

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Analytische Bestimmung der THF-Konzentration

##### 3.1.1 Analytische Bestimmung der THF-Konzentration mit GC/FID

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

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

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

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

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

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

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

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

### **3.2 Kultivierung einer THF abbauenden Mischkultur**

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

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

### **3.3 Isolierung und Charakterisierung der Bakterien der THF abbauenden Mischkultur**

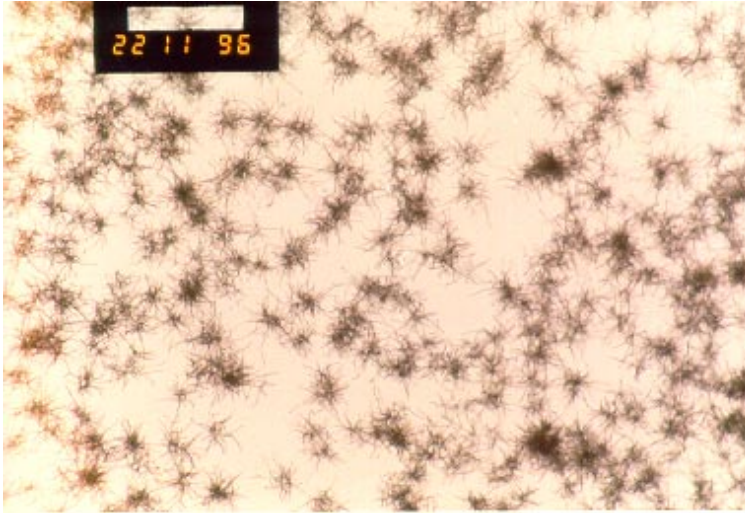
Beim Mikroskopieren der THF abbauenden Mischkultur zeigte sich, daß diese aus stäbchenförmigen Bakterien und myzelartig wachsenden Mikroorganismen bestand. Um letztere zu isolieren, wurde ein Arginin-Glyzerin-Agarmedium eingesetzt, das von El-Nakeeb und Lechevalier (1963) zur Isolierung von Actinomyceten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

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

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

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

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



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

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



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

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

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

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

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

Die Menachinonanalyse, durchgeführt für Stamm K1 und *Pseudonocardia sulfidoxydans* als Referenzstamm zeigte, daß beide Bakterien die gleichen Menachinone besitzen. Neben dem Menachinon MK-8 (H<sub>4</sub>) wurde ein zweites Menachinon detektiert, das mit MK-7 koeluierte (U. Lechner, persönliche Mitteilung). Die Analyse des Fettsäuremethylestergemisches ergab das in Tabelle 5 dargestellte Profil. Aufgrund dieses Fettsäuremusters konnte das THF abbauende Bakterium der Familie der *Pseudonocardiaceae* zugeordnet werden (R.M. Kroppenstedt, persönliche Mitteilung).

**Tabelle 5:** Fettsäureanalyse des Stamms K1.

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

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

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

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

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

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

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

Fortsetzung **Tabelle 6:**

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

n.b. = nicht bestimmt

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

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



Fortsetzung **Tabelle 7:**

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

n.b. = nicht bestimmt, <sup>1)</sup> = siehe Kapitel 3.4.6, \* Mit dem BBL-Crystal-Testsystem bestimmt.

### 3.3.1 16S rDNA-Analyse des Stamms K1

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

```

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

```

```

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

```

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

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

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

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

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

Bakterien, Literatur und Bezeichnung der Datenbankeinträge (EMBL):

