

Bakterielle Duftstoffe

Dufte(nde) Rhizobakterien – Flüchtige Bekanntschaften im Untergrund

MARCO KAI, BIRGIT PIECHULLA
INSTITUT FÜR BIOWISSENSCHAFTEN, UNIVERSITÄT ROSTOCK

Mikrobiologen kennen den charakteristischen Duft von *Escherichia coli* (Indol) und *Clostridium acetobutylicum* (Buttersäure). Noch vielfältiger als bisher an- und wahrgenommen geben Bakterien ihre typischen „Duftnoten“ ab und beeinflussen das Wachstum verschiedener Pilze.

Bacteria produce a wealth of volatiles which effect the growth of various fungi and *Arabidopsis thaliana*.

Die bakterielle Produktion von Duftstoffen ist seit langem bekannt. Diese Fähigkeit der Bakterien führt zu den speziellen Aromen von Lebensmitteln wie Käse und anderen Milchprodukten oder Sauerkraut. Auch der abstoßende Geruch von verrottendem Material wird häufig durch Bakterien hervorgerufen. Typisch für *Streptomyces*-Spezies ist der erdige Geruch, der auf der Synthese und Ausscheidung von Geosmin (eines bizyklischen Alkohols) beruht. Doch das Duft-Potenzial von Bakterien geht weit über das hinaus, was unsere Nase wahrnehmen kann. Während die Aromen und Düfte von lebensmittelbildenden Bakterien oder auf Fleisch vorkommenden Bakterien recht gut untersucht sind, ist die generelle Kapazität der Duftstoffbildung von

Bakterien im Allgemeinen kaum bekannt. Neuere Befunde zeigen, dass auch an Pflanzenwurzeln vergesellschaftet lebende Bakterien (Rhizobakterien) eine Vielzahl organischer flüchtiger Verbindungen ausscheiden^[1].

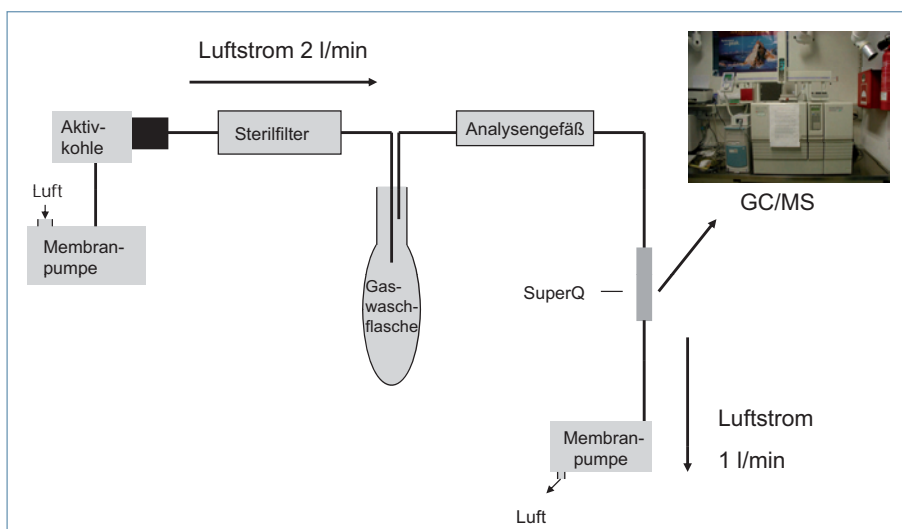
Flüchtige Metabolite (*volatile organic compounds*, VOCs) sind Substanzen, die sich durch eine molekulare Masse unter 300 D und einen hohen Dampfdruck auszeichnen und somit leicht in die Gasphase übergehen. Mit speziell ausgearbeiteten Headspace-Systemen können die VOCs der Rhizobakterien (*Serratia odorifera*, *S. plymuthica*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. trivialis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *S. rhizophila*, *Bacillus subtilis*) gesammelt und über ein Adsorbens (Aktivkohle, Tenax, SuperQ o. Ä.) geleitet und dort

