



**This is a pre- or post-print of an article published in
Abraham, W.-R.**

**Microbial ecology: Stable isotopes allow insights into
microbial communities [Mikrobielle Ökologie: Stabile
Isotope erlauben Einblicke in Bakteriengemeinschaften]
(2013) BioSpektrum, 19 (5), pp. 505-507.**

Wer macht was? Stabile Isotope erlauben Einblicke in Bakteriengemeinschaften

Wolf-Rainer Abraham

Arbeitsgruppe Chemische Mikrobiologie, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig

Metabolic interactions in communities allow bacteria to influence our daily life. Controlling these communities requires knowledge of their metabolic interactions. Feeding microbial communities with substrates labeled with stable isotopes and analysis of their enriched biomolecules by isotope ratio mass spectrometry is a powerful method for unraveling the dynamics of metabolic community interactions. Biomarkers but also cell sorting has been used to discern between bacterial members.

Mikroorganismen sind allgegenwärtig und haben mit ihren Aktivitäten großen Einfluss auf unser Leben. Mikroorganismen wirken sich vielfältig – positiv und negativ – auf die Menschheit aus: Sie sind beispielsweise für die Mehrzahl der Krankheiten und Todesfälle verantwortlich, tragen andererseits entscheidend dazu bei, organische Abfallstoffe abzubauen oder unsere Nahrung im Darm aufzuschließen. Um von den positiven Aspekten der Mikroorganismen stärker profitieren zu können und die negativen Auswirkungen zurückzudrängen, müssen wir verstehen, wie sie leben und wie ihre Tätigkeiten gesteuert werden.

Die klassische Mikrobiologie untersucht Reinkulturen unter Laborbedingungen. In der Natur jedoch existieren Mikroorganismen in komplizierten, dynamischen Lebensgemeinschaften. Deren Mitglieder nutzen auf komplexen Wegen gemeinsam die verfügbaren Ressourcen. Diese Wechselwirkungen mit anderen Lebewesen und der Umwelt bestimmen die Aktivität einer Lebensgemeinschaft. Allgemeine Erkenntnisse über solche Interaktionen besitzen wir bisher nur sehr wenig.

Stabile Isotope als Marker

Um Stoffwechselfvorgänge zu verfolgen, setzt man deren Ausgangsstoffe markiert den Zellen zu und untersucht die entstehenden Metabolite. Während man in der Vergangenheit dazu meist instabile, also radioaktive, Isotopen verwendete und dann deren Zerfall in den Metaboliten bestimmte, geht man seit einigen Jahren zunehmend zu stabilen, nicht-radioaktiven Isotopen über, wobei hier nur der Kohlenstoff diskutiert wird.

Stabile Isotope biologisch wichtiger Elemente

Wasserstoff	99,99% ¹ H	0,01% ² H		
Kohlenstoff	98,9% ¹² C	1,1% ¹³ C		
Stickstoff	99,6% ¹⁴ N	0,4% ¹⁵ N		
Sauerstoff	99,76% ¹⁶ O	0,04% ¹⁷ O	0,2% ¹⁸ O	
Schwefel	95,06% ³² S	0,74% ³³ S	4,18% ³⁴ S	0,02% ³⁵ S
Natrium	100% ²³ Na			
Phosphor	100% ³¹ P			

Der Umgang mit stabilen Isotopen ist gefahrlos und erfordert keine zusätzlichen Sicherheitsvorkehrungen; der Nachweis muss auf massenspektroskopischem Wege erfolgen. In einigen Arbeiten werden für die Quantifizierung des Einbaus gängige Massenspektrometer verwendet, meist in Kombination mit vorgeschalteten Gas-Chromatographen (GC). Solche Geräte sind recht preiswert und in vielen Laboren ohnehin vorhanden, können aber nur Einbauraten von über 0,5 Atomprozent reproduzierbar detektieren. Sensitiver sind spezielle Isotopen-Massenspektrometer (isotope ratio mass spectrometer, IRMS). Die zu untersuchenden Substanzen werden zuvor durch einen Katalysator oxidiert, die gebildeten Verbindungen Wasser, Kohlendioxid oder Stickstoff dann im IRMS vermessen. Die zu erreichenden Empfindlichkeiten sind beeindruckend und können je nach Verfahren und Geräten durchaus drei Größenordnungen unter denen von Standard-Massenspektrometern liegen.

