



Makroskopische und mikroskopische Betrachtung der Motilität von *Pseudomonas putida* in Gelen

Bachelorarbeit

im Studiengang

Physik

Sönke Beier
Matrikelnummer: 790592

Betreuerin: Veronika Pfeifer
Erstbegutachter: Prof. Dr. Carsten Beta
Zweitbegutachter: Dr. Jürgen Reiche

Potsdam, 01.08.2021

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit selbstständig, ohne Hilfe Dritter und ohne Verwendung anderer als der angegebenen Quellen angefertigt habe. Diese Bachelorarbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen und wurde auch nicht veröffentlicht. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass eine Plagiatserkennungssoftware zur Überprüfung dieser Arbeit angewandt wird.

Die „Richtlinie zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis für Studierende an der Universität Potsdam (Plagiatsrichtlinie)“ habe ich zur Kenntnis genommen.

Potsdam, den 01.08.2021

Sönke Beier

Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich bei allen Menschen, die mich während meines Bachelorstudiums begleitet haben, bedanken. Ich habe in den letzten Jahren das Glück gehabt viele tolle Menschen im Studium kennenzulernen, mit denen ich die glücklichen Zeiten (nach den Klausuren) und die nicht so tollen Zeiten (kurz vor den Klausuren) zusammen verbringen konnte. Wir haben gemeinsam (mindestens) tausende Übungsaufgaben / Protokolle / Altklausuren durchgerechnet / bearbeitet, gemeinsam in unseren Gruppenräumen prokrastiniert, auf FSR Sitzungen diskutiert und tolle Momente am Zernsee erlebt. Ohne euch wäre ich nicht die Person, die ich heute bin und sicherlich hätte ich viele tolle Erinnerungen weniger.

Doch zum Ende hin steht dort eine Aufgabe, die man nicht wirklich gemeinsam bewältigen kann - die Bachelorarbeit. Zum Glück konnte ich diese in der offenen und sehr herzlichen Arbeitsgruppe der Biologischen Physik schreiben. Hier möchte ich mich zuerst bei meiner Betreuerin Veronika Pfeifer für die Einführung und Hilfe im Labor und die vielen Ratschläge bedanken. Mein Dank gilt auch Prof. Carsten Beta für die Gespräche zur Beprechung der Forschungsergebnisse und den Tipps für das weitere Vorgehen. Dankbar bin ich auch für die erhellenden Gespräche mit Robert Großmann über die Deutung der Ergebnisse (und Entschuldigung, dass doch nicht so viel Theorie in dieser Bachelorarbeit gelandet ist. Ich freue mich aber auf weitere Auswertungen).

Natürlich gab es in der Phase sehr viele Menschen, die mir beiseite standen, mich motiviert haben und mit mir über den aktuellen Stand bzw. aktuelle Problemen diskutiert haben. Hierfür möchte ich mich vor allem bei Lilly Zeberer, Kolja Klett, Milena Gottschalk, Hans Reimann, Kevin Meißner, Julian Stähle und meiner Familie bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Theoretischer Hintergrund	2
2.1 Gele	2
2.1.1 Allgemein	2
2.1.2 Agar und Agarose	3
2.1.3 Vergleich zu anderen porösen Medien	5
2.2 Fortbewegung einzelner Bakterien	5
2.2.1 Flagellenbewegung	6
2.2.2 Rotationsmotor der Flagellen	7
2.2.3 Verwendete Mutanten	8
2.2.4 Chemotaxis	9
2.2.5 Bewegungsmuster in porösen Medien	10
2.3 Ausbreitung von Zellkulturen in Agargel	12
3 Methodik	13
3.1 Verwendete Materialien	13
3.2 Herstellung der mit Agar gefüllten Kulturschalen	14
3.3 Makroskopische Untersuchung der Ausbreitung von Bakterienkolonien	15
3.3.1 Experimenteller Aufbau	15
3.3.2 Anpassungen des Versuchsaufbaus	18
3.4 Mikroskopische Untersuchung der Ausbreitung der Bakterienkolonien	20
3.5 Mikroskopische Untersuchung einzelner Trajektorien	20
3.5.1 Videoaufnahme	20
3.5.2 Das Analyseprogramm	22
3.5.2.1 Bakterien-Tracking	22
3.5.2.2 Eventerkennung	23
3.5.2.3 Analyse der Events und Runs	26
4 Experimentelle Ergebnisse	27
4.1 Ausbreitung von Bakterienkulturen	27
4.1.1 Makroskopische Beobachtung	27
4.1.2 Mikroskopische Betrachtung der Zellkulturausbreitung	30
4.2 Mikroskopische Beobachtungen einzelner Trajektorien	32
4.2.1 Mittlere quadratische Verschiebung	33
4.2.2 Winkeländerung	35
4.2.3 Dauer und Länge der Runphasen	36
4.2.4 Orientierung der Runphasen	37
4.2.5 Geschwindigkeit während der Runphasen	40
4.2.6 Eventdauer	41

5 Auswertung und Diskussion	43
5.1 Ausbreitung von Bakterienkolonien	43
5.2 Richtungsänderungen und Eventtypen	45
5.3 Mittlere quadratische Verschiebung	48
5.4 Runphasen	49
5.4.1 Geschwindigkeiten	49
5.4.2 Länge und Dauer	50
5.4.3 Orientierung	50
5.5 Eventdauer	50
6 Zusammenfassung und Fazit	52
Literatur	54
Anhang	60

1 Einleitung und Zielsetzung

Pseudomonas Putida ist ein Bakterium, an welchem aufgrund von vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten in der industriellen Biotechnologie geforscht wird. So ist es in der Lage, künstlich erzeugte Schadstoffe, wie Pestizide oder Toluol, abzubauen[1, 2, 3], wird bei der Biosynthese zur Erzeugung von biologischen Polymeren eingesetzt [1, 4, 5] und kann das Wachstum von beispielsweise Maispflanzen fördern [6].

Bisher wurde das Schwimmverhalten von *P. putida* meist in Flüssigkeiten untersucht (siehe [7, 8, 9, 10, 11]), in welchen sie sich mithilfe von Flagellen fortbewegen. Dabei wechseln sich geradlinige Schwimmphasen (auch Runphasen genannt) und Events, bei welchen sich das Bakterium nicht bewegt, ab.

In der Natur kommt *P. putida* vor allem im Erdboden vor [12, 13, 14] und kolonisiert hier Pflanzenwurzeln[15]. Auch das ursprüngliche Habitat des hier verwendeten *P. putida* Bakterienstamms KT2440 ist das Erdreich ([15] mit [16]).

Um das natürliche Fortbewegungsverhalten besser verstehen zu können, soll in dieser Arbeit die Schwimmotilität der Bakterien in einer erdähnlichen Umgebung untersucht werden. Bei Erde handelt es sich um Teilchen verschiedener Korngröße, welche „auch bei dichtester Lagerung den Raum nicht vollständig ausfüllen können“[17], da zwischen den Teilchen Zwischenräume (Poren) frei bleiben, in welchen sich Wasser ansammeln kann[17].

Als erdähnliches Material wird in dieser Arbeit Agargel verwendet, welches wie Erde aus einer Festkörpermatrix besteht, welche mit Wasser gefüllte Porenräume einschließt[18]. Im Gegensatz zu Erde ist dieses Agargel allerdings durchsichtig, sodass das Innere des Agargels unter dem Mikroskop betrachtet werden kann.

Ziel dieser Arbeit wird es sein, das Schwimmverhalten von *P. putida* mikroskopisch und makroskopisch zu untersuchen. Makroskopisch wird dabei die Ausbreitungsgeschwindigkeit einer *P. putida* Zellkultur in Agar beobachtet. Mikroskopisch wird dann der Fokus auf die Analyse der Trajektorien einzelner Bakterien gerichtet. Hierbei sollen Daten für zukünftige Arbeiten gesammelt werden, in welchen mithilfe der mikroskopischen Daten der Trajektorien mathematische Modelle für das Schwimmverhalten von *P. putida* entwickelt werden können. Die Ergebnisse dieser Modelle können dann mit den makroskopischen Daten abgeglichen werden.

Als Besonderheit werden in dieser Arbeit außerdem verschiedene Mutanten von *P. putida* untersucht, bei welchen Bestandteile des Flagellenmotors ausgeschaltet wurden. Die Ergebnisse sollen hierbei einen Rückschluss auf die Funktionsweise dieser ausgeschalteten Bestandteile ermöglichen.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Gele

Als Umgebung für die Bewegungen der untersuchten Bakterien wird in dieser Arbeit Gel verwendet. Um Gel von anderen ähnlichen Materialien oder viskosen Flüssigkeiten zu unterscheiden, werden im Folgenden die Eigenschaften und der Aufbau von Gelen geschildert.

2.1.1 Allgemein

Die rheologischen¹ Eigenschaften reichen je nach Art des Geles von viskosen Flüssigkeiten bis zu Festkörpern. Gele bestehen dabei aus einer netzartigen dreidimensionalen Struktur, in deren Hohlräumen sich Lösungsmittel befindet[18]. Die gelbildenden Partikel, aus welchen die netzartige Struktur aufgebaut ist, werden auch Geliermittel genannt. Geliermittel können unter anderem Biopolymere (wie Gelatine, Stärke, Naturkautschuk oder Agarose), Polymere oder Bentonite sein[18]. Je nach Art des Geliermittels, werden die Moleküle durch Hauptvalenzbindungen (ionische Bindungen, kovalente Bindungen), Nebenvalenzbindungen (Dipol-Dipol Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen oder Coulomb Kräfte) oder der Verschlaufung der Moleküle zusammengehalten[18, 21, 20]. Da die Bindungen bei Nebenvalenzgelen schwächer sind als bei Hauptvalenzgelen, können diese durch Temperaturerhöhung aufgebrochen werden[20].

Als Abgrenzung zu anderen Materialien mit ähnlichen makroskopischen Eigenschaften, wie Pasten (welche auch als Lösungen bzw. Suspensionen bezeichnet werden könnten), spricht man bei Gelen auch von kohärenten Systemen [21]. Bei diesen kohärenten Systemen hängen Geliermittel und Lösungsmittel zusammen und durchdringen sich gegenseitig (siehe Abb. 2.2) [21]. Im Gegensatz dazu sind bei den inkohärenten Systemen (siehe Abb. 2.1) die einzelnen Partikel nicht miteinander verbunden und von einem Medium umgeben [21].

¹Rheologie ist „das Teilgebiet der Physik, das sich mit den Erscheinungen, die beim Fließen und Verformen von Stoffen unter Einwirkung äußerer Kräfte auftreten, befasst“[19].

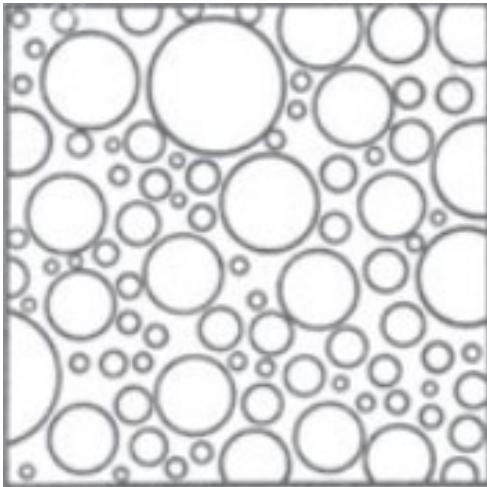


Abbildung 2.1: inkohärentes System - wie Pasten [21]



Abbildung 2.2: kohärentes System - wie Gele [21]

2.1.2 Agar und Agarose

In meinen Experimenten benutzte ich Agar- und Agarosegele in unterschiedlichen Konzentrationen. Es handelt sich hierbei um Biopolymere, welche in ihrem Gelnetzwerk eine große Menge von Wasser halten können, das sich innerhalb des Netzwerks frei bewegen kann [22]. Zusammen mit Wasser bilden die Biopolymere also ein Gel.

Agar wird aus bestimmten Rotalgen gewonnen, welche die Agarmoleküle in ihren Zellwänden herstellen[22]. Agar ist eine Mischung aus den beiden Polysacchariden Agarose und Agaropektin. Agarose bildet den größten Bestandteil mit 70% [23] und ist der Bestandteil des Agar, welcher durch Wasserstoffbrückenbindungen das Gelnetzwerk aufbaut [22]. Der andere Bestandteil, Agaropektin, alleine kann kein Gelnetzwerk aufbauen, hat aber möglicherweise einen unterstützenden Einfluss auf die Bildung des Gelnetzwerks[24]. Grundsätzlich sind die Eigenschaften von Agaropektin noch nicht gut erforscht, da Agaropektin nahezu keine praktischen Anwendungen hat [22]. Agarose hingegen wird vor allem bei der Gelelektrophorese zur Größenauf trennung von DNA benutzt und ist deshalb besser erforscht. Da das Gelnetzwerk nur durch die relativ schwachen Nebenvalenzbindungen zusammen gehalten wird, kann die Gelstruktur durch Hitze aufgelöst werden und bildet sich bei Abkühlen wieder aus. Die Schmelztemperatur liegt bei 85°C und die Geliertemperatur bei 38°C [22].

Abb. 2.3 zeigt die Struktur von Agar unter einem Rasterelektronenmikroskop.

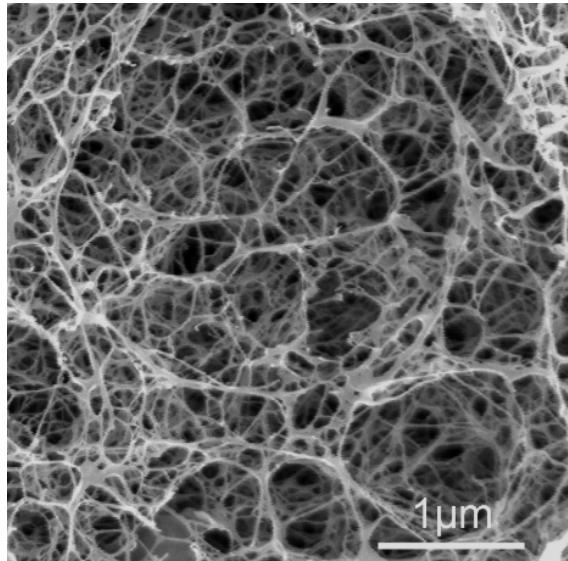


Abbildung 2.3: Bild von 1,5% (w/w) Agar unter Verwendung eines Kyro-Rasterelektronenmikroskop [25]

Da es sich bei Agar um ein Naturprodukt handelt, können die Eigenschaften des Agar, wie zum Beispiel die Gelierfähigkeit, bei unterschiedlichen Chargen variieren [26]. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit versucht auf die besser definierte Agarose umzusteigen, was aber letztendlich nicht gelang (siehe dazu Kapitel 3.3.2).

Auch die Datenlage zur Porengröße der Gele ist sehr gering, da bisher keine quantitativen experimentellen Messdaten zur Porengröße bei Konzentrationen um die verwendeten 0,25% bzw. 0,3% (w/w) Agar bzw. Agarose vorliegen. Ein Grund hierfür ist, dass bisher vor allem höhere Konzentrationen, bei welchen auch Gelelektrophorese möglich ist, im Fokus lagen. Zusätzlich ist das Agargel bei geringeren Konzentrationen auch sehr weich und anfällig, was die Untersuchungen erschwert[27]. Nach [28] findet man für den Zusammenhang der durchschnittlichen Porengröße bei Konzentrationen zur Agarosekonzentrationen ein Potenzgesetz. Dies wurde dort bei Konzentrationen von 2 bis 5% experimentell bestätigt. Licata et. al errechnen durch die Extrapolation von Daten der Experimente aus [28, 29] eine durchschnittliche Porengröße von $740\text{nm} < \langle a \rangle < 4800\text{nm}$ [30] für ein 0,25%iges Agarosegel. Die große Spanne röhrt hier auch daher, dass die Porengröße von der Hinzugabe von anderen Stoffen, wie Puffern² abhängt. Auch für diese Arbeit wurden Agarosegele bzw. Agargele hergestellt, zu welchen neben Wasser auch verschiedene Inhaltsstoffe, wie bspw. Nährstoffe, hinzugegeben wurden (siehe dazu Abschnitt 3.2). Zusammenfassend ist zu sagen, dass für zukünftige Experimente die durchschnittliche Porengröße experimentell bestimmt werden sollte. Dies gilt insbesondere für Agargele, da die bisherigen Betrachtungen nur für Agarosegele gemacht wurden.

Eine weitere Eigenschaft von Agargelen ist, dass sie von Syneresis betroffen sind [31]. Das heißt, dass sie mit zunehmender Zeit das Dispersionsmittel (also Wasser) ausscheiden und dabei zusammenschrumpfen[18]. Bei diesem Vorgang bildet sich eine Wasserschicht auf dem Gel[31].

²Salze, die der Agarose bei der Verwendung als Elektrophoresegel hinzugegeben werden, um die Leitfähigkeit zu erhöhen

2.1.3 Vergleich zu anderen porösen Medien

In anderen wissenschaftlichen Arbeiten ist bei der Untersuchung von Bakterien häufig von „porösen Medien“ die Rede (bspw. [30, 32]). Diese sind schwierig zu klassifizieren, da es viele unterschiedliche Strukturen gibt, die als poröses Medium bezeichnet werden[33]. Eine Eigenschaft, welche alle porösen Medien einigt, ist, dass diese aus einer Festkörpermatrix mit Porenräumen bestehen[33]. Es handelt sich hierbei also um einen Oberbegriff, welcher neben kohärenten Systemen, wie Gelen, auch inkohärente Systeme (siehe Abbildung 2.1) mit einschließt. So wurden im Paper „Bacterial hopping and trapping in porous media“ [32] geschwollene Hydrogelkugelchen verwendet, welche, wie in Abbildung 2.4 auf der rechten Seite zu sehen, ein inkohärentes poröses Medium bilden. Das „Gel“ in „Hydrogel“ bezieht sich hier auf die innere Struktur der Hydrogelkugelchen.

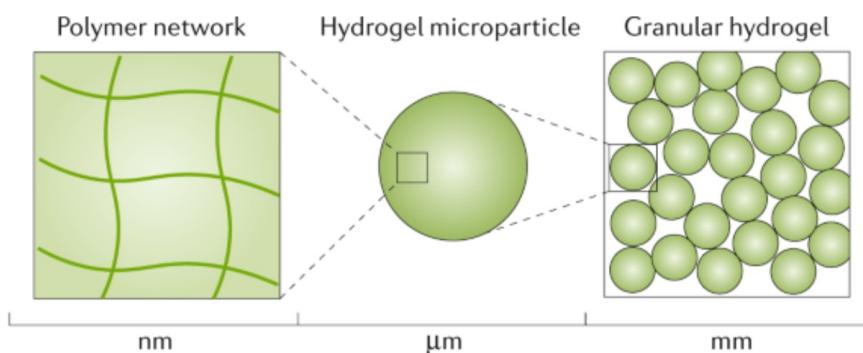


Abbildung 2.4: Aufbau eines porösen Mediums aus Hydrogelkugelchen; die Hydrogelkugelchen sind Gele, welche aus einem Polymerenetzwerk und einem Lösungsmittel bestehen [34]

Anders wird in „Diffusion of Bacterial Cells in Porous Media“ [30] ein Agargel als poröses Medium bezeichnet.

Für diese Arbeit werde ich meine Ergebnisse auch mit wissenschaftlichen Arbeiten vergleichen, welche inkohärente poröse Medien für die Untersuchung von Bakterien benutzen, da es sich um ähnliche Materialien unter dem Oberbegriff „poröse Medien“ handelt. Trotzdem sollte bei dieser und bei zukünftigen Arbeiten mit unterschiedlichen porösen Medien der jeweilige Unterschied der Medien bedacht werden.

2.2 Fortbewegung einzelner Bakterien

Um Bereiche mit möglichst vielen Nährstoffen zu finden oder Bereiche mit schädlichen Stoffen zu verlassen, ist es für Bakterien nützlich sich aus eigener Kraft bewegen zu können[35]. Hierfür haben Bakterien eine Vielzahl von Fortbewegungsarten entwickelt. Beispiele dafür sind „Swimming“, „Swarming“, „Gliding“ oder „Twitching“ [36]. In dieser Arbeit werde ich mich auf die Untersuchung des Schwimmverhaltens von *P. putida* beschränken. Deshalb werden hier kurz die Grundlagen zu diesem Schwimmverhalten vorgestellt.

2.2.1 Flagellenbewegung

Viele Bakterien (darunter das Modellbakterium *Escherichia coli* und das in dieser Arbeit betrachtete *P. putida*) nutzen Flagellen als Fortbewegungsmittel. Die Zahl und Anordnung der Flagellen ist dabei von Art zu Art unterschiedlich. Bei *E. coli* beispielsweise sind die Flagellen gleichmäßig über den Zellkörper verteilt, was als „peritrich begeißelt“ bezeichnet wird.

Das von uns betrachtete *P. putida* hingegen wird „lophotrich begeißelt“ genannt und besitzt mehrere an einem Zellpol angeordnete Flagellen, was in der Abbildung 2.5 zu erkennen ist.

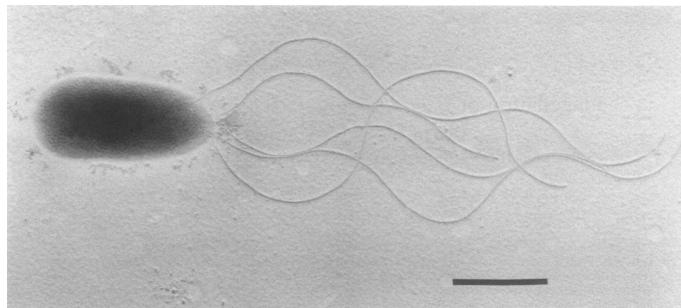


Abbildung 2.5: *P. putida* unter einem Elektronenmikroskop [37], Balken ist $2\mu\text{m}$ lang

Je nach Art haben die Bakterien verschiedene Schwimmmodi. Nach [10] sind für *P. putida* drei unterschiedliche Schwimmmodi bekannt (siehe Abbildung 2.6). Beim „**Push - Modus**“ führen die wendelförmigen Flagellen eine Drehung gegen den Uhrzeigersinn durch. In den meisten Fällen bilden die Flagellen dabei ein wendelförmiges kohärentes Bündel [10], dessen Drehbewegung zu einer resultierende Kraft in Fortbewegungsrichtung führt (für eine genaue Betrachtung siehe dazu [38, Seite 579]). Die Durchschnittsgeschwindigkeit dieses Typs liegt bei $25,4 \pm 0,4\mu\text{m/s}$ [10].

Beim „**Pull - Modus**“ drehen sich die Flagellen im Uhrzeigersinn und ziehen das Bakterium hinter sich her. Die Durchschnittsgeschwindigkeit liegt bei $29,0 \pm 1,5\mu\text{m/s}$ [10].

Beim dritten Modus, dem „**Wrapped - Modus**“, wickelt sich das Flagellenbündel um den Zellkörper, bildet dadurch eine Art Bohrergeometrie und bewegt den Zellkörper durch eine Drehung im Uhrzeigersinn vorwärts[10]. Die Durchschnittsgeschwindigkeit ist hier deutlich geringer als bei den anderen Runtypen und liegt bei $15,5 \pm 0,2\mu\text{m/s}$

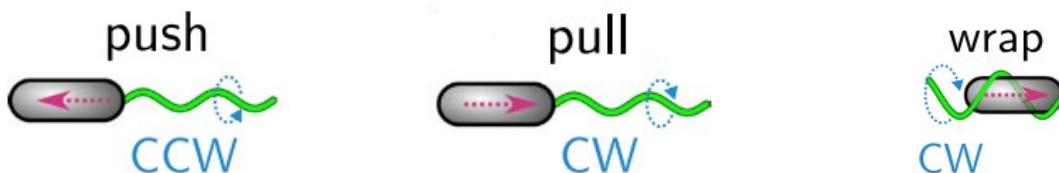


Abbildung 2.6: Verschiedene Bewegungsmodi von *P. putida* [10]

Diese drei beschriebenen Schwimmmodi werden durch verschiedene sogenannte „Events“ unterbrochen, während denen sich das Bakterium kaum bewegt. Die Richtungsänderungen während bzw. nach diesen Events sind bimodal verteilt [7, 11, 40, 39] und die Maxima liegen je nach Quelle leicht unterschiedlich bei $\varphi = 180^\circ$ und $\varphi = 0^\circ$ [7, Bakterienstamm KT 2440, gemessen mittels 2D Tracking] oder $\varphi = 160^\circ$ und $\varphi = 40^\circ$ [39, Bakterienstamm PRS2000, gemessen mittels 3D Tracking], wobei in [7] darauf hingewiesen wird,

dass aufgrund des 2D Trackings große Winkel ($\varphi > 90^\circ$) noch größer und kleine Winkel ($\varphi < 90^\circ$) noch kleiner erscheinen können. Dies würde das qualitative Erscheinungsbild als bimodale Verteilung aber nicht beeinflussen (vgl. [7]).

Aufgrund der bimodalen Verteilung werde ich im Laufe dieser Arbeit die Events ohne bzw. mit einer geringen Richtungsänderung als „**Stoppevents**“ und die Events mit großer Richtungsänderung als „**Turnevents**“ bezeichnen. Es gibt verschiedene Angaben zur Dauer der Turn- bzw. Stoppevents bei Experimenten mit *P. putida*. Für Turnevents findet man eine durchschnittliche Dauer von $0,13\text{s} \pm 0,004\text{s}$ [7] und $0,3\text{s}$ [11]. Die Stoppdauer wird in [9] mit ca. 1s und in [11] mit 0,3s angegeben. Die Untersuchung der genauen Dauer der Turn- bzw. Stoppevents und mögliche äußere Parameter, welche diese Dauer beeinflussen könnten, sollten daher Teil zukünftiger Forschung sein.

In den Abbildungen 2.7 und 2.8 sieht man zwei Trajektorien von Bakterien, bei denen diese beiden Eventtypen und geradlinige Schwimmphasen, welche ich in dieser Arbeit als „Run“ bezeichnen werde, erkennbar sind.

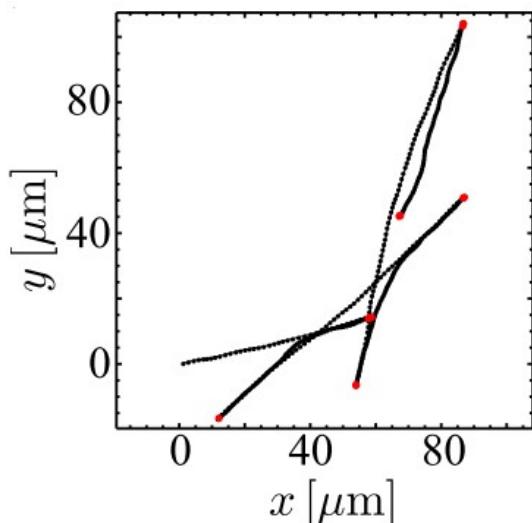


Abbildung 2.7: Trajektorie eines *P. putida* Bakteriums in Flüssigkeit mit verschiedenen Turnevents in rot[7]

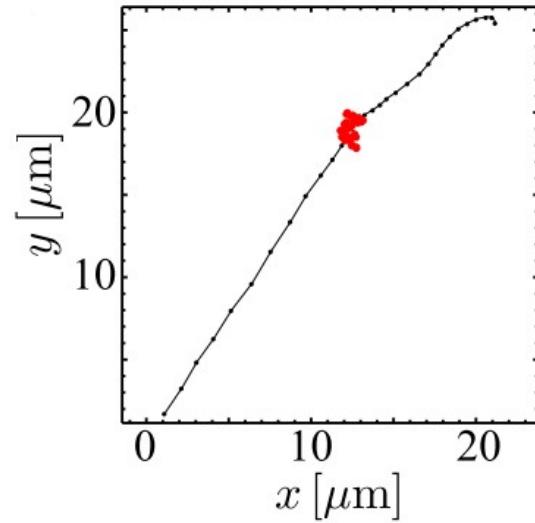


Abbildung 2.8: Trajektorie eines *P. putida* Bakteriums in Flüssigkeit mit einem Stoppevent in rot[7]

2.2.2 Rotationsmotor der Flagellen

Während meiner Arbeit verwendete ich neben dem Wildtyp von *P. putida* auch Mutanten, bei denen die Gene für bestimmte Bausteine des Rotationsmotors der Flagellen ausgeschaltet wurden.