gebunden werden (Abb. 1). Die VOCs werden durch Dichlormethan oder Hexan von der Matrix eluiert und im Gaschromatografen mit Massenspektrometer (GC/MS) analysiert. Die Komplexität der GC-Profile (Abb. 2) variiert je nach Bakterienart, Wachstumsphase und Kulturbedingungen. Meist produzieren Bakterien auf Flüssigmedium mehr Duftstoffe als auf Festmedium. In den Duftmustern verwandter Bakterien-Spezies treten gleiche flüchtige, aber auch Spezies-spezifische Metabolite auf. Die massenspektroskopische Analyse der bakteriellen Duftsubstanzen und der Vergleich mit allgemein verwendeten MS-Bibliotheken (z. B. NIST 147) identifizierte einige Substanzen. *Pseudomonas fluorescens* emittiert beispielsweise Dimethyltrisulfid, ein Nonen, ein Undecadien, ein Undecen, β -Phenylethanol, Phenylacetone, Pentadecen und mindestens zehn unbekannte Substanzen. *Stenotrophomonas maltophilia* gibt Dimethylpyrazin, 4-Thiopentanol-1-ol, verschiedene Alkylpyrazine, β -Phenylethanol, Citronellol, o-Aminoacetophenon und mehr als 40 unbekannte Substanzen ab. Somit sind Bakterien eine reiche Quelle für neue flüchtige Metabolite. Sehr komplexe Duft-Bouquets besitzen beispielsweise *Streptomyces*-Spezies und *Myxococcus xanthus*^[3, 4]. Es handelt sich um komplizierte Strukturen wie aromatische, stickstoffhaltige oder schwefelhaltige azyklische und zyklische Verbindungen und Terpenoide, aber auch strukturell einfachere Kohlenwasserstoffe (Alkane, Alkene, Ketone, Alkohole, Ester) und Fettsäurederivate.

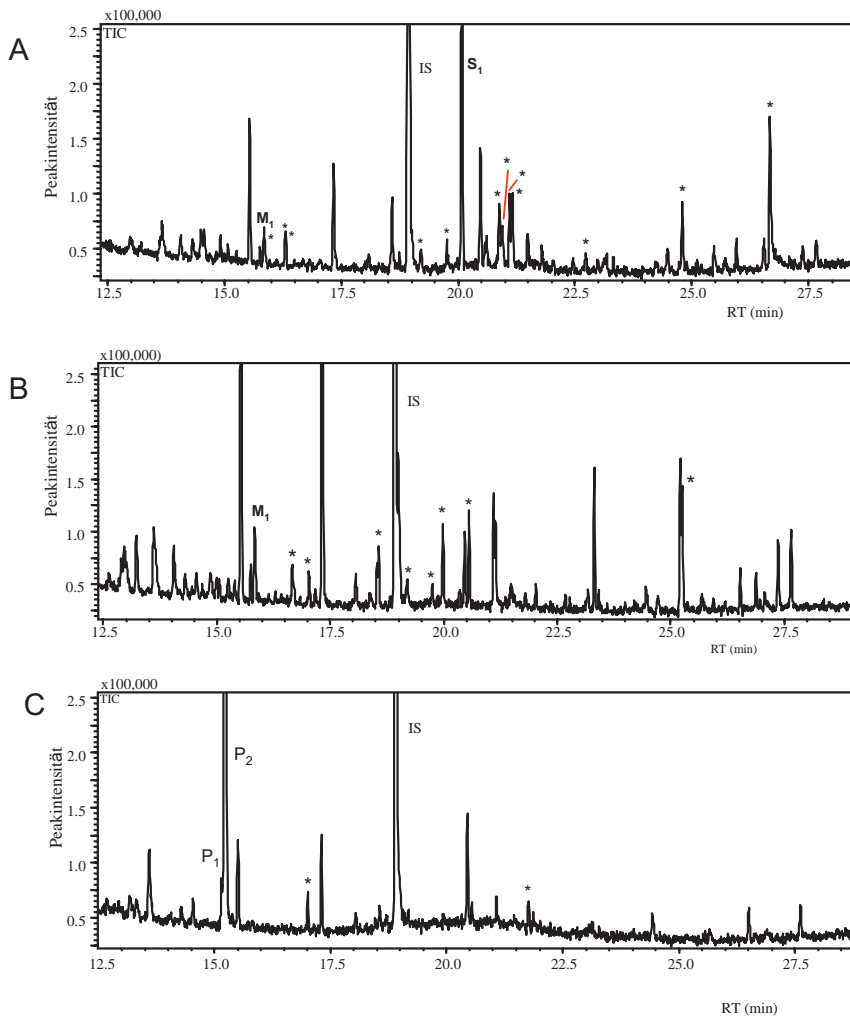
Biologische Funktion von Duftstoffen

VOCs sind besonders geeignete Informationsüberträger, weil sie über größere Distanzen und in extrem geringen Mengen als Einzelsubstanz oder in spezifischen Kombinationen in der Luft und im Boden wirken können. Bei Pflanzen und Tieren dienen flüchtige Metabolite der inter- und intraspezifischen Kommunikation. Mit welchen Organismen „kommunizieren“ aber Rhizobakterien?