Als Notation hat sich die δ -Notation durchgesetzt, die definiert ist als

$$\delta [\text{‰}] = ((R_{\text{Probe}}/R_{\text{PDB}}) - 1) * 10^3$$

wobei R_{Probe} und R_{PDB} die ¹³C/¹²C-Isotopenverhältnisse der Probe bzw. des internationalen Standards PeeDee Belemnite sind. Als Faustregel kann gelten, dass $\delta^{13}\text{C} = 1000\text{‰}$ etwa 1 Atomprozent entspricht.

(Bio-)Marker zur Unterscheidung der Taxa

Mit dem oben beschriebenen Ansatz lassen sich eine Fülle von kinetischen Studien durchführen, und die erreichte Empfindlichkeit reicht oft aus, um sogar Isotopendiskriminierungen einzelner Enzymschritte zu beobachten [1]. Um solche Untersuchungen bei mikrobiellen Gemeinschaften durchzuführen, ist eine Unterscheidung der einzelnen Mitglieder in der Gemeinschaft nötig. Dazu nutzt man meist Biomarker, Stoffe also, die für bestimmte Organismen charakteristisch sind. Die wohl bekanntesten bakteriellen Biomarker sind Fettsäuren, die man auch in der bakteriellen Systematik verwendet. Nach unseren Erfahrungen muss hier oft auf Kombinationen mehrerer Fettsäuren zurückgreifen, um eindeutige Aussagen zu bekommen [2]. Ein idealer Biomarker wären sicher die ribosomalen Ribonukleinsäuren (rRNAs), leider aber ist hier der Einbau zumindest von Kohlenstoff sehr langsam.

Sortieren der Zellen und Isotopenanalyse eröffnen neue Möglichkeiten

Statt die verschiedenen Zellen über deren Biomarker zu unterscheiden, kann man sie auch sortieren. Mit den großen technischen Verbesserungen bei der Fluoreszenz-aktivierten Sortierung von Zellen (FACS) lassen sich vielfältige Methoden der spezifischen Zellmarkierung mit der Analyse im IRMS kombinieren. So kann man fluoreszierende Bakterienstämme einsetzen oder einzelne Stämme mit spezifischen Antikörpern farbmarkieren und dann aus den Gemeinschaften sortieren (Abb. 1). Dies soll hier am Beispiel eines Konsortiums gezeigt werden, das aus vier Bakterienstämmen besteht und 4-Chlorsalizylsäure als Substrat nutzt. In dieser Gemeinschaft ist lediglich *Pseudomonas reinekei* MT1 in der Lage, das Substrat anzugreifen, stirbt aber rasch an seinem eigenen toxischen Zwischenprodukt 4-Chlor-Catechol. Die anderen Stämme entgiften diesen Metaboliten und erlauben so das Überleben der Gemeinschaft. Um Einblick in die Kinetik zu bekommen, haben wir der Gemeinschaft eine geringe Menge von [U-¹³C]-4-Chlor-Catechol zugesetzt. Nach sechs Stunden wurden die beiden Hauptvertreter, *P. reinekei* MT1 und *Achromobacter spanius* MT3, mit spezifischen monoklonalen Antikörpern markiert und diese wiederum mit einem sekundären Antikörper farbmarkiert. Zudem wurde die DNA der Zellen des Konsortiums gefärbt. Die so gefärbten Zellen wurden dann im FACS sortiert und die MT1- und MT3-Zellen jeweils gesammelt. Etwa eine Million sortierter Bakterienzellen reichen aus, um genügende Menge an Fettsäuren für die Analyse im IRMS zu isolieren. Diese Fettsäuren werden anschließend für die Trennung im GC verestert, um sie verdampfen zu können; das fügt aber zusätzlichen Kohlenstoff ein, der nicht aus dem Einbau stammt. Der gemessene Isotopenwert muss also um den der Estergruppe korrigiert werden. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen (Abb. 2), dass der Stamm MT3 einen stabilisierenden Einfluss auf das 4-Chlorsalizylsäure verwertende Konsortium hat, weil er bevorzugt den Metaboliten 4-Chlor-Catechol abbaut, der sonst den 4-Chlor-Salizylat-Abbauer MT1 vergiften würde.