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

### 3.4 Wachstumsversuche mit Stamm K1

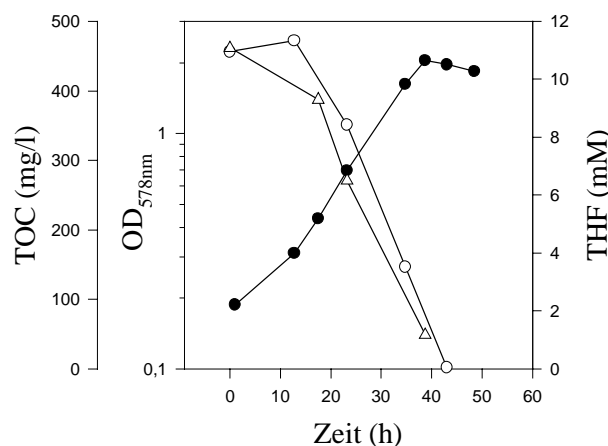
#### 3.4.1 Optimierung der Wachstumsbedingungen für das Wachstum in Mineralmedium mit THF

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

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

### 3.4.2 Wachstum des Stamms K1 in Mineralmedium mit 10 mM THF

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



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

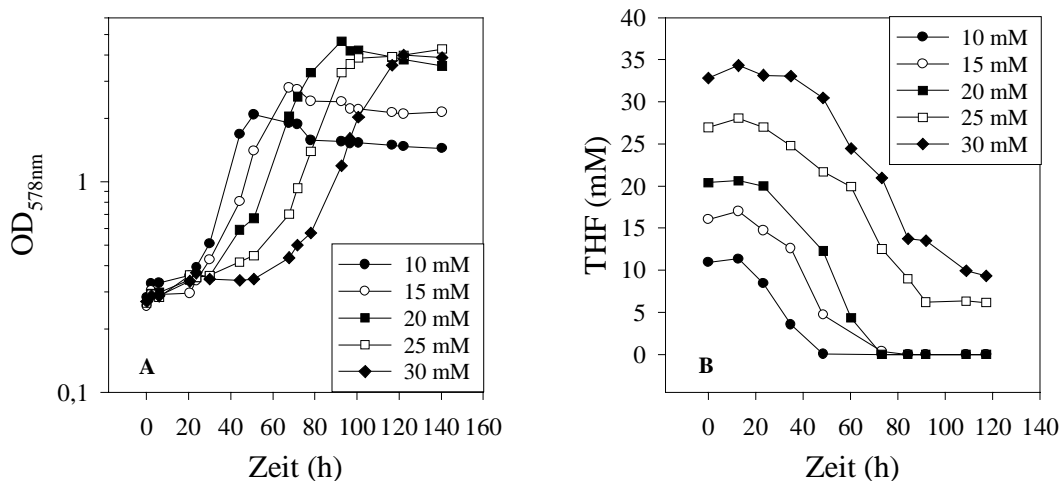
Das Mineralmedium (ohne Substrat) hatte einen TOC-Gehalt von ca. 20 mg/l. Nach Zugabe des Inokulums (und vor Zugabe des Substrats) war der TOC-Gehalt ca. 37,5 mg/l. Die gemessene Standardabweichung lag bei 1,7 % (n=5).

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

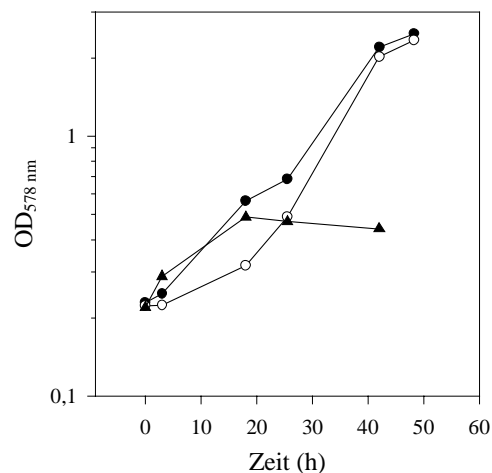
#### **3.4.5 Untersuchung der Stabilität des THF-Abbaupotentials in Stamm K1**

