

**Entwicklung einer Gensondenanalytik für
die Mineralisation von DMSO
sowie
Untersuchungen an den Genen des
 β -Ketoacidweges in *Pseudomonas* sp. B13**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Naturwissenschaften II
der Bergischen Universität Gesamthochschule Wuppertal

vorgelegt von Kerstin Kassel-Çatı
aus Schwelm

Wuppertal 1999

Die experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurden im Zeitraum von Februar 1993 bis Dezember 1997 am Lehrstuhl für Chemische Mikrobiologie der Bergischen Universität Gesamthochschule Wuppertal durchgeführt.

Gefördert wurden die Untersuchungen durch Mittel des Bundesministeriums für Forschung und Technologie und der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Referent: Priv. Doz. Dr. Eberhard Schmidt

Koreferent: Prof. Walter Reineke

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Nov. 1999

Danksagung

Am Ende eines langen Weges möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die zum Entstehen und Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Bei Priv. Doz. Dr. Eberhard Schmidt möchte ich mich nicht nur für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit bedanken, sondern auch für die sehr freundschaftliche und kollegiale Zusammenarbeit. Wir konnten auch auf anderen Themengebieten so manche Diskussionen führen und beim „Geldeintreiben“ für eine bestimmte Kasse ;-)
stand er doch meistens auf meiner Seite.

Bei allen (ehemaligen) Mitgliedern der Arbeitsgruppen von Herrn Professor Walter Reineke, Herrn Professor Piepersberg und Herrn Priv. Doz. Dr. Eberhard Schmidt möchte ich mich für die freundschaftliche und zeitweise sehr lustige Arbeitsatmosphäre bedanken. Mit vielen Kollegen verbindet mich auch ausserhalb der Universität eine schöne Freundschaft. Pilzesuchen, Spanier-Treffen oder Reisen nach Holland waren nur einige Aktivitäten ausserhalb des normalen Laboralltags.

Frau Dipl.-Ing. Dagmar Müller vom Forschungszentrum Jülich möchte ich für die N-terminale Aminosäuresequenzierung danken.

Bei meiner Familie und allen Freunden möchte ich mich für ihre moralische Unterstützung bedanken. Mein besonderer Dank gilt meinem Mann Peter, der mir zu jeder Zeit tolerant und offen zur Seite gestanden hat. Besonders möchte ich ihm danken, dass es mir auch nach der Geburt unserer Tochter Aleah möglich war, diese Arbeit fertig zu stellen.

Nachdem ich nun schon über ein Jahr in München lebe und arbeite, denke ich doch noch oft an die Zeit in Wuppertal zurück. In den Jahren der Promotion habe ich nicht nur in der Mikrobiologie viel gelernt, auch auf menschlicher Seite habe ich viele neue Erfahrungen machen können. Dafür möchte ich allen Beteiligten DANKE sagen.

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abstract	V
1 Einleitung	1
Teil I Entwicklung einer Gensondenanalytik für die Mineralisation von DMSO	
1.1 Schwefelverbindungen in der Umwelt	2
1.2 Mineralisation von DMSO und DMS	4
1.3 Die Gattung <i>Hyphomicrobium</i> und ihr Einsatz in der Abwasserbehandlung	7
1.4 Nachweisverfahren für Bakterien in Umweltmedien	8
1.4.1 Traditionelle Methoden zum Nachweis von Bakterien	8
1.4.2 Isolation von genetischem Material aus Umweltmedien	9
1.4.3 Nachweis von Bakterien durch rRNA-gerichtete Gensonden	10
1.4.4 Nachweis von Bakterien durch Markergene	11
1.4.5 Nachweis von Bakterien durch DNA-Fingerprinting	12
1.4.6 Quantitativer Nachweis von Bakterien in Umweltproben	13
Teil II Untersuchung an den Genen des β-Ketoacidweges in <i>Pseudomonas</i> sp. B13	
1.5 Der bakterielle Abbau aromatischer Verbindungen	14
1.6 Der β -Ketoacidweg	15
1.6.1 Konvergenz und Isoenzyme	15
1.6.2 Genorganisation	15
2 Material und Methoden	20
2.1 Verwendete Organismen	20
2.2 Vektoren und rekombinante Plasmide	20
2.3 Verwendete Oligonukleotide	22
2.4 Medien	22
2.4.1 Minimalmedium zur Anzucht von Hyphomicrobien und von <i>Pseudomonas</i> sp. B13	22
2.4.2 LB (Luria Broth) Medium zur Anzucht von <i>E. coli</i>	23
2.4.3 NB (Nutrient Broth) Medium	23

2.5 Stammanzucht und Lagerung	23
2.6 Messung des Bakterienwachstums	24
2.7 Lebendzellzahlbestimmung	24
2.8 Herstellung von Proteinextrakten	24
2.9 Proteingehaltsbestimmung	25
2.10 Enzymaufreinigung	25
2.10.1 Ionenaustauschchromatographie	25
2.10.2 Aceton Fällung	25
2.11 Messung der Enzymaktivität von Methylmercaptan Oxidase	26
2.12 Gelelektrophorese von Proteinen	26
2.12.1 SDS-Page	27
2.12.2 Färbung von Proteingelen	28
2.13 Protein (Western) Blotting	28
2.14 Protein Fragmentierung	29
2.14.1 Proteinspaltung	29
2.14.2 Auftrennung der Proteinfragmente	29
2.15 Proteinsequenzierung	30
2.16 Isolation von DNA	30
2.16.1 Extraktion von genomischer DNA	30
2.16.2 Präparation von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	30
2.16.3 Isolation von DNA aus Wasserproben	31
2.17. DNA-Umsetzungen	31
2.17.1 Enzymatische Hydrolyse von DNA	31
2.17.2 Agarosegelelektrophorese	32
2.17.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	32
2.17.4 Dephosphorylierung von DNA	32
2.17.5 Auffüllreaktion	32
2.17.6 Ligation von DNA-Fragmenten	33
2.18 Herstellung von kompetenten Zellen	33
2.19 Transformation	33
2.20 Konzentrationsbestimmungen	33
2.20.1 DNA-Konzentrationsbestimmung	33
2.20.2 Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden	34
2.21 DNA-Sequenzierung	34
2.22 Oligonukleotidsynthese	34
2.23 Nukleinsäure-Blotting	34
2.23.1 DNA-Blotting (Southern-Blot)	34
2.23.2 Kolonie-Blotting	35

2.24 Radioaktive Markierung von DNA	35
2.24.1 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	35
2.24.2 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden	36
2.25 Hybridisierung	36
2.25.1 Hybridisierungsreaktion	36
2.25.2 Autoradiographie	36
2.26 Polymerasekettenreaktion (PCR)	37
2.26.1 Allgemeine PCR-Bedingungen	37
2.26.2 Amplifizierung der 16S rDNA mit Hilfe der PCR	37
2.27 Chemikalien und Enzyme	38
2.28 Computerprogramme	38
3 Experimente und Ergebnisse	39
Teil I Entwicklung einer Gensondenanalytik für die Mineralisation von DMSO	
3.1 Entwicklung einer stammspezifischen Gensonde für <i>Hyphomicrobium</i> EG	39
3.1.1 Amplifizierung und Klonierung der 16S rDNA aus Hyphomicrobien	39
3.1.2 Sequenzanalyse der 16S rDNA aus Hyphomicrobien	41
3.1.3 Ableitung einer stammspezifischen Gensonde aus den 16S rDNA-Sequenzen der verschiedenen Hyphomicrobien Stämme	44
3.1.4 Einsatz der stammspezifischen Gensonde für <i>Hyphomicrobium</i> EG in verschiedenen Wasserproben	47
3.2 Entwicklung einer Gensonde für den DMSO-Abbau durch <i>Hyphomicrobium</i> EG	49
3.2.1 Reinigung und N-terminale Sequenzierung des Enzyms Methylmercaptan Oxidase	49
3.2.2 Proteolyse des Enzyms Methylmercaptan Oxidase	50
3.2.3 Amplifizierung und Klonierung eines für die Methylmercaptan Oxidase kodierenden DNA-Abschnittes	51
3.2.4 Ableitung einer für den DMSO-Abbau durch <i>Hyphomicrobium</i> EG spezifischen Gensonde	53
3.3 Entwicklung einer Gensonde für die anaerobe Reduktion von DMSO durch unspezifische Reduktasen	55
Teil II Untersuchungen an den Genen des β-Ketoacidatweges in <i>Pseudomonas</i> sp. B13	
3.4 Versuche zur Lokalisierung des Gens für die 3-Oxoacidat:Succinyl-CoA-Transferase aus <i>Pseudomonas</i> sp. B13	58
3.5 Versuche zur Identifikation eines Genclusters für die Gene des β -Ketoacidatweges in <i>Pseudomonas</i> sp. B13	60

4 Diskussion	65
4.1 Nachweisverfahren für methylo trope Bakterien	65
4.1.1 Entwicklung stammspezifischer Gensonden und ihre Anwendungsmöglichkeiten	65
4.1.2 Einsatz stammspezifischer Gensonden in verschiedenen Wasserproben und ihre Nachweisgrenzen	68
4.2 Gensondenanalytik für den Nachweis einer Stoffwechseleigenschaft	69
4.2.1 Nachweis des DMSO-Abbaus unter aeroben Bedingungen	69
4.2.2 Nachweis des DMSO-Abbaus unter anaeroben Bedingungen	70
4.3 Die Gene des β -Ketoacidweges in <i>Pseudomonas</i> sp. B13	72
5 Zusammenfassung	75
6 Literatur	76
Abkürzungen	89
Lebenslauf	90

Abstract

For the development of a gene probe for the mineralization of DMSO by *Hyphomicrobium* EG the 16S rDNA of *Hyphomicrobium* EG, *Hyphomicrobium* sp.1564, *Hyphomicrobium* sp.1565 and *Hyphomicrobium* sp.1566 was amplified, cloned and sequenced. From these sequences a strain specific oligonucleotide for *Hyphomicrobium* EG could be found. This oligonucleotide was used for detecting *Hyphomicrobium* EG in different kind of bacterial mixtures. *Hyphomicrobium* EG could be detected likewise in different kind of natural water probes in a concentration of 100 bacteria/ml.

For the development of a gene probe for the key enzyme of the DMSO degradation by *Hyphomicrobium* EG, the methylmercaptane oxidase, the enzyme was purified and digested with trypsin. The peptides were sequenced. Using certain oligonucleotides derived from these sequences the gene for the methylmercaptane oxidase was nearly complete amplified by PCR. From this gene fragment oligonucleotides were derived. With these oligonucleotides the gene of the methylmercaptane oxidase could be detected for the identification of the specific degradation of DMSO by *Hyphomicrobium* EG.

DMSO could also be degraded to DMS by unspecific reductases. For detecting this anaerobic reduction oligonucleotides were derived from known sequences of the enzyme DMSO reductase. These oligonucleotides could be used in PCR experiments for detecting the genes of the unspecific DMSO reductases in the different kind of natural water probes.

From the strain *Pseudomonas* sp. B13 the enzyme β -keto adipate:succinyl-CoA transferase was purified and N-terminal sequenced previously. From these sequences oligonucleotides could be derived for amplification and sequencing a 2.3 kbp DNA fragment. It seems that this fragment contains the gene of the enzyme β -keto adipyl-CoA thiolase and part of the genes of the enzymes β -keto adipate:succinyl-CoA transferase and β -keto adipate-enolactone hydrolase.

1 Einleitung

Die Verunreinigung unserer Umwelt wie Luft, Boden oder Wasser durch Xenobiotica hat in den letzten Jahrzehnten immer stärkere Ausmaße angenommen. Mit Zunahme der Verschmutzung der Umweltmedien wurden auch immer mehr Verfahren entwickelt, um die Schadstoffe aus den Umweltmedien zu beseitigen. Ein Bericht der amerikanischen Umweltschutzbehörde von November 1991 hat bereits mehr als 130 konzeptionell verschiedene Verfahren aufgelistet und nach Ort der Sanierung unterschieden: direkt in der kontaminierten Zone (*in situ*), in unmittelbarer Nähe (*on site*) und fernab (*off site*). Die traditionellen Methoden bieten jedoch oft nur wenige Möglichkeiten. Bei der Bodensanierung wird z.B. belasteter Boden entweder ausgehoben und in einer geeignet erscheinenden Deponie gelagert oder in speziellen Anlagen verbrannt. In beiden Fällen sind die Transportkosten sehr hoch und der für die Bodenfruchtbarkeit wichtige Humus geht verloren. Bei der Deponierung werden die Schadstoffe zudem nicht vernichtet, sondern lediglich beiseite geschafft, wodurch sich später weitere Risiken ergeben können. In überbautem Gebiet kann kontaminiertes Material zudem häufig nicht ausgebaggert werden. In den letzten Jahren sind jedoch zahlreiche alternative physikalische, chemische, biologische und thermische Sanierungsverfahren entwickelt und zum Teil in der Praxis bereits erfolgreich eingesetzt worden. Biologische Sanierungen erscheinen als besonders attraktiv, weil sich dabei im Idealfall die Schadstoffe direkt im Erdreich, Grundwasser oder Abwasser mit Hilfe von Mikroorganismen zu anorganischen Verbindungen abbauen, also mineralisieren lassen, wobei gleichzeitig Biomasse in Form von Zellsubstanz entsteht und die Bodenfruchtbarkeit erhalten bleibt.

Zur biologischen Sanierung von Umweltmedien müssen je nach Schadstoff jedoch erstmal Mikroorganismen angereichert werden, die diese Schadstoffe mineralisieren können. Stehen schon Mikroorganismen zum Abbau zur Verfügung oder reicht die natürliche Population im Umweltmedium aus, ist es während der Sanierung erforderlich, die Biodynamik im Umweltmedium zu beobachten, das heißt, der Verbleib der zum Abbau erforderlichen Mikroorganismen im Medium muß genauso verfolgt werden wie seine Abbauleistung. Dies kann zum einem durch den Nachweis und Konzentrationsverlauf des Schadstoffes selbst erfolgen, und zum anderen durch den Nachweis der zum Abbau eingesetzten Bakterien.

Stehen für ein bestimmtes Kontaminierungsproblem noch keine effizienten Mikroorganismen zur Mineralisierung des Schadstoffes zur Verfügung, können durch klassische Methoden wie der Adaptation oder der *in vivo* Konstruktion von Hybridstämmen durch konjugativen DNA-Transfer leistungsfähige Bakterienstämme entwickelt werden. Aber auch durch Kenntnis der Zusammenhänge des Abbaupotentials eines Bakteriums auf genetischer Ebene können durch *in vitro* Konstruktion von genetisch veränderten Mikroorganismen (GVO) neue Abbauleistungen geschaffen werden. Dafür sind jedoch intensive Untersuchungen der enzymatischen und genetischen Zusammenhänge des Abbaus eines Schadstoffes durch einen Bakterienstamm notwendig.

Die Sicherheit im Umgang mit industriell genutzten Produktions- oder Abbauorganismen, seien es nun natürlich vorkommende Organismen oder gentechnisch veränderte, sollte durch die Entwicklung von einfachen, zuverlässigen und empfindlichen Nachweismethoden geschaffen werden. Wichtig ist dabei eine möglichst intensive Kenntnis der allgemeinen Verhaltensweise von Mikroorganismen sowie ihrer genetischen Eigenschaften in einer Vielzahl relevanter Ökosysteme.

Die vorliegende Arbeit besteht aus zwei Teilen. Im ersten Teil soll am Beispiel des DMSO-Abbaus durch *Hyphomicrobium* EG gezeigt werden, wie ein Nachweisverfahren entwickelt werden kann, um den Verbleib eines natürlich vorkommenden Bakteriums und sein Abbaupotential während einer Abwasserreinigung zu untersuchen. Weiterhin soll ein Nachweisverfahren entwickelt werden, um das DMSO-Abbaupotential von den Mikroorganismen, welche schon im Abwasser vorhanden sind, zu analysieren.

Der zweite Teil der Arbeit zeigt die Analyse eines Genclusters des Stammes *Pseudomonas* sp. B13. Es werden die Gene des β -Ketoacid-Weges untersucht, ein in Bakterien und Pilzen weit verbreiteter Abbauweg zur Mineralisation von aromatischen Substanzen.

Teil I

Entwicklung einer Gensondenanalytik für die Mineralisation von DMSO

1.1 Schwefelverbindungen in der Umwelt

Dimethylsulfoxid (DMSO) ist das bekannteste und am häufigsten gebrauchte Sulfoxid. Es stellt ein hervorragendes Lösemittel für viele organische und anorganische Substanzen dar. Es wird bei Alkylierungsreaktionen eingesetzt, da es eine hohe Polarität und eine gute Solvationsfähigkeit für Kationen besitzt. Weitere Reaktionen mit DMSO als Lösungsmittel sind Dehydrierungen, Dehydrohalogenierungen, Phosphorylierungen, Ringöffnungsreaktionen von Epoxiden und Radikalreaktionen.

Da DMSO die Fähigkeit der Haut zur Resorption von Arzneimittel erhöht, wird es unter anderem auch als Lösemittel für Ohrentropfen und Injektionslösungen verwendet (Leake, 1967). Es findet weiterhin Verwendung als Lösemittel zur Herstellung spinnfähiger Lösungen von Polymeren.

DMSO hat eine geringe Toxizität. Die LD₅₀-Werte liegen nach oraler, dermal oder intraperitonealer Zufuhr für verschiedene Tierarten im Bereich von 10-30 g/kg Körpergewicht. Resorptiv toxische Wirkungen sehr hoher Dosen zeigen sich vorwiegend an Leber und Niere. Unverdünnt führt DMSO zu einer histaminartigen Reaktion der Haut, die Schleimhäute werden gereizt. Eine intradermale Injektion führt zur Blasenbildung. DMSO/Wasser-Gemische zeigen keine Reizwirkung. Enzymatische Reaktionen können durch DMSO inhibiert werden, die Wirkung anderer Stoffe, wie z.B. von Medikamenten oder aromatischen Kohlenwasserstoffen, kann gesteigert werden. Auch eine Steigerung der Aktivität cancerogener Stoffe und gesteigerte Tumorinduktion, im Sinne einer Cocarcinogenität ist denkbar.

