

---

## Inhaltsverzeichnis

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

---

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

---

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

---

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

<b>4.8 Ausblick .....</b>	<b>106</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>108</b>
<b>6. Literatur .....</b>	<b>110</b>
<b>7. Anhang</b>	

**Abkürzungen**

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

---

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