

Institut für Angewandte Mikrobiologie
der Justus-Liebig-Universität Giessen
Prof. Dr. Dr.-Ing. P. Kämpfer

**Nachweis von PAK-metabolisierenden
Mikroorganismen durch kulturelle und
molekularbiologische Verfahren**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades des
Naturwissenschaftlichen Fachbereiches (Fachbereich Biologie)
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Vorgelegt von
Svenja Meyer
aus Hamburg

Giessen 1999

D26

Dekan: Prof. Dr. R. Renkawitz
1. Gutachter: Prof. Dr. G. Klug
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr.-Ing. P. Kämpfer

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Oktober 1999

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 ENTSTEHUNG UND TOXIKOLOGIE DER POLYAROMATISCHEN KOHLENWASSERSTOFFE	1
1.2 MIKROBIOLOGISCHER PAK-ABBAU.....	2
1.3 ORGANISATION UND EVOLUTION DER GENE, DIE FÜR DIE ENZYME DES PAK-ABBAUS CODIEREN	8
1.4 DETEKTION VON PAK-ABBAUPOTENTIAL	10
1.4.1 Struktur und Gensequenzen der initialen PAK-Dioxygenase	11
1.4.2 Struktur und Gensequenzen der Catechol 2,3-Dioxygenase	11
1.4.3 Probleme bei der universellen Detektion der katabolischen Gene.....	14
1.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	15
2 MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 VERWENDETE BAKTERIENSTÄMME UND PLASMIDE.....	17
2.2 HÄUFIG VERWENDETE MEDIEN, LÖSUNGEN UND PUFFER	18
2.3 HÄUFIG VERWENDETE ARBEITSMITTEL UND GERÄTE.....	19
2.4 STAMMHALTUNG	19
2.5 UMWELTPROBEN.....	19
2.6 FIXIERUNG VON UMWELTPROBEN UND BAKTERIENSTÄMMEN	20
2.6.1 Zellfixierung mit para-Formaldehyd	20
2.6.2 Zellfixierung mit Ethanol	21
2.6.3 Schnellfixierung von Bakterienzellen	21
2.7 GANZZELL- UND IN SITU-HYBRIDISIERUNG.....	21
2.8 MARKIERUNG VON OLIGONUKLEOTIDSONDEN	23
2.8.1 Verwendete rRNA-gerichtete Oligonukleotidsonden.....	23
2.8.2 Markierungsreaktionen.....	24
2.8.3 Abtrennung des nicht umgesetzten Farbstoffes.....	25
2.8.4 Gelelektrophoretische Abtrennung der markierten von den unmarkierten Oligonukleotiden	25
2.8.5 Entsalzung und Aufkonzentrierung der Markierungsansätze.....	27
2.8.6 Photometrische Vermessung der markierten Oligonukleotide	28
2.9 QUANTITATIVE BESTIMMUNGEN VON MIKROORGANISMEN IN UMWELTPROBEN	28
2.9.1 Quantifizierung aerober und fakultativ anaerober heterotropher Mikroorganismen.....	28
2.9.2 Gesamtzellzahlbestimmung nach DAPI-Färbung.....	29
2.9.3 Quantifizierung stoffwechseltaktiver Bakterien durch Vitalfärbung mit CTC	30
2.9.4 Quantifizierung stoffwechseltaktiver Bakterien durch in situ-Hybridisierung und DAPI-Färbung	30
2.9.5 Quantifizierung Naphthalin- und Phenanthren-verwertender Bakterien nach dem MPN-Verfahren.....	30
2.10 SELEKTIVE ANZUCHT VON NAPHTHALIN- UND PHENANTHREN-ABBAUENDEN MIKROORGANISMEN	31
2.11 IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER ISOLIERTEN REINKULTUREN.....	32
2.11.1 Typisierung durch Ganzzellhybridisierung	32
2.11.2 Bestimmung des Fettsäuremusters nach Sasser (1990).....	32
2.11.3 Durchführung von physiologischen Tests.....	33
2.12 BEURTEILUNG DER NAPHTHALIN- BZW. PHENANTHREN ABBAULEISTUNG DER BAKTERIEN-STÄMME	34
2.13 ABBAU ANDERER AROMATISCHER VERBINDUNGEN	35
2.14 BESTIMMUNG DER CATECHOL-DIOXYGENASE AKTIVITÄTEN	35
2.14.1 Anzucht der Stämme und Präparation des Proteinextraktes	35
2.14.2 Proteinkonzentrationsbestimmung	36
2.14.3 Enzymassay.....	36
2.15 DNA-ISOLIERUNGSMETHODEN.....	37
2.15.1 Isolierung von Gesamt-DNA aus Bakterien-Reinkulturen	37
2.15.2 Schnelle DNA-Extraktion aus Bakterienzellen.....	38
2.15.3 Isolierung von Gesamt-DNA aus Belebtschlammproben	38
2.15.4 Aufreinigung der aus Belebtschlamm isolierten DNA-Rohextrakte	40

2.16 GELELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON DNA	42
2.17 RESTRIKTIONSENZYMATISCHER VERDAU VON GESAMT-DNA.....	43
2.18 BLOTTINGVERFAHREN.....	44
2.18.1 Southern-Blotting.....	44
2.18.2 DNA-Dot-Blots.....	44
2.19 HYBRIDISIERUNGSTECHNIKEN.....	45
2.19.1 Hybridisierung membrangebundener DNA.....	45
2.19.2 Koloniehybridisierung	48
2.20 AMPLIFIZIERUNG VON C23O CODIERENDEN DNA-BEREICHEN MITTELS DER PCR	49
2.20.1 Design von Primern für die PCR und von Oligonukleotidsonden.....	50
2.21 KLONIERUNG VON PCR-FRAGMENTEN IN PLASMID-VEKTOREN	50
2.21.1 Aufreinigung der PCR-Produkte aus Agarose-Gelen	51
2.21.2 Vorbereitung des Vektors.....	51
2.21.3 Ligation	52
2.21.4 Herstellung kompetenter Bakterienzellen.....	52
2.21.5 Transformation	53
2.21.6 Isolierung von rekombinanten Plasmiden	53
2.22 SEQUENZIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN	54
2.22.1 Sequenzierung mit dem GATC-BioCycle Sequencing Kit	55
2.22.2 Sequenzierung mit dem „ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“	58
2.22.3 Computergestützte Sequenzanalyse.....	59
2.22.4 Phylogenetische Analyse von Sequenzdaten.....	59
3 ERGEBNISSE	60
3.1 QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON POPULATIONEN IN UMWELTPROBEN	60
3.2 AUSWAHL DES ANZUCHTMEDIUMS ZUR ANREICHERUNG PAK-ABBAUENDER BAKTERIEN	61
3.3 ISOLIERUNG VON NAPHTHALIN- UND PHENANTHREN-ABBAUENDEN BAKTERIEN AUS UMWELTPROBEN	62
3.4 IDENTIFIZIERUNG DER NAPHTHALIN- UND PHENANTHREN-ABBAUENDEN ISOLATE.....	63
3.5 ABBAU VON POLYAROMATEN UND ANDEREN AROMATISCHEN VERBINDUNGEN	65
3.6 QUANTIFIZIERUNG DER NAPHTHALIN- BZW. PHENANTHRENABBAULEISTUNG VERSCHIEDENER BAKTERIENSTÄMME.....	66
3.6.1 Naphthalinumsetzung durch Bakterienstämme, die in dYT-Vollmedium bzw. in Naphthalin-haltigem Medium vorkultiviert wurden.....	70
3.7 CATECHOL-DIOXYGENASE AKTIVITÄTEN VERSCHIEDENER PAK-ABBAUENDER REFERENZSTÄMME UND ISOLATE.....	72
3.8 DETEKTION VON C23O-CODIERENDEN GENEN DURCH PCR- UND HYBRIDISIERUNGSTECHNIKEN	76
3.8.1 Ableitung von Primerpaaren und Oligonukleotidsonden anhand bekannter C23O-Sequenzen.....	76
3.8.2 Spezifische Detektion von C23O codierenden Genen von Pseudomonas und Sphingomonas Stämmen.....	78
3.8.3 Detektion von C23O codierenden Genabschnitten in einer PAK-Anreicherungskultur	83
3.8.4 Verwendung des Primerpaares COM23OF/COM23OR.....	85
3.8.5 Verwendung der Primerpaare RCTMOF/RCTMOR, RWOB23OF/RHD23OR und RHD23OF/RHD23OR.....	85
3.9 SEQUENZIERUNG DER MITTELS C23O-SPEZIFISCHER PRIMER AMPLIFIZIERTEN PCR-FRAGMENTE	86
3.9.1 Sequenzierung der PCR-Amplifikate aus verschiedenen PAK-abbauenden Pseudomonas und Sphingomonas Stämmen.....	87
3.9.2 Sequenzierung der klonierten PCR-Fragmente, die aus einer Naphthalin-Anreicherungskultur amplifiziert wurden	94
3.9.3 Sequenzierung der PCR-Amplifikate aus verschiedenen Naphthalin-abbauenden Rhodokokken-Stämmen	96
3.10 DOT-BLOT-HYBRIDISIERUNG MIT NUKLEINSÄURESONDEN, GERICHTET GEGEN C23O-CODIERENDE ABSCHNITTE	97
3.11 DETEKTION VON C23O-CODIERENDEN ABSCHNITTEN IN RESTRIKTIONSVERDAUTER GESAMT-DNA	98
3.12 KOLONIEHYBRIDISIERUNG ZUR DETEKTION VON BAKTERIEN MIT C23O-CODIERENDEN SEQUENZEN	101

3.13 DETEKTION VON PAK-ABBAUPOTENTIAL IN BELEBTSCHLAMMPROBEN	102
3.13.1 DNA-Isolierung aus Belebtschlammproben.....	102
3.13.2 Hemmung der PCR durch coextrahierte Substanzen.....	103
3.13.3 Bestimmung der Detektionsgrenze für die Amplifizierung von C23O-codierenden Abschnitten	104
3.13.4 Detektion von PAK-Abbaupotential in Belebtschlammproben.....	104
4 DISKUSSION	107
4.1 QUANTITATIVE BESTIMMUNGEN VON POPULATIONEN IN UMWELTPROBEN	108
4.2 NAPHTHALIN- UND PHENANTHREN-ABBAUENDE BAKTERIEN AUS UMWELTPROBEN.....	109
4.2.1 Isolierung und Identifizierung Naphthalin- und Phenanthren-abbauender Bakterien.....	109
4.2.2 Vorkommen PAK-abbauender Bakterien in unterschiedlichen Umweltproben	111
4.2.3 Substratspektren der isolierten PAK-abbauenden Bakterien.....	113
4.2.4 Quantifizierung des Naphthalin- und Phenanthrenabbaus	115
4.3 AKTIVITÄTEN DER CATECHOL DIOXYGENASEN BEI DEM ABBAU VON PAK	117
4.4 DETEKTION VON C23O-CODIERENDEN SEQUENZEN BEI PAK-ABBAUENDEN STÄMMEN	120
4.4.1 Detektion von C23O-codierenden Genabschnitten bei verschiedenen PAK-verwertenden <i>Pseudomonas</i> und <i>Sphingomonas</i> Stämmen	121
4.4.2 Verwendung des Primerpaares COM23OF/COM23OR.....	122
4.4.3 Detektion von C23O-ähnlichen Sequenzabschnitten bei verschiedenen <i>Rhodococcus</i> Isolaten ...	122
4.4.4 Schlußfolgerungen aus den Ergebnissen der PCR und Hybridisierung	123
4.5 WEITERE METHODEN ZUR SPEZIFISCHEN DETEKTION VON GENABSCHNITTEN.....	124
4.5.1 Koloniehybridisierung	124
4.5.2 Dot-Blot-Verfahren	125
4.5.3 Hybridisierung restriktionsverdauter Gesamt-DNA mit C23O-gerichteten Sonden.....	125
4.6 SEQUENZIERUNG DER MITTELS C23O-SPEZIFISCHER PRIMER AMPLIFIZIERTEN PCR-FRAGMENTE	127
4.6.1 Vergleich der C23O-Nukleinsäuresequenzen verschiedener <i>Pseudomonas</i> und <i>Sphingomonas</i> Stämme	127
4.6.2 Vergleich der N- und C-terminalen Regionen der C23O-Sequenzen	128
4.6.3 Vergleich der C23O-Aminosäuresequenzen verschiedener <i>Pseudomonas</i> und <i>Sphingomonas</i> Stämme	129
4.6.4 C23O-codierende Sequenzen in Anreicherungskulturen mit Naphthalin.....	130
4.6.5 Sequenzierung der PCR-Amplifikate aus verschiedenen Naphthalin-abbauenden Rhodokokken Stämmen	131
4.7 DETEKTION VON PAK-ABBAUPOTENTIAL IN BELEBTSCHLAMMPROBEN	131
4.7.1 Isolierung von DNA aus Umweltproben.....	132
4.7.2 Aufreinigung der extrahierten DNA und Einsatz der gereinigten DNA in der PCR.....	133
4.7.3 Detektion von C23O- und initiale Dioxygenase-codierenden Genabschnitten.....	134
4.7.4 Probleme bei der Detektion von C23O-codierenden Genabschnitten.....	136
4.8 SCHLUßFOLGERUNG UND AUSBLICK	136
5 ZUSAMMENFASSUNG	138
6 LITERATURVERZEICHNIS	140

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
abs. Ethanol	absoluter Ethanol
AC	accessionnumber
APS	Ammoniumperoxidsulfat
aqua demin.	Demineralisiertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serumalbumine
BTX	Benzol/Toluol/Xylol
C	Cytosin
C12O	Catechol 1,2-Dioxygenase
C23O	Catechol 2,3-Dioxygenase
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide
CTC	5-Cyano-2,3-ditolyltetrazoliumchlorid
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
dATP	2'-Deoxyadenosine-5'-triphosphate
ddATP	2',3'-Dideoxy-adenosine-5'-triphosphate
ddCTP	2',3'-Dideoxy-cytidine-5'-triphosphate
ddGTP	2',3'-Dideoxy-guanosine-5'-triphosphate
ddNTP	Dideoxy-nucleoside-triphosphate
ddTTP	2',3'-Dideoxy-thymidine-5'-triphosphate
dITP	2'-Deoxyinosin-5'-triphosphate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynucleoside triphosphate
DSM(Z)	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; Braunschweig
dTTP	2'-Deoxythymidine-5'-triphosphate
dYT	digested Yeast Tryptone
ECL	enhanced chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E_{max}	Extinktionsmaximum
FLUOS	5,(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimidester
FSME	Fettsäuremethylester
G	Guanin
Glu	Glutamin
Gly	Glycin
GZZ	Gesamtzellzahl
His	Histidin
Leu	Leucin
MPN	Most Probable Number
mU	milli Units
n.b.	nicht bestimmt
NBT	4-Nitoblue-tetrazolium-chloride
NCIMB	The National Collections of Industrial and Marine Bacteria, Torry Research Station; Aberdeen, Scotland, UK

OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
PAK	Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe
PCR	Polymerase Chain Reaction
pFA	para-Formaldehyd
POD	Meerrettich Peroxidase
Pro	Prolin
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
RG	Reaktiongefäß
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfate
T	Thymin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin-5,6-isothiocyanat
Tyr	Tyrosin
U	Units
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
VT	Volumenteile
w/v	Masse/Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

1 Einleitung

1.1 Entstehung und Toxikologie der Polyaromatischen Kohlenwasserstoffe

Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) sind ubiquitär verbreitete Verbindungen aus zwei oder mehr kondensierten Benzolringen. Naphthalin ist mit zwei annellierten Benzolringen und einem Molekulargewicht von 128,2 g pro mol der kleinste Polyaromat. Beispiele für höherkondensierte PAK sind Phenanthren mit drei, Pyren mit vier oder Benzo(a)pyren mit fünf kondensierten Ringen.

Die Polyaromaten entstehen in kleinem Umfang durch natürliche Verbrennungsprozesse, wie Waldbrände oder vulkanische Aktivitäten. Die zunehmende Industrialisierung der letzten 150 Jahren hat jedoch dazu beigetragen, daß die PAK in weit größerem Umfang durch anthropogene Aktivitäten, wie dem Betrieb von Heizkraftwerken, der Abfallverbrennung, der Kohleverkockung, über die petrochemische Industrie oder durch die Holzveredelungsindustrie freigesetzt werden (Cerniglia, 1984a und 1984b; Kästner *et al.*, 1994a; Shuttleworth & Cerniglia, 1995). Große Mengen der Polyaromaten gelangen durch den Kraftverkehr in die Atmosphäre. Mit den ungereinigten Abgasen eines Ottomotors werden beispielsweise pro km durchschnittlich 8,6 mg PAK emittiert (Rippen, 1993).

Diese vielfältigen Quellen der PAK-Freisetzung bedingen ihr Vorkommen in allen Umweltbereichen. Astrophysikalische Beobachtungen lassen sogar vermuten, daß PAK die organische Stoffklasse mit der größten Verbreitung im Universum überhaupt sind (Leger *et al.*, 1987 zitiert in Kästner *et al.*, 1994a). Allein für die BRD wurde die Gesamtemission der PAK auf 500 bis 1000 t für das Jahr 1989 geschätzt (Scheffer & Schachtschabel, 1992). Bei einer gleichmäßigen Verteilung der emittierten PAK auf die Fläche entspricht das 20 bis 40 g pro ha und Jahr. Die höchsten PAK-Konzentrationen mit bis zu mehreren g pro kg wurden in Böden ehemaliger Kokereien und Gaswerkgeländen gefunden (Kästner *et al.*, 1994a).

Einigen polyaromatischen Verbindungen mit niedrigem Molekulargewicht, wie dem Naphthalin, werden akut toxische Wirkungen zugeschrieben (Kästner *et al.*, 1994a). Die meisten höher molekularen PAK werden als genotoxisch eingestuft. Aufgrund der Toxizität, Kanzerogenität und ihrer weiten Verbreitung in der Umwelt hat die amerikanische Umweltbehörde (*U.S. Environmental Protection Agency*) 16 polyaromatische Verbindungen in eine Liste gefährdender Umweltgifte aufgenommen (EPA-Liste). Nach der deutschen Trinkwasserverordnung liegt der Grenzwert für die polyaromatischen Verbindungen Fluoranthen, Benzo(b)fluoranthen, Benzo(k)fluoranthen, Benzo(a)pyren, Benzo(ghi)perylen und Indenol(1,2,3-cd)pyren bei insgesamt 0,2 µg pro l Trinkwasser.

Schon 1761 wurde von dem englischen Arzt John Hill indirekt nachgewiesen, daß PAK-haltige Stoffe krebsauslösend sein können. Er warnte vor dem Gebrauch von Schnupftabak,

weil dieser unheilbare Krankheiten auslösen kann (Kästner *et al.*, 1994a). Auch im Tabakrauch sind die Polyaromaten die wirksamsten kanzerogenen Verbindungen. Die Fraktionierung des Tabakrauchs und der anschließende Test im Tierversuch zeigten deutlich, daß Lungenkarzinome bei Ratten hauptsächlich durch die PAK-haltige Fraktion verursacht werden (Grimmer *et al.*, 1988). Epidemiologische Studien haben ergeben, daß 85 bis 90% aller Lungenkrebsfälle in industrialisierten Ländern auf das Rauchen von Zigaretten zurückzuführen sind. Unter der Annahme, daß auch beim Menschen die PAK entscheidend bei der Karzinombildung sind, ist der Tod von 40000 Menschen pro Jahr allein in Deutschland auf diese Stoffklasse zurückzuführen (Grimmer *et al.*, 1995). Die kanzerogene Wirkung von PAK in Säugetierzellen entfaltet sich erst nach einer metabolischen Aktivierung in der Empfängerzelle selbst. Durch die Enzymaktivität von Cytochrom-abhängigen Oxygenasen werden reaktive elektrophile Metabolite gebildet, die sich kovalent an nucleophile Gruppen der DNA oder anderer Makromoleküle binden. Die Zellen können daraufhin zu malignem Wachstum entarten (Grimmer *et al.*, 1995). Toxikologisch relevante Kontakte erfolgen nicht nur durch die Inhalation von Tabakrauch oder generell PAK-belasteter Luft, sondern auch durch die Aufnahme PAK-haltiger Lebensmittel und Wasser oder durch Hautresorption bei Kontakt mit Teer oder Ölprodukten (Kästner *et al.*, 1994a).

1.2 Mikrobiologischer PAK-Abbau

Aufgrund des immanenten Gefährdungspotentials für Mensch und Tier besteht ein großes Interesse an der Entfernung dieser Schadstoffe aus kontaminierten Böden, Sedimenten oder aquatischen Ökosystemen. In der Umwelt kann die Umwandlung der PAK durch physikochemische Prozesse, wie die Photolyse, durch chemische Oxidation oder durch Verflüchtigung erfolgen (Weißenfels *et al.*, 1990; Weißenfels *et al.*, 1991) Häufig führen diese Umwandlungsprozesse aber nicht zu einer vollständigen Entfernung der Verbindungen, sondern es findet lediglich eine Verlagerung der Stoffe statt (Maue, 1994). Chemische Prozesse können beispielsweise dazu führen, daß PAK und ihre Metaboliten durch kovalente Bindung an huminstoffreiche Bodenschichten in die Bodenmatrix eingelagert werden.

Der mikrobiologische Abbau von Polyaromaten ist ein wesentlicher Prozeß für die Dekontamination von PAK-kontaminierten Umweltbereichen (Sims *et al.*, 1990, zitiert in Cerniglia, 1992). Die Entwicklung von PAK-metabolisierenden Mikroorganismen im Verlauf der Evolution wird darauf zurückgeführt, daß bedingt durch natürliche Prozesse polyaromatische Verbindungen schon immer freigesetzt wurden (Zylstra *et al.*, 1997) und somit als potentielle Energie- und Kohlenstoffquelle genutzt werden konnten. Dabei haben sich nicht die Spezialisten des PAK-Abbaus entwickelt, sondern die Fähigkeit zum Abbau der PAK ist bei phylogenetisch entfernt stehenden Mikroorganismen verbreitet (Cerniglia,

1992; Kästner *et al.*, 1994a). Für den mikrobiologischen Abbau von Polyaromaten sind generell drei verschiedene Mechanismen bekannt: die unspezifische radikalische Oxidation, die kometabolische Transformation und die vollständige Mineralisierung (Kästner *et al.*, 1994a).

Der Abbau von PAK durch unspezifische radikalische Oxidation ist für verschiedene Weißfäulepilze beschrieben. Diese Mikroorganismen können Wasserstoffperoxid als Substrat verwerten und die dabei entstehenden Sauerstoffradikale die Oxidation des PAK-Ringgerüsts initiieren. Die Oxidationsprodukte wiederum können ungerichtet weiterreagieren. Bei der kometabolischen Transformation werden die Ringgerüste in den meisten Fällen nur partiell oxidiert und es kommt zu einer Akkumulation von teiloxidierten Metaboliten. Pilze und Bakterien, die PAK kometabolisch transformieren, können als Reinkultur nicht mit PAK als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen. Im Gegensatz dazu sind einige Bakterien in der Lage, verschiedene Polyaromaten als alleiniges Substrat zu verwerten. Da hierbei die gefährliche Substanz vollständig in zelleigenes Material und CO₂ umgesetzt wird, ist es von erheblichem Interesse Bakterien mit diesen Abbaufähigkeiten für die Reinigung von kontaminierten Böden und Gewässern einzusetzen. Die Abbauwege für Naphthalin, Phenanthren und Anthracen wurden durch zahlreiche Untersuchungen aufgeklärt (Kiyohara *et al.*, 1976; Kiyohara & Nagao, 1978; Ensley *et al.*, 1982; Cerniglia, 1984a und 1984b; Gibson & Subramanian, 1984; Cerniglia & Heitkamp, 1989; Grund *et al.*, 1992). Der vollständige Abbau dieser Polyaromaten gliedert sich in einen oberen (Abbau bis Catechol, Abb. 1a) und einen unteren Abbauweg (Abbau ab Catechol, Abb. 1b). Die Metabolisierung der Polyaromaten erfolgt immer aerob und wird durch die Einführung molekularen Sauerstoffes in den aromatischen Ring eingeleitet.

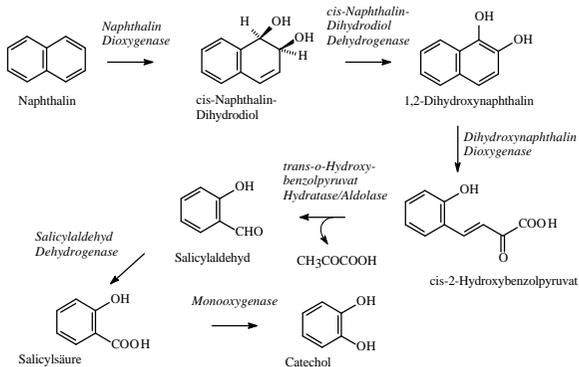


Abbildung 1a: Oberer Abbauweg für Naphthalin.

Katalysiert wird diese Reaktion durch ein Multikomponenten-Enzymssystem, das, wie von Simon *et al.* (1993) am Beispiel der Naphthalin Dioxygenase von *P. putida* PpG7 und *P. putida* NCIMB 9816-4 beschrieben, aus einer Reduktase, einem Ferredoxin und einem Eisen-Schwefel-Protein besteht. Bei dem Abbau von Naphthalin entsteht bei dieser Reaktion *cis*-Naphthalin-Dihydrodiol. In drei nachfolgenden Schritten wird diese Verbindung durch die Aktivität einer Dihydrodiol-Dehydrogenase, einer weiteren Dioxygenase und einer Aldolase zu einem Molekül Pyruvat und einem Molekül Salicylaldehyd umgesetzt. Salicylaldehyd wird weiter zu Salicylsäure oxidiert, das letztlich durch eine Monooxygenase zu Catechol umgesetzt wird (oberer Abbauweg, Abb. 1a). Catechol ist das Substrat des unteren Abbauweges (Abb. 1b).

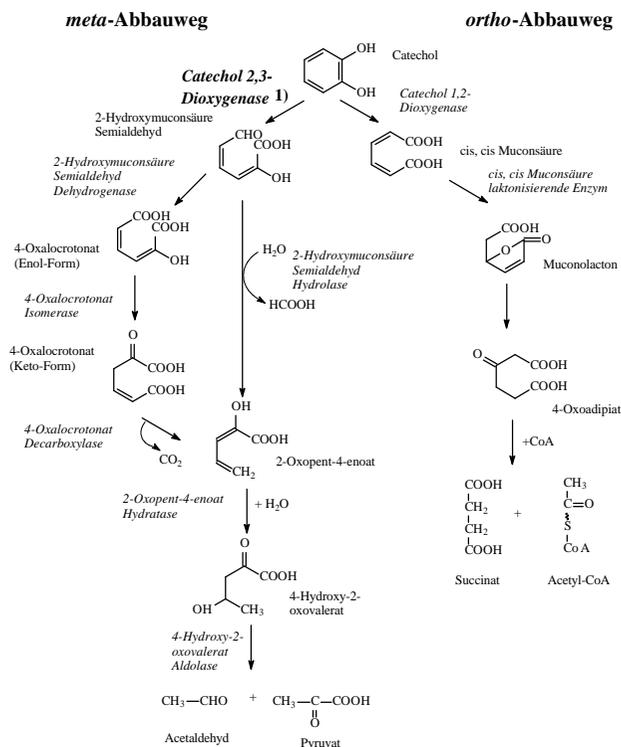


Abbildung 1b: Unterer Abbauweg (*meta*- und *ortho*-Spaltung) für aromatische und polyaromatische Verbindungen.

¹⁾ Die Metabolisierung von Aromaten und Polyaromaten über den *meta*-Abbauweg, eingeleitet durch die Aktivität der Catechol 2,3-Dioxygenase, ist in der Literatur häufiger beschrieben als über den *ortho*-Abbauweg, der durch die Catechol 1,2-Dioxygenase initiiert wird.

Auf der Stufe des Catechols konvergieren die Abbauewege der Polyaromaten mit denen der einfach aromatischen Verbindungen wie beispielsweise Toluol, Xylen oder Phenol (Williams & Sayers, 1994). Die weitere Umsetzung des Catechols erfolgt durch die Aktivität einer Catechol 2,3-Dioxygenase (C23O), die den aromatischen Ring extradiol (*meta*) spaltet und Catechol zu 2-Hydroxymuconsäure-Semialdehyd umsetzt (Keil *et al.*, 1985; Ghosal *et al.*, 1987; Bartilson & Shingler, 1989; Carrington *et al.*, 1994; Williams & Sayers, 1994; Herrmann *et al.*, 1995; Kitayama *et al.*, 1996; Arai *et al.*, 1998). Für einige Bakterienstämme wird auch eine intradiole (*ortho*) Spaltung des Catechols beschrieben, die von der Catechol 1,2-Dioxygenase katalysiert wird (Van der Meer *et al.*, 1991; Eck & Belter, 1993; Ehart *et al.*, 1995). Je nachdem ob Catechol *meta* oder *ortho* gespalten wird, entstehen so ein Molekül Pyruvat und Acetaldehyd/CO₂ oder Succinat und Acetyl-CoA. Der Abbau der dreikernigen Aromaten Phenanthren und Anthracen erfolgt nach dem gleichen Muster wie der Naphthalinabbau (Kästner *et al.*, 1994a) und ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

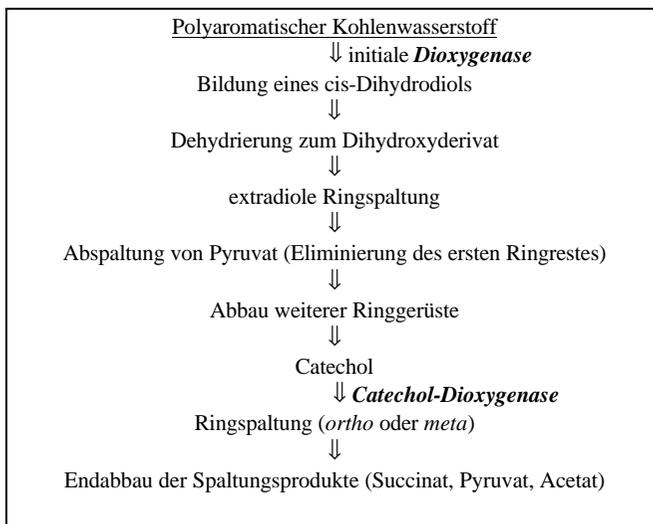


Abbildung 2: Schematisierte Darstellung des Abbaus von PAK.

Bei einigen Bakterienstämmen sind bei der Metabolisierung der dreikernigen Aromaten die gleichen Enzyme aktiv wie beim Naphthalinabbau (Menn *et al.*, 1993; Sanseverino *et al.*, 1993a; Kiyohara *et al.*, 1994; Zylstra *et al.*, 1997). Andere Bakterien scheinen Enzyme spezifisch für den Abbau von Naphthalin und Phenanthren zu aktivieren. Barnsley (1983) zeigte, daß verschiedene Bakterienisolate, die sowohl mit Naphthalin als auch Phenanthren

als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle wuchsen, zwei unterschiedliche Enzyme für die initiale Oxidation induzierten.

Kiyohara & Nagao (1978) gehen sogar davon aus, daß der komplette Abbauweg für Phenanthren und Naphthalin bei verschiedenen Bakterienstämmen getrennt voneinander verläuft. Der Abbau von Naphthalin soll dabei, wie beschrieben, über Catechol erfolgen, während der Abbau von Phenanthren über Phtalsäure zur Bildung von Protocatechursäure führt. Die Existenz von Protocatechuat-Dioxygenasen bei einigen Bakterien, die Aromaten oder Polyaromaten verwerten (Ghosh & Mishra, 1983; Hartnett *et al.*, 1990; Eulberg *et al.*, 1998), lassen darauf schließen, daß die Stämme den Weg über die Protocatechursäure zum Abbau dieser Verbindungen nutzen. Nicht beschrieben wurde dieser Stoffwechselweg für den Naphthalinabbau.

Der Abbau von polyaromatischen Verbindungen, die aus vier oder mehr Ringen bestehen, ist für wenige Bakterienstämme beschrieben (Heitkamp *et al.*, 1988a und 1988b; Weißenfels *et al.*, 1990; Boldrin *et al.*, 1993). Es ist bisher nicht bekannt, ob der Abbau über einen ähnlichen Mechanismus wie bei den zwei- und dreikernigen Aromaten verläuft.

Unabhängig von den unterschiedlichen Abbauwegen können Bakterienstämme, die PAK vollständig verwerten können, zu einer signifikanten Reduzierung der Schadstoffkonzentrationen an kontaminierten Umweltstandorten führen. Die PAK-Abbauraten in Umweltmaterialien hängt maßgeblich von den an den Standorten vorherrschenden Milieubedingungen und den Stoffeigenschaften der vorliegenden Substanzen ab. Der Stoffübergang der Polyaromaten von der festen in die flüssige Phase hat einen entscheidenden Einfluß auf die Abbauraten. Volkering *et al.* (1992) zeigten, daß die Wachstumsgeschwindigkeit eines *Pseudomonas* sp. mit Naphthalin in Flüssigmedium abhängig ist von der Größe der Naphthalinkristalle, mit einer steigenden Wachstumsrate mit Abnahme der Kristallgröße.

Die Abnahme der Wasserlöslichkeit mit zunehmender Zahl kondensierter Ringe (Cerniglia, 1992) bedingt, daß hochmolekulare PAK allgemein langsamer abgebaut werden als niedrigmolekulare. Für den Stamm *Mycobacterium* sp. PYR-I wurde dagegen gezeigt, daß Pyren und Fluoranthren schneller abgebaut werden als Naphthalin und Phenanthren (Heitkamp & Cerniglia, 1988). Interessanterweise wurden wiederholt Mycobakterien, mit der Fähigkeit PAK mit vier oder mehr kondensierten aromatischen Ringen abzubauen, isoliert. Vermutet wird, daß die hydrophobe Zelloberfläche dieser Bakterien die Adhäsion an die unlöslichen PAK und somit den Übergang des Substrats ins Zellinnere erleichtert.

Die geringe Wasserlöslichkeit der PAK hat generell zur Folge, daß die Verbindungen mit hoher Affinität an Boden- und Sedimentpartikel adsorbieren und so in der organischen Matrix festgelegt werden. Der Grad der Sorption ist einerseits abhängig von der Hydrophobizität der Verbindung, andererseits von dem organischen Kohlenstoffgehalt des Bodens oder Sediments (Weißenfels, 1998). Die Desorptions- und Diffusionsrate der PAK

bestimmt somit die Abbauraten in der natürlichen Umwelt.

Entscheidend für die Mineralisierung von PAK sind nicht nur die vorherrschenden Milieubedingungen, sondern Voraussetzungen für einen effizienten Abbau sind in erster Linie kompetente PAK-Abbauer.

In verschiedenen Arbeiten wurden gezeigt, daß die Beimpfung von PAK-kontaminierten Böden mit PAK-verwertenden Mikroorganismen zu einem schnelleren Abbau der Polyaromaten führen kann (Heitkamp & Cerniglia, 1989; Grosser *et al.*, 1991; Brodkorb & Legge, 1992; Guerin & Boyd, 1992; Smith *et al.*, 1997). In einem *ex situ* Experiment fanden Smith *et al.* (1997), daß die Halbwertszeit für den Phenanthrenabbau in sandigen Bodenproben von 86 auf 3,6 Tage nach Beimpfung mit einem Phenanthren-abbauenden gramnegativen Bakterienisolat herabgesetzt wurde. In Bodenproben mit hohem organischen Gehalt wurde die Halbwertszeit von 80 auf 3,1 Tage reduziert. Ebenso wurde die Dauer der Pyren-Mineralisierung nach Zusatz von Bakterien in sandigen und organischen Böden um den Faktor sieben bis neun reduziert. Die Abbauraten wurden von verschiedenen zugesetzten Stämmen unterschiedlich beeinflußt. Es wird angenommen, daß einige Bakterien durch die Produktion von Exoenzymen oder Detergenzien-ähnlichen Stoffen die Bioverfügbarkeit der PAK erhöhen können (Guerin & Boyd, 1992; Providenti *et al.*, 1995). Smith *et al.* (1997) zeigten jedoch auch, daß, mit einer Verzögerung von 15 Tagen, in den getesteten Bodenproben die Phenanthren- und Pyren-Mineralisierung auch ohne zusätzlich Inokulation mit PAK-verwertenden Bakterienstämmen eingeleitet wurde. Natürlich vorkommende Mikroorganismen, mit dem Potential PAK abzubauen, reicherten sich offensichtlich während dieser Zeit an und adaptierten sich an die neuen Kohlenstoff- und Energiequellen.

Die Bestimmung des PAK-Abbaus in Umweltproben erfolgt hauptsächlich über eine Messung der Substratabnahme oder Produktzunahme mit Hilfe von Gaschromatographie oder HPLC-Analytik. Alternativ können die Aktivitäten der am Abbau beteiligten Enzyme bestimmt werden. Die Enzymaktivitäten der Catechol-Dioxygenasen, die am Abbau der Polyaromaten maßgeblich beteiligt sind, können beispielsweise durch einen photometrischen Enzymtest nachgewiesen werden (Nekazawa & Nekazawa, 1970; Nozaki, 1970; Hamzah & Al-Baharna, 1994). Mit der Umsetzung von Catechol zu *cis*, *cis*-Muconsäure durch die Aktivität der Catechol 1,2-Dioxygenase ist ein im Photometer meßbarer Anstieg der Absorption bei 255 nm verbunden. Wird Catechol dagegen durch die C23O umgesetzt, resultiert ein Absorptionsanstieg bei 375 nm aufgrund der Formation des gelbgefärbten Catechol-Spaltungsprodukts 2-Hydroxymuconsäure Semialdehyd.

Die Bestimmung der PAK-Abbauraten und der enzymatischen Aktivitäten macht eine Aussage bezüglich des aktuellen PAK-Umsatzes möglich. Interessant ist jedoch auch, das Abbaupotential von Mikroorganismen gegenüber PAK einschätzen zu können. Auf diese Weise kann beurteilt werden, ob die natürlich vorkommende Mikropopulation bei auftretender PAK-Kontamination, die Schadstoffe effizient mineralisieren kann.

Der Nachweis des PAK-Abbaupotentials in Umweltproben kann durch klassisch mikrobiologische Verfahren erfolgen; z.B. durch die selektive Anreicherung von Mikroorganismen mit anschließender Isolierung von Reinkulturen, die entsprechende Abbauleistungen zeigen. Eine andere Möglichkeit besteht in dem Nachweis von Genen, die für Schlüsselenzyme des PAK Katabolismus codieren, mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) und der Gensondentechnik. Diese molekularen Methoden sind gegenüber der Isolierungstechnik aufgrund der wesentlich geringeren Detektionszeiten von Vorteil.

1.3 Organisation und Evolution der Gene, die für die Enzyme des PAK-Abbaus codieren

Zur Entwicklung einer Nachweisteknik für PAK-abbauende Bakterien mittels molekularbiologischer Methoden sind Informationen über die Organisation der katabolischen Gene und die entsprechenden Gensequenzen notwendig. Die bis heute genetisch am besten untersuchte Bakteriengruppe hinsichtlich des Abbaus von PAK, am Beispiel von Naphthalin und Phenanthren, sind Stämme der Gattung *Pseudomonas* (Kiyohara *et al.*, 1976; Cerniglia, 1984b; Dagley, 1986; Harayama & Timmis, 1992; Williams & Sayers, 1994).

Bei dem gut untersuchten Stamm *P. putida* pPG7 sind die *nah* Gene auf dem 83-kb Plasmid NAH7 in zwei Operons organisiert (Yen & Gunsalus, 1982). Das erste Operon für den oberen Abbauweg (*nah*-Operon, *nahABCFDE*) codiert für Enzyme, die Naphthalin zu Salicylsäure umsetzen, das Operon für den unteren Abbauweg (*sal*-Operon, *nahGTHINLJK*) ist verantwortlich für die Umsetzung von Salicylsäure zu zentralen Stoffwechselmetaboliten (Abb. 3). Die Regulation beider Operons erfolgt durch Salicylsäure, dem Produkt des *nah*-Operons (Yen & Gunsalus, 1985). Das *nah* Operon wird auf niedrigem Level in Abwesenheit eines Induktors exprimiert. In Anwesenheit von Naphthalin wird so Salicylsäure produziert, die an das konstitutiv gebildete Genprodukt NahR bindet. Dieses Protein agiert als positiver Regulator an den Promotoren beider Operons und somit als Induktor dieses Stoffwechselweges.

Die gleiche Zwei-Operonstruktur wurde auf einem weiteren Plasmid pWW60-1 des Naphthalin-verwertenden Stammes *P. putida* NCIMB 9816 gefunden (Cane & Williams, 1986). Die Orientierung und relative Position der beiden Operons zueinander unterscheiden sich jedoch von der des *nah*-Operons des NAH7-Plasmids.

Ein ähnliche Situation existiert für die Anordnung der Operons auf verschiedenen TOL-Plasmiden, die für den oberen und unteren Abbauweg von Toluol codieren (Assinder & Williams, 1988; Williams & Sayers, 1994). Auf den TOL-Plasmiden pWW0 (Abb. 3), pWW53 und pDK1 codiert das Operon für den oberen Abbauweg für die Umsetzung von Toluol zu Bezoat (*xyICMABN*). Die Enzyme, die auf dem Operon des unteren Abbauweges codiert sind, katalysieren den Übergang von Bezoat zu Metaboliten des zentralen Stoffwechselgeschehens über Catechol und den *meta*-Abbauweg (*xyIXYZLTEGFJQKIH*).

Alle drei TOL-Plasmide haben die gleiche Operonstruktur, aber auch hier ist die Anordnung und Orientierung der beiden Operons zueinander unterschiedlich.

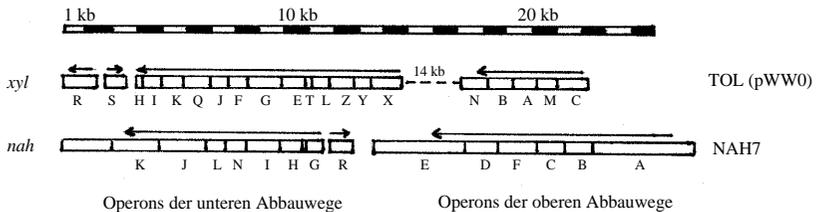


Abbildung 3: Organisation der katabolischen Gene des Plasmids TOL (pWW0) des Stammes *P. putida* mt-2, die für den Abbau von Toluol codieren, und des Plasmids NAH7 des Stammes *P. putida* pPG7, die für den Abbau von Naphthalin codieren (nach Van der Meer *et al.*, 1992).

Die Richtung der Transkription wird durch die Pfeile angezeigt.

xyl: R: regulatorisches Protein; S: regulatorisches Protein; H: 4-Oxalocrotonat Isomerase; I: 4-Oxalocrotonat Decarboxylase; K: 4-Hydroxy-2-oxovalerat Aldolase; Q: Acetaldehyd Dehydrogenase; J: 2-Oxopent-4-enoat Hydratase; F: 2-Hydroxyumuonsäure Semialdehyd Hydrolase; G: 2-Hydroxyumuonsäure Semialdehyd Dehydrogenase; E: Catechol 2,3-Dioxygenase; T: Ferredoxin ähnliches ORF; L: Toluat cis-diol Dehydrogenase; Z/Y/X: Toluat 1,2-Dioxygenase; N: nicht benannt; B: Benzylalkohol Dehydrogenase; A/M: Xylen Oxygenase; C: Benzaldehyd Dehydrogenase

nah: K: 4-Oxalocrotonat Decarboxylase; J: 4-Oxalocrotonat Isomerase; L: 2-Oxopent-4-enoat Hydratase; N: 2-Hydroxyumuonsäure-Semialdehyd Hydrolase; I: 2-Hydroxyumuonsäure-Semialdehyd-Dehydrogenase; H: Catechol 2,3-Dioxygenase; G: Salicylat Hydroxylase; R: regulatorisches Protein; E/D: Trans-*o*-Hydroxybenzylpyruvat Hydratase/Aldolase; F: Salicylaldehyd Dehydrogenase; C: Dihydroxynaphthalin Dioxygenase; B: cis-Naphthalin-Dihydrodiol Dehydrogenase; A: Naphthalin Dioxygenase

Ebenso sind die katabolischen Gene *bph* bzw. *dmp*, die bei *Pseudomonas* sp. IC für den Abbau von Biphenyl codieren (Carrington *et al.*, 1994) und dem Stamm *P. putida* CF600 den Abbau von Phenol ermöglichen (Bartilson & Shingler, 1989), in zwei Operons angeordnet. Untersuchungen der verschiedenen Operons der unteren Abbauege zeigen, daß die Anordnung der Gene des *meta*-Abbaueges (enzymatische Reaktionen ab Catechol) konserviert ist und die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des gut untersuchten Gens der C23O homolog sind. Sogar die nicht-codierenden Regionen zwischen den TGA-Stopcodons der C23O und den Startcodons der 2-Hydroxyumuonsäure-Semialdehyd-Hydrolase des *xyl*-, *dmp*- und *bph*-Operons sind hochkonserviert (Carrington *et al.*, 1994; Williams & Sayers, 1994).

Die große Übereinstimmung der für den *meta*-Abbaueweg codierenden Gene bei verschiedenen *Pseudomonas* Stämmen läßt einen gemeinsamen Ursprung dieser Gensequenzen vermuten. Die unterschiedliche Anordnung der Operons für den oberen und unteren Abbaueweg von Naphthalin und Toluol schließt jedoch die Möglichkeit aus, daß der Erwerb der genetischen Information für den Abbau dieser Verbindungen auf ein einfaches

Rekombinationsereignis zurückzuführen ist (Cane & Williams, 1986). Vielmehr wird angenommen, daß die Abbauwege durch die Kombination von katabolischen Modulen gebildet wurde (Cane & Williams, 1986; Carrington *et al.*, 1994, Williams & Sayers, 1994). Danach soll durch Rekombinationsereignisse eine gemeinsame Sequenz des *meta*-Abbauweges verknüpft worden sein mit den Genen, die stabile Substrate (Phenol, Benzoat oder Salicylsäure) zu Catechol transformieren. Diese Gene codieren im Naphthalin-Katabolismus die Salicylat-Hydroxylase, beim Phenolabbau die Phenol-Hydroxylase und beim Abbau von Biphenyl und Toluol für die Enzyme, die Benzoat zu Catechol umsetzen. Während diese Gene untereinander nicht ähnlich sind, stimmen die stromabwärts gelegenen Gene gut überein und werden deshalb auf einen gemeinsamen Ursprung zurückgeführt.

Die Operons der oberen Abbauwege zur Umsetzung von Naphthalin, Toluol oder Biphenyl wurden dann vermutlich anschließend erworben und so der komplette Abbauweg gebildet (Carrington *et al.*, 1994). Einen selektiven Vorteil, nach der Formation eines solchen komplexen Abbauweges, hatten die Bakterienstämme, die die entsprechenden Enzyme nicht konstitutiv exprimierten, sondern nur nach Bedarf bildeten. Die unterschiedliche Regulation der *nah* und *xyl* Gene mit den regulatorischen Proteinen NahR bzw. XylR und XylS läßt darauf schließen, daß die regulierenden Einheiten erst nach der Anordnung der katabolischen Gene integriert wurden (Williams & Sayers, 1994).

Untersuchungen verschiedener anderer katabolischer Gensequenzen hatten ergeben, daß es ebenso *meta*-Abbauwege gibt, die keine enge Verwandtschaft zu den beschriebenen *meta*-Sequenzen aufweisen und deren Genanordnung nicht konserviert ist. Beispiele sind die *tbu* Gene von *Ralstonia pickettii* PKO1 (vormals *Pseudomonas pickettii*; Kukor & Olsen, 1996), die für den Abbau von Toluol, Benzol und Phenol codieren. Allgemein sind die katabolischen Gensequenzen von Stämmen, die nicht den Pseudomonaden angehören, nur entfernt verwandt mit den entsprechenden *Pseudomonas* Genen. Aus diesem Grund wird es als nicht wahrscheinlich angenommen, daß der Gentransfer zwischen Stämmen verschiedener Gattungen zur Verbreitung dieser Gene beigetragen hat (Williams & Sayers, 1994).

1.4 Detektion von PAK-Abbaupotential

Zur Detektion von PAK-Abbaupotential auf DNA-Ebene scheinen die initiale Dioxygenase, die auf dem Operon des oberen Abbauweges codiert ist, und die C23O als Schlüsselenzym des unteren Abbauweges geeignete Zielsequenzen zu sein. Die Suche nach bereits bekannten Sequenzen in den Datenbanken sollte zeigen, ob die Gene auch gattungübergreifend so gut konserviert sind, um sie über die PCR- und Gensondentechnik universell zu detektieren.

1.4.1 Struktur und Gensequenzen der initialen PAK-Dioxygenase

Die initiale PAK-Dioxygenase ist ein Multikomponenten-Enzymsystem bestehend aus einer Reduktase, einem Ferredoxin und einem Eisen-Schwefel-Protein. Die Reduktase übernimmt Elektronen von NADH oder NADPH und überträgt sie auf die Ferredoxin-Untereinheit. Von dort werden die Elektronen an das Eisen-Schwefel-Protein weitergegeben, welches die Oxidation von Naphthalin bzw. Phenanthren zu dem entsprechenden Dihydrodiol katalysiert (Ensley & Gibson, 1983). Das Eisen-Schwefel-Protein besteht aus zwei identischen großen und zwei identischen kleinen Untereinheiten (Harayama *et al.*, 1992). Die große Untereinheit vermittelt vermutlich die Substratspezifität (Parales *et al.*, 1998).

Die bekannten Nukleotidsequenzen für die große Untereinheit des Eisen-Schwefel-Proteins der initialen Dioxygenase der *Pseudomonas putida* Stämme NCIMB 9816, NCIMB 9816-4, OUS82 und pPG7 und des *Pseudomonas aeruginosa* Stammes PaK1 (Kurkela *et al.*, 1988; Simon *et al.*, 1993; Takizawa *et al.*, 1994) zeigen 87 und 93% Ähnlichkeit. Diese gute Konservierung der Gensequenzen bei den verschiedenen *Pseudomonas* Stämmen macht die Detektion dieser DNA-Abschnitte innerhalb der Gattung *Pseudomonas* über die PCR möglich.

Verschiedene Untersuchungen haben jedoch ergeben, daß die Dioxygenasen einiger isolierter PAK-abbauender Bakterien keine gute Übereinstimmung zu diesen Gensequenzen aufweisen (Zylstra *et al.*, 1997). Drei verschiedene *C. testosteroni* Stämme, die Naphthalin und Phenanthren abbauen konnten, zeigten beispielsweise geringe Ähnlichkeit zu der Sequenz von *P. putida* NCIMB 9816-4 (Goyal & Zylstra, 1996; Zylstra *et al.*, 1997). Der Nachweis der Genabschnitte erscheint bei Vertretern verschiedener Gattungen mit einem universellen PCR-Primern somit nicht möglich.

1.4.2 Struktur und Gensequenzen der Catechol 2,3-Dioxygenase

Ähnlich wie bei der initialen Dioxygenase sind auch die codierenden Abschnitte der C23O innerhalb der Gattung *Pseudomonas* gut konserviert, während gattungsübergreifend die Sequenzen heterogen sind. Die C23O besteht aus vier identischen Untereinheiten, die jeweils mit einem Eisenatom (FeII) komplexiert sind (Harayama & Reikik, 1989). Die vier Untereinheiten sind tetraedrisch angeordnet (Winkler *et al.*, 1995) und die Bindung des Fe(II) erfolgt vermutlich über zwei Histidine und ein Glutamin (Eltis & Bolin, 1996).

Nach Eltis & Bolin (1996) gehören die C23O-Sequenzen zusammen mit weiteren extradiolen Dioxygenasen zu einer Superfamilie und werden damit alle auf einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung zurückgeführt (Abb. 4). Bei allen extradiolen Dioxygenasen sind neun Aminosäuren strikt konserviert. Drei von ihnen (His-146, His-210 und Glu-260) sind an der Bindung des Fe(II) beteiligt, weitere drei Aminosäuren (His-195, His-241 und Tyr-250) sind essentiell für die aktiven Zentren der Enzyme und die

Aminosäuren Gly-28, Leu-165 und Pro-254 haben vermutlich maßgeblich strukturgebenden Charakter.

Die Superfamilie der extradiolen Dioxygenasen gliedert sich in fünf Familien und mehrere Subfamilien. Die beiden großen Familien I.2 und I.3 werden gebildet durch Enzyme, die bevorzugt monozyklische Substrate, wie Catechol oder substituierte Catechole (I.2), bzw. bipyklische Verbindungen, wie Biphenyl oder Naphthalin (I.3), spalten (Harayama & Rekek, 1989). Die meisten C23O-Sequenzen gehören der Familie I.2 an, welche sich wiederum in fünf Subfamilien aufspaltet. Die Sequenzen einer Subfamilie sind minimal zu 54% identisch (Eltis & Bolin, 1996). Eine große Subfamilie (I.2.A) mit Sequenzähnlichkeiten von minimal 77% besteht aus C23O-Sequenzen verschiedener *Pseudomonas* Stämme (Ghosal *et al.*, 1987; Bartilson & Shingler, 1989; Benjamin *et al.*, 1991; Ng *et al.*, 1994; Carrington *et al.*, 1994; Herrmann *et al.*, 1995; Kitayama *et al.*, 1996). Eine weitere Subfamilie (I.2.B) wird gebildet aus zwei *Sphingomonas* C23O-Sequenzen (Yrjälä *et al.*, 1994, Kim & Zylstra, 1995), die untereinander zu 77% homolog sind. Die Gensequenz der C23O von *Ralstonia pickettii* PKO1 (vormals *Pseudomonas pickettii*) (Kukor & Olson, 1996) bilden mit der C23OII des TOL-Plasmids pWW15 von *P. putida* MT15 (Keil *et al.*, 1985) und der 3-Methylcatechol Dioxygenase eines weiteren *P. putida* Stammes eine neue Subfamilie (I.2.C). Die C23O von pKO1 haben eine wesentlich höhere Affinität zu Sauerstoff und die Substratumsetzung ist signifikant höher als bei analogen C23O-Enzymen, z.B. des TOL-Plasmids pWW0. Aus diesem Grund postulierten Kukor & Olsen (1996), daß diese Subfamilie der extradiolen Dioxygenasen sich an Standorten mit geringen Substrat- und Sauerstoffkonzentrationen entwickelt haben könnte.

Den zwei weiteren Subfamilien werden nach Eltis & Bolin (1996) nur jeweils eine C23O-Sequenz zugeordnet. Die C23O von *R. rhodochrous* CTM (Candidus *et al.*, 1994) bildet die Subfamilie I.2.D, die Sequenz von *B. stearothermophilus* FDTP-3 die Subfamilie I.2.E.

Nicht zu der Familie I.2 gehören die C23O-Sequenzen von *P. fluorescens* IP01 (Aoki *et al.*, 1996) und *R. eutrophus* JMP 222 (*mcpII*) (Kabisch & Fortnagel., 1990a). Diese Sequenzen weisen größere Ähnlichkeiten zu Sequenzen der Familie I.3 bzw. I.4 auf. Das zweite C23O-Gen von *Ralstonia eutrophus* JMP 222 (*mcpI*) (Kabisch & Fortnagel, 1990b) wurde nicht der Superfamilie der extradiolen Dioxygenasen zugeordnet, sondern auf einen anderen evolutionären Ursprung zurückgeführt.

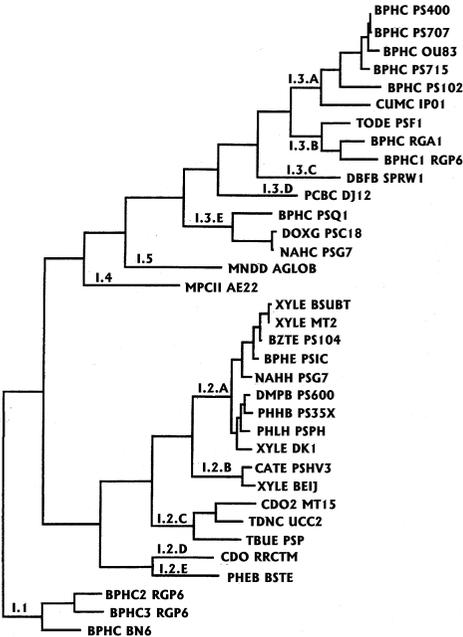


Abbildung 4: Stammbaum von 35 extradiolen Dioxygenasen nach Eltis & Bolin (1996). Der Stammbaum wurde berechnet nach dem Maximum Parsimony Verfahren des Programms PAUP (Version 3.1.1). Die Bezeichnungen an den Verzweigungen bezeichnen die Superfamilie (I), die Familien (1-5) und die Subfamilien (A-E) der extradiolen Dioxygenasen, wie im Text beschrieben.

BPHC PS400: *P. cepacia* LB400, 2,3-Dihydroxybiphenyl Dioxygenase; **BPHC PS707:** *P. pseudoalcaligenes* KF707, 2,3-Dihydroxybiphenyl Dioxygenase; **BPHC OU83:** *P. putida* OU83; 2,3-Dihydroxybiphenyl Dioxygenase; **BPHC PS715:** *P. putida* KF 715, 2,3-Dihydroxybiphenyl Dioxygenase; **BPHC PS102:** *Pseudomonas* sp. KKS102, 2,3-Dihydroxybiphenyl Dioxygenase; **CUMC IP01:** *P. fluorescens* IP01, Catechol 2,3-Dioxygenase; **TODE PSF1:** *P. putida* F1, 3-Methylcatechol 2,3-Dioxygenase; **BPHC RGA 1:** *Rhodococcus* sp. RHA1, 2,3-Dihydroxybiphenyl Dioxygenase; **BPHC1 RGP6:** *R. globerulus* P6, 2,3-Dihydroxybiphenyl Dioxygenase I; **DBFB SPRW1:** *S. paucimobilis*, 2,2',3-Trihydroxybiphenyl Dioxygenase; **PCPC DJ12:** *Pseudomonas* sp. DJ12, 2,3-Dihydroxybiphenyl Dioxygenase; **BPHC PSQ1:** *S. paucimobilis* Q1, 2,3-Dihydroxybiphenyl Dioxygenase; **DOXG PSC18:** *Pseudomonas* sp. C18, 1,2-Dihydroxynaphthalin Dioxygenase; **NAHC PSG7:** *P. putida* pPG7, 1,2-Dihydroxynaphthalin Dioxygenase; **MNDD AGLOB:** *A. globiformis* CM-2, 3,4-Dihydroxyphenylacetat 2,3-Dioxygenase; **MPCII AE22:** *R. eutropha* JMP 222, Catechol 2,3-Dioxygenase; **XYLE BSUBT:** *B. subtilis*, Catechol 2,3-Dioxygenase; **XYLE MT2:** *P. putida* MT2, Catechol 2,3-Dioxygenase; **BZTE PS104:** *P. aeruginosa* J1104, Catechol 2,3-Dioxygenase; **BPHE PSIC:** *Pseudomonas* sp. IC, Catechol 2,3-Dioxygenase; **NAHH PSG7:** *P. putida* pPG7, Catechol 2,3-Dioxygenase; **DMPB PS600:** *P. putida* CF600, Catechol 2,3-Dioxygenase; **PHHB PS35X:** *P. putida* P35X, Catechol 2,3-Dioxygenase; **PHLH PSPH:** *P. putida* H, Catechol 2,3-Dioxygenase; **XYLE DK1:** *P. putida* (pDK1), Catechol 2,3-Dioxygenase; **CATE PSHV3:** *Sphingomonas* sp. HV3, Catechol 2,3-Dioxygenase; **XYLE BEIJ:** *S. yanoikuyae* B1, Catechol 2,3-Dioxygenase; **CDO2 MT15:** *P. putida* MT-15, Catechol 2,3-Dioxygenase; **TDNC UCC2:** *P. putida* UCC2, 3-Methylcatechol 2,3-Dioxygenase; **TBUE PSP:** *R. pickettii* PKO1, Catechol 2,3-Dioxygenase; **CDO RRCTM:** *R. rhodochrous* CTM, Catechol 2,3-Dioxygenase; **PHEB BSTE:** *B. stearothersophilus* FDTP-3, Catechol 2,3-Dioxygenase; **BPHC2 RGP6:** *R. globerulus* P6, 2,3-Dihydroxybiphenyl Dioxygenase II; **BPHC3 RGP6:** *R. globerulus* P6, 2,3-Dihydroxybiphenyl Dioxygenase III; **BPHC BN6:** Naphthalinsulfonat abbauendes Bakterium BN6, 2,3-Dihydroxybiphenyl-Dioxygenase.

Bei der Einteilung der verschiedenen C23O-Gene nach Eltis & Bolin (1996) wurden einige neuere C23O-Sequenzen nicht berücksichtigt. Nach Vergleich der DNA-Sequenzen gehört die C23O des Stammes *Alcaligenes* sp. KF711 (Moon *et al.*, 1995) zu den Sequenzen der verschiedenen *Pseudomonas* Stämme (I.2.A), während die C23O von *C. testosteroni* TA441 (Arai *et al.*, 1998) und *B. cepacia* AA1 der Subfamilie 1.2.C zugehörig sind. Die weiteren bekannten C23O-Sequenzen von *Acinetobacter* sp. YAA (Takeo *et al.*, 1998), *B. thermoleovorans* A2 (Duffner & Müller, 1998), *Burkholderia* sp. PS12 (Beil *et al.*, 1997) und *R. rhodochrous* NCIMB 13064 sind zum Teil so heterolog, daß sie vermutlich neue Subfamilien innerhalb der Familie der C23O bilden.

Die Sequenzanalysen bekannter C23O-Sequenzen machen deutlich, daß die Detektion dieser Gene mit universellen Primern und Sonden aufgrund der großen Heterogenität nicht möglich ist. Vielmehr scheinen für die Erfassung einer großen Anzahl von Sequenzen mehrere Primer und Sonden notwendig zu sein. Jedes Primerpaar könnte dann die C23O-Sequenzen von Vertretern einer Subfamilie detektieren. Damit wäre nicht nur eine Aussage bezüglich des PAK-Abbaupotentials möglich, sondern es kann ebenso abgeschätzt werden, welche Bakterienvertreter potentiell am Abbau beteiligt sein werden.

1.4.3 Probleme bei der universellen Detektion der katabolischen Gene

Bei der Detektion der katabolischen Gene muß davon ausgegangen werden, daß anhand bekannter Sequenzdaten entwickelte PCR-Primer immer nur einen Teil der tatsächlich vorhandenen funktionellen Genabschnitte detektieren. Bevor diese Nachweismethode also zur Detektion von codierenden Abschnitten der initialen Dioxygenase bzw. der C23O in Umweltproben eingesetzt werden kann und damit eine Aussage bezüglich des PAK-Abbaupotentials möglich ist, müssen die verschiedenen Primer zunächst auf ihre Funktionalität, entsprechende Genabschnitte bei verschiedenen Bakterien zu erfassen, getestet werden.

Ein weiteres Problem bei der Detektion von funktionellen Genabschnitten in Umweltproben besteht darin, daß diese Sequenzen oft nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegen. Notwendig für dieses Nachsverfahren sind somit geeignete Methoden zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Umweltproben, die für den anschließenden Einsatz in der PCR geeignet sind.