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

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

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

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



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

### 3.4.6 Bestimmung des Substratspektrums

Zur Bestimmung des Substratspektrums wurde Stamm K1 mit den nachfolgend aufgelisteten Ethern, Alkoholen, Zuckern, Purinen, Aminosäuren, Carbonsäuren, aromatischen Kohlenwasserstoffen und mit Misch-Rohabwasser eines THF verarbeitenden Betriebs, wie unter Kap. 2.2 in flüssigem Mineralmedium, inkubiert. Die jeweils untersuchten Substrate und -konzentrationen sind in Tabelle 9 angegeben. Die Substrate wurden unverdünnt oder in sterilem H<sub>2</sub>O dest gelöst eingesetzt. Zucker wurden in H<sub>2</sub>O dest gelöst, sterilfiltriert und dem Mineralmedium zugegeben. In Abb. D (Anhang) sind die Strukturformeln einiger untersuchter Substrate gezeigt.

**Tabelle 9:** Substratspektrum des Stamms K1.

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



Fortsetzung **Tabelle 9:**

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

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

<sup>2)</sup> Kohlweyer et al. (2000)

<sup>3)</sup> Die Toluolabnahme wurde gaschromatographisch verfolgt.

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

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

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

### 3.4.7 Toleranz gegenüber erhöhten Salzkonzentrationen

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

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

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

#### **3.4.8 Einfluß verschiedener Substrate auf die Hopanoidsynthese**

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

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

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

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

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

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

Für die quantitative Bestimmung wurden 0,2 mg C<sub>34</sub> als interner Standard gewählt. Die angegebenen Werte für Hopen und Monolacetal beziehen sich auf 10 mg Lipid (K. Poralla, persönliche Mitteilung).

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

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

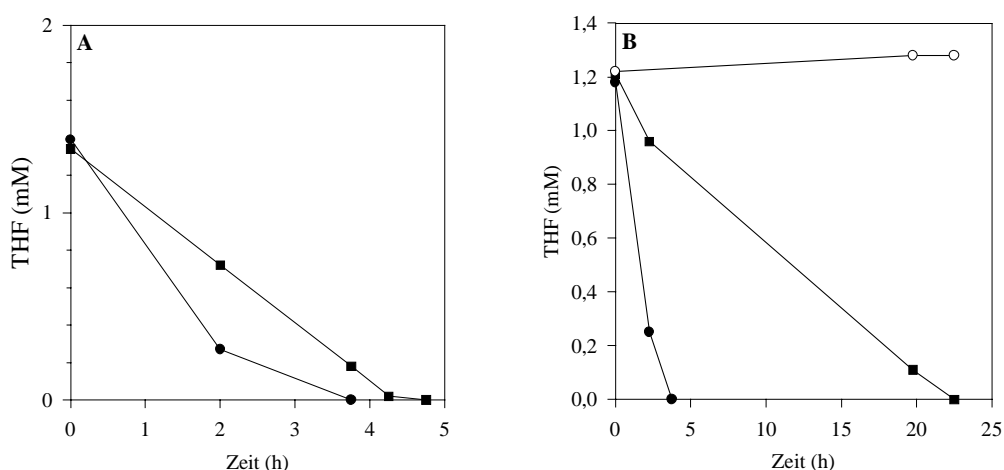
### 3.5.1 Zellaufschlußmethoden

#### 3.5.1.1 Zellpermeabilisierung

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

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

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



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

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

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

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

### 3.5.1.2 Zellaufschluß mit der French-Press oder mit Ultraschall

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

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

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

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

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

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

Messungen mit ruhenden Zellen des Stamms K1 zeigten, daß durch THF-Zugabe der Sauerstoffverbrauch im Vergleich zur endogen gemessenen Respiration (ca. 7 nmol O<sub>2</sub> / 20 µl ruhende Zellen, 1 g ZFG/ml Puffer) um das 3 bis 4fache anstieg (mit 0,1 mM THF 21 nmol O<sub>2</sub> / 20 µl ruhende Zellen, 1 g ZFG/ml Puffer; mit 1 mM THF 39 nmol O<sub>2</sub> / 20 µl ruhende Zellen, 1 g ZFG/ml Puffer). Eine THF-Konzentration von 0,1 bis 1 mM im Ansatz führte zu einer Steigerung, während THF-Konzentrationen größer 1 mM zur Verringerung der substratabhängigen Sauerstoffabnahme führte.