Um besser verstehen zu können, um welche Teile es sich dabei handelt, betrachten wir nun die Funktionsweise des Rotationsmotors bei *E. coli* (vgl. dazu mit Abb. 2.9), welcher ähnlich wie der Rotationsmotor von *P. putida* aufgebaut ist:

Ähnlich wie bei Elektromotoren wird die Rotation durch das Zusammenspiel vom drehbaren Rotor (MS Ring, bestehend aus mehreren Proteinen) und dem in der inneren Membran verankerten Statorkomplexen (bestehend aus den beiden Proteinen MotA und MotB) erzeugt [38]. Die Rotationsbewegung wird dann über mehrere verbindende Elemente an das

wendelförmige Filament weitergegeben, welches für den Antrieb des Bakteriums sorgt. Die Energie für die Rotationsbewegung entstammt dem Konzentrationsunterschied von H^+ -Ionen zwischen dem von der inneren Membran getrennten periplasmatischen Raum und dem Zytosoma, welcher durch Ionenpumpen erzeugt wird.

Das MotB des Statorkomplexes bildet einen Ionenkanal, durch welchen die H^+ -Ionen fließen können[38].

Der Energiebetrag, welcher hierbei frei wird, kann aus der Gibbs Energie hergeleitet werden und ist

$$G = eU - k_b T \ln \left(\frac{c_{H^+, \text{aussen}}}{c_{H^+, \text{innen}}} \right)$$

Wobei U die Membranspannung und c die Konzentration der H^+ -Ionen ist (vgl.[41, 38]). Die einzelnen Beiträge kommen hierbei vom elektrischen und chemischen Gradienten, die aufgrund des Konzentrationsunterschiedes der geladenen Ionen entstehen (vgl. [41]).

Das genaue Funktionsprinzip der Erzeugung der Rotation ist Gegenstand aktueller Forschung und bisher noch unklar [42].

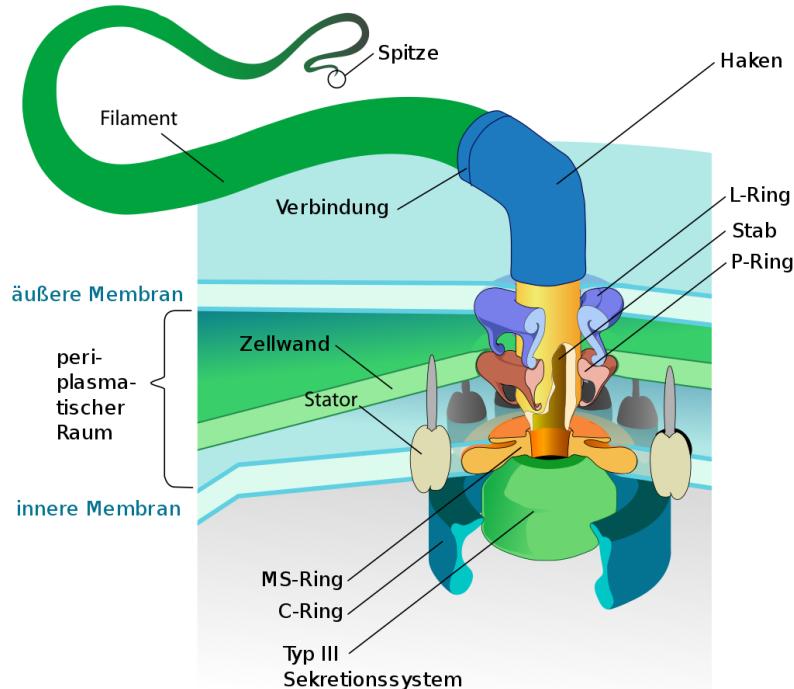


Abbildung 2.9: Schematisches Bild eines Rotationsmotors von *E. coli* [43], der Stator besteht aus MotA (unten, beige) und MotB (oben, grau) Proteinen

2.2.3 Verwendete Mutanten

Der für uns wichtigste Unterschied zwischen dem in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Rotationsmotor von *E. coli* zu dem Rotationsmotor von *P. putida* ist, dass *P. putida* zwei unterschiedliche Statorkomplexe besitzt. Neben MotAB, welches aus MotA und MotB aufgebaut ist, gibt es bei *P. putida* auch MotCD Statorkomplexe, welche aus den Proteinen MotC und MotD bestehen und auch Ionenkanäle bilden.

Wie bereits im vorherigen Kapitel angedeutet, werden in dieser Arbeit neben dem Wildtyp von *P. putida* auch die Mutanten $\Delta motAB$ und $\Delta motCD$, bei denen keine MotAB Statorkomplexe bzw. keine MotCD Statorkomplexe existieren, verwendet. Die Gene für den jeweiligen Komplex wurden durch homologe Rekombination aus dem Erbgut der Bakterien herausgelöscht.

Ziel der Untersuchungen solcher Mutanten in der Wissenschaft ist es, durch das veränderte Verhalten Rückschlüsse auf die Funktionsweise bzw. das Verhalten der ausgeschalteten Motorbausteine ziehen zu können [38]. Da bisher nicht bekannt ist, wieso *P. putida* zwei unterschiedliche Statorkomplexe besitzt, soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob Unterschiede in der Motilität der Mutanten erkennbar sind und ob dies Rückschlüsse auf den Zweck ermöglicht.

2.2.4 Chemotaxis

Für einen Organismus ist es sinnvoll Orte aufzusuchen, an denen sich viele Nährstoffe befinden oder sich von Orten zu entfernen, an denen toxische Stoffe zu finden sind. Zeigen Mikroorganismen eine solche gerichtete Bewegung, entlang eines Nährstoffgradienten hin zu einer Nährstoffquelle oder von einer Schadstoffquelle weg, so spricht man von Chemotaxis[35, 36, 44].

Dieses Verhalten ist bei peritrich begeißelten *E. coli* Bakterien sehr genau erforscht. *E. coli* zeigt ähnlich wie das lophotrich begeißelte *P. putida* ein Verhalten mit geraden Runs (*E. coli* besitzt im Gegensatz zu *P. putida* allerdings nur den Schwimmodus Push) und Turnevents, die als „Tumble“ bezeichnet werden (Stop events werden bei *E. coli* nicht beobachtet und die Richtungsänderung bei Events ist unimodal verteilt [39]).

Da Bakterien nur wenige Mikrometer lang sind, können sie keinen Nährstoffgradienten entlang des Bakterienkörpers messen und so keine optimale Richtung für die Bewegung bestimmen[44]. Als Lösung für dieses Problem bewegen sich die *E. coli* Bakterien durch den Raum und vergleichen die gemessene Nährstoffkonzentration bzw. Schadstoffkonzentration von früheren Zeitpunkten mit dem aktuellen Zeitpunkt[44]. Wird eine Verschlechterung der Umgebungseigenschaften erkannt (also gibt es weniger Nährstoffe oder wird die Schadstoffkonzentration höher), dann verkürzen sich die Run-Zeiten und es kommt zu mehr Turnevents. Verbessern sich hingegen die Umgebungseigenschaften, so werden die Run-Zeiten erhöht und es kommt zu weniger Turnevents[45]. Dies führt dazu, dass Runs in der gewünschten Richtung länger fortgeführt werden und das Bakterium in der Nettobewegung dem Nährstoffgradienten bzw. dem Schadstoffgradienten folgt[45].

Trotz der Ähnlichkeit gibt es Unterschiede zum Chemotaxisverhalten von *P. putida*, welches in [11] untersucht wurde. Hier wurde festgestellt, dass der Push Modus (zur Beschreibung der Modii siehe Abschnitt 2.2.1) kein Chemotaxisverhalten zeigt. Lediglich für den Wrapped Modus wurden Beweise für ein chemotaktisches Verhalten gefunden. So verkürzten sich die Wrapped-Runs, wenn sie von der Nährstoffquelle wegzeigten. Eine Verlängerung von Runs, die zur Nährstoffquelle zeigten wurde jedoch nicht festgestellt. Zum Pull Modus wurde das chemotaktische Verhalten nicht untersucht, da zu wenige solcher Runs aufgenommen wurden.

Für diese Arbeit wird sich auch die Frage stellen, ob wir Beweise für ein chemotaktisches Verhalten von *P. putida* in Gelen finden können.

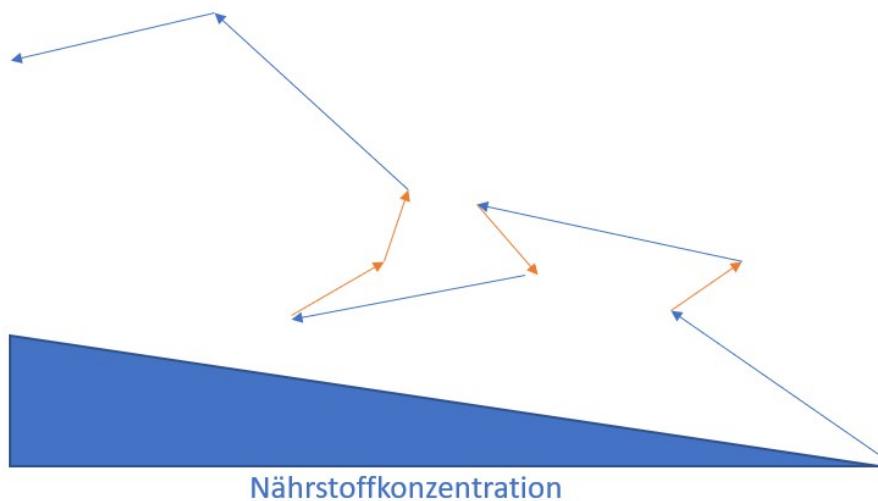


Abbildung 2.10: Veranschaulichung: Bei zufällig gewählten Winkeländerungen bei Turnevents und längeren Runs in Richtung der Nährstoffquelle zeigt die Nettorichtung , wie veranschaulicht, mit großer Wahrscheinlichkeit in Richtung der Nährstoffquelle

2.2.5 Bewegungsmuster in porösen Medien

P. putida ist ein Bakterium, welches im Erdreich vorkommt [13, 14, 12]. Deshalb wird versucht, das Verhalten von *P. putida* auch in einer Umgebung zu untersuchen, welche ähnlich zum natürlichen Habitat von *P. putida*, ein poröses Medium ist [30].

Es gibt bereits mikroskopische Untersuchungen zu Bakterien in porösen Medien (z.B. mit *E. coli* in [32]). Die Bewegung in porösen Medien wird hier durch ein Modell mit „Hops“ und „Trapevents“ beschrieben, wonach die Bakterien sich während der Hops geradlinig durch den Porenraum fortbewegen, bis sie sich im Netzwerk des porösen Mediums verfangen.

Die Länge der Hops hängt hier direkt mit der durchschnittlichen Porengröße zusammen, da bei größeren Porengrößen die Bakterien eine größere freie Weglänge haben (vgl. [32]), bis sie sich wieder in einem Trap verfangen.

Im weiteren Verlauf der Arbeit verwende ich wie bisher den Namen Run statt Hop als Bezeichnung für die gradlinigen Fortbewegungsphasen.

Im Laufe der Arbeit werden wir sehen, dass wir nicht nur Traps als Eventtyp feststellen können. Auch die Eventtypen Stop und Turn, welche bei der Bewegung in Flüssigkeit vorkommen (siehe Abschnitt 2.2.1), können bei einigen Trajektorien erkannt werden. Dadurch können nun die drei in Tabelle 2.1 vorkommenden Events, welche bei *P. putida* Bakterien in Gel zu beobachten sind, charakterisiert werden. Eine Trajektorie mit zugeordneten Eventtypen kann in Abbildung 2.11 betrachtet werden.

Bezeichnung	Beschreibung
Run	Geradlinige Fortbewegungsphase. Es gibt drei verschiedene Run-typen (siehe Abschnitt 2.2.1), welche nicht näher in dieser Arbeit untersucht werden.
Turnevent	Kurzer Eventtyp (je nach Quelle 0,3s [11] oder $0,13s \pm 0,004s$ [7]) mit großer Richtungsänderung
Stopevent	Kurzer Eventtyp (je nach Quelle ca. 0,3s [11] bzw. ca. 1s [9]) mit geringer Richtungsänderung
Trapeevent	Lang dauernder Eventtyp, bei welchem die Bakterien im Gelnetzwerk gefangen sind. Bei Experimenten dieser Bachelorarbeit ist zu erkennen, dass sich die Bakterien auf engem Raum vor und zurück bewegen bzw. hin und her wackeln, bis sie sich befreit haben. Diese Bewegungen bis zur Befreiung zählen zum Trap dazu.

Tabelle 2.1: Zusammenfassung: Charakterisierung Eventtypen und Runphase

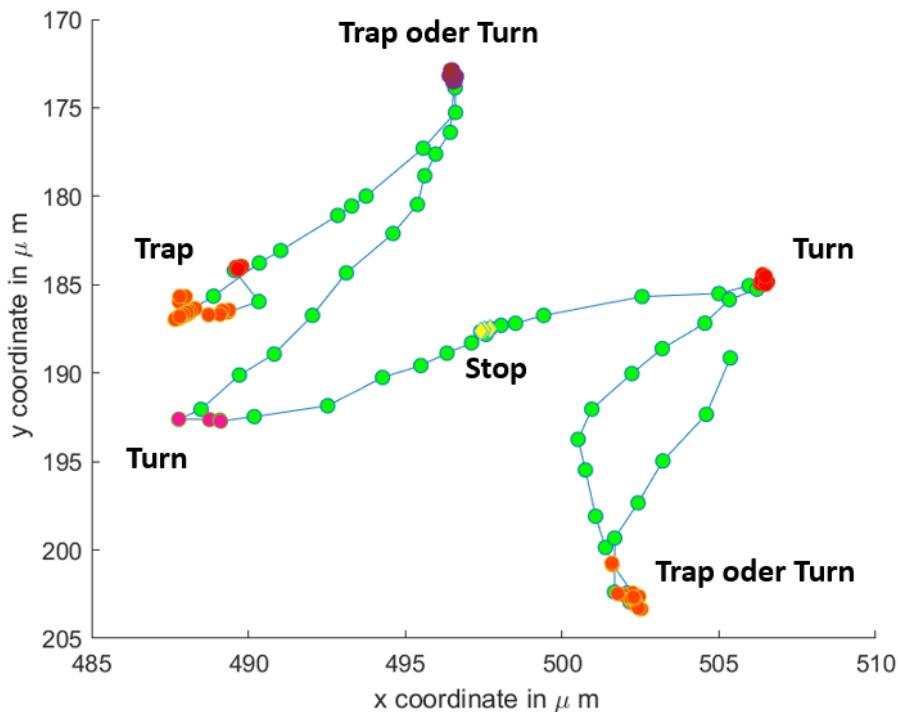


Abbildung 2.11: Beispiel einer Trajektorie eines $\Delta motCD$ Bakteriums in 0,25%igem Agar mit verschiedenen Eventtypen. Runphasen sind grün markiert. Events sind orange, lila, gelb, rosa oder rot markiert (der Eventtyp hängt nicht mit der Farbe zusammen). Manche Events sind nicht eindeutig zuordnbar. Bei der Zuordnung helfen Videoaufnahmen der Trajektorie. Die Trajektorie startet beim Trap oben links und endet unter dem Turn rechts.

2.3 Ausbreitung von Zellkulturen in Agargel

Zur Untersuchung der Schwimmotilität von Bakterien können sogenannte Swimming-Assays durchgeführt werden (vgl. [46]). Hierfür werden Bakterien in Agargel, welches sich in einer kreisrunden Kulturschale befindet, injiziert und es wird die Geschwindigkeit der Bakterienausbreitung im Agar untersucht.

Hierbei wird eine kreisrunde isotrope Ausbreitung der Bakterienkolonie erwartet (vgl. Messergebnisse von bspw. [30, 32, 47]).

Zum Agargel werden Nährstoffe hinzugefügt, sodass diese vor der Injektion der Bakterien gleichverteilt sind. Durch den Stoffwechsel der Bakterien werden nach der Injektion am Standort der Bakterien Nährstoffe verbraucht. Dadurch entsteht durch Diffusion der Nährstoffe ein Nährstoffgradient, mit einem Minimum an Nährstoffen in der Mitte der Bakterienkultur. Dieser Nährstoffgradient kann durch Bakterien, welche ein chemotaktisches Verhalten zeigen ausgenutzt werden, was zu einer schnelleren Ausbreitung der chemotaktisch aktiven Bakterien führt. Die schnellere Ausbreitung chemotaktisch aktiver *E. coli* Bakterien konnte in [47] nachgewiesen werden. In [47] konnte auch nachgewiesen werden, dass Bakterien nicht zwangsläufig Chemotaxis betreiben müssen, um sich in Agar ausbreiten zu können. Chemotaxis führte hier nur zu einer schnelleren Ausbreitung im Vergleich zu *E. coli* Stämme, bei welchen Chemotaxisgene ausgeschaltet wurden. Des Weiteren wurde in [47] nachgewiesen, dass *E. coli* Zellen, welche weniger häufig ihre Richtung durch Tumbleevents ändern, sich nicht bzw. nicht schnell ausbreiten, da sie in Traps gefangen werden und sich aufgrund der geringen Rate der Richtungsänderungen nicht befreien.

Auch Bakterienstämme, die unaufhörlich Richtungsänderungen durchführen, breiten sich langsam aus. Dies liegt allerdings daran, dass diese auch in anderen Umgebungen, wie Flüssigkeiten, einen sehr kleinen Diffusionskoeffizienten und somit eine geringe Ausbreitungsgeschwindigkeit besitzen[47].

Bei experimentellen Untersuchungen von *E. coli* in Agar wurde festgestellt, dass die Ausbreitung nach einer bestimmten Zeit linear erscheint [30, 47]. Wolfe und Berg gingen in [47] darauf ein, dass ein linearer Zusammenhang nicht das ist, was man für die Diffusion von einer festen Anzahl an Bakterienzellen erwarten würde, da bei Diffusion die Wurzel der mittleren quadratischen Verschiebung proportional zu \sqrt{t} ist und dass der lineare Zusammenhang mit der Zellteilung und der immer weiter steigenden Bakterienanzahl zu tun haben muss. Licata et al. [30] stellten folgende Gleichung für den Radius $R(t)$ einer Zellkultur in Agar unter Beachtung der Zellteilung auf:

$$R^2(t) = 4D\lambda t^2 - 4Dt \ln(4\pi\rho_0 D t) \text{ mit } \rho_0 = \rho_{Schwelle}/N_0 \quad (2.1)$$

Hierbei sind D der Diffusionskoeffizient der Bakterien, λ die Wachstumsrate der Anzahl der motilen Bakterien, $\rho_{Schwelle} = \rho(R, t)$ die Zeldichte, welche am Rand der Kolonie vorliegt und N_0 die anfängliche Bakterienanzahl, welche in das Agar injiziert wurde. Auch hier ist der führende Term für $R(t)$ ein linearer Term, was zu den experimentellen Beobachtungen passte[30]. Vernachlässigt wurde hier, dass die Wachstumsrate auch vom Ort und der Zeit abhängt[48]. Wir werden allerdings in dieser Arbeit als Vereinfachung eine konstante Wachstumsrate annehmen. Im speziellen Fall der Betrachtung von Bakterien in Agar bzw. porösen Medien muss bei der Anwendung dieser Formel bei der Wachstumsrate nicht nur die Vermehrung der Zellen durch Zellteilung, sondern auch die Anzahl der Zellen, welche in einem Trap gefangen werden und sich daraus nicht mehr befreien können, betrachtet und mit bedacht werden.

3 Methodik

3.1 Verwendete Materialien

Verwendete Bakterien

Bezeichnung	Besonderheit
<i>Pseudomonas putida</i> WT	Bakterienstamm KT2440 Wildtyp ¹
<i>Pseudomonas putida</i> ΔmotAB	Mutante des Bakterienstamms KT2440 ohne MotAB Statoren
<i>Pseudomonas putida</i> ΔmotCD	Mutante des Bakterienstamms KT2440 ohne MotCD Statoren

Tabelle 3.1

Alle Mutanten von *Pseudomonas putida* wurden von Veronika Pfeifer durch homologe Rekombination hergestellt.

Verwendete Geräte und Gebrauchsmaterialien

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Waage	ATL-6202-I	Acculab
Präzisionswaage	ATL-224-I	Acculab
Photometer	BioPhotometer Plus	Eppendorf
Schüttel-Inkubator	IKA KS 260 basic	Sigma-Aldrich
Autoklave	Laboklav 25-MV	SHP Steriltechnik
Mikroskop	IX71	Olympus
20x Mikroskopobjektiv	UPLFLN-PH	Olympus
Kamera (mikroskopische Aufnahmen)	Orca Flash 4.0 V2	Hamamatsu
Kamera (makroskopische Aufnahmen)	D5100	Nikon
Kameraobjektiv (makroskopische Aufnahmen)	AF NIKKOR 35-80mm 1:4-5.6D	Nikon
Kulturschale	FluoroDish - Tissue Culture Dish with Cover Glass Bottom Dish Ø50mm, Glass Ø40mm	World Precision Instruments

Tabelle 3.2

¹Alle verwendeten Bakterienstämme enthalten eine Mutation in dem Flagellenbaustein FLIC (FliCS267C). Diese beeinträchtigt nicht die Motilität und deshalb wird dieser Bakterienstamm einfachheitshalber als Wildtyp bezeichnet und mit WT abgekürzt.

Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller bzw. Herstellung
Agar	Carl Roth GmbH: Agar-Agar Kobe 1
Agarose	AppliChem: Agarose low EEO
Glukose	AppliChem: D(+)-Glucose anhydrous BioChemica A1422
Magnesiumsulfat	AppliChem: Magnesiumsulfat - Heptahydrat für die Molekularbiologie A6287
Casimosäuren	Amresco: Casimo Acids J851-500G
Lysogeny broth (LB) Medium	Formedium: LB-Broth Lennox
5x M8 Lösung	10,52g Na ₂ HPO ₄ H ₂ O (Merck: MC1065801000), 3,75g KH ₂ PO ₄ (Labochem international: LC-4508.3), 0,625g NaCl (AppliChem: A2942,1000), auf 250ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt

Tabelle 3.3

Verwendete Software

Bezeichnung	Verwendung	Zitierung
Hokawo	Aufnahme Bakterientrajektorien	[49]
MATLAB	Datenauswertung	[50]
Fiji (ImageJ)	Videobearbeitung, Ausmessung von Zellkolonien, Hintergrundkorrektur	[51]
Origin	Datenauswertung	[52]
Bacteria Tracker	Tracking der Bakterien und Analyse der Trajektorien	[53, 7] unter Verwendung von [55, 54]

Tabelle 3.4

3.2 Herstellung der mit Agar gefüllten Kulturschalen

Für die mikroskopischen und makroskopischen Untersuchungen wurden mit Agar gefüllte Kulturschalen benötigt, zu welchen im Anschluss je eine Bakterienkultur hinzugegeben wurde. Beim Herstellen der Kulturschalen wurde sich an dem „Plate-Based Assay for Swimming Motility in *Pseudomonas aeruginosa*“[46] orientiert.

Das folgende Verfahren beschreibt die Herstellung der 0,25%igen (bzw. 0,3%igen)² Agarplatten, welche für die Experimente angefertigt wurden. Diese Agarplatten wurden dann für die makroskopischen und mikroskopischen Aufnahmen verwendet. Die wichtigsten verwendeten Chemikalien, Geräte und Gebrauchsmaterialien sind im Abschnitt 3.1 aufgelistet.

²Die Prozentangabe 0,25% (bzw. 0,3%) bezieht sich hier auf die Herstellung einer Agarlösung mit 0,25g (bzw. 0,3g) Agarpulver auf 100g fertige Lösung.

1. Herstellung der Agar-Grundlösung:

- Abwiegen von 0,25g (bzw. 0,3g) Agar mit der Präzisionswaage unter Zuhilfenahme einer Messschale
- Abfüllen des abgewogenen Agars in eine Laborgewindeflasche mittels Ausspülen der Messschale durch bi-destilliertes Wasser
- Auffüllen der Lösung auf 80g mittels bi-destilliertem Wasser
- Erhitzung der Lösung mittels Autoklaven auf 120 Grad Celsius. Halten der Temperatur für 20 Minuten. Abkühlen der Temperatur über eine Stunde und 20 Minuten. In diesem Schritt geht etwas Flüssigkeit verloren.
- Hinzugeben von
 - 20 ml 5xM8 Lösung
 - 2 ml 10%ige Glucoselösung
 - 5 ml 10%ige Casimosäurelösung
 - 100 µl 1M MgSO₄ Lösung
- Umrühren der fertigen Lösung mittels Magnetrührer
- Gießen der Agarplatten: Pipettieren von je 7ml fertige Agarlösung in eine Kulturschale
- Abkühlen der Agarplatten für 4 Stunden bei geschlossenem Deckel

Für die anschließende Untersuchung werden 2 µl einer Übernachtkultur des jeweiligen Bakteriums mithilfe einer Pipette mittig in die Agarplatte gegeben. Die Übernachtkultur hatte hierbei eine optische Dichte von 1 bzw. wurde auf eine optische Dichte von 1 verdünnt.

Für die Übernachtkultur wurde am Tag zuvor 5 ml Lysogeny Broth Medium mit den gewünschten Bakterien angesetzt und über Nacht im Schüttelinkubator bei 30°C inkubiert.

3.3 Makroskopische Untersuchung der Ausbreitung von Bakterienkolonien

3.3.1 Experimenteller Aufbau

Für die makroskopischen Untersuchungen wurde die Ausbreitung der Bakterienkolonie in einer mit Agar gefüllten Kulturschale untersucht. Hierfür wurden die Platten in eine Lichtkammer mit einer fest montierten Kamera gestellt (siehe Abbildung 3.1). Jede halbe Stunde wurden mit der Kamera automatisiert Bilder über einen Zeitraum von mehreren Tagen gemacht. Zur Untersuchung wurden jedoch nur Aufnahmen in Drei-Stunden-Schritten ausgewertet. Die Lichtqualität wurde durch die Lichtkammer und durch die durchgehend leuchtenden Deckenlampe und Stehlampe konstant gehalten. Während des gesamten Versuches war die Lüftung eingeschaltet, welche die Raumtemperatur konstant bei ca. 21°C hielt. Während der gesamten Zeit wurden die Platten mit Deckeln abgedeckt, um die Agarstruktur vor Austrocknen zu schützen.