Techniken zur Isolierung von DNA aus Bodenproben sind in der Literatur beschrieben (Tsai & Olson, 1991; Herrick *et al.*, 1993; Wikström *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1996). Sie basieren auf dem Zellaufschluß mittels Lysozym, SDS, Proteinase K und thermischer Behandlung. Nachfolgend werden die Nukleinsäuren durch Phenolisierung und Chloroformierung oder durch Behandlung mit Hexadecyltrimethyl-ammoniumbromid (CTAB) von Proteinen und anderen Zellbestandteilen getrennt.

Bei diesen Methoden findet eine Coextraktion von anderen hochmolekularen Substanzen, z.B. von Huminstoffen statt, für die ein hemmender Einfluß auf die PCR und Hybridisierungsreaktionen beschrieben wurde (Tsai & Olson 1992; Tebbe & Vahjen, 1993). Für den Einsatz der extrahierten DNA in der PCR sind somit weitere Aufreinigungsschritte der meist bräunlich gefärbten DNA-Rohextrakte unumgänglich. Mit der Aufreinigung ist oft ein Verlust der ursprünglichen DNA-Menge verbunden, wodurch die Zahl der Zielsequenzen weiter reduziert wird. Fraglich ist somit, ob die Konzentration der Zielsequenzen in den Umweltproben ausreichend ist, um diese auch in gereinigten DNA-Präparationen noch nachweisen zu können.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war der Nachweis von PAK-abbauenden Mikroorganismen in Umweltproben mittels klassischen mikrobiologischen Arbeitstechniken und molekularbiologischen Methoden. Durch selektive Anreicherung sollten Bakterien mit der Fähigkeit, Polyaromaten abzubauen, isoliert werden. Als Modellsubstanz sollte dabei der zweikernige Aromat Naphthalin verwendet werden, weil bekannte Sequenzdaten der initialen Naphthalin-Dioxygenasen als Grundlage zur Entwicklung von Primern und Oligonukleotidsonden dienen sollten. Zusätzlich wurde Phenanthren aufgrund seiner Mittelstellung bezüglich Löslichkeit und physikochemischem Verhalten eingesetzt.

Die Identifizierung der isolierten Bakterien sollte Aufschluß geben über die Diversität PAK-abbauender Organismen, die mit kulturellen Verfahren erfaßt werden können. Als Untersuchungsobjekt waren Belebtschlamm-Biozönosen vorgesehen. Dabei sollte auch untersucht werden, ob atmende Zellen in Belebtschlammproben durch den Einsatz fluoreszierender Redoxfarbstoffe nachgewiesen und quantifiziert werden können. Zu Vergleichszwecken wurden neben Belebtschlämmen weitere aquatische und terrestrische Standorte mit unterschiedlichem PAK Kontaminierungsgrad berücksichtigt.

Reinkulturen sollten bezüglich ihrer PAK-Abbaufähigkeiten mittels gaschromatographischer Verfahren und enzymatischer Aktivitätstests beurteilt werden.

Zur Detektion von Gensequenzen, die für Schlüsselenzyme des PAK-Abbaus codieren, sollten molekularbiologische Methoden wie die PCR- und Gensondentechnik etabliert werden. Als Schlüsselenzyme des PAK-Abbaus wurden die initiale PAK-Dioxygenase und die C230 gewählt. Die PCR-Primer und Oligonukleotidsonden zur Erfassung der C230-Sequenzen wurden in dieser Arbeit entwickelt. Die Untersuchungen zur initialen Dioxygenase wurden von dem Kooperationspartner, dem Institut für Biotechnologie der Technischen Universität Berlin (Prof. U. Stahl und Dipl.-Biologe R. Moser) durchgeführt.

Als Grundlage für die Ableitung von Primer- und SONDENSEQUENZEN sollten computergestützte Vergleiche von bereits bekannten Nukleotidsequenzen der entsprechenden Gene dienen. Zur Überprüfung der Funktionalität der entwickelten Primer

und Sonden wurden diese zur Detektion der entsprechenden Gene bei den isolierten PAK-abbauenden Bakterien und verschiedenen Referenzstämmen eingesetzt. Die Sequenzierung der dabei erhaltenen PCR-Amplifikate sollte Aufschluß geben über die Konservierung der entsprechenden Gene bei verschiedenen PAK-abbauenden Stämmen aus unterschiedlichen Umweltproben.

Ziel war der Einsatz der getesteten Oligonukleotide zum kultivierungsunabhängigen Nachweis von PAK-Abbauern in Umweltmaterial. Um dieses Detektionssystem anwendbar zu machen, war die Entwicklung und Optimierung von Nukleinsäure-Extraktionsmethoden aus Belebtschlamm ein weiteres Teilziel dieser Arbeit. Der nachfolgende Einsatz der isolierten DNA in der PCR und die Analyse erhaltener Amplifikate mittels der Gensonden-Technik sollten zeigen, ob ein solcher molekulargenetischer Ansatz zur Detektion von PAK-abbauenden Bakterien geeignet ist.

Desweiteren sollten die entwickelten Sonden auf ihre Eignung, abbaufähige Mikroorganismen durch Kolonihybridisierung nachzuweisen, getestet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Die in der Arbeit verwendeten Bakterienstämme, ihre Abbaufähigkeiten gegenüber aromatischen und polyaromatischen Verbindungen und die in Klonierungsexperimenten verwendeten Plasmide sind in der Tabelle 1 mit den entsprechenden Referenzen aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme und Plasmide.

Name und Bezeichnung der Bakterienstämme	Abbau von Polyaromaten/ Aromaten	Referenz/ Herkunft
<i>Pseudomonas putida</i> OUS82	Na, Ph	Kiyohara <i>et al.</i> , 1994
<i>Pseudomonas putida</i> NCIMB 9816	Na	Simon <i>et al.</i> , 1993
<i>Pseudomonas putida</i> F1 (DSM 6899)	To	DSM(Z) (Braunschweig), Zylstra & Gibson, 1989
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (DSM 6125)		DSM(Z) (Braunschweig), Franklin <i>et al.</i> , 1981
<i>Pseudomonas stutzeri</i> AN11	Na	erhalten von R. Rosselló-Mora, MPI für aquatische Mikrobiologie, Bremen
<i>Sphingomonas yanoikuyae</i> DSM 6900	Ph	Gibson <i>et al.</i> , 1973
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> BA2	Na, Ph, Ac	Kästner <i>et al.</i> , 1994b
Isolate H1a und H1b ¹⁾	Ph	erhalten von G. Maue, TU-Berlin
Isolate N1, N2, N3, N4, N6, N7, N8, N9, NEN9 (<i>Rhodococcus</i> sp.)	Na	erhalten von R. Rosselló-Mora
<i>Escherichia coli</i> SURE (lacZΔM15, Tn10 - (Tet ^r), Tn5 (Kan ^r), relA1, endA1, gyrA96)	-	Fa. Promega (Madison, WI, USA)
<i>Escherichia coli</i> K12, DH5α (DSM 6897) - (lacZΔM15, relA1, endA1, gyrA96)	-	DSM(Z) (Braunschweig)
Bezeichnung der Plasmide	Eigenschaften	Referenz/ Herkunft
pGEM-T	3003 bp, trägt Amp ⁺ und lacZ', MCS, T7 und SP6 Promotor	Fa. Promega (Madison, WI, USA)
Bluescript II SK	2961 bp, trägt Amp ⁺ und lacZ', MCS, T3 und T7 Promotor	Fa. Stratagene (Heidelberg)

Na: Naphthalin, Ph: Phenanthren, To: Toluol, Ac: Anthracen

DSMZ: Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; Braunschweig; NCIMB: The National Collections of Industrial and Marine Bacteria; Torry Research Station; Aberdeen, Scotland, UK; Amp^r: Ampicillinresistenz; lacZ': Teilsequenz des lacZ Gens. Ermöglicht die α-Komplementation für das Blau-Weiß Screening von rekombinanten Plasmiden; MCS: Multiple Cloning Site

¹⁾Identifiziert als *Sphingomonas yanoikuyae* (diese Arbeit).

lacZΔM15: spezifische N-terminale Deletion im *lacZ* Gen, ermöglicht die α-Komplementation durch pBluescript-Vektoren; Tn10 (Tet^r): Transposon, codiert für Tetrazyklinresistenz; Tn5 (Kan^r): Transposon, codiert für Kanamycinresistenz; relA1: relaxierter Phänotyp, erlaubt RNA-Synthese ohne Proteinsynthese; endA1: DNA-spezifische Endonuclease I; gyrA96: DNA Gyrase Untereinheit A, resultiert in Resistenz gegen Nalixidinsäure

2.2 Häufig verwendete Medien, Lösungen und Puffer

Medien, Lösungen und Puffer wurden, falls nicht anders angegeben, bei 121 °C für 15 min autoklaviert. Die Sterilfiltration verschiedener Lösungen erfolgte mit einer Einwegspritze (Becton Dickinson, Cockeysville, MD, USA) mit aufgesetztem Einmal-Filterhalter (0,2 µm Porengröße; Schleicher & Schüll, Dassel).

- dYT-Flüssigmedium:

- 16 g Trypton
 - 10 g Hefeextrakt
 - 10 g NaCl
 - ad 1 l mit aqua demin., autoklavieren

- R2A-Flüssigmedium, pH 7,2:

- 0,5 g Hefeextrakt
 - 0,5 g Pepton Nr. 3
 - 0,5 g Casamino Säure
 - 0,5 g Glukose
 - 0,5 g Stärke
 - 0,3 g K₂HPO₄
 - 0,05 g MgSO₄ × 7 H₂O
 - 0,3 g Natriumpyruvat
 - ad 1 l mit aqua demin., autoklavieren

- R2A-Agarplatten:

- Agarplatten wurden nach Herstellerangaben (Oxoid, Wesel) vorbereitet.

- TE-Puffer, pH 8,0:

- 1,21 g Tris, pH 8,0
 - 0,29 g EDTA, pH 8,0
 - ad 1 l mit aqua demin., autoklavieren

- 20 × SSC:

- 175,3 g NaCl
 - 88,2 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat
 - ad 1 l mit aqua demin.

2.3 Häufig verwendete Arbeitsmittel und Geräte

- Die 0,5- und 1,5-ml-Reaktionsgefäße (RG) wurden von der Firma Biozym (Hessisch Oldendorf), die 2-ml-RG von der Firma Eppendorf (Hamburg) bezogen.
- Für Zentrifugationsschritte wurden folgende Zentrifugen verwendet:
 - Hettich Zentrifuge, Nr. 1394 (Hettich, Würzburg): für Zentrifugation kleiner Volumina (bis max. 2,0 ml) in RG bei Raumtemperatur (RT).
 - Biofuge fresco (Heraeus, Hanau): für Zentrifugation kleiner Volumina (bis max. 2,0 ml) in RG bei 4 °C.
 - Megafuge 1.0, Rotor 2704 (Heraeus, Hanau): für die Zentrifugation großer Volumina in 50-ml-Greiner-Röhrchen (Greiner, Nürtingen) oder Corex-Röhrchen (DuPont, Bad Nauheim) bei RT.
 - Megafuge 1.0R, Rotor 2704 (Heraeus, Hanau): für die Zentrifugation großer Volumina in 50-ml-Greiner-Röhrchen (Greiner, Nürtingen) oder Corex-Röhrchen (DuPont, Bad Nauheim) bei 4 °C.Die Rotationsgeschwindigkeiten in dieser Arbeit wurden in *rounds per minute* (rpm) angegeben.
- Für die Vakuumzentrifugation wurde der Vakuum Concentrator der Firma Bachofer (Reutlingen) verwendet.

2.4 Stammhaltung

Die verwendeten Bakterienstämme wurden auf R2A-Agarplatten (Oxoid, Wesel) bei 4 °C aufbewahrt und alle 4-8 Wochen auf neue Agarplatten überimpft. Die Überprüfung der Reinheit erfolgte durch Verdünnungsausstriche. Als Dauerkulturen wurde etwas Bakterienmaterial in Rinderserum (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) eingebracht und bei 20 °C verwahrt.

2.5 Umweltproben

Zur Anreicherung von PAK abbauenden Bakterienstämmen wurden verschiedene aquatische und terrestrische Standorte beprobt (Tab. 2). Das Probenmaterial wurde in sterilisierte Glas- oder Kunststoffflaschen überführt, auf Eis transportiert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei 4 °C gelagert.

10 g der Bodenproben wurden mit 90 ml einer 0,2%igen (w/v) Natriumpyrophosphatlösung versetzt und zur Homogenisierung für 30 min bei 60 rpm geschüttelt. Die Überstände der so bearbeiteten Bodenproben bzw. die nicht vorbehandelten aquatischen Umweltproben wurden zur Erstellung einer dezimalen Verdünnungsreihe in 0,9%iger (w/v) NaCl-Lösung verwendet. Für die *in situ* Hybridisierung von Probenmaterial (2.7) wurden die Umweltproben mit para-Formaldehyd (pFA) oder Ethanol fixiert (2.6).

Tabelle 2: Charakterisierungen der Probenahmestellen.

Probenahmestelle	Probenart
Kommunale Kläranlage, Gießen	Abwasser, Belebtschlammbecken
Industrielle Kläranlage Höchst, Frankfurt	Abwasser, Belebtschlammbecken
Mülldeponie, Reiskirchen	Sickerwasser
Unbefestigter Parkplatz, Gießen	Bodenprobe, obere Bodenschicht
Alter Gaswerkstandort, Gießen ¹⁾	Bodenprobe, 0,1 m und 3,1 m unter GOF
Alter Gaswerkstandort, Marburg ¹⁾	Bodenprobe, 1,8 m unter GOF, Bodenaushub
Alter Gaswerkstandort, Hulin (Tschechische Republik)	Bodenprobe, Bodenaushub

GOF: Geländeoberfläche

¹⁾ PAK und BTX-Bestimmung der Bodenproben in Tab. 20 (Anhang).

2.6 Fixierung von Umweltproben und Bakterienstämmen

Für die *in situ* Hybridisierung von Umweltproben und die Ganzzellhybridisierung (2.7) ist eine Fixierung der Bakterienzellen notwendig. Gramnegative Zellen wurden mit para-Formaldehyd (pFA; Sigma-Aldrich, Deisenhofen), grampositive Zellen mit absolutem Ethanol fixiert. Durch die Fixierung blieben die Bakterienzellen in ihrer Form erhalten und die Zellwände durchlässig für die verwendeten Oligonukleotidsonden.

Die zu fixierenden Bakterienstämme wurden zunächst bei 37 °C und 180 rpm (SM-30; Edmund Bühler, Tübingen) in R2A-Flüssigmedium (2.2) bis zu einer optischen Dichte zwischen 0,5 und 1,0 (gemessen bei 600 nm) kultiviert. 2 ml dieser Kulturen wurden in 2-ml-RG überführt und durch Zentrifugation (2 min, 12000 rpm, RT) geerntet.

2.6.1 Zellfixierung mit para-Formaldehyd

Zur Vorfixierung wurden die geernteten Zellen in 200 µl 1 × PBS-Puffer resuspendiert und mit 600 µl frisch hergestellter pFA-Lösung (4 °C) versetzt. Belebtschlammproben wurden vor Ort mit 3 VT auf Eis gekühlter pFA-Lösung vorfixiert. Bodenproben wurden vor der Zugabe von 3 VT pFA-Lösung mit dem, dem Bodenvolumen entsprechenden Teil 1 × PBS-Puffer versetzt. Die vorfixierten Zellsuspensionen bzw. Umweltproben wurden für 30 min bis 16 h auf Eis oder bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen bzw. das Umweltmaterial durch Zentrifugation (5 min, 12000 rpm, RT) pelletiert, mit 1 × PBS-Puffer gewaschen und erneut abzentrifugiert. Die Resuspendierung des Pellets erfolgte in dem Volumen, welches dem ursprünglichen Volumen der Probe oder der Bakterien-suspension entsprach. Nach Zugabe von gleichem VT eiskaltem absoluten Ethanol wurden die fixierten Proben bei -20 °C gelagert.

Verwendete Puffer und Lösungen:

- 3 × PBS-Puffer:

22,79 g NaCl
150 ml 200 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄
ad 1,0 l mit aqua demin., autoklavieren

1 × PBS wurde durch 1:3 Verdünnung aus 3 × PBS angesetzt.

- pFA-Lösung:

30 µl aqua demin. auf 60 °C erwärmen.
2 g pFA in erwärmtem aqua demin. durch Zugabe von 1 N NaOH lösen.
16,6 ml 3 × PBS zufügen.
pH mit HCl auf 7,2-7,4 einstellen
ad 50 ml mit aqua demin., sterilfiltrieren

2.6.2 Zellfixierung mit Ethanol

Geerntete Zellen wurden in 200 µl 1 × PBS-Puffer resuspendiert und die Zellsuspensionen mit 200 µl eiskaltem absolutem Ethanol versetzt. Zu den Belebtschlammproben wurde vor Ort der gleiche VT an absolutem eisgekühltem Ethanol zugegeben. Die Bodenproben wurden zunächst in 1 VT 1 × PBS-Puffer aufgenommen, dann mit 1 VT eisgekühltem absolutem Ethanol versetzt und bei -20 °C gelagert.

2.6.3 Schnellfixierung von Bakterienzellen

Für die Ganzzellhybridisierung von Bakterienkolonien, die auf festem Medium gewachsen waren, wurde etwas Bakterienmaterial einer Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher entnommen und in einem RG in 100 µl TE-Puffer (pH 8,0) suspendiert. Ein Aliquot der Bakteriensuspension wurde auf epoxidbeschichtete Objektträger (Paul Marienfeld, Bad Mergentheim) aufgebracht und wie unter 2.7 erläutert verfahren.

2.7 Ganzzell- und *in situ*-Hybridisierung

Für die Ganzzellhybridisierung zur Identifizierung von Bakterienstämmen und die *in situ* Hybridisierung wurden einzelsträngige DNA-Oligonukleotidsonden verwendet, die mit komplementären RNA-Strängen Hybride ausbilden können. Die verwendeten rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden (Tab. 4, 2.8.1) waren mit Fluoreszenzfarbstoffen (2.8.2) markiert.

Für die Ganzzellhybridisierung wurden je nach Zelldichte 5-20 µl pFA- oder Ethanolfixierter Zellen, für die *in situ* Hybridisierung 5-20 µl der fixierten Umweltproben auf die Aussparungen der Epoxidharz-beschichteten Objektträger (Marienfeld, Bad Mergentheim) gegeben und bei 37 °C für einige Minuten getrocknet. Zur Fixierung und Dehydratisierung

der Zellen wurden die Objektträger je etwa 3 min in 50, 80 und 96%igem Ethanol belassen. Nach erneutem Trocknen der Objektträger wurden auf jedem Feld 8 μl des entsprechenden Hybridisierungspuffers mit 1 μl der jeweiligen Fluoreszenz-markierten Oligonukleotid-sonde (Konzentration: 50 ng μl^{-1}) gemischt, der Objektträger in ein 50-ml-Greiner-Röhrchen, das mit 2 ml Hybridisierungspuffer befeuchtem Zellstoff ausgelegt war, plaziert und für 1,5 h bei 46 °C inkubiert. Der Objektträger wurde mit 48 °C warmem Waschpuffer abgespült und dann für 15 min bei 48 °C in Waschpuffer mit der erforderlichen Stringenz (Tab. 3) belassen. Nach Abspülen mit aqua demin. wurde der Objektträger im Dunkeln getrocknet und zur mikroskopischen Auswertung in Einbettmedium (Citifluor AF1; Citifluor Ltd., London, UK) überführt. Die Auswertung erfolgte an dem Epifluoreszenzmikroskop Axioplan (Zeiss, Oberkochen). Es wurden Plan-Neofluar Objektive mit 10-, 40- und 100-facher Vergrößerung und die Filtersätze 09, 16 (für den Fluoreszenz-Farbstoff FLUOS), 15 oder 20 (für den Fluoreszenz-Farbstoff TRITC) eingesetzt (Zeiss, Oberkochen).

Tabelle 3: NaCl-Konzentration im Waschpuffer für die Hybridisierung mit Fluoreszenz-markierten Sonden.

Hybridisierung bei 46 °C		Waschung bei 48 °C	
% Formamid (v/v) bei der Hybridisierung	NaCl [mM]	μl 5 M NaCl auf 50 ml	
0	900	9000	
5	636	6300	
10	450	4500	
15	318	3180	
20	225	2150	
25	159	1490	
30	112	1020	
35	80	700	
40	56	460	
45	40	300	
50	28	180	
55	20	100	
60	14	40	
65	10	-	

Verwendete Puffer:

- Hybridisierungspuffer:
 - 360 μl 5 M NaCl
 - 40 μl 1 M TrisHCl, pH 8,0
 - 2 μl 10% SDS (w/v)
 - x μl Formamid (je nach Stringenz, Tab. 3)
 - ad 2 ml mit sterilem aqua demin.

- Waschpuffer:
 - 1 ml 1M TrisHCl, pH 8,0
 - 50 µl 10% SDS (w/v)
 - x ml 5 M NaCl (je nach Stringenz, Tab. 3)
 - ad 50 ml mit sterilem aqua demin.

2.8 Markierung von Oligonukleotidsonden

Die Markierung der Oligonukleotide erfolgte mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen oder mit Meerrettich-Peroxidase. Die Oligonukleotide sind an ihren 5'-Ende über einen Alkylabstandshalter mit einer primären Aminogruppe versehen. Über diese reaktive Aminogruppe werden die isothiocyanatgekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe (TRITC) unter Ausbildung einer Thioharnstoffbindung, die N-Hydroxysuccinimidester-gekoppelten Farbstoffe (FLUOS) über eine Säureamidbindung kovalent gebunden. Die Peroxidase wird über ein Diisothiocyanat angekoppelt.

Die fluoreszenz-markierten Sondenmoleküle werden von nicht umgesetzten Farbstoffmolekülen durch Größenausschlußchromatographie (Gelfiltration) getrennt. Die Abtrennung der markierten Sonden von unmarkierten Oligonukleotiden wird über eine Gelelektrophorese auf einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel erreicht. Anschließend werden die markierten Sonden aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten, mit Pufferlösungen aus dem Gel eluiert und die Sondenlösung durch Reverse-Phase-Chromatographie entsalzt.

2.8.1 *Verwendete rRNA-gerichtete Oligonukleotidsonden*

Die Sonden, die für die Typisierung von Bakterienstämmen durch Ganzzellhybridisierung und für die *in situ* Hybridisierung von Umweltproben eingesetzt wurden, sind in der Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotidsonden mit ihren Bindungsstellen an die 16 oder 23S rRNA und den Stringenzbedingungen für die Hybridisierung.

Sonde ¹⁾	rRNA; Bindungsstelle ²⁾	Zielorganismen	Stringenz ³⁾	Referenz
EUB338	16S; 338-355	<i>Bacteria</i>	0	Amann <i>et al.</i> , 1990
ALF1b	16S; 19-35	Alpha-Subklasse der <i>Proteobacteria</i>	20	Manz <i>et al.</i> , 1992
BET42a	23S; 1027-1043	Beta-Subklasse der <i>Proteobacteria</i>	35	Manz <i>et al.</i> , 1992
GAM42a	23S; 1027-1043	Gamma-Subklasse der <i>Proteobacteria</i>	35	Manz <i>et al.</i> , 1992
HGC69a	23S; 1901-1918	Grampositive Bakterien mit hohem G+C Gehalt der DNA	25	Roller <i>et al.</i> , 1994
COM1424	16S; 1424-1440	Bakterien der Gattung <i>Comamonas</i>	25	Amann <i>et al.</i> , 1996
ACI208	16S; 208-222	Bakterien der Gattung <i>Acidovorax</i>	20	Amann <i>et al.</i> , 1996
PS	23S; 1432-1446	Bakterien der Gattung <i>Pseudomonas</i>	20	Schleifer <i>et al.</i> , 1992
PPU	23S; 1432-1446	Bestimmte <i>Pseudomonas</i> <i>putida</i> Stämme	20	Schleifer <i>et al.</i> , 1992
SPH120	16S; 120-137	Bakterien der Gattung <i>Sphingomonas</i>	30	Neef, 1997

¹⁾ Die aminogelinkten Sonden wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen

²⁾ Numerierung der Basen nach Brosius *et al.* (1981).

³⁾ Formamidgehalt im Hybridisierungspuffer [%].

2.8.2 Markierungsreaktionen

2.8.2.1 Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen

50-100 µg des zu markierenden Oligonukleotids wurden mit sterilem aqua demin. auf 175 µl aufgefüllt und mit 50 µl Carbonatpuffer (1 M NaHCO₃/Na₂CO₃; pH 9,0) versetzt. Die Farbstoffe TRITC oder FLUOS wurden zu 5 mg ml⁻¹ in Dimethylformamid gelöst und 25 µl der Farbstofflösung zu der Oligonukleotidlösung pipettiert. Nach gründlichem Vortexen wurden die Ansätze für 4-16 h im Dunkeln bei RT inkubiert.

Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe:

- TRITC (MoBiTec, Göttingen):

Tetramethylrhodamin-5,6-isothiocyanat; Absorptionsmaximum bei 537 nm, Emissionsmaximum bei 566 nm.

- FLUOS (Boehringer Mannheim, Mannheim):

5,(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimidester; Absorptionsmaximum bei 494 nm, Emissionsmaximum bei 518 nm.

2.8.2.2 Markierung mit Peroxidase

100 µg des zu markierenden Oligonukleotids wurden unter Vakuum eingedampft und in 50 µl Natriumboratpuffer (0,1 M, pH 9,2) aufgenommen. Es wurden 500 µl p-Phenylendiisothiocyanat-Lösung (20 mg ml⁻¹ in Dimethylformamid) zugefügt und für eine Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert. Nicht umgesetztes DITC wurde durch Ausschütteln mit n-Butanol extrahiert. Dazu wurden 3 ml aqua demin. und 5 ml n-Butanol mit dem Reaktionsansatz in einem Corex-Röhrchen (DuPont, Bad Nauheim) gemischt und kräftig geschüttelt. Nach Zentrifugation (10 min, 4000 rpm, RT) wurde die obere Butanol-Phase verworfen. Die Ausschüttelung wurde mit je 5 ml Butanol solange wiederholt, bis die wäßrige Phase weniger als 1 ml betrug. Nach Überführen in ein RG wurde die wäßrige Phase durch weitere Ausschüttelungsschritte mit entsprechend geringeren Volumina Butanol auf 100 µl Volumen eingeeengt.

10 mg Meerrettich-Peroxidase (POD; Boehringer Mannheim, Mannheim) wurde in 100 µl Natriumboratpuffer (0,1 M, pH 9,2) gelöst, zu dem Markierungsansatz zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

2.8.3 Abtrennung des nicht umgesetzten Farbstoffes

Die Abtrennung des nicht umgesetzten Fluoreszenzfarbstoffs erfolgte mittels Gelfiltration über die Sephadex G-25 Säulen (NAPTM-5, Pharmacia, Freiburg).

Die Säulen wurden zunächst dreimal mit sterilem aqua demin. gespült. Der Markierungsansatz wurde mit sterilem aqua demin. auf 250 µl Volumen aufgefüllt und auf die Säule gegeben. Die Elution der Oligonukleotide von der Säulenmatrix erfolgte durch dreimalige Zugabe von je 200 µl sterilem aqua demin. und anschließendem getrennten Auffangen der drei Fraktionen in RG. Die Fraktionen wurden unter Vakuum eingedampft, die Rückstände in 100 µl aqua demin. resuspendiert und anschließend vereinigt.

2.8.4 Gelelektrophoretische Abtrennung der markierten von den unmarkierten Oligonukleotiden

Die senkrechte Gelapparatur wurde aus Pufferkammern, Glasplatten und Spacern zusammengesetzt. Als Auslaufschutz wurden 5 ml einer schnell-polymerisierenden Blockgel-Lösung zwischen die Glasplatten gegeben. Nach der Aushärtung des Blockgels wurde das Trenngel gegossen und der Auftragskamm eingesetzt. Nach der vollständigen

Auspolymerisierung wurde der Kamm vorsichtig aus dem Gel herausgezogen und die obere und untere Pufferwanne mit je 250 ml $1 \times$ NN-Puffer gefüllt. Die Fluoreszenz- oder Peroxidase-Markierungsansätze wurden mit 50 μ l Auftragspuffer (20%ige Saccharose-lösung) versetzt und in die Geltaschen pipettiert.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 300 V (Fluoreszenz-Markierung) bzw. 100 V (Peroxidase-Markierung) für etwa 2 h. Danach wurde das Gel von den Glasplatten abgelöst und in Frischhaltefolie eingewickelt. Die Banden von markiertem und unmarkiertem Oligonukleotid wurden im Gel, das auf einer fluoreszierenden F254-Dünnschichtplatte lag, durch Beleuchtung mit einer UV-Handlampe (Bachofer, Reutlingen) sichtbar gemacht. Bei 254 nm sind die markierten und unmarkierten Oligonukleotide als Schatten auf der fluoreszierenden Platte erkennbar. Die Fluoreszenz-markierten Oligonukleotide leuchten zusätzlich bei 365 nm, während das Oligonukleotid-Peroxidase-Konjugat durch die bräunliche Färbung der Bande erkennbar ist. Zur Elution der markierten Oligonukleotide aus dem Gel wurde die entsprechende Bande mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten, in ein RG überführt und mit einem sterilen Spatel zerkleinert. Die Gelstücke wurden mit 1 ml TE-Puffer versetzt, gut gevortext und zentrifugiert (3 min, 12000 rpm, RT). Der Überstand wurde abgenommen und eingefroren. Die zwei nachfolgenden Eluierungsschritte erfolgten mit jeweils 1 ml TE-Puffer unter Rotation (Rotator; Bachofer, Reutlingen) für jeweils 3-16 h bei 4 °C. Die Eluate wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

Verwendete Lösungen:

- $10 \times$ NN-Puffer

162 g Tris
27,5 g Borsäure
10,3 g EDTA
ad 1,0 l mit aqua demin., autoklavieren

$1 \times$ NN-Puffer wurde aus $10 \times$ NN-Puffer durch 1:10 Verdünnung angesetzt.

- 15% Acrylamidstammllösung:

187,5 ml 40% Acrylamidlösung (Roth, Karlsruhe)
50 ml $10 \times$ NN-Puffer
ad 500 ml mit aqua demin.

- Blockgel:

5 ml 15% Acrylamidstammllösung
70 μ l 10% (w/v) APS
10 μ l TEMED (Roth, Karlsruhe)

- 15%iges Trenngel für die Aufreinigung von Fluoreszenz-markierten Oligonukleotiden:
 - 45 ml 15% Acrylamidstammlösung
 - 360 µl 10% (w/v) APS
 - 36 µl TEMED (Roth, Karlsruhe)
- 7,5%iges Trenngel für die Aufreinigung von Peroxidase-markierten Oligonukleotiden:
 - 22,5 ml Acrylamidstammlösung
 - 22,5 ml 1 × NN-Puffer
 - 360 µl 10% (w/v) APS
 - 36 µl TEMED (Roth, Karlsruhe)
- TE-Puffer, pH 7,2:
 - 1,21 g Tris
 - 0,29 g EDTA
 - ad 1,0 l mit aqua demin., autoklavieren

2.8.5 *Entsalzung und Aufkonzentrierung der Markierungsansätze*

Zur Abtrennung von Gelresten, störenden Salzen und zur Aufkonzentrierung der Fluoreszenz-markierten Oligonukleotide wurde eine Reverse-Phase-Chromatographie mit NensorbTM20 Säulen (DuPont, Bad Nauheim) durchgeführt.

Die Säulen wurden mit 2 ml 100%igem Methanol vorgespült und mit 2 ml TEA-Puffer äquilibriert. Die drei Geleluate wurden jeweils mit 300 µl TEA versetzt, gevortext und auf die Säule aufgebracht. Nach dem Waschen der Säule mit 2 ml TEA-Puffer wurde 1 ml 50%iges Methanol aufgebracht und die nun scharf zusammenlaufende Bande der farbig markierten Sonden tropfenweise (Tropfen 3-10) aufgefangen. Der Ansatz wurde unter Vakuum eingedampft und der trockene Rückstand in 100 µl TE-Puffer aufgenommen.

Die Eluate aus der Peroxidase-Markierungsreaktion wurden nach Herstellerangaben mit Centricon 30 Mikrokonzentratoren (Amicon, Witten) auf 50-150 µl eingengt.

Verwendete Lösungen:

- Triethylaminpuffer (TEA-Puffer), pH 7,7:
 - 15,76 g TrisHCl
 - 0,29 g EDTA
 - Nach dem Autoklavieren 0,14% Triethylamin (v/v) zugeben.

2.8.6 Photometrische Vermessung der markierten Oligonukleotide

2.8.6.1 Photometrische Vermessung der Fluoreszenz-markierten Oligonukleotide

5 µl der TRITC-markierten Sonde wurde mit 495 µl sterilem aqua demin., 5 µl der FLUOS-markierten Sonde mit 495 µl Carbonatpuffer (1M NaHCO₃/Na₂CO₃; pH 9,0) gemischt, und die Absorptionsspektren von 230-700 nm mit dem Spektralphotometer Ultrospec 4000 UV/VIS (Pharmacia, Freiburg) aufgenommen. Der Quotient aus Nukleotidabsorption (OD_{260nm}) und Farbstoffabsorption (TRITC: OD_{550nm}; FLUOS: OD_{490nm}) sollte bei den verwendeten Farbstoffen und Oligonukleotiden (bestehend aus etwa 18 Nukleotiden) zwischen 2,5 und 3,0 liegen.

Die Konzentration der markierten Oligonukleotid-Stammlösung errechnete sich aus:

$$c_{\text{Oligostammlösung}} = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor (100)} \times 20 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$$

Aus den Stammlösungen wurden durch entsprechende Verdünnungen mit TE-Puffer Arbeitslösungen mit einer Konzentration von 50 ng µl⁻¹ hergestellt und wie die Stammlösungen bei -20 °C gelagert.

2.8.6.2 Photometrische Vermessung Peroxidase-markierter Oligonukleotide

5 µl der Peroxidase-markierten Sonde wurde mit 495 µl TE-Puffer gemischt und von 230-450 nm spektrophotometrisch vermessen. Der Quotient aus Nukleotidabsorption (OD_{260nm}) und der Peroxidase-Absorption (OD_{404nm}) sollte bei erfolgreicher Markierung zwischen 2 und 2,5 liegen.

Die Konzentration der Peroxidase-markierten Oligonukleotid-Stammlösung errechnete sich aus:

$$c_{\text{POD-Stammlösung}} = (\text{OD}_{260} - 0,276 \times \text{OD}_{404}) \times \text{Verdünnungsfaktor (100)} \times 20 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$$

Aus den Stammlösungen wurden durch entsprechende Verdünnungen mit TE-Puffer Arbeitslösungen mit einer Konzentration von 35 ng µl⁻¹ hergestellt und bei 4 oder -20 °C gelagert.

2.9 Quantitative Bestimmungen von Mikroorganismen in Umweltproben

2.9.1 Quantifizierung aerober und fakultativ anaerober heterotropher Mikroorganismen

Zur Quantifizierung der Kolonie-Bildenden-Einheiten (KBE) wurden 100 µl der aquatischen Originalprobe bzw. der aufgearbeiteten Bodenproben (2.5) und je 100 µl der Verdünnungsstufen 10⁻¹ bis 10⁻⁶ in drei Parallelansätzen auf R2A-Agarplatten ausgebracht und nach 48 h bei 25 °C die sichtbaren Gesamtkoloniezahlen erfaßt.

2.9.2 Gesamtzellzahlbestimmung nach DAPI-Färbung

Diese Methode zur Bestimmung der Gesamtzellzahl beruht auf der Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs 4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) an die DNA, insbesondere an AT-reiche Regionen (Porter & Feig, 1980). Der Farbstoff wird durch kurzwelliges Licht (Anregungsoptimum: 365 nm) angeregt und emittiert Licht der Wellenlänge 418 nm. DAPI gefärbte Zellen erscheinen blauviolett.

5-20 µl der Zellsuspensionen oder der pFA-fixierten Belebtschlamm- oder Bodenproben wurden mit sterilem aqua demin. auf insgesamt 100 µl aufgefüllt und mit 50 µl DAPI-Arbeitslösung (1 µg ml⁻¹) versetzt und für 15-30 min im Dunkeln inkubiert.

Das autoklavierte oder durch Abflammen mit 70%igem Ethanol sterilisierte Vakuumfiltrationsgerät (Schleicher & Schüll, Dassel) wurde, wie vom Hersteller beschrieben, zusammengesetzt. Ein Polycarbonatfilter (0,2 µm Nucleopore^R-Polycarbonatfilter, 25 mm Durchmesser; Reichelt Chemietechnik, Heidelberg) wurde mit der glänzenden Seite nach oben auf die Fritte des Gerätes aufgelegt.

Es wurden 2 ml steriles aqua demin. in die Filtrationseinheit vorgelegt, die gefärbte Probe hinzupipettiert, das RG mit 1 ml sterilem aqua demin. gespült und dies Volumen anschließend ebenfalls in die Filtrationseinheit gegeben. Die Probe wurde durch Anlegen eines Vakuums (Vakuumpumpe; KNF Neuberger, Freiburg-Münzingen) durch die Filtrationseinheit gesaugt, der Polycarbonatfilter anschließend mit einer sterilen Pinzette in eine Petrischale überführt und für 10 min im Dunkeln getrocknet.

Zur Bestimmung der Nullprobe wurden diese Schritte ohne Zugabe von Zellsuspension oder Umweltproben durchgeführt.

Die Polycarbonatfilter wurden zur mikroskopischen Auswertung auf einen Objektträger (IDL, Nidderau) gelegt und in Citifluor-Lösung (Citifluor Ltd.; London, UK) eingebettet. Die blauviolett fluoreszierenden Zellen waren bei 1000 × Vergrößerung unter UV-Anregung (Epifluoreszenzmikroskop; Axioplan; Filter 01; Zeiss, Oberkochen) sichtbar. Zur Bestimmung der Zellzahlen wurden mindestens 20 Gesichtsfelder eines Zähllokulars (10 × 10 Teilfelder; Zeiss, Oberkochen) ausgezählt.

$$\text{Gesamtzellzahl [ml}^{-1}\text{]} = \frac{\bar{x}_{\text{Probe}}}{\bar{x}_{\text{Nullprobe}}} \times M \times V$$

M (Mikroskopfaktor) = gesamte effektive Filterfläche : Fläche des Gitternetzes

Der Faktor ist abhängig vom Zähllokular und beträgt für das verwendete Okular (Zeiss, Oberkochen) 21991.

V (Verdünnungsfaktor) = 1000 µl : für die Filtration eingesetztes Probenvolumen

2.9.3 Quantifizierung stoffwechselaktiver Bakterien durch Vitalfärbung mit CTC

Diese Methode der Vitalfärbung beruht auf der Dehydrogenaseaktivität stoffwechselaktiver Mikroorganismen. Das als Redoxfarbstoff verwendete Tetrazoliumsalz 5-Cyano-2,3-ditolyltetrazoliumchlorid (CTC) wird durch aktive Dehydrogenasen intrazellulär zu einem wasserunlöslichen Formazankristall reduziert, der nach UV-Anregung durch Epifluoreszenzmikroskopie in der Zelle rot fluoresziert (Griebe *et al.*, 1995).

1 ml einer Bakterienkultur bzw. 1 ml Belebtschlamm wurde mit 1 ml einer frischgesetzten 4 mM CTC-Lösung für mindestens 2 h inkubiert. 50 µl der gefärbten Zellsuspension wurden mit 50 µl sterilem Wasser versetzt und 50 µl einer DAPI-Lösung (1 µg ml⁻¹) zugefügt. Nach 15 bis 30 min wurde der Ansatz, wie beschrieben, über ein Vakuum-Filtrationsgerät auf ein Polycarbonatfilter abfiltriert. Die Auswertung erfolgte mit dem Epifluoreszenzmikroskop (Axioplan, Filter 01 und 05; Zeiss, Oberkochen) bei 1000 × Vergrößerung.

2.9.4 Quantifizierung stoffwechselaktiver Bakterien durch *in situ*-Hybridisierung und DAPI-Färbung

Bei der *in situ* Hybridisierung mit der rRNA-gerichteten Bakterien-spezifischen Sonde EUB338 (Amann *et al.*, 1990) können fluoreszierende Signale bei hohem rRNA-Gehalt der Ribosomen, wie er für stoffwechselaktive Bakterienzellen charakteristisch ist, Fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden. Durch Gegenfärbung mit DAPI kann der Anteil positiv-hybridisierender Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt werden.

5-20 µl der Ethanol-fixierten Umweltproben wurden mit der eubakteriellen Sonde EUB338 auf einem gefelderten Objektträger hybridisiert (2.7). Nach der Hybridisierung wurde der Objektträger im Dunkeln getrocknet, anschließend das Objektträgerfeld mit 40 µl DAPI-Arbeitslösung (1 µg ml⁻¹) überschichtet und für 10 min im Dunkel inkubiert. Die DAPI-Lösung wurde mit aqua demin. abgespült und der Objektträger im Dunkeln getrocknet.

Für die mikroskopische Auswertung wurden zunächst die EUB-positiven Zellen und dann die DAPI-gefärbten Zellen im gleichen Gesichtsfeld ausgezählt. Der Anteil stoffwechselaktiver Zellen an der Gesamtzellzahl berechnete sich aus dem Verhältnis EUB-positiver zu DAPI-positiver Zellen.

2.9.5 Quantifizierung Naphthalin- und Phenanthren-verwertender Bakterien nach dem MPN-Verfahren

Zur quantitativen Erfassung von PAK-verwertenden Bakterien in den Umweltproben wurde das MPN (Most Probable Number)-Verfahren angewendet.

Jeweils 500 µl der Verdünnungsstufen 10⁰ bis 10⁻⁴ der aufgearbeiteten Umweltproben (2.5) wurde in zwei parallelen Ansätzen in 25 ml Mineralsalzmedium (Kästner *et al.*, 1994b) mit 0,05% (w/v) Naphthalin oder Phenanthren geimpft und die Ansätze sieben Tage bei 25 °C

und 180 rpm inkubiert. Blindproben wurden in Mineralsalzmedium ohne PAK angesetzt. Die Auswertung erfolgte nach Auftreten einer Trübung oder Färbung mittels einer MPN Tabelle für zwei Parallelansätze (Demeter, 1952).

2.10 Selektive Anzucht von Naphthalin- und Phenanthren-abbauenden Mikroorganismen

25 ml eines Mineralsalzmediums (Kästner *et al.*, 1994b) mit 0,05% (w/v) Naphthalin bzw. Phenanthren (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) wurden mit je 500 µl der aufgearbeiteten Bodenextrakte oder der aquatischen Originalproben bzw. mit 500 µl der Verdünnungsstufen 10^{-1} und 10^{-2} beimpft und bei 25 °C mit 180 rpm bis zur sichtbaren Trübung geschüttelt. Naphthalin-abbauende Stämme wurden aufgrund der hohen Flüchtigkeit des Naphthalins in 100-ml-Enghalskolben angereichert, die mit einer Gummikappe luftdicht verschlossen waren. Zur Anreicherung von Phenanthren-abbauenden Bakterien wurden 100-ml-Weithalskolben mit Wattestopfen verwendet. Nach erfolgter Trübung wurden 500 µl der Anreicherungskultur in frisches Medium mit 0,05% des PAK überführt. Durch Abimpfungen aus diesen Anreicherungskulturen und wiederholten Verdünnungsausstrichen auf R2A-Agarplatten wurden Reinkulturen gewonnen. Die Bakterienstämme wurden auf ihre Fähigkeit, Naphthalin bzw. Phenanthren in Reinkultur abzubauen, getestet. Der Abbau wurde zunächst anhand der Trübung der Kulturen beurteilt und bei positivem Resultat die Abbauleistung, wie unter 2.12 beschrieben, quantifiziert.

Verwendete Medien und Lösungen:

- Mineralsalzmedium, pH 6,9 (Kästner *et al.*, 1994b):
 - 2,13 g Na_2HPO_4
 - 1,30 g KH_2PO_4
 - 0,5 g NH_4Cl
 - 0,2 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
 - 1 ml Spurenelementlösung (Pfennig & Lippert, 1966)
 - 0,3 ml $10 \times$ Vitaminlösung
 - ad 1,0 l mit aqua demin., autoklavieren
- Spurenelementlösung (Pfennig & Lippert, 1966):
 - 500 mg Titriplex III
 - 200 mg $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
 - 10 mg $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
 - 3 mg $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$
 - 30 mg H_3BO_3
 - 20 mg $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$
 - 1 mg $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
 - 2 mg $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$
 - 3 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

- 10 × konzentrierte Vitaminlösung
 - 100 mg Ca-Pantothemat
 - 100 mg Nicotinsäure
 - 5 mg Biotin
 - 5 mg Cyanocobalamin (Vitamin B12)
 - 5 mg Folsäure
 - 100 mg Pyridoxin × HCl
 - 100 mg p-Aminobenzoesäure
 - 100 mg Thiaminpyrophosphat
 - 100 mg Inosit
 - 100 mg Thiamin (Vitamin B1)
 - 100 mg Riboflavin (Vitamin B2)

2.11 Identifizierung und Charakterisierung der isolierten Reinkulturen

Zur Identifizierung der isolierten Bakterienstämme mit PAK-Abbaufähigkeit wurden verschiedene Methoden angewendet. Die Isolate wurden anhand ihrer Kolonieform und -farbe und der mittels eines Phasenkontrastmikroskops (Leitz, Wetzlar) bestimmten Zellform morphologisch charakterisiert. Die Klassifizierung in grampositive bzw. gramnegative Organismen erfolgte mittels Gram-Färbung nach einer modifizierten Methode nach Hucker (Doetsch, 1981). Oxidase-Tests zur Überprüfung des Vorhandenseins aktiver Cytochromoxidasen in der Atmungskette der Mikroorganismen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt (Bactident Oxidase 1.13300.; Merck, Darmstadt). Die Identifizierung der isolierten Bakterien bis zur Gattungs- oder Artebene wurde durch die Kombination dreier methodischer Ansätze erreicht.

2.11.1 Typisierung durch Ganzzellhybridisierung

Mittels Fluoreszenz-markierter gruppen- bzw. gattungsspezifischer rRNA-gerichteter Oligonukleotidsonden (Tab. 4, 2.8.1) erfolgte eine Typisierung durch Ganzzellhybridisierung (2.7).

2.11.2 Bestimmung des Fettsäuremusters nach Sasser (1990)

Die Kultivierung von Bakterien unter standardisierten Bedingungen mit anschließender Extraktion der Fettsäuren, Überführung der Fettsäuren in Fettsäuremethylester (FSME) und gaschromatographischer Analyse liefert ebenso Daten zur Identifizierung von Bakterien. Der Vergleich der erhaltenen FSME Profile mit Datenbanken ermöglicht eine Identifizierung auf Gattungs-, Spezies- oder Subspeziesebene.

TSB-Agarplatten wurden mit etwas Zellmaterial einer isolierten Einzelkolonie nach Art eines Vierfelder-Verdünnungsausstrichs beimpft. Nach Bebrütung über 24 h bei 28 °C

wurde etwa 40 mg Bakterienzellmaterial aus dem dritten, bei langsam wachsenden Bakterien aus dem ersten oder zweiten Quadranten, in Duran-Kulturröhrchen mit Teflondichtung (Schott, Mainz) überführt. Durch Zugabe von 1 ml Lösung 1, kräftigem Vortexen und 30 minütigem Kochen im Wasserbad wurden die Bakterienzellen lysiert, die Fettsäuren von den Zelllipiden abgespalten und in ihre Natriumsalze überführt. Nach Abkühlen der Ansätze in kaltem Wasser wurden 2 ml der Lösung 2 zugefügt, 5 - 10 sec gevortext und für 10 min bei 80 °C im Wasserbad inkubiert. Dieser Schritt bewirkte die Veresterung der Fettsäuren zu FSME. Die Proben wurden in einem Eiswasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt. Zur Überführung der FSME in eine organische Phase erfolgte die Zugabe von 1,25 ml Reagenz 3 und anschließendes Überkopfschütteln für 10 min. Die untere wässrige Phase wurde mit einer Pasteurpipette entnommen und verworfen. Zur Entfernung von freien Fettsäuren wurden 3 ml Reagenz 4 zur organischen Phase zugefügt und erneut 5 min geschüttelt. Die obere organische Phase wurde in ein GC Röhrchen (Hewlett Packard, Waldbronn) überführt und mittels des Gaschromatographen HP6890 (Hewlett Packard, Waldbronn), ausgestattet mit der Kapillarsäule Ultra 2 (25 m, 0,2 mm, 0,33 µm), analysiert. Die gaschromatographische Analyse erfolgte mit der von MIDI vorgegebenen Methode und die numerische Identifizierung mittels der Sherlock software (MIDI, Inc., Newark, Delaware).

Verwendete Medien und Lösungen:

- TSB-Agarplatten:

30 g TSB (Becton Dickinson, Cockeysville, MD, USA)
15 g Agar (Bacto Agar; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)
Ad 1,0 l mit aqua demin., autoklavieren

- Lösung 1:

45 g NaOH
150 ml Methanol
150 ml aqua demin.

- Lösung 2:

325 ml 6N HCl
275 ml Methanol

- Lösung 3:

200 ml Hexan
200 ml Methyl tert.-Butylether

- Lösung 4:

10, 8 g NaOH
240 g NaCl
900 ml aqua demin.

2.11.3 Durchführung von physiologischen Tests

Als weitere Identifizierungsmethode wurden die Isolate mittels 87 physiologischer Tests nach dem Mikrotitrationsverfahren charakterisiert. Das Verfahren basiert auf klassischen biochemischen Tests, d.h. der Verwertung diverser Kohlenstoffquellen und der

Säurebildung aus Zuckern, und qualitativen enzymatischen Tests mittels chromogener Substrate (Kämpfer *et al.*, 1991).

Die Bakterienisolate wurden auf R2A-Agar angezogen und nach dem McFarland Standard 0,5 in 0,9%iger NaCl-Lösung resuspendiert. Je 50 µl der Bakteriensuspensionen wurden in die 96 Vertiefungen der Standard Mikrotitrationsplatten (Greiner, Nürtingen), die mit je 50 µl des jeweiligen Testmediums (Kämpfer *et al.*, 1991) gefüllt waren, pipettiert.

Die beimpften Platten wurden mit Folie abgeklebt und je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Bakterien für mehrere Tage bei 25 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte mit einem Multiscan MCC340 Photometer (Flow Laboratories, Meckenheim). Die gemessenen Extinktionswerte, die zusätzlich visuell kontrolliert wurden, wurden von einem Computer (Compaq Deskpro 286) nach Vergleich mit zuvor ermittelten Schwellenwerten in Plus- und Minusdaten umgewandelt. Die erhaltenen Testprofile wurden als prozentuale Häufigkeit positiver Testausprägungen mit einer Datenbank verglichen.

2.12 Beurteilung der Naphthalin- bzw. Phenanthren-Abbauleistung der Bakterienstämme

Zur Beurteilung der PAK-Abbauleistung der isolierten Bakterien und verschiedener Referenzstämme wurden nach standardisiertem Verfahren fünf parallele Kulturen in 100-ml-Enghalskolben mit je 10 ml Mineralsalzmedium (Kästner *et al.*, 1994b) und 5 mg Naphthalin bzw. Phenanthren angesetzt. Die Kolben wurden mit Gummikappen verschlossen und die Kulturen bei 25 °C und 180 rpm auf einem Rotationsschüttler inkubiert. An fünf aufeinanderfolgenden Tagen bzw. in kürzeren Zeitabständen wurde jeweils die optische Dichte der Kulturen bei 600 nm photometrisch gemessen. Die verbliebene Menge des entsprechenden PAK im Medium wurde mittels eines gaschromatographischen Verfahrens bestimmt, indem die verbliebene Menge des Polyaromaten durch Ausschütteln der Kultur mit 5 ml Hexan in die organische Phase überführt wurde. Ein Aliquot dieser Phase wurde im Gaschromatographen HP6890 (Säule Ultra 2, Hewlett Packard, Waldbronn) mit folgenden Parametern analysiert:

- Trägergas: H₂ (0,5 ml min⁻¹)
- Injektortemp.: 250 °C
- FID-Temp.: 300 °C
- Temperaturprogramm:
 - Anfangstemperatur: 50 °C
 - Temperaturerhöhung (15 °C min⁻¹) auf 275 °C
 - 1 min bei 275 °C
 - Temperaturerhöhung (20 °C min⁻¹) auf 325 °C
- Säulendruck: 6,7 psi

Abiotische Prozesse, die zur Reduktion der PAK im Medium führen, wurden durch Mitführen einer sterilen Probe berücksichtigt.

2.13 Abbau anderer aromatischer Verbindungen

Die Isolate wurden auf ihre Fähigkeit, Phenol, Salicylat, Benzoat und Biphenyl abzubauen, untersucht. 25 ml Mineralsalzmedium mit 0,05 % (w/v) der entsprechenden aromatischen Verbindung wurden mit etwas Zellmaterial der verschiedenen Bakterienstämme beimpft und die Kulturen bei 25 °C und 180 rpm inkubiert. Der Abbau wurde qualitativ anhand auftretender Trübung und Färbung beurteilt.

2.14 Bestimmung der Catechol-Dioxygenase-Aktivitäten

Der Abbau von Catechol kann durch zwei unterschiedliche Catechol-Dioxygenasen katalysiert werden. Während die Catechol 1,2-Dioxygenase das Substrat zwischen (*ortho*) den beiden Hydroxygruppen spaltet und zu *cis*, *cis* Muconsäure ($E_{\text{max}} = 255 \text{ nm}$) umsetzt (Nekazawa & Nekazawa, 1970), führt die Aktivität der *meta*-spaltenden Catechol 2,3-Dioxygenase zu dem gelbgefärbten Produkt 2-Hydroxymuconsäure-Semialdehyd ($E_{\text{max}} = 375 \text{ nm}$) (Nozaki, 1970). Aufgrund der unterschiedlichen Absorptionsmaxima der entstehenden Spaltungsprodukte können durch einen photometrischen Test die beiden Catechol-Dioxygenase-Aktivitäten in Bakterienkulturen parallel bestimmt werden. Zur Bestimmung der Catechol-Dioxygenase-Enzymaktivitäten wurde eine veränderte Methode nach Hamzah & Al-Baharna (1994) angewendet.

2.14.1 Anzucht der Stämme und Präparation des Proteinextraktes

150 ml mit 0,05% (w/v) Naphthalin oder Phenanthren angereichertes Mineralsalzmedium (Kästner *et al.*, 1994b) oder 50 ml dYT-Medium (2.2) wurden mit den Isolaten bzw. den Referenzstämmen beimpft. Die Kulturen wurden bei 25 °C auf einem Rotationsschüttler bis zu einer optischen Dichte von 0,5 bis 0,8 (gemessen bei 600 nm) inkubiert. Die Zellen wurden in 50-ml-Greiner-Röhrchen überführt (Greiner, Nürtingen), durch 20minütige Zentrifugation bei 4 °C und 4000 rpm geerntet, in 2 ml 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,8) resuspendiert und im Ultraschallbad (Bandelin Sonorex, TK52 Transistor; Bachhofer, Reutlingen) aufgeschlossen (5 min). Zur Abtrennung der Zellbestandteile von der wasserlöslichen Proteinfraction wurde der Ansatz für 20 min bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde bis zur Bestimmung der Proteinkonzentration und Durchführung des photometrischen Enzymtests auf Eis verwahrt.

2.14.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinquantifizierung im wäßrigen Überstand erfolgte nach der Biuret-Methode (Süßmuth *et al.*, 1987). 1 ml des Proteinextraktes wurden mit 3 ml Biuret-Reagenz versetzt und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Die Absorption des entstehenden Kupfer-Protein-Komplexes wurde gegen eine Referenz bei 546 nm gemessen. Zur Kalibrierung wurde eine 1%ige (w/v) Rinderserumalbuminlösung (BSA; Riedel-de Häen, Seelze) hergestellt und jeweils 1 ml der Verdünnungen mit 10, 5, 2, 1 bzw. 0,1 mg BSA ml⁻¹ wie die Proben behandelt.

Verwendete Lösung:

- Biuret-Reagenz:

0,75 g CuSO₄ × 5H₂O
 3,00 g NaKTartrat × 4H₂O
 150 ml NaOH (0,1 g ml⁻¹)
 ad 500 ml mit aqua demin.

2.14.3 Enzymassay

Die enzymatische Reaktion wurde in Quarzküvetten mit mindestens 50 µg Proteinextrakt in 250 µl 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6.8) durch Zugabe von 500 µl 1 mM Catechol-Kaliumphosphatpuffer (20 mM, pH 6,8) gestartet. Das Absorptionsspektrum von 230 bis 450 nm wurde mittels des Photometers Ultrospec 4000 UV/VIS (Pharmacia, Freiburg, FRG) über einen Zeitraum von 3,5 min in 30 sec Intervallen bestimmt. Bei geringen Catechol-Dioxygenase-Aktivitäten wurden die Meßintervalle auf 2 min und die Gesamtmeßzeit auf 14 min erhöht.

Berechnung der spezifischen enzymatischen Aktivität:

Die spezifische Enzymaktivität wird angegeben in µmol umgesetztes Substrat pro Minute und eingesetzter Proteinmenge [mg]. Wird das Substrat im Verhältnis 1:1 in das Produkt umgewandelt, so entspricht die umgesetzte Substratmenge dem anfallenden Produkt.

$$c_p = \Delta E \times \varepsilon^{-1} \times d^{-1}$$

$$M_p = c_p \times V$$

$$A = M_p \times (eM_{\text{Prot.}})^{-1}$$

c_p : Produktkonzentration [mol × l⁻¹]; entspricht der umgesetzten Substratkonzentration

ΔE : Extinktionsänderung [min⁻¹] bei Extinktionsmaximum

ε : molarer Extinktionskoeffizient [mol × l⁻¹ × cm⁻¹]

d : Schichtdicke der Küvette [cm]

M_p : entstehende Produktmenge

V : eingesetztes Reaktionsvolumen

A: spezifische Enzymaktivität

$eM_{\text{Prot.}}$ = für den Enzymtest eingesetzte Proteinmenge [mg]

$\epsilon_{\text{cis, cis Muconsäure}} = 1,62 \times 10^4 \text{ mol l}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Hamzah & Al-Baharna, 1994)

$\epsilon_{2\text{-Hydroxymuconsäure-Semialdehyd}} = 4,4 \times 10^4 \text{ mol l}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Nekazawa & Nekazawa, 1970)

2.15 DNA-Isolierungsmethoden

Die Isolierung von Gesamt-DNA aus Bakterien-Reinkulturen oder aus Umweltproben basiert auf dem Aufschluß der Bakterienzellen mittels Lysozym, SDS und Proteinase K, mittels thermischer oder mechanischer Behandlung. Die nachfolgende Phenolisierung und Chloroformierung bzw. die Komplexierung von Proteinen und Polysacchariden durch CTAB dient der Abtrennung der Nukleinsäuren von Proteinen und anderen Zellbestandteilen. Durch Zugabe von Salzen und Alkohol kann die DNA aus wäßrigen Lösungen gefällt werden.

Alle Zentrifugationsschritte wurden, falls nicht anders beschrieben, für 15 min bei 13000 rpm und 4 °C durchgeführt.

2.15.1 Isolierung von Gesamt-DNA aus Bakterien-Reinkulturen

Zur Isolierung von DNA aus Reinkulturen verschiedener Bakterienstämme wurde ein modifiziertes DNA-Isolierungsprotokoll nach Marmur (1961) angewendet.

5 ml einer Bakterienkultur (OD_{600} im Bereich zwischen 1,0 und 2,0) wurden für 10 min bei 4000 rpm bei RT zentrifugiert, und das Bakterienpellet in 5 ml Lysispuffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 4000 rpm, RT) und Resuspendierung des Pellets in 0,5 ml Lysispuffer wurden die Bakterienzellen in 2-ml-RG überführt und bis zur sichtbaren Lyse (max. 60 min) mit 250 μl Lysozym (20 mg ml^{-1}) und 50 μl Proteinase K (2 mg ml^{-1}) bei 37 °C inkubiert. 100 μl 25% SDS wurden zugefügt, 10 s gevortext und für 5 min bei RT belassen. Die Ansätze wurden auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 240 μl 5M NaCl zur Ausfällung von Proteinen vorsichtig geschüttelt.

800 μl Chloroform/Phenol/Isoamylalkohol (Roti-Phenol/Chloroform; Roth, Karlsruhe) wurden zugefügt, 10 s gevortext und 10 min bei RT inkubiert. Nach nochmaligem Vortexen wurden die Ansätze zentrifugiert und anschließend der obere wäßrige Überstand in ein neues RG überführt.

Diese Vorgänge wurden nach Zugabe von 900 μl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wiederholt. Durch Hinzufügen von 0,1 VT 3 M Natriumacetat (pH 8,0) und 0,6 VT Isopropanol (-20 °C) wurde die DNA durch vorsichtiges Schütteln aus der wäßrigen Lösung ausgefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation pelletiert und das DNA-Pellet mit 500 μl 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde die DNA in der Vakuumzentrifuge getrocknet, in 50 bis 200 μl TE/RNAse-Puffer (20 $\mu\text{g ml}^{-1}$)

aufgenommen und zum Verdau von RNA etwa 30 min bei 37 °C inkubiert.

1 µl der DNA-Lösungen wurden zur Kontrolle und zur Abschätzung der DNA-Konzentrationen auf einem 1,0%igen Agarosegel aufgetragen (2.16).

Alternativ erfolgte eine photometrische Bestimmung der DNA-Konzentrationen.

Dazu wurden 5 µl der DNA mit 495 µl TE-Puffer verdünnt und gegen TE-Puffer bei 230, 260 und 280 nm im Photometer (Ultraspac 4000 UV/VIS; Pharmacia, Freiburg) gemessen. Die DNA-Konzentrationen wurde nach folgender Formel berechnet:

$$c_{\text{DNA}} [\text{ng } \mu\text{l}^{-1}] = E_{260 \text{ nm}} \times 40 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1} \times \text{Verdünnungsfaktor (Sambrock } et al., 1989)$$

Verunreinigungen der DNA wurden durch Bildung der Quotienten $E_{260}/E_{280 \text{ nm}}$ und $E_{260 \text{ nm}}/E_{230 \text{ nm}}$ bestimmt. Als Richtlinien für nicht verunreinigte DNA gelten folgende Werte (Marmur, 1961):

$$E_{260}/E_{280 \text{ nm}} \geq 1,8$$

$$E_{260 \text{ nm}}/E_{230 \text{ nm}} \geq 2,2$$

Verwendete Lösungen:

- Lysispuffer
 - 25 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0
 - 5 ml 5 M NaCl
 - ad 250 ml mit aqua demin.
 - autoklavieren
- Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)
 - 24 VT Chloroform
 - 1 VT Isoamylalkohol

2.15.2 Schnelle DNA-Extraktion aus Bakterienzellen

Etwas Material einer Bakterienkolonie wurde in 100 µl sterilem aqua demin. resuspendiert und für 10 min in kochendem Wasser inkubiert. Die Suspension wurde für 5 min auf Eis belassen und der Überstand nach der Zentrifugation (10 min, 12000 rpm, 4 °C) in ein neues RG überführt. 10 µl dieses Überstands wurden in der PCR eingesetzt (2.20).

2.15.3 Isolierung von Gesamt-DNA aus Belebtschlammproben

Zur Isolierung von DNA aus Belebtschlamm wurden unterschiedliche, in der Literatur beschriebene Methoden (Tsai *et al.*, 1991; Herrick *et al.*, 1993; Wikström *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1996) kombiniert und optimiert.