Durch den weit verbreiteten Einsatz von DMSO in den unterschiedlichsten Formen, gelangt DMSO in größeren Mengen als Verunreinigung in die Umwelt. Da es sich bei DMSO jedoch nicht um einen abiotischen Fremdstoff handelt, sollte eine Mineralisation von DMSO möglich sein.

Die Problematik von DMSO in Umweltmedien ist nicht durch die Substanz selber gegeben, sondern durch ihre Abbauprodukte wie z.B. Dimethylsulfid (DMS), die durch einen unvollständigen biologischen Abbau entstehen. DMSO wird z.B. im Abwasser durch unspezifische Reduktasen, welche in vielen Mikroorganismen vorhanden sind, zu DMS reduziert. DMS diffundiert aufgrund seiner hohen Flüchtigkeit aus dem Abwasser, was zu einer erheblichen Geruchsbelästigung führen kann (Abb. 1.1).

Der Gestank in Barmen kam von Akzo Nobel

Mittel zur Membran-Herstellung ist wahrscheinlich schuld an der Geruchsbelästigung / Akzos Lösung: Der „rollende Kanal“

(tom). „Wir sind höchstwahrscheinlich die Verursacher des Gestanks in Barmen“, meldete sich Dr. Günter H. Vitzthum, Chef der Firma Akzo Nobel, freiwillig bei den Stadtentwässerern. Nach dem Bericht in der Westdeutschen Zeitung über die Geruchsbelästigungen in Barmen forschte die Mannschaft von Vitzthum in den eigenen Produktionshallen — und wurde fündig. Das Lösungsmittel, das

bei der Herstellung von Kunststoffmembranen eingesetzt wird, ist mit dem Abwasser in die Kanalisation gelangt und wahrscheinlich die Quelle des unangenehmen Geruchs. Inzwischen wurde auch eine Lösung — in Absprache mit der Stadtverwaltung — gefunden: Das Abwasser wird mit dem Tankwagen zur Kläranlage gefahren. Vitzthum nennt es den „rollenden Kanal“.

Es handelt sich um die Sub-

stanz Dimethylsulfoxid (DMSO), die in der Produktion von Dialyse-Membranen eingesetzt wird. Der Stoff werde am Ende der Herstellung wieder ausgewaschen, ein Teil in die Produktion zurückgeführt, der andere mit dem Abwasser in den Kanal gespült. Dafür hat Akzo Nobel eine Einleitungserlaubnis, da es sich um eine ungefährliche Substanz handle, bestätigt Franz Pölkling vom Ressort Natur und Frei-

raum. DMSO werde auch als Trägermittel zum Beispiel bei Salben eingesetzt.

Im Kanal, so Vitzthum, bauten Mikroorganismen DMSO ab. Dabei entstünden schwefelhaltige Verbindungen, „die ziemlich stark stinken“. Etwa sechs Kilogramm DMSO wurden stündlich in den Kanal eingeleitet. Im Sommer war die Produktion erheblich ausgeweitet worden. Um die üblen Gerüche zu verhin-

dem, wird das Spülwasser in Tanks aufgefangen und zweimal täglich in die Kläranlage gefahren. Der Versuch laufe seit vergangener Dienstag. Seither gebe es auch keine Beschwerden mehr, sagte Pölkling. Der „rollende Kanal“ sei aber nur ein Provisorium, verrät Vitzthum. Bis in einem halben Jahr soll DMSO schon im Produktionsprozeß abgebaut werden, damit es in Barmen nicht mehr stinkt.

Abb. 1.1: Zeitungsausschnitt aus WESTDEUTSCHER ZEITUNG vom November 1996

Die in dem Zeitungsartikel (Abb. 1.1) beschriebene provisorische Lösung in Form des „rollenden Kanals“ zur Überführung des DMSO-haltigen Abwasser direkt in die kommunale Kläranlage ist bedenklich. In der Kläranlage stehen den dort vorhandenen

Mikroorganismen leichter verwertbare Substanzen als DMSO zur Verfügung, so daß ein effizienter Abbau auch dort verhindert wird. Im Belebtecken der Kläranlage wird das durch unspezifische Reduktion entstehende DMS durch die Belüftung herausgeblasen, so daß die Überführung des DMSO-haltigen Abwassers in Tankwagen in die Kläranlage nur eine örtliche Verlagerung des Problems darstellt. Wesentlich sinnvoller ist eine Beseitigung von DMSO aus Industrieabwässern direkt nach dem Produktionsprozeß.

Bei DMS handelt es sich im Gegensatz zu DMSO um eine toxische Substanz (Mhatre et al., 1983). Sie ist äußerst flüchtig und übelriechend mit einer Geruchsschwelle von 2,5 ppb (Leach et al., 1982). Flüchtige Sulfide wie DMS werden in großen Mengen in der papierverarbeitenden Industrie, in Ölraffinerien und in Düng- und Abwassersystemen produziert.

DMS ist neben Schwefelwasserstoff die mengenmäßig wichtigste Schwefelverbindung aus biogener Emission. Von DMS wird angenommen, daß es eine Hauptkomponente der reduzierten Schwefelverbindungen ist, welche aus Ozeangebieten zu terrestrischen Regionen durch Wind und Regen transportiert werden (Lovelock et al., 1972; Nguyen et al., 1978; Andreae et al., 1983). Weiterhin ist DMS ein bedeutender Bestandteil der flüchtigen Schwefelverbindungen aus terrestrischen Gebieten (Banwart et al., 1976).

DMS kann biologisch und chemisch zu DMSO oxidiert werden (Taylor et al., 1989). Die chemische Oxidation zu DMSO wurde sowohl im Oberflächenwasser der Meere als auch in der Atmosphäre (Plane, 1989) nachgewiesen. Nach Andreae (1980) ist DMSO auch im Regen über marinen Regionen enthalten.

Die biologische Oxidation von DMS zu DMSO erfolgt durch verschiedene Monoxygenasen in Tieren, Pflanzen, Pilzen und Bakterien (Taylor et al., 1989), und unter anaeroben Bedingungen mit Hilfe von Licht durch Anoxiphotobakterien (Zeyer et al., 1987).

Eine vollständige Mineralisation von DMSO und DMS in einem Abwasser direkt nach einem Produktionsprozeß und vor dem Einleiten in das öffentliche Kanalsystem ist durchaus möglich, da leistungsfähige Organismen zum Abbau von DMSO und DMS angereichert werden konnten.

1.2 Mineralisation von DMSO und DMS

Die Mineralisation von DMSO und DMS kann unter aeroben oder anaeroben Bedingungen erfolgen und wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben.

Unter anaeroben Bedingungen wird DMSO über DMS und Methylmercaptan zu Methan, Kohlendioxid und Schwefelwasserstoff abgebaut (Kiene et al., 1986). Zinder et al. (1978) beschrieben sowohl Prokaryonten als auch Eukaryonten, die DMSO zu DMS umsetzten. Dabei zeigten Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* und *Bacillus subtilis*

mengenmäßig den größten Umsatz von DMSO zu DMS. Aber auch fermentative Anaerobier wie *Streptococcus faecalis* und *Clostridium butyricum* sind ebenso in der Lage, DMSO zu reduzieren, wie auch *Aspergillus niger* und *Saccharomyces cerevisiae*. Sulfat-reduzierende Bakterien der Gattung *Desulfovibrio*, welche aus marinen Regionen isoliert wurden, sind ebenfalls in der Lage, DMSO zu DMS umzusetzen (Jonkers et al., 1996).

Unter aeroben Bedingungen wird DMSO und DMS durch Thiobacillen und Hyphomicrobien abgebaut (Taylor et al., 1989). Als Zwischenstufen treten bei der Mineralisation von DMSO DMS, Methylmercaptan, Schwefelwasserstoff und Formaldehyd auf. Endprodukte sind Schwefelsäure und Kohlendioxid (de Bont et al., 1981).

Sivelä et al. (1975) isolierten den Stamm *Thiobacillus*MS1 aus einer Biofilteranlage, welche zur Geruchsbeseitigung aus Abwässern einer Sulfat-Cellulose Fabrik eingesetzt wurde. Dieser Stamm ist bei Wachstum in einem thiosulfatlimitierten Chemostaten in der Lage, DMS als alleinige Kohlenstoff- und /oder Energiequelle zu nutzen (Sivelä, 1980). Es konnte beobachtet werden, daß *Thiobacillus*MS1 als obligater chemolithotropher Organismus beim Wachstum auf Thiosulfat und DMS sowohl den Calvin-Cyclus zur CO₂-Fixierung, als auch den Serinweg zur Assimilation von Formaldehyd einsetzen kann. Kanagawa et al. (1986) zeigten, daß die meisten Thiobacillen jedoch das von anderen Mikroorganismen freigesetzte Kohlendioxid als alleinige Kohlenstoffquelle verwenden.

Aus Anreicherungskulturen auf DMSO aus Erdproben unter aeroben Bedingungen konnten de Bont et al. (1981) den Stamm *Hyphomicrobium* S isolieren. Es handelt sich um einen obligat methylo-trophen Organismus, der nur auf DMSO und DMS wachsen kann. Im Gegensatz zu den meisten Vertretern der Gattung *Hyphomicrobium* ist dieser Stamm nicht in der Lage Ethanol, Acetat, Methanol, Formiat, Trimethylamin-N-oxid oder methylierte Amine umzusetzen. In einer pH-kontrollierten Batchkultur mit DMSO als alleiniger Kohlenstoffquelle lag die Verdopplungszeit bei 32 Stunden.

Einen wesentlich effektiveren Umsatz von DMSO zu Schwefelsäure und Kohlendioxid erreichte der von Suylen et al. (1986) isolierte Stamm *Hyphomicrobium* EG. Dieser Stamm wurde aus einer Probe aus einem Biofilter in einer Batchkultur mit DMSO als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle angereichert. Der Biofilter diente zur Reinigung von Abwasser, welches durch methylierte Schwefelverbindungen verunreinigt war. Das Substratspektrum von *Hyphomicrobium* EG ist größer als das von *Hyphomicrobium* S. Neben DMSO und DMS kann *Hyphomicrobium* EG auch methylierte Amine, Formiat und Trimethylamin-N-Oxid umsetzen. Die Wachstumskonstante μ_{\max} ist bei *Hyphomicrobium* EG fünfmal höher als die von *Hyphomicrobium* S, während die K_S-Werte für DMSO in beiden Stämmen etwa gleich groß sind.

Die Mineralisation von DMSO durch Hyphomicrobien zeigt Abb. 1.2. Die Umsetzung des Schwefelwasserstoffes zu Schwefelsäure wird von den Bakterien als Energiequelle

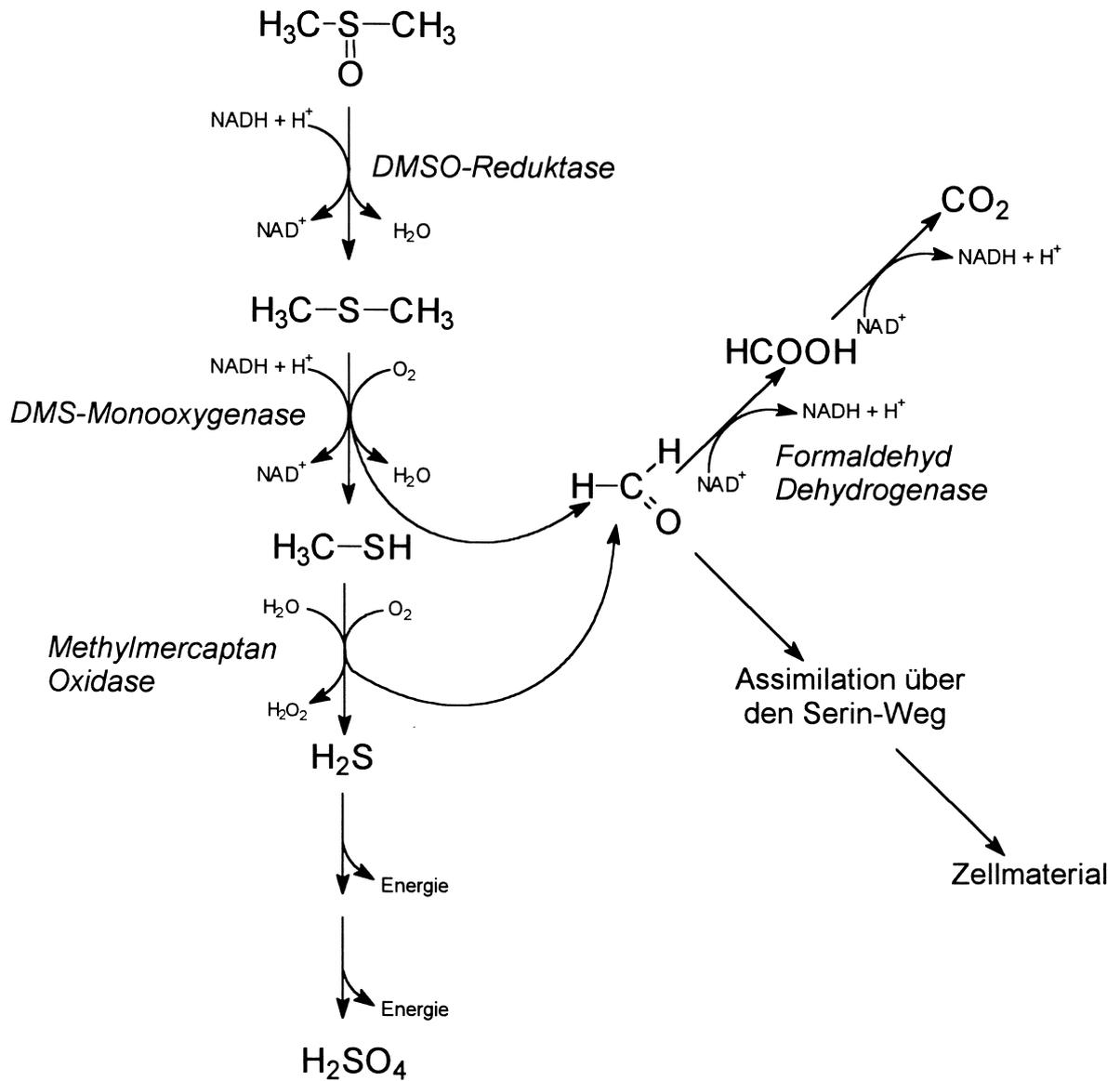


Abb. 1.2: Abbauschema der Mineralisation von DMSO durch Hyphomicrobien

genutzt. Als alleinige Kohlenstoffquelle dient den Hyphomicrobien das abgespaltene Formaldehyd, welches über den Serin-Weg verwertet wird. Hyphomicrobien können zur Entfernung von DMSO und DMS aus Abwässern eingesetzt werden (Large et al., 1988).

1.3 Die Gattung *Hyphomicrobium* und ihr Einsatz in der Abwasserbehandlung

Hyphomicrobien gehören zu den knospenden, prosthekativen Bakterien. Als methylo-trophe Bakterien sind sie durch ihre Fähigkeit zum Wachstum auf C_1 -Verbindungen ausgezeichnet. Hyphomicrobien sind fakultativ methylo-troph, einige auch eingeschränkt fakultativ methylo-troph, d.h. daß sie neben den C_1 -Verbindungen nur eine sehr begrenzte Anzahl von Verbindungen mit mehreren Kohlenstoffatomen verwerten können. Die Gattung *Hyphomicrobium* nimmt eine besondere Stellung unter den fakultativ methylo-trophen Bakterien ein, da sie durch ihre Morphologie mikroskopisch leicht erkennbar ist. Der Lebenszyklus dieser Gattung ist charakterisiert durch die morphologische Differenzierung (Abb. 1.3).

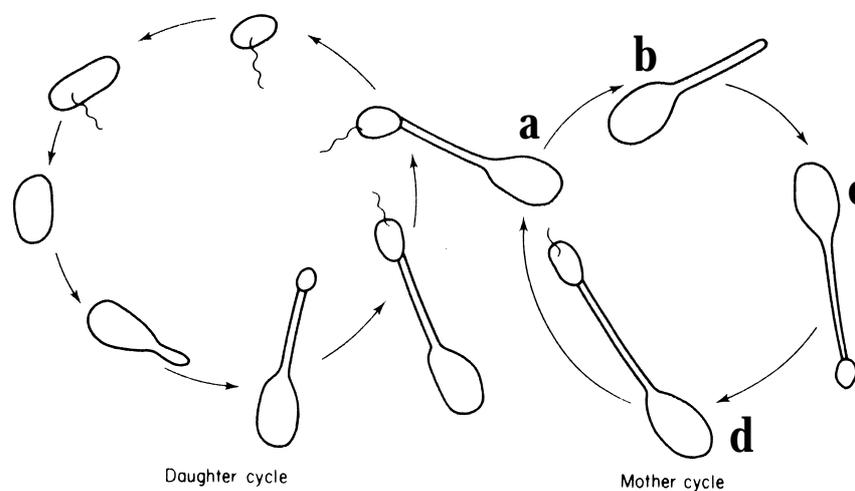


Abb. 1.3: Entwicklungszyklus von Hyphomicrobien

Die reife Zelle bildet eine Hyphe, an der eine Knospe entsteht (b-c). An dieser Tochterzelle entwickeln sich polar 1-3 Geißeln und die Zelle wird beweglich (d). Sie trennt sich von der Mutterzelle ab (a) und setzt sich an Oberflächen fest, oder sie heftet sich an andere Zellen (Zellsternbildung). Nach dem Festsetzen geht die Geißel verloren und eine Hyphenbildung beginnt. Die Mutterzelle kann mehrmals weitere Tochterzellen ausbilden (aus: Harder et al., 1978).