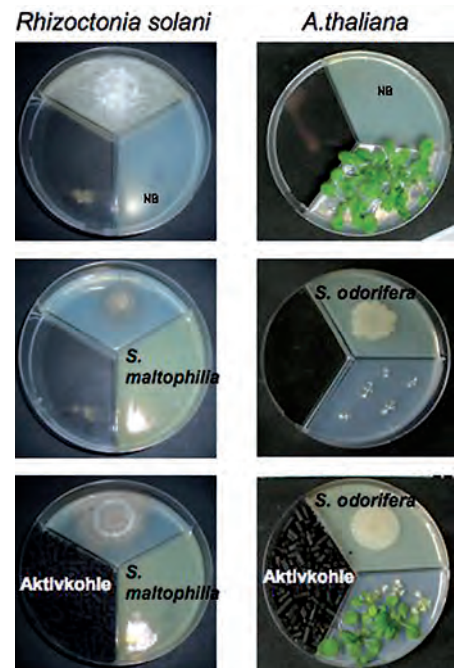
Die Grenzschicht zwischen der Wurzeloberfläche und den wurzelnahen Bodenpartikeln ist von besonderer Bedeutung für das



▲ Abb. 1: Versuchsaufbau. Im offenen Headspace-System werden flüchtige Metabolite von Bakterien gesammelt und nach gaschromatografischer Trennung im Massenspektrometer identifiziert.



▲ **Abb. 2:** GC-Profile. Flüchtige Metabolite (*) von: **A,** *Serratia plymuthica*. **B,** *Stenotrophomonas rhizophila*. **C,** *Pseudomonas fluorescens*. Im Vergleich mit MS-Bibliotheken konnten folgende Substanzen identifiziert werden: M1: β -Phenylethanol, S1: dominante unbekannte Substanz von *Serratia*, P1: Undecadien, P2: Undecen, (IS: Interner Standard).



▲ **Abb. 3:** Ko-Kultivierung. Links: *Rhizoctonia solani* (oben), *R. solani* und *Stenotrophomonas maltophilia* (Mitte), *R. solani*, *S. maltophilia* und Aktivkohle (unten). Rechts: *Arabidopsis thaliana* (oben), *A. thaliana* und *Serratia odorifera* (Mitte), *A. thaliana*, *S. odorifera* und Aktivkohle (unten), NB: Nährbouillon-Agar.

Pflanzenwachstum. In dieser ökologischen Nische, der Rhizosphäre, leben und interagieren verschiedene Organismen wie Pilze, Nematoden, Ziliaten, Amöben, Viren und (Rhizo-)Bakterien. Dabei beeinflussen sich die Organismen gegenseitig sowohl positiv als auch negativ. Pflanzen beispielsweise können bis zu 40 Prozent ihrer Photoassimilate in Form von Exsudaten abgeben, die wiederum insbesondere Rhizobakterien und Pilzen als Kohlenstoffquelle zur Verfügung stehen, sodass sich große Populationen von Mikroorganismen ansiedeln können. Im Kampf um die C-Quelle versuchen die Organismen, die Konkurrenten in Schach zu halten. Dies erreichen sie durch Ausschüttung von lytischen Enzymen und/oder wachstumshemmenden Substanzen. Die Gruppe der antibiotisch wirkenden Naturstoffe muss nach neuen Erkenntnissen um flüchtige Metabolite erweitert werden.

Zum Funktionsnachweis werden Bakterien und Pilze in getrennten Kompartimenten der Petrischale gemeinsam inkubiert, sodass nur flüchtige Substanzen zwischen den Kompartimenten diffundieren können (**Abb. 3**). Rhizobakterien hemmen die meisten der getesteten Bodenpilze massiv in ihrem Mycelwachstum, darunter phytopathogene Pilze wie *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae* und *Sclerotinia sclerotiorum* (**Tab. 1**). Aktivkohle in einem dritten Kompartiment fängt

Tab. 1: Duftstoffe von Bakterien hemmen das Wachstum von Pilzen

| Rhizobacteria | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | <i>Serratia plymuthica</i> | <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> |
|---------------------------------|--------------------------|--------------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| Fungi | B2g | L 13-6-12 | HRO-C48 | P69 |
| <i>Aspergillus niger</i> | - | - | - | + |
| <i>Fusarium solani</i> | - | - | - | - |
| <i>Microdochium bolleyi</i> | ++ | + | ++ | ++ |
| <i>Neurospora crassa</i> | + | + | + | + |
| <i>Paecilomyces carneus</i> | ++ | ++ | ++ | ++ |
| <i>Penicillium waksmanii</i> | ++ | + | ++ | ++ |
| <i>Phoma eupyrena</i> | ++ | + | ++ | ++ |
| <i>Rhizoctonia solani</i> | + | + | + | + |
| <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> | ++ | ++ | ++ | ++ |
| <i>Trichoderma strictipile</i> | ++ | + | ++ | ++ |
| <i>Verticillium dahliae</i> | + | + | + | ++ |