2.15.3.1 DNA-Isolierung 1

1 ml Belebtschlamm wurde zentrifugiert, in einem 2-ml-RG in 510 μl TE-Puffer und 30 μl Lysozymlösung (50 mg ml^{-1}) resuspendiert, gevortext und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 50 μl Proteinase K (2 mg ml^{-1}) wurde 10 min bei 65 °C inkubiert, anschließend 30 μl 25% SDS zugefügt, gevortext und die Probe für 30 min bei 65 °C belassen. Durch Zufügen von 100 μl 5 M NaCl und 80 μl CTAB/NaCl mit nachfolgender 30minütiger Inkubation bei 65 °C wurden Proteine und andere Zellbestandteile komplexiert. Die Ansätze wurden mit 1 VT Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, leicht gemischt, 10 min bei RT belassen und nachfolgend zentrifugiert (30 min, 12000 rpm, RT). Der wäßrige Überstand wurde in ein neues RG überführt, und die DNA durch Zugabe von 0,7 VT Isopropanol, vorsichtigem Schütteln und mindestens 30minütiger Inkubation auf Eis ausgefällt. Die DNA wurde bei 12000 rpm (30 min, 4 °C) pelletiert und mit 500 μl 70% Ethanol (-20 °C) gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min, 12000 rpm, 4 °C) wurde die DNA in der Vakuumzentrifuge getrocknet und das Pellet in 50-100 μl TE/RNase-Puffer (20 $\mu\text{g ml}^{-1}$) aufgenommen und zum Verdau von RNA etwa 30 min bei 37 °C inkubiert.

1,0 μl der DNA wurde auf einem 1%igem Agarosegel getestet (2.16).

Verwendete Puffer und Lösungen:

- TE-Puffer, pH 8,0:
6,06 g Tris
5,84 g EDTA
ad 1 l mit aqua demin., autoklavieren
- CTAB/NaCl:
10% (w/v) CTAB in 0,7 M NaCl

2.15.3.2 DNA-Isolierung 2

4 ml Belebtschlamm wurden zentrifugiert (2 min, 12000 rpm, 4 °C) und in einem 2-ml-RG in 1 ml eiskaltem AE-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 5000 rpm, 4 °C) wurde das Zellpellet in 400 μl SET-Puffer aufgenommen und nach Zugabe von 50 μl Proteinase K (2 mg ml^{-1}) für 30 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden 75 μl 25% SDS, ca. 1 VT Quarzsand und 600 μl Chloroform/Phenol/Isoamylalkohol (Roti-Phenol/Chloroform; Roth, Karlsruhe) zugefügt, die Probe gründlich gevortext und für 5 min im Ultraschallbad behandelt (Bandelin Sonorex, TK52 Transistor; Bachhofer, Reutlingen). Es folgte eine zehnminütige Inkubation bei 60 °C mit anschließender Zentrifugation. Die obere wäßrige Phase wurde in ein neues RG überführt, mit gleichem VT Phenol (Roti-

Phenol; Roth, Karlsruhe) versetzt, gevortext, 10 min inkubiert und zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen, mit gleichem VT Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Dann wurde weiter, wie oben beschrieben, verfahren.

Die obere Phase wurde wiederum in ein neues RG überführt, und die DNA mit 0,1 VT 3 M Natriumacetat (pH 8,0) und 2 VT abs. Ethanol für 1 h bis über Nacht bei -20 °C gefällt. Nach der Zentrifugation wurde die DNA mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 13000 rpm, 4 °C). Das DNA-Pellet wurde in der Vakuumentrifuge getrocknet und in 50-100 µl TE/RNAse-Puffer (20 µg ml⁻¹) aufgenommen und zum Verdau von RNA etwa 30 min bei 37 °C inkubiert. 1,0 µl der DNA wurde auf einem 1%igem Agarosegel getestet (2.16).

Verwendete Puffer:

- AE-Puffer, pH 5,5:
 - 1,64 g Natriumacetat (20 mM)
 - 0,29 g EDTA (1 mM)
 - ad 1 l mit aqua demin., autoklavieren

- SET-Puffer, pH 7,6:
 - 1,46 g EDTA (50 mM)
 - 0,61 g Tris (50 mM)
 - 20 g Saccharose
 - ad 1 l mit aqua demin., frisch ansetzen

2.15.4 Aufreinigung der aus Belebtschlamm isolierten DNA-Rohextrakte

Bei der DNA-Isolierung aus Umweltproben findet eine Coextraktion von anderen hochmolekularen Substanzen, wie z.B. Huminstoffen statt, für die ein hemmender Einfluß auf die PCR und Hybridisierungsreaktionen beschrieben wurde (Tsai % Olson, 1992; Tebbe & Vahjen, 1993). Unumgänglich sind somit weitere Aufreinigungsschritte der oft bräunlich gefärbten DNA-Rohextrakte. Dabei wird die natürliche Affinität der DNA, sich an Glaspartikel, Silica oder Gelmatrices (z.B. Sephadex) zu binden, ausgenutzt.

2.15.4.1 Aufreinigung der DNA-Rohextrakte mit Silica-Glasmilch

Die Aufreinigung der DNA durch Silica-Glasmilch wurde aus den DNA-Präparationen direkt oder nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA-Rohextrakte mit anschließender Extraktion der Nukleinsäure aus dem Agarosegel durchgeführt.

Die gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten, das Gelstück in ein RG überführt, 3 VT 6 M NaI zugefügt und bis zum Schmelzen der Agarose (etwa 5 min) bei 55 °C inkubiert. Zur Bindung der DNA an die Silica-Matrix wurden 30 µl

Silica-Glasmilch, die zuvor 1 min gevortext wurde, zugegeben und 5 min bei RT, mit wiederholtem Vortexen, inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation (5-15 s, 12000 rpm, RT) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet in 500 µl Waschlösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (5-15 s, 12000 rpm, RT) wurde der Waschschrift wiederholt und das verbleibende Pellet in der Vakuumzentrifuge vollständig getrocknet. Das Silica-Pellet wurde in 30-50 µl 0,1 × TE-Puffer (pH 8,0) gelöst, gut gemischt und 5-10 min bei 55 °C mit wiederholtem Vortexen inkubiert. Die Silica-Glasmilch wurde abzentrifugiert (1 min, 12000 rpm, RT) und der Überstand in ein neues RG überführt. 1-5 µl wurden zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen (2.16).

Die Silica-Aufreinigung der flüssigen DNA-Präparationen erfolgte analog zu den beschriebenen Aufreinigungsschritten. Dabei wurden nur 2 VT 6 M NaJ zu den Ansätzen pipettiert und auf den anfängliche Inkubationsschritt bei 55 °C verzichtet.

Verwendete Lösungen:

- 10 × PBS (pH 7,4):
 - 8 g NaCl
 - 0,2 g KCl
 - 1,15 g Na₂HPO₄ × 7 H₂O
 - 0,2 g KH₂PO₄
 - ad 100 ml mit aqua demin., autoklavieren
 - 1 × PBS wurde durch 1:10 Verdünnung aus 10 × PBS hergestellt.
- Silica-Glasmilch (Boyle & Lew, 1995); 100 mg ml⁻¹:
 - 10 g Silica (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) in 10 ml 1 × PBS resuspendieren.
 - 2 h absetzen lassen.
 - Überstand vorsichtig abdekantieren.
 - Resuspendieren in 10 ml 1 × PBS.
 - 2 h absetzen lassen.
 - Zentrifugation (2 min, 3500 rpm, RT).
 - Silica-Pellet in 10 ml sterilfiltriertem 3 M NaJ resuspendieren.
 - Zu je 500 µl aliquotieren, RG mit Parafilm verschließen und bei 4 °C im Dunkeln lagern.
- Waschlösung:
 - 0,5 ml 5 M NaCl
 - 0,5 ml 1 M TrisHCl, pH 7,5
 - 250 µl 0,5 M EDTA
 - 25 ml abs. Ethanol
 - ad 50 ml mit aqua demin.

2.15.4.2 Aufreinigung der DNA-Rohextrakte mit Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP)

Zur Reinigung der DNA-Rohextrakte wurde eine modifizierte Agarose-Gelelektrophorese nach Kowalchuk *et al.* (1997) eingesetzt. Die Methode basiert auf der Fähigkeit des PVPPs, Huminstoffe zu binden.

Es wurde ein 2%iges Agarose-Gel, welches mit 1% PVPP angereichert wurde, in einen Gelschlitten mit breiten Geltaschen gegossen und das Gel nach dem Erstarren 1-2 cm hinter den Slots abgeschnitten. Der Rest des PVPP-Gels wurde verworfen und ein unangereichertes 1%iges Agarose-Gel in den leeren Teil des Gelschlittens gegossen. 30-50 μ l der DNA-Rohextrakte wurden, wie beschrieben (2.16), in die Geltaschen pipettiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Bande wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA, wie unter 2.21.1 beschrieben, aus der Agarose extrahiert.

2.15.4.3 Aufreinigung der DNA-Rohextrakte mit dem Wizard™ DNA Clean-Up System

Die Wizard DNA Clean-Up Säulen wurden mit den mitgelieferten Spritzen nach Herstellerangaben zusammengesetzt und 50 μ l des DNA-Rohextraktes mit 1 ml Wizard DNA Clean-Up Resin versetzt. Nach gründlichem Mischen wurde das Gemisch vollständig in die Spritze gegeben und durch die Säule gedrückt. Das Säulchen wurde zweimal mit je 2 ml 80%igem Isopropanol gespült und die Durchflußfraktionen verworfen. Die Säule wurde in ein RG überführt und das Säulenmaterial durch kurze Zentrifugation (20 s, 12000 rpm, RT) getrocknet. Nach Überführen des Säulchens in ein neues RG wurde die an die Säulenmatrix gebundene DNA durch Zugabe von 50 μ l erwärmten (65-70 °C) TE-Puffers (pH 8,0), einminütiger Inkubation bei RT und Zentrifugation (20 s, 12000 rpm, RT) von der Säule eluiert.

2.16 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Auftrennung von DNA nach deren Molekülgröße erfolgte auf Agarose-Gelen (1,0%ig für genomische DNA, restriktionsverdauten Plasmiden oder PCR-Produkten; 1,5%ig für restriktionsverdaute Gesamt-DNA) mittels einer Horizontal-Gelelektrophorese (MWG Biotech, Eberstadt).

1,0-1,5 g Agarose (Qualex Gold Agarose; AGS, Heidelberg) bzw. 0,3-0,45 g wurde in 100, bzw. 30 ml TAE-Puffer in der Mikrowelle bei 360 W bis zum vollständigen Schmelzen der Agarose aufgekocht. Nach kurzem Abkühlen wurde die Agaroselösung in einen gesäuberten Gelschlitten mit eingesetztem Gelkamm gegeben. Die aufzutragenden DNA-Proben wurden je nach Volumen mit 5-10 VT 1 \times bzw. mit 1/10 VT 10 \times DNA-Auftragspuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von etwa 10 V cm^{-1} Gellänge in 1 \times TAE als Laufpuffer. Die DNA wurde in einem Ethidiumbromidbad (500 $\mu\text{g l}^{-1}$ in aqua demin.) für 30-60 min

angefärbt und unter UV-Licht bei 365 nm (Transilluminator TL-365, Spectroline) sichtbar gemacht. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte durch Ausdrucken der Videoaufnahmen der Agarose-Gele mit dem Videoprinter Cybertech CS1 (Mitsubishi, Ratingen) oder durch Fotografieren unter UV-Licht (Blende 8,0; Belichtungszeit 10 und 20 s; Film Agfapan APX25) mit einem Rot-Orange-Filter.

Verwendete Lösungen:

- 50 × TAE

- 242 g Tris base
 - 57,1 ml Eisessig
 - 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0
 - autoklavieren

- 1 × TAE wurde durch 1:50 Verdünnung aus 50 × TAE hergestellt.

- 10 × DNA-Auftragspuffer:

- 200 µl 50 × TAE
 - 300 µl 87%iges Glycerin
 - 500 µl aqua demin.
 - Spatelspitze Bromphenolblau
 - Spatelspitze Xylylencyanol

Verwendete DNA-Fragmentlängenstandards:

Zur Abschätzung der Größen und der Konzentrationen der auf Agarose-Gelen aufgetrennten Gesamt-DNA oder der DNA-Fragmente wurden parallel zu den Proben DNA-Längenstandards eingesetzt. Verwendet wurde *EcoR I/Hind III*-geschnittene Lambda-DNA mit einer Konzentration von 500 ng µl⁻¹ (Promega, Madison, WI, USA), die aus 13 Fragmenten der folgenden Größe besteht:

21227, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 974, 831, 564 und 125 bp.

Ebenso wurde ein 100 bp Längenstandard (Promega, Madison, WI, USA) mit einer Konzentration von 130 ng × µl⁻¹ eingesetzt, bestehend aus 11 Fragmenten der Größe:

1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 und 100 bp.

2.17 Restriktionsenzymatischer Verdau von Gesamt-DNA

Für den Restriktionsverdau wurden 0,2 bis 1,0 µg genomischer DNA mit 10 bis 20 Units des jeweiligen Restriktionsenzym und 0,1 VT der entsprechenden 10 × Pufferlösung versetzt und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Nach Zugabe von 0,1 VT 3 M Natriumacetat und 2 VT 96% Ethanol wurde die restriktionsverdaute DNA durch Zentrifugation (15 min, 13000 rpm, 4 °C) ausgefällt und anschließend mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach

erneuter Zentrifugation (5 min, 13000 rpm, 4 °C) wurde das Vakuum-getrocknete DNA-Pellet in 20 µl TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen und komplett auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen.

2.18 Blottingverfahren

Bei den Blottingverfahren werden einzelsträngige Nukleinsäuren oder denaturierte doppelsträngige DNA auf Nylon- oder Nitrocellulosemembranen übertragen. Die Nukleinsäuren sind fest an die Membranen gebunden, können aber mit einer einzelsträngigen oder denaturierten doppelsträngigen Nukleinsäuresonde hybridisieren.

2.18.1 Southern-Blotting

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA-Gemische wurden zur Durchführung von Folgereaktionen nach dem Verfahren von Southern (1975) auf eine positiv-geladene Nylonmembran (HybondTM-N+, Amersham, Braunschweig) übertragen.

Nach der Agarose-Gelelektrophorese wurde das Gel zur Denaturierung der aufgetrennten DNA-Fragmente in 1,5 M NaCl und 0,5 M NaOH unter leichtem Schütteln für ca. 30 min. inkubiert. Anschließend wurde das Agarose-Gel auf ein mit 10 × SSC getränktes Gel-Blotting-Papier (GB002; Schleicher & Schüll, Dassel), welches mit beiden Enden in ein 10 × SSC-Pufferreservoir eintauchte, gelegt. Eine Nylonmembran wurde luftblasenfrei auf das Gel aufgebracht, darüber 2 Lagen Gel-Blotting-Papier und mehrere Lagen Filterpapier gestapelt und das Ganze mit einer Glasplatte und einem Gewicht (ca. 500 g) beschwert. Nach 2-16 h Blotting-Dauer wurde der Nylonfilter kurz in 2 × SSC gewaschen, getrocknet und für die Hybridisierung verwendet.

2.18.2 DNA-Dot-Blots

Bei einem DNA-Dot-Blot wird die DNA, ohne deren Komponenten zuerst in einer Elektrophorese aufzutrennen, mittels einer Saugapparatur auf eine Membran aufgebracht.

Eine definierte Menge an DNA, ca. 1,0 µg, wurde mit aqua demin. auf ein Volumen von 40 µl aufgefüllt, mit 160 µl 0,5 M NaOH versetzt und zur Denaturierung der DNA für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden anschließend auf Eis gestellt.

In eine Dot-Blot-Apparatur (Minifold; Schleicher & Schüll, Dassel) wurde eine Hybond-N+-Nylonmembran (Amersham, Braunschweig) auf eine Lage Blottingpapier (GB002; Schleicher & Schüll, Dassel), das mit 10 × SSC befeuchtet wurde, aufgelegt. Die Apparatur wurde zusammengebaut und in die Slots 200 µl 0,5 M NaOH eingebracht. Das komplette Volumen wurde durch Anlegen eines Vakuums mittels einer Vakuumpumpe durch die Membran gesaugt und die Slots erneut mit 200 µl 0,5 M NaOH befüllt. In diese Vorlage wurden die denaturierten DNA-Ansätze pipettiert. Durch erneutes Vakuumanlegen wurde

die DNA auf die Nylonmembran aufgebracht. Die Slots wurden nochmals mit 200 µl 0,5 M NaOH gespült und der Nylonfilter an der Luft getrocknet.

2.19 Hybridisierungstechniken

Bei der Hybridisierung binden Nukleinsäuresonden an komplementäre Sequenzabschnitte. Befinden sich die Zielsequenzen auf doppelsträngiger DNA, wird die DNA vor der Hybridisierung durch Erwärmen oder chemische Behandlung in ihre Einzelstränge dissoziiert.

Die Hybridisierung von DNA-Sonden an Zielsequenzen wurde zur Überprüfung von PCR-Amplifikaten, zur Detektion von C23O-codierenden Bereichen auf Restriktionsfragmenten enzymatisch-verdauter DNA (2.17), zum Nachweis von C23O-Genen in Gesamt-DNA über Dot-Blot-Verfahren (2.18.2) oder in Bakterienkolonien durch Koloniehybridisierung (2.19.2), durchgeführt. Als Sonden wurden einzelsträngige DNA-Oligonukleotidsonden oder doppelsträngige DNA-Fragmente aus der PCR verwendet. Die Sonden waren mit einer Meerettich-Peroxidase markiert. Bei der Detektionsreaktion (*enhanced chemilumineszenz*, ECL) wird das Substrat für die Peroxidase, H_2O_2 , in H_2 und O_2 gespalten. Bei der nachfolgenden Oxidation von Luminol durch den entstandenen Sauerstoff wird blaues Licht emittiert. Die Emission von Blaulicht wird durch einen sogenannten *enhancer* verstärkt, so daß eine Detektion auf einem Blaulicht-sensitiven Film möglich ist.

2.19.1 Hybridisierung membrangebundener DNA

2.19.1.1 Hybridisierung mit Peroxidase-markierten Oligonukleotidsonden

Die Nylonfilter (Southern-Blots, Dot-Blots) wurden in eine Glasröhre (Bachofer, Reutlingen) überführt, 10 ml Prähybridisierungslösung zugegeben und für mindestens 1 h bei 35 °C im Hybridisierungsöfen (Bachofer, Reutlingen) bei konstanter Rotation inkubiert. Die Prähybridisierungslösung wurde verworfen und 1 ml des entsprechenden Hybridisierungspuffers mit 1 µl ($35 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$) Peroxidase-markierter Oligonukleotidsonde (2.8.2.2) zugefügt. Nach mindestens 30-minütiger Inkubation wurde die Hybridisierungslösung durch 10 ml auf 35 °C vorgewärmte Waschlösung ersetzt und für 15 min bei 37 °C rotiert. Der Waschschrift wurde einmal wiederholt, die Membran in eine Plastikwanne überführt, bei Raumtemperatur ca. 1 min in $2 \times \text{SSC}$ gewaschen und für 1 min auf Gel-Blotting-Papier mit der DNA-Seite nach oben getrocknet.

Zur Detektion der hybridisierten Sonden wurden gleiche VT der ECL-Detektionslösungen 1 und 2 (Amersham, Buckinghamshire, UK) gemischt und der Nylonfilter mit der DNA-Seite nach unten für 1 min darin inkubiert. Die Exposition des in Frischhaltefolie eingewickelten Filters erfolgte für 2-30 min gegen einen Blaulicht-sensitiven Film (HyperfilmTM ECL; Amersham, Buckinghamshire, UK).

Nach der Detektionsreaktion wurden die Filter zur Entfernung der gebundenen Sondenmoleküle zunächst 10 min bei RT in aqua demin., anschließend 10 min bei 80 °C in Denaturierungslösung (0,5% SDS, 0,1 × SSC) und wiederum 10 min bei RT in aqua demin. gewaschen.

Verwendete Lösungen:

- Maleinsäurepuffer, pH 7,5:

8,77 g NaCl
11,6 g Maleinsäure
ad 1,0 l

- Blockierungsvorratslösung:

10% (w/v) Blocking-Reagenz (Boehringer Mannheim, Mannheim) in Maleinsäurepuffer lösen und autoklavieren. Bei 4 °C lagern.

- Prähybridisierungslösung:

28,1 ml 20 × SSC
22,5 ml Blockierungsvorratslösung
1,125 ml 10% (w/v) N-Laurylsarkosin (Sigma, Deisenhofen)
225 µl 10% (w/v) SDS

- Hybridisierungslösung:

180 µl 5 M NaCl
400 µl Blockierungsvorratslösung
x µl Formamid (je nach Stringenz, Tab. 5)
1 µl 10% SDS (w/v)
10 µl 10% (w/v) N-Laurylsarkosin (Sigma, Deisenhofen)
20 µl TrisHCl
ad 1 ml mit sterilem aqua demin.

- Waschlösung:

1 ml 1M TrisHCl, pH 8,0
50 µl 10% SDS (w/v)
x ml 5 M NaCl (je nach Stringenz, Tab. 5)
ad 50 ml mit sterilem aqua demin.

Tabelle 5: NaCl-Konzentration im Waschpuffer für die Hybridisierung mit Peroxidase-markierten Sonden.

Hybridisierung bei 35 °C	Waschung bei 37 °C	
% Formamid bei der Hybridisierung	NaCl [mM]	µl 5 M NaCl auf 50 ml
0	900	9000
5	581	5810
10	376	3760
15	243	2430
20	157	1570
25	101	1010
30	65	650
35	42	420
40	27	270
45	18	180
50	11	110
55	7	70
60	5	50
65	3	30

2.19.1.2 Hybridisierung mit doppelsträngigen DNA-Fragmenten

Zur Hybridisierung der Membran-gebundenen DNA mit doppelsträngigen DNA-Sonden, die durch die PCR hergestellt wurden, wurden die etwa 700 bp langen Sonden zunächst mit Meerrettich-Peroxidase markiert. Die Markierungsreaktion wurde mit dem Labelling Mix/ Glutaraldehyd der Firma Amersham (Buckinghamshire, UK) durchgeführt. Dabei bindet sich die im Mix enthaltene, mit einem positiv-geladenen Polymer komplexierte Peroxidase zunächst lose an die denaturierten DNA-Stränge und wird dann durch die Zugabe von Glutaraldehyd kovalent an die Einzelstränge gebunden.

Die aufgereinigten PCR-Fragmente wurden für 5 min bei 95 °C denaturiert, anschließend ca. 2 min auf Eis belassen, 10 µl Labelling Mix und 10 µl Glutaraldehyd hinzupipettiert, vorsichtig gemischt und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die markierte Sonde wurde direkt zu den Filtern pipettiert, die zuvor bei 42 °C für mindestens 30 min mit etwa 5 ml ECL-Hybridisierungspuffer vorinkubiert wurden. Die Hybridisierung erfolgte für 2 h bis über Nacht bei 42 °C.

Die Waschung der Filter erfolgte unter unstringenten oder stringenten Bedingungen:

- Unstringente Waschschrte:
 - 42 °C: 2 × 10 min mit 1 × SSC, 0,5% SDS
 - RT: 2 × 5 min mit 2 × SSC

- Stringente Waschschrte:

42 °C: 5 min mit $2 \times \text{SSC}$

42 °C: 10 min mit $0,02 \times \text{SSC}$, 0,1% SDS

60 °C: 2×5 min mit $0,02 \times \text{SSC}$, 0,1% SDS

RT: 5 min mit $20 \times \text{SSC}$

Die Detektion der hybridisierten Sonden und die nachfolgende Denaturierung erfolgte wie beschrieben (2.19.1.1).

2.19.2 Koloniehybridisierung

Diese Methode beruht auf der *in situ*-Lyse von Bakterienkolonien auf Nitrocellulose- oder Nylonfiltern und der Fixierung der freigesetzten DNA an die Filteroberfläche. Durch Hybridisierung der Filter mit Enzym-markierten Sonden können Bakterienkolonien, die entsprechende Zielsequenzen besitzen, direkt nachgewiesen werden.

Die zu testenden Bakterienstämme wurden rasterförmig auf eine R2A-Agarplatte geimpft und die Kolonien bis zu einer Größe von etwa 2-5 mm angezogen. Die Agarplatte wurde zunächst für 1 h in den Kühlschrank gestellt und dann zur Übertragung der Bakterienkolonien ein Nylonfilter (Qiagen, Hilden) für etwa 1 min aufgelegt.

Alternativ wurden die Bakterienkolonien direkt auf einer Nylonmembran (Biodyne A Transfer Membrane, 0,2 μm ; Pall, Portsmouth, UK), die auf eine Caso-Agarplatte (Caso-Agar; Oxoid, Wesel) aufgelegt war, herangezogen.

Die Lysierung der auf der Membran haftenden Bakterienkolonien erfolgte durch verschiedene Methoden (2.19.2.1 und 2.19.2.2). Die anschließende Hybridisierung und Detektion wurde wie beschrieben mit Peroxidase-markierten Oligonukleotidsonden (2.19.1.1) oder doppelsträngigen DNA-Fragmenten (2.19.1.2) nach dem ECL-Verfahren durchgeführt.

2.19.2.1 Kolonielyse durch alkalische Denaturierung:

Bei der alkalischen Lysierung wurde die Membran mit der Bakterienkolonieseite nach oben für etwa 7 min auf eine Doppellage Gelblotting-Papier (GB002; Schleicher & Schüll, Dassel), die mit Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) getränkt war, aufgebracht. Durch diesen Schritt wurden die Bakterienkolonien lysiert und gleichzeitig die bakterielle DNA denaturiert. Zur Entfernung der Bakterienreste wurde der Filter mehrmals unter heftigem Schütteln mit $2 \times \text{SSC}$ gewaschen.

2.19.2.2 Kolonielyse nach Buluwela et al. (1989):

Die Nylonfilter wurden mit der Bakterienkolonieseite nach oben in einer 20-cm-Glaspetrischale auf 2 Lagen Gelblotting-Papier, das mit einer $2 \times \text{SSC}$, 5% SDS-Lösung

getränkt war, aufgelegt. Nach guter Durchfeuchtung der Filter wurden diese bei 600 W für 2 min in der Mikrowelle inkubiert und anschließend auf einer desinfizierten Glasplatte an der Luft getrocknet. Die freigesetzten Nukleinsäuren wurden durch zweiminütiges UV-Crosslinken (GATC link; GATC, Freiburg) auf der Membran fixiert.

Zum Nachweis grampositiver Kolonien wurde ein Lysozym- und Proteinase K-Verdau angeschlossen. Dazu wurden die Membranen mit sterilem aqua demin. befeuchtet und 30 min bei RT in Lysozypuffer inkubiert. Nach zweimaligem Spülen mit sterilem aqua demin. und kurzem Lufttrocknen wurden die Membranen erneut 2 min gecrosslinkt. Die Filter wurden anschließend wiederum mit sterilem aqua demin. befeuchtet, dann zunächst 1 h mit Prähybridsierungslösung (2.19.1.1) bei 65 °C inkubiert und ein weiterer einstündiger Inkubationsschritt bei 65 °C mit ProteinaseK-Lösung angeschlossen. Nach zweimaligem Waschen der Filter bei 65 °C mit $2 \times \text{SSC}$, 0,1% SDS wurden sie für die Hybridisierung mit Peroxidase-markierten Sonden verwendet.

Verwendete Lösungen:

- Lysozypuffer:

100 ml 1 M TrisHCl, pH 8,0

100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0

ad 1,0 l mit aqua demin.

Vor Gebrauch Zugabe von $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ Lysozym (75000 U ml^{-1}) (Serva, Heidelberg)

- Proteinase K-Lösung:

100 µg ml^{-1} Proteinase K (Serva, Heidelberg) in $2 \times \text{SSC}$, 0,1% SDS

2.20 Amplifizierung von C230 codierenden DNA-Bereichen mittels der PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR), die 1985 von Kary Mullis entwickelt wurde (Saiki *et al.*, 1988; Mullis, 1990), ist eine *in vitro*-Technik zur gezielten millionenfachen Amplifizierung von spezifischen DNA-Segmenten, die zwischen zwei Regionen bekannter DNA-Sequenzen liegen. Die PCR basiert auf einer zyklischen Wiederholung von drei aufeinanderfolgenden Reaktionen: Denaturierung, Primeranlagerung (*annealing*) und Primerverlängerung (*extension*). Als Starthilfe für die Reaktion benötigt man zwei Oligonukleotidprimer, kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu den Enden der zu vervielfältigten Sequenz sind. Diese lagern sich nach der Denaturierung der doppelsträngigen DNA an ihre Zielregionen an. In Gegenwart von Desoxynucleotiden (dNTPs) und unter geeigneten Reaktionsbedingungen verlängert eine thermostabile DNA-Polymerase die Primer nach der einzelsträngigen DNA-Vorlage. Die neusynthetisierten DNA-Stränge dienen wiederum als Matrize für die Synthese weiterer Stränge.

Das Zielfragment, dessen Enden definiert sind durch die 5'Enden der Primer, wird damit exponentiell vermehrt.

- Standard-Reaktionsansatz (Die Reagenzien für die PCR wurden von der Fa. Promega, Madison, WI, USA bezogen)

Template-DNA	max. etwa 2 µg
10 × Reaktionspuffer	5 µl
MgCl ₂ , 25 mM	4-10 µl
dNTP, 1 mmol	6 µl
Primer, 100 pmol (Gibco, Eggenstein)	je 1 µl
<i>Taq</i> -Polymerase, 5 U µl ⁻¹	0,2 µl
ad 50 µl mit sterilem aqua demin.	

- Standard-PCR-Temperaturprogramm (Hybaid Touchdown; Hybaid, Heidelberg)

1 ×	5 min	94 °C
30 ×	30 sec	94 °C
	30 sec	50 bis 63 °C (je nach Primerpaar)
	1 min	72 °C
1 ×	3 min	72 °C

2.20.1 Design von Primern für die PCR und von Oligonukleotidsonden

Veröffentlichte C23O Sequenzen (GenBank, National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA) wurden mit dem DNA- Programm ClustalX (Thompson *et al.*; 1997) *aligned* und aus den konservierten Genabschnitten PCR-Primer und Oligonukleotidsonden generiert.

2.21 Klonierung von PCR-Fragmenten in Plasmid-Vektoren

Amplifikate aus der PCR (2.20) wurden zur Erfassung der kompletten Sequenz der PCR-Fragmente in Vektoren kloniert.

Für die Klonierung wurden die Vektoren pGEM-T (Promega, Madison, WI, USA) oder Bluescript II SK (Stratagene, Heidelberg) verwendet (Tab. 1; 2.1). Beide Vektoren besitzen für den definierten Einbau von Fremd-DNA einen 100 bis 200 bp langen DNA-Abschnitt mit eng nebeneinanderliegenden, singulären Erkennungssequenzen für verschiedene Restriktionsschnittstellen (*multiple cloning site*). Durch den Besitz von zwei selektiven Markern, dem Ampicillinresistenz- und dem *lacZ*-Gen der beiden verwendeten Bluescript-Vektoren, können Bakterienzellen, die ein rekombinantes Plasmid aufgenommen haben, selektiv angereichert werden.

2.21.1 Aufreinigung der PCR-Produkte aus Agarose-Gelen

Zur Aufreinigung der aufgetrennten PCR-Fragmente aus Agarose-Gelen wurde das DNAClean™ Kit (AGS, Heidelberg) verwendet. Die Methode basiert auf der Eigenschaft der DNA, sich in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen an Silica-Partikel zu binden (Vogelstein & Gilesie, 1979). Durch nachfolgende Elution mit Wasser oder Pufferlösungen kann die DNA wieder in die wäßrige Phase überführt werden.

Die DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell aus der Agarose-Matrix ausgeschnitten und in ein 1,5-ml-RG überführt. Pro 100 mg Agarose wurden 200 µl Lösung 1 zugefügt und der Ansatz für etwa 5 min, bis zum Schmelzen der Agarose, bei 55 °C im Wasserbad belassen. Nachfolgend wurden 5-15 µl Silica-Suspension zugefügt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit zwei- bis dreimaligem Vortexen während der Inkubationszeit. Die Silica-gebundene DNA wurde durch Zentrifugation (30 sec, 12000 rpm, RT) sedimentiert und das Pellet zweimal mit Lösung 2 gewaschen. Nach dem zweiten Waschschritt wurde das Pellet in der Vakuumzentrifuge vollständig getrocknet, und die DNA durch Resuspendierung des Silica-Pellets in 20-50 µl 0,1 × TE (pH 8,0) und 10minütiger Inkubation bei 55 °C eluiert. Während der Inkubation wurde 2-3 × gevortext. Nach einminütiger Zentrifugation bei 12000 rpm wurde der Überstand, der die gelöste DNA enthält, in ein neues RG überführt.

2.21.2 Vorbereitung des Vektors

Für die Klonierung von PCR-Fragmenten, die, bedingt durch die zusätzliche terminale Deoxynukleotid-Transferaseaktivität der verwendeten *Taq* Polymerase, einen dATP-Überhang an ihren 3'Enden aufweisen, war eine Vorbereitung des Bluescript II SK Vektors (Stratagene, Heidelberg) notwendig. Dabei wurde der Vektor linearisiert und dTTPs an beiden 3'Enden angefügt. Für diese Reaktion wurden 50 µl des Vektors durch Zugabe von 5 µl 3 M Natriumacetat (pH 8,0) und 110 µl abs. Ethanol für 30 min bei -20 °C gefällt. Durch Zentrifugation (15 min, 13.000 rpm, 4 °C) wurde die Vektor-DNA pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Die in der Vakuumzentrifuge getrocknete Vektor-DNA wurde in 50 µl sterilem aqua demin. aufgenommen und zur Linearisierung des Plasmids 5 µl 10 × Puffer und 1 µl *EcoR* V (Sigma BioScience, St. Louis, Mo, USA) zugefügt und für 1-2 h bei 37 °C belassen. Die Linearisierung des Plasmids wurde durch Auftragen eines Aliquots des Reaktionsansatzes auf ein Agarosegel (2.16) überprüft.

Das Anfügen der dTTPs an die 3'Enden des linearisierten Vektors erfolgte im Thermocycler über 2 h bei 72 °C. Die Reaktion wurde in einem Endvolumen von 50 µl durchgeführt.

- Reaktionsansatz (Die Reagenzien wurden von der Fa. Promega, Madison, WI, USA bezogen):

10 × <i>Taq</i> Reaktionspuffer	5 µl
MgCl ₂ , 25 mM	3 µl
dTTP, 1 mmol	2,5 µl
<i>Taq</i> -Polymerase, 5 U µl ⁻¹	0,5 µl
<i>EcoR</i> V geschnittener Vektor	39 µl

Der Reaktionsansatz wurde über die MicroSpin S-400 HR Säulchen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), wie vom Hersteller beschrieben, aufgereinigt.

2.21.3 Ligation

Die Ligation der aufgereinigten PCR-Produkte erfolgte mit dem pGEM-T oder dem vorbereiteten Bluescript II SK Vektor (2.21.2). Der Vektor pGEM-T wurde vom Hersteller durch den Restriktionsverdau des Vektors pGEM-5Zf(+) mit *EcoR* V und der Addition von 3'-terminalen dTTPs an beiden Enden gebrauchsfertig vorbereitet. Die einzelnen 3'-dTTP Überhänge ermöglichen aufgrund der dATP-Überhänge an ihren 3'-Enden eine direkte Ligation der PCR-Amplifikaten mit dem pGEM-T Vektor.

Für die Ligationsreaktion wurde jeweils 1 µl der in dem pGEM-T Vector Systems (Promega, Madison, WI, USA) enthaltenen Komponenten, pGEM-T Vektor (50 ng), T4 DNA Ligase 10 × Puffer und T4 DNA Ligase (entspricht 3 Weiss U), mit 7 µl des aufgereinigten PCR-Produktes gemischt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Die Ligation mit dem Bluescript II SK Vektor erfolgte in einem Volumen von 20 µl mit 2 µl des vorbereiteten Vektors (2.21.2), 2 µl 10 × T4 Ligase Puffer, 2 µl T4 DNA Ligase (Amersham, Cleveland, Ohio, USA), 10 µl des gereinigten PCR-Produktes und 4 µl sterilem aqua demin.. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4 °C.

2.21.4 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Zum effektiven Einschleusen von Fremd-DNA in Bakterienzellen müssen die Zellen zuvor vorbehandelt werden, um die Zellwand der Bakterien für die Plasmide durchlässig zu machen.

25 ml dYT Medium wurde mit 50-100 ml einer alten Charge kompetenter Zellen (*E. coli* K 12, DH5α, DSM 6897) beimpft und über Nacht bei 37 °C auf einem Rotationsschüttler (SM-30, Edmund Bühler, Tübingen) inkubiert. Am folgenden Tag wurde 1 ml dieser Vorkultur zu 100 ml frischem dYT Medium gegeben und bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von etwa 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden bei 3000 rpm und 4 °C sedimentiert, der Überstand verworfen und die Zellen auf Eis gelagert. Das Zellpellet wurde in 10 ml TSS vorsichtig resuspendiert und portioniert zu 200 µl bei -80 °C eingefroren.

Verwendete Lösungen:

- TSS (Transformation-Storage-Solution):
 - dYT-Medium mit
 - 10% (w/v) PEG 3300 oder PEG 8000
 - 5% (v/v) DMSO
 - 50 mM Mg²⁺ als MgCl₂ oder MgSO₄

2.21.5 Transformation

Bei der Transformation werden DNA-Moleküle in Form eines Plasmids in Bakterienzellen eingeführt.

100 µl kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, zu dem Ligationsansatz gegeben und für 30 min auf Eis belassen. Es folgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42-45 °C. Nach Zugabe von 300 µl dYT-Medium und vorsichtigem Mischen wurde für 45 min bei 37 °C inkubiert. 100 µl des Ansatzes wurden auf eine dYT/Amp-Agarplatte, die zuvor mit 40 µl einer X-Gal-Lösung bestrichen wurden, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bakterienzellen mit einem rekombinanten Plasmid wuchsen zu weißen Kolonien heran.

Verwendete Medien und Lösungen:

- dYT/Amp-Agarplatten
 - 1 l dYT-Flüssigmedium (2.2)
 - 15 g Agar (Bacto Agar; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)
 - autoklavieren, abkühlen auf 49 °C
 - Zugabe von 2 ml 2,5%iger (w/v) Ampicillinlösung (AGS, Heidelberg)
- X-Gal
 - 20 mg ml⁻¹ X-Gal (AGS, Heidelberg) wurden in Dimethylformamid gelöst und bei -20 °C verwahrt.

2.21.6 Isolierung von rekombinanten Plasmiden

Die Extraktion und Aufreinigung der rekombinanten Plasmide aus *E. coli* Zellen erfolgte mit dem GFXTM Micro Plasmid Prep Kit (Pharmacia Biotech, Freiburg). Die Methode beruht auf alkalischer Lyse der Bakterienzellen, Denaturierung der Proteine durch chaotrophe Salze und selektiver Bindung der Plasmid-DNA an eine Glasfibrermatrix. Denaturierende Reagenzien können durch Waschstschritte entfernt werden, und anschließend die Plasmid-DNA von der Matrix durch Pufferlösungen mit niedrigen Salzkonzentrationen eluiert werden.

Mit einem sterilen Zahnstocher wurde etwas Material eines Bakterienklones aus einem Transformationsansatz in 3 ml dYT Medium mit Ampicillin (50 µg ml⁻¹) überführt und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm auf einem Schüttelinkubator vermehrt.

1,5 ml der Übernachtskultur wurden in 1,5-ml-RG überführt, und die Zellen für 30 s bei 12000 rpm (RT) pelletiert. Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen, und das Pellet vollständig durch kräftiges Vortexen in 150 µl Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 150 µl Lösung II wurde der Ansatz 10-15 × invertiert und 300 µl Lösung III zugegeben. Durch vorsichtiges Mischen wurden Zellbestandteile und denaturierte Proteine ausgefällt und in dem nachfolgenden Zentrifugationsschritt (5 min, 12000 rpm, RT) präzipitiert. Der Überstand wurde auf ein nach Herstellerangaben vorbereitetes GFX-Säulchen aufgebracht. Bei der einminütigen Inkubation bei Raumtemperatur fand eine Bindung der Plasmid-DNA an die Glasfibrermatrix statt. Nach Zentrifugation (30 s, 12000 rpm, RT) der Säulchen-Einheit wurde die Durchflußfraktion verworfen, 300 µl Lösung III auf das Säulchen gegeben, zentrifugiert (30 s, 12000 rpm, RT) und die Durchflußfraktion erneut verworfen. Dieser Waschschrift wurde mit 400 µl Waschlösung wiederholt und anschließend die Matrix durch Zentrifugation (1 min, 12000 rpm, RT) getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 50 µl TE-Puffer (pH 8,0), einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur und nachfolgender Zentrifugation (1 min, 12000 rpm, RT) von der Glasfibrermatrix eluiert.

Zur Kontrolle, daß das PCR-Fragment in dem Plasmid enthalten war, wurden die Vektoren mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten. Für den pGEM-T Vektor wurden die Enzyme *Sal* I und *Apa* I und für den Bluescript II SK Vektor die Enzyme *Eco*R I und *Hind* III verwendet (AGS, Heidelberg). Diese Restriktionsendonukleasen schneiden die entsprechenden Plasmide links- bzw. rechtsseitig des Inserts in der „multiple cloning site“. Für den Restriktionsverdau wurden 3,0 µl des isolierten Plasmids und 6,0 µl steriles aqua demin. mit je 0,2 µl der entsprechenden Restriktionsenzyme und 1,0 µl 10 × Reaktionspuffer gemischt und für 1-2 h bei 37 °C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde komplett auf einem 1,0%igen Agarosegel aufgetragen (2.16).

2.22 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Zur Durchführung von Sequenzierungsreaktionen wurden PCR-Produkte in einen Vektor kloniert (2.21) und mittels Standardprimern oder abgeleiteten internen Primern sequenziert. Alternativ wurden die PCR-Produkte direkt, ohne vorherige Klonierung, sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger *et al.* (1977) mittels des „GATC-BioCycle Sequencing Kits“ (GATC, Konstanz) mit Biotin-markierten Terminatoren (ddNTPs) oder des „ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits“ (Applied Biosystems, Foster City, CA., USA) mit fluoreszenz-markierten ddNTPs.

Bei den Cycle-Sequencing Verfahren findet durch die Aktivität einer thermostabilen Sequenase eine Synthese neuer DNA-Stränge statt. Die Neusynthese wird, ausgehend von dem eingesetzten Primer, gestartet und endet mit der Inkooperation von Didesoxy-

nukleotiden (ddNTPs). Ergebnis dieser Reaktion ist ein Satz von markierten DNA-Fragmenten verschiedener Längen, die, aufgetrennt auf einem Polyacrylamid-Gel, zu der Sequenzinformation führen.

2.22.1 Sequenzierung mit dem GATC-BioCycle Sequencing Kit

Für die Sequenzierung mit Biotin-markierten Terminatoren wurden vier Ansätze mit verschiedenen Reaktionsgemischen, die jeweils nur ein ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP) für den Kettenabbruch enthielten, durchgeführt. Die vier Ansätze wurden nebeneinander auf einem Polyacrylamid-Gel aufgebracht und die, nach der Größe aufgetrennten, DNA-Einzelstränge auf eine Nylonmembran übertragen. Dabei wurde das GATC 1500-System der Firma GATC (Freiburg) verwendet. Die Detektion der Sequenzierungsprodukte erfolgte durch die Bindung eines Streptavidin-Konjugats mit angekoppelter alkalischer Phosphatase (SA-AP Konjugat) an die Biotin-markierten ddNTPs. Durch Spaltung eines chromogenen Substrats (NBT/BCIP) durch die alkalische Phosphataseaktivität wurden die Fragmente auf der Membran sichtbar gemacht.

Die verwendeten Materialien und Reagenzien wurden, falls nicht anders angegeben, von der Firma GATC (Freiburg) bezogen.

2.22.1.1 Sequenzierungsreaktion

Die Sequenzierungsreaktionen wurden nach folgendem Schema pipettiert:

Template DNA	ca. 2 µg Plasmid-DNA oder 0,2-1 µg PCR-Produkt
Primer (Gibco, Eggenstein)	1 µl (5 pmol)
Reaktionspuffer	2 µl
dITP-Mix	2 µl
Thermo Sequenase™ (Amersham Life Science, Cleveland, Ohio, USA)	10 Units
ad 20 µl H ₂ O _{reinst}	

Jeweils 5 µl dieses Ansatzes wurden in vier 0,5-ml-RGs, die je 1 µl des jeweiligen Terminators (ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP) enthielten, gegeben und anschließend gut gevortext. Die Sequenzierungsansätze wurden zum Verdunstungsschutz mit 10 µl Mineralöl (GATC, Freiburg) überschichtet, in den Thermocycler überführt und die zyklische Sequenzierungsreaktion mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

	3 min	95 °C
30 ×	30 sec	95 °C
	30 sec	55 bis 63 °C (je nach Primer)
	1 min	74 °C
	5 min	74 °C

Nach Beendigung der Reaktion wurden 4 µl Stopppuffer zu jedem Ansatz zugefügt, kurz zentrifugiert, und die untere wäßrige Phase in neue RGs überführt. Die Sequenzierungsansätze wurden für 3 min bei 90 °C denaturiert und bis zum Auftragen auf ein Polyacrylamidgel auf Eis verwahrt.

2.22.1.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Transfer der Sequenzierprodukte auf eine Nylonmembran im Direct-Blotting Verfahren

Zwei 32 cm lange Glasplatten wurden mit aqua dest. und Ethanol gesäubert und mit 1 ml einer Silanlösung vorbehandelt. Die beiden Glasplatten wurde getrennt durch 0,19 mm dicke Spacer aufeinandergelegt. Für das Polyacrylamidgel wurden 25 ml einer 4%igen Sequenzgellösung für 10 min entgast und anschließend zur Polymerisierung 25 µl TEMED und 110µl 10% APS (w/v) zugegeben und gemischt. Die Gellösung wurde nach Angaben des Herstellers (GATC, Freiburg) zwischen die beiden Glasplatten gegeben, und ein 0,19 mm dicker Vorkamm 2 bis 3 mm in die obere Gelkante eingesteckt.

Für den Gellauf wurden 700 ml 1 × TBE für 20 min entgast und nachfolgend in die untere Pufferkammer des GATC-1500 Systems gefüllt. Die 15 × 60 cm Direct-Blotting-Membran wurde auf dem Förderband des Systems befestigt und die Apparatur mit der Schrittmotorsteuerung CCU 1500 verbunden. Das auspolymerisierte Polyacrylamidgel wurde, wie vom Hersteller beschrieben, in die Apparatur eingesetzt, die obere Pufferkammer mit 1 × TBE gefüllt, der Vorkamm durch einen Haifischkamm mit 32 Zähnen ersetzt und die Abdeckhaube aufgesetzt. Nach 30 minütigem Gel-Vorlauf bei 1700 V und 17 mA (Spannungsquelle E-700; Bachhofer, Reutlingen) wurden 1 bis 1,5 µl der denaturierten Sequenzierungsansätze in die Slots pipettiert. Der Probeneinlauf erfolgte für 10 min bei 500 V. Anschließend wurden die DNA-Fragmente bei 1900 V und 15 mA aufgetrennt und mit Erreichen der unteren Gelkante direkt auf die Nylonmembran gebloftet, die mit einer Geschwindigkeit von 19 cm h⁻¹ transportiert wurde.

Nach dem Gellauf wurde die Membran für 20 min bei 80 °C getrocknet und die DNA-Einzelstränge durch zweiminütige Bestrahlung mit UV-Licht (GATC-LINK crosslinker; GATC, Freiburg) kovalent an die Membran gebunden.

Verwendete Lösungen:

- Silanlösung:
 - 50 µl Silan
 - 30 µl 100% Essigsäure
 - 300 µl aqua demin.
 - 9,62 ml 98% Ethanol p.A.

- 10 × TBE
 - 154,5 g Tris
 - 26,2 g Borsäure
 - 9 g Na₂EDTA
 - 810 g aqua demin.

- Harnstoff-Diluent
 - 84 g Harnstoff ultra pure
 - 18,7 g TBE
 - 73,4 g aqua demin.

- 4%ige Sequenzgellösung (50 ml)
 - 6,7 ml GATC-Gel 30%
 - 43,3 ml Harnstoff-Diluent

2.22.1.3 Detektion der Sequenzierungsprodukte auf der Direct-Blotting-Membran

Zur Detektion der Biotin-markierten Sequenzierungsprodukte wurde die Membran in eine Plexiglasröhre überführt. Die Detektionsreaktion erfolgte auf einem Rolleninkubator bei 30°C und wurde wie folgend durchgeführt:

- 5 min waschen mit 150 ml aqua demin..
- 5 min waschen mit 150 ml Maleinsäurepuffer.
- 35 min inkubieren mit 80 ml 1,5% Blocking-Puffer.
- Mind. 30 min mit 20 ml 1,5% Blocking-Puffer mit 2,7 µl SA-AP Konjugat inkubieren.
- 3 × 10 min waschen mit je 150 ml Maleinsäurepuffer.
- 5-10 min mit 150 ml Reaktionspuffer waschen.
- Für die colorimetrische Reaktion wurden 55 µl NBT und 55 µl BCIP (beides Boehringer Mannheim) mit 20 ml Reaktionspuffer gemischt und die Membran für 1-10 h darin inkubiert.
- 3 × 10 min waschen mit je 150 ml TE-Puffer.

Verwendete Lösungen:

- Maleinsäurepuffer, pH 7,5
 - 23,21 g Maleinsäure
 - 17,53 NaCl p.A.
 - 16 g NaOH p.A.
 - ad 2,0 l mit aqua demin.

- 10%iger (w/w) Blocking-Puffer, pH 6,0
 - 10% Blocking Reagent (Boehringer Mannheim)
 - 90% Maleinsäurepuffer, pH 7,5
 - autoklavieren, in Aliquots bei -20 °C lagern

- 1,5%iger Blocking-Puffer (v/v) (100 ml)
 - 15 ml 10%iger Blocking-Puffer, pH 6,0
 - 85 ml Maleinsäurepuffer, pH 7,5

- Reaktionspuffer, pH 9,5
 - 5,84 g NaCl
 - 0,83 g Tris HCl
 - 11,58 g Tris base
 - ad 1 l mit aqua demin.

2.2.2.2 Sequenzierung mit dem „ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“

Bei diesem Sequenzierverfahren werden Terminatoren verwendet, die durch vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe markiert sind. Die unterschiedliche Markierung der ddNTPs ermöglicht, daß pro Sequenzierungsreaktion nur ein Reaktionsansatz erstellt werden muß. Das verwendete Terminator Ready Reaction Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) enthielt neben den 4 dNTPS und den fluoreszenzmarkierten ddNTPs bereits die AmpliTaq DNA Polymerase (FS).

2.2.2.2.1 Sequenzierungsreaktion

Die Sequenzierungsreaktionen wurden nach folgendem Schema in 0,5-ml-PCR-RGs pipettiert:

Template DNA	ca. 2 µg Plasmid-DNA bzw. 0,2-1 µg PCR-Produkt
Primer(Gibco, Eggenstein)	1 µl (3,2 pmol)
Terminator Ready Reaction Mix	4-8 µl
ad 20 µl H ₂ O _{reinst}	

Der Reaktionsansatz wurde in den Thermocycler überführt und die zyklische Sequenzierungsreaktion mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

	3 min	96 °C
25 ×	30 sec	96 °C
	30 sec	55 bis 63 °C (je nach Primer)
	4 min	60 °C
	5 min	60 °C

Nach erfolgter Sequenzierung wurden die überschüssigen Fluoreszenz-markierten Terminatoren durch Ethanol fällung aus den Ansätzen entfernt. Dazu wurde das gesamte Volumen des Reaktionsansatzes in 1,5-ml-RGs überführt und mit 2,0 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,6) und 50 µl 98%igem Ethanol (RT) versetzt und gevortext. Durch 15minütige Inkubation (RT) und anschließender Zentrifugation (30 min, 12000 rpm, RT) wurden die DNA-Fragmente präzipitiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Pellet mit 250µl 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 12000 rpm, RT) wurde der Überstand wiederum entfernt und das Pellet in einer Vakuumentrifuge vollständig getrocknet.

Die Vorbereitung der Reaktionsansätze für den Gellauf, die Anfertigung des Sequenzgels sowie der Sequenzgellauf mit dem ABI, Model 373A wurde freundlicherweise von Frau Lautenschläger (Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Universität Gießen) durchgeführt.

2.22.3 Computergestützte Sequenzanalyse

Die in dieser Arbeit ermittelten DNA-Sequenzen wurden mit den Computerprogrammen DNASIS (V 3.21; Hibio Systems) ausgewertet. Datenbankrecherchen, basierend auf Nukleinsäuresequenzen, wurden mit dem Programm Blast 2,0, blastn (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA) durchgeführt (Altschul *et al.*, 1994).

Multiple Alignments mit den ermittelten Nukleinsäure- und Proteinsequenzen wurden mittels ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) und einer Testversion des „Megalign“ aus dem Programmpaket Lasergene nach der Clustal-Methode (DNASTAR, Madison, WI, USA) durchgeführt.

2.22.4 Phylogenetische Analyse von Sequenzdaten

Die phylogenetische Analyse für die Stammbaumerstellung und Distanzmatrices, basierend auf Multiplen Alignments der DNA- und AS-Sequenzen, wurde mit der Berechnung NEIGHBOR-JOINING (Saitou & Nei, 1987) aus dem Sequenzdatenprogramm ARB (Dr. Ludwig; Technische Universität München) oder DNASTAR (Madison, WI, USA) erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Quantitative Bestimmung von Populationen in Umweltproben

Die Ergebnisse zur Quantifizierung von Bakterienpopulationen in Umweltproben sind in der Tabelle 6 dargestellt.

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl (GZZ) durch DAPI-Färbung zeigte, daß die Gesamtzellzahl in den zwei untersuchten Belebtschlammproben mit etwa 10^8 Zellen pro ml um mindestens zwei Zehnerpotenzen höher lag als in den vier untersuchten Bodenproben.

Die Quantifizierung lebender aerober und fakultativ anaerober heterotropher Mikroorganismen durch Bestimmung der Kolonie-Bildenen-Einheiten (KBE) auf R2A ergab für die Proben aus den Kläranlagen Koloniezahlen im Bereich von 10^6 bis 10^8 pro ml Probe. Mit 10^3 bis 10^6 Kolonien pro g waren die Koloniezahlen in den aufgearbeiteten Bodenproben durchschnittlich um eine bis zwei Zehnerpotenzen niedriger als in den Belebtschlammproben. Ebenso war die Koloniezahl der Sickerwasserprobe der Mülldeponie mit $8,7 \times 10^4$ KBE pro ml gering. Ein Extremwert wurde für eine Bodenprobe des alten Gaswerks in Marburg ermittelt. Auf R2A-Agar konnte kein Mikroorganismus kultiviert werden.

Der durch *in situ* Hybridisierung mit der rRNA-gerichteten *Bacteria*-spezifischen Sonde EUB338 (Amann *et al.*, 1990) ermittelte Anteil aktiver Zellen an der GZZ in den Umweltproben lag etwa um eine Zehnerpotenz höher als die durch Auszählung der KBE bestimmte Lebendzellzahl. Bei der *in situ* Hybridisierung wurde für die Bodenprobe des Marburger Gaswerkes, für die bei der KBE-Bestimmung keine Kolonie bestimmt wurde, mit 10^7 aktiven Zellen pro g Boden ein Anteil ermittelt, der sich von den Durchschnittszellzahlen der anderen untersuchten Bodenproben nicht unterschied.

Wurde die durch *in situ* Hybridisierung bestimmte Lebendzellzahl in Verhältnis gesetzt zur GZZ, zeigte sich, daß der Anteil aktiver Zellen in den Bodenproben mit 10 bis 20% wesentlich geringer war als in den Belebtschlammproben, in denen ein prozentualer Anteil aktiver Zellen von etwa 40% festgestellt wurde.

Die Anwendung des fluoreszierenden Redoxfarbstoffs CTC (5-Cyano-2,3-ditolyltetrazolium-chlorid) zeigte, daß dieser Ansatz zum Nachweis und zur Quantifizierung atmender Zellen in Umweltproben ungeeignet ist. Bei der CTC-Färbung wurden auch extrazelluläre Formazan-Kristalle an Flockenbestandteilen abgelagert, die nicht von den intrazellulären Formazankristallen unterschieden werden konnten.

Die Quantifizierung der PAK-abbauenden Mikroorganismen durch das MPN-Verfahren ergab, daß mit 24 bis 60 Abbauern pro ml Probe die Zahlen Naphthalin- bzw. Phenanthren-metabolisierender Bakterien im Belebtschlamm sowie in einer der Bodenproben (Gaswerk Marburg, Bodenaushub) in der gleichen Größenordnung lagen. Im Gegensatz dazu wurde

für die Bodenprobe (1,8 m unter Geländeoberfläche) des alten Gaswerkstandortes in Marburg mit diesem Verfahren mehr als 7000 Naphthalin-Abbauer, jedoch nur 25 Phenanthren-abbauende Mikroorganismen ermittelt. Ebenso wurde die MPN von Naphthalinabbauern in der Bodenprobe des alten Gießener Gaswerks (0,1 m unter Geländeoberfläche) mit 60 bestimmt, die von Phenanthrenabbauern jedoch mit null. Keine PAK-verwertenden Bakterien wurden in der, aus einer Bodentiefe von 3,1 m unter der Geländeoberfläche, entnommenen Bodenprobe des alten Gaswerkes Gießen nachgewiesen.

Tabelle 6: Bestimmung der Gesamtzellzahl in Umweltproben mittels DAPI-Färbung, der Kolonie-Bildenden-Einheiten (KBE) auf R2A-Agar, der Zahl metabolisch aktiver Bakterien durch *in situ*-Hybridisierung mit der *Bacteria* spezifischen Sonde EUB338 und Quantifizierung von Naphthalin (N)- bzw. Phenanthren (P)-abbauenden Mikroorganismen mittels des Most Probable Number (MPN) Verfahrens.

Probenahme- stelle	Monat der Probenahme	Anga- be in	Gesamt- zellzahl	KBE	Lebendzell- zahl	MPN-Verfahren	
						N-Abbauer	P-Abbauer
Kommunale Kläranlage	Dez. 1996	Zellen	n.b.	$1,1 \times 10^8$	n.b.	n.b.	n.b.
Gießen	Jul. 1997	pro ml	$9,6 \times 10^8$	$1,3 \times 10^7$	$4,2 \times 10^8$	46 ⁵⁾	24 ⁵⁾
	Aug. 1997		n.b.	$3,4 \times 10^7$	n.b.	25	25
	Apr. 1998		$8,7 \times 10^8$	$5,2 \times 10^6$	$3,5 \times 10^8$	60	60
Mülldeponie, Reiskirchen	Okt. 1996	Zellen pro g	n.b.	$8,7 \times 10^4$	n.b.	n.b.	n.b.
Industrielle Klär- anlage, Frankfurt	Dez. 1996	Zellen pro ml	n.b.	$6,9 \times 10^7$	n.b.	n.b.	n.b.
Parkplatz, Gießen	Nov. 1996	Zellen pro g	n.b.	$4,3 \times 10^4$	n.b.	n.b.	n.b.
Gaswerk, Hulin, CR	Apr. 1997	Zellen pro g	n.b.	$5,8 \times 10^5$	n.b.	n.b.	n.b.
Gaswerk Marburg	Dez. 1997	Zellen	¹⁾ $8,3 \times 10^6$	$1,0 \times 10^5$	$8,0 \times 10^5$	>7000	25
		pro g	²⁾ $2,4 \times 10^7$	0	$2,5 \times 10^6$	25	25
Gaswerk Gießen	Jan. 1998	Zellen	³⁾ $6,2 \times 10^7$	$5,5 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6$	60	0
		pro g	⁴⁾ $2,7 \times 10^6$	$5,7 \times 10^3$	$4,8 \times 10^5$	0	0

n.b.: nicht bestimmt

¹⁾ Bodenprobe entnommen 1,8 m unter Geländeoberfläche.

²⁾ Bodenprobe entnommen aus Bodenaushub.

³⁾ Bodenprobe entnommen 0,1 m unter Geländeoberfläche.

⁴⁾ Bodenprobe entnommen 3,1 m unter Geländeoberfläche.

⁵⁾ MPN wurde durch 3 parallel Ansätze bestimmt.

3.2 Auswahl des Anzuchtmediums zur Anreicherung PAK-abbauender Bakterien

In Vorversuchen wurden verschiedene Mineralsalz-Flüssigmedien (Weißenfels *et al.*, 1990; Keuth & Rehm, 1991; Kästner *et al.*, 1994b; Thiem, 1994), die Naphthalin bzw. Phenanthren als alleinige Kohlenstoffquelle enthielten, zur Anzucht von PAK-abbauenden

Stämmen getestet. Das Wachstum der Bakterienstämme wurde anhand der Trübung in den Kulturen beurteilt. Bei verschiedenen getesteten Referenzstämmen trat eine Trübung in dem Medium nach Kästner *et al.* (1994b) im Vergleich zu den anderen getesteten Medien früher auf und war besser erkennbar.

Für die selektive Anzucht von PAK-Abbauern wurde eine Methode nach Bogardt & Hemmingsen (1992) getestet. Aliquots der Umweltproben wurden mit flüssiger Agarose und in Ethanol gelöstem Phenanthren gemischt und ein festes Mineralsalzmedium damit überschichtet. Phenanthren abbauende Stämme sollten durch die Bildung klarer Höfe in der oberen Schicht detektiert werden. Die Bildung klarer Höfe war bei diesen Versuchsansätzen nicht festzustellen. Bakterien, die in diesem Medium gewachsen waren, zeigten in allen Fällen keinen Abbau von PAK in Reinkultur.

Ebenso war die Methode nach Thiem & Fritzsche (1995), die im Rahmen der Diplomarbeiten von M. Kraus und J. Hammerschmidt an diesem Institut getestet wurde, zur Anreicherung von PAK-abbauenden Bakterien nicht erfolgreich. Zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit der Polyaromaten wurden bei diesen Ansätzen die PAK durch Zugabe des Detergenzes Sapogenat T-300 zunächst vorgelöst. Es zeigte sich aber auch in den Kontrollansätzen, die keine PAK enthielten, nach kurzer Zeit Bakterienwachstum, d.h., das Detergenz konnte als alternative Kohlenstoff- und Energiequelle verwendet werden.

Aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche wurden PAK-abbauende Bakterienstämme aus Umweltproben in dem Mineralsalzmedium nach Kästner *et al.* (1994b) selektiv angereichert. Der Abbau von Naphthalin, Phenanthren und anderen aromatischen Verbindungen durch die isolierten Reinkulturen wurde in dem gleichen Medium getestet.