Vertreter der Gattung *Hyphomicrobium* konnten aus dem Belebtschlammbecken einer Kläranlage isoliert werden (Schmider et al., 1986). Nach Zugabe von Methanol als externe Kohlenstoffquelle zur gezielten Denitrifikation in der Abwasserbehandlung stieg die Zahl der Hyphomicrobien in der Belebtschlammflocke und in Biofilmen an (Timmermanns et al., 1983; Liessens, 1993). Die Fähigkeit zur Denitrifikation scheint jedoch auf bestimmte Arten beschränkt zu sein (Hirsch, 1989). Die Biochemie der Denitrifikation unter Verwendung von C_1 -Verbindungen bei diesen Stämmen wurde intensiv untersucht (Uebaysi et al., 1976; Nurse, 1980; Lebedinskii, 1981). Neben der gezielten Denitrifikation können Vertreter der Gattung *Hyphomicrobium* auch für den Abbau von Halomethanen, Methylaminen, methylierten Schwefelverbindungen und Methylphosphaten in Abwässern eingesetzt werden (Large et al., 1988; Kelly et al., 1993; Ghisalba et al., 1983; Ghisalba et al., 1985; Ghisalba et al., 1986).

Die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft in einer Kläranlage ist stark abhängig von der Rohwasserzusammensetzung und den Verfahrenskombinationen. Wie schon oben beschrieben, haben spezifische Verfahren, wie z.B. die der gezielten Denitrifikation unter Einsatz von Methanol erhebliche Einwirkungen auf die Population der Gattung *Hyphomicrobium* im Belebtschlammbecken einer Kläranlage.

Um generell die Abbauleistung einer Bakterienpopulation in einem Umweltmedium und die Änderung der Zusammensetzung im Laufe der Zeit beurteilen zu können, sind schnelle qualitative und quantitative Nachweisverfahren unerlässlich. Dabei kann es sich bei den Bakterienpopulationen sowohl um natürlich vorkommende Mischkulturen, als auch um Mischkulturen, welche durch Zugabe von Spezialstämmen verändert wurden, handeln. Bei der Zugabe von Spezialkulturen ist die Beobachtung über den Verbleib dieses Stammes in der Population ein wichtiges Kriterium für ein Nachweisverfahren.

1.4 Nachweisverfahren für Bakterien in Umweltmedien

1.4.1 Traditionelle Methoden zum Nachweis von Bakterien

Es gibt zahlreiche Strategien zum Nachweis und zur Isolierung von Mikroorganismen aus Umweltproben (Herbert, 1990). Konventionelle Methoden, wie das Auszählen von Kolonien nach der Kultivierung der Bakterien auf speziellen Medien, sind stark abhängig von einzelnen Faktoren wie der Medienzusammensetzung, der Inkubationstemperatur, dem pH-Wert usw. (Jones, 1970) und liefern daher nur unzureichende Ergebnisse über die mikrobiologische Zusammensetzung des Umweltmediums, sowohl in quantitativer als auch in qualitativer Hinsicht. Die Methode der „most-probable-number“-Bestimmung

(Roszak et al., 1987) liefert ebenfalls nur ein ungefähres Bild über die Anzahl der Mikroorganismen in der Umweltprobe. Der größte limitierende Faktor bei diesen Methoden stellt die Kultivierbarkeit der meisten Bakterien dar. Die Mikroorganismen, die durch klassische Kultivierungsmethoden nicht nachweisbar sind, sind entweder tatsächlich nicht mehr lebensfähig, befinden sich in einem lebensfähigen, aber nicht kultivierbaren Zustand („viable but non-culturable“; Colwell, 1985) oder sind einfach nur unter den verwendeten Bedingungen nicht kultivierbar. Ferguson et al. (1984) und Hope (1978) kamen zu dem Ergebnis, daß nur 0,01–12,5% der lebensfähigen Bakterien aus marinen Umweltproben kultivierbar sind. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam Atlas (1983) für die mikrobielle Population in Erdproben.

Für eine exaktere und vor allen Dingen schnellere Bestimmung der mikrobiellen Zusammensetzung von Umweltmedien sind in den letzten Jahren zahlreiche molekulargenetische Methoden entwickelt worden (Ford et al., 1988; Sayler et al., 1990; Pickup, 1991; Bej et al., 1991; Steffan et al., 1991;), die sowohl qualitative als auch quantitative Ergebnisse liefern.

1.4.2 Isolation von genetischem Material aus Umweltmedien

Molekulargenetische Methoden zur Charakterisierung der mikrobiellen Zusammensetzung von Umweltmedien oder zum Nachweis bestimmter Mikroorganismen in Umweltmedien besitzen den großen Vorteil, daß die Bakterien aus dem Medium nicht kultiviert werden müssen. Es wurden zahlreiche Methoden entwickelt, das gesamte genetische Material aus dem Medium zu isolieren, ohne daß die Mikroorganismen isoliert wurden. Eine Übersicht zeigt Tab. 1.1. Es können zwei Arten der DNA-Isolierung unterschieden werden. Bei der direkten Methode wird die DNA aus Wasserproben durch direkte Lyse der Zellen und anschließender Präzipitation ohne eine Zellabtrennung isoliert. Diese Methode ist nicht für alle Bakterien geeignet und die Größe der isolierten DNA kann relativ gering sein. Bei der indirekten Methode werden die Zellen durch Zentrifugation oder Filtration angereichert und anschließend zur DNA-Extraktion lysiert. Bei einer direkten Extraktion von DNA aus Erdproben ergibt die Zugabe von Polyvinyl-polypyrrolidon (PVPP) zur Beseitigung der Huminsäuren eine höhere Ausbeute und eine bessere Qualität der DNA (Holben et al., 1988; Steffan et al., 1988).

Alle Methoden liefern DNA in ausreichender Qualität zur Durchführung von molekulargenetischen Nachweisen von Mikroorganismen wie z.B. Hybridisierungen, Restriktionen oder der Polymerase Kettenreaktion (PCR).

Tab 1.1: Qualität und Quantität der extrahierten DNA aus Umweltmedien durch unterschiedliche Methoden (aus: Pickup, 1991)

Methoden	Medium	Probengröße	Methoden der DNA-Extraktion	Zellzahl/g	DNA-Ausbeute	DNA-Größe (max. kb)	Literatur
1	Wasser	>1 Liter	direkte Lyse; EtOH-Präzipitation oder CsCl-Zentrifugation	10^6	1 ng	>25	Sommerville et al. (1989)
2	Erde	50 g	Lyse nach Zelldispersion und PVPP-Behandlung; CsCl-Zentrifugation	10^6	nb	>50	Holben et al. (1988)
3	Erde	100 g	direkte Lyse; EtOH-Präzipitation oder CsCl-Zentrifugation	10^9	350 µg	nb	Steffan et al. (1988)
	Sediment	100 g	direkte Lyse; EtOH-Präzipitation oder CsCl-Zentrifugation	10^9	1,9 mg	nb	
			Lyse nach Zelldispersion und PVPP-Behandlung; CsCl-Zentrifugation Hydroxyapatit-chromatographie; EtOH-Präzipitation	10^9	30 µg	nb	
4	Sediment	100 g	direkte Lyse in Verbindung mit Glasperlen; DNA-Präzipitation; CsCl-Zentrifugation; Hydroxyapatit-chromatographie; EtOH-Präzipitation	10^7	2,6 mg	20	Ogram et al. (1988)

1.4.3 Nachweis von Bakterien durch rRNA-gerichtete Gensonden

Eine die Phylogenie widerspiegelnde Klassifizierung und eindeutige Identifizierung von Mikroorganismen ist möglich, wenn man die umfangreiche Information nutzt, die in den Sequenzen und Strukturen ihrer Makromoleküle steckt. Durch vergleichende Sequenzanalyse von Proteinen und Nukleinsäuren, insbesondere von ribosomalen Ribonukleinsäuren (rRNA), konnte erstmals ein umfassendes natürliches System für die Klassifizie-

rung von Mikroorganismen erstellt werden (Schleifer et al., 1989; Woese, 1987). Die rRNA-Moleküle sind als phylogenetische Marker besonders gut geeignet, da sie in allen Lebewesen vorkommen und die gleiche Funktion erfüllen. Sie sind homolog und nicht konvergent entstanden.

Eine Sequenzanalyse der rRNA ist nicht immer notwendig. Oligonukleotidsonden zum Einsatz in Hybridisierungsexperimenten gestatten die Identifizierung von Mikroorganismen auf unterschiedlichen taxonomischen Ebenen. Das Spezifitätsspektrum reicht von Universalsonden, die gegen völlig konservierte Abschnitte gerichtet sind und an die rRNA aller Organismen binden, bis zu art- und unterartspezifischen Sonden gegen hochvariable Bereiche (Stahl et al., 1991).

Mit der Entwicklung der PCR wurden auch zahlreiche Primer entwickelt, die eine Amplifizierung der gesamten 16S rDNA, oder hochvariable Bereiche der 16S rDNA ermöglichen (Edwards et al., 1989; Barry et al., 1990). 16S rRNA-spezifische Oligonukleotidsonden in Kombination mit PCR nutzten Giovannoni et al. (1990) zur Untersuchung der genetischen Mannigfaltigkeit der mikrobiellen Flora im Saragossa See. Dabei wurde eine neue Gruppe von oligotrophen Bakterien entdeckt, die vorher nicht kultivierbar waren. Ward et al. (1990) analysierten 16S rRNA-Sequenzen der Population einer heißen Quelle und fanden eine Zusammensetzung von Organismen, die zuvor aus dieser Umgebung nicht isoliert werden konnten.

1.4.4 Nachweis von Bakterien durch Markergene

Der Nachweis von Bakterien mit Hilfe von Markergenen hat sich gerade zum Nachweis gentechnisch veränderter Mikroorganismen (GVO) bewährt. In Abhängigkeit der Art des Markergens kann der GMO entweder phänotypisch, durch Expression des Markergens und Messung einer Enzymaktivität oder genotypisch, durch Detektion des Gens durch molekularbiologische Methoden wie PCR, nachgewiesen werden (Jain et al., 1988). Markergene können in drei Gruppen unterteilt werden:

- a) kurze, aber einmalige Oligonukleotidsequenzen
- b) genetische Systeme, die eine selektive Reaktion, wie z.B. eine Antibiotikaresistenz oder den Metabolismus einer Chemikalie zur Folge haben
- c) Farbmarkergene, die eine Verfärbung der Bakterienkolonie oder der Zellen verursachen.

Es ist nicht immer notwendig, den GMO mit einem Markergen zu versehen, oftmals reicht die genetische Veränderung an sich aus, um diesen Organismus im Umweltmedium nachzuweisen (Morgan et al., 1989).

Markergene können aber nicht nur zum Nachweis gentechnisch veränderter Mikroorganismen herangezogen werden, sondern auch aus der Eigenschaft eines Bakteriums zum

Abbau einer bestimmten Substanz, kann ein Markergen abgeleitet werden. Herrick et al. (1993) entwickelten aus den bekannten Sequenzen des einleitenden Enzyms des Naphthalinabbaus, der Naphthalin-Dioxygenase, zweier *Pseudomonas putida* Stämme Oligonukleotide zum Einsatz in einer PCR zur Amplifizierung eines Abschnittes des kodierenden Gens für die Naphthalin-Dioxygenase. Außerdem konnte eine Genprobe aus dem kodierenden Genabschnitt des Enzyms als Markergen in Hybridisierungsexperimenten für den spezifischen Nachweis dieser Stämme in Sedimentproben eingesetzt werden.

1.4.5 Nachweis von Bakterien durch DNA-Fingerprinting

Bei der Untersuchung von „Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismen“ (RFLP-Analyse) wird DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen hydrolisiert, auf eine Nylonmembran geblottet und mit einer Sonde hybridisiert. Dabei entstehen typische Bandenmuster, die zur Identifizierung von Mikroorganismen dienen können. Die Sondentypen können spezifisch für eine Art von Mikroorganismus sein, es können aber auch Sonden eingesetzt werden, die so generell anwendbar sind, daß nahezu von allen Bakterienarten spezifische Hybridisierungsmuster erzeugt werden können. Diese Sonden reagieren mit den Genen für ribosomale RNAs, die sowohl hochkonservierte als auch variable Regionen enthalten. Gene für RNAs liegen meist in mehreren Kopien an verschiedenen Stellen im Genom vor. Sowohl in den flankierenden Regionen als auch innerhalb der rRNA Gene und der Spacerregion zwischen 16S- und 23S-rRNA-Genen können Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme variabel sein. Je nach Bakterienspezies und analysierter Genregion ergeben sich daher Spezies-, Subspezies oder auch Stamm-spezifische Muster (Grimont et al., 1991).

Zur Umgehung der zeitaufwendigen Hybridisierung kann die RFLP-Analyse auch mit der PCR kombiniert werden. Im Prinzip kann jede Genregion, deren DNA-Sequenz zumindestens an den Enden bekannt ist, Ziel einer PCR-RFLP-Analyse sein. Es können spezifische Primer verwendet werden, die nur für eine geringe Zahl von Spezies oder sogar nur für eine einzige verwendbar sind. Es gibt aber auch generell anwendbare Methoden, bei denen PCR-Primer verwendet werden, die mit konservierten Bereichen in den rRNA-Genen reagieren können und die PCR-Amplifikation ermöglichen. Die in den Genen ebenfalls vorhandenen variablen Bereiche enthalten die DNA-Sequenz-Polymorphismen, die als RFLP sichtbar gemacht werden können. Für diese Analysen sind Primerpaare spezifisch für die 16S-rDNA (Gurtler et al., 1991; Jayarao et al., 1991) und eine 16S/23S rDNA Primerkombination (Vanechoutte et al., 1992) beschrieben worden.

1.4.6 Quantitativer Nachweis von Bakterien in Umweltproben

Zum quantitativen Nachweis von Bakterien in Umweltproben können die molekular-genetischen Nachweismethoden in Kombination mit den quantitativen Methoden wie MPN oder Lebendzellzählbestimmung eingesetzt werden. Fredrickson et al. (1988) setzten DNA-Hybridisierungen zusammen mit der „most-probable-number“-Methode, dem Auszählen von Kolonien auf spezifischen Medien oder fluoreszenzmarkierten Antikörper zur Quantifizierung von Tn5 Mutanten der Stämme *Rhizobium* spp. und *Pseudomonas putida* in Erde ein. Degrange et al. (1995) kombinierten die PCR zur Amplifizierung eines Abschnittes des 16S rRNA-Gens aus *Nitrobacter* mit dem quantitativen Nachweis durch MPN und fluoreszenzmarkierten Antikörper. Mc Sweeney et al. (1993) quantifizierten das Bakterium *Synergistes jonesii* in einer Mischkultur in einem Chemostaten über einen längeren Zeitraum durch RNA-Extraktion und anschließender Hybridisierung mit einer rRNA-Gensonde. Die Hybridisierungssignale konnten dann densitometrisch quantifiziert werden. Es gibt also zahlreiche Methoden zum quantitativen und qualitativen Nachweis von Bakterien in Umweltmedien. Welche Methode gewählt wird, hängt insbesondere von dem nachzuweisenden Stamm und dem Umweltmedium ab. Eine Übersicht über einige ausgewählte Methoden und ihre Nachweisgrenzen zur Identifikation von Bakterien in Umweltmedien zeigt Tab. 1.2.

Tab. 1.2 Methoden und ihre Nachweisgrenzen zur Identifikation von Bakterien in Umweltmedien (aus: Pickup, 1991)

Methode	Zellen/ml oder Zellen/g	natürlicher Hintergrund	Target	Medium	Literatur
nicht-selektive Kultivierung	10 ³	10 ⁶	<i>xyE</i>	Seewasser	Morgan et al. (1989)
selektive Kultivierung	10 ¹	10 ⁶	RP4-Tol	Seewasser	Pickup et al. (1990)
Bioassay	10 ³	10 ⁶	<i>xyE</i>	Seewasser	Morgan et al. (1989)
ELISA	10 ³	10 ⁶	<i>xyE</i>	Seewasser	Morgan et al. (1989)
Lumineszenz	10 ³	nb	<i>lux</i>	Erde	Ratray et al. (1990)
DNA-Hybridisierung	10 ³	10 ⁶	<i>xyE</i>	Seewasser	Morgan et al. (1989)
direkte Hybridisierung	10 ² -10 ³	nb	2,4,5-T	Erde	Steffan et al. (1990)
DNA-Hybridisierung und MPN	10 ¹ -10 ²	nb	Tn5	Erde	Fredrickson et al. (1988)
PCR	10 ² (100g)	10 ¹¹	2,4,5-T	Erde	Steffan et al. (1989)
fluoreszenzmark. Antikörper	2*10 ¹	nb	<i>Flavobacterium</i>	Erde	Mason et al. (1990)
fluoreszenzmark. Oligonukleotide	3*10 ⁵	10 ⁸	16S rRNA	Suspension	Amman et al. (1990)

Teil II

Untersuchung an den Genen des β -Ketoacidweges in *Pseudomonas* sp. B13

1.5 Der bakterielle Abbau aromatischer Verbindungen

Die Mineralisierung von aromatischen Verbindungen hat eine sehr hohe Bedeutung. Neben den aromatischen Verbindungen durch anthropogenen Eintrag gibt es riesige Mengen von aromatischen Verbindungen aus natürlichen Quellen in der Biosphäre. Die komplexe, aromatische Verbindung Lignin umfaßt ca. 25% der Landbiomasse der Erde und die Umsetzung dieser Verbindung und weiteren pflanzlichen aromatischen Material ist eine Hauptkomponente des Kohlenstoffzyklus auf der Erde. Es gibt sowohl aerobe als auch anaerobe Mikroorganismen, die in der Lage sind, aromatische Verbindungen umzusetzen. Die Mineralisierung verläuft in 2 Phasen. Zu Beginn wird der aromatische Ring durch unterschiedliche Modifikationen für die Ringspaltung vorbereitet. Bei allen untersuchten Abbauwegen tritt ein Mono- oder Dioxygenaseschritt zur Bildung eines dihydroxylierten Benzolringes auf. In der 2. Phase erfolgt dann die Ringspaltung des dihydroxylierten Benzolringes, welche Intermediate für den Tricarbonsäurecyclus liefert. Bei der Ringspaltung werden 3 Arten unterschieden:

Bei der *ortho*-Spaltung wird die C-C-Bindung zwischen den Hydroxylgruppen gespalten (intradiol Spaltung), während bei der *meta*-Spaltung die an die Hydroxylgruppen angrenzende C-C-Bindung gespalten wird (extradiol Spaltung). Beim sogenannten Gentisatweg erfolgt eine Spaltung, wenn die Hydroxylgruppen in *para*-Position zueinander stehen, und es wird die C-C-Bindung zwischen einem carboxylierten C-Atom und dem angrenzenden hydroxylierten C-Atom gespalten.

