

Fachbereich Biologie
Institut für Mikrobiologie



Isolierung und Charakterisierung eines Tetrahydrofuran abbauenden Stamms *Pseudonocardia* sp.

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dipl.-Biol. Ulrike Kohlweyer
geb. am 14. September 1968 in Hannover

Gutachter:

1. Prof. Dr. J.R. Andreesen
2. Prof. Dr. H. Diekmann
3. Prof. Dr. S. Fetzner

Datum der Verteidigung: 22. Juni 2000

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	9
2.1 Verwendete Bakterienstämme und Vektoren	9
2.2 Medien und Medienzusätze	9
2.3 Kulturbedingungen, Zellanzucht und -ernte, Reinheitskontrolle, Stammhaltung und Konservierung	14
2.4 Analytik	16
2.4.1 Messung der optischen Dichte (OD).....	16
2.4.2 Trockengewichtsbestimmung von frischen Zellen.....	16
2.4.3 Proteinbestimmung	16
2.4.4 TOC-Messung	17
2.4.5 Analytische Bestimmung der THF-Konzentration mit GC/FID	17
2.4.6 Analytische Bestimmung der THF-Konzentration mit GC/FID/ Headspace.....	18
2.4.7 Messungen an der Sauerstoffelektrode.....	19
2.5 Taxonomische Untersuchungen.....	19
2.5.1 Makroskopische und mikroskopische Beschreibung	19
2.5.2 Standarduntersuchungen für die taxonomische Einordnung der isolierten Bakterien.....	19
2.5.3 Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	21
2.5.3.1 Zellaufschluß zur Isolierung der Template DNA.....	21
2.5.3.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	21
2.5.3.3 Agarosegelelektrophorese.....	22
2.5.3.4 Reinigung von Nukleinsäuren.....	22
2.5.3.5 Ligation und Mikrodialyse des Ligationprodukts.....	23
2.5.3.6 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation	23
2.5.3.7 Restriktionsverdau der amplifizierten PCR-Produkte.....	24
2.5.3.8 Sequenzierung von DNA und Auswertung.....	24
2.6 Enzymatische Messungen	25
2.6.1 Herstellung ruhender Zellen	25

2.6.2	Zellaufschlußmethoden und Dialyse von Rohextrakten.....	25
2.6.2.1	Zellpermeabilisierung.....	25
2.6.2.2	Zellaufschluß mit der French-Press oder mit Ultraschall.....	26
2.6.2.3	Dialyse von Rohextrakten	27
2.6.3	Messungen zum Nachweis THF abhängiger enzymatischer	
	Aktivität an der Sauerstoffelektrode	27
2.6.3.1	Messungen mit ruhenden Zellen.....	28
2.6.3.2	Messungen mit Rohextrakt	28
2.6.4	Messung THF abhängiger enzymatischer Aktivität durch analytische	
	Bestimmung der THF-Konzentration mit GC/FID oder	
	GC/FID/Headspace	28
2.6.4.1	Messungen mit wachsenden, ruhenden und permeabilisierten	
	Zellen	28
2.6.4.2	Messungen mit NADH-regenerierendem System.....	29
2.6.5	Reaktionsansatz für die Messung von NADH-Oxidaseaktivität.....	29
2.6.6	Reaktionsansatz für die Messungen von Reduktaseaktivitäten.....	29
2.6.6.1	Verwendete Elektronenakzeptoren.....	30
2.6.7	Bestimmung enzymatischer Aktivität.....	30
2.6.7.1	Bestimmung enzymatischer Aktivität durch	
	gaschromatographische Analyse der Substratabnahme	30
2.6.7.2	Bestimmung enzymatischer Aktivität durch Messungen an der	
	Sauerstoffelektrode.....	31
2.6.7.3	Bestimmung von Oxidase- und Reduktaseaktivitäten	31
2.6.8	Untersuchung auf das Vorhandensein von bakteriellem	
	Cytochrom P-450.....	31
2.7	Chromatographische Methoden	32
2.7.1	Gelfiltration von Rohextrakt.....	32
2.7.2	Ionenaustauschchromatographie von Rohextrakt	32
2.7.3	Anaerobe Ionenaustauschchromatographie von Rohextrakt	33
2.8	Immobilisierungsversuche.....	33
2.8.1	Charakterisierung der Zelloberfläche.....	33
2.8.1.1	Messung des Zetapotentials	33
2.8.1.2	Mikrotitration.....	34

2.8.1.3	Isoelektrische Fokussierung (IEF) ganzer Zellen.....	34
2.8.1.4	Adsorption von Kristallviolett und Orange II.....	35
2.8.1.5	Messung der Hydrophobizität	35
2.8.1.6	Nachweis von sauren Exopolysacchariden	37
2.8.2	Untersuchung des Adhäsionsverhaltens	37
2.8.3	Einschlußimmobilisierung ganzer Zellen mit Alginat	39
2.9	Chemikalien, Gase und Labormaterial	40
2.10	Laborgeräte	41
3.	Ergebnisse	43
3.1	Analytische Bestimmung der THF-Konzentration	43
3.1.1	Analytische Bestimmung der THF-Konzentration mit GC/FID	43
3.1.2	Analytische Bestimmung der THF-Konzentration mit GC/FID/Headspace	44
3.2	Kultivierung einer THF abbauenden Mischkultur.....	44
3.3	Isolierung und Charakterisierung der Bakterien der THF abbauenden Mischkultur	45
3.3.1	16S rDNA-Analyse des Stamms K1	51
3.4	Wachstumsversuche mit Stamm K1.....	53
3.4.1	Optimierung der Wachstumsbedingungen für das Wachstum in Mineralmedium mit THF	53
3.4.2	Wachstum des Stamms K1 in Mineralmedium mit 10 mM THF.....	54
3.4.3	Einfluß der eingesetzten THF-Konzentrationen auf das Wachstum von Stamm K1 in Mineralmedium.....	55
3.4.4	Einfluß der Spurenelementkonzentration und des Kolbenbeschickungsvolumens und auf das Wachstum mit THF	56
3.4.5	Untersuchung der Stabilität des THF-Abbaupotentials in Stamm K1	56
3.4.6	Bestimmung des Substratspektrums	58
3.4.7	Toleranz gegenüber erhöhten Salzkonzentrationen	59
3.4.8	Einfluß verschiedener Substrate auf die Hopanoidsynthese.....	60
3.5	Einleitende Untersuchungen zur Charakterisierung des initialen Enzyms im THF-Abbauweg	61
3.5.1	Zellaufschlußmethoden	62

3.5.1.1	Zellpermeabilisierung	62
3.5.1.2	Zellaufschluß mit der French-Press oder mit Ultraschall.....	63
3.5.2	Messungen zum Nachweis THF abhängiger enzymatischer Aktivität mit ruhenden Zellen und mit Rohextrakt an der Sauerstoffelektrode ..	64
3.5.3	Messung THF abhängiger enzymatischer Aktivität mittels analytischer Bestimmung der THF-Konzentration mit GC/FID oder GC/FID/Headspace	65
3.5.3.1	In wachsenden, ruhenden und permeabilisierten Zellen	65
3.5.3.2	Messungen mit Rohextrakt	65
3.5.4	Untersuchung auf das Vorhandensein von bakteriellem Cytochrom P-450.....	66
3.5.5	Wachstum mit dem Kupferchelator Bathocuproin	66
3.5.6	Nachweis von Reduktaseaktivitäten in Zellextrakten des Stamms K1..	68
3.5.6.1	Gemessene NADH-Oxidaseaktivitäten	69
3.5.6.2	Nachweis einer NADH-Cytochrom-c-Reduktaseaktivität	69
3.6	Untersuchungen zur Immobilisierung von Stamm K1	72
3.6.1	Charakterisierung der Zelloberfläche.....	72
3.6.2	Untersuchung des Adhäsionsverhaltens	76
3.6.3	Einschlußimmobilisierung ganzer Zellen mit Alginat	78
4.	Diskussion	79
4.1	Wachstumsoptimierung einer THF abbauenden Mischkultur.....	79
4.2	Isolierung und Charakterisierung einer THF abbauenden Reinkultur	80
4.3	16S rDNA-Analyse des Stamms K1	83
4.4	Wachstum des Stamms K1 mit THF und anderen Substraten	86
4.5	Einleitende Untersuchungen zur Charakterisierung des initialen Enzyms im THF-Abbauweg	92
4.6	Nachweis einer in mit THF angezogenen Zellen spezifisch vorkommenden NADH-Cytochrom-c-Oxidoreduktaseaktivität	95
4.7	Immobilisierungsversuche mit Stamm K1	96
4.7.1	Charakterisierung der Zelloberfläche.....	96
4.7.2	Untersuchung des Adhäsionsverhaltens	103
4.7.3	Einschlußimmobilisierung mit Alginat.....	105

4.8 Ausblick	106
5. Zusammenfassung	108
6. Literatur	110
7. Anhang	

Abkürzungen

Amp	: Ampicillin
ATCC	: American Type Culture Collection; Rockville, Maryland, U.S.A.
a_w	: Wasseraktivität oder relative Feuchtigkeit
<i>B.</i>	: <i>Bacillus</i>
BATH	: Bacterial Adhesion To Hydrocarbons
CSB	: Chemischer Sauerstoffbedarf
d	: Tag(e)
dest	: destilliert
DCPIP	: 2,6 - Dichlorophenolindophenol
DNA	: Desoxyribonukleinsäure (-acid, engl.)
dNTP	: Desoxynukleotidtriphosphat
DSMZ	: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
DTT	: Dithiothieitol
<i>E.</i>	: <i>Escherichia</i>
ΔE	: Extinktionsänderung
EDTA	: Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	: European Molecular Biology Laboratory
End-OD	: maximal erreichte optische Dichte
F	: Farad
FAD	: Flavinadenindinukleotid
FID	: Flammenionisationsdetektor
FMN	: Flavinadeninmononukleotid
GC	: Gaschromatograph; gaschromatographisch
G+C	: Guanin und Cytosin
ΔG	: freie Enthalpie (Gibb'sche Energie)
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
IEF	: Isoelektrische Fokussierung
IEP	: Isoelektrischer Punkt
IPTG	: Isopropyl- β -D-thiogalactosid
K1	: interne Institutsbezeichnung für ein THF abbauendes bakterielles Isolat

KPP	: Kaliumphosphatpuffer
Metyrapon	: 2-Methyl-1,2-di-3-pyridyl-1-propanon
N	: Newton
NA	: Nähragar
NAD(P)	: Nicotinadenin dinucleotid (phosphat), oxidiert
NAD(P) H ₂	: Nicotinadenin dinucleotid (phosphat), reduziert
NBT	: Nitroblautetrazoliumchlorid
OD	: Optische Dichte
Pa	: Pascal
PEG	: Polyethylenglykol
PMSF	: Phenylmethylsulfonylfluorid
P _{o/w}	: Verteilungskoeffizient in einem n-Octanol-Wasser-Gemisch
psi	: pounds per square inch
R.	: <i>Rhodococcus</i>
RE	: Rohextrakt; zellfreier Extrakt
RNA	: Ribonukleinsäure (-acid, engl.)
RSA	: Rinderserumalbumin
RT	: Raumtemperatur
SDS	: Natriumdodecylsulfat
SPME	: Solid-phase micro extraction (engl.), Festphasenmikroextraktion
t _d	: Verdopplungszeit
THF	: Tetrahydrofuran
THP	: Tetrahydropyran
TOC	: Total Organic Carbon (engl.), gesamter organischer Kohlenstoff
Tris	: Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	: Unit (µmol Substratumsatz pro Minute)
Upm	: Umdrehungen pro Minute
V	: Volt
v/v	: Volumen pro Volumen
w/v	: Gewicht pro Volumen
X-Gal	: 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactosid
ZFG	: Zellfeuchtgewicht
ZTG	: Zelltrockengewicht

1. Einleitung

Die Akkumulation schwer abbaubarer naturfremder Stoffe, sog. Xenobiotika, in der Umwelt erfährt immer stärkere Beachtung. Ein Abbau dieser persistenten Stoffe kann biologisch oder technisch eingeleitet werden. Wenn ein biologischer Abbau von Xenobiotika möglich ist, ist dem meist der Vorrang einzuräumen, da der Schadstoff im günstigsten Fall vollständig zu Kohlendioxid und Wasser umgewandelt werden kann und so dem biologischen Gleichgewicht zurückgeführt wird, ohne daß toxische oder schwer abbaubare Intermediate entstehen. Zudem ist die biologische Reinigung meist auch die kostengünstigere Alternative.

Zu den Xenobiotika werden auch Etherverbindungen gezählt. Neben industriell eingesetzten Etherverbindungen, wie Tetrahydrofuran, Diethylether, Polyethylenglykole, u.v.a.m., machen Detergenzien und Agrochemikalien, wie Fungi- und Herbizide, den Großteil der anthropogen in die Umwelt entlassenen Etherverbindungen aus (White et al., 1996). In der Literatur findet man Hinweise darauf, daß ein mikrobiologischer Abbau von Etherverbindungen möglich ist. In der Praxis wird jedoch auch mittels chemischer Oxidation durch Einsatz von Wasserstoffperoxid und Ozon die biologische Abbaubarkeit von Ethern unterstützt (Adams et al., 1994).

Tetrahydrofuran (THF) ist ein gut wasserlöslicher, leicht flüchtiger zyklischer Ether, der in großem Maße in der Industrie als Lösungsmittel Anwendung findet (Brownstein, 1991). Im Jahr 1997 wurde THF weltweit mit ca. 70 000 t produziert (Jassel, persönliche Mitteilung), wobei es auch als Ausgangsprodukt für andere Produkte dient. THF wird als Lösungsmittel für Lacke, Klebstoffe und in Spinn-, Tauch- und Streichlösungen eingesetzt. Im chemischen Labor wird es u.a. bei Extraktionen verwandt. Des Weiteren ist es Ausgangsprodukt für hochmolekulare Ether (z.B. Polyoxitetramethylenglykole), fünfgliedriger Heterozyklen (Pyrrolidin, Tetrahydrothiophen) und Verbindungen wie Succinatdialdehyd oder 1,4-Dihalogenbutan (BG Chemie, 1988; Römpp, 1990).

Chemisch können Etherbindungen durch Einsatz hoher Temperaturen und konzentrierter Säuren gespalten werden (Mo et al., 1997). Über den mikrobiellen Abbau von THF, das im Mittelpunkt des Interesses der vorliegenden Arbeit steht, ist bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt vergleichsweise wenig publiziert worden. In der jüngeren Literatur findet man einige Hinweise auf die Existenz THF abbauender Mikroorganismen (Dmitrenko et al.,

1987; Gvozdyak et al., 1988; Bernhardt und Diekmann, 1991; Parales et al., 1994; Poupin et al., 1998; Steffan, 1998), obwohl Painter und King (1985) den zyklischen Ether THF als eine nicht schnell biologisch abbaubare chemische Substanz bezeichneten. Die wenigen wissenschaftlichen Arbeiten, die sich mit dem biologischen Abbau dieses zyklischen Ethers befassen, stehen in klarem Widerspruch zu dessen Bedeutung in der heutigen chemischen Industrie. In der oben zitierten Literatur finden sich allerdings eingesetzte THF-Konzentrationen von z.T. weit unterhalb der *in situ* anzutreffenden 50 mM (3,61 g/l). Diese Konzentration kann in entsprechenden industriellen, nicht kommunalen, Abwassern angetroffen werden (J.R. Andreesen, persönliche Mitteilung). Wird ein mikrobiologischer Abbau gewünscht, müssen Organismen isoliert werden, die in der Lage sind die THF-Konzentrationen, wie sie *in situ* vorkommen, zu tolerieren und abzubauen. Die genetische Stabilität der schadstoffabbauenden Bakterien ist von Bedeutung. Oftmals liegen die Gene, die für die am Schadstoffabbau beteiligten Enzyme codieren, auf Plasmiden in der Bakterienzelle vor (Schlegel, 1992; Madigan et al., 1997). Es ist jedoch bekannt, daß Plasmide verlorengehen können und so dem betroffenen Bakterium die dort codierten genetischen Informationen dann fehlen.

Der Lösungsmittelcharakter von Etherverbindungen, der die Integrität von Cytoplasmamembranen angreift, stellt einen Schwierigkeitsfaktor beim mikrobiellen Abbau von Ethern dar. Die Toxizität organischer Lösungsmittel für mikrobielle Zellen beruht auf der Anreicherung in der Cytoplasmamembran, wodurch diese zerstört wird (Sikkema et al., 1995). Die Bakterien, die lipidauflösende Substrate zur Energiegewinnung nutzen können, müssen demzufolge in der Lage sein, sich vor der Zerstörung ihrer Zellintegrität zu schützen; sie müssen daher auf den Lösungsmittelstreß reagieren können.

Es besteht ein großes Interesse an Lösungsmittel toleranten Mikroorganismen, die für Biotransformationsprozesse eingesetzt werden könnten (Isken et al., 1999), und an den Mechanismen, die zu dieser Toleranz führen (Aono und Kobayashini, 1997). Um die negativen Einflüsse von Lösungsmitteln zu überleben, sind Veränderungen in der Zusammensetzung der Cytoplasmamembran erforderlich (Weber und de Bont, 1996). Diese Mechanismen sind jedoch bisher noch nicht vollständig verstanden (Weber et al., 1994; Aono und Kobayashini, 1997). Während durch Lösungsmittel hervorgerufene Adaptationsprozesse in Gram-positiven Bakterien erst wenig untersucht wurden (Rhee et

al., 1996; Tsitko et al., 1999), wurden in den vergangenen Jahren die zugrunde liegenden Mechanismen für Lösungsmitteltoleranz in Gram-negativen Bakterien, insbesondere von *Pseudomonas spp.* und *E. coli*, intensiv untersucht (Isken et al., 1999). Mehrere Adaptionsmechanismen werden in der Literatur genannt, wobei zwischen Kurz- und Langzeitantworten unterschieden wird. Durch Verstärkung der Cytoplasmamembran erreicht der Mikroorganismus, daß die Diffusion des Lösungsmittels vom Medium ins Zellinnere erschwert wird. So gilt als erste Antwort der Zelle, wenn sie einem Lösungsmittel ausgesetzt wird, die *cis* → *trans* Isomerisierung der ungesättigten Fettsäuren (Kurzzeitantwort) (Weber et al., 1994; Isken et al., 1997; Ramos et al., 1997), wobei diese Umwandlung unabhängig von einer *de novo* Fettsäure- und Lipidsynthese ist (Holtwick et al., 1997). Als Langzeitantworten werden die vermehrte Synthese ungesättigter Fettsäuren, Veränderung der Phospholipidzusammensetzung und Konzentrationsänderungen von den in den membraneingeschlossenen Proteinen und Hopanoiden genannt (Weber und de Bont, 1996; Segura et al., 1999). Organische Lösungsmittel erhöhen die Membranfluidität; ungesättigte Fettsäuren in der *trans* Konfiguration wirken dem entgegen (Holtwick et al., 1997; Segura et al., 1999). Diese genannten Adaptationen werden von Ramos et al. (1997) und Kieboom et al. (1998) als statische Adaptationen angesehen, durch die eine physikalische, aber dennoch durchlässige Barriere erreicht wird. Die Resistenzen gegenüber sehr hohen Lösungsmittelkonzentrationen können jedoch damit nicht erklärt werden (Ramos et al. 1997; Kieboom et al., 1998). Vielmehr sind hierfür Efflux-Systeme verantwortlich (Isken und de Bont, 1996; Isken et al., 1997; Kieboom et al., 1998; Li et al., 1998). Das von Isken und de Bont (1996) beschriebene Efflux-System hat hohe Sequenzhomologien zu bekannten Efflux-Systemen, die u.a. hydrophobe Antibiotika, Farbstoffe und Schwermetalle aus den Zellen schleusen (Nikaido, 1996; Paulsen et al., 1996). Einer weiteren Resistenzantwort, der Metabolisierung der Chemikalie (Ramos et al., 1997; Segura et al., 1999), messen Segura et al. (1999) interessanterweise nur eine geringe Bedeutung bei, weil viele Bakterien bekannt sind, die Lösungsmittel nur tolerieren und nicht als Energiequelle nutzen (siehe z.B. Inoue und Horikoshi, 1989).

White et al. (1996) geben eine gute Übersicht über die bekannten aeroben und anaeroben bakteriellen Etherabbauwege und die zugrunde liegenden biochemischen Mechanismen, die zur Öffnung der Etherbindung führen. Bereits Alexander (1965) beschrieb, daß es die Etherbindung ist, die einen biologischen Abbau sehr erschwert. Interessant ist, daß

strenggenommen viele einleitende Enzyme, die am Etherabbau beteiligt sind, nicht direkt die Etherbindung spalten, sondern daß sie das Substrat labilisieren, indem sie molekularen Sauerstoff an ein an der Etherbindung benachbartes C-Atom einführen und es so in seine halbacetale Form überführen, die spontan hydrolytisch gespalten wird (White et al., 1996).

Viele Oxygenasen sind initiale Enzyme in bekannten Schadstoffabbauwegen. Man unterscheidet bei diesen Enzymen Mono- und Dioxygenasen. Letztere führen beide Sauerstoffatome des O₂ in das Substrat ein. Monooxygenasen hingegen katalysieren den Einbau nur eines Sauerstoffatoms in das Substrat, während das zweite zu Wasser reduziert wird (Lehninger et al., 1994). Oxygenasen bestehen meist aus einer Oxygenase- und einer Reduktasekomponente und man unterscheidet zwischen Ein- und Mehrkomponenten Enzymen. Es gibt verschiedene Klassen von Monooxygenasen, die aufgrund der jeweils involvierten Redoxcofaktoren unterschieden werden (Ziegler, 1988). Neben flavin- oder eisenhaltigen Monooxygenasen gibt es die Familie der Cytochrom P-450 haltigen Enzyme, die ein breites Spektrum von Hydroxylierungsreaktionen katalysieren (Sariaslani, 1991). Cytochrom P-450 haltige Enzyme sind bei Eu- und Prokaryoten verbreitet, in der Lage Etherbindungen zu spalten (White et al., 1996) und oft am Abbau von Xenobiotika beteiligt (Sariaslani, 1991).

Bernhardt und Diekmann (1991) isolierten einen THF abbauenden *Rhodococcus ruber* Stamm, der neben THF auch γ -Butyrolacton, 1,4-Butandiol und Succinat, nicht jedoch 3-Hydroxytetrahydrofuran verstoffwechseln konnte. Aufgrund dieser Substratstudie gingen sie von folgendem THF-Abbauweg aus:

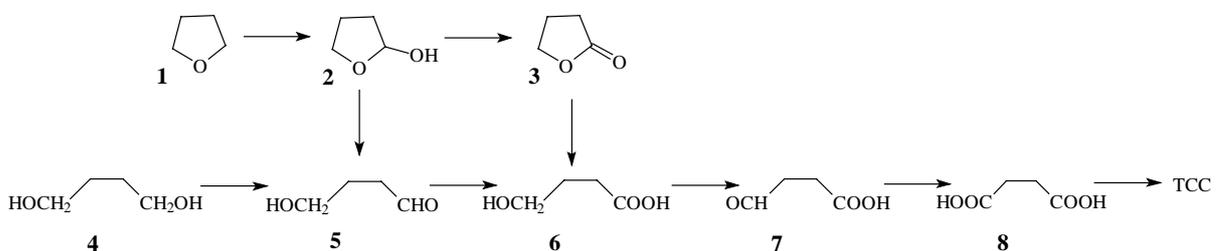


Abb. 1: Postulierter THF-Abbauweg (Bernhardt und Diekmann, 1991). 1, Tetrahydrofuran; 2, 2-Hydroxytetrahydrofuran; 3, γ -Butyrolacton; 4, 1,4-Butandiol; 5, 4-Hydroxybutyraldehyd; 6, 4-Hydroxybuttersäure; 7, Succinatsemialdehyd; 8, Succinat.

Die Autoren postulierten, daß es am C2-Atom des THFs zur Hydroxylierung kommt (Abb. 1), die von einer Monooxygenase katalysiert wird. 2-Hydroxytetrahydrofuran könnte als Hemiacetal durch hydrolytische Spaltung des Rings zu 4-Hydroxybutyraldehyd umgewandelt oder durch eine Alkoholdehydrogenase zu γ -Butyrolacton oxidiert werden. Aus beiden letztgenannten Intermediaten könnte über eine Aldehyddehydrogenase- bzw. Lactonasereaktion 4-Hydroxybuttersäure entstehen, die durch eine Alkoholdehydrogenase- bzw. Aldehyddehydrogenasereaktionen über Succinatsemialdehyd zu Succinat oxidiert werden kann. Succinat kann dann zur Energiegewinnung in den Tricarbonsäurezyklus (TTC) eingeschleust werden. Die postulierte Hydroxylierung am C2-Atom wurde durch Arbeiten von Bock et al. (1996) bestätigt. Da es sich bei 2-Hydroxy-THF um eine instabile Verbindung handelt, wurden THF induzierte Zellen des *R. ruber* Stamms 219 mit 2,5-Dimethyl-THF inkubiert, um ein stabiles Zwischenprodukt nachweisen zu können (Bock, 1994). Es wurden zwei Hauptintermediate detektiert, wovon ein Metabolit als Hexan-2,5-dion identifiziert wurde (Bock et al., 1996). Dies wird als Bestätigung des Reaktionswegs $2,5\text{-Dimethyl-THF} \rightarrow 2,5\text{-Dimethyl-2-Hydroxy-THF} \rightleftharpoons 5\text{-Hydroxy-Hexan-2-on} \rightarrow \text{Hexan-2,5-dion}$ gewertet (Bock et al., 1996).

In Abwasseraufbereitungsanlagen wird THF allgemein im CSB-Summenparameter erfaßt. Wegen der Flüchtigkeit des Ethers ist die Konzentrationsabnahme aufgrund biologischer Aktivität im Abwasser nicht exakt zu bestimmen (Diekmann, 1994). Niedrigere THF-Konzentrationen in Abwässern würden zu einem niedrigeren CSB-Wert führen, was aus ökologischer und finanzieller Sicht von großem Nutzen ist.

Für eine biologische Abwasserreinigung ist es vorteilhaft mit immobilisierten Zellen zu arbeiten, insbesondere bei hohen oder stark schwankenden Schadstoffkonzentrationen, oder wenn der Abbau stark persistenter oder toxischer Substanzen erwünscht ist (Rehm, 1990; Schulz, 1993). Eine häufig eingesetzte Methode ist die adsorptive Immobilisierung von Mikroorganismen (Busscher und Weerkamp, 1987).

Die Bildung eines Biofilms wird von van Loosdrecht et al. (1990a) in vier Phasen eingeteilt: Transport von Mikroorganismen an die Trägeroberfläche (Phase I), initiale reversible Adhäsion der Mikroorganismen (Phase II), feste irreversible Anheftung der Organismen an die Trägeroberfläche (Phase III) und Ausbildung eines Biofilms durch Wachstum der adsorbierten Mikroorganismen (Phase IV).

Bei der reversiblen Adhäsion zeigt die Bakterienzelle noch zweidimensionale Brown'sche Molekularbewegungen, bei der irreversiblen Adhäsion zeigt die Bakterienzelle diese Bewegung nicht mehr und kann nur durch Einwirkung starker Scherkräfte vom Träger gelöst werden (James, 1982; van Loosdrecht et al., 1990b).

Wenn Zelle und Träger genügend nahe sind, kommt es zu sog. „short-range“ Interaktionen. Es wird spekuliert, daß nun die hydrophoben Gruppen der Bakterienoberfläche für die Verdrängung des Wasserfilms zwischen Zelle und Träger sorgen. Nimmt ihre Distanz auf $\leq 1,5$ nm ab, so wird die Energiebarriere zwischen Zelle und Träger aufgehoben und es kann zu spezifischen Interaktionen kommen (ionische Bindungen, Ausscheidungen von Exopolysacchariden, die Zelle und Träger „zusammenkleben“). Die weitere Ausbildung des Biofilms erfolgt durch Synthese der extrazellulären Matrix, Wachstum und Vermehrung der Mikroorganismen. Die Primärbesiedlung ist ein Prozeß, der sich im Zeitraum von Stunden vollzieht, während die Ausbildung eines Biofilms Tage oder längere Zeit benötigt (Schaule, 1992).

Es gibt keine allgemein anerkannte Theorie, die die mikrobielle Adsorption beschreibt (Klein und Ziehr, 1990; Martienssen, 2000a), weil die Gesamtheit der ablaufenden Interaktionen zwischen Zell- und Trägeroberfläche noch nicht im Detail verstanden ist (Marshall, 1991). Van Loosdrecht et al. (1990b), geben eine gute Übersicht über die zwei bisher am häufigsten diskutierten Theorien: Die Derjaguin-Landau-Verwey-Oberbeek-(DLVO-) Theorie und die Theorie der Gibb'schen Oberflächenenergie (ΔG).

Die DLVO-Theorie beschreibt die sog. „long-range“ Interaktionen, die Van-der-Waals- und elektrostatischen Kräfte, die die Adhäsion beeinflussen. Nach van Loosdrecht et al. (1990b) ist diese Theorie geeignet, sowohl das Phänomen der reversiblen, als auch der irreversiblen Adsorption zu erklären, während Norde und Lyklema (1989) die biologischen Prozesse, die zur irreversiblen Adhäsion führen, durch die DLVO-Theorie nicht erfaßt sehen. Für die Theorie der Gibb'schen Oberflächenenergie gilt als Voraussetzung, daß unmittelbarer Kontakt zwischen den miteinander agierenden Oberflächen besteht. Hierbei ist die Adhäsion allein von den vorhandenen Oberflächenenergien abhängig. Adhäsion erfolgt wenn $\Delta G \leq 0$ ist (Klein und Ziehr, 1990; van Oss et al., 1995).

Da physikochemische Wechselwirkungen zwischen Zellen und Trägern die erste Phase der Adsorption beeinflussen (van Loosdrecht et al., 1989; Dalton et al., 1994; Groening et al., 1988), sollte die Charakterisierung der Bakterienzelloberfläche des THF abbauenden Bakteriums im Vordergrund stehen, um mögliches Adhäsionsverhalten voraussagen zu

können. Aus der Literatur ist bekannt, daß Zellalter und Substrat (Neufeld et al., 1980; Hazen et al., 1986; van Loosdrecht et al., 1987), Inkubationstemperatur (Hazen et al., 1986) und weitere Inkubationsparameter (Sutherland, 1985), wie z.B. Phosphatgehalt (Büchs et al., 1988), den Charakter von mikrobiellen Zelloberflächen beeinflussen, aber auch die Wachstumsphase Einfluß auf die Hydrophobizität hat. So beschreiben van Loosdrecht et al. (1987) eine ansteigende Zellhydrophobizität mit hoher Wachstumsrate im Chemostaten und in der exponentiellen Wachstumsphase in einer Batch-Kultur. Als verantwortliche Faktoren für die bakterielle Adhäsion an angebotene Träger werden Ladung (Olssen et al., 1976; Pelletier et al., 1997), Hydrophobizität (Rosenberg und Kjelleberg, 1986; Rijnaarts et al., 1993; Pelletier et al., 1997) und extrazelluläre Strukturen der Zelloberfläche (Marshall, 1992; Gehrke et al., 1998; Langille und Weiner, 1998; Quintera et al., 1998), wie extrazelluläre Polysaccharide, Flagellen und Fimbrien genannt. Zita und Hermansson (1997) berichten, daß eine hohe Oberflächenhydrophobizität mit erhöhter Zelladhäsion an Abwasserflocken korrelierte. Dies ist im Prozeß der Abwasserreinigung erwünscht, da es die Abscheidung mikrobieller Zellen vom gereinigten Effluentenstrom erleichtert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine vorhandene Mischkultur an höhere, *in situ* relevante THF-Konzentrationen zu adaptieren und das für den THF-Abbau verantwortliche Bakterium in Reinkultur zu isolieren, um die zugrunde liegende Stoffwechselaktivität einem charakterisierbaren Bakterium zuordnen zu können. Das THF abbauende Isolat sollte taxonomisch und wachstumsphysiologisch charakterisiert werden. Da das Wachstum mit Ether einem Lösungsmittelstreß entspricht, sollte das Wachstumsverhalten unter verschiedenen Streßbedingungen (Temperatur, Salz, hohe Ethersubstratkonzentrationen) untersucht werden, um herauszufinden, inwieweit das Bakterium auf diese untersuchten Stressoren wachstumsphysiologisch reagiert. Einleitende enzymatische Untersuchungen sollten klären, ob eine THF abhängige enzymatische Aktivität in wachsenden, ruhenden und permeabilisierten Zellen nachgewiesen werden kann, da aus Untersuchungen von Bernhardt (1991) und Bock (1994) abgeleitet werden konnte, daß mit einer geringen und instabilen Enzymaktivität gerechnet werden mußte. Für die Reinigung und Charakterisierung eines Enzyms sind diese Voruntersuchungen wichtig, um so Aussagen über dessen Stabilität im zellfreien Extrakt zu erhalten. Für einen möglichen biotechnologischen Einsatz zur Reinigung THF haltiger Abwasser wäre es vorteilhaft, das THF abbauende bakterielle Isolat

mittels Adhäsion- oder Zelleinschlußmethoden zu immobilisieren. In Vorversuchen sollten die physikochemischen Zelloberflächeneigenschaften, die die primäre Adhäsion beeinflussen, untersucht werden, um Voraussagen zum möglichen Adhäsionsverhalten machen zu können. Des weiteren sollte untersucht werden, inwieweit das angebotene Substrat die physikochemischen Eigenschaften der Zelloberfläche beeinflusste. Für den quantitativen Nachweis des THFs mußte eine gaschromatographische Methode erarbeitet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Bakterienstämme und Vektoren

Als Referenzorganismen dienten *Escherichia coli* Stamm K 12, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* (DSM 31^T) und *Bacillus licheniformis* (DSM 13^T) aus der institutseigenen Stammsammlung und *Pseudonocardia sulfidoxydans* (DSM 44248^T), der freundlicherweise von Herrn Dr. A. Lipski (Universität Osnabrück) zur Verfügung gestellt wurde. Der in der vorliegenden Arbeit isolierte Stamm K1 wurde unter der DSM Nummer 44239 bei der DSMZ in Braunschweig hinterlegt. Für die molekularbiologischen Arbeiten wurden kompetente *Escherichia coli* Zellen XL1-Blue (Epicurian coli[®]; Stratagene GmbH, Heidelberg) und der Vektor pGEM[®]-T-Easy (T4 DNA-Ligase System 1; Promega, Madison, U.S.A.) eingesetzt.

2.2 Medien und Medienzusätze

Mineralmedium

Das Mineralmedium wurde, wie bei Koenig (1991) beschrieben, hergestellt.

Salzlösung	50,0 ml
Spurenelementlösung	1,0 ml
Vitaminlösung	5,0 ml
Kaliumphosphatpuffer (1 M, pH 7,4)	50,0 ml
Natriummolybdat (1 mM)	1,0 ml
H ₂ O dest	ad 1000 ml

Der Kaliumphosphatpuffer wurde getrennt autoklaviert und mit den sterilen Spurenelement-, Vitamin- und Natriummolybdatlösungen zu der abgekühlten autoklavierten Salzlösung in H₂O dest gegeben. Der pH-Wert des Mineralmediums war 7,4.

Salzlösung:

		Endkonz. (M) im Mineralmedium
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,2 g/l	0,09
MnSO ₄ x H ₂ O	0,2 g/l	0,06
MgSO ₄	10,0 g/l	2,0
NH ₄ Cl	6,0 g/l	5,6
NaCl	1,0 g/l	0,85
ad H ₂ O dest	1 l	

Spurenelementlösung (modifiziert nach Widdel et al., 1983):

		Endkonz. (M) im Mineralmedium
FeCl ₂ x 4 H ₂ O	2,0 g/l	1,0 x 10 ⁻⁵
ZnCl ₂	0,070 g/l	5,1 x 10 ⁻⁷
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,100 g/l	5,0 x 10 ⁻⁷
H ₃ BO ₃	0,006 g/l	1,0 x 10 ⁻⁸
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,190 g/l	8,0 x 10 ⁻⁷
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,003 g/l	2,0 x 10 ⁻⁸
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,024 g/l	1,0 x 10 ⁻⁷
HCl 25 % (v/v)	10 ml	
ad H ₂ O dest	1 l	

Das Eisenchlorid wurde zuerst in der Salzsäure gelöst und dann mit H₂O dest aufgefüllt, um darin die weiteren Spurenelemente zu lösen. Die Spurenelementlösung wurde getrennt für 15 Minuten autoklaviert oder sterilfiltriert.

Vitaminlösung (modifiziert nach Genthner et al., 1981):

Pantothersäure	50 mg/l
Riboflavin	50 mg/l
Pyridoxamin-HCl	10 mg/l
Biotin	20 mg/l
Folsäure	20 mg/l

Nicotinsäure	25 mg/l
Nicotinsäureamid	25 mg/l
α -Liponsäure	60 mg/l
p-Aminobenzoesäure	50 mg/l
Thiamin-HCl	50 mg/l
Vitamin B ₁₂	50 mg/l
ad H ₂ O dest	1 l

Die Vitaminlösung wurde sterilfiltriert und lichtgeschützt bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

Zur Herstellung fester Medien wurden 15 g Agar/l zugegeben.

Nährbouillon

Die Nährbouillon wurde von der Fa. Immunpräparate Berlin bezogen.

Pankreatisches Pepton (Casein, Fleisch, Gelatine)	13,50 g/l
Eiweißhydrolysat	3,50 g/l
Hefeextrakt	3,0 g/l
NaCl	5,0 g/l
pH-Wert	7,5

Zur Herstellung fester Medien wurden 10 g Agar/l zugegeben.

TYS-Medium

Bacto Trypton	10 g/l
Bacto Yeast Extract	5 g/l
Dinatrium-Succinat	2 g/l

Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren auf pH 7,5 eingestellt.

Beweglichkeitsagar (Koenig, 1991)

Um die Beweglichkeit der Bakterien zu untersuchen, wurde dem TYS-Medium (Kap. 2.2) 0,3 % (w/v) Agar zugegeben. Mit einer sterilen Impföse wurde Zellmaterial in das Zentrum der noch frischen Agarplatte aufgetupft und die Platte inkubiert. Ein schwärmendes Wachstum, von der Mitte der Agarplatte zu ihrem Rand hin, wurde als beweglich-positiv gewertet.

Arginin-Glyzerin-Agar (El-Nakeeb und Lechevalier, 1963)

L-Arginin	1,0 g/l
Glyzerin	12,5 g/l
NaCl	1,0 g/l
K ₂ HPO ₄	1,0 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g/l
Fe ₂ (SO ₄) ₃ x H ₂ O	0,01 g/l
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	1,0 g/l
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	1,0 g/l
MnSO ₄ x H ₂ O	1,0 g/l
Agar	15 g/l

Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren auf 7,0 bis 7,5 eingestellt. Das Kaliumhydrogenphosphat wurde getrennt autoklaviert und nach dem Autoklavieren, zusammen mit dem sterilfiltrierten Arginin zu dem auf etwa 40 °C abgekühlten Medium gegeben.

Leitungswasseragar (modifiziert nach Atlas, 1993)

12,5 g Agar wurden in 1 l Leitungswasser gelöst und autoklaviert. Der pH-Wert des Mediums war 6,0. Dem Medium wurde 0,01 % (w/v) Succinat aus einer sterilen Stammlösung zugegeben.

Haferflockenagar (modifiziert nach Atlas, 1993)

Haferflocken	60 g/l
Agar	12,5 g/l
Spurenelementlösung	1 ml/l

Die Haferflocken wurden zuerst zermörsert und dann mit 1 l H₂O dest aufgefüllt und unter Rühren zum Kochen gebracht. Die Haferflockensuspension wurde durch ein Leinentuch gegeben und das Filtrat mit dem Agar versetzt, der pH-Wert auf 6,0 eingestellt, das Medium für 15 Minuten autoklaviert und die sterile Spurenelementlösung (Kap. 2.2) hinzugegeben.

Tryptophan-Bouillon

Trypton	10 g/l
D,L-Tryptophan	1 g/l
NaCl	5 g/l
ad H ₂ O dest	1 l

Zur Differenzierung eingesetzte feste Medien

Die nachfolgenden festen Differenzierungsmedien wurden nach Herstellerangaben hergestellt: Bacto MacConkey Agar (Difco Manual, 1984), Bacto Schaedler Agar mit 5 % (v/v) Schafsblut (Difco Manual, 1984), Czapek-Dox Agar (DSM Katalog, 1993, Nr. 130) und Trypticase-Soja-Agar (Sigma).

Medienzusätze

Ampicillin wurde in einer Endkonzentration von 125 µg/ml, IPTG (dioxanfrei) in einer Endkonzentration von 40 µg/ml und X-Gal in einer Endkonzentration von 48 µg/ml eingesetzt. Sterile Stammlösungen für alle Verbindungen wurden in den Konzentrationen von 100 mg/ml Ampicillin, 40 mg/ml IPTG und 20 mg/ml X-Gal hergestellt und bei -20 °C gelagert.

2.3. Kulturbedingungen, Zellanzucht und -ernte, Reinheitskontrolle, Stammhaltung und Konservierung

Kulturbedingungen für Wachstumsversuche und Stammhaltung in Flüssigkultur: Routinemäßig wurde in flüssiges Mineralmedium (Kap. 2.2) überimpft, dem, wenn nicht anders erwähnt, 10 mM THF als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zugeben wurde. Inkubiert wurde bei 28 °C und 160 Upm auf einem Rundschüttler. Wenn flüchtige Substrate eingesetzt wurden, wie z.B. THF, wurde in Erlenmeyerkolben mit vier Schikanen und Schraubverschluß mit Teflon-Silikoneinlage (Ochs Glasgerätebau, Bovenden) inkubiert. Bei nichtflüchtigen Substraten wurden Erlenmeyerkolben mit vier Schikanen oder Reagenzgläser, die mit Wattestopfen und Aluminiumfolie verschlossen wurden, benutzt. Die Kolben waren maximal mit 18 vol-% gefüllt, wenn Schraubverschlüsse mit Silikoneinlage verwendet wurden bzw. mit 30 vol-%, wenn der Kulturkolben mit Wattestopfen verschlossen wurde. Die Zellen wurden routinemäßig mit einer Vorkultur aus der logarithmischen Wachstumsphase angeimpft, so daß in der Regel eine anfängliche optische Dichte bei 578 nm von 0,1 eingestellt wurde. Die Verdopplungszeiten und Wachstumsraten wurden wie bei Schlegel (1992) berechnet.

In den Wachstumsversuchen, in denen die Salztoleranz untersucht werden sollte, wurden die jeweiligen Salze einzeln oder in Kombination vor dem Autoklavieren dem Mineralmedium zugegeben. Die Ansätze wurden mit einer Vorkultur aus der logarithmischen Wachstumsphase beimpft und das Wachstum durch Messung der optischen Dichte in Gegenwart von 10 mM THF oder Succinat verfolgt.

Zellanzucht und -ernte: Die Zellen wurden wie oben beschrieben angeimpft und in der logarithmischen Wachstumsphase (bzw. auch in der stationären Phase für die Mikrotitrationsexperimente) geerntet. Volumina bis 7 Litern wurden mit der Sorvall 5 RC B Plus mit 8500 Upm (12210 g) für 30 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert. Größere Volumina wurden mit der Heraeus Sepatech Biofuge 28 RS, die mit dem Titandurchflußrotor 8575 ausgestattet war, bei 15500 Upm (20144 g) und einer Durchflußrate von ca. 400 ml/min bei 4 °C abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden mit sterilem Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,4) dreimal gewaschen und anschließend sofort verwendet oder bei -80 °C oder -20 °C eingefroren.

Mikroskopische und makroskopische Reinheitskontrolle: Um die Reinheit der isolierten Bakterien zu überprüfen, wurden sie regelmäßig lichtmikroskopisch auf einheitliche

Zellmorphologie untersucht und Zellen oder Zellsuspensionen auf Agarplatten ausgestrichen, um die einheitliche Koloniemorphologie zu überprüfen.

Stammhaltung und Konservierung auf Agarplatten: Die Bakterienkultur wurde auf dem entsprechenden Nährmedium (Nähr-, Mineral- oder Arginin-Glyzerin-Agar) im Verdünnungsausstrich ausgestrichen bzw. Zellsuspensionen ausplattiert. Die Platten wurden mit Parafilm zum Schutz vor Austrocknung verschlossen und solange inkubiert bis deutliches Wachstum sichtbar war und dann bei 4 °C gelagert. Wenn die Agarplatten mit THF versetzt werden sollten, wurden in den Agar aseptisch Löcher gestanzt (Bernhardt, 1991), die dann mit 10 bis 50 µl THF befüllt wurden. Die mit THF beschickten Agarplatten wurden in einem luftdicht zu verschließenden Inkubator inkubiert.