3.3 Isolierung von Naphthalin- und Phenanthren-abbauenden Bakterien aus Umweltproben

Aus den untersuchten aquatischen und terrestrischen Umweltproben wurden insgesamt 23 Bakterienstämme mit Naphthalin- oder Phenanthrenabbaufähigkeit isoliert (Tab. 7). Der Grad der Kontamination der verschiedenen beprobten Umweltstandorte mit PAK hatte keinen Einfluß auf das Ergebnis der Isolierung. Die Bodenprobe aus Marburg war mit bis zu 9 g pro kg Boden mit PAK stark belastet. 1,4 bzw. 1,2 g entfielen dabei auf die Polyaromaten Naphthalin bzw. Phenanthren (Anhang; Tab. 20; die Meßdaten wurden freundlicherweise von der UEG Wetzlar zur Verfügung gestellt). Im Gegensatz dazu war die Belastung der Bodenproben des ehemaligen Gaswerkstandortes in Gießen mit PAK-Maximalwerten von 6 mg bzw. Durchschnittswerten von 2,4 µg pro kg Boden vergleichsweise niedrig. Aus beiden Bodenproben wurden jeweils zwei Stämme mit der Fähigkeit Naphthalin abzubauen isoliert.

Für die aquatischen und weiteren terrestrischen Standorte sind keine Meßdaten zur PAK-Belastung vorhanden. Aus der kommunale Kläranlage in Gießen, in die nach Angaben der

Betreiber keine potentiell PAK-haltigen Abwässer eingeleitet werden, wurden bei der ersten Beprobung vier Isolate mit Naphthalin- bzw. Phenanthrenabbauleistung isoliert. Weitere Probenahmen aus diesem Habitat hatte die Isolierung von insgesamt 15 PAK-abbauenden Isolaten zur Folge. Aus den anderen untersuchten Umweltproben aquatischer und terrestrischer Herkunft wurden bei einer Probenahme jeweils maximal zwei Stämme, die Naphthalin oder Phenanthren abbauen konnten, isoliert.

3.4 Identifizierung der Naphthalin- und Phenanthren-abbauenden Isolate

Die Isolate wurden durch die Kombination von Ganzzellhybridisierung mit rRNA-gerichteten Sonden, Bestimmung der Fettsäuremuster und Durchführung von physiologischen Tests bis zur Gattungs- oder Artebene identifiziert. Die echten Pseudomonaden, die hinsichtlich ihres Fettsäuremuster untereinander sehr ähnlich sind, wurden anhand der physiologischen Tests bis zur Artebene identifiziert.

Die Ergebnisse der Identifizierung (Tab. 7) zeigten, daß die Fähigkeit, PAK abzubauen, phylogenetisch weit verbreitet ist. Vertreter der alpha-, beta- und gamma-Subklasse der Proteobakterien sowie grampositive Bakterien mit hohem und niedrigem GC-Gehalt der DNA konnten als PAK-Abbauer identifiziert werden. Insgesamt wurden aus den sieben untersuchten Habitaten Vertreter sechs verschiedener Gattungen isoliert.

Die vier Stämme, die bei der ersten Beprobung der kommunalen Kläranlage Gießen isoliert wurden, wurden den Gattungen *Acidovorax*, *Comamonas* und *Pseudomonas* zugeordnet. Bei weiteren Probenahmen konnten aus der Gießener Kläranlage neben weiteren Species dieser drei Gattungen auch Vertreter der Gram-positiven Rhodokokken und der Gattung *Sphingomonas* isoliert werden. Aus den anderen aquatischen und terrestrischen Umweltproben wurden ebenso PAK-abbauende *Pseudomonas*, *Rhodococcus* und *Sphingomonas* Stämme sowie ein *Paenibacillus* sp. isoliert, jedoch keine Vertreter der beta-Proteobakterien.

Die Gattung *Pseudomonas* repräsentierte mit zehn Vertretern den größten Teil der PAK-Abbauer. Dabei wurden Pseudomonaden mit PAK Abbauleistung aus aquatischen und terrestrischen Umweltproben isoliert. Die zehn isolierten *Pseudomonas* Stämme wurden zu drei verschiedenen Species der Pseudomonaden, *P. putida*, *P. fluorescens* und *P. mendocina*, zugeordnet.

Fußnoten Tabelle 7:

- ¹⁾ Die Isolate E, F, G, H, B1, C4 und E3 wurden von M. Kraus und J. Hammerschmidt, die Isolate N3, N8, N22 und N23 von M. Weiß isoliert. Die Arbeiten wurden im Rahmen von Diplomarbeiten durchgeführt.
- ²⁾ Die Hybridisierungsergebnisse mit der höchsten taxonomischen Auflösung sind angegeben. Positive Hybridisierungsergebnisse mit den entsprechenden weniger spezifischen Sonden (BET42a oder GAM42a) sind in diesen Ergebnissen mit eingeschlossen.
- ³⁾ Kriterium für die eindeutige Identifizierung auf Spezieslevel war eine Identifikationswahrscheinlichkeit > 0,5.
- ⁴⁾ Kriterium für die eindeutige Identifizierung auf Spezieslevel war eine Willcox Wahrscheinlichkeit > 0,9.

Tabelle 7: Taxonomische Zuordnung der aus unterschiedlichen Umweltproben isolierten Naphthalin und Phenanthren abbauenden Stämme durch unterschiedliche Methoden

Probenahmestelle		Isolat- Bezeichnung ¹⁾	Gram- Färbung	Oxidase Test	Taxonomische Zuordnung mittels		
					Typisierung mit RNA Sonden ²⁾	Fettsäuremuster ³⁾	Physiologische Tests ⁴⁾
Kommunale Kläranlage, Gießen	Dez. 1996	E	-	+	<i>Acidovorax</i> sp.	<i>Acidovorax</i> sp.	<i>Acidovorax</i> sp.
		F	-	+	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>P. putida</i>	<i>P. putida</i>
		G	-	+	<i>Comamonas</i> sp.	<i>C. testosteroni</i>	<i>C. testosteroni</i>
		H	-	+	<i>Comamonas</i> sp.	<i>C. testosteroni</i>	<i>C. testosteroni</i>
	Jul. 1997	L7	-	+	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>P. mendocina</i>	<i>P. mendocina</i>
		M7	-	+	<i>Comamonas</i> sp.	<i>Comamonas</i> sp.	<i>C. terrigena</i>
	Aug. 1997	A10	-	+	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>P. fluorescens</i>
		F9	-	+	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>P. fluorescens</i>
		H9	-	+	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>P. fluorescens</i>
		T9	-	+	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>P. fluorescens</i>
		E10	-	+	<i>Acidovorax</i> sp.	<i>Acidovorax</i> sp.	<i>Acidovorax</i> sp.
		V10	-	+	<i>Acidovorax</i> sp.	<i>Acidovorax</i> sp.	<i>Acidovorax</i> sp.
		G10	+	-	Actinomycet	<i>R. erythropolis</i>	<i>R. erythropolis</i>
	Y9	-	+	alpha-Proteobacterium	<i>Sphingomonas</i> sp.	<i>Sphingomonas</i> sp.	
Apr. 1998	N30	-	+	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>P. putida</i>	
Mülldeponie, Sickerwasser, Reiskirchen	Okt. 1996	E3	-	+	alpha-Proteobacterium	<i>Sphingomonas</i> sp.	<i>Sphingomonas</i> sp.
Industrielle Kläranlage, Frankfurt	Dez. 1996	B1	+	-	Actinomycet	<i>R. rhodochrous</i>	<i>R. rhodochrous</i>
Parkplatz, Gießen	Nov. 1996	C4	-	+	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>P. fluorescens</i>
Bodenprobe, altes Gaswerk, Hulin, CR	Apr. 1997	3	+	+	<i>Paenibacillus</i> sp.	<i>Paenibacillus</i> sp.	<i>Paenibacillus</i> sp.
Bodenprobe, altes Gaswerk, Marburg	Dez. 1997	N3	-	+	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>P. putida</i>	<i>P. putida</i>
		N8	-	+	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>P. putida</i>	<i>P. putida</i>
Bodenprobe, altes Gaswerk, Gießen	Jan. 1998	N22	+	-	Actinomycet	<i>Rhodococcus</i> sp.	<i>Rhodococcus</i> sp.
		N23	+	-	Actinomycet	<i>Rhodococcus</i> sp.	<i>Rhodococcus</i> sp.

3.5 Abbau von Polyaromaten und anderen aromatischen Verbindungen

Die isolierten Stämme und die verschiedenen Referenzstämme wurden auf ihre Fähigkeit, die Polyaromaten Naphthalin, Phenanthren und Anthracen sowie die aromatischen Verbindungen Salicylsäure, Benzoesäure, Phenol und Biphenyl abzubauen, getestet. In der Tabelle 8 sind die Ergebnisse dargestellt.

Die isolierten *Acidovorax* Stämme (Isolat E, E10 und V10) metabolisierten Phenanthren in Flüssigmedium mit 0,05% Phenanthren als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle. Der Abbau dieses dreikernigen Aromaten war mit der Bildung von gelb-orange gefärbten Zwischenprodukten verbunden. Die *Sphingomonas* Stämme (E3 und Y9), ein *Pseudomonas fluorescens* Isolat (C4) und ein *Paenibacillus* sp. (Isolat 3) dagegen hatten die Fähigkeit, sowohl Naphthalin als auch Phenanthren abzubauen. Die anderen 16 Isolate der Gattungen *Comamonas*, *Pseudomonas* und *Rhodococcus* bauten in Flüssigmedium nur Naphthalin ab. Mit Ausnahme des *Pseudomonas fluorescens* Isolats C4 zeigten damit die Isolate aus gleichen Gattungen qualitativ jeweils gleiche Abbauleistungen gegenüber den getesteten PAK.

Anthracen als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle im Flüssigmedium führte bei keinem der getesteten Stämme zur sichtbaren Trübung der Kulturen. *Sphingomonas paucimobilis* BA2, der von Kästner *et al.* (1994b) als Naphthalin-, Phenanthren- und Anthracen-verwertender Stamm beschrieben wurde, baute unter den Testbedingungen ebenso kein Anthracen ab.

Die PAK-abbauenden Stämme wurden ebenso auf ihre Fähigkeit getestet, verschiedene einfach-aromatische Verbindungen abzubauen. Die Ergebnisse zeigten, daß Isolate der gleichen Gattungen oder auch der gleichen Species keine identischen Abbauspektren besaßen. Die beiden *C. testosteroni* Stämme (G und H) beispielsweise metabolisierten sowohl Salicylsäure als auch Benzoesäure, während *C. terrigena* keine der beiden Substanzen abbaute. Desweiteren waren zwei der fünf isolierten *P. fluorescens* Stämme (A10 und C4) in der Lage, mit Salicyl- oder Benzoesäure als alleiniger Energie- und Kohlenstoffquelle zu wachsen, während die anderen drei *P. fluorescens* Stämme (F9, H9 und T9) Benzoesäure nicht verwerten konnten. Der Abbau von Biphenyl war ebenso nicht allen Vertretern einer Species gemein. Isolat A10 baute kein Biphenyl ab, während alle anderen *P. fluorescens* Isolate der Kläranlage Gießen diese aromatische Verbindung verstoffwechselten. Beim Abbau von Biphenyl wurden farbige Produkte gebildet. Isolat Y9 (*Sphingomonas* sp.) beispielsweise metabolisierte Biphenyl zu einem intensiv rot-gefärbten Produkt, während beim Biphenylabbau durch verschiedene andere Isolate (F, F9, T9, H9, B1 und E3) gelbgefärbten Produkte entstanden. Phenol wurde nur von drei Isolaten, *P. medocina* (L7), *P. putida* (F) und *R. rhodochrous* (B1), sowie dem Referenzstamm *P. putida* NCIMB 9816 abgebaut.

Tabelle 8: Fähigkeit der verschiedenen Referenzstämmen und der isolierten Bakterienstämme Naphthalin, Phenanthren und andere aromatische Verbindungen abzubauen.

Bakterienstämmen	Abbau von PAK in Flüssigmedium	Abbau von Aromaten in Flüssigmedium
Referenzstämmen		
<i>P. putida</i> OUS82	Na, Ph	Sal, Bz
<i>P. putida</i> NCIMB 9816	Na	Sal, Bz, Phe
<i>P. stutzeri</i> AN11	Na	Bz
<i>S. paucimobilis</i> BA2	Na, Ph, Ac ¹⁾	n.b.
Isolate		
Y9 (<i>Sphingomonas</i> sp.)	Na, Ph	Sal, Bi
E3 (<i>Sphingomonas</i> sp.)	Na, Ph	Bi
E (<i>Acidovorax</i> sp.)	Ph	-
E10 (<i>Acidovorax</i> sp.)	Ph	Bz
V10 (<i>Acidovorax</i> sp.)	Ph	Bz
G (<i>C. testosteroni</i>)	Na	Sal, Bz
H (<i>C. testosteroni</i>)	Na	Sal, Bz, Bi
M7 (<i>C. terrigena</i>)	Na	Bi
A10 (<i>P. fluorescens</i>)	Na	Sal, Bz
F9 (<i>P. fluorescens</i>)	Na	Sal, Bi
H9 (<i>P. fluorescens</i>)	Na	Sal, Bi
T9 (<i>P. fluorescens</i>)	Na	Sal, Bi
C4 (<i>P. fluorescens</i>)	Na, Ph	Sal, Bz
L7 (<i>P. mendocina</i>)	Na	Bz, Phe
F (<i>P. putida</i>)	Na	Sal, Bz, Phe, Bi
N30 (<i>P. putida</i>)	Na	n.b.
N3 (<i>P. putida</i>)	Na	n.b.
N8 (<i>P. putida</i>)	Na	n.b.
B1 (<i>R. rhodochrous</i>)	Na	Phe, Bi
N22 (<i>Rhodococcus</i> sp.)	Na	n.b.
N23 (<i>Rhodococcus</i> sp.)	Na	n.b.
G10 (<i>R. erythropolis</i>)	Na	Sal, Bi
3 (<i>Paenibacillus</i> sp.)	Na, Ph	Bi

Na: Naphthalin, Ph: Phenanthren, Ac: Anthracen, Sal: Salicylsäure, Bz: Benzoesäure, Phe: Phenol, Bi: Biphenyl

¹⁾ Charakterisierung nach Kästner *et al.* (1994b)

3.6 Quantifizierung der Naphthalin- bzw. Phenanthrenabbauleistung verschiedener Bakterienstämme

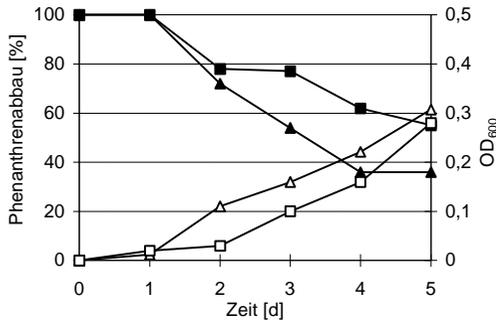
Gaschromatographische Messungen der Naphthalin- und Phenanthrenkonzentrationen in sterilen Kontrollansätzen zeigten, daß abiotische Prozesse über einen Zeitraum von fünf Tagen nur zu einer geringen Abnahme der Phenanthrenmenge im Medium führten. Im Gegensatz dazu ist Naphthalin sehr flüchtig, und der Gehalt im Medium reduzierte sich innerhalb von fünf Tagen durch abiotische Prozesse auf 50% des Anfangsgehaltes.

Die Quantifizierung des Phenanthrenabbaus zeigte, daß die getesteten Isolate C4 (*P. fluorescens*), E (*Acidovorax* sp.), E10 (*Acidovorax* sp.), Y9 (*Sphingomonas* sp.) und E3 (*Sphingomonas* sp.) die Phenanthrenmenge im Medium nach fünf Tagen auf 40-60% der Ursprungsmenge reduzierten, und der Abbau in allen Fällen mit einer Zunahme der optischen Dichte verbunden war. Beispielhaft wurde der Verlauf des Phenanthrenabbaus und die Zunahme der optische Dichte über fünf Tage für Isolat E (*Acidovorax* sp.) und C4 (*P. fluorescens*) in der Abbildung 5a graphisch dargestellt. Nach einer Adaptationszeit von einem Tag begann die Metabolisierung des Polyaromaten, und der Phenanthrengehalt im Medium nahm im Verlauf der nächsten vier Tage kontinuierlich ab. Der gleichzeitige Anstieg der optische Dichte zeigte, daß Phenanthren als Kohlenstoff- und Energiequelle von den Stämmen verwertet wurde. Die Abbildung 6 zeigt die Kultivierung des Isolats E10 (*Acidovorax* sp.) in Phenanthren-haltigem Mineralsalzmedium über ein bis vier Tage. Einhergehend mit dem Anstieg der optischen Dichte nahm die gelb-orange Färbung der Kultur über die Zeit zu.

Naphthalin konnte von den meisten getesteten Bakterienstämmen schneller abgebaut werden als Phenanthren. Wie die Abbildung 5b am Beispiel eines *Pseudomonas fluorescens* Stammes (Isolat C4) darstellt, waren innerhalb von zwei Tagen nur noch etwa 20% der Ausgangsmenge des Naphthalins im Medium nachweisbar. Die optische Dichte der Kulturansätze stieg zunächst während der ersten zwei Tage an. War die einzige Kohlenstoff- und Energiequelle verbraucht, ging die Kultur in die stationäre oder Absterbephase über. Die *Pseudomonas* Isolate (A10, F, F9, H9, T9, N3, N8 und N30), der *Pseudomonas* Referenzstamm (*P. putida* OUS82) und die *Comamonas* Isolate (G, H und M7) bauten Naphthalin ähnlich schnell ab. Die Abbildung 7 zeigt ein bis vier Tage alte Naphthalin-Kulturen des Isolates A10 (*P. fluorescens*). Schon am ersten Tag nach der Inokulation war die Kultur deutlich getrübt.

Im Gegensatz zu dem schnellen Naphthalin-Abbau durch die getesteten *Pseudomonas* und *Comamonas* Stämme, wurde Naphthalin durch die Rhodokokken Stämme B1 (Abb. 5b) und G10 wesentlich langsamer abgebaut. Innerhalb der ersten zwei Tage war keine Abnahme des Naphthalins im Medium zu verzeichnen. Innerhalb der folgenden drei Tage wurden dann etwa 60% des ursprünglichen Naphthalinmenge metabolisiert. Die optische Dichte in den Kulturansätzen stieg dabei nur minimal an.

(a)



(b)

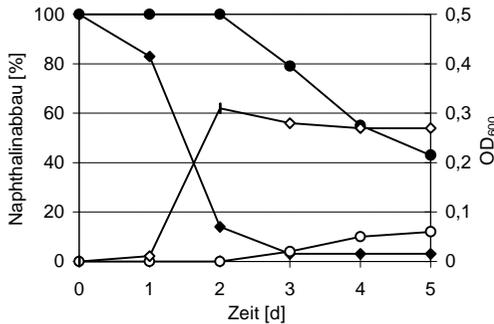


Abbildung 5: Zeitlicher Verlauf des mikrobiellen Wachstums (offene Symbole) und des PAK-Abbaus (gefüllte Symbole) durch verschiedene Umweltisolate in Mineralsalzmedium mit Phenanthren (a) bzw. Naphthalin (b) als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle.

Die jeweils verbliebene Menge an Naphthalin und Phenanthren in den einzelnen Kulturen wurde gaschromatographisch bestimmt, und zur Erfassung der abiotischen Verluste der erhaltene Wert in Beziehung zu einer sterilen Kontrolle gesetzt.

(a) ■, □ Isolat C4 (*P. fluorescens*); ▲, △ Isolat E (*Acidovorax* sp.). (b) ◆, ◇ Isolat C4 (*P. fluorescens*); ●, ○ Isolat B1 (*R. rhodochrous*).



Abbildung 6: 1 bis 4 Tage alte Phenanthren-Kulturen des Isolats E10 (*Acidovorax* sp.). Die Kultivierung erfolgte in 25 ml Mineralsalzmedium mit 0,05% (w/v) Phenanthren bei 25 °C und 180 rpm.

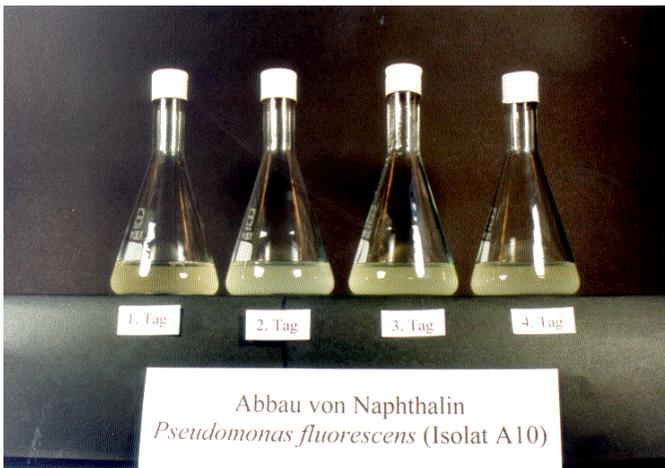


Abbildung 7: 1 bis 4 Tage alte Naphthalin-Kulturen des Isolats A10 (*P. fluorescens*). Die Kultivierung erfolgte in 25 ml Mineralsalzmedium mit 0,05% Naphthalin (w/v) bei 25 °C und 180 rpm.

3.6.1 Naphthalinumsetzung durch Bakterienstämme, die in dYT-Vollmedium bzw. in Naphthalin-haltigem Medium vorkultiviert wurden

Der Abbau von Naphthalin und die Zunahme der optischen Dichte über einen Zeitraum von 12 h wurde für den Referenzstamm *P. putida* OUS82, das Isolat A10 (*P. fluorescens*) und das Isolat H (*C. testosteroni*) detaillierter untersucht. Die Stämme waren zuvor in Naphthalin-haltigem Mineralsalzmedium oder in dYT-Vollmedium vorkultiviert worden.

Die Anfangskonzentration des Naphthalins im Medium (0,05%, w/v) wurde dabei gleich 100% gesetzt, und die während der Meßdauer ermittelten Werte auf die Anfangskonzentration bezogen. Die Meßungenauigkeiten waren relativ groß, so lagen die ermittelten Werte zum Teil über den Anfangswerten. Tendenziell zeigte sich, daß in den Kulturansätzen, die mit in dYT-Vollmedium gewachsenen Zellen beimpft wurden, keine Abnahme des Naphthalingehaltes im Medium über diesen Zeitraum zu verzeichnen war (Abb. 8a). Nur für das Isolat A10 (*P. fluorescens*) lag die gemessene Naphthalinkonzentration nach zwölfstündiger Inkubationszeit deutlich unter den zuvor gemessenen Werten. Übereinstimmend mit dem Ergebnis, daß Naphthalin durch Isolat H (*C. testosteroni*) und *P. putida* OUS82 über den Meßzeitraum nicht merklich abgebaut wurde, stieg die optische Dichte nicht (H) bzw. minimal (OUS82) an. Die optische Dichte des Versuchsansatzes mit Isolat A10 (*P. fluorescens*) stieg von der 10 zur 12 h des Meßzeitraums auf 0,05 Einheiten an. Dies steht in Übereinstimmung mit der in diesem Zeitraum gemessenen Naphthalinabnahme.

Wurden die Kulturansätze mit Zellen beimpft, die zuvor drei Tage in Naphthalin-haltigem Medium gewachsen waren, so nahm die Naphthalinmenge im Medium für *P. putida* OUS82 und Isolat A10 (*P. fluorescens*) während des gesamten Meßzeitraums kontinuierlich ab. Ebenso war für Isolat H, über 12 h gesehen, eine tendenzielle Substratabnahme zu verzeichnen (Abb. 8b). Der Anstieg der Werte für die optische Dichte bei allen drei getesteten Stämmen zeigte, daß Naphthalin als Kohlenstoff- und Energiequelle zum Aufbau zelleigenen Materials genutzt wurde. Dabei stieg im Fall von Isolat A10 die optische Dichte mit einem OD-Wert von 0,3 stark an.

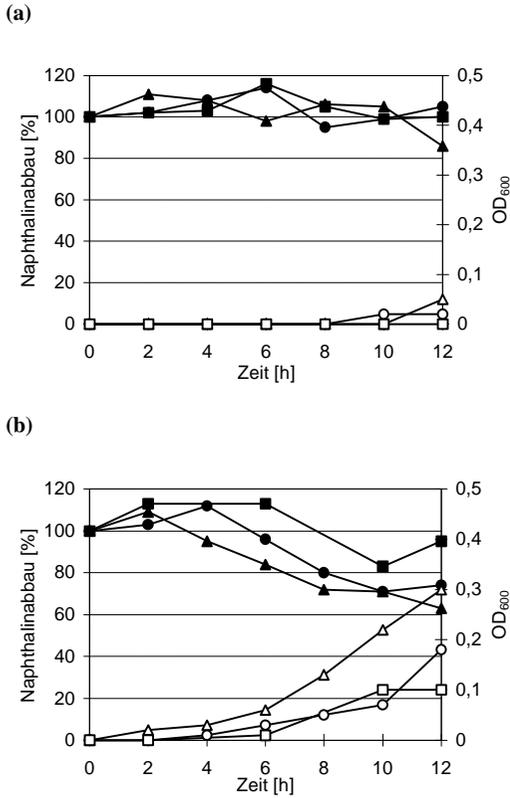


Abbildung 8: Zeitlicher Verlauf des mikrobiellen Wachstums (offene Symbole) und des PAK-Abbaus (gefüllte Symbole) durch verschiedene Bakterienstämme, in Mineralsalzmedium mit Naphthalin als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle. Die Bakterienstämme wurden zuvor in dYT-Medium (a) bzw. in Naphthalin-haltigem Medium (b) vorkultiviert. Die verbliebenen Mengen an Naphthalin und Phenanthren in den Kulturen wurden gaschromatographisch bestimmt.

●, ○ *P. putida* OUS2; ■, □ Isolat H (*C. testosteroni*); ▲, △ Isolat A10 (*P. fluorescens*).

3.7 Catechol-Dioxygenase Aktivitäten verschiedener PAK-abbauender Referenzstämmen und Isolate

Die enzymatischen Tests sollten zeigen, ob in PAK-abbauenden Stämmen Catechol-Dioxygenasen aktiv sind, und ob diese enzymatischen Aktivitäten durch Naphthalin- bzw. Phenanthren als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle induziert werden oder eine konstitutive Aktivität der Enzyme vorliegt.

Es zeigte sich, daß verschiedene der PAK-abbauenden Umweltisolate und Referenzstämmen nach Kultivierung in Mineralsalzmedium mit 0,05% Naphthalin bzw. Phenanthren C23O-Aktivität hatten (Tab. 9). Wurden die, aus diesen Kulturen aufgearbeiteten, Proteinextrakte im photometrischen Test eingesetzt, stieg die Absorption bei 375 nm über die Zeit an. Diese Zunahme der Absorption kann auf die Umsetzung von Catechol zu 2-Hydroxymuconsäure-Semialdehyd, d.h. auf C23O-Aktivität zurückgeführt werden. Keine aktive C23O wurde für die untersuchten Rhodokokken Isolate (B1, G10 und N23) und das Isolat *Paenibacillus* sp. festgestellt.

Die ermittelten spezifischen C23O-Aktivitäten variierten extrem bei Stämmen aus verschiedenen Gattungen (Tab. 9). Durchschnittlich wurden für die verschiedenen *P. fluorescens* Isolate (A10, F9, H9, T9 und C4) mit Werten zwischen 140 und 380 mU (mg Protein)⁻¹ die höchsten spezifischen Aktivitäten festgestellt. Abbildung 9a zeigt die periodisch in 30 sec Intervallen aufgenommenen Absorptionsspektren im Bereich von 225 bis 475 nm für Naphthalin-gewachsene Zellen eines *P. fluorescens* Stammes (Isolat C4).

Isolate, die der Spezies *P. putida* zugeordnet wurden, sowie der Referenzstamm *P. putida* NCIMB 9816 zeigten mit weniger als 100 mU (mg Protein)⁻¹ geringere Aktivitäten als die *P. fluorescens* Stämme. *P. putida* OUS82 besaß mit 380 bzw. 650 mU (mg Protein)⁻¹ die höchsten Aktivitäten aller getesteten Stämme. Ein Vertreter einer weiteren *Pseudomonas* Spezies (Isolat L7; *P. mendocina*) hatte mit weniger als 1 mU (mg Protein)⁻¹ mit Abstand die geringste spezifische Aktivität der getesteten Stämme der Gattung *Pseudomonas*.

Die verschiedenen Isolate der Gattung *Sphingomonas* (E3, Y9, H1a und H1b) zeigten ähnlich hohe spezifische C23O-Aktivitäten wie die *P. fluorescens* Stämme. Dabei wurde für das Isolat E3 (*Sphingomonas* sp.) nach fünftägiger Kultivierung in Phenanthrenhaltigem Medium mit 440 mU (mg Protein)⁻¹ die höchste spezifische Aktivität für die getesteten *Sphingomonas* Stämme festgestellt. Für den Referenzstamm *S. yanokuyae* DSM 6900 wurden dagegen mit 0,9 bzw. 6,1 mU (mg Protein)⁻¹ weit geringere enzymatische Aktivitäten ermittelt.

Die Isolate, die der beta-Subklasse der *Proteobacteria* zugeordnet wurden, zeigten alle ausnahmslos sehr geringe C23O-Aktivitäten (Abb. 9b). Die spezifischen Aktivitäten der Phenanthren-abbauenden *Acidovorax* spp. (E, E10 und V10) und der Naphthalin-verwertenden *Comamonas* spp. (G, H und M7) stiegen nicht über 2 mU (mg Protein)⁻¹.

Tabelle 9: Spezifische enzymatische Aktivitäten der Catechol 2,3-Dioxygenase verschiedener Referenzstämmen und Umweltisolate nach Kultivierung in Mineral-salzmedium mit 0,05% Naphthalin oder Phenanthren bzw. in dYT-Medium.

Referenzstämmen	Spezifische Catechol 2,3-Dioxygenase-Aktivität [mU mg ⁻¹] ¹⁾	
	MS-Medium mit N oder P ²⁾	dYT-Medium ³⁾
<i>P. putida</i> OUS82	380 (N, 4 d); 650 (P, 4 d)	12
<i>P. putida</i> NCIMB 9816	36 (N, 2 d), 12 (N, 3 d) ⁴⁾	4
<i>P. stutzeri</i> AN11	197 (N, 4 d)	
<i>S. yanoikuyae</i> DSM 6900	0,9 (N, 5 d); 6,1 (P, 5 d)	0,2
<i>P. putida</i> KT2440	0	0
Isolate		
Y9 (<i>Sphingomonas</i> sp.)	9 (P, 3 d); 100 (P, 4 d); 140 (P, 5 d)	0
E3 (<i>Sphingomonas</i> sp.)	270 (P, 4 d); 440 (P, 5 d)	5
H1a (<i>Sphingomonas</i> sp.)	149 (P, 5 d)	n.b.
H1b (<i>Sphingomonas</i> sp.)	81 (P, 5 d)	n.b.
E (<i>Acidovorax</i> sp.)	0,1 (P, 5 d)	0
E10 (<i>Acidovorax</i> sp.)	0,5 (P, 5 d)	0,2
V10 (<i>Acidovorax</i> sp.)	2 (P, 5 d)	0
G (<i>C. testosteroni</i>)	0,6 (N, 5 d)	0
H (<i>C. testosteroni</i>)	1,9 (N, 2 d); 0,5 (N, 5 d)	0
M7 (<i>C. terrigena</i>)	0,9 (N, 3 d)	0
A10 (<i>P. fluorescens</i>)	226 (N, 2 d); 140 (N, 3 d),	1
F9 (<i>P. fluorescens</i>)	380 (N, 3 d)	4
H9 (<i>P. fluorescens</i>)	270 (N, 3 d)	5
T9 (<i>P. fluorescens</i>)	240 (N, 3 d)	7
C4 (<i>P. fluorescens</i>)	240 (N, 3 d)	2
L7 (<i>P. mendocina</i>)	0,6 (N, 3 d)	0
F (<i>P. putida</i>)	20 (N, 3 d); 13 (N, 6 d)	0,1
N30 (<i>P. putida</i>)	40 (N, 3 d)	n.b.
N3 (<i>P. putida</i>)	33 (N, 3 d)	n.b.
N8 (<i>P. putida</i>)	97 (N, 3 d)	n.b.
B1 (<i>R. rhodochrous</i>)	0	n.b.
N22 (<i>Rhodococcus</i> sp.)	n.b.	n.b.
N23 (<i>Rhodococcus</i> sp.)	0	n.b.
G10 (<i>R. erythropolis</i>)	0	n.b.
3 (<i>Paenibacillus</i> sp.)	0	n.b.

n.b.: nicht bestimmt

- ¹⁾ Die spezifische Enzymaktivität [mU mg⁻¹] wird angegeben in umgesetztes Substrat [nmol] pro min und mg Protein.
- ²⁾ Die Stämme wurden in Mineralsalzmedium (Kästner *et al.*, 1994b) mit 0,05% Naphthalin (N) bzw. Phenanthren (P) als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle über einen Zeitraum von 2-6 Tagen, wie in Klammern angegeben, kultiviert.
- ³⁾ Die Bakterienstämme wurden in dYT-Medium über ein bis zwei Tage bis zu einer optischen Dichte von etwa 1,0 kultiviert. Die OD-Werte für die Stämme Y9, V10 und E10 lagen nur bei etwa 0,1.
- ⁴⁾ Neben einer spezifischen C23O-Aktivität von 12 mU (mg Protein)⁻¹ wurde in Zellen dieses Stamme nach dreitägigem Wachstum in Naphthalin angereichertem Medium ebenso eine C12O-Aktivität von 11 mU (mg Protein)⁻¹ festgestellt.

Es zeigte sich, daß die spezifischen enzymatischen Aktivitäten abhängig waren von der Kultivierungsdauer in Mineralsalzmedium mit Naphthalin bzw. Phenanthren. So stiegen die spezifischen Aktivitäten der *Sphingomonas* Isolate E3 und Y9 mit zunehmender Kultivierungsdauer mit Phenanthren als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle an. Umgekehrt hatte eine längere Inkubationsdauer in Naphthalin-angereicherter Mineralsalzmedium eine Abnahme der Aktivitäten bei den Isolaten H (*C. testosteroni*), A10 (*P. fluorescens*) und F (*P. putida*) zur Folge.

Parallel zur Detektion von C23O-Aktivitäten können mittels des gleichen enzymatischen Tests auch Catechol 1,2-Dioxygenase (C12O)-Aktivitäten detektiert werden. Aktive C12O spalten Catechol zu cis, cis Muconsäure, welches sein Absorptionsmaximum bei 255 nm hat.

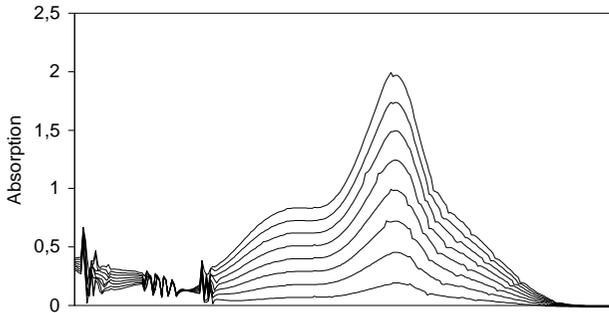
Für den Referenzstamm *P. putida* NCIMB 9816, der für drei Tage in Mineralsalzmedium mit 0,05% Naphthalin kultiviert wurde, wurde in diesem Wellenlängenbereich ein deutlicher Anstieg festgestellt (Abb. 9c). Die C12O-Aktivität wurde für diesen Stamm mit 11 mU berechnet. Alle anderen getesteten Stämme zeigten keine meßbare C12O-Aktivität. Für einige Bakterienstämme wurde, wie in Abbildung 9a gezeigt, über die Zeit eine Zunahme der Absorption im Bereich von ca. 240 bis 260 nm festgestellt, jedoch ohne Ausbildung eines charakteristischen Absorptionsmaximums bei 255 nm.

Der enzymatische Test zeigte, daß in dYT-Vollmedium kultivierte Zellen aller *P. fluorescens* Isolate und der Stämme *P. putida* OUS82 und *P. putida* NCIMB 9816 C23O-Aktivitäten aufwiesen. Diese waren aber mit maximal 12 mU (mg Protein)⁻¹ in allen Fällen wesentlich geringer, als die spezifischen Aktivitäten in Zellen, die mit Naphthalin bzw. Phenanthren als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle gewachsen waren (Tab. 9).

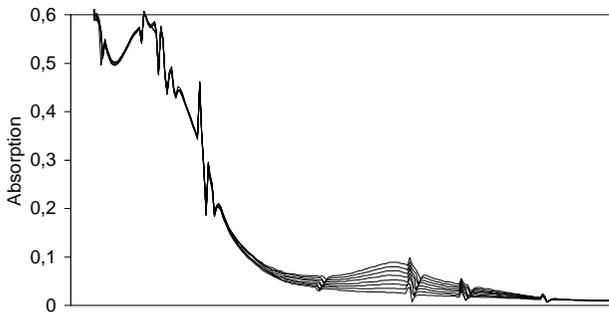
Geringe spezifische Aktivitäten wurden unter diesen Kulturbedingungen auch für *S. yanokuyae* DSM 6900 und *Sphingomonas* sp. (Isolat E3), für *P. putida* (Isolat F) und *Acidovorax* sp. (Isolat E10) gemessen. Die Zellen der Bakterienstämme, die nach Kultivierung in Naphthalin- bzw. Phenanthren-Medium nur geringe Enzymaktivitäten aufwiesen, hatten, mit Ausnahme des Isolats E10, nach Wachstum in dYT-Medium keinerlei C23O-Aktivität.

Für Isolat A10 (*P. fluorescens*) wurde zusätzlich festgestellt, daß in Mineralsalzmedium mit 0,05% Naphthalin und zusätzlich 1% TS-Medium die C23O-Aktivität mit 36 mU (mg Protein)⁻¹ geringer war, als in Medium, das nur Naphthalin als Kohlenstoff- und Energiequelle enthielt.

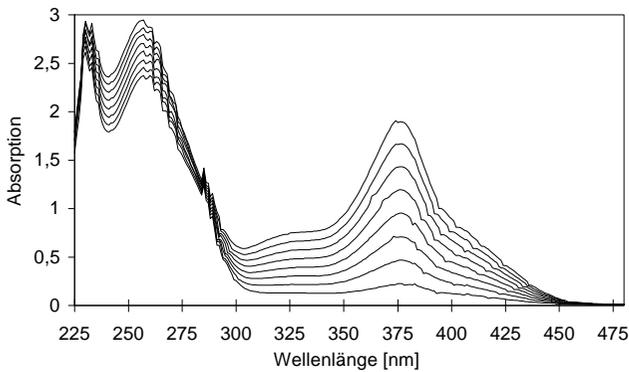
Die Ergebnisse zeigten, daß bei allen gramnegativen PAK-abbauenden Isolaten in Mineralsalzmedium mit Naphthalin bzw. Phenanthren die C23O aktiv ist. Die C23O wurde dabei bei einigen Stämmen durch Naphthalin oder Phenanthren als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle stark aktiviert, bei anderen Stämmen wurde das Enzym offensichtlich durch die Polyaromaten induziert.



(a)



(b)



(c)

Abbildung 9: Enzymatische Umsetzung von Catechol durch Proteinextrakte aus Zellen des Isolats C4 (*P. fluorescens*) (a), des Isolats H (*C. testosteroni*) (b) und des Stamms *P. putida* NCIMB 9816 (c). Die Stämme wurden 2 (Isolat H) bzw. 3 Tage (Isolat C4, *P. putida* NCIMB 9816) in Mineralsalzmedium mit 0,05% (w/v) Naphthalin kultiviert. Für den Enzymtest wurden 50 µg (Isolat C4), 165 µg (Isolat H) bzw. 690 µg (*P. putida* NCIMB 9816) Protein eingesetzt. Die Spektren wurden periodisch in 30 Sekunden Intervallen im Wellenlängenbereich von 225 bis 475 nm aufgenommen.

3.8 Detektion von C23O-codierenden Genen durch PCR- und Hybridisierungstechniken

3.8.1 Ableitung von Primerpaaren und Oligonukleotidsonden anhand bekannter C23O-Sequenzen

In Datenbanken zugängliche Nukleotidsequenzen der C23O (Anhang; Tab. 21) wurden *aligned* und die Ähnlichkeitsdistanzen paarweise berechnet. Die C23O-Sequenzen von verschiedenen *Pseudomonas* Stämmen (*P. putida* 35X, *P. putida* H, *P. putida* mt-2, *P. putida* pPG7, *P. putida* CF600, *P. putida* HS1, *P. aeruginosa* JI104, *P. stutzeri* OM1, *Pseudomonas* sp. IC) sind mit minimal 75% Sequenzähnlichkeit gut konserviert (Anhang; Tab. 22). Der C23O-codierende Bereich des Stammes *Alcaligenes* sp. KF711 ist als einzige Sequenz, die nicht von einem *Pseudomonas* Vertreter stammt, zu der C23O-Sequenzgruppe der genannten *Pseudomonas* Stämme („*Pseudomonas* Gruppe“) sehr ähnlich.

Sequenzen von zwei Vertretern der Gattung *Sphingomonas* sind ebenfalls veröffentlicht. C23O-Sequenzen von *Sphingomonas* sp. HV3 und *S. yanoikuyae* B1 sind zu 76,5% ähnlich zueinander („*Sphingomonas*-Gruppe“) und zwischen 56 und 61% ähnlich zu der Sequenzgruppe der *Pseudomonaden*.

C23O-Sequenzen, die zu anderen Bakteriengattungen gehören, wie *Ralstonia* (*R. pickettii* PK01 und *R. eutropha* JMP222), *Rhodococcus* (*R. rhodochrous* NCIMB 13064 und *R. rhodochrous* CTM), *Bacillus* (*B. stearothermophilus* FDTP-3 und *B. thermoleovorans* A2), *Comamonas* (*C. testosteroni* TA441) und *Burkholderia* (*Burkholderia* sp. PS12 und *B. cepacia* AA1), aber auch von zwei Vertretern der *Pseudomonaden* (*P. putida* MT15 und *P. fluorescens* IP01) sind sowohl zueinander als auch zu den beiden Sequenzgruppen der *Pseudomonaden* und *Sphingomonaden* sehr heterolog. Auch die Sequenzen von Vertretern gleicher Gattungen sind schlecht konserviert. Die Sequenzähnlichkeit beträgt beispielsweise für die beiden *Rhodokokken* Stämme nur 35,9%, für die beiden *Burkholderia* Vertreter 38,4%.

Aufgrund dieser Sequenzheterogenität ist die spezifische Erfassung C23O-codierender Sequenzen durch den Einsatz eines universellen Primerpaares in der PCR nicht möglich. Zur Detektion einer möglichst großen Anzahl von C23O-Genen verschiedener Bakterienstämme wurden insgesamt sechs verschiedene Primerpaare und vier verschiedene Oligonukleotidsonden entwickelt (Tab. 10). Als Grundlage dienten zunächst die *Sequenzalignments* der „*Pseudomonas*-Gruppe“ (Primerpaar PSCA23St/PSCA23End) bzw. „*Sphingomonas*-Gruppe“ (Primerpaar SPHCA23St/23OR). Auf Basis dieser Sequenzgruppen wurden zur Identifizierung der amplifizierten DNA-Fragmente ebenso interne Oligonukleotidsonden (CDO, PS1, PS2 und SPH) abgeleitet.

Tabelle 10: Sequenzen und Positionen der PCR Primer und der Oligonukleotidsonden zur Detektion Catechol 2,3-Dioxygenase-codierender Sequenzen.

Primer- Bezeichnung	Position	Annealing Temperatur	Sequenz von 5' nach 3'	Referenz
23OF	207-229 ¹⁾	63 °C	ATGGATDTDATGGGDTTCAAGGT ²⁾	Wikström <i>et al.</i> , 1996
23OR	906-928 ¹⁾	63 °C	ACDGTCADGAADCGDTCGTTGAG ²⁾	Wikström <i>et al.</i> , 1996
PSCA23St	15-34 ¹⁾	57 °C	ATGAAMAAAGGHGTWATGCG	diese Arbeit
PSCA23End ³⁾	908-928 ¹⁾	57 °C	DGTCADGAADCGDTCGTTGAG	diese Arbeit
SPHCA23St	28-56 ⁴⁾	60 °C	ATGGCWYTGACYGGTGTAMTTCG	diese Arbeit
COM23OF	5341-5361 ⁵⁾	52-58 °C	ATGGGWRTMATGCGAATCGGC	diese Arbeit
COM23OR	6228-6248 ⁵⁾	52-58 °C	CCMGTTGTATARAAGATSCCG	diese Arbeit
RHD23OF	134-153 ⁶⁾	52-58 °C	GCATCGGGTACATCGGCATC	diese Arbeit
RHD23OR	1046-1065 ⁶⁾	52-58 °C	AGCGGCTACGGGTTCTTCCA	diese Arbeit
RCTM23OF	549-570 ⁷⁾	52 °C	CACAATTKGCWCCATGTRGAG	diese Arbeit
RCTM23OR	1366-1385 ⁷⁾	52 °C	TCCAKATMACMGGMTCCCA	diese Arbeit
RWOB23OF	134-153 ⁶⁾	52 °C	GCWTSGGBTAYATSGGSWTC	diese Arbeit
Sonden- Bezeichnung	Position	Stringenz der Hybridisierung ⁸⁾	Sequenz von 5' nach 3'	Referenz
CDO	765-785 ¹⁾	50	GAAGAAGTAGATGGTCTTGCC	diese Arbeit
PS1	595-613 ¹⁾	50	TCGTGSGCYTTGGTCGACA	diese Arbeit
PS2	702-719 ¹⁾	30	GACCTGATCTCCATGACC	diese Arbeit
SPH	689-709 ⁴⁾	50	CTGGCACGATGTTGGCCATG	diese Arbeit

B=T+C+G, D=A+T+G, H=A+T+C, K=T+G, M=A+C, R=A+G, S=C+G, W=A+T, Y=C+T

- ¹⁾ Die Positionen der Primer und Oligonukleotidsonden beziehen sich auf *P. putida* pPG7, Plasmid NAH7; GenBank *accession number* (AC): M17159.)
- ²⁾ Desoxyinosin Nukleotide der Primer nach (Wikström *et al.*, 1996) wurden durch „Wobble Nukleotide“ (A+T+G) ersetzt.
- ³⁾ Modifikation des Primers 23OR.
- ⁴⁾ Die Positionen der Primer und Oligonukleotidsonden beziehen sich auf *Sphingomonas yanoikuyae* B1; AC: U23375.
- ⁵⁾ Die Positionen der Primer beziehen sich auf *Comamonas testosteroni* TA441; AC: AB006479 (Arai *et al.*, 1998)
- ⁶⁾ Die Positionen der Primer beziehen sich auf *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB13064; AC: L77225
- ⁷⁾ Die Positionen der Primer beziehen sich auf *Rhodococcus rhodochrous* CTM, Plasmid pTC1; AC: X69504 (Candidus *et al.*, 1994).
- ⁸⁾ Prozentualer Formamidanteil [v/v] im Hybridisierungspuffer. Die Hybridisierung wurde bei 35 °C durchgeführt.

Aufgrund der geringen Sequenzähnlichkeit wurden, basierend auf den Einzelsequenzen von *C. testosteroni* TA441 (Primerpaar COM23OF/COM23OR), *R. rhodochrous* NCIMB 13064 (Primerpaar RHD23OF/RHD23OR) und *R. rhodochrous* CTM (Primerpaar RCTM23OF/RCTM23OR) Primerpaare abgeleitet. Der *wobbleprimer* RWOB23OF wurde basierend auf einem *alignment* der C23O-Sequenz des Stammes *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB13064 und den Sequenzen der Stämme *P. fluorescens* IP01 und *Burkholderia* sp. PS12, die mit 50 bzw. 54% die größte Sequenzähnlichkeit zu der *Rhodococcus* Sequenz aufwiesen, abgeleitet. Als Rückwärtsprimer wurde RHD23OR eingesetzt.

Desweiteren wurde ein Primerpaar nach Wikström *et al.* (1996) zur Amplifizierung eines etwa 700 bp großen Abschnitts der C23O getestet (Primerpaar 23OF/23OR).

Als Negativkontrollstämmen wurden die Stämme *P. putida* KT2440, dem ein C23O-codierendes Gen fehlt, und *E. coli* SURE, der keine Abbaufähigkeit gegenüber Polyaromaten besitzt, verwendet.

3.8.2 Spezifische Detektion von C23O-codierenden Genen von *Pseudomonas* und *Sphingomonas* Stämmen

Die Verwendung des Primerpaares 23OR/23OF (Wikström *et al.*, 1996) führte bei einer *annealingtemperatur* von 63 °C zur Amplifizierung eines DNA-Fragments der erwarteten Größe von etwa 700 bp bei allen Referenzstämmen und allen Isolat, die den Gattungen *Pseudomonas* bzw. *Sphingomonas* zugeordnet wurden (Tab. 11, Abb. 10a). Für die Isolate, die zu anderen Gattungen gehören, wurde auch unter relaxierten PCR-Bedingungen (58 °C) keine PCR-Produkte der erwarteten Größe erhalten. Ebenso wurden keine Fragmente für den Referenzstamm *P. putida* KT2440, der keine C23O besitzt, und *P. putida* F1, für den eine 3-Methylcatechol 2,3-Dioxygenase beschrieben wurde (Lau *et al.*, 1994), amplifiziert. Die Ansequenzierung einiger PCR-Fragmente und die anschließende Datenbankrecherche ergab eine große Übereinstimmung zu C23O-codierenden Genen verschiedener *Pseudomonas* Stämme (3.9.1).

Die Ergebnisse der PCR waren unabhängig davon, ob nach Standardverfahren extrahierte DNA (2.15.1) eingesetzt wurde oder die DNA durch Aufkochen der Bakterienzellen in einem Schnellverfahren (2.15.2) gewonnen wurde.

Der Einsatz der Primerpaare PSCA23St/PSCA23End führte bei 57 °C zur spezifischen Amplifizierung bei allen PAK-abbauenden *Pseudomonas*-Referenzstämmen und -Isolaten, während keine Amplifikate für die *Sphingomonas*-Stämme und die Referenzstämmen *P. putida* KT2440 und *E. coli* SURE erhalten wurden (Tab. 11, Abb. 11a). Der Stamm *P. mendocina* (Isolat L7) zeigte nur ein schwaches Amplifikationsprodukt. Umgekehrt wurden für alle *Sphingomonas* Stämme, aber nicht für Vertreter der Pseudomonaden oder der Negativkontrollstämmen, mit dem Primerpaar SPHCA23St/23OR Amplifikate erhalten (Abb. 12a). Die mit diesen beiden Primerpaaren erhaltenen PCR-Fragmente entsprachen der

erwarteten Länge von etwa 900 bp. Die ansequenzierten Nukleotidabschnitte der Amplifikate zeigten auch hier eine große Ähnlichkeit zu bekannten C23O-Genen von *Pseudomonas* oder *Sphingomonas* Stämmen (3.9.1).

Mittels der beiden eingesetzten Primerpaare war somit die spezifische Detektion von C23O-Sequenzabschnitten für PAK-abbauende Vertreter der Pseudomonaden bzw. Sphingomonaden möglich.

Alternativ zu dieser spezifischen Detektion durch verschiedene Primerpaare wurde gezeigt, daß ein differentieller Nachweis von C23O-codierenden Sequenzabschnitten für *Pseudomonas* bzw. *Sphingomonas*-Stämme auch durch den Einsatz des Primerpaares 23OF/23OR mit anschließender Hybridisierung der aufgetrennten und geblotteten Fragmente mit den Oligonukleotidsonden PS1, PS2 und SPH möglich ist (Abb. 10).

Mittels der Sonde PS1 wurden unter stringenten Hybridisierungsbedingungen (50% (v/v) Formamid) spezifische PCR-Fragmente der *Pseudomonas* Stämme detektiert (Tab. 11; Abb. 10b). Die PCR-Amplifikate der verschiedenen getesteten Sphingomonaden hybridisierten nicht mit der Sonde PS1.

Das PCR-Amplifikat von Isolat L7 (*Pseudomonas mendocina*) zeigte dabei ein schwächeres Hybridisierungssignal als die anderen Stämme der Pseudomonaden. Die PCR mit dem Primerpaar PSCA23St/PSCA23End führte mit der DNA dieses Stammes zu einem schwächeren Amplifikat, verglichen mit den übrigen *Pseudomonas* Isolaten (Abb. 11a).

Die Sonde PS2 hybridisierte ebenso mit allen erhaltenen PCR-Amplifikaten der getesteten Stämme der Gattung *Pseudomonas* (Abb. 11b), nicht aber mit denen der *Sphingomonas* Vertreter. Das schwache PCR-Amplifikat des Isolats L7 zeigte mit dieser Sonde ebenso deutliche Hybridisierungssignale. Außerdem konnte durch den Einsatz dieser Sonde gezeigt werden, daß mit dem Primerpaar PSCA23St/PSCA23End auch ein 900-bp langes Amplifikat des Stammes *P. putida* F1 erhalten wurde, welches auf dem Agarosegel nicht erkennbar war.

Die „*Sphingomonas*-Gruppen“-Sonde SPH hybridisierte spezifisch mit Amplifikationsprodukten der verschiedenen Vertreter der Sphingomonaden. Nur das PCR-Amplifikat von *S. paucimobilis* BA2 hybridisierte nicht mit dieser Sonde (Abb. 10c, 12b). Wurde die Hybridisierung mit geringer Stringenz, bei 20% (v/v) Formamid im Hybridisierungspuffer, durchgeführt, zeigte das Amplifikat dieses Stammes ein schwaches Hybridisierungssignal. Neben diesen spezifischen Sonden hybridisierte die Sonde CDO mit allen erhaltenen PCR-Fragmenten, unabhängig von ihrer Zugehörigkeit zu der Gattung *Pseudomonas* oder *Sphingomonas*. Ausnahme ist wiederum der Stamm *S. paucimobilis* BA2; dieser zeigte kein Hybridisierungssignal mit CDO.

Tabelle 11: Ergebnisse der PCR mit verschiedenen Primerpaaren und Ergebnisse der Hybridisierung mit C23O-gerichteten Oligonukleotidsonden zur Detektion von C23O-codierenden Genabschnitten bei verschiedenen PAK-abbauenden Bakterienstämmen.

Bakterienstämme	PCR-Produkt			Hybridisierung mit Sonde				
	Referenzstämme	23OF/23OR	PSCA23St/ PSCA23End	SPHCA23St/ 23OR	CDO	PS1	PS2	SPH
<i>P. putida</i> OUS82	+	+	-	+	+	+	-	
<i>P. putida</i> NCIMB9816	+	+	-	+	+	+	-	
<i>P. stutzeri</i> AN11	+	+	-	+	+	+	-	
<i>P. putida</i> F1	-	+ ¹⁾	-	+	-	+	-	
<i>S. yanoikuyae</i> DSM6900	-	-	+	+	-	-	+	
<i>S. paucimobilis</i> BA2	+	-	+	-	-	-	+ ²⁾	
<i>P. putida</i> KT2440	-	-	-	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	
<i>E. coli</i> SURE	-	-	-	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	
Isolate								
Y9 (<i>Sphingomonas</i> sp.)	+	-	+	+	-	-	+	
E3 (<i>Sphingomonas</i> sp.)	+	-	+	+	-	-	+	
H1a (<i>Sphingomonas</i> sp.)	+	-	+	+	-	-	+	
H1b (<i>Sphingomonas</i> sp.)	+	-	+	+	-	-	+	
E (<i>Acidovorax</i> sp.)	-	-	-	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	
E10 (<i>Acidovorax</i> sp.)	-	-	-	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	
V10 (<i>Acidovorax</i> sp.)	-	-	-	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	
G (<i>C. testosteroni</i>)	-	-	-	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	
H (<i>C. testosteroni</i>)	-	-	-	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	
M7 (<i>C. terrigena</i>)	-	-	-	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	
A10 (<i>P. fluorescens</i>)	+	+	-	+	+	+	-	
F9 (<i>P. fluorescens</i>)	+	+	-	+	+	+	-	
H9 (<i>P. fluorescens</i>)	+	+	-	+	+	+	-	
T9 (<i>P. fluorescens</i>)	+	+	-	+	+	+	-	
C4 (<i>P. fluorescens</i>)	+	+	-	+	+	+	-	
L7 (<i>P. mendocina</i>)	+	+	-	+	-	+	-	
F (<i>P. putida</i>)	+	+	-	+	+	+	-	
N8 (<i>P. putida</i>)	+	+	-	+	+	+	-	
N30 (<i>P. putida</i>)	+	+	-	+	+	+	-	
N3 (<i>P. putida</i>)	+	+	-	+	+	+	-	
N8 (<i>P. putida</i>)	+	+	-	+	+	+	-	
B1 (<i>R. rhodochrous</i>)	-	-	-	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	
N22 (<i>Rhodococcus</i> sp.)	-	-	-	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	
N23 (<i>Rhodococcus</i> sp.)	-	-	-	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	
G10 (<i>R. erythropolis</i>)	-	-	-	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	
3 (<i>Paenibacillus</i> sp.)	-	-	-	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	

k.A.: kein Amplifikat

¹⁾ Amplifikat erst nach Hybridisierung mit PS2 detektiert.

²⁾ Zeigte nur unter relaxierten Bedingungen ein schwaches Hybridisierungssignal (20% Formamid).

Durch die spezifischen Primerpaare PSCA23St/PSCA23End und SPHCA23St/23OR oder durch das Primerpaar 23OR/23OF mit nachfolgender Hybridisierung mit den *Pseudomonas*- (PS1 oder PS2) bzw. der *Sphingomonas*-Sonden (SPH) ist also der differentielle Nachweis von C23O-codierenden Genen der PAK-abbauenden

Pseudomonaden einerseits und der PAK-verwertenden Sphingomonaden andererseits möglich.

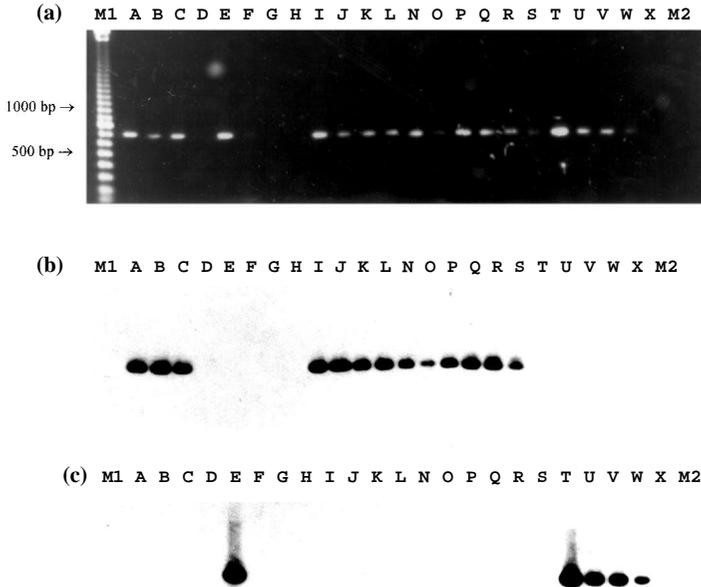


Abbildung 10: Elektrophoretisch auf einem 1,5%igen Agarose-Gel aufgetrennte PCR-Fragmente (a), die aus Gesamt-DNA verschiedener Referenzstämme und Isolate mit dem Primerpaar 23OF/23OR amplifiziert wurden und die Ergebnisse der Hybridisierung des entsprechenden Southern-Blots mit den Sonden PS1 (b) und SPH (c).

Spur M1, 100 bp Leiter; A, *P. putida* OUS82; B, *P. putida* NCIMB 9816; C, *P. stutzeri* AN11; D, *P. putida* F1; E, *S. yanoikuyae* DSM 6900; F, *S. paucimobilis* BA2; G, *P. putida* KT2440; H, *E. coli* SURE; I, Isolat A10 (*P. fluorescens*); J, Isolat F9 (*P. fluorescens*); K, Isolat H9 (*P. fluorescens*); L, Isolat T9, (*P. fluorescens*); N, Isolat C4 (*P. fluorescens*); O, Isolat L7, (*P. mendocina*); P, Isolat F (*P. putida*); Q, Isolat N30 (*P. putida*); R, Isolat N3 (*P. putida*); S, Isolat N8 (*P. putida*); T, Isolat E3 (*Sphingomonas* sp.); U, Isolat Y9 (*Sphingomonas* sp.); V, H1a (*Sphingomonas* sp.); W, H1b (*Sphingomonas* sp.); X, Kontrolle, ohne DNA; M2, Lambda *EcoR* I/*Hind* III Marker.

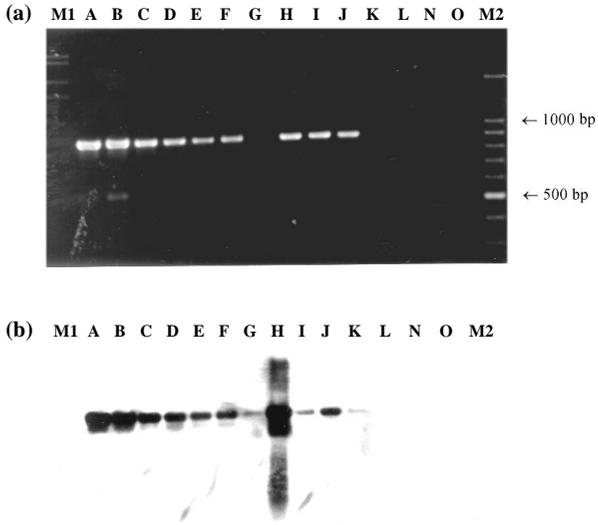


Abbildung 11: Elektrophoretisch auf einem 1,5%igen Agarose-Gel aufgetrennte PCR-Fragmente (a), die aus Gesamt-DNA verschiedener Referenzstämme und Isolate mit dem Primerpaar PSCA23ST/PSCA23End amplifiziert wurden und die Ergebnisse der Hybridisierung des entsprechenden Southern-Blots mit der Sonde PS2 (b).

Spur **M1**, Lambda *EcoR I/Hind III* Marker; **A**, Isolat F (*P. putida*); **B**, Isolat A10 (*P. fluorescens*); **C**, Isolat C4 (*P. fluorescens*); **D**, Isolat F9 (*P. fluorescens*); **E**, Isolat H9 (*P. fluorescens*); **F**, Isolat T9, (*P. fluorescens*); **G**, Isolat L7, (*P. mendocina*); **H**, *P. stutzeri* AN11; **I**, *P. putida* OUS82; **J**, *P. putida* NCIMB 9816; **K**, *P. putida* F1; **L**, *P. putida* KT2440; **N**, *E. coli* SURE, **O**, Kontrolle, ohne DNA; **M2**, 100 bp Leiter.

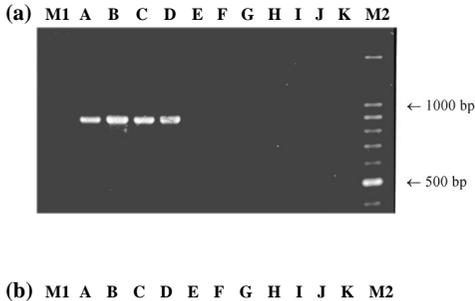


Abbildung 12: Elektrophoretisch auf einem 1,5%igen Agarose-Gel aufgetrennte PCR-Fragmente (a), die aus Gesamt-DNA verschiedener Referenzstämmen und Isolate mit dem Primerpaar SPHCA23St/23OR amplifiziert wurden und die Ergebnisse der Hybridisierung des entsprechenden Southern-Blots mit der Sonde SPH (b).