Die am besten untersuchten Abbauwege sind der *meta*- und der *ortho*-Weg. Der *ortho*-Weg wird auch als β -Ketoacidweg bezeichnet, da als Schlüsselintermediat β -Ketoacid auftritt. Der β -Ketoacidweg ist unter taxonomisch sehr unterschiedlichen Bakterien und Eukaryonten weit verbreitet. Er ist immer chromosomal kodiert und ist der zentrale Abbauweg sowohl bei der Mineralisierung von aromatischen Verbindungen, welche von Lignin oder anderen pflanzlichen Komponenten abgeleitet sind, als auch bei dem Abbau von einigen anthropogen eingebrachten, aromatischen Umweltgiften. Der β -Ketoacidweg besitzt für jede bakterielle Gruppe charakteristische Genorganisationen und Regulationsfaktoren. Der β -Ketoacidweg stellt ein ideales Modellsystem dar, um zu untersuchen, wie sich weitverbreitete, zum Teil konservierte Enzymkaskaden in unterschiedlichen Stämmen differenzieren, ohne ihre gemeinsamen katalytischen Eigenschaften zu verlieren.

1.6 Der β -Ketoacidweg

1.6.1 Konvergenz und Isoenzyme

β -Ketoacid tritt als Intermediat beim Abbau von verschiedenen Aromaten auf. Bakterienstämme wie *Pseudomonas putida*, *Ralstonia eutropha* oder *Acinetobacter calcoaceticus* bauen 4-Hydroxybenzoat und Benzoat über diese Verbindung ab.

Die Gene des 4-Hydroxybenzoat Abbaus sind als *pca*-Gene und die des Benzoat Abbaus als *cat*-Gene bezeichnet worden (Abb. 1.4).

Während sich in *Acinetobacter calcoaceticus* (Kowalchuk et al., 1994) Isoenzyme für alle Schritte der beiden Abbauwege von den Dioxygenasen bis zu den β -Ketoacidp-CoA-Thiolasen nachweisen lassen, sind in *Pseudomonas putida* (Ornston, 1966) die β -Ketoacidp-nollacton-Hydrolase, die β -Ketoacidp:Succinyl-CoA-Transferase und die β -Ketoacidp-CoA-Thiolase nur einmal vorhanden. Sie werden durch die Gene *pcaD*, *pcaIJ* und *pcaF* kodiert. In *Ralstonia eutropha* (Johnson et al., 1971) konvergieren die beiden Zweige auf der Höhe des β -Ketoacidp, d.h. es existieren in diesem Stamm noch zwei isofunktionale β -Ketoacidp-Enollacton-Hydrolasen mit den sie kodierenden Genen *catD* und *pcaD*, die β -Ketoacidp:Succinyl-CoA-Transferase und die β -Ketoacidp-CoA-Thiolase sind jedoch nur einmal vorhanden. Sie werden durch die Gene *pcaIJ* und *pcaF* kodiert.

1.6.2 Genorganisation

Die Gene des β -Ketoacidpweges wurden in *Pseudomonas putida* (Frazee et al., 1993; Harwood et al., 1994; Houghton et al. 1995; Parales et al., 1992; Williams et al., 1992), *Acinetobacter calcoaceticus* (Elsemore et al., 1994 und 1995; Hartnett et al., 1990 und 1994; Kowalchuk et al., 1994; Neidle et al. 1988, 1991 und 1992; Shanley et al., 1994) und *Agrobacterium tumefaciens* (Parke, 1995) ausführlich untersucht. Für die *pca*-Gene und die *cat*-Gene liegen in allen 3 Stämmen Gencluster vor. Innerhalb der Cluster sind jedoch keine Gemeinsamkeiten zu erkennen. Abbildung 1.5 zeigt eine Darstellung der Genorganisation in *Pseudomonas putida* und *Acinetobacter calcoaceticus*. Die Gene der beiden Zweige des β -Ketoacidpweges liegen auf dem Chromosom nicht nahe zusammen. In *Acinetobacter calcoaceticus* beträgt der Abstand zwischen den *pca*- und *cat*-Genen annähernd 290 kb (Harwood et al., 1996). In *Pseudomonas putida* wurde die relative Lage der *pca*- und *cat*-Gene auf dem Chromosom noch nicht untersucht. In *Pseudomonas aeruginosa* liegen sie praktisch auf verschiedenen Seiten des Chromosoms, 2000 kb auseinander (Holloway et al., 1994). Die relative Lage der transkriptionalen Einheiten *pcaIJ*, *pcaGH* und *pcaRKFTBDC* in *Pseudomonas putida* zueinander wurde ebenfalls noch nicht untersucht, sie könnten sowohl zusammenhängend oder aber auch nur benachbart auf dem Chromosom liegen.

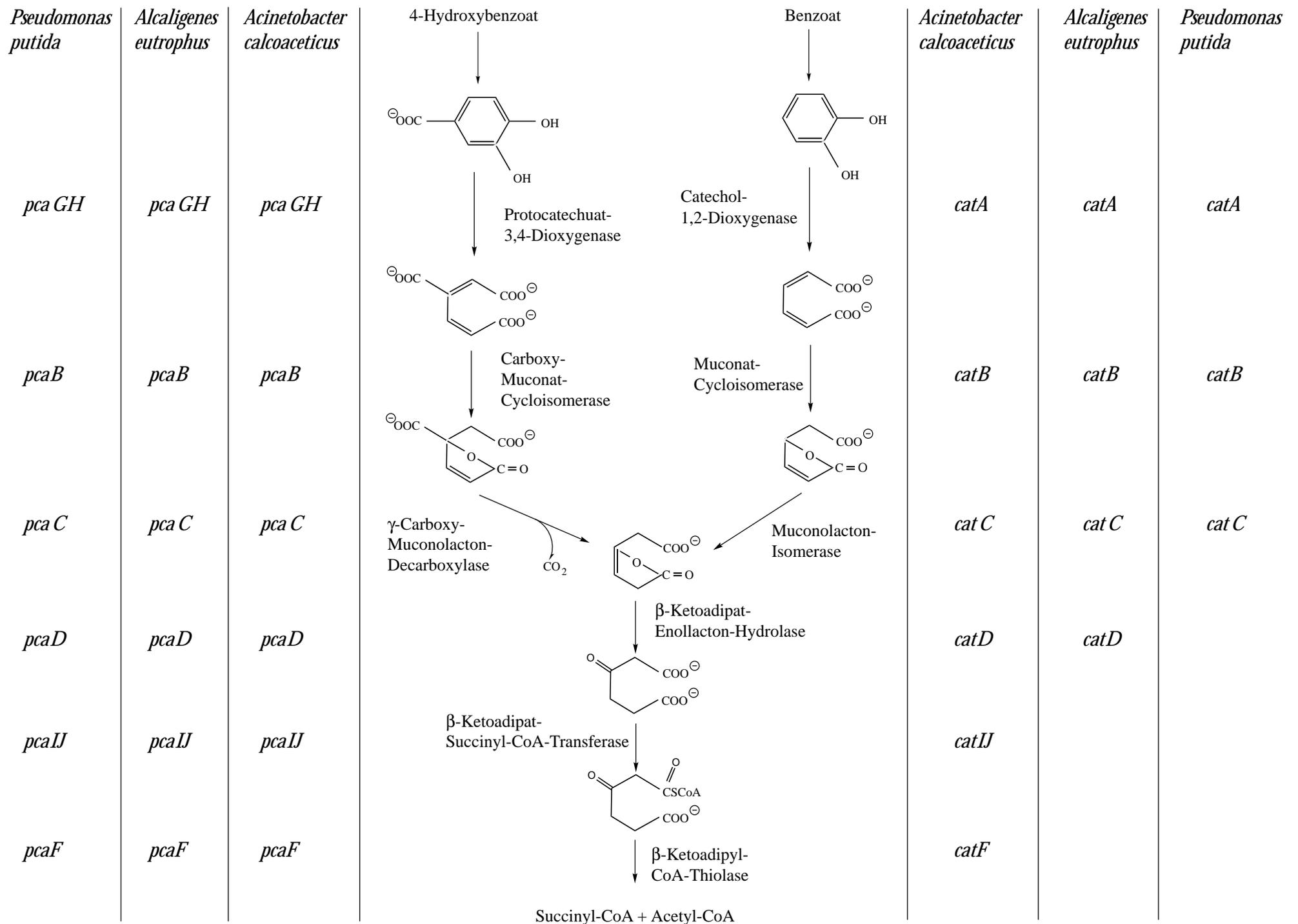


Abb. 1.4 Protocatechuat- und Catechol-Zweig des β-Ketoadipatweges und ihre Gene in unterschiedlichen Bakterien

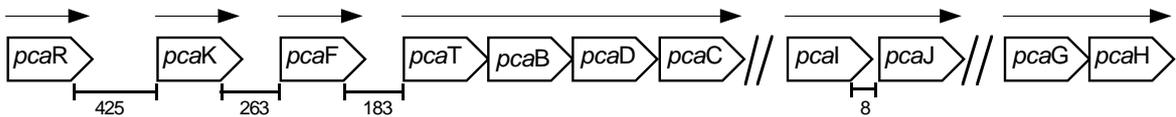
Sequenzuntersuchungen der einzelnen Gene lassen auf eine gleiche Abstammung der Gene schließen, welche isofunktionale Enzyme in *Pseudomonas putida* und *Acinetobacter calcoaceticus* kodieren. Ein Sequenzvergleich der Gene der letzten drei Enzymschritte des β -Ketoacidweges in *Acinetobacter calcoaceticus*, *catIIF* und *catD*, *pcaIIF* und *pcaD*, zeigen einige Unterschiede. Während die Gene *catIIF* und *pcaIIF* bei einer 99%igen Ähnlichkeit nahezu identisch sind, beträgt die Ähnlichkeit der *pcaD*- und *catD*-Gene in *Acinetobacter calcoaceticus* nur noch 52%, diese Gene zeigen zueinander die gleiche Übereinstimmung, wie zu dem *pcaD*-Gen aus *Pseudomonas putida* (Hartnett et al., 1994).

Doten et al. (1987a) begründen die Existenz der beinahe identischen *catIIF*- und *pcaIIF*-Gene in *Acinetobacter calcoaceticus* mit dem großen Abstand der *cat*- und *pca*-Gene auf dem Chromosom. Sie konnten auch zeigen, daß bei Rekombinanten, die eine *cat*-Sequenz in der *pca*-Region erhalten haben, eine starke Instabilität der *pca*-Gene auftritt (Doten et al., 1987b).

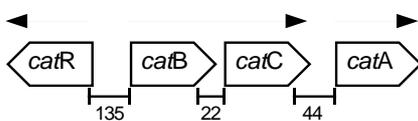
Unterschreitet die Identität von Genen, die Isoenzyme kodieren, einen gewissen Schwellenwert, wie im Falle der *pcaD/catD*-Gene in *Acinetobacter calcoaceticus*, so würde nach Hartnett et al. (1994) ein genetischer Austausch zwischen diesen Enzymen zu defekten Proteinen führen. Durch diese Tatsache wird die Selektion von schnell divergierenden Genen für Isoenzyme begünstigt.

Pseudomonas putida

pca-Gene

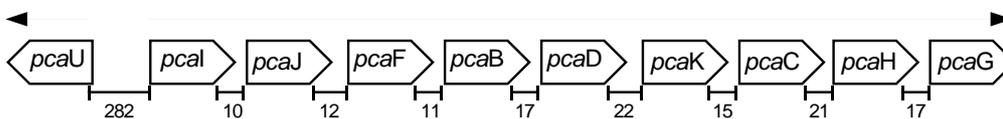


cat-Gene



Acinetobacter calcoaceticus

pca-Gene



cat-Gene

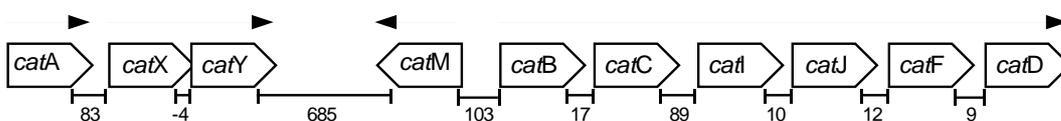


Abb. 1.5: *pca*- und *cat*-Genorganisation in *Pseudomonas putida* und *Acinetobacter calcoaceticus*

Die Zahlen zwischen den Genen geben die Abstände in bp an, die horizontalen Pfeile symbolisieren transkriptionale Einheiten. Die beiden Schrägstriche (//) stellen unbekannte Genabstände dar. Die Funktion von *catX* und *catY* ist unbekannt. *pcaK* und *pcaT* sind Transportergene, *catR*, *catM*, *pcaR* und *pcaU* stellen Regulatorgene dar. Alle anderen Gene haben die gleiche Funktion wie in Abb. 1.4 dargestellt.

Ziele der Arbeit:

Im Verlauf der vorliegenden Dissertation sollten die nachfolgend aufgeführten Punkte der Teile I und II untersucht werden:

Teil I

- Entwicklung einer Gensondenanalytik für den Stamm *Hyphomicrobium* EG.
- Entwicklung einer Gensondenanalytik für die Mineralisation von DMSO durch *Hyphomicrobium* EG.
- Entwicklung einer Gensondenanalytik für die Mineralisation von DMSO unter anaeroben Bedingungen.
- Einsatz der entwickelten Gensonden in verschiedenen Abwässern

Teil II

- Untersuchungen an den Genen des β -Ketoacidweges in *Pseudomonas* sp. B13, ausgehend von den N-terminalen Sequenzen der Untereinheiten A und B der β -Ketoacid: Succinyl-CoA-Transferase aus diesem Stamm.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Organismen

Die zur Erstellung dieser Arbeit verwendeten und untersuchten Organismen sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tab. 2.1: Verwendete und untersuchte Organismen

Organismus	Merkmale	Herkunft
<i>Hyphomicrobium</i> EG	DMSO ⁺ , CH ₃ NH ₂ x HCl ⁺	Suylen et al. (1986)
<i>Hyphomicrobium</i> sp. 1564	DMSO ⁻ , CH ₃ NH ₂ x HCl ⁺	DSM, Braunschweig
<i>Hyphomicrobium</i> sp. 1565	DMSO ⁻ , CH ₃ NH ₂ x HCl ⁺	DSM, Braunschweig
<i>Hyphomicrobium</i> sp. 1566	DMSO ⁻ , CH ₃ NH ₂ x HCl ⁺	DSM, Braunschweig
<i>Escherichia coli</i> JM83	<i>F ara Δ(lac-proAB) rpsL Φ80 lacZΔM15</i>	Yanish-Perron et al. (1985)
<i>Pseudomonas</i> sp. B13	B ⁺ ; 3CB ⁺	Dorn et al. (1974)
<i>Streptomyces griseus</i> N2-3-11	str ⁺	Kaben Chem. Co.; Tokio

2.2 Vektoren und rekombinante Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten und konstruierten Vektoren und rekombinante Plasmide sind in Tabelle 2.2 aufgelistet und beschrieben.