Konservierung mit Kieselgel: Die Konservierung mit Kieselgel erfolgte wie bei Koenig (1991) beschrieben. 1 g Kieselgel wurde in ein Hungate-Reagenzglas eingewogen, die Reagenzglasöffnung mit Watte verschlossen und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurden die Röhrchen für eine Woche bei Raumtemperatur über Blaugel im Exsikkator getrocknet. Das zu konservierende Zellmaterial wurde in 1 ml steriler Magermilch (10 g Magermilchpulver in 100 ml H₂O dest gelöst und für 10 min autoklaviert) resuspendiert. Die sterilen Hungateröhrchen, deren Kieselgel getrocknet war, wurden auf Eis gestellt, mit 1 ml Bakteriensuspension aseptisch befüllt und für eine weitere Woche bei Raumtemperatur über Blaugel im Exsikkator getrocknet. Dann wurde der Wattestopfen entfernt, die Hungateröhrchen mit sterilen Stopfen verschlossen und diese bei 4 °C gelagert. Zur Reaktivierung der Bakterien wurde das "beimpfte" Kieselgel entweder auf eine Agarplatte aufgetragen oder in Flüssigmedium gegeben.

Konservierung auf Schrägagarröhrchen mit und ohne Paraffinölüberschichtung: Es wurden mit entsprechenden Nährmedien, die 1,5 % (w/v) Agar enthielten, Schrägagarröhrchen hergestellt, diese beimpft, inkubiert, die Kolonien mit sterilem Paraffinöl überschichtet und das Röhrchen bei 4 °C für mehrere Monate aufbewahrt.

Konservierung mit Glycerin: Flüssigkulturen oder von einer Agarplatte resuspendierte Bakteriensuspensionen, wurden mit sterilem H₂O dest oder Saline gewaschen und in frischem Mineralmedium oder Kaliumphosphatpuffer (20 mM, pH 7,4) resuspendiert. Dann wurden 10 oder 20 % (v/v) steriles Glycerin zugegeben und die Ansätze bei -80 °C eingefroren.

Anlegen von Glycerin-Stammkulturen: Zur Herstellung von Glycerin-Stammkulturen transformierter Zellen wurde von jeweils einer Kolonie Zellmaterial in 2 ml steriler

Nährbouillon, die 125 µg Ampicillin/ml enthielt, überimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Morgen wurden 900 µl Medium mit 100 µl sterilem Glycerin versetzt und bei -80 °C eingefroren.

2.4 Analytik

2.4.1 Messung der optischen Dichte (OD)

Die optische Dichte (OD) wurde an einem Zweistrahlsspektralphotometer Uvikon 930 (Kontron, Neufahrn) bei 578 nm gemessen. Als Referenz diente H₂O dest oder Saline. Die zu messenden Proben wurden verdünnt, wenn ihre optischen Dichten größer als 0,3 waren. Mit einem Spectronic 20 + Photometer (Milton Roy, U.S.A.) wurde die optische Dichte in Reagenzröhrchen gemessen.

2.4.2 Trockengewichtsbestimmung von frischen Zellen (Koch und Gerhardt, 1994)

Mit THF angezogene Bakterienzellen aus der logarithmischen Wachstumsphase einer 46 Stunden alten Kultur wurden geerntet und zweimal mit steriler Saline und einmal mit sterilem H₂O bi-dist gewaschen. Je ca. 1 bis 4 g ZFG wurden in vorher bei 105 °C getrocknete und ausgewogene Wägeschälchen eingewogen und die Zellen bis zur Gewichtskonstanz bei 105 °C im Trockenschrank getrocknet. Bei der Entnahme aus dem Trockenschrank wurden die Wägeschälchen mit Schliffdeckeln verschlossen. Es wurde mit drei Parallelansätzen gearbeitet.

2.4.3 Proteinbestimmung

Proteinbestimmung mit Coomassie-Brilliant-Blue (Bradford, 1976)

Herstellung der Bradford-Reagenz: 100 mg Coomassie-Brilliant-Blue G-250 wurden in 95 %igem (v/v) Ethanol gelöst, mit 100 ml 85 %iger (w/v) Phosphorsäure versetzt und mit H₂O dest auf 1000 ml aufgefüllt. Die Eichung wurde mit Rinderserumalbumin durchgeführt,

indem eine Eichgerade von 0 bis 100 µg erstellt wurde. Die entsprechende Verdünnung wurde mit Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,4) hergestellt. Zu 20 µl Probe wurde 1 ml der o.g. Bradford-Reagenz gegeben, der Ansatz mit einem Vortexer durchmischt und nach drei Minuten am Uvikon 930 bei 595 nm gemessen. Als Referenz diente ein Ansatz, der nur Kaliumphosphatpuffer und Bradford-Reagenz enthielt.

Extinktionsmessung bei 280 nm

Die Absorption einer Proteinlösung wurde im Uvikon 930 bei 280 nm in Quarzküvetten (d=1 cm) bestimmt. Der Probenpuffer diente als Referenz.

2.4.4 TOC-Messung

Für die Bestimmung des TOC (Total Organic Carbon) wurde zu verschiedenen Zeitpunkten in der Wachstumsphase aus einer Kultur Proben entnommen, diese abzentrifugiert und der Überstand zusätzlich filtriert, um sicherzustellen, daß eine zellfreie Flüssigkeit mit einem TOC-Analysator DIMA-TOC 100 (DIMATEC, Essen) analysiert wurde.

2.4.5 Analytische Bestimmung der THF-Konzentration mit GC/FID

Die Proben wurden in einem Shimadzu GC-14Bsc, der mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) und einem AOC17-Autosampler ausgestattet war, mit einer Supelco SPB-1701-Kapillarsäule (Länge: 30 m, Innendurchmesser: 0,25 mm, Filmdicke: 0,25 µm) analysiert. Helium wurde als Trägergas mit einer Flußgeschwindigkeit von 40 cm/s eingesetzt. Als interner Standard diente Tetrahydropyran (THP). Die Injektortemperatur war 220 °C und die Detektortemperatur 280 °C. Die Säulenanfangstemperatur war 40 °C und wurde für 3 Minuten isotherm gehalten und dann mit einer Rate von 35 °C/min auf 150 °C erhöht. Es wurde mit einem Split von 1:20, einem Injektionsvolumen von 2 µl und im Konzentrationsbereich von 0,5 bis 45 ng (0,07 bis 6,24 mM) gearbeitet. Zur Bestimmung der Toluolkonzentrationen wurde die Ofentemperatur für 4,2 Minuten isotherm auf 40 °C gehalten.

Um in niedrigeren THF-Konzentrationsbereichen messen zu können, wurde splitlos gemessen. Dafür wurde der Injektoreinsatz ausgetauscht und mit einer Supelco SPB-35-Kapillarsäule (Länge: 30 m, Innendurchmesser: 0,25 mm, Filmdicke: 0,25 μm) gearbeitet. Das Temperaturprogramm war: 70 °C für 2 Minuten und anschließender Temperaturerhöhung mit einer Rate von 20 °C/min auf 110 °C. Es wurde sowohl mit Injektionsvolumina von 0,5 μl (Supelco Empfehlung) als auch mit 1 μl im Konzentrationsbereich von 0,5 bis 10 ng gearbeitet (bei 1 μl Probenauftrag: 0,007 bis 0,14 mM).

Um die Kapillarsäulen zu schonen, wurde auch mit mittelpolaren Vorsäulen (2,5 m) gearbeitet. Diese wurden mit handelsüblichen Konnektoren mit der Trennsäule verbunden.

2.4.6 Analytische Bestimmung der THF-Konzentration mit GC/FID/Headspace

Für die THF-Konzentrationsbestimmung mit FID/Headspace wurde das GC AutoSystem (Perkin-Elmer, Weiterstadt) mit FID und PE Nelson Integrator Modell 1020 benutzt. Gemessen wurde mit einer Perkin-Elmer Kapillarsäule Permaphase PVMS/54 (Länge: 25 m, Innendurchmesser: 0,25 mm, Filmdicke: 1 μm). Stickstoff wurde als Trägergas eingesetzt, die Injektor- und Detektortemperaturen waren 200 und 220 °C. Es wurde isotherm bei 40 °C Säulenofentemperatur für 10 Minuten gemessen. Im Bereich von 0,01 bis 0,1 mM THF war ein linearer Zusammenhang zwischen Peakfläche und Konzentration gegeben (Zenner, 1997).

Enzymhaltige Proben, die ein NADH-regenerierendes System enthielten (Kap. 2.6.4.2), mußten nach Festphasenmikroextraktion (engl.: SPME) am o.g. GC-System, das dafür zusätzlich mit einem speziell angefertigten SPME-Insert (Innendurchmesser: 1,25 mm) ausgestattet war, gemessen werden. Für die Festphasenmikroextraktion wurde das THF aus der Gasphase für 3 Minuten bei Raumtemperatur an eine 100 μm Polydimethylsiloxan-Faser (Supelco, Jena) gebunden, wobei der Übergang des Analyten in die Gasphase durch Rühren bei 1000 Upm/min beschleunigt wurde (Zenner, 1997). Die anschließende Desorption des Analyten erfolgte im GC-Injektor für die Dauer von 1 Minute. Es wurde im THF-Konzentrationsbereich von 0,01 bis 0,1 mM gemessen. Die Bestimmung der Proben mittels GC/FID/Headspace erfolgte freundlicherweise durch Herrn T. Zenner (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg).

2.4.7 Messungen an der Sauerstoffelektrode (Cooper, 1981 und Becker, 1997)

Für die Messungen zur Bestimmung einer THF abhängigen Enzymaktivität mit ruhenden Zellen (Kap. 2.6.3.1) und Rohextrakt (Kap. 2.6.3.2) wurde eine Clark-Sauerstoff-Elektrode (Rank Brothers, England) genutzt. Die Eichung des Gerätes erfolgte bei gewählter Temperatur mit luftgesättigtem Puffer (Schreiberausschlag = 100 %) und einer frisch zubereiteten 10 mM Natriumdithionitlösung für den Wert ohne Sauerstoffgehalt (Schreiberausschlag = 0). Durch ein Wasserbad wurde das Meßgerät temperiert. Wenn nicht anders erwähnt, wurde bei 25 °C gemessen. Bei dieser Temperatur beträgt die gelöste Sauerstoffkonzentration 258 nmol/ml H₂O, bei 28 und 30 °C 244 bzw. 237 nmol/ml H₂O (Cooper, 1981).

2.5 Taxonomische Untersuchungen

2.5.1 Makroskopische und mikroskopische Beschreibung

Die Kolonien (Kolonieform und -farbe) der isolierten Bakterien wurden makroskopisch notiert und ihre mikroskopischen Zellmorphologien beschrieben. Die Größenbestimmung wurde mit einem Okularmikrometer, das mit einem Objektmikrometer geeicht wurde, durchgeführt. Die Beweglichkeit der isolierten Bakterien wurde mikroskopisch bzw. durch Einsatz des Beweglichkeitsagars (Kap. 2.2) untersucht. Die Ausbildung von Luft- und Substratmyzel wurde durch Animpfen auf Leitungswasser- (Lechevalier, 1989), Arginin-, Glycerin- oder Nähragar untersucht. Die Untersuchung erfolgte wie bei Cross (1994) beschrieben.

2.5.2 Standarduntersuchungen für die taxonomische Einordnung der isolierten Bakterien

Die Gram-Färbung wurde mit dem 3-Schritt Gram Safranin-S Kit (Difco, Augsburg) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Säurefestigkeit (Ziehl-Neelsen-Färbung) wurde, wie bei Murray et al. (1994) beschrieben, überprüft. Der Katalase-Test wurde wie bei Smibert und Krieg (1994), der Oxidase-Test wie bei Atlas et al. (1984), und der KOH-Test wie bei

Gregersen (1978) beschrieben, durchgeführt. Der Aminopeptidase-Test wurde mit Bactident Aminopeptidase Teststreifen (Merck, Darmstadt) nach Herstellerangaben und der Test auf Indolbildung aus Tryptophan nach Süßmuth et al. (1987) durchgeführt. Dafür wurde das zu untersuchende Bakterium in Tryptophan-Bouillon (Kap. 2.2) angezogen und die Bouillon mit Kovacs-Reagenz versetzt. Für die Herstellung des Kovacs-Reagenzes wurden 5 g p-Dimethylaminobenzaldehyd in 75 ml n-Butanol gelöst und 25 ml HCl hinzugegeben. Für die Kapselbildung mit Nigrosin wurden 10 g Nigrosin in 100 ml H₂O dest gelöst und für 30 Minuten gekocht, dann durch einen Faltenfilter gegeben und mit 0,5 ml Formaldehyd konz. versetzt (Schröder, 1987). Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden geerntet und zweimal mit steriler Saline gewaschen. Etwas Koloniematerial wurde in einem Tropfen Nigrosinlösung auf einem Objektträger verrieben, das Deckgläschen aufgedrückt und das Präparat im Lichtmikroskop, im Phasenkontrast und mit Ölimmersion mikroskopiert. Kapseln und Schleime werden von Nigrosin nicht angefärbt, sie erscheinen im mikroskopischen Bild hell. Als Positivkontrollen dienten *B. cereus* (DSM 31^T) und *B. licheniformis* (DSM 13^T).

Die Testsysteme api 20 E (für Enterobakterien) und api ZYM (beide von bioMérieux, Frankreich) und das BBLCRYSTAL Identifizierungssystem für Gram-positive Bakterien (Becton Dickinson, Heidelberg) wurden laut Herstellerangaben verwendet und ausgewertet. Ausnahme: Die Teststreifen, die mit Zellsuspensionen eines THF abbauenden Bakteriums beimpft waren, wurden bei 28 °C, und nicht bei 37 °C, inkubiert. Der Guanin und Cytosin (G+C) Gehalt und die Chinonanalyse wurde wie bei Lechner et al. (1995) beschrieben, bestimmt. Für die Chinonanalyse wurde als Referenzstamm *Pseudonocardia sulfidoxydans* DSM 44248^T eingesetzt. Die Bestimmung des G+C-Gehalts und die Chinonanalyse wurden freundlicherweise von einer Praktikumsgruppe unter der Anleitung von Frau Dr. U. Lechner durchgeführt. Für die Fettsäureanalyse des THF abbauenden Bakteriums wurde das Isolat auf Trypton-Soja-Agar angezogen. Die Fettsäureanalyse wurde freundlicherweise von Herrn Prof. R.M. Kroppenstedt (DSMZ) durchgeführt.

2.5.3 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.5.3.1 Zellaufschluß zur Isolierung der Template DNA

Etwas Koloniematerial des zu untersuchenden Bakteriums wurde mit einem sterilem Zahnstocher von einer Agarplatte abgenommen, einmal mit sterilem H₂O dest gewaschen und in sterilem H₂O bi-dest resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend für 3 Minuten bei 95 °C inkubiert, um die DNA freizusetzen.

2.5.3.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Der Ansatz ("Master Mix") bestand aus folgenden Komponenten:

5	µl	<i>Tfl</i> -Puffer (20x)
6,4	µl	MgCl ₂ (25 mM)
1	µl	dNTP-Mix (20 mM)
2	µl	<i>Tfl</i> -Polymerase (1 U/ml)
3	µl	Primer 1 (ca. 50 pmol)
3	µl	Primer 2 (ca. 50 pmol)

ad 100 µl H₂O bi-dest

Zu 29 µl "Master-Mix" wurde je 1 µl des entsprechenden Templates pipettiert und die PCR im Thermozykler (Biometra, Göttingen) gestartet. Das Temperaturprogramm war: 94 °C für 2 min (Denaturierung), dann 10 Zyklen 94 °C für 15 s, 51-55 °C für 30 s und 72 °C für 1 min gefolgt von 16-20 Zyklen des o.g. Zeitprogramms mit 5 s Zeitinkrement pro Zyklus. Es folgte eine abschließende Elongation bei 72 °C für 2 min. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Template DNA mitgeführt.

2.5.3.3 Agarosegelelektrophorese

Für die Herstellung von 200 ml Agarosegel wurden 2 oder 10 g Agarose in 200 ml 0,5 x TAE-Puffer (20 mM Tris, 10 mM Essigsäure, 0,5 mM EDTA, pH 8,0) in der Mikrowelle so lange erhitzt bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Nach dem Abkühlen wurde Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml zugegeben. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Probenpuffer (Loading dye, Promega, U.S.A.) versetzt und die Fragmentgrößen mit Hilfe des pGEM[®] Markers (Promega, U.S.A.) abgeschätzt. PCR-Produkte wurden auf einem 1 oder 5 %igen (w/v) Agarosegel bei 80 mV für ca. 45 bzw. 90 Minuten getrennt.

Der Probenpuffer von Promega (Loading dye) enthielt:

- 10 % Ficoll 400
- 0,25 % Bromphenol Blau
- 0,25 % Xylen Cyanol FF
- 0,4 % Orange G
- 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
- 50 mM EDTA

2.5.3.4 Reinigung von Nukleinsäuren

Die Reinigung des PCR-Produkts von Salzen, Primer- und Nukleotidresten erfolgte mit dem QIAquick PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers. Das gereinigte PCR-Produkt wurde abschließend für ca. 5 Minuten in einer Speed-Vac (ohne zugeschalteter Heizung) behandelt.

Positive Klone wurde über Nacht in 100 ml Nährbouillon, die mit 100 µg Ampicillin/ml versetzt war, bei 37 °C und ca. 200 Upm inkubiert und am Morgen mit einer Sorvall Zentrifuge im SS34-Rotor für 10 min bei 26890 g geerntet. Die Plasmid-DNA-Isolierung erfolgte laut Anleitung des Herstellers (Midi Protocol, Qiagen, Hilden). Zur Abschätzung der Plasmid-DNA-Konzentration wurde ein Aliquot der isolierten Plasmid-DNA mit Template DNA bekannter Konzentration in einem 1 %igen Agarosegel verglichen.

2.5.3.5 Ligation und Mikrodialyse des Ligationsprodukts (Marusyk und Sergeant, 1980)

Gereinigte PCR-Produkte wurden über Nacht bei 4 °C in einen pGEM[®]-T-Easy Vector ligiert. Dazu wurden 7 µl gereinigtes PCR-Produkt mit je 1 µl T4-DNA-Ligase-Puffer (10x), T4 DNA-Ligase und pGEM[®]-T-Easy Vector (T4 DNA-Ligase System 1, Promega, U.S.A.) steril versetzt.

Die Mikrodialyse erfolgte wie bei Marusyk und Sergeant (1980) beschrieben. In eine sterile Petrischale wurde steriles H₂O dest gefüllt, so daß der Boden gut bedeckt war. Ein Stück Membranfilter (0,025 µm, Millipore, Bedford, England) wurde auf die Wasseroberfläche gelegt, das Ligationsprodukt auf die Filteroberfläche aufgetragen und der Deckel der Petrischale wieder aufgelegt. Dialysiert wurde bei Raumtemperatur für 45 Minuten.

2.5.3.6 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation (Dower et al., 1988)

Für die Herstellung kompetenter *E. coli* XL Blue I Zellen wurde für die Vorkultur eine Kolonie von Epicurian coli[®] competent cells XL1-Blue (Stratagene, Heidelberg) in 5 ml Nährbouillon (Kap. 2.2), die mit 12,5 µg Tetrazyklin/ml versetzt war, bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde mit dieser Vorkultur eine 200 ml Hauptkultur (Nährbouillon mit 12,5 µg Tetrazyklin/ml) 1 %ig (v/v) angeimpft und die optische Dichte in regelmäßigen Abständen gemessen, bis die Kultur eine optische Dichte von 0,56 erreicht hatte. Vor der Zellernte wurde die Kultur für zehn Minuten bei 4 °C abgekühlt. Je 50 ml der Kultur wurden in sterile Röhrchen überführt, für 15 Minuten bei 4800 Upm abzentrifugiert und anschließend zweimal mit je 50 ml sterilem eiskalten H₂O dest gewaschen. Jedes Zellpellet wurde in 5 ml eiskaltem 10 %igen (w/v) Glycerin resuspendiert und in 40 µl Aliquots portioniert bei -80 °C gelagert.

Transformiert wurde mit Hilfe der Elektroporationsmethode. Dazu wurden kompetente *E. coli* XL Blue I Zellen mit dem mikrodialysierten Ligationsprodukt inkubiert. Dafür wurde ein Gene Pulser[™] mit Pulskontrollgerät (BioRad, München) eingesetzt. Der Elektroporationsansatz bestand aus 80 µl kompetenten Zellen und 5 µl mikrodialysierten Ligationsansatz, die zusammen für ca. 1 Minute auf Eis vorgekühlt wurden. Elektroporiert wurde mit 25 µFD, 200 Ω und 2,5 kV für ca. 2 Sekunden in einer Elektroporationsküvette.

Das Elektroporationsprodukt wurde in 1 ml steriler Nährbouillon verdünnt und für 1 Stunde auf einem Rundschüttler bei 37 °C inkubiert. Verdünnte Aliquots wurden dann auf Nähragarplatten, die mit Ampicillin, IPTG und X-Gal versetzt waren (Kap. 2.2) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Transformierte Zellen, die das Insert integriert hatten, konnten anhand der Blau-Weiß-Selektion (α -Komplementation) identifiziert werden. Mittels PCR (Kap. 2.5.3.2) wurden die Tranformanten auf die Größe des Inserts überprüft.

2.5.3.7 Restriktionsverdau der amplifizierten PCR-Produkte

Für den "Restriktionsansatz-Master-Mix" wurden zusammengegeben:

6,25 μ l *Rsa* I (8 U/ μ l) (Promega, U.S.A.)

5,0 μ l *Msp* I (10 U/ μ l) (Promega, U.S.A.)

3,0 μ l Restriktionsinkubationspuffer (10x) (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

ad 30 μ l H₂O bi-dist

Der Restriktionsverdau wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend im Agarosegel überprüft.

2.5.3.8 Sequenzierung von DNA (Sanger et al., 1977) und Auswertung

Die Sequenzierungsreaktion beruhte auf dem Prinzip des Kettenabbruchs (Sanger et al., 1977). Cycle Sequencing wurde mit ca. 1,5 μ g isolierter Plasmid-DNA und mit dem ABI PRISM™ dRhodamine Terminator Cycle Sequencing ready Reaction Kit mit AmpliTag® DNA Polymerase FS (Biosystems, Perkin-Elmer, Weiterstadt) durchgeführt. Das Temperaturprogramm bestand aus 33 Zyklen von 95 °C für 30 s, individuelle Primerannealingtemperatur für 15 s und 60 °C für 4 min. Die Sequenzierung erfolgte mit einem ABI377 Sequenzierungsgerät, Version 4.0 (Biosystems, Perkin-Elmer, Weiterstadt) nach Herstellerangaben. Primer, die zur Sequenzierung der unbekanntenen 16S rDNA-Sequenz eingesetzt wurden, waren die von Sawada et al. (1993) und Snel et al. (1994) beschriebenen. Diese Primer waren aus den konservierten Sequenzbereichen der 16S rDNA von *E. coli* (Brosius et al., 1978) abgeleitet worden. Im Laufe der Sequenzierung wurden noch zwei weitere Primer ("U3F" und "U3R") aus der bereits sequenzierten DNA

abgeleitet. In Tabelle A (Anhang) sind die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Primer aufgeführt. Mit jedem Primer wurden mindestens sechs zeitlich unabhängige Sequenzierungen durchgeführt.

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem PCGENE-Programm (6.85/1995™ IntelliGenetics Inc.) ausgewertet und mit vorhandenen Sequenzen in der Blast Database Searches, England, (<http://www.ebi.ac.uk/searches/searches.html>) verglichen. Sequenzen von verwandten Gattungen wurden mit dem CLUSTAL W-Programm (Thompson et al., 1994) verglichen. Die nicht eindeutig definierten Sequenzpositionen wurden aus der Gesamtsequenz herausgenommen, so daß diese in den weiter angestellten phylogenetischen Analysen nicht berücksichtigt wurden. Mit Hilfe der Algorithmen von Jukes und Cantor (1969) und Kimura (1980) wurden die evolutionären Distanzen mit dem Programm DNADIST aus den PHYLIP-Programmpaket (Felsenstein, 1993) bestimmt. Aus den errechneten Distanzen wurde mit dem Programm NEIGHBOR (PHYLIP-Programmpaket, Felsenstein, 1993) ein Dendogramm angefertigt. Die zu den Abzweigungen gehörenden "Bootstrap"-Werte wurden mit dem SEQBOOT-Programm (PHYLIP-Programmpaket, Felsenstein, 1993) auf Grundlage von 200 Datensätzen errechnet.

2.6 Enzymatische Messungen

2.6.1 Herstellung ruhender Zellen

Bakterienzellen aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden geerntet, dreimal mit Kaliumphosphatpuffer (25 mM, pH 7,4) gewaschen und in Kaliumphosphatpuffer (25 mM, pH 7,4) resuspendiert.

2.6.2 Zellaufschlußmethoden und Dialyse von Rohextrakten

2.6.2.1 Zellpermeabilisierung

Für die Zellpermeabilisierung wurden frische Zellen, die wie unter Kap. 2.3 angezogen wurden, verwendet. Ruhende Zellen (Kap. 2.6.1) wurden als Kontrolle eingesetzt. Als

weitere Kontrollen dienten Ansätze, die autoklavierte Zellen oder nur Puffer und das entsprechende Permeabilisierungsreagenz enthielten. Die THF-Konzentration in den Permeabilisierungsversuchen war 1,4 mM.

Toluol-Aceton-Permeabilisierung (Chassy und Thompson, 1983; modifiziert nach Kornberg und Reeves, 1972: Ein eisgekühlter Ansatz von 400 mg ZFG in 2 ml Kaliumphosphatpuffer (25 mM, pH 7,4) wurde mit 100 µl eines Toluol-Aceton-Gemisches (1:9, v/v) versetzt und der Ansatz für 5 Minuten bei Raumtemperatur gemischt. Dann wurde der Permeabilisierungsansatz mit 100 ml Kaliumphosphatpuffer (25 mM, pH 7,4) aufgefüllt und bei Raumtemperatur inkubiert (s.u.).

Toluol-Permeabilisierung: Es wurden entweder 250 mg ZFG in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (25 mM, pH 7,4) aufgenommen, mit 50 µl Toluol konz. versetzt und nach 5 Minuten Inkubation auf 100 ml mit o.g. Puffer aufgefüllt (Phillips, 1994), oder 2,5 g ZFG in 5 ml Kaliumphosphatpuffer (25 mM, pH 7,4) aufgenommen und jeweils 0,5 ml dieser Zellsuspension mit 1,6, 3,2, 4,7 bzw. 6,3 mM Toluol versetzt und 5 Minuten auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit 50 ml Kaliumphosphatpuffer (25 mM, pH 7,4) aufgefüllt. Es wurde bei 90 bzw. 200 Upm auf einem Rundschtüttler bei Raumtemperatur inkubiert.

Triton X-100-Permeabilisierung (Miozarri et al., 1978): Pro ml eisgekühlten Kaliumphosphatpuffers (0,1 M, pH 7,4) wurden 100 mg ZFG resuspendiert und mit 0,05 % (v/v) Triton X-100 versetzt, gemischt und für drei Tage bei -20 °C eingefroren. Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen bei Raumtemperatur aufgetaut und 2,5 ml jeweils mit 1 mM THF-Endkonzentration in Reagenzgläsern, die mit Schraubverschluß und Silikoneinlage ausgestattet waren, bei Raumtemperatur und ca. 100 Upm inkubiert.

2.6.2.2 Zellaufschluß mit der French-Press oder mit Ultraschall

Zellen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und pro g ZFG in 2 ml Aufschlußpuffer, Kaliumphosphat- (50 mM, pH 7,4) oder Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 7,4 mit 2 mM DTT), vorsichtig im Eisbad resuspendiert. Dem Ansatz wurde 0,2 µl Benzonase (25 U/µl, Merck, Darmstadt)/ml zugegeben.

Für kleine Volumina wurde die Mini-French-Press-Zelle und für größere die 20-K-Zelle eingesetzt. Beide Zellen wurden mit einem Kammerinnendruck von 20.000 psi (138 MPa)

betrieben. Der Aufschluß erfolgte durch drei Passagen. Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen wurden im SS34-Rotor in der Sorvallzentrifuge sedimentiert (20 Minuten bei 15000 Upm = 26891 g). Der klare zellfreie Überstand wurde abgenommen und nachfolgend als Rohextrakt (RE) bezeichnet.

Für den anaeroben Zellaufschluß wurde der Aufschlußpuffer vor Verwendung entgast und anschließend mit Stickstoff durchströmt. Die verwendete French-Press-Zelle und Röhrchen wurden ebenfalls vor Gebrauch mit Stickstoff begast. Aufbewahrt wurde der Rohextrakt unter anaeroben Bedingungen in Hungate-Röhrchen. Beim anaeroben Aufschluß wurde der Puffer mit 2 mM DTT versetzt und 5 mM MgSO₄ zugegeben.

Für den Zellaufschluß mit Ultraschall wurde die Zellsuspension in vier bis sechs Zyklen für jeweils 30 Sekunden und 30 sekundiger Abkühlphase bei voller Leistung mit einem Uni-Equip-Gerät (Martinsried) beschallt.

2.6.2.3 Dialyse von Rohextrakten

Der Rohextrakt wurde über Nacht bei 4 °C gegen das 1000fache Volumen an Puffer in Dialyseschläuchen dialysiert. Das Ausschlußvolumen der verwendeten Dialyseschläuche war 6 bis 8 bzw. 10 bis 12 kDa.

2.6.3 Messungen zum Nachweis THF abhängiger enzymatischer Aktivität an der Sauerstoffelektrode

Oxygenasen und Oxidasen sind Enzyme, die mit molekularem Sauerstoff reagieren. Ihre Aktivität kann deshalb mittels Messung des Sauerstoffverbrauchs bestimmt werden.

2.6.3.1 Messungen mit ruhenden Zellen

Im Standardansatz wurden eingesetzt:

	<u>Endkonzentration im Test</u>
Ruhende Zellen	10-20 μ l
THF	0,1-10 mM
Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,4)	ad 1500 μ l

2.6.3.2 Messungen mit Rohextrakt

	<u>Endkonzentration im Test</u>
FAD oder FMN / oder FAD + FMN	0,04-0,2 mM
NADH oder NADPH	0,2-1,5 mM
Rohextrakt *	5-200 μ l
THF	0,05-10 mM
Kaliumphosphatpuffer oder Tris-HCl (50 mM, pH 7,4)	ad 1500 μ l

*Es wurde auch mit dialysiertem Rohextrakt (Kap. 2.6.2.3) gemessen.

Es wurde im pH-Bereich von 5 bis 8,5 gemessen und 1,5 μ l Spurenelementlösung/Ansatz oder 0,1 mM FeSO_4 zugegeben. Die mögliche Bildung von H_2O_2 wurde durch Katalasezugabe (65 U/Ansatz; Becker, 1997) überprüft. Bei Einsatz der Katalase wurde mit dem Elektronendonator gestartet.

2.6.4 Messung THF abhängiger enzymatischer Aktivität durch analytische Bestimmung der THF-Konzentration mit GC/FID oder GC/FID/Headspace

2.6.4.1 Messungen mit wachsenden, ruhenden und permeabilisierten Zellen

Zellsuspensionen wurden abzentrifugiert und der Überstand entweder sofort analysiert oder bis zur Analyse bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Ruhende und permeabilisierte Zellen wurden wie unter 2.6.1 bzw. 2.6.2.1 angegeben präpariert.

Es wurde auch untersucht, ob eine THF-Abnahme in zellfreiem Kulturüberstand detektiert werden konnte. Ansätze wurden sowohl stehend als auch schüttelnd inkubiert.

2.6.4.2 Messungen mit NADH-regenerierendem System (Honorat-Pascal et al., 1990)

Bedingt durch eine THF unabhängige NADH-Oxidase-reaktion wurde ein NADH-regenerierendes System eingesetzt, um sicherzustellen, daß NADH in der Reaktion nicht limitierend war. Es wurde dem Ansatz pro ml zusätzlich Glucose (50 mM) und Glucose-Dehydrogenase (0,5 U, aus *B. megaterium*) zugegeben.

2.6.5 Reaktionsansatz für die Messung von NADH-Oxidaseaktivität

Der Reaktionsansatz für die Messung von NADH-Oxidaseaktivität bestand aus:

	<u>Zugabe (µl)</u>	<u>Endkonzentration im Testansatz:</u>
Rohextrakt	2-100	
FAD/FMN (je 8 mM)	25	je 0,2 mM
NADH (30 mM)	1,3	0,04 mM
Tris-HCl (50 mM, pH 7,5)	ad 1000	

Die NADH-Abnahme wurde bei 340 nm ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) am Zweistrahlenspektrophotometer Uvikon gemessen.

2.6.6 Reaktionsansatz für die Messungen von Reduktaseaktivitäten

Der Reaktionsansatz für die Messungen von Reduktaseaktivitäten war:

	<u>Zugabe (µl)</u>	<u>Endkonzentration im Testansatz:</u>
Rohextrakt	2-100	
FAD/FMN (je 8 mM)	25	je 0,2 mM
NADH (30 mM) *	1,3	0,04 mM
Elektronenakzeptor **	10-50	0,1-200 mM
Tris-HCl (50 mM, pH 7,5)	ad 1000	

* Nicht im Meßansatz enthalten, wenn mit NAD gemessen wurde.

** Ausnahme: siehe Akzeptormix

2.6.6.1 Verwendete Elektronenakzeptoren

Die in Tabelle 1 aufgeführten Elektronenakzeptoren wurden verwendet.

Tabelle 1: Verwendete Elektronenakzeptoren.

Elektronen-akzeptor	Konz. der Stammlösung (mM)	Konz. im Test (mM)	λ (nm)	ϵ (mM ⁻¹ cm ⁻¹)	Literatur
Akzeptormix *			522	8,6	Armstrong (1964)
Brilliant-Cresyl-Blau **	10	0,1	620	37,0	Serva (1989)
Cytochrom c	10	0,1	550	21,1	Dawson et al. (1986)
Ferricyanid	100	1,0	420	1,0	Ohe und Watanabe (1979)
NAD	50	0,5	340	6,3	Dawson et al. (1986)
NBT	10	0,2	535	18,3	Koenig und Andreesen (1989)
Methylviologen **	200	10,0	600	13,0	Thornley (1974)

* Der Akzeptormix enthielt 10 mM Phenazinethosulfat (PES) 5 % (w/v) DCPIP in H₂O dest oder Ethanol gelöst. 20 μ l wurden pro ml Testansatz eingesetzt.

** Anaerob gemessen.

2.6.7 Bestimmung enzymatischer Aktivität

2.6.7.1 Bestimmung enzymatischer Aktivität durch gaschromatographische Analyse der Substratabnahme

Die spezifischen Enzymaktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{spezifische Aktivität (U/mg)} = \frac{\mu\text{mol THF / min}}{\text{mg Protein}}$$

2.6.7.2 Bestimmung enzymatischer Aktivität durch Messungen an der Sauerstoffelektrode

Die spezifische Enzymaktivität wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$U/mg = \frac{\text{Änderung des Sauerstoffgehalts (\%)} \times \text{min}^{-1} \times \text{Sauerstoffgehalt im gesättigten Ansatz (\mu\text{mol/ml})}{100 \% \times \text{Protein (mg/ml)}}$$

2.6.7.3 Bestimmung von Oxidase- und Reduktaseaktivitäten

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte nach der Formel:

$$U/ml = \frac{\Delta E / \text{min} \cdot V}{d \cdot \epsilon \cdot v}$$

$\Delta E / \text{min}$ = Extinktionsänderung (min)

V = Gesamtvolumen des Meßansatzes (ml)

d = Schichtdicke der Küvette (cm)

ϵ = Extinktionskoeffizient ($\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

v = Probenvolumen (ml)

Der Lichtweg der Küvette betrug 1 cm und der Meßansatzpuffer wurde vor der Messung im Uvikon auf 25 °C temperiert. Für die Bestimmung der endogenen Rate wurde zuerst ohne proteinhaltige Fraktion gemessen, dann diese zugegeben und die Extinktionsänderung bestimmt. Für die Bestimmung der ΔE -Werte wurde die endogene Extinktionsänderung von der Extinktionsänderung der proteinhaltigen Probe subtrahiert.

2.6.8 Untersuchung auf das Vorhandensein von bakteriellem Cytochrom P-450

Metyrapon wurde zur Untersuchung auf das Vorhandensein von Cytochrom P-450 in wachsenden Zellen eingesetzt (Poupin et al., 1998). THF adaptierte Zellen wurden im Mineralmedium (Kap. 2.2) unter Zusatz von 1 mM Metyrapon inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne diesen spezifischen Cytochrom P-450 Inhibitor. Das Wachstumsverhalten beider Ansätze wurden verglichen.

Die Untersuchung auf bakterielles Cytochrom P-450 in ganzen Zellen erfolgte wie bei Estabrook et al. (1972) und Peterson und Lu (1991) beschrieben: Mit THF angezogene Zellen wurden geerntet, mit Saline gewaschen, in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,4) mit einer Zelldichte von 1 bis 5 g ZFG/l aufgenommen und mit 7,5 % (v/v) Glycerin versetzt. Durch Zugabe einiger Körner Natriumdithionit wurden die Meßansätze reduziert. Die Probe wurde danach für ca. 30 Sekunden mit Kohlenmonoxid durchströmt und anschließend das Differenzspektrum der Kontrolle (ohne Kohlenmonoxidbehandlung) und der Probe (mit Kohlenmonoxidbehandlung) im Bereich von 400 bis 500 nm am Uvikon gemessen.

2.7 Chromatographische Methoden

2.7.1 Gelfiltration von Rohextrakt

Um die Abtrennung niedermolekularer Substanzen zu erreichen, wurde Rohextrakt nach Herstellerangaben an einer PD-10-Fertigsäule (Gelmaterial: Sephadex G-25; Amersham Pharmacia, Freiburg) chromatographiert. Nachdem die Säule mit einem Bettvolumen Probenpuffer (Kaliumphosphatpuffer, 50 mM, pH 7,4) äquilibriert worden war, wurden 2,5 ml Rohextrakt aufgetragen. Das Protein wurde mit 3,5 ml des o.g. Probenpuffers eluiert.

2.7.2 Ionenaustauschchromatographie von Rohextrakt

Es wurde eine Pharmacia-Säule (Durchmesser: 2 cm), die mit Q-Sepharose Fast Flow beschickt war und deren Bettvolumen 8 ml betrug, eingesetzt. Angeschlossen wurde eine LKB-Pumpe P-1 und ein Fraktionssammler (LKB RediFrac). Die Säule wurde vor Versuchsbeginn mit 10fachem Säulenvolumen mit dem Laufpuffer (Tris-HCl, 50 mM, pH 7,5) äquilibriert. Die Flußrate betrug 1 ml/min. Nachdem der Rohextrakt aufgetragen war (ca. 17 ml Rohextrakt, die Proteinkonzentration betrug ca. 20,5 mg/ml Säulenmaterial), wurde solange mit dem Laufpuffer gewaschen (ca. zwei Säulenvolumina), bis die Absorption bei 280 nm (Kap. 2.4.3) wieder die Grundlinie erreicht hatte. Die gebundenen Proteine wurden mit einem Salzgradienten über 10 Säulenvolumina von 0 bis 1 M KCl in Puffer eluiert. Die Fraktionsgröße betrug 1,5 ml.

2.7.3 Anaerobe Ionenaustauschchromatographie von Rohextrakt

Zellen wurden anaerob aufgeschlossen (Kap. 2.6.2.2) und an einer Q-Sepharose Fast Flow unter anaeroben Bedingungen im Anaerobenzelt chromatographiert. Die Proteinkonzentration betrug ca. 20 mg/ml Säulenmaterial. Als Probenpuffer diente Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) mit 2 mM DTT. Die gebundenen Proteine wurden mit einem Salzgradienten über 6 Säulenvolumina von 0 bis 1 M KCl in Puffer eluiert.

2.8 Immobilisierungsversuche

2.8.1 Charakterisierung der Zelloberfläche

Die physikochemischen Zelleigenschaften, die die primäre Adhäsion an Trägermaterial beeinflussen (McEldowney und Fletcher, 1986; Dalton et al., 1994; Groening et al., 1998), sollten mit den nachfolgend beschriebenen Experimenten untersucht werden.

2.8.1.1 Messung des Zetapotentials (Martienssen et al., 2000)

Durch Messung des Zetapotentials kann die Nettooberflächenladung einer Bakterienzelle bestimmt werden (James, 1991; Martienssen, 2000a). Die Ermittlung des Zetapotentials erfolgte durch die Bestimmung der elektrophoretischen Mobilität in einem ZetaSizer 3000 (Malvern Instruments, Malvern, England) unter Verwendung der Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung (Krekeler, 1990):

$$\zeta = \frac{\mu_E \times \eta}{\varepsilon}$$

ζ = Zetapotential (mV)

μ_E = elektrophoretische Mobilität ($\text{m}^2 \times \text{V}^{-1} \times \text{s}^{-1}$)

η = Dielektrizitätskonstante in der elektrischen Doppelschicht

ε = Viskosität (mPa x s)

Es wurden sowohl Zellen in Mineralmedium mit THF als auch mit Succinat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle angezogen und Zellen aus der frühlogarithmischen, logarithmischen und stationären Wachstumsphase geerntet und zweimal mit NaCl (10 mM)

gewaschen. Das Zellpellet wurde auf eine Zellkonzentration von 1 g ZTG/l mit NaCl (10 mM) eingestellt und bis zur Messung auf einem Schüttler auf Eis gelagert. Bei Versuchsbeginn wurde die Bakteriensuspension 1:10 mit H₂O bi-dist verdünnt und mit 0,1 N HCl bzw. NaOH (pH-Bereich 3 bis 10) und 1 N HCl bzw. NaOH (pH-Bereich ≤ 3 und ≥ 10) auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Die so eingestellte Probe wurde sofort im ZetaSizer 3000 bei Raumtemperatur gemessen. Es wurden für das jeweilige Substrat und Zellalter mindestens zwei Meßreihen unabhängig voneinander durchgeführt und jeder Meßwert mindestens doppelt bestimmt.

2.8.1.2 Mikrotitration

Mit Hilfe der Mikrotitration können die Oberflächenladungen von Bakterien charakterisiert werden (James, 1991). Die Zellen wurden in Mineralmedium mit THF oder Succinat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle angezogen und in verschiedenen Wachstumsphasen geerntet, zweimal mit Saline (0,9 %, w/v) gewaschen und in carbonatarmer Saline auf eine Zellkonzentration von ca. 5 g ZTG/l eingestellt. Für die Herstellung carbonatarmer Saline wurde das H₂O dest direkt in fest verschraubbare Glasflaschen, in die das Natriumchlorid eingewogen war, gefüllt und sofort verschlossen.

Der Versuch wurde an einer Mikrotitratorapparatur (Deutsche Metrohm, Filderstadt) durchgeführt. Dafür wurden 25 ml Bakteriensuspension mit 225 ml carbonatarmer Saline versetzt und der Anfangs-pH-Wert mit 1 N NaOH auf ca. pH 11 eingestellt. Vor Versuchsbeginn wurde der Ansatz 15 Minuten äquilibriert und der pH-Wert nachgestellt. Titriert wurde mit 0,1 N HCl bis ca. pH 3,4.

2.8.1.3 Isoelektrische Fokussierung (IEF) ganzer Zellen (Martiensen et al., 2000)

Ganze Zellen (maximal 10 mg ZFG/Ansatz) wurden in einem Ampholytgemisch in Röhrchen (Innendurchmesser: 6 mm, Volumen: 20 ml) getrennt und der isoelektrische Punkt der intakten Bakterienzelle in einem Gradienten von 10 bis 60 % (v/v) Glycerin mit 1 % (v/v) Ampholin pH 3-10 im elektrischen Feld bestimmt. Als Marker dienten Myoglobin (p_I 7,3) und Cytochrom C (p_I 10,6). Der Anodenpuffer war Essigsäure (0,3 M) und der

Kathodenpuffer Natronlauge (0,25 M in 60 %, v/v, Glycerin). Das Elektrophoreseprogramm war: 200 V (15 min), 400 V (30 min) und 1600 V (mit maximal 1 mA/Röhrchen) über Nacht.

2.8.1.4 Adsorption von Kristallviolett und Orange II (Martienssen et al., 2000)

In diesem Test wurde untersucht, inwieweit der kationische Farbstoff Kristallviolett und der anionische Farbstoff Orange II (Strukturformeln siehe Abb. A, Anhang) an die Bakterienoberfläche adsorbiert (Krekeler, 1990; Martienssen, 2000b).

Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase, die mit THF angezogen waren, wurden geerntet, zweimal mit 0,9 % (w/v) Saline gewaschen und mit Kaliumphosphatpuffer (10 mM, pH 7,0) auf 11 g ZTG/l eingestellt. Im Test wurden 0 (Negativkontrolle) bis 5,3 g ZTG/l und 10 mM Kristallviolett bzw. 1 mM Orange II eingesetzt. Die Bakteriensuspensionen wurden mit Kristallviolett oder Orange II in 100 ml Erlenmeyerkolben pipettiert und auf einem Schüttler bei ca. 100 Upm inkubiert. Zum Zeitpunkt $t=2h$ wurden Proben entnommen, abzentrifugiert und die Kristallviolettkonzentration im Überstand photometrisch bei 590 nm, die Orange-II-Konzentrationen im Überstand bei 475 nm gemessen.

2.8.1.5 Messung der Hydrophobizität

Für die Messung der Hydrophobizität der bakteriellen Oberfläche wurde sowohl die Methode der Kontaktwinkelmessung (Neufeld et al., 1980), als auch die Bakterienzellverteilung in einem Wasser-Hexadekan-Gemisch (BATH Test, BATH = Bacterial Adhesion To Hydrocarbons, modifiziert nach Rosenberg et al., 1980) durchgeführt. Die Einflüsse des Zellalters und des Wachstumssubstrats (THF bzw. Succinat) wurden untersucht.

Messung des Kontaktwinkels: Für die Kontaktwinkelmessung wurde so viel Bakteriensuspension von Zellen auf THF angezogenen Zellen aus der frühlogarithmischen, logarithmischen und stationären Wachstumsphase über Celluloseacetatfilter (0,2 μ m)

filtriert, bis sich ein dichter Bakterienrasen bildete (ca. 10 bis 40 ml Kulturmedium), dieser anschließend mit H₂O dest gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Dazu wurden die Filter in Streifen geschnitten und mit doppelseitig klebenden Klebeband auf einem sauberen Objektträger fixiert und über Nacht getrocknet. Für die Messung war eine glatte Oberfläche wichtig. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur mit einem Kontaktwinkelmeßgerät OCA 5 (Data Physics, Filderstadt) unmittelbar nach der Benetzung des getrockneten Bakterienrasens mit einem H₂O dest Tropfen durchgeführt. Jeder angegebene Meßwert ist der Durchschnittswert von mindestens 5 durchgeführten Messungen.

Durchführung des BATH Tests: Für die Messung der Bakterienzellverteilung im Hexadekan-Wasser-Gemisch wurden die Zellen abzentrifugiert, zweimal mit Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7,0) gewaschen und in 100 mM KH₂PO₄ (für den pH-Bereich 3-7) bzw. K₂HPO₄ (für den pH-Bereich 8-11) resuspendiert. Die Bakteriensuspensionen wurden am Uvikon auf eine optische Dichte bei 578 nm von ca. 0,3 mit dem entsprechenden Puffer eingestellt. Aliquots wurden mit 1 N NaOH bzw. HCl auf den gewünschten pH-Wert gebracht und je 4 ml/Reagenzglas eingesetzt und die optische Dichte bei 578 nm vor der Zugabe von 2 ml Hexadekan für jedes Reagenzglas gemessen (pro pH-Wert vier Parallelansätze). Anschließend wurden die Ansätze für 30 Sekunden intensiv durchmischt (Vortexer, Stufe 6) und nach weiteren 15 Minuten, in denen sich die hydrophile und hydrophobe Phase vollständig trennen konnten, die optische Dichte der wäßrigen Phasen erneut bei 578 nm gemessen. Aus den optische Dichten t_{Anfang} und t_{Ende} wurde die Hydrophobizität als bakterielle Adsorption an das organische Lösungsmittel nach der Formel (Pelletier et al., 1997):

$$\% \text{-Hydrophobizität} = (1 - OD_{t_{\text{Ende}}} / OD_{t_{\text{Anfang}}}) \times 100$$

bestimmt. Es wurden jeweils drei zeitlich voneinander unabhängige Meßreihen durchgeführt.

2.8.1.6 Nachweis von sauren Exopolysacchariden

Viele Bakterien synthetisieren extrazelluläre Polysaccharide, die, wenn mit der Zellwand assoziiert, einen Einfluß auf das Adhäsionsverhalten des Organismus haben. Durch Farbstoffadsorptionstests sollte die Existenz von sauren Exopolysacchariden untersucht werden. In der Literatur findet man dafür die Farbstoffadsorptionstests mit den kationischen Farbstoffen Ruthenium Red und Alcian Blue (Figueroa und Silverstein, 1989; Handley, 1991).

Methode mit Ruthenium Red: Mit THF angezogene Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden geerntet und zweimal mit Saline gewaschen. Zu je 2 ml Bakteriensuspension (ZTG 4-40 mg in Saline) wurde 0,2 ml Ruthenium-Red-Lösung (5 g/l) gegeben. Nach dreistündiger Inkubation wurden die Proben abzentrifugiert und die Extinktion bei 533 nm gegen eine Referenz gemessen.

Methode mit Alcian Blue: Mit THF angezogene Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden geerntet und einmal mit Kaliumphosphatpuffer (10 mM, pH 7,0) gewaschen. Zu je 2 ml Bakteriensuspension (ZTG 0,1-1 g/l in Kaliumphosphatpuffer, 10 mM, pH 7,0) wurden 0,1 ml Alcian-Blue-Lösung (10 mM) pipettiert. Nach fünfminütiger Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert und die Extinktion des Überstands bei 606 nm gegen eine Referenz gemessen.

2.8.2 Untersuchung des Adhäsionsverhaltens

Für Untersuchungen im pH-Bereich 4 bis 11 wurden Styrol-Divenylbenzol-Copolymere eingesetzt, die im untersuchten pH-Bereich laut Hersteller nicht titrierbar waren. Letzteres war wichtig, da die Adhäsion in Abhängigkeit des vorgegebenen pH-Werts untersucht werden sollte. Eingesetzt wurden ein ungeladener Träger 1 (vergleichbar mit dem Handelsprodukt EP 63 von Bayer-Wolfen), ein Kationenaustauscher Träger 2 (vergleichbar mit dem Handelsprodukt KS 10 von Bayer-Wolfen) und ein Anionenaustauscher Träger 3 (vergleichbar mit dem Handelsprodukt SZ 30 von Bayer-Wolfen).

Des weiteren wurden die Träger Lewatit[®] VP OC 1066, ein makroporöses Adsorberharz auf Polystyrolbasis ohne funktionelle Gruppen von Bayer-Leverkusen, und Sinterglas (Versuchsprobe HITK V11, Forschungsinstitut Keramische Werke Hermsdorf) eingesetzt.

Das Adhäsionsverhalten für die Produkte OC 1066 und Sinterglas wurden bei pH 7 untersucht. Für weitere Trägerangaben siehe Tabellen 2 und 3.

In den Adhäsionsversuchen wurde mit Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase gearbeitet, da davon ausgegangen wurde, daß diese Zellen das höchste THF-Abbaupotential besitzen. Pro Versuchsansatz wurden 20 g Trägerfeuchtgewicht bzw. 20 Vol-% eingesetzt und der pH-Wert der einzelnen Träger über 24 Stunden vor Versuchsbeginn eingestellt. Die Zellen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet und zweimal mit Saline gewaschen. Etwa 5 g ZFG/l wurden entweder in 10 mM K_2HPO_4 (für den pH-Bereich 8-11) bzw. KH_2PO_4 (für den pH-Bereich 3-7) resuspendiert. 100 ml Bakteriensuspension, die vorher auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt worden war, wurde pro Versuchsansatz eingesetzt.

Das abgewogene und auf den entsprechenden pH-Wert eingestellte Trägermaterial wurde in einer Versuchsfritte abgenutscht und mit der Bakteriensuspension versetzt. Für ca. 30 s wurde Luft, die vorher durch eine NaOH-Falle geleitet worden war, um den Carbonateintrag und somit pH-Veränderungen zu vermeiden, durch den Versuchsansatz geleitet. Nachdem das Trägermaterial sedimentiert war, wurde eine Probe aus dem Überstand entnommen, deren optische Dichte bei 578 nm am Uvikon gemessen wurde. Die Luftdurchwirbelung wurde wieder angestellt und zu den Zeitpunkten $t=1h$ und $t=2h$ die Probenentnahme wiederholt. Nach zwei Stunden wurde der Versuch beendet.

Tabelle 2: Charakteristika der eingesetzten Trägermaterialien.

	Lewatit Produkt ¹⁾	Versuchschargen Bayer-Wolfen ^{2,3)}	Sinterglas ⁴⁾
Trägermatrizes	Styrol-Divenyl-Copolymerisat	Styrol-Divenyl-Copolymerisat	
Vernetzung	keine Herstellerangaben	10-11 %	
Dichte	1,1 g/ml	1,2 g/ml	
Porendurchmesser	5-10 nm	10 nm	
Korngröße	0,3-1,2 mm	0,6-0,8 mm	1,6-3,15 mm

¹⁾ Produktinformation Bayer-Leverkusen, ²⁾ Produktinformation Bayer-Wolfen, ³⁾ Martienssen und Schübb, 1998, ⁴⁾ M. Martienssen, persönliche Mitteilung.

Tabelle 3: Physikalische und chemische Eigenschaften der eingesetzten Trägermaterialien (Martienssen, 2000b).

Träger	Hersteller	Funktionelle Gruppe	Zetapotential (mV)	Ionische Austauschkapazität Kristallviolett // Orange II	Hydrophobizität $\alpha = k^* \text{Ethylbenzol} / k^* \text{Toluol}$
OC 1066	Bayer Leverkusen	keine	- 28,6	n. b. // n.b.	1,77
Träger 1	Bayer-Wolfen	keine	- 25,5	0,008 // 0,004	1,33
Träger 2	Bayer-Wolfen	-SO ₃ Na	- 32,9	0,430 // 0,005	1,08
Träger 3	Bayer-Wolfen	-N (CH ₃) ₃ Cl	+ 23,3	0,003 // 0,460	0,86
Sinterglas	Keramische Werke Hermsdorf	keine	n.b.	n.b.	n.b. ¹⁾

¹⁾ Träger aus Glasmaterial sind hydrophil (Rijnaarts et al., 1993), n.b. = nicht bestimmt

Untersuchung der Adhäsion mittels Rasterelektronenmikroskopie

Gewaschenes Trägermaterial Lewatit OC 1066 wurde 20 vol-%ig in steriles Mineralmedium gegeben und mit einer bakteriellen THF abbauenden Reinkultur beimpft. Inkubiert wurde bei 110 Upm und 28 °C in einem Erlenmeyerkolben ohne Schikanen, um einwirkende Scherkräfte zu minimieren. THF war in einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben worden. Nach 42 Stunden Inkubation wurden Proben entnommen, diese vakuumgetrocknet und dann mit Gold unter Argonatmosphäre beschichtet (35 mm Abstand, 200 s, 20 mA mit dem Gerät SCD 004 der Fa. Balzers, Balzers, Liechtenstein). Die Proben wurden mit einem S-2400 Rasterelektronenmikroskop der Fa. Hitachi mikroskopiert (20 kV). Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. G. Tschuch (Institut für Zoologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt.

2.8.3 Einschlußimmobilisierung ganzer Zellen mit Alginat

Es sollte untersucht werden, ob sich eine bakterielle THF abbauende Reinkultur mittels Einschlußverfahren immobilisieren läßt, ob ihre THF-Abbauaktivität nach dem Einschluß noch vorhanden bleibt und wie sich ggf. die THF-Abbauraten von immobilisierten und freien Zellen unterscheiden. Als Einschlußmatrix wurde Alginat gewählt.

Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase, die mit THF als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle angezogen worden waren, wurden geerntet und zweimal mit Saline gewaschen. Pro Versuchsansatz wurden 0,1 g Alginat in 3,5 ml H₂O dest gelöst. 1 g ZFG

wurde vorsichtig mit dem gelösten Alginat gemischt, dann in 20 ml einer 2 %igen (w/v) Kalziumchloridlösung eingetroppt und für ca. 1 Stunde gerührt. Dieses Einschlußverfahren bezeichnet man auch als ionotrope Gelbildung. Die Alginatkugeln von 1 g ZFG wurden in 50 ml Mineralmedium in einem Erlenmeyerkolben (500 ml, ohne Schikanen) mit 12 mM THF versetzt und bei 80 Upm und 28 °C inkubiert. Vor und unmittelbar nach der Alginatkugelzugabe und zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, deren THF-Konzentration analysiert wurde. Als Kontrollen wurden a) alginateingeschlossene Hefezellen (fala Backhefe, Straßburg) eingesetzt, um sicherzustellen, daß weder Alginat noch Zellkomponenten THF adsorbierten, b) eine unbeimpfte Kontrolle, die nur Mineralmedium und THF enthielt, und c) ein Ansatz, der 1 g nicht immobilisiertes ZFG einer THF abbauenden Reinkultur enthielt.

2.9 Chemikalien, Gase und Labormaterial

Die Standardchemikalien stammten von den Firmen Aldrich-Chemie (Steinheim), Fluka-Chemie (Neu-Ulm), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Chemie (Deisenhofen) und wiesen den Reinheitsgrad p.A. oder reinst auf. Weitere verwendete Chemikalien, Gase und verwendetes Labormaterial wurden von folgenden Firmen bezogen:

Aldrich-Chemie, Steinheim

Tetrahydrofuran (THF; 99,5+%)

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

PD-10-Fertigsäulen (Sephadex G-25), Q-Sepharose Fast-Flow

Applied Biosystems, Perkin-Elmer, Weiterstadt

ABI *PRISM™* dRhodamine Terminator Cycle Sequencing ready Reaction Kit mit AmpliTag® DNA Polymerase, FS

Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf

Tfl DNA Polymerase, MgCl₂ (25 mM)

Difco, Augsburg

Bacto®-Agar, Bacto®-Hefeextrakt, MacConkey-Agar, 3-Schritt Gram Safranin-S

Fluka Chemie, Neu-Ulm

Cytochrom C (aus Rinderherz)

Gibco BRL, Eggenstein

Alle Primer zur Amplifizierung und Sequenzierung der 16S rDNA (Kap. 2.5.3.8 und Tabelle A, Anhang)

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Inkubationspuffer

Merck, Darmstadt

Bactident Aminopeptidase Teststreifen, Benzonase, Nigrosin (wasserlöslich, Certistain®)

Messer Griesheim, Krefeld

CO 4.7 (99,997 Vol-%), Druckluft, Helium 5.0, Stickstoff 4.0, Wasserstoff 6.0

Peglab Biotechnologie, Erlangen

Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand: 2 mm)

Promega, Madison, WI, U.S.A.

Loading dye, pGem® Marker, pGem®-T Easy Vector, T4 DNA Ligase, T4 DNA Ligase Puffer, *Msp* I, *Rsa* I

Qiagen, Hilden

QIAfilter Plasmid Midi Kit, QIAquick PCR-Purification Kit

Roche Diagnostics, Mannheim

Katalase (aus Rinderleber), RNase A, RNase T₁

Serva, Heidelberg

Agarose für DNA Elektrophorese, Ampholin ("Servalyt" 3-10, polyampholytisches Gemisch für isoelektrische Fokussierung), Coomassie-Brilliant-Blue G250 (rein)

Stratagene, Heidelberg

Epicurian coli® competent cells XL1-Blue

2.10 Laborgeräte

ABI377 Sequenzierungsgerät, Version 4.0, Applied Biosystems Perkin Elmer, Weiterstadt
Clark-Sauerstoff-Elektrode, Rank Brothers, Bottisham, England

Elektroporationsgerät (Gene Pulser™ mit capacitance extender und pulse controller),

BioRad Laboratories, München

French Presse, SLM Aminco, SLM Instruments. Inc., Silver-Springs, U.S.A.

Gaschromatograph GC - 14Bsc mit Flammenionisationsdetektor (FID), Shimadzu Europa,
Jena

Kontaktwinkelmeßgerät OCA 5, Data Physics, Filderstadt

Mikroskop Zeiss Axioskop FS mit Fotoapparat, Jena

Mikrotitrator, Deutsche Metrohm, Filderstadt

Photometer MILTON ROY Spectronic 20 +, Milton Roy, U.S.A.

Thermozykler, TRIO-Thermoblock, Biometra, Göttingen

TOC-Analysator, DIMA-TOC 100, DIMATEC, Essen

Zentrifugen: Heraeus Sepatech Biofuge 28 RS, ausgestattet mit einem Titandurchflußrotor
8575; Hettich Universal 30 RF; DuPont Sorvall RC 5 B Plus

ZetaSizer 3000, Malvern Instruments, Malvern, England

Zweistrahlspektralphotometer Uvikon 930 Kontron, Neufahrn

3. Ergebnisse

3.1 Analytische Bestimmung der THF-Konzentration

3.1.1 Analytische Bestimmung der THF-Konzentration mit GC/FID

Bei gaschromatographischen Messungen mit Split und der Kapillarsäule SPB-1701 lag die Retentionszeit für Tetrahydrofuran bei 2,1 Minuten und die für Tetrahydropyran bei 2,8 Minuten. Die Totzeit der Säule war 1,1 Minuten. Die relative Standardabweichung wurde mit 1,2 % (n=12; 21,6 ng THF/0,1 µl) und 7,25 % (n=9; 8,24 ng THF/0,1 µl) bestimmt. Bei Messungen im Konzentrationsbereich von 0,5 bis 45 ng/0,1 µl (0,07 bis 6,24 mM) begann der lineare Meßbereich bei 0,5 ng/0,1 µl mit einem linearen Regressionskoeffizienten $r^2=0,99$ und größer (Abb. B, Anhang). Die Bestimmungsgrenze war 0,5 ng THF/0,1 µl Probenauftrag.

Bei den gaschromatographischen Messungen ohne Split mit der Kapillarsäule SPB-35 betrug die Totzeit der Säule 1,5 Minuten und die Retentionszeit für THF lag bei 1,9 Minuten. Bei Messungen im Konzentrationsbereich von 0,5 bis 10 ng/µl (0,007 bis 0,14 mM) begann der lineare Meßbereich bei 0,5 ng/µl mit einem linearen Regressionskoeffizienten von $r^2=0,999$ und größer. Die Standardabweichung für 0,8 ng (n=5) THF war 2,9 %. Eine Kalibrierungsgerade ist in Abb. C (Anhang) gezeigt.

Durch das Einfügen einer Vorsäule wurden die oben angegebenen Retentionszeiten um etwa 0,2 Minuten verlängert. Der Charakter des zu analysierenden THF enthaltenen Mediums (H₂O dest oder Puffer) hatte keinen Einfluß auf die THF-Detektion. Eine unbeimpfte Kontrolle, die in den Versuchen mitgeführt wurde, stellte sicher, daß kein THF abiotisch verloren ging.

Weitere Kontrollansätze enthielten FAD und FMN (Endkonzentration: 0,1-0,2 mM), NADH (Endkonzentration: 2 mM), ohne oder mit Rohextrakt (200 µl, der vor der Messung ausgefällt wurde) in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,5). Wenn mit und ohne Rohextrakt und 0,1 mM THF gemessen wurde, lag die Standardabweichung bei 5,8 bis 7,2 % (n=9). Wenn mit Rohextrakt und 0,2 mM THF gemessen wurde, betrug die Standardabweichung 11,4 % (n=9). Mit gleichen Kontrollansätzen wurde auch überprüft,

ob die Verweilzeit bis zur Probenanalyse im Autosampler einen Einfluß auf die gemessene THF-Konzentration hatte. Dies war nicht der Fall.

Es stellte sich heraus, daß das Isopropanol, in welchem der Proteinase-Hemmer PMSF gelöst war, die THF-Detektion störte, da der Isopropanolpeak den THF-Peak überlagerte. Versuche zeigten, daß Kolben mit Schraubverschluß (und Teflon-Silikoneinlage) ein "Abdampfen" des THFs verhinderten, wohingegen bei gleichen Tests in Erlenmeyerkolben, die mit Wattestopfen und Aluminiumfolie verschlossen waren und bei 28 bis 30 °C inkubiert wurden eine abiotische THF-Abnahme von 1 mM THF/d gemessen wurde. Deshalb wurden die Versuche mit flüchtigen Substraten in verschraubbaren Erlenmeyerkolben durchgeführt. Auch die Inkubation in Reagenzgläsern, die mit Silikonstopfen verschlossen sind, eigneten sich nicht für THF-Abnahmestudien, da es zur abiotischen THF-Abnahme in diesen Ansätzen kam.

3.1.2 Analytische Bestimmung der THF-Konzentration mit GC/FID/Headspace

Die Retentionszeit von THF lag bei 1,6 Minuten. Es wurde im linearen Konzentrationsbereich von 0,01 bis 1,0 mM THF gemessen und mit einem Regressionskoeffizienten von $r^2=0,998$ und größer gearbeitet.

3.2 Kultivierung einer THF abbauenden Mischkultur

Eine von Frau Ebner (Institut für Mikrobiologie, Universität Göttingen) mit THF als Substrat isolierte Mischkultur stand zu Beginn dieser Arbeit zur Verfügung. Sie war aus dem Abwasser des Göttinger kommunalen Klärwerks angereichert worden (J.R. Andreesen, persönliche Mitteilung). Diese Mischkultur wurde zu Beginn dieser Arbeit über viele Passagen in frisches Mineralmedium (Kap. 2.2) überimpft, das 2 bis 5 mM THF enthielt. Die Mischkultur wuchs in Mineralmedium mit 5 mM THF mit Verdopplungszeiten von ca. 30 Stunden. Um das Wachstum zu unterstützen, wurde Hefeextrakt oder Succinat (0,02-0,1 %, w/v) zugegeben. Der Zusatz von Hefeextrakt oder Succinat zusätzlich zum THF erwies sich jedoch als ungeeignet, da die Zusätze als Wachstumssubstrat genutzt wurden und THF nicht abgebaut wurde; das Wachstum der Mischkultur mit THF verbesserte sich

nicht. Wachstumsverbesserungen wurden durch den Einsatz von 10 mM THF und durch Inkubation in Erlenmeyerkolben mit vier Schikanen bei 30 °C und 160 Upm erzielt. Nach etwa 48stündigen Wachstum erreichte die Kultur eine optische Dichte von ca. 1,5. Zu diesem Zeitpunkt war das THF gaschromatographisch nicht mehr nachweisbar. Es wurden auch Kulturverdünnungen auf Mineralagarplatten ausgespatelt. Sollte der Agar mit THF versetzt werden, wurden Agarzylinder (Durchmesser: 10 mm) mit einem sterilen Korkbohrer ausgestanzt und mit 10 bis 50 µl THF befüllt. In Abhängigkeit von der eingesetzten THF-Menge bildeten sich direkt um das ausgestanzte Loch unterschiedlich große "Hemmhöfe" aus, wobei sich mit zunehmender Entfernung das Wachstum intensivierte.

3.3 Isolierung und Charakterisierung der Bakterien der THF abbauenden Mischkultur

Beim Mikroskopieren der THF abbauenden Mischkultur zeigte sich, daß diese aus stäbchenförmigen Bakterien und myzelartig wachsenden Mikroorganismen bestand. Um letztere zu isolieren, wurde ein Arginin-Glyzerin-Agarmedium eingesetzt, das von El-Nakeeb und Lechevalier (1963) zur Isolierung von Actinomyceten empfohlen wurde. Viele Vertreter der Ordnung *Actinomycetales* wachsen myzelartig.

Durch Ausplattierung von Kulturverdünnungen der THF adaptierten Mischkultur auf Arginin-Glyzerin-Agar wurde ein bakterielles Isolat isoliert, das als Stamm K1 benannt wurde. Dieses Isolat K1 wuchs in Mineralmedium mit THF und war in der Lage, THF als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen.

Auf Arginin-Glyzerin-, Mineral-, Trypticase-Soja-, Leitungswasser- und Nähragar wuchs Stamm K1 in kompakten weißen kreidig-trocken aussehenden Kolonien. Bei Wachstum auf den vier erstgenannten Agartypen wurde bei der Betrachtung der Agarplatte eine gelbliche Verfärbung unterhalb der Kolonien festgestellt, deren Ursache nicht weiter untersucht wurde. Eine gleiche Verfärbung wurde auch von Akimov et al. (1989) für einen Vertreter der Familie der *Pseudonocardiaceae* beschrieben. Abb. 2 zeigt eine Kolonieaufsicht von Zellen des Stamms K1.

Bei Inkubation in Mineralmedium bei 28 °C und 10 mM Substrat wurde die Verdopplungszeit für Succinat mit 11 Stunden und die für THF mit 14 Stunden bei einer Wachstumsrate von $0,05 \text{ h}^{-1}$ bestimmt. Wenn die Zellen bei einer optischen Dichte von 1,8

geerntet wurden, ergab sich eine Zellausbeute von ca. 4 g ZFG/l. Lag die optische Dichte unter 1,7, sedimentierten die Zellen sehr schlecht. Das Zellrockengewicht (ZTG) betrug durchschnittlich 8 % des vorher eingewogenen Zellfeuchtgewichts (ZFG).

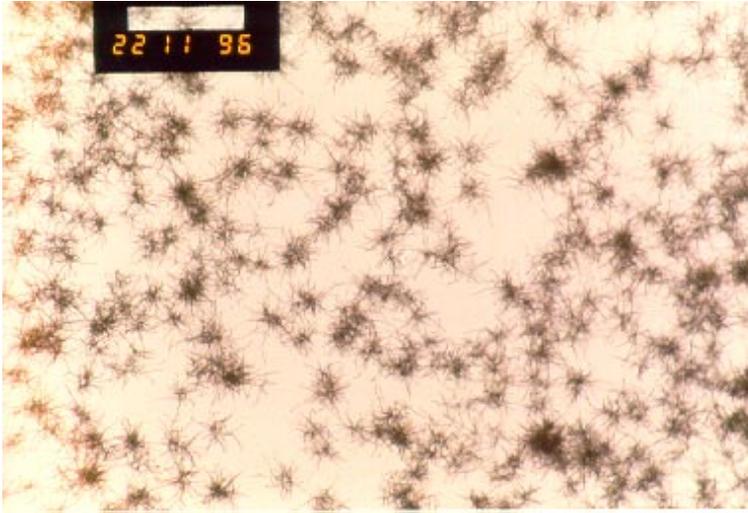


Abb. 2: Kolonieaufsicht. Junge Kolonien des Stamms K1 kultiviert auf Leitungswasseragar (Balken im schwarzen Fenster entspricht 50 µm).

Stamm K1 bildete sowohl Luft- als auch Substratmyzel. Mikroskopisch zeigte Stamm K1 in Flüssigkultur myzelartige Zellfäden, die ca. 21 µm lang waren, einen Durchmesser von 1,3 µm besaßen und sich zu Zellaggregaten von ca. 23 x 33 µm zusammenlagerten (Abb. 3). Dieses pilzähnliche Wachstum und das Auseinanderfallen der Hyphen in stäbchen- oder kugelförmige Einheiten, wird allgemein als "nocardioformes Wachstum" bezeichnet (Lechevalier, 1989).



Abb. 3: Stamm K1 in flüssigem Mineralmedium, das THF enthält (Balken im schwarzen Fenster entspricht 25 µm).

An den Zellenden waren aufgetriebene Bereiche (Durchmesser: 2,3 μm) zu erkennen, die im Phasenkontrast dunkler erschienen. Es wurde davon ausgegangen, daß es sich hierbei um Sporen handelte, die sich vom Zellfaden lösen, um neu zu sporulieren. Diese Annahme wurde von der Beobachtung unterstützt, daß gleich kleine Zellen wie die angenommenen Sporen im mikroskopischen Bild sichtbar waren. Durch Ausplattierung auf Agarplatten wurde ausgeschlossen, daß es sich hierbei um bakterielle Verunreinigungen handelte. Wurde die Reinkultur K1 in Flüssigmedium schüttelnd inkubiert, so war die Kultur in den meisten Fällen so homogen, daß man problemlos ihre optische Dichte messen konnte. Ließ man die Kultur ungeschüttelt stehen, bildete sich eine Kahmhaut. Diese Kahmhaut war aus vielen plättchenartigen Gebilden zusammengesetzt. Wenn diese mikroskopiert wurden, erkannte man die o.g. Zellaggregate. Bei der Überimpfung von Agar- in Flüssigmedium klumpten die Zellen stark. Weitere Wachstums- und Zelleigenschaften des Stamms K1 sind den Kapiteln 3.4 und 3.6 zu entnehmen.

Stamm K1 färbte Gram-positiv, war nicht beweglich, die Zellen waren weder säurefest noch bildeten sie Kapseln. Tabelle 4 zeigt das Ergebnis des durchgeführten ApiZYM-Tests. Der G+C-Gehalt des Stamms K1 wurde mit 71,3 mol-% bestimmt (U. Lechner, persönliche Mitteilung).

Tabelle 4: Ergebnis des ApiZYM-Tests für Stamm K1.

Enzym	Reaktion
Alkalische Phosphatase	-
Esterase	+
Esterase Lipase	+
Lipase	-
Leucin-Arylamidase	+
Valin-Arylamidase	+
Cystin-Arylamidase	+
Trypsin	-
Chymotrypsin	-
Saure Phosphatase	+
Naphtol-AS-BI-Phosphohydrolase	-
α -Galactosidase	-
β -Galactosidase	-
β -Glucuronidase	-
α -Glucosidase	+
β -Glucosidase	-
N-Acetyl- β -Glucosaminidase	-
α -Mannosidase	-
α -Fucosidase	-

Die Menachinonanalyse, durchgeführt für Stamm K1 und *Pseudonocardia sulfidoxydans* als Referenzstamm zeigte, daß beide Bakterien die gleichen Menachinone besitzen. Neben dem Menachinon MK-8 (H₄) wurde ein zweites Menachinon detektiert, das mit MK-7 koeluierte (U. Lechner, persönliche Mitteilung). Die Analyse des Fettsäuremethylestergemisches ergab das in Tabelle 5 dargestellte Profil. Aufgrund dieses Fettsäuremusters konnte das THF abbauende Bakterium der Familie der *Pseudonocardiaceae* zugeordnet werden (R.M. Kroppenstedt, persönliche Mitteilung).

Tabelle 5: Fettsäureanalyse des Stamms K1.

Fettsäure	Fettsäureanteil (%)
C 14:0 iso	4,5
C 14:0	1,1
C 15:0 iso	15,0
C 15:0 anteiso	2,40
C 15:1 B	1,1
C 15:0	4,4
C 16:1 iso	7,4
C 16:0 iso	27,2
C 16:1 <i>cis</i> 9	6,9
C 16:0	4,7
C 16:0 10Methyl	2,6
C 17:0 iso	2,3
C 17:0 anteiso	5,2
C 17:1 <i>cis</i> 9	3,9
C 16:0 iso	7,0
C 17:0	2,3
C 17:0 10 Methyl	1,1
C 17:0 anteiso	0,8

Die erste Zahl gibt die Anzahl der C-Atome der Methylester, die zweite die Sättigung (:0 = gesättigt, :1 = einfach ungesättigt) an. Der jeweils bestimmte Fettsäureanteil ist in % von 100 angegeben.

Aus der adaptierten, THF abbauenden Mischkultur wurden durch Verdünnungsausstriche auf Nähr- und THF bzw. Succinat haltigem Mineralagar drei weitere Bakterienstämme isoliert, die mit K2, K3 und K4 benannt und charakterisiert wurden. Es handelte sich bei diesen drei Isolaten um Gram-negativ färbende Bakterien. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse aus dem Api 20 E-Test handelt es sich beim Isolat K3 um einen *Sphingomonas paucimobilis* Stamm (Wahrscheinlichkeit 73 %) und beim Isolat K4 *Pseudomonas putida/fluorescens* (Wahrscheinlichkeit 23 %). Das Isolat K2 konnte nach zusätzlicher Bestimmung des G+C-Gehalts (64,1 mol-%) und Analyse des Fettsäuremusters als *Alcaligenes* sp. (U. Lechner, persönliche Mitteilung) identifiziert werden. Keines der drei o.g. Isolate wuchs in Reinkultur mit THF als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle in

Mineralmedium. Auch sterilfiltrierter Zellüberstand der Mischkultur, der möglicherweise eine wichtige Komponente für den THF-Abbau für das Isolat K1 enthielt, konnte nach Zugabe zum Mineralmedium den THF-Abbau in den Isolaten K2, K3 und K4 nicht induzieren. Auch wenn zwei oder alle drei Isolate zu einer künstlichen Mischkultur vereinigt wurden verstoffwechselten sie THF nicht. Der Zusatz von Hefeextrakt, Succinat oder Casaminosäuren hatte ebenfalls keinen positiven Einfluß auf die THF-Verwertung in Mineralmedium. Daß dennoch Wachstum auf Mineralagar, der nur THF als Substrat enthielt, zu verzeichnen war, könnte mit Verunreinigungen im verwendeten Difco-Agar erklärt werden. So erklärten auch Juteau et al. (1999) das Wachstum von nicht Toluol abbauenden Bakterien auf Agarplatten mit Verunreinigungen, die sich immer noch in gereinigtem Agar befinden. Die Tabellen 6 und 7 fassen morphologische, physiologische und biochemische Eigenschaften der in dieser Arbeit isolierten Bakterien zusammen.

Wenn die THF abbauende Mischkultur oder Stamm K1 in flüssigem Mineralmedium inkubiert wurden (Kap. 2.2), zeigte sich, daß der jeweilige Wachstumsverlauf und die analytisch bestimmte THF-Konzentrationsabnahme vergleichbar waren. Es wird deshalb angenommen, daß Stamm K1 für den THF-Abbau verantwortlich ist und gleichzeitig ausgeschlossen, daß die Isolate K2, K3 und K4 einen negativen Einfluß auf das Wachstum von Stamm K1 ausübten.

Tabelle 6: Morphologische und physiologische Eigenschaften der vier Bakterienisolate, aus denen sich die THF abbauende Mischkultur zusammensetzte.

Isolatbezeichnung	K1	K2	K3	K4
Zellmorphologie	nocardioforme Zellen	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen
Kolonieform und -farbe (auf Nähragar)	kompakt, krümelig; weiß, kreidig trocken	in der Mitte erhaben, glatter Rand; creme, matt	in der Mitte erhaben, glatter Rand; creme, matt	in der Mitte erhaben, glatter Rand; gelb, glänzend
Koloniefarbe (auf Mineralagar)	weiß, kreidig trocken	weiß, matt	weiß, matt	weiß, matt
Gram-Färbung	positiv	negativ	negativ	negativ
KOH-Test	n.b.	positiv	positiv	positiv
Aminopeptidase-Test	n.b.	positiv	positiv	positiv
Katalase-Test	positiv	positiv	positiv	positiv
Cytochrom Oxidase	negativ	positiv	positiv	positiv
Beweglichkeit	negativ	positiv	positiv	positiv
Luftmyzel	positiv	negativ	negativ	negativ
Substratmyzel	positiv	negativ	negativ	negativ
G+C-Gehalt	71,3 mol-%	64,1 mol-%	n.b.	n.b.

Fortsetzung **Tabelle 6:**

Säurefestigkeit	negativ	n.b.	n.b.	n.b.
Wachstum auf:				
Mineralagar + THF	positiv	negativ	negativ	negativ
Mineralagar + Succinat	positiv	positiv	positiv	positiv
Arginin-Glyzerin-Agar	positiv	positiv	positiv	positiv
NA (in d) bei RT	positiv (3-4)	positiv (1-2)	positiv (1-2)	positiv (1-2)
MacConkey-Agar	negativ	positiv (rote Kolonien)	positiv (rote Kolonien)	negativ
Bacto-Schaedler-Agar	positiv	n.b.	n.b.	n.b.
Leitungswasseragar	positiv	positiv	positiv	positiv
TYS-Agar	positiv	positiv	positiv	positiv
Haferflockenagar	positiv	n.b.	n.b.	n.b.
Czapek-Dox-Agar	positiv	n.b.	n.b.	n.b.
Trypticase-Soja-Agar	positiv	n.b.	n.b.	n.b.
Wachstum in:				
Mineralmedium + THF	positiv	negativ	negativ	negativ
Mineralmedium + Succinat	positiv	positiv	positiv	positiv
Nährbouillon	positiv	positiv	positiv	positiv
Tryptophanbouillon	positiv	n.b.	n.b.	n.b.
Wachstum bei:				
37 °C	negativ	positiv	positiv	positiv

n.b. = nicht bestimmt

Tabelle 7: Ergebnisse aus dem API 20 E- und BBL-Crystal-Test für die vier Bakterienisolate.

Isolatbezeichnung	K1	K2	K3	K4
Vorhandensein der:				
β-Galaktosidase	negativ	negativ	negativ	positiv
Arginin Hydrolase	positiv	positiv	positiv	positiv
Urease	negativ	negativ	negativ	negativ
Lysin Decarboxylase	negativ	negativ	negativ	negativ
Ornithin Decarboxylase	negativ	negativ	negativ	negativ
Tryptophan Desaminase	negativ	negativ	negativ	negativ
Gelatinase	negativ	negativ	negativ	negativ

Fortsetzung **Tabelle 7:**

Verwertung von:				
Citrat	negativ	positiv	negativ	negativ
Glucose	negativ ¹⁾	negativ	negativ	negativ
Mannit	negativ	negativ	negativ	negativ
Inosit	negativ	negativ	negativ	negativ
Sorbit	negativ	negativ	negativ	negativ
Rhamnose	negativ	negativ	negativ	negativ
Saccharose	negativ ¹⁾	negativ	negativ	negativ
Melibiose	negativ	negativ	negativ	negativ
Amygdalin	negativ	negativ	negativ	negativ
Arabinose	negativ	negativ	negativ	negativ
Lactose	negativ	positiv	positiv	negativ
L-Phenylalanin *	positiv	n.b.	n.b.	n.b.
L-Valin *	positiv	n.b.	n.b.	n.b.
L-Isoleucin *	positiv	n.b.	n.b.	n.b.
Bildung von:				
Nitrit aus Nitrat	negativ	pos	negativ	negativ
N ₂ aus Nitrat	negativ	negativ	negativ	negativ

n.b. = nicht bestimmt, ¹⁾ = siehe Kapitel 3.4.6, * Mit dem BBL-Crystal-Testsystem bestimmt.

3.3.1 16S rDNA-Analyse des Stamms K1

Zur taxonomischen Einordnung des Stamms K1 sollte das 16S rDNA-Gen isoliert und seine Sequenz bestimmt werden. Mit den universellen Primern fD1 und rP2 (Tabelle A, Anhang), die laut Weisburg et al. (1991) für die Amplifizierung des 16S rDNA-Gens der meisten Bakterien geeignet sind, wurde das 16S rDNA-Gen des Stamms K1 amplifiziert und anschließend in den pGEM[®]-T-Easy Vektor kloniert.

```

1  GACGAACGCT  GCGGGCGTGC  TTAACACATG  CGAGTCGAGC  GGTAAGGCCT
51  TTCGGGGTAC  ACGAGCGGCG  AACGGGTGAG  TAACACGTGG  GTGACCTGCC
101 CTCAGCTCTG  GGATAAGCCT  GGGAAACTGG  GTCTAATACC  GGATATGACC
151 TCTCATCGCA  TGGTGGGTGG  TGGAAAGTTT  TTCGGCTGGG  GATGGGCCCCG
201 CGGCCTATCA  GCTTGTGGT  GGGGTGATGG  CCTACCAAGG  CGACGACGGG
251 TAGCCGGCCT  GAGAGGGCGA  CCGCCACAC  TGGGACTGAG  ACACGGCCCA
301 GACTCCTACG  GGAGGCAGCA  GTGGGAATA  TTGCGCAATG  GCGGAAGCC

```

```

351 TGACGCAGCG ACGCCGCGTG GGGGATGACG GCCTTCGGGT TGTAACCTC
401 TTTCGCCAGG GACGAAGCGC AAGTGACGGT ACCTGGATAA GAAGCACCGG
451 CCAACTACGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GTAGGGTGCG AGCGTTGTCC
501 GGAATTATTG GCGTAAAGA GCTCGTAGGC GGTCTGTCGC GTCGGTCGTG
601 AAAACCTGCA GCTTAACTGT GGGCTTGC GG TCGATACGGG CATGACTGGA
651 GTTCGGCAGG GGAGACTGGA ATTCCTGGTG TAGCGGTGAA ATGCGCAGAT
701 ATCAGGAGGA ACACCGGTGG CGAAGGCGGG TCTCTGGGCC GATACTGACG
751 CTGAGGAGCG AAAGCGTGGG GAGCGAACAG GATTAGATAC CCTGGTAGTC
801 CACGCCGTAA ACGGTGGGTG CTAGGTGTGG GGGCCATTCC ACGGTCTCTG
851 TGCCGCAGCT AACGCATTAA GCACCCCGCC TGGGGAGTAC GGCCGCAAGG
901 CTA AAACTCA AAGGAATTGA CGGGGGCCCG CACAAGCGGC GGAGCATGTG
951 GATTAATTCG ATGCAACGCG AAGAACCTTA CCTGGGTTTG ACATGCACCA
1001 GACATCCCTA GAGATAGGGC TTCCTTGTG GTTGGTGTGC AGGTGGTGCA
1051 TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT CGTGAGATGT TGGGTAAAGT CCCGCAACGA
1101 GCGCAACCTT CGTTCCATGT TGCCAGCGCG TTATGGCGGG GACTCATGGG
1151 AGACTGCCGG GGTCAACTCG GAGGAAGGTG GGGATGACGT CAAGTCATCA
1201 TGCCCTTAT GTCCAGGGCT TCACACATGC TACAATGGCA AGTACAGAGG
1251 GCTGCGAGAC CGCGAGGTGG AGCGAATCCC TTAAAGCTTG TCTCAGTTCG
1301 GATCGGGGTC TGCAACTCGA CCCCCTGAAG TTGGAGTCGC TAGTAATCGC
1351 AGATCAGCAA CGCTGCGGTG AATACGTTCC CGGGCCTTGT ACACACCGCC
1401 CGTCACGTCA CGAAAGTTGG TAACACCCGA AGCCGACGGC CTAACCCGTG
1451 AGGGAGGGAG TTGTCGAAGG TGGGACTGGC GATTGGGACG

```

Abb. 4: Sequenz der 16S rDNA des Stamms K1.

Nach Transformation wurden von 10 ausgesuchten Klonen die Plasmid-Inserts amplifiziert, mittels Restriktion verdaut und die Banden im Agarosegel verglichen. Die Bandenmuster der überprüften Klone waren gleich. Ein Klon wurde für die Plasmidisolierung ausgewählt und dessen isolierte Plasmid-DNA vollständig sequenziert (Abb. 4) und die Sequenz in der EMBL-Datenbank unter der Accession Number AJ249200 hinterlegt. Tabelle 8 zeigt die prozentuale Ähnlichkeit und evolutionäre Distanzmatrix des Stamms K1 zu verwandten Bakterien.

Tabelle 8: Prozentuale Ähnlichkeit und evolutionäre Distanzmatrix der 16S rDNA-Sequenz des Stamms K1 und ausgewählten Vertretern der Familie *Pseudonocardiaceae*.

Organismus	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
1. Stamm K1	-	99,0	97,2	97,6	96,8	94,9	93,2	93,8	92,4	89,6
2. <i>P. sulfidoxydans</i>	0,010	-	90,8	98,1	96,7	95,1	93,4	93,5	92,4	89,9
3. <i>A. yunnanensis</i>	0,029	0,030	-	96,4	96,0	93,9	92,9	93,4	92,5	89,3
4. <i>P. halophobica</i>	0,024	0,019	0,037	-	96,9	94,8	92,6	93,2	92,0	88,6
5. <i>P. alni</i>	0,033	0,034	0,041	0,032	-	94,4	92,6	94,1	91,8	88,5
6. <i>K. aridum</i>	0,053	0,051	0,064	0,054	0,059	-	94,1	93,8	92,8	88,7
7. <i>S. hirsuta</i>	0,071	0,070	0,075	0,078	0,078	0,062	-	93,2	92,2	90,0
8. <i>A. fastidiosa</i>	0,065	0,069	0,070	0,071	0,061	0,065	0,071	-	93,0	88,3
9. <i>S. viridis</i>	0,080	0,080	0,079	0,085	0,087	0,076	0,083	0,074	-	88,8
10. <i>A. halophila</i>	0,112	0,109	0,116	0,124	0,126	0,123	0,108	0,127	0,121	-

Die unkorrigierte prozentuale Ähnlichkeit ist im oberen Dreieck angegeben, im unteren Dreieck sind die nach Jukes und Cantor (1969) korrigierten Werte für die evolutionäre Distanz aufgeführt. Als Außengruppe wurde *Actinopolyspora halophila* gewählt.

Bakterien, Literatur und Bezeichnung der Datenbankeinträge (EMBL):

2. *Pseudonocardia sulfidoxydans* DSM 44248^T, Reichert et al., 1998, Y08537; 3. *Actinobispora yunnanensis*, Tamura et al., 1997, D85472; 4. *Pseudonocardia halophobica* DSM 43089^T, Reichert et al., 1998, Y08534; 5. *Pseudonocardia alni* DSM 44104^T, Reichert et al., 1998, Y08535; 6. *Kibdelosporangium aridum* DSM 43828^T, Bowen et al., 1989, X53191; 7. *Saccharopolyspora hirsuta* DSM 43463^T, Wang, Y., 1997, unpubliziert, U93341; 8. *Amycolatopsis fastidiosa* ATCC 31181, Embley et al., 1988, X53200; 9. *Saccharomonospora viridis* DSM 43017^T, Embley et al., 1988, X54286; 10. *Actinopolyspora halophila* DSM 43834^T, McVeigh et al., 1993, unpubliziert, X54287.

3.4 Wachstumsversuche mit Stamm K1

3.4.1 Optimierung der Wachstumsbedingungen für das Wachstum in Mineralmedium mit THF

Die isolierte THF abbauende Reinkultur Stamm K1 wuchs im Temperaturbereich von 11 bis 36 °C, mit größter Wachstumsrate bei 30 bis 32 °C. Bei 4 bzw. 37 °C war kein Wachstum zu beobachten. Das Wachstum mit 10 mM THF in Mineralmedium mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer war im pH-Bereich 5,5 bis 7 gleich schnell (t_d ca. 14 h), im pH-Bereich von anfangs 8 bis 9,5 verlangsamte es sich (t_d ca. 18,5 h), wobei jeweils gleiche optischen Dichten am Ende der logarithmischen Wachstumsphase erreicht wurden. Im Verlauf des Wachstums mit 30 mM THF nahm der pH-Wert des mit 50 mM Phosphat gepufferten Mineralmediums von 7,4 auf 6,7, des 25 mM gepufferten Mineralmediums von 7,4 auf 6,3 und des 10 mM gepufferten Mineralmediums von 7,3 auf 5,4 ab. Das gemessene

Wachstum (Wachstumsrate und erreichte optische Dichte) war in den drei verschiedenen gepufferten Ansätzen identisch. Es wurde kein negativer Einfluß des absinkenden pH-Werts in den mit 10 oder 25 mM gepufferten Medium auf das bakterielle Wachstum festgestellt. Ansätze, die mit 5,6 und 11,2 mM Ammonium versetzt und mit 30 mM THF inkubiert wurden, zeigten gleiche Wachstumsraten und erreichten gleiche optische Dichten. Es zeigte sich, daß auf die Zugabe der Vitaminlösung zum Mineralmedium verzichtet werden kann. Da jedoch schon viele Wachstumsversuche abgeschlossen worden waren, wurde die Zugabe der Vitaminlösung zum Mineralmedium wegen der besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse beibehalten.

3.4.2 Wachstum des Stamms K1 in Mineralmedium mit 10 mM THF

In Abb. 5 ist das Wachstum von Stamm K1 in Mineralmedium mit THF, dessen Konzentration gaschromatographisch bestimmt wurde, und die dazugehörigen TOC-Konzentrationen gezeigt.

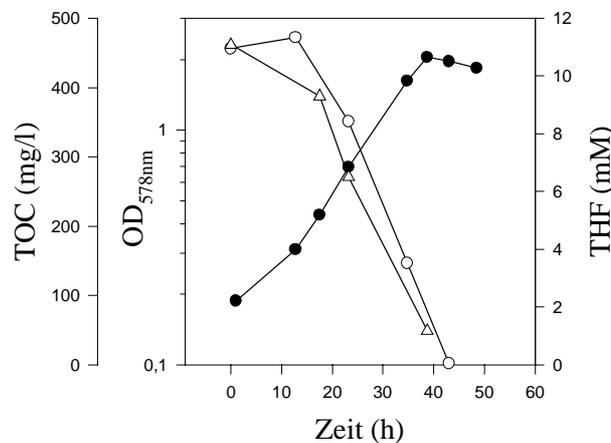


Abb. 5: Wachstum des Stamms K1 in Mineralmedium mit THF. ● = optische Dichte (OD), O = THF- und Δ = TOC-Konzentrationen.

Das Mineralmedium (ohne Substrat) hatte einen TOC-Gehalt von ca. 20 mg/l. Nach Zugabe des Inokulums (und vor Zugabe des Substrats) war der TOC-Gehalt ca. 37,5 mg/l. Die gemessene Standardabweichung lag bei 1,7 % (n=5).

3.4.3 Einfluß der eingesetzten THF-Konzentrationen auf das Wachstum von Stamm K1 in Mineralmedium

Aus Abb. 6 ist ersichtlich, daß mit zunehmender THF-Konzentration eine längere Anlaufphase (lag-Phase) zu verzeichnen war. Die Verdopplungszeiten während der exponentiellen Wachstumsphase waren jedoch gleich. In diesem Versuch wurde mit einer höheren Animpfdichte (OD 578 nm) von ca. 0,3 gearbeitet.

Es zeigte sich, daß THF-Konzentrationen > 20 mM nicht bis unterhalb der gaschromatographischen Bestimmungsgrenze abgebaut wurden, wenn Stamm K1 unter Standardbedingungen (Kap. 2.2) kultiviert worden war. THF-Konzentrationen \leq 20 mM wurden hingegen innerhalb von ca. 75 Stunden verstoffwechselt. Das THF war zu diesem Zeitpunkt nicht mehr gaschromatographisch nachweisbar.

Wenn die Ansätze mit 40 und 50 mM THF versetzt wurden, setzte das Wachstum zeitlich versetzt, entsprechend der höheren THF-Konzentration ein (Abb. 6). Bei den Versuchsansätzen, die mit > 50 mM THF versetzt wurden, wurde das Wachstum mit ja/nein beurteilt. Wachstumskurven wurden nicht erstellt. Stamm K1 tolerierte und wuchs mit THF-Konzentrationen bis 70 mM. Man mußte die Kulturen aber mit einer höheren optischen Dichte (von ca. 0,3) animpfen.

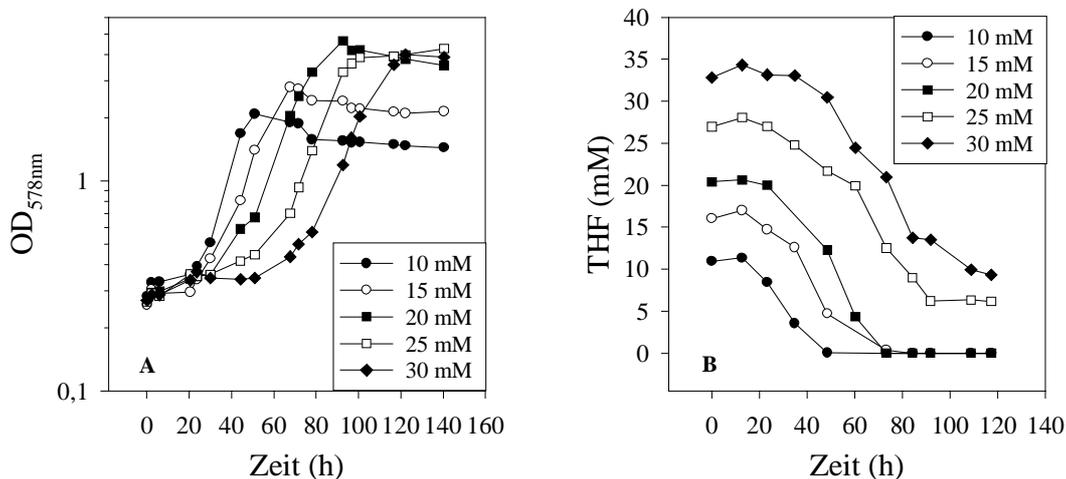


Abb. 6: Wachstum von Stamm K1, inkubiert in Mineralmedium bei 28 °C und 160 Upm mit 10, 15, 20, 25 und 30 mM THF. Gezeigt sind die gemessenen optischen Dichten (A) und die THF-Konzentrationen (B) in den Ansätzen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Das Isolat Stamm K1 ist somit in der Lage, in Gegenwart von bis zu 70 mM THF zu wachsen. Bei Wachstumsversuchen mit höheren THF-Konzentrationen (> 60 mM) ist eine höhere Animpfdichte erforderlich (hier OD 578 nm von ca. 0,3). Die höhere Zelldichte

stellte somit einen Vorteil dar, der wahrscheinlich hilft, die hohen THF-Konzentrationen zu tolerieren.

3.4.4 Einfluß der Spurenelementkonzentration und des Kolbenfüllvolumens auf das Wachstum mit THF

Es sollte untersucht werden, ob die Verfügbarkeit eines Spurenelements dafür verantwortlich war, daß THF in Konzentrationen größer als 20 mM nicht vollständig abgebaut wurde. Um dies zu untersuchen, wurde Stamm K1 mit 30 mM THF in Mineralmedium inkubiert, wobei die doppelte Spurenelementkonzentration verwendet wurde. Als Kontrolle diente Medium mit normaler Spurenelementkonzentration. Das Kolbenfüllvolumen in diesem Versuch war 100 ml Kulturvolumen je 3,3-l-Schikanekolben. Das Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte verfolgt und die THF-Konzentrationen des Mediums analysiert. Es zeigte sich, daß die eingesetzten THF-Konzentrationen innerhalb von 120 Stunden bis unterhalb der gaschromatographischen Nachweisgrenze abgebaut waren. Dabei war kein unterschiedlicher THF-Abbau und kein unterschiedliches Wachstumsverhalten in den Proben zu beobachten. Die Spurenelementkonzentration hatte somit keinen Einfluß auf den THF-Abbau durch Stamm K1, wenn mit 30 mM THF gearbeitet wurde.

Der Versuch zeigte, daß das Kolbenfüllvolumen für den THF-Abbau sehr wichtig ist, da ein reduziertes Kolbenfüllvolumen (100 ml je 3,3-l-Kolben) mehr Sauerstoff zur Verfügung stellt und einen vollständigen Abbau von 30 mM THF durch Stamm K1 ermöglichte.

3.4.5 Untersuchung der Stabilität des THF-Abbaupotentials in Stamm K1

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob Zellen des Stamms K1, die seit ca. 220 Generationen (d.h. das Isolat wurde insgesamt 56 mal in einem Zeitraum von 28 Wochen überimpft) mit Succinat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle gewachsen waren, ihre Fähigkeit zum Wachstum mit THF als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle verloren hatten. Da für viele Enzyme, die ein Bakterium zum Abbau von Schadstoffen befähigen, die zugehörigen Gene auf Plasmiden codiert sind und Plasmide aus dem Genom

”verlorengehen” können, sollte dieser Versuch Aufschluß darüber geben, wie stabil die THF-Abbaufähigkeit in Stamm K1 weitervererbt wird.

Für den Wachstumsversuch wurde die oben beschriebene Succinat adaptierte Kultur aus der logarithmischen Wachstumsphase in Mineralmedium, das mit 10 mM THF versetzt war, überimpft. Als erste Kontrolle diente ein Ansatz mit Succinat adaptierten, ungewaschenen Zellen in Mineralmedium, dem keine Kohlenstoff- und Energiequelle zugegeben wurde. Die zweite Kontrolle bestand aus mit THF angezogenen Zellen des Stamms K1 in Mineralmedium, dem 10 mM THF als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zugegeben worden war.

Es zeigte sich, daß Stamm K1 auch nach ca. 220 Generationen Wachstum auf Succinat seine THF-Abbaufähigkeit nicht verloren hatte (Abb. 7). Das Wachstum war vergleichbar mit der Kontrolle, die aus THF adaptierten Zellen bestand. Daß die Kontrolle, die aus ungewaschenen, Succinat adaptierten Zellen bestand, ihre optische Dichte verdoppelte, wird damit erklärt, daß Rest-Succinat des Mineralmediums, das beim Überimpfen in den Versuchsansatz eingebracht wurde, das gezeigte Wachstum ermöglichte. Daß die Succinat adaptierten Zellen, die mit THF inkubiert wurden, keine lag-Phase im Vergleich zu THF adaptierten Zellen zeigten, wird ebenfalls auf eingetragene Rest-Succinat zurückgeführt.

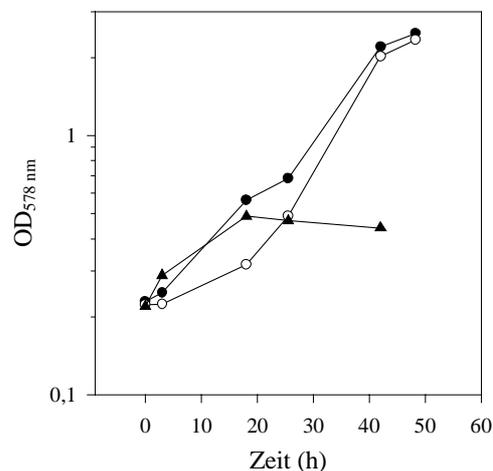


Abb. 7: Vergleichendes Wachstum von Succinat adaptierten Zellen (über ca. 220 Generationen) ● und THF adaptierten Zellen ○ von Stamm K1 in Mineralmedium und 10 mM THF. Eine Kontrolle bestand aus Succinat adaptierten Zellen ▲ (ungewaschen) ohne Substrat.

3.4.6 Bestimmung des Substratspektrums

Zur Bestimmung des Substratspektrums wurde Stamm K1 mit den nachfolgend aufgelisteten Ethern, Alkoholen, Zuckern, Purinen, Aminosäuren, Carbonsäuren, aromatischen Kohlenwasserstoffen und mit Misch-Rohabwasser eines THF verarbeitenden Betriebs, wie unter Kap. 2.2 in flüssigem Mineralmedium, inkubiert. Die jeweils untersuchten Substrate und -konzentrationen sind in Tabelle 9 angegeben. Die Substrate wurden unverdünnt oder in sterilem H₂O dest gelöst eingesetzt. Zucker wurden in H₂O dest gelöst, sterilfiltriert und dem Mineralmedium zugegeben. In Abb. D (Anhang) sind die Strukturformeln einiger untersuchter Substrate gezeigt.

Tabelle 9: Substratspektrum des Stamms K1.

	untersuchtes Substrat	Wachstum	eingesetzte Substratkonzentration (mM)
Ether	Tetrahydrofuran (THF)	+	2 bis 70
	3-Hydroxy-THF	+	10
	γ -Butyrolacton	+	10
	2,3-Dihydrofuran	+	10
	Diethylether	+	10
	Polyethylenglykol 4000	+	5
	Polyethylenglykol 8000	+	5
	2,5-Dihydrofuran	-	5 und 10
	Diphenylether	-	5 und 10
	Diisopropylether	-	5 und 10
	1,4-Dioxan	-	5 und 10
	Morpholin	-	5 und 10
	Tetrahydrofurfurylalkohol	-	10
	Tetrahydropyran	-	5 und 10
Tetrahydrothiophen	-	5 und 10	
Alkohole	1,4-Butandiol	+	10
	Ethanol	+	20
	Ethylenglykol	+	5
	Glyzerin	+	10
	Methanol	+	10
Zucker	Fructose	+	10
	D+ Galaktose	+	10
	Glucose ¹⁾	+	10

Fortsetzung **Tabelle 9:**

	Saccharose ¹⁾	+	10
	Lactose	-	10
	Maltose	-	10
Purine	Xanthin ²⁾	+	5
	Hypoxanthin ²⁾	+	5
Aminosäuren	Tyrosin ²⁾	-	5
Carbonsäuren	Succinat	+	25
	4-Hydroxybuttersäure	+	10
	THF-2-carbonsäure	-	5 und 10
Aromatische Kohlenwasserstoffe	Toluol ³⁾	+	1,5
	Phenol	- ⁴⁾	1 und 5

¹⁾ Es zeigte sich, daß Stamm K1 Glucose und Saccharose als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten kann. Die Ergebnisse aus dem API 20 E-Test (Tabelle 7) werden als falsch negativ gewertet und als Indiz genommen, daß dieses Testsystem für Stamm K1 ungeeignet war.

²⁾ Kohlweyer et al. (2000)

³⁾ Die Toluolabnahme wurde gaschromatographisch verfolgt.

⁴⁾ Phenol verlangsamte das Wachstum von Stamm K1, wenn dieser in Mineralmedium mit 10 mM THF und 1 mM Phenol inkubiert wurde (die Zunahme der optischen Dichte in 136 Stunden betrug etwa 0,26).

Es wurde auch das Wachstum mit dem postulierten THF-Abbauintermediat Succinatsemialdehyd als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle untersucht. Es zeigte sich, daß Stamm K1 erst nach einer lag-Zeit von ca. 50 bis 80 Stunden mit diesem Substrat Wachstum zeigte. Auch in Ansätzen, in welchen das Mineralmedium mit Succinatsemialdehyd ohne Inokulum auf dem Schüttler vorinkubiert worden war, oder wenn Succinatsemialdehyd adaptierte Zellen als Inokulum eingesetzt wurden, setzte das Wachstum erst nach ca. 80 Stunden ein.

Des weiteren konnte Stamm K1 Misch-Rohabwasser eines THF verarbeitenden Betriebs als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen. Nach 29stündiger Inkubation hatte sich die optische Dichte um den Faktor 2,8 erhöht.

3.4.7 Toleranz gegenüber erhöhten Salzkonzentrationen

Es sollte untersucht werden, inwieweit Stamm K1 hohe Natrium- und Kaliumchloridkonzentrationen, auch in Abhängigkeit hoher Inkubationstemperaturen, tolerierte. Von Interesse war, ob es Unterschiede im Toleranzvermögen von ausschließlich

mit THF gewachsenen Zellen im Gegensatz zu Zellen gab, die seit ca. fünf Monaten mit Succinat angezogen worden waren.

Stamm K1 tolerierte Natriumchloridkonzentrationen bis 4 % (w/v), Kaliumchloridkonzentrationen bis 3 % (w/v), auch wenn beide Salze kombiniert wurden (7 %, w/v, Gesamtsalzkonzentration), bis zur maximal vom Bakterium tolerierten Wachstumstemperatur von 36 °C. Die eingesetzte Kohlenstoff- und Energiequelle (THF oder Succinat) hatte keinen Einfluß auf die Salztoleranz.

3.4.8 Einfluß verschiedener Substrate auf die Hopanoidsynthese

Hopanoide beeinflussen die Stabilität der prokaryotischen Cytoplasmamembran und übernehmen die Funktion, die die Sterole (Cholesterin) in eukaryotischen Zellen haben (Sahm, 1993; Madigan et al., 1997). Es sollte untersucht werden, ob Stamm K1 Hopanoide synthetisiert und wenn ja, ob die angebotene Kohlenstoff- und Energiequelle einen Einfluß hat. Als Substrate wurden THF, Succinat und Ethanol eingesetzt. Es wurde davon ausgegangen, daß THF und Ethanol andere Anforderungen an die prokaryotische Cytoplasmamembran stellen als Succinat, da beide Substrate fettlösend sind und somit Cytoplasmamembranen auflösen können.

Für die Hopanoidanalysen wurde Stamm K1 jeweils separat mit 15 mM THF, 20 mM Succinat bzw. 15 mM Ethanol in Mineralmedium angezogen und in der spätlogarithmischen Wachstumsphase geerntet. Das mit steriler Saline gewaschene Zellpellet wurde bei -20 °C eingefroren und anschließend lyophilisiert. Die Lipide wurden aus den gefriergetrockneten Zellen nach Bligh und Dyer (1959) extrahiert und der Gesamtlipidgehalt anschließend gravimetrisch bestimmt (K. Poralla, persönliche Mitteilung). Die Probenderivatisierung und GC-Analytik erfolgte nach Bringer et al. (1985) und Poralla et al. (1984) (K. Poralla, persönliche Mitteilung). Die Extraktion der Lipide und die Bestimmung der Hopanoidkonzentrationen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. K. Poralla (Universität Tübingen) durchgeführt.

In allen Zellproben des Stamms K1, die entweder auf THF, Ethanol oder Succinat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle angezogen worden waren, wurden Hopanoide gefunden (Tabelle 10; K. Poralla, persönliche Mitteilung). Der prozentuale Anteil der Hopanoide (Summe von Hopen und Monolacetal) an der Gesamtlipidausbeute betrug 0,3 % (Substrat THF), 0,5 % (Substrat Succinat) und 0,2 % (Substrat Ethanol).

Der Versuch zeigte, daß Stamm K1 Hopanoide bildete, wenn er mit THF, Succinat und Ethanol als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle angezogen wurde. Um jedoch einen möglichen unterschiedlichen Einfluß des jeweiligen Substrats auf die Hopanoidsynthese charakterisieren zu können, müßten die gefundenen Hopanoidkonzentrationen 2 bis 5 % der Gesamtlipide ausmachen (K. Poralla, persönliche Mitteilung).

Tabelle 10: Quantitative und qualitative Ergebnisse der Hopanoidanalyse aus Zellmaterial des Stamms K1.

Wachstumssubstrat	THF	Succinat	Ethanol
Lipidausbeute	27,1 mg	27,2 mg	11,9 mg
Squalen	positiv	positiv	positiv
Hopen	0,002 mg	0,002 mg	0,008 mg
Monolacetal	0,025 mg	0,05 mg	0,01 mg

Für die quantitative Bestimmung wurden 0,2 mg C₃₄ als interner Standard gewählt. Die angegebenen Werte für Hopen und Monolacetal beziehen sich auf 10 mg Lipid (K. Poralla, persönliche Mitteilung).

3.5 Einleitende Untersuchungen zur Charakterisierung des initialen Enzyms im THF-Abbauweg

Es sind erst wenige etherspaltende Enzyme in der Literatur beschrieben und charakterisiert. Spallek (1998) beschreibt eine THF-Monooxygenase aus einem *R. ruber* Stamm, die den einleitenden Schritt im THF-Abbau katalysiert. In der vorliegenden Arbeit sollten einleitende enzymatische Untersuchungen klären, um welches äquivalente Enzym es sich bei dem isolierten *Pseudonocardia* sp. handeln könnte. Alle etherspaltenden Enzyme sind als sehr instabil beschrieben. Das zeigte sich auch in ersten Vorversuchen für das THF abbauende Enzym aus Stamm K1. Aufgrund dessen wurde versucht, durch Herstellung permeabilisierter Zellen Enzymaktivität nachzuweisen.

3.5.1 Zellaufschlußmethoden

3.5.1.1 Zellpermeabilisierung

In Permeabilisierungsversuchen, bei denen die Zellwände durch Zugabe von Agenzien durchlässig gemacht wurden, sollte geprüft werden, ob das für den THF-Abbau verantwortliche Enzymsystem seine Aktivität behielt.

In allen Permeabilisierungsversuchen zeigte sich, daß die Kontrollen, die aus Puffer/Permeabilisierungsreagenz/THF oder autoklavierten Zellen/Puffer/Permeabilisierungsreagenz/THF bestanden, keine THF-Abnahme zeigten. Es konnte somit ausgeschlossen werden, daß eine THF-Abnahme abiotische Gründe hatte. Vergleiche zwischen Zellen die frisch geerntet bzw. zwei Monate bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert worden waren, zeigten bezüglich ihrer THF-Abbauraten, wenn sie als ruhende Zellen verwendet wurden, keine Unterschiede. Ruhende Zellen setzten durchschnittlich $18,5\text{ mmol THF} \times \text{g ZTG}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ um.

In den Versuchen, in denen mit Toluol und Aceton permeabilisiert wurde, setzten permeabilisierte Zellen $9,7\text{ mmol THF} \times \text{g ZTG}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ um, so daß die THF-Umsatzaktivität der ruhenden Zellen 1,9fach höher war als die der permeabilisierten Zellen. Im Inkubationszeitraum von 4,3 h wurde das THF von den permeabilisierten Zellen kontinuierlich umgesetzt (Abb. 8, A).

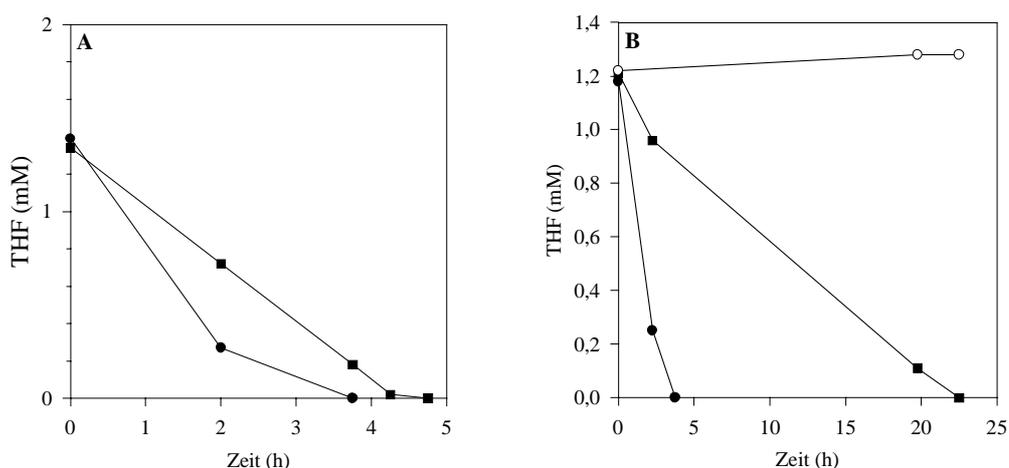


Abb. 8: Abnahme von THF in ruhenden und permeabilisierten Zellen. A) Mit Toluol und Aceton permeabilisiert, B) mit Toluol (Toluolkonzentration im Ansatz 4,7 mM) permeabilisiert. ● = ruhende Zellen, ■ = permeabilisierte Zellen (A = 4 mg ZFG/ml, B = 2,5 mg ZFG/ml), O = autoklavierte Zellen.

In den Versuchen, bei denen mit Toluol permeabilisiert wurde, setzten permeabilisierte Zellen $2,8 \text{ mmol THF} \times \text{g ZTG}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ um. Die ruhenden Zellen besaßen, verglichen zu den permeabilisierten Zellen, eine ca. 6fach höhere Aktivität (Abb. 8, B).

Wenn Toluolkonzentrationen von 1,6 bis 4,7 mM im Ansatz eingesetzt wurden, lagen die Umsatzraten für THF durchschnittlich bei $0,3 \text{ mmol} \times \text{g ZTG}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ (inkubiert bei 90 Upm). Bei Ansätzen, die Toluol in einer Endkonzentration von 6,3 mM enthielten, wurden keine THF-Umsatzraten gemessen. Wurde die Inkubationsschüttelfrequenz von 90 auf 200 Upm erhöht, lagen die THF-Umsatzraten zwischen $1,5$ und $2,5 \text{ mmol} \times \text{g ZTG}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ (Ansätze mit 1,55 bis 4,72 mM Toluol/Ansatz) bzw. $0,5 \text{ mmol} \times \text{g ZTG}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ (Ansatz mit 6,3 mM Toluol). Gaschromatographisch wurde die Toluolpeakflächenabnahme im Laufe der Inkubationszeit gemessen (Kap. 2.4.5).

In den Versuchen, bei denen mit Triton X-100 permeabilisiert wurde, setzten die permeabilisierten Zellen $26,5 \text{ mmol THF} \times \text{g ZTG}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ um. Die Umsatzrate für permeabilisierte Zellen war somit ca. 1,4fach höher als die der ruhenden Zellen.

3.5.1.2 Zellaufschluß mit der French-Press oder mit Ultraschall

Wenn die Bakterienzellen mit der French-Presse aufgeschlossen wurden und der Proteingehalt des zellfreien Überstands (Rohextrakt) mit Bradford-Reagenz gemessen wurde, ergab sich:

Passage	1	2	3	4	5	6
Protein (mg/ml)	3,1	7,5	10,0	9,7	10,0	10,0

Nach drei French-Press-Passagen wurde die maximale Proteinkonzentration erreicht, wobei durchschnittlich 7,8 bis 12,2 mg/ml erzielt wurden. Für den Zellaufschluß wurden 0,5 g ZFG in 1 ml Aufschlußpuffer resuspendiert (Kap. 2.6.2.2). 0,5 g ZFG des Stamms K1 entsprechen 0,04 g ZTG. Wenn man davon ausgeht, daß 50 % des ZTG Protein ist, wäre theoretisch eine maximale Proteinmenge von 0,02 g zu erreichen. Im vorliegenden Fall wurden 0,01 g Protein pro ml gefunden, was bedeutet, daß 50 % des theoretisch vorhandenen Proteins nach drei French-Press-Passagen wiedergefunden werden konnte.

Bei Aufschluß der Zellen mit Ultraschall lag die Proteinkonzentration nach vier bis sechs Zyklen bei ca. 9 mg/ml im zellfreien Überstand, wenn 0,5 g ZFG in 1 ml Aufschlußpuffer aufgeschlossen wurde.

3.5.2 Messungen zum Nachweis THF abhängiger enzymatischer Aktivität mit ruhenden Zellen und mit Rohextrakt an der Sauerstoffelektrode

Oxygenasen inkorporieren molekularen Sauerstoff in das Substrat, so daß ein aktives Enzym indirekt durch die Messung der Sauerstoffabnahme im Meßansatz an einer Clark-Sauerstoffelektrode bestimmt werden kann.

Messungen mit ruhenden Zellen des Stamms K1 zeigten, daß durch THF-Zugabe der Sauerstoffverbrauch im Vergleich zur endogen gemessenen Respiration (ca. 7 nmol O₂ / 20 µl ruhende Zellen, 1 g ZFG/ml Puffer) um das 3 bis 4fache anstieg (mit 0,1 mM THF 21 nmol O₂ / 20 µl ruhende Zellen, 1 g ZFG/ml Puffer; mit 1 mM THF 39 nmol O₂ / 20 µl ruhende Zellen, 1 g ZFG/ml Puffer). Eine THF-Konzentration von 0,1 bis 1 mM im Ansatz führte zu einer Steigerung, während THF-Konzentrationen größer 1 mM zur Verringerung der substratabhängigen Sauerstoffabnahme führte.

In Messungen mit Rohextrakt konnte keine THF abhängige Zunahme des Sauerstoffverbrauchs gemessen werden, da ein starker substratunabhängiger Sauerstoffverbrauch zu verzeichnen war. Bei Zugabe von 1 mM NADH zum Ansatz betrug der substratunabhängige Sauerstoffverbrauch ca. 35 mU/mg, wenn 2 mM NADH, FAD und FMN zugegeben wurden ca. 38 mU/mg. Die endogene Rate lag bei ca. 1,3 mU/mg wenn ohne Elektronendonator gemessen wurde. Wurde NADPH in den Messungen eingesetzt, betrug die substratunabhängige Respirationsrate ca. 2 mU/mg, durch Zugabe von THF kam es zu keiner Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs. Durch Zugabe von Katalase erfolgte keine Sauerstoffrückbildung. Auch bei Einsatz eines NADH-regenerierenden Systems wurde keine substratabhängige Sauerstoffabnahme gemessen.

Bei den Messungen mit Rohextrakt zeigte sich, daß THF-Konzentrationen größer als 0,1 mM den endogenen substratunabhängigen Sauerstoffverbrauch hemmten.

Da die Messungen mit Rohextrakt erfolglos waren, wurde dieser durch Gelfiltration an einer PD-10-Säule (Kap. 2.7.1) von niedermolekularen Substanzen befreit. Auch hier wurde im Meßansatz mit proteinhaltigen Eluat und NADH eine THF unabhängige endogene Sauerstoffabnahme von ca. 24 mU/mg gemessen. Durch THF-Zugabe konnte diese nicht

gesteigert werden. Ohne Zugabe von Elektronendonator war ein endogener Sauerstoffverbrauch nicht meßbar.

Der Rohextrakt wurde auch einer Ultrazentrifugation unterzogen und die Membranfraktion und der Überstand separat getestet (auch im GC-Ansatz, siehe Kap. 3.5.3.2). Es konnte keine substratabhängige Reaktion gemessen werden. Die substratunabhängige NADH-abhängige Reaktion wurde in der Membranfraktion wiedergefunden. Keine Aktivität befand sich im Überstand.

Es zeigte sich also, daß mittels Messungen an der Sauerstoffelektrode keine THF abhängige Oxygenaseaktivität nachzuweisen war.

3.5.3 Messung THF abhängiger enzymatischer Aktivität mittels analytischer Bestimmung der THF-Konzentration mit GC/FID oder GC/FID/Headspace

3.5.3.1 In wachsenden, ruhenden und permeabilisierten Zellen

In den Versuchsansätzen mit wachsenden, ruhenden und permeabilisierten Zellen wurde eine THF-Abnahme gemessen (Kap. 3.4 und 3.5). Keine THF-Abnahme wurde im zellfreien Überstand von ganzen wachsenden Zellen detektiert.

3.5.3.2 Messungen mit Rohextrakt

Nach dem Zellaufschluß (Kap. 2.6.2.2) wurde der Rohextrakt (0,01-0,9 ml/ml Ansatz) sofort oder nach Lagerung über Nacht bei 4 °C in Kaliumphosphat- oder Tris-HCl-Puffer (beide 50 mM, pH 7,4) mit FAD/FMN (Endkonzentration: 0,2 mM), NADH oder NADPH (Endkonzentration: 2 mM) und THF (Endkonzentration: 0,2-10 mM), auch mit Zusatz von MgSO₄, Spurenelementlösung oder in Mineralmedium (Kap. 2.2), aerob oder anaerob, stehend oder bei ca. 100 Upm schüttelnd, bei Raumtemperatur bzw. 30 °C inkubiert. Variiert wurde durch Weglassen des DTT-Zusatzes, durch Zugabe von 5 bis 10 µl PMSF (0,1 M in Isopropanol gelöst) oder 2,5 µl 4-Amidinophenylmethansulphonyl Fluorid (20 mM in H₂O dest) pro ml Zellsuspension, durch Zugabe von 1 mg Lysozym pro g Zellen und anschließender 30 minütiger Inkubation entweder bei 30 °C oder Raumtemperatur und Zusatz von MgSO₄ (Endkonzentration: 5-10 mM). Der pH-Wert des Inkubationsmediums

wurde im Bereich von 5 bis 10, unter Verwendung jeweils geeigneter Puffersysteme, variiert. Inkubiert wurde in Reagenzröhrchen, die mit einem Teflon-Silikon Schraubverschluß verschlossen wurden. Zum Abstoppen der Reaktion wurde das Protein durch Zugabe von HCl angesäuert und ausgefällt. Es wurde auch die Proteinfraction nach Chromatographie an Sephadex G-25 (Kap. 2.7.1) im Test eingesetzt. THF abhängige Enzymaktivität konnte nicht detektiert werden. Es wurde auch das Eluat, das kein Protein enthielt, in Komplementationstests eingesetzt.

Es zeigte sich, daß weder Mineralmedium noch Puffer die zu messende THF-Konzentration beeinflusste. Die Einflüsse von Elektronendonatoren, FAD/FMN, Rohextrakt und Isopropanol sind im Kap. 3.1.1 erwähnt. Um die Kapillarsäule nicht zu zerstören, wurde durch Ansäuerung der Proben das Protein ausgefällt, indem der pH-Wert auf 3,0 gesenkt wurde (Proben mit einem pH-Wert $\leq 2,5$ sollten nicht analysiert werden, um die Kapillarsäule nicht zu zerstören, Supelco-Empfehlung).

Weder in den Proben mit Rohextrakten, dialysierten Rohextrakten oder an Sephadex G-25 chromatographierten Rohextrakten, noch in den Proben mit einem NADH-regenerierendem System (Kap. 2.6.4.2), wurde THF abhängige enzymatische Aktivität detektiert.

3.5.4 Untersuchung auf das Vorhandensein von bakteriellem Cytochrom P-450

Cytochrom P-450 haltige Enzyme sind bei Eu- und Prokaryoten oft an Schadstoffabbauprozessen beteiligt. Es sollte untersucht werden, ob ein solches Enzym am THF-Abbau in dem isolierten *Pseudonocardia* sp. beteiligt ist.

Das Wachstum der Kulturansätze mit und ohne Cytochrom P-450 Inhibitor Metyrapon unterschied sich nicht und das CO-Differenzspektrum von Kontrolle und Probe zeigte keine Maxima im Wellenbereich von 400 bis 500 nm. Es wurde somit kein Cytochrom P-450 abhängiges Enzym detektiert.

3.5.5 Wachstum mit dem Kupferchelator Bathocuproin

Ammonium- und Methanmonooxygenasen können in Nebenreaktionen auch Etherbindungen spalten. Die Ammoniummonooxygenase aus einem *Nitrosomonas europaea*

Stamm benötigt für ihre katalytische Aktivität Kupfer (Hyman et al., 1994). Daher sollte untersucht werden, ob ein kupferabhängiges Enzym im THF-Abbauweg involviert ist.

Eine Kultur des Stamms K1 wurde an Kupfer verarmt. Dem Mineralmedium wurde Spurenelementlösung (Kap. 2.2), die kein Kupfer enthielt, und der Kupferchelator Bathocuproin zugegeben. Als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle diente THF.

Für die Versuchsdurchführung wurden fabrikneue Erlenmeyerkolben mit Schraubverschluß und Teflon-Silikoneinlage benutzt. Es wurde je ein Parallelansatz von 1) THF + Kupferchelator, 2) Succinat + Kupferchelator, 3) THF und 4) Succinat in Mineralmedium angesetzt, mit einer kupferverarmten Vorkultur aus der logarithmischen Wachstumsphase beimpft und die optische Dichte über 105 Stunden gemessen. Die Substratendkonzentration betrug 10 mM, die Bathocuproin-Endkonzentration 1 mM (Hormann, 1991).

Aus Abb. 9 ist ersichtlich, daß durch die Zugabe des Kupferchelators Bathocuproin der Beginn des logarithmischen Wachstums zeitlich verzögert wurde, wobei die erreichte optische Dichte in den Ansätzen mit nur Substrat bzw. Substrat und Bathocuproin vergleichbar waren. Dies galt sowohl für die Ansätze mit Succinat als auch für die Ansätze mit THF. Während des Wachstums blieb der pH-Wert konstant.

Es wird aus dem Versuch geschlossen, daß kein kupferhaltiges Enzym im THF-Abbau in Stamm K1 involviert ist.

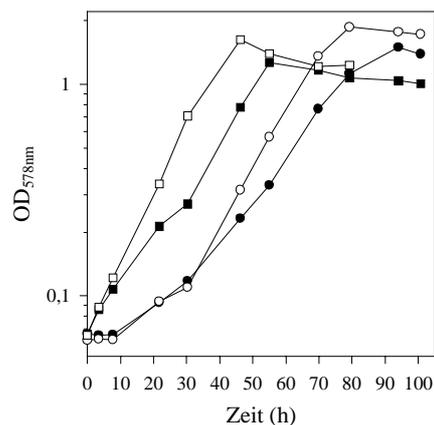


Abb. 9: Wachstum von Stamm K1 in Mineralmedium mit THF oder Succinat (jeweils 10 mM) und mit und ohne Kupferchelator Bathocuproin (1 mM).

● = Stamm K1 inkubiert mit THF und Bathocuproin, ■ = Stamm K1 inkubiert mit Succinat und Bathocuproin, ○ = Stamm K1 inkubiert mit THF, □ = Stamm K1 inkubiert mit Succinat.

3.5.6 Nachweis von Reduktaseaktivitäten in Zellextrakten des Stamms K1

Da keine THF abhängige Enzymaktivität in den oben beschriebenen Versuchen (Messungen an der Sauerstoffelektrode, photometrische und gaschromatographische Bestimmungen) in Rohextrakten des Stamms K1 nachgewiesen werden konnte, mußte eine andere Strategie verfolgt werden, um das im THF-Abbau involvierte Enzym zu identifizieren. Da Untersuchungen mit NAD auf eine THF abhängige Dehydrogenaseaktivität negativ ausfielen (Kap. 3.5.6.2) und auch die Beteiligung eines Cytochrom P-450 Enzyms negiert werden konnte, wurde angenommen, daß es sich bei dem einleitenden Enzym des THF-Abbaus im Stamm K1 um eine Monooxygenase handeln könnte, die kein Cytochrom P-450 besitzt, so wie es auch von Bernhardt und Diekmann (1991) für den von ihnen bearbeiteten *R. ruber* Stamm 219 postuliert und von Spallek (1998) beschrieben wurde.

Monooxygenasen besitzen eine Oxygenase- und eine Reduktasekomponente. In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob eine Reduktaseaktivität detektiert werden konnte, die für das Substrat THF spezifisch ist. Dafür wurden Zellen des Stamms K1 mit THF oder Succinat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle angezogen und die zellfreien Extrakte an einem Anionenaustauscher (Kap. 2.7.2) chromatographiert (Abb. 10). Gezeigt sind die Proteinelutionsprofile und die KCl-Gradienten, die ab Fraktion 23 bis einschließlich Fraktion 76 angelegt wurden (0-1 M KCl). Die einzelnen Fraktionen wurden mit verschiedenen künstlichen Elektronenakzeptoren getestet (Kap. 2.6.6.1).

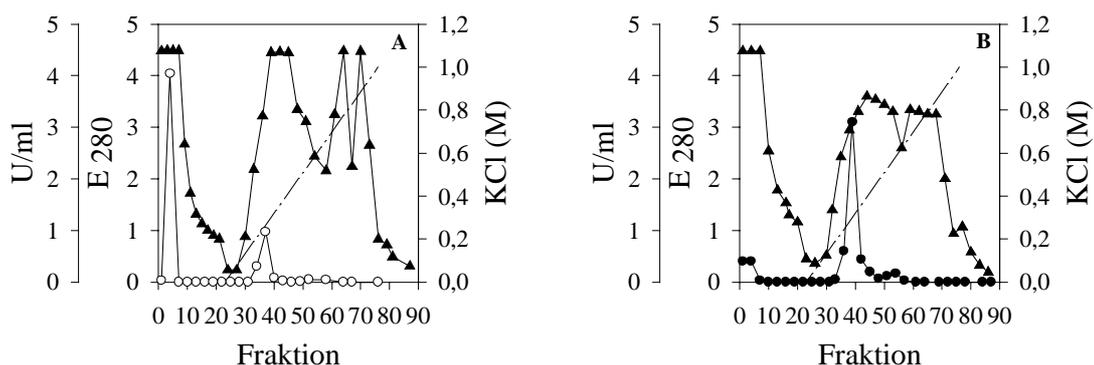


Abb. 10: Chromatographie zellfreien Extrakts von mit THF (A) oder mit Succinat (B) angezogenen Zellen des Stamms K1 an Q-Sepharose. Proteinelutionsprofile, KCl-Gradienten und NADH-Oxidaseaktivitäten. ▲ = Protein (E_{280}), O = NADH-Oxidaseaktivität von Zellen, die mit THF angezogen worden waren, ● = NADH-Oxidaseaktivität von Zellen, die mit Succinat angezogen worden waren, —•— = KCl-Gradient.

Die NADH-Oxidaseaktivitäten der einzelnen Fraktionen wurden gemessen (Abb. 10). Da nicht ausgeschlossen werden konnte, daß die NADH-Oxidaseaktivität die eigentliche THF

abhängige Enzymaktivität maskierte, wurden die Fraktionen, die diese nicht enthielten, an der Sauerstoffelektrode und in photometrischen und gaschromatographischen Tests auf eine THF abhängige Enzymaktivität überprüft. Desweiteren wurde überprüft, ob sich die gemessenen Reduktaseaktivitäten in Extrakten aus den mit THF bzw. Succinat angezogenen Zellen unterschieden.

3.5.6.1 Gemessene NADH-Oxidaseaktivitäten

Alle Fraktionen wurden auf NADH-Oxidaseaktivität überprüft. Die gemessenen NADH-Oxidaseaktivitäten sind in Abb. 10 graphisch dargestellt. Die auf THF angezogenen Zellen zeigten einen Aktivitätspeak, der bei einer KCl-Konzentration von 0,17 bis 0,32 M (Fraktionen 32-40) mit maximaler Aktivität von 0,97 U/ml eluierte. Der Rohextrakt der mit Succinat angezogenen Zellen zeigte ebenfalls einen Aktivitätspeak, der zwischen 0,18 und 0,46 M KCl (Fraktionen 33-48) mit 3,1 U/ml eluierte.

Es war keine zusätzliche NADH oxidierende Aktivität in zellfreien Extrakten von mit THF angezogenen Zellen nachzuweisen (Abb. 10).

3.5.6.2 Nachweis einer NADH-Cytochrom-c-Reduktaseaktivität

Nach Chromatographie von Rohextrakten der mit THF angezogenen Zellen eluierte die erste gemessene NADH abhängige Cytochrom-c-Reduktaseaktivität bei einer KCl-Konzentration von 0,15 bis 0,43 M (Fraktionen 31-46), deren maximale Aktivität 3,4 U/ml war (Abb. 11). Der zweite Aktivitätspeak eluierte von 0,54 bis 0,8 M KCl (Fraktionen 52-67) mit maximaler Aktivität von 2 U/ml. In den Fraktionen 34 bis 49 (0,2-0,48 M KCl) des Rohextrakts aus Succinat angezogenen Zellen wurde eine maximale NADH-Cytochrom-c-Reduktaseaktivität von 3,3 U/ml gemessen. Eine zweite, mit 0,2 U/ml, eluierte zwischen 0,54 und 0,63 M KCl (Fraktionen 52-57). Die NADH-Cytochrom-c-Reduktaseaktivität, die zwischen 0,54 und 0,8 M KCl eluierte, und deren Aktivität mit 2 U/ml bestimmt wurde, war nur im Rohextrakt der Bakterienzellen zu finden, die mit THF angezogen worden waren. Die Fraktionen dieses zweiten NADH-Cytochrom-c-Reduktaseaktivitätspeaks wurden vereinigt und sowohl durch Messung an der Sauerstoffelektrode, als auch durch GC-

Messungen auf eine THF abhängige Aktivität überprüft. Es wurde keine Enzymaktivität gemessen.