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

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

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

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

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

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

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

#### **3.5.3.1 In wachsenden, ruhenden und permeabilisierten Zellen**

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

#### **3.5.3.2 Messungen mit Rohextrakt**

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

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

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

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

#### **3.5.4 Untersuchung auf das Vorhandensein von bakteriellem Cytochrom P-450**

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

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

#### **3.5.5 Wachstum mit dem Kupferchelator Bathocuproin**

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



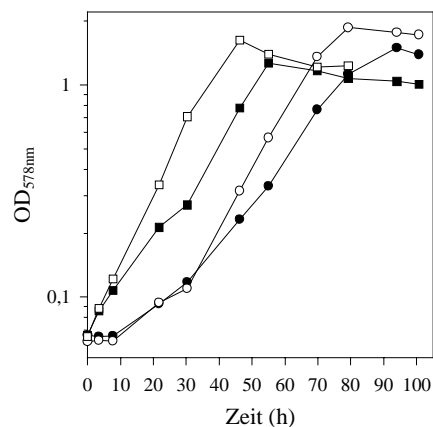
Stamm benötigt für ihre katalytische Aktivität Kupfer (Hyman et al., 1994). Daher sollte untersucht werden, ob ein kupferabhängiges Enzym im THF-Abbauweg involviert ist.

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

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

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

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



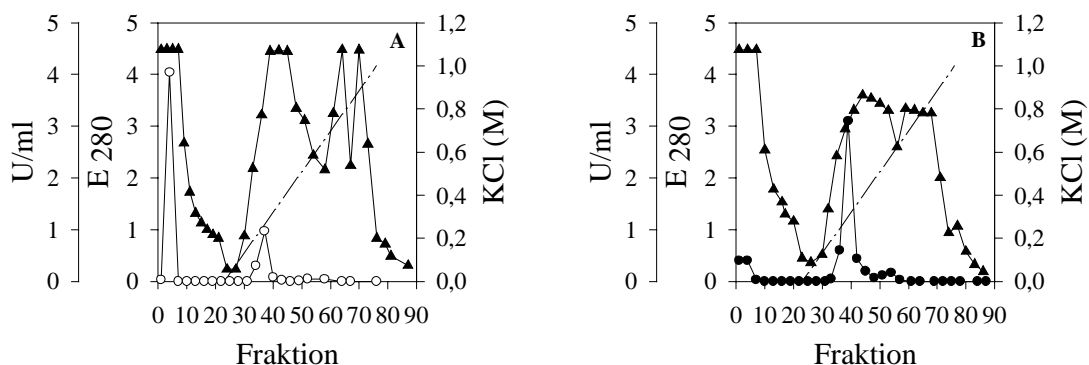
**Abb. 9:** Wachstum von Stamm K1 in Mineralmedium mit THF oder Succinat (jeweils 10 mM) und mit und ohne Kupferchelator Bathocuproin (1 mM).

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

### 3.5.6 Nachweis von Reduktaseaktivitäten in Zellextrakten des Stamms K1

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

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



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

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

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

### **3.5.6.1 Gemessene NADH-Oxidaseaktivitäten**

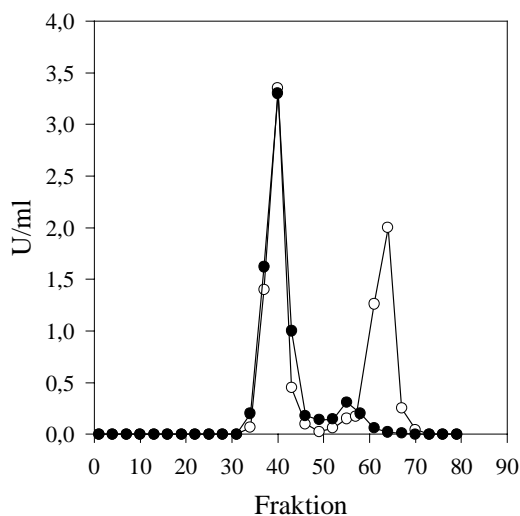
Alle Fraktionen wurden auf NADH-Oxidaseaktivität überprüft. Die gemessenen NADH-Oxidaseaktivitäten sind in Abb. 10 graphisch dargestellt. Die auf THF angezogenen Zellen zeigten einen Aktivitätspeak, der bei einer KCl-Konzentration von 0,17 bis 0,32 M (Fraktionen 32-40) mit maximaler Aktivität von 0,97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

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

### **3.5.6.2 Nachweis einer NADH-Cytochrom-c-Reduktaseaktivität**

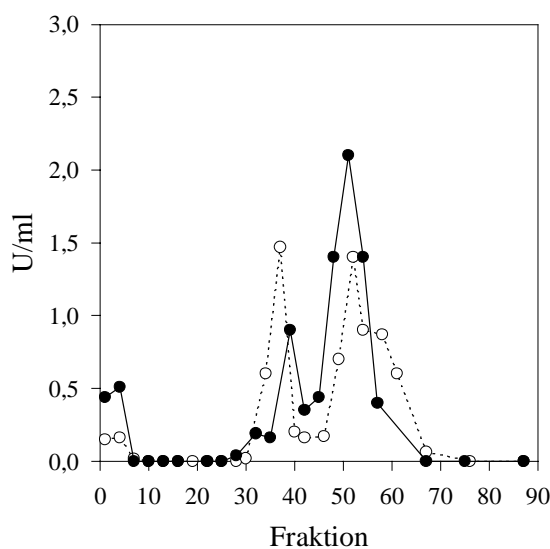
Nach Chromatographie von Rohextrakten der mit THF angezogenen Zellen eluierte die erste gemessene NADH abhängige Cytochrom-c-Reduktaseaktivität bei einer KCl-Konzentration von 0,15 bis 0,43 M (Fraktionen 31-46), deren maximale Aktivität 3,4 U/ml war (Abb. 11). Der zweite Aktivitätspeak eluierte von 0,54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

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



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

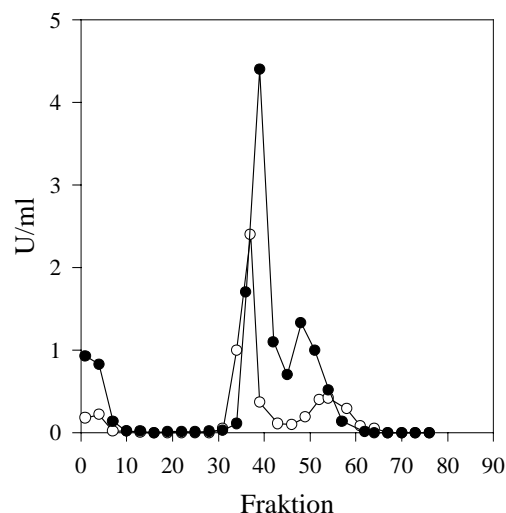
Weitere Untersuchungen sollten zeigen, ob in THF angezogenen Zellen noch mit anderen künstlichen Elektronenakzeptoren eine spezifische NADH abhängige Reduktaseaktivität vorhanden war. In Abb. 12 sind die gemessenen Reduktaseaktivitäten mit den künstlichen Elektronenakzeptoren "Akzeptormix" (Kap. 2.6.6.1)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