Tab. 2.2: Verwendete und konstruierte Vektoren und rekombinante Plasmide

Plasmid	Merkmale	Herkunft
pUC18	<i>bla</i> , <i>lacZ-α</i> , <i>ori</i> , ColE1, Ap ^r	Vieira&Messing (1982)
pCR-Script™		
Amp SK(+)	ColE1, <i>fl lacZ-α</i> , Ap ^r	Fa. Stratagene GmbH, Heidelberg

Plasmid	Merkmale	Herkunft
pKKC18	1,5 kb Amplifikat der 16S rDNA aus <i>Hyphomicrobium</i> EG in pCR-Script SK(+)/ <i>SrfA</i>	diese Arbeit
pKKC19	1,5 kb Amplifikat der 16S rDNA aus <i>Hyphomicrobium</i> sp. 1565 in pCR-Script SK(+)/ <i>SrfA</i>	diese Arbeit
pKKC27	0,9 kb Religation von pKKC19 ohne <i>EcoRI</i> -Fragment	diese Arbeit
pKKC28	1,5 kb Amplifikat der 16S rDNA aus <i>Hyphomicrobium</i> sp. 1564 in pCR-Script SK(+)/ <i>SrfA</i>	diese Arbeit
pKKC31	0,9 kb Religation von pKKC28 ohne <i>EcoRI</i> -Fragment	diese Arbeit
pKKC32	1,5 kb Amplifikat der 16S rDNA aus <i>Hyphomicrobium</i> sp. 1566 in pCR-Script SK(+)/ <i>SrfA</i>	diese Arbeit
pKKC37	0,6 kb <i>EcoRI</i> -Fragment aus pKKC28 in pUC18/ <i>EcoRI</i>	diese Arbeit
pKKC38	0,9 kb Religation von pKKC32 ohne <i>EcoRI</i> -Fragment	diese Arbeit
pKKC40	0,6 kb <i>EcoRI</i> -Fragment aus pKKC32 in pUC18/ <i>EcoRI</i>	diese Arbeit
pKKC41	0,9 kb Religation von pKKC18 ohne <i>EcoRI</i> -Fragment	diese Arbeit
pKKC42	0,6 kb <i>EcoRI</i> -Fragment aus pKKC18 in pUC18/ <i>EcoRI</i>	diese Arbeit
pKKC43	0,6 kb Amplifikat der 16S rDNA aus <i>Hyphomicrobium</i> EG in pCR-Script SK(+)/ <i>SrfA</i>	diese Arbeit
pKKC44	0,6 kb Amplifikat der 16S rDNA aus <i>Hyphomicrobium</i> sp. 1565 in pCR-Script SK(+)/ <i>SrfA</i>	diese Arbeit
pKKC45	0,6 kb Amplifikat der 16S rDNA aus <i>Hyphomicrobium</i> sp. 1566 in pCR-Script SK(+)/ <i>SrfA</i>	diese Arbeit
pKKC46	0,6 kb Amplifikat der 16S rDNA aus <i>Hyphomicrobium</i> sp. 1564 in pCR-Script SK(+)/ <i>SrfA</i>	diese Arbeit
pKKC49	0,6 kb <i>EcoRI</i> -Fragment aus pKKC19 in pUC18/ <i>EcoRI</i>	diese Arbeit
pKKC51	1,1 kb PCR-Amplifikat aus <i>E. Coli</i> JM83 in pUC18/ <i>SmaI</i>	diese Arbeit
pKKC52	1,1 kb PCR-Amplifikat von DNA aus Abwassertank der Universität in pUC18/ <i>SmaI</i>	diese Arbeit
pKKC53	1,1 kb PCR-Amplifikat von DNA aus Belebtecken einer Kläranlage in pUC18/ <i>SmaI</i>	diese Arbeit
pKKC91	0,9 kb Amplifikat der Methylmercaptan-Oxidase aus <i>Hyphomicrobium</i> EG in pUC18/ <i>SmaI</i>	diese Arbeit
pKKC92	0,9 kb Amplifikat der Methylmercaptan-Oxidase aus <i>Hyphomicrobium</i> EG in pUC18/ <i>SmaI</i>	diese Arbeit
pKSC1	0,8 kb PCR-Amplifikat aus <i>Pseudomonas</i> sp. B13 in pUC18/ <i>SmaI</i>	diese Arbeit
pKSC2	2,3 kb <i>PstI</i> -Fragment aus <i>Pseudomonas</i> sp. B13 in pUC18/ <i>PstI</i>	diese Arbeit
pKSC2-1	2,0 kb <i>EcoRI</i> -Fragment aus pKSC2 in pUC18/ <i>EcoRI</i>	diese Arbeit
pKSC2-2	1,1 kb <i>HincII</i> -Fragment aus pKSC2 in pUC18/ <i>HincII</i>	diese Arbeit
pKSC2-3	0,3 kb Religation von pKSC2 ohne <i>EcoRI</i> -Fragment	diese Arbeit
pKSC2-4	0,35 kb Religation von pKSC2 ohne <i>SmaI</i> -Fragment	diese Arbeit
pKSC2-5	0,6 kb <i>HincII</i> -Fragment aus pKSC2 in pUC18/ <i>HincII</i>	diese Arbeit
pKSC2-6	0,45 kb <i>HincII</i> -Fragment aus pKSC2 in pUC18/ <i>HincII</i>	diese Arbeit
pKSC2-7	0,15 kb <i>HincII</i> -Fragment aus pKSC2 in pUC18/ <i>HincII</i>	diese Arbeit

2.3 Verwendete Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit eingesetzten und entwickelten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.3 vermerkt.

Tab. 2.3: Verwendete Ologonukleotide

Primerbezeichnung	Nukleotidsequenz	Herkunft
pA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Edwards et al., 1989
pH*	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	Edwards et al., 1989
U1	GCAACGCGAAGAACCCTTACC	Barry et al., 1990
KKC1	GA(TC)GA(AG)AC(TCAG)TG(TCG)AA(TC)TC(TCAG)C	diese Arbeit
KKC2	AT(TCA)AA(AG)GG(TCAG)CA(AG)GA(AG)GA(TC)TT	diese Arbeit
KKC18	TGGGATGAGGC(GC)CTCGA(CT)CT	diese Arbeit
KKC19	GCAGCA(GC)GATGTC(GA)GCAT(GA)	diese Arbeit
KKC22	TGCCGGCAGAGATGCCGGAG	diese Arbeit
KKC23	AC(AG)TC(AGCT)GG(AG)TA(AGCT)(GC)A(AGCT)GT(AGCT)CC	diese Arbeit
KKC29	TCTCCATGTGTGGACCCTTG	diese Arbeit
KKC30	GTCCAAGAAGGTGTTGACCC	diese Arbeit
SK-A	TT(CT)GT(AGCT)AA(CT)GA(CT)GG(AGCT)AC(AGCT)GT(AGCT)GC	diese Arbeit
SK-B	AC(AG)AA(AGCT)AC(AGCT)AC(AGCT)GC(AGCT)CC(AG)TT(CT)TT	diese Arbeit

2.4 Medien

2.4.1 Minimalmedium zur Anzucht von Hyphomicrobien und von *Pseudomonas* sp. B13

Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	7,00 g
KH ₂ PO ₄	2,00 g
NH ₄ Cl	0,50 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,20 g
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,10 g
NH ₄ Fe(III)-citrat	0,01 g
Spurenelementlösung SL6	1,00 ml
nach Pfennig und Lippert (1965)	
mit bidestilliertem Wasser ad 1000 ml	

Diesem Minimalmedium wurde als alleinige Kohlenstoffquelle bei Anzucht von *Hyphomicrobium* EG DMSO (13 mM) und bei Anzucht von allen übrigen Hyphomicrobien Stämmen Methylaminhydrochlorid (50 mM) zugesetzt. Bei Anzucht von *Pseudomonas* sp. B13 wurde dem Minimalmedium 3-Chlorbenzoat (10 mM) zugesetzt.

Zur Herstellung fester Nährmedien wurden allen Medien 1,5% Agar zugesetzt. Die Agarplatten wurden mit 0,1 ml folgender Substratlösung versetzt:

Hefeextrakt	1,00 g
DMSO	2,00 ml bzw.
CH ₃ NH ₂ x HCl-Lösung (2,5 mM)	0,20 ml
mit bidestilliertem Wasser ad 10 ml	

2.4.2 LB (Luria Broth) Medium zur Anzucht von *E. coli*

Trypton	10,00 g
Hefeextrakt	5,00 g
NaCl	10,00 g
mit bidestilliertem Wasser ad 1000 ml	

2.4.3 NB (Nutrient Broth) Medium

Nutrient Broth	8,00 g
NaCl	5,00 g
mit bidestilliertem Wasser ad 1000 ml	

2.5 Stammanzucht und Lagerung

Alle Hyphomicrobien und *Pseudomonas* sp. B13 wurden in Minimalmedium kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 30°C in Schikanekolben im Schüttelwasserbad. Zur Reinheitsprüfung wurden die Stämme mikroskopiert und auf Minimalagarplatten ausgestrichen.

E. coli wurde in flüssigem oder festem LB Medium bei 37°C angezogen. *E. coli* Stämme mit einem rekombinanten Plasmid wurden in LB Medium, versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum, angezogen.

Die Lagerung über einen kürzeren Zeitraum erfolgte bei 4°C, zur Herstellung von Dauerkulturen wurden 0,7 ml Flüssigkultur mit 0,3 ml Glycerin vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.6 Messung des Bakterienwachstums

Das Wachstum der Bakterien wurde durch Messung der optischen Dichte bestimmt. Die optische Dichte wurde mit einem Spektralphotometer (Typ Uvikon 820, Kontron, Eichung) bei einer Wellenlänge von 546 nm in einer 1 ml Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Die Proben wurden verdünnt, wenn die Extinktion der Lösung den Wert 0,3 überschritt. Der Nullabgleich sowie die Verdünnung erfolgte mit dem jeweiligen Anzuchtmedium.

2.7 Lebendzellzahlbestimmung

Eine Lebendzellzahlbestimmung für den Stamm *Hyphomicrobium* EG wurde nach der Most-probable-number-Methode (Süßmuth et al. 1987) durchgeführt, da eine Keimzahlbestimmung durch Bestimmung der Kolonienzahl nicht möglich war. Eine OD_{546nm} von 0,5 für eine Zellkultur von *Hyphomicrobium* EG entspricht einer wahrscheinlichsten Keimzahl von 10^4 Keime/ml.

Zur Lebendzellzahlbestimmung in den Wasserproben wurden geeignete Verdünnungsstufen auf NB-Medium ausplattiert und die Kolonienzahl bestimmt.

2.8 Herstellung von Proteinextrakten

Die Zellen wurden 30 min bei 7000 rpm und 4°C in einer Kühlzentrifuge (Typ Sorvall RC5B, Du Pont, Newton, Connecticut, USA) abzentrifugiert und in Tris/HCl (50 mM; pH 8,2) Puffer gewaschen. Sie wurden erneut 30 min bei 7000 rpm und 4°C in einer Laborzentrifuge (Typ 3K-1, Sigma, Osterrode) abzentrifugiert und in Tris/HCl (10 mM; pH 8,2) Puffer resuspendiert.

Die Zellsuspension wurde mit einer Spatelspitze Desoxyribonuclease I versetzt und in einer bei 4°C vorgekühlten Frenchpresse (Amicon, Silver Spring, Maryland, USA) mit einem Druck von 8 Mpa aufgeschlossen.

Die Zelltrümmer wurden in einer Ultrazentrifuge (Typ OTD-50B, Du Pont, Newton, Connecticut, USA) 30 min bei 4°C und 40.000 rpm abgetrennt. Der Überstand (Rohextrakt) wurde zur weiteren Aufreinigung bzw. für Enzymtest bei 4°C oder -20°C gelagert, das Sediment wurde verworfen.

2.9 Proteingehaltsbestimmung

Die Proteingehaltsbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Zur Eichung diente Rinderserumalbumin in Konzentrationen von 0,15 - 1,5 mg/ml.

2.10 Enzymaufreinigung

2.10.1 Ionenaustauschchromatographie

Die Aufreinigung der Methylmercaptan-Oxidase erfolgte über eine DEAE-Cellulose-Ionenaustauschersäule mit Hilfe einer FPLC-Anlage der Fa. Pharmacia (Uppsala, Schweden). Die FPLC-Anlage bestand aus folgenden Komponenten:

Pumpen:	Präzisions-Kolbenpumpen P-500
Controller:	Chromatographie-Controller LCC-500
Injektor:	Injektions-Motorventil MV-7
Detektor:	Einkanal-UV-Monitor UV-1 mit 256 nm Filter
Schreiber:	Zweikanal-Laborschreiber REC-482
Fraktionssammler:	Frac-100

Der Anionenaustauscher DE-52 (Whatman Ltd., Springfield Mill, Maidstone, England) wurde in 500 ml 0,5 N HCl aufgenommen, 30 min stehengelassen und bis zum Erreichen eines pH-Wertes von 0,4 mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Dieselbe Behandlung erfolgte anschließend mit 500 ml NaOH (0,5 N) und waschen bis zur Neutralisation. Die Cellulose wurde nun in Tris/HCl Puffer (10 mM; pH 8,2) äquilibriert und nach Entgasen in eine Säule (30 mm Durchmesser, 10,5 cm Betthöhe) gefüllt. Die gepackte Säule wurde mit 1 l Tris/HCl Puffer (10 mM; pH 8,2) äquilibriert und nach Auftragen von 2 ml Rohextrakt erneut mit Puffer (500 ml) gewaschen. Das Enzym wurde durch Anlegen eines linearen Salzgradienten von 0 - 250 mM KCl in Tris/HCl (10 mM; pH 8,2) von der Säule eluiert. Es wurden Fraktionen zu je 5 ml gesammelt und auf ihre Enzymaktivität getestet.

2.10.2 Aceton Fällung

Zur Aufkonzentrierung des Rohextraktes sowie der aktivsten Fraktionen aus der Ionenaustauschchromatographie wurden die Proteinextrakte mit dem doppelten Volumen an eisgekühltem Aceton versetzt, die gefällten Proteine abzentrifugiert und in Tris/HCl Puffer (10 mM; pH 8,2) aufgenommen.

2.11 Messung der Enzymaktivität von Methylmercaptan-Oxidase

Bei der Umsetzung von Methylmercaptan durch die Methylmercaptan-Oxidase entsteht Formaldehyd, Schwefelwasserstoff und H_2O_2 . Formaldehyd wird in einem NADH(P)^+ - und Glutathion abhängigen Reaktionsschritt von der Formaldehydehydrogenase zu Ameisensäure oxidiert (Suylén et al., 1986).

Die Aktivitätsmessung der Methylmercaptan-Oxidase im Rohextrakt und in den Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie erfolgte indirekt als gekoppelter optischer Test mit der Formaldehydehydrogenase als Hilfsenzym. Um sicherzustellen, daß die Umsetzung durch die Methylmercaptan-Oxidase der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, wurde Methylmercaptan als Substrat, Formaldehydehydrogenase (FDH) als Hilfsenzym und NAD^+ sowie Glutathion (GSH) im Überschuß eingesetzt.

Die Aktivität der Methylmercaptan-Oxidase wurde in diesem gekoppelten Test photometrisch über die Extinktionszunahme bei 340 nm, die durch die Umsetzung von NAD^+ zu $\text{NADH}+\text{H}^+$ verursacht wird, bestimmt.

1 ml Reaktionsansatz enthielten (Suylén et al., 1987):

NAD^+	1 mM
Glutathion	3 mM
Formaldehydehydrogenase	1 Einheit
Tris/HCl pH 8,2	50 mM
Methylmercaptan Lösung	50 μl
Rohextrakt bzw.	10 μl
Fraktion der FPLC	100 μl

Die Herstellung der Methylmercaptan Lösung erfolgte durch Einleiten von Methylmercaptan in bidestilliertes Wasser, welches durch vorheriges Einleiten von Stickstoff deoxygeniert wurde. Die so erhaltene Lösung wurde um das Hundertfache ihres Volumens verdünnt und konnte so zum Enzymtest eingesetzt werden. Die Lösung mußte immer frisch hergestellt werden, da eine Lagerung über mehrere Tage nicht möglich war.

2.12 Gelelektrophorese von Proteinen

Zur Reinheitskontrolle der Rohextrakte und der Fraktionen aus der Enzymaufreinigung sowie für einen Proteintransfer auf Nylonmembran (Western Blotting) wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) eingesetzt.

2.12.1 SDS-Page

Zur Herstellung eines 12%igen (w/v) SDS-Polyacrylamidgels (180x150x1 (bzw. 1,5 mm) wurde zuerst das Trenngel zwischen zwei Glasplatten, die mit Abstandshaltern (1 bzw. 1,5 mm) zusammengeklammert und mit 1%iger Agaroselösung abgedichtet waren, bis 3 cm unterhalb des oberen Randes gegossen.

Zusammensetzung des Trenngels:

30% Acrylamidlösung (Mono:Bis 30 :0,8)	9,6 ml
Puffer I (1,5 M Tris/HCl pH 8,9; 0,4% SDS)	6,0 ml
bidestilliertes Wasser	8,4 ml
APS (10%)	75 µl
TEMED	10 µl

Das Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet, welcher nach der Polymerisation des Gels wieder abgeschüttet wurde. Das Sammelgel hatte folgende Zusammensetzung:

30% Acrylamidlösung (Mono:Bis 30 :0,8)	1,86 ml
Puffer II (0,5 M Tris/HCl pH 6,7; 0,1% SDS)	3,00 ml
bidestilliertes Wasser	7,20 ml
APS (10%)	75 µl
TEMED	15 µl

Nach dem Gießen des Sammelgels auf das Trenngel wurde sofort ein Kamm, dessen Dicke und Anzahl der Taschen sich nach dem aufzutragenden Probenvolumen richtete, eingeschoben. Nach der Polymerisation des Gels wurde der Kamm entfernt, die Proteinproben mit 10% ihres Volumens mit Farbmarker versetzt, zur Denaturierung 5 min auf 90°C erhitzt und in die Geltaschen pipettiert.

Die Elektrophorese erfolgte 1 Stunde bei 100 V und 4 Stunden bei 200 V mit folgendem Elektrophoresepuffer:

Tris	3,0 g
SDS	1,0 g
Glycerin	14,4 g
mit bidestilliertem Wasser ad 1000 ml, pH 8,5	

Anschließend wurde das Gel gefärbt bzw. in einer wäßrigen Lösung mit 30% Methanol und 10% Eisessig gelagert.

2.12.2 Färbung von Proteingelen

Die Proteingele wurden für ca. 2 Stunden in Coomassie Färbelösung geschwenkt:

Coomassie Brilliant Blue R250	525 mg
Methanol	150 ml
Eisessig	30 ml
bidestilliertes Wasser	150 ml

Zur Entfärbung des Hintergrundes wurde das Gel in Entfärberlösung (10% Eisessig, 30% Methanol), welche mehrmals gewechselt wurde, mehrere Stunden leicht geschwenkt. Gele, die zum Western-Blotting hergestellt wurden, wurden nicht gefärbt.

2.13 Protein (Western) Blotting

Für eine N-terminale Sequenzierung der Methylmercaptan-Oxidase wurde das aufgereinigte Enzym von einem Proteingel auf eine Immobilon™ PVDF Transfermembran (Millipore Corporation, Bedford, USA) überführt.

Dafür wurde ein der Membran entsprechend großer Gelbereich (10x10 cm) mit der Proteindecke aus dem Gel geschnitten und in Blotting Puffer (10 mM CAPS; 20% Methanol, pH 11,0) äquilibriert.

Die Membran wurde ca. 3 Sekunden in 100% Methanol und anschließend für ca. 2 Minuten in bidestilliertem Wasser geschwenkt. Danach wurde sie, ebenso wie 6 Lagen Blottingpapier (Whatman International Ltd., Maidstone, England) in Blotting Puffer äquilibriert.

Die Anode der Fast-Blot B33-Apparatur (Biometra, Göttingen, Deutschland) wurde nun mit 3 Lagen Blottingpapier belegt. Darauf wurden luftblasenfrei die PVDF-Membran, das Proteingel und 3 weitere Lagen Blottingpapier gelegt. Die Apparatur wurde mit der Abdeckplatte (Kathode) verschlossen und mit einem Gewicht von ca. 2 kg beschwert. Das Protein Blotting erfolgte 90 min bei 35 V.

Nach dem Blotten wurde die Membran ca. 2 Minuten mit Amido-Schwarz gefärbt.

Färbelösung:	Amido-Schwarz	0,5% (w/v)
	Methanol	25% (v/v)
	Essigsäure	10% (v/v)
Entfärbelösung:	Methanol	25% (v/v)
	Essigsäure	10% (v/v)

Nach dem Entfärben der Membran war eine Bande, welche der Methylmercaptan-Oxidase nach ihrem Molekulargewicht von 49.000 Dalton (Suylen et al. 1987) zuzuordnen war, zu erkennen, so daß eine N-terminale Sequenzierung des Enzyms von dieser Membran aus möglich war.

2.14 Protein Fragmentierung

Für eine Ableitung weiterer Oligonukleotide aus der Sequenz der Methylmercaptan-Oxidase wurde das Enzym einer Proteinfragmentierung unterworfen.

2.14.1 Proteinspaltung

Die Spaltung des Proteins erfolgte nach einer modifizierten Methode von Matsudaira (1990) mit der Endopeptidase Trypsin.

500 µl der aufgereinigten Methylmercaptan-Oxidase (0,24 mg/ml) wurden mit 15 µl einer Trypsinlösung (100 µg Trypsin in 100 µl 0,01% (w/v) TFA in Wasser) 16 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.14.2 Auftrennung der Proteinfragmente

Die Oligopeptide aus der Umsetzung der aufgereinigten Methylmercaptan-Oxidase mit Trypsin wurden portionsweise zu je 100 µl mittels HPLC an einer LiChropher® RP-18 Säule (Typ SC, Fa. Bischoff, Leonberg) aufgetrennt. Dazu wurde folgender Gradient verwendet:

Fließmittel A	0,1% (w/v) Trifluoressigsäure (TFA) in Wasser
Fließmittel B	80% (v/v) Acetonitril; 0,085% (w/v) TFA in Wasser
0–5 min	5% (v/v) B
5–90 min	5–70% (v/v) B
90–95 min	70–100% (v/v) B
95–100 min	100–5% (v/v) B

Die Elution der Oligopeptide von der Säule wurde bei 210 nm verfolgt. Die Eluate wurden gesammelt und an einer Speedvac (Vakuum Concentrator, Fa. Bachhofer, Reutlingen) lyophilisiert.

2.15 Proteinsequenzierung

Die aufgereinigte Methylmercaptan-Oxidase auf der PVDF-Membran und die Oligopeptide aus der Proteinspaltung wurden am Institut für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich N-terminal mit Hilfe eines Proteinsequenzierers (Modell 477A, Fa. Applied Biosystems, Forster City, Californien, USA) mit on-line HPLC (Modell 120A, Fa. Applied Biosystems) sequenziert.

2.16 Isolation von DNA

2.16.1 Extraktion von genomischer DNA

Die gesamte genomische DNA wurde aus Hyphomicrobien, *Pseudomonas* sp. B13 und *E. coli* nach der CTAB (Hexadecyltrimethylammoniumbromid)-Methode (Wilson 1990) präpariert.

Bakterien aus 1,5-3 ml einer Flüssigkultur, die sich am Ende der exponentiellen Wachstumsphase befand, wurden pelletiert und in 567 µl TE-Puffer (10 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 30 µl einer 10% (w/v) SDS-Lösung und 3 µl einer wäßrigen Proteinase K Lösung (20 mg/ml) wurde die Zellsuspension für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl einer 5 M NaCl Lösung wurde die viskose Lösung gut gemischt, mit 80 µl einer CTAB/NaCl Lösung (10% CTAB in 0,7 M NaCl) versetzt und für 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Der Ansatz wurde mit 780 µl Chloroform/Isoamylalkohol (21 : 1 v/v) gemischt und 5 Minuten zentrifugiert. Der wäßrige Überstand wurde in ein neues Reagiergefäß überführt, mit 780 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25 : 24 : 1 v/v) extrahiert und nochmals zentrifugiert. Nach erneuter Überführung der wäßrigen Phase in ein neues Reagiergefäß wurde die DNA durch Zugabe des 0,6 fachen Volumens Isopropanol gefällt. Nach 20 minütiger Zentrifugation wurde die DNA mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 - 100 µl TE-Puffer bzw. bidestilliertem Wasser gelöst.

2.16.2 Präparation von Plasmid DNA aus *E. coli*

Für die Präparation von Plasmid DNA aus *E. coli* wurden zwei Methoden verwendet. DNA, welche zur Sequenzierung verwendet werden sollte, wurde entweder mit dem Qia-quick 8 Plus Plasmid Kit (Fa. Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers präpariert und gereinigt oder nach einer modifizierten Methode von Birnboim und Doly (1979) isoliert: 1,5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* in LB wurden zentrifugiert, der Überstand ab-

genommen und die Zellen 3 Minuten in 100 µl Lysozymlösung (50 mM Glucose, 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0, 5 mg/ml Lysozym) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung II (1% SDS in 0,2 M NaOH) wurde 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 150 µl Lösung III (3 M Kaliumacetat, 1,8 M Ameisensäure) hinzugegeben und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Reagiergefäß überführt, mit 400 µl Chloroform/Phenol (1 : 1 v/v) extrahiert und 5 Minuten zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde abgenommen, mit 400 µl Chloroform extrahiert, zentrifugiert und in ein neues Reagiergefäß überführt. Die DNA wurde nun durch Zugabe eines 0,54 fachen Volumens Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt. Nach 20 minütiger Zentrifugation wurde die DNA mit 70% eiskaltem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl bidestilliertem Wasser gelöst.

Für ein schnelles Screening von Transformanden wurde die DNA ebenfalls nach der oben beschriebenen Methode von Birnboim und Doly (1979) präpariert, jedoch erfolgte keine Extraktion mit Chloroform und Phenol.

2.16.3 Isolation von DNA aus Wasserproben

Für die Isolation von DNA aus Wasserproben wurde eine definierte Menge der Wasserprobe (1-1000 ml) 30 min bei 7000 rpm und 4°C in einer Kühlzentrifuge (Typ Sorvall RC5B, Du Pont, Newton, Connecticut, USA) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Phosphatpuffer (55 mM, pH 7,3) aufgenommen und gewaschen. Es wurde erneut 30 min bei 7000 rpm in einer Laborzentrifuge Laborzentrifuge (Typ 3K-1, Sigma, Osterode) abzentrifugiert. Das Pellet wurde nun in 567 µl TE-Puffer (10 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen und die DNA konnte nach der CTAB-Methode (Kapitel 2.16.1) präpariert werden.

2.17. DNA-Umsetzungen

2.17.1 Enzymatische Hydrolyse von DNA

Zur Spaltung von DNA in einzelne Fragmente wurde die DNA mit Restriktionsendonukleasen nach Angaben des Herstellers für Puffer- und Inkubationsbedingungen umgesetzt. Die Hydrolyse der DNA wurde mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.17.2 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden mit 1/10 ihres Volumens mit Auftragungspuffer (0,5 g/ml Saccharose, 160 mM EDTA pH 8,0, 0,5 mg/ml Bromphenol Blau, 0,5 mg/ml Xylen-cyanol) gemischt und in 1-2%igen (w/v) Agarosegelen, versetzt mit Ethidiumbromid (0,1 µg/ml), in horizontaler Richtung aufgetrennt. Als Elektrophoresepuffer diente TAE-Puffer (40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA; pH 8,3-8,5). Die DNA-Fragmente wurden unter langwelligem UV-Licht (366 nm) mit einem Längenstandard (*EcoRI/HindIII*-Hydrolysat des λ -Phagen) bestimmt.

2.17.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde die DNA einer enzymatischen Hydrolyse unterworfen und die Fragmente mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Eine Bande, die das gewünschte Fragment enthielt, wurde aus dem Gel geschnitten und die DNA daraus mit dem JetSorb Kit (Genomed, Bad Oeynhausen) nach den Angaben des Herstellers eluiert.

2.17.4 Dephosphorylierung von DNA

Zur Entfernung von 5'-Phosphatgruppen von linearisierter DNA wurde die DNA mit alkalischer Phosphatase behandelt. Dazu wurde die DNA 2x 15 min bei 37°C mit je 1-2 Einheiten alkalischer Phosphatase inkubiert. Zur Inaktivierung der Phosphatase wurde der Ansatz auf 68°C erwärmt. Anschließend erfolgte eine Extraktion mit Phenol/Chloroform und eine Fällung der DNA mit Ethanol.

2.17.5 Auffüllreaktion

Zur Erzeugung von glatten Enden (blunt ends), welche zur Klonierung benötigt werden, wurden die DNA-Fragmente nach der enzymatischen Hydrolyse mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I nach den Angaben des Herstellers umgesetzt. Zur Enzyminaktivierung wurde der Ansatz 5 min auf 70°C erhitzt und mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die DNA wurde mit Ethanol gefällt.

2.17.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde die DNA in einem molaren Verhältnis von 4:1 zum Vektor in einem 20 µl Reaktionsansatz für 5 min auf 70°C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Eis wurde der Ligationsansatz mit Ligationspuffer und 2 Einheiten T4-DNA Ligase versetzt und für 12-16 Stunden bei 12-14°C inkubiert.

2.18 Herstellung von kompetenten Zellen

Die Herstellung von kompetenten Zellen erfolgte nach einer modifizierten CaCl₂-Methode von Sambrook et al. (1989).

100 ml LB Medium wurde mit ca. 5 Kolonien von *E. coli* JM83 angeimpft und bei 37°C im Schüttelwasserbad bis zu einer OD_{546nm} von 0,4-0,5 inkubiert. Die Kultur wurde für ca. 5 min auf Eis gestellt und dann bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden in 5 ml CaCl₂-Lösung (10 mM) resuspendiert und 10 min auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 4°C und 4000 rpm. Die Zellen wurden nun in einer CaCl₂-Lösung (75 mM) resuspendiert und bis zu ihrem Gebrauch, mindestens aber für 16 Stunden auf Eis gelagert.

2.19 Transformation

Zur Transformation von *E. coli* Zellen wurden 100 µl kompetente Zellen zusammen mit 10 µl Ligationsansatz 30 min auf Eis gelagert. Nach 2 minütiger Inkubation bei 42°C wurde der Ansatz mit 900 µl LB Medium versetzt und 1 Stunde bei 37°C regeneriert. Die Zellsuspension wurde auf LB Agarplatten, versetzt mit Ampicillin und X-Gal, ausplattiert und bei 37°C für 16-24 Stunden inkubiert.

2.20 Konzentrationsbestimmungen

2.20.1 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration einer DNA-Lösung wurde photometrisch bei einer OD von 260 nm bestimmt. Eine OD_{260nm} von 1,0 entspricht annähernd einer DNA-Konzentration von 52 µg/ml. Zur Reinheitskontrolle wurde noch die OD bei 280 nm bestimmt. Liegt der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} zwischen 1,8 und 2,0, so ist die DNA-Lösung nicht mit Phenol oder Proteinen kontaminiert (Sambrook et al., 1989).

2.20.2 Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden

Die Konzentration eines Oligonukleotids bekannter Sequenz wurde mit Hilfe der Extinktionskoeffizienten ϵ der einzelnen Basen bestimmt. Für ein gegebenes Oligonukleotid wurde die Anzahl der jeweiligen Basen mit dem entsprechenden Extinktionskoeffizienten multipliziert und diese Werte wurden zum resultierenden Extinktionskoeffizienten des Gesamtnukleotids addiert.

$$\epsilon (\text{dGTP}) = 11,7 \text{ ml}/\mu\text{mol} * \text{cm}$$

$$\epsilon (\text{dATP}) = 15,4 \text{ ml}/\mu\text{mol} * \text{cm}$$

$$\epsilon (\text{dCTP}) = 7,3 \text{ ml}/\mu\text{mol} * \text{cm}$$

$$\epsilon (\text{dTTP}) = 8,8 \text{ ml}/\mu\text{mol} * \text{cm}$$

Die Konzentration des Oligonukleotids wurde dann nach Messung der OD bei 260 nm nach

$$\text{OD} = \epsilon * c * d$$

berechnet, wobei d = Schichtdicke der Küvette [cm] ist.

2.21 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurde mit der DNA eine Kettenabbruchreaktion mit Didesoxynukleotiden und fluoreszenzmarkierten Primern nach der Methode von Sanger et al. (1977) mit Hilfe des AutoRead Sequenzierungskit (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt und auf einem automatischen DNA-Sequenzierer (A.L.F., Pharmacia, Freiburg) sequenziert.

2.22 Oligonukleotidsynthese

Oligonukleotide wurden über Gibco BRL (Eggenstein) bzw. MWG in PCR-Qualität bezogen oder nach Herstellerangaben auf einem Synthesizer (Modell 381A DNA Synthesizer, Applied Biosystems, Weiterstadt) synthetisiert und mit Hilfe der HPLC über eine "reversed phase"-Säule gereinigt.

2.23 Nukleinsäure-Blotting

2.23.1 DNA-Blotting (Southern-Blot)

Zur Überführung von DNA auf Nylonmembran (Hybond N⁺, Amersham Buchler, Braunschweig) wurde die DNA zuerst einer enzymatischen Hydrolyse unterworfen und dann mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Das Agarosegel wurde dann auf

Filterpapier, welches mit 0,4 N NaOH getränkt war, gelegt. Auf das Gel wurde die Nylonmembran in entsprechender Größe gelegt und auf die Membran mehrere Lagen Filterpapier, welche mit einem Gewicht beschwert wurden. Die DNA wurde so durch die NaOH, welche durch kapillare Kräfte durch das Gel und die Membran in die oberen Schichten Filterpapier gesogen wurde, denaturiert und an die Nylonmembran transferiert. Das DNA-Blotting (Southern, 1975) erfolgte über 14–16 Stunden und anschließend wurde die Membran zur Fixierung der DNA bei 80°C gebacken.

2.23.2 Kolonie-Blotting

Für ein schnelles Screening von Transformanten wurden die zu untersuchenden Kolonien auf LB Agaroseplatten mit Ampicillin (bis zu 50 Kolonien/Platte) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nylonmembran (Hybond N⁺) wurde in der Größe der Agarplatten ausgeschnitten und für 5 Minuten auf die Agarplatten gelegt, wobei die Kolonien an der Membran haften bleiben. Anschließend wurde die Membran für jeweils 15 Minuten mit der den Kolonien entgegengesetzten Seite nacheinander auf Filterpapiere gelegt, welche mit folgenden Lösungen getränkt waren:

Filterpapier 1 (Denaturierungslösung):	NaOH	0,5 N
	NaCl	1,5 M
Filterpapier 2 (Neutralisationslösung):	NaCl	1,5 M
	Tris/HCl	0,5 M
	pH 7,4	
Filterpapier 3 (Waschlösung):	SSC	0,5 x
	SDS	0,1%
20 x SSC	NaCl	3 M
	Natriumcitrat	0,3 M
	mit Citronensäure auf pH 7,2	

Die Membran wurde an der Luft getrocknet und zur Fixierung der DNA 30 Minuten bei 80°C gebacken.

2.24 Radioaktive Markierung von DNA

2.24.1 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mit 5 µl α -[³²P]-dCTP mit einer spezifischen Aktivität von 3000 Ci/mmol nach Angaben des Herstellers mit dem *Redi*prime DNA labelling Kit (Amersham Buchler, Braunschweig) radioaktiv markiert.

2.24.2 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Oligonukleotide wurden mit γ - ^{32}P -dATP in einer Kinasereaktion radioaktiv markiert. 50 pmol des Oligonukleotids wurden mit 50 pmol γ - ^{32}P -dATP (spezifische Aktivität 5000 mCi/mmol) und 1 Einheit T4-Polynukleotidkinase für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

2.25 Hybridisierung

2.25.1 Hybridisierungsreaktion

Zur Vermeidung von unspezifischen Hybridisierungssignalen wurde die Nylonmembran für ca. 3 Stunden bei Hybridisierungstemperatur in Prähybridisierungslösung geschwenkt.

Prähybridisierungslösung:

SSC (s. 2.23.2)	6x
Natriumphosphatpuffer pH 6,8	0,01 M
EDTA	1 mM
SDS	0,5%
Magermilchpulver	0,1%

Die Prähybridisierungslösung wurde verworfen und durch frische Lösung, versetzt mit der radioaktiv markierten Probe, ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei geeigneter Hybridisierungstemperatur. Nach der Hybridisierung wurde die Membran zuerst unter nicht stringenten Bedingungen für je 3 x 15 Minuten bei Raumtemperatur mit einer Lösung aus 6 x SSC; 0,5% SDS gewaschen. Unter stringenten Bedingungen wurde die Membran bei erhöhten Temperaturen bis hin zur Hybridisierungstemperatur mit einer Lösung aus 0,5 - 2x SSC; 0,1% SDS für 10 Minuten gewaschen.

2.25.2 Autoradiographie

Zur Detektion der Hybridisierungssignale wurde in einer Exponierbox ein Röntgenfilm (Amersham Typ Hyperfilm MPTM) auf die Membran gelegt und bei -70°C für unterschiedliche Zeit (ein bis mehrere Tage) belichtet.

2.26 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.26.1 Allgemeine PCR-Bedingungen

Die PCR wurde in 100 µl Reaktionsvolumen mit Templat-DNA (ca. 500 ng), Primer (je 1 µM), einer Nukleotid-Mischung aus dATP, dTTP, dGTP und dCTP (je 200 µM) sowie Vent-DNA-Polymerase (New England Biolab, Beverly, Madison, USA) oder *Taq*-DNA-Polymerase (Life Technology) durchgeführt. Zur vollständigen Denaturierung der DNA wurde den Ansätzen DMSO (10%) beigefügt. Zur Verminderung der Verdunstung während der Reaktion wurden alle Ansätze mit einigen Tropfen Mineralöl überschichtet.

Durchgeführt wurden die Reaktionen in einem automatischen Thermocycler (Personal Cycler, Biometra, Göttingen), wobei das Temperaturprogramm für jeden Versuch optimiert wurde. Bei allen Versuchen wurde die Polymerase nach einem "hot-start" in den Reaktionsansatz gegeben, d.h. der Ansatz wurde zu Beginn für 5 min auf 98°C erhitzt und nach Abkühlen auf 95°C wurde die Reaktion durch Zugabe des Enzyms gestartet.

Die Annealing-Temperatur T_A wurde für jeden Primer mit Hilfe des Computerprogramms PrimFind 3.0 oder nach der folgenden Formel ermittelt:

$$T_A = 4(G+C) + 2(A+T) - 5$$

Die Elongationszeit richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments, wobei als Richtwert für die Vent-Polymerase 1 min pro 1000 bp angenommen werden konnte. Die Temperatur für die Elongation betrug in allen Versuchen 72°C, ebenso wurden alle Versuche nach dem Durchlaufen der Zyklen mit einem Elongationsschritt von 5 min beendet.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.26.2 Amplifizierung der 16S rDNA mit Hilfe der PCR

Die Primer pA und pH* (Edwards et al., 1989; Tab. 2.3) und U1 (Barry et al., 1990; Tab. 2.3) wurden zur Amplifizierung der 16S rDNA verwendet. Die Reaktionen wurden unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

Primer pA/ pH*			Primer U1/ pH*			
Schritt	Zeit	Temperatur	Schritt	Zeit	Temperatur	
1	5 min	98°C	"hot-start"	1	5 min	98°C
2	1 min	95°C	Denaturierung	2	1 min	95°C
3	40 sec	52°C	Annealing	3	40 sec	55°C
4	2 min	72°C	Elongation	4	1 min	72°C
5	5 min	72°C	abschließende Elongation	5	5 min	72°C

Die Schritte 2-4 wurden in einem Zyklus 30 mal durchlaufen.

2.27 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien (p.a. Qualität) und Medienbestandteile:	- Fluka, Buchs, Schweiz - Merck, Darmstadt - Serva, Heidelberg - Sigma-Aldrich, Deisenhofen - Boehringer, Mannheim - Difco, Detroit, USA - Oxoid, Wesel - Roth, Karlsruhe
Enzyme:	- Boehringer, Mannheim - GIBCO BRL, Eggenstein - Roth, Karlsruhe - GIBCO BRL, Eggenstein - Sigma-Aldrich, Deisenhofen - Amersham-Buchler, Braunschweig - Perkin Elmer Cetus, Überlingen - Pharmacia, Freiburg
Alkalische Phosphatase	- GIBCO BRL, Eggenstein
Klenow Enzym	- Biolabs, Schwalbach
Lysozym	- Pharmacia, Freiburg
Restriktionsendonukleasen	- Pharmacia, Freiburg
RibonucleaseA	- Qiagen, Hilden
Sequenase	- Genomed GmbH, Bad Oeynhausen
<i>Taq</i> -Polymerase	- Amersham-Buchler, Braunschweig
T4-Ligase	
Vent Polymerase	
Kits:	
Auto-Read-Sequencing-Kit	
Deaza T7-Sequencing-Kit	
DNA-Präparations-Kit	
JetSorb	
<i>Redi</i> prime-DNA labeling-Kit	

2.28 Computerprogramme

- DNA-STRIDER™ 1.1 (Marck, 1988)
- ClustalV 3.0 (Higgins et al., 1991)
- FASTA (Pearson und Lipmann, 1988)
- PrimFind 3.0 (Fröbel Labor-Geräte, Lindau)
- BLAST (Altschul et al., 1990)

3 Experimente und Ergebnisse

Teil I

Entwicklung einer Gensondenanalytik für die Mineralisation von DMSO

3.1. Entwicklung einer stammspezifischen Gensonde für *Hyphomicrobium* EG

Die ribosomale RNA (rRNA), respektive die sie kodierenden Gene (rDNA), insbesondere die der 16S rRNA, besitzt zur Entwicklung stammspezifischer Gensonden sowie zur phylogenetischen Einordnung von Bakterienstämmen alle Anforderungen, die an solche Marker gestellt werden. Sie stellt einen hochkonservativen Merkmalsträger dar, der jedoch auch stammspezifische, variable Regionen besitzt. Stackebrandt et al. (1988) ordneten mit Hilfe einer 16S rRNA Katalogisierung sowie der Sequenzierung von 1373 Nukleotiden der 16S rRNA aus *Hyphomicrobium vulgare* MC-750 die knospenden und/oder prosthekatigen Bakterien der Gruppen *Hyphomicrobium*, *Hyphomonas*, *Pedomicrobium*, *Filomicrobium* und *Caulobacter* phylogenetisch der α -Untereinheit der Purpurbakterien zu.

Neben der Sequenz aus *Hyphomicrobium vulgare* MC-750 war zu Beginn dieser Arbeiten aus der Gruppe der Hyphomicrobien nur eine weitere Sequenz von 1441 Nukleotiden aus einem *Hyphomicrobium*-ähnlichen Bakterium US-353 bekannt (Becker, 1994).

Von Bakterien aus der α -Untereinheit der Purpurbakterien, wie z.B. *Pedomicrobium* standen in der Literatur jedoch noch weitere Nukleotidsequenzen der 16S rRNA zur Verfügung. Zur Entwicklung einer stammspezifischen Gensonde für *Hyphomicrobium* EG wurde daher das Gen für die 16S rRNA ausgewählt.

3.1.1 Amplifizierung und Klonierung der 16S rDNA aus Hyphomicrobien

Zur Amplifizierung der 16S rDNA aus Hyphomicrobien mit Hilfe der PCR wurden die Primerpaare (Tab. 2.3) pA/pH* und U1/pH* verwendet (Kap. 2.26.2). Die Primer pA und pH* lieferten das bei Edwards et al. (1989) beschriebene Amplifikat der nahezu vollständigen 16S rDNA. Die Primerkombination U1 und pH* ergab ein Amplifikat, mit der bei Barry et al. (1990) beschriebenen variablen Region V6 (Abb. 3.1).

Um die Fehler durch die DNA-Polymerase so gering wie möglich zu halten, wurde die

Vent-Polymerase mit „proofreading“-Aktivität verwendet. Als Negativkontrolle wurde immer ein Ansatz ohne DNA angesetzt, um eine eventuelle Kontamination der eingesetzten Lösungen mit DNA auszuschließen.

Bei allen Amplifikationen wurde immer ein einziges PCR-Produkt mit der Länge von annähernd 1500 bp mit der Primerkombination pA/pH* erhalten und ein Produkt mit der Länge von annähernd 600 bp mit der Primerkombination U1/pH* (Abb. 3.2).

Alle PCR-Produkte wurden zur weiteren Analyse in die Vektoren pUC18 bzw. pCR-Script Amp SK(+) kloniert. Die rekombinanten Plasmide, welche das 1500 bp große Amplifikat enthielten, wurden durch Hydrolyse mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* subkloniert (Tab. 2.2). Die Erkennungssequenz für dieses Restriktionsenzym lag wie die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *SmaI* in den Amplifikaten aus allen untersuchten Hyphomicrobien Stämmen konserviert vor (Abb. 3.1).

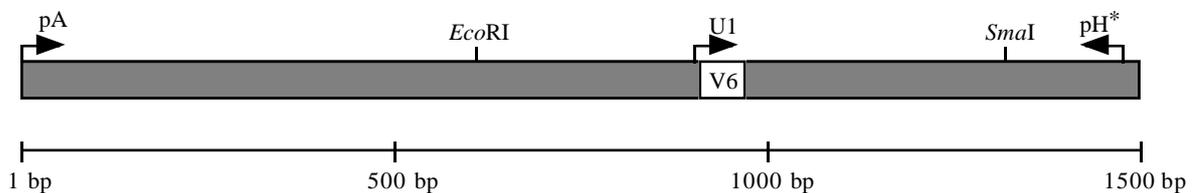


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der 16S rDNA aus Hyphomicrobien.

Es wird die Lage der verwendeten Primer zur Amplifizierung der 16S rDNA aus Hyphomicrobien dargestellt, sowie die konservierten Restriktionsstellen und die bei Barry et al. (1990) beschriebene variable Region V6.

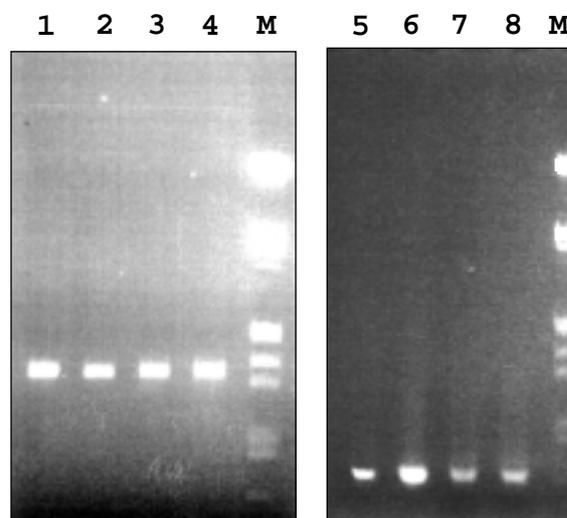


Abb. 3.2: Gelbild einer Agarosegelelektrophorese der amplifizierten Teile der 16S rDNA aus verschiedenen Hyphomicrobien Stämmen.

Spuren 1-4: Amplifikate einer PCR mit den Primern pA und pH*
 Spuren 5-8: Amplifikate einer PCR mit den Primern U1 und pH*
 Spur M: Standardlängenmarker (*EcoRI/HindIII*-Lysat des λ -Phagen)
 In der PCR eingesetzte DNA:

Spur 1 und 5: *Hyphomicrobium* EG; Spur 2 und 6: *Hyphomicrobium* sp. 1564; Spur 3 und 7: *Hyphomicrobium* sp. 1565; Spur 4 und 8: *Hyphomicrobium* sp. 1566

3.1.2 Sequenzanalyse der 16S rDNA aus Hyphomicrobien

Die 16S rDNA aus *Hyphomicrobium* EG, *Hyphomicrobium* sp. 1564, *Hyphomicrobium* sp. 1565 und *Hyphomicrobium* sp. 1566 wurde amplifiziert und sequenziert.

Es wurden Amplifikate zwischen 1468 und 1474 Nukleotiden mit den Primern pA und pH* erhalten, sowie Amplifikate zwischen 573 und 577 Nukleotiden mit den Primern U1 und pH* (Tab. 3.1). Die Nomenklatur der Nukleotide bezieht sich im weiteren Verlauf der Arbeit auf die Nukleotidsequenz der 16S rDNA aus *Hyphomicrobium* EG.

Ein Sequenzvergleich der hier untersuchten und der aus der Literatur bekannten 16S rDNA-Sequenzen aus Hyphomicrobien und einem weiteren Vertreter aus der Gruppe der α -Untereinheit der Purpurbakterien mit Vertretern der β, γ und δ -Untereinheiten der Purpurbakterien zeigt Abbildung 3.3. Die für die Vertreter der α -Untereinheit der Purpurbakterien etwa in der Größe von 30 Nukleotiden typischen Deletionen an Position 160 bzw. 408 (Stackebrandt et al., 1988) zeigen sich auch bei den Hyphomicrobien Stämmen.

Der GC-Gehalt der amplifizierten 16S rDNA liegt bei allen eingesetzten Hyphomicrobien Stämmen bei 55%. Dies liegt etwas unter dem GC-Gehalt für die Gesamt-DNA aus Hyphomicrobien von 59,3-64,7% (Gebers et al., 1985).

Ein Sequenzvergleich der einzelnen Stämme untereinander lieferte Identitäten zwischen 89% und 97% (Tab. 3.1). Die bei Stackebrandt et al. (1988) für Hyphomicrobien beschriebenen 23 konservierten Oligonukleotide sind bis auf wenige Ausnahmen in allen hier untersuchten und aus der Literatur bekannten Sequenzen der 16S rDNA der Hyphomicrobien vorhanden (Abb. 3.3).

Tab. 3.1: Übersicht über die Daten aus der Sequenzanalyse der 16S rDNA aus verschiedenen Hyphomicrobien Stämmen.

Stamm	% Identität zu <i>Hyphomicrobium</i> EG	GC-Gehalt [%]	Nukleotidlänge der Amplifikate mit den Primern	
			pA/pH*	U1/pH*
<i>Hyphomicrobium</i> EG	100,0	55,5	1468	573
<i>Hyphomicrobium</i> sp. 1564	89,0	55,6	1474	577
<i>Hyphomicrobium</i> sp. 1565	97,2	55,3	1471	574
<i>Hyphomicrobium</i> sp. 1566	90,8	54,9	1472	575
<i>Hyphomicrobium vulgare</i> MC-750	91,4	55,7	1386 ¹⁾	–
<i>Hyphomicrobium</i> -ähnliches Bakterium US-353	91,5	54,7	1441 ¹⁾	–

¹⁾ Die sequenzierte 16S rDNA aus den in der Literatur beschriebenen Stämmen umfaßt einen kleineren Bereich, als den in dieser Arbeit mit den Primern pA und pH* amplifizierten Bereich.


```

1052
(A) ATTAGTTACCATC-ATTCAGTTGGGCACTCTAGTGGGACTGCCGGTATAAGCCG-GAG-AAGGTGGG-ATGACGTCAAGTCATCATTGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACCGTCTACAATGGCCGTGACAATGCGCAGCCA-CCTAGTAATAGGGAGCTAATCGCAAAAAGCCG-TCTCAGTTCA
(B) C.....G..G...T.....AG.....A..G.....T.....G.....G.....G..G.A.GCG.G.GT.A.....T.C.....A.....G
(C) .....G.....T.....G.....G.....C.....GC.....
(D) C.....G..G...T.....AG.....A..G.....T.....G.....G.....A.AC.C..GT.A.....T.....G
(E) .....G.....T.....G.....A..G.....N.....G.....A..TC.C..TG.A.....T.....G
(F) .....G.....T.....T.GN..G.....G.....A..AC.C..TGT.A.....T.....G
(G) C.....G..G...T.....AG.....A..G.....C.....T.....G..G...G.G.ACGCG.GTGT.A.....T.C.....A.....G
(H) .....N..TG.TA.G---A---A..AN.....NGAC..A..G.....G.....C.....T..TA..T.....CA.....TC.GT..GA.G.TT..AGCCGCG.G-GT.....C..C..G.....A..GT.....C.G
(I) CC.....G..G...G..C..A.....A.A.....C..A.....G.....G.....C.A.....GTAGT..GA.G.TC..A.A..CGCG.G-G.....T..C.....TAC..GT.....C.G
(J) T.....G.....A.....A.....TC..A.....G.....G.....C.....T..T.AC.A.....A.....ATGT..AAG.....CTTCGCG.G-..A.....G.....CT-T..A..ATG.....C.G

1232

1233
(A) GATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGCATCAGCATGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTCTTACCCTAAAACGGTGCGCTAACCGCAAGGAGGC--AGCCGGCCACGGTAAGGTACAGCGACTGGGG
(B) .....CAC.....GTG.....T.....G.....C.....T.....G..GG..C..T.....G.....G.....
(C) .....
(D) .....G.C.....G.C.....T.....T.....G..G.....
(E) .....G.C.....G.C.....T.....T.....G..G.....N.....
(F) .....G.C.....G.C.....T.....T.....G..G.....
(G) .....CAC.....GTG.....T.....G.....C.....T.....G..GGTA.....TAA.....G.....
(H) .....TTCA.A.....GAG.....T.....N.....G.AAAC.GG.AG..GTA..A..C.....-GC..TTA.....C.GG.T.NCAT.....GG
(I) .....GA.....TC.....G.....T.....G.....CTG.....AG..GTA..AGT..A.A..CGCG.G-G.....-AC..TTA.....T..TCAT.....
(J) .....GA.....TC.....T.....TAG.....CTA.....C.....TG...AG..GTA.T..A..G...TTTTTC...A.GCA.G.TA...A...T.A..G.TA.....GG

1418
(A) TGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAAC-TGCGGCTGGATCACCTCCTT
(B) .....C.....
(C) .....
(D) .....
(E) .....
(F) .....
(G) .....C.....
(H) .....
(I) .....
(J) .....

1468

```

Abb. 3.3: Sequenzvergleich der 16S rDNA-Sequenzen aus Hyphomicrobien mit typischen Vertretern der vier Untereinheiten der Purpurbakterien

Die Sequenzen wurden mit der Sequenz aus *Hyphomicrobium* EG verglichen. Die Nummerierung bezieht sich auf die Sequenz aus *Hyphomicrobium* EG. Punkte zeigen gleiche Nukleotide an, Nukleotidaustausche werden durch den Buchstaben angezeigt (N bedeutet A, G, C oder T). Gedankenstriche zeigen eine Lücke an. Die nach Stackebrandt et al. (1988) konservierten Oligonukleotide für Hyphomicrobien sind unterstrichen. (A): *Hyphomicrobium* EG; (B): *Hyphomicrobium* sp. 1564; (C): *Hyphomicrobium* sp. 1565; (D): *Hyphomicrobium* sp. 1566; (E): *Hyphomicrobium vulgare* MC-750 (Stackebrandt et al., 1988); (F): *Hyphomicrobium*-ähnliches Bakterium US-353 (Becker, 1994); (G): *Agrobacterium tumefaciens* NCPPB2437 (Sawada et al., 1993); (H): *Thiobacillus thioparus* LV43 (Vlasceanu et al., 1997); (I): *Beggiatoa* sp. „Bay of Concepcion“ (Teske et al., 1997); (J): *Desulfocapsa sulfoexigens* SB164P1 (Finster et al., 1998)

3.1.3 Ableitung einer stammspezifischen Gensonde aus den 16S rDNA-Sequenzen der verschiedenen *Hyphomicrobium* Stämme

Ein Sequenzvergleich aller hier untersuchten und aus der Literatur bekannten 16S rDNA-Sequenzen aus verschiedenen *Hyphomicrobium* Stämmen zeigt Abb. 3.4. Die Abbildung zeigt über weite Bereiche große Sequenzhomologien, es sind jedoch auch variable Bereiche zu erkennen. Barry et al. (1990) beschreiben in ihrer Arbeit zwei variable Regionen der 16S rDNA verschiedener Eubakterien zur Ableitung spezies- und stammspezifischer Gensonden. Die von ihnen beschriebene Region V2 liegt zwischen den Nukleotiden 1–100 der 16S rDNA aus *Hyphomicrobium* EG. Dieser Bereich zeigt für die *Hyphomicrobium* Stämme ebenfalls eine gewisse Variabilität, jedoch liegen zwischen dem Stamm *Hyphomicrobium* EG und dem Stamm *Hyphomicrobium* sp. 1565, die eine Identität von 97,2% besitzen (Tab. 3.1), über dem gesamten Bereich nur 3 Nukleotidaustausche vor. Eine abgeleitete Oligonukleotidprobe von ca. 20 Basen würde sich zwischen diesen beiden Stämmen nur in maximal 2 Basen unterscheiden.