Kinetik der Stoffwechselforgänge in Gemeinschaften

Mit dem hier geschilderten Verfahren kann man die Unterschiede des Einbaus in verschiedene Mitglieder des Konsortiums bestimmen. Dies ist jedoch nur eine Momentaufnahme. Um Kinetiken zu berechnen, bedarf es der Probenahme zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Zugabe des markierten Substrates. Die zu verschiedenen Zeitpunkten erhaltenen Einbaudaten können dann in kinetischen Modellen verwendet werden (Abb. 2) [3]. Reproduzieren, Sortieren, Derivatisieren und Vermessen der Proben erfordern schnelle FACS und hochempfindliche Isotopen-Massenspektrometer, um den Zeitaufwand in Grenzen zu halten.

Weitere Anwendungen

Die Methode ist keineswegs auf Fettsäuren beschränkt. So sind Proteine über ihre derivatisierten Aminosäuren oder Nukleinsäuren ebenso zugänglich wie ganze Zellen oder Gewebeproben, die durch

Verbrennung im Elementar-Analysator (EA) für das IRMS aufgeschlossen werden. Es lassen sich so beispielsweise auch Umsetzungen im Boden oder Wechselwirkungen in Wirts-Pathogen-Gemeinschaften quantifizieren. Wegen der Unbedenklichkeit der stabilen Isotope ist auch ein Einsatz bei Patienten möglich.

Danksagung

Danke an Esther Surges für Messungen der Isotopenwerte und das Bundesministerium für Bildung und Forschung sowie die Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung mehrerer Forschungsprojekte.

Bildlegenden

Abb. 1: Verschiedene Aufarbeitungen mikrobieller Gemeinschaften und Analyse von Biomolekülen im Isotopen-Massenspektrometer. Zellen werden entweder an spezifische, immobilisierte Antikörper gebunden (immunocapture) oder mit diesen farbmarkiert und dann im Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierer (FACS) sortiert. Sie werden dann im Elementaranalysator (EA) verbrannt oder aber aus den so aufgetrennten Zellen werden Fettsäuren oder Aminosäuren extrahiert, im Gas-Chromatographen (GC) getrennt und im IRMS analysiert. Im IRMS wird CO₂ mit den Molmassen 44 (¹²C¹⁶O¹⁶O), 45 (¹³C¹⁶O¹⁶O) und 46 (¹³C¹⁷O¹⁶O) gesammelt und daraus das Isotopenverhältnis ¹³C/¹²C berechnet.

Abb. 2: Einbaukinetik von [U-¹³C]-4-Chlorcatechol in die Stearinsäure zweier Stämmen eines mikrobiellen Konsortiums. Die Affinität des Stammes MT3 zum toxischen Substrat ist etwa dreimal größer, was seinen stabilisierenden Einfluss auf die Gemeinschaft erklärt.

