+		
gtI23	<i>Bacillus aquimaris</i>	M4		99			
gtB2	<i>Bacillus aquimaris</i>	HW 0,01%	n.b.	99			
C20	<i>Hoeflea marina</i>	HW 0,01%	n.b.	99			
gtC4a	<i>Bacillus simplex</i>	HW 0,01%	n.b.	99			
gtC4b	<i>Bacillus indicus</i>	HW 0,01%	n.b.	99			
D26	<i>Bacillus boroniphilus</i>	HW 0,01%	n.b.	98			
D27	<i>Bacillus niabensis</i>	HW 0,01%	n.b.	99			
C18b	<i>Bacillus aquimaris</i>	HW 0,01%	n.b.	99			
C18a	<i>Bacillus aquimaris</i>	HW 0,01%	n.b.	99			
gtF18	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	M4		99			
C21b	<i>Bacillus simplex</i>	HW 0,01%	n.b.	99			
gtF20x1	<i>Bacillus simplex</i>	HW 0,01%	n.b.	99			
F4	<i>Bacillus firmus</i>	HW 0,01%	n.b.	98			
J4	<i>Paracoccus carotinifaciens</i>	HW 0,01%	n.b.	99			
U15	<i>Bacillus simplex</i>	SGCY		99		+	
Z8b	<i>Bacillus aerophilus</i>	SGCY		99			
Z11	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	SGCY	n.b.	99			
Z10	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	SGCY	+	99			
Z9	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	SGCY	+	99			
XX14a	<i>Bacillus licheniformis</i>	SGCY	+	99			
XX14b	<i>Salinibacterium amurskyense</i>	SGCY	+	100			
XX12	<i>Halomonas denitrificans</i>	SGCY		95			
XX11	<i>Maribacter sedimenticola</i>	SGCY	n.b.	99			
W9	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	SGCY		94	+	+	
Z12	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	SGCY	+	99			
W5a	<i>Bacillus licheniformis</i>	SGCY		99	+		
W14	<i>Paenibacillus lautus</i>	TSB		99	+		
W14a	<i>Bacillus aerophilus</i>	TSB	+	99	+		
X9	<i>Bacillus licheniformis</i>	TSB	+	99			
X3	<i>Bacillus licheniformis</i>	TSB		99			

Fortsetzung Anhang 3: Übersichtstabelle über die isolierten Bakterien. +: positiv, n.b.: nicht bestimmt, gt: getrocknet.

Isolat	nächster Verwandter (16S rDNA)	Isolierungsmedium	Bioaktivität	Similarität (%)	NRPS	PKS I	PKS II
U13	<i>Bacillus clausii</i>	TSB		99	+		
U1	<i>Bacillus simplex</i>	Hafermehl	+	99	+		
W25	<i>Streptomyces sampsonii</i>	Hafermehl	+	99	+		+
U6b	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	Hafermehl		99	+	+	
U6a	<i>Bacillus licheniformis</i>	Hafermehl		99	+		
X14b	<i>Bacillus licheniformis</i>	Hafermehl	+	99	+		
W26b	<i>Bacillus licheniformis</i>	Hafermehl		99			
W26a	<i>Bacillus aerophilus</i>	Hafermehl	n.b.	99			
Z2	<i>Bacillus aerophilus</i>	Hafermehl	n.b.	99			
Z4	<i>Shewanella colwelliana</i>	Hafermehl	n.b.	99			
Z5	<i>Microbacterium lacus</i>	Hafermehl	n.b.	98			
gtV3	<i>Bacillus vallismortis</i>	Hafermehl	+	99	+		
gtV4	<i>Bacillus licheniformis</i>	Hafermehl		99	+		
U2	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	Hafermehl	+	99	+		
U3	<i>Bacillus licheniformis</i>	Hafermehl		99	+		
U4	<i>Bacillus licheniformis</i>	Hafermehl	+	99	+		
U7	<i>Bacillus licheniformis</i>	CN	+	99			
V23	<i>Bacillus simplex</i>	CN	n.b.	99			
XX16	<i>Thalassospira lucentensis</i>	CN	+	98			
W19	<i>Bacillus aerophilus</i>	CN	+	99	+		+
U8	<i>Bacillus licheniformis</i>	CN	+	99			
Z14	<i>Microbulbifer thermotolerans</i>	CN	n.b.	99	+		
W16	<i>Streptomyces sampsonii</i>	CN	+	99	+		
W18	<i>Streptomyces sampsonii</i>	Hafermehl	+	99	+		
gtV2	<i>Bacillus megaterium</i>	Hafermehl		99			
W23	<i>Bacillus licheniformis</i>	Hafermehl	+	99			
U6	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	Hafermehl		99	+		
W26b-1	<i>Bacillus aerophilus</i>	Hafermehl		99	+		+
Z1	<i>Microbacterium lacus</i>	Hafermehl	n.b.	98			
W25a	<i>Streptomyces sampsonii</i>	Hafermehl	+	99	+	+	+
W26a-1	<i>Bacillus licheniformis</i>	Hafermehl		99			
U5b	<i>Bacillus licheniformis</i>	Hafermehl		99	+		
X12	<i>Shewanella colwelliana</i>	TSB	+	99			
V18	<i>Bacillus licheniformis</i>	TSB		99	+		
X20	<i>Bacillus licheniformis</i>	TSB	+	99			
gtV21	<i>Bacillus licheniformis</i>	TSB		99	+		
XX8	<i>Paenibacillus lautus</i>	TSB	n.b.	99			
W11	<i>Bacillus pumilus</i>	TSB	+	99	+		
XX3	<i>Vibrio ponticus</i>	SGCY		97			
W10	<i>Bacillus vallismortis</i>	SGCY	+	99	+		
gtV17	<i>Bacillus simplex</i>	SGCY		99			
W4	<i>Bacillus aerophilus</i>	SGCY	+	99	+		
W1	<i>Halomonas denitrificans</i>	SGCY	+	95	+		
U20	<i>Bacillus licheniformis</i>	SGCY		99	+		
XX9	<i>Bacillus cereus</i>	SGCY	+	99			
V12	<i>Sphingomonas panni</i>	SGCY		98	+	+	+
XX15	<i>Rhodobacter ovatus</i>	SGCY	+	96			

Fortsetzung Anhang 3: Übersichtstabelle über die isolierten Bakterien. +: positiv, n.b.: nicht bestimmt, gt: getrocknet.

Isolat	nächster Verwandter (16S rDNA)	Isolierungs- medium	Bioaktivität	Similarität (%)	NRPS	PKS I	PKS II
V7	<i>Salinicoccus halodurans</i>	SGCY		97	+		
W17	<i>Halomonas denitrificans</i>	SGCY		95	+	+	+
XX10	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	SGCY		99			
W2	<i>Bacillus licheniformis</i>	SGCY		99	+		
X14a	<i>Bacillus licheniformis</i>	Hafermehl	+	99	+		
X23	<i>Streptomyces sampsonii</i>	CN	+	99	+		
X19	<i>Bacillus licheniformis</i>	TSB		99		+	
X21	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	TSB	n.b.	99			
gtU17	<i>Bacillus licheniformis</i>	TSB	+	99	+		
X17	<i>Bacillus licheniformis</i>	TSB		99			
gtU19	<i>Bacillus simplex</i>	Hafermehl	+	100			
gtU20	<i>Bacillus licheniformis</i>	Hafermehl	+	100	+		
U5a	<i>Bacillus licheniformis</i>	Hafermehl		99			
W26c	<i>Bacillus aerophilus</i>	Hafermehl		99			
X11	<i>Bacillus licheniformis</i>	Hafermehl	+	99			
XX13	<i>Cobetia marina</i>	SGCY	+	100	+		
V11	<i>Bacillus licheniformis</i>	SGCY		99	+		
Z13	<i>Bacillus licheniformis</i>	SGCY	+	99	+		
V10	<i>Bacillus licheniformis</i>	SGCY	n.b.	99			
W6	<i>Hyphomonas jannaschiana</i>	SGCY	n.b.	97		+	+
W8	<i>Bacillus pumilus</i>	SGCY		99			

Publikationsliste

Teile dieser Arbeit wurden bereits in Publikationen veröffentlicht:

Longjiang Fan, Shiping Bo, Huan Chen, Wanzhi Ye, **Katrin Kleinschmidt**, Heike I. Baumann, Johannes F. Imhoff, Michael Kleine and Daguang Cai
Genome Sequence of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* gtP20b, Isolated from the Indian Ocean. **Journal of Bacteriology** (2011), 193(5):1276-1277. doi: 10.1128/JB.01351-10.

Longjiang Fan, Yun Liu, Zefeng Li, Heike I. Baumann, **Katrin Kleinschmidt**, Wanzhi Ye, Johannes F. Imhoff, Michael Kleine, and Daguang Cai
Draft Genome Sequence of the Marine *Streptomyces* sp. Strain PP-C42, Isolated from the Baltic Sea. **Journal of Bacteriology** (2011), Vol. 193 (14): 3691-3692. doi:10.1128/JB.05097-11

Baumann H.I., Pešić A., **Kleinschmidt K.**, Ensle P., Schmieder P., Süßmuth R. D., Imhoff J.F.

A cyclic octapeptid from *Streptomyces*..... (in Bearbeitung)

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und dass sie nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist. Sie wurde weder im Ganzen noch zum Teil einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt und entstand unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der deutschen Forschungsgemeinschaft.

Kiel, den .6.2012