Größere Variabilitäten gerade zwischen diesen beiden Stämmen zeigen sich in den Bereichen zwischen den Nukleotiden 568-594, sowie 754-780. Aus diesen Bereichen würden sich Oligonukleotidproben für den Stamm *Hyphomicrobium* EG ableiten lassen, die sich über einen Bereich von 20 Basen in mindestens 4 Positionen von allen anderen *Hyphomicrobium* Stämmen unterscheiden.

Die höchste Variabilität zeigt sich jedoch auch für die *Hyphomicrobium* Stämme in der von Barry et al. (1990) beschriebenen Region V6. Sie liegt zwischen den Nukleotiden 896–992. Für den Stamm *Hyphomicrobium* EG läßt sich aus diesem Bereich eine Oligonukleotidsonde von 20 Basen ableiten (KKC22, Tab. 2.3), die sich zwischen 7 Basen (*Hyphomicrobium* sp. 1565) und 12 Basen (*Hyphomicrobium* sp. 1564) von allen anderen *Hyphomicrobium* Stämmen unterscheidet (Abb. 3.5). Ein Sequenzvergleich dieses Oligonukleotids mit dem Programm BLASTN gegen die Datenbank zeigte keine Ähnlichkeiten zu irgendeiner DNA-Sequenz.

	928	KKC22	975
(A)	TCACTGATTG	<u>CCCGGCAGAGATGCCGGAG</u>	TTCAGCA-ATGGACAGTGGG
(B)	A.CGGTCGC.GACACTGTCTT.CAGTTCGGCC.GAT-
(C)C...T.G.....	CCG...A.....-
(D)	.T..G..CC.TTTCGATTCA.C.T...	A-.AGG.C..A.-
(E)C.TTTCGATTCA.C.T...	C..AGG.....
(F)	.T..G..CC.TTTCGATTCA.C.T...	N..AGG.C..A..

Abb. 3.5: Variable Region zwischen Nukleotid 928 und 975 aus dem Sequenzvergleich verschiedener *Hyphomicrobium* Stämme.

Die Sequenzen wurden mit der Sequenz aus *Hyphomicrobium* EG verglichen. Die Nummerierung bezieht sich auf die Sequenz aus *Hyphomicrobium* EG. Punkte zeigen gleiche Nukleotide an, Nukleotidaustausche werden durch den Buchstaben angezeigt (N bedeutet A, G, C oder T). Gedankenstriche zeigen eine Lücke an. Der stammspezifische Primer KKC22 für den Stamm *Hyphomicrobium* EG ist unterstrichen. (A): *Hyphomicrobium* EG; (B): *Hyphomicrobium* sp. 1564; (C): *Hyphomicrobium* sp. 1565; (D): *Hyphomicrobium* sp. 1566; (E): *Hyphomicrobium vulgare* MC-750 (Stackebrandt et al., 1988); (F): *Hyphomicrobium*-ähnliches Bakterium US-353 (Becker, 1994)

Das Oligonukleotid KKC22 wurde in Kombination mit dem Primer pH* in PCR-Experimenten zum Nachweis des Stammes *Hyphomicrobium* EG aus Bakterienmischungen verschiedener *Hyphomicrobium* Stämme eingesetzt. Dazu wurden Kulturen aus flüssigem Minimalmedium (Kap. 2.4.1) der Stämme *Hyphomicrobium* EG, *Hyphomicrobium* sp. 1564, *Hyphomicrobium* sp. 1565 und *Hyphomicrobium* sp. 1566 nach Bestimmung ihrer OD in verschiedenen Konzentrationen miteinander vermischt. Es wurde einmal eine Mischung mit gleichen Anteilen von *Hyphomicrobium* sp. 1564, *Hyphomicrobium* sp. 1565 und *Hyphomicrobium* sp. 1566 und 1/10 Anteil an *Hyphomicrobium* EG hergestellt, dann eine Mischung mit allen *Hyphomicrobium* Stämmen in gleicher Konzentration sowie eine Mischung mit gleichen Anteilen an *Hyphomicrobium* sp. 1564, *Hyphomicrobium* sp. 1565 und *Hyphomicrobium* sp. 1566 und einem 10fachen Überschuß an *Hyphomicrobium* EG. Als Negativkontrolle wurde eine Mischung aus allen *Hyphomicrobium* Stämmen jedoch ohne *Hyphomicrobium* EG hergestellt.

Von diesen Kulturmischungen wurde die DNA präpariert (Kap. 2.16.1) und in einer PCR mit den Primern KKC22 und pH* eingesetzt. Es wurde immer ein Amplifikat in der Größe von 530 bp erhalten, wenn *Hyphomicrobium* EG in der Mischung vorhanden war (Abb. 3.6). Die Mischung mit 1/10 Anteil *Hyphomicrobium* EG enthielt, ausgehend von der Lebendzellzahlbestimmung für *Hyphomicrobium* EG (Kap. 2.7), etwa 400 Keime *Hyphomicrobium* EG/ml.

Mit DNA aus den Stämmen *E. coli* JM83, *Pseudomonas* sp. B13 und *Streptomyces griseus* N2-3-11 konnte mit der Primerkombination KKC22/pH* kein Amplifikat aus einer PCR erhalten werden. Auch nach Amplifizierung der beinahe vollständigen 16S rDNA dieser Stämme mit den Primern pA/pH* und dem Einsatz dieser Amplifikate in eine erneute PCR mit den Primern KKC22/pH* konnten keine PCR-Produkte erhalten werden.

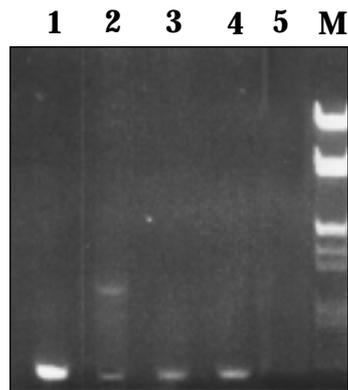


Abb. 3.6: Gelbild einer Agarosegelelektrophorese von PCR-Experimenten zum Nachweis von *Hyphomicrobium* EG in Kulturmischungen

Alle Amplifikationen wurden mit der Primerkombination KKC22/ pH* durchgeführt.

In der PCR eingesetzte DNA:

Spur 1: *Hyphomicrobium* EG

Spur 2: Mischung aus *Hyphomicrobium* sp. 1564, *Hyphomicrobium* sp. 1565 und *Hyphomicrobium* sp. 1566 in gleicher Konzentration und *Hyphomicrobium* EG in einer Verdünnung von 1:10

Spur 3: Mischung aus *Hyphomicrobium* EG, *Hyphomicrobium* sp. 1564, *Hyphomicrobium* sp. 1565 und *Hyphomicrobium* sp. 1566 in gleicher Konzentration

Spur 4: Mischung aus *Hyphomicrobium* sp. 1564, *Hyphomicrobium* sp. 1565 und *Hyphomicrobium* sp. 1566 in gleicher Konzentration und *Hyphomicrobium* EG in einem Überschuß von 10:1

Spur 5: Mischung aus *Hyphomicrobium* sp. 1564, *Hyphomicrobium* sp. 1565 und *Hyphomicrobium* sp. 1566 in gleicher Konzentration ohne *Hyphomicrobium* EG

Spur M: Standardlängenmarker (*Eco*RI/*Hind*III-Lysat des λ -Phagen)

3.1.4 Einsatz der stammspezifischen Gensonde für *Hyphomicrobium* EG in verschiedenen Wasserproben

Um zu zeigen, daß ein Nachweis von *Hyphomicrobium* EG in Wasserproben möglich ist, wurde die DNA aus Wasserproben unterschiedlicher Herkunft isoliert (Kap. 2.16.3) und in verschiedenen PCR-Experimenten eingesetzt.

Es wurden Wasserproben aus einem Abwassertank der Universität, aus dem Belebtecken einer Kläranlage, einem Gartenteich sowie aus einem Abwasserkanal einer chemischen Fabrik, in deren Produktionsprozeß DMSO mit großen Mengen Wasser von Membranen gespült und ins Abwasser eingeleitet wird, verwendet. Die Gesamtkeimzahl der Wasserproben (Bestimmung der Kolonienzahl, Kap. 2.7) lagen bei $3 \cdot 10^6$ Keime/ml im Abwassertank der Universität, $4 \cdot 10^6$ Keime/ml im Belebtecken der Kläranlage, $2 \cdot 10^3$ Keime/ml im Gartenteich und $1 \cdot 10^5$ Keime/ml im Abwasserkanal der chemischen Fabrik.

Zum Nachweis, daß eine generelle Amplifikation in PCR-Experimenten mit der DNA aus den Wasserproben möglich ist, wurde die DNA immer zuerst in einer PCR mit der Primerkombination pA/pH* zur Amplifizierung der beinahe vollständigen 16S rDNA eingesetzt. Diese Amplifikate wurden dann zur Identifikation von *Hyphomicrobium* EG in

einer erneuten PCR mit der Primerkombination KKC22/pH* eingesetzt.

In den Wasserproben konnte der Stamm *Hyphomicrobium* EG nicht nachgewiesen werden, wurden die Wasserproben jedoch mit einer definierten Menge an *Hyphomicrobium* EG versetzt, so gelang jedesmal der Nachweis dieses Stammes. Er konnte in einer Konzentration von 100 Keime/ml nachgewiesen werden (Abb. 3.7).

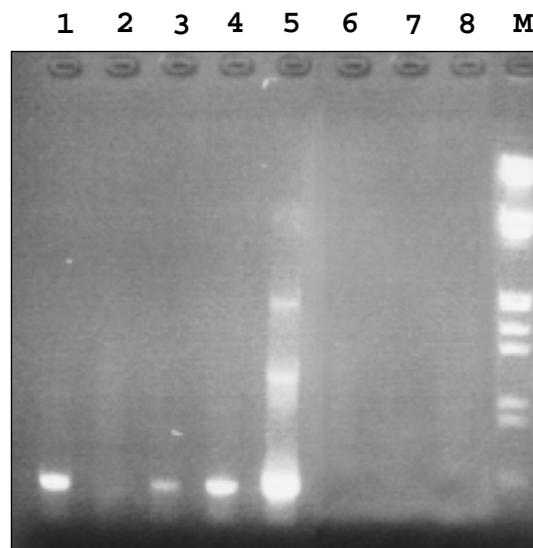


Abb. 3.7: Gelbild einer Agarosegelelektrophorese von PCR-Experimenten zum Nachweis von *Hyphomicrobium* EG in unterschiedlichen Wasserproben

Alle Amplifikationen wurden mit der Primerkombination KKC22/pH* durchgeführt.

In der PCR eingesetzte DNA:

Spur 1: *Hyphomicrobium* EG

Spur 2: Wasserprobe (100 ml) aus Abwassertank der Universität

Spur 3: Wasserprobe (100 ml) aus Abwassertank der Universität, versetzt mit 1 ml einer Kultur von *Hyphomicrobium* EG

Spur 4: Wasserprobe (90 ml) aus Abwassertank der Universität, versetzt mit 10 ml einer Kultur von *Hyphomicrobium* EG

Spur 5: Wasserprobe (50 ml) aus Abwassertank der Universität, versetzt mit 50 ml einer Kultur von *Hyphomicrobium* EG

Spur 6: Wasserprobe (3 ml) aus Belebtecken einer Kläranlage

Spur 7: Wasserprobe (1000 ml) aus einem Gartenteich

Spur 8: Wasserprobe (1000 ml) aus Abwassertank einer chemischen Fabrik

Spur M: Standardlängenmarker (*EcoRI/HindIII*-Lysat des λ -Phagen)

3.2 Entwicklung einer Gensonde für den DMSO-Abbau durch *Hyphomicrobium* EG

Das Enzym Methylmercaptan-Oxidase ist das charakteristische Enzym des DMSO-Abbaus durch *Hyphomicrobium* EG (Suylen et al., 1987). Außer einer erfolgreichen Reinigung dieses Enzyms und Messung kinetischer Daten war über dieses Enzym zu Beginn dieser Arbeiten nichts bekannt. Sequenzen von Enzymen ähnlicher Funktion lagen ebenfalls nicht vor.

Zur Entwicklung einer Gensonde für den DMSO-Abbau durch *Hyphomicrobium* EG sollte daher der gesamte kodierende DNA-Abschnitte der Methylmercaptan-Oxidase oder Teile davon identifiziert werden.

Dazu wurde das Enzym gereinigt, N-terminal sequenziert und durch das Enzym Trypsin proteolytisch gespalten. Die isolierten Fragmente der Proteolyse wurden ebenfalls N-terminal sequenziert.

3.2.1 Reinigung und N-terminale Sequenzierung des Enzyms Methylmercaptan-Oxidase

Das Enzym Methylmercaptan-Oxidase wurde, wie in Kapitel 2.10 beschrieben, mit Hilfe der Anionenaustauschchromatographie und der Aceton-Fällung aufgereinigt. Die Daten der einzelnen Anreicherungsschritte zeigt Tabelle 3.2, das Elutionsprofil des Enzyms von der Säule zeigt Abbildung 3.8.

Tab. 3.2: Anreicherungsdaten der Aufreinigung des Enzyms Methylmercaptan Oxidase

	Volumen [ml]	Protein [mg]	Aktivität [U]	spez. Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Anreicherungs- faktor
Rohextrakt	4	48	2,29	0,048	100	1
Aceton-Fällung	3	46,2	2,62	0,057	114	1,2
DEAE-Säule	32	1,73	1,62	0,94	71	19,6
Aceton-Fällung	4	0,96	1,38	1,43	60	29,8

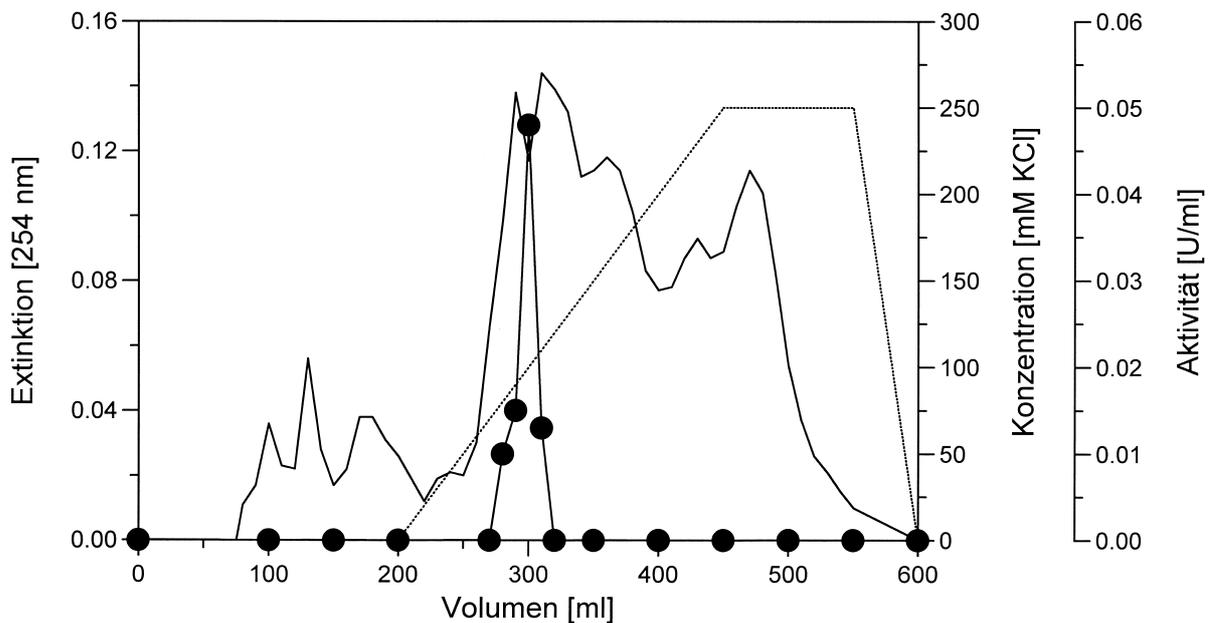


Abb. 3.8 Elutionsprofil der Anionenaustauschchromatographie zur Aufreinigung der Methylmercaptan-Oxidase (Kap. 2.10)

Die Punkte zeigen den Aktivitätsverlauf der Elutionsproben, die gestrichelte Linie den Salzgradienten und die durchgezogene Linie das UV-Spektrum bei 256 nm.

Das aufgereinigte Enzym wurde von einem Proteingel auf eine PVDF-Membran geblottet (Kap. 2.13) und N-terminal sequenziert. Es konnten die ersten 20 Aminosäuren bestimmt werden:

D E T C/W N S P Y T S A L I K G Q E D F L

Die Aminosäure an der 4. Stelle konnte nicht eindeutig bestimmt werden, es könnte sich um Cystein oder Tryptophan handeln.

Ein Vergleich dieser Aminosäuresequenz mit dem Programm BLASTP gegen die Datenbank zeigte keinerlei Ähnlichkeiten zu bekannten Sequenzen.

3.2.2 Proteolyse des Enzyms Methylmercaptan-Oxidase

Um noch weitere Aminosäuresequenzen aus dem Enzym Methylmercaptan Oxidase zu erhalten, wurde das aufgereinigte Enzym mit dem Enzym Trypsin proteolytisch gespalten (Kap. 2.14). Aus dem entstandenen Oligopeptidgemisch konnten 4 Fragmente mit Hilfe eines Gradienten an der HPLC über eine „reversed phase“ Säule (Kap. 2.14.2) getrennt werden (Abb. 3.9).