Spur **M1**, Lambda *EcoRI/Hind III* Marker; **A**, Isolat E3 (*Sphingomonas* sp.); **B**, Isolat Y9 (*Sphingomonas* sp.); **C**, *S. paucimobilis* BA2; **D**, *S. yanoikuyae* DSM 6900; **E**, isolate A10 (*P. fluorescens*); **F**, *P. putida* OUS82; **G**, *P. putida* NCIMB 9816; **H**, *P. putida* F1; **I**, *P. putida* KT2440; **J**, *E. coli* SURE; **K**, Kontrolle, ohne DNA; **M2**, 100 bp Leiter.

3.8.3 Detektion von C23O codierenden Genabschnitten in einer PAK-Anreicherungskultur

150 ml Mineralsalzmedium mit 0,05% (w/v) Naphthalin bzw. Phenanthren wurden mit 0,5 ml einer Belebtschlammprobe aus der Gießener Kläranlage beimpft und über vier Tage bei 25 °C und 180 rpm inkubiert. Aus 2 ml dieser Anreicherungskulturen wurde DNA isoliert (2.15.3.1) und für eine PCR mit dem Primerpaar 23OF/23OR eingesetzt.

Aus der DNA-Aufarbeitung der Phenanthren-Anreicherungskultur wurden keine PCR-Amplifikate erhalten. Im Gegensatz dazu wurden aus der isolierten DNA der Naphthalin-Kultur Fragmente der erwarteten Länge bei Einsatz von 2 µl, 1 µl, 0,5 µl bzw. 1 µl einer 10fachen Verdünnung des DNA-Extraktes erhalten (Abb. 13a).

Durch die Hybridisierung mit der *Pseudomonas* spezifischen Sonde PS1 wurden desweiteren auch PCR-Fragmente in den Reaktionsansätzen mit 5 bzw. 1 µl eingesetzter DNA einer 100fachen Verdünnung detektiert, die zuvor nicht auf dem Gel sichtbar waren (Abb. 13b). Wurde mit der *Sphingomonas* spezifischen SPH Sonde hybridisiert, zeigten nur die auf dem Gel bereits sichtbaren PCR-Fragmente Signale (Abb. 13c).

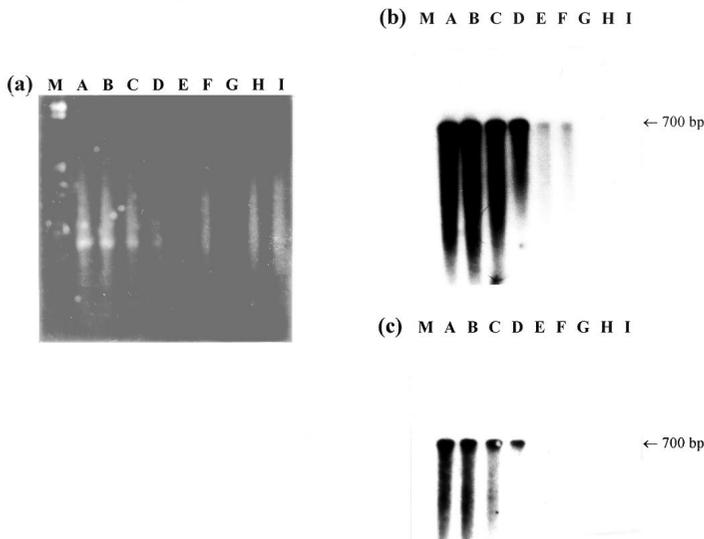


Abbildung 13: Elektrophoretisch auf einem 1,0%igen Agarose-Gel aufgetrennte PCR-Fragmente (a), die aus isolierter DNA einer Naphthalin-Anreicherungskultur mit dem Primerpaar 23OF/23OR amplifiziert wurden und die Ergebnisse der Hybridisierung des entsprechenden Southern-Blots mit den Sonden PS1 (b) und SPH (c).

Spur M, Lambda *EcoR I/Hind III* Marker; **A,** 2 μ l DNA; **B,** 1 μ l DNA; **C,** 0,5 μ l DNA; **D,** 1 μ l DNA, 10fach verdünnt; **E,** 5 μ l DNA, 100fach verdünnt; **F,** 1 μ l DNA, 100fach verdünnt; **G,** 5 μ l DNA, 1000fach verdünnt; **H,** 1 μ l DNA, 1000fach verdünnt; **I,** Kontrolle, ohne DNA.

Die Ergebnisse zeigten, daß in der Kultur mit Naphthalin Stämme angereichert wurden, die C23O-codierende Gene besitzen. Die Hybridisierungen mit den spezifischen Sonden lassen vermuten, daß sowohl C23O-Sequenzen, die der „*Pseudomonas*-Gruppe“ zugeordnet werden können, als auch C23O codierende Gene der „*Sphingomonas*-Gruppe“ in der Kultur vorhanden waren. Die entsprechenden Sequenzen der „*Pseudomonas*-Gruppe“ scheinen dabei in einer höheren Konzentration vorgelegen zu haben als jene der „*Sphingomonas*-Gruppe“, weil auch bei einer 100fachen Verdünnung der isolierten DNA noch PCR-Amplifikate erhalten wurden.

Die erhaltenen Amplifikate wurden kloniert und teilweise ansequenziert (3.9.2).

3.8.4 Verwendung des Primerpaares COM23OF/COM23OR

Das Einsatz des Primerpaares COM23OF/COM23OR führte auch bei niedrigen Annealingtemperaturen (52 °C) nicht zur Amplifizierung der entsprechenden DNA-Abschnitte bei den getesteten *Comamonas*- und *Acidovorax*-Isolaten (Isolat G, H, M7, E, E10 und V10).

3.8.5 Verwendung der Primerpaare RCTMOF/RCTMOR, RWOB23OF/RHD23OR und RHD23OF/RHD23OR

Die auf der Basis der bekannten *Rhodococcus*-Sequenzen abgeleiteten Primer wurden auf ihre Funktion C23O-codierende Abschnitte bei verschiedenen *Rhodococcus*-Isolate zu amplifizieren, getestet. Verwendet wurden die in dieser Arbeit isolierten Stämme B1 (*R. rhodochrous*), G10 (*R. erythropolis*), N22 (*Rhodococcus* sp.) und N23 (*Rhodococcus* sp.), sowie verschiedene Naphthalin-abbauende *Rhodococcus*-Isolate aus dem antarktischen Raum (Tab. 1; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. R. Roselló-Mora; MPI für aquatische Mikrobiologie, Bremen). Die Verwendung des Primerpaares RCTMOF/RCTMOR, das basierend auf der plasmidcodierten Sequenz von *Rhodococcus rhodochrous* CTM entwickelt wurde, führte bei einer Annealingtemperatur von 52 °C bei keinem der getesteten *Rhodococcus*-Isolaten zu einem PCR-Amplifikat. Schwache Amplifikate wurden bei Einsatz des Primers RWOB23OF in Kombination mit dem Primer RHD23OR für die Stämme N9, N7, N2, N0, B1 und G10 erhalten. Die 500 bis etwa 800 bp langen Amplifikate entsprachen nicht der erwarteten Länge von etwa 900 bp. Wurde die annealingtemperatur auf 58 °C erhöht, wurden keine Fragmente aus diesen Ansätzen amplifiziert.

Mit dem Primerpaar RHD23OF/RHD23OR wurden sowohl bei 52 °C als auch bei 58 °C bei den antarktischen Stämmen N0, N4, N6, N7 und N9 deutliche PCR-Produkte erhalten (Abb. 14a). Die Amplifikate entsprachen mit ca. 480 bp nicht der erwarteten Länge von etwa 900 bp. Ein schwaches Amplifikat der gleichen Länge war für das Isolat NEN9 auf dem Gel sichtbar. Die Hybridisierung der gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Ansätze mit dem PCR-Fragment des Stammes N0 zeigte, daß „N0-ähnliche“ Sequenzabschnitte ebenso in weiteren Stämmen amplifiziert worden waren (Abb. 14b). Diese *Rhodococcus* Stämme stammten aus weiteren antarktischen Habitaten (N1 und N2) und aus unterschiedlichen Habitaten des hessischen Raums (Tab. 7; Isolat B1, G10, N22 und N23). Nur für den antarktischen Stamm N3 wurde kein amplifizierter Sequenzabschnitt mit dieser Sonde detektiert. Die Sequenzierung sollte zeigen, ob die 480-bp-langen Amplifikate Ähnlichkeiten zu der C23O-codierenden Sequenz des Stammes *R. rhodochrous* NCIMB 13064 aufwiesen (3.9.2).

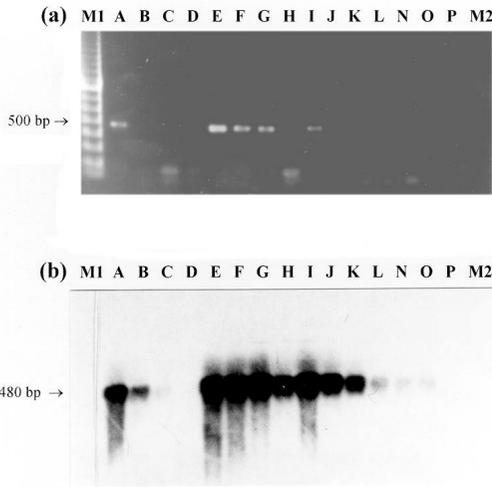


Abbildung 14: Elektrophoretisch auf einem 1,5%igen Agarose-Gel aufgetrennte PCR-Fragmente (a), die aus Gesamt-DNA verschiedener *Rhodococcus* Stämme mit dem Primerpaar RHD23OF/RHD23OR amplifiziert wurden und die Ergebnisse der Hybridisierung des entsprechenden Southern-Blots mit dem 480-bp-PCR-Fragment des Stammes N0 als Sonde (b).

Spur **MI**, 100 bp Leiter; **A**, Isolat N0 (*Rhodococcus* sp.); **B**, Isolat N1 (*Rhodococcus* sp.); **C**, Isolat N2 (*Rhodococcus* sp.); **D**, Isolat N3 (*Rhodococcus* sp.); **E**, Isolat N4 (*Rhodococcus* sp.); **F**, Isolat N6 (*Rhodococcus* sp.); **G**, Isolat N7 (*Rhodococcus* sp.); **H**, Isolat N8 (*Rhodococcus* sp.); **I**, Isolat N9 (*Rhodococcus* sp.); **J**, Isolat NEN9 (*Rhodococcus* sp.); **K**, Isolat N22 (*Rhodococcus* sp.); **L**, Isolat N23 (*Rhodococcus* sp.); **N**, Isolat B1 (*R. rhodochrous*); **O**, Isolat G10 (*R. erythropolis*); **P**, Kontrolle, ohne DNA; **M2**, Lambda *EcoR* I/*Hind* III Marker.

3.9 Sequenzierung der mittels C23O-spezifischer Primer amplifizierten PCR-Fragmente

Die erhaltenen PCR-Amplifikate von verschiedenen PAK-abbauenden Stämmen, sowie die amplifizierten Fragmente aus der Naphthalin-Anreicherungskultur wurden vollständig sequenziert oder ansequenziert. Für die klonierten PCR-Fragmente wurden die vektoriellen Standardprimer zur Sequenzierung eingesetzt. Die direkte Sequenzierung der PCR-Amplifikate erfolgte mit den PCR-Primern PSCA23St, PSCA23End, SPHCA23St, 23OR, 23OF, RHD23OF, RHD23OR (Tab. 10). Zur vollständigen Sequenzierung wurden weitere interne Primer (entsprechend den Sondensequenzen PS1 und CDO, Tab. 10) verwendet.

3.9.1 Sequenzierung der PCR-Amplifikate aus verschiedenen PAK-abbauenden *Pseudomonas* und *Sphingomonas* Stämmen

Die mit den Primerpaaren PSCA23St/PSCA23End bzw. SPHCA23St/23OR erhaltenen 915 bp langen DNA-Fragmente umfassen die C23O-Sequenzabschnitte, ausgehend von dem Startcodon bis 9 Basen vor dem Stopcodon (Referenzsequenz von *P. putida* PpG7, Plasmid NAH7; Nukleotidpositionen 15-929; AC: M17159). Die vollständige Sequenzierung der PCR-Amplifikate der isolierten PAK-abbauenden *Pseudomonas*-Stämme A10, C4, F, N3, N8 und N30 zeigte, daß die von den Umweltisolaten stammenden Nukleinsäure-Sequenzen mit Sequenzunterschieden von etwa 1 bis 24% untereinander sehr ähnlich sind (Tab. 12).

Tabelle 12: Distanzwerte [%] der sequenzierten PCR-Amplifikate (obere rechte Hälfte) und der abgeleiteten Aminosäuresequenzen (untere linke Hälfte) verschiedener PAK-abbauender *Pseudomonas* Stämme im Vergleich zu C23O-Nukleinsäure- bzw. Aminosäuresequenzen von vier *Pseudomonas* Stämmen und einem *Sphingomonas* Stamm aus der Datenbank (GenBank). Die Berechnung erfolgte mit den Programmen „Arb“ (Nukleinsäuren) und „Lasergene“ (Aminosäuren).

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
I <i>P. putida</i> P35X		11,4	12,2	21,2	20,5	19,9	20,1	23,6	23,7	23,9	21,0	40,1	23,1
II <i>P. putida</i> HS1	10,7		1,4	18,9	22,7	21,9	22,7	22,9	23,1	23,6	21,8	39,6	22,7
III Isolat N8 (<i>P. putida</i>)	11,4	2,9		19,9	22,8	22,5	22,8	23,3	23,6	23,7	22,1	39,8	22,3
IV <i>P. putida</i> mt-2	18,2	16,9	18,2		20,1	19,2	20,5	18,7	18,7	19,5	7,0	43,2	18,7
V Isolat F (<i>P. putida</i>)	15,5	18,8	18,8	17,1		1,0	3,4	9,9	10,8	11,0	17,3	42,0	10,6
VI <i>P. putida</i> pPG7	14,3	16,9	18,2	15,3	2,0		2,9	9,6	9,8	10,2	16,7	41,6	10,2
VII <i>P. putida</i> OUS82	14,1	17,4	18,1	16,1	3,6	2,3		11,2	11,5	11,7	17,9	42,4	11,4
VIII Isolat N3 (<i>P. putida</i>)	17,2	17,2	17,5	14,2	8,6	7,6	8,9		1,1	2,2	15,8	42,5	1,6
IX Isolat A10 (<i>P. fluorescens</i>)	18,2	18,5	19,5	14,6	10,6	8,9	10,3	2,3		2,6	16,2	42,9	1,9
X Isolat C4 (<i>P. fluorescens</i>)	18,4	18,8	19,4	15,8	10,9	9,5	10,5	3,3	4,3		16,9	43,1	2,5
XI <i>P. stutzeri</i> AN11	16,4	18,1	18,8	4,9	13,5	11,5	12,5	10,6	11,6	12,2		43,4	15,8
XII <i>Sphingomonas</i> sp. HV3	51,8	50,2	50,8	54,4	53,9	53,1	53,6	53,6	55,6	55,3	53,6		42,7
XIII Isolat N30 (<i>P. putida</i>)	17,6	17,9	17,6	15,0	9,2	8,8	9,5	1,0	2,6	3,6	11,2	53,4	

Dabei waren C23O-Sequenzen der *Pseudomonas*-Isolate aus dem gleichen Habitat nicht besser konserviert, als Sequenzen von Isolaten, die aus unterschiedlichen Habitaten stammten. Die aus dem Belebtschlamm der kommunalen Kläranlage in Gießen isolierten Stämme F (*P. putida*) und A10 (*P. fluorescens*) zeigten beispielsweise Sequenzunterschiede von 12%, während die Sequenz des Isolates N3, welches aus einer Bodenprobe des alten Gaswerks Marburgs stammte, nur etwa 1% Unterschied zu der A10-Sequenz aufzeigte.

Die Ähnlichkeiten zwischen den erhaltenen Sequenzen der verschiedenen *Pseudomonas* Isolate und den Datenbanksequenzen für C23O-codierende Gene verschiedener *Pseudomonas* Stämme betragen ebenso zwischen 99 und 76%. Dabei stimmten die Sequenzen der Isolate A10, C4, N3 und N30 untereinander mit mindestens 97,4% überein

und waren mit nur etwa 10% Unterschied am ähnlichsten zu der C23O-Sequenz (*nahH*) von *P. putida* pPG7. Die Sequenz des Isolates F war sogar zu 99% identisch mit der von *nahH*, wies aber Sequenzunterschiede um die 10% zu den Isolaten A10, C4, N3 und N30 auf.

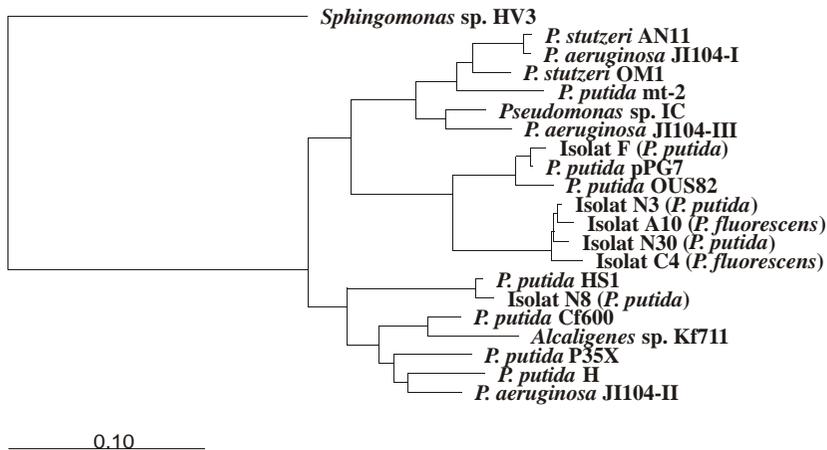


Abbildung 15: Dendrogramm der Nukleinsäure-Sequenzen der vollständig sequenzierten PCR-Amplifikate verschiedener *Pseudomonas* Stämme und den in GenBank zugänglichen C23O-Sequenzen von Vertretern der Pseudomonaden und eines *Alcaligenes* Stammes. Die Berechnung erfolgte basierend auf einem in ClustalX erstellten *alignment* nach dem Distanzmatrix-Verfahren („*neighbor-joining-tool*“) aus dem Sequenzdatenprogramm ARB (Dr. W. Ludwig; Technische Universität München). Als Außengruppe wurde eine C23O-Sequenz des Stammes *Sphingomonas sp. HV3* gewählt. Der Größenbalken von 0.10 steht für 10% Sequenzunterschied.

Die Sequenz des Isolates N8 dagegen wies mit 22,5% Sequenzunterschied eine wesentlich geringere Ähnlichkeit zu *nahH* als die anderen *Pseudomonas* Isolate auf, war aber dafür mit 98,6% sehr gut konserviert zu der C23O-Sequenz von *P. putida* HS1 (*xyIE*).

Das sequenzierte Amplifikat des Stamms *P. stutzeri* AN11 zeigte mit 99,2% Sequenzähnlichkeit die größte Übereinstimmung zu einem der drei C23O-Gene von *P. aeruginosa* JI104-I (Abb. 15; Anhang, Tab. 22), während die ermittelte C23O-Sequenz von *P. putida* OUS82 ebenso sehr ähnlich zu dem plasmidcodierten *nahH* Gen von *P. putida* pPG7 war.

Auf Aminosäureebene waren die Ähnlichkeiten der C23O-Sequenzen bei den Vertretern der Pseudomonaden untereinander im allgemeinen mit 80 bis 99% noch größer als auf Nukleinsäureebene (Tab. 12). Im Gegensatz dazu unterschieden sich die Aminosäuresequenzen der Pseudomonaden stärker von denen der Sphingomonaden, als dies für die

Nukleinsäuresequenzen der Fall war. Die C23O-Nukleinsäuresequenz des Stammes *Sphingomonas* sp. HV3 differierte zu verschiedenen *Pseudomonas*-Nukleinsäure-Sequenzen beispielsweise mit 40 bis 43%, während der Sequenzunterschied auf Aminosäureebene über 50% betrug.

In der Abbildung 16 ist ein *alignment* von ausgewählten Aminosäure-Sequenzen verschiedener Vertreter der Pseudomonaden und Sphingomonaden dargestellt. Die neun Aminosäuren, die nach Eltis & Bolin (1996) 35 verschiedenen extrazellulären Dioxygenasen gemein und für die Struktur, die katalytische Funktion und als Metalliganden entscheidend sind, sind auch innerhalb aller ermittelten Sequenzen konserviert.

```

P. fluorescens (A10)      -MNGVMRPGHVQLRVLDMGKALEHYIELLGLIEMDRDQGRVYLKAWSEVDFKFSVVLRE
P. putida (F)           -MNGVMRPGHVQLRVLDMGKALEHYVELLGLIEMDRDQGRVYLKAWTEVDFKFSVVLRE
P. putida PpG7         -MNGVMRPGHVQLRVLDMGKALEHYVELLGLIEMDRDQGRVYLKAWTEVDFKFSVVLRE
P. stutzeri AN11      -MNGVMRPGHVQLRVLDMGKALEHYVELLGLIEMDRDQGRVYLKAWTEVDFKFSVVLRE
S. yanoikuyae DSM 6900 MALTGVLRPQYVQLRVLDLDEAIQHRYDRIRGLNLSVVEG-GRAFFQAFDEFDRHSIILRE
S. paucimobilis BA2   MALTGVLRPQYVQLRVLDLDEAIVHYDRIRGLNLSVVEG-GRAFFQAFDEFDRHSIILRE
Sphingomonas sp. (Y9) MALTGDLRPQYVQLRVLDLDEAIIHYDRIRGLNLFVNRG-DRAFFQAFDEFDRHSIILRE
Sphingomonas sp. HV3  MALTGVIRPQYVQLRVLDLDEAIIHYDRIRGLNLFVNRG-DRAFFQAFDEFDRHSIILRE
                        * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

```

P. fluorescens (A10)      ADEPGMDFIPFKVVDEVSLLQQLQDLQAHGCSVEQVPAGELNNSCGRRVRFQAPSGHHFEL
P. putida (F)           ADEPGTDFPMGFKVVEEDSLNRLTDDLNFGLIENVAAGELKCGGRRVRFQAPSGHHFEL
P. putida PpG7         ADEPGMDFPMGFKVVEEDSLNRLTDDLNFGLIENVAAGELKCGGRRVRFQAPSGHHFEL
P. stutzeri AN11      ADEPGMDFPMGFKVVEEDSLNRLTDLTAYGCAVEQLPAGELNNSCGRRVRFQAPSGHHFEL
S. yanoikuyae DSM 6900 ADSAGLDRMAFKVARDADLDHFAERLLDIGHVVDVIAAGEDPGVGRKIRPNTPTSHVFDL
S. paucimobilis BA2   ADTAGLDRMAFKVAKDSLLDHFARLLDAGVNDVPIAGEDPGVGRKIRPNTPTAHVFDL
Sphingomonas sp. (Y9) ADQAGMDVMGFKVAKDADLDHFTERLLDIGHVVDVPIAGEDPGVGRKIRPNTPTQHVFDL
Sphingomonas sp. HV3  ADQAGMDVMGFKVAKDADLDHFTERLLDIGHVVDVPIAGEDPGVGRKIRPNTPTQHVFDL
                        ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

```

P. fluorescens (A10)      YADKEYTGKMGVNEVNEPEAWPRDLKGMAAVRFDHCLLYGDELQATYELFTEVLGFLYLAEQ
P. putida (F)           YADKEYTGEWGVSEVNEPEAWPRDLKGMAAVRFDHCLLYGDELQATYELFTEVLGFLYLAEQ
P. putida PpG7         YADKEYTGKMGVSEVNEPEAWPRDLKGMAAVRFDHCLLYGDELQATYELFTEVLGFLYLAEQ
P. stutzeri AN11      YADKEYTGKMGVNEVNEPEAWPRDLKGMAAVRFDHCLLYGDELQATYELFTEVLGFLYLAEQ
S. yanoikuyae DSM 6900 YAEMELS-ESGPAVRNPDVWIAEPRGMRATRFDCALNGVDISASAKIFVEALDFVAEE
S. paucimobilis BA2   YAEMELS-ETGPAVRNPDVWIAEPRGMRATRFDCALNGVDISASAKIFVEALDFVTEE
Sphingomonas sp. (Y9) YAEMALS-ATGPAVKNPDVWVVEPRGMRATRFDCALNGVDIASSAKIFVDALDFVAEE
Sphingomonas sp. HV3  YAEMALS-ATGPAVKNPDVWVVEPRGMRATRFDCALNGVDIASSAKIFVDALDFVAEE
                        ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

