

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Bakterienstämme und Vektoren

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

2.2 Medien und Medienzusätze

Mineralmedium

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

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

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

Salzlösung:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Nährbouillon

Die Nährbouillon wurde von der Fa. Immunpräparate Berlin bezogen.

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

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

TYS-Medium

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

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

Beweglichkeitsagar (Koenig, 1991)

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

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

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

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

Leitungswasseragar (modifiziert nach Atlas, 1993)

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

Haferflockenagar (modifiziert nach Atlas, 1993)

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

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

Tryptophan-Bouillon

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

Zur Differenzierung eingesetzte feste Medien

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

Medienzusätze

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.4 Analytik

2.4.1 Messung der optischen Dichte (OD)

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

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

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

2.4.3 Proteinbestimmung

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

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

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

Extinktionsmessung bei 280 nm

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

2.4.4 TOC-Messung

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

2.4.5 Analytische Bestimmung der THF-Konzentration mit GC/FID

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

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

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

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

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

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

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

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

2.5 Taxonomische Untersuchungen

2.5.1 Makroskopische und mikroskopische Beschreibung

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

2.5.2 Standarduntersuchungen für die taxonomische Einordnung der isolierten Bakterien

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

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

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

2.5.3 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.5.3.1 Zellaufschluß zur Isolierung der Template DNA

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

2.5.3.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

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

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

ad 100 µl H₂O bi-dest

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

2.5.3.3 Agarosegelelektrophorese

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

Der Probenpuffer von Promega (Loading dye) enthielt:

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

2.5.3.4 Reinigung von Nukleinsäuren

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.5.3.7 Restriktionsverdau der amplifizierten PCR-Produkte

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

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

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

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

ad 30 μ l H₂O bi-dist

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

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

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

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

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

2.6 Enzymatische Messungen

2.6.1 Herstellung ruhender Zellen

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

2.6.2 Zellaufschlußmethoden und Dialyse von Rohextrakten

2.6.2.1 Zellpermeabilisierung

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

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

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

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

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

2.6.2.2 Zellaufschluß mit der French-Press oder mit Ultraschall

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

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

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

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

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

2.6.2.3 Dialyse von Rohextrakten

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

2.6.3 Messungen zum Nachweis THF abhängiger enzymatischer Aktivität an der Sauerstoffelektrode

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

2.6.3.1 Messungen mit ruhenden Zellen

Im Standardansatz wurden eingesetzt:

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

2.6.3.2 Messungen mit Rohextrakt

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

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

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

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

2.6.4.1 Messungen mit wachsenden, ruhenden und permeabilisierten Zellen

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

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

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

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

2.6.5 Reaktionsansatz für die Messung von NADH-Oxidaseaktivität

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

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

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

2.6.6 Reaktionsansatz für die Messungen von Reduktaseaktivitäten

Der Reaktionsansatz für die Messungen von Reduktaseaktivitäten war:

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

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

** Ausnahme: siehe Akzeptormix

2.6.6.1 Verwendete Elektronenakzeptoren

Die in Tabelle 1 aufgeführten Elektronenakzeptoren wurden verwendet.

Tabelle 1: Verwendete Elektronenakzeptoren.

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

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

** Anaerob gemessen.

2.6.7 Bestimmung enzymatischer Aktivität

2.6.7.1 Bestimmung enzymatischer Aktivität durch gaschromatographische Analyse der Substratabnahme

Die spezifischen Enzymaktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

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

2.6.7.2 Bestimmung enzymatischer Aktivität durch Messungen an der Sauerstoffelektrode

Die spezifische Enzymaktivität wurde nach folgender Formel bestimmt:

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

2.6.7.3 Bestimmung von Oxidase- und Reduktaseaktivitäten

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte nach der Formel:

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

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

V = Gesamtvolumen des Meßansatzes (ml)

d = Schichtdicke der Küvette (cm)

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

v = Probenvolumen (ml)

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

2.6.8 Untersuchung auf das Vorhandensein von bakteriellem Cytochrom P-450

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

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

2.7 Chromatographische Methoden

2.7.1 Gelfiltration von Rohextrakt

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

2.7.2 Ionenaustauschchromatographie von Rohextrakt

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

2.7.3 Anaerobe Ionenaustauschchromatographie von Rohextrakt

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

2.8 Immobilisierungsversuche

2.8.1 Charakterisierung der Zelloberfläche

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

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

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

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

ζ = Zetapotential (mV)

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

η = Dielektrizitätskonstante in der elektrischen Doppelschicht

ε = Viskosität (mPa x s)

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

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

2.8.1.2 Mikrotitration

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

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

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

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

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

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

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

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

2.8.1.5 Messung der Hydrophobizität

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

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

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

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

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

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

2.8.1.6 Nachweis von sauren Exopolysacchariden

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

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

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

2.8.2 Untersuchung des Adhäsionsverhaltens

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

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

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

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

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

Tabelle 2: Charakteristika der eingesetzten Trägermaterialien.

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

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

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

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

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

Untersuchung der Adhäsion mittels Rasterelektronenmikroskopie

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

2.8.3 Einschlußimmobilisierung ganzer Zellen mit Alginat

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

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

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

2.9 Chemikalien, Gase und Labormaterial

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

Aldrich-Chemie, Steinheim

Tetrahydrofuran (THF; 99,5+%)

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

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

Applied Biosystems, Perkin-Elmer, Weiterstadt

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

Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf

Tfl DNA Polymerase, MgCl₂ (25 mM)

Difco, Augsburg

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

Fluka Chemie, Neu-Ulm

Cytochrom C (aus Rinderherz)

Gibco BRL, Eggenstein

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

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Inkubationspuffer

Merck, Darmstadt

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

Messer Griesheim, Krefeld

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

Peglab Biotechnologie, Erlangen

Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand: 2 mm)

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

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

Qiagen, Hilden

QIAfilter Plasmid Midi Kit, QIAquick PCR-Purification Kit

Roche Diagnostics, Mannheim

Katalase (aus Rinderleber), RNase A, RNase T₁

Serva, Heidelberg

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

Stratagene, Heidelberg

Epicurian coli® competent cells XL1-Blue

2.10 Laborgeräte

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

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

BioRad Laboratories, München

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

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

Kontaktwinkelmeßgerät OCA 5, Data Physics, Filderstadt

Mikroskop Zeiss Axioskop FS mit Fotoapparat, Jena

Mikrotitrator, Deutsche Metrohm, Filderstadt

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

Thermozykler, TRIO-Thermoblock, Biometra, Göttingen

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

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

ZetaSizer 3000, Malvern Instruments, Malvern, England

Zweistrahlspektralphotometer Uvikon 930 Kontron, Neufahrn