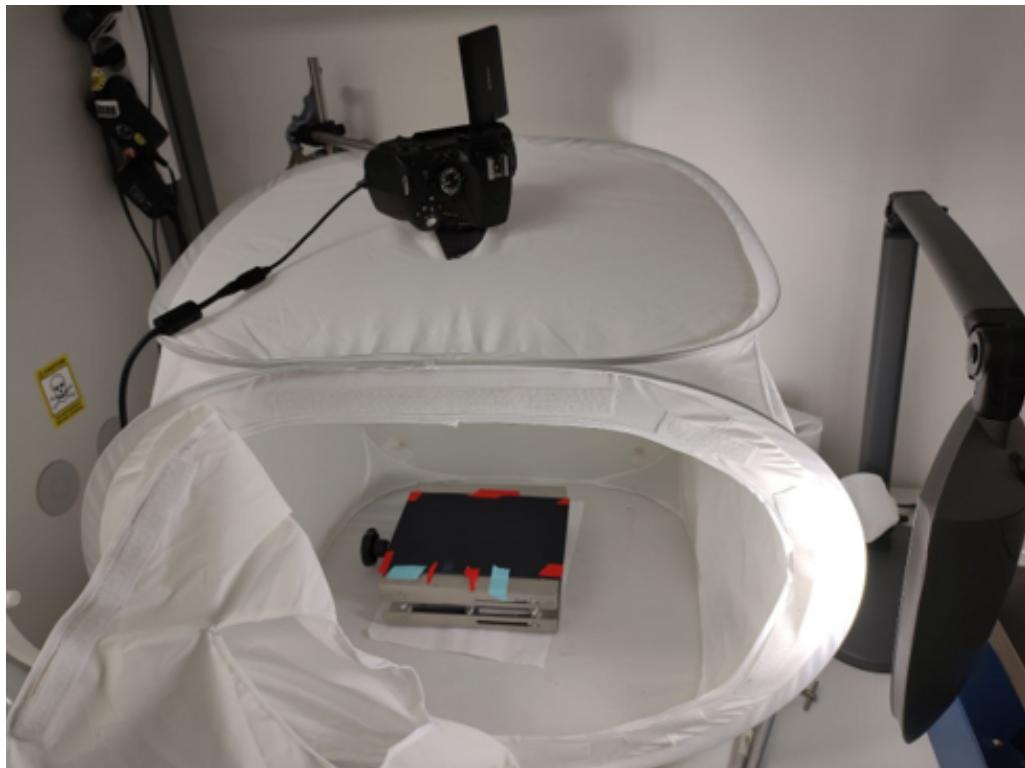


Abbildung 3.1: Versuchsaufbau mit Lichtkammer und am Stativ befestigter Kamera.

In Abbildung 3.2 befindet sich eine beispielhafte Aufnahme von mehreren Bakterienkolonien bei der makroskopischen Untersuchung der Koloniedurchmesser. Mittels der Fiji Funktion „Plot Profile“ konnte der jeweils aktuelle Durchmesser der Bakterienkultur ermittelt werden. Diese Funktion ermittelt die Helligkeit des Bildes entlang einer Linie (siehe gelbe Linie Abbildung 3.3) und gibt sie als Gray-Wert an (siehe Abbildung 3.4). In diesem Beispiel ist die Hintergrundhelligkeit bei ca. 50 Gray zu erkennen.

Da die Hintergrundhelligkeit zum Rand der Aufnahme abnahm, wurde eine Hintergrundkorrektur vorgenommen, indem die Helligkeitswerte des ersten Bildes der Intervallaufnahme von den Helligkeitswerten des aktuellen Bildes abgezogen wurden. Die Hintergrundhelligkeit liegt hier bei 50 und nicht wie zu erwarten wäre bei 0, da die Helligkeit vom aktuellen Bild im vorhinein manuell erhöht wurde, um die Ausbreitung visuell besser erkennen zu können. Außerdem wurde jeweils einmalig die Smoothfunktion von Fiji verwendet um das Hintergrundrauschen zu verringern.

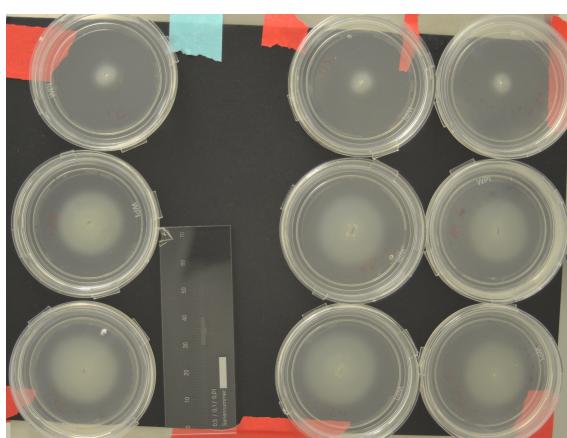


Abbildung 3.2: Aufnahme nach ca. 66 Stunden in 0,3%igem Agar; zu sehen sind Triplikate von ΔmotCD , ΔmotAB , WT (von oben nach unten) in einer Reihe

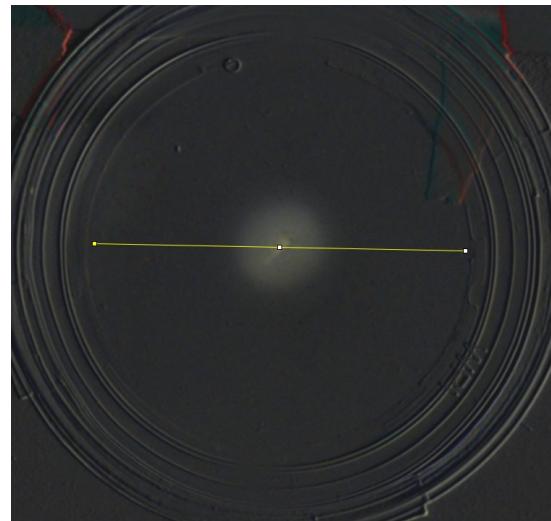


Abbildung 3.3: ΔmotCD nach 66 Stunden in 0,3%igem Agar nach Hintergrundkorrektur

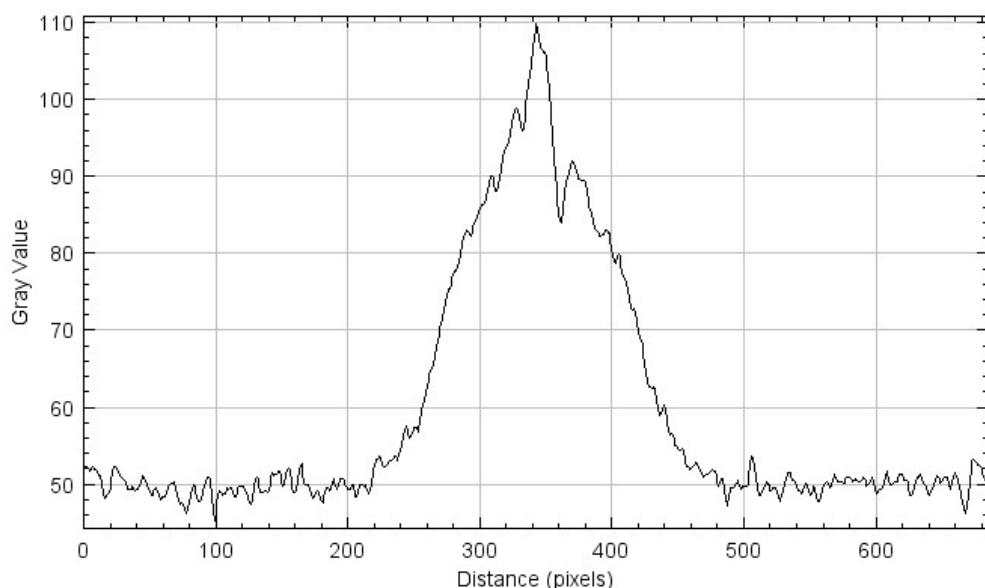


Abbildung 3.4: „Plot Profile“ (Fiji Funktion) der gelben Linie in Abbildung 3.3; zeigt die Helligkeit entlang der gelben Linie.

Für die Messung des Durchmessers wurde ein Schwellenwert von vier Gray über der Umgebungshelligkeit gewählt, um die Grenze zur Bakterienkolonie zu definieren. Dieser Wert wurde so gewählt, dass das Hintergrundrauschen bei der Hintergrundhelligkeit den Wert nicht überschreitet. Dieser Schwellenwert konnte für alle Messungen verwendet werden, da die Lichtqualität wie oben beschrieben konstant gehalten wurde und sich so die Größe des Rauschens nicht verändert hat.

Um den endgültigen Durchmesser einer Kolonie zu bestimmen, wurden einmal in waagerechter und einmal in senkrechter Richtung der Durchmesser, also die Entfernung von einer der zuvor definierten Grenzen der Bakterienkolonie zur anderen, gemessen. Dies

wurde bei zwei weiteren Kolonien mit der selben Agarkonzentration und dem selben Bakterientyp wiederholt und schlussendlich wurde aus allen Werten der Mittelwert gebildet, sowie Standarderror des Mittelwertes berechnet. Die Ergebnisse sind in Abschnitt 4.1 einsehbar.

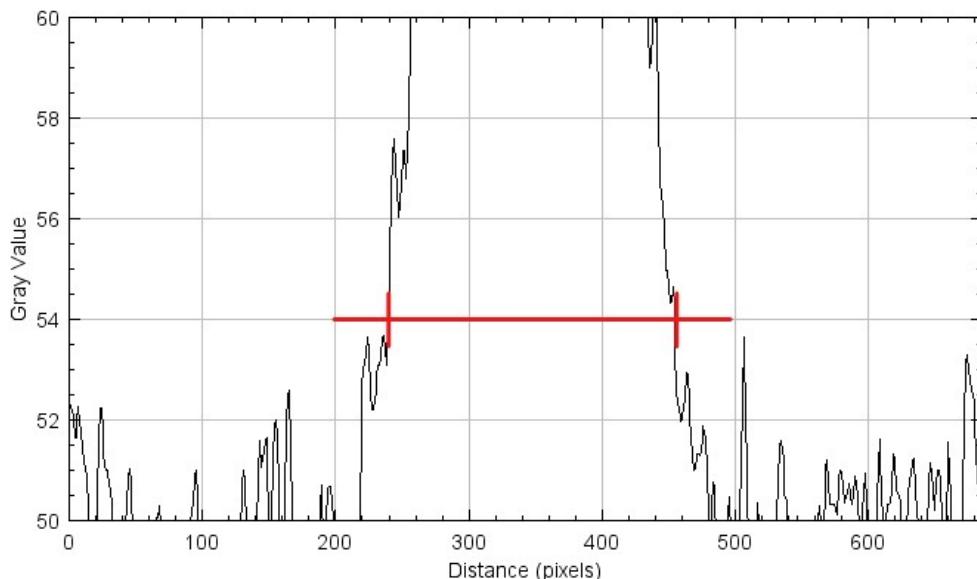


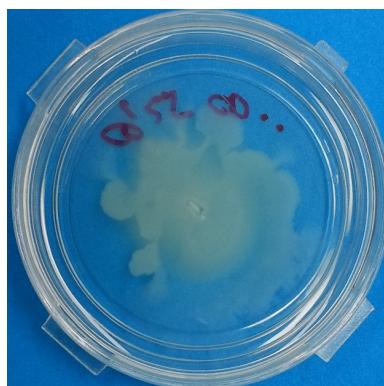
Abbildung 3.5: Ausschnitt der Abbildung 3.4; Vermessung des Koloniedurchmessers;
Als Definition für die Ränder der Zellkultur wurde ein Gray Value von vier über der Hintergrundhelligkeit verwendet.

3.3.2 Anpassungen des Versuchsaufbaus

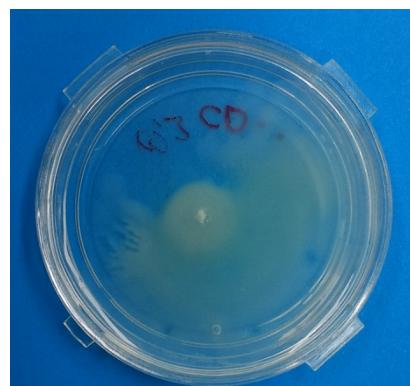
Um das optimale Setup für die makroskopischen Untersuchungen zu finden, wurden verschiedene Einflüsse auf die Ausbreitung der Bakterien untersucht.

Wie bereits beschrieben, wurden auch mehrere Experimente mit Agarosegel als Umgebung für die Bakterien durchgeführt. Hierbei wurden allerdings sehr viele Unregelmäßigkeiten bei der Ausbreitung der Kolonien festgestellt. Einige Beispiele können in Abbildung 3.6 betrachtet werden. Die Unregelmäßigkeiten könnten daher röhren, dass sich manche Bakterien nicht innerhalb der Agarose, sondern in der dünnen Wasserschicht auf der Agarose ausbreiten. Diese Wasserschicht entsteht durch die Syneresis der Agarose.

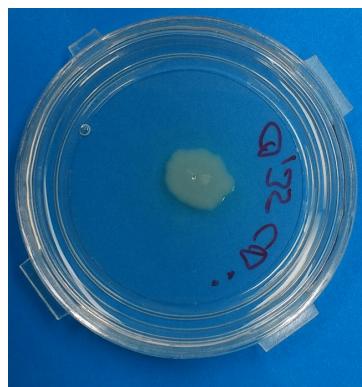
Da diese Unregelmäßigkeiten beim Experimentieren mit Agar nicht bzw. seltener vorgekommen sind, wurden die endgültigen Experimente mit Agar durchgeführt. Möglich ist hierbei, dass das Agaropektin durch die möglicherweise unterstützende Wirkung bei der Bildung des Gelnetzwerkes (siehe Abschnitt 2.1.2) die Syneresis verlangsamt und dadurch keine Wasserschicht zur Ausbreitung der Bakterien auf der Agaroberfläche vorhanden ist. Außerdem könnte es sich um andere Fortbewegungsarten wie „Swarming“ handeln, was in dieser Arbeit aber nicht untersucht wird.



(a) unregelmäßige Ausbreitung von $\Delta motCD$ bei 0,25%iger Agarose nach zwei Tagen



(b) unregelmäßige Ausbreitung von $\Delta motCD$ bei 0,35%iger Agarose nach zwei Tagen



(c) unregelmäßige mäanderförmige Ausbreitung von $\Delta motCD$ bei 0,35%iger Agarose nach zwei Tagen



(d) unregelmäßige mäanderförmige Ausbreitung mit einer weiteren blässeren unregelmäßigen Ausbreitung von $\Delta motAB$ bei 0,35%iger Agarose nach zwei Tagen

Abbildung 3.6: Vier Beispiele für unregelmäßige Ausbreitungen bei Versuchen mit Agarose. Bei Versuchen mit Agar wurde ein solches Verhalten nicht beobachtet. Die kreisrunde Ausbreitung in Agar ist in Abbildung 3.2 zu erkennen.

Beim Experimentieren mit Agarose wurde außerdem ein starker Alterungsprozess durch die schon genannte Syneresis festgestellt. So trocknete die Agarose bei der Verwendung einer offenen Kulturschale innerhalb von einem Tag aus. Aus diesem Grund wurden für die endgültigen Experimente Deckel für die Kulturschalen verwendet. Bei der Verwendung von Deckeln konnten bei Agarosegelen und Agargelen kein Alterungsprozess erkannt werden.

Neben der Art des Gels hatten auch die Größe der Kulturschale, sowie die Temperatur Einfluss auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit. Die endgültigen Experimente wurden bei Zimmertemperatur und mit den unter Abschnitt 3.1 genannten Kulturschalen durchgeführt.

3.4 Mikroskopische Untersuchung der Ausbreitung der Bakterienkolonien

Um das Langzeitverhalten der Bakterien bei der Ausbreitung der Bakterienkolonie besser verstehen zu können, wurden Langzeitaufnahmen der Bakterienkolonien unter dem Mikroskop mit 20x Objektiv angefertigt. Für die Aufnahmen wurde eine niedrige Framerate (bei unterschiedlichen Aufnahmen ein Bild alle 20 Sekunden bzw. ein Bild alle 50 Sekunden) verwendet, um Aufnahmen von einer Länge von bis zu 15 Stunden machen zu können. Einzelne Trajektorien der Bakterien sind also nicht erkennbar. Jedoch ist es durch diese langen Aufnahmen möglich Rückschlüsse auf den Lebenszyklus der Bakterien und die Haufenbildung, welche bei einigen mikroskopischen Aufnahmen beobachtet wurde, zu ziehen. Dazu mehr in Abschnitt 4.1.2.

3.5 Mikroskopische Untersuchung einzelner Trajektorien

Neben der Ausbreitung der Bakterienkolonien werden innerhalb dieser Arbeit auch das individuelle Kurzzeitverhalten einzelner Bakterien bzw. deren Trajektorien analysiert.

3.5.1 Videoaufnahme

Um die Trajektorien der Bakterien zu untersuchen, wurden ca. 20 Stunden nach der Injektion der Bakterien mehrere Kulturschalen mit Zellkulturen unter dem Mikroskop mit einem 20x Objektiv betrachtet. Je Mutante und Agarkonzentration wurden dabei mehrere einminütige Videos aufgenommen, die mithilfe des in Abschnitt 3.5.2 beschriebenen Programms ausgewertet werden konnten. Die Framerate betrug jeweils 20 Bilder pro Sekunde. Wie in Abbildung 3.7 zu sehen, reicht die Vergrößerung nicht aus, um die Flagellen der Bakterien zu erkennen. Deswegen wird sich diese Arbeit auf die Auswertung der Zellposition beschränken.

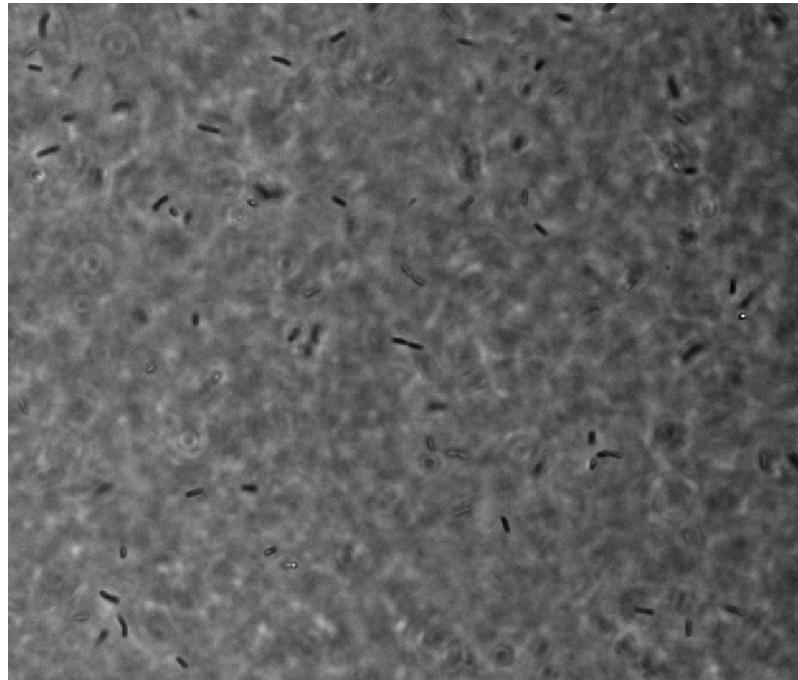


Abbildung 3.7: Ausschnitt einer mikroskopischen Aufnahme mit mehreren *P. putida* Bakterien. Für den Zugriff auf Videoaufnahmen siehe Anhang (Seite 60).

Für das Mikroskopieren wurde eine Ebene $30\mu\text{m}$ über dem Schalenboden, als Fokusebene ausgewählt. Durch diese Auswahl stellen wir sicher, dass die Bakterien nicht mit dem Schalenboden interagieren. Dabei verwenden wir dasselbe Setup, welches auch in [7] verwendet wurde. Durch das Setup können wir alle Bakterien erkennen, welche sich im Bereich von $\pm 7\mu\text{m}$ um die Fokusebene befinden[7]. Die dreidimensionale Bewegung der Bakterien in dieser Schicht wird in unserem Setup als 2D Projektion abgespeichert. Bei der Aufnahme der Bakterienzellen wurden die Bakterien im äußeren Rand der Bakterienkolonie untersucht (zur besseren Veranschauung siehe Abbildung 3.8).

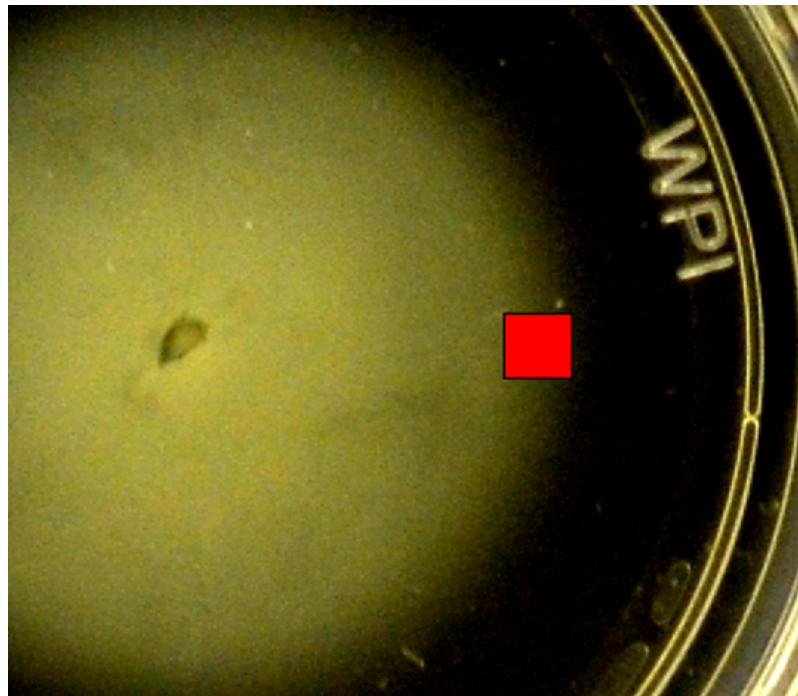


Abbildung 3.8: Veranschaulichung des Messbereichs (rotes Quadrat) bei der mikroskopischen Messung. Zur besseren Visualisierung der Lage und Ausrichtung sind die Höhe und Breite des Messbereichs um den Faktor 10 vergrößert dargestellt. Der tatsächliche Messbereich hatte eine Höhe und Breite von $666 \mu\text{m}$. Die Bakterienkultur ist hier in Weiß zu erkennen. Der Kontrast wurde zur besseren Darstellung angepasst.

3.5.2 Das Analyseprogramm

Die frühere Version des von mir verwendeten Analyseprogramms „Bacteria Tracker“ (siehe Tabelle 3.4), wurde vor dieser Arbeit zur Erkennung und Analyse der Bewegung von Bakterien in Flüssigkeit verwendet. Für diese Arbeit wurde das Programm für die Analyse von Bakterien in der komplexeren Gelumgebung angepasst. Die Funktionsweise und von mir durchgeführte Änderungen im Programm werden in diesem Abschnitt. Der für die Arbeit verwendete Matlabcode mit den von mir erstellten Änderungen ist hier einsehbar: https://gitup.uni-potsdam.de/biophy-baki/baki-tracker/tree/analysis_in_gel

3.5.2.1 Bakterien-Tracking

Als ersten Schritt müssen die Videoaufnahmen in verarbeitbare Daten umgewandelt werden. Hierfür werden wie in [7] beschrieben, Hintergrundkorrekturen, sowie die Umwandlung in ein binäres Bild (mutmaßliche Bakterien - schwarz; Hintergrund - weiß) vorgenommen. Alle Bakterien, die sich nicht bewegen, werden bei dieser Korrektur herausgefiltert. Durch Berechnung des Massenmittelpunktes der schwarzen Objekte erhält man für jeden Zeitpunkt Positionen von mutmaßlichen Bakterien. Nach dem Filtern zu kleiner und zu großer „schwarz markierter Stellen“ werden die übriggebliebenen einzelnen Positionen der Bakterien durch einen Trackingalgorithmus von John Crocker et al. [55, 54] verbunden und in Trajektorien umgewandelt. Jetzt steht uns pro Bakterium für jeden Zeitpunkt eine Ortskoordinate zur Verfügung.

Mit diesen Koordinaten können nun verschiedene Informationen, wie Geschwindigkeit, Richtungsänderungen und Dauer T , sowie Verschiebung³ D der Trajektorien ermittelt werden. Nun werden weitere Trajektorien herausgefiltert, die folgende Eigenschaften erfüllen:

$$T < 1,5 \text{ sec}$$

$$D < 1 \mu\text{m}$$

Damit werden sehr kurze Trajektorien und weitere kaum bewegte Bakterien herausgefiltert⁴. Dies unterscheidet sich zur Vorgängerversion, da bei der Untersuchung in Flüssigkeit die Aussortierregeln strenger waren und auch die Trajektorien mit geringer Durchschnittsgeschwindigkeit und hoher Trajektorienkrümmung⁵ herausgefiltert wurden. In Gelen ergibt dies aber keinen Sinn, da sich die Bakterien über lange Zeiträume in Traps befinden, also eine geringe Durchschnittsgeschwindigkeit haben und sich in diesen Traps auch hin und her bewegen, um sich wieder zu befreien, was zu einer hohen Krümmung der Trajektorien führt.

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei den verarbeiteten Rohdaten um zweidimensionale Projektionen einer Bewegung in der dreidimensionalen Gelumgebung. Dies führt zu kleinen Messfehlern bei der Geschwindigkeit, aber auch bei Winkeländerungen [7]. So werden die Geschwindigkeiten von schräg zur Fokusebene schwimmenden Bakterien unterschätzt. Außerdem werden Winkeländerungen mit $\varphi < 90^\circ$ unterschätzt und Winkeländerungen mit $\varphi > 90^\circ$ überschätzt, wenn die Bewegung nicht parallel zur Fokusebene verläuft[7, 56].

3.5.2.2 Eventerkennung

Um mehr Daten über die Events zu erhalten, überprüft ein Algorithmus des „Bacteria Tracker“ jeden Zeitschritt jeder Trajektorie und ordnet diesen entweder einem Run oder einem Event zu. Zwischen den einzelnen Eventtypen wird nicht unterschieden.

Da der ursprüngliche Eventerkennungsalgorithmus des Bacteria Tracker Programms⁶ für Bakterien in Flüssigkeit sehr schlecht für die Bewegung in Gel funktioniert, musste ein neuer Algorithmus entwickelt werden. Das Problem bestand hier in der Erkennung von längeren Trapevents, da diese nicht als solche erkannt wurden.

Zunächst wurde überprüft, ob der Algorithmus aus den Arbeiten von Bhattacharjee et al. [32] gute Ergebnisse liefert. Dieser basiert darauf, dass alle Zeitpunkte einer Trajektorie, bei denen die momentane Geschwindigkeit geringer als ein Schwellenwert ist, als Event markiert wird. Ein Event kann aus mehreren aufeinanderfolgenden Zeitpunkten bestehen, die als Event markiert worden sind. Dieser Algorithmus wurde mit einer Schwellengeschwindigkeit

$$v_S = 7 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}} \quad (3.1)$$

³im Sinne von „displacement“, also Abstand vom Startpunkt zum Endpunkt der Trajektorie

⁴im Vergleich: *P. putida* ist ca. $2 \mu\text{m}$ lang

⁵Hierfür wurden die Mediane der Krümmungswerte jeder Trajektorie errechnet und Trajektorien mit Medianwerten im oberen Quantil herausgefiltert. Für jeden Zeitschritt kann die Krümmung definiert werden als Winkeländerung durch die im Zeitschritt zurückgelegte Entfernung.

⁶Für eine nähere Beschreibung dieses ursprünglichen Algorithmus siehe [7])

getestet. Die Betrachtung mehrerer Trajektorien zeigte allerdings, dass größere Trapevents nicht als ein Event erkannt wurden, sondern als mehrere kleinere Events (siehe Abbildung 3.9). Dies liegt daran, dass bei Traps die Bakterien einen kleinen Spielraum haben und sich in einem kleinen Raum hin und her bewegen können. Da sich die Bakterien während des Hin-und-Her-Bewegens schneller als mit dem Schwellenwert v_S bewegen, werden die Trapevents fälschlicherweise aufgespalten.