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

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

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



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

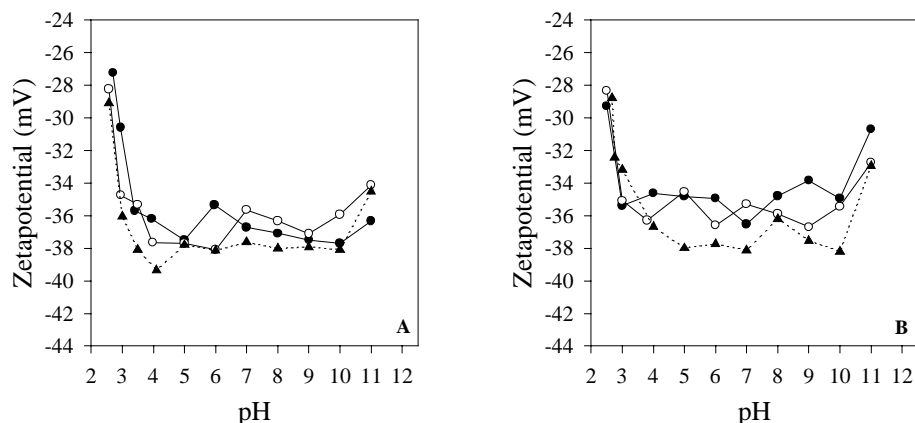
Der erste NBT-Reduktaseaktivitätspeak der mit Succinat angezogenen Zellen eluierte zwischen 0,2 und 0,4 M KCl mit einer maximalen Aktivität von 4,4 U/ml, der zweite

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

### **3.6 Untersuchungen zur Immobilisierung von Stamm K1**

#### **3.6.1 Charakterisierung der Zelloberfläche**

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

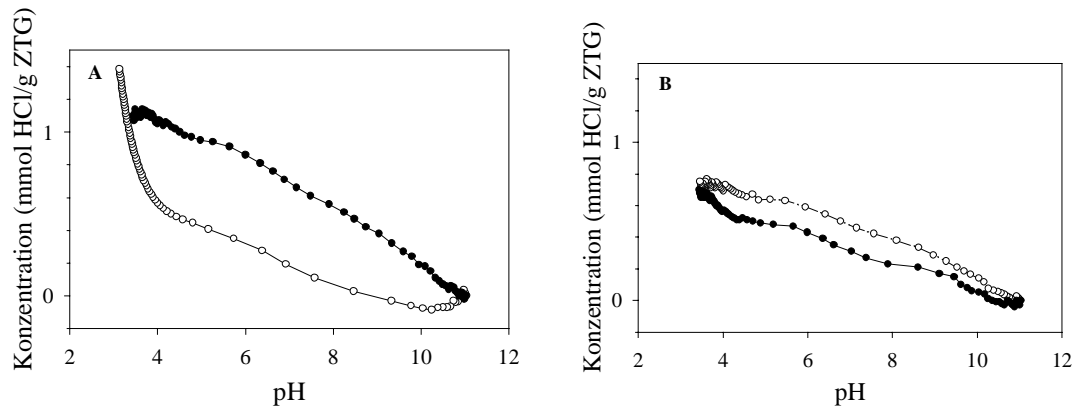


**Abb. 14:** Zetapotentiale des Stamms K1. A) Mit THF angezogene Zellen, B) Mit Succinat angezogene Zellen. ● = Zellen aus der frühlogarithmischen Wachstumsphase, O = Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase, ▲ = Zellen aus der stationären Wachstumsphase.