Literatur

[1] Abraham W-R, Hesse C (2003) Isotope fractionations in the biosynthesis of cell compounds by different fungi: A basis for environmental carbon flux studies. FEMS Microb Ecol 46:121-128

[2] Tillmann S, Strömpl C, Timmis KN et al. (2005) Stable isotope probing reveals the dominant role of *Burkholderia* sp. in aerobic degradation of PCBs. FEMS Microb Ecol 52:207-217

[3] Pawelczyk S, Bumann D, Abraham W-R (2011) Kinetics of carbon sharing in a bacterial consortium revealed by combining stable isotope probing with fluorescence-activated cell sorting. J Appl Microbiol 110:1065-1073

Korrespondenzadresse:

Dr. Wolf-Rainer Abraham

Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung mbH

Arbeitsgruppe Chemische Mikrobiologie

Inhoffenstrasse 7

D-38124 Braunschweig

Tel. 0531-6181-4300

Fax: 0531-6181-4699

Wolf-rainer.abraham@helmholtz-hzi.de

Autor

Wolf-Rainer Abraham

1972-1976 Chemiestudium und 1979 Promotion an der Technischen Universität Berlin (bei Prof. F. Bohlmann/ über Pflanzeninhaltsstoffe. Seit 1980 am heutigen Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, dort Leiter der Arbeitsgruppe Chemische Mikrobiologie. Sein Forschungsfeld ist die mikrobielle Ökologie von Biofilm-Gemeinschaften, insbesondere im Zusammenhang mit infektiösen Prozessen beim Menschen.

Abbildung 1:

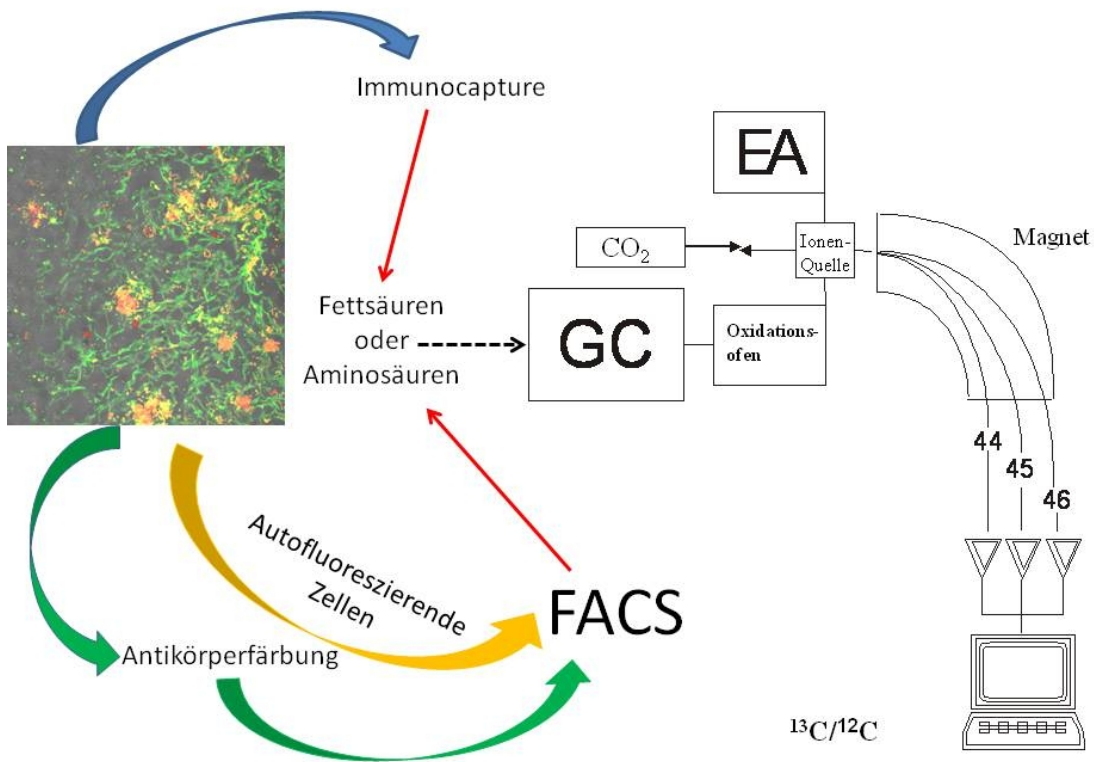


Abbildung 2:

