

4. Diskussion

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

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

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

4.1 Wachstumsoptimierung einer THF abbauenden Mischkultur

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

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

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

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

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

4.2 Isolierung und Charakterisierung einer THF abbauenden Reinkultur

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.3 16S rDNA-Analyse des Stamms K1

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

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

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

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

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

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

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

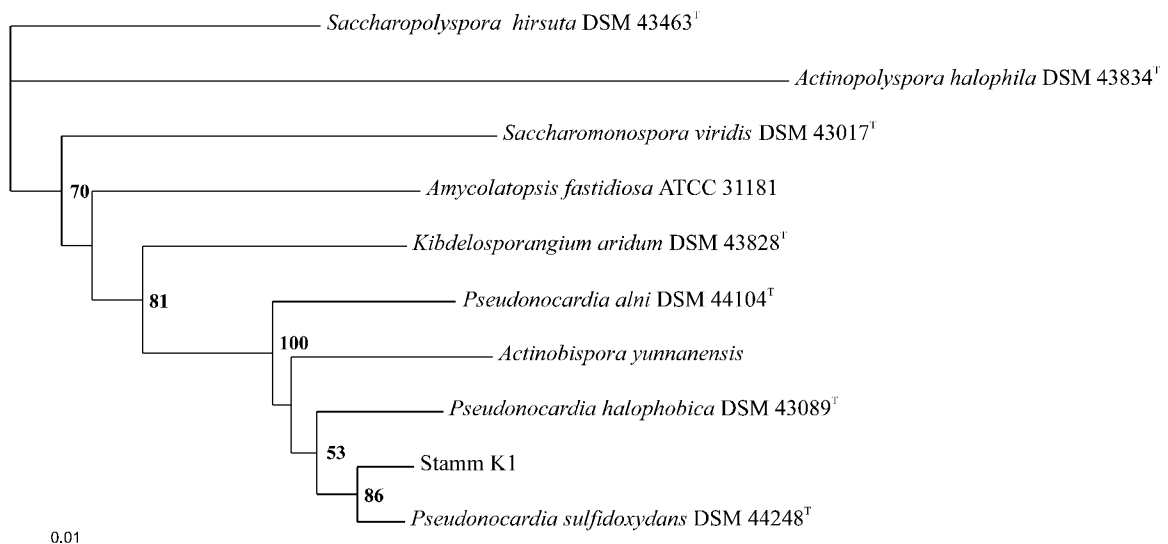


Abb. 20: Dendrogramm erstellt aufgrund durchgeführter 16S rDNA-Sequenzvergleiche mit dem PHYLIP-Programmpaket (Felsenstein, 1993) zur phylogenetischen Einordnung des THF abbauenden Bakteriums Stamm K1.

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

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

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

4.4 Wachstum des Stamms K1 mit THF und anderen Substraten

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.7 Immobilisierungsversuche mit Stamm K1

4.7.1 Charakterisierung der Zelloberfläche

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.7.2 Untersuchung des Adhäsionsverhaltens

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

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

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

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

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

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

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

4.7.3 Einschlußimmobilisierung mit Alginat

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

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

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

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

4.8 Ausblick

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

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

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

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