- geringe Förderung des Mycelwachstums, + Inhibition des Mycelwachstums < 50 %, ++ Inhibition des Mycelwachstums > 50 %

die VOCs ab, sodass das Pilzwachstum hier deutlich weniger inhibiert wird. Die Mycelien von *Aspergillus niger* und *Fusarium solani* entwickeln sich allerdings mit und ohne Rhizobakterien-Co-Kultivierung gleich gut; sie sind möglicherweise gegen die Wirkung der VOCs resistent. Unterschiedlich reagieren auch Pflanzen auf die bakteriellen VOCs: Während die rhizobakteriellen VOC-Gemische in den meisten Fällen für die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* in kurzer Zeit sogar tödlich sind^[5], zeigten Ryu et al.^[6], dass von *Bacillus subtilis* ausgeschiedenes Acetoin und 2,3-Butandiol eine deutliche Auxin-vermittelte Wachstumsförderung hervorruft und systemische Resistenzmechanismen aktiviert.

Flüchtige Metabolite haben dramatische Auswirkungen auf Organismen und beeinflussen das Leben in einer ökologischen Gemeinschaft deutlich. Besonders starke Auswirkungen auf Bodenpilze verursachen die Rhizobakterien *Serratia odorifera*, *Serratia plymuthica*, *Stenotrophomonas maltophilia* und *Stenotrophomonas rhizophila*, während *Pseudomonas*-Spezies kaum hemmen. *A. thaliana* exprimiert in ihren Wurzeln eine Terpensynthase (1,8-Cineolsynthase) und kann somit ebenfalls flüchtige Sekundärmetabolite synthetisieren. Sesquiterpen-Lactone wurden in Wurzel-Exsudaten verschiedener Nutzpflanzen gefunden und können unter anderem die Hyphen-Verästelung von mykorrhizierenden Pilzen fördern. Emittiertes (E)- β -Caryophyllen aus Maiswurzeln lockt Nematoden an. Diese Hinweise machen deutlich, dass auch im Boden flüchtige Metabolite auftreten und bisher kaum beachtete Wirkungen ausüben. Künftiges Ziel ist es, die Komponenten der VOC-Gemische der Rhizobakterien (und anderer Bakterien) zu identifizieren, um die biologisch relevanten Schlüsselkomponenten (oder Gemische) und deren Wirkmengen zu bestimmen.

Eine weitere Herausforderung ist die Entschlüsselung der Wirkmechanismen in den „Empfänger“-Organismen.

Die wachstumshemmenden Effekte rhizobakterieller VOCs auf phytopathogene Pilze, die für ökonomisch relevante Pflanzenkrankheiten verantwortlich sind, könnten für die Landwirtschaft von Interesse sein, etwa zur Nutzung als biologische Kontrollorganismen. Einige der untersuchten Pilze (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*) rufen auch Krankheiten beim Menschen hervor (opportunistische Infektionen, Mykosen, allergische Reaktionen). Daher sind auch medizinische Anwendungen für (rhizo-)bakterielle flüchtige Metabolite denkbar. ■

Literatur

- [1] Kai, M., Effmert, U., Berg, G., Piechulla B. (2006): Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Arch. Microbiol.* 187: 351–360.
- [2] Stotzky, G., Schenk, S. (1976): Volatile organic compounds and microorganisms. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 4: 333–382.
- [3] Schöller, C. E. G., Gürtler, H., Pedersen, R., Molin, S., Wilkins K. (2002): Volatile metabolites from Actinomyces. *J. Agric. Food Chem.* 50: 2615–2621.
- [4] Schulz, S., Dickschat, J. S. (2007): Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Nat. Prod. Rep.* 24: 814–842.
- [5] Vespermann, A., Kai, M., Piechulla, B. (2007): Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5639–5641.
- [6] Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Wie, H. X., Pare, P. W., Kloepper, J. W. (2003): Bacterial volatiles promote growth of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 4927–4932.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Birgit Piechulla
 Institut für Biowissenschaften
 Abteilung Biochemie
 Leiterin des Studienbüros Biologie
 Universität Rostock
 Albert-Einstein-Str. 3
 D-18059 Rostock
 Tel: 0381-498-6130
 Fax: 0381-498-6132
 birgit.piechulla@uni-rostock.de
 www.biologie.uni-rostock.de/biochemie/
 _BIOCH_Home.HTM

AUTOREN



Birgit Piechulla

Jahrgang 1956. 1975–1980 Biologiestudium Oldenburg/Göttingen. 1983 Promotion MPI für experimentelle Medizin und Universität Göttingen. 1984–1986 Postdoc University of California, Berkeley. 1992 Habilitation Universität Göttingen, Fach Biochemie. Seit 1996 C4-Professorin für Biochemie Universität Rostock, Co-Editorin *Plant Biology*.



Marco Kai

Jahrgang 1978. 2005 Diplom der Universität Rostock, Schwerpunktfächer Biochemie, Mikrobiologie, Immunbiologie und Biotechnologie. Seit 2005 Doktorand der Universität Rostock, Abteilung Biochemie.