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

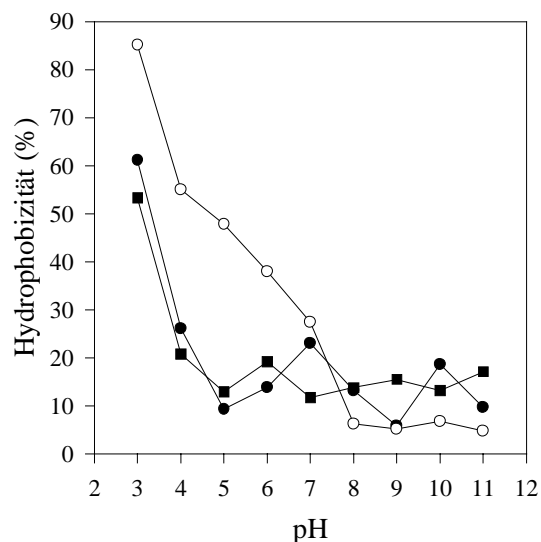
**Tabelle 11:** Titrierbare Oberflächengruppen Gram-positiver Bakterien (nach James, 1991).

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



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

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



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

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



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

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

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

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

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

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

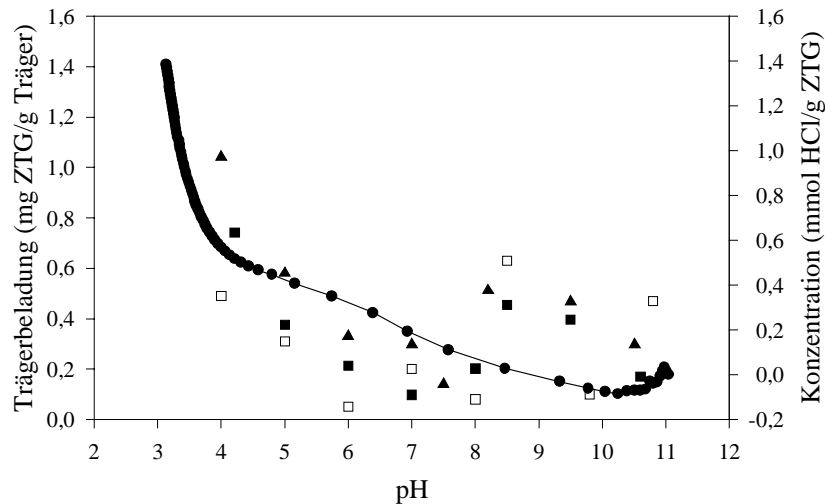
Die Versuche zur Bestimmung der physikochemischen Zelleigenschaften lassen vermuten, daß Stamm K1 kein "extremes", d.h. sehr spezielles, Adsorptionsverhalten besitzt. Das Isolat ist negativ geladen und die Ergebnisse aus den Farbstoffadsorptionstests mit dem negativ geladenen Farbstoff Orange II deuten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

### **3.6.2 Untersuchung des Adhäsionsverhaltens**

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

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

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



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

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

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

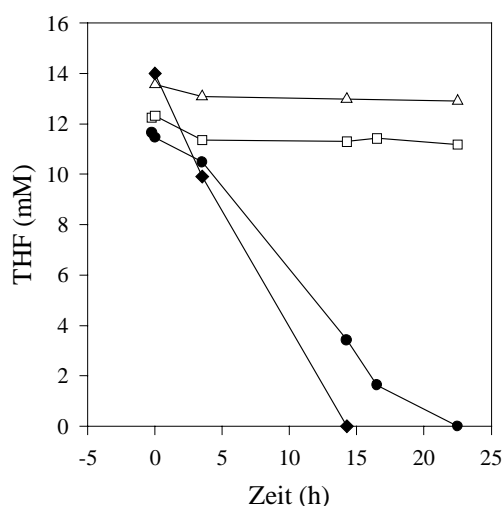
Mittels Rasterelektronenmikroskopie wurde der Bewuchs des Trägermaterials untersucht. Nach 48stündiger Inkubation waren die einzelnen Lewatit OC 1066 Trägerkugeln partiell bewachsen (Abb. F, Anhang). In Abb. G (Anhang) sieht man wie Stamm K1 die Oberfläche des Trägers überspannt. In Abb. H (Anhang) begrenzen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

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

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

### 3.6.3 Einschlußimmobilisierung ganzer Zellen mit Alginat

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



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