Um diesem Fehler entgegenzuwirken, wurde ein minimaler Abstand d_{min} zwischen zwei Events eingeführt. Liegt ein fälschlich detektierter Run zwischen zwei Events, bei welchen der Endpunkt des ersten Events näher als d_{min} bei den Anfangskoordinaten des zweiten Events liegt, so werden die fälschlich als Run klassifizierten Zeitpunkte auch als Event markiert. Die beiden Events werden also fusioniert. Die Verwendung von

$$d_{min} = 2 \mu\text{m} \quad (3.2)$$

brachte die besten Ergebnisse. Bei dem Test von $d_{min} = 3 \mu\text{m}$ wurden sichtbar mehr Runphasen fälschlicherweise als Trap erkannt. Beim Test von $d_{min} = 1 \mu\text{m}$ wurden mehrere lange Traps nicht als solche erkannt.

So kann man als Beispiel in den folgenden Abbildungen erkennen, dass die fälschliche Aufspaltung in mehrere Traps in Abbildung 3.9 mit der Zusatzbedingung (Gleichung 3.2) in Abbildung 3.10 behoben wurde. Ein Test mit einem um $\pm 1 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$ veränderten Geschwindigkeitsschwellenwert erbrachte schlechtere Erkennungsergebnisse, weswegen $v_S = 7 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$ während dieser Bachelorarbeit verwendet wurde.

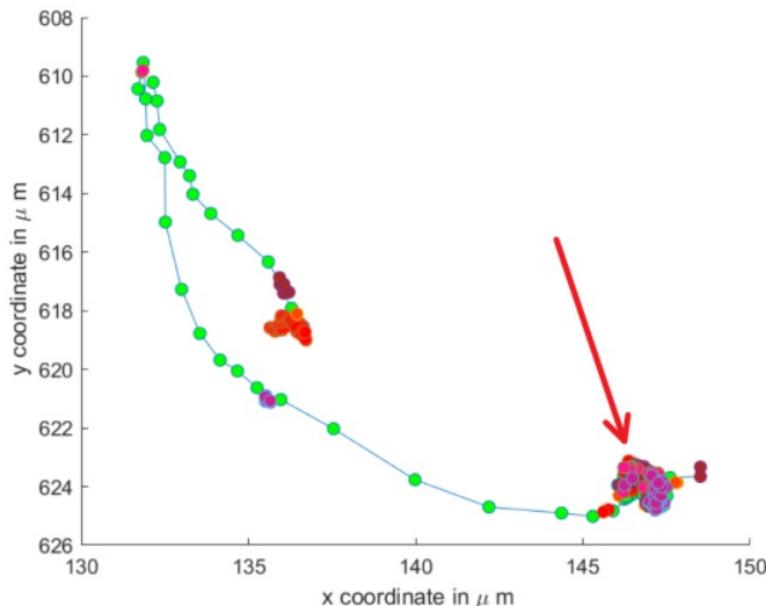


Abbildung 3.9: Trajektorie eines WT Bakteriums in 0,25% Agar mit der Eventerkennung von Bhattacharjee et al. [32] mit einem Schwellenwert $v_S = 7 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$. Runs werden in grün dargestellt. Events sind farblich mit rot, lila, orange und rosa markiert. Unterschiedliche Events erhalten unterschiedliche Farben. Das mit einem roten Pfeil markierte Trapevent wurde falsch erkannt, da es in mehrere Events aufgespalten wurde.

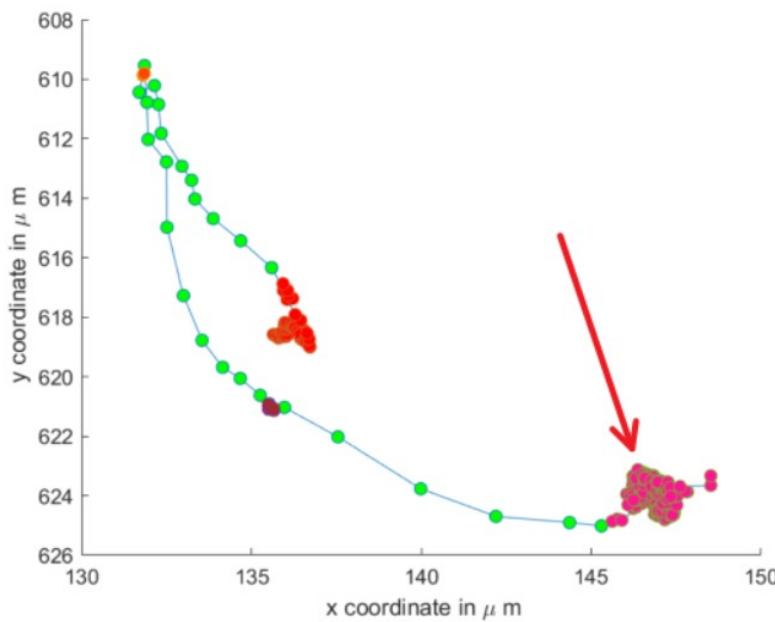


Abbildung 3.10: Fügt man der Eventerkennung eine zweite Bedingung, also einen minimalen Abstand hinzu, so kann man die Erkennung von größeren Trapevents verbessern. Hier wurde ein Geschwindigkeitsschwellenwert von $v_S = 7 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$ und ein minimaler Abstand $d_{min} = 2 \mu\text{m}$ verwendet. Der mit dem roten Pfeil markierte Trap wird korrekt erkannt. Für den Zugriff auf Videos mit ausgewählten Trajektorien siehe Anhang (Seite 60, Video 22-27).

Insgesamt wurden je 84 Trajektorien von Bakterien in 0,25%igem und 0,3%igem Agargel auf Fehler in der Eventerkennung überprüft. Fehler in der Eventerkennung sind als Abschnitte der Trajektorien definiert, bei denen der menschliche Betrachter die Einordnung in Run oder Event anders als der Algorithmus vornehmen würde. Die Fehlerbetrachtung wird mit Videos der Trajektorien durchgeführt.

Auch Trajektorien mit Fehlern beim Tracken der aktuellen Position des Bakteriums werden als fehlerhaft markiert. Trackingfehler treten auf, wenn sich zwei Bakterien sehr nahe kommen und der Algorithmus nicht mehr zwischen den beiden Bakterien unterscheiden kann.

Kleine Fehler sind dabei Fehler, welche nur wenige Datenpunkte der Trajektorie betreffen. Bei mehreren „kleinen Fehlern“ in einer Trajektorie oder Fehlern, welche einem Großteil der Trajektorie entsprechen, wird von „großen Fehlern“ gesprochen.

Aus der Fehlerstatistik (Tabellen 3.5 und 3.6) ist zu erkennen, dass die Eventerkennung noch nicht optimal funktioniert. Zukünftige Arbeiten sollten sich daher mit der Verbesserung der Eventerkennungskriterien beschäftigen.

Trajektorien ...	Anzahl
... ohne Fehler	63 (75%)
... mit kleinen Fehlern	15 (17,5%)
... mit großen Fehlern	6 (7,1%)

Tabelle 3.5: Fehlerstatistik der Erkennung von Events bei Trajektorien in 0,25%igem Agargel

Trajektorien ...	Anzahl
...ohne Fehler	57 (67,9%)
...mit kleinen Fehlern	19 (39,6%)
...mit großen Fehlern	8 (9,5%)

Tabelle 3.6: Fehlerstatistik der Erkennung von Events bei Trajektorien in 0,3%igem Agargel

3.5.2.3 Analyse der Events und Runs

Die erkannten Events und Runs können weiter analysiert werden. Den einzelnen Events und Runs können Eigenschaften, wie die Durchschnittsgeschwindigkeit, die Winkeländerung während der Events (siehe Abb. 3.11), die Orientierung von Runs⁷, Länge bzw. Dauer von Events und Runs zugeordnet werden.

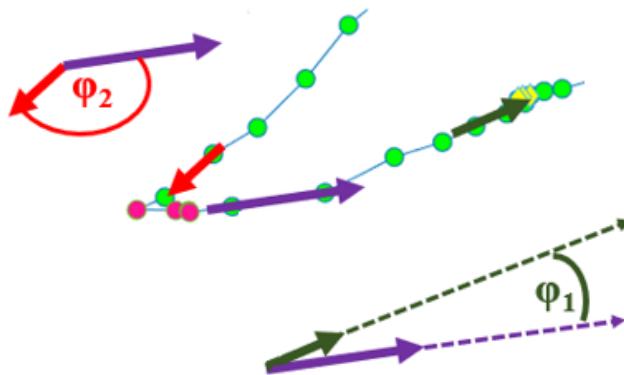


Abbildung 3.11: Exemplarische **Winkeländerung bei einem Event**: Der rote Pfeil zeigt die Eintrittsrichtung in das Event, der lilafarbene Pfeil die Austrittsrichtung aus dem Event. φ_2 ist die Richtungsänderung, welche das Bakterium ausführt. Zur Ermittlung der Richtung werden die zwei Rundatenpunkte vor bzw. nach einem Event benutzt.
Exemplarische Winkeländerung bei Runs: Der lilafarbene Pfeil zeigt die Bewegungsrichtung zu Beginn des Runs. Der grüne Pfeil zeigt die Bewegungsrichtung am Ende des Runs. φ_1 ist die Richtungsänderung, welche das Bakterium während des Runs ausführt. Die Bewegungsrichtung wird durch die ersten beiden Datenpunkte zu Beginn des Runs und durch die letzten beiden Datenpunkte gegen Ende des Runs ermittelt.

Um keine Events und Runs zu analysieren, welche am Anfang bzw. am Ende der Aufnahme abgeschnitten werden, wurden alle Events und Runs aus der Auswertung herausgenommen, welche sich direkt am Anfang oder am Ende der Aufnahme befinden.

⁷gemeint ist die Orientierung des Vektors, welcher vom Anfangspunkt zum Endpunkt eines Runs gebildet werden kann

4 Experimentelle Ergebnisse

In diesem Abschnitt wollen wir nun die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit betrachten. Zuerst wird dabei auf die makroskopisch sichtbare Ausbreitung der Zellkultur in Agar eingegangen. Danach werden wir uns mikroskopisch das Langzeitverhalten, also den Lebenszyklus der Bakterien beim Ausbreiten in Agar anschauen. Darauffolgend werden wir uns mit den maximal einminütigen Trajektorien beschäftigen, um anschließend im Diskussionsteil das Schwimmverhalten charakterisieren zu können. Hierzu werden vor allem Daten zu den erkannten Runs und Events vorgestellt.

Im darauffolgenden Auswertungs- und Diskussionsabschnitt 5 werden dann alle hier aufgezeigten Daten in einen Kontext gebracht und interpretiert. Der genaue Ablauf der Experimente zur Aufnahme der hier präsentierten Daten wurde in Abschnitt 3 vorgestellt.

4.1 Ausbreitung von Bakterienkulturen

4.1.1 Makroskopische Beobachtung

Mithilfe des in Abschnitt 3.3 beschriebenen Setups, wurde der Durchmesser von sich ausbreitenden Zellkulturen mit dem Wildtyp und den Mutanten $\Delta motAB$ und $\Delta motCD$ in 0,25%igem und 0,3%igem Agar gemessen. Die Messergebnisse sind in Abbildung 4.1 zu sehen. Datengrundlage waren je ein Experiment mit Triplikaten, bei welchen die Durchmesser der Kulturen senkrecht und waagerecht vermessen wurden.

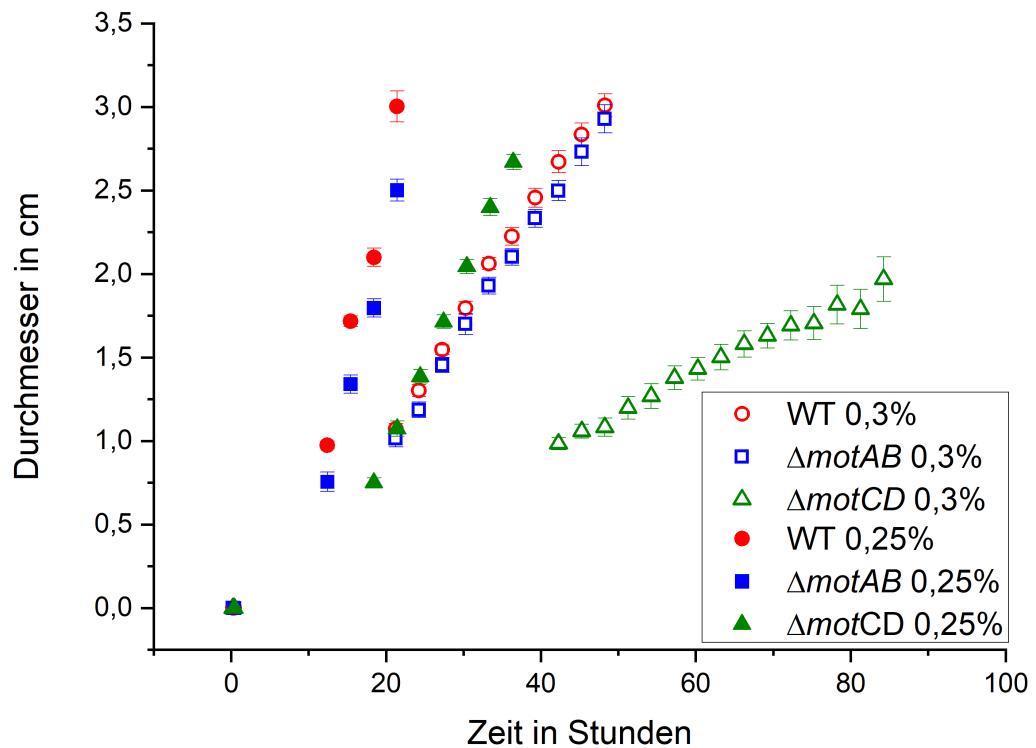


Abbildung 4.1: Durchmesser der Bakterienkultur mit dem Wildtyp, sowie $\Delta motAB$ und $\Delta motCD$ Mutanten von *P. putida* in 0,3%igem und 0,25%igem Agar in Abhängigkeit von der vergangenen Zeit.

Die Bakterienkultur benötigt zu Beginn des Experiments Zeit sich soweit auszubreiten, dass sie vermessen werden kann und die typische kreisrunde Form aufweist. Erst nachdem die kreisrunde Form erkennbar war, wurde der Durchmesser vermessen. Daher kann für kurze Zeiten nach der Injektion keine Angabe zur Ausbreitung gemacht werden. In Abbildung 4.2 kann die exemplarische zeitliche Entwicklung einer Zellkultur nachvollzogen werden. Bei einer Kulturschale (0,3% Agar, $\Delta motCD$) wurde eine Unregelmäßigkeit entdeckt, weswegen die betreffenden Daten (Durchmesser in vertikaler Richtung ab 48:25h) nicht mit einberechnet wurden.

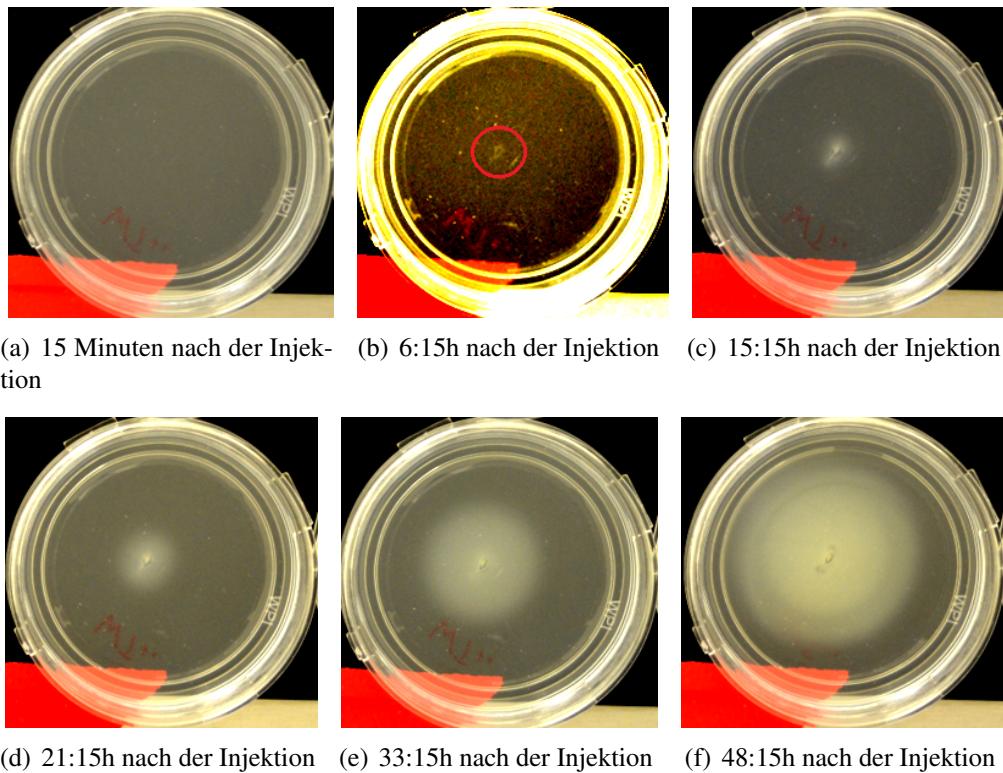


Abbildung 4.2: Betrachtet wird exemplarisch die Aufnahme einer Kulturschale mit 0,3%igem Agar und dem Wildtyp von *P. putida*. Die angegebenen Zeiten beziehen sich auf diese eine Kulturschale und dienen der Veranschaulichung der Messergebnisse in Abbildung 4.1. Andere Platten mit anderen Bakterienarten bzw. Agarkonzentrationen haben teils davon abweichenende Zeiten für die hier geschilderten Phasen der Zellkultur. (a) Kurz nach der Injektion ist wie erwartet keine Ausbreitung zu erkennen. Auch die Einstichstelle ist nicht zu erkennen. (b) Ab 4:15h nach der Injektion bis zur Aufnahme bei 6:55h nach dem Einstechen ist die Ausbreitung (innerhalb des roten Kreises) der Zellkultur um den Einstechpunkt nur mit einer Bildbearbeitung (Kontrastanpassung) gut sichtbar zu machen. (c) Bei Aufnahmen zwischen 6:55h nach der Injektion und 21:15h nach der Injektion ist die Zellausbreitung ohne Bildbearbeitung zu erkennen. Allerdings war diese in diesem Zeitabschnitt nicht kreisförmig und deshalb konnte der Durchmesser nicht gemessen werden. (d,e) 21:15h nach der Injektion waren die Zellkulturen als kreisförmige Ausdehnung sichtbar, bei welchen sich der Durchmesser linear vergrößerte. (f) Bei dieser Kulturschale konnte der Durchmesser ab 48:15h nach der Injektion nicht mehr verwendet werden, da der Rand der Kultur den Rand der Kulturschale erreichte. Für den Zugriff auf alle Bilder siehe Anhang (Seite 60, Video 1 und 2).

Mit den aufgenommenen Messwerten können folgende Ergebnisse festgestellt werden:

1. Die Ausbreitung der Bakterien in Agargel mit niedriger Konzentration (0,25%) verläuft schneller als bei Bakterien in Agar mit höherer Konzentration (0,3%).
2. Der Durchmesser der Zellkulturen verhält sich in dem untersuchbaren Bereich li-

near. (Hierzu sind im Anhang - Abschnitt 6 lineare Fits für die einzelnen Bakterienstämme und Agarkonzentrationen zu finden.)

3. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der $\Delta motAB$ Mutante verhält sich nahezu gleich zum Wildtyp. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der $\Delta motCD$ Mutante ist wiederum geringer als die Ausbreitungsgeschwindigkeiten der $\Delta motAB$ und Wildtyp Bakterienstämme.

4.1.2 Mikroskopische Betrachtung der Zellkulturausbreitung

Wie in Abschnitt 3.4 beschrieben, wurden Langzeitaufnahmen von der Ausbreitung der Zellkulturen unter dem Mikroskop aufgenommen. Hierfür wurde der Wildtyp in 0,25%igem Agar, die $\Delta motAB$ Mutante bei 0,3%igem Agar und die $\Delta motCD$ Mutante in 0,25%igem und 0,3%igem Agar untersucht.

Erwartet wird hier, dass sich die Bakterienkultur im Laufe der Aufnahme vom Ursprung der Bakterienkultur zum Rand ausbreitet, was auch bei sich zufällig bewegenden Bakterien zu beobachten wäre, da sich im Mittel mehr Bakterien von Orten mit hoher Bakterienkonzentration zu Orten niedriger Bakterienkonzentration bewegen würden.

Hier wollen wir nun qualitativ das Langzeitverhalten der Bakterien beschreiben: Die Bakterien des Wildtyps und der $\Delta motAB$ Mutante bewegten sich während der Aufnahmen in 0,25%igem Agar bzw. 0,3%igem Agar einzeln fort. Manche der Bakterien stellten ihre Bewegung ein und blieben an einem Ort liegen. Dies könnte daraus folgen, dass sich diese Bakterien in einem Trap verfangen haben und sich nicht mehr aus diesem befreien konnten.

Es waren mehrere Zellteilungen beobachtbar. Hierbei stellten die Bakterien ihre Bewegung ein, bis die Zellteilung vollendet war. Danach bewegten sich meist beide Zellen einzeln weiter. Teilweise fanden mehrere Zellteilungen hintereinander statt, wobei nach der ersten Zellteilung eine Zelle am Ort blieb und eine zweite Zellteilung durchführte. Ein Beispiel für eine Zellteilung des Wildtyps ist in Abbildung 4.3 zu erkennen.

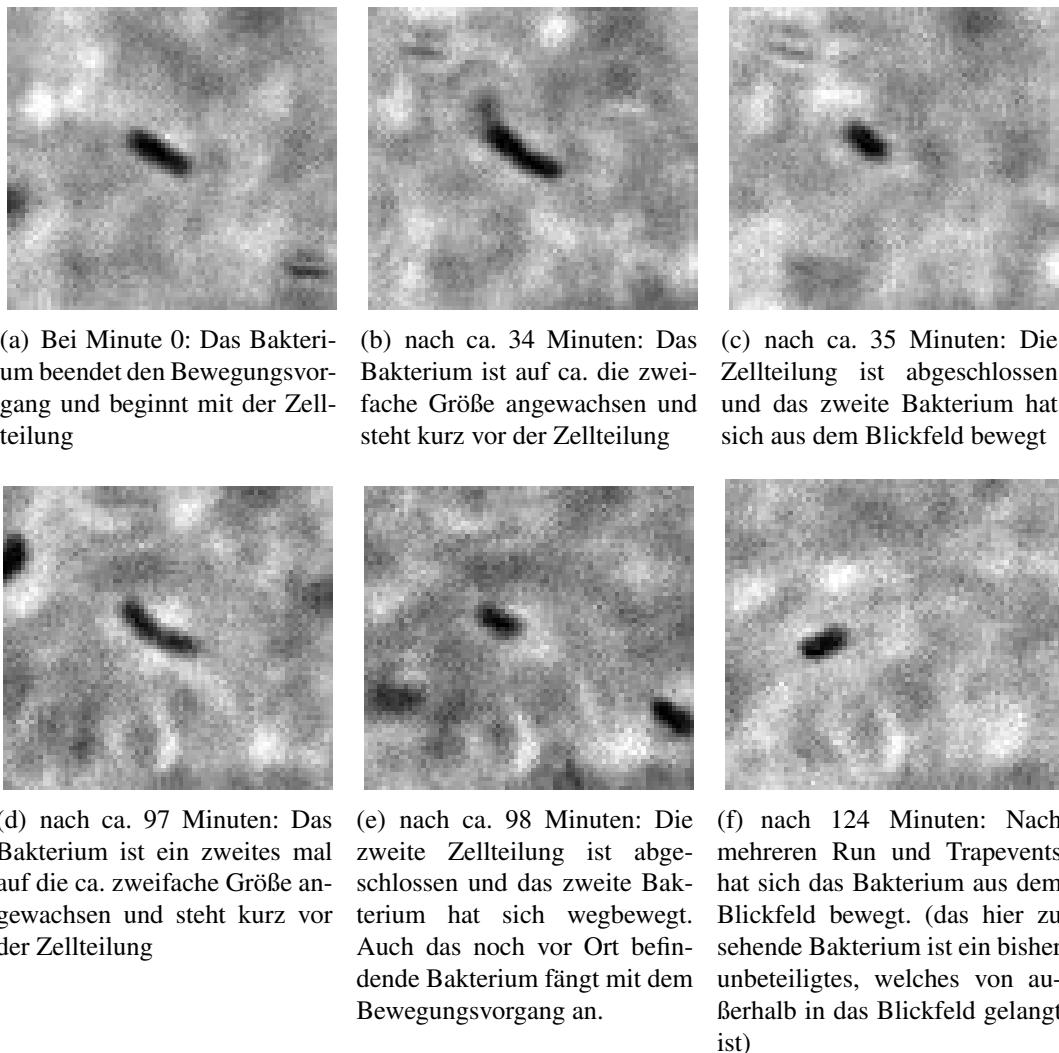


Abbildung 4.3: Aufnahmen des Zellteilungsvorgangs eines Wildtyp-Bakteriums in 0,3%igem Agar. Das ursprüngliche Bakterium teilte sich während dieses Vorgangs zwei Mal hintereinander. Für den Zugriff auf Videos von Zellteilungen siehe Anhang (Seite 60, Video 13, 14 und 15).

Bei der Betrachtung der Langzeitaufnahmen von $\Delta motCD$ in 0,3%igem Agar, zeigte sich ein klarer Unterschied zu den Aufnahmen vom Wildtyp bzw. von der $\Delta motAB$ Mutante. Einerseits waren sehr viel weniger frei bewegende Bakterien zu erkennen, andererseits bildeten sich bei der Zellteilung Zellhaufen aus. Eine Entwicklung hin zu einem solchen Zellhaufen ist in Abbildung 4.4 zu erkennen. Es war nicht zu erkennen, ob sich einzelne Bakterien wieder von diesem Zellhaufen lösten oder ob alle Bakterien am Ort des Zellhaufens blieben. Vermuten lässt sich, dass manche Bakterien wieder lösen, da sonst nach einer gewissen Zeit keine motilen Bakterien, sowie keine Ausbreitung der Kultur, mehr zu beobachten wären, weil sich dann alle Bakterien in Zellhaufen befinden würden.

Bei der Betrachtung von $\Delta motCD$ in 0,25%igem Agar entstanden auch mehrere dieser Zellhaufen. Allerdings waren hier auch Bakterien zu erkennen, welche eine Zellteilung, wie in Abbildung 4.3 gezeigt, durchführten. Außerdem war hier zu erkennen, dass sich einzelne Bakterien aus den Zellhaufen wieder herauslösen. Die Zahl der sich frei bewegenden Bakterien war hier auch deutlich größer als bei der 0,3%igen Konzentration, aber geringer als beim Wildtyp bzw. der $\Delta motAB$ Mutante.

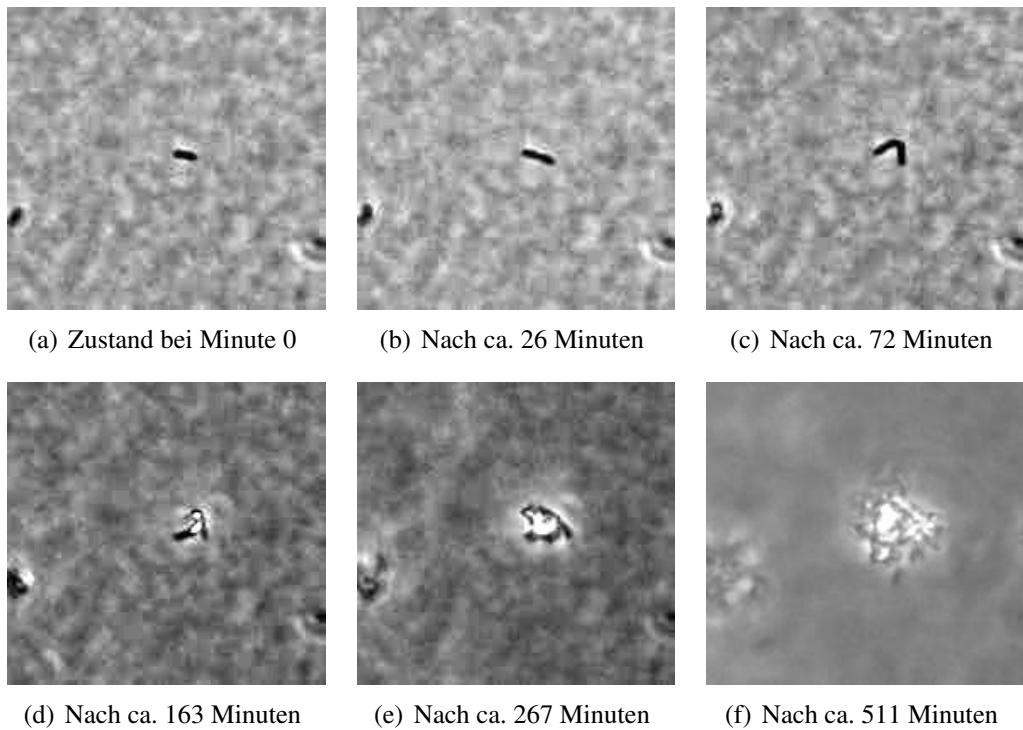


Abbildung 4.4: Aufnahme des Zellteilungsvorgangs eines $\Delta motCD$ Bakteriums in 0,3%igem Agar. Die entstandenen Bakterien bleiben am Ort und nach mehreren Zellteilungen entsteht ein Bakterienhaufen. Eine Aufnahme mit einem größeren Bildausschnitt befindet sich im Anhang Abbildung 6.4. Für den Zugriff auf Videos von Zellhaufenbildungen siehe Anhang (Seite 60, Videos 7-12 bzw. 3 und 6).

4.2 Mikroskopische Beobachtungen einzelner Trajektorien

Insgesamt wurden für diese Arbeit 39.848 Trajektorien analysiert und ausgewertet. Diese verteilten sich auf verschiedene Agarkonzentrationen und Bakterienstämme. Die Anzahl an Trajektorien für jede Experimentanordnung ist der Tabelle 4.1 zu entnehmen. Die Anzahl der erkannten Trajektorien bei der $\Delta motCD$ Mutante ist im Vergleich zu den anderen Bakterienstämmen sehr gering. Bei einer Agarkonzentration von 0,3% ist die Anzahl der Trajektorien so gering, dass diese nicht ausgewertet werden konnten. Dies liegt an der sehr geringen Anzahl an sich frei bewegenden Bakterien, was mit der in Abschnitt 4.1.2 beobachteten Tendenz der $\Delta motCD$ Bakterien, bei der Zellteilung Bakterienhaufen zu bilden, erklärt werden kann. Bei $\Delta motCD$ bei 0,25%igem Agargel werden nur Bakterien untersucht, die sich nicht in einem solchen Haufen befinden.

Bakterientyp	Agarkonzentration	Anzahl Aufnahmen	Trajektorienanzahl
<i>P. putida</i> WT	0,25%	5	8.023
<i>P. putida</i> WT	0,3%	5	7.481
<i>P. putida</i> Δ motAB	0,25%	5	11.234
<i>P. putida</i> Δ motAB	0,3%	5	11.181
<i>P. putida</i> Δ motCD	0,25%	7	1.929

Tabelle 4.1: Anzahl der in dieser Arbeit ausgewerteten Trajektorien nach Bakterientyp und Agarkonzentration sortiert. Eine Längenverteilung der Trajektorien des Wildtyps in 0,25%igem Agar ist im Anhang in Abbildung 6.1 zu finden.

Die Zuordnung von Abschnitten der Trajektorien als Run oder Event wurde durch den in Abschnitt 3.5.2.2 beschriebenen Algorithmus durchgeführt. Nachträglich wurden keine Trajektorien per Hand von der Auswertung ausgeschlossen.

4.2.1 Mittlere quadratische Verschiebung

In Abbildung 4.5 ist die mittlere quadratische Verschiebung (MQV) $\langle r^2(\tau) \rangle$ aller Trajektorien der verschiedenen Kombinationen aus Bakterienstamm und Agarkonzentration zu erkennen. Zur Berechnung von $r(\tau)$ wurde für jeden Zeitpunkt innerhalb einer Trajektorie der Abstand zum Startpunkt der Trajektorie ermittelt. Nach dem Quadrieren wurde der Mittelwert über alle Trajektorien berechnet. Bei den Werten der MQV handelt sich also um Ensemblemittelwerte.

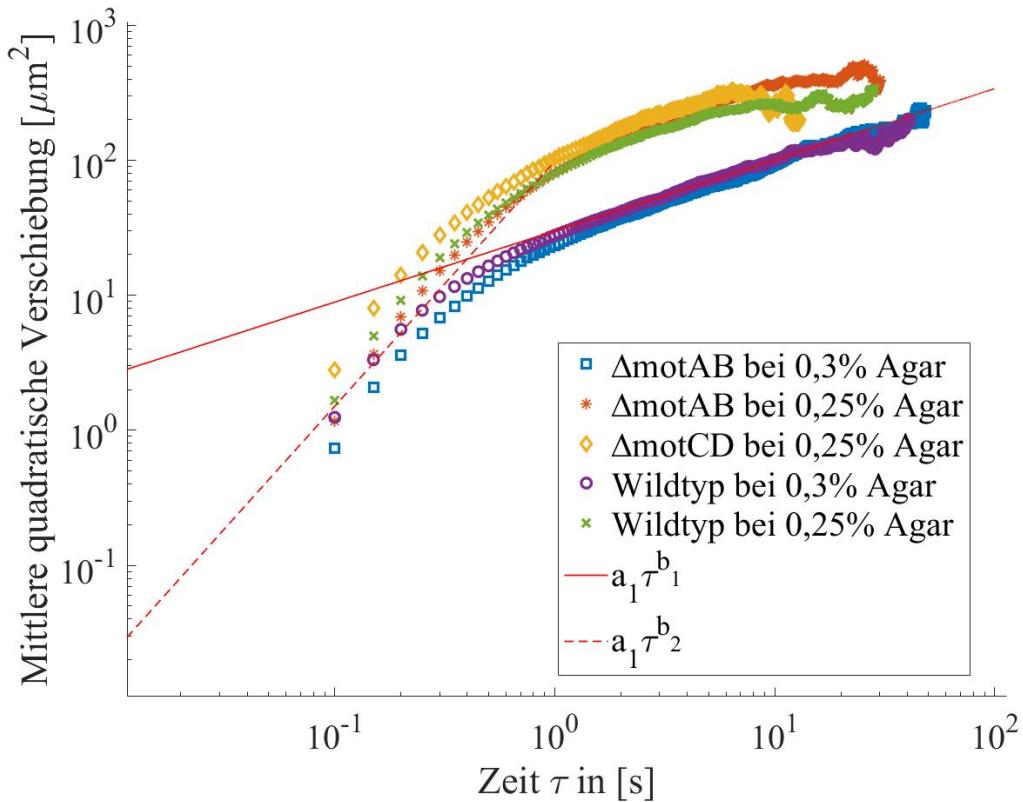


Abbildung 4.5: Mittlere quadratische Abweichung (Ensemblemittel) der Trajektorien mit Unterscheidung zwischen den drei Bakterienstämmen und den beiden Agarkonzentrationen. Es sind für alle Datensätze zwei lineare Regime zu erkennen, die ineinander übergehen. Für beide Regime sind Fitgeraden (exemplarisch an den Daten des Wildtyps bei 0,3%igem Agar) erstellt worden. Die Werte der Parameter sind $a_1 = 29,96 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}^{b_1}}$, $b_1 = 0,53$ und $a_2 = 97,99 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}^{b_2}}$, $b_2 = 1,81$

Zuerst ist zu erkennen, dass die MQV der Trajektorien in der höheren 0,3%igen Agarkonzentration niedriger ist als die MQV der Trajektorien in der niedrigeren Agarkonzentration.

Außerdem sind im hier gezeigten Log-Log-Plot für alle Kombinationen aus Agarkonzentration und Bakterienstamm zwei lineare Bereiche zu erkennen. So erkennt man für den vorderen Abschnitt jedes Datensatzes einen linearen Bereich mit einem ungefähren Anstieg von $b_2 = 1,81$, welcher dann in einen hinteren linearen Bereich mit Anstieg $b_1 = 0,53$ übergeht. Fitfunktionen für beide Bereiche sind in rot dargestellt.

Unterschiede bei der MQV zwischen unterschiedlichen Bakterien bei der selben Agarkonzentration sind im hinteren Bereich nicht auszumachen. Im vorderen Bereich liegen die Werte der MQV von der $\Delta motCD$ Mutante über denen des Wildtyps und diese wiederum über den Werten der $\Delta motAB$ Mutante.

4.2.2 Winkeländerung

Durch den in Abschnitt 3.5.2.2 beschriebenen Algorithmus kann bei den Trajektorien der Bakterien zwischen Runs und Events unterschieden werden. Durch die Ermittlung der Eintritts- bzw. Austrittsbewegungsrichtung bei einem Event oder die Anfangs- bzw. Endbewegungsrichtung bei einem Run kann die Richtungsänderung bei Runs und Events ermittelt werden (siehe dafür Abbildung 3.11).

In Abbildung 4.6 ist die Wahrscheinlichkeitsdichte für die unterschiedlichen möglichen Richtungsänderungen gezeigt. Zu erkennen ist, dass die meisten Runs eine sehr kleine Richtungsänderung zur Folge haben.

Die Verteilung der Richtungsänderungen bei Events ist dagegen bimodal. Hier ist ein Maximum bei kleinen Winkeländerungen und eines bei großen Winkeländerungen zu erkennen. Bei Events erfolgt also mit einer großen Wahrscheinlichkeit entweder eine sehr kleine oder eine sehr große Richtungsänderung.

Dasselbe Erscheinungsbild der Wahrscheinlichkeitsdichte zeigt sich auch bei den anderen beiden Bakterienstämmen.

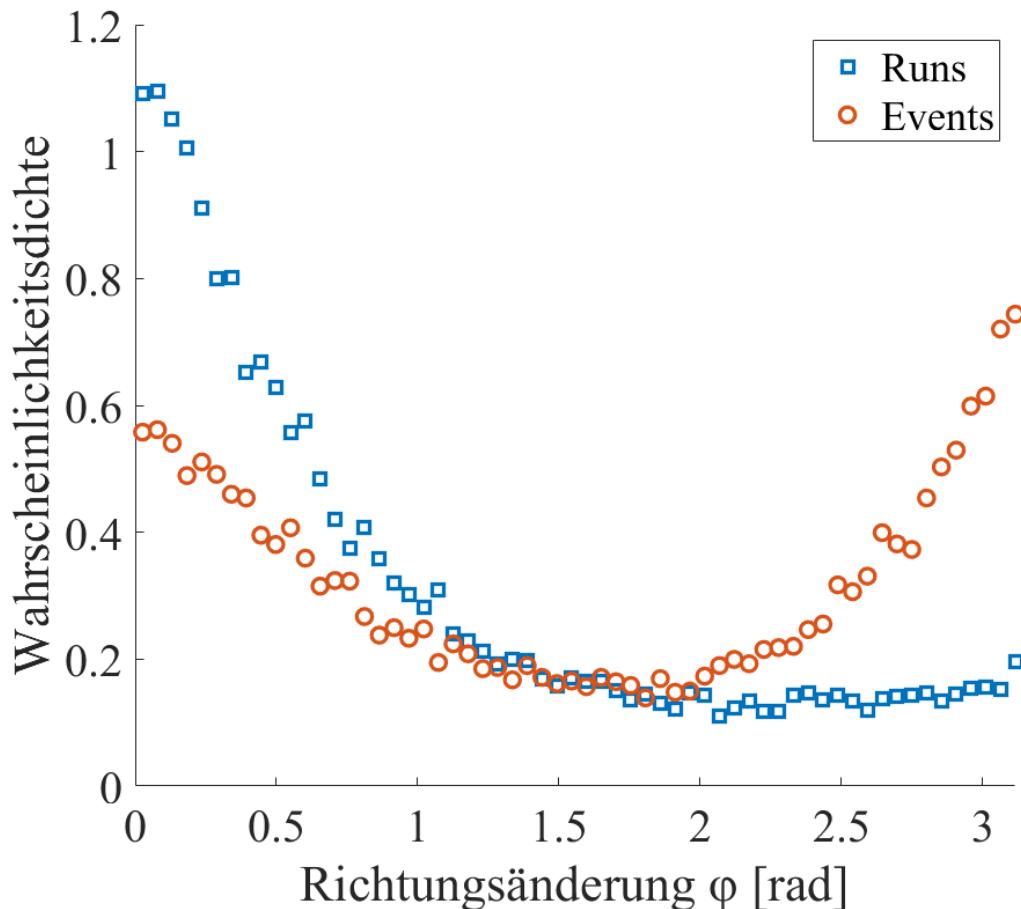


Abbildung 4.6: Wahrscheinlichkeitsdichte der Richtungsänderung während einer Run- phase oder eines Events. Zu sehen sind die Daten für den Wildtyp bei einer Agarkonzentration von 0,25%

4.2.3 Dauer und Länge der Runphasen

Die Dauer und die Länge der Runphasen sind in Abbildung 4.7 und 4.8 dargestellt. Die verschiedenen Datensätze für unterschiedliche Agarkonzentrationen und Bakterienstämme zeigen alle eine exponentielle Verteilung, da diese mit einer logarithmierten y-Achse ein lineares Verhalten zeigen. Der erste Datenpunkt sticht hierbei allerdings heraus, da dieser bei allen Datensätzen niedriger ist, als bei einer exponentiellen Verteilung erwartet, ausfällt. Dies liegt daran, dass Runevents aufgrund des in Abschnitt 3.5.2.2 beschriebenen Eventerkennungsalgorithmus nicht kürzer als $2 \mu\text{m}$ sein können, da dann die begrenzenden Events weniger als $2 \mu\text{m}$ voneinander entfernt wären. Diese sehr kurzen Runs ($2 \mu\text{m}$ entspricht ca. der Länge des Bakteriums) werden als hin und her Wackeln in einem Trap interpretiert und sind damit den Events zugeordnet.

Bei gleicher Agarkonzentration ist hierbei kein Unterschied zwischen den Bakterienstämmen auszumachen. Der Unterschied zwischen den Agarkonzentrationen ist allerdings klar zu erkennen, da sich der Anstieg im Log-Lin-Plot bei der Darstellung der Dauer und der Länge um einen Faktor von 2 unterscheidet. Bei der höheren Konzentration von 0,3% des Agar sind die Runs also im Durchschnitt erkennbar kleiner als bei 0,25% Agar.

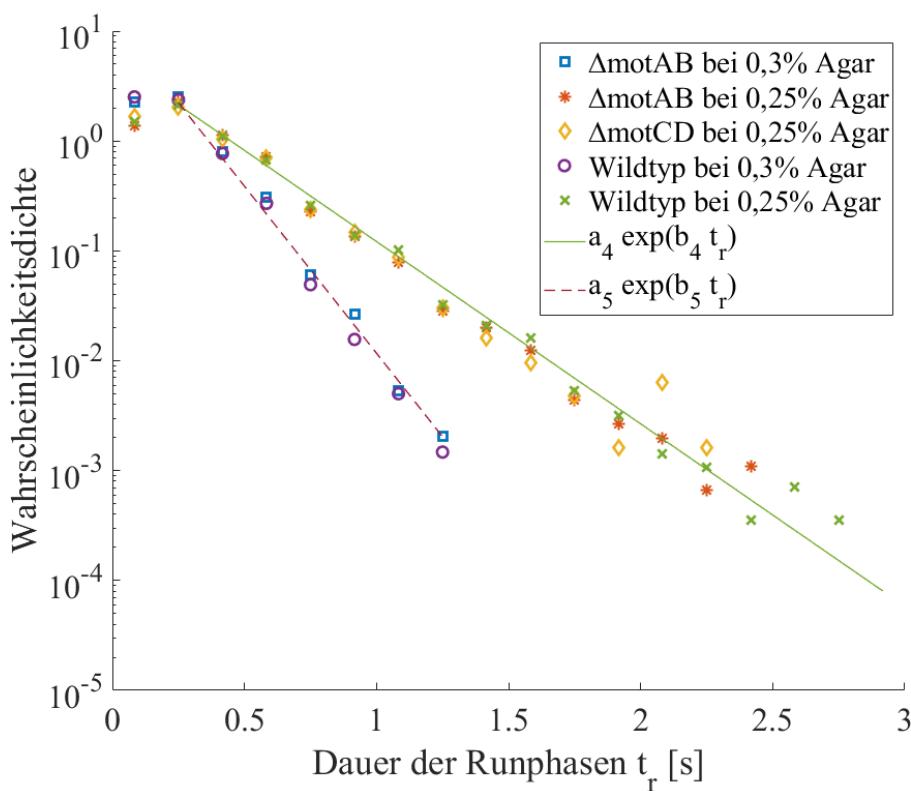


Abbildung 4.7: Wahrscheinlichkeitsdichte der Rundauer mit logarithmierter y-Achse. Für beide Agarkonzentrationen gibt es jeweils eine exponentielle Orientierungsgerade mit den Parametern $a_4 = 5,54$, $b_4 = -3,82 \text{ s}^{-1}$ für das 0,25%ige Agar und $a_5 = 12,83$, $b_5 = -7,00 \text{ s}^{-1}$ für das 0,3%ige Agar.

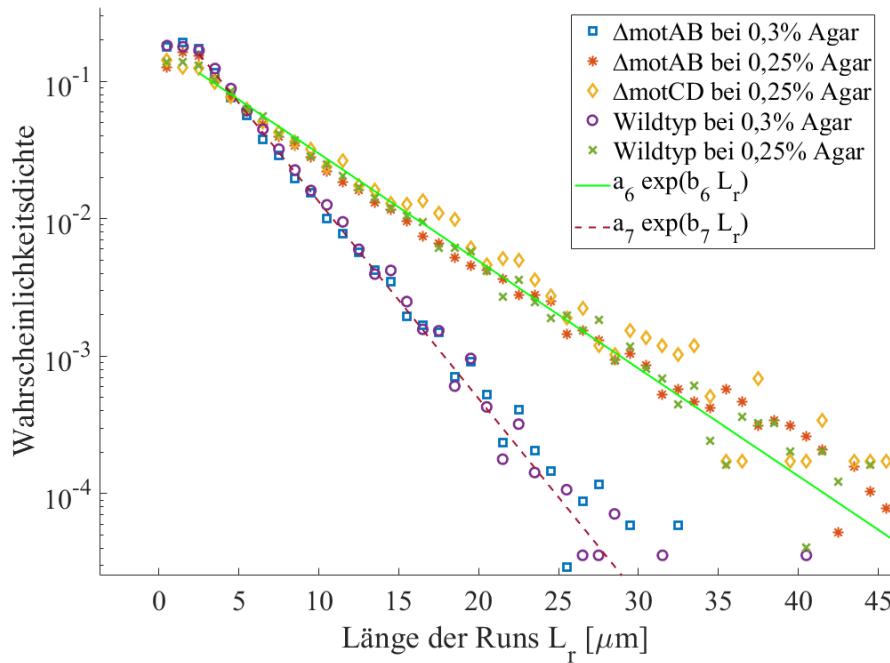


Abbildung 4.8: Wahrscheinlichkeitsdichte der Länge der Runs mit logarithmierter y-Achse. Für beide Agarkonzentrationen gibt es jeweils eine exponentielle Orientierungsgerade mit den Parametern $a_6 = 0,19$, $b_6 = -0,18 \mu\text{m}^{-1}$ für das 0,25%ige Agar und $a_7 = 0,36$, $b_7 = -0,33 \mu\text{m}^{-1}$ für das 0,3%ige Agar.

4.2.4 Orientierung der Runphasen

Auch die Orientierung der einzelnen Runphasen wurde untersucht, um mögliche Tendenzen in der Richtung zu finden. Hierfür wurden alle Aufnahmen der Agarkonzentration 0,25% so gemacht, dass sich der Mittelpunkt der kreisrunden Bakterienkultur auf der linken Seite des Bildes befindet. Somit ist der Rand der Kultur auf der rechten Seite der Aufnahme. Die Aufnahme wurde nahe des Rands der Kultur gemacht, wobei der gesamte sichtbare Bereich innerhalb der Kultur lag. (zur Veranschauligung siehe Abbildung 3.8). Die Richtungen der Runphasen wurden für unterschiedliche Bakterienstämme in den Abbildungen 4.9, 4.10, 4.11 in Kreishistogramme eingetragen. Die Richtung eines Runs wird durch den Anfangs- und den Endpunkt eines Runs definiert (der Richtungsvektor zeigt also vom Anfangspunkt zum Endpunkt).

Zusätzlich zum Histogramm wurden außerdem die Richtungsvektoren addiert, um die bevorzugte Richtung der Bakterien während der Runphasen zu ermitteln. Dies wurde in den genannten Abbildungen einmal mit Berücksichtigung der Länge der Richtungsvektoren (durchgezogene, rote Linie), sowie ohne Berücksichtigung (gepunktete, grüne Linie) durchgeführt.

Beim Wildtyp und bei ΔmotAB ist eindeutig zu erkennen, dass die Mehrzahl der Bakterien Runs durchführen, welche in Richtung Rand zeigen. Bei der ΔmotCD Mutante gibt es auch eine Tendenz der Runrichtungen hin zum nächstgelegenen Randstück der Kultur. Die Tendenz ist allerdings auch nicht eindeutig, was möglicherweise an der geringeren Anzahl an aufgenommenen Trajektorien und somit auch an der geringeren Anzahl an

Runphasen liegen könnte.

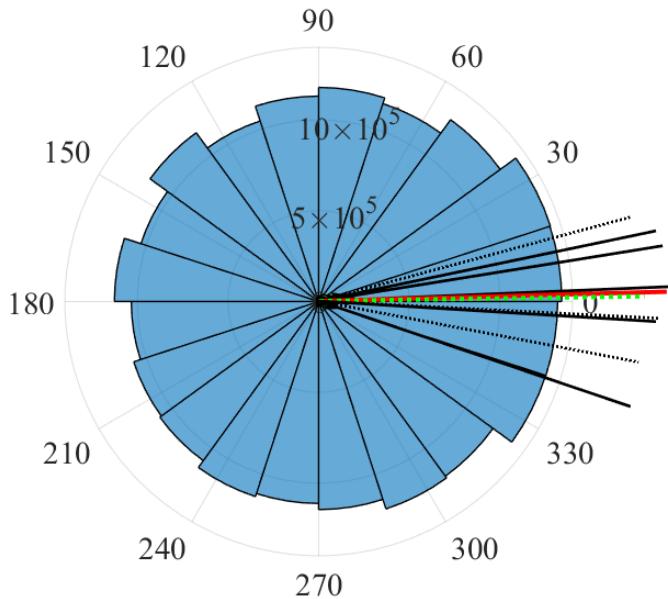


Abbildung 4.9: Kreishistogramm der Orientierung aller Runphasen der fünf Aufnahmen beim Wildtyp und einer Agarkonzentration von 0,25%. Die 0° -Richtung zeigt auf das nächstgelegene Randstück der Kultur. Somit zeigt die 180° -Richtung zum Zentrum der Zellkultur. Addiert man die Richtungsvektoren aller Runs auf, so zeigt der resultierende Vektor in Richtung der roten Linie. Normiert man zuvor die Richtungsvektoren und addiert dann alle Richtungsvektoren auf, so zeigt der resultierende Vektor in Richtung der grünen gestrichelten Linie. Die schwarzen gestrichelten bzw. nicht gestrichelten Linien zeigen in die bevorzugte Richtung von je einer der fünf Aufnahmen, wobei die gestrichelten schwarzen Linien die bevorzugte Richtung der einzelnen Aufnahmen bei Normierung der Richtungsvektoren darstellen. Teilweise liegen Richtungslinien übereinander, weswegen nicht alle sichtbar sind.

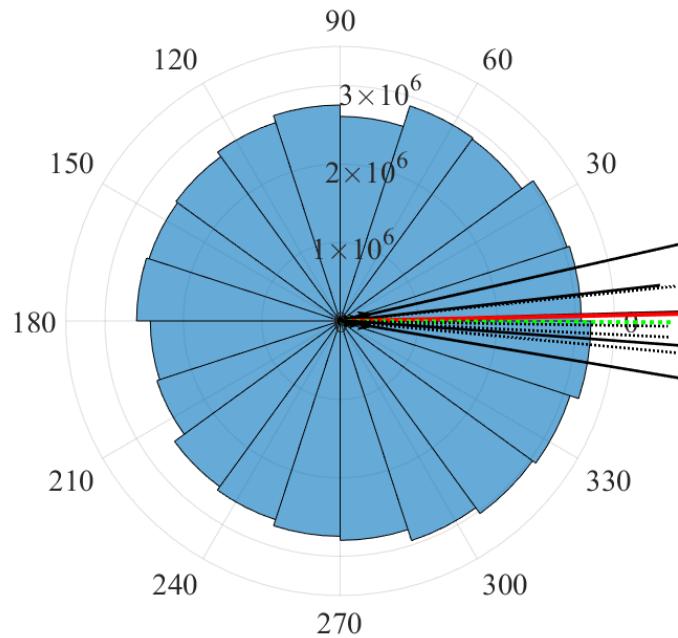


Abbildung 4.10: Kreishistogramm der Orientierung aller Runphasen der fünf Aufnahmen bei der $\Delta motAB$ Mutante und einer Agarkonzentration von 0,25%. Die schwarzen gestrichelten bzw. nicht gestrichelten Linien zeigen in die bevorzugte Richtung von je einer der fünf Aufnahmen. Weitere Angaben sind aus Abb. 4.9 zu entnehmen.

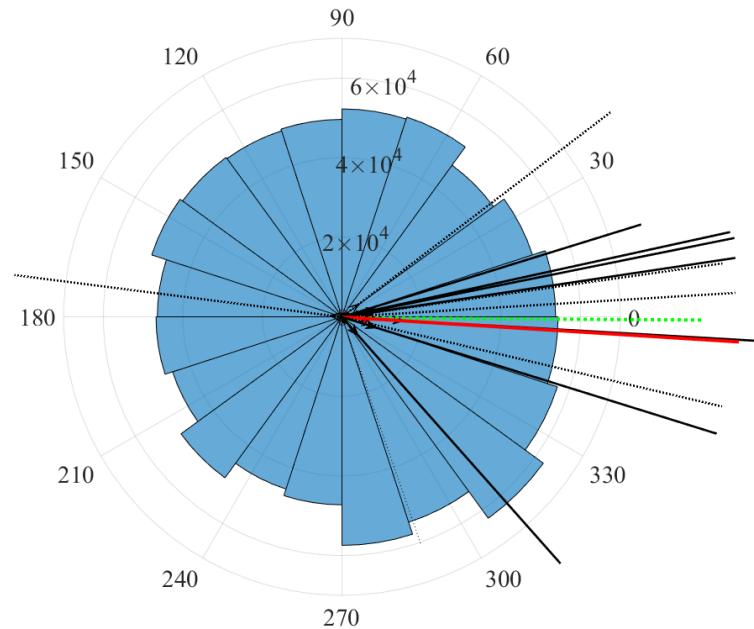


Abbildung 4.11: Kreishistogramm der Orientierung aller Runphasen der sieben Aufnahmen bei der $\Delta motCD$ Mutante und einer Agarkonzentration von 0,25%. Die schwarzen gestrichelten bzw. nicht gestrichelten Linien zeigen in die bevorzugte Richtung von je einer der sieben Aufnahmen. Weitere Angaben sind aus Abb. 4.9 zu entnehmen.

4.2.5 Geschwindigkeit während der Runphasen

Mit der Aufteilung der Trajektorien nach Runphasen und Events kann nun auch die durchschnittliche Geschwindigkeit der Runphasen untersucht werden. Zu beachten ist hierbei, dass aufgrund der gewählten Kriterien für den Unterscheidungsalgorithmus die Geschwindigkeit bei einem Run nicht unter $7\mu\text{m}/\text{s}$ liegen kann.

Aus Abbildung 4.12 kann herausgelesen werden, dass die Durchschnittsgeschwindigkeit der Runphasen vom Bakterienstamm abhängt. So sind die Geschwindigkeiten der Runphasen vom Wildtyp im Durchschnitt größer als die von der ΔmotAB Mutante. Die Geschwindigkeit der ΔmotCD Mutante ist wiederum im Durchschnitt größer als die vom Wildtyp.

Gleichzeitig ist keine Abhängigkeit von der Agarkonzentration erkennbar. In Abbildung 4.13 ist daher derselbe Zusammenhang ohne Unterscheidung nach Agarkonzentrationen aufgetragen.

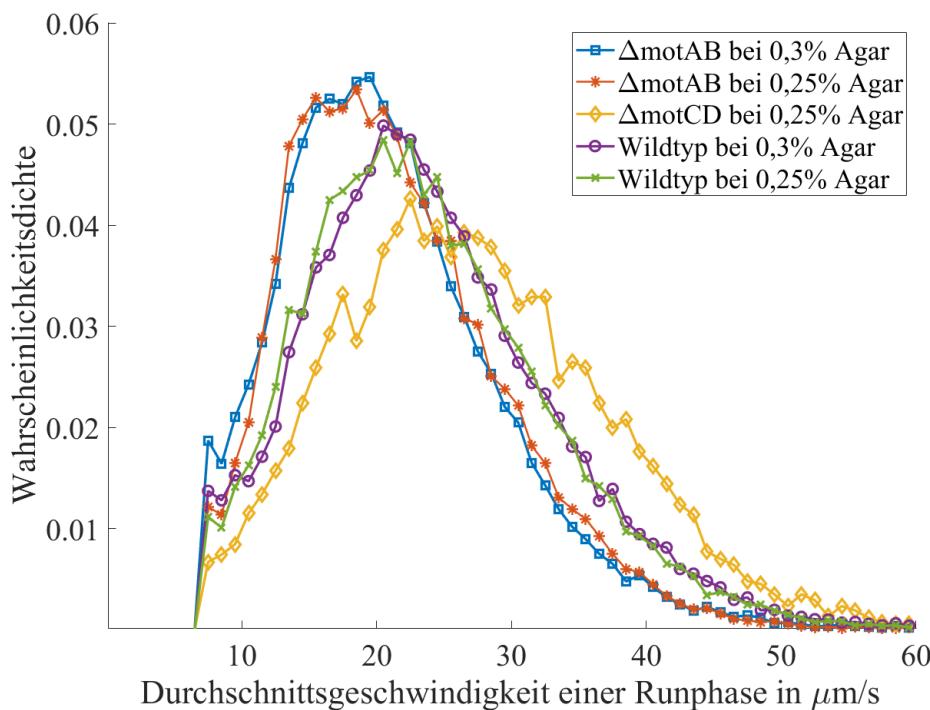


Abbildung 4.12: Wahrscheinlichkeitsdichte der Durchschnittsgeschwindigkeit einer Runphase mit Unterscheidung nach Agarkonzentration und Bakterienstamm

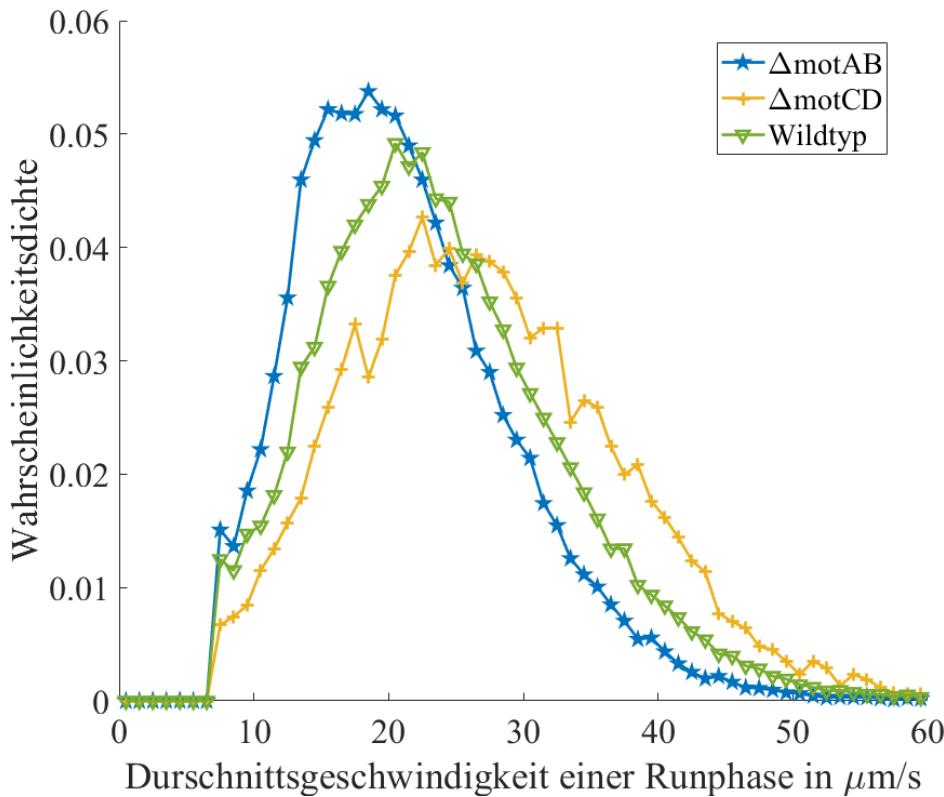


Abbildung 4.13: Wahrscheinlichkeitsdichte der Durchschnittsgeschwindigkeit einer Runphase mit Unterscheidung nach Bakterienstamm. Für jeden Datensatz wurden Daten der beiden Agarkonzentrationen 0,25% und 0,3% verwendet.

4.2.6 Eventdauer

In Abbildung 4.14 ist die Verteilung der Eventdauer in einem Log-Log Plot dargestellt.

Bei größeren Eventdauern kann man bei allen Datensätzen ein Potenzgesetz als Verteilung erkennen. Zu sehen ist, dass dieses Verhalten als Potenzgesetz bei höheren Konzentrationen des Agars später einsetzt. (Bei höheren Konzentrationen geschieht dies ab Datenpunkt 5; Bei niedrigen Konzentrationen ab Datenpunkt 3.). Bei geringen Zeiten bis 1,1 Sekunden ist kein Unterschied zwischen den einzelnen Datensets zu erkennen.

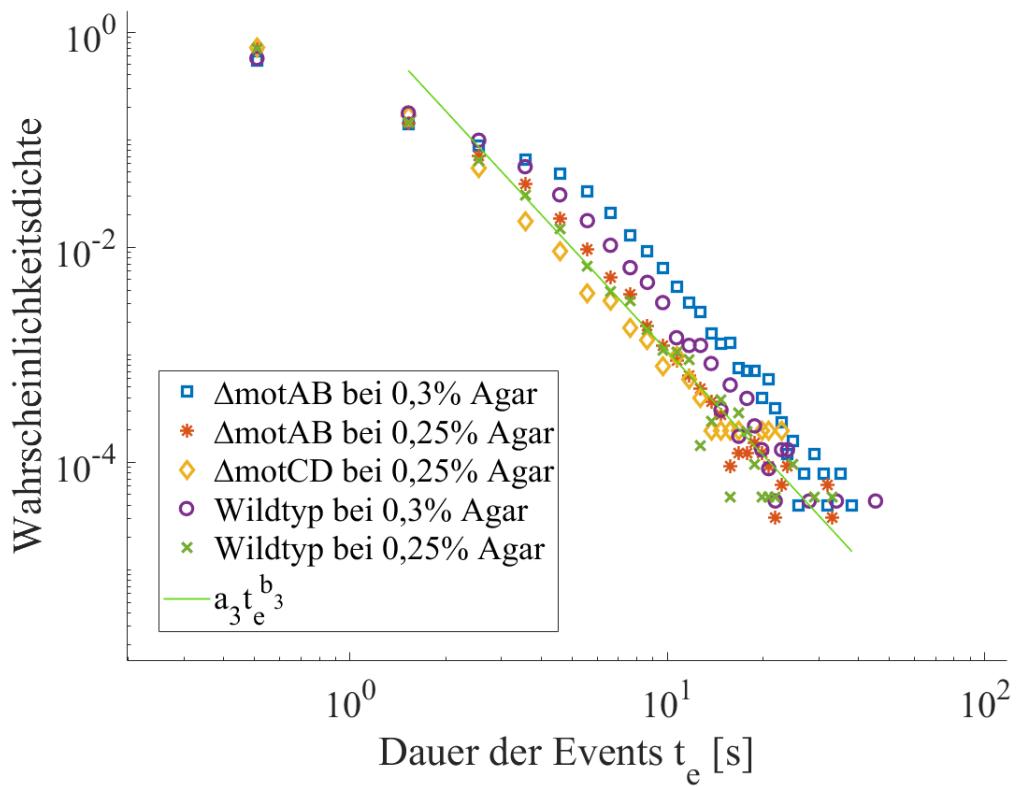


Abbildung 4.14: Wahrscheinlichkeitsdichte der Eventdauer mit logarithmierten Achsen.
In Grün ist eine Orientierungsgerade mit den Parametern $a_3 = 1,70 \text{ s}^{-b_3}$
und $b_3 = -3,20$ dargestellt.

5 Auswertung und Diskussion

Nachdem im vorherigen Kapitel 4 die Messergebnisse der mikroskopischen und makroskopischen Betrachtung der Motilität der *P. putida* Bakterien vorgestellt wurde, wollen wir diese nun analysieren, interpretieren und in einen Kontext bringen.

5.1 Ausbreitung von Bakterienkolonien

Zuerst wird sich mit den Ergebnissen aus Abschnitt 4.1 zur makroskopisch sichtbaren Ausbreitung der Bakterien in Agar befasst.

Die Beobachtung der schnelleren Ausbreitung der Bakterien in niedrigeren Agarkonzentrationen lässt sich damit erklären, dass bei höheren Konzentrationen von Agar ein Gelnetzwerk mit kleineren Porengrößen entsteht (vgl. [28]). Dadurch verkleinert sich die durchschnittliche freie Weglänge der Bakterien (vgl. [32]) und die Bakterien gelangen so häufiger in Traps, was ein Grund für die langsamere Ausbreitung sein könnte. Die Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen aus [32], wonach der Diffusionskoeffizient der dort betrachteten *E. coli* Bakterienkolonien bei porösen Medien mit kleinerer Porengröße abnimmt, also auch die Ausbreitungsgeschwindigkeit kleiner ist.

Der beobachtete lineare Zusammenhang zwischen Radius der Bakterienkultur $R(t)$ und der vergangenen Zeit wurde auch bereits von anderen Arbeiten (siehe dazu Abschnitt 2.3) bestätigt. Licata et al. [30] hatten dazu die Formel 2.1

$$R^2(t) = 4D\lambda t^2 - 4Dt \ln(4\pi\rho_0 Dt)$$

aufgestellt, welche neben der Diffusion der Bakterien auch die Wachstumsrate der Anzahl der motilen Bakterien mit einbezieht. Der Radius $R(t)$ erhält durch den ersten führenden Term ein lineares Erscheinungsbild [30], was wiederum zu den experimentellen Daten passt.

Weiterhin wurde beobachtet, dass das Fehlen der MotCD Statorkomplexe einen großen Einfluss auf die Ausbreitung der Zellkolonie in Agar hat. Während die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Bakterien mit Statorkomplex MotCD (also Wildtyp und $\Delta motAB$ Mutante) nicht signifikant voneinander abwichen, war die Ausbreitung der $\Delta motCD$ Mutante deutlich verlangsamt.

Betrachten wir nun dazu das Ergebnis aus Abschnitt 4.1.2, wonach die $\Delta motCD$ Mutante in 0,3%igem Agar bei der Zellteilung Zellhaufen mit mehreren Bakterien ausbildet, von denen sich wenn, dann nur ein kleiner Teil wieder löst, um weiterzuschwimmen. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Wachstumsrate λ der Anzahl motiler Bakterien bei der $\Delta motCD$ Mutante deutlich geringer ist, als beim Wildtyp bzw. bei der $\Delta motAB$ Mutante, bei welchen dieses Verhalten nicht beobachtet wurde. Ein Hinweis darauf ist

auch die geringe Anzahl an frei schwimmenden $\Delta motCD$ Bakterien, welche auch mit einer geringen Wachstumsrate der $\Delta motCD$ Mutante erklärt werden könnte. Mit dieser geringen Wachstumsrate könnte sich auch die geringere Ausbreitungsgeschwindigkeit der $\Delta motCD$ Kulturen erklären. Beim Einsetzen einer geringeren Wachstumsrate λ in die obere Gleichung 2.1 würde man für den Radius $R(t)$ der Kultur immer noch ein lineares Erscheinungsbild mit allerdings einem kleineren Anstieg erhalten. Dies passt zu dem beobachteten kleineren Anstieg bei der $\Delta motCD$ Mutante.

Aus der Beobachtung, dass bei der $\Delta motCD$ Mutante in der geringeren Agarkonzentration von 0,25% zusätzlich zur Zellhaufenbildung auch „normale“ Zellteilungen (wie in Abb. 4.3) zu sehen waren, kann man schließen, dass hier die Wachstumsrate motiler Zellen etwas höher als bei 0,3%igem Agar war.

Zu erwähnen ist, dass in vorherigen Untersuchungen zwischen den Wachstumsraten aller Bakterienstämme in flüssigem Medium kein Unterschied festzustellen war. Im flüssigen Medium ist allerdings auch nur die Zellteilungsrate von Bedeutung, während bei der Gelumgebung auch die Rate betrachtet werden muss, mit der Bakterien aufhören sich zu bewegen.

Aus Abschnitt 2.3 wissen wir, dass es neben der geringeren Wachstumsrate noch andere Gründe für eine langsamere Ausbreitung geben kann. Deshalb werden wir nun darauf eingehen, ob auch diese anderen Gründe in Frage kämen.

Ein möglicher Grund wäre, dass sich die $\Delta motCD$ Bakterien langsamer bewegen, als die Bakterien anderer Bakterienstämme. Gegen diese Theorie der langsameren Fortbewegungsgeschwindigkeit spricht, dass Toutain et al. bei der verwandten Bakterienart *Pseudomonas aeruginosa*, welche auch MotAB und MotCD Statoren besitzen und daher einen ähnlichen Fortbewegungsapparat haben, bei der Untersuchung in 0,3%igem Agar [57] keinen Unterschied in der Schwimmgeschwindigkeit der Mutanten und des Wildtyps feststellen konnte.

Auch bei bisherigen Arbeiten von Veronika Pfeifer aus der Biophysik-Arbeitsgruppe an der Uni Potsdam konnte nicht beobachtet werden, dass sich die $\Delta motCD$ Mutanten langsamer bewegen. Bei Untersuchungen in niedrigviskosen Flüssigkeiten wurde stattdessen das Gegenteil festgestellt. Hier waren die Bakterien der $\Delta motAB$ Mutante weniger motil und schwammen langsamer, als die Bakterien des Wildtyps bzw. der $\Delta motAB$ Mutante. In Abschnitt 4.2.5 konnte außerdem festgestellt werden, dass sich die $\Delta motCD$ Bakterien im Schnitt bei den Runphasen schneller bewegen als die Bakterien der anderen beiden Bakterienstämme. Abschließend lässt sich dazu zusammenfassen, dass eine langsame Fortbewegungsgeschwindigkeit nicht der Grund für die langsamere Ausbreitung sein kann.

Nach [47] und wie in 2.3 beschrieben, könnten zu häufige (instantane) Richtungsänderungen durch Turnevents oder zu seltene Richtungsänderungen Gründe für eine geringere Ausbreitung sein.

Würde das Bakterium zu häufig Richtungsänderungen durchführen, läge das langsamere Ausbreiten nicht an der Agarstruktur. Auch in flüssigen Medien wäre der Diffusionskoefizient klein, da das Bakterium nur sehr kurze Strecken zurücklegen würde. Diese These deckt sich aber nicht mit den allgemeinen Beobachtungen der Bewegung der motilen

Bakterien von $\Delta motCD$ in Agar, da mit bloßem Auge kein Unterschied zu den anderen Bakterienstämmen zu erkennen war, also keine instantanen Richtungsänderungen aufgefallen sind.

Würden die Bakterien zu selten ihre Richtung ändern, so würden sich diese langsamer aus den Traps befreien können. Dies liegt daran, dass sich die Bakterien in den Traps hin und her bewegen, bis sie einen Ausweg gefunden haben und bei weniger Richtungsänderungen der Vorgang des Findens länger dauert.

Unter der Annahme, dass die Turnrate in Flüssigkeit und im Gelnetzwerk gleich sind oder die Turnraten der unterschiedlichen Bakterientypen in Flüssigkeit im Vergleich zur Gelumgebung mit dem selben Faktor skalieren, könnte hierfür die Häufigkeit der Turns in flüssigen Medien untersucht werden. Dies ist notwendig, da die Länge der Runs im Agar zu sehr von der Porengröße bestimmt wird. Zu geringe Raten der Turnevents könnten so schwer nachgewiesen werden, da bevor es zu einem Turnevent kommt, das Bakterium meist schon mit dem Agarnetzwerk interagiert. Lange Strecken ohne (Turn)Event zu beobachten ist also nicht möglich.

Da uns die Daten in Flüssigkeit nicht vorliegen, kann stattdessen ein Blick auf die Dauer der Events geworfen werden. In Abbildung 4.14 ist aber nicht zu erkennen, dass die Dauer der Events bei $\Delta motCD$ länger wäre. Ganz im Gegenteil sind die Events im Schnitt kürzer als bei den anderen Bakterienstämmen. Also ist nicht davon auszugehen, dass die geringere Ausbreitungsgeschwindigkeit der $\Delta motCD$ Kultur mit einer geringeren Turneventrate begründet werden kann.

Zusammengefasst deutet alles darauf hin, dass die geringere Ausbreitung von $\Delta motCD$, welche mit dem Schwimmotilitätsassay von [46] erkennbar ist und in dieser Arbeit quantifiziert wurde, mit einer großen Wahrscheinlichkeit nicht mit einer geringeren Motilität und somit einem geringeren Diffusionskoeffizienten der Bakterien der $\Delta motCD$ Mutante in Agar begründet werden kann. Verantwortlich hierfür scheint stattdessen die Bildung von Zellhaufen (siehe Abbildung 4.4) und die daraus folgende geringere Wachstumsrate der Anzahl der motilen Bakterien λ zu sein.

5.2 Richtungsänderungen und Eventtypen

In Abschnitt 4.2.2 wurden die Richtungsänderungen bei Runphasen und Events untersucht. Hier wurde festgestellt, dass sich während der meisten Runphasen die Fortbewegungsrichtung der Bakterien kaum ändert, wie dies auch für die geradlinigen Fortbewegungsphasen zu erwarten ist.

An der bimodalen Wahrscheinlichkeitsdichte bei den Events kann man erkennen, dass die Bakterien mit einer hohen Wahrscheinlichkeit entweder eine Richtungsänderung um 180° durchführen oder ohne bzw. mit einer geringen Richtungsänderung nach dem Event weiterschwimmen. Vergleichen wir dies mit den Eventtypen, die wir für die Fortbewegung in Agar erwarten (siehe 2.1), so kann erkannt werden, dass die Wahrscheinlichkeitsdichte aus Abbildung 4.6 zu den erwarteten Eventtypen passt und die Erwartung bestätigt. Das Maximum um eine Richtungsänderung von $\varphi = 0$ lässt sich hierbei durch die kurzen Stopevents erklären, bei denen das Bakterium sich nach den Stops in die selbe Richtung weiterbewegt und welches bereits in Flüssigkeit beobachtet wurde [7]. Das Maximum bei

$\varphi = \pi$ passt zu zwei der Eventtypen. Eines ist hierbei das kurze Turnevent, welches auch in flüssigem Medium vorkommt. Das zweite ist das Trapevent, bei dem sich ein Bakterium an einer schmalen Stelle des Gelnetzwerkes festschwimmt und nicht mehr vorankommt. Wenn wir davon ausgehen, dass das Bakterium die Gelstruktur nicht zu zerstören vermag, so kann sich das Bakterium erst aus einem Trap befreien, wenn es dafür in entgegengesetzter Richtung aus dem „Eingang“ des Traps wieder herausschwimmt. In diesem Fall wäre die Richtungsänderung des Bakterium während eines Traps $\varphi = \pi$.

Diese Zuordnung soll nun damit überprüft werden, dass zwischen kurzen Events und langen Events unterschieden wird, was mit einem Schwellenwert $t_{Schwelle}$ erreicht wird. Liegt die Dauer eines Events über $t_{Schwelle}$, so wird es den langen Events zugeordnet. Events kürzerer Dauer werden den kurzen Events zugeordnet.

Da die Angaben für die Dauer der kurzen Events von 0,13s bis 1s reicht (siehe Tabelle 2.1), wird der Schwellenwert auf $t_{Schwelle} = 1\text{s}$ festgelegt. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.1 zu sehen.

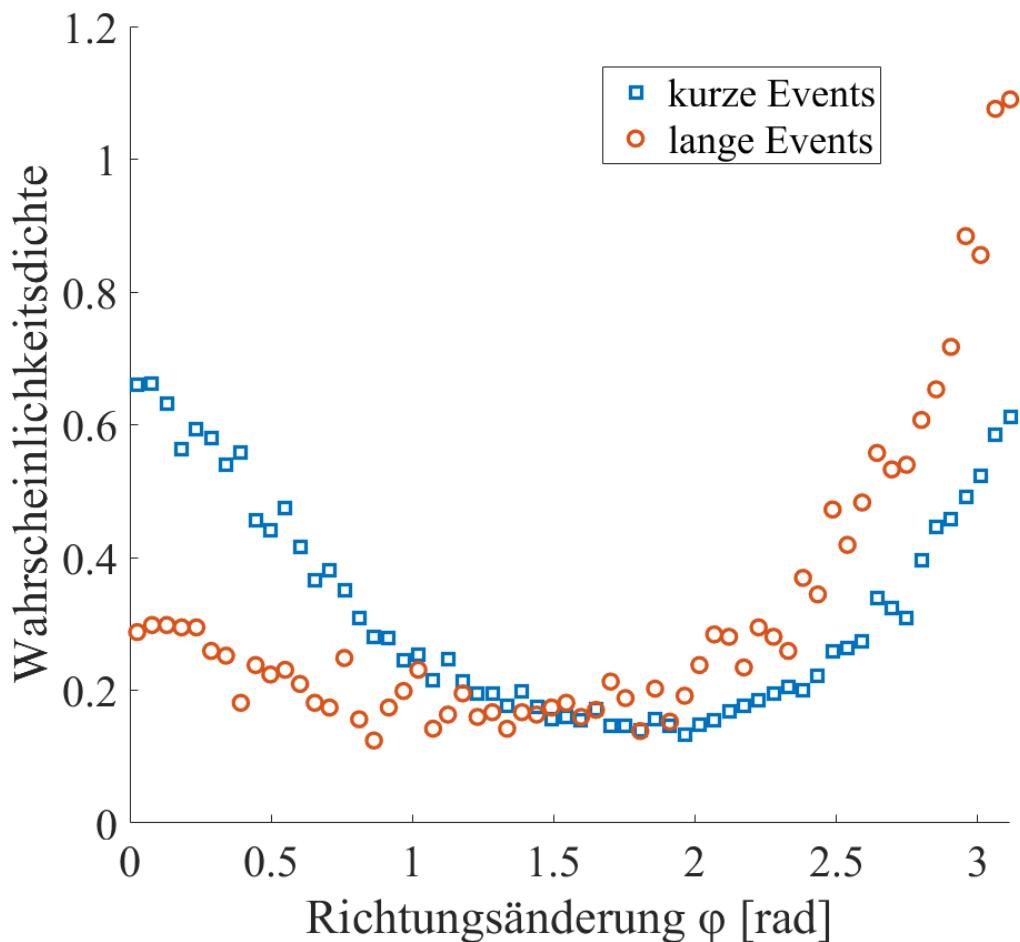


Abbildung 5.1: Wahrscheinlichkeitsdichte der Richtungsänderung während eines kurzen bzw. eines langen Events. Für die Dauer eines langen Events t_e gilt $t_e > 1\text{s}$. Alle anderen Events sind kurze Events. Zu sehen sind die Daten für den Wildtyp bei einer Agarkonzentration von 0,25%.

Das Ergebnis deckt sich größtenteils mit den formulierten Erwartungen. So sind bei den

kurzen Events eindeutige Maxima um $\varphi = 0$ und $\varphi = \pi$ zu erkennen, welche zu den kurzen Eventtypen Stop und Turn passen. Bei den langen Events ist ein Maximum bei $\varphi = \pi$ zu erkennen, welches bestätigt, dass sich Bakterien mit einer großen Wahrscheinlichkeit nach einem Trap in entgegengesetzter Richtung weiterbewegen. Daraus kann man schließen, dass wie vermutet die meisten Bakterien einen Trap wieder durch den Eingang des Traps verlassen. Entgegen der Erwartungen gibt es ein kleines lokales Maximum bei langen Events bei $\varphi = 0$, welches auch bei größeren Schwellenwerten von $t_{Schwelle}$ nicht verschwindet (getestet wurden Schwellenwerte bis $t_{Schwelle} = 3\text{s}$). Drei Erklärungen sind hierfür möglich:

1. Die Verteilung der Dauer von Stopevents könnte so sein, dass es auch noch Stopevents mit einer deutlich größeren Dauer als 1s gibt. Hierfür müsste die genaue Verteilung in zukünftigen Arbeiten näher untersucht werden.
2. Es könnte Trapevents geben, bei denen die Bakterien, entgegen der Annahme dieser Arbeit, das Gelnetzwerk so verändern können, dass sie sich den Weg bei engen Stellen „freischwimmen“ können. Zukünftige Arbeiten müssten klären, ob Beispiele für diese Situation in den Daten gefunden werden können. Außerdem könnte eine theoretische Betrachtung von der Größe der Kräfte, die das Bakterium bei einer Schwimmbewegung aufbringen kann, sowie eine Betrachtung der Kraft, welche notwendig, um das Gelnetzwerk zu verändern, hilfreich sein um diese These mit Sicherheit bestätigen zu können.
3. Das Maximum könnte auch auf Fehler in der Eventerkennung hinweisen. In Abschnitt 3.5.2.2 wurde bereits beschrieben, dass nicht alle Zeitpunkte in den Trajektorien korrekt zugeordnet wurden. Werden Runs fälschlicherweise als Traps charakterisiert, so kann dies eine erhöhte Wahrscheinlichkeitsdichte bei $\varphi = 0$ erklären.

Das hier gefundene experimentelle Ergebnis der Verteilung der Events und der Runphasen ist dabei ähnlich zu dem von Bhattacharjee und Datta (siehe Abbildung 5.2). Ein Unterschied ist hierbei, dass das dort untersuchte Bakterium *E. coli* keine Stopevents ausführt. Deshalb ist in diesem Paper auch kein deutliches Maximum der Wahrscheinlichkeitsdichte bei $\varphi = 0$ zu erkennen. Bei der größten durchschnittlichen Porengröße ($3,6\mu\text{m}$) gibt es davon abweichend ein erkennbares Maximum bei $\varphi = 0$, was möglicherweise darauf hinweist, dass bei diesen großen Porengrößen die Kraft von *E. coli* Bakterien ausreicht um die umliegende Hydrogelkugelchenmatrix zu verändern, sodass es die verengten Stellen passieren kann.

Im Paper wird von einer breiten Verteilung der Messergebnisse gesprochen und daraus interpretiert, dass die Zellen die Traps in einer zufälligen Richtung verlassen. Denkbar wäre aber stattdessen auch, dass die Eventerkennung von Bhattacharjee und Datta, die bereits im Kapitel 3.5.2.2 vorgestellt wurde, die Traps nicht optimal erkennt. Für diese Bachelorarbeit wurde diese Erkennung genau für diesen Zweck, der besseren Erkennung von Traps, optimiert. Würde die Traperkennung schlechter funktionieren und würden Wackelbewegungen während eines Traps als kleine Runs erkannt werden, so könnte es die breitere Verteilung erklären.

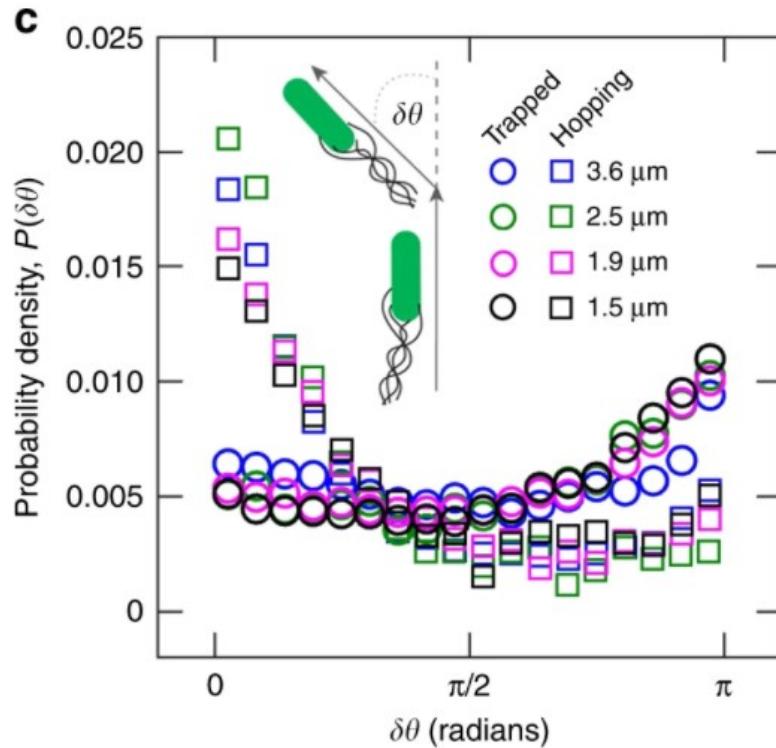


Abbildung 5.2: Zitat aus der Bildunterschrift: „Distribution of reorientation angle for all hops (squares) and all traps (circles); legend indicates characteristic pore sizes of the different media. $P(\delta\theta)$ of hops is peaked at $\delta\theta = 0$, indicating that hops are highly directed, while $P(\delta\theta)$ of traps is broadly distributed, indicating that motions of trapped cells are randomly oriented“ [32, Abbildung 3c]

Im Methodikteil wurde bereits erwähnt, dass die gemessenen Richtungsänderungen so durch das 2D Trackingverfahren beeinflusst werden können, dass Richtungsänderungen mit $\varphi > \pi/2 = 90^\circ$ größer eingeschätzt werden und Richtungsänderungen mit $\varphi < \pi/2 = 90^\circ$ kleiner eingeschätzt werden[7, 56]. Um diesen Fehler zu untersuchen sollte diese Messung mit einer 3D Trackingmethode (siehe bspw. [56] oder [58]) wiederholt werden.

5.3 Mittlere quadratische Verschiebung

In Abschnitt 4.2.1 ist die mittlere quadratische Verschiebung der Bakterien in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

Für die MQV können zwei unterschiedliche Regime erkannt werden, für welche beispielhaft zwei Fitfunktionen an der Kurve des Wildtyps bei 0,3% gefittet wurden.

Bei beiden Regimen handelt es sich um anomale Diffusion, bei welchen die MQV proportional zu τ^b ist. Genauer handelt es sich beim vorderen Regime (gestrichelte Linie) um ein superdiffusives Regime ($b_1 = 1,81 > 1$), welches dann in ein subdiffusives ($b_2 = 0,53 < 1$) Regime im hinteren Teil der Kurve übergeht. Damit ist das gefundene Ergebnis ähnlich zu dem Ergebnis von Bhattacharjee et. al, welche bei der Untersuchung von *E. coli* in einem porösen Medium auch ein superdiffusives und ein subdiffusives Regime

feststellten[32].

Das erste Regime beschreibt die kurzzeitige Bewegung innerhalb einer Pore. Hierfür wird ein ballistisches Verhalten mit einem Exponenten $b = 2$ erwartet[32]. Der hier gefundene Koeffizient liegt mit $b_1 = 1,81$ etwas unter dieser Erwartung, was aber damit begründet werden kann, dass manche Bakterien zu Beginn in einem Trap gefangen sind und sich daher zu Beginn der Trajektorie gar nicht bewegen. Mittelt man nun über alle Bakterien, die zum Startzeitpunkt eine Runphase ausführen oder sich in einem Trap befinden, so erhält man einen Exponenten, welcher niedriger ist als der erwartete.

Für größere Zeiten geht nun die Kurve in das Regime über, welches den Übergang von einem Porenraum in den nächsten und von da in den übernächsten usw. beschreibt. Dies ist ein subdiffusives Verhalten, da die Bakterien sich vorübergehend in Traps verfangen können und sich in dieser Zeit nicht mehr fortbewegen können[32]. Wie zu erkennen ist, gehen die Kurven für die niedrigere Agarkonzentration erst später in das subdiffusive Regime über. Dies liegt daran, dass hier die durchschnittliche Porengröße größer ist, was zu einer größeren mittleren freien Weglänge führt und was ein längeres ballistisches bzw. superdiffusives Verhalten zur Folge hat.

5.4 Runphasen

5.4.1 Geschwindigkeiten

In Kapitel 4.2.5 wurden die Ergebnisse zur Geschwindigkeitsmessung der Runphasen vorgestellt. Hierfür wurde die Wahrscheinlichkeitsdichte der Durchschnittsgeschwindigkeiten der Runs ausgerechnet. Hierbei wurde festgestellt, dass es eine Abhängigkeit vom Bakterienstamm gibt, wonach sich die $\Delta motCD$ im Mittel am schnellsten während der Runphasen bewegen, gefolgt vom Wildtyp und $\Delta motAB$. Möglicherweise deckt sich dies mit den schon in Abschnitt 5.1 erwähnten Beobachtungen von Veronika Pfeifer, wonach $\Delta motAB$ Bakterien in Flüssigkeit weniger motil (also langsamer) waren als Bakterien des Wildtyps bzw. $\Delta motCD$ Bakterien.

Aus der mikroskopischen Betrachtung konnte nun eine größere Motilität der $\Delta motCD$ Mutante festgestellt werden.

Außerdem wurde in Abbildung 4.12 festgestellt, dass die Geschwindigkeit der Runphase in Agargel nicht von der Agarkonzentration abhängt. Dies ist damit zu erklären, dass sich bei höheren Konzentrationen nicht die Viskosität verändert, wie das z.B. bei Experimenten mit Ficol der Fall ist und woraufhin sich die Geschwindigkeit der Bakterien verändern würde (siehe dafür beispielsweise [59, Abbildung 3]). Die Viskosität des Lösungsmittels im Inneren der Gelstruktur bleibt die selbe. Was sich verändert ist die Porengröße, welche allerdings, wie oben beschrieben, nur zu einer veränderten Länge der Runs führt und nicht zu einer Veränderung in der Durchschnittsgeschwindigkeit.

Wie bereits im Methodikteil erwähnt wurde, können die Geschwindigkeiten in der von uns verwendeten 2D Trackingmethode unterschätzt werden [7], was alle Mutanten bzw. Agarkonzentrationen gleich beeinflussen würde. Das qualitative Erscheinungsbild der Geschwindigkeitsverteilungen wäre dadurch nicht beeinflusst.

5.4.2 Länge und Dauer

Die Ergebnisse zur Länge und Dauer der Runphasen (Kapitel 4.2.3) zeigen, dass die Wahrscheinlichkeitsdichten der beiden Größen einem exponentiellen Zusammenhang folgen.

Bhattacharjee et al. haben bei ihren Experimenten in einem porösen Medium festgestellt, dass die Runlänge durch die Längenverteilung von geraden Strecken im porösen Medium bestimmt ist[32], was auch so zu erwarten ist, da die Länge eines Runs durch die Länge einer geraden Strecke im Raum limitiert ist. Auch Bhattacharjee et al. stellten eine exponentielle Verteilung der Länge der Runs und eine passende exponentielle Verteilung der Länge gerader Strecken fest, woraus wir für unsere Agargelumgebung auch auf eine exponentielle Längenverteilung der geraden Strecken im Gel erwarten können.

Unter der Annahme, dass die Geschwindigkeit eines Runs als konstant angesehen werden kann und diese Geschwindigkeit für jeden Bakterienstamm um einen Durchschnittswert streut, ist zu erklären, dass auch die Rundauer ein exponentielles Verhalten zeigt, da dann die Länge proportional zur Dauer wäre ($s = vt$). Dass die einzelnen Bakterienstämme unterschiedliche Durchschnittsgeschwindigkeiten haben, wonach man für die einzelnen Bakterienstämme eine unterschiedliche Steigung des linearen Verlaufs im Log-Lin-Plot erwarten würde, ist in Abbildung 4.7 nicht zu erkennen. Wahrscheinlich sind hierfür die Messungenauigkeiten zu groß.

5.4.3 Orientierung

In Abschnitt 4.2.4 wurde die Orientierung der Runphasen untersucht. Hier wurde festgestellt, dass Runs in Richtung der Ausbreitung der Kulturgrenze häufiger vorkommen, als Runs in Richtung der Kulturmitte. Dieses Ergebnis stimmt mit Untersuchungen von Bhattacharjee et al. überein, welche bei Experimenten mit *E. coli* in einer Hydrogelkugelchen-Umgebung auch eine Tendenz der Orientierung der Runphasen in Ausbreitungsrichtung der Kultur feststellten [60]. Hinweise auf ein solches Verhalten von *E. coli* gab es auch schon in früheren Arbeiten [61, 62].

In [60] wird darauf hingewiesen, dass es sich dabei um einen zweiten Methode zur Chemo-taxis handeln könnte, da die Bakterien so versuchen die Runrichtung an den Nährstoffgradienten anzupassen, welcher durch den Metabolismus der Bakterien entsteht.

In porösen Medien ist die Durchführung der ersten Chemotaxismethode (beschrieben in Kapitel 2.2.4), welche auf der Anpassung der Runlänge beruht, für die Bakterien nicht anwendbar. Dies liegt daran, dass die Runlänge in porösen Medien von der freien Weglänge, also von der Porengröße des Mediums abhängt. Dieser Zusammenhang wurde bereits in 5.4.2 diskutiert.

Mit *P. putida* kennen wir nun ein weiteres Bakterium, welches möglicherweise diese zweite Chemotaxismethode ausführt. Um das Ergebnis zu bestätigen sollten in Zukunft Mutanten mit entfernten Chemotaxisgenen auf diese Tendenz der Runrichtung untersucht werden.

5.5 Eventdauer

In Abschnitt 4.2.6 ist das Ergebnis der Messung der Eventdauer zu erkennen. Zu erkennen sind zwei Regime, welche je nach Konzentration in einem unterschiedlichen Zeitbereich

aufreten.

Das erste Regime verläuft vom ersten Datenpunkt bis zum zweiten Datenpunkt (bei 1s, bei 0,25%igem Agar) bzw. bis zum vierten Datenpunkt (bei 1,2s bei 0,3%igem Agar). In diesem Regime liegen die Datenpunkte der einzelnen Bakterienstämme am selben Ort und bilden im Log-Log-Plot eine flache Gerade. Es lässt sich darauf schließen, dass wir hier das Regime der kurzen Events (Stop und Turn) betrachten. Da hierbei keine Unterschiede zwischen den einzelnen Bakterienstämmen erkannt werden kann, können wir also davon ausgehen, dass die Stop- und Turnevents bei allen Bakterienstämmen gleich schnell durchgeführt werden.

Beim zweiten Regime handelt es sich um das Regime der Traps. Hier ist eine steilere Gerade im Log-Log-Plot zu erkennen, was anzeigt, dass sich die Wahrscheinlichkeitsdichte wie ein Potenzgesetz verhält, was zu den Ergebnissen von Bhattacharjee et al. [32] passt, da hier auch ein Potenzgesetz festgestellt wurde.

Warum das zweite Regime bei höheren Konzentrationen erst später einsetzt, ist nicht geklärt. Im zweiten Regime ist ein Unterschied zwischen den Bakterienstämmen und der Agarkonzentration zu erkennen. In der jeweiligen Konzentration ist die Wahrscheinlichkeitsdichte für alle Trapeventdauern (wenn wir die sehr großen Eventdauern aufgrund der wenigen Daten nicht mit einbeziehen) bei $\Delta motAB$ höher als beim Wildtyp. Außerdem ist die Wahrscheinlichkeitsdichte bei einer hohen Agarkonzentration generell höher.

Dies könnte aus dem Verhältnis der Anzahl kurzer Events zu der Anzahl größerer Events zusammenhängen. Das Ergebnis lässt sich also so interpretieren, dass für $\Delta motAB$ mehr lange Traps im Vergleich zu den kurzen Stops und Turns aufgenommen wurden. Das selbe gilt für die Konzentration: Bei hohen Konzentrationen ist die Porengröße geriner, wodurch die freie Weglänge geringer wird und die Bakterien im Schnitt weniger Stops und Turns ausführen können, aber schneller mit einer Wand oder einer engen Stelle interagieren und somit öfter gefangen sind und somit mehr Traps als Stop und Turns aufgenommen werden. Wieso es hier einen Unterschied zwischen den einzelnen Bakterienstämmen gibt, lässt sich nicht so einfach erklären. Möglich ist, dass eine unterschiedliche Eventrate der Bakterien zu diesem Effekt führt.

6 Zusammenfassung und Fazit

In dieser Arbeit wurde die Motilität von *P. putida* über verschiedene makroskopische und mikroskopische Kennzahlen (Ausbreitungsgeschwindigkeit der Kulturen, Länge, Dauer, Geschwindigkeit und Orientierung der Runphasen, Dauer und Richtungsänderung der Events, sowie die mittlere quadratische Verschiebung) in Agargel charakterisiert. Hierfür wurde ein Trackingalgorithmus auf die neue Gelumgebung angepasst, um so automatisiert die Daten auswerten zu können. Die genannten Kennzahlen wurden für zwei verschiedene Agarkonzentrationen und für den Wildtyp, sowie die Mutanten $\Delta motAB$ und $\Delta motCD$ ermittelt, um einerseits einen Zusammenhang mit der Porengröße des Agargels herstellen zu können und andererseits Rückschlüsse auf die Funktionsweise bzw. die Verwendung der MotCD und MotAB Statorkomplexe in *P. putida* Bakterien ziehen zu können.

In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die Porengröße vor allem einen Einfluss auf die Dauer bzw. die Länge der Runphasen hat, da die Bakterien eine kürzere freie Weglänge haben. Dadurch ist auch eine geringere Ausbreitungsgeschwindigkeit der Kultur bei kleineren Porengrößen feststellbar.

Bei dem Vergleich zwischen der mikroskopischen und makroskopischen Untersuchung der $\Delta motCD$ Mutante wurde festgestellt, dass die $\Delta motCD$ Mutante in Agar „Zellhaufen“ bei der Zellteilung ausbildet. Dieses Verhalten konnte bei den anderen beiden Bakterienstämmen nicht beobachtet werden, wodurch bei $\Delta motCD$ weniger motile Bakterien erkennbar waren, was auch der Hauptgrund für die geringere makroskopische Ausbreitung dieser Zellkultur in Agar war. Rückschlüsse auf die Motilität der sich bewegenden Zellen von $\Delta motCD$ konnten durch diese makroskopische Beobachtung also nicht gemacht werden. Bei der mikroskopischen Betrachtung von $\Delta motCD$ konnte jedoch festgestellt werden, dass die Schwimmgeschwindigkeit leicht höher ist als die der anderen Bakterienstämme. Dies verdeutlicht, dass man bei einem makroskopischen Motilitätsassay (wie bspw. [46]) auch immer die Kultur mikroskopisch untersuchen muss, um andere Faktoren für eine geringere makroskopische Ausbreitung ausschließen zu können. Hierbei bleibt die Frage bestehen, welchen Einfluss der MotCD Stator auf die Zellteilung oder das Loslösen von solchen Bakterienhaufen hat. Einen genauen Hinweis darauf, ob einer der Statoren für die eigentliche Motilität¹ in porösen Medien besonders wichtig ist, konnte nicht festgestellt werden.

Mit Hilfe der Daten für die Richtungsänderungen bei Events konnten die erwartbaren Eventtypen Stop, Turn und Trap in Agar erkannt werden und von den Runphasen unterschieden werden. Stop, Turn und Run sind dabei Teil der auch in Flüssigkeit beobachtbaren Schwimmbewegung von *P. putida*. Traps treten in porösen Medien auf, da die Bakterien sich im Gelnetzwerk verfangen. Durch mehrere Richtungsänderungen auf kleinem Raum, können sich die Bakterien wieder aus den Traps befreien. Die Traps konnten auch am Langzeitverlauf der mittleren quadratischen Verschiebung der Bakterien erkannt werden, welcher dadurch subdiffusiv ist.

¹im Sinne ob sich motile Bakterien bestimmter Mutanten besonders gut durch das Gelnetzwerk fortbewegen können

Bei der näheren Untersuchung der Orientierung der Runphasen konnte eine Tendenz in Richtung des Nährstoffgradienten festgestellt werden. Dies deutet auf ein chemotaktisches Verhalten hin, bei welchem das Bakterium die Richtung der Runphasen aktiv beeinflusst. Hinweise hierfür konnten bereits bei Untersuchungen von *E. coli* gefunden werden [60, 61, 62]. Zur weiteren Untersuchung sollten hier Mutanten von *P. putida* mit fehlenden Chemotaxisrezeptoren betrachtet werden. Zeigen diese ein solches Verhalten nicht, würde dies die hier getroffene Vermutung unterstützen.

Während dieser Arbeit kamen noch weitere Fragen auf, welche zukünftig untersucht werden müssten. Um die Vergleichbarkeit zu anderen porösen Medien zu verbessern, müsste die Porengröße der unterschiedlichen Agarkonzentrationen bestimmt werden. Bisher gibt es dazu nur Schätzungen (vgl. [27]).

Weiterhin sollte untersucht werden, ob Bakterien die Gelstruktur verändern bzw. zerstören können. Hierfür könnten die aufgenommenen Trajektorien untersucht werden, um Beispieltrajektorien zu finden, bei denen Bakterien ihren Weg „frei gekämpft“ haben und sich nach einem Trap in derselben Richtung weiterbewegen.

Um in zukünftigen Arbeiten den Eventerkennungsalgorithmus soweit zu verbessern, dass zwischen Stop, Turn und Trap unterschieden werden kann, muss die genaue Verteilung der Eventdauer bei Stop und Turnevents bestimmt werden. Bisher findet man unterschiedliche Angaben dazu (siehe Tabelle 2.1).

Des Weiteren sollte darüber nachgedacht werden andere poröse Medien, wie Hydrogalkugeln, zur weiteren Untersuchung zu verwenden, da Agar ein Naturprodukt ist und die Gelierfähigkeit zwischen einzelnen Chargen leicht variieren kann. Agarose eignete sich bei den durchgeführten Experimenten nicht als Alternative.

Schlussendlich kann man in zukünftigen Arbeiten mit dem hier erworbenen Wissen ein Modell entwickeln, welches mit einer Simulation und unter Abgleich mit dem makroskopischen Verhalten der Bakterien überprüft werden kann.

Literatur

- [1] Ignacio Poblete-Castro, Judith Becker, Katrin Dohnt, Vitor Martins Dos Santos und Christoph Wittmann. „Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida* and related species“. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 93.6 (2012), S. 2279–2290. ISSN: 01757598. DOI: [10.1007/s00253-012-3928-0](https://doi.org/10.1007/s00253-012-3928-0).
- [2] Ting Gong, Xiaoqing Xu, Yulei Dang, Annie Kong, Yunbo Wu, Peixin Liang, Shufang Wang, Huilei Yu, Ping Xu und Chao Yang. „An engineered *Pseudomonas putida* can simultaneously degrade organophosphates, pyrethroids and carbamates“. In: *Science of the Total Environment* 628-629 (2018), S. 1258–1265. ISSN: 18791026. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2018.02.143](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.143). URL: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.143>.
- [3] G. J. Zylstra, W. R. McCombie, D. T. Gibson und B. A. Finette. „Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1: genetic organization of the tod operon.“ In: *Applied and environmental microbiology* 54.6 (1988), S. 1498–1503. ISSN: 00992240. DOI: [10.1128/aem.54.6.1498-1503.1988](https://doi.org/10.1128/aem.54.6.1498-1503.1988).
- [4] Pablo I. Nikel und Víctor de Lorenzo. „*Pseudomonas putida* as a functional chassis for industrial biocatalysis: From native biochemistry to trans-metabolism“. In: *Metabolic Engineering* 50.May (2018), S. 142–155. ISSN: 10967184. DOI: [10.1016/j.ymben.2018.05.005](https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.05.005). URL: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.05.005>.
- [5] Anita Loeschke und Stephan Thies. „*Pseudomonas putida* - a versatile host for the production of natural products“. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 99.15 (2015), S. 6197–6214. ISSN: 14320614. DOI: [10.1007/s00253-015-6745-4](https://doi.org/10.1007/s00253-015-6745-4).
- [6] Stefanie B. Costa-Gutierrez, María Jesús Lami, María Carolina Caram Di Santo, Ana M. Zenoff, Paula A. Vincent, María Antonia Molina-Henares, Manuel Espinosa-Urgel und Ricardo E. de Cristóbal. „Plant growth promotion by *Pseudomonas putida* KT2440 under saline stress: role of eptA“. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 104.10 (2020), S. 4577–4592. ISSN: 14320614. DOI: [10.1007/s00253-020-10516-z](https://doi.org/10.1007/s00253-020-10516-z).
- [7] Matthias Theves, Johannes Taktikos, Vasily Zaburdaev, Holger Stark und Carsten Beta. „A Bacterial Swimmer with Two Alternating Speeds of Propagation“. In: *Biochemical Journal* 105.8 (2013), S. 1915–1924. ISSN: 0006-3495. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bj.2013.08.047>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349513010217>.
- [8] Veronika Waljur. „Adaptation von *Pseudomonas putida* an die Lockstoffe Casaminoäuren und Benzoat“. Bachelorarbeit. Universität Potsdam, 2016.
- [9] Marius Hintsche. „Locomotion of a bacterium with a polar bundle of flagella“. Dissertation. Universität Potsdam, 2018.

- [10] Marius Hintsche, Veronika Waljor, Robert Großmann, J. Kühn Marco, Kai M. Thormann, Fernando Peruani und Carsten Beta. „A polar bundle of flagella can drive bacterial swimming by pushing, pulling, or coiling around the cell body“. English. In: *Scientific Reports (Nature Publisher Group)* 7 (Dez. 2017), S. 1–10. URL: <https://www.proquest.com/scholarly-journals/polar-bundle-flagella-can-drive-bacterial/docview/1970989685/se-2?accountid=14491>.
- [11] Zahra Alirezaeizanjani, Robert Großmann, Veronika Pfeifer, Marius Hintsche und Carsten Beta. „Chemotaxis strategies of bacteria with multiple run modes“. In: *Science Advances* 6.22 (2020). ISSN: 23752548. DOI: [10.1126/sciadv.aaz6153](https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz6153).
- [12] Yogesh Kumar Negi, Deepti Prabha, Satyendra K. Garg und J. Kumar. „Genetic Diversity Among Cold-Tolerant Fluorescent *Pseudomonas* Isolates from Indian Himalayas and Their Characterization for Biocontrol and Plant Growth-Promoting Activities“. In: *Journal of Plant Growth Regulation* 30.2 (2011), S. 128–143. ISSN: 07217595. DOI: [10.1007/s00344-010-9175-7](https://doi.org/10.1007/s00344-010-9175-7).
- [13] Susanna K. Remold, Christopher K. Brown, Justin E. Farris, Thomas C. Hundley, Jessica A. Perpich und Megan E. Purdy. „Differential Habitat Use and Niche Partitioning by *Pseudomonas* Species in Human Homes“. In: *Microbial Ecology* 62.3 (2011), S. 505–517. ISSN: 00953628. DOI: [10.1007/s00248-011-9844-5](https://doi.org/10.1007/s00248-011-9844-5).
- [14] Susanna K. Remold, Megan E. Purdy-Gibson, Michael T. France und Thomas C. Hundley. „*Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* species group recovery from human homes varies seasonally and by environment“. In: *PLoS ONE* 10.5 (2015), S. 1–19. ISSN: 19326203. DOI: [10.1371/journal.pone.0127704](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127704).
- [15] L. Ázaro Molina, Cayo Ramos, Estrella Duque, M. Carmen Ronchel, Juan M. García, Lene Wyke und Juan L. Ramos. „Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions“. In: *Soil Biology and Biochemistry* 32.3 (2000), S. 315–321. ISSN: 00380717. DOI: [10.1016/S0038-0717\(99\)00156-X](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00156-X).
- [16] F. C.H. Franklin, M. Bagdasarian, M. M. Bagdasarian und K. N. Timmis. „Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78.12 II (1981), S. 7458–7462. ISSN: 00278424. DOI: [10.1073/pnas.78.12.7458](https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7458).
- [17] Wulf Amelung, Hans-Peter Blume, Heiner Fleige, Rainer Horn, Ellen Kandeler, Ingrid Kögel-Knabner, Ruben Kretzschmar, Karl Stahr und Berndt-Michael Wilke. *Scheffer/Schachtschabel Lehrbuch der Bodenkunde*. 17. Auflag. Berlin: Springer Spektrum, 2018, S. 224–229. ISBN: 9783662558706. DOI: [10.1007/978-3-642-59093-1_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-59093-1_5).
- [18] H.-D. Dörfler. *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*. Kapitel 15 - Hyrdogele und Aerogele. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2002, S. 603–641.
- [19] „Rheologie“ auf Duden online. <https://www.duden.de/node/121777/revision/121813>. Abrufdatum: 27.07.2021.

- [20] Günter Jakob Lauth, Jürgen Kowalczyk, Günter Jakob Lauth und Jürgen Kowalczyk. *Einführung in die Physik und Chemie der Grenzflächen und Kolloide*. Kapitel 16 - Gele: Hydrogele und Aerogele. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2016, S. 429–431. ISBN: 9783662470176. DOI: [10.1007/978-3-662-47018-3_13](https://doi.org/10.1007/978-3-662-47018-3_13).
- [21] J. Stauff. *Kolloidchemie*. Springer Verlag OHG Berlin - Göttingen - Heidelberg, 1960, S. 29–31, 665–712.
- [22] Rafael Armisen und Fernando Galatas. „Agar“. In: *Handbook of hydrocolloid (incl. Alginates)*. Hrsg. von G.O. Phillips und P.A. Williams. CRC Press LLC, 2009. Kap. 4, S. 82–107.
- [23] *Manual of Methods for General Bacteriology*. zitiert nach Abhay Solunke. *Agar:A Review*. 2018. 1981.
- [24] Rheo Takahashi, Madoka Hirashima, Yoko Tanida und Katsuyoshi Nishinari. „Thermal and Rheological Properties of Agaropectin Aqueous Solutions“. In: *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 56.11 (2009), S. 591–599. DOI: [10.3136/nskkk.56.591](https://doi.org/10.3136/nskkk.56.591).
- [25] Bosi Mao, Ahmed Bentaleb, Frédéric Louerat, Thibaut Divoux und Patrick Snabre. *Overcooked agar solutions: impact on the structural and mechanical properties of agar gels*. 2016. arXiv: [1603.00778 \[cond-mat.mtrl-sci\]](https://arxiv.org/abs/1603.00778).
- [26] *Typanalyse des verwendeten Agar Kobe 1*. <https://www.carlroth.com/de/de/agar/agar-agar-kobe-i/p/5210.2>. Abrufdatum: 25.07.2021. Carl Roth GmbH.
- [27] Nicholas A. Licata, Bitan Mohari, Clay Fuqua und Sima Setayeshgar. „Diffusion of Bacterial Cells in Porous Media“. In: *Biophysical Journal* 110.1 (2016). Supplemental Material, S. 247–257. ISSN: 15420086. DOI: [10.1016/j.bpj.2015.09.035](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.09.035).
- [28] Nadine Pernodet, Mounir Maaloum und Bernard Tinland. „Pore size of agarose gels by atomic force microscopy“. In: *Electrophoresis* 18.1 (1997), S. 55–58. ISSN: 01730835. DOI: [10.1002/elps.1150180111](https://doi.org/10.1002/elps.1150180111).
- [29] Mounir Maaloum, Nadine Pernodet und Bernard Tinland. „Agarose gel structure using atomic force microscopy: Gel concentration and ionic strength effects“. In: *Electrophoresis* 19.10 (1998), S. 1606–1610. ISSN: 01730835. DOI: [10.1002/elps.1150191015](https://doi.org/10.1002/elps.1150191015).
- [30] Nicholas A. Licata, Bitan Mohari, Clay Fuqua und Sima Setayeshgar. „Diffusion of Bacterial Cells in Porous Media“. In: *Biophysical Journal* 110.1 (2016), S. 247–257. ISSN: 15420086. DOI: [10.1016/j.bpj.2015.09.035](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.09.035).
- [31] Shilpi Boral, Anita Saxena und H. B. Bohidar. „Syneresis in agar hydrogels“. In: *International Journal of Biological Macromolecules* 46.2 (2010), S. 232–236. ISSN: 01418130. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2009.12.008](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.12.008).
- [32] Tapomoy Bhattacharjee und Sujit S. Datta. „Bacterial hopping and trapping in porous media“. In: *Nature Communications* 10.1 (2019), S. 2–10. ISSN: 20411723. DOI: [10.1038/s41467-019-10115-1](https://doi.org/10.1038/s41467-019-10115-1). URL: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-10115-1>.
- [33] Anja Waske. „Kolloidabscheidungen im Tiefenfilter Untersuchungen mit Röntgentomographie“. Kapitel 2 - Poröse Medien. Dissertation. Technische Universität Dresden, 2011.

- [34] Andrew C. Daly, Lindsay Riley, Tatiana Segura und Jason A. Burdick. „Hydrogel microparticles for biomedical applications“. In: *Nature Reviews Materials* 5 (2020), S. 20–43.
- [35] Rob Phillips, Jane Kondev, Julie Theriot, Hernan Garcia und Nigel Orme. *Physical Biology of the Cell*. second edition. CRC Press Taylor und Francis Group, 2013, 159ff, 634f, 873ff.
- [36] Jean Baptiste Raina, Vicente Fernandez, Bennett Lambert, Roman Stocker und Justin R. Seymour. „The role of microbial motility and chemotaxis in symbiosis“. In: *Nature Reviews Microbiology* 17.5 (2019), S. 284–294. ISSN: 17401534. DOI: [10.1038/s41579-019-0182-9](https://doi.org/10.1038/s41579-019-0182-9).
- [37] C. S. Harwood, K. Fosnaugh und M. Dispensa. „Flagellation of Pseudomonas putida and analysis of its motile behavior“. In: *Journal of Bacteriology* 171.7 (1989), S. 4063–4066. ISSN: 00219193. DOI: [10.1128/jb.171.7.4063-4066.1989](https://doi.org/10.1128/jb.171.7.4063-4066.1989).
- [38] Erich Sackmann und Rudolf Merkel. *Lehrbuch der Biophysik*. Wiley VCH Verlag, 2010, S. 555–582.
- [39] Kevin J. Duffy und Roseanne M. Ford. „Turn angle and run time distributions characterize swimming behavior for Pseudomonas putida“. In: *Journal of Bacteriology* 179.4 (1997), S. 1428–1430. ISSN: 00219193. DOI: [10.1128/jb.179.4.1428-1430.1997](https://doi.org/10.1128/jb.179.4.1428-1430.1997).
- [40] Michael L. Davis, Leslie C. Mounteer, Lindsey K. Stevens, Charles D. Miller und Anhong Zhou. „2D motility tracking of Pseudomonas putida KT2440 in growth phases using video microscopy“. In: *Journal of Bioscience and Bioengineering* 111.5 (2011), S. 605–611. ISSN: 13891723. DOI: [10.1016/j.jbiosc.2011.01.007](https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.01.007).
- [41] David Nicholls und Stuart Ferguson. *Bioenergetics*. 2nd print. San Diego: Acad. Press, 1997, S. 46, 47. ISBN: 9781451168853. DOI: [10.1016/b978-0-7236-1751-8.50023-5](https://doi.org/10.1016/b978-0-7236-1751-8.50023-5).
- [42] Kai M. Thormann und Anja Paulick. „Tuning the flagellar motor“. In: *Microbiology* 156.5 (2010), S. 1275–1283. ISSN: 13500872. DOI: [10.1099/mic.0.029595-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.029595-0).
- [43] Mariana Ruiz Villarreal (abgeleitet von einer Arbeit von Matthias M.) *Flagellum base diagram*. https://de.wikipedia.org/wiki/Flagellum#/media/Datei:Flagellum_base_diagram-de.svg.
- [44] Daniel J. Webre, Peter M. Wolanin und Jeffry B. Stock. „Bacterial chemotaxis.“ In: *Current Biology* 13(2) (2003). ISSN: 00664278. DOI: [10.1146/annurev.ph.44.030182.002441](https://doi.org/10.1146/annurev.ph.44.030182.002441).
- [45] Howard Berg. *Random walks in biology*. Expanded edition. Princeton Univ. Press, 1993.
- [46] Dae-Gon Ha, Sherry Kuchma und O’Toole George. „Plate-Based Assay for Swimming Motility in Pseudomonas aeruginosa“. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1149 (2014), S. 59–65. ISSN: 19406029. DOI: [10.1007/978-1-4939-0473-0](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0).
- [47] Alan J. Wolfe und Howard C. Berg. „Migration of bacteria in semisolid agar“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86.18 (1989), S. 6973–6977. ISSN: 00278424. DOI: [10.1073/pnas.86.18.6973](https://doi.org/10.1073/pnas.86.18.6973).

- [48] Daniel A. Koster, Avraham Mayo, Anat Bren und Uri Alon. „Surface growth of a motile bacterial population resembles growth in a chemostat“. In: *Journal of Molecular Biology* 424.3-4 (2012), S. 180–191. ISSN: 10898638. DOI: [10.1016/j.jmb.2012.09.005](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.09.005). URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2012.09.005>.
- [49] *Hokawo*. Hamamatsu Photonics.
- [50] *MATLAB*. Version R2020a. The MathWorks Inc. Natick, Massachusetts, 2020.
- [51] Johannes Schindelin, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch, Stephan Preibisch, Curtis Rueden, Stephan Saalfeld, Benjamin Schmid u. a. „Fiji: an open-source platform for biological-image analysis“. In: *Nature methods* 9.7 (2012), S. 676–682.
- [52] *Origin(Pro)*. Version 2021b. OriginLab Corporation. Northampton, USA.
- [53] Marius Hintsche und Zahra Alirezaeizanjani. *Bacteria Tracker*. <https://gitup.uni-potsdam.de/biophy-baki/baki-tracker/tree/master>.
- [54] John Crocker und Eric Weeks. *Particle tracking using IDL*. <http://www.physics.emory.edu/faculty/weeks//idl/>.
- [55] John C. Crocker und David G. Grier. „Methods of Digital Video Microscopy for Colloidal Studies“. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 179.1 (1996), S. 298–310. ISSN: 0021-9797. DOI: <https://doi.org/10.1006/jcis.1996.0217>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979796902179>.
- [56] K. M. Taute, S. Gude, S. J. Tans und T. S. Shimizu. „High-throughput 3D tracking of bacteria on a standard phase contrast microscope“. In: *Nature Communications* 6.May (2015), S. 1–9. ISSN: 20411723. DOI: [10.1038/ncomms9776](https://doi.org/10.1038/ncomms9776).
- [57] Christine M. Toutain, Michael E. Zegans und George A. O’Toole. „Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*“. In: *Journal of Bacteriology* 187.2 (2005), S. 771–777. ISSN: 00219193. DOI: [10.1128/JB.187.2.771-777.2005](https://doi.org/10.1128/JB.187.2.771-777.2005).
- [58] Paul D. Frymier, Roseanne M. Ford, Howard C. Berg und Peter T. Cummings. „Three-dimensional tracking of motile bacteria near a solid planar surface“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92.13 (1995), S. 6195–6199. ISSN: 00278424. DOI: [10.1073/pnas.92.13.6195](https://doi.org/10.1073/pnas.92.13.6195).
- [59] Bonnie Chaban, Izaak Coleman und Morgan Beeby. „Evolution of higher torque in Campylobacter-Type bacterial flagellar motors“. In: *Scientific Reports* 8.1 (2018), S. 1–12. ISSN: 20452322. DOI: [10.1038/s41598-017-18115-1](https://doi.org/10.1038/s41598-017-18115-1). URL: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-18115-1>.
- [60] Tapomoy Bhattacharjee, Daniel B. Amchin, Jenna A. Ott, Felix Kratz und Sujit S. Datta. „Chemotactic migration of bacteria in porous media“. In: *Biophysical Journal* (2021). ISSN: 0006-3495. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.05.012>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349521004276>.

- [61] J. Saragosti, V. Calvez, N. Bournaveas, B. Perthame, A. Buguin und P. Silberzan. „Directional persistence of chemotactic bacteria in a traveling concentration wave“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.39 (2011), S. 16235–16240. ISSN: 0027-8424. DOI: [10.1073/pnas.1101996108](https://doi.org/10.1073/pnas.1101996108). eprint: [https://www.pnas.org/content/108/39/16235](https://www.pnas.org/content/108/39/16235.full.pdf). URL: <https://www.pnas.org/content/108/39/16235>.
- [62] Nikita Vladimirov, Dirk Lebiedz und Victor Sourjik. „Predicted auxiliary navigation mechanism of peritrichously flagellated chemotactic bacteria“. In: *PLoS Computational Biology* 6.3 (2010), S. 1–8. ISSN: 1553734X. DOI: [10.1371/journal.pcbi.1000717](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000717).
- [63] M. Theves, J. Taktikos, V. Zaburdaev, H. Stark und C. Beta. „Random walk patterns of a soil bacterium in open and confined environments“. In: *Epl* 109.2 (2015). ISSN: 12864854. DOI: [10.1209/0295-5075/109/28007](https://doi.org/10.1209/0295-5075/109/28007).
- [64] Howard C. Berg. *E. coli in Motion*. New York: Springer Verlag, 2004. ISBN: 0387008888. DOI: [10.1007/b97370](https://doi.org/10.1007/b97370).

Anhang

Verwendeter Code des „Bacteria Trackers“

Für diese Bachelorarbeit wurde das Programm Bacteria Tracker (siehe Tabelle 3.4) abgeändert und auf die Gelumgebung angepasst. Der für diese Arbeit benutzte Matlab-Code befindet sich in folgendem Gitup Verzeichnis:

https://gitup.uni-potsdam.de/biophy-baki/baki-tracker/tree/analysis_in_gel

Videoaufnahmen

Verschiedene Videoaufnahmen zur Veranschaulichung der experimentellen Rohdaten wurden hochgeladen und können unter <https://github.com/SoenBeier/Bachelorarbeit> abgerufen werden. Alternativ sind alle Videos auch unter https://drive.google.com/drive/folders/1Y1bxrfH1c7tmx7en39iKfM4fjttuKr_K?usp=sharing abrufbar. Die Aufnahmen wurden teilweise komprimiert.

Zum Abspielen der .mp4 Dateien kann jedes Standardvideoprogramm (mit Ausnahme von ImageJ) verwendet werden. Zum Abspielen der .avi Dateien wird das Abspielen mit ImageJ empfohlen. Diese Dateien können aber auch mit bspw. dem VLC mediaplayer oder dem Windows mediaplayer abgespielt werden.

Folgende Videos können dort abgerufen werden:

Video1 makroskopische Aufnahme mit 0,3%igem Agar mit WT, $\Delta motAB$ und $\Delta motCD$ (von unten nach oben, Triplikate) zeigt einen Zeitraum ab Minute 45 bis 90 Stunden nach dem Injizieren der Bakterien

Video2 makroskopische Aufnahme mit 0,25%igem Agar mit Wildtyp, $\Delta motAB$ und $\Delta motCD$ (von unten nach oben, Triplikate) zeigt einen Zeitraum ab Minute 45 bis 90 Stunden nach dem Injizieren der Bakterien

Video3 Ausschnitt einer mikroskopischen Langzeitaufnahme von $\Delta motCD$ in 0,3%igem Agar zeigt einen Zeitraum von 15 Stunden

Video4 Ausschnitt einer mikroskopischen Langzeitaufnahme vom Wildtyp in 0,3%igem Agar zeigt einen Zeitraum von 5 Stunden

Video5 Ausschnitt einer mikroskopischen Langzeitaufnahme von $\Delta motAB$ in 0,25%igem Agar zeigt einen Zeitraum von 5 Stunden

Video6 Ausschnitt einer mikroskopischen Langzeitaufnahme von $\Delta motCD$ in 0,25%igem Agar zeigt einen Zeitraum von 5 Stunden und 32 Minuten

-
- Video7** Ausschnitt einer mikroskopischen Langzeitaufnahme von $\Delta motCD$ in 0,3%igem Agar zeigt die Bildung eines Zellhaufens
- Video8** Ausschnitt einer mikroskopischen Langzeitaufnahme von $\Delta motCD$ in 0,25%igem Agar zeigt die Bildung eines Zellhaufens mit vermutlich einem ausbrechenden Bakterium
- Video9** Ausschnitt einer mikroskopischen Langzeitaufnahme von $\Delta motCD$ in 0,3%igem Agar zeigt die Bildung eines Zellhaufens
- Video10** Ausschnitt einer mikroskopischen Langzeitaufnahme von $\Delta motCD$ in 0,25%igem Agar zeigt die Bildung eines Zellhaufens und eine „normal“ ablaufende Zellteilung
- Video11** Ausschnitt einer mikroskopischen Langzeitaufnahme von $\Delta motCD$ in 0,3%igem Agar zeigt die Bildung eines Zellhaufens
- Video12** Ausschnitt einer mikroskopischen Langzeitaufnahme von $\Delta motCD$ in 0,3%igem Agar zeigt die Bildung eines Zellhaufens
- Video13** Ausschnitt einer mikroskopischen Langzeitaufnahme vom Wildtyp in 0,3%igem Agar zeigt zwei aufeinanderfolgende Zellteilungen
- Video14** Ausschnitt einer mikroskopischen Langzeitaufnahme vom Wildtyp in 0,3%igem Agar zeigt eine Zellteilung
- Video15** Ausschnitt einer mikroskopischen Langzeitaufnahme vom Wildtyp in 0,3%igem Agar zeigt zwei aufeinanderfolgende Zellteilungen
- Video16** Ausschnitt einer mikroskopischen Aufnahme vom Wildtyp in 0,25%igem Agar mit hoher Framerate zur Analyse der Trajektorien zeigt einen Zeitraum von 15 Sekunden
- Video17** Ausschnitt einer mikroskopischen Aufnahme vom Wildtyp in 0,3%igem Agar mit hoher Framerate zur Analyse der Trajektorien zeigt einen Zeitraum von 15 Sekunden
- Video18** Ausschnitt einer mikroskopischen Aufnahme vom $\Delta motAB$ in 0,25%igem Agar mit hoher Framerate zur Analyse der Trajektorien zeigt einen Zeitraum von 15 Sekunden
- Video19** Ausschnitt einer mikroskopischen Aufnahme vom $\Delta motAB$ in 0,3%igem Agar mit hoher Framerate zur Analyse der Trajektorien zeigt einen Zeitraum von 15 Sekunden
- Video20** Ausschnitt einer mikroskopischen Aufnahme vom $\Delta motCD$ in 0,25%igem Agar mit hoher Framerate zur Analyse der Trajektorien zeigt einen Zeitraum von 15 Sekunden
- Video21** Ausschnitt einer mikroskopischen Aufnahme vom $\Delta motCD$ in 0,3%igem Agar mit hoher Framerate zur Analyse der Trajektorien zeigt einen Zeitraum von 15 Sekunden
- Video22** Trajektorie eines Wildtyp Bakteriums in 0,25%igem Agar mit Runphasen in Grün und unterschiedliche Events in Orange, Rot, Lila oder Gelb

Video23 Trajektorie eines Wildtyp Bakteriums in 0,3%igem Agar mit Runphasen in Grün und unterschiedliche Events in Orange, Rot, Lila oder Gelb

Video24 Trajektorie eines $\Delta motAB$ Bakteriums in 0,25%igem Agar mit Runphasen in Grün und unterschiedliche Events in Orange, Rot, Lila oder Gelb

Video25 Trajektorie eines $\Delta motAB$ Bakteriums in 0,3%igem Agar mit Runphasen in Grün und unterschiedliche Events in Orange, Rot, Lila oder Gelb

Video26 Trajektorie eines $\Delta motCD$ Bakteriums in 0,25%igem Agar mit Runphasen in Grün und unterschiedliche Events in Orange, Rot, Lila oder Gelb

Video27 Trajektorie eines $\Delta motCD$ Bakteriums in 0,25%igem Agar mit Runphasen in Grün und unterschiedliche Events in Orange, Rot, Lila oder Gelb

Verteilung der Trajektoriendauer

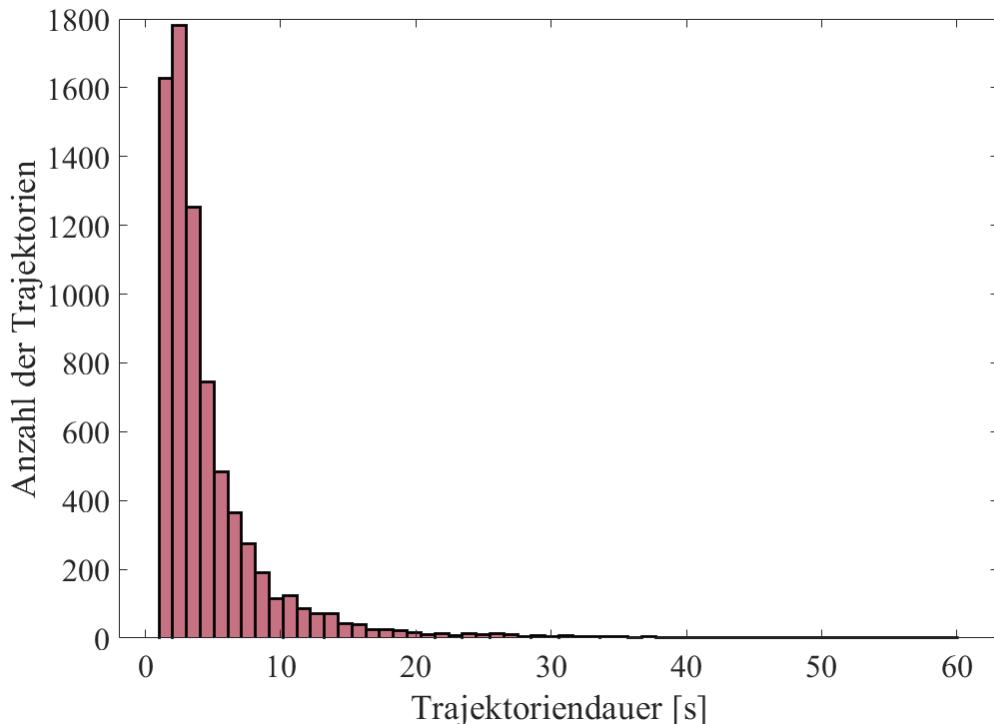


Abbildung 6.1: Verteilung der Trajektoriendauer von allen 5 Aufnahmen von *P. putida* bei 0,25%igem Agar.

Makroskopische Untersuchungen - Lineare Fits

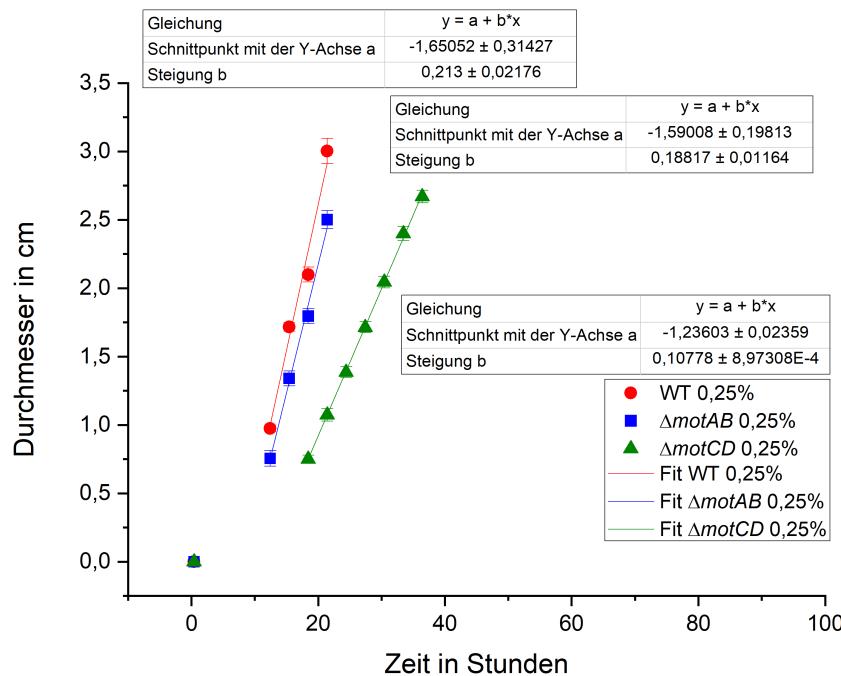


Abbildung 6.2: Makroskopisch gemessene Ausbreitung der Zellkulturen bei 0,25%igem Agar mit Fitgeraden

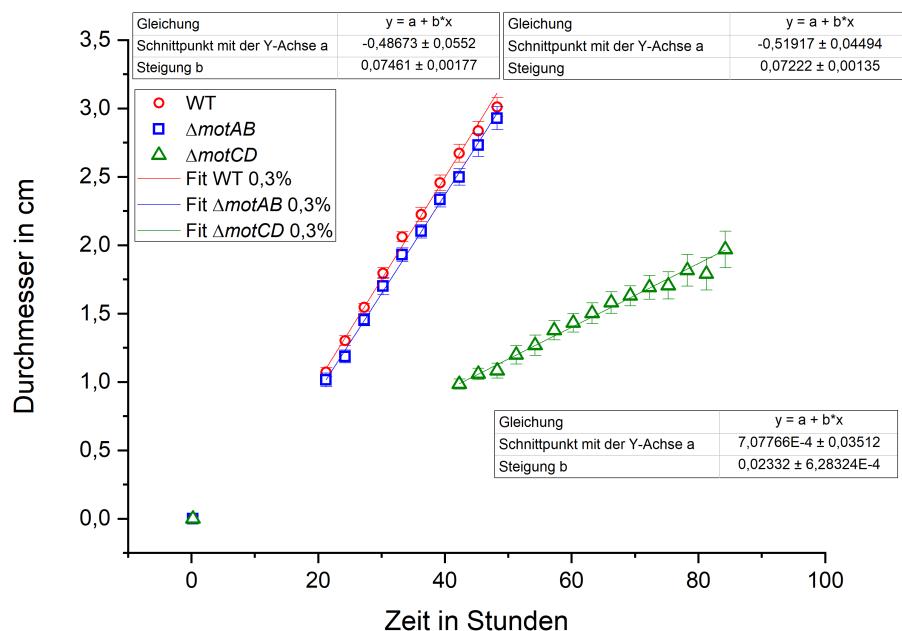
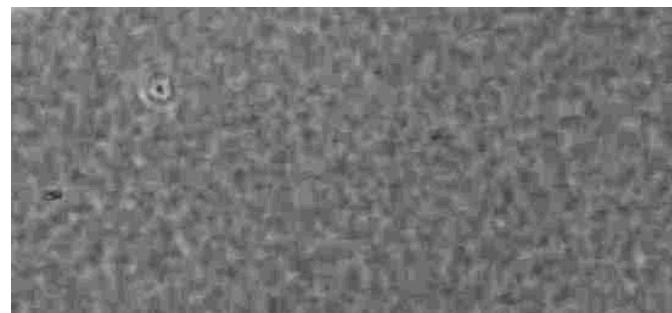


Abbildung 6.3: Makroskopisch gemessene Ausbreitung der Zellkulturen bei 0,3%igem Agar mit Fitgeraden

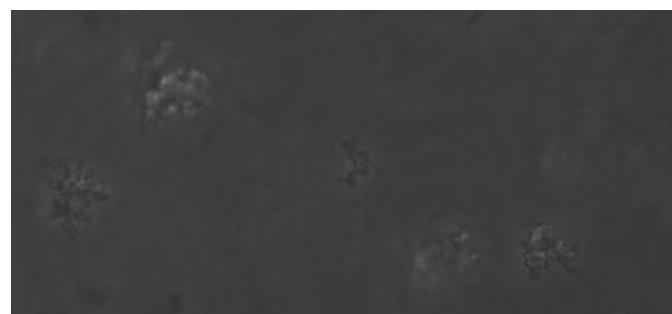
Mikroskopische Betrachtung der Ausbreitung von Δ MotCD



(a) Startzeit der Aufnahme



(b) Nach 6 Stunden und 20 Minuten



(c) Nach 10 Stunden und 40 Minuten

Abbildung 6.4: Ausschnitt einer Langzeitaufnahme von $\Delta motCD$ in 0,3%igem Agargel.
Zu sehen sind sich entwickelnde Zellhaufen.