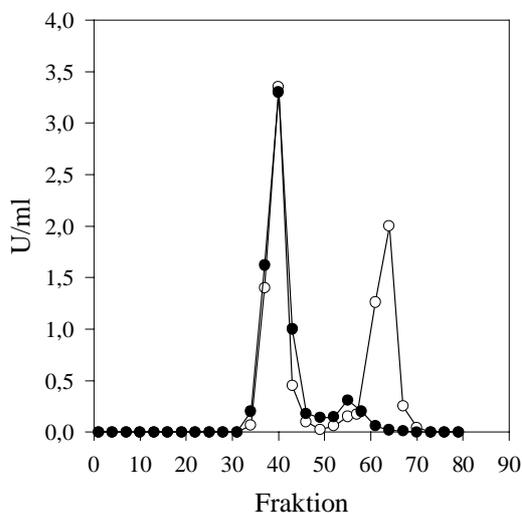


Abb. 11: Chromatographie zellfreien Extrakts von mit THF oder mit Succinat angezogenen Zellen des Stamms K1 an Q-Sepharose. Gemessene NADH-Cytochrom-c-Reduktaseaktivitäten von mit THF (O) bzw. von mit Succinat (●) angezogenen Zellen.

Weitere Untersuchungen sollten zeigen, ob in THF angezogenen Zellen noch mit anderen künstlichen Elektronenakzeptoren eine spezifische NADH abhängige Reduktaseaktivität vorhanden war. In Abb. 12 sind die gemessenen Reduktaseaktivitäten mit den künstlichen Elektronenakzeptoren "Akzeptormix" (Kap. 2.6.6.1) dargestellt.

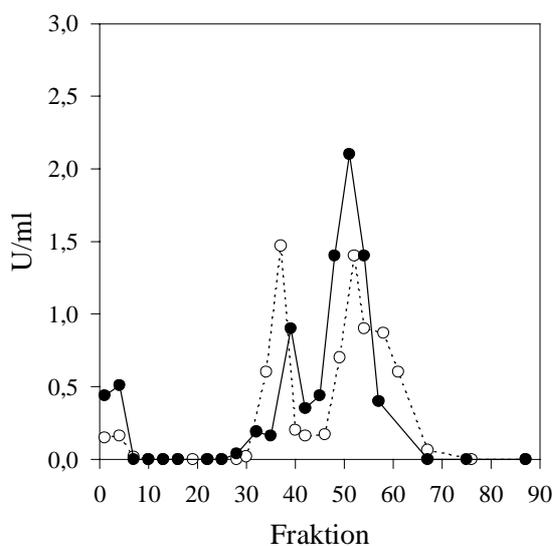


Abb. 12: Chromatographie zellfreien Extrakts von mit THF oder mit Succinat angezogenen Zellen des Stamms K1 an Q-Sepharose. Gemessene Akzeptormix-Reduktaseaktivitäten von mit THF (O) und von mit Succinat (●) angezogenen Zellen.

Mit THF oder Succinat angezogenen Zellen zeigten zwei Akzeptormix-Reduktase-Aktivitätspeaks. Der erste Peak bei der Chromatographie der mit THF angezogenen Zellen eluierte bei einer KCl-Konzentration von 0,13 bis 0,35 M (Fraktionen 30-42) mit einer maximalen Aktivität von 1,5 U/ml, der zweite eluierte mit Schulter zwischen 0,42 und 0,82 M KCl (Fraktionen 46-67) mit maximaler Aktivität von 1,4 U/ml. Bei Chromatographie von Rohextrakt der mit Succinat angezogenen Zellen eluierte der erste Aktivitätspeak zwischen 0,16 und 0,35 M KCl (Fraktionen 32-42) mit maximaler Aktivität von 0,9 U/ml, der zweite zwischen 0,4 und 0,68 M KCl (Fraktionen 45 - ca. 60) mit maximaler Aktivität von 2,1 U/ml. Vergleiche von mit THF angezogenen Zellen und solchen, die mit Succinat angezogen worden waren, zeigten keine unterschiedlichen Reduktaseaktivitäten.

Des weiteren sollte NBT als Elektronenakzeptor verwendet werden. Abb. 13 zeigt die gemessenen NBT-Reduktaseaktivitäten. Die Fraktionen der mit THF oder Succinat angezogenen Zellen zeigten zwei NBT-Reduktaseaktivitätspeaks. Bei THF angezogenen Zellen eluierte der erste Aktivitätspeak zwischen 0,15 und 0,37 M KCl (Fraktionen 31-43) mit maximaler Aktivität von 2,4 U/ml, der zweite zwischen 0,48 und 0,68 M KCl (Fraktionen 49-60) mit maximaler Aktivität von 0,42 U/ml.

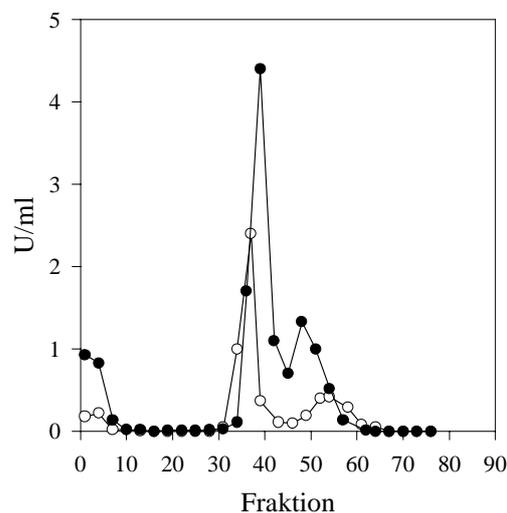


Abb. 13: Chromatographie zellfreien Extrakts von mit THF oder mit Succinat angezogenen Zellen des Stamms K1 an Q-Sepharose. Gemessene NBT-Reduktaseaktivitäten von mit THF (O) und von mit Succinat (●) angezogenen Zellen.

Der erste NBT-Reduktaseaktivitätspeak der mit Succinat angezogenen Zellen eluierte zwischen 0,2 und 0,4 M KCl mit einer maximalen Aktivität von 4,4 U/ml, der zweite

eluierte zwischen 0,4 und 0,65 M KCl (Fraktionen 45-58) mit maximaler Aktivität von 1,3 U/ml. Es wurde keine zusätzliche Reduktaseaktivität für mit THF angezogene Zellen, verglichen mit Zellen, die mit Succinat angezogen worden waren, bestimmt. Es wurden keine NADH abhängigen Reduktaseaktivitäten mit dem künstlichen Elektronenakzeptoren Ferricyanid, Brilliant-Cresyl-Blau oder Methylviologen gemessen. Da auch zu Beginn nicht ausgeschlossen werden konnte, daß möglicherweise eine Dehydrogenasereaktion den THF-Abbau einleitet, wurde auch mit NAD (Tabelle 1) als Elektronenakzeptor gearbeitet. In photometrischen und gaschromatographischen Messungen wurden sowohl unchromatographierter Rohextrakt als auch Protein von chromatographierten Rohextrakt eingesetzt. Gemessen wurde mit 0,05-10 mM THF bei pH 7,5 und 8,5. Es wurde keine Enzymaktivität detektiert. Aus diesen Untersuchungen wurde ersichtlich, daß nur eine NADH abhängige Reduktaseaktivität nachgewiesen werden konnte, die spezifisch in mit THF gewachsenen Zellen zu beobachten war. Es handelte sich dabei um eine NADH-Cytochrom-c-Reduktaseaktivität.

3.6 Untersuchungen zur Immobilisierung von Stamm K1

3.6.1 Charakterisierung der Zelloberfläche

Wenn das Zetapotential in Abhängigkeit des pH-Werts gemessen wird, können daraus Rückschlüsse auf die Nettoladung der Zelloberfläche gezogen werden (Martienssen, 2000a). Dazu wird eine Bakteriensuspension in eine Quarzküvette gegeben und ein konstantes elektrisches Feld angelegt. Die Geschwindigkeit, mit der sich die Bakterien im Feld bewegen, wird mit zwei gekreuzten Laserstrahlen gemessen. Mit Hilfe der Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung (Kap. 2.8.1.1) wird von der elektrischen Mobilität auf das Zetapotential rückgeschlossen. In Abb. 14 sind die gemessenen Zetapotentiale für Zellen, die mit THF bzw. Succinat angezogen worden waren, in Abhängigkeit vom pH-Wert dargestellt. Im physiologisch relevanten pH-Bereich war das Zetapotential mit ca. - 36 mV relativ konstant. Die Standardabweichung bei Parallelmessungen betrug ± 2 mV. Im unteren und oberen pH-Bereich nahmen die gemessenen Zetapotentiale ab, im physiologisch relevanten pH-Bereich nahmen sie zu. Es wurde kein signifikanter Einfluß des Kulturalters und der angebotenen Kohlenstoffquelle festgestellt.

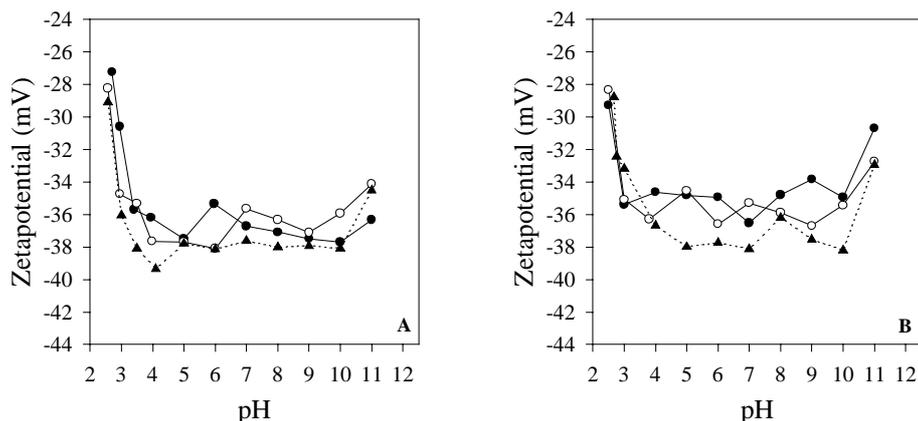


Abb. 14: Zetapotentiale des Stamms K1. A) Mit THF angezogene Zellen, B) Mit Succinat angezogene Zellen. ● = Zellen aus der frühlogarithmischen Wachstumsphase, O = Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase, ▲ = Zellen aus der stationären Wachstumsphase.

Die Methode der Mikrotitration von Bakterienzellen erlaubt Rückschlüsse auf die titrierbaren geladenen Oberflächengruppen (James, 1991; Tabelle 11), die die Adhäsionseigenschaften mitbestimmen. Eine Beispieltitrationskurve für Zellen aus der stationären Wachstumsphase ist im Anhang (Abb. E) gezeigt. Wurden die von der Bakterienzelloberfläche aufgenommenen Protonen in mmol/g ZTG graphisch dargestellt, ergaben sich für Zellen des Stamms K1 aus der logarithmischen und stationären Wachstumsphase die in Abb. 15 dargestellten Titrationskurven. Die Oberflächenladung THF angezogener Zellen veränderte sich mit dem Zellularalter. Exponentiell wachsende Zellen besaßen kaum titrierbare Aminogruppen, wenige titrierbare Carboxyl- und vergleichsweise viele Phosphatgruppen. Mit zunehmendem Kulturalter nahmen die titrierbaren Aminogruppen leicht und die Carboxylgruppen signifikant zu, während die Phosphatgruppen deutlich abnahmen (Abb. 15, A).

Tabelle 11: Titrierbare Oberflächengruppen Gram-positiver Bakterien (nach James, 1991).

		pKa - Bereich	Vorkommen
Aminogruppen	- NH ₂	9 - 11	Murein, Lipopolysaccharide, Proteine, Polysaccharide
Carboxylgruppen	- COO ⁻	3,2 - 4,6	Murein, Kapselmaterial (Polysaccharide), Proteine, Teichuronsäuren
Phosphatgruppen	- PO ₄ ²⁻	≤ 3,5	Teichonsäuren, Lipoteichonsäuren, Lipopolysaccharide

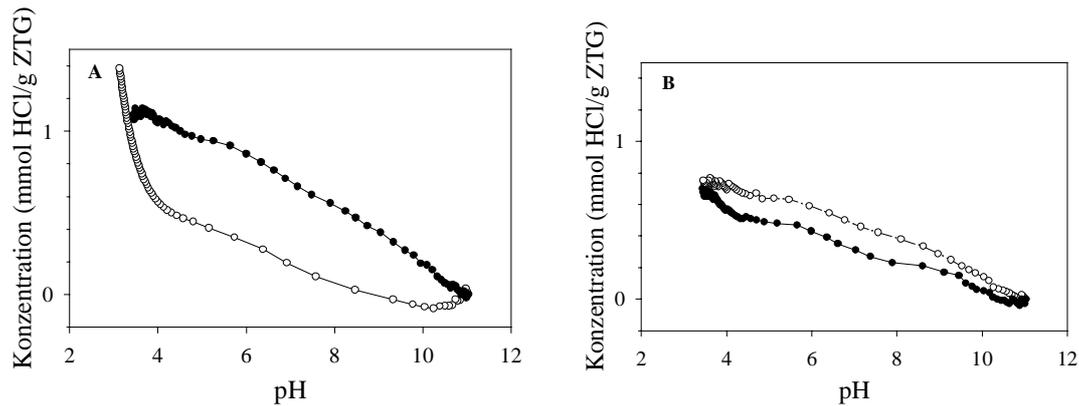


Abb. 15: Mikrotitration von Stamm K1 zur Ermittlung der titrierbaren Zelloberflächengruppen. A) Mit THF angezogene Zellen, B) mit Succinat angezogene Zellen. O = Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase, ● = Zellen aus der stationären Wachstumsphase.

Mit Succinat gewachsene Zellen zeigten hinsichtlich ihrer titrierbaren Oberflächengruppen in Abhängigkeit vom Alter kaum Unterschiede (Abb. 15, B). Sie besaßen etwas mehr titrierbare Aminogruppen, deutlich mehr Carboxyl- und weniger Phosphatgruppen als Zellen, die mit THF angezogen worden waren. Die Gesamtprotonenaufnahme war niedriger (ca. 0,9 mmol/g ZTG) als bei mit THF gewachsenen Zellen (ca. 1,2 mmol/g ZTG).

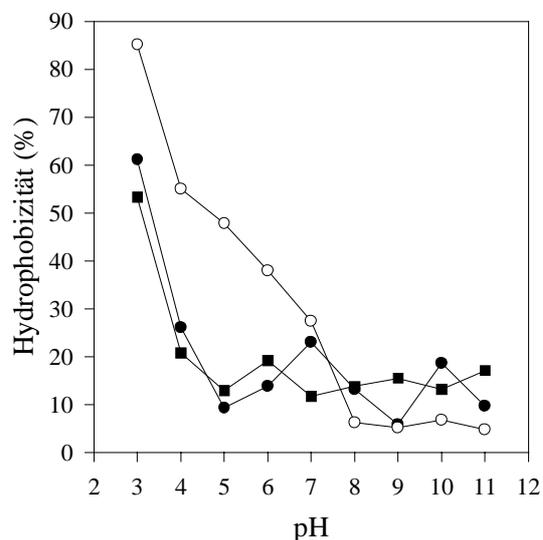


Abb. 16: Oberflächenhydrophobizitäten (%) des Stamms K1. Zellen aus der logarithmischen (●) und stationären (■) Wachstumsphase, die mit THF und Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase, die mit Succinat (O) angezogen worden waren.

Zur weiteren Kontrolle wurde die Ladung von Stamm K1 durch IEF ganzer Zellen und mittels Farbstoffadsorptionstest untersucht. Nach IEF von ganzen Zellen des Stamms K1

ergab sich, daß sich die Zellen unter allen untersuchten Bedingungen in der obersten Schicht des pH-Gradienten anlagerten. Diese Bande entsprach einem pH-Wert von ≤ 3 . Weder die THF-Konzentrationen, mit denen die Zellen angezogen worden waren, noch das Zellalter beeinflussten das Ergebnis. Mittels Farbstoffadsorptionstests mit Kristallviolett und Orange II wurde untersucht, inwieweit geladene Farbstoffe an der Zelloberfläche adsorbierten. Für den positiv geladenen Farbstoff Kristallviolett war die Beladung 0,095 mmol/g ZTG. Bei der Messung des negativ geladenen Farbstoffs Orange II wurde keine Differenz zur Kontrolle gemessen; die Bakterienzelloberfläche hatte Orange II nicht adsorbiert, womit die negative Oberflächenladung des Stamms K1 bestätigt wurde.

Da für das mikrobielle Adhäsionsverhalten die Zellhydrophobizität mitentscheidend ist, wurde die des Stamms K1 untersucht. Mit der Kontaktwinkelmethode wurden für Zellen aus der frühen logarithmischen Wachstumsphase 44° , für Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase 53° und für Zellen aus der stationären Wachstumsphase 55° gemessen. Die aus den gemessenen Kontaktwinkeln abzuleitenden Oberflächenenergien (γ_{BV}) wurden nach der Methode von Neumann et al. (1973) bestimmt und betragen 54 mN/m (44°) und je 49 mN/m (für 53° und 55°).

Als zweite Methode wurde die Zellverteilung in einem Wasser-Hexadekan-Gemisch (BATH Test) untersucht (Abb. 16). Auf Succinat angezogene Zellen zeigten im pH-Bereich 3 bis 7 die höchste Hydrophobizität, während sie im pH-Bereich 8 bis 11 die geringste zeigten. Demgegenüber zeigten mit THF angezogene Zellen, unabhängig vom Alter, in etwa gleiche Hydrophobizitäten, wobei Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase etwas hydrophober im pH-Bereich 3 bis 4 waren als Zellen aus der stationären Wachstumsphase. Auf THF angezogene Zellen waren im pH-Bereich 8 bis 11 hydrophober als die mit Succinat angezogenen.

In Adsorptionsvorgängen spielen Kapseln und aus Polysacchariden bestehende Schleime, zu deren Nachweis der Farbstoff Nigrosin eingesetzt wurde, eine Rolle. Im mikroskopischen Bild zeigten einzelne Zellen des Stamms K1 keine hellen Höfe; die Zellen besaßen keine Kapseln. Bei Zellaggregaten waren im Innern helle Bereiche zu sehen, die das mögliche Vorhandensein von Schleimen anzeigten.

Für den Nachweis von sauren Exopolysacchariden wurde mit Ruthenium Red und Alcian Blue gearbeitet. Dabei ergab sich für die Adsorption von Ruthenium Red eine Beladung von 0,062 mmol/g ZTG und für die Adsorption von Alcian Blue 0,071 mmol/g ZTG. Farbstoffadsorptionstests mit den kationischen Farbstoffen Ruthenium Red und Alcian Blue

lassen eine Einschätzung des Polysaccharidgehalts der bakteriellen Zelloberfläche zu (Handley, 1991). Alcian Blue besitzt eine geringere Spezifität als Ruthenium Red, was sich durch die höhere Adsorption im Vergleich zu Ruthenium Red zeigte. Dies ist auch in der Literatur beschrieben (Handley, 1991; Martienssen, 2000a). Alcian Blue bindet an Carboxyl-, Sulfat- und wahrscheinlich auch an Phosphatgruppen. Die für Stamm K1 bestimmten Werte zeigen, daß dieses Isolat extrazelluläre Polysaccharide besitzt. Die Größenordnung der Quantität liegt im mittleren Bereich, der von Martienssen (2000a) für verschiedene Bakterien bestimmten Quantitäten.

Die Versuche zur Bestimmung der physikochemischen Zelleigenschaften lassen vermuten, daß Stamm K1 kein "extremes", d.h. sehr spezielles, Adsorptionsverhalten besitzt. Das Isolat ist negativ geladen und die Ergebnisse aus den Farbstoffadsorptionstests mit dem negativ geladenen Farbstoff Orange II deuten darauf hin, daß die positiven Ladungen auf der Zelloberfläche quantitativ zu vernachlässigen sind. Die vorliegenden Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß ein positiv geladener Träger zur Immobilisierung besser geeignet sein könnte als ein negativ geladener. Stamm K1 ist moderat hydrophob und man kann annehmen, daß er sich an einem hydrophoben Träger immobilisieren lassen wird. Inwieweit sich jedoch die gleichzeitigen Einflüsse von Ladung und Hydrophobizität auf die Adhäsion auswirken, kann anhand der Zelloberflächencharakteristika nicht immer korrekt vorausgesagt werden (Martienssen, 2000a). Deshalb wurden nachfolgende Modellexperimente durchgeführt (Kap. 3.6.2), die das tatsächliche Adhäsionsverhalten aufzeigen sollten. Für die Immobilisierung des Stamms K1 wurden positiv, negativ und ungeladene Modellträger getestet.

3.6.2 Untersuchung des Adhäsionsverhaltens

Für einen möglichen biotechnologischen Einsatz des Stamms K1 zur Abwasserreinigung THF haltiger Abwasser sollte untersucht werden, inwieweit Stamm K1 an verschiedene Trägermaterialien adsorbierte. Eine Zellimmobilisierung ist wichtig, um ein Auswaschen der schadstoffabbauenden Bakterienzellen aus der Reinigungsanlage zu verhindern.

Es wurden verschiedene Träger (Tabelle 2 und 3) auf ihre Fähigkeit untersucht, Stamm K1 zu immobilisieren. Von den Trägern 1, 2 und 3, die im pH-Bereich von 4 bis 11 getestet wurden, zeigte der ungeladene Träger (Träger 1) durchschnittlich die höchste Beladung

(Abb. 17). Bei pH 4, wo die Gesamtladung des Bakteriums für den o.g. pH-Bereich am geringsten war, wurde eine Beladung von ca. 1 mg ZTG/g Träger bestimmt. Sie nahm kontinuierlich bis pH 7,5 ab, stieg dann im Bereich pH 8 bis pH 8,5 an und nahm danach kontinuierlich bis pH 11 ab.

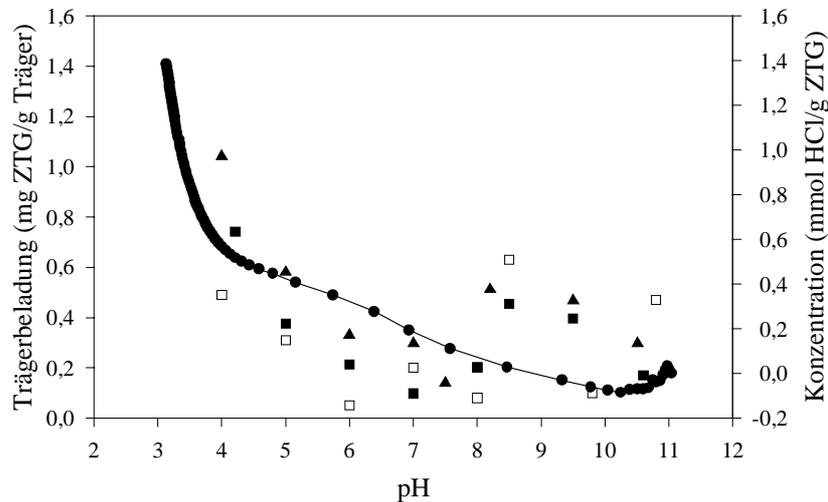


Abb. 17: Adsorption der mit THF angezogenen Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase des Stamms K1 an die Träger 1, 2 und 3 im pH-Bereich von 4 bis 11. Gezeigt ist auch die Ladungsänderung an der Bakterienzelloberfläche (ermittelt durch Mikrotitration, siehe Abb. 14 A).

▲ = Träger 1, □ = Träger 2, ■ = Träger 3, —●— Ladungsänderung an der Bakterienoberfläche.

Für den Anionenaustauscher (Träger 3) wurde die zweithöchste Trägerbeladung im pH-Bereich 4 bis 6 bestimmt und die niedrigste für den Kationenaustauscher (Träger 2). Nach sehr niedriger Adsorption bei pH 8 (Träger 2) stieg die Adsorption sprunghaft bei pH 8,5 an, sank bei pH 9,8 und nahm bei pH 10,8 wieder zu. Auch die Trägerbeladung für den Träger 3 nahm bis pH 8,5 noch einmal zu und nahm dann kontinuierlich bis pH 10,6 ab. Es zeigte sich weiterhin, daß Stamm K1 im physiologisch relevanten pH-Bereich am besten am Träger OC 1066 adsorbierte, gefolgt von Träger 1, Sinterglas, Träger 2 und Träger 3 (Tabelle 12).

Mittels Rasterelektronenmikroskopie wurde der Bewuchs des Trägermaterials untersucht. Nach 48stündiger Inkubation waren die einzelnen Lewatit OC 1066 Trägerkugeln partiell bewachsen (Abb. F, Anhang). In Abb. G (Anhang) sieht man wie Stamm K1 die Oberfläche des Trägers überspannt. In Abb. H (Anhang) begrenzen helle Unschärfen das Bakterium. Es könnte sich um Polysaccharidabsonderungen ("Schleime") handeln.

Tabelle 12: Zusammenfassung der durchschnittlichen Trägerbeladung mit Zellen des Stamms K1 nach zweistündiger Inkubation für die Träger 1, 2, 3, OC 1066 und Sinterglas.

Träger	Beladung nach 2 h Inkubation
Träger 1	0,3 mg \pm 0,1 mg ZTG/g Träger (pH 6 bis 8)
Träger 2	0,15 mg \pm 0,05 mg ZTG/g Träger (pH 6 bis 8)
Träger 3	0,15 mg \pm 0,05 mg ZTG/g Träger (pH 6 bis 8)
OC 1066	0,6 mg \pm 0,05 mg ZTG/g Träger (pH 7)
Sinterglas	0,2 mg \pm 0,05 mg ZTG/g Träger (pH 7)

3.6.3 Einschlußimmobilisierung ganzer Zellen mit Alginat

Untersuchungen sollten klären, ob sich Stamm K1 mittels Alginateinschlußverfahren immobilisieren läßt, ohne seine THF-Abbauaktivität zu verlieren. Der Versuch ergab, daß Stamm K1 mit Alginat immobilisiert werden kann, die THF-Abbauaktivität erhalten bleibt und sich die THF-Abbauraten von alginatimmobilisierten und freien Zellen unterscheiden (Abb. 18). Die nicht immobilisierten Zellen setzten 14,6 mmol THF \times g ZTG⁻¹ \times h⁻¹ um, während die alginatimmobilisierten Zellen etwa die Hälfte umsetzten. Die mit THF versetzten Kontrollansätze, ohne Zellen oder mit alginatimmobilisierten Hefezellen, zeigten keine THF-Adsorption.

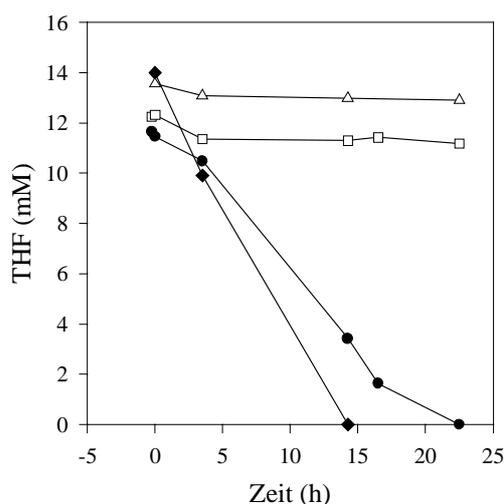


Abb. 18: Zelleinschlußimmobilisierung mit Alginat. Gezeigt ist die THF-Konzentration in Ansätzen mit immobilisierten Zellen (Stamm K1 ● und Hefezellen □), nicht immobilisierte Zellen von Stamm K1 ◆ und eine unbeimpfte Kontrolle Δ. Die eingesetzten Zellkonzentrationen waren 0,02 g ZFG/ml. Inkubiert wurde bei 80 Upm und 28 °C.

4. Diskussion

Organische Lösungsmittel, die in großen Mengen in industriellen Abwässern vorkommen können, sind oft toxisch für mikrobielle Zellen (Rhee et al., 1996), weil sie in der Zellmembran akkumulieren und so deren Integrität zerstören (Sikkema et al., 1995). Eine normale Zellfunktion wird dadurch unmöglich.

Der zyklische Ether THF ist ein solches Lösungsmittel, über dessen mikrobiologischen Abbau erst in wenigen Publikationen berichtet wurde (siehe Einleitung). Leider werden oft keine konkreten Angaben über den Umfang der THF-Abnahme bzw. dessen Abbau gemacht, so bei Parales et al. (1994), Poupin et al. (1998) und Steffan (1998). Es ist verwunderlich, warum diese Verbindung bisher so selten im Mittelpunkt der Forschung gestanden hat, da sie in großem Maße in der Industrie Verwendung findet, während der mikrobielle Abbau von heterozyklische Verbindungen auf Furanbasis, wie Furan, Dibenzofuran, Furfural, Furan-2-carboxylat und Furfurylalkohol, bereits relativ gut untersucht worden ist (Trudgil, 1984; Koenig und Andreesen, 1992; Boopathy, 1993; Bünz und Cook, 1993). Der Furan-Ring ist in biologisch relevanten Verbindungen selten, er kommt allerdings als Komponente im Lignin und im Methanofuran vor. Bei THF handelt es sich hingegen um ein anthropogenes Produkt.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein *Pseudonocardia* Stamm isoliert, der in der Lage ist THF in bisher noch nicht beschriebenen Konzentrationen zu tolerieren und als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen.

4.1 Wachstumsoptimierung einer THF abbauenden Mischkultur

Während Parales et al. (1994) Hefeextrakt dem verwendeten Basalmedium zugaben, um u.a. THF abbauende Bakterien anzureichern und zu isolieren, wurde in der vorliegenden Arbeit auf diese Zugabe bewußt verzichtet. Es wurde ein nährstoffarmes Mineralmedium zur Isolierung von THF abbauenden Bakterien eingesetzt. Bakterien, die schwer zu verstoffwechselnde Substrate verwerten können, kommen in Biosystemen an Standorten vor, an denen limitierte Nährstoffbedingungen zu finden sind. Gleichzeitig wird durch Wahl dieses Mediums verhindert, daß schnell wachsende Bakterien, die sehr wahrscheinlich nicht

das gewünschte Substrat verstoffwechseln können, schneller als die gesuchten Organismen wachsen und letztere so zusätzlich einem negativen Populationsdruck ausgesetzt werden.

Es zeigte sich, daß es von Vorteil war, die Bakterienkulturen in Erlenmeyerkolben mit Schikanen und nicht in Reagenzgläsern zu kultivieren. Es wird davon ausgegangen, daß der Lufteintrag ins Mineralmedium bei der Inkubation in Reagenzgläsern für die Anreicherung THF abbauender Bakterien suboptimal war. Nur eine gute Sauerstoffversorgung ermöglichte ein gutes Wachstum mit THF, deshalb empfiehlt sich die Anzucht in Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde auch deutlich, daß man Erlenmeyerkolben mit Schraubverschlüssen, die zusätzlich mit einer Teflon- und Silikoneinlage ausgestattet sind, einsetzen mußte, um einen abiotischen THF-Verlust durch verdampfen zu vermeiden.

Für die analytische Bestimmung des THF war es erforderlich, eine eigene gaschromatographische Methode zu erarbeiten. Die von Bock (1994) und Parales et al. (1994) publizierten Methoden konnten nicht übernommen werden, weil gleiches Material (Gaschromatographiesäulen, Gaschromatograph) nicht zur Verfügung stand.

Die in der vorliegenden Arbeit erarbeitete Analytik zur THF-Detektion ermöglichte eine genaue quantitative Bestimmung. Die ermittelten Standardabweichungen und Regressionskoeffizienten waren zufriedenstellend. Zu überdenken wäre allerdings, in Zukunft Kapillarsäulen mit größerer Filmdicke einzusetzen, wie dies auch Parales et al. (1994) taten. Eine höhere Filmdicke bewirkt, daß die Retentionszeit des Analyten erhöht wird. Dies ist für die Analyse leicht flüchtiger Verbindungen, wie THF, von Interesse. Durch die splitlose Messung konnte mehr Probenvolumen (0,5 bzw. 1,0 µl/Probenauftrag anstatt 0,1 µl/Probenauftrag) auf der Säule getrennt werden. Es zeigte sich, daß auch mit 1 µl Probenauftrag gut reproduzierbar gemessen werden konnte. Die bestimmte THF-Nachweisgrenze von 5 µg/ml (Kap. 3.1) lag im gleichen Bereich, wie sie von Bock (1994) beschrieben ist (3,6 µg/ml).

4.2 Isolierung und Charakterisierung einer THF abbauenden Reinkultur

Die Isolierung des für den THF-Abbau verantwortlichen Bakteriums Stamm K1 erwies sich als sehr schwierig. Bei mikroskopischer Betrachtung der THF adaptierten Mischkultur erkannte man Bakterien, die stäbchenförmiges bzw. nocardioformes Wachstum zeigten. Durch Verdünnungsausstriche, Einsatz verschiedener Flüssigmedien, Agartypen und

Zusätzen (z.B. einem Aminosäuregemisch, Zugabe anderer Cosubstrate, u.a.) ließen sich nur die stäbchenförmigen Bakterien isolieren, die allerdings THF nicht als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen konnten. Erschwerend war auch die Tatsache, daß alle vier Isolate, aus denen die THF abbauende Mischkultur bestand, mit weißer Koloniefarbe auf Mineralagar wuchsen, bzw. das Bakterium mit nocardioformen Wachstum mit Hilfe mikroskopischer Untersuchung auf den Agarplatten nicht zu finden war. Dies kann seine Ursache darin gehabt haben, daß bei Herstellung von Verdünnungsausstrichen (Kap. 2.5) entweder keine oder nur sehr wenige Zellen dieses Bakteriums auf die Platten aufgetragen wurde. Im zweiten Fall ist es zudem möglich, daß die schneller wachsenden Gram-negativen Bakterien das langsamer wachsende Gram-positive Bakterium überwuchsen.

Erst der Einsatz eines Arginin-Glyzerin-Agarmediums führte zur Isolierung einer Reinkultur, die THF als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen kann. Arginin-Glyzerin-Agar wurde von El-Nakeeb und Lechevalier (1963) zur Isolierung von Actinomyceten empfohlen. Jiang et al. (1991) beschrieben die erfolgreiche Isolierung eines *Actinobispora yunnanensis* Stamms unter Verwendung dieses Agars. Auch in der vorliegenden Arbeit führte der Einsatz dieses Agars zum Erfolg.

Wenn Stamm K1 auf Mineral-, Leitungswasser- und Arginin-Glyzerin-Agar wuchs, wurden gelbliche Verfärbungen festgestellt (Kap. 3.3). Solche Verfärbungen des Agars wurden auch von Akimov et al. (1989) für einen *Pseudoamycolata halophobica* Stamm (dieser wurde später von McVeigh et al., 1994, als *Pseudonocardia halophobica* reklassifiziert) beschrieben.

Die beiden eingesetzten Testsysteme API 20-E und BBL CRYSTAL (Kap. 2.5.2) eigneten sich nicht als Identifizierungssystem für Stamm K1. So zeigte das erstgenannte System, das für die Identifizierung von Enterobakterien entwickelt wurde, ein falsch negatives Ergebnis für die Verwertung von Glucose und Saccharose an. Obwohl das System für fakultativ anaerobe Bakterien konzipiert ist, war davon ausgegangen worden, daß bei "aerober" Inkubation, d.h. durch Verzicht der Übersichtung mit Paraffinöl, eine verlässliche Aussage über die Substratverwertung erhalten werden könnte. Dies war nicht der Fall und deshalb sollten die Ergebnisse in Tabelle 7 mit Vorsicht berücksichtigt werden bzw. ggf. in Wachstumsversuchen überprüft werden. Auch das BBL CRYSTAL-Auswertungssystem gab keine Auskunft über die taxonomische Zugehörigkeit des in dieser Arbeit isolierten Gram-positiven Bakteriums Stamm K1.

Der G+C-Gehalt des Stamms K1 wurde mit 71,3 mol-% bestimmt. Das Bakterium gehört somit zu den G+C-reichen Gram-positiven Prokaryoten. Im mikroskopischen Bild zeigte das THF abbauende Bakterium nocardioforme Zellmorphologie, die Säurefestigkeit, die durch die Ziehl-Neelsen-Färbung überprüft wurde, war jedoch negativ. Da in der Ordnung *Actinomycetales* nur die Gattungen *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium* und *Corynebacterium* Mykolsäuren besitzen (Kroppenstedt, 1979; Stackebrandt et al., 1997), die die Säurefestigkeit bedingen, konnte eine Zugehörigkeit in die Gattung *Nocardia* ausgeschlossen werden, da Stamm K1 nicht säurefest war. Die Fettsäureanalyse ergab, daß das isolierte THF abbauende Bakterium in die Familie der *Pseudonocardia* einzuordnen ist; eine genaue Gattungszuordnung war aber durch diese Analyse noch nicht möglich (R.M. Kroppenstedt, persönliche Mitteilung). Erst die Ergebnisse der 16S rDNA-Sequenz Analyse (Kap. 3.3.1) erlaubte eine eindeutige taxonomische Einordnung zur Gattung *Pseudonocardia* (Kap. 4.3).

In dieser Arbeit wurde ein THF abbauendes Bakterium der Ordnung *Actinomycetales* isoliert. Laut Godden et al. (1992), die den Abbau von Lignin durch Vertreter der Ordnung *Actinomycetales* untersuchten, sind diese Gram-positiven Bakterien sehr interessant, um Schadstoffdekontaminationen in der Umwelt zu erreichen. Die Autoren gehen davon aus, daß sich das Forschungsinteresse an diesen Bakterien intensivieren wird. Juteau et al. (1999), die eine Quantifizierung von Bakterien vornahmen, die Toluol in einem Kompostbiofilter abbauten, berichten, daß Vertreter der Gattungen *Pseudonocardia* und *Rhodococcus* den Hauptanteil der Toluol abbauenden Bakterien ausmachten und die isolierten Gram-negativen Bakterien eine untergeordnete Bedeutung im Toluolabbau hatten. Aus der Literatur (Bernhardt, 1991; Parales et al., 1994) sind Bakterien bekannt, die derselben Ordnung angehören und ebenfalls THF, jedoch in niedrigeren Konzentrationen als der isolierte Stamm K1, als Energiequelle nutzen können. Gram-positive Bakterien haben im Gegensatz zu Gram-negativen aufgrund ihrer Zellwandstruktur eine größere Resistenz gegenüber Lösungsmitteln. Jedoch gibt es auch Berichte von Gram-negativen Bakterien, die die C-O-C Etherbindungen spalten können (siehe z.B. Kilbane et al., 1982).

Viele Xenobiotika werden nur von Mischkulturen abgebaut (Møller et al., 1998). Bei der Isolierung von Reinkulturen aus Bakterienkonsortien können Probleme auftreten, was u.a. damit begründet wird, daß ein Bakterienkonsortium den beteiligten Mikroorganismen

unbestreitbare Vorteile bietet, wie z.B. die Bereitstellung von Vitaminen, der Verbrauch toxischer Stoffwechselprodukte, Oberfläche zur Adsorption, u.v.a.m.. Mischkulturen sind meist leistungs- und widerstandsfähiger gegenüber negativen Einwirkungen, da sie im Vergleich zu Reinkulturen ein stärker "pufferndes" System darstellen (Slater und Bull, 1978). Da aber in der vorliegenden Arbeit eine THF abbauende Reinkultur aus einer Mischkultur isoliert werden konnte, wird davon ausgegangen, daß keine toxischen oder bakteriziden Intermediate während des THF-Abbaus entstanden. Vielmehr wird die langwierige Prozedur zur Isolierung der Reinkultur mit einer manchmal anscheinend nötigen Adaptationszeit in einer Mischkultur erklärt, in der nur ein einziger Vertreter für den gewünschten Schadstoffabbau verantwortlich ist, wie es auch von Chakrabarty (1995) beschrieben wurde. So ist es ungewiß, ob der Einsatz des Arginin-Glyzerin-Agars in der vorliegenden Arbeit gleich zu Beginn zur Isolierung der THF abbauenden Reinkultur geführt hätte.

Die anfängliche Sorge, daß das THF abbauende Bakterium seine spezifische Abbaufähigkeit, wenn in einem Vollmedium inkubiert wird, verlieren könnte, war im nachhinein unbegründet. Die Inkubation des Stamms K1 in Mineralmedium mit Succinat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle, auf Nähr- und Arginin-Glyzerin-Agarplatten und Wachstum nach anschließender Überimpfung in Mineralmedium und THF als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle zeigte, daß das Bakterium seine THF-Abbaufähigkeit nicht leicht verliert. Zur Methodik läßt sich abschließend sagen, daß die Inkubation in Flüssigkultur der auf Agarplatten, die mit THF versetzt worden waren, vorzuziehen ist.

Das Potential, THF in Reinkultur abzubauen, scheint nicht weit verbreitet zu sein. Damit wird erklärt, daß weitere eigene Anstrengungen, THF abbauende Reinkulturen zu isolieren, erfolglos blieben.

4.3 16S rDNA-Analyse des Stamms K1

Die 16S rDNA-Analyse wird neben morphologischen, physiologischen und chemotaxonomischen Untersuchungen zur taxonomischen Einordnung von Bakterien eingesetzt. Die Sequenzierung der 16S rDNA hat sich im vergangenen Jahrzehnt als Methode zur phylogenetischen Einordnung etabliert (Vandamme et al., 1996). Dennoch

sind auch Unzulänglichkeiten für diese Methode bekannt und in der Literatur beschrieben (Ludwig und Schleifer, 1999).

Im Bereich des 16S rDNA-Gens gibt es sowohl Bereiche, die hochkonserviert als auch stark variabel sind (Woese, 1987). Dieses Wissen erlaubte die Auswahl der in dieser Arbeit verwendeten Primer. Aufgrund der erhaltenen Sequenz und den vorliegenden Sequenzen aus Datenbanken läßt sich ein Organismus taxonomisch einordnen.

Die erhaltene Sequenz des 16S rDNA-Gens von Stamm K1 ließ eine eindeutige Einordnung in die Familie *Pseudonocardiaceae* und in die Gattung *Pseudonocardia* zu (Tabelle 8 und Abb. 20). Weitere Gattungen, die zu dieser Familie gehören sind: *Actinopolyspora*, *Amycolatopsis*, *Kibdelosporangium*, *Saccharomonospora* und *Saccharopolyspora* (Warwick et al., 1994). Stackebrandt et al. (1997) vergrößern die Familie um die Gattungen *Actinosynnea*, *Kutzneria*, *Lentzea*, *Saccharothrix*, *Streptoallochteichus* und *Thermocrispum*. Die Familie *Pseudonocardiaceae* gehört zu den G+C-reichen Gram-positiven Bakterien der Ordnung *Actinomycetales*. Eine gute taxonomische Übersicht zu verwandten Familien, wie *Nocardiaceae*, *Streptomycetaceae*, *Mycobacteriaceae* u.a., basierend auf rRNA- bzw. rDNA-Analysen, geben Olsen et al. (1994) und Stackebrandt et al. (1997).

Gemeinsame Merkmale der Familie *Pseudonocardiaceae* sind obligat aerobes Wachstum, Vorhandensein von Katalase und die sog. Zellwand-IV-Zusammensetzung (Lechevalier und Lechevalier, 1970; Embley, 1992), bestehend aus *meso*-Diaminopimelinsäure, Arabinose und Galaktose (als Hauptzucker) und Abwesenheit von Mykolsäuren (Embley, 1992). Wo und in welchen Strukturen die Zucker in der bakteriellen Zelle lokalisiert sind ist noch unbekannt (Embley, 1992). Trotz der Gemeinsamkeiten sind große Unterschiede hinsichtlich Morphologie und Physiologie vorhanden, so gibt es autotrophe, thermophile und halophile Vertreter. Als Familie kommt ihnen große Bedeutung hinsichtlich der Synthese von bioaktiven Substanzen wie Erythromycin, Rifamycin und Vankomycin zu (Embley, 1992). Vertreter dieser Familie scheinen ubiquitär vorhanden zu sein. Mit Ausnahme der Sporen von *Saccharopolyspora rectivirgula* und *Saccharomonospora viridis* (Lacey, 1988) sind nur wenige opportunistisch wirkende pathogene Bakterien innerhalb der Familie *Pseudonocardiaceae* bekannt (Embley, 1992). Mitglieder der Gattung *Pseudonocardia* besitzen als Menachinon MK8 (H₄) (Embley et al., 1988; Korn-Wendisch und Kutzner, 1991) und unterscheiden sich durch den „budding“-Prozess als endständige Hyphenverlängerung. Es kommt dabei zur Segmentierung, die charakteristisch für die

Gattung *Pseudonocardia* ist und sie von allen weiteren Gattungen der Familie *Pseudonocardiaceae* unterscheidet (Henssen, 1989).

Das abgebildete Dendrogramm (Abb. 20) wurde auf Grundlage der nach Jukes und Cantor (1969) korrigierten evolutionären Distanzen erstellt (Kap. 2.5.3.8). Wurden die nach Kimura (1980) korrigierten evolutionären Distanzen zugrunde gelegt, ergab sich ein Dendrogramm des gleichen Aufbaus. Interessant ist die nahe Verwandtschaft von Stamm K1 und *Actinobispora yunnanensis* (97 %), das zwar in die Ordnung *Actinomycetales* ursprünglich eingeordnet worden war (Jiang et al., 1991) doch erst von Tamura et al. (1997) auf Grund der bekannten 16S rRNA Sequenz der Familie *Pseudonocardiaceae* zugeordnet wurde. Die Zugehörigkeit dieser Gattung zur Familie *Pseudonocardiaceae* wurde von Lee et al. (2000) bestätigt.

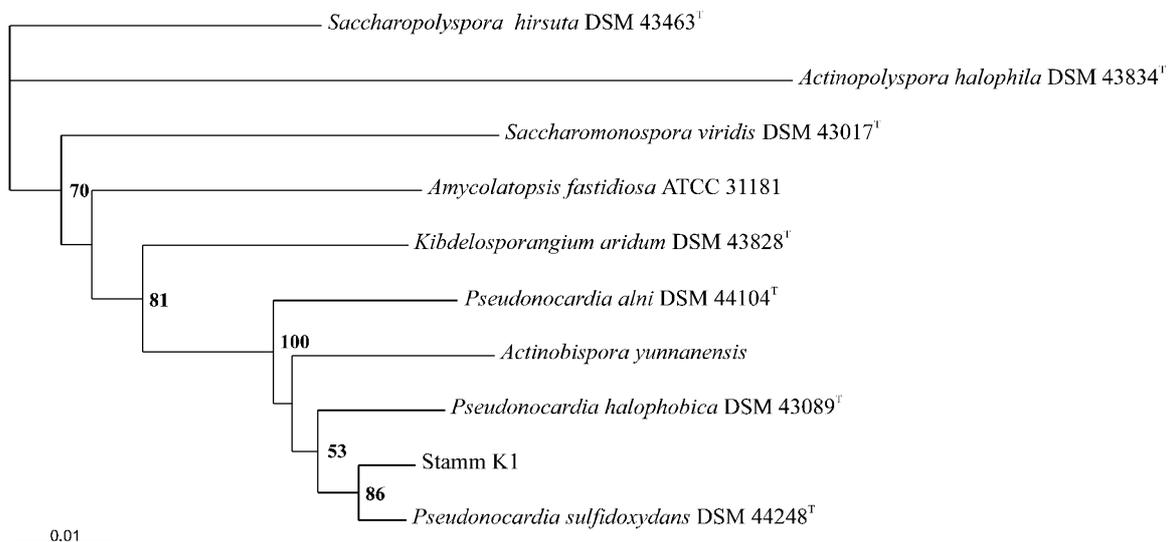


Abb. 20: Dendrogramm erstellt aufgrund durchgeführter 16S rDNA-Sequenzvergleiche mit dem PHYLIP-Programmpaket (Felsenstein, 1993) zur phylogenetischen Einordnung des THF abbauenden Bakteriums Stamm K1.

„Bootstrap“-Werte, errechnet aufgrund 200 Datensätze, größer 50 % wurden an den entsprechenden Knoten vermerkt. Der Balken repräsentiert die evolutionäre Distanz in Basenaustauschen pro Base.

Die größte Verwandtschaftsbeziehung besteht zwischen Stamm K1 und *Pseudonocardia sulfidoxydans*. Viele Gemeinsamkeiten, wie hohe 16S rDNA Sequenzhomologie, Menachinongehalt, Morphologie, Substratverwertung, siehe dazu auch Reichert et al. (1998), Metabolisierung von 10 mM THF (J.R. Andreesen, persönliche Mitteilung) lassen vermuten, daß es sich um dieselbe Art handeln könnte. Jedoch toleriert *Pseudonocardia sulfidoxydans* nur 3 % NaCl (Reichert et al., 1998), während das in dieser Arbeit isolierte Bakterium auch in Anwesenheit von 4 % (w/v) NaCl (Kap. 3.4.6) wächst. Ein weiterer

wachstumsphysiologischer Unterschied dieser beiden bakteriellen Isolate besteht in ihrer Fähigkeit in Gegenwart von Dimethylsulfid (0,5 mM) oder Dimethyldisulfid (1 mM) zu wachsen. Während *Pseudonocardia sulfidoxydans* beide Verbindungen verstoffwechseln kann (Reichert et al., 1998), kann der isolierte Stamm K1 nur in Gegenwart von Dimethylsulfid wachsen, während Dimethyldisulfid das Wachstum vollständig hemmt (Kohlweyer et al., 2000). Auch in der Fähigkeit, Xanthin, Hypoxanthin und Tyrosin abzubauen bestehen Unterschiede. *Pseudonocardia sulfidoxydans* kann alle drei genannten Verbindungen umsetzen (Reichert et al., 1998), während Stamm K1 nur Xanthin und Hypoxanthin nutzen kann. Letzten Aufschluß über die Verwandtschaftsbeziehung würde allerdings erst eine DNA-DNA-Hybridisierung geben.

4.4 Wachstum des Stamms K1 mit THF und anderen Substraten

Die in dieser Arbeit isolierte Reinkultur Stamm K1 wächst bis zu einer Konzentration von 70 mM THF, was eine deutliche Steigerung gegenüber den aus der Literatur bekannten maximal tolerierten Konzentrationen bedeutet. Es wird angenommen, daß Stamm K1 in Abwasserkläranlagen evtl. THF-Stoßbelastungen überleben kann. Das von Parales et al. (1994) beschriebene Isolat tolerierte maximal 4 mM THF. Der von Bernhardt (1991) isolierte *R. ruber* zeigte ab THF-Konzentrationen von 7,5 mM verringerte Wachstumsraten und THF-Konzentrationen > 45 mM wirkten bakterizid. Die von Stamm K1 maximal tolerierte THF-Konzentrationen von 70 mM stellt hohe Anforderungen an die Zelle; sie muß sich adaptieren, um nicht vom Lösungsmittel aufgelöst zu werden. Neben der wahrscheinlichen Kurzzeitantwort *cis* → *trans* Isomerisierung der ungesättigten Fettsäuren wird davon ausgegangen, daß sich auch das Verhältnis von ungesättigten zu gesättigten Fettsäuren, die Phospholipidzusammensetzung und die Konzentration der membraneingeschlossenen Proteine und Hopanoide verändert. Auch ein Efflux-System, so wie es für andere Bakterien in der Literatur (Isken und de Bont, 1996; Kieboom et al., 1998; Li et al., 1998) beschrieben ist, ist als Antwort der Zelle auf Lösungsmittelstreß wahrscheinlich. Denkbar ist auch, daß die myzelartige Zellorganisation des Stamms K1 Vorteile bietet, wenn die Zellen mit zellauflösenden Substraten in Kontakt kommen. Es könnte zu einem Lösungsmittelkonzentrationsgefälle in diesen Zellaggregaten kommen, wobei die höchste Konzentration außen und die geringste innen vorliegt.

Der in der vorliegenden Arbeit isolierte *Pseudonocardia* Stamm baute THF bis unter die gaschromatographische Nachweisgrenze ab (Kap. 3.1.1), wobei keine potentiellen Intermediate gaschromatographisch detektiert wurden. Letzteres wurde auch von Bernhardt (1991) und Bock (1994) für den von ihnen untersuchten *R. ruber* berichtet. Die geringe Differenz von 17,5 mg TOC/l, die sich vom unbeimpften zum beimpften Mineralmedium ergab (Kap. 3.4.2), wird damit erklärt, daß Zelltrümmer oder andere Bestandteile doch den Filter passierten und so in das frische Mineralmedium gelangten. Es wurde beobachtet, daß Stamm K1, wenn unter Standardbedingungen inkubiert (Kap. 2.2), d.h. wenn mit einem Füllvolumen von 18 % gearbeitet wurde, THF in Konzentrationen > 20 mM nicht unter die gaschromatographische Nachweisgrenze abbaute (Abb. 6). Ein Versuch, in dem höhere THF-Konzentrationen eingesetzt wurden, aber der Kolben nur mit ca. 3 Vol-% beschickt wurde, zeigte, daß hier das THF bis unterhalb der Nachweisgrenze abgebaut wurde (Kap. 3.4.4).

Die THF abbauende Reinkultur wuchs mit größter Wachstumsrate bei Inkubationstemperaturen von ca. 30 °C und ist somit als mesophil einzuordnen. Die maximal tolerierte Inkubationstemperatur ist 36 °C, die minimale 11 °C. Das Isolat wuchs in neutralem bis leicht saurem (pH-Wert = 5,5) unwesentlich besser als in basischem Mineralmedium (Kap. 3.4.1). Daß Streptomyceten während des Wachstums Säuren ausscheiden, ist aus der Literatur bekannt (Korn-Wendisch und Kutzner, 1991). Ein Absinken des pH-Werts im 10 bzw. 25 mM Kaliumphosphat gepufferten Mineralmedium (Kap. 3.4.1) während des Wachstums des Stamms K1 in Batch-Kultur wirkte sich nicht negativ auf dessen Wachstum aus.

Das getestete Substratspektrum ist in Tabelle 9 gezeigt. Während Stamm K1 einige O-heterozyklische Verbindungen verstoffwechselt (Abb. D, Anhang) werden Tetrahydrothiophen und Tetrahydropyran nicht als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt (Kap. 3.4.6). Diethylether wird hingegen verstoffwechselt. Dies ist interessant, da erst wenige Literaturstellen von einem mikrobiellen Abbau dieses Ethers berichten, obwohl auch dieser Ether in großen Mengen Verwendung in der Industrie findet. So beschreiben Hardison et al. (1997) einen *Graphium* sp., einen filamentös wachsenden Pilz, und Parales et al. (1994) einen Actinomyceten, die dieses Substrat abbauen. Stamm K1 konnte die anderen untersuchten Ether nicht als Substrat nutzen (Tabelle 9). Unter diesen getesteten Ethern war auch Morpholin, das ebenfalls eine für die Industrie interessante Chemikalie ist

(Poupin et al., 1998), die, wie THF, als biologisch schwer abbaubar eingestuft wurde (Swain et al., 1991). Die Tatsache, daß Stamm K1 die ihm angebotenen langkettigen Polyethylenglykole (PEG) als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen konnte ist interessant, da auch PEG in großem Maßstab in den unterschiedlichsten Produkten der chemischen Industrie eingesetzt wird (White et al., 1996). Stamm K1 kann auch Toluol als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen (Tabelle 9), was gaschromatographisch verifiziert wurde. Toluol ist für die meisten Mikroorganismen in Konzentrationen $\geq 0,1$ % (v/v) (0,9 mM) toxisch (Inoue und Horikoshi, 1989; Inoue et al., 1991), sein $\log P_{o/w}$ ist 2,73 (Lide, 1995). Der Parameter $\log P_{o/w}$ wird genutzt, um die Polarität eines Lösungsmittels zu quantifizieren. P ist dabei der Verteilungskoeffizient des untersuchten Lösungsmittels in einer äquimolaren Mischung aus n-Octanol und Wasser (Inoue und Horikoshi, 1989; Aono und Kobayashi, 1997). Sehr zelltoxische Lösungsmittel, wie Hexanol, Toluol, Octanol (Weber und de Bont, 1996; Ramos et al., 1997), haben einen $\log P_{o/w}$ zwischen 1,5 und 3 (Sikkema et al., 1995; Ramos et al., 1997). Der $\log P_{o/w}$ von THF ist 0,82 (Lide, 1995). Juteau et al. (1999) gehen davon aus, daß sie als erste von der Existenz eines Toluol abbauenden Bakteriums der Gattung *Pseudonocardia* berichten. Wenn dies der Fall ist, dann ist der in der vorliegenden Arbeit isolierte Stamm K1 erst das zweite bekannte Isolat der Gattung *Pseudonocardia*, das Toluol verstoffwechseln kann.

Stamm K1 wurde auf dessen Fähigkeit überprüft, Produktionsabwässer aus einem Furanharz verarbeitenden Betrieb zu verstoffwechseln. Im Wachstumsversuch zeigte sich, daß sie die im Abwasser befindlichen Substrate als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen konnte, bzw. deren Anwesenheit tolerierte. In diesen Abwässern kommen neben THF und Tetrahydrofurfurylalkohol auch Phenol, Formaldehyd und Furfurylalkohol vor, die, jedes für sich, bakterielles Wachstum fördern oder hemmen können.

Im Wachstumsversuch zeigte sich, daß Stamm K1 kein Phenol ($P_{o/w} = 1,50$; Lide, 1995) als Substrat nutzen kann. Eine Kontrolle zeigte, daß eine Konzentration von 5 mM Phenol zumindest eine bakteriostatische Wirkung hat. Interessant wäre nun zu klären, warum Stamm K1 in der Lage war mit Misch-Rohabwasser, das auch Phenol enthält, des o.g. Betriebs zu wachsen. Leider gab es keine Informationen des Betriebs, die über die im Abwasser vorhandenen Chemikalien und deren durchschnittlichen Konzentrationen Auskunft geben. In Verbindung mit dem Wissen, daß die THF-Abbaufähigkeit anscheinend sehr stabil im Genom weitervererbt wird, und auch die Versuche zur Immobilisierung (Kap.

3.6) vielversprechend sind, ist es wahrscheinlich, daß das in dieser Arbeit isolierte Bakterium zur Abwasserreinigung eingesetzt werden kann.

Ein auffälliger Unterschied der Substratverwertung zwischen dem genannten *R. ruber* Stamm 219 und dem in dieser Arbeit isolierten *Pseudonocardia* sp. ist, daß letzterer 3-Hydroxy-THF als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen kann. Theoretisch ist es auch denkbar, daß der THF-Abbau über 3-Hydroxy-THF stattfindet (Bernhardt, 1991; Bock, 1994). Sander (1992) untersuchte den Abbau von THF-Derivaten durch *Rhodococcus* sp. und reinigte teilweise eine 3-Hydroxy-THF-dehydrogenase und Baeyer-Villiger-Monooxygenase. Der von Trudgil (1984) postulierte Abbauweg wurde so bestätigt (Sander, 1992).

Das Wachstum von Stamm K1 in Flüssigkultur, dem Succinatsemialdehyd, einem von Bernhardt und Diekmann (1991) postulierten Intermediat im THF-Abbau, zugegeben war, setzte erst nach langer lag-Phase ein. Man könnte annehmen, daß der Transportweg des Succinatsemialdehyds vom Medium ins Zellinnere schwierig und somit eine gewisse Adaptationszeit notwendig war. Da aber auch auf Succinatsemialdehyd vorinkubierte Zellen, wenn sie in frisches Mineralmedium mit diesem Substrat überimpft wurden, eine gleich lange lag-Phase zeigten, wird vermutet, daß die lag-Phase mit der Instabilität des Succinatsemialdehyds zusammenhing und vielleicht ein Zerfallsprodukt das Wachstum ermöglichte. Dieser Versuch gibt daher keine Auskunft darüber, ob Stamm K1 das postulierte Intermediat als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen kann.

Bock (1994) geht davon aus, daß die für den THF-Abbau notwendigen Enzyme des von ihr bearbeiteten *R. ruber* Stamms plasmidcodiert sind. Für einen biotechnologischen *in situ* Einsatz ist die genetische Stabilität bezüglich des Etherabbaus der beteiligten Mikroorganismen von großer Bedeutung. Bock (1994) beschreibt weiter, daß die von ihr bearbeiteten Bakterien nur 50 % der sonst beobachteten THF-Abbauraten besaßen, wenn die Zellen während 25 Passagen auf einem Vollmedium vorinkubiert wurden.

Stamm K1 hatte auch nach ca. 170 Generationen in Mineralmedium mit Succinat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle seine Fähigkeit, THF abzubauen, nicht verloren. Dieser Versuch läßt vermuten, daß die Enzyme, die den THF-Abbau katalysieren, nicht plasmidcodiert in Stamm K1 vorliegen. Auch Inoue et al. (1991) berichteten, daß die

Lösungsmitteltoleranz gegenüber Toluol in dem untersuchten *Pseudomonas putida* Stamm IH-2000 nicht plasmidcodiert war.

Das Potential THF abzubauen scheint sehr stabil im Stamm K1 weitervererbt zu werden, was für einen möglichen Einsatz zum Schadstoffabbau wichtig ist. Es konnte gezeigt werden, daß sowohl Succinat als auch THF adaptierte Zellen des Stamms K1 in Mineralmedium, dem THF zugegeben war, gleiches Wachstumsverhalten zeigten und THF mit gleicher Rate abbauten (Abb. 7). Interessant wäre nun zu untersuchen, welche Vorgänge auf der Zell- und molekularen Ebene ablaufen, wenn THF 'entwöhnte' Zellen wieder ein Lösungsmittel als Substrat nutzen. Angenommen wird, daß neben der Kurzzeitantwort *cis* → *trans* Isomerisierung der Fettsäuren, auch eine Langzeitantwort stattfindet. Weiterführende Untersuchungen könnten klären, ob und wenn ja welche Efflux-Systeme exprimiert werden. Interessant wäre auch zu klären, ob die Transportsysteme nur in Gegenwart des Lösungsmittels exprimiert werden, so wie dies in der Literatur beschrieben wurde (Kieboom et al., 1998; Li et al., 1998). Weitergehend sollte geklärt werden, ob auch andere Substanzen, wie z.B. Antibiotika (Isken et al., 1997), über den Transportweg ausgeschleust werden.

Während Sterole in eukaryotischen Membranen deren Festigkeit bestimmen, übernehmen Hopanoide diese Aufgabe in prokaryotischen Cytoplasmamembranen (Sahm et al., 1993; Madigan et al., 1997). Hopanoide sind in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien weit verbreitet, es handelt sich um Triterpenoide, die als Untergruppe zu den Isoprenoiden gezählt werden (Poralla, 1998). Die Hopanoid-Detektion und -Identifikation ist problematisch, weil es sehr viele verschiedene Derivate gibt (Sahm et al., 1993). Das Schlüsselenzym der Hopanoid-Biosynthese ist die Squalen Hopan Cyclase (SHC), sie katalysiert die Zyklisierung des linearen Triterpenoids Squalen zu Hopan und Diplopterol (Perzl et al., 1997). Flesch und Rohmer (1987) zeigten in ihren Versuchen, in denen sie mit verschiedenen SHC-Inhibitoren arbeiteten, daß Hopanoide für diejenigen Bakterien, die sie synthetisieren, essentiell sind.

Die Einflüsse von Wachstumstemperatur, pH-Wert, Sauerstoff und Ethanol auf die Synthese und den Gehalt von Hopanoiden in Bakterien ist in der Literatur beschrieben. So berichten Poralla et al. (1984), daß der Hopanoidgehalt in dem von ihnen untersuchten *Bacillus acidocaldarius* bei 65 °C siebenmal höher war als bei 60 °C und daß die

gefundenen Hopanoide 16 % der Gesamtlipidkonzentration ausmachten. Weitere Untersuchungen dieser Autoren zeigten, daß der Hopanoidgehalt desselben Bakteriums unter sauren Inkubationsbedingungen (pH-Wert = 3) am höchsten war. Die Autoren spekulieren, daß Hopanoide in diesem Fall auch für die Protonendurchlässigkeit der Membran verantwortlich sind und diese unter aciden Bedingungen herabsetzt. Berry et al. (1991) gehen davon aus, daß die von ihnen gefundenen großen Mengen des Hopanoids Bacteriohopanetetrol in einem *Frankia* sp. die Vesikelwände sauerstoffundurchlässig macht und so die Nitrogenase geschützt wird. Bringer et al. (1985) fanden heraus, daß hohe Ethanolkonzentrationen einen hohen Hopanoidgehalt in der Lipidfraktion des untersuchten *Zymomonas mobilis* Stamm bedingten. Die Autoren gehen davon aus, daß Hopanoide die Cytoplasmamembran vor der Auflösung durch den Alkohol schützen.

Um zu klären, ob der in dieser Arbeit im Mittelpunkt stehende Stamm K1 in Abhängigkeit der Substrate THF, Ethanol und Succinat Hopanoide synthetisiert (Kap. 3.4.8), wurden die isolierten Gesamtlipide aus gefriergetrocknetem Zellmaterial einer gaschromatographischen Analyse unterzogen, die auch eine quantitative Aussage erlaubt. Des weiteren wurde Monolacetal durch massenspektrometrische Untersuchungen nachgewiesen (K. Poralla, persönliche Mitteilung). Charakteristisch für diese Verbindung ist ein Massenpeak bei 498 und zwei Fragmente bei 369 und 191. Bei Monolacetal handelt es sich um ein Derivat, das aus verschiedenen physiologisch relevanten elongierten Hopanoiden besteht. Es wird bei der Laboranalyse erzeugt. Ein positiver Hopanoidnachweis zeichnet sich durch Detektion von Hopan und Monolacetal in derselben Probe aus. Bei Zweifeln sollte man das Probenmaterial mittels GC/MS tiefergehend untersuchen. Quantitative Nachweise können erst ab einer Lipidkonzentration von ≥ 10 mg/Probe sicher geführt werden. Bei Hopan und Squalen handelt es sich um Hopanoidvorstufen (K. Poralla, persönliche Mitteilung).

In den Proben des Stamms K1, die mit THF, Ethanol oder Succinat angezogen worden waren, wurden Hopanoide detektiert. Die Hopanoidsynthese fand unabhängig von angebotenen Substrat in Stamm K1 statt. Die Lipidausbeute war > 10 mg und auch Hopan- und Squalenpeaks wurden nachgewiesen. Die gefundenen Hopanoidkonzentrationen lagen jedoch mit 0,3 % (THF), 0,5 % (Succinat) und 0,2 % (Ethanol) unterhalb des Bereichs, der 2 bis 5 % der Gesamtlipide ausmachen sollte (K. Poralla, persönliche Mitteilung). Aufgrund der geringen Ausbeute war eine verlässliche Quantifizierung nicht möglich. Die Differenzen der in den Proben detektierten Hopanoidkonzentrationen sind nicht signifikant, d.h. man kann im vorliegenden Fall keine Aussage darüber machen, inwieweit die angebotene

Kohlenstoffquelle die Hopanoidsynthese beeinflusste. Um dies genauer zu beleuchten, müßten weitergehende Versuche durchgeführt werden, in denen die induzierenden Faktoren (wie z.B. höhere Substratkonzentrationen bzw. höhere Inkubationstemperatur) variiert werden.

Es ist davon auszugehen, daß die Hopanoidsynthese essentiell für Stamm K1 ist. Dies ist auch in der Literatur für andere Bakterien beschrieben. So publizierten Flesch und Rohmer (1987), daß die Hopanoidsynthese für Hopanoid produzierende Bakterien essentiell ist und zwar ungeachtet vom angebotenen Substrat.

Das Leben in salzhaltiger Umgebung erfordert Anpassungen der Bakterienzelle. Stamm K1 ist in der Lage in Gegenwart von 3 % Kalium- und 4 % Natriumchlorid zu wachsen. Meerwasser enthält in etwa 3 % Natriumchlorid, was einer Wasseraktivität a_w 0,98 entspricht (Madigan et al., 1997). Die meisten Bakterien benötigen zum Wachstum Wasseraktivitäten von $> 0,98$ (Schlegel, 1992), d.h. Stamm K1 ist halotoleranter als viele andere Bakterien.

4.5 Einleitende Untersuchungen zur Charakterisierung des initialen Enzyms im THF-Abbauweg

Enzymatische Untersuchungen zur Aufklärung des THF-Abbauweg wurden außerhalb unserer Arbeitsgruppe bisher nur noch in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Diekmann (Universität Hannover) unternommen. Diese Arbeitsgruppe arbeitet mit einem *R. ruber* Stamm, der von Bernhardt (1991) isoliert und von Bock (1994) weiter charakterisiert wurde. Bock (1994) geht davon aus, daß die Enzyme, die für den THF-Abbau in dem bearbeiteten *R. ruber* Stamm 219 codieren, auf einem Plasmid lokalisiert sind. Spallek (1998) beschreibt eine Drei-Komponenten-Monooxygenase, die den einleitenden Schritt im THF-Abbau katalysiert. Die gemessenen spezifischen Enzymaktivitäten sind jedoch sehr niedrig.

Für die enzymatischen Arbeiten wurden Zellgroßanzuchten durchgeführt, um ausreichend Zellmaterial zur Verfügung zu haben. Im Gegensatz zu Arbeiten mit *R. ruber* (Spallek, 1998) war es in der vorliegenden Arbeit unmöglich, im Rohextrakt von Stamm K1 eine THF abhängige Enzymaktivität zu detektieren. Es war deshalb wichtig herauszufinden, wann der Verlust der Enzymaktivität einsetzte. Durch gaschromatographische Messungen

wurde zunächst überprüft, ob noch eine Umsetzung von THF in ruhenden oder permeabilisierten Zellen stattfindet. Die Versuche mit permeabilisierten Zellen zeigten, daß diese THF umsetzen konnten. Zellen, die mit Toluol permeabilisiert wurden, wiesen niedrigere THF-Umsatzraten als die entsprechenden ruhenden Zellen auf. Dies könnte einerseits damit zusammenhängen, daß Stamm K1 auch Toluol als Substrat umsetzen kann, was gaschromatographisch nachgewiesen wurde, und so THF und Toluol in den permeabilisierten Zellen konkurrierende Substrate waren. Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, daß Toluol das Enzymsystem schädigte und so der THF-Umsatz gehemmt wurde. Wurden die Zellen hingegen mit Triton permeabilisiert, waren die Umsatzraten der permeabilisierten Zellen etwa anderthalb Mal so hoch wie die der ruhenden Zellen. In diesem Fall scheinen Permeabilisierungsreagenz und THF nicht zu konkurrieren. Es wird erwartet, daß permeabilisierte Zellen eine höhere Substratumsatzrate haben, da der Substrattransport über die Cytoplasmamembran entfällt und das Enzymsystem frei zugänglich ist. Da mit ruhenden und mit permeabilisierten Zellen noch eine THF-Abnahme nachgewiesen werden konnte (Kap. 3.5.3), könnte die irreversible Schädigung der Enzymaktivität bei der Herstellung des Zellextrakts aufgetreten sein.

Des weiteren wurden Messungen zur Bestimmung von THF abhängiger Aktivität in Rohextrakt an der Sauerstoffelektrode (Kap. 3.5.2) und am Photometer durchgeführt. In den photometrischen Messungen wurde die Oxidation von reduziertem NADH oder NADPH, welche bei vielen Mono- und Dioxygenasen als Elektronendonatoren fungieren, verfolgt. Beide Ansätze eigneten sich wegen einer konkurrierenden THF unabhängigen NADH-Oxidase-Reaktion im Rohextrakt nicht als Enzymtest. Aufgrund dieses Umstands wurden gaschromatographische Analysen durchgeführt, um auch bei niedrigen THF-Umsätzen eine THF abhängige Enzymaktivität im Rohextrakt detektieren zu können. Auch mit dieser Methode und bei Verwendung eines NADH-regenerierenden Systems (Kap. 2.6.4.2) wurde keine THF-Abnahme im Rohextrakt detektiert. Bedingt durch die NADH-Oxidaseaktivität hätte der, für die mögliche Monooxygenasereaktion essentielle Cofaktor, nicht mehr ausreichend vorhanden sein können.

Auch im Überstand von wachsenden Zellen wurde keine THF abhängige enzymatische Aktivität detektiert. Aus der Literatur (z.B. Godden et al., 1992; Mercer et al., 1996) ist bekannt, daß viele Vertreter der Actinomyceten extrazelluläre Enzyme ausscheiden. Ferner berichten Ball et al. (1990) und Wang et al. (1990), daß extrazelluläre Peroxidaseaktivitäten nicht nur bei Lignin abbauenden Actinomyceten gefunden werden. Aufgrund der Ergebnisse

des durchgeführten Experiments muß davon ausgegangen werden, daß es sich bei den Enzymen, die am THF-Abbau im isolierten *Pseudonocardia* sp. beteiligt sind, nicht um Exoenzyme handelt. Da auch die Untersuchungen auf eine evtl. vorhandene Dehydrogenase als einleitendes Enzym negativ ausfielen, wird angenommen, daß eine initiale Dehydrogenase-Reaktion im THF-Abbau auszuschließen ist.

Problematisch war somit, daß im Rohextrakt keine THF abhängige Enzymaktivität nachgewiesen werden konnte. Mögliche Erklärungen könnten sein, daß folgende Faktoren zur Desaktivierung beitragen: Proteolytische Vorgänge, Sauerstofflabilität, Abtrennung von für die Katalyse essentiellen Cofaktoren oder Metallionen, Verlust der katalytisch aktiven Anordnung bei Desintegration der Bakterienzellen. So berichtet z.B. Xun (1996) den Verlust der Enzymaktivität durch die Trennung der beiden katalytisch aktiven Proteinkomponenten der Chlorphenol-4-Monooxygenase aus einem *Burkholderia cepacia* Stamm. Nicht verhindert wurde der Verlust THF abhängiger Enzymaktivität im zellfreien Extrakt durch Zugabe von Proteinaseinhibitoren, arbeiten bei niedrigen Temperaturen (4 °C, Raumtemperatur, max. 28-30 °C), unter aeroben oder anaeroben Bedingungen, Zugabe von Metall- und Cofaktoren, aeroben oder anaeroben Zellaufschlüssen ohne und mit weiteren Agenzien.

Cytochrom P-450 Monooxygenasen sind eine besonders wichtige Klasse von Enzymen, da sie oft den einleitenden Schritt bei Abbauvorgängen schwer abzubauenen Substanzen katalysieren. So fanden Poupin et al. (1998) Hinweise auf eine Cytochrom P-450 Monooxygenase aus einem *Mycobacterium* Stamm, die den einleitenden Hydroxylierungsschritt im Morpholin-Abbau katalysiert. Durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Nachweis von Cytochrom P-450 (Kap. 3.5.4) mittels Wachstumsversuche mit dem spezifischen Cytochrom P-450-Inhibitor Metyrapon und Kohlenmonoxid-Differenzspektren, kann ausgeschlossen werden, daß es sich bei der gesuchten, den THF-Abbau einleitenden Monooxygenase aus dem isolierten *Pseudonocardia* sp., um ein Cytochrom P-450 haltiges System handelt.

Es gibt kupferhaltige Enzyme, die verschiedene Ether umsetzen können, so zum Beispiel einige Ammonium- und Methan-Monooxygenasen (Prior und Dalton, 1985; Zahn und DiSpirito, 1996). Die Ammonium-Monooxygenase aus einem *Nitrosomonas europaea* Stamm kann auch Dimethylether umsetzen (Hyman et al., 1994). Das Enzym erlitt jedoch bei der Aufreinigung hohe Aktivitätsverluste (Hooper et al., 1997). Ensign et al. (1993)

gehen davon aus, daß der Aktivitätsverlust durch den Verlust des Kupfers im aktiven Zentrum bedingt ist. In der vorliegenden Arbeit konnte durch Wachstumsversuche mit dem Kupferchelator Bathocuproin ausgeschlossen werden, daß ein kupferhaltiges Enzym im THF-Abbau durch *Pseudonocardia* sp. involviert ist.

Experimente der vorliegenden Arbeit zeigten, daß es sich bei dem einleitenden Enzym in THF-Abbau durch Stamm K1 um keine Dehydrogenase oder Cytochrom P-450 abhängige Monooxygenase handelt. Des weiteren zeigten Wachstumsversuche mit dem Kupferchelator Bathocuproin, daß die Aktivität des gesuchten Enzyms nicht kupferabhängig ist.

4.6 Nachweis einer in mit THF angezogenen Zellen spezifisch vorkommenden NADH-Cytochrom-c-Oxidoreduktaseaktivität

Generell kann angenommen werden, daß es sich bei dem einleitenden Enzym im THF-Abbauweg um eine Monooxygenase handeln muß, um zu einer Labilisierung der Etherbindung zu kommen. Dieses ist auch von Bernhardt und Diekmann (1991) postuliert und von Spallek (1998) bestätigt worden. Monooxygenasen können aus einer oder mehreren Proteinkomponenten bestehen (Hur et al., 1997; Wieser et al., 1997). Zu den Mehr-Komponenten-Monooxygenasen gehören z.B. die Methan-Monooxygenase aus *Methylococcus capsulatus* (Bath) (Colby et al., 1977), die Alken-Monooxygenasen aus einem *Mycobacterium* Stamm (Weber et al., 1992) und aus einem *Nocardia corallina* Stamm (Miura und Dalton, 1995) und die Toluol-4-Monooxygenase, die aus einem *Pseudomonas mendocina* Stamm isoliert wurde (Whited und Gibson, 1991). Als Cofaktoren kommen u.a. NAD(P)H, Flavine und Übergangsmetalle, wie Eisen und Kupfer, vor (Harayama et al., 1992).

Die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigten, daß THF spezifische Enzymaktivität in Rohextrakt, der entweder aerob oder anaerob aufgeschlossen worden war, nicht nachgewiesen werden konnte (Kap. 3.5.3.2). Eine hohe substratunabhängige NADH-Oxidaseaktivität ließ die Bestimmung einer möglichen THF abhängigen Enzymaktivität nicht zu. Es sollte überprüft werden, ob eine THF abhängige enzymatische Aktivität in den Fraktionen nachgewiesen werden konnte, die keine NADH-Oxidaseaktivität enthielten. Rohextrakt wurde aerob und anaerob an einem Anionenaustauscher chromatographiert und die Fraktionen, die keine THF unabhängige NADH-Oxidaseaktivität enthielten, in Komplementationstests auf THF abhängige Aktivität untersucht. In der

Literatur, z.B. Hartmans et al. (1991), Uetz et al. (1992), Xun (1996) und Becker et al. (1997), findet man Hinweise darauf, daß mittels solcher Komplementationen eine nach der Chromatographie von Rohextrakten verlorene Enzymaktivität rekonstituiert werden kann. Dies war jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht der Fall.

White et al. (1996) nennen mögliche Gründe für eine oft beobachtete Instabilität und gehen auch auf die Schwierigkeit der Reinigung und Charakterisierung etherspaltender Enzyme ein, bei denen es sich auch um Multi-Komponenten-Enzysysteme handeln kann. Da diese Monooxygenasen eine Oxygenase- und eine Reduktasekomponente besitzen, wurde versucht eine THF spezifische NADH abhängige Reduktaseaktivität in Fraktionen zu finden, wenn der Rohextrakt aufgetrennt worden war. Vergleiche zeigten, daß THF angezogene Zellen eine zusätzliche NADH abhängige Cytochrom-c-Reduktaseaktivität besitzen, die im KCl-Gradienten im Bereich von ca. 0,5 bis 0,8 M eluierte. In weiterführenden Arbeiten wurde diese Cytochrom-c-Reduktaseaktivität angereichert und das Protein ansequenziert (B. Thiemer, persönliche Mitteilung). Die erhaltene Sequenz besitzt große Homologie zu der Reduktasekomponente einer Phenolhydroxylase, die von Powlowski und Shingler (1990) publiziert wurde (T. Schröder, persönliche Mitteilung). Weitere Untersuchungen werden klären, ob die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene NADH abhängige Cytochrom-c-Reduktaseaktivität eine Komponente des gesuchten Enzyms des THF-Abbauwegs darstellt.

4.7 Immobilisierungsversuche mit Stamm K1

4.7.1 Charakterisierung der Zelloberfläche

Die Messung des Zetapotentials ist eine bewährte Methode, um die Nettoladung der Zelloberfläche eines Bakteriums zu bestimmen. Jedoch gibt das Zetapotential keine Auskunft über die Art und die Dichte der vorhandenen Ladungsträger. Entgegengesetzt geladene Zelloberflächengruppen können sich ausgleichen, so können z.B. negativ geladene Phosphatgruppen von positiv geladenen Aminogruppen ausgeglichen werden (Fletcher und Marshall, 1982). Es werden ionisierte Gruppen bis 3 nm unterhalb der Zelloberfläche erfaßt (James, 1991). Neben ionisierbaren Gruppen haben auch Filamente, Fimbrien und Kapseln Einfluß auf das Zetapotential (Krekeler, 1990).

Beeinflusst wird die Messung durch die sog. „Doppelschicht“, die sich um einen Partikel, in diesem Fall die Bakterienzelle, aufbaut, wenn er sich in einer ionischen Lösung befindet, an die ein elektrisches Feld angelegt wird (James, 1991; Malvern Instruments, 1996). Die Doppelschicht schirmt die Partikeloberfläche ab und wird unterteilt in eine innere und eine diffuse Region, in denen unterschiedliche ionische Bedingungen herrschen. In der inneren Schicht sind die (Gegen-) Ionen durch Van-der-Waalsche-Wechselwirkungen und/oder elektrostatischer Kräfte fest an den Partikel gebunden, während die Ionen in der diffusen Schicht frei beweglich sind (Stern-Modell). Je höher die Ionenstärke des Mediums ist, um so kompakter ist die diffuse Schicht und um so größer ist der Abschirmeffekt der Oberflächenladungen. Die Grenze zwischen diffuser Doppelschicht und dem umgebenden Medium wird „Plane of Shear“ (oder „Shear Plane“) genannt. Das Potential an dieser Grenzfläche ist per Definition das Zetapotential (Malvern Instruments, 1996). Hier werden die Ionen des umgebenden Mediums nicht mehr durch Einwirkung der Partikeloberflächenladung im elektrischen Feld mitgerissen.

Der untersuchte Stamm K1 zeigte unabhängig vom Zellalter und den beiden untersuchten Wachstumssubstraten THF und Succinat im physiologisch relevanten pH-Bereich ein Zetapotential von -36 mV und gehört somit zu den Bakterien, bei denen nur saure ionisierbare Oberflächengruppen das Zetapotential bestimmen. In der Literatur werden aber auch Bakterien beschrieben, die sich amphoter verhalten, wie z.B. *B. cereus*, die im niedrigen pH-Bereich ein positives Zetapotential besitzen (Krekeler, 1990). Daß das Zetapotential vom untersuchten Bakterium Stamm K1 im pH-Bereich < 3 abnimmt, d.h. positiver wird, hängt mit der pH-Wert bedingten abnehmenden Gesamtnegativladung zusammen.

Während das Zetapotential Auskunft über die Nettoladung einer Zelloberfläche gibt, ermöglicht die Methode der Mikrotitration die verfügbaren Ladungen der Zelloberfläche zu bestimmen. Die Methode der Mikrotitration wird sowohl für die Charakterisierung der Oberflächenladungen von unbelebtem Material (Elimelech und O'Melia, 1990) als auch von Bakterien (Noda und Kanemasa, 1984; James, 1991) eingesetzt.

Stamm K1 besaß wenige titrierbare Oberflächenladungen, wobei die ionisierbaren Oberflächengruppen vom Substrat und Zellalter abhängig waren (Kap. 3.6.1). Daß Substrat und Zellalter Einfluß auf die Zelloberfläche haben, ist aus der Literatur bekannt (Neufeld et al., 1980; Hazen et al., 1986; van Loosdrecht et al., 1987). Stamm K1 hat eine negative Zelloberflächenladung; die negativ geladenen titrierbaren Oberflächengruppen überwogen.

Auch in der Literatur wird beschrieben, daß allgemein im physiologischen pH-Bereich bakterielle Oberflächen negativ geladen sind (Archibald et al., 1993).

In der vorliegenden Arbeit war klar erkennbar, daß THF einen größeren Einfluß auf die titrierbaren Zelloberflächengruppen besitzt als Succinat. Generell läßt sich sagen, daß das hier untersuchte Bakterium wenige titrierbare Ladungen trägt, so können Gesamtprotonenaufnahmen von 10 bis 12 mmol HCl pro g ZTG, wie es von *Pseudomonas pseudoalcaligenes* und *B. niacini* Stämmen berichtet wurde, erreicht werden (Martienssen, 2000a). Mit THF angezogene Zellen des Stamms K1 aus der logarithmischen Wachstumsphase besitzen überwiegend negativ geladene Carboxyl- und Phosphatgruppen hingegen kaum titrierbare positiv geladene Aminogruppen (Abb. 15, A). Mit zunehmendem Kulturalter nimmt die Anzahl der titrierbaren Carboxyl- und Aminogruppen zu, die titrierbaren Phosphatgruppen nehmen hingegen ab. Wenn Succinat als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle angeboten wurde, glichen sich die bestimmten Titrationskurven von Zellen aus der logarithmischen und stationären Wachstumsphase auffällig (Abb. 15, B), was bedeutet, daß eine Veränderung der titrierbaren Zelloberflächengruppen mit zunehmendem Zellalter nicht festgestellt wurde. Verglichen mit den Kurven, die mit THF angezogenen Zellen bestimmt wurden, ist die Anzahl der titrierbaren Phosphatgruppen deutlich niedriger, die titrierbaren Carboxylgruppen vergleichbar mit den von Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase und die titrierbaren Aminogruppen vergleichbar mit THF angezogenen Zellen aus der stationären Wachstumsphase. Aus der Literatur (Archibald et al., 1993) ist bekannt, daß Lipoteichonsäuren den anionischen Charakter Gram-positiver Bakterien bestimmen. Diese anionischen Polymere sind für spezifische Oberflächeneigenschaften wie Oberflächenladung und Kationenbindung (z.B. von toxischen Metallionen) verantwortlich (Archibald et al., 1993). Des weiteren ist bekannt, daß Gram-positive Bakterien im allgemeinen weniger Zellwandproteine besitzen als Gram-negative (Archibald et al., 1993). Obwohl ein direkter Vergleich von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien in dieser Arbeit nicht gemacht werden kann, so wurde durch die Untersuchung von Stamm K1 deutlich, daß dieser nur wenige (titrierbare) Proteine an der Zelloberfläche besitzt. Aus der Literatur (Weber und de Bont, 1996) ist bekannt, daß sich der Membrangehalt von Proteinen und Lipopolysacchariden im Rahmen einer Streßantwort erhöhen kann, wenn die bakterielle Zelle mit Lösungsmitteln in Kontakt kommt. Ein höherer Proteingehalt hat eine höhere Membranfestigkeit zur Folge. In der vorliegenden Arbeit wurde kein Einfluß von 10 mM

THF auf die titrierbaren Aminogruppen festgestellt. Für die praktische Anwendung von Stamm K1 läßt sich aus den Ergebnissen (Kap. 3.6) folgern, daß mit fortschreitendem Zellalter ein verändertes Adsorptionsverhalten auftreten könnte, wenn mit THF als Kohlenstoff- und Energiequelle gearbeitet wird.

Die IEF ist eine gängige Methode, um die bakterielle Ladung zu charakterisieren. So setzten z.B. Hermansson et al. (1982) diese Methode ein, um Interaktionen von Ladungen im Zusammenhang mit dem Vorhandensein von Fimbrien und Lipopolysacchariden bei *Salmonella thyphimurium* und *Serratia marcescens* zu untersuchen. Die IEF besitzt eine hohe Auflösung (Jaspers und Overmann, 1997) und es wird angenommen, daß ionisierbare Gruppen auch noch 6 bis 7 nm unterhalb der Zelloberfläche erfaßt werden (James, 1991). Als Nachteil der Methode wird die mögliche Adsorption des Ampholyten an die Zelloberfläche gesehen (James, 1991). Neben der Charakterisierung von geladenen Oberflächen wurde die von Jaspers und Overmann (1997) beschriebene Methode von den Autoren eingesetzt, um Reinkulturen aus einer vorhandenen Mischkultur zu isolieren.

Die Ergebnisse der IEF der vorliegenden Arbeit bestätigten die bisher erhaltenen Ergebnisse, daß Stamm K1 überwiegend negative Ladungen an seiner Oberfläche trägt, da sich das Bakterium im pH-Gradienten bei ca. pH 3,0 anlagerte (Kap. 3.6.1). Es wurde kein Einfluß von Zellalter und Substratkonzentration festgestellt. Stamm K1 besitzt im Vergleich zu anderen Bakterien einen niedrigen IEP (≤ 3). Zum Vergleich seien *Micrococcus luteus* (IEP 3,2), *Pseudomonas stutzeri* (IEP 3,8) (Jaspers und Overmann, 1997), *Rhodococcus* Stamm RSI (IEP 3,85) und *Comamonas acidovorans* Ca50 (IEP 5,7) (Martienssen, 2000a) genannt.

Die Methode der Farbstoffadsorptionsversuche von Kristallviolett und Orange II, um Ladungen zu charakterisieren, wurde bei Krekeler (1990) beschrieben und der Einsatz zur Charakterisierung von bakteriellen Oberflächen von Martienssen (2000b) publiziert.

Stamm K1 adsorbierte nur geringe Mengen des positiv geladenen Farbstoffs Kristallviolett. Die bestimmten 0,095 mmol/g ZTG sind vergleichbar mit den für einen *Rhodococcus* Stamm RSI bestimmten Konzentrationen (Martienssen, 2000a). Auch in diesem Versuch wurde deutlich, daß Stamm K1 wenige Ladungen besitzt, was auch die Ergebnisse des Mikrotitrationsversuchs bestätigt. Daß Stamm K1 den negativ geladenen Farbstoff

Orange II nicht meßbar adsorbierte, bedeutet, daß die Anzahl positiver Ladungen an der Zelloberfläche quantitativ zu vernachlässigen sind.

Nach den beiden am häufigsten diskutierten Theorien (DLVO, Gibb'sche Oberflächenenergie, siehe Einleitung) sind Hydrophobizität und Ladung ausschlaggebend für die Adhäsion von Bakterien an Trägermaterial. Tanford (1978) geht in seinem Artikel auf die eminente Bedeutung der Hydrophobizität bezüglich der Organisation von Materie ein, durch die es erst zum Phänomen Leben kommen kann. Nichtsdestotrotz ist die Bestimmung der Hydrophobizität kompliziert. Sie kann nicht direkt gemessen werden und ist deshalb immer relativ. Die benutzte Methode sollte deshalb immer angegeben werden (Mozes und Rouxhet, 1987; van der Mei et al., 1987; van Loosdrecht et al., 1990b; van der Mei et al., 1991). Zur indirekten Bestimmung der Hydrophobizität haben sich die Methoden der Kontaktwinkelmessung (Neufeld et al., 1980; Mozes und Rouxhet, 1987; van Loosdrecht et al., 1990b; Daffonchio et al., 1995) und die Methode der Bakterienzellverteilung in zwei nicht mischbaren Phasen, in der vorliegenden Arbeit in einem Wasser-Hexadekan-Gemisch (BATH Test), in der Praxis besonders bewährt (Rosenberg et al., 1980; van Loosdrecht et al., 1990b; Pelletier et al., 1997). In der Literatur findet man jedoch Kritikpunkte für beide Methoden. So wird für die Methode der Kontaktwinkelmessung der unphysiologische Zustand der Zellen (Fletcher und Marshall, 1982; Mozes und Rouxhet, 1987; van Loosdrecht et al., 1990b), der Einfluß der Rauigkeit sowohl des Filterpapiers als auch des Bakterienrasens (Neufeld et al., 1980) und die Penetration des Wassers in den Bakterienfilm (Mozes und Rouxhet, 1987) kritisiert. Rosenberg et al. (1980) beschrieben die Untersuchung von bakteriellen Zellen in einem Wasser-Hexadekan-Gemisch als einfache quantitative Bestimmung, um eine Aussage über die Zellhydrophobizität treffen zu können. Allerdings beeinflussen schlecht reproduzierbare Mischvorgänge und die mögliche Ansammlung von Bakterien an der Phasengrenzfläche die Meßergebnisse. Andere Autoren (Kjelleberg und Hermansson, 1984; Sweet et al., 1987) ziehen den aromatischen Kohlenwasserstoff Xylol dem aliphatischen Hexadekan vor, da sie davon ausgehen, daß weniger hydrophobe Zellen besser am aromatischen Kohlenwasserstoff adsorbieren. Der Einsatz von Xylol wird allerdings von Vanhaecke und Pijck (1988) kritisch gesehen, da sie unterstellen, daß die Zellwände lysieren könnten. Verschiedene extrazelluläre Strukturen der Zelloberfläche beeinflussen die Zellhydrophobizität. So verleihen Lipoteichonsäuren (Archibald et al., 1993), Proteine mit

vielen hydrophoben Seitenketten (Hancock, 1991), Lipide und Fimbrien (Korhonen et al., 1980) der Zelle einen hydrophoben Charakter. Studien von van der Mei et al. (1987) zeigten, daß die Fimbrienanzahlabnahme von *Streptococcus salivarius* Stämmen mit einer geringeren Zellhydrophobizität korrelierte. Hydrophilen Charakter verleihen indes Polysaccharide und Proteine (Daffonchio et al., 1995). Bei der Ernte und Zellbehandlung sollte vorsichtig vorgegangen werden, da einwirkende Kräfte, z.B. Scherkräfte, Anhängsel der Zelloberfläche abtrennen können. Da diese aber die Zellhydrophobizität beeinflussen, kann der Verlust zu einem verfälschten Ergebnis führen (van der Mei et al., 1991).

In der Kontaktwinkelmessung zeigte sich, daß Zellen aus der frühlogarithmischen Wachstumsphase den hydrophilsten (Kontaktwinkel 44°), Zellen aus der logarithmischen (Kontaktwinkel 53°) und der stationären Wachstumsphase (Kontaktwinkel 55°) einen hydrophoberen Charakter besaßen. Zum Vergleich: Martiensen (2000a) beschreibt Kontaktwinkel für einen *Rhodococcus* Stamm RSI und *Comamonas acidovorans* Ca50 von 21,5 und 12,6. Nach Mozes und Rouxhet (1987) werden Zellen, die einen Kontaktwinkel $< 40^\circ$ besitzen als hydrophil und die mit einem Kontaktwinkel von 50 bis 60° als moderat hydrophob eingestuft. Daffonchio et al. (1995) definieren Hydrophobizität aufgrund eines Kontaktwinkels $< 45^\circ$ als hydrophil und $> 45^\circ$ als hydrophob. Laut dieser Definitionen sind die untersuchten Zellen des Stamms K1 als moderat hydrophob einzustufen. Daß sich die Zellhydrophobizität mit fortschreitendem Zellalter erhöht ist in der Literatur beschrieben (van Loosdrecht et al., 1987) und beruht auf Änderungen der Zelloberflächenstruktur.

Im BATH Test zeigte sich, daß die Hydrophobizitäten von Zellen aus der logarithmischen und stationären Wachstumsphase des Stamms K1, wenn sie mit THF als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle angezogen wurden, vergleichbar sind. Der mögliche Einfluß des Zellalters auf die Hydrophobizität wurde mit dieser Methode nicht erfaßt. Im pH-Bereich von 4 bis 11 zeigten die Zellen Hydrophobizitäten von $< 30\%$. Laut Pelletier et al. (1997) sind diese Werte als hydrophil einzustufen. Der starke Anstieg der Hydrophobizität bei pH 3 läßt sich mit der Abnahme der Oberflächengesamtladung erklären (siehe auch Mikrotitrationsversuche). Die (graduelle) Protonierung von geladenen Oberflächengruppen führt zur Reduktion der Zelloberflächen negativität. Die repulsiven elektrostatischen Interaktionen nehmen ab. Der Charakter und die Anzahl der extrazellulären Strukturen der Zelloberfläche gewinnen an Einfluß auf die Hydrophobizität.

Vergleicht man nun die Aussagen zwischen Kontaktwinkelmessung und BATH Test, so wird einmal von mäßig hydrophoben bzw. hydrophilen Zellen gesprochen. Aus der Literatur

(Mozes und Rouxhet, 1987) erfährt man, daß die Aussage der Meßergebnisse für mittelhydrophile bzw. mittelhydrophobe Zellen im BATH-Test problematisch sein kann. Die Autoren empfehlen daher diese Zellen zusätzlich der Kontaktwinkelmessung zu unterziehen. In dem vorliegenden Fall wird die marginale Definitionsdifferenz zwischen "mäßig hydrophob" bzw. "hydrophil" als nicht signifikant gewertet.

Die mit Succinat angezogenen Zellen des Stamms K1 zeigen im BATH Test im pH-Bereich 3 bis 6 deutlich höhere Hydrophobizitätswerte im Vergleich zu den mit THF angezogenen Zellen, was wahrscheinlich durch die größere Anzahl titrierbarer Carboxylgruppen bedingt ist, die in diesem Bereich nicht dissoziiert vorliegen (Abb. 15). Im pH-Bereich 7 bis 11 sind die gemessenen Hydrophobizitäten vergleichbar bzw. liegen etwas unterhalb der Werte der mit THF angezogenen Zellen. Man erkennt den Einfluß des anderen Substrats auf die Zellhydrophobizität.

Obwohl auch hydrophobe Aminosäuren zur Gesamtzellhydrophobizität beitragen können, ist dies bei dem untersuchten Stamm K1 auszuschließen, da aus den Ergebnissen der Mikrotitrationsexperimente ersichtlich wurde, daß das untersuchte Bakterium keine bzw. nur wenige titrierbare Aminogruppen besitzt (Kap. 3.6.1). Da aus der Literatur bekannt ist, daß Gram-positive Bakterien einen hohen Gehalt an Lipoteichonsäuren (Archibald et al., 1993) und Bakterien der Ordnung *Actinomycetales* (Hancock, 1991) an Lipiden haben können, wird davon ausgegangen, daß die bestimmte Zellhydrophobizität auf diese beiden Zellkomponenten zurückzuführen ist. Der Einfluß des Zellalters von Zellen aus der logarithmischen bzw. stationären Wachstumsphase auf die Zellhydrophobizität konnte weder mit der Kontaktwinkelmeßmethode noch mit dem BATH Test erfaßt werden.

Aus der Literatur ist bekannt, daß bakterielle Zelloberflächenpolysaccharide einen entscheidenden Einfluß auf die primäre Adhäsion haben (Christensen et al., 1985; Merker und Smit, 1988) und somit als Biofilm-Matrix wichtig sind (Langille und Weiner, 1998). Costerton et al. (1981) definieren als Glykokalyx jegliche Art von Polysaccharid, das sich außerhalb einer bakteriellen Zelle befindet.

Fletcher und Floodgate (1973) nennen Ruthenium Red und Alcian Blue zum Nachweis saurer Polysaccharide der bakteriellen Zellwand. Die Synthese von extrazellulären Polysacchariden unterliegt verschiedenen Einflüssen. So berichten die Autoren, daß sowohl die Ionenkonzentration im Kulturmedium als auch die Art der Kultur in wäßrigem oder auf Agarmedium die Menge und chemische Zusammensetzung beeinflusst. Des Weiteren

beschreiben die Autoren, daß die optimale Temperatur der Polysaccharidsynthese unterhalb der optimalen Wachstumstemperatur in ihren Versuchen lag.

Neben ihrer Bedeutung für die Etablierung von Mikrokolonien und der Ausbildung von Biofilmen (Eighmy et al., 1983) bietet die Glykokalyx Schutz vor antimikrobiellen Substanzen, wie Antibiotika, oberflächenaktiven Substanzen (Surfactants) und phagozytotischen Zellen (Costerton et al., 1981). In der Praxis sollte man vorsichtig sein, wenn man aus Laborversuchen gewonnene Daten auf natürliche Habitate extrapolieren will, da aus der Literatur bekannt ist, daß Bakterienstämme, die unter Laborbedingungen gehalten werden, oftmals keine Glykokalyx mehr synthetisieren (Costerton et al., 1981), was durch elektronenmikroskopische Untersuchungen unter Einsatz von Färbungen mit Alcian Blue und Ruthenium Red überprüft werden kann (Fletcher und Floodgate, 1973).

In der vorliegenden Arbeit gaben die rasterelektronischen Aufnahmen (Kap. 3.6.2) erste Hinweise auf das Vorhandensein von Zelloberflächenpolysacchariden beim untersuchten Stamm K1, was durch die Farbstoffadsorptionstests mit Ruthenium Red und Alcian Blue (Kap. 3.6.1) bestätigt wurde.

Während Costerton et al. (1981) von einer oftmals zu beobachteten Glykokalyx-SyntheseEinstellung unter Laborbedingungen berichten, synthetisierte Stamm K1 auch nach dreijähriger Kultivierung unter Laborbedingungen (saure) Zelloberflächenpolysaccharide. Inwieweit sich allerdings Kulturbedingungen, wie Ionenstärke, pH-Wert und Temperatur auf die Synthese auswirkten, wurde nicht weiter untersucht. Man kann nun spekulieren, warum Stamm K1 die Energie zur Synthese aufwendet. Wahrscheinlich ist, daß die Glykokalyx die Bakterienzellmembran vor dem als Substrat geeigneten Lösungsmittel THF schützt. Dieser "Schutzschild" ist sicherlich (mit-) verantwortlich dafür, daß das Bakterium Stamm K1 Substrate verstoffwechseln kann, die lipidhaltige Membranen auflösen.

4.7.2 Untersuchung des Adhäsionsverhaltens

Die Immobilisierungsversuche des Stamms K1 an verschiedene Trägermaterialien zeigten, daß im physiologischen pH-Bereich ungeladene Träger (OC 1066, Träger 1) besser geeignet sind als die untersuchten geladenen Träger 2 und 3 und der hydrophile Träger Sinterglas (Tabelle 12). Das bedeutet, daß die hydrophoben Wechselwirkungen größeren Einfluß als die ionischen Wechselwirkungen haben und der Charakter der

Bakterienoberfläche eine Adsorption an hydrophobe Oberflächen begünstigt bzw. die Adsorption an hydrophilen Oberflächen (siehe Sinterglas) benachteiligt. Das Phänomen, daß Bakterien mit wenig titrierbaren Oberflächengruppen eher an hydrophobe Träger adsorbieren und daß geladene Gruppen am Trägermaterial sich negativ auf die Adsorption auswirken, wurde auch von Martiensen (2000a) beschrieben. Die beiden ungeladenen Träger OC 1066 und Träger 1 unterscheiden sich in ihrer Hydrophobizität. Der Träger OC 1066 ist hydrophober (siehe auch Tabelle 2). Genauere Informationen, welche exakten Unterschiede es zwischen diesen beiden Trägern gibt, waren vom Hersteller Bayer-Leverkusen aufgrund von Patentrechten nicht zu erhalten.

Daß die für Stamm K1 bestimmte Beladung am Träger Sinterglas höher als bei den Trägern 2 und 3 bei pH 7 war, zeigt, daß Ladungen am Trägermaterial, auch wenn sie positiv sind, sich allgemein ungünstig auf die Adsorption auswirken.

Der Anstieg der Adsorption im Versuch mit den Trägern 1, 2 und 3 (Abb. 17) im Bereich der dissoziierenden Carboxylgruppen ist vermutlich damit zu erklären, daß die Träger, entgegen der Herstellerangabe, doch in diesem Bereich titrierbar sind, was auch experimentell nachgewiesen werden konnte (M. Martiensen, persönliche Mitteilung). Dies bedeutet, daß die Träger im pH-Bereich > 8 positive Ladungen tragen, an die das überwiegend negative Ladungen tragende Bakterium Stamm K1 adsorbieren konnte. Die bestimmten Differenzen der Adsorption im pH-Bereich 8,5-11 waren so gering, daß auf eine Diskussion verzichtet wird.

Die Porengröße der eingesetzten Träger betrug nur 10 nm, während der Bakterienzeldurchmesser mit $1,3 \mu\text{m}$ bestimmt worden war (Kap. 3.3). In den Untersuchungen des Adsorptionsverhaltens sollte der Einfluß von Zellladung und -hydrophobizität auf die Anlagerung am Träger untersucht werden. Die Besiedlung der Trägermaterialien durch Eindringen der Bakterienzellen in die Trägermatrix sollte die Untersuchungen nicht beeinflussen. Die gemessene Beladung von Zellen des Stamms K1 auf den ungeladenen Trägern (OC 1066 und Träger 1) (Kap. 3.6.2) liegt in dem Bereich, der auch von Martiensen (2000a) für andere Bakterien bestimmt wurde. Die Praxis zeigt, daß die Effektivität des Schadstoffabbaus nicht von der Dichte der Trägerbeladung abhängt, sondern vielmehr von der katalytischen Aktivität der adsorbierten Mikroorganismen (Stronach et al., 1987; Martiensen, 2000a).

Urbain et al. (1993) sprechen das häufig in der Praxis anzutreffende Problem der schlechten Sedimentation der Biomasse an, das zu ökologischen aber auch zu technischen Problemen

führt. Wanner und Grau (1989) setzten sich mit der Problematik des negativen Einflusses von filamentösen Mikroorganismen auf die Sedimentation auseinander. Im experimentellen Teil dieser Arbeit wurde festgestellt, daß Stamm K1 flokkulierte, sobald der pH-Wert des Mediums auf ca. 2-3 erniedrigt wurde. Man konnte ihn dann gut sowohl vom Trägermaterial als auch von der Suspensionsflüssigkeit trennen. Neben pH-Wert-Veränderungen können auch Änderungen der Ionenstärke des Mediums zur Abtrennung von mikrobiellen Zellen eingesetzt werden. So beschreiben Bar et al. (1986) 100 %ige Desorption eines *Acetobacter aceti* Stamms von einem Cellulose-Ionenaustauscher bei Erhöhung der Mediumionenstärke auf $> 1,5 \text{ M NaCl}$.

4.7.3 Einschlußimmobilisierung mit Alginat

Neben der Immobilisierung von Bakterienzellen auf Trägermaterial kommt auch die Methode der Immobilisierung ganzer Zellen mittels Einschlußverfahren zur Anwendung (Hartmeier, 1986). In der jüngeren Vergangenheit fokussiert das Interesse der Biotechnologen auf die Methode der Immobilisierung mittels Einschluß, da diese leichter durchgeführt werden kann als die Methode der Adsorption und auch teilungsunfähige Zellen eingesetzt werden können (Klein und Ziehr, 1990). Untersuchungen haben gezeigt, daß durch Einschluß oder Adsorption immobilisierte Mikroorganismen häufig eine wesentlich verlängerte Lebensdauer besitzen (Rehm, 1990). Allerdings ist bekannt, daß immobilisierte Mikroorganismen sowohl höhere als auch niedrigere Schadstoffabbauraten besitzen können im Vergleich zu nicht immobilisierten Zellen (Rehm, 1990). Der Nachteil der Immobilisierung durch Einschluß ist, daß diese Methode in Abhängigkeit der eingesetzten Einschlußmatrix weniger schonend sein kann als die Methode der Immobilisierung durch Adsorption (Klein und Ziehr, 1990). Die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Immobilisation durch Einschluß sind zum einen, daß die immobilisierten Zellen ihre gewünschte Stoffwechselaktivität behalten und zum anderen, daß Substrate und Produkte, nicht aber die Zellen selbst, die Matrix des Einschlußmaterials passieren können (Hartmeier, 1986).

Neben den in der Praxis eingesetzten Polyvinylchlorid-Einschlüssen werden bei Hartmeier (1986) auch Agar, Gelatine, Carrageenan und Alginat als Einschlußmatrices genannt. In dieser Arbeit wurde Stamm K1 mit Alginat immobilisiert, welches eine kostengünstige organische Immobilisierungsmatrix ist (Klein und Ziehr, 1990). Bei Alginat handelt sich um

Salze der Alginsäure (Polymer aus β -D-Mannuronsäure und β -L-Gulonsäure), die aus Braunalgen gewonnen wird und deren Natriumsalz wasserlöslich, das Kalziumsalz aber wasserunlöslich ist (Sitte et al., 1991). Es handelt sich um ein schonendes Einschlußverfahren, weil es keine Kupplungsreaktionen zwischen Matrix und Zellen gibt (Hartmeier, 1986).

Alginat immobilisierte Zellen des Stamms K1 verloren ihre THF-Abbauaktivität nicht. Da die THF-Konzentrationen in den Kontrollansätzen im Laufe des Versuchs konstant blieben, konnten abiotische Einflüsse, die eine THF-Abnahme bewirkt hätten, ausgeschlossen werden. Die niedrigere Umsatzrate Alginat immobilisierter Zellen verglichen mit der von nicht immobilisierten Zellen hängt sicherlich damit zusammen, daß die nicht immobilisierten Zellen während der Inkubation wuchsen und somit ansteigende Zellmasse mehr THF verstoffwechselte. Bei den immobilisierten Zellen ist zudem nicht auszuschließen, daß alle in einer Kugel immobilisierten Zellen nicht optimal mit THF und Sauerstoff versorgt waren und deswegen ihr Stoffumsatz unterhalb ihres Optimums erniedrigt war. Die Problematik der Diffusionsbarriere bei durch Einschluß immobilisierten Zellen ist aus der Literatur bekannt (Rehm, 1990; Jekel et al., 1998). Jedoch zeigten Brower und Barford (1997) in ihren Studien, daß natürliche Einschlußmatrices, wie Alginat und Carrageenan, durchlässiger für Diffusionsprozesse waren als die untersuchten synthetischen.

4.8 Ausblick

Zukünftige Untersuchungen sollten klären, ob es sich bei dem in dieser Arbeit isolierten *Pseudonocardia* sp. und dem in der Literatur beschriebenen *Pseudonocardia sulfidoxydans* um dieselbe Art handelt. Dies sollte mittels DNA-DNA-Hybridisierung geschehen, weil die Verwandtschaftsbeziehung mit dieser Methode eindeutig beurteilt werden könnte.

Etherspaltende Enzyme sind von großem Interesse, da sie sowohl für den Umweltschutz wichtig, als auch für die Grundlagenforschung sehr interessant sind. Erst wenig ist über ihren biologischen Aufbau und den Mechanismen der Katalyse bekannt. Durch Klonierung und Sequenzierung müßte in weitergehenden Untersuchungen geklärt werden, ob die gefundene NADH abhängige Cytochrom-c-Reduktaseaktivität zu der Reduktasekomponente einer THF-Monooxygenase gehört und wenn ja, ob diese mit anderen bereits sequenzierten Monooxygenasen verwandt ist. Dies könnte durch Klonierung

und anschließender Sequenzierung geschehen. Das Ziel dieser molekularbiologisch-enzymatischen Arbeiten sollte die Identifizierung und Charakterisierung der am THF-Abbau im isolierten *Pseudonocardia* sp. beteiligten Enzyme sein.

Es wird davon ausgegangen, daß Stamm K1 aufgrund der gezeigten Lösungsmitteltoleranz ein geeigneter Organismus ist, die zugrunde liegenden Resistenzmechanismen in einem Gram-positiven Bakterium zu untersuchen. Um zu klären, inwieweit sich der isolierte *Pseudonocardia* sp. für die Reinigung THF haltiger Abwässer unter *in situ* Bedingungen eignet, sollten praxisbezogene Versuche in Klärwerken durchgeführt werden.

5. Zusammenfassung

1. In der vorliegenden Arbeit wurde eine THF abbauende Mischkultur mit *in situ* vorkommenden THF-Konzentrationen ≥ 50 mM kultiviert und das für den THF-Abbau verantwortliche Bakterium isoliert.

2. Die Mischkultur bestand aus vier verschiedenen bakteriellen Isolaten, von denen drei Gram-negativ und eins Gram-positiv färbten. Das Gram-positive Isolat Stamm K1 war allein für den beobachteten THF-Abbau verantwortlich. Erste taxonomische Untersuchungen dieses THF abbauenden Bakteriums erlaubten dessen Zuordnung in die Familie *Pseudonocardiaceae* (Ordnung *Actinomycetales*). Durch Sequenzierung der 16S rDNA konnte der Stamm als eine Art der Gattung *Pseudonocardia* identifiziert werden. Vergleiche mit Datenbanken ergaben eine 99 %ige Sequenzhomologie zu dem erst kürzlich beschriebenen *Pseudonocardia sulfidoxydans*.

3. Der in dieser Arbeit isolierte und taxonomisch charakterisierte *Pseudonocardia* Stamm K1 wuchs mit THF in Mineralmedium als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle bis zu Konzentrationen von 70 mM. Dies ist eine signifikante Steigerung zu den bisher beschriebenen bakteriell verstoffwechselten THF-Konzentrationen.

Damit wurde ein Bakterium beschrieben, das das Potential besitzt, in mit THF stark verunreinigten Abwassern zur Reinigung eingesetzt zu werden und Stoßbelastungen zu tolerieren. Die Fähigkeit des THF-Abbaus wird stabil weitervererbt. Untersuchungen des Substratspektrums zeigten weiterhin, daß das isolierte Bakterium auch noch andere Ether, wie Diethylether, als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen kann. Auch Toluol wird als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt.

4. Im postulierten THF-Abbauweg soll eine Monooxygenase den einleitenden Schritt katalysieren (Bernhardt und Diekmann, 1991). Durch Wachstumsversuche und Aufnahme von Differenzspektren wurde ausgeschlossen, daß eine Cytochrom-P-450-Monooxygenase im THF-Abbauweg des isolierten *Pseudonocardia* Stamms involviert ist. Weitere enzymatische Untersuchungen ergaben, daß ein THF-Abbau in ruhenden und permeabilisierten Zellen, nicht aber in Rohextrakten, auch wenn sehr unterschiedliche Testbedingungen gewählt wurden, detektiert wurde. Weitere enzymatische Arbeiten gingen von der Tatsache aus, daß Oxygenasen eine Oxygenase- und eine Reduktasekomponente besitzen. Für die Messung von NADH abhängigen Reduktaseaktivitäten mit künstlichen Elektronenakzeptoren wurden Zellen des isolierten *Pseudonocardia* Stamms mit THF oder

Succinat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle angezogen, die Rohextrakte an einem Anionenaustauscher chromatographiert und die Fraktionen mit verschiedenen Elektronenakzeptoren überprüft. Es konnte nachgewiesen werden, daß Zellen, die mit THF angezogen worden waren, eine zusätzliche NADH abhängige Cytochrom-c-Reduktaseaktivität besaßen. Mit Succinat angezogene Zellen besaßen diese nicht.

5. In Trägeradsorptionsversuchen wurde die höchste Trägerbeladung mit Zellen des in dieser Arbeit isolierten *Pseudonocardia* Stamms mit einem ungeladenen hydrophoben Trägermaterial erreicht. Es wurde auch gezeigt, daß dieses Bakterium mittels Alginateinschlußverfahren immobilisiert werden konnte und daß es seine THF-Abbaufähigkeit durch den Einschluß nicht verlor.

6. Literatur

- Adams, C.D.; Scanian, P.A. und N.D. Secrist.** 1994. Oxidation and biodegradability enhancement of 1,4-dioxane using hydrogen peroxide und ozone. *Environ. Sci. Technol.* **28**:1812-1818.
- Akimov, V.N.; Evtushenko, L.I. und S.V. Dobritsa.** 1989. *Pseudoamycolata halophobica* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**:457-461.
- Alexander, M.** 1965. Biodegradation: problems of molecular recalcitrance and microbial fallibility. *Adv. Appl. Microbiol.* **7**:35-80.
- Aono, R. und H. Kobayashi.** 1997. Cell surface properties of organic solvent-tolerant mutants of *Escherichia coli* K-12. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3637-3642.
- Archibald, A.R.; Hancock, I.C. und C.R. Harwood.** 1993. Cell wall structure, synthesis, and turnover. Kapitel 27. In: *Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics.* ASM Press, Washington, DC, U.S.A.
- Armstrong, J.M.C.D.** 1964. The molar extinction coefficient of 2,6-dichlorphenol-indophenol. *Biochim. Biophys. Acta.* **86**:194-197.
- Atlas, R.M; Brown, A.E.; Dobra, K.W. und L. Miller.** 1984. *Experimental microbiology - fundamentals and applications.* Macmillan Publ. Company, New York, U.S.A.
- Atlas, R.M.** 1993. Handbock of microbiological media. In: L.C. Parks (Hrsg.), CRC Press, Inc., Boca Raton, U.S.A.
- Ball, A.S.; Godden, B.; Helvenstein, P.; Penninck, M.J. und A.J. McCarthey.** 1990. Lignocarbhydrate solubilization from straw by actinomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:3017-3022.
- Bar, R.; Gainer, J.L. und D.J. Kirwan.** 1986. Immobilization of *Acetobacter aceti* on cellulose ion exchangers: adsorption isotherms. *Biotechnol. Bioeng.* **28**:1166-1171.
- Becker, D.** 1997. Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von Naphthalin, Phenanthren und Pyrrol-2-carboxylat (P2C): Charakterisierung der flavinabhängigen P2C-Zwei-Komponenten-Monooxygenase aus *Rhodococcus* sp. Sedi2. Dissertation. Martin-Luther-Universität. Halle-Wittenberg.

- Becker, D.; Schröder, T. und J.R. Andreesen.** 1997. Two-component flavin-dependent pyrrole-2-carboxylate monooxygenase from *Rhodococcus* sp. Eur. J. Biochem. **249**:739-747.
- Bernhardt, D.** 1991. Abbau von Dioxan, Tetrahydrofuran und anderer zyklischer Ether durch eine neu isolierte *Rhodococcus* sp. Dissertation. Universität Hannover.
- Bernhardt, D. und H. Diekmann.** 1991. Degradation of dioxane, tetrahydrofuran and other cyclic ethers by an environmental *Rhodococcus* strain. Appl. Microbiol. Biotechnol. **36**:120-123.
- Berry, A.M.; Moreau, R.A. und A.D. Jones.** 1991. Bacteriohopantetrol: abundant lipid in *Frankia* cells and in nitrogen-fixing tissue. Plant. Physiol. **95**:111-115.
- Berufsgenossenschaft (BG) Chemie.** 1988. Merkblatt M 038, 5/88.
- Bligh, E.G. und W.J. Dyer.** 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. **37**:911-917
- Bock, C.** 1994. Untersuchungen zum Abbau von Tetrahydrofuran und anderen cyclischen Ethern, zur initialen C-Hydroxylierung und zur Charakterisierung von *Rhodococcus ruber* Stamm 219. Dissertation. Universität Hannover.
- Bock, C.; Kroppenstedt, R.M. und H. Diekmann.** 1996. Degradation and bioconversion of aliphatic and aromatic hydrocarbons by *Rhodococcus ruber* 219. Appl. Microbiol. Biotechnol. **45**:408-410.
- Boopathy, R.; Bokang, H. und L. Daniels.** 1993. Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural by enteric bacteria. J. Indust. Microbiol. **11**:147-150.
- Bowen, T.; Stackebrandt, E.; Dorsch, M. und T.M. Embley.** 1989. The phylogeny of *Amycolata autotrophica*, *Kibdelosporangium aridum* and *Saccharothrix australiensis*. J. Gen. Microbiol. **135**:2529-2536.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72**:248-254.

- Bringer, S.; Härtner, T.; Poralla, K. und H. Sahn.** 1985. Influence of ethanol on the hopanoid content and the fatty acid pattern in batch and continuous cultures of *Zymomonas mobilis*. Arch. Microbiol. **140**:312-316.
- Brosius, J.; Palmer, M.L.; Kennedy, J.P. und H.F. Noller.** 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **75**:4801-4805.
- Brower, J.B. und C.C. Barford.** 1997. Biological fixed-film systems. Water Environ. Research. **69**:487-500.
- Brownstein, A.M.** 1991. 1,4-butanediol and tetrahydrofuran: exemplary small-volume commodities. Chemtech. **21**(8):506-510.
- Busscher, H.J. und A.H. Weerkamp.** 1987. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. FEMS Microbiol. Rev. **46**:165-173.
- Büchs, J.; Mozes, N.; Wandrey, C. und P.G. Rouxhet.** 1988. Cell adsorption control by culture conditions. Appl. Microbiol. Biotechnol. **29**:119-128.
- Bünz, P.V. und A.M. Cook.** 1993. Dibenzofuran 4,4a-dioxygenase from *Sphingomonas* sp. strain RW1: Angular dioxygenation by a three-component enzyme system. J. Bacteriol. **175**:6467-6475.
- Chakrabarty, A.M.** 1995. Microbial degradation of toxic chemicals: molecular and evolutionary insights. Vortrag im Rahmen der Jahrestagung der American Society for Microbiology (ASM), Washington, D.C., U.S.A.
- Chassy, B.M. und J. Thompson.** 1983. Regulation of lactose-phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system and β -D-Phosphogalactoside galactohydrolase activities in *Lactobacillus casei*. J. Bacteriol. **154**:1195-1203.
- Christensen, B.E.; Kjosbakken, J. und O. Smidsrod.** 1985. Partial physical and chemical characterization of two extracellular polysaccharides produced by marine, periphytic *Pseudomonas* sp. strain NCMB 2012. Appl. Environ. Microbiol. **50**:837-845.
- Colby, J.; Stirling, D.I. und H. Dalton.** 1977. The soluble methane mono-oxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath). Biochem. J. **165**:395-402.

- Cooper, T.G.** 1981. Biochemische Arbeitsmethoden. Walter de Gruyter. Berlin. New York.
- Costerton, J.W.; Irvin, R.T. und K.-J. Cheng.** 1981. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* **35**:299-324.
- Cross, T.** 1994. The actinomycetes II: Growth and examination of actinomycetes-some guidelines. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. W.R. Hensyl (Hrsg.). Vol. 4:2340-2343. Williams & Williams, Baltimore, U.S.A.
- Daffonchio, D.; Thaveesri, J. und W. Verstraete.** 1995. Contact angle measurement and cell hydrophobicity of granular sludge from upflow anaerobic sludge bed reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3676-3680.
- Dalton, H.M.; Poulsen, L.K.; Halasz, P.; Angeles, M.L.; Goodman, A.E. und K.C. Marshall.** 1994. Substratum-induced morphological changes in a marine bacterium and their relevance to biofilm structure. *J. Bacteriol.* **176**:6900-6906.
- Dawson, R.M.C., Elliott, D.C., Elliott, W.H. und K.M. Jones.** 1986. Data for Biochemical Research. 1986. 3. Auflage. Clarendon Press, Oxford.
- Diekmann, H.** 1994. Biologischer Abbau von zyklischen Ethern. *BioEngineering.* **10**(4):48-49.
- Difco manual.** 1984. Dehydrated culture media and reagents for microbiology. 10. Auflage. Difco Laboratories. Detroit, MI, U.S.A.
- Dmitrenko, G.N.; Gvozdyak, P.I. und V.M. Udod.** 1987. Selection of destructor microorganisms for heterocyclic xenobiotics. *Khim Tekhnol Vody.* **9**:442-445.
- Dower, W.J.; Miller, J.F. und C.W. Ragsdale.** 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acid Res.* **16**:6127-6145.
- Eighmy, T.T.; Maratea, D. und P.L. Bishop.** 1983. Electron microscopic examination of wastewater biofilm formation and structural components. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:1921-1931.
- El-Nakeeb, M.A. und H.A. Lechevalier.** 1963. Selective isolation of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.* **11**:75-77.

- Elimelech, M. und R. O'Melia.** 1990. Kinetics of deposition of colloidal particles in porous media. *Environ. Sci. Technol.* **24**:1528-1536.
- Embley, T.M.** 1992. The family *Pseudonocardiaceae*. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. und K.-H. Schleifer (Hrsg.). *The procaryotes*. Springer-Verlag, Berlin, pp 996-1027.
- Embley, T.M.; Smida, J. und E. Stackebrandt.** 1988. The phylogeny of mycolate-less wall chemotype IV actinomycetes and description of *Pseudonocardiaceae* fam. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **11**:44-52.
- Ensign, S.A.; Hyman, M.R. und D.J. Arp.** 1993. In vitro activation of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea* by copper. *J. Bacteriol.* **175**:1971-1980.
- Estabrook, R.W.; Peterson, J.; Baron, J. und A. Hildebrandt.** 1972. The spectrophotometric measurement of turbid suspensions of cytochromes associated with drug metabolism. In: *Methods in Pharmacology*. Band **2**:303-350.
- Felsenstein, J.** 1993. PYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.5c. Bereitstellung durch den Autor. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, Washington.
- Figueroa, L.A. und J.A. Silverstein.** 1989. Ruthenium red adsorption method for measurement of extracellular polysaccharides in sludge flocs. *Biotechnol Bioeng.* **33**:941-947.
- Flesch, G. und M. Rohmer.** 1987. Growth inhibition of hopanoid synthesizing bacteria by squalene cyclase inhibitors. *Arch. Microbiol.* **147**:100-104.
- Fletcher, M. und G.D. Floodgate.** 1973. An electron-microscopic demonstration of an acidic polysaccharide involved in the adhesion of a marine bacterium to solid surfaces. *J. Gen. Microbiol.* **74**:325-334.
- Fletcher, M. und K.C. Marshall.** 1982. Bubble contact angle method for evaluating substratum interfacial characteristics and its relevance to bacterial attachment. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**:184-192.
- Gehrke, T.; Telegdi, J.; Thierry, D. und W. Sand.** 1998. Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2743-2747.

- Genthner, B.R.S.; Davis, C.L. und M.P. Bryant.** 1981. Features of rumen and sewage sludge strains of *Eubacterium limosum*, a methanon- and H₂-CO₂-utilizing species. Appl. Environ. Microbiol. **42**:12-19.
- Godden, B.; Ball, A.S.; Helvenstein, P. und A.J. McCarthy.** 1992. Towards elucidation of the lignin degradation pathway in actinomycetes. J. Gen. Microbiol. **138**:2441-2448.
- Gregersen, T.** 1978. Rapid method for distinction of gram-negative from gram-positive bacteria. Eur. J. Appl. Microbiol. **5**:123-127.
- Groening, J.; Veerman, E.C.I.; Zaanvoort, M.S.; van der Mei, H.C.; Busscher, H.J. und A.N. Amerongen.** 1998. The interaction between saliva and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* influenced by the zeta potential. Antonie von Leeuwenhoek **73**:279-288.
- Gvozdyak, P.I.; Udod, V.M. und G.N. Dimitrenko.** 1988. *Xanthomonas* bacterial strain for removing tetrahydrofuran from wastewater. USSR patent no. SU 1375646.23.2.1988. (CA 108:192259)
- Hancock, I.C.** 1991. Microbial cell surface architecture. In: Mozes, N., Handley, P.S., Busscher, H.J., und P.G. Rouxhet (Hrsg.): Microbial cell surface analysis: structural and physicochemical methods. pp 21-59. VCH Publishers, Inc., New York, U.S.A.
- Handley, P.S.** 1991. Detection of cell surface carbohydrate components. In: Mozes, N., Handley, P.S., Busscher, H.J., und P.G. Rouxhet (Hrsg.): Microbial cell surface analysis: structural and physicochemical methods. pp 87-107. VCH Publishers, Inc., New York, U.S.A.
- Harayama, S.; Kok, M. und E.L. Neidle.** 1992. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. Annu. Rev. Microbiol. **46**:565-601.
- Hardison, L.K.; Curry, S.S.; Ciuffetti, L.M. und M.R. Hyman.** 1997. Metabolism of diethyl ether and cometabolism of methyl *tert*-butyl ether by a filamentous fungus, *Graphium* sp. Appl. Environ. Microbiol. **63**:3059-3067.
- Hartmans, S.; Weber, F.J.; Somhorst, D.P.M. und J.A.M. de Bont.** 1991. Alkene monooxygenase from *Mycobacterium*: a multicomponent enzyme. J. Gen. Microbiol. **137**:2555-2560.
- Hartmeier, W.** 1986. Immobilisierte Biokatalysatoren. Springer-Verlag Berlin.

- Hazen, K.C.; Plotkin, B.J. und D.M. Klimas.** 1986. Influence of growth conditions on cell surface hydrophobicity of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Infect. Immun.* **54**:269-271.
- Henssen, A.** 1989. In: Lechevalier, H.A. 1989. Nocardioform actinomycetes. In: Williams, S.T., Sharpe, M.E. und J.G. Holt (Hrsg.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol.4. p 2378. Williams & Wilkins, Baltimore. U.S.A.
- Hermansson, M.; Kjelleberg, S.; Korhonen, T.K. und T.-A. Stenström.** 1982. Hydrophobic and electrostatic characterization of surface structures of bacteria and its relationship to adhesion to an air-water interface. *Arch. Microbiol.* **131**:308-312.
- Holtwick, R.; Meinhardt, F. und H. Keweloh.** 1997. *Cis-trans* isomerization of unsaturated fatty acids: cloning and sequencing of the *cti* gene from *Pseudomonas putida* P8. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4292-4297.
- Honorat-Pascal, A.; Monot, F. und D. Ballerini.** 1990. Comparative study of the enzymatic synthesis of L-valine by purified enzymes, crude extract, intact or permeabilized cells from *Bacillus megaterium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**:236-241.
- Hooper, A.B.; Vanelli, T.; Bergmann, D.J. und D.M. Arciero.** 1997. Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Ant. v. Leeuwenhoek.* **71**:59-67.
- Hormann, K.** 1991. Untersuchungen zum aeroben Abbau von Pyrrol-2-carboxylat und Charakterisierung einer Flavin abhängigen Pyrrol-2-carboxylat Oxygenase. Dissertation. Universität Göttingen.
- Hur, H.-G.; Newman, L.M.; Wackett, L.P. und M.J. Sadowsky.** 1997. Toluene 2-Monooxygenase-dependent growth of *Burkholderia cepacia* G4/PR on diethyl ether. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1606-1609.
- Hyman, M.R.; Page, C.L. und D.J. Arp.** 1994. Oxidation of methyl fluoride and dimethyl ether by ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3033-3035.
- Inoue, A. und K. Horikoshi.** 1989. A *pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nature.* **338**:264-266.

- Inoue, A.; Yamamoto, M. und K. Horikoshi. 1991.** *Pseudomonas putida* which can grow in the presence of toluene. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1560-1562.
- Isken, S. und J.A.M. de Bont. 1996.** Active efflux of toluene in a solvent-resistant bacterium. *J. Bacteriol.* **178**:6056-6058.
- Isken, S.; Derks, A.; Wolffs, P.F.G. und J.A.M. de Bont. 1999.** Effect of organic solvents on the yield of solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2631-2635.
- Isken, S.; Santos, P.M.A.C. und J.A.M. de Bont. 1997.** Effect of solvent adaptation on the antibiotic resistance in *Pseudomonas putida* S12. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**:642-647.
- James, A.M. 1982.** The electrical properties and topochemistry of bacterial cells. *Adv. Coll. Interf. Sci.* **15**:171-221.
- James, A.M. 1991.** Charge properties of microbial cell surface. In: Mozes, N., Handley, P.S., Busscher, H.J., und P.G. Rouxhet (Hrsg.): *Microbial cell surface analysis: structural and physicochemical methods*. pp 221-262. VCH Publishers, Inc., New York, U.S.A.
- Jaspers, E. und J. Overmann. 1997.** Separation of bacterial cells by isoelectric focusing, a new method for analysis of complex microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3176-3181.
- Jekel, M.; Buhr, A.; Wilke, T. und K.-D. Vorlop. 1998.** Neuartige Geleinschlüßimmobilisate (LentiKats) in der Biotechnologie. *Chem. Ingen. Techn.* **70**:438-441.
- Jiang, C.; Xu L.; Yang, Y-R.; Guo, G.-Y.; Ma, J. und Yong Liu. 1991.** *Actinobispora*, a new genus of the order *Actinomycetales*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**:526-528.
- Jukes, T.H. und C.R. Cantor. 1969.** Evolution of protein molecules. In: M.H. Munro (Hrsg.), *Mammalian Protein Metabolism*, Academic Press, New York.
- Juteau, P.; Larocque, R.; Rho, D. und A LeDuy. 1999.** Analysis of the relative abundance of different types of bacteria capable of toluene degradation in a compost biofilter. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**:863-868.

- Kieboom, J.; Dennis, J.J.; Zylstra, G.J. und J.A.M de Bont.** 1998. Active efflux of organic solvents by *Pseudomonas putida* S12 is induced by solvents. J. Bacteriol. **180**:6769-6772.
- Kilbane, J.J.; Chatterjee, D.K.; Karns, J.S.; Kellogg, S.T. und A.M. Chakrabarty.** 1982. Biodegradation of 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid by a pure culture of *Pseudomonas cepacia*. Appl. Environ. Microbiol. **44**:72-78.
- Kimura, T.** 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. **16**:111-120.
- Kjelleberg, S. und M. Hermansson.** 1984. Starvation-induced effects on bacterial surface characteristics. Appl. Environ. Microbiol. **48**:497-503.
- Klein, J. und H. Ziehr.** 1990. Immobilization of microbial cells by adsorption. J. Biotechnol. **16**:1-16.
- Koch, A.L. und P. Gerhardt.** 1994. Growth measurement. In: Gerhardt, P.; Murray, R.G.E.; Wood, W.A. und N.R. Krieg (Hrsg.). Methods for general and molecular bacteriology. ASM Press, Washington, D.C., U.S.A.
- Kohlweyer, U.; Thiemer, B.; Schröder, T. und J.R. Andreesen.** 2000. Tetrahydrofuran degradation by a newly isolated culture of *Pseudonocardia* sp. strain K1. FEMS Microbiol. Lett. **186**:301-306.
- Koenig, K.** 1991. Physiologische, enzymatische und erste molekularbiologische Untersuchungen zum aeroben und anaeroben Abbau von Furan-Derivaten. Dissertation. Universität Göttingen.
- Koenig, K. und J.R. Andreesen.** 1989. Molybdenum involvement in aerobic degradation of 2-furoic acid by *Pseudomonas putida* Fu1. Appl. Environ. Microbiol. **55**:1829-1834.
- Koenig, K. und J.R. Andreesen.** 1992. Aerober und anaerober Abbau von heterocyclischen, aromatischen Verbindungen durch Bakterien. BioEngineering. **8**(2):78-84.
- Korhonen, T.K., Lounatmaa, K., Ranta, H. und N. Kuusi.** 1980. Characterization of type 1 pili of *Salmonella typhimurium* LT2. J. Bacteriol. **144**:800-805.

- Kornberg, H.L. und R.E. Reeves.** 1972. Inducible phosphoenolpyruvate-dependent hexose phosphotransferase activity in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **128**:1339-1344.
- Korn-Wendisch, F. und H.J. Kutzner.** 1991. The family *Streptomycetaceae*. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. und K.-H. Schleifer (Hrsg.). *The procaryotes*. 2. Auflage. Springer-Verlag, New York Inc. pp 921-995.
- Krekeler, C.** 1990. Einfluß der Oberflächeneigenschaften von Mikroorganismen auf die Adsorption an porösen Trägermaterialien und deren Anwendung als Immobilisierungsmatrix. Dissertation. Universität Braunschweig.
- Kroppenstedt, R.M.** 1979. Chromatographische Identifizierung von Mikroorganismen, dargestellt am Beispiel der Actinomyceten. *Kontakte.* **2**:12-21.
- Lacey, J.** 1988. Actinomycetes as biodeteriogens and pollutants of the environment. In: *Actinomycetes in biotechnology*. Goodfellow, M; Williams, S.T. und M. Mordarski (Hrsg.). pp 359-432. Academic Press. London.
- Langille, S.E. und R.M. Weiner.** 1998. Spatial and temporal deposition of *Hyphomonas* strain VP-6 capsules involved in biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2906-2913.
- Lechevalier, H.A.** 1989. Nocardioform actinomycetes. In: Williams, S.T., Sharpe, M.E. und J.G. Holt (Hrsg.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 4 pp 2348-2404. Williams & Wilkins, Baltimore. U.S.A.
- Lechevalier, M.P. und H.A. Lechevalier.** 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **20**:435-443.
- Lechner, U.; Baumbach, R.; Becker, D.; Kitunen, V.; Auling, G. und M. Salkinoja-Salonen.** 1995. Degradation of 4-chloro-2-methylphenol by an activated sludge isolate and its taxonomic description. *Biodegradation.* **6**:83-92.
- Lee, S.D.; Kim, E.S. und Y.C. Hah.** 2000. Phylogenetic analysis of the genera *Pseudonocardia* and *Actinobispora* based on 16S ribosomal DNA sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* **188**:125-129.
- Lehninger, A.L.; Nelson, D.L. und M.M. Cox.** 1994. *Prinzipien der Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg. 2. Auflage.

- Li, X-Z.; Zhang, L. und K. Poole.** 1998. Role of the multidrug efflux systems of *Pseudomonas aeruginosa* in organic solvent tolerance. *J. Bacteriol.* **180**:2987-2991.
- Lide, D.R.** 1995. CRC Handbook of chemistry and physics. D.M. Lide (Hrsg.). 76. Auflage. Kapitel 16, pp 25-26. CRC Press, Boca Raton, U.S.A.
- Ludwig, W. und K.-H. Schleifer.** 1999. Phylogeny of *bacteria* beyond the 16S rRNA standard. *ASM News.* **65**:752-757.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M. und J. Parker.** 1997. Brock: Biology of microorganisms. Prentice Hall, U.S.A.
- Malvern Instruments.** 1996. Handbuch. Zetasizer 1000/2000/3000. Malvern, England.
- Marshall, K.C.** 1991. The importance of studying microbial cell surfaces. In: Mozes, N., Handley, P.S., Busscher, H.J., und P.G. Rouxhet (Hrsg.): Microbial cell surface analysis: structural and physicochemical methods. pp 3-19. VCH Publishers, Inc., New York, U.S.A.
- Marshall, K.C.** 1992. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity, and control at surfaces. *ASM News.* **58**:202-207.
- Martiensen, M.** 2000a. Leistungen immobilisierter Mikroorganismen bei der Eliminierung von Umweltschadstoffen. Habilitationsschrift, in Vorbereitung. Institut für Biotechnologie. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Martiensen, M.** 2000b. Surface and adhesive properties of bacteria from different origin. *Water Res.* Im Druck.
- Martiensen, M. und S. Schübb.** 1998. Der Einfluß geladener Oberflächen bei der Anreicherung und Selektion von Mikroorganismen für den Abbau methylierter Phenole. *gwf-Wasser/Abwasser.* **139**:214-219.
- Martiensen, M.; Reichel, O. und U. Kohlweyer.** 2000. Impact of environmental conditions to surface properties of bacteria from different origin. Biodegradation. Im Druck.
- Marusyk, R. und A. Sergeant.** 1980. A simple method for dialysis of small-volume samples. *Anal. Biochem.* **105**:403-404.

- McEldowney, S. und M. Fletcher.** 1986. Variability of the influence of physicochemical factors affecting bacterial adhesion to polystyrene substrata. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**:460-465.
- McVeigh, H.P.; Munro, J. und T.M. Embley.** 1994. The phylogenetic position of *Pseudoamycolata halophobica* (Akimov et al. 1989) and a proposal to reclassify it as *Pseudonocardia halophobica*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:300-302.
- Mercer, D.K.; Iqbal, M.; Miller, P.G.G. und A.J. McCarthy.** 1996. Screening actinomycetes for extracellular peroxidase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2186-2190.
- Merker, R.I. und J. Smit.** 1988. Characterization of the adhesive holdfast of marine and freshwater caulobacters. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2078-2085.
- Miozzari, G.F.; Niederberger, P. und R. Hütter.** 1978. Permeabilization of microorganisms by Triton.X-100. *Anal. Biochem.* **90**:220-233.
- Miura, A. und H. Dalton.** 1995. Purification and characterization of the alkene monooxygenase from *Nocardia corallina* B-276. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**:853-859.
- Mo, K.; Lora, C.O; Wanken, A.E.; Javanmardian, M.; Yang, X. und C.F. Kulpa.** 1997. Biodegradation of methyl t-butyl ether by pure bacterial cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**:69-72.
- Møller, S.; Sternberg, C.; Andersen, J.B.; Christensen, B.B.; Ramos, J.L.; Givskov, M. und S. Molin.** 1998. *In situ* gene expression in mixed-culture biofilms, evidence of metabolic interactions between community members. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:721-732.
- Mozes, N. und P.G. Rouxhet.** 1987. Methods for measuring hydrophobicity of microorganisms. *J. Microbiol. Meth.* **6**:99-112.

- Murray, R.G.E.; Doetsch, R.N. und C.F. Robinow.** 1994. Determinative and cytological light microscopy. In: Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A. und N.R. Krieg (Hrsg.): Methods for general and molecular bacteriology. ASM, Washington, D.C., U.S.A.
- Neufeld, R.J.; Zajic, J.E. und D.F. Gerson.** 1980. Cell surface measurements in hydrocarbon and carbohydrate fermentations. Appl. Environ. Microbiol. **39**:511-517.
- Neumann, A.W.; Good, R.J.; Ehrlich, P.; Basu, P.K. und G.J. Johnston.** 1973. The temperature dependence of the surface tension of solutions of atactic polystyrene. J. Macromol. Sci. Phys. **7**:525-537.
- Nikaido, H.** 1996. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. J. Bacteriol. **178**:5853-5859.
- Noda, Y. und Y. Kanemasa.** 1984. Determination of surface charge of some bacteria by colloid titration. Physiol. Chem. Phys. Med. NMR. **16**:263-274.
- Norde, W. und J. Lyklema.** 1989. Protein adsorption and bacterial adhesion to solid surfaces: a colloid-chemical approach. Colloids Surf. **38**:1-13.
- Ohe, T. und V. Watanabe.** 1979. Purification and properties of xanthine dehydrogenase from *Streptomyces cyanogenus*. J. Biochem. **86**:45-53.
- Olsen, G.L.; Woese, C.R. und R. Overbeek.** 1994. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. J. Bacteriol. **176**:1-6.
- Olssen, J.; Glantz, P.O. und B. Krasse.** 1976. Electrophoretic mobility of oral streptococci. Arch. Oral. Biol. **21**:605-609.
- Painter, H.A. und E.F. King.** 1985. Ring test programme. Assessment of biodegradability of chemicals in water by nanometric respirometry. Final report. Comm. Eur. Communities. Contract No. XI/W/83/238.
- Parales, R.E.; Adamus, J.E.; White, N. und H.D. May.** 1994. Degradation of 1,4-dioxane by an actinomycete in pure culture. Appl. Environ. Microbiol. **60**:4527-4530.
- Paulsen, I.T.; Brown, H. und R.A. Skurray.** 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. Microbiol. Rev. **60**:575-608.

- Pelletier, C.; Bouley, C.; Cayuela, C.; Bouttier, S.; Bourlioux, P. und M.-N. Bellon-Fontaine.** 1997. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* Strains. Appl. Environ. Microbiol. **63**:1725-1731.
- Perzl, M.; Müller, P.; Poralla, K. und E.L. Kannenberg.** 1997. Squalene-hopene cyclase from *Bradyrhizobium japonicum*: cloning, expression, sequence analysis and comparison to other triterpenoid cyclases. Microbiology. **143**:1235-1242.
- Peterson, J.A., und J.-Y. Lu.** 1991. Bacterial cytochromes P450: isolation and identification. In: Methods in Enzymology. **206**:612-620.
- Phillips, A.T.** 1994. Enzymatic activity. In: Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A. und N.R. Krieg (Hrsg.): Methods for general and molecular bacteriology. ASM Press, Washington, D.C., U.S.A.
- Poralla, K.** 1998. Die Struktur der Squalen-Hopen-Cyclase. BIOSpektrum. **4**(4):32-34.
- Poralla, K.; Härtner, T. und E. Kannenberg.** 1984. Effect of temperature and pH on the hopanoid content in *Bacillus acidocaldarius*. FEMS Microbiol. Lett. **23**:253-256.
- Poupin, P.; Truffaut, N.; Combourieu, B., Besse, P.; Sancelme, M.; Veschambre, H. und A.M. Delort.** 1998. Degradation of morpholine by an environmental *Mycobacterium* strain involves a cytochrome P-450. Appl. Environ. Microbiol. **64**:159-165.
- Powlowski, J. und V. Shingler.** 1990. In vitro analysis of polypeptide requirements of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. J. Bacteriol. **172**:6834-6840.
- Prior, S.D. und H. Dalton.** 1985. The effect of copper ions on membrane content and methane monooxygenase activity in methanol-grown cells of *Methylococcus capsulatus* (Bath). J. Gen. Microbiol. **131**:155-163.
- Quintero, E.J.; Busch, K. und R.M. Weiner.** 1998. Spatial and temporal deposition of adhesive extracellular polysaccharide capsule and fimbriae by *Hyphomonas* strain MHS-3. Appl. Environ. Microbiol. **64**:1246-1255.

- Ramos, J.L.; Duque, E.; Rodriguez-Herva, J.-J.; Godoy, P.; Haidour, A.; Reyes, F. und A. Fernandez-Barrero.** 1997. Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. *J. Biol. Chem.* **272**:3887-3890.
- Rehm, H.-J.** 1990. Besondere Eigenschaften immobilisierter Mikroorganismen beim Abbau von Problemsubstanzen. *gwf-Wasser/Abwasser.* **131**:46-51.
- Reichert, K.; Lipski, A.; Pradella, S.; Stackebrandt, E. und K. Altendorf.** 1998. *Pseudonocardia asaccharolytica* sp. nov. and *Pseudonocardia sulfidoxydans* sp. nov., two new dimethyl disulfide-degrading actinomycetes and emended description of the genus *Pseudonocardia*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:441-449.
- Rhee, S.-K.; Lee, G.M.; Kim, Y.B. und S.-T. Lee.** 1996. Effect of pyridine on the fatty acid composition of *Pimelobacter* sp. *FEMS Microbiol. Lett.* **141**:139-143.
- Rijnaarts, H.H.M.; Norde, W.; Bouwer, E.J.; Lyklema, J. und A.J.B. Zehnder.** 1993. Bacterial adhesion under static and dynamic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3255-3265.
- Römpp, H.** 1990. Römpp Chemie Lexikon. In: Falbe, J. und R. Regnitz (Hrsg.). Georg ThiemeVerlag Stuttgart, New York. 9. Auflage.
- Rosenberg, M.; Gutnick, G. und E. Rosenberg.** 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* **9**:29-33.
- Rosenberg, M. und S. Kjelleberg.** 1986. Hydrophobic interactions: role in bacterial adhesion. *Microbiol. Ecol.* **9**:353-393.
- Sahm, H.; Rohmer, M.; Bringer-Meyer, S.; Sprenger G.A. und R. Welle.** 1993. Biochemistry and physiology of hopanoids in bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.* **35**:247-273.
- Sander, E.** 1992. Abbau von Derivaten des Tetrahydrofurans durch *Rhodococcus* sp. Diplomarbeit. Universität Hannover.
- Sanger, F.; Nickler, S. und A.R. Coulsen.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**:5463-5467.

- Sariaslani, F.S.** 1991. Microbial cytochromes P-450 and xenobiotic metabolism. *Adv. Appl. Microbiol.* **60**:133-178.
- Sawada, H.; Ieki, H.; Oyaizu, H. und S. Matsumoto.** 1993. Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**:694-702.
- Segura, A.; Duque, E.; Mosqueda, G.; Ramos, J.L. und F. Junker.** 1999. Multiple reponses of gram-negative bacteria to organic solvents. *Environ. Microbiol.* **1**:191-198.
- Schaule, G.** 1992. Bakterielle Adhäsion und Aggregation auf inerten Oberflächen: ihre Rolle bei der Bildung von Biofilmen auf Umkehrosiose-Membranen. Dissertation. Universität Stuttgart.
- Schlegel, H.G.** 1992. Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 7. Auflage.
- Schröder, H.** 1987. Mikrobiologisches Praktikum. Volk und Wissen, Berlin. 4. Auflage.
- Schulz, J.** 1993. Der Einfluß des Trägermaterials auf die Leistungsfähigkeit von Biofilmsystemen zur Abwasserreinigung. *Korrespondenz Abwasser.* **40**:68-73.
- Serva.** 1989. Produktkatalog. Serva, Heidelberg.
- Sikkema, J.; de Bont, J.A.M. und B. Poolman.** 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* **59**:201-222.
- Sitte, P.; Noll, F.; Schenck, H. und A.F.W. Schimper.** 1991. Strasburger: Lehrbuch der Botanik. G. Fischer Verlag, Stuttgart, Jena New York. 33. Auflage
- Slater, J.H. und A.T. Bull.** 1978. Interactions between microbial populations. In: Bull, A.T. und P.M. Meadow (Hrsg.): *Companion to microbiology - selected topics for future study.* Longman, London und New York.
- Smibert, R.M. und N.R. Krieg.** 1994. Phenotypic characterization. In: Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A. und N.R. Krieg (Hrsg.): *Methods for general and molecular bacteriology.* ASM Press, Washington, D.C., U.S.A.

- Snel, J.; Blok, H.J.; Kengen, H.M.P.; Ludwig, W.; Poelma, F.G.J.; Koopman, J.P. und A.D.L. Akkermans.** 1994. Phylogenetic characterization of *Clostridium* related segmented filamentous bacteria in mice based on 16S ribosomal RNA analysis. *System. Appl. Microbiol.* **17**:172-179.
- Spallek, R.** 1998. Charakterisierung der Tetrahydrofuran-Monooxygenase aus *Rhodococcus ruber* 219. Dissertation. Universität Hannover.
- Stackebrandt, E.; Rainey, F.A. und N.L. Ward-Rainey.** 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria classis* nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:479-491.
- Steffan, R.J.** 1998. Propan-oxidierende Bakterien bauen MTBE ab. *Chemie Ingenieur Technik.* **70**:1581.
- Stronach, S.M.; Diaz-Baez, M.C.; Rudi, T. und J.N. Lester.** 1987. Factors affecting biomass attachment during start-up and operation of anaerobic fluidized beds. *Biotechnol. Bioeng.* **30**:611-620.
- Süssmuth, R.; Eberspächer, J.; Haag, R. und W. Springer.** 1987. Biochemisch-mikrobiologisches Praktikum. Thieme Verlag.
- Sutherland, I.W.** 1985. Biosynthesis and composition of Gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. *Ann. Rev. Microbiol.* **39**:243-270.
- Swain, A.; Waterhouse, K.V.; Veneables, W.A.; Calley, A.G. und S.E. Lowe.** 1991. Biochemical studies of morpholine catabolism by an environmental *Mycobacterium*. **35**: 100-114.
- Sweet, S.P.; MacFarlane, T.W. und L.P. Samaranayake.** 1987. Determination of the cell surface hydrophobicity of oral bacteria using a modified hydrocarbon adherence method. *FEMS Microbiol. Lett.* **48**:159-163.
- Tamura, T.; Hayakawa, M. und K. Hatano.** 1997. A new genus of the order *Actinomycetales*, *Spirilliplanes* gen. nov., with description of *Spirilliplanes yamanashiensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:97-102.

Tanford, C. 1978. The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science*. **200**:1012-1018.

Thompson, J.D.; Higgins, D.G. und T.J. Gibson. 1994. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, position-gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-4680.

Thornley, R.N.F. 1974. A convenient electrochemical preparation of reduced methyl viologen and a kinetic study of the reaction with oxygen using an anaerobic stopped-flow apparatus. *Biochim. Biophys. Acta* **333**:487-496.

Trudgill, P.W. 1984. The microbial metabolism of furans. In: D.T. Gibson (Hrsg.). *Microbial degradation of organic compounds*. pp 295-308. Marcel Dekker, Inc. New York.

Tsitko, I.V.; Zaitsev, G.M.; Lobanok, A.G. und M.S. Salkinoja-Salonen. 1999. Effect of aromatic compounds on cellular fatty acids composition of *Rhodococcus opacus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:853-855.

Urbain, V.; Block, J.C. und J. Manem. 1993. Bioflocculation in activated sludge: an analytic approach. *Wat. Res.* **27**:829-838.

Uetz, T.; Schneider, R.; Snozzi, M. und T. Egli. 1992. Purification and characterization of a two-component monooxygenase that hydroxylates nitrilotriacetate from "*Chelobacter*" Strain ATTC 29600. *J. Bacteriol.* **174**:1179-1188.

Vandamme, P.; Pot, B.; Gillis, M.; De Vos, P.; Kersters, K. und J. Swings. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**:407-438.

Van der Mei, H.C.; Weerkamp, A.H. und H.J. Busscher. 1987. Physico-chemical surface characteristics and adhesive properties of *Streptococcus salivarius* strains with defined cell surface structures. *FEMS Microbiol. Lett.* **40**:15-19.

Van der Mei, H.C.; M. Rosenberg und H.J. Busscher. 1991. Assessment of microbial cell surface hydrophobicity. In: Mozes, N., Handley, P.S., Busscher, H.J., und P.G. Rouxhet (Hrsg.): *Microbial cell surface analysis: structural and physicochemical methods*. pp 263-287. VCH Publishers, Inc., New York, U.S.A.

- Vanhaecke, R. und J. Pijck.** 1988. Bioluminescence assay for measuring the number of bacteria adhering to the hydrocarbon phase in the BATH test. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1436-1439.
- Van Loosdrecht, M.C.M.; Lyklema, J.; Norde, W.; Schraa, G. und A.J.B. Zehnder.** 1987. Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:1898-1901.
- Van Loosdrecht, M.C.M.; Lyklema, J.; Norde, W. und A.J.B. Zehnder.** 1989. Bacterial adhesion: a physicochemical approach. *Microb. Ecol.* **17**:1-15.
- Van Loosdrecht, M.C.M.; Lyklema, J.; Norde, W. und A.J.B. Zehnder.** 1990a. Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol. Rev.* **54**:75-87.
- Van Loosdrecht, M.C.M.; Norde, W. und A.J.B. Zehnder.** 1990b. Physical chemical description of bacterial adhesion. *J. Biomater. Applic.* **5**:91-106.
- Van Oss, C.J.** 1995. Hydrophobicity of biosurfaces - origin, quantitative determination and interaction energies. *Colloids Surfaces B* **5**:91-110.
- Warwick, S.; Bowen, T.; McVeigh, H. und T.M. Embley.** 1994. A phylogenetic analysis of the family *Pseudonocardiaceae* and the genera *Actionkineospora* and *Saccharothrix* with 16S rRNA sequences and a proposal to combine the genera *Amycolata* and *Pseudonocardia* in an emended genus *Pseudonocardia*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:293-299.
- Wang, Z.; Bleakley, B.H.; Crawford, D.L.; Hertel, G. und F. Rafil.** 1990. Cloning and expression of a lignin peroxidase gene from *Streptomyces viridosporus* in *Streptomyces lividans*. **13**:131-144.
- Wanner, J. und P. Grau.** 1989. Identification of filamentous microorganisms from activated sludge: a compromise between wishes, needs and possibilities. *Wat. Res.* **23**:883-891.
- Weber, F.J. und J.A.M. de Bont.** 1996. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1286**:225-245.
- Weber, F.J.; Van Berkel, W.J.H.; Hartmans, S. und J.A.M. de Bont.** 1992. Purification and Properties of the NADH reductase component of alkene monooxygenase from *Mycobacterium* Strain E3. *J. Bacteriol.* **174**:3275-3281.

- Weber, F.J.; Isken, S. und J.A.M. de Bont.** 1994. *Cis/trans* isomerization of fatty acids as a defence mechanism of *Pseudomonas putida* strains to toxic concentrations of toluene. *Microbiology* **140**:2013-2017.
- Weisburg, W.G.; Barns, S.M.; Pelletier, D.A. und D.J. Lane.** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173** :697-703.
- White, G.F.; Russel, N.J. und E.C. Tidswell.** 1996. Bacterial scission of ether bonds. *Microbiol. Rev.* **60**:216-232.
- Whited, G.M. und D.T. Gibson.** 1991. Toluene-4-monooxygenase, a three-component enzyme system that catalyzes the oxidation of toluene to p-cresol in *Pseudomonas mendocina* KR1. *J. Bacteriol.* **173**:3010-3016.
- Widdel, F.G.; Kohring, G.W. und F. Mayer.** 1983. Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. Characterization of the filamentous gliding *Desulfonema limicola* gen. nov. sp. nov. and *Desulfonema magnum* sp. nov. *Arch. Microbiol.* **134**:286-294.
- Wieser, M.; Wagner, B.; Eberspächer, J. und F. Lingens.** 1997. Purification and characterization of 2,4,6-trichlorophenol-4-monooxygenase, a dehalogenating enzyme from *Azotobacter* sp. strain GP1. *J. Bacteriol.* **179**:202-208.
- Woese, C.R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**:221-271.
- Xun, L.** 1996. Purification and characterization of chlorophenol 4-monooxygenase from *Burkholderia cepacia* AC1100. *J. Bacteriol.* **178**:2645-2649.
- Zahn, J.A. und A.A. DiSpirito.** 1996. Membrane-associated methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J. Bacteriol.* **178**:1018-1029.
- Zenner, P.T.** 1997. Analyse von umweltrelevanten Schadstoffen in wäßrigen Systemen mittels Headspace-Festphasenmikroextraktion. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Ziegler, D.M.** 1988. Flavin-containing monooxygenases: catalytic mechanism and substrate specificities. *Drug Metabol. Rev.* **19**:1-32.

Zita, A. und M. Hermansson. 1997. Effects of bacterial cell surface structures and hydrophobicity on attachment to activated sludge flocs. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1168-1170.

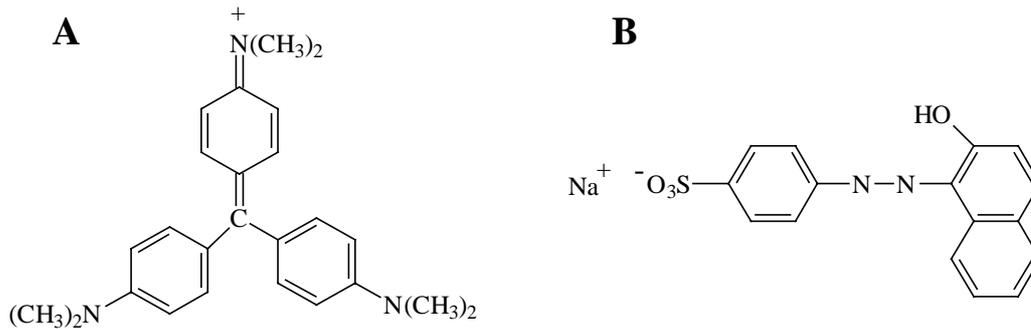


Abb. A: Chemische Strukturformeln für A) Kristallviolett und B) Orange II

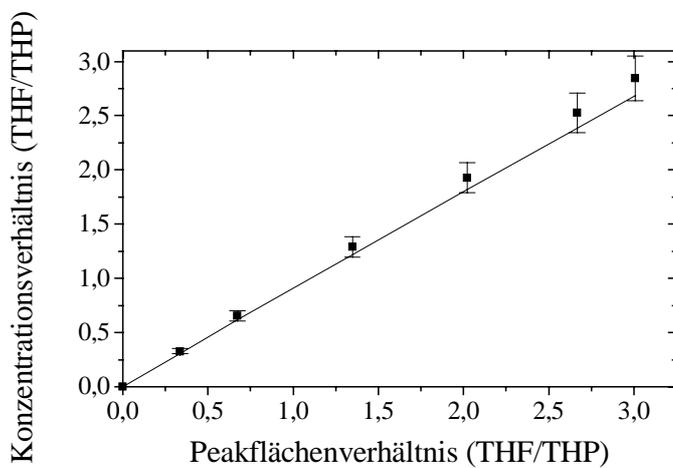


Abb. B: Kalibrierungsgerade. Kapillarsäule SPB-1701. Lineare Regression für THF im Bereich von 0 bis 45,11 ng/0,1 μ l (gelöst in H₂O dest) und einer Standardabweichung von 7,25 % (Korrelationskoeffizient = 0,99997). Aufgetragen ist der Peakflächenquotient von THF und THP (interner Standard).

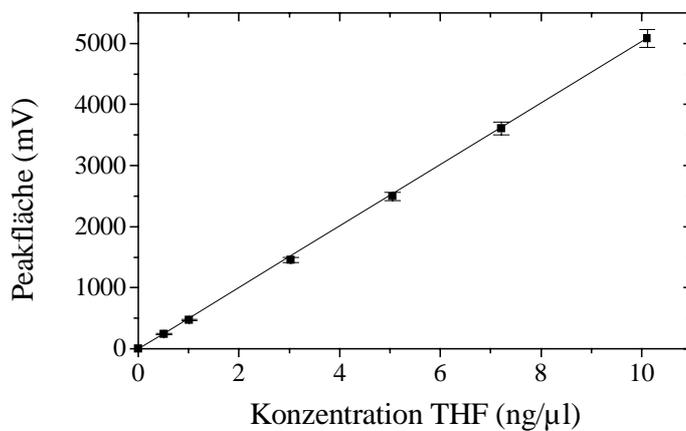


Abb. C: Kalibrierungsgerade. Kapillarsäule SPB-35. Lineare Regression für THF im Bereich von 0 bis 10,11 ng THF/ μ l (gelöst in H₂O dest) und einer Standardabweichung von 2,9 % (Korrelationskoeffizient = 0,99991). Aufgetragen ist die THF-Peakfläche gegen die THF-Konzentration. Ohne internen Standard.

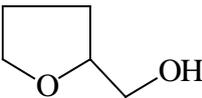
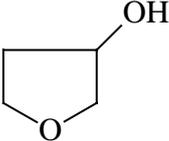
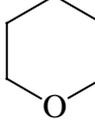
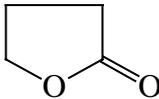
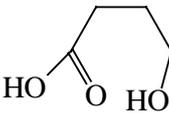
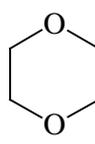
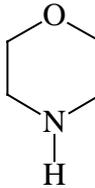
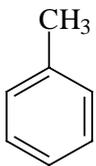
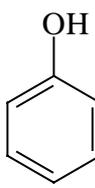
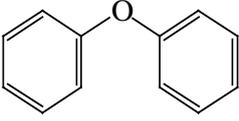
Substrat	Wachstum	Substrat	Wachstum
Tetrahydrofuran 	+	Tetrahydrofurfurylalkohol 	-
2,3-Dihydrofuran 	+	2,5-Dihydrofuran 	-
3-Hydroxy-Tetrahydrofuran 	+	Tetrahydropyran 	-
γ -Butyrolacton 	+	Tetrahydrothiophen 	-
4-Hydroxy-Buttersäure 	+	1,4-Dioxan 	-
Diethylether $(\text{CH}_2\text{H}_5)_2\text{O}$	+	Morpholin 	-
Toluol 	+	Diisopropylether $(\text{CH}_3)_4(\text{CH}_2)_2\text{O}$	-
		Phenol 	-
		Diphenylether 	-

Abb. D: Einige untersuchte Substrate, die Stamm K1 als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle angeboten wurden.

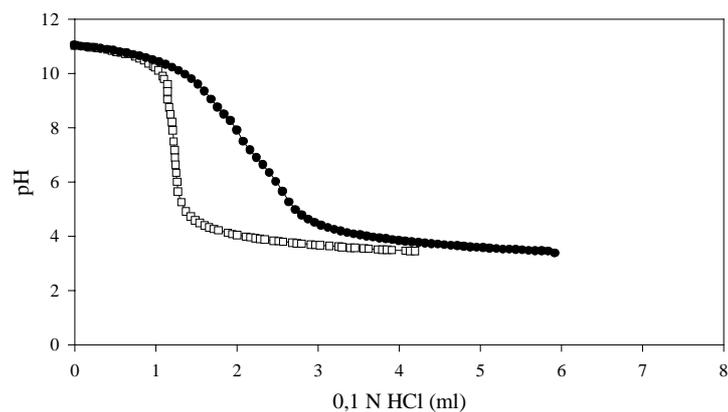


Abb. E: Titrationskurve (Kap. 2.8.8.1). Gezeigt sind die Titrationskurven der Kontrolle (Saline) □ und der Probe (Zellen des Stamms K1 aus der stationäre Wachstumsphase; 5 g ZTG/l) ●. Die Konzentration (mmol HCl/g ZTG) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration (mmol HCl/g ZTG)} = \frac{\text{Differenz HCl (ml)} \times 0,1 \text{ mmol}}{\text{ZTG (g)}}$$

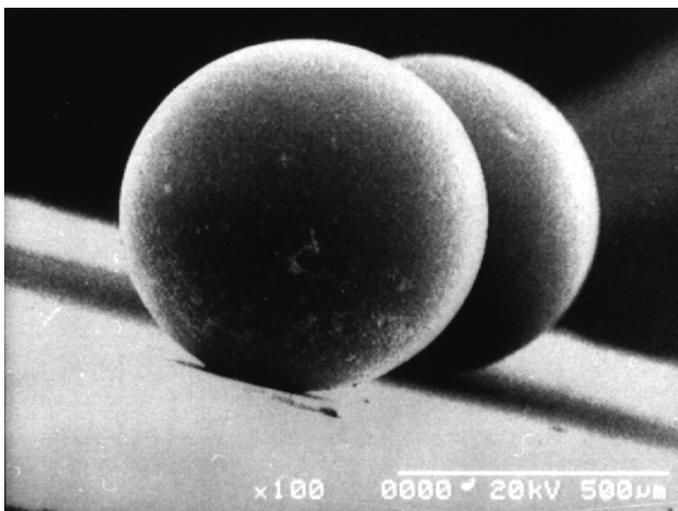


Abb. F: Partiiell mit Stamm K1 bewachsene Lewatit OC 1066 Trägerkugeln nach 48 h Inkubation.

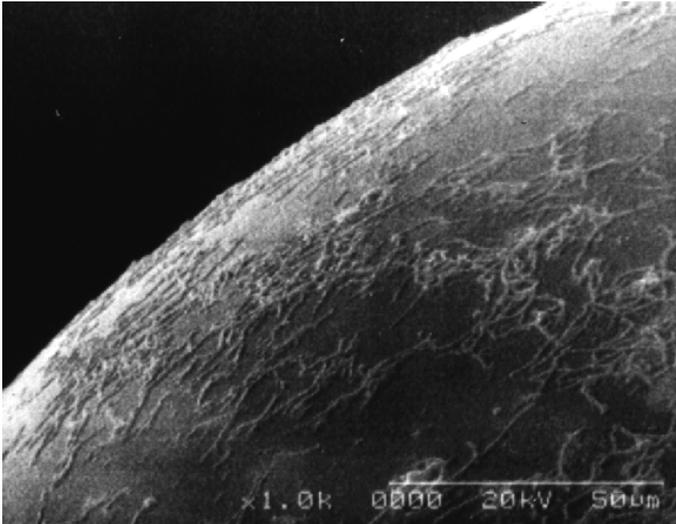


Abb. G: Stamm K1 überspannt die Oberfläche des Trägermaterials OC 1066 nach 48stündiger Inkubation.

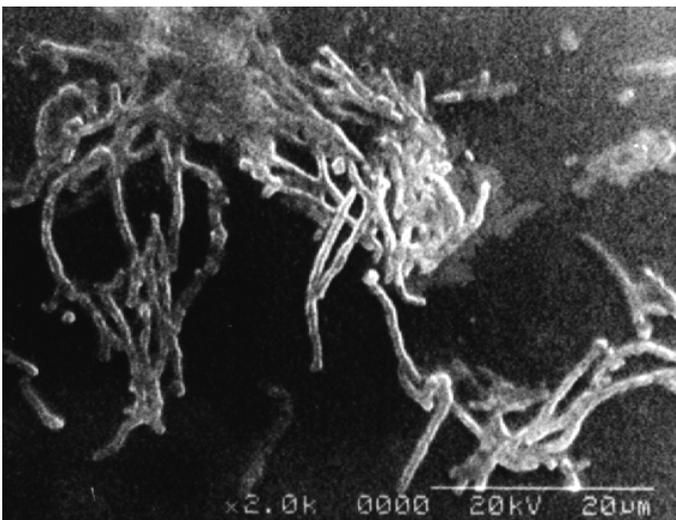


Abb. H: Nahaufnahme der Bakterienkultur Stamm K1 angeheftet am Träger OC 1066 nach 48stündiger Inkubation.

Tabelle A: Verwendete Primer für die Sequenzierung der 16S rDNA des Stamms K1.

Interne Institutsbe- zeichnung	Literaturbe- zeichnung	Sequenz 5' → 3'	Position entsprechend der <i>E. coli</i> Numerierung (Brosius, 1978)	Literatur	
826	fD1	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	8 - 27	Weisburg et al., 1991	
827	rP2	ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT	1511 - 1491	Weisburg et al., 1991	
	SP6	ATT TAG GTG ACA TAT AGA ATA C			
	T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GA			
858		GCA ACG AGC GCA ACC C	1099 - 1114	Sawada et al., 1993	
860		CTG CTG CCT CCC GTAG	357 - 342	Sawada et al., 1993	
862		ATT AGA TAC CCT GGT A	787 - 802	Sawada et al., 1993	
908		GTG CCA GCA GCC GCG G	515 - 530	Sawada et al., 1993	
796		GGG TTG CGC TCG TTG	1114 - 1100	Snel et al., 1994	
	M13 Universal / Forward	CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT			pGEM [®] -T Easy Vector 2959 - 2975
	M13 Reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC			pGEM [®] -T Easy Vector 192 - 176
U3F		GCT TGT TGG TGG GGT GAT GG	216 - 236		
U3R		GCT GGC GTT CGG GTG TCA AT	638 - 618		

Danksagung

Herrn Prof. Dr. J.R. Andreesen danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und für sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Für Ihre Unterstützung und sehr konstruktive Ideen danke ich Frau Dr. U. Lechner. Frau Dr. M. Martienssen vom Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg danke ich für die interessante Zusammenarbeit, Betreuung und die vielen Diskussionen.

Die Fettsäureanalyse wurde von Herrn Prof. Dr. R.M. Kroppenstedt von der DSMZ in Braunschweig durchgeführt. Der Nachweis und die Identifizierung von Hopanoiden wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. K. Poralla des Biologischen Instituts Mikrobiologie/Biotechnologie der Universität Tübingen durchgeführt, wofür ich mich herzlich bedanke.

Ich danke Herrn T. Zenner und Frau Dr. A. Kraus vom Institut für Analytik und Umweltchemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die Messung der Proben mit GC/FID/Headspace. Die Messungen der Reduktaseaktivitäten erfolgten in Zusammenarbeit mit Frau B. Thiemer. Für die Durchführung der Rasterelektronenmikroskopie danke ich Herrn Dr. G. Tschuch vom Institut für Zoologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Die Messungen mit Orange II und Ruthenium Red wurden von Frau J. Schrader vom Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt. Die Messungen der Reduktaseaktivitäten wurden in Zusammenarbeit mit Frau B. Thiemer durchgeführt. Danken möchte ich Frau Dr. K. Fritsche, die mir die Auswertung der 16S rDNA Gen-Analyse erklärte.

Herrn Prof. Dr. H. Diekmann (Universität Hannover) danke ich für seinen Erstvorschlag zur Aufnahme in das Doktorandenförderungsprogramms der Studienstiftung des deutschen Volkes. Herrn Prof. Dr. Andreesen danke ich, daß er diesen Vorschlag unterstützte.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes danke ich für die gewährte ideelle und finanzielle Unterstützung. Dem Land Sachsen-Anhalt danke ich für die finanzielle Unterstützung durch die Drittmittelfinanzierung des Projekts „Mikrobiologischer Abbau der zyklischen Ether Tetrahydrofuran (THF) und Tetrahydrofurfurylalkohol (THFA)“.

Herrn Dr. O. Kuhlmann danke ich dafür, daß er meine Arbeit unterstützend begleitete. Meiner Mutter danke ich für ihre moralische Unterstützung und ihr großes Engagement als Großmutter. Meiner Tochter Ann-Kathrin danke ich, daß sie viele Stunden ohne ihre Mutter auskam.

Lebenslauf

Name: Kohlweyer
Vorname: Renate Ulrike
Geburtsdatum: 14. September 1968
Geburtsort: Hannover
Schulausbildung: 1975-1988 Freie Waldorfschule, Hannover
Schulabschluß: Abitur
Ausbildung: 1988-1989 Ausbildung zur Fremdsprachenkorrespondentin
WS 1989 Aufnahme des Studium der Biologie (Diplom) an der Universität Hannover
1991 Diplomvorprüfung
1992-1993 Studienaufenthalt in den U.S.A. als Stipendiatin an der Michigan Technological University, Houghton, Michigan
1993 Abschluß des Graduate Programs mit dem Master of Science in Biological Sciences (M.S.). Titel der Diplomarbeit: „Isolation and characterization of microorganisms from a petroleum hydrocarbon contaminated soil“ (Betreuerin: Prof. Dr. S.T. Bagley)
WS 1994 Beginn der Promotion an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Betreuer: Prof. Dr. J.R. Andreesen)
1995 Aufnahme in das Doktorandenförderungsprogramm der Studienstiftung des deutschen Volkes
1997 Reisestipendium der American Society of Microbiology (ASM), Posterpräsentation auf der Jahrestagung der ASM in Miami, U.S.A.
2000 Abgabe der Dissertationsschrift

Halle, im März 2000

Ich versichere, daß ich die vorliegende
Arbeit selbständig angefertigt, die benutzten
Hilfsmittel vollständig angegeben und die den
benutzten Werken entnommene Stellen als
solche gekennzeichnet habe.

Halle/Saale, im März 2000

Fachbereich Biologie
Institut für Mikrobiologie

Isolierung und Charakterisierung eines Tetrahydrofuran abbauenden *Pseudonocardia* sp.

Thesen zur Dissertation

von Dipl.-Biol. Ulrike Kohlweyer

Tetrahydrofuran (THF) ist ein O-heterozyklischer Ether, der in großem Maße in der chemischen Industrie als Lösungsmittel eingesetzt wird. Erst wenige Veröffentlichungen berichten von einem bakteriellen THF-Abbau.

Aufgabenstellung

- Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine vorhandene Mischkultur an höhere, *in situ* relevante Tetrahydrofuran (THF) -Konzentrationen zu adaptieren und das für den THF-Abbau verantwortliche Bakterium in Reinkultur zu isolieren, um die zugrunde liegende Stoffwechselaktivität einem charakterisierbaren Bakterium zuordnen zu können.
- Das THF abbauende Isolat sollte taxonomisch und wachstumsphysiologisch charakterisiert werden.
- Da das Wachstum mit Ether einem Lösungsmittelstreß entspricht, sollte das Wachstumsverhalten unter verschiedenen Streßbedingungen untersucht werden, um herauszufinden, inwieweit das Bakterium auf diese untersuchten Stressoren wachstumsphysiologisch reagiert.

- Einleitende enzymatische Untersuchungen sollten klären, ob eine THF abhängige enzymatische Aktivität in wachsenden, ruhenden und permeabilisierten Zellen nachgewiesen werden kann, da aus Untersuchungen von Bernhardt (1991) und Bock (1994) abgeleitet werden konnte, daß mit einer geringen und instabilen Enzymaktivität gerechnet werden mußte. Für die Reinigung und Charakterisierung eines Enzyms sind diese Voruntersuchungen wichtig, um so Aussagen über dessen Stabilität im zellfreien Extrakt zu erhalten.
- Für einen möglichen biotechnologischen Einsatz zur Reinigung THF haltiger Abwasser wäre es vorteilhaft, das THF abbauende bakterielle Isolat mittels Adhäsion- oder Zelleinschlußmethoden zu immobilisieren.
- In Vorversuchen sollten die physikochemischen Zelleigenschaften, die die primäre Adhäsion beeinflussen, untersucht werden, um Voraussagen zum möglichen Adhäsionsverhalten machen zu können. Des weiteren sollte untersucht werden, inwieweit das angebotene Substrat die physikochemischen Eigenschaften der Zelloberfläche beeinflusste.
- Für den quantitativen Nachweis des THFs mußte eine gaschromatographische Methode erarbeitet werden.

Zusammenfassung

- 1. In der vorliegenden Arbeit wurde eine THF abbauende Mischkultur mit *in situ* vorkommenden THF-Konzentrationen ≥ 50 mM kultiviert und das für den THF-Abbau verantwortliche Bakterium isoliert.
- 2. Die Mischkultur bestand aus vier verschiedenen bakteriellen Isolaten, von denen drei Gram-negativ und eins Gram-positiv färbten. Das Gram-positiv Isolat Stamm K1 war allein für den beobachteten THF-Abbau verantwortlich. Erste taxonomische Untersuchungen dieses THF abbauenden Bakteriums erlaubten dessen Zuordnung in die

Familie *Pseudonocardiaceae* (Ordnung *Actinomycetales*). Durch Sequenzierung der 16S rDNA konnte der Stamm als eine Art der Gattung *Pseudonocardia* identifiziert werden.

- 3. Der in dieser Arbeit isolierte und taxonomisch charakterisierte *Pseudonocardia* Stamm K1 wuchs mit THF in Mineralmedium als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle bis zu Konzentrationen von 70 mM. Dies ist eine signifikante Steigerung zu den bisher beschriebenen bakteriell verstoffwechselten THF-Konzentrationen. Damit wurde ein Bakterium beschrieben, das das Potential besitzt, in mit THF stark verunreinigten Abwassern zur Reinigung eingesetzt zu werden. Die Fähigkeit des THF-Abbaus wird stabil weitervererbt. Untersuchungen des Substratspektrums zeigten weiterhin, daß das isolierte Bakterium auch noch andere Ether, wie Diethylether, als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen kann. Auch Toluol wird als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt.
- 4. Im postulierten THF-Abbauweg soll eine Monooxygenase den einleitenden Schritt katalysieren (Bernhardt und Diekmann, 1991). Durch Wachstumsversuche und Aufnahme von Differenzspektren wurde ausgeschlossen, daß eine Cytochrom-P-450-Monooxygenase im THF-Abbauweg des isolierten *Pseudonocardia* Stamms involviert ist. Weitere enzymatische Untersuchungen ergaben, daß ein THF-Abbau in ruhenden und permeabilisierten Zellen, nicht aber in Rohextrakten, auch wenn sehr unterschiedliche Testbedingungen gewählt wurden, detektiert wurde. Weitere enzymatische Arbeiten gingen von der Tatsache aus, daß Oxygenasen eine Oxygenase- und eine Reduktasekomponente besitzen. Für die Messung von NADH abhängigen Reduktaseaktivitäten mit künstlichen Elektronenakzeptoren wurden Zellen des isolierten *Pseudonocardia* Stamms mit THF oder Succinat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle angezogen, die Rohextrakte an einem Anionenaustauscher chromatographiert und die Fraktionen mit verschiedenen Elektronenakzeptoren überprüft. Es konnte nachgewiesen werden, daß Zellen, die mit THF angezogen worden waren, eine zusätzliche NADH abhängige Cytochrom-c-Reduktaseaktivität besaßen. Mit Succinat angezogene Zellen besaßen diese NADH abhängige Cytochrom-c-Reduktaseaktivität nicht.
- 5. In Trägeradsorptionsversuchen wurde die höchste Trägerbeladung mit Zellen des in dieser Arbeit isolierten *Pseudonocardia* Stamms mit einem ungeladenen hydrophoben

Trägermaterial erreicht. Es wurde auch gezeigt, daß dieses Bakterium mittels Alginateinschlußverfahren immobilisiert werden konnte und daß es seine THF-Abbaufähigkeit durch den Einschluß nicht verlor.