```

P. fluorescens (A10)      VVDVAE-GIRLAQFLSLSTKAHDVAFIQAHAEGKGFPHASFFLDTWELLRAEALISMTDTS
P. putida (F)           VVDAD-GIRLAQFLSLSTKAHDVAFIHAHAEGKGFPHASFFLDTWEDVLRRAADLISMTDTS
P. putida PpG7         VVDAD-GIRLAQFLSLSTKAHDVAFIHAHAEGKGFPHASFFLDTWEDVLRRAADLISMTDTS
P. stutzeri AN11      VLDEN-GTRVAQFLSLSTKAHDVAFIHHPEKGRLLHVSFHLETWEDVLRRAADLISMTDTS
S. yanoikuyae DSM 6900 LVDETSGVRMGIFLSCSNKAHDVAFVFGYPEDGRIHHTSFNLESWHDVGHAAIISRVDIS
S. paucimobilis BA2   LVDETSGARLGIFLSCSNKAHDVAFVFGYPEDGKIHHTSFNLESWHDVGHAAIISRVDIS
Sphingomonas sp. (Y9) LVDETSGARLGIFLSCSNKAHDVAFVFGYPEDGKIHHTSFNLESWHDVGHAAIISRVDIS
Sphingomonas sp. HV3  LVDETSGARLGIFLSCSNKAHDVAFVFGYPEDGKIHHTSFNLESWHDVGHAAIISRVDIS
                        * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

```

P. fluorescens (A10)      IDIGPTRHGLTHGKTIYFFDPSGNRCEVFCGGNYNYPDHKPVTWLAKDVGKAI FYHDRVL
P. putida (F)           IDIGPTRHGLTQGNTIYFFDPSGNRCEVFCGGNYNYPDHKPVTWLAKDVGKAI FYHDRVL
P. putida PpG7         IDIGPTRHGLTQGKTIYFFDPSGNRCEVFCGGNYNYPDHKPVTWLAKDVGKAI FYHDRVL
P. stutzeri AN11      IDIGPTRHGLTHGKTIYFFDPSGNRSEVFCGGNYNYPDHKPVTWLAKDVGKAI FYHDRVL
S. yanoikuyae DSM 6900 LDIGPTRHGITRGQTIYFFDPSGNRNETFSGGYIYYPDNPQRLMQAENAGKAI FYYEKAL
S. paucimobilis BA2   LDIGPTRHGITRGQTIYFFDPSGNRNETFSGGYIYYPDNPQRLMQAENAGKAI FYYEKAL
Sphingomonas sp. (Y9) LDIGPTRHGITRGQTIYFFDPSGNRNETFSGGYIYYPDNPQRLMQAENAGKAI FYYEKAL
Sphingomonas sp. HV3  LDIGPTRHGITRGQTIYFFDPSGNRNETFSGGYIYYPDNPQRLMQAENAGKAI FYYEKAL
                        ***** * * * * * ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

<i>P. fluorescens</i> (A10)	NERF-----
<i>P. putida</i> (F)	NDRFLT---
<i>P. putida</i> PpG7 .	NERFMVMT
<i>P. stutzeri</i> AN11	NERFMT---
<i>S. yanoikuyae</i> DSM 6900	NDRFLT---
<i>S. paucimobilis</i> BA2	NDRFLT---
<i>Sphingomonas</i> sp. (Y9)	NDRFMTVIN
<i>Sphingomonas</i> sp. HV3	NDRFMVNT
	* * *

Abbildung 16: Alignment von zwei C23O-Aminosäure-Sequenzen aus der Datenbank (*P. putida* PpG7, AC: M17159; *Sphingomonas* sp. HV3, AC: LI0655) und sechs Aminosäure-Sequenzen von ausgewählten *Pseudomonas* und *Sphingomonas* Vertretern. Die ermittelten DNA-Sequenzen dieser Stämme wurden mit dem Programm DNASIS in Aminosäure-Sequenzen umgeschrieben. Die fettgedruckten Aminosäuren sind in verschiedenen extradiol spaltende Dioxygenasen konserviert und sind entscheidend für die katalytische Funktion, die Strukturgebung des Enzyms und als Metalliganden.

* Aminosäure in allen Sequenzen konserviert.

Die PCR-Amplifikate der Isolate F9, T9 und L7 wurden nicht vollständig sequenziert, sondern von beiden Enden ansequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit entsprechenden Sequenzabschnitten von anderen *Pseudomonas*-Stämmen und -Isolaten und von *Sphingomonas* sp. HV3 verglichen.

Die etwa 250bp langen N- und C-terminalen C23O-Teilabschnitte der Isolate F9 und T9 (beide *P. fluorescens*) waren mit 1 bis 4% Sequenzunterschied zu den ermittelten Sequenzen der Isolate N3, N30 (beide *P. putida*), A10 und C4 (beide *P. fluorescens*) sehr ähnlich. Ebenfalls zeigten die C-terminalen Sequenzbereiche dieser beiden Isolate große Übereinstimmung mit entsprechenden Abschnitten des Isolates F (*P. putida*), *P. putida* OUS 82 und *P. putida* pPG7 (97 bis 99% Sequenzähnlichkeit). Die Übereinstimmung der entsprechenden N-terminalen Bereiche waren dagegen mit 82 bis 80% wesentlich geringer. Bei dem allgemeinen Vergleich der N- und C-terminalen Sequenzabschnitte zeigte sich, daß die C-terminalen Bereiche der C23O zum Teil erheblich besser konserviert waren als die N-terminalen (Tab. 13).

Zeigte der N-terminale Bereich des Isolats F beispielsweise Sequenzunterschiede um die 16% zu den zugehörigen Bereichen der Isolate A10, C4, N3 und N30, wurde für die entsprechenden C-terminalen Sequenzabschnitt nur eine maximale Differenz von 5,6% verzeichnet.

Tabelle 13: Distanzwerte [%] der sequenzierten N-terminalen Abschnitte (obere rechte Hälfte) und der C-terminalen Sequenzen (untere linke Hälfte) verschiedener PAK-abbauender *Pseudomonas* Stämme im Vergleich zu entsprechenden Abschnitten der C23O-Nukleinsäuresequenzen von vier *Pseudomonas* Stämmen und einem *Sphingomonas* Stamm aus der Datenbank (GenBank). Die Berechnung erfolgte mit dem Programm „Lasergene“. Der N-terminale Bereich entspricht den Nukleotidpositionen 15-276, der C-terminale den Positionen 671-922 von *P. putida* pPG7 (Plasmid NAH7; AC: M17159).

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI
I <i>P. putida</i> P35X		6,9	6,9	29,4	23,7	22,9	23,7	30,5	31,3	30,5	29,8	29,4	30,5	31,7	13,4	53,8
II <i>P. putida</i> HS1	15,5		0,0	27,9	28,6	27,9	28,2	30,2	31,3	30,2	29,8	29,0	30,9	32,1	16,0	53,7
III Isolat N8 (<i>P. putida</i>)	16,3	2,0		27,9	28,6	27,9	28,2	30,2	31,3	30,2	29,8	29,0	30,9	32,1	16,0	53,7
IV <i>P. putida</i> mt2	16,3	4,8	7,1		30,2	19,5	19,1	16,0	16,8	16,4	6,5	15,3	16,0	17,9	27,9	55,3
V Isolat F (<i>P. putida</i>)	16,7	20,2	19,4	21,4		0,4	1,9	17,9	19,1	17,9	17,2	19,5	17,9	19,8	21,0	57,6
VI <i>P. putida</i> pPG7	16,3	18,3	19,2	19,4	2,0		1,5	17,6	18,7	17,6	16,8	18,7	17,6	19,5	20,2	56,9
VII <i>P. putida</i> OUS82	15,9	20,2	20,2	21,4	3,2	2,8		18,3	19,5	18,3	16,8	19,5	18,3	20,2	20,6	56,9
VIII Isolat N3 (<i>P. putida</i>)	17,1	17,9	19,0	19,8	4,0	2,4	4,4		1,5	0,8	16,0	1,5	1,1	2,3	28,2	58,0
IX Isolat A10 (<i>P. fluorescens</i>)	17,9	18,7	20,2	20,2	5,6	3,6	4,8	2,4		1,5	16,8	2,3	1,9	3,1	29,4	59,2
X Isolat C4 (<i>P. fluorescens</i>)	16,3	19,4	19,4	21,8	4,8	4,4	4,0	3,8	3,6		16,4	1,5	1,1	2,3	28,2	58,0
XI <i>P. stutzeri</i> AN11	12,7	13,1	15,5	15,1	14,7	12,7	13,9	11,1	11,1	12,3		15,6	16,0	17,6	27,5	57,6
XII Isolat N30 (<i>P. putida</i>)	16,7	19,4	19,0	21,4	4,0	4,0	4,0	1,6	3,6	2,4	12,3		1,9	3,1	28,2	58,4
XIII Isolat F9 (<i>P. fluorescens</i>)	16,3	19,0	18,3	21,0	3,2	3,6	3,6	1,6	3,2	2,0	11,9	0,8		2,7	28,2	58,0
XIV Isolat T9 (<i>P. fluorescens</i>)	16,7	18,3	19,0	20,2	4,0	2,8	4,0	0,8	2,0	2,4	10,7	2,0	1,2		30,2	58,8
XV Isolat L7 (<i>P. medocina</i>)	10,7	15,1	15,5	17,5	18,3	17,9	17,9	17,9	17,9	17,1	13,9	17,5	17,1	17,5		50,8
XVI <i>Sphingomonas</i> sp. HV3	42,2	39,7	40,9	42,6	40,9	38,8	40,1	38,0	38,8	39,2	36,3	38,8	38,4	38,1	39,2	

Die beiden ansequenzierten Bereiche des Isolates L7 (*P. mendocina*) zeigten mit 86,4% für die N-terminale Sequenz bzw. 89,3% für den C-Terminus die größte Ähnlichkeit zu der Sequenz von *P. putida* P35X. Die Übereinstimmung zu den verschiedenen anderen *Pseudomonas* Isolaten (A10, C4, F9, T9, N3 und N30) war mit 82 bis 83% für den C-terminalen Bereich wiederum wesentlich größer als für die N-terminalen Sequenzabschnitte, hier betrug die Ähnlichkeit nur etwa 72%.

Auffällig bei dem Vergleich der N- und C-Termini verschiedener C23O war, daß die N-terminale Region von *Sphingomonas* sp. HV3 Sequenzunterschiede zu verschiedenen *Pseudomonas* Sequenzen zwischn 50 und 60% aufwies, während die C-terminalen Abschnitte nur zu etwa 40% differierten (Tab. 13 und 15).

Die ermittelten Sequenzen der verschiedenen *Sphingomonas* Isolate (E3, Y9 und H1b) waren mit nur 0,9 bis 1,6% Sequenzunterschied untereinander und zu der bekannten C23O-Sequenz des Stammes *Sphingomonas* sp. HV3 sehr ähnlich (Tab. 14, Abb. 17). Der Unterschied zwischen den Sequenzen dieser Vertreter und den ermittelten Sequenzen von *S. yanoikuyae* DSM 6900 und *S. paucimobilis* BA2 und der bekannten Sequenz von *S. yanoikuyae* B1 betrug dagegen um die 20%. Sehr gut konserviert war die Sequenz des Stammes *S. yanoikuyae* DSM 6900 im Vergleich zu der von *S. yanoikuyae* B1 (GenBank AC: U23375). Alle *Sphingomonas* Nukleinsäure-Sequenzen zeigten zu den C23O-codierenden Abschnitten der *Pseudomonas* Stämme Distanzwerte von maximal 44% (Anhang, Tab. 22). Auf Aminosäureebene war der Unterschied zwischen *Sphingomonas*- und *Pseudomonas*-Sequenzen mit 54 bis 61% höher als auf Nukleinsäureebene. Der Vergleich der Sphingomonaden untereinander zeigte, daß die Aminosäure-Sequenzen allgemein ähnlicher waren als die Nukleinsäure-Sequenzen.

Auch für die verschiedenen *Sphingomonas*-Vertreter wurden N- und C-terminale Bereiche der C23O getrennt voneinander verglichen. Bei den Sequenzen dieser Vertreter sind ebenfalls die C-terminalen Sequenzabschnitte allgemein besser konserviert als die N-terminalen.

Die Ergebnisse der Sequenzierung zeigten, daß alle sequenzierten PCR-Amplifikate verschiedener *Pseudomonas* Stämme mit mindestens 76% Nukleinsäure-Übereinstimmung große Ähnlichkeit zu DNA-Abschnitten, die bei verschiedenen *Pseudomonas* Vertretern für C23O codieren, aufweisen. Die ermittelten Sequenzen der *Sphingomonas* Stämme sind zu C23O-codierenden Sequenzen der Stämme *S. yanoikuyae* B1 und *Sphingomonas* sp. HV3 minimal zu 77% identisch. Die ermittelten und bekannten C23O-Sequenzen bilden somit zwei Sequenzgruppen. Der einen können alle C23O-Sequenzen, die von unterschiedlichen Pseudomonaden stammen, zugeordnet werden, der anderen die entsprechenden Sequenzabschnitte verschiedener *Sphingomonas* Stämme.

Zwischen den C23O-Sequenzen der Pseudomonaden und Sphingomonaden und weiteren bekannten C23O-Sequenzen, die von Vertretern anderer Gattungen stammen, besteht nur eine geringe Übereinstimmung (Anhang, Abb. 23, Tab. 22).

Tabelle 14: Distanzwerte [%] der sequenzierten PCR-Amplifikate (obere rechte Hälfte) und der abgeleiteten Aminosäuresequenzen (untere linke Hälfte) verschiedener PAK-abbauender *Sphingomonas* Stämme im Vergleich zu C23O-Nukleinsäure- bzw. Aminosäuresequenzen von zwei *Sphingomonas* Stämmen und einem *Pseudomonas* Stamm aus der Datenbank (GenBank). Die Berechnung erfolgte mit den Programmen „ARB“ (Nukleinsäuren) und „Lasergene“ (Aminosäuren).

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
I <i>P. putida</i> mt2		43,7	43,7	44,2	43,6	43,2	43,6	43,8
II <i>S. yanoikuyae</i> DSM 6900	55,9		0,7	22,4	22,6	22,4	19,4	22,4
III <i>S. yanoikuyae</i> B1	55,0	1,0		22,6	22,6	21,9	19,4	22,3
IV Isolat Y9 (<i>Sphingomonas</i> sp.)	55,4	11,8	11,4		1,6	1,4	22,0	0,9
V Isolat E3 (<i>Sphingomonas</i> sp.)	54,9	11,8	11,5	2,3		1,1	22,2	0,9
VI <i>Sphingomonas</i> sp. HV3	54,4	11,5	10,4	1,6	1,3		22,1	0,4
VII <i>S. paucimobilis</i> BA2	60,9	8,2	9,8	20,8	19,7	20,2		21,9
VIII Isolat H1b (<i>S. yanoikuyae</i>)	55,0	11,3	10,6	1,0	1,7	0,7	19,2	

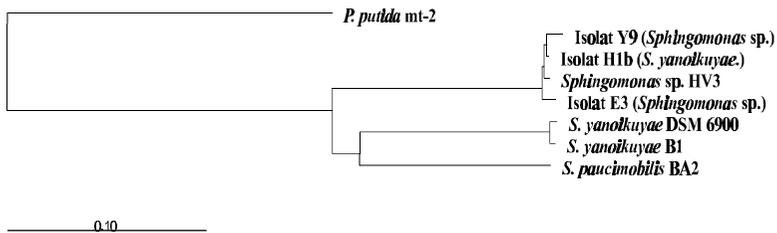


Abbildung 17: Dendrogramm der C23O-Nukleinsäure-Sequenzen der vollständig sequenzierten PCR-Amplifikate verschiedener *Sphingomonas* Stämme und den in GenBank zugänglichen C23O-Sequenzen von Vertretern der Sphingomonaden. Die Berechnung erfolgte, basierend auf einem in ClustalX erstellten *alignment*, nach dem Distanzmatrix-Verfahren („neighbor-joining-tool“) aus dem Sequenzdatenprogramm ARB (Dr. W. Ludwig; Technische Universität München). Als Außengruppe wurde eine C23O-Sequenz des Stammes *P. putida* mt-2 gewählt. Der Größenbalken von 0,10 steht für 10% Sequenzunterschied.

Tabelle 15: Distanzwerte [%] der N-terminalen sequenzierten Abschnitte (obere rechte Hälfte) und der C-terminalen C23O-Sequenzen (untere linke Hälfte) verschiedener PAK-abbauender *Sphingomonas* Stämme im Vergleich zu entsprechenden Abschnitten der C23O-Nukleinsäuresequenzen von zwei *Sphingomonas* Stämmen und einem *Pseudomonas* Stamm aus der Datenbank (GenBank). Die Berechnung erfolgte mit dem Programm „Lasergene“. Der N-terminale Bereich entspricht den Nukleotidpositionen 28-477, der C-terminale den Positionen 568-933 von *S. yanoikuyae* B1 (AC: U23375).

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
I <i>P. putida</i> Plasmid pWW0		62,7	62,4	61,1	60,2	60,2	60,7	60,7
II <i>S. yanoikuyae</i> DSM 6900	44,9		0,2	18,2	18,2	18,4	22,4	18,2
III <i>S. yanoikuyae</i> B1	44,6	1,1		18,0	18,0	18,2	22,4	18,0
IV Isolat Y9 (<i>Sphingomonas</i> sp.)	44,4	18,3	18,3		1,8	1,1	27,3	1,3
V Isolat E3 (<i>Sphingomonas</i> sp.)	44,4	18,9	18,9	1,1		0,7	27,3	0,9
VI <i>Sphingomonas</i> sp. HV3	44,8	18,0	18,0	0,3	0,8		27,6	0,7
VII <i>S. paucimobilis</i> BA2	42,1	19,4	19,1	18,6	18,9	18,3		27,3
VIII Isolat H1b (<i>Sphingomonas</i> sp.)	43,8	18,3	18,3	0,5	0,5	0,3	18,0	

3.9.2 Sequenzierung der klonierten PCR-Fragmente, die aus einer Naphthalin-Anreicherungskultur amplifiziert wurden

Wie unter 3.8.3 erläutert, wurden aus der DNA, die aus einer Anreicherungskultur mit Naphthalin isoliert wurde, mit dem Primerpaar 23OR/23OF PCR-Fragmente amplifiziert. Jeweils sechs der klonierten Fragmente wurden von der N- (MP 2, 3, 6, 10, 15, 18) oder C-terminalen Seite (MP 1, 2, 3, 5, 7, 18) ansequenziert. Der Vergleich dieser etwa je 300 bp langen Sequenzabschnitte zeigte, daß die erhaltenen Amplifikate sehr ähnlich, aber, mit Ausnahme der N-terminalen Sequenzen MP3 und MP10, nicht identisch waren. Es ergaben sich für die sechs N-terminalen Abschnitte Sequenzdifferenz von 0 bis 28,3%, für die C-terminalen Bereiche von 1,4 bis 4,5% (Tab. 16). Im Vergleich zu bekannten Sequenzen der Datenbank bestand bei vier der sechs N-terminalen Sequenzen und bei allen C-terminalen Sequenzen mit minimal 96% die größte Ähnlichkeit zu der auf dem NAH7 Plasmid codierten C23O (*nahH*) von *P. putida* pPG7. Zwei der N-terminalen Sequenzen (MP2 und MP18) zeigten dagegen einen Sequenzunterschied zu *nahH* von 22,9 und 19,6%. Für die C-terminalen Bereiche der gleichen Fragmente dagegen hatte sich mit 99,4 bzw. 96,0% eine wesentlich höhere Übereinstimmung zu *nahH* ergeben.

Tabelle 16: Distanzwerte [%] der N-terminalen Bereiche (obere rechte Hälfte) und der C-terminalen Bereiche der PCR-Amplifikate (untere linke Hälfte), die aus der extrahierten DNA einer Anreicherungskultur mit Naphthalin erhalten wurden, im Vergleich zu drei verschiedenen C230-Nukleinsäuresequenzen aus der Datenbank (GenBank) und zu den Sequenzen der PCR-Amplifikate der verschiedenen *Pseudomonas* Isolate. Als Ausgangsmaterial für die Anreicherung wurde eine Belebtschlammprobe aus der Gießener Kläranlage verwendet. Die amplifizierten Fragmente wurden in pGEM-T Vektoren kloniert. Die klonierten Fragmente MP 2, 3, 6, 10, 15 und 18 wurden von der N-terminalen Seite ansequenziert, die Fragmente MP 1, 2, 3, 5, 7 und 13 von der C-terminalen Seite. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm „Lasergene“.

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII
I MP 2		33,3	34,0	28,3	23,4	10,2				34,9	22,9	18,4	3,5	5,4	23,8	2,9	34,6	3,2
II MP3	0,9		0,3	0,0	12,1	22,0				23,9	0,3	26,7	16,7	18,9	0,6	16,7	32,8	16,9
III MP6				1,7	12,4	22,3				24,0	0,5	25,9	15,3	17,2	0,7	15,3	31,0	15,5
IV MP10					7,1	20,8				27,2	1,6	25,8	16,5	17,7	2,3	15,8	33,5	16,0
V MP15						25,3				23,3	0,9	23,9	20,6	21,8	1,5	19,8	33,0	19,8
VI MP18	3,5	3,5								32,8	19,6	19,0	0,0	3,6	20,2	0,3	33,4	0,6
VII MP1	2,9	3,8				1,4												
VIII MP5	2,9	1,6				4,5	4,5											
IX MP7	1,2	1,2				4,1	2,9	2,1										
X <i>P. putida</i> P35X	16,2	15,9				17,4	19,2	15,2	16,7		23,4	17,4	26,2	26,6	22,0	25,8	13,8	25,5
XI <i>P. putida</i> pPG7	0,6	0,9				4,0	3,6	2,1	0,9	21,4		18,4	10,9	11,6	1,0	10,4	25,5	11,3
XII <i>P. stutzeri</i> OM1	15,4	15,6				17,1	17,8	16,5	15,8	17,4	18,4		18,1	18,9	19,3	17,7	23,6	18,0
XIII Isolat A10 (<i>P. fluorescens</i>)	4,9	5,5				3,1	3,6	7,4	6,1	26,4	10,9	18,1		3,0	12,0	1,2	26,4	2,0
XIV Isolat C4 (<i>P. fluorescens</i>)	4,1	4,0				1,4	3,1	5,3	4,7	26,6	11,6	18,9	3,0		12,3	2,5	26,5	3,0
XV Isolat F (<i>P. putida</i>)	1,7	2,0				5,1	5,6	2,9	2,3	22,0	1,0	19,3	12,0	12,3		10,1	26,1	11,8
XVI Isolat N3 (<i>P. putida</i>)	2,9	3,2				1,4	0,3	4,1	3,2	25,8	10,4	17,7	1,2	2,5	11,1		25,2	1,1
XVII Isolat N8 (<i>P. putida</i>)	17,4	17,9				17,4	18,6	20,2	17,5	13,7	25,5	23,6	26,4	26,5	26,1	25,2		24,8
XVIII Isolat N30 (<i>P. putida</i>)	3,8	4,0				0,9	1,1	4,1	3,8	25,5	11,3	18,0	2,0	3,0	11,8	1,1	24,8	

Vergleicht man die amplifizierten Fragmente, die aus der Anreicherungskultur gewonnen wurden, mit den C23O-Sequenzen der verschiedenen *Pseudomonas* Umweltisolate, so erhielt man für die N-terminalen Sequenzen von MP 3, 6, 10 und 15 die größten Ähnlichkeiten zu der Sequenz des Isolates F (*P. putida*) aus der Gießener Kläranlage. Im Gegensatz dazu stimmten die entsprechenden Sequenzen von MP 2 und 18 wesentlich besser mit jenen der Isolate C4, N30, N3 und A10 überein. Die C-Termini der Amplifikate aus der Anreicherungskultur waren mit maximal 7,4% alle gut konserviert zu den C23O-Sequenzen der *Pseudomonas* Isolat A10, C4, N3, F und N30.

3.9.3 Sequenzierung der PCR-Amplifikate aus verschiedenen Naphthalin-abbauenden Rhodokokken-Stämmen

Die Sequenzierung der mittels des Primerpaares RHD23OF/RHD23OR erhaltenen PCR-Amplifikate zeigte, daß die Nukleinsäure-Sequenz dieser amplifizierten Bereiche bei den Naphthalin-abbauenden *Rhodococcus*-Stämme N0, N4, N6, N7 und N9 gut konserviert ist. Die Sequenzunterschiede liegen bei maximal 2,7% (Tab. 17). Innerhalb der Sequenzen lag ein 435-bp-*open reading frame* (ORF). Die abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen der Fragmente waren mit Distanzwerten von 1,4 bis 4,6% ebenso untereinander sehr ähnlich. Der Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit C23O-codierenden Abschnitten des Stammes *R. rhodochrous* NCIMB 13064 zeigte eine Ähnlichkeit um die 55%. Die Übereinstimmung lag dabei zwischen den Nukleotiden 238 und 709 der Referenzsequenz (AC: L77225; C23O-codierender Bereich von Nukleotid 118-1074).

Die Distanzwerte zu C23O-Sequenzen der Stämme *P. putida* mt-2 und *S. yanoikuyae* B1 waren mit über 72% sehr groß. Ebenso konnte nur eine minimale Ähnlichkeiten für die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Rhodokokken Isolate zu den drei Referenz-Aminosäure-Sequenzen festgestellt werden (Tab. 17).

Durch die Datenbankrecherche über blastn (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA) wurden für die amplifizierten Fragmente Sequenzähnlichkeiten von etwa 54% zu einem 166-bp-Abschnitt des Gens *dmpD*, welches für 2-Hydroxyumuconsäure Semialdehyd Hydrolase des Stammes *P. putida* CF600 codiert, festgestellt. *DmpD* liegt auf dem *Dmp*-Operon, welches für Enzyme des Phenolabbaus codiert. 2400 bis 1500 bp stromabwärts von *dmpD* liegt der codierende Abschnitt für die C23O (*dmpB*).

Tabelle 17: Distanzwerte [%] der sequenzierten PCR-Amplifikate der *Rhodococcus*-Isolate N0, N4, N6, N7 und N9 (obere rechte Hälfte) und der abgeleiteten Aminosäuresequenzen (untere linke Hälfte) im Vergleich zu C23O-Nukleinsäure- bzw. Aminosäuresequenzen von *R. rhodochrous* NCIMB 13064, *P. putida* mt-2 und *S. yanoikuyae* B1 (GenBank). Die Berechnung erfolgte mit den Programmen „ARB“ (Nukleinsäuren) und „Lasergene“ (Aminosäuren).

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
I Isolat N0 (<i>Rhodococcus</i> sp.)		1.1	0.5	1.8	1.8	46.1	73.2	74.9
II Isolat N4 (<i>Rhodococcus</i> sp.)	1,4		0.7	1.6	2.1	45.4	72.7	74.7
III Isolat N7 (<i>Rhodococcus</i> sp.)	1,8	2,1		1.4	1.4	45.7	72.9	74.6
IV Isolat N6 (<i>Rhodococcus</i> sp.)	3,4	3,2	4,1		2.7	45.7	73.3	74.5
V Isolat N9 (<i>Rhodococcus</i> sp.)	2,3	2,5	3,0	4,6		46.3	73.2	74.7
VI <i>R. rhodochrous</i> NCIMB 13064	70,0	70,0	73,4	74,9	70,5		72.2	72.9
VII <i>P. putida</i> MT2 Plasmid pWW0	76,2	77,3	77,5	75,3	77,6	76,1		43.7
VIII <i>S. yanoikuyae</i> B1	74.4	75.7	75.2	74.2	76.4	74.5	54.2	

3.10 Dot-Blot-Hybridisierung mit Nukleinsäuresonden, gerichtet gegen C23O-codierende Abschnitte

Zum Nachweis von C23O-codierenden Bereichen in der Gesamt-DNA der verschiedenen Bakterienstämme wurde die isolierte DNA über ein Dot-Blot-Verfahren auf eine Nylonmembran aufgebracht. Die auf der Membran fixierte DNA wurde mit Peroxidase-markierten Oligonukleotidsonden oder mit 700-bp-langen PCR-Fragmenten als Sonden, die gegen C23O-codierende Abschnitte gerichtet waren, hybridisiert.

Die Ergebnisse zeigten, daß die verschiedenen Oligonukleotidsonden auch unter hohen Stringenzbedingungen (bis 60% Formamid im Hybridisierungspuffer) mit DNA der Negativkontrollstämmen, die keine C23O-codierende Gene besitzen, hybridisierten. Die Hybridisierung mit der *Pseudomonas*-spezifischen Oligonukleotidsonde PS 1 (3.8.2) zeigte beispielsweise bei 55% (v/v) Formamid im Hybridisierungspuffer und bei 42 °C als Hybridisierungstemperatur auch für die Stämme *E. coli* SURE und *P. putida* KT2440 deutliche Signale. Das gleiche Ergebnis wurde für die *Sphingomonas*-spezifische Oligonukleotidsonde SPH (3.8.2) erhalten.

Wurden die 700-bp langen PCR-Fragmente (erhalten mit dem Primerpaar 23OR/23OF) als Sonden eingesetzt, so wurden bei Verwendung des Formamid-haltigen Hybridisierungspuffers auch bei hohen Stringenzen unspezifische Hybridisierungssignale detektiert.

Alternativ wurde der Hybridisierungspuffer des ECL Kits (Amersham, Buckinghamshire, UK) eingesetzt, und die Stringenz durch anschließende Waschschritte mit SSC/SDS-haltigen Waschlösungen und durch die Temperatur eingestellt. Abbildung 18 zeigt das Ergebnis der Hybridisierung bei Verwendung eines PCR-Amplifikats (Primer 23OF/23OR) des Isolats A10 als Sonde. Die verschiedenen Naphthalin- bzw. Phenanthren-abbauenden

Stämme der Gattung *Pseudomonas* hybridisierten deutlich mit der verwendeten Sonde. Schwache Hybridisierungssignale zeigten sich ebenso für verschiedene andere PAK-abbauende Isolate, die nicht zu den *Pseudomonaden* zugeordnet wurden. Keine Signale wurden für die DNA der Stämme *P. putida* KT2440 und *E. coli* SURE erhalten.

Somit war eine spezifische Detektion von C23O-codierenden Genabschnitten von verschiedenen PAK abbauenden *Pseudomonas* Stämmen unter diesen Hybridisierungsbedingungen möglich.

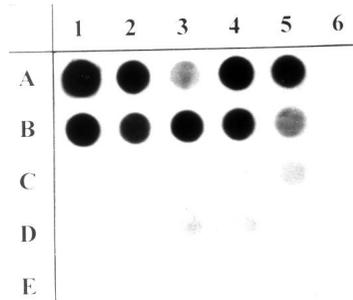


Abbildung 18: Dot-Blot-Hybridisierung der Gesamt-DNA verschiedener Referenzstämme und PAK-abbauender Umweltisolate mit einer Nukleinsäuresonde zum Nachweis von C23O-codierenden Genabschnitten. Pro Stamm wurden etwa 1,0 µg der isolierten Gesamt-DNA aufgetragen. Als Sonde wurde ein 700-bp langes PCR-Fragment, das mit den Primern 23OF/23OR aus DNA des Isolats A10 (*P. fluorescens*) amplifiziert wurde, eingesetzt. Die Temperatur der Hybridisierung betrug 42 °C, die Waschschriffe wurden unter stringenten Bedingungen (2.19.1.2) durchgeführt.

A1, *P. putida* OUS82; **A2**, *P. putida* NCIMB 9816; **A3**, *P. stutzeri* AN11; **A4**, Isolat A10 (*P. fluorescens*); **A5**, Isolat C4 (*P. fluorescens*); **B1**, Isolat F9 (*P. fluorescens*); **B2**, Isolat H9 (*P. fluorescens*); **B3**, Isolat T9 (*P. fluorescens*), **B4**, Isolat F (*P. putida*), **B5**, Isolat L7 (*P. mendocina*); **C1**, *S. yanoikuyae* DSM 6900; **C2**, *S. paucimobilis* BA2; **C3**, Isolat H1b (*Sphingomonas* sp.); **C4**, Isolat Y9 (*Sphingomonas* sp.); **C5**, Isolat E3 (*Sphingomonas* sp.); **D1**, Isolat G (*C. testosteroni*); **D2**, Isolat H (*C. testosteroni*); **D3**, Isolat M7 (*C. terrigena*); **D4**, Isolat E (*Acidovorax* sp.); **D5**, Isolat E10 (*Acidovorax* sp.); **D6**, Kontrolle, ohne DNA; **E1**, Isolat V10 (*Acidovorax* sp.); **E2**, Isolat 3 (*Paenibacillus* sp.); **E3**, Isolat B1 (*R. rhodochrous*); **E4**, Isolat G10 (*R. erythropolis*); **E5**, *P. putida* KT2440; **E6**, *E. coli* SURE.

3.11 Detektion von C23O-codierenden Abschnitten in restriktionsverdauter Gesamt-DNA

Alternativ zu dem Dot-Blot Verfahren zum Nachweis C23O-codierender Genabschnitte bei verschiedenen Bakterienstämme wurde restriktionsenzymatisch verdaute Gesamt-DNA auf einem Agarose-Gel aufgetrennt, geblottet und nachfolgend mit einer C23O-gerichteten

700-bp-Sonde hybridisiert. Die Sonde wurde mit den Primer 23OF/23OR über die PCR aus der DNA des *P. fluorescens* Isolates A10 amplifiziert. Für den enzymatischen Verdau der isolierten DNA verschiedener *Pseudomonas* Stämme, die C23O-codierende Sequenzen besitzen, und der Referenzstämme *P. putida* KT2440 und *E. coli* SURE wurden die Restriktionsenzyme *EcoR* I, *Pst* I und *Sal* I verwendet. Neben dem Nachweis von C23O-codierenden Genabschnitten sollte die Hybridisierung der verdauten DNA Aufschluß darüber geben, ob ein spezifisches Bandenmuster bei den unterschiedlichen *Pseudomonas* Species detektiert werden kann.

Die gelelektrophoretisch aufgetrennte restriktionsverdaut DNA des Stammes *P. stutzeri* AN11 zeigt auffällig diskrete Banden bei etwa 2,0 und 2,1 kb in *EcoR* I- bzw. *Sal* I-verdauter DNA und bei etwa 1,8 und 3,5 kb in *Pst* I-geschnittener DNA. Fraglich ist, ob diese Banden auf den Besitz von extrachromosomaler DNA zurückzuführen sind. Es wurde nicht getestet, ob dieser Stamm Plasmide besitzt.

Die Ergebnisse der Hybridisierung zeigten, daß verschiedene Restriktionsfragmente der getesteten *Pseudomonas* Stämme mit der verwendeten Sonde hybridisierten. Keine Hybridisierungssignale wurden für die verdauter DNA der Negativkontrollstämme *P. putida* KT2440 und *E. coli* SURE erhalten.

Eine spezifische Detektion von Restriktionsfragmenten, auf denen das komplette C23O-Gen bzw. Teilsequenzen des Gens lokalisiert sind, scheint somit möglich. Für die Isolate A10 und C4 wurden starke Hintergrundsignale erhalten. Auf dem Röntgenfilm waren jedoch deutlich hybridisierende Banden vor dem Hintergrund sichtbar.

Das durch die Hybridisierung erhaltene Bandenmuster war für die verschiedenen *Pseudomonas* Species, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. fluorescens* und *P. mendocina*, nicht identisch (Abb. 19, Tab. 18). Auch bei den untersuchten Vertretern der Species *P. putida* unterschied sich zum Teil sowohl das Bandenmuster, als auch die Anzahl hybridisierender Banden voneinander. Beispielsweise hybridisierten zwei Restriktionsfragmente *Sal* I-verdauter DNA (ca. 3,0 und 0,5 kb) des Stammes *P. putida* NCIMB 9816 mit der Sonde, während für *P. putida* OUS82 vier (ca. 2,6; 0,7; 0,4 und 0,3 kb) und für Isolat F drei (0,5; 0,4 und 0,3 kb) Banden detektiert wurden. Dagegen hybridisierte bei allen *P. putida* Stämme ein hochmolekulares *EcoR* I-Fragment mit der C23O-gerichteten Sonde.

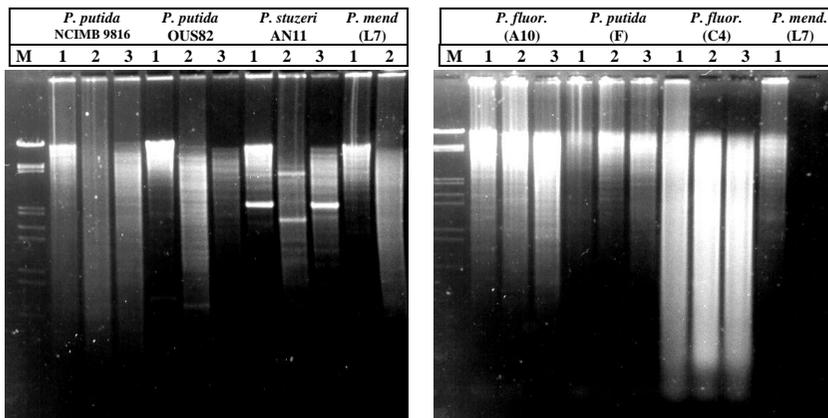
Im Gegensatz zu den drei untersuchten *P. putida* Vertretern hybridisierten *EcoR* I-, *Pst* I- und *Sal* I-Restriktionsfragmente der gleichen Länge bei den zwei *P. fluorescens* Isolaten A10 und C4. Ebenso wurden die gleichen Banden bei dem Isolat H9, einem weiteren *P. fluorescens* Stamm, detektiert (ohne Abb.).

Aller untersuchten *P. putida* und *P. fluorescens* Vertretern war gemein, daß mehr als ein *Sal* I-Restriktionsfragment mit der Sonde hybridisierte. Dieses Ergebnis ist konform damit, daß *Sal* I-Restriktionsschnittstellen auf dem sequenzierten PCR-Fragment lokalisiert wurden (Tab. 18).

Ebenso zeigten zwei *Sal* I-Fragmente der verdauten DNA des Stammes *P. stutzeri* AN11 schwache Hybridisierungssignale, während nur jeweils ein hybridisierendes Fragment in der *EcoR* I- bzw. *Pst* I-verdauten DNA detektiert wurde. Die ermittelte C23O-Sequenz dieses Stammes wies für *Sal* I eine Schnittstelle auf, während keine *EcoR* I- bzw. *Pst* I-Schnittstelle auf dem sequenzierten C23O-Gen liegt (Tab. 18).

Nur jeweils ein hybridisierendes Fragment wurde in der *EcoR* I-, *Pst* I- und *Sal* I-verdauten DNA des *P. mendocina* Isolates L7 detektiert.

(a)



(b)

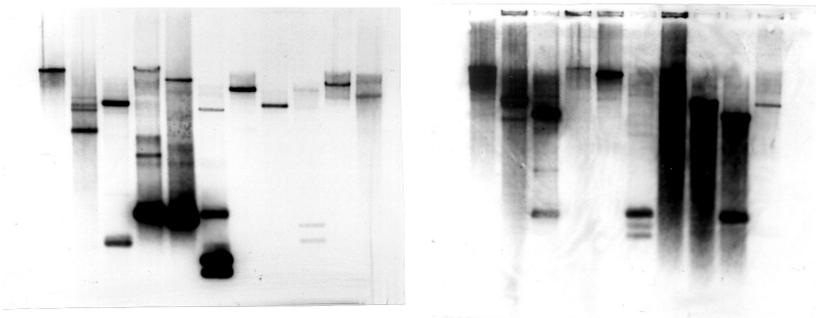


Abbildung 19: Restriktionsenzymatisch verdaut Gesamt-DNA verschiedener *Pseudomonas* Stämme, die auf einem 1,5%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt wurde (a), und die Ergebnisse der Hybridisierung des entsprechenden Southern-Blots mit der 700-bp C23O-gerichteten Sonde (b), amplifiziert mit den Primern 23OF/23OR aus DNA des *P. fluorescens* Isolates A10.

Verwendet wurden die Restriktionsenzyme *EcoR* I (1), *Pst* I (2) und *Sal* I (3).

Tabelle 18: Länge der *EcoR* I-, *Pst* I- und *Sal* I-Restriktionsfragmente (RF) von verschiedenen *Pseudomonas* Stämmen, die mit der C23O-gerichteten 700-bp-Sonde hybridisierten, und Position der Schnittstellen auf den C23O-codierenden Genen für diese Restriktionsenzyme.

Bakterienstamm	Länge der hybridisierenden RF ¹⁾			Position der Schnittstelle ²⁾		
	<i>EcoR</i> I	<i>Pst</i> I	<i>Sal</i> I	<i>EcoR</i> I	<i>Pst</i> I	<i>Sal</i> I
<i>P. putida</i> NCIMB 9816	23,0 kb	3,2; 3,0; 2,5; 2,0 kb	3,0; 0,5 kb	C23O-Sequenz nicht bestimmt.		
<i>P. putida</i> OUS82	23,0; 1,9; 1,7; 0,7 kb	ca. 12,0; 0,6 kb	2,8; 0,7; 0,4; 0,3 kb	-	-	231-236; 596-601
<i>P. putida</i> (F)	23,0 kb	20,0 kb	0,5; 0,4; 0,3 kb	-	-	231-236; 596-601
<i>P. fluorescens</i> (A10)	23 kb	3,3; 3,1; 2,1 kb	2,3; 1,7; 0,9; 0,55; 0,5 kb	-	267-272	596-601
<i>P. fluorescens</i> (H9)	23 kb	3,3; 3,1; 2,1 kb	2,3; 1,7; 0,55; 0,5 kb	C23O-Sequenz nicht bestimmt.		
<i>P. fluorescens</i> (C4)	23 kb	3,3; 3,1 kb	2,3; 0,5 kb	-	267-272	596-601
<i>P. mendocina</i> (L7)	8,0 kb	3,0 kb	3,3 kb	C23O-Sequenz nicht bestimmt.		
<i>P. stutzeri</i> AN11	6,0 kb	3,0 kb	0,6; 0,4 kb	-	-	596-601

¹⁾ Die Länge der hybridisierenden RF wurde anhand der DNA-Längenmarker abgeschätzt.

²⁾ Die Position der Schnittstellen für die drei Restriktionsenzyme beziehen sich auf die Sequenz von *P. putida* pPG7, Plasmid NAH7; GenBank *accession number*: M17159.

3.12 Koloniehybridisierung zur Detektion von Bakterien mit C23O-codierenden Sequenzen

Ziel der Koloniehybridisierung war der spezifische Nachweis von Bakterienkolonien, die C23O-codierende Gene besitzen. Entscheidend ist hierbei, daß ausreichend Zielsequenzen in den Einzelkolonien vorliegen. Als C23O-gerichtete Sonden wurden Oligonukleotide und über die PCR amplifizierte Fragmente verwendet. Desweiteren wurde, zur Kontrolle der Zellyse, die rRNA gerichtete *Bacteria*-spezifische Sonde EUB eingesetzt.

Bakterienkolonien, die auf eine Nylonmembran übertragen wurden und anschließend nach der Methode nach Buluwela *et al.* (1989) lysiert wurden (2.19.2.2), zeigten alle positive Hybridisierungssignale mit der Oligonukleotidsonde EUB, d.h. die Zellen der getesteten Stämme wurden effizient lysiert. Keine Hybridisierungssignale wurden erhalten, wenn die Zellen alkalisch lysiert wurden (2.19.2.1).

Die Hybridisierung der Bakterienkoloniefilter mit den Peroxidase-markierten *Pseudomonas*- bzw. *Sphingomonas*-spezifischen DNA-gerichteten Oligonukleotidsonden resultierte in schwachen Hybridisierungssignalen. Es zeigten allerdings auch Bakterienkolonien von Negativkontrollstämmen, die keine C23O-Zielsequenzen besitzen, Chemilumineszenzsignale. Die Erhöhung der Stringenz bei der Hybridisierung führte zu einer weiteren Abschwächung der Hybridisierungssignale. Die Ergebnisse mit den DNA-gerichteten Sonden waren dabei unabhängig davon, ob die Zellyse nach der Methode nach

Buluwela *et al.* (1989) oder mittels alkalischer Denaturierung durchgeführt wurde. Eine weitere getestete Methode zur Zellyse (Neef *et al.*; Manuskript in Vorbereitung) führte ebenso nicht zur spezifischen Detektion von Baktereinkolonien, die entsprechende Zielsequenzen besitzen.

Alternativ zu den Oligonukleotidsonden wurden C23O-gerichtete 700 bp lange Sonden eingesetzt. Auch mit diesen Sonden wurden unter stringenten Hybridisierungsbedingungen keine spezifischen Signale für Stämme erhalten, die nachweislich C23O-codierende Abschnitte besitzen.

3.13 Detektion von PAK-Abbaupotential in Belebtschlammproben

Die getesteten Primer zur Amplifizierung von C23O-codierenden Sequenzen wurden zur molekulargenetischen Detektion von PAK-Abbaupotential in Belebtschlammproben in Kombination mit einem Primerpaar zur Amplifizierung codierender Bereiche der initialen PAK-Dioxygenase eingesetzt. Diese Primer wurden am Institut für Biotechnologie der Technischen Universität Berlin entwickelt und getestet (Dipl.-Biologe R. Moser).

Mittels dieses Primerpaares wurde bei allen getesteten PAK-abbauenden *Pseudomonas*-Referenzstämmen und -Isolaten ein 900 bp-Fragment der großen Eisen-Schwefel-Untereinheit der initialen PAK-Dioxygenase amplifiziert. Entsprechende Genabschnitte konnten mit diesem Primerpaar bei Naphthalin- oder Phenanthren-abbauenden Stämmen anderer Gattungen nicht erfaßt werden (Meyer *et al.*; 1999).

3.13.1 DNA-Isolierung aus Belebtschlammproben

Zur Detektion von PAK-Abbaupotential über die PCR war die Etablierung einer universell anwendbaren Methode zur DNA-Isolierung aus unterschiedlichen Umweltproben notwendig. Techniken zur DNA-Isolierung aus Umweltproben sind in der Literatur beschrieben (Tsai & Olson, 1991; Herrick *et al.*, 1993; Wikström *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1996) und wurden als Grundlage zur Entwicklung eines geeigneten DNA-Isolierungsprotokolls herangezogen. Ein generelles Problem bei der DNA-Extraktion aus Umweltproben ist die Coextraktion von anderen hochmolekularen Substanzen, z.B. von Huminstoffen, für die ein hemmender Einfluß auf die PCR beschrieben wurden (Tsai & Olson, 1992; Tebbe & Vahjen, 1993).

Zur Extraktion von DNA aus Belebtschlammproben wurden auf der Basis der vorhandenen Methoden zwei unterschiedliche Verfahren entwickelt (die Arbeiten wurden in Kooperation mit dem Institut für Biotechnologie der Technischen Universität Berlin, Dipl.-Biologe R. Moser durchgeführt), mittels derer hochmolekulare DNA aus verschiedenen Belebtschlammproben gewonnen wurde. Der Zellaufschluß wurde bei der einen Methode durch Lysozym, Proteinase K-Verdau und SDS-Behandlung erreicht (2.15.3.1), bei der

anderen Methode fand ein zusätzlicher Aufschlußschritt durch kurzzeitige Inkubation im Ultraschallbad statt (2.15.3.2).

Die Abtrennung der freigesetzten Nukleinsäuren von anderen Zellbestandteilen wurde durch die Komplexierung der Proteine und Polysaccharide mit CTAB (2.15.3.1) oder durch phenolische Extraktion (2.15.3.2) erreicht.

Die mittels dieser Methoden extrahierte DNA aus der Kläranlagen Gießen war bräunlich gefärbt. Die photometrisch ermittelten DNA-Konzentrationen lagen bei etwa $1\text{-}1,5 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ (Methode 1) bzw. $3\text{-}5 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ (Methode 2). Zurückgerechnet auf das eingesetzte Belebtschlammvolumen (1 ml bei Methode 1; 4 ml bei Methode 2) entspricht dies etwa einer isolierten Gesamt-DNA-Menge von etwa 50-75 bzw. 40-60 μg pro ml Belebtschlamm. Die gebildeten Quotienten aus den gemessenen Extinktionswerten bei 260 und 280 nm lagen zwischen 1,4 und 1,6.

Der Test der DNA-Rohextrakte auf einem Agarose-Gel zeigte, daß die Isolierung nach der Methode 2 einen größeren Anteil an gescherter DNA zur Folge hatte als die Methode 1. Der Einsatz von $1 \mu\text{l}$ der extrahierten DNA in der PCR (Primerpaare 23OR/23OF oder PSCA23St/PSCA23End) führte nicht zur Amplifikation der erwarteten Fragmente. Dieses negative Ergebnis wurde auf die Hemmung der PCR durch coextrahierte Substanzen zurückgeführt. Die bräunlich gefärbten DNA-Rohextrakte mußten zur Entfernung dieser Hemmstoffe weiter aufgereinigt werden.

Eine von Herrick *et al.* (1993) und Kowalchuk *et al.* (1996) beschriebene Methode, bei der die DNA über ein mit 2% Polyvinylpyrrolidon angereichertes Agarosegel aufgereinigt wurde, führte zu einem fast vollständigen Verlust der DNA. Die Aufreinigung der Roh-DNA über das *Wizard DNA Clean-Up System* (Promega, Madison) oder mittels des DNA-Clean-Kits (AGS, Heidelberg) führte ebenfalls zu großen Verlusten der DNA-Mengen. Desweiteren wurde eine Methode zur DNA-Aufreinigung mittels Silica-Glasmilch (Boyle & Lew, 1995) getestet. Die so aufgereinigte DNA war weiß gefärbt und nach photometrischer Messung bei 260 und 280 nm frei von weiteren UV-Licht-absorbierenden Substanzen. Diese Aufreinigungsmethode führte allerdings zu mindestens 50% Verlust der ursprünglichen DNA-Menge.

3.13.2 Hemmung der PCR durch coextrahierte Substanzen

Es wurden die Hemmeffekte auf die PCR durch Substanzen, die mit den Nukleinsäuren aus den Belebtschlammproben der Kläranlage Gießen coextrahierten wurden, untersucht. Als *template* zur Amplifizierung der C23O-codierenden Abschnitte wurde das NAH-Plasmid aus *P. putida* NCIMB 9816 eingesetzt.

Die Ergebnisse zeigten, daß durch den Zusatz von $1 \mu\text{l}$ einer 10-fach verdünnten Roh-DNA-Lösung die Amplifizierung des 700-bp C23O-Fragments aus dem Plasmid des Stammes *P. putida* NCIMB 9816 verhindert wurde. Durch die Silica-Aufreinigung konnten

die Hemmeffekte auf die PCR verringert werden. Der C23O-Genabschnitte aus dem NAH-Plasmid wurde auch dann noch amplifiziert, wenn 1 μ l Silica-gereinigter DNA den PCR-Ansätzen zugesetzt wurde.. D.h. die Hemmeffekte waren etwa um den Faktor 10 geringer, verglichen mit der unaufgereinigten DNA

3.13.3 Bestimmung der Detektionsgrenze für die Amplifizierung von C23O-codierenden Abschnitten

Zur Ermittlung der Detektionsgrenze für die Amplifizierung von C23O-codierenden Abschnitten wurde DNA aus einer definierten Anzahl von Bakterienzellen (10^0 bis 10^8) des Stammes *P. putida* NCIMB 9816 isoliert. Um jeweils von der gleichen Zellzahl (10^8) bei der DNA-Isolierung auszugehen, wurde zu den Ansätzen entsprechende Volumina einer *E. coli* SURE Kultur zugefügt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch mikroskopische Auszählung nach DAPI-Färbung. Die Ergebnisse der PCR mit dem Primerpaar 23OR/23OF zeigten, daß zur erfolgreichen Amplifizierung C23O-codierender Genabschnitte mindestens 20 Zielsequenzen in einem PCR-Ansatz vorhanden sein mußten. Dies entspricht, bei Einsatz von 1 μ l DNA pro PCR-Ansatz und 50 μ l Gesamtvolumen des DNA-Extraktes, 10^3 Zielsequenzen in der extrahierten DNA (Abb. 20). Zur Amplifizierung codierender Bereiche der initialen Dioxygenase wurde die gleiche Detektionsgrenze ermittelt (R. Moser, TU-Berlin; mündliche Mitteilung).

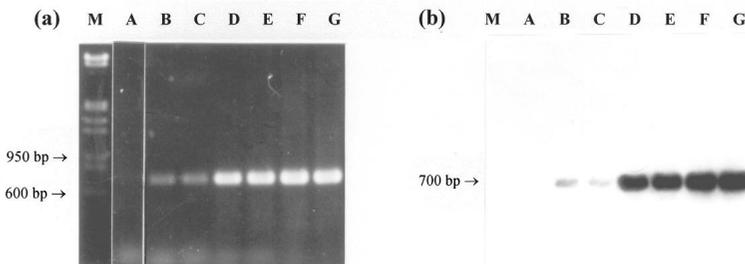


Abbildung 20: Elektrophoretisch auf einem 1,0%igen Agarose-Gel aufgetrennte PCR-Fragmente, die aus DNA, extrahiert aus einer definierten Anzahl von Bakterienzellen (10^3 bis 10^8) des Stammes *P. putida* NCIMB 9816, mit dem Primerpaar 23OR/23OF amplifiziert wurden (a) und Ergebnisse der Hybridisierung des entsprechenden Southern-Blots mit der Sonde PS1 (b).

A, Kontrolle, ohne DNA; B, 10^3 ; C, 10^4 ; D, 10^5 ; E, 10^6 ; F, 10^7 und G, 10^8 *P. putida* NCIMB 9816 Zellen, die für die DNA-Aufarbeitung eingesetzt wurden; M, Lambda *EcoR* I/*Hind* III Marker.

3.13.4 Detektion von PAK-Abbaupotential in Belebtschlammproben

Zur Detektion des PAK-Abbaupotentials in Belebtschlammproben durch den Nachweis codierender Abschnitte der initialen Dioxygenase und der C23O wurde die isolierte DNA als Rohextrakt in verdünnter und unverdünnter Form oder die Silica aufgereinigte DNA für die PCR eingesetzt.

Mittels des Primerpaares zur Detektion codierender Abschnitte der initialen Dioxygenase wurden aus dem 100-fach verdünnten DNA-Rohextrakt, isoliert aus Belebtschlamm der Kläranlage in Gießen, PCR-Fragmente der erwarteten Länge amplifiziert (R. Moser, TU-Berlin; mündliche Mitteilung). Keine PCR-Amplifikate dagegen wurden mit dem Primerpaar 23OR/23OF zur Amplifizierung der C23O-Sequenzen erhalten. Ebenso wurden für beide Primerpaare keine Fragmente amplifiziert, wenn die DNA unverdünnt oder 10-fach verdünnt eingesetzt wurde. D.h., die PCR-hemmenden Substanzen in den DNA-Rohextrakten machten eine Verdünnung der eingesetzten DNA notwendig, um zu positiven PCR Resultaten zu gelangen. Die Verdünnungsschritte reduzierten dabei offensichtlich die Zahl der C23O-Zielsequenzen auf unterhalb des Detektionslimits, während noch genug *templates* zur Amplifizierung der initialen Dioxygenase in den verdünnten DNA-Rohextrakten verblieben.

Wenn man von der ermittelten Detektionsgrenze von 10^3 Zielsequenzen pro DNA-Aufarbeitung ausgeht und den Verdünnungsfaktor einrechnet, bedeutet das, daß in der untersuchten Belebtschlammprobe mehr als 10^5 codierende Abschnitte (pro ml Belebtschlamm) der initialen Dioxygenase oder ähnlicher Genabschnitte vorhanden waren. Die Zahl der zu erfassenden C23O-Zielsequenzen dagegen mußte unterhalb dieser Detektionsgrenze gelegen haben.

Der Einsatz der Silica-gereinigten DNA aus der Kläranlage Gießen in der PCR führte weiterhin nicht zur Amplifikation codierender Abschnitte der C23O.

Zu Vergleichszwecken wurden Belebtschlammproben aus anderen Kläranlagen untersucht. Schwache PCR-Amplifikate mit dem Primerpaar 23OF/23OR wurden für Silica-gereinigte und 100-fach verdünnte Roh-DNA aus Belebtschlammproben der Kläranlage in Berlin-Ruhleben erhalten. Offensichtlich waren hier ausreichend Zielsequenzen der C23O in der Umweltprobe vorhanden.

Der Einsatz von 1 µl unverdünnter, nichtgereinigter DNA aus Belebtschlamm der kommunalen Kläranlagen in Steinbach, Butzbach und Marburg/Cappel (alle in Hessen) ergab ebenso sehr schwache PCR-Produkte, die auf dem Agarose-Gel kaum sichtbar waren, aber durch die Hybridisierung mit der Oligonukleotidsonde PS1 detektiert werden konnten (Abb. 21). Dies zeigt, daß in DNA-Aufarbeitungen dieser Belebtschlammproben wesentlich geringere Mengen an PCR-hemmenden Substanzen vorhanden waren als in den Extrakten aus den anderen beiden Belebtschlammproben. Keine C23O-Amplifikate wurde für die Proben aus den Kläranlagen aus Opershofen und Wetzlar erhalten.

Wurde die aus den fünf unterschiedlichen Belebtschlämmen aufgearbeitete DNA vor dem PCR-Einsatz Silica-gereinigt, zeigte sich, daß ebenso für die Kläranlagen Butzbach und Marburg/ Cappel und zusätzlich für die Kläranlage Opershofen ein Amplifikat erhalten wurde, nicht aber für den Belebtschlamm aus der Anlage Steinbach.

Die Untersuchungen wurden bisher nicht auf ihre Reproduzierbarkeit überprüft.

Die Ergebnisse zeigten, daß es generell möglich war mit den getesteten Primern codierende Abschnitte der initialen PAK-Dioxygense und der C23O in Umweltproben nachzuweisen. Die Nachweisgrenze war allerdings sehr hoch, weil die Coextraktion von PCR-hemmenden Substanzen bei der Nukleinsäureisolierung weitere Aufreinigungs- bzw. Verdünnungsschritte der DNA-Rohextrakte notwendig machte. Bei diesen Schritten wurde die Zahl der Zielsequenz zum Teil vermutlich auf unterhalb des Detektionslimits reduziert.

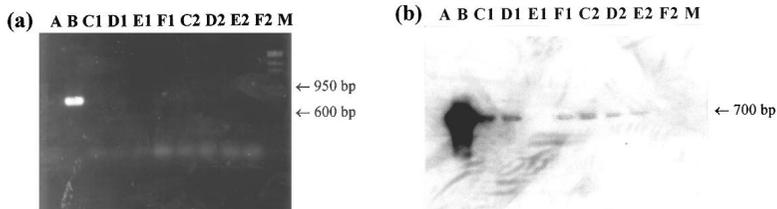


Abbildung 21: Elektrophoretisch auf einem 1,0%igen Agarose-Gel aufgetrennte PCR-Fragmente, die aus Silica-gereinigter DNA (1) bzw. aus den DNA-Rohextrakten (2), isoliert aus Belebtschlammproben verschiedenener Kläranlagen, mit dem Primerpaar 23OF/23OR amplifiziert wurden (a) und Ergebnisse der Hybridisierung des entsprechenden Southern-Blots mit der Sonde PS1 (b).

A, Negativkontrolle, ohne DNA; B, Positivkontrolle, NAH-Plasmid; C1, C2, Kläranlage Opershofen; D1, D2, Kläranlage Steinbach; E1, E2, Kläranlage Butzbach, F1, F2, Kläranlage Marburg/Cappel; M, Lambda *EcoR* I/*Hind* III Marker.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war der Nachweis von PAK-abbauenden Mikroorganismen mittels klassischer mikrobiologischer Arbeitstechniken und molekularbiologischer Methoden. Hauptuntersuchungsobjekt waren dabei Belebtschlamm-Biozönosen einer kommunalen Kläranlage. Zum Vergleich wurden auch andere aquatische und terrestrische Umweltstandorte beprobt, die unterschiedlich mit aromatischen und polyaromatischen Verbindungen belastet waren. Bezüglich der Gesamt- und Lebendzellzahlen, der KBE und der Zahl Naphthalin- und Phenanthren-verwertender Bakterien wurden durch die Untersuchungen ebenfalls große Unterschiede nachgewiesen (4.1).

Durch selektive Anreicherung wurden aus unterschiedlichen Umweltproben Bakterien isoliert, die in der Lage waren, mit den zwei- bzw. dreikernigen Polyaromaten Naphthalin oder Phenanthren als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen. Die Identifizierung der isolierten Bakterien und die Charakterisierung ihres Abbauverhaltens gegenüber den Polyaromaten Naphthalin und Phenanthren sowie weiterer aromatischer Verbindungen sollten Aufschluß geben über die Diversität PAK-abbauender Mikroorganismen der unterschiedlichen Standorte (4.2).

Alternativ zum Nachweis von PAK-verwertenden Bakterien mittels kultureller Techniken wurde getestet, ob das PAK-Abbaupotential von Mikroorganismen durch molekularbiologische Methoden detektiert werden kann. Ansatzpunkt dabei war der Nachweis von Gensequenzen, die am Abbau beteiligte Enzyme codieren. Als Zielsequenzen für dieses Detektionssystem wurden die initiale Dioxygenase, die die einleitenden Schritte des PAK-Abbaus katalysiert, und die Catechol 2,3-Dioxygenase (C23O) gewählt. Durch enzymatische Aktivitätstests wurde zunächst überprüft, ob die C23O bei dem Abbau polyaromatischer Verbindungen eine Rolle spielt, und ob bei den verschiedenen Bakterienstämmen Unterschiede bezüglich dieser Enzymaktivitäten vorliegen (4.3).

Desweiteren wurden anhand bekannter C23O-Sequenzen PCR-Primer und Oligonukleotidsonden für die Detektion der C23O-Sequenzabschnitte entwickelt und anhand der isolierten Stämme getestet, ob diese universell einsetzbar sind (4.4). Andere Methoden zum Nachweis C23O-codierender Abschnitte, wie die Koloniehybridisierung, das Dot-Blot-Verfahren und die Hybridisierung restriktionsverdauter Gesamt-DNA, wurden auf ihre Funktionalität überprüft (4.5).

Die Sequenzierung der erhaltenen PCR-Amplifikate von verschiedenen *Pseudomonas* und *Sphingomonas* Stämmen sollte Aufschluß geben über die Diversität dieser codierenden Sequenzen, insbesondere im Hinblick auf die phylogenetische Verwandtschaft der Stämme und deren Herkunft (4.6).

Die getesteten C23O-Primer und -Sonden sollten letztlich eingesetzt werden, um, in Kombination mit den Primern für die initiale Dioxxygenase, PAK-Abbaupotential in Umweltproben nachzuweisen. Diese kultivierungsunabhängige Nachweismethode machte die Isolierung von Nukleinsäuren aus Umweltproben notwendig. Das Problem bei der Nukleinsäureisolierung ist, daß dabei Substanzen coextrahiert werden, die die PCR stark hemmen. Weitere Aufreinigungsschritte können aber zu starken Verlusten der ursprünglichen DNA-Mengen führen. Fraglich war also, ob die Zahl der entsprechenden Zielsequenzen ausreichend war, um sie in isolierter und gereinigter DNA über die PCR detektieren zu können (4.7).

4.1 Quantitative Bestimmungen von Populationen in Umweltproben

Zur Isolierung PAK-abbauender Bakterien wurden unterschiedliche Umweltstandorte beprobt, für die eine unterschiedliche Belastung mit PAK angenommen bzw. bestimmt wurde. Die Zahlen der KBE der Proben unterschieden sich zum Teil stark voneinander. Die um ein bis zwei Zehnerpotenzen höheren KBE-Werte der Proben der beiden Kläranlagen im Vergleich zu den Bodenproben wurden auf das höhere Angebot an Nährstoffen in den Belebtschlämmen zurückgeführt. Es konnte nicht geklärt werden, warum keine Mikroorganismen aus der aufgearbeiteten Probe des Bodenaushubs des alten Marburger Gaswerkstandortes auf R2A-Agar kultiviert werden konnten. Das Ergebnis kann nicht auf die hohe Belastung mit PAK zurückgeführt werden, denn die PAK-Belastung der zweiten Probe dieses Standortes, für die die KBE mit 10^5 bestimmt wurden, war um den Faktor 50 höher. Außerdem konnte bei der *in situ* Hybridisierung mit der *Bacteria*-spezifischen Sonde EUB338 nachgewiesen werden, daß die Zahl aktiver Zellen vergleichbar war mit der anderer Bodenproben. Generell hatte sich gezeigt, daß die bestimmte Zellzahl durch *in situ* Hybridisierung um den Faktor zehn höher ist als die ermittelten KBE-Werte. Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme, daß weniger als 10% der Bakterien aus Umweltproben unter standardisierten Anzuchtbedingungen kultivierbar sind (Ogram & Saylor, 1988).

Die Verwendung des Redoxfarbstoffs CTC erwies sich als ungeeignet für die Bestimmung der Lebendzellzahl in Belebtschlammproben. Bei der Färbung wurden auch außerhalb der Zellen Formazankristalle gebildet. Dieses war vermutlich auf extrazelluläre Redoxsysteme und durch physiologisch intakte Bestandteile lysierter Bakterien zurückzuführen (Griebe *et al.*, 1995).

Bei der Bestimmung der Naphthalin-abbauenden Bakterien in den Bodenproben mittels MPN-Verfahren fiel auf, daß in einer der Bodenproben des alten Gaswerks Marburg die Zahl Naphthalin-abbauender Bakterien mit 7000 durchschnittlich um den Faktor 200 höher war als in den anderen untersuchten Proben. Dies korrelierte mit der Naphthalinbelastung in den Proben. Während für diese Bodenprobe extrem hohe Naphthalinkonzentrationen ($1,4 \text{ g kg}^{-1}$; Anhang, Tab. 20) gemessen wurden, war die Naphthalinbelastung der anderen

Bodenproben vergleichsweise niedrig ($0,12 \text{ g kg}^{-1}$). Die durch DAPI-Färbung, *in situ* Hybridisierung oder KBE-Bestimmung ermittelten Zellzahlen lagen, unabhängig von der PAK-Belastung, dagegen in ähnlichen Bereichen. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis wurde von Geiselbrecht *et al.* (1996) mittels MPN-Verfahren nachgewiesen, daß die Zahl PAK-abbauender Mikroorganismen in kontaminierten Sedimenten höher ist als in nicht kontaminierten. Die Zahl der Gesamtmikroorganismen dagegen ist in den unterschiedlich belasteten Proben ähnlich. PAK-abbauende Mikroorganismen sind offensichtlich in hoch belasteten Proben angereichert. Das Ergebnis zeigte ebenso, daß die Gesamtzahl der Mikroorganismen durch die Belastung mit Polyaromaten nicht vermindert wurde.

Im Gegensatz dazu ergaben sich für die stark Phenanthren-belastete Bodenprobe des Marburger Gaswerks keine höheren MPN-Werte für Phenanthren-abbauende Mikroorganismen als für die unbelasteten Belebtschlammproben der Gießener Kläranlage. Möglich ist, daß Phenanthren aufgrund seiner relativ geringen Wasserlöslichkeit weniger bioverfügbar war als Naphthalin und damit nicht zu einer spezifischen Anreicherung von Phenanthren-abbauenden Bakterien führte.

4.2 Naphthalin- und Phenanthren-abbauende Bakterien aus Umweltproben

4.2.1 Isolierung und Identifizierung Naphthalin- und Phenanthren-abbauender Bakterien

Zur Isolierung PAK-abbauender Bakterien aus Umweltproben wurde ein Mineralsalzmedium nach Kästner *et al.* (1994b) verwendet. Vorversuche hatten ergeben, daß verschiedene PAK-abbauende Referenzstämmen in Medium dieser Zusammensetzung mit 0,05% (w/v) Naphthalin oder Phenanthren gut kultiviert werden konnten.

Durch selektive Anreicherung in diesem Medium wurden von Kästner *et al.* (1994b) aus mit Teeröl kontaminierten Bodenproben verschiedene PAK-abbauende nocardioforme Actinomyceten der Gattungen *Mycobacterium*, *Rhodococcus* und *Gordonia*, sowie ein Vertreter der Sphingomonaden (*S. paucimobilis*) isoliert.

Vier der in dieser Arbeit isolierten PAK-abbauenden Bakterien wurden ebenso dieser Bakteriengruppe, der Gattung *Rhodococcus*, zugeordnet. Die *Rhodococcus*-Stämme wurden aus einer Teeröl-belasteten Bodenproben eines ehemaligen Gaswerkstandorts und aus aquatischen Umweltproben, die vermutlich nur gering mit polyaromatischen und anderen aromatischen Verbindungen belastet waren, isoliert. Die Identifizierung der weiteren Naphthalin- und Phenanthren-abbauenden Isolate als Vertreter der alpha-, beta- und gamma-Subklasse der Proteobakterien und der grampositiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt der DNA bestätigte jedoch, daß die Fähigkeit zur metabolischen Transformation von PAK phylogenetisch weit verbreitet ist (Kästner *et al.*, 1994a).

Mit 10 der 23 isolierten Bakterienstämme wurde die Mehrheit der Isolate der Gattung *Pseudomonas* zugeordnet. Dies zeigt, daß durch die gewählte Isolierungsstrategie bevorzugt Pseudomonaden angereichert wurden. Aufgrund der selektiven Kultivierung bestimmter Bakteriengattungen ist es generell nicht möglich, anhand der Isolierungsergebnisse der Isolierung eine Aussage über die in der natürlichen Umwelt am Abbau beteiligten Bakterien zu machen.

Der Vergleich der Ergebnisse der Arbeit von Kästner *et al.* (1994b) und dieser Arbeit läßt jedoch den Rückschluß zu, daß die Zusammensetzung des verwendeten Mediums vermutlich wenig Einfluß auf die Ergebnisse der Isolierung hatte, weil von Kästner *et al.* (1994b) in gleichem Medium bevorzugt nocadioforme Actinomyceten angereichert wurden. Entscheidend war möglicherweise, daß die PAK-Abbauer in dieser Arbeit in Flüssigmedium selektiert wurden, während Kästner *et al.* (1994b) das Medium als Festmedium verwendete, das nach der Technik von Kiyohara *et al.* (1982) mit den verwendeten Polyaromaten überschichtet wurde. Auch von Mueller *et al.* (1997) wurden in Flüssigmedium aus verschiedenen kontaminierten Bodenproben hauptsächlich gramnegative Phenanthren- oder Fluoranthen-abbauende Stämme selektiv angereichert. Als Ursache für die differierenden Ergebnisse zu Kästner *et al.* (1994b) wurde von ihnen angenommen, daß die schneller wachsenden gramnegativen Bakterien die langsamer wachsenden grampositiven Bakterien in der Flüssigkultur überwuchsen.

Die in dieser Arbeit getestete Methode nach Kiyohara *et al.* (1982) zeigte sich als wenig praktikabel. Bei dieser Methode wurden die PAK zu 4 mg pro ml in Aceton gelöst, 1 ml dieser Lösung auf die Oberfläche einer Mineralsalz-Agarplatte aufgebracht und nach Abdampfen des Acetons ein Aliquot der Probenextrakte aufgebracht. Es wurde die Bildung klarer Höfe in der kristallinen PAK-Schicht in der Umgebung Polyaromaten-abbauender Bakterien beschrieben. Das Aufbringen der Probenextrakte hatte hier allerdings die Zerstörung der homogenen kristallinen PAK-Schicht zur Folge und es konnte keine Hofbildung um die Bakterienkolonien nachgewiesen werden.

Mit dem gleichen Argument kritisierten Bogardt & Hemmingsen (1992) diese Vorgehensweise und stellten eine weitere Methode zur Isolierung PAK-abbauender Bakterien vor. Wie beschrieben (3.2), wurde dabei der Polyaromat in Ethanol gelöst, mit flüssiger Agarose und einem Aliquot der Umweltprobe vermischt und ein Mineralsalz-Festmedium mit dem Gemisch überschichtet. Bakterien mit PAK-Abbaufähigkeiten wurden nach fünf- bis vierzehntägigem Wachstum durch die Bildung klarer Höfe in der oberen Agaroseschicht nachgewiesen. Die Anwendung dieser Methode führte zwar zur Kultivierung von Mikroorganismen, es wurden jedoch keine klaren Höfe um die gewachsenen Kolonien detektiert und die isolierten Stämme zeigten in Reinkultur keine PAK-Abbaufähigkeit. Das Wachstum der Bakterienstämme war vermutlich auf die weitere

Kohlenstoff- und Energiequelle, in Form des zur Lösung der Polyaromaten verwendeten Ethanols, zurückzuführen.

Ein generelles Problem bei der selektiven Anreicherung mit PAK ist die geringe Wasserlöslichkeit der Polyaromaten, die mit steigender Zahl zyklischer Ringe abnimmt (Cerniglia, 1992). Es ist bekannt, daß die Abbaugeschwindigkeit dieser Verbindungen abhängig ist von der Transferrate, mit der feste PAK-Partikel in die wäßrige Phase übergehen (Volkering *et al.*, 1992). Die Konzentration an gelösten PAK in Flüssigmedium kann durch die Zugabe von nichtionischen Detergenzien und Natriumdodecylsulfat (SDS) erhöht werden (Thiem, 1994; Thiem & Fritzsche, 1995; Thibault *et al.*, 1996). Einige Bakterien produzieren selbst Detergenz-ähnliche Stoffe (*biosurfactants*), die zur verbesserten Mobilisierung von verschiedenen PAK führen (Providenti *et al.*, 1995)

Thiem (1994) zeigte, daß durch die Zugabe von SDS die Phenanthren-Umsatzrate einer Bakterien-Mischkultur vermindert wurde, weil SDS als Kohlenstoffquelle mikrobiell verwertet werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde der PAK-Abbau und die Produktion der Biomasse in Bakterienkulturen durch die Vorlösung der Polyaromaten mittels des Detergenz Sapogenat T-300 gesteigert. Die erhöhte Biomassenproduktion wurde dabei nicht auf die Verwertung von Sapogenat T-300 als alternative Kohlenstoffquelle zurückgeführt.

In dieser Arbeit zeigte sich jedoch, daß auch in Kontrollkulturen, die mit Umweltmaterial beimpft wurden und statt PAK nur Sapogenat T-300 enthielten, nach kurzer Inkubationszeit eine wachstumsbedingte Trübung zu verzeichnen war. Offensichtlich konnte auch dieses Detergenz von einigen Bakterienstämmen als alternative Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden. Aus diesem Grund wurde die Methode zur selektiven Anreicherung PAK-abbauender Bakterien nicht als geeignet angesehen.

4.2.2 Vorkommen PAK-abbauender Bakterien in unterschiedlichen Umweltproben

Die Ergebnisse der Isolierung aus unterschiedlichen Umweltproben zeigten, daß aus der kommunalen Kläranlage in Gießen vier Naphthalin- oder Phenanthren-abbauende Bakterienstämme, die drei unterschiedlichen Gattungen zugeordnet wurden, isoliert werden konnten. Aus den anderen untersuchten Umweltproben dagegen wurden maximal zwei PAK-abbauende Stämme isoliert, die jeweils der gleichen Gattung angehörten. Die Kontaminierung mit PAK, wie sie für die Bodenprobe des alten Gaswerkstandorts in Marburg bekannt war, hatte keinen positiven Einfluß auf die Anzahl isolierter PAK-abbauender Bakterienstämme, obwohl im MPN-Verfahren für diese Umweltprobe mit mehr als 7000 Naphthalin-Abbauern pro g Bodenprobe eine wesentlich höhere Zahl Naphthalin-verwertender Bakterien festgestellt wurde als in den geringer PAK-kontaminierten Bodenproben des alten Gaswerkstandorts Gießen oder den Belebtschlammproben der Gießener Kläranlage.

Unabhängig vom Grad der Kontaminierung sind offenbar in jeder Umweltprobe Bakterien, die das Potential zum Abbau von Polyaromaten besitzen, vorhanden. In der Literatur wird vielfach die Isolierung PAK-metabolisierender Bakterien beschrieben. Als Ausgangssubstanz zur selektiven Anreicherung dienten aber in den meisten Fällen stark PAK-kontaminierte Bodenproben. Aus kontaminierten Bodenproben wurde beispielsweise ein Phenanthren-abbauender *Arthrobacter polychromogenes* (Keuth & Rehm, 1991), ein PAK-verwertender *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas vesicularis* und *Alcaligenes denitrificans* (Weißenfels *et al.*, 1990) oder Phenanthren-metabolisierende Bakterien der Gattungen *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* und *Sphingomonas* (Aitken *et al.*, 1998) isoliert. Umweltproben, die nicht mit Polyaromaten verunreinigt waren, wurden nur selten als Ausgangsmaterial für die Anreicherung PAK-abbauender Bakterienstämme verwendet. Von Kästner *et al.* (1994b) wurde beobachtet, daß Bakterien mit Naphthalin-Abbaufähigkeit auch in nichtkontaminierten Kontrollböden vorhanden waren. Im Gegensatz dazu wurden Bakterien, die andere Polyaromaten als Naphthalin abbauen konnten, nur aus Bodenproben isoliert, die signifikant mit PAK belastet waren. In der Arbeit von Kästner *et al.* (1994b) wurde davon ausgegangen, daß eine minimale PAK-Konzentration in Böden vorhanden sein muß, um das Wachstum der PAK-abbauenden Mikroflora zu selektieren und zu stimulieren. In dieser Arbeit zeigte sich nun, daß auch aus nichtkontaminierten Belebtschlammproben Bakterienstämme mit der Befähigung zum Abbau des dreikernigen Aromaten Phenanthren isoliert werden konnten. Obwohl nicht vollständig auszuschließen ist, daß eine minimale Verunreinigung durch Polyaromaten vorlag, wird das Ergebnis darauf zurückgeführt, daß Bakterien mit PAK-Abbaupotential ubiquitär verbreitet sind. Durch die Kultivierung mit PAK als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle wurden Bakterien, die das Potential zum Abbau von Polyaromaten besitzen, selektiv angereichert. Ebenso wurde auch von Geiselbrecht *et al.* (1998) aus nichtkontaminierten Sedimenten 23 Naphthalin-, Phenanthren-, Anthracen- oder andere Polyaromaten-abbauende Stämme isoliert. Die Isolate wurden alle der Gattung *Cycloclasticus* zugeordnet, d.h. die PAK-Abbaufähigkeit war an diesem Standort auf eine Gattung beschränkt. Dieses steht im Gegensatz zu der allgemeinen Annahme, daß die Fähigkeit zum Abbau von PAK phylogenetisch divers ist (Cerniglia, 1992; Kästner *et al.*, 1994a). Vermutlich bedingten die gewählten Isolierungsstrategien die selektive Anreicherung von ausschließlich *Cycloclasticus* Vertretern. Auch Mueller *et al.* (1997) stellten fest, daß die Befähigung zum Abbau von Phenanthren und Fluoranthren bei einigen phylogenetisch nicht nah verwandten Gattungen vorhanden ist. Sie führten dieses darauf zurück, daß die am PAK-Abbau beteiligten, meist plasmidcodierten Gene (Zylstra & Gibson, 1991) leicht über horizontalen Gentransfer, auch an nicht verwandte Bakterien, weiter gegeben werden können.

Unter dieser Annahme müßte man davon ausgehen, daß die Gene, die am PAK-Abbau beteiligte Enzyme codieren, gattungsübergreifend gut konserviert sind. Wie unter 4.4 und 4.5 näher erläutert, war dieses zumindest für die C23O-codierenden Abschnitte nicht der Fall.

4.2.3 Substratspektren der isolierten PAK-abbauenden Bakterien

Bei gleicher Ausstattung mit katabolischen Genen und somit gleicher Enzymsausstattung der PAK-abbauenden Stämme wäre anzunehmen, daß auch die Substratspektren gleich sind.

In dieser Arbeit zeigte sich, daß das Substratspektrum bei Stämmen einer Gattung ähnlicher ist als zwischen Vertreter zwei verschiedener Gattungen. Während die Isolate, die der Gattung *Acidovorax* sp. zugeordnet wurden, nur Phenanthren metabolisierten, bauten die *Comamonas* und *Pseudomonas* Stämme in dem verwendeten Flüssigmedium kein Phenanthren, aber dafür den zweikernigen Aromaten Naphthalin ab. Eine Ausnahme war ein *P. fluorescens* Isolat, das beide Polyaromaten verstoffwechseln konnte. Beide isolierten *Sphingomonas* Stämme metabolisierten ebenfalls sowohl Naphthalin als auch Phenanthren. Der von Kästner *et al.* (1994b) isolierte Stamm *S. paucimobilis* BA2 baute ebenso diese beiden Verbindungen ab. Aus dieser Beobachtung kann abgeleitet werden, daß die Enzymsausstattung innerhalb einer Gattung ähnlicher ist als zwischen Vertretern zwei verschiedener Gattungen.

Einen entscheidenden Einfluß auf das PAK-Abbauspektrum der einzelnen Stämme scheinen auch die für die Kultivierung gewählten Parameter zu haben. So wurde von Kästner *et al.* (1994b) gezeigt, daß *S. paucimobilis* BA2 auf einem Festmedium auch Anthracen abbauen kann. In dem in dieser Arbeit verwendeten Flüssigmedium konnte für diesen Stamm jedoch keine Anthracen-Abbauaktivität nachgewiesen werden.

Ebenso wurde festgestellt, daß die isolierten *Pseudomonas* Stämme (Isolate F, L7, A10, F9, H9, T9 und C4), die in Flüssigmedium kein Phenanthren metabolisierten, auf Festmedium in der Lage waren, den dreikernigen Aromaten abzubauen (Meyer *et al.*, 1999). In der kristallinen Phenanthrenschicht, die nach der Überschichtungstechnik nach Kiyohara *et al.* (1982) auf Salicylsäure-angereichertem Mineralsalz-Festmedium aufgebracht wurde, wurden um die punktförmig aufgetragenen Bakterienstämme nach einiger Zeit klare Höfe detektiert. Die in Flüssigmedium nur Naphthalin-abbauende *Comamonas* (Isolate G und H) und *Rhodococcus* Stämme (Isolate B1 und G10) zeigten ebenso auf diesem Festmedium die Fähigkeit zum Abbau von Phenanthren.

Von Kim *et al.* (1997) wurde berichtet, daß *Sphingomonas yanoikuyae* EK 504 nicht mit Anthracen wächst. Auf Mineralsalz-Succinat-Agar bildeten sich um EK 504-Kolonien allerdings klare Höfe in der kristallinen Anthracenschicht. Eine mögliche Erklärung für die kultivierungsbedingte Abweichung der Substratspektren verschiedener Bakterienstämme ist,

daß die im Festmedium zusätzlich vorhandenen Kohlenstoffquellen den Phenanthren- bzw. Anthracen-Abbau stimulieren oder induzieren können.

Von Williams & Sayers (1994) wurde der Regulationsmechanismus für den Naphthalinabbau des Stammes *P. putida* PpG7 zusammengefaßt. Die am Abbau beteiligten Gene sind bei diesem Stamm auf dem katabolischen Plasmid NAH7 in zwei Operons angeordnet. Das erste Operon codiert für Enzyme, die Naphthalin zu Salicylsäure umsetzen, das zweite Operon ist für die Umwandlung von Salicylsäure zu zentralen Stoffwechselmetaboliten über den *meta* Abbauweg verantwortlich (Einleitung, Abb. 3). Als positiver Regulator für die Promotoren beider Operons dient das Protein NahR, dessen Bindung an die Promotoren der beiden Operons einzig durch Salicylsäure induziert wird. Möglich ist, daß der Phenanthrenabbauweg der verschiedenen Isolate durch die Salicylsäure im Festmedium aktiviert wurde. Phenanthren als alleinige Kohlenstoffquelle in Flüssigmedium konnte diesen Abbauweg nicht induzieren.

Generell bleibt zu klären, ob der Abbau der verschiedenen Polyaromaten durch die gleichen oder verschiedene Enzyme katalysiert wird. Kiyohara & Nagao (1978) berichteten, daß der Abbauweg für Naphthalin und Phenanthren bei 13 getesteten Stämmen unabhängig voneinander, über unterschiedliche Zwischenverbindungen, verläuft. Barnsley (1983) zeigte, daß Bakterien, die sowohl mit Naphthalin als auch Phenanthren als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen, zwei unterschiedliche Enzyme für die initiale Oxidation induzierten. Im Gegensatz dazu wurde von Sansaverino *et al.* (1993a) und Menn *et al.* (1993) dargelegt, daß NAH7 oder NAH7-ähnliche Plasmide den Abbau von Phenanthren, Anthracen und Naphthalin vermitteln können. Dabei wurden die gleichen Enzyme für den Abbau der drei Verbindungen verantwortlich gemacht. Ebenso berichtete Kiyohara *et al.* (1994) von einem einzigen Enzymsystem für den oberen Abbauweg von Naphthalin und Phenanthren bei *P. putida* OUS82.

Es scheint so, daß verschiedene PAK-abbauende Bakterienstämme unterschiedliche Enzymausstattungen besitzen. Während die Enzyme einiger Stämme relativ breite Substratspektren haben, besitzen andere Stämme dagegen spezifischere Enzymsysteme.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, daß bei den verschiedenen *Pseudomonas*, *Comamonas* und *Rhodococcus* Stämmen unterschiedliche Enzymsysteme für den oberen Naphthalin- und Phenanthrenabbauweg vorhanden sind. Bei einem universellen Enzymsystem wäre nicht zu erklären, warum diese Stämme zwar Naphthalin aber nicht Phenanthren in Flüssigmedium ohne zusätzliche Energie- und Kohlenstoffquelle verwerten können. Offensichtlich mußte der Phenanthrenabbauweg bei diesen Isolaten durch Salicylsäure induziert werden, während der Naphthalinabbauweg keinen zusätzlichen Inducer benötigte.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre die unterschiedliche Affinität einer universellen Naphthalin- und Phenanthren-Dioxygenase für die beiden Polyaromaten. Nach Fleming *et*

al. (1993) wird das *nah* Operon in Abwesenheit eines Induktors gering exprimiert. Vorhandenes Naphthalin kann dadurch zu Salicylsäure umgesetzt werden, welche, wie beschrieben, die Expression der am Abbau beteiligten Gene aktiviert. Bei einer geringen Affinität der initialen Dioxygenase für Phenanthren wäre vorstellbar, daß die geringe konstitutive Aktivität dieses Enzyms nicht ausreichend ist, um Phenanthren umzusetzen. Damit würde keine Salicylsäure, gebildet und somit der Abbau nicht aktiviert werden. Bei einem solchen Mechanismus müßte die Zugabe von geringen Mengen Naphthalin in Flüssigmedium den Abbau von Phenanthren stimulieren. Dies wurde nicht getestet. Keine Vermutungen können darüber angestellt werden, ob die Fähigkeit der beiden *Sphingomonas* Isolate, Naphthalin und Phenanthren abzubauen, auf einem universellen oder auf zwei unabhängigen Enzymsystemen beruht.

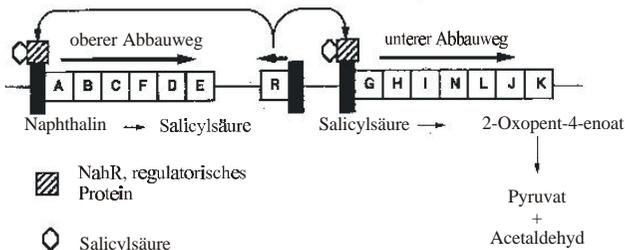


Abbildung 22: Organisation der Operons des oberen (*nah*) und unteren (*sal*) Abbaupfades des NAH7 Plasmids und positive Transkriptionsregulation durch Salicylsäure/NahR (nach Sanseverino *et al.*, 1993b).

4.2.4 Quantifizierung des Naphthalin- und Phenanthrenabbaus

Die Quantifizierung des Naphthalinabbaus zeigte, daß die am Naphthalinabbau beteiligten Enzyme keine oder nur geringe konstitutive Aktivitäten besitzen. Wurden Zellen des Stammes *P. putida* OUS82 und der Isolate A10 (*P. fluorescens*) und H (*C. testosteroni*) in Naphthalin-haltigem Medium vorkultiviert, so wurde Naphthalin in frischem Medium ohne längere Anlaufphase metabolisiert. In dYT-Medium vorkultivierte Zellen dagegen metabolisierten innerhalb der ersten zehn Stunden nach Überimpfung in Naphthalin-haltiges Medium diesen Polyaromaten nicht. Aus den Ergebnissen konnte gefolgert werden, daß der Abbaupfad durch Naphthalin aktiviert wurde. Die Enzyminduktion durch das Substrat selbst ist typisch für die Regulation katabolischer Enzyme (Schlegel, 1992). Für den Zellstoffwechsel ist ein Regulationsmechanismus, der die Bildung von Enzymen nur dann

gewährt, wenn der betreffende Nährstoff in der Nährlösung vorliegt, ökonomisch sehr sinnvoll.

Mittels der gaschromatographischen Quantifizierung des Naphthalin- und Phenanthrenabbaus im allgemeinen konnte nachgewiesen werden, daß Naphthalin von verschiedenen Isolaten in einem wesentlich kürzeren Zeitraum abgebaut wurde, als Phenanthren. Dieses ist vermutlich auf die geringere Wasserlöslichkeit und damit größere Beständigkeit des Phenanthrens zurückzuführen.

Die erhaltenen Werte für den Abbau von Phenanthren und Naphthalin sind schlecht mit Literaturwerten zu vergleichen, weil die Ausgangskonzentrationen der PAK im Medium, sowie die Kultivierungs- und Meßverfahren voneinander differierten. Weißenfels *et al.* (1990) verwendeten für die Quantifizierung der verbliebenen Phenanthrenmenge im Medium ebenso ein gaschromatographisches Verfahren. Der Stamm *S. paucimobilis* BA2 metabolisierte 1 mg ml⁻¹ Phenanthren innerhalb von zwei Tagen und die optische Dichte stieg im Zeitverlauf auf 0,8 Einheiten bei 578 nm an. Verglichen mit diesem Stamm bauten die getesteten *Acidovorax*, *Sphingomonas* und *P. fluorescens* Isolate Phenanthren mit etwa 0,25 mg ml⁻¹ in fünf Tagen wesentlich langsamer ab und die optische Dichte (bei 600 nm) stieg nur auf 0,3 an. Möglich ist, daß andere Parameter als die Phenanthrenmenge die Abbaurate der Stämme limitierten. Für den Stamm *Gordonia* sp. BP9 wurde von Mahro *et al.* (1995) mit 1 µg ml⁻¹ innerhalb von fünf Tagen eine noch geringere Abbaurate festgestellt. Allerdings wurde bei diesem Versuchsansatz auch von einer Anfangskonzentration ausgegangen, die im Vergleich zu Weißenfels *et al.* (1990) um den Faktor 1000 geringer war.

Der Vergleich des Naphthalinabbaus der verschiedenen in dieser Arbeit isolierten Stämme ließ deutlich erkennen, daß die *Rhodococcus* Isolate Naphthalin deutlich langsamer abbauten als die anderen isolierten gramnegativen Stämme und die optische Dichte nur minimal anstieg. Vermutlich verläuft der Abbau von Naphthalin bei den Rhodokokken über einen anderen Abbauweg. Von Allen *et al.* (1997) wurde vermutet, daß sich der Naphthalinabbau grampositiver und gramnegativer Stämme in biochemischer und genetischer Hinsicht unterscheidet. Während Salicylsäure als zentrales Stoffwechselprodukt des Naphthalinabbaus bei gramnegativen Stämmen zu Catechol decarboxyliert wird (Gibson & Subramanian, 1984), wurde festgestellt, daß bei dem Naphthalinabbau von *Rhodococcus* sp. B4 das Enzym Salicylat Hydroxylase die Salicylsäure zu Gentsiat umsetzt (Grund *et al.*, 1992).

Die geringe Wachstumsrate der isolierten *Rhodococcus* Stämme kann möglicherweise darauf zurückgeführt werden, daß ein Großteil der auftretenden Intermediate in das Medium sekretiert wird. Von Iwabuchi *et al.* (1994) wurde gezeigt, daß die geringe Wachstumsrate des marinen Stammes *Pseudomonas* sp. AJ1 darauf zurückzuführen war, daß nur 1,5 der 14 Kohlenstoffatome des Phenanthrens in zelleigenes Material überführt wurden. Als

Erklärungsmöglichkeit wurde von Iwabuchi *et al.* (1994) in Betracht gezogen, daß diese PAK-Abbauege wenig differenziert sind und nicht balancierte Enzymaktivitäten zu einer Akkumulation und Sekretion einiger Stoffwechselintermediate führen. Mit dieser Theorie übereinstimmend wurde von Guerin & Jones (1988) vermutet, daß die geringe Akkumulation von Phenanthren-Metaboliten bei *Mycobacterium* sp. BG1 auf die gut regulierte Synthese der am Phenanthrenabbau beteiligten Enzyme zurückzuführen ist.

Bei der gaschromatographischen Bestimmung der verbliebenen Menge des Naphthalins und Phenanthrens im Medium konnte keine Aussagen bezüglich der auftretenden Stoffwechselprodukte gemacht werden. Interessant wäre die Analyse der auftretenden Metaboliten bei dem Naphthalinabbau der Rhodokokken Isolate B1 und G10 im Vergleich zu den anderen Isolaten gewesen.

Methodisch betrachtet zeigte sich, daß aus den gaschromatographisch ermittelten Meßwerten zwar deutliche Tendenzen und Unterschiede bezüglich des Polyaromatenabbaus bei verschiedenen Bakterienstämmen hervorgingen, jedoch generell bei der angewendeten Methode relativ große Meßungenauigkeiten auftraten. Als hauptsächliche Ursache wurde dabei die Ungenauigkeit bei der Einwaage des kristallinen Naphthalins und Phenanthrens verantwortlich gemacht. Ebenso wurde die Größe der PAK-Kristalle, die in fester Form dem Medium zugeführt wurden, nicht berücksichtigt. Volkering *et al.* (1992) wiesen aber nach, daß das Wachstum eines *Pseudomonas* sp. mit Naphthalin als Kohlenstoff- und Energiequelle abhängig war von der Größe der Naphthalinkristalle im Medium. Dabei war die Wachstumsrate mit zunehmender Kristallgröße geringer.

4.3 Aktivitäten der Catechol Dioxygenasen bei dem Abbau von PAK

Der Abbau von PAK ist am Beispiel von Naphthalin und Phenanthren von Kästner *et al.* (1994a) beschrieben worden. Wie einleitend dargestellt, ist das Grundmuster des Abbaus der beiden Polyaromaten gleich. Als entscheidendes Zwischenprodukt beider Verbindungen kann Catechol (Brenzkatechin) auftreten, das nachfolgend durch Catechol-Dioxygenasen gespalten wird. Die entstehenden Produkte werden in zentrale Stoffwechselwege eingespeist und vollständig zu CO₂ mineralisiert. Catechol-Dioxy-genase-Aktivitäten in Zellen, die mit PAK als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle kultiviert wurden, kann somit als Indiz für die vollständige Mineralisierung der Polyaromaten angesehen werden. Der enzymatische Test lieferte gleichzeitig Informationen darüber, ob Catechol *ortho* gespalten wurde und *cis*, *cis* Muconsäure als Produkt entstand oder ob durch *meta*-Spaltung Catechol zu 2-Hydroxymuconsäure-Semialdehyd umgewandelt wurde. Der *meta*-Spaltungsweg wird in der Literatur als der am meist verbreiteste beschrieben (Houghton & Shanley, 1994).

Die Ergebnisse der Aktivitätstests zeigten, daß die C230 in Zellen der meisten untersuchten Stämme, die mit Naphthalin oder Phenanthren gewachsen waren, signifikant induziert war.

Daraus kann gefolgert werden, daß diese Stämme die Polyaromaten vollständig metabolisieren konnten und für den PAK-Katabolismus den *meta*-Abbauweg nutzten. Die geringen C23O-Aktivitäten von Zellen einiger Stämme, die in dYT-Vollmedium ohne polyaromatische oder aromatische Kohlenstoffquelle kultiviert wurden, läßt den Rückschluß zu, daß die C23O dieser Stämme in geringen Mengen konstitutiv exprimiert wurden. Durch Naphthalin oder Phenanthren selbst oder durch Metaboliten, die durch geringe konstitutive Enzymaktivitäten gebildet wurden (vergl. 4.2.3), wurde die Expression der C23O vermutlich aktiviert. Da das Gen für die C23O meist auf einem Operon mit anderen Genen des unteren Abbauwegs liegt (Ng *et al.*, 1994; Herrmann *et al.*, 1995; Kukor & Olsen, 1996; Arai *et al.*, 1998; Takeo *et al.*, 1998) und dieses Operon, wie für das NAH7 Plasmid beschrieben, gemeinsam mit dem Operon des oberen Abbauwegs reguliert wird (Yen & Gunsalus, 1982), ist anzunehmen, daß alle am PAK-Abbau beteiligten Enzyme in den Zellextrakten aktiv waren.

Die gaschromatographisch bestimmte Abnahme der Naphthalinmenge im Medium bei Naphthalin-vorinduzierten und in Vollmedium kultivierten Zellen hatte bereits ergeben, daß die am PAK-Abbau beteiligten Enzyme keine hohen konstitutiven Aktivitäten aufwiesen, sondern erst induziert werden mußten. Das Ergebnis steht in Einklang mit den ermittelten C23O-Aktivitäten für Naphthalin- und dYT-gewachsene Zellen.

Die enzymatischen Tests hatten gezeigt, daß die C23O-Aktivitäten im allgemeinen bei Vertretern gleicher Spezies oder Gattungen weniger stark voneinander abwichen, als bei Angehörigen verschiedener Gattungen. Die Isolate der beta-Proteobakterien hatten, ohne Ausnahme, sehr geringe C23O-Aktivitäten, während annähernd alle getesteten Stämme der Pseudomonaden und Sphingomonaden relativ hohe spezifische Aktivitäten aufwiesen. Informationen bezüglich der C23O-Aktivitäten sind in der Literatur für Bakterienstämme beschrieben, die einfacharomatische Verbindungen abbauen (Worsey *et al.*, 1978; Keil *et al.*, 1985; Brinkmann *et al.*, 1994; Carrington *et al.*, 1994). Auf der Ebene des Catechols laufen die Abbauege für einfach aromatische und polyaromatische Verbindungen zusammen. Die spezifischen Aktivitäten waren bei verschiedenen *Pseudomonas* Stämmen in allen Fällen mit mindestens 1000 mU (mg Protein)⁻¹ höher als bei den in dieser Arbeit getesteten Stämmen. So betrug beispielsweise die spezifische Aktivität der plasmid-codierten C23O von *P. putida* MT15 1900 mU (mg Protein)⁻¹ bzw. 3000 mU, wenn die Zellen in *m*-Toluat bzw. *m*-Xylen kultiviert wurden (Keil *et al.*, 1985). Mit Toluat gewachsene Zellen von *Pseudomonas* sp. IC hatten eine spezifische Aktivität von 3900, in Benzoat kultivierte Zellen von 12900 mU (mg Protein)⁻¹ (Carrington *et al.*, 1994). Im Gegensatz dazu wurde von Arai *et al.* (1998) für den Stamm *C. testosteroni* TA441, der in *p*-Hydroxybenzoat kultiviert wurde, mit 20 mU (mg Protein)⁻¹ eine vergleichsweise niedrige spezifische C23O-Aktivität gemessen.

Diese variierenden Aktivitäten kann man durch eine unterschiedliche Struktur der Enzyme und damit einem unterschiedlichen Substrat-Umsatz oder durch eine voneinander abweichende Regulation der Genexpression erklären. Möglich ist aber auch, da nicht das aufgereinigte Enzym für den Test eingesetzt, sondern von der Gesamtproteinmenge ausgegangen wurde, daß der Anteil der C23O an der Gesamtproteinmenge bei den Stämmen mit geringen gemessenen Aktivitäten vergleichsweise kleiner war als bei Stämmen mit hohen C23O-Aktivitäten. Desweiteren betonten Carrington *et al.* (1994), daß die hohen gemessenen C23O-Aktivitäten bei *Pseudomonas* sp. IC nicht allein die Expression der C23O (*BphE*) widerspiegeln, sondern es zu Überlappungen von Catechol-*meta*-Spaltungsaktivitäten verschiedener Enzyme kam. Sie zeigten, daß Catechol auch durch die 2,3 Dihydroxybiphenyl 1,2-Dioxygenase umgesetzt wurde. D.h., die variierende Aktivitäten der Stämme können auch auf eine differierende Ausstattung der Zellen mit Catechol-spaltenden Enzymen zurückgeführt werden. Ein Vergleich der C23O-Aktivitäten verschiedener Bakterienstämme ist also nur dann möglich, wenn für die Versuche die aufgereinigten Enzyme eingesetzt werden.

Einen Einfluß auf die C23O-Aktivitäten hatte ebenso die Dauer der Kultivierung. Die Abnahme der C23O-Aktivität mit zunehmender Kultivierungsdauer in Naphthalin-haltigem Medium kann in Verbindung damit gebracht werden, daß Naphthalin schon nach relativ kurzer Inkubationszeit komplett metabolisiert wurde. Bei vollständigem Verbrauch des Naphthalins besteht kein Bedarf mehr an aktiven, am Abbau beteiligten Enzymen. Im Gegensatz dazu wurde Phenanthren langsamer abgebaut und die C23O-Aktivität stieg mit zunehmender Kultivierungsdauer.

Für die getesteten *Rhodococcus* Isolate konnte keine C23O-Aktivität nachgewiesen werden. Möglicherweise wurde bei diesen grampositiven Stämmen beim Naphthalinabbau kein Catechol als Intermediat gebildet. Wie unter 4.2 beschrieben, wurde von Grund *et al.* (1992) festgestellt, daß bei dem Naphthalinabbau von *Rhodococcus* sp. B4 Salicylsäure zu Gentsat umgesetzt wurde und nicht zu Catechol wie bei vielen gramnegativen Stämmen. In der Literatur sind aber ebenso Rhodokokken Stämme beschrieben, die eine C23O besitzen. Candidus *et al.* (1994) wiesen bei *R. rhodochrous* CTM eine C23O nach. Das aufgereinigte Enzym zeigte allerdings mit $29 \text{ mU (mg Protein)}^{-1}$ eine sehr geringe Aktivität, die vermutlich in Gesamtproteinextrakten nicht detektiert worden wäre. Ebenso charakterisierten Kulakov *et al.* (1998) extradiole Dioxygenasen mit Catechol-Spaltungsaktivitäten bei *R. rhodochrous* NCIMB 13064. Auch hier waren die spezifischen Aktivitäten mit weniger als $1 \text{ mU (mg Protein)}^{-1}$ sehr gering.

Für die getesteten Stämme wurde mit Ausnahme von *P. putida* NCIMB 9816 keine C12O-Aktivität nachgewiesen. D.h. die Stämme besitzen entweder nur für die C23O die genetische Ausstattung oder durch die gegebenen Kultivierungsbedingungen wurde nur das *meta*-spaltende Enzym aktiviert. Für Zellen des Stammes *P. putida* NCIMB 9816, die drei

Tage in Naphthalin gewachsen waren, wurde parallel C12O- und C23O-Aktivität nachgewiesen. Offensichtlich wurde Catechol hier sowohl über den *ortho*- als auch den *meta*-Abbaueweg verstoffwechselt. Die fehlende Aktivität der C12O in Zellen, die lediglich zwei Tage in Naphthalin kultiviert worden waren, läßt den Rückschluß zu, daß die Abbauewege komplex reguliert wurden.

So zeigten Hamzah & Al-Baharna (1994) für den Stamm *P. cepacia* ATCC 29351 eine unterschiedliche Aktivierung der beiden Catechol-Dioxygenasen in Abhängigkeit der gebotenen Kohlenstoffquelle. Während die Kultivierung mit Salicylsäure zu einer C12O-Aktivität führte, wurden beide Dioxygenasen in Benzoat-gewachsenen Zellen aktiviert.

4.4 Detektion von C23O-codierenden Sequenzen bei PAK-abbauenden Stämmen

Mittels der photometrischen Enzymtests wurde nachgewiesen, daß bei den meisten Isolaten C23O-Aktivität vorlag, wenn diese mit Naphthalin oder Phenanthren als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle kultiviert wurden. Ziel war es nun, die entsprechenden codierenden Abschnitte dieses Enzyms mittels PCR und Gensondentechnik zu detektieren.

Die Suche nach bekannten Sequenzen in Datenbanken hatte gezeigt, daß die C23O-Sequenzen verschiedener Bakterien zum Teil sehr heterolog sind. Deshalb mußte zunächst überprüft werden, wie universell einsetzbar diese Methode zum Nachweis von C23O-codierenden Sequenzen ist.

Eltis & Bolin (1996) untersuchten die evolutionäre Verwandtschaft verschiedener extradioler Dioxygenasen (Einleitung, Abb. 4). Die verschiedenen C23O wurden zusammen mit weiteren extradiolen Dioxygenasen einer Superfamilie zugeordnet, d.h. für diese Enzyme wurde ein gemeinsamer evolutionärer Ursprung angenommen. Innerhalb dieser Superfamilie bildeten die C23O eine Familie, die wiederum in fünf Subfamilien unterteilt wurde. Die Sequenzübereinstimmungen innerhalb einer Subfamilien beschrieben sie mit minimal 54%.

Allerdings betonten sie, daß die verwandtschaftlichen Verhältnisse einiger C23O zueinander nicht geklärt sind. Die C23O-Sequenz von *P. fluorescens* IP01 beispielsweise wurde innerhalb der Superfamilie der extradiolen Dioxygenasen einer anderen Familie zugeordnet als die meisten anderen C23O. Ebenso gliederte sich die Sequenz von *Ralstonia eutrophus* JMP 222 (*mcpII*) deutlich von den anderen C23O-Sequenzen ab und die zweite C23O dieses Stammes (*mcpI*) wurde sogar auf einen anderen evolutionären Ursprung zurückgeführt.

Die universelle Detektion von C23O-Sequenzen mit einem Primerpaar ist somit nicht möglich. Aus diesem Grund wurden, wie unter 3.8.1 beschrieben, mehrere Primerpaare entworfen und auf ihre Funktion getestet, C23O bei verschiedenen PAK-abbauenden Stämmen zu detektieren.

4.4.1 Detektion von C23O-codierenden Genabschnitten bei verschiedenen PAK-verwertenden *Pseudomonas* und *Sphingomonas* Stämmen

Das Primerpaar PSCA23St/PSCA23End leitete sich von Sequenzen verschiedener *Pseudomonas* Stämme ab, die nach Eltis & Bolin (1996) der Subfamilie I.2.A zugeordnet wurden. Die PCR zeigte, daß mit diesem Primerpaar für alle PAK-abbauenden Referenzstämmen und Isolate, die der Gattung *Pseudomonas* zugehörten, ein PCR-Fragment der erwartete Größe amplifiziert wurde. Die C23O-Sequenzen der verschiedenen getesteten Pseudomonaden gehörten also vermutlich ebenso der Subfamilie I.2.A an. Da mit diesem Primerpaar keine C23O-codierenden Abschnitte von PAK-abbauenden Vertretern anderer Gattungen amplifiziert wurden, schien das Primerpaar geeignet für eine spezifische Detektion der Genabschnitte verschiedener *Pseudomonas* Spezies. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß das katabolische Gen bei anderen nicht getesteten Pseudomonaden aufgrund fehlender Sequenzähnlichkeiten nicht detektiert werden kann. So sind in der Datenbank C23O-Sequenzen von zwei *Pseudomonas* Stämmen, *P. fluorescens* IP01 und *P. putida* MT15, vorhanden, die nicht mit dem Primerpaar nachgewiesen worden wären.

Ebenso hatte sich gezeigt, daß die C23O-Sequenz des Stammes *Alcaligenes* sp. KF711 mit 81 bis 92% Nukleinsäuresequenz-Übereinstimmung zu entsprechenden plasmidcodierten Sequenzen der Stämme *P. putida* mt-2; *P. putida* PpG7 und *P. putida* CF600 (Moon *et al.*, 1995) ebenso der Subfamilie I.2.A zuzuordnen ist (Dendrogramm, Abb. 23; Anhang). Das Primerpaar erfaßt somit vermutlich auch vereinzelt C23O-Sequenzen von Stämmen, die nicht der Gattung *Pseudomonas* angehören. Da keine Stämme der Gattung *Alcaligenes* isoliert wurden, konnte nicht getestet werden, ob die C23O-Sequenzen von verschiedenen anderen *Alcaligenes* Stämmen mit dem verwendeten Primerpaar detektiert worden wären.

Das Primerpaar SPHCA23St und 23OR, welches von der Subfamilie I.2.B mit den Sequenzen der Stämme *Sphingomonas* sp. HV3 und *S. yanoikuyae* B1 abgeleitet wurde, war zur spezifischen Detektion von C23O-Sequenzen von verschiedenen *Sphingomonas* Stämmen geeignet. Die entsprechenden Sequenzen von Stämmen anderer Gattungen wurden mit diesem Primerpaar nicht amplifiziert.

Das Ergebnis, daß die untersuchten C23O-Gene von *Pseudomonas* und *Sphingomonas* Stämmen vermutlich innerhalb der Familie der extradiolen Dioxygenasen zwei unterschiedlichen Subfamilien angehören und mittels spezifischer Primer getrennt voneinander nachgewiesen werden können, läßt den Rückschluß zu, daß die Gene innerhalb dieser beiden Gattungen gut konserviert sind. Die Ergebnisse der Sequenzierung der PCR-Amplifikate bestätigten diese Annahme. Die Sequenzdaten werden unter 4.6.1 diskutiert.

Von Joshi & Walia (1996) wurde ebenso ein Primerpaar zur spezifischen Amplifizierung von C23O-Gensequenzen vorgeschlagen. Der Primerentwicklung wurden allerdings nur drei Sequenzen von verschiedenen *Pseudomonas* Stämmen zugrunde gelegt. Nach Sequenzvergleich ist es mit diesem Primerpaar nicht möglich, C23O-Sequenzen von

Sphingomonas Stämmen zu erfassen. Im Gegensatz dazu wurden von Wikström *et al.* (1996) verschiedene *Pseudomonas* C23O-Sequenzen und die entsprechende Gensequenz von *Sphingomonas* sp. HV3 bei der Entwicklung eines degenerierten Primerpaares berücksichtigt. Das Primerpaar wurde in dieser Arbeit verwendet, und es wurde gezeigt, daß C23O-Sequenzen aller getesteten *Pseudomonas* und *Sphingomonas* mit diesen Primern universell detektiert werden können. Die anschließende Hybridisierung der aufgetrennten PCR-Fragmente mit verschiedenen Oligonukleotidsonden, die in dieser Arbeit entwickelt wurden, ermöglichte ebenso die spezifische Detektion von *Pseudomonas* und *Sphingomonas* C23O-Sequenzen. Allerdings zeigte sich bei der Hybridisierung, daß das PCR-Amplifikat des Stammes *S. paucimobilis* BA2 unter stringenten Hybridisierungsbedingungen nicht mit der *Sphingomonas* spezifischen Sonde SPH hybridisierte, während das Amplifikat des Stammes *P. mendocina* (Isolat L7) kein Signal mit der *Pseudomonas* spezifischen Sonde PS1 ergab. Die C23O-Sequenzen dieser Vertreter unterschieden sich offensichtlich, zumindest im Bereich der Zielsequenz der beiden Sonden, stärker von den Sequenzen anderer getesteter *Pseudomonas* und *Sphingomonas* Stämmen.

4.4.2 Verwendung des Primerpaares COM23OF/COM23OR

Die negativen PCR-Ergebnisse für alle *Comamonas* und *Acidovorax* Isolate mit dem Primerpaar COM23OF/COM23OR zeigten, daß hier keine ausreichende Sequenzübereinstimmung zu der C23O-Sequenz des Stammes *Comamonas testosteroni* TA441 (Arai *et al.*, 1998) vorlag. Es bleibt zu klären, ob die vollständige C23O-Sequenz dieses Stammes von der entsprechenden Sequenz der isolierten *Comamonas* Stämme abwich oder ob lediglich die gewählten Primerbindungsstellen nicht ausreichend konserviert waren. Die Primer wurden jedoch auf Genregionen gelegt, die bei den Pseudomonaden und Sphingomonaden hochkonserviert waren.

Möglich ist auch, daß C23O-codierende Abschnitte bei diesen Stämmen vollständig fehlen und die gemessene C23O-Aktivität nicht durch eine aktive C23O selbst, sondern durch andere Enzyme mit Catechol-Spaltungsaktivität verursacht wurde. Wie erwähnt (4.3), zeigten Carrington *et al.* (1994), daß Catechol auch durch 2,3 Dihydroxybiphenyl 1,2-Dioxygenase aus *Pseudomonas* sp. IC umgesetzt wurde.

4.4.3 Detektion von C23O-ähnlichen Sequenzabschnitten bei verschiedenen *Rhodococcus* Isolaten

In den enzymatischen Tests wurde für die verschiedenen *Rhodococcus* Stämme keine aktive C23O detektiert. Wie schon erläutert (4.3) ist es möglich, daß bei dem Abbau von Naphthalin in *Rhodococcus* Stämmen kein Catechol gebildet wird und somit auch kein Bedarf an diesem Enzym besteht. Möglich ist aber auch, daß eine aktive C23O in diesen Stämmen zwar vorhanden war, aber die Aktivität zur Detektion in den eingesetzten

Gesamtproteinextrakten nicht ausreichte.

Die Ergebnisse der PCR zeigten, daß alle getesteten Rhodokokken Isolate keine ähnlichen Genabschnitte zu der plasmidcodierten C23O von *R. rhodochrous* CTM besaßen. Im Gegensatz dazu wurden mittels des Primerpaares RHD23OF/RHD23OR, welches auf der Basis der C23O-Sequenz von *R. rhodochrous* NCIMB 13064 entworfen wurde, für eine große Anzahl der *Rhodococcus* Stämme auch unter stringenten PCR-Bedingungen Fragmente amplifiziert. Da die erhaltenen Amplifikate nicht der erwarteten Größe entsprachen, muß davon ausgegangen werden, daß die amplifizierten Sequenzen nicht für eine aktive C23O codierten. Auffällig ist aber, daß, mit einer Ausnahme, für alle getesteten Rhodokokken Stämme ein Amplifikat der gleichen Größe erhalten wurde. Da allen Stämmen der Abbau von Naphthalin gemein ist, ist nicht auszuschließen, daß die amplifizierten Abschnitte Teilsequenzen eines Gens darstellen, welches für ein Enzym des Naphthalinabbaus codiert.

4.4.4 Schlußfolgerungen aus den Ergebnissen der PCR und Hybridisierung

Die Ergebnisse der PCR und der Hybridisierungen zeigen also, daß es möglich ist C23O-Sequenzen spezifisch für PAK-abbauende Vertreter der Pseudomonaden und der Sphingomonaden zu detektieren. Bakterienstämme dieser beiden Gattungen machten nicht nur einen großen Anteil der insgesamt isolierten PAK-Abbauer aus, sondern sie zeichneten sich auch durch eine hohe C23O-Aktivität aus.

Angestrebt werden sollte aber die Entwicklung weiterer Primer und Sonden auf der Basis neugewonnener C23O-Sequenzdaten von verschiedenen PAK-verwertender Stämme, die nicht der Gattung *Pseudomonas* oder *Sphingomonas* zugehören. Nur so ist es möglich, die entsprechenden Genabschnitte bei verschiedensten Stämmen umfassend zu detektieren.

C23O-codierende Abschnitte, die ähnlich zu entsprechenden Sequenzen von *Pseudomonas* und *Sphingomonas* Stämmen sind, konnten über die PCR auch direkt in einer Anreicherungskultur mit Naphthalin als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle detektiert werden. Dabei wurden mehr „*Pseudomonas*-“ als „*Sphingomonas*-Sequenzen“ nachgewiesen. Das Ergebnis kann dadurch erklärt werden, daß Naphthalin-abbauende Pseudomonaden sich in dem Selektivmedium schneller vermehrten oder, daß in der Umweltprobe selbst die Pseudomonaden einen größeren Anteil der PAK-abbauenden Stämme ausmachten. Generell ist fraglich, inwieweit die gewählten Kultivierungsbedingungen die selektive Anreicherung bestimmter Bakterienspezies beeinflussen.

Die Ergebnisse der PCR und der Hybridisierung lassen erkennen, daß die Sequenzen innerhalb der Gattungen der *Pseudomonas* und *Sphingomonas* besser konserviert sind als zwischen den beiden Gattungen. Daraus kann der Rückschluß gezogen werden, daß die C23O dieser Gattungen einen gemeinsamen Ursprung hatten, und die Sequenzen sich

entsprechend der Phylogenie der Stämme divergent entwickelten.

Die C23O-Sequenzen der *Comamonas* Isolate waren, verglichen mit der bekannten Sequenz eines anderen *Comamonas* Stammes, nicht ähnlich genug, um sie über die PCR zu detektieren.

Ebenso sind die C23O-Sequenzen der Rhodokokken Stämme *R. rhodochrous* CTM und *R. rhodochrous* NCIMB 13064 sehr unähnlich. Die Heterogenität isofunktionaler Enzyme bei Stämmen einer Gattung kann dadurch erklärt werden, daß die katabolischen Gensequenzen einen unterschiedlichen evolutionären Ursprung haben und durch konvergente Entwicklung die isofunktionalen Enzyme entstanden sind. Möglich ist aber auch, daß die Gene durch horizontalen Gentransfer nachträglich in die Erbsubstanz der Stämme aufgenommen wurden.

4.5 Weitere Methoden zur spezifischen Detektion von Genabschnitten

Neben der PCR wurden andere Methoden zur spezifischen Detektion von C23O-codierenden Genabschnitten getestet.

4.5.1 Koloniehybridisierung

Mittels der Koloniehybridisierung und funktionspezifischen Sonden ist es möglich, Bakterienkolonien zu detektieren, deren DNA für eine bestimmte Funktion codiert. Die positiven Kolonien können anschließend direkt isoliert werden. Die Koloniehybridisierung ist im Vergleich zu Methoden, die auf DNA-Extraktion mit nachfolgender Detektion der entsprechenden DNA-Sequenzen in den Nukleinsäureextrakten beruhen, zeitaufwendig und kultivierungsabhängig (Ogram & Sayler, 1988).

Die Anwendung der Koloniehybridisierung zum Nachweis von C23O-codierenden Sequenzen hatte sich in dieser Arbeit als nicht praktikabel erwiesen. Unter unstringenten Hybridisierungsbedingungen wurden teilweise auch Kolonien negativer Kontrollstämmen detektiert. Bei Stringenzerhöhung dagegen wurden zum Teil keine Hybridisierungssignale für die Stämme, die C23O-codierende Sequenzen besaßen, erhalten. Die Hybridisierung der Filter mit der RNA-gerichteten Sonde EUB338 dagegen führte zu deutlichen Signalen. Die Zielsequenzen dieser Sonde (16S rRNA) liegen in tausendfacher Kopienzahl in einer Zelle vor, während die C23O-Zielsequenzen vermutlich nur einmal pro Bakterienzelle vorhanden sind. Die geringe Anzahl C23O-codierender Bereiche war vermutlich nicht ausreichend für eine spezifische Detektion C23O-positiver Kolonien.

Von Fleming *et al.* (1993) wurde durch Koloniehybridisierung der Anteil Naphthalin-abbauender Bakterien an der Gesamtbakterienzahl bestimmt. Die eingesetzte Gensonde richtete sich gegen codierende Abschnitte der Naphthalin-Dioxygenase (*nahA* von Plasmid NAH7, *P. putida* pPG7). Der Anteil *nahA* positiver Stämme an der Gesamtzahl kultivierter

Stämme erscheint mit 1 bis 35% relativ hoch. Nicht getestet wurde hier, ob die Signale spezifisch waren. Möglich ist, daß auch hier Kolonien, ohne die entsprechende Sequenzabschnitte, mit erfaßt wurden.

4.5.2 Dot-Blot-Verfahren

Für den kultivierungsunabhängigen Nachweis von C23O-Sequenzen in DNA-Extrakten wurde Gesamt-DNA in Dot-Blot-Verfahren auf Membranen aufgebracht und anschließend mit C23O-gerichteten Gensonden hybridisiert. Wurde die Hybridisierung in Formamidhaltigem Puffer durchgeführt, wurden auch unter stringenten Bedingungen, d.h. bei hohen Formamidkonzentrationen, Signale für negative Kontrollstämmen erhalten. Dieses Ergebnis war unabhängig davon, ob Oligonukleotide oder PCR-Fragmenten als Sonden eingesetzt wurden. Möglicherweise ist dieses Ergebnis auf das methodische Vorgehen bei der Hybridisierung zurückzuführen. Die Vorhybridisierungslösung wurde aus den Hybridisierungsröhren abgekippt und 1 ml Hybridisierungspuffer der entsprechenden Stringenz zugegeben. Durch die verbliebene Vorhybridisierungslösung in den Röhren wurde eventuell der Hybridisierungspuffer verdünnt und so die Formamidkonzentration und damit die Stringenz herabgesetzt. Unter diesen weniger stringenten Bedingungen konnten die Sonden vermutlich auch unspezifisch binden. Wurde die Methode so variiert, daß die Stringenz nicht durch den Hybridisierungspuffer selbst, sondern durch die anschließenden Waschschrte eingestellt wurde, war eine spezifische Detektion mit PCR-Fragmenten als Sonden von C23O-codierenden Sequenzen verschiedener *Pseudomonas* Stämme möglich.

4.5.3 Hybridisierung restriktionsverdauter Gesamt-DNA mit C23O-gerichteten Sonden

Alternativ zu dem Dot-Blot Verfahren wurden C23O-codierende Abschnitte in restriktionsverdauter Gesamt-DNA detektiert. Die Ergebnisse zeigten, daß mittels dieser Methode spezifisch C23O-codierende Bereiche in der DNA verschiedener PAK-abbauender Pseudomonaden nachgewiesen werden konnten. Die Anwendung dieser Methode lieferte zusätzliche Informationen bezüglich der C23O-codierenden Gene. Mit Kenntnis der Restriktionsschnittstellen innerhalb der C23O-codierenden Bereiche ist es möglich, anhand der Zahl hybridisierender Restriktionsfragmente eine Aussage darüber zu machen, ob die detektierten Gene einfach oder mehrfach in der Erbsubstanz des jeweiligen Stammes vorliegen. Ebenso läßt das Bandenmuster Rückschlüsse über die Ähnlichkeit der Gensequenzen und den Gensequenzen benachbarter Bereiche bei verschiedenen Bakterienstämmen zu.

Die Hybridisierung der *EcoR* I-, *Pst* I- und *Sal* I-verdauten DNA mit einer C23O-gerichteten Sonde ergab für verschiedene *P. putida* Stämme (*P. putida* NCIMB 9816, *P. putida* OUS82 und Isolat F) ein unterschiedliches Bandenmuster. Entsprechend der zwei

übereinstimmenden *Sal* I-Schnittstellen innerhalb der C230-Sequenz von *P. putida* OUS82 und Isolat F wurde für beide Stämme ein etwa 400 bp großes hybridisierendes Fragment detektiert. Zusätzlich wurde in beiden *Sal* I-verdauten DNAs ein Signal bei einer Fragmentgröße von etwa 300 bp ausgemacht. D.h., eine weitere identische Schnittstelle dieses Enzyms lag in unmittelbarer Nachbarschaft des C230-Gens, stromaufwärts des Startcodons. Eine *Sal* I-Schnittstelle stromabwärts der C230-Sequenz scheint dagegen nicht konserviert zu sein. D.h., die benachbarten Gensequenzen sind zum Teil offen-sichtlich nicht so gut konserviert wie das Gen selbst.

Da für *P. putida* OUS82 ein viertes hybridisierendes *Sal* I-Fragment detektiert wurde, wurde angenommen, daß eine weitere C230-ähnliche Sequenz in der DNA dieses Stammes vorhanden war. Diese Vermutung würde ebenso erklären, warum mehrere *Eco*R I- bzw. *Pst* I-Restriktionsfragmente mit der Sonde hybridisierten, obwohl keine Restriktionsschnittstellen auf dem C230-Gen lagen.

Von Kitayama *et al.* (1996) wurden drei homologe C230-Gene in der DNA des Stammes *P. aeruginosa* J1104 detektiert. Ebenso wurde von Chatfield & Williams (1986) gezeigt, daß in natürlich vorkommenden TOL-Plasmiden zwei homologe oder zwei nicht homologe Gene für *meta*-spaltende Dioxygenasen vorhanden waren. Möglich ist also, daß *P. putida* OUS 82 zwei homologe C230-codierende Abschnitte besitzt. Aufgrund des erhaltenen Bandenmusters wurde für Isolat F sowie für Isolat L7 und *P. stutzeri* AN11 nur ein C230-Gen angenommen.

Aufgrund der singulären Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Pst* I und *Sal* I innerhalb des C230-Gens der beiden *P. fluorescens* Isolate C4 und A10 waren je zwei hybridisierende Fragmente in der entsprechend verdauten DNA zu erwarten. Bei beiden Stämmen, sowie dem *P. fluorescens* Isolat H9 hybridisierten in *Pst* I-verdauter DNA ca. 3,3 und 3,1 kb große DNA-Fragmente, in *Sal* I-geschnittener DNA wurden Hybridisierungssignale für etwa 2,3 und 0,5 kb große Fragmente erhalten. Dieses läßt darauf schließen, daß nicht nur die *Pst* I- und *Sal* I-Schnittstellen in dem Gen selbst konserviert waren, sondern ebenso in benachbarten Sequenzregionen. Aufgrund der Organisation der katabolischen Gene in einem Operon (Williams & Sayers, 1994) ist anzunehmen, daß die C230 benachbarten Sequenzen für ein weiteres Enzym des oberen Abbauweges codieren.

Während in der *Pst* I- bzw. *Sal* I-geschnittenen DNA des Isolates C4, wie erwartet, nur zwei Fragmente hybridisierten, wurden in der verdauten DNA des Isolates A10 und H9 mehr als zwei hybridisierende Fragmente detektiert. Daraus kann man ableiten, daß diese Stämme vermutlich mehr als ein C230-Gen besitzen.

Zur Detektion von C230-codierender Genabschnitte konnten also neben der PCR-Methode weitere kultivierungsunabhängige Verfahren angewendet werden. Ein Nachteil gegenüber dem PCR-Verfahren war, daß eine größere Menge an DNA eingesetzt werden mußte und die Detektionsgrenzen allgmein größer sind.

4.6 Sequenzierung der mittels C23O-spezifischer Primer amplifizierten PCR-Fragmente

4.6.1 Vergleich der C23O-Nukleinsäuresequenzen verschiedener *Pseudomonas* und *Sphingomonas* Stämme

Die Sequenzierung der mit den Primerpaaren PSCA23St/PSCA23End erhaltenen PCR-Amplifikate hatte gezeigt, daß die Sequenzen verschiedener PAK-abbauender *Pseudomonas* Stämme untereinander gut konserviert sind und große Ähnlichkeiten haben zu veröffentlichten C23O-Sequenzen verschiedener *Pseudomonas* Stämme. Nach der Einteilung der Sequenzen verschiedener extradioler Dioxygenasen nach Eltis & Bolin (1996) gehören diese Sequenzen alle der Subfamilie I.2.A an. Zu dieser Subfamilie gehörten C23O-Sequenzen von verschiedenen anderen *Pseudomonas* Stämmen.

Die sequenzierten Amplifikate der *Sphingomonas* Isolate E3, Y9 und H1b und von *S. paucimobilis* BA2 und *S. yanoikuyae* DSM 6900 zeigten dagegen eine bessere Übereinstimmung zu bekannten C23O-Sequenzen von *Sphingomonas* sp. HV3 und *S. yanoikuyae* B1. Die C23O-Sequenzen verschiedener Sphingomonaden scheinen somit eine weitere Subfamilie (I.2.B) innerhalb der Familie der C23O zu bilden (Eltis & Bolin, 1996).

Die C23O-Sequenzen sind also innerhalb einer Gattung besser konserviert. Daraus kann geschlossen werden, daß die Gensequenzen einen gemeinsamen Ursprung hatten, und die Anhäufung von Mutationen in nichtfunktionellen Genbereichen im Laufe der phylogenetischen Entwicklung zu den divergenten Sequenzen führten. Die Unterschiede in den Gensequenzen sind dabei Indikatoren für den Zeitraum der evolutionären Divergenz.

Der C23O-Sequenzvergleich verschiedener *Pseudomonas* Spezies legte jedoch dar, daß die Sequenzen von Vertretern der gleichen Spezies, d.h. von phylogenetisch näher verwandten Bakterienstämmen, oft nicht besser konserviert waren als die Sequenzen verschiedener *Pseudomonas* Spezies. So wiesen die Sequenzen von einigen *P. putida* Stämmen beispielsweise die größte C23O-Sequenzähnlichkeit zu *P. fluorescens* Stämmen auf.

Herrick *et al.* (1997) hatten gezeigt, daß bei verschiedenen *Pseudomonas* Isolaten aus einer Bodenprobe die codierenden Bereiche für die große Eisen-Schwefel-Untereinheit der Naphthalin-Dioxygenase (*nahAc*) weniger stark voneinander differierten als die 16S rRNA-Sequenzen der entsprechenden Stämme. Als Erklärung für die große Homologie dieses Gens führten sie den horizontalen Gentransfer bei Naphthalin-abbauenden Stämmen an.

Horizontaler Gentransfer als verbreiteter Mechanismus des Austausches katabolischer Gene müßte dazu führen, daß die entsprechenden Sequenzen von Isolaten eines Umweltstandortes besser konserviert sind als jene von Vertretern unterschiedlicher Habitats. Für die C23O-Sequenzen konnte dieses aber nicht gezeigt werden. Während die C23O-Sequenzen der beiden *P. putida* Isolate N30 und F aus Belebtschlammproben der Kläranlage Gießen um

etwa 10% differierten, waren die C23O-Sequenzen der beiden *P. fluorescens* Isolate A10 und C4, die aus unterschiedlichen Umweltproben isoliert wurden, nur zu etwa 1,0% unterschiedlich. Ebenso waren die C23O-Sequenzen der *Sphingomonas* Isolate E3, Y9 und H1b, die alle aus verschiedenen Habitaten isoliert wurden, mit einem maximalen Sequenzunterschied von 1,6% sehr gut konserviert. Die gute Übereinstimmung der C23O-Sequenzen bei geographisch voneinander isolierten Stämmen kann nicht auf horizontalen Gentransfer zurückgeführt werden.

Eine Erklärungsmöglichkeit für die teilweise gut konservierten C23O-Sequenzen bei Isolaten aus unterschiedlichen Habitaten einerseits und die zum Teil größeren Sequenzunterschiede bei Isolaten aus dem gleichen Habitat auf der anderen Seite ist die Existenz von multiplen C23O-Gensequenzen bei gemeinsamen Vorfahren dieser Stämme. Die Entstehung von multiplen C23O können auf Genduplikationen der entsprechenden Sequenzabschnitte mit anschließender Divergenz durch Akkumulation von Mutationen auf den duplizierten Genen, die keinem selektiven Druck unterlagen, zurückgeführt werden (Kitayama *et al.*, 1996). Bei verschiedenen Stämmen blieben, vermutlich nach dem Zufallsprinzip, unterschiedliche Genkopien für die C23O-Funktion erhalten. Möglich ist auch, daß, wie von Kitayama *et al.* (1996) für *P. aeruginosa* J1104 gezeigt, die DNA eines Stammes für mehrere isofunktionelle C23O codiert. Die mit einer C23O-gerichteten Sonde erhaltenen Hybridisierungssignale für die *P. fluorescens* Isolate A10 und H9 und für *P. putida* OUS 82 ließen vermuten, daß eventuell mehrere C23O-Kopien vorhanden waren (4.5.3).

Das Vorhandensein von homologen Genen kann durch Rekombinationsereignissen zu Hybriden und damit zu einer großen Sequenzvariabilität führen. Bei Eltis & Bolin (1996) wurde beschrieben, daß die C-terminale Domäne der C23O ($xyIE_{p_{wv0}}$) von *P. putida* mt-2 eine größere Übereinstimmung zu entsprechenden Sequenzabschnitten ($xyIE_{p_{DK1}}$) von *P. putida* HS1 hat, während der N-Terminus ähnlicher ist zu dem C23O-Gen (*nahH*) von *P. putida* pPG7. Sie führten die Entstehung des $xyIE_{p_{wv0}}$ auf Rekombinationsereignisse zwischen coexistierenden C23O-Gensequenzen zurück und nannten diesen Vorgang „Domänen swapping“.

4.6.2 Vergleich der N- und C-terminalen Regionen der C23O-Sequenzen

Der Vergleich der N- und C-terminalen Regionen der C23O-Sequenzen der in dieser Arbeit isolierten *Pseudomonas* Stämme läßt darauf schließen, daß auch einige dieser C23O-Sequenzen auf Rekombinationsereignisse zwischen homologen C23O-Genen zurückzuführen sind. Die C-terminalen Domänen stimmten bei den Isolaten T9, N3, N30, F9, C4, A10, F und *P. putida* OUS 82 und *P. putida* pPG7 mit maximalen Sequenzunterschieden von 5,6% gut überein. Im Gegensatz dazu gliederten sich die N-terminalen Sequenzen dieser Stämme in zwei Ähnlichkeitsgruppen. Die eine Gruppe mit

Sequenzähnlichkeiten zwischen 0,8 und 3,1% wurde von den Isolaten T9, N3, N30, F9, C4 und A10 gebildet und die andere Gruppe mit einer minimalen Sequenzübereinstimmung von 98,1% von Isolat F, *P. putida* OUS 82 und *P. putida* pPG7 (Tab. 13). Die N-terminalen Domänen dieser beiden Gruppen zeigten zueinander nur eine maximale Sequenzübereinstimmung von 83,4%. Möglich ist, daß die C23O-Sequenz von einem gemeinsamen Vorfahren der Isolate T9, N3, N30, F9, C4 und A10 Resultat eines Rekombinationsereignisses zwischen der gemeinsamen Ursprungssequenz des Isolates F und der Stämme *P. putida* OUS 82 und *P. putida* pPG7 und einer weiteren homologen C23O-Sequenz ist.

Generell zeigte sich, daß die C-Termini verschiedener C23O oft besser übereinstimmten als die N-Termini. Besonders auffällig war dies, wie unter 3.9.1 näher beschrieben, bei dem Vergleich von *Pseudomonas* und *Sphingomonas* C23O-Sequenzen. Möglich ist, daß aufgrund funktionell entscheidender Aminosäuren im C-terminalen Bereich des Enzyms der Selektionsdruck auf diese Genregion größer war als auf den N-terminalen Sequenzbereich. Tatsächlich liegen sieben der neun Aminosäuren, die bei verschiedenen extradiolen Dioxygenasen strikt konserviert sind (Eltis & Bolin, 1996), in der C-Domäne des Enzyms. Nach Eltis & Bolin (1996) sind diese Aminosäuren (Gly-28, His-146, Leu-165, His-195, His-210, His-241, Tyr-250, Pro-254 und Glu-260) essentiell für die katalytische Funktion, die Struktur des Enzyms oder für die Eigenschaft als Metalliganden. Es wurde schon von Candidus *et al.* (1994) und Spence *et al.* (1996) gezeigt, daß Histidin (His) essentiell ist für die Funktion von extradiolen Dioxygenasen. Die Behandlung mit dem Histidin-gerichteten Reagenz DEPC führte zu einer Inaktivierung des Enzyms. Als Metalliganden für die Bindung der Fe(II) Atom dienen, wie bei Duffner & Müller (1998) beschrieben, die strikt konservierten Aminosäuren His-146, His-210 und Glu-260.

Die anhand der Nukleinsäuresequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen der in dieser Arbeit sequenzierten PCR-Amplifikate zeigte, daß die genannten neun Aminosäuren auch in den C23O dieser Stämme konserviert waren.

4.6.3 Vergleich der C23O-Aminosäuresequenzen verschiedener *Pseudomonas* und *Sphingomonas* Stämme

Bei dem Vergleich der Aminosäuresequenzen wurde generell deutlich, daß der Sequenzunterschied auf Aminosäureebene zwischen den C23O von *Pseudomonaden* auf der einen und *Sphingomonaden* auf der anderen Seite größer war als auf Nukleinsäureebene. Daraus läßt sich ableiten, daß Mutationen, die zu den divergierenden Nukleinsäuresequenzen geführt haben, in allen drei Codonpositionen aufgetreten sind. Aufgrund des degenerierten genetischen Codes führt die Veränderung von Nukleotiden in der dritten Codonposition meist nicht zu einem Austausch der entsprechende Aminosäuren. Candidus *et al.* (1994) erwähnten ebenso, daß die Nukleinsäuresequenz der C23O von

R. rhodochrous CTM besser konserviert ist als die Aminosäuresequenz im Vergleich zu C23O-Nuklein-/Aminosäuresequenzen von verschiedenen *Pseudomonas*. Sie sahen darin einen Hinweis für einen gemeinsamen Ursprung der C23O-Sequenzen. Bei einer konvergenten Entwicklung von Enzymen gleicher Funktion wäre anzunehmen, daß die Sequenzen auf Aminosäureebene besser konserviert sind als auf Nukleinsäureebene.

In der Gesamtheit kann aus den Ergebnissen der Sequenzierung geschlossen werden, daß die C23O-Sequenzen der *Pseudomonas* und *Sphingomonas* Vertreter von einer gemeinsamen Ursprungssequenz abstammten. Durch divergente Entwicklung der Gensequenzen einerseits und Genduplikationen und Rekombinationsereignisse andererseits sind eine Vielzahl mehr oder weniger ähnlicher C23O-Sequenzen entstanden.

4.6.4 C23O-codierende Sequenzen in Anreicherungskulturen mit Naphthalin

Aus den gewonnenen Sequenzdaten der PCR-Amplifikate, die aus einer Anreicherungskultur mit Naphthalin gewonnen wurden, kann geschlossen werden, daß unterschiedliche *Pseudomonas* Stämme in diesen Kulturen selektiv angereichert wurden. Die Sequenzen der ansequenzierten PCR-Fragmente sind untereinander nicht identisch, aber zum Teil sehr ähnlich zu C23O-codierenden Abschnitten verschiedener *Pseudomonas* Stämme.

Ausgangsmaterial für die Anreicherungskultur war eine Belebtschlammprobe der Gießener Kläranlage. Aus diesem Habitat wurden durch selektive Anreicherung auch drei *Pseudomonas* Stämme (Isolat A10, F und N30) isoliert. Bei dem Vergleich der N-terminalen Sequenzbereiche der klonierten PCR-Fragmente aus der Anreicherungskultur zeigte sich, daß die Sequenzen von MP2 und MP18 ähnlicher waren zu den Sequenzen der Isolate A10 und N30, während MP3, 6, 10 und 15 besser mit der C23O-Sequenz von Isolat F übereinstimmten. Wie bei den C23O-Sequenzen der *Pseudomonas* Isolate zeigten die C-terminalen Bereiche aller sequenzierten PCR-Amplifikate eine gute Übereinstimmung. Die erfaßten unterschiedlichen C23O-Sequenzen in der Anreicherungskultur spiegeln somit die Sequenzvariabilitäten, die für die Isolate A10, F und N30 vorhanden waren, wider.

Obwohl auch ein Vertreter der Gattung *Sphingomonas* aus Belebtschlamm der Kläranlage Gießen isoliert wurde, zeigte keine der Sequenzen große Übereinstimmung zu C23O-Sequenzen von *Sphingomonas* Vertretern. Dieses Ergebnis entspricht den Hybridisierungsergebnissen mit den *Pseudomonas*- und *Sphingomonas*-spezifischen Sonden. Die Hybridisierung hatte ergeben, daß auch Stämme mit „*Sphingomonas*-ähnlichen C23O-Sequenzen“ in der Anreicherungskultur mit Naphthalin vorhanden waren, aber in einer etwa 100fach geringeren Konzentration als Bakterienstämme mit „*Pseudomonas* ähnlichen C23O-Sequenzen“. Demnach war es unwahrscheinlich, daß bei der Sequenzierung einer begrenzten Anzahl von klonierten PCR-Fragmenten die „*Sphingomonas* ähnlichen C23O-Sequenzen“ erfaßt wurden.

4.6.5 Sequenzierung der PCR-Amplifikate aus verschiedenen Naphthalin-abbauenden Rhodokokken Stämmen

Die Sequenzen der mit dem Primerpaar RHD23OF/RHD23OR erhaltenen PCR-Amplifikate von verschiedenen Naphthalin-abbauenden Rhodokokken Stämmen sind sehr ähnlich. Da auch bei relativ hohen *annealing*-Temperaturen für einige *Rhodococcus* Stämme deutliche PCR-Amplifikate erhalten wurden, kann man annehmen, daß zumindest die Primerbindungsstellen bei diesen Stämmen konserviert sind. Da die erhaltenen Amplifikate nicht der erwarteten Länge entsprachen, müssen diese Bindungsstellen im Vergleich zu der C23O-Sequenz von *R. rhodochrous* NCIMB 13064 anders lokalisiert gewesen sein. Da mit 55% Sequenzähnlichkeit nur eine relativ geringe Übereinstimmung zu der C23O-Sequenz von *R. rhodochrous* NCIMB 13064 vorlag, ist aber generell fraglich, ob diese Sequenzen auf einen gemeinsamen Ursprung zurückzuführen sind, oder die Übereinstimmungen in den Primersequenzen zufällig waren. Ebenso ist nicht geklärt, ob die amplifizierten und sequenzierten Abschnitte funktionellen Genbereichen entsprechen. Das durchgängige Leseraster über 435 bp läßt jedoch vermuten, daß es sich hier um codierende Bereiche handelt.

Die gute Konservierung dieses Sequenzabschnittes in geographisch voneinander getrennten Naphthalin-abbauenden Rhodokokken Stämmen legt die Vermutung nahe, daß die sequenzierten Bereiche für ein am Naphthalinabbau beteiligtes Enzym codieren. Durch die Sequenzierung von angrenzenden Sequenzbereichen könnte diese Frage geklärt werden.

4.7 Detektion von PAK-Abbaupotential in Belebtschlammproben

Zur Detektion von PAK-Abbaupotential in Belebtschlammproben wurden die entwickelten und getesteten PCR-Primer zur Amplifikation C23O-codierender Bereiche in Kombination mit einem Primerpaar, welches Genabschnitte der initialen Dioxygenase detektierte, eingesetzt. Es wurde gezeigt, daß, aufgrund der heterologen Sequenzen der initialen Dioxygenase, das entsprechende Gen bei verschiedenen *Pseudomonas* Stämmen nachgewiesen werden konnte, nicht aber bei Bakterien anderer Gattungen (Meyer *et al.*, 1999). In Übereinstimmung mit den C23O-Sequenzen scheint dieses Gen also innerhalb der Gattung *Pseudomonas* gut konserviert zu sein, während die Sequenz bei anderen Gattungen zu stark differieren, um sie universell mit dem gleichen Primerpaar zu erfassen.

Herrick *et al.* (1997) fanden große Übereinstimmungen von *nahAc*-Genen (große Eisen-Schwefel-Untereinheit der initialen Dioxygenase) verschiedener isolierter Bakterien-stämme eines mit Teeröl kontaminierten Standortes und begründeten dieses Ergebnis mit natürlichem horizontalen Transfer dieser Plasmid-codierten Gene. Es wurden hier allerdings nur Isolate berücksichtigt, die der Gattung *Pseudomonas* zugehörig waren. Im Gegensatz dazu zeigten Wilson *et al.* (1999) mittels einer kultivierungsunabhängigen Methode, daß Naphthalin-katabolische Gene divers sind. Es muß also davon ausgegangen werden, daß

mit dem eingesetzten Primerpaar zur Erfassung von Sequenzen der initialen Dioxxygenase nur *Pseudomonas*-homologe Abschnitte erfaßt werden können.

4.7.1 Isolierung von DNA aus Umweltproben

Zur Detektion von bestimmten Gensequenzen in Umweltmaterial ist die Extraktion von Nukleinsäuren notwendig. Die in der Literatur beschriebenen Protokolle zur Isolierung von DNA aus Boden-, Wasser- oder Sedimentproben beruhen alle auf dem gleichen Prinzip: Zellaufschluß und anschließende Trennung der freigesetzten Nukleinsäuren von Proteinen und anderen Zellbestandteilen. Hinsichtlich der Zellaufschlußverfahren unterschieden sich die Methoden geringfügig voneinander. Tsai & Olson (1991) und Herrick *et al.* (1993) lysierten die Zellen durch Lysozym-, SDS- und Wärme-Kälte-Behandlung. Wikström *et al.* (1996) setzten die gleichen Methoden ein, verzichteten aber auf den Lysozym-Schritt. Zhou *et al.* (1996) setzten nur SDS und Proteinase K für den Zellaufschluß ein. Basierend auf diesen Methoden wurde für die beiden entwickelten Protokolle zur Isolierung von DNA aus Belebtschlammproben eine Kombination aus Lysozym, SDS und Proteinase K eingesetzt (2.15.3). Durch eine zusätzliche mechanische Behandlung der Zellen im Ultraschallbad konnte keine erhöhte Ausbeute an extrahierter DNA registriert werden. Offensichtlich war die chemische und enzymatische Behandlung für einen optimalen Zellaufschluß ausreichend.

Die Trennung der freigesetzten Nukleinsäuren von Proteinen und anderen Zellbestandteilen erfolgte hier, analog zu den meisten Isolierungsprotokollen, durch Phenolisierung und Chloroformierung oder durch CTAB-Behandlung. Die Menge an extrahierter DNA war bei beiden Methoden vergleichbar. Es konnte jedoch nicht, wie bei Zhou *et al.* (1996) beschrieben, festgestellt werden, daß die durch die CTAB-Methode isolierte DNA heller in der Farbe war als die durch Phenolisierung und Chloroformierung extrahierte DNA. Nach Zhou *et al.* (1996) ist die hellere Färbung auf die Entfernung der Huminstoffe aus der DNA-Präparation durch die CTAB-Behandlung zurückzuführen. Die coextrahierten Huminstoffe und andere hochmolekulare Substanzen hemmen nachhaltig die PCR und führen so zu falsch-negativen Ergebnissen, wenn sie nicht zuvor aus den DNA-Aufarbeitungen entfernt wurden (Tsai & Olson 1992; Tebbe & Vahjen, 1993). Die starke Braunfärbung der isolierten DNA und die nachhaltige Hemmung der PCR durch Aliquote dieses Rohextraktes ließen darauf schließen, daß auch mittels der CTAB-Methode Huminstoffe und andere PCR-hemmende Substanzen aus der Belebtschlammprobe der Kläranlage Gießen coextrahiert wurden.

Tsai & Olson (1992) zeigten, daß der Zusatz von 1 µl DNA-Rohextrakt, isoliert aus Boden- und Sedimentproben, oder 10 ng reine Huminsäuren die Amplifikation von Zielsequenzen in einem 100-µl PCR-Ansatz inhibierten. Da schon 1 µl des 10-fach verdünnten DNA-Rohextraktes, isoliert aus Belebtschlamm der Kläranlage Gießen, für eine vollständige

Hemmung der PCR (50- μ l Reaktionsgemisch) ausreichend waren, wurde davon ausgegangen, daß aus dieser Umweltprobe große Mengen PCR-hemmender Substanzen coextrahiert wurden.

4.7.2 Aufreinigung der extrahierten DNA und Einsatz der gereinigten DNA in der PCR

Die Entfernung der Hemmstoffe aus den DNA-Präparationen stellte sich als problematisch dar. Zwar führten die Aufreinigungsschritte zur Entfernung der braunen Farbe der DNA-Extrakte, aber die Aufreinigung war auch mit großen Verlusten der DNA-Mengen verbunden. Die getesteten Aufreinigungsmethoden basierten auf Techniken, die in der Literatur als geeignet für die Aufreinigung der DNA-Rohextrakte beschrieben wurden. Von Herrick *et al.* (1993) wurde die aus Sedimentproben isolierte DNA durch ein PVPP-haltiges Agarose-Gel von PCR-hemmenden Substanzen gereinigt. In dieser Arbeit zeigte sich, daß die auf dieser PVPP basierende Aufreinigungsmethode zu sehr großen DNA-Verlusten führte und keine C23O-codierenden Sequenzabschnitte in der gereinigten DNA-Präparation detektiert werden konnten. Auch von Zhou *et al.* (1996) wurde erwähnt, daß die Verwendung von PVPP zu DNA-Verlusten führte. Von Herrick *et al.* (1993) wurden keine Aussagen über die DNA-Verluste bei dieser Methode gemacht, jedoch wurde die so gereinigte DNA anschließend erfolgreich zur Amplifikation von *nahA*-codierenden Sequenzabschnitten eingesetzt. Geht man davon aus, daß auch hier die Aufreinigungsschritte zu einer Minimierung der ursprünglichen DNA-Menge und damit der Zielsequenzen führten, muß die Zahl der entsprechenden Zielsequenzen in der Umweltprobe sehr hoch gewesen sein, um das positive Ergebnis der PCR zu erklären.

Von Zhou *et al.* (1996) wurden zur Aufreinigung *Wizard* Minisäulchen der Firma Promega (Madison, WI, USA) verwendet. Nach ihren Angaben führte das Verfahren zu einer 20%igen Reduzierung der ursprünglichen DNA-Mengen. Die Anwendung dieser Methode und der anschließende Einsatz der aufgereinigten DNA in der PCR führte nicht zur erfolgreichen Amplifizierung C23O-codierender Genabschnitte. Vermutlich waren hier die DNA-Verluste höher als von Zhou *et al.* (1996) beschrieben, so daß die Zahl der Zielsequenzen für eine Detektion nicht mehr ausreichten. Ein Erklärungsansatz für diese größeren Verluste wurde ebenso von Zhou *et al.* (1996) geliefert. Sie stellten fest, daß die Verluste bei der DNA-Aufarbeitung mit der Menge vorhandener Huminstoffe in den DNA-Extrakten korrelierte. Sie zeigten, daß die Huminstoffe eventuell mit der DNA um die Bindung an die Säulenmatrix konkurrierten. Wie erwähnt, lassen die starken PCR-hemmenden Effekte auf eine hohe Konzentration an Huminstoffen in den DNA-Rohextrakten, isoliert aus Belebtschlamm der Kläranlage Gießen, schließen. Diese hohen Konzentrationen könnten möglicherweise die hohen DNA-Verluste bei der Aufreinigung verursacht haben.

Eventuell war die gleiche Ursache verantwortlich für die Reduzierung der DNA-Menge bei der Silica-Aufreinigung der DNA-Rohextrakte, wie sie von Boyle & Lew (1995) beschrieben wurde.

Wurde zur Kompensierung der DNA-Verluste ein größeres Volumen der gereinigten DNA für die PCR-Reaktion eingesetzt, konnten ebenso keine DNA-Fragmente amplifiziert werden. Vermutlich konnten die PCR-hemmenden Substanzen auch durch die Aufreinigungsschritte nicht vollständig entfernt werden.

Bei dem Isolierungsprotokoll nach Wikström *et al.* (1996) fand die Aufreinigung der DNA bereits während der DNA-Extraktionsphase statt. Der verwendete Lysepuffer enthielt sowohl PVPP als auch CTAB und die DNA-Aufarbeitung wurde in Ultrafree-CL-Filtern der Firma Millipore (Eschborn) durchgeführt. In der DNA, die mittels dieser Methode aus Belebtschlamm extrahiert wurde, konnten über die PCR keine C230-codierenden Abschnitte detektiert werden. Von Wikström *et al.* (1996) wurde dieses Protokoll zur Isolierung von DNA aus verschiedenen Bodenproben mit unterschiedlichem Gehalt an organischem Material angewendet. Sie zeigten, daß die PCR mit DNA-Extrakten, isoliert aus einer Bodenprobe mit hohem organischen Gehalt, nicht zur Amplifizierung der Zielsequenzen führte. Sie führten dieses Ergebnis auf die Coextraktion von PCR-hemmenden Substanzen zurück. Wurde die gleiche Bodenprobe einem weiteren Elutionsschritt mit einer Pufferlösung mit erhöhter Salzkonzentration (1M NH₄Cl statt 0,6 M NaCl im ersten Elutionsschritt) unterworfen, wurden nur noch sehr geringe Mengen an DNA extrahiert. Der Einsatz dieser DNA führte bei Wikström *et al.* (1996) zu schwachen PCR-Amplifikaten.

Da für die Belebtschlammproben ebenso ein hoher Gehalt an organischem Material angenommen wurde, wurden auch hier weitere Eluierungsschritte mit steigenden Salzkonzentrationen vorgenommen. Die Elution mit 1 M NH₄Cl oder Puffern höherer Salzkonzentrationen führte aber weiterhin nicht zu positiven PCR-Ergebnissen. Daraus kann geschlossen werden, daß die Zahl der Zielsequenzen in der zweiten Fraktion unterhalb der Detektionsgrenze lag oder daß auch mit dem zweiten Eluierungsschritt PCR-hemmende Substanzen coextrahiert wurden.

4.7.3 Detektion von C230- und initiale Dioxygenase-codierenden Genabschnitten

Obwohl die Isolierungsergebnisse gezeigt hatten, daß Bakterienstämme mit den entsprechenden Zielsequenzen in der untersuchten Umweltprobe vorhanden waren, konnten diese Sequenzen nicht kultivierungsunabhängig nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis wurde auf die geringe Zahl der Zielsequenzen und die starke Hemmung der PCR durch coextrahierte Substanzen zurückgeführt.

Im Gegensatz zu den C230-codierenden Bereichen war es möglich, codierende Abschnitte der initialen Dioxygenase in der Belebtschlammprobe nachzuweisen. Die extrahierte DNA

wurde dazu nicht in aufgereinigter Form, sondern die DNA-Rohextrakte in einer 100fachen Verdünnung eingesetzt. Die Verwendung der DNA aus der gleichen Aufarbeitung und derselben Verdünnung führte nicht zur Amplifizierung C23O-codierender Bereiche. D.h., es müssen mehr Zielsequenzen für die initiale Dioxygenase als für die C23O in der DNA-Präparation der Belebtschlammprobe vorgelegen haben. Dieses Ergebnis ist insofern überraschend, weil die C23O ein Enzym ist, daß beim Abbau sowohl aromatischer als auch polyaromatischer Verbindungen so gut wie universell ist, die initiale Dioxygenase dagegen nur am Abbau von Polyaromaten beteiligt ist. Außerdem wurden mit dem eingesetzten Primerpaar zur Amplifizierung C23O-codierender Abschnitte Sequenzen von Pseudomonaden und Sphingomonaden erfaßt, während der Einsatz des Primerpaares für die initiale Dioxygenase nur bei Isolaten der Gattung *Pseudomonas* zur Amplifizierung entsprechender Sequenzabschnitte geführt hatte.

Nachgewiesen werden müßte, ob spezifisch initiale Dioxygenase-Abschnitte detektiert wurden oder ob eventuell weitere ähnliche Sequenzabschnitte mit erfaßt wurden.

Die unterschiedlichen Ergebnisse bei dem Nachweis der beiden katabolischen Gene ist nicht darauf zurückzuführen, daß die Detektionsgrenze für die beiden Gene unterschiedlich war. Es hatte sich gezeigt, daß der Einsatz der beiden Primerpaare dann zur Amplifikation der entsprechenden Zielsequenzen führte, wenn in der PCR mindestens 1 µl der aus 10^3 *P. putida* NCIMB 9816 Zellen isolierten DNA eingesetzt wurde. Umgerechnet auf das PCR-Volumen entspricht dieses einem Detektionslimit von 20 Zielsequenzen pro PCR-Ansatz. Dieser Wert ist vergleichbar mit den in der Literatur angegebenen Werten. Tsai & Olson (1992) registrierten für die Amplifikation von 16S rRNA Zielsequenzen eine Detektionsgrenze von 21 Kopien und Tebbe & Vahjen (1993) kamen auf eine Nachweisgrenze von 40 Kopien.

Die Untersuchung von weiteren Belebtschlammproben aus anderen Kläranlagen hatte gezeigt, daß es generell möglich war, mit den verwendeten Primern auch C23O-codierende Abschnitte nachzuweisen. Allerdings waren in allen Fällen die PCR-Amplifikate so schwach, daß sie nur nach Hybridisierung mit einer internen Oligonukleotidsonde nachgewiesen werden konnten.

Die Zahl der C23O-Zielsequenzen war in diesen Umweltproben offensichtlich höher oder die Konzentrationen an coextrahierten PCR-hemmenden Substanzen war geringer als in DNA-Rohextrakten aus der Belebtschlammprobe der Gießener Kläranlage.

4.7.4 Probleme bei der Detektion von C23O-codierenden Genabschnitten

Die Probleme bei der Detektion von PAK-Abbauern in den Belebtschlammproben durch den Nachweis C23O-codierender Gene beruhten folglich auf der geringen Zahl der Zielsequenzen einerseits und der Hemmung der PCR durch coextrahierte Substanzen andererseits. Die Aufreinigung der Roh-DNA führte zu starken Verlusten der

ursprünglichen DNA-Menge und somit zu einer weiteren Verringerung der Zielsequenzen. Ebenso wurden die Hemmeffekte auf die PCR durch die Aufreinigung der DNA, z.B. der Silica-Reinigung, nicht vollständig beseitigt. Zur Detektion von katabolischen Genen, die in geringen Konzentrationen in Umweltproben vorliegen, müssen folglich spezielle Methoden zur Aufreinigung der extrahierten DNA etabliert werden. Die Verluste bei der Aufreinigung sowie die Hemmeffekte auf die PCR müssen dabei gering gehalten werden. Alternativ können PCR-Additive auf ihre Eignung, die PCR-Hemmeffekte zu minimieren, getestet werden. Von Tebbe & Vahjen (1993) wurde beschrieben, daß durch Zusatz des DNA-Einzelstrang-stabilisierenden Gene-32-Proteins des T4-Phagens bei der PCR die *Taq*-Polymerase durch coextrahierte Huminstoffe weniger stark gehemmt wurde. Für die PCR-Amplifikation kann somit eine größere Menge aus Umweltproben extrahierter DNA als *template* eingesetzt werden.

4.8 Schlußfolgerung und Ausblick

Der Nachweis von PAK-Abbaupotential in Umweltproben kann durch die selektive Anreicherung von Mikroorganismen in PAK-haltigem Medium erfolgen. Es zeigte sich aber, daß hierbei vermutlich immer bevorzugt nur Vertreter weniger Gattungen kultiviert wurden. Um ein genaueres Bild der in der natürlichen Umwelt vorkommenden Bakterien mit PAK-Abbaufähigkeit zu erhalten, wäre es somit sinnvoll, verschiedene Isolierungsstrategien mit Fest- und Flüssigmedien unterschiedlicher Zusammensetzung zu verwenden. Ein generelles Problem bei den Anreicherungskulturen besteht darin, daß nur ein geringer Anteil der Mikroorganismen durch Standardverfahren kultivierbar ist. Die Methode der Wahl zur Detektion von Bakterien mit PAK-Abbaupotential ist aus diesem Grund ein kultivierungsunabhängiges Nachweisverfahren. Diese Verfahren beruhen darauf, daß Gene, die für Schlüsselenzyme des PAK-Abbaus codieren, nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, daß die Zielsequenzen der zu detektierenden Gene zum Teil sehr heterogen und aus diesem Grund nicht universell nachweisbar sind. Zur Detektion einer großen Anzahl potentieller PAK-Abbauer müßten auf der Basis neu hinzukommender Sequenzdaten weitere Primer und Sonden entwickelt werden. Diese könnten dann in Kombination mit den in dieser Arbeit entwickelten Primern und Sonden eingesetzt werden, um so umfassende Informationen über die in der natürlichen Umwelt vorkommenden potentiellen PAK-Abbauer zu liefern.

Der Nachweis von funktionellen Genabschnitten in DNA-Extrakten, isoliert aus Belebtschlammproben, hatte sich aufgrund der geringen Konzentration dieser Gene und der stark hemmenden Effekte coextrahierter Substanzen teilweise als problematisch dargestellt. Effizientere Methoden zur Aufreinigung der DNA-Rohextrakte müssen etabliert werden, um die Nachweisgrenze für die zu detektierenden Genabschnitte gering zu halten.

Eine alternative Methode für den Nachweis bestimmter Genabschnitte ist die *in situ* PCR.

Diese Methode liefert nicht nur Informationen darüber, ob in der untersuchten Umweltprobe Mikroorganismen, die genetische Information für den Abbau von Polyaromaten besitzen, vorhanden sind, sondern sie ermöglicht ebenso eine genaue Quantifizierung der PAK-Abbauer. Die *in situ* PCR zum funktionsspezifischen Nachweis einzelner Bakterienzellen ist in der Literatur beschrieben (Hodson *et al.*, 1995; Tani *et al.*, 1998), aber methodische Weiterentwicklungen zur Etablierung dieser Methode sind notwendig.

Bei Anwendung dieser Methode in Kombination mit der *in situ* Hybridisierung mit Gattungs- oder Spezies-spezifischen Sonden wäre es so möglich, ein differenziertes Bild der PAK-abbauenden Bakterien in der Umwelt zu bekommen.

5 Zusammenfassung

Zielsetzung der Arbeit war der Nachweis von PAK-abbauenden Mikroorganismen in Umweltproben mittels klassischer mikrobiologischer Arbeitstechniken und molekularbiologischer Methoden.

Durch selektive Anreicherung wurden Bakterien mit der Fähigkeit Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) abzubauen, in aquatischen und terrestrischen Umweltproben nachgewiesen. Unabhängig von der Belastung der Standorte mit PAK wurden aus allen untersuchten Habitaten Bakterien isoliert, die mit Naphthalin oder Phenanthren als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen konnten.

Die 23 isolierten PAK-abbauenden Bakterien konnten als Mitglieder der Gattungen *Sphingomonas*, *Acidovorax*, *Comamonas*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* und *Paenibacillus* identifiziert werden und waren somit den alpha-, beta- und gamma-Subklassen der Proteobakterien und den Entwicklungslinien der grampositiven Bakterien mit hohem und niedrigem GC-Gehalt der DNA zuzuordnen. Die größte Gruppe bildeten mit 10 der 23 Isolate Vertreter der Gattung *Pseudomonas*, die alle Naphthalin metabolisierten.

Die Quantifizierung des Naphthalin-Abbaus mittels gaschromatographischer Verfahren zeigte, daß in Flüssigmedium vorhandenes kristallines Naphthalin (0,05%, w/v) von den meisten Stämmen nach nur zwei Tagen Kultivierungsdauer vollständig metabolisiert wurde. Die getesteten *Rhodococcus* Isolate bauten Naphthalin wesentlich langsamer ab, als die verschiedenen Isolate, die den Proteobakterien zugeordnet wurden. Der dreikernige Aromat Phenanthren wurde von den getesteten Bakterienstämmen langsamer abgebaut als Naphthalin. Innerhalb von fünf Tagen wurde die Phenanthrenmenge im Medium auf 40-60% der Ausgangsmenge reduziert.

Die Untersuchung des Naphthalinabbaus durch Zellen, die zuvor in Naphthalin-haltigem Medium bzw. in Vollmedium vorkultiviert worden waren, ergab, daß die Enzyme für den Abbau von Naphthalin in Abwesenheit eines Induktors nicht exprimiert wurden. Ebenso zeigte sich, daß Zellen, die in Medium mit Naphthalin oder Phenanthren kultiviert wurden, wesentlich höhere Catechol 2,3-Dioxygenase (C23O)-Aktivitäten aufwiesen als in Vollmedium gewachsene Zellen.

Zum Nachweis von PAK-Abbauern auf molekulargenetischer Ebene wurden, basierend auf bekannten Sequenzen, PCR-Primer und Oligonukleotidsonden für codierende Abschnitte der C23O entwickelt, und, in Kombination mit Primern und Oligonukleotidsonden, zur Detektion der initialen PAK-Dioxygenase (entwickelt von R. Moser, TU-Berlin), eingesetzt. Mit den entworfenen Primern und Sonden konnten die C23O-Sequenzabschnitte bei allen PAK-abbauenden Referenzstämmen und Isolaten, die der Gattung *Pseudomonas* und *Sphingomonas* zugehörten, spezifisch detektiert werden. Durch die Anwendung

spezifischer Primer und Sonden konnten dabei die Gene der C23O für Vertreter der Pseudomonaden und Sphingomonaden getrennt voneinander erfaßt werden.

Sequenzanalysen der erhaltenen PCR-Amplifikate zeigten, daß die C23O-Gene innerhalb der Gattungen *Pseudomonas* bzw. *Sphingomonas* mit über 75% Sequenzähnlichkeit sehr gut konserviert sind. Dagegen waren Sequenzen der katabolischen Gene der PAK-abbauenden *Comamonas*-, *Acidovorax*- oder *Rhodococcus*-Vertreter offensichtlich zu verschieden, verglichen mit den *Pseudomonas*- und *Sphingomonas*-Sequenzen, um sie mittels der entwickelten Primer und Sonden detektieren zu können. Die Diversität der C23O zeigte sich auch bei der spezifischen enzymatischen Aktivität, die im Bereich von 0,1 bis 650 mU mg⁻¹ Protein variierte. Dabei wurde die höchste spezifische Aktivität für verschiedene *Pseudomonas*-Stämme nachgewiesen.

Die entwickelten Primer wurden auf ihre Anwendbarkeit getestet, PAK-abbauende Bakterien in Umweltproben kultivierungsunabhängig zu detektieren. Verschiedene DNA-Isolierungsmethoden und Techniken zur Aufreinigung der isolierten DNA wurden getestet und variiert. Bei der DNA-Isolierung aus Belebtschlammproben wurden Substanzen coextrahiert, die stark hemmenden Einfluß auf die PCR hatten. Die weitere Aufreinigung der DNA führte zu starken Verlusten der ursprünglichen DNA-Mengen und damit zu einer Reduzierung der zu detektierenden Zielsequenzen.

Die extrahierte und gereinigte DNA aus unterschiedlichen Belebtschlammproben wurde in der PCR zur Detektion von initiale Dioxygenase- und C23O-codierenden Genabschnitten eingesetzt. Während codierende Bereiche der initialen Dioxygenase in der Belebtschlammprobe der Kläranlage Gießen mit den entwickelten Primern nachgewiesen werden konnten (R. Moser, TU-Berlin), wurden bei der Verwendung der C23O-spezifischen Primer keine PCR-Amplifikate erhalten. Offensichtlich lag die Zahl der C23O-Zielsequenzen in den untersuchten Umweltproben unterhalb des Detektionslimits. In der extrahierten DNA aus anderen Belebtschlammproben konnten C23O-codierende Abschnitte detektiert werden. Die erhaltenen PCR-Amplifikate waren aber in allen Fällen sehr schwach. Die Ergebnisse zeigen, daß zur Detektion von katabolischen Genen, die in geringen Konzentrationen in Umweltproben vorliegen, spezielle Methoden zur Aufreinigung der DNA-Rohextrakte etabliert werden müssen.

6 Literaturverzeichnis

- Aitken, M. D., Stringfellow, W. T., Nagel, R. D., Kazunga, C. & Chen, S.-H. (1998). Characteristics of phenanthrene-degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Can J Microbiol* **44**, 743-752.
- Allen, C. C. R., Boyd, D. R., Larkin, M. J., Reid, K. A., Sharma, N. D. & Wilson, K. (1997). Metabolism of naphthalene, 1-naphthol, indene, and indole by *Rhodococcus* sp. Strain NCIMB 12038. *Appl Environ Microbiol* **63**, 151-155.
- Altschul, S. F., Boguski, M. S., Gish, W. & Wootton, J. C. (1994). Issues in searching molecular sequence databases. *Nature genetics* **6**, 119-129.
- Amann, R. I., Krumholz, L. & Stahl, D. A. (1990). Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J Bacteriol* **172**, 762-770.
- Amann, R. I., Ludwig, W., Schulze, R., Spring, S., Moore, E. & Schleifer, K.-H. (1996). rRNA-targeted oligonucleotide probes for the identification of genuine and former Pseudomonads. *Syst Appl Microbiol* **19**, 501-509.
- Aoki, H., Kimura, T., Habe, H., Yamane, H., Kodama, T. & Omori, T. (1996). Cloning, nucleotide sequence, and characterization of the genes encoding enzymes involved in the degradation of cumene to 2-hydroxy-6-oxo-7-methylocta-2,4-dienoic acid in *Pseudomonas fluorescens* IP01. *J Ferment Bioeng* **81**, 187-196.
- Arai, H., Akahira, S., Ohishi, T., Maeda, M. & Kudo, T. (1998). Adaption of *Comamonas testosteroni* TA441 to utilize phenol: organization and regulation of the genes involved in phenol degradation. *Microbiol* **144**, 2895-2903.
- Assinder, S. J. & Williams, P. A. (1988). Comparison of the *meta* pathway operons on NAH plasmid pWW60-22 and TOL plasmid pWW53-4 and its evolutionary significance. *J Gen Microbiol* **134**, 2769-2778.
- Barnsley, E. A. (1983). Bacterial oxidation of naphthalene and phenanthrene. *J Bacteriol* **153**, 1069-1071.
- Bartilson, M. & Shingler, V. (1989). Nucleotide sequence and expression of the catechol 2,3-dioxygenase encoding gene of phenol-catabolizing *Pseudomonas* CF600. *Gene* **85**, 233-238.
- Beil, S., Happe, B., Timmis, K. N. & Pieper, D. H. (1997). Genetic and biochemical characterization of the broad spectrum chlorobenzene dioxygenase from *Burkholderia* sp. strain PS12. Dechlorination of 1,2,4,5-tetrachlorobenzene. *Eur J Biochem* **247**, 190-199.
- Benjamin, R. C., Voss, J. A. & Kunz, D. A. (1991). Nucleotide sequence of *xyIE* from the TOL pDK1 plasmid and structural comparison with isofunctional catechol 2,3-dioxygenase genes from TOL pWW0 and NAH7. *J Bacteriol* **173**, 2724-2728.
- Bogardt, A. H. & Hemmingsen, B. B. (1992). Enumeration of phenanthrene-degrading bacteria by an overlay technique and its use in evaluation of petroleum-contaminated sites. *Appl Environ Microbiol* **58**, 2579-2582.
- Boldrin, B., Thiem, A. & Fritzsche, C. (1993). Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a *Mycobacterium* sp.. *Appl Environ Microbiol* **59**, 1927-1930.
- Boyle, J. S. & Lew, A. M. (1995). An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends in genetics* **11**, 8.
- Brinkmann, U., Ramos, J. L. & Reineke, W. (1994). Loss of the TOL *meta*-cleavage pathway functions of *Pseudomonas putida* strain PaW1 (pWW0) during growth on toluene. *J Basic Microbiol* **34**, 303-309.
- Brodkorb, T. S. & Legge, R. L. (1992). Enhanced biodegradation of phenanthrene in oil tar-contaminated soils supplemented with *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* **58**, 3117-3121.
- Brosius, J., Dull, T. L. & Noller, H. F. (1981). Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **148**, 107-127.
- Buluwela, L., Forster, A., Boehm, T. & Rabbitts, T. H. (1989). A rapid procedure for colony screening using nylon filters. *Nucleic Acids Res* **17**, 452.

- Candidus, S., Pee, K.-H. & Lingens, F. (1994).** The catechol 2,3-dioxygenase gene of *Rhodococcus rhodochrous* CTM: nucleotide sequence, comparison with isofunctional dioxygenases and evidence for an active-site histidine. *Microbiol* **140**, 321-330.
- Cane, P. A. & Williams, P. A. (1986).** A restriction map of naphthalene catabolic plasmid pWW60-1 and the location of some of its catabolic genes. *J Gen Microbiol* **132**, 2919-2929.
- Carrington, B., Lowe, A., Shaw, L. E. & Williams, P. A. (1994).** The lower pathway operon for benzoate catabolism in biphenyl-utilizing *Pseudomonas* sp. strain IC and the nucleotide sequence of the *bphE* gene for catechol 2,3-dioxygenase. *Microbiol* **140**, 499-508.
- Cerniglia, C. E. (1984a).** Microbial transformation of aromatic hydrocarbons. In *Petroleum Microbiology*, pp. 99-128. Edited by R. M. Atlas. New York: Macmillan.
- Cerniglia, C. E. (1984b).** Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Adv Appl Microbiol* **30**, 31-71.
- Cerniglia, C. E. & Heitkamp, M. A. (1989).** Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the aquatic environment. In *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*. Edited by U. Varansi. Boca Raton: CRC Press.
- Cerniglia, C. E. (1992).** Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* **3**, 351-368.
- Chatfield, L. K. & Williams, P. A. (1986).** Naturally occurring TOL plasmids in *Pseudomonas* strains carry either two homologous or two nonhomologous catechol 2,3-oxygenase genes 168. *J Bacteriol* **168**, 878-885.
- Dagley, S. (1986).** Biochemistry of aromatic hydrocarbon degradation in *Pseudomonas*. In *The bacteria*, pp. 527-556. Edited by I. C. Gunsalus, J. R. Sokatch & L. Ornston. New York: Academic Press.
- Demeter, K. (1952).** *Bakteriologische Untersuchungsmethoden der Milchwirtschaft*. Stuttgart: Ulmer Verlag.
- Doetsch, R. N. (1981).** Determinative methods in light microscopy. In *Manual of methods for general microbiology*, pp. 21-33. Edited by P. Gerhardt, R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg & E. B. Phillips. Washington D.C.: American Society of Microbiology.
- Duffner, F. M. & Müller, R. (1998).** A novel phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase from the thermophilic *Bacillus thermoleovorans* strain A2: nucleotide sequence and analysis of the genes. *FEMS Microbiol Lett* **161**, 37-45.
- Eck, R. & Belter, J. (1993).** Cloning and characterization of a gene coding for the catechol 1,2-dioxygenase of *Arthrobacter* sp. mA3. *Gene* **123**, 87-92.
- Ehrt, S., Schirmer, F. & Hillen, W. (1995).** Genetic organization, nucleotide sequence and regulation of gene expression of genes encoding phenol hydroxylase and catechol 1,2-dioxygenase in *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB 8250. *Mol Microbiol* **18**, 13-20.
- Eltis, L. D. & Bolin, J. T. (1996).** Evolutionary relationships among extradiol dioxygenases. *J Bacteriol* **178**, 5930-5937.
- Ensley, B. D. & Gibson, D. T. (1983).** Naphthalene dioxygenase: purification and properties of a terminal oxygenase component. *J Bacteriol* **155**, 505-511.
- Ensley, B. D., Gibson, D. T. & Laborde, A. L. (1982).** Oxidation of naphthalene by multicomponent enzyme system from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816. *J Bacteriol* **149**, 948-954.
- Eulberg, D., Lakner, S., Golovleva, L. A. & Schlömann, M. (1998).** Characterization of a protocatechuate catabolic gene cluster from *Rhodococcus opacus* ICP: Evidence for a merged enzyme with 4-carboxymuconolactone-decarboxylating and 3-oxoadipate enol-lactone-hydrolyzing activity. *J Bacteriol* **180**, 1072-1081.
- Fleming, J. T., Sansaverino, J. & Saylor, G. S. (1993).** Quantitative relationship between naphthalene catabolic gene frequency and expression in predicting PAH degradation in soils at town gas manufacturing sites. *Envi. Sci Technol* **27**, 1068-1074.
- Franklin, F. C. H., Bagdasarian, M., Bagdasarian, M. M. & Timmis, K. N. (1981).** Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway. *Proc Natl Acad Sci* **78**, 7458-7462.

- Geiselbrecht, A. D., Hedlund, B. P., Tichi, M. A. & Staley, J. T. (1998). Isolation of marine polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading *Cycloclasticus* strains from the Gulf of Mexico and comparison of their PAH degrading ability with that of Puget Sound *Cycloclasticus* strains. *Appl Environ Microbiol* **64**, 4703-4710.
- Geiselbrecht, A. D., Herwig, R. P., Deming, J. W. & Staley, J. T. (1996). Enumeration and phylogenetic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading marine bacteria from puget sound sediments. *Appl Environ Microbiol* **62**, 3344-3349.
- Ghosal, D., You, I. S. & Gunsalus, I. C. (1987). Nucleotide sequence and expression of gene *nahH* of plasmid NAH7 and homology with gene *xylE* of TOL pWW0. *Gene* **55**, 19-28.
- Ghosh, D. K. & Mishra, A. K. (1983). Oxidation of phenanthrene by a strain of *Micrococcus*: Evidence of protocatechuate pathway. *Curr Microbiol* **9**, 219-224.
- Gibson, D. T., Roberts, R. L.; Wells, M. C. & Kobal, V. M. (1973). Oxidation of biphenyl by a *Beijerinckia* species. *Biochem Biophys Res Com* **50**, 211-219.
- Gibson, D. T. & Subramanian, V. (1984). Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In *Microbial degradation of organic compounds*, pp. 181-252. Edited by D. T. Gibson. New York: Dekker.
- Goyal, A. K. & Zylstra, G. J. (1996). Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39. *Appl Environ Microbiol* **62**, 230-236.
- Griebe, T., Schaule, G., Secker, J. & Flemming, H.-C. (1995). Bestimmung der stoffwechselfaktiven Bakterien im belebten Schlamm. *Wasser-Abwasser* **136**, 608-615.
- Grimmer, G., Brune, H., Dettbarn, G., Naujack, K.-W. & Wenzel-Hartung, R. (1988). Contribution of polycyclic aromatic compounds to the carcinogenicity of sidestream smoke of cigarettes evaluated by implantation into the lungs of rats. *Cancer Lett.* **43**, 173-177.
- Grimmer, G., Jacob, J., Dettbarn, G., Naujack, K.-W. & Heinrich, U. (1995). Urinary metabolite profile of PAH as a potential mirror of the genetic disposition for cancer. *Exp Toxic Pathol* **47**, 421-427.
- Grosser, R. J., Warshawsky, D. & Vestal, J. R. (1991). Indigenous and enhanced mineralization of pyrene, benzo[*a*]pyrene, and carbazole in soils. *Appl Environ Microbiol* **57**, 3462-3469.
- Grund, E., Denecke, B. & Eichenlaub, R. (1992). Naphthalene degradation via salicylate and gentisate by *Rhodococcus* sp. strain B4. *Appl Environ Microbiol* **58**, 1874-1877.
- Guerin, W. F. & Boyd, S. A. (1992). Differential bioavailability of soil-sorbed naphthalene to two bacterial species. *Appl Environ Microbiol* **58**, 1142-1152.
- Guerin, W. F. & Jones, G. E. (1988). Mineralization of phenanthrene by a *Mycobacterium* sp.. *Appl Environ Microbiol* **54**, 937-944.
- Hamzah, R. Y. & Al-Baharna, B. S. (1994). Catechol ring-cleavage in *Pseudomonas cepacia*: the simultaneous induction of *ortho* and *meta* pathways. *Appl Microbiol Biotechnol* **41**, 250-256.
- Harayama, S. & Rekik, M. (1989). Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. *J Biol Chem* **264**, 15328-15333.
- Harayama, S., Kok, M. & Neidle, E. L. (1992). Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu Rev Microbiol* **46**, 565-601.
- Harayama, S. & Timmis, K. N. (1992). Aerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. In *metal ions in biological systems.*, pp pp 99-156. Edited by H. Sigel & A. Sigel. New York: Marcel Dekker Inc.
- Hartnett, C., Neidle, E. L., Ngai, K.-L. & Ornston, L. N. (1990). DNA sequences of genes encoding *Acinetobacter calcoaceticus* protocatechuate 3,4-dioxygenase: Evidence indicating shuffling of genes and of DNA sequences within genes during their evolutionary divergence. *J Bacteriol* **172**, 956-966.
- Heitkamp, M. A. & Cerniglia, C. E. (1988). Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below an oil field. *Appl Environ Microbiol* **54**, 1612-1614.
- Heitkamp, M. A. & Cerniglia, C. E. (1989). Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a *Mycobacterium* sp. in microcosms containing sediment and water from a pristine ecosystem. *Appl Environ Microbiol* **55**, 1968-1973.
- Heitkamp, M. A., Franklin, W. & Cerniglia, C. E. (1988a). Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene degrading bacterium. *Appl Environ Microbiol* **54**, 2549-2555.

- Heitkamp, M. A., Freeman, J. P., Miller, D. W. & Cerniglia, C. E. (1988b). Pyrene degradation by a *Mycobacterium* sp.: Identification of ring oxidation and ring fission products. *Appl Environ Microbiol* **54**, 2556-2565.
- Herrick, J. B., Madsen, E. L., Batt, C. A. & Ghiorse, W. C. (1993). Polymerase chain reaction amplification of naphthalene-catabolic and 16S rRNA gene sequences from indigenous sediment bacteria. *Appl Environ Microbiol* **59**, 687-694.
- Herrick, J. B., Stuart-Keil, K. G., Ghiorse, W. C. & Madsen, E. L. (1997). Natural horizontal transfer of a naphthalene dioxygenase gene between bacteria native to a coal tar-contaminated field site. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2330-2337.
- Herrmann, H., Müller, C., Schmidt, I., Mahnke, J., Petruschka, L. & Hahnke, K. (1995). Localization and organization of phenol degradation genes of *Pseudomonas putida* strain H. *Mol Gen Genet* **247**, 240-246.
- Hodson, R. E., Dustman, W. A., Garg, R. P. & Moran, M. A. (1995). In situ PCR for visualization of microscale distribution of specific genes and gene products in prokaryotic communities. *Appl Environ Microbiol* **61**, 4074-4082.
- Houghton, J. E. & Shanley, M. S. (1994). Catabolic potential of pseudomonads: a regulatory perspective. In *Biological degradation and bioremediation of toxic chemicals*, pp. 11-32. Edited by G. R. Chaudhry. Portland, OR: Dioscorides Press.
- Iwabuchi, T., Venkateswaran, K., Harayama, S. & Tanaka, H. (1994). Low growth yield of a marine *Pseudomonas* grown on phenanthrene: a general phenomenon in bacteria grown on polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Mar Biotechnol* **2**, 11-14.
- Joshi, B. & Walia, S. (1996). PCR amplification of catechol 2,3-dioxygenase gene sequences from naturally occurring hydrocarbon degrading bacteria isolated from petroleum hydrocarbon contaminated groundwater. *FEMS Microbiol Ecol* **19**, 5-15.
- Kabisch, M. & Fortnagel, P. (1990a). Nucleotide sequence of the metapyrocatechase II (catechol 2,3-oxygenase II) gene *mcpII* from *Alcaligenes eutrophus* JMP 222. *Nucleic Acids Res* **18**, 5543.
- Kabisch, M. & Fortnagel, P. (1990b). Nucleotide sequence of metapyrocatechase I (catechol 2,3-oxygenase I) gene *mcpI* from *Alcaligenes eutrophus* JMP 222. *Nucleic Acids Res* **18**, 3405-3406.
- Kämpfer, P., Steiof, M. & Dott, W. (1991). Microbiological characterization of a fuel-oil contaminated site including numerical identification of heterotrophic water and soil bacteria. *Microb Ecol* **21**, 227-251.
- Kästner, M., Mahro, B. & Wienberg, R. (1994a). *Biologischer Schadstoffabbau in kontaminierten Böden unter besonderer Berücksichtigung der Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffe*. Bonn: Economica Verlag.
- Kästner, M., Breuer-Jammali, M. & Mahro, B. (1994b). Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Appl Microbiol Biotechnol* **41**, 267-273.
- Keil, H., Lebens, M. R. & Williams, P. A. (1985). TOL plasmid pWW15 contains two nonhomologous, independently regulated catechol 2,3-oxygenase genes. *J Bacteriol* **163**, 248-255.
- Keuth, S. & Rehm, H.-J. (1991). Biodegradation of phenanthrene by *Arthrobacter polychromogenes* isolated from contaminated soil. *Appl Microbiol Biotechnol* **34**, 804-808.
- Kim, E. & Zylstra, G. J. (1995). Molecular and biochemical characterization of two meta-cleavage dioxygenases involved in biphenyl and *m*-xylene degradation by *Beijerinckia* sp. strain B1. *J Bacteriol* **177**, 3095-3103.
- Kim, E., Zylstra, G. J., Freeman, J. P., Heinze, T. M., Deck, J. & Cerniglia, C. E. (1997). Evidence for the role of 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase in the degradation of anthracene by *Sphingomonas yanikuyae* B1. *FEMS Microbiol Lett* **153**, 479-484.
- Kitayama, A., Achioku, T., Yanagawa, T., Kanou, K., Kikuchi, M., Ueda, H., Suzuki, E., Nishimura, H., Nagamune, T. & Kawakami, Y. (1996). Cloning and characterization of extradiol aromatic ring-cleavage dioxygenases of *Pseudomonas aeruginosa* J1104. *J Ferment Bioeng* **82**, 217-223.
- Kiyohara, H., Nagao, K. & Nomi, R. (1976). Degradation of phenanthrene through o-phthalate by an *Aeromonas* sp. *Agr Biol Chem* **40**, 1075-1082.
- Kiyohara, H. & Nagao, K. (1978). The catabolism of phenanthrene and naphthalene by bacteria. *J Gen Microbiol* **105**, 69-75.

- Kiyohara, H., Nagao, K. & Yana, K. (1982). Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. *Appl Environ Microbiol* **43**, 454-457.
- Kiyohara, H., Torigoe, S., Kaida, N., Asaki, T., Iida, T., Hayashi, H. & Takizawa, N. (1994). Cloning and characterization of a chromosomal gene cluster, *pah*, that encodes the upper pathway for phenanthrene and naphthalene utilization by *Pseudomonas putida* OUS82. *J Bacteriol* **176**, 2439-2443.
- Kowalchuk, G. A., Stephen, J. R., De Boer, W., Prosser, J. I., Embley, T. M. & Woldendorp, J. W. (1997). Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class *Proteobacteria* in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl Environ Microbiol* **63**, 1489-1497.
- Kukor, J. J. & Olsen, R. H. (1996). Catechol 2,3-dioxygenases functional in oxygen-limited (hypoxic) environments. *Appl Environ Microbiol* **62**, 1728-1740.
- Kulakov, L. A., Delcroix, V. A., Larkin, M. J., Ksenzenko, V.N. & Kulakova, A. N. (1998). Cloning of a new *Rhodococcus* extradiol dioxygenase genes and study of their distribution in different *Rhodococcus* strains. *Microbiol* **144**, 955-963.
- Kurkela, S., Lehväläaho, H., Palva, E.T. & Teeri, T. H. (1988). Cloning, nucleotide sequence and characterization of genes encoding naphthalene dioxygenase *Pseudomonas putida* strain NCIB9816. *Gene* **73**, 355-362.
- Lau, P. C. K., Bergeron, H., Labbe, D., Wang, Y., Brousseau, R. & Gibson, D. T. (1994). Sequence and expression of the *todGIH* genes involved in the last three steps of toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. *Gene* **146**, 7-13.
- Mahro, B., Rode, K. & Kasche, V. (1995). Non-selective precultivation of bacteria able to degrade different polycyclic aromatic hydrocarbons. *Acta Biotechnol.* **15**, 337-345.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. & Schleifer, K.-H. (1992). Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *System Appl Microbiol* **15**, 593-600.
- Marmur, J. (1961). A procedure for the isolation of desoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J Mol Biol* **3**, 208-218.
- Maue, G. (1994). Aktivität und Abbauleistung bakterieller Biozönosen beim PAK-Umsatz. Thesis, Technische Universität Berlin, Fachbereich 6.
- Menn, F., Applegate, B. M. & Saylor, G. S. (1993). NAH plasmid-mediated catabolism of anthracene and phenanthrene to naphthoic acids. *Appl Environ Microbiol* **59**, 1938-1942.
- Meyer, S., Moser, R., Neef, A., Stahl, U. & Kämpfer, P. (1999). Differential detection of key enzymes of polyaromatic-hydrocarbon-degrading bacteria using PCR and gene probes. *Microbiol* **145**, 1731-1741.
- Moon, J., Chang, H., Min, K. R. & Kim, Y. (1995). Cloning and sequencing of the catechol 2,3-dioxygenase gene of *Alcaligenes* sp. KF711. *Biochem Biophys Res Comm* **208**, 943-949.
- Mueller, J. G., Devereux, R., Santavy, D. L., Lantz, S. E., Willis, S. G. & Pritchard, P. H. (1997). Phylogenetic and physiological comparison of PAH-degrading bacteria from geographically diverse soils. *Antonie van Leeuwenhoek* **71**, 329-343.
- Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Science American* **262**, 64-65.
- Neef, A. (1997). Anwendung der *in situ*-Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen. Thesis, Technische Universität München, Lehrstuhl für Mikrobiologie.
- Nekazawa, T. & Nekazawa, A. (1970). Pyrocatechase (*Pseudomonas*). *Methods Enzymology* **64**, 518-522.
- Ng, L. C., Shingler, V., Sze, C. C. & Poh, C. L. (1994). Cloning and sequences of the first eight genes of chromosomally encoded (methyl) phenol degradation pathway from *Pseudomonas putida* P35X. *Gene* **151**, 29-36.
- Nozaki, M. (1970). Metapyrocatechase (*Pseudomonas*). *Methods Enzymology* **65**, 522-525.
- Ogram, A. V. & Saylor, G. S. (1988). The use of gene probes in the rapid analysis of natural microbial communities. *J Ind Microbiol* **3**, 281-292.
- Parales, R. E., Emig, M. D., Lynch, N. A. & Gibson, D. T. (1998). Substrate specificities of hybrid naphthalene and 2,4-dinitrotoluene dioxygenase enzyme system. *J Bacteriol* **180**, 2337-2344.

- Pfennig, N. & Lippert, K. D. (1966).** Über das Vitamin B₁₂ Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. *Arch Microbiol* **55**, 245-256.
- Porter, K. G. & Feig, Y. S. (1980).** The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol Oceanogr* **25**, 943-948.
- Providenti, M. A., Flemming, C. A., Lee, H. & Trevors, J. T. (1995).** Effect of addition of rhamnolipid biosurfactants or rhamnolipid-producing *Pseudomonas aeruginosa* on phenanthrene mineralization in soil slurries. *FEMS Microbiol Ecol* **17**, 15-26.
- Rippen, G. (1993).** *Handbuch Umweltchemikalien*. Landsberg/Lech: Ecomed-Verlag.
- Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W. & Schleifer, K.-H. (1994).** *In situ* probing of gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiol* **140**, 2849-2858.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Ehrlich, H. A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Saitou, N & Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-5467.
- Sanseverino, J., Applegate, B. M., King, J. M. H. & Saylor, G. S. (1993a).** Plasmid-mediated mineralization of naphthalene, phenanthrene, and anthracene. *Appl Environ Microbiol* **59**, 1931-1937.
- Sanseverino, J., Werner, C., Fleming, J., Applegate, B., King, J. M. H. & Saylor, G. S. (1993b).** Molecular diagnostics of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in manufactured gas plant soil. *Biodegradation* **4**, 303-321.
- Sasser, M. (1990).** MIDI technical note #104. MIDI, Newark, Del.
- Scheffer, F. & Schachtschabel, P. (1992).** *Lehrbuch der Bodenkunde*. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag.
- Schlegel, H. G. (1992).** *Allgemeine Mikrobiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Schleifer, K.-H., Amann, R., Ludwig, W., Rothmund, C., Springer, N. & Dorn, S. (1992).** Nucleic acid probes for the identification and *in situ* detection of *Pseudomonads*. In *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*, pp. 127-134. Edited by G. Galli, S. Silver & B. Witholt. Washington, DC: American society for microbiology.
- Shuttleworth, K. L. & Cerniglia, C. E. (1995).** Environmental aspects of PAH biodegradation. *Appl Biochem Biotechnol* **54**, 291-302.
- Simon, M. J., Osslund, T. D., Saunders, R., Ensley, B. D., Suggs, S., Harcourt, A., Suen, W., Cruden, D. L., Gibson, D. T. & Zylstra, G. J. (1993).** Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strain G7 and NCIB 9816-4. *Gene* **127**, 31-37.
- Smith, M. J., Lethbridge, G. & Burns, R. G. (1997).** Bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils. *FEMS Microbiol Lett* **152**, 141-147.
- Southern, E. M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gelelectrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Spence, E. L., Kawamukai, M., Sanvoisin, J., Braven, H. & Bugg, T.D.H. (1996).** Catechol dioxygenases from *Escherichia coli* (MhpB) and *Alcaligenes eutrophus* (MpcI): Sequence analysis and biochemical properties of a third family of extradiol dioxygenases. *J Bacteriol* **178**, 5249-5256.
- Süßmuth, R., Eberspächer, J., Haag, R. & Springer, W. (1987).** *Biochemisch-mikrobiologisches Praktikum*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Takeo, M., Fujii, T., Takenaka, K. & Maeda, Y. (1998).** Cloning and sequencing of a gene cluster for the meta-cleavage pathway of aniline degradation in *Acinetobacter* sp. strain YAA. *J Ferment Bioengin* **85**, 514-517.

- Takizawa, N., Kaida, N., Torigoe, S., Moritani, T., Sawada, T., Satoh, S. & Kiyohara, H. (1994). Identification and characterization of genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase and polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol dehydrogenase in *Pseudomonas putida* OUS82. *J Bacteriol* **176**, 2444-2449.
- Tani, K., Kurokawa, K. & Nasu, M. (1998). Development of a direct *in situ* PCR method for detection of specific bacteria in natural environments. *Appl Environ Microbiol* **64**, 1536-1540.
- Tebbe, C. C. & Vahjen, W. (1993). Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Appl Environ Microbiol* **59**, 2657-2665.
- Thibault, S. L., Anderson, M. & Frankenberger, W. T. (1996). Influence of surfactants on pyrene desorption and degradation in soils. *Appl Environ Microbiol* **62**, 283-287.
- Thiem, A. (1994). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Appl Environ Microbiol* **60**, 258-263.
- Thiem, A. & Fritzsche, C. (1995). Utilization of solubilized and crystalline mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by a *Mycobacterium* sp.. *Appl Microbiol Biotechnol* **42**, 964-968.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876-4882.
- Tsai, Y.-L. & Olson, B. H. (1991). Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl Environ Microbiol* **57**, 1070-1074.
- Tsai, Y.-L. & Olson, B. H. (1992). Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* **58**, 2292-2295.
- Van der Meer, J. R., Eggen, R. I. L., Zehnder, J. B. & De Vos, W. M. (1991). Sequence analysis of the *Pseudomonas* sp. strain P51 *tcb* gene cluster, which encodes metabolism of chlorinated catechols: evidence for specialization of catechol 1,2-dioxygenases for chlorinated substrates. *J Bacteriol* **173**, 2425-2434.
- Vogelstein, B. & Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 615-619.
- Volkering, F., Breure, A. M., Sterkenburg, A. & Van Aniel, J. G. (1992). Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: effect of substrate availability on bacterial growth kinetics. *Appl Microbiol Biotechnol* **36**, 548-552.
- Weißenfels, W. D., Beyer, M. & Klein, J. (1990). Degradation of phenanthrene, fluorene and fluoranthene by pure bacterial cultures *Appl Microbiol Biotechnol* **32**, 479-484.
- Weißenfels, W. D., Beyer, M., Klein, J. & Rehm, H. J. (1991). Microbial metabolism of fluoranthene: isolation and identification of ring fission products. *Appl Microbiol Biotechnol* **34**, 528-535.
- Weißenfels, W. D. (1998). Bewertung von Gefährdungspotential und mikrobiologische Sanierbarkeit PAK-kontaminierter Böden. In *Handbuch der Altlastensanierung*. Edited by V. Franzius, K. Wolf & E. Brandt. Heidelberg: C.F. Müller Verlag.
- Wikström, P., Wiklund, A., Andersson, A.-C. & Forsman, M. (1996). DNA recovery and PCR quantification of catechol 2,3-dioxygenase genes from different soil types. *J Biotechnol* **52**, 107-120.
- Williams, P. A. & Sayers, J. R. (1994). The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas*. *Biodegradation* **5**, 195-217.
- Wilson, M. S., Bakermans, C. & Madsen, E. L. (1999). In situ, real-time catabolic gene expression: extraction and characterization of naphthalene dioxygenase mRNA transcripts from groundwater. *Appl Environ Microbiol* **65**, 80-87.
- Winkler, J., Eltis, L. D., Dwyer, D. F. & Rohde, M. (1995). Tetrameric structure and cellular location of catechol 2,3-dioxygenase. *Arch Microbiology* **163**, 65-69.
- Worsey, M. J., Franklin, F. C. H. & Williams, P. A. (1978). Regulation of the degradative pathway enzymes coded for by the TOL plasmid (pWW0) from *Pseudomonas putida* mt-2. *J Bacteriol* **134**, 757-764.
- Yen, K.-M. & Gunsalus, I. C. (1982). Plasmid gene organization: Naphthalene/salicylat oxidation. *Proc Natl Acad Sci* **79**, 874-878.

- Yen, K.-M. & Gunsalus, I. C. (1985).** Regulation of naphthalene catabolic genes of plasmid NAH7. *J Bacteriol* **162**, 1008-1013.
- Yrjälä, K., Paulin, L., Kilpi, S. & Romantschuk, M. (1994).** Cloning of *cmpE*, a plasmid borne catechol 2,3-dioxygenase-encoding gene from the aromatic- and chloroaromatic-degrading *Pseudomonas* sp. HV3. *Gene* **138**, 119-121.
- Zhou, J., Bruns, M. A. & Tiedje, J. M. (1996).** DNA recovery from soil. *Appl Environ Microbiol* **62**, 316-322.
- Zylstra, G. J. & Gibson, D. T. (1989).** Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. *J Biol Chem* **264**, 14940-14946.
- Zylstra, G. J. & Gibson, D. T. (1991).** Aromatic hydrocarbon degradation: A molecular approach. In *Genetic Engineering: Principles and methods*, pp. 183-203. Edited by J. K. Setlow. New York: Plenum Press.
- Zylstra, G. J., Kim, E. & Goyal, A. K. (1997).** Comparative molecular analysis of genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. *Gen Engen* **19**, 257-269.

Anhang

Tabelle 20: Meßdaten der PAK- und BTX-Aromaten-Konzentrationen [mg kg^{-1}] in den Bodenproben des alten Gaswerkstandortes Marburg. Die Daten wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von dem Institut für Umweltanalytik und Geotechnik UEG, Wetzlar. Die PAK-Bestimmung wurde mittels GC/MS - GC/FID nach Extraktion und die Bestimmung der BTX-Aromaten mittels Dampfdruckanalyse GC/FID durchgeführt.

Polyaromatische bzw. aromatische Verbindung	Konzentration der PAK bzw. BTX-Aromaten in der	
	Bodenprobe entnommen 1,8 m unter Geländeoberfläche	Bodenprobe aus Bodenaushub
Naphthalin	1408	106
Acenaphthylen	82,1	0,74
Acenaphthen	2046	11,5
Fluoren	2260	12,9
Phenanthren	1195	7,54
Anthracen	218	1,46
Fluoranthren	68,7	1,97
Pyren	47	1,44
Benzo(a)anthracen	n.n.	n.n.
Chrysen	n.n.	n.n.
Dibenzo(a,h)anthracen	n.n.	n.n.
Benzo(b)fluoranthren	n.n.	n.n.
Benzo(k)fluoranthren	n.n.	n.n.
Benzo(a)pyren	n.n.	n.n.
Benzo(ghi)perylene	n.n.	n.n.
Indeno(1,2,3-cd)pyren	n.n.	n.n.
Benzol	0,763	0,016
Toluol	0,144	3,765
m,p-Xylol	7,56	45,5
o-Xylol	4,144	9,779
1,3,5-Trimethylbenzol	0,565	13,1
1,2,4-Trimethylbenzol	1,402	19,4
1,2,3-Trimethylbenzol	0,229	2,171

n.n.: nicht nachweisbar

Tabelle 21: Bakterienstämme, für die Nukleinsäuresequenzen der Catechol 2,3-Dioxygenase (C23O) beschrieben und in GenBank veröffentlicht sind. Die Stämme bauen unterschiedliche aromatische und polyaromatische Verbindungen ab. Die C23O liegen chromosomal- (chr.) oder plasmidcodiert (pl.) vor.

Bakterienstamm	Abbau-fähigkeit	Bezeichnung des Gens	Länge des Gens	Codierung (chr./ pl.)/ Plasmid	Accession-number	Referenz
<i>P. putida</i> P35X	Phe; Cr	<i>phhB</i>	924 bp	chr.	X77856	Ng <i>et al.</i> , 1994
<i>P. putida</i> H	Phe, Cr	<i>phIH</i>	924 bp	pl./ pPGH1	X80765	Herrmann <i>et al.</i> , 1995
<i>P. putida</i> mt-2	Tol	<i>xyIE</i>	924 bp	pl/ pWW0	M64747	n.v.
<i>B. stearothermophilus</i> FDTP-3	n.v.	<i>pheB</i>	984 bp	n.v.	X67860	n.v.
<i>P. aeruginosa</i> J1104	Ben	<i>xyIE</i> _{J1104-1} <i>xyIE</i> _{J1104-2} <i>xyIE</i> _{J1104-3}	924 bp	chr.	X60740 D83057 D83056	Kitayama <i>et al.</i> , 1996
<i>P. putida</i> CF600	Phe	<i>dmpB</i>	924 bp	pl./ pV1150	M33263	Bartilson & Shingler, 1989
<i>P. fluorescens</i> IP01	Cu	<i>cumC</i>	938 bp	n.v.	D37828	Aoki <i>et al.</i> , 1996
<i>Pseudomonas</i> sp. IC	Bi, Be, To, pTo	<i>bphE</i>	924 bp	pl./ pWW110	UO1825	Carrington <i>et al.</i> , 1994
<i>P. putida</i> pPG7	Na	<i>nahH</i>	924 bp	pl./ NAH7	M17159	Ghosal <i>et al.</i> , 1987
<i>P. putida</i> HS1	n.v.	<i>xyIE</i>	924 bp	pl./ pDK1	M65205	Benjamin <i>et al.</i> , 1991
<i>P. putida</i> MT15	Tol, Xy	<i>cdoII</i>	945 bp	pl./ pWW15	UO1826	Keil <i>et al.</i> , 1985
<i>R. rhodochrous</i> NCIMB 13064	Na	<i>catA</i>	957 bp	n.v.	L77225	n.v.
<i>R. rhodochrous</i> CTM	2Mea	<i>cdo</i>	966 bp	pl./ pTC1	X69504	Candidus <i>et al.</i> , 1994
<i>S. yanoikuyae</i> B1 ¹⁾	Xy, Bi, Na, An, Ph	<i>xyIE</i>	924 bp	chr.	U23375	Kim <i>et al.</i> , 1997
<i>Sphingomonas</i> sp. HV3 ²⁾	Be, Sal, mTo, pTo	<i>catE</i>	924 bp	pl./ pSKY4	LI0655	Yrjälä <i>et al.</i> , 1994
<i>Alcaligenes</i> sp. KF711	Bi	o.N.	927 bp	chr.	S77084	Moon <i>et al.</i> , 1995
<i>R. pickettii</i> PKO1	Tol	<i>tbuE</i>	945 bp	n.v.	U20258	Kukor & Olsen, 1996
<i>R. eutropha</i> JMP222 ³⁾	Ph	<i>mpcI</i>	942 bp	n.v.	X52414	Kabisch & Fortnagel, 1990b
<i>R. eutropha</i> JMP222 ³⁾	Ph	<i>mcpII</i>	963 bp	n.v.	X52415	Kabisch & Fortnagel, 1990a
<i>Acinetobacter</i> sp. YAA	Al	<i>atdB</i>	924 bp	n.v.	AB008831	Takeo <i>et al.</i> , 1998
<i>B. cepacia</i> AA1	n.v.	o.N.	945 bp	n.v.	BCU47111	n.v.

Fortsetzung Tabelle 21:

Bakterienstamm	Abbau- fähigkeit	Bezeichnung des Gens	Länge des Gens	Codierung (chr./ pl.)/ Plasmid	Accession- number	Referenz
<i>Burkholderia</i> sp. PS12	Cbe	<i>itecE</i> ⁴⁾ C23O ist inaktiv	877 bp	n.v.	BSU78099	Beil <i>et al.</i> , 1997
<i>B. thermoleovorans</i> A2	Phe, Cr	<i>pheB</i>	927 bp	n.v.	AF031325	Duffner & Müller, 1998
<i>C. testosteronei</i> TA441	Ph	<i>aphB</i>	945 bp	chr.	AB006479	Arai <i>et al.</i> , 1998
<i>P. stutzeri</i> OM1	Car	o.N.	924 bp	n.v.	AB001722	n.v.

2Mea: 2-Methylanilin; Al: Anilin; An: Anthracen; Be: Benzoat; Ben; Benzol; Bi: Biphenyl; Car: Carbazole, Cbe: Chlorobenzol; Cr: Cresol; Cu: Cumen; mTo: m-Toluat; n.v.: nicht veröffentlicht; Na: Naphthalin; o.N.: ohne Name; Ph: Phenanthren; Phe: Phenol; pTo: p-Toluat; Sal: Salicylsäure; To: Toluat; Tol: Toluol; Xy: Xylol

¹⁾ ehemals *Beijerinckia* sp. B1

²⁾ ehemals *Pseudomonas* sp.

³⁾ ehemals *Alcaligenes eutrophus*

⁴⁾ codiert für inaktive Catechol 2,3-Dioxygenase

Tabelle 22: Distanzwerte [%] der sequenzierten PCR-Amplifikate (obere rechte Hälfte) und der abgeleiteten Aminosäuresequenzen (untere linke Hälfte) verschiedener PAK-abbauender *Pseudomonas* und *Sphingomonas* Stämme im Vergleich zu veröffentlichten C23O-Nukleinsäure- und -Aminosäure-Sequenzen aus der Datenbank (GenBank). Die Berechnung erfolgte in den Programmen „ARB“ (Nukleinsäuren) und „Lasergene“ (Aminosäuren).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
1 R. rhodochromis CTM	0.00	56.4	53.8	53.2	56.3	50.9	50.2	49.6	50.3	51.3	49.6	49.8	49.7	50.5	49.3	50.1	48.3	51.3	51.0	51.4	50.2	50.3	50.0	54.2	52.2	52.1	54.6	54.6	54.1	53.7	62.4	56.0	50.7	63.1	56.4	50.4	64.6	60.8	69.2	50.8
2 P. putida MT15	77.7	0.00	38.1	35.7	45.8	50.3	51.0	48.3	48.8	50.1	50.3	50.6	48.2	48.0	47.4	48.9	48.2	48.6	48.8	49.3	48.9	48.8	49.3	51.4	49.1	48.5	51.5	50.9	50.6	50.2	61.1	51.0	49.3	63.7	41.4	60.0	63.8	68.2	49.4	
3 R. capsula AA1	76.6	34.7	0.00	30.0	47.9	46.4	47.1	47.6	45.6	45.8	44.6	44.9	47.9	47.9	44.8	45.8	48.1	47.2	46.4	46.9	48.0	48.2	48.6	47.5	47.9	47.7	48.6	48.0	47.6	49.3	60.7	48.3	47.9	62.0	40.4	61.8	66.3	66.9	48.0	
4 C. testosteroni TA441	74.1	30.0	28.9	0.00	44.7	46.5	45.6	45.2	42.7	44.0	44.1	44.2	45.1	44.6	45.0	43.5	47.5	47.7	47.0	47.5	47.5	47.7	47.8	46.8	45.8	45.1	47.4	47.0	46.4	46.7	62.2	46.8	47.4	62.4	33.2	61.9	60.0	58.2	61.1	45.8
5 R. thermolovorans A2	74.0	60.7	59.4	59.3	0.00	49.8	49.7	46.8	49.8	49.8	48.7	49.0	47.1	46.9	47.0	48.5	47.2	50.4	49.4	49.4	49.3	48.6	49.3	49.3	50.4	49.8	50.0	51.7	51.4	51.0	50.8	61.2	51.3	49.1	64.7	51.5	61.8	64.1	66.6	47.4
6 P. putida CF600	73.0	61.2	60.3	65.2	64.8	0.00	6.00	30.20	7.950	9.00	14.7	34.8	20.6	16.5	21.7	6.00	17.2	19.8	19.3	19.5	22.1	22.8	23.0	29.6	39.3	39.5	38.6	38.5	38.4	39.8	57.7	38.6	21.9	59.7	48.8	56.7	60.0	54.9	60.6	19.1
7 Alcaligenes sp. KF711	73.4	64.0	61.0	67.4	66.4	7.50	0.00	21.0	14.3	12.6	15.0	15.7	21.2	19.8	21.9	19.0	17.0	21.0	20.4	20.9	23.0	23.4	23.8	31.2	39.8	39.9	40.5	40.1	39.9	40.3	58.0	40.4	23.0	60.9	50.0	58.3	59.5	65.5	15.0	
8 R. aeruginosa JH1041	73.3	62.5	59.9	64.4	62.9	15.6	19.9	0.00	21.5	20.9	21.3	22.4	0.80	5.00	6.90	20.3	6.0	17.0	17.0	18.1	16.0	16.3	17.1	30.7	42.3	42.2	43.8	43.1	42.8	41.9	57.1	43.3	16.4	60.4	50.0	55.3	61.1	58.1	60.3	10.0
9 P. putida H	73.3	63.6	58.6	64.4	63.2	8.50	15.3	16.6	0.00	8.30	13.0	14.0	21.6	16.8	21.5	6.70	17.5	21.4	20.7	21.4	22.5	22.6	23.0	29.5	39.3	39.3	39.8	39.8	39.4	40.6	58.4	39.8	22.3	59.2	47.3	56.7	59.7	56.2	29.0	20.1
10 P. putida P35X	73.6	62.5	59.3	65.9	64.2	6.50	11.7	16.9	9.10	0.00	11.4	12.2	21.0	16.2	21.2	7.70	16.9	20.5	19.9	20.1	23.6	23.7	23.9	30.3	39.2	39.3	40.7	40.3	40.1	41.1	57.9	40.3	23.1	59.2	48.8	56.5	59.3	57.2	60.6	18.7
11 P. putida H51	73.6	61.9	58.3	65.6	62.8	12.1	15.6	18.6	11.7	10.7	11.0	14.0	21.8	20.6	18.9	14.5	17.8	22.9	21.7	22.7	22.9	23.1	23.6	28.9	39.7	39.8	40.1	40.1	39.6	41.5	57.5	40.0	22.7	59.9	49.3	57.4	59.0	56.9	59.6	17.0
12 Isolat NS (P. putida)	72.6	61.9	59.6	65.9	63.2	12.4	16.9	19.5	13.4	11.4	2.90	0.00	22.1	21.6	19.9	15.5	19.1	22.8	22.5	22.8	23.3	23.6	23.7	28.6	40.0	40.2	39.8	40.0	39.8	41.6	57.6	40.0	23.2	60.4	49.7	57.4	59.5	56.3	59.2	18.0
13 P. stutzeri AN11	72.0	63.5	60.5	62.2	64.5	15.1	19.4	0.7	16.1	16.4	18.1	18.8	0.00	5.00	7.00	20.4	6.60	17.0	17.7	17.9	15.8	16.2	16.9	18.0	42.5	42.6	41.9	43.5	43.4	42.3	57.3	43.5	15.8	60.1	50.1	54.5	60.7	60.2	11.2	
14 P. stutzeri OM1	73.0	61.6	59.8	63.7	62.9	12.7	18.2	3.30	13.7	14.0	16.9	18.2	3.30	0.00	8.40	15.8	12.0	17.4	16.6	17.9	16.6	17.0	17.2	29.7	41.8	41.8	43.9	43.3	42.9	41.3	57.4	43.4	16.8	59.3	49.6	55.0	61.0	58.1	59.7	12.9
15 P. putida mt-2	73.7	61.9	60.9	64.8	61.2	16.9	11.2	5.50	17.3	18.2	16.9	18.2	4.90	6.00	0.00	21.0	13.3	20.1	19.2	20.5	18.7	18.7	19.2	30.7	43.7	44.2	43.2	43.2	43.6	58.2	43.8	18.7	59.9	49.3	55.6	60.7	58.8	60.0	7.60	
16 P. aeruginosa JH1041H	73.6	61.9	59.9	65.6	63.8	4.90	10.4	15.6	7.20	6.80	12.4	14.0	15.1	12.7	16.7	0.00	16.6	19.0	18.4	19.1	21.6	22.2	22.4	29.3	38.8	38.8	38.6	38.1	39.9	57.9	38.6	22.0	59.2	47.9	59.7	60.2	56.6	60.9		
17 Pseudomonas sp. IC	72.0	61.9	60.9	64.8	64.2	13.0	17.0	6.50	15.6	16.0	17.6	18.6	5.90	10.0	9.80	15.3	0.00	17.9	17.2	19.1	19.7	20.0	20.8	31.8	39.1	39.1	40.9	40.9	40.2	39.6	59.2	40.6	19.9	61.2	48.7	54.2	61.8	57.5	60.3	5.00
18 Isolat F (P. putida)	72.0	64.5	61.7	67.4	65.8	14.1	18.1	14.1	17.1	15.5	18.8	18.8	13.5	13.5	17.1	15.3	13.2	13.5	13.0	13.40	9.90	10.8	11.8	29.0	40.0	40.9	42.6	42.5	42.0	42.1	58.8	42.3	10.6	61.2	53.2	56.4	62.9	58.5	65.0	18.5
19 P. putida pPG7	72.0	63.8	59.9	66.3	64.8	13.0	16.9	13.4	15.6	14.3	16.9	18.2	11.5	11.7	15.3	13.2	13.7	3.00	0.00	2.90	9.60	9.80	10.2	28.4	40.6	40.5	42.5	42.1	41.6	41.6	58.0	42.1	10.2	61.0	52.4	56.2	62.9	60.3	17.0	
20 P. putida OUS82	72.4	63.8	59.9	67.0	65.1	12.2	16.8	13.2	15.5	14.1	17.4	18.1	12.5	12.5	16.1	11.2	11.5	11.7	12.6	11.1	11.2	13.0	42.6	42.6	42.1	41.2	43.0	42.6	42.4	42.1	58.7	42.7	11.4	61.1	52.4	56.7	62.9	60.6	19.4	
21 Isolat N3 (P. putida)	72.5	63.6	60.9	67.6	63.6	16.6	19.5	13.1	16.9	17.2	17.2	17.5	10.6	10.9	14.2	16.2	13.6	8.60	7.80	8.90	0.00	1.10	2.20	29.9	41.6	41.6	43.1	42.8	42.5	42.7	58.0	42.5	1.60	60.4	52.1	56.3	62.1	60.9	20.2	
22 Isolat A10 (P. fluorescens)	73.5	64.6	61.3	65.8	63.2	17.9	20.9	12.3	17.9	18.2	18.5	19.5	11.6	11.9	14.6	18.2	14.9	10.6	8.90	10.3	2.30	0.00	2.60	30.0	42.0	41.8	43.1	43.3	42.9	43.0	58.6	43.1	1.90	60.6	52.1	56.2	61.7	59.9	60.8	21.2
23 Isolat CA (P. fluorescens)	72.7	64.1	61.5	67.6	64.1	17.4	21.1	12.8	18.4	18.4	18.8	19.4	12.2	12.2	15.8	18.4	15.5	10.9	9.30	10.5	3.30	4.00	30.0	42.4	42.5	43.7	43.5	43.1	43.5	58.6	43.3	2.90	60.6	52.9	55.9	62.3	60.0	60.2	22.0	
24 Acinetobacter sp. YAA	73.0	63.5	61.2	65.6	65.8	25.7	29.6	26.1	16.7	27.7	25.4	27.0	25.7	24.8	27.0	25.7	26.4	26.6	25.1	26.0	26.8	27.8	27.6	0.00	42.7	42.8	43.3	41.6	41.7	43.3	61.5	42.0	29.9	62.8	50.9	57.0	63.2	60.4	62.0	30.6
25 S. yanukayae DSM 6900	75.3	64.1	63.5	63.3	66.8	52.3	55.6	55.6	53.0	52.0	51.6	52.0	54.9	53.3	55.9	53.3	54.3	53.3	53.6	53.6	54.6	56.3	55.3	56.6	0.00	0.70	22.4	22.6	22.4	19.4	61.1	22.4	43.8	61.1	50.0	59.6	65.6	62.8	62.7	42.5
26 S. yanukayae B1	74.9	63.2	62.9	62.2	66.8	52.1	55.4	54.7	52.1	51.8	50.8	51.8	54.4	54.4	55.6	54.3	56.0	55.6	55.7	1.00	0.00	22.6	22.6	21.9	19.4	61.1	61.2	61.2	43.8	61.4	50.0	61.1	22.3	43.8	61.4	50.0	59.0	65.2	62.7	42.5
27 Isolat Y9 (Sphingomonas sp.)	74.0	65.3	64.9	64.4	67.2	51.8	55.8	54.7	52.8	52.8	51.1	51.5	54.3	54.1	55.4	54.3	54.3	54.6	54.1	54.3	54.3	56.3	55.9	54.7	11.8	11.4	0.00	1.60	1.20	62.0	61.6	0.90	43.0	61.4	51.8	57.7	64.8	60.2	63.8	42.3
28 Isolat E3 (Sphingomonas sp.)	73.0	64.5	64.5	64.4	66.4	50.7	54.3	54.6	52.3	51.6	50.7	50.7	53.9	53.9	54.9	54.0	56.0	55.5	54.3	51.8	11.5	13.30	0.00	1.10	22.2	61.1	61.0	60.9	62.9	61.7	53.5	57.4	65.0	59.7	63.5	63.5	62.2	42.2		

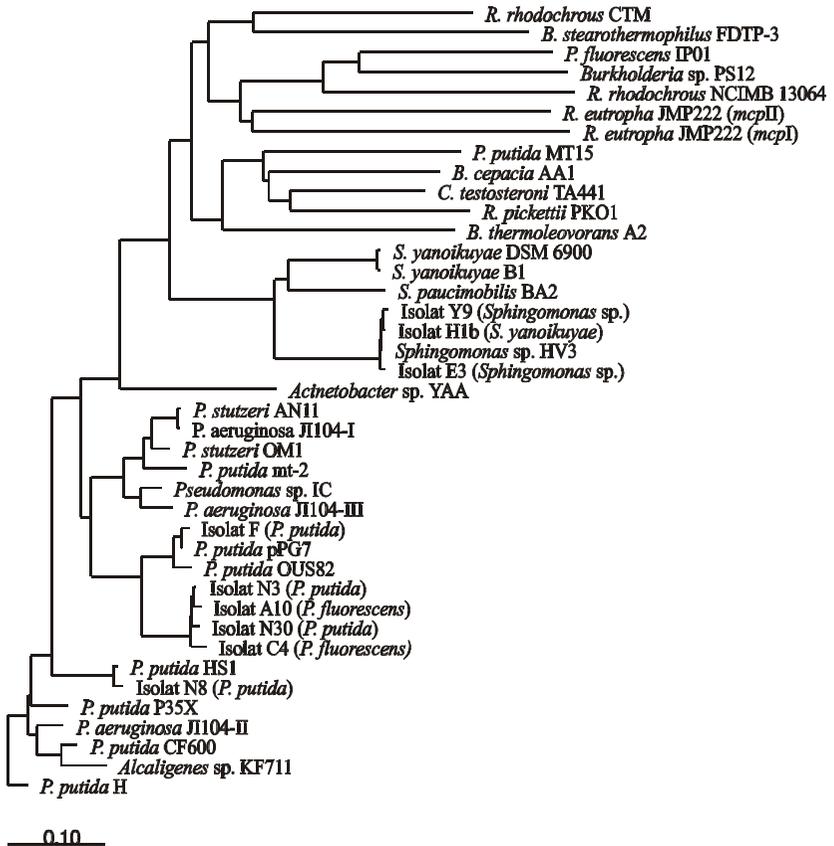


Abbildung 23: Dendrogramm der Nukleinsäure-Sequenzen der vollständig sequenzierten PCR-Amplifikate verschiedener *Pseudomonas* und *Shingomonas* Stämme und den in GenBank zugänglichen C230-Sequenzen. Die Berechnung erfolgte, basierend auf einem in ClustalX erstellten *alignment*, nach dem Distanzmatrixverfahren („*neighbor-joining-tool*“) aus dem Sequenzdatenprogramm ARB (Dr. W. Ludwig; Technische Universität München). Der Größenbalken von 0.10 steht für 10% Sequenzunterschied.

Anhang

Sphingomonas sp. HV3 ATGGCTTTGACTGGTGAATTCGTCTGGCTATGTCCAGCTCAGGGTTCTGGACTTGGAC
Isolat E3 (*Sphingomonas* sp) ATGGCTCTGACCGGTGAATTCGTCTGGCTATGTCCAGCTCAGGGTTCTGGACTTGGAC
Isolat Y9 (*Sphingomonas* sp) ATGGCATTGACTGGTGATCTTCGTCTGGCTATGTCCAGCTCAGGGTTCTGGACTTGGAC
S. yanoikuyae DSM 6900 ATGGCACTGACCGGTGACTTCGCCCTGGCTATGTCCAGTTGCGCGTCCCTCGATCTGGAT
S. yanoikuyae B1 ATGGCACTGACCGGTGACTTCGCCCTGGCTATGTCCAGTTGCGCGTCCCTCGATCTGGAT
S. paucimobilis BA2 ATGGCATTGACCGGTGACTTCGCCCTGGATATGTGCAACTGCGGGTCTCGATCTCGAT
Isolat H1b (*S. yanoikuyae*) ATGGCTTTGACCGGTGACTTCGTCTGGCTATGTCCAGCTCAGGGTTCTGGACTTGGAC
***** **

Sphingomonas sp. HV3 GAGGCCATTATCCACTACCGCGACCGGATTGGTCTAAACTTCGTCAATCGCGAGGGGGAT
Isolat E3 (*Sphingomonas* sp) GAGGCCATTATCCACTACCGCGACCGGATTGGTCTAAACTTCGTCAATCGCGAGGGGGAT
Isolat Y9 (*Sphingomonas* sp) GAGGCCATTATCCACTACCGCGACCGGATTGGTCTAAACTTCGTCAATCGCGAGGGGGAT
S. yanoikuyae DSM 6900 GAAGCGATCCAGCACTATCGTGACCGTATCGCCCTCAACCTGGTGAGCGTCGAGGGAGGC
S. yanoikuyae B1 GAAGCGATCCAGCACTATCGTGACCGTATCGCCCTCAACCTGGTGAGCGTCGAGGGAGGC
S. paucimobilis BA2 GAGGCTATTGTTCAATTATCGTGACCGGATTGGTCTCAATCTCGTCAAGCTCGAGGATGGG
Isolat H1b (*S. yanoikuyae*) GAGGCCATTATCCACTACCGCGACCGGATTGGTCTAAACTTCGTCAATCGCGAGGGGGAT
***** **

Sphingomonas sp. HV3 CGGGCCTTTTTCCAGCGTTCGACGAATTTCGATCGTCAAGTATCATCCTTCGCGAGGGCC
Isolat E3 (*Sphingomonas* sp) CGGGCCTTTTTCCAGCGTTCGACGAATTTCGATCGTCAAGTATCATCCTTCGCGAGGGCC
Isolat Y9 (*Sphingomonas* sp) CGGGCCTTTCTCCAGCGTTCGACGAATTTCGATCGTCAAGTATCATCCTTCGCGAGGGCC
S. yanoikuyae DSM 6900 AGGGCTTTCTTCAGGCCTTCGACGAGTTCGATCGCCACAGCATCATTTGCGCGAAGCC
S. yanoikuyae B1 AGGGCTTTCTTCAGGCCTTCGACGAGTTCGATCGCCACAGCATCATTTGCGCGAAGCC
S. paucimobilis BA2 CGTGCTTTCTCCAGCGTTCGACGAATTTCGACCGCCACAGCATTATCTTCGCGCGAAGCC
Isolat H1b (*S. yanoikuyae*) CGGGCCTTTTTCCAGCGTTCGCGGAATTTCGATCGTCAAGTATCATCCTTCGCGAGGGCC
***** **

Sphingomonas sp. HV3 GATCAGCGGGCATGGATGTGATGGGCTTCAAGTTCGCCAAGGACGCGGACTTGGACCAT
Isolat E3 (*Sphingomonas* sp) GATCAGCGGGCATGGATGTGATGGGCTTCAAGTTCGCCAAGGACGCGGACTTGGACCAT
Isolat Y9 (*Sphingomonas* sp) GATCAGCGGGCATGGATGTGATGGGCTTCAAGTTCGCCAAGGACGCGGACTTGGACCAT
S. yanoikuyae DSM 6900 GATTCTGCCGGGCTCGACCGGATGGCTTCAAGTTCGCCAAGGATGCCGATCTCGACCAC
S. yanoikuyae B1 GATTCTGCCGGGCTCGACCGGATGGCTTCAAGTTCGCCAAGGATGCCGATCTCGACCAC
S. paucimobilis BA2 GATACCGCTGGGCTTGACCGGATGGCTTCAAGTTCGCCAAGGATCCGATCTTGATCAT
Isolat H1b (*S. yanoikuyae*) GATCAGCGGGCATGGATGTGATGGGCTTCAAGTTCGCCAAGGACGCGGACTTGGACCAT
***** **

Sphingomonas sp. HV3 TTTACCAGCGCTTGCTCGATATCGGTGTCATGTGACGTGATCCCGCGGGGGAAGAT
Isolat E3 (*Sphingomonas* sp) TTTACCAGCGCTTGCTCGATATCGGTGTCATGTGACGTGATCCCGCGGGGGAAGAT
Isolat Y9 (*Sphingomonas* sp) TTTACCAGCGCTTGCTCGATATCGGTGTCATGTGACGTGATCCCGCGGGGGAAGAT
S. yanoikuyae DSM 6900 TTTGCCGAACGGCTGCTCGACATCGGGGTTCAATGTGACGTGATTCGCGCCGGAGAGGAT
S. yanoikuyae B1 TTTGCCGAACGGCTGCTCGACATCGGGGTTCAATGTGACGTGATTCGCGCCGGAGAGGAT
S. paucimobilis BA2 TTTGCCGAACGGCTGCTCGATGCGGGAGTGAACGTGATGTCATTCGCGTGGCGAAGAT
Isolat H1b (*S. yanoikuyae*) TTTACCAGCGCTTGCTCGATATCGGTGTCATGTGACGTGATCCCGCGGGGGAAGAT
***** **

```
Sphingomonas sp. HV3      CGCTTCATGACGGTGAACACCTGA
Isolat E3 (Sphingomonas sp) CGCTTCCTGACAGT-----
Isolat Y9 (Sphingomonas sp) CGCTTCATGACAGTAATCAATAGT
S. yanoikuyae DSM 6900    CGCTTCCTGACCGT-----
S. yanoikuyae B1          CGCTTCATGACGGTGAACACCTGA
S. paucimobilis BA2      CGCTTCITGACAGT-----
Isolat H1b (S. yanoikuyae) CGCTTC-----
*****  * *
```

Abbildung 25: *Alignment* der DNA-Sequenzen der in dieser Arbeit sequenzierten C23O-Gene verschiedener *Sphingomonas*-Isolate (E3, Y9, H1b) und -Referenzstämme (DSM 6900 und BA2) und den C23O-Datenbanksequenzen von *Sphingomonas* sp. HV3 (*accession-number*: L10655) *S. yanoikuyae* B1 (*accessionnumber*: U23375).

*: Nukleotid in allen Sequenzen konserviert.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Angewandte Mikrobiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Dr.-Ing. P. Kämpfer durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr.-Ing. P. Kämpfer danke ich für die Überlassung des Themas und für seine stete Bereitschaft zur fachlichen Diskussion.

Frau Prof. Dr. G. Klug danke ich ebenso für die Betreuung meiner Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt Dr. A. Neef für die zahlreichen Anregungen in fachlichen Gesprächen und der ständigen Hilfsbereitschaft.

Der experimentelle Teil der Arbeit wurde von Frau K. Grebing mit großem Engagement unterstützt. An dieser Stelle ein besonders herzliches Dankeschön.

Bei Dipl.-Ing. M. Weiß, M. Kraus und J. Hammerschmidt möchte ich mich für ihre Unterstützung bei meiner Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dipl.-Biol. R. Moser für die gute Zusammenarbeit, die fachlichen Diskussionen und die angenehmen (arbeitsreichen) Berlinaufenthalte.

Mein Dank gilt auch Dr. Grösser von der UEG Wetzlar für die zur Verfügung gestellten PAK- und BTX-Analysedaten der Bodenproben, Frau Lautenschläger und Dr. Willems vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Universität Gießen für die Unterstützung bei den Sequenzierungen und Dr. Rosselló-Mora für die Überlassung von verschiedenen Bakterienstämmen.

Herzlichen Dank an Dipl.-Biol. B. Schacht für ihre Hilfsbereitschaft und vielfältige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Ihr und Dr. A. Albrecht möchte ich ebenso für die angenehme Gewächshausatmosphäre danken.

Herzlichen Dank an O. Hochgatz für die große Unterstützung bei der Vervielfältigung der Arbeit.

Ich danke auch Frau V. Schmidt und Frau R. Geißler-Plaum sowie allen anderen Institutsangehörigen für alle guten Ratschläge und das angenehme Arbeitsklima.

Nicht zuletzt danke ich meiner Schwester A. Müller und meinem Onkel K. Sass für das aufmerksame Korrekturlesen meiner Arbeit und ihnen und dem Rest meiner Familie für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen.

Diese Arbeit wurde von der DFG finanziell gefördert (Az Ka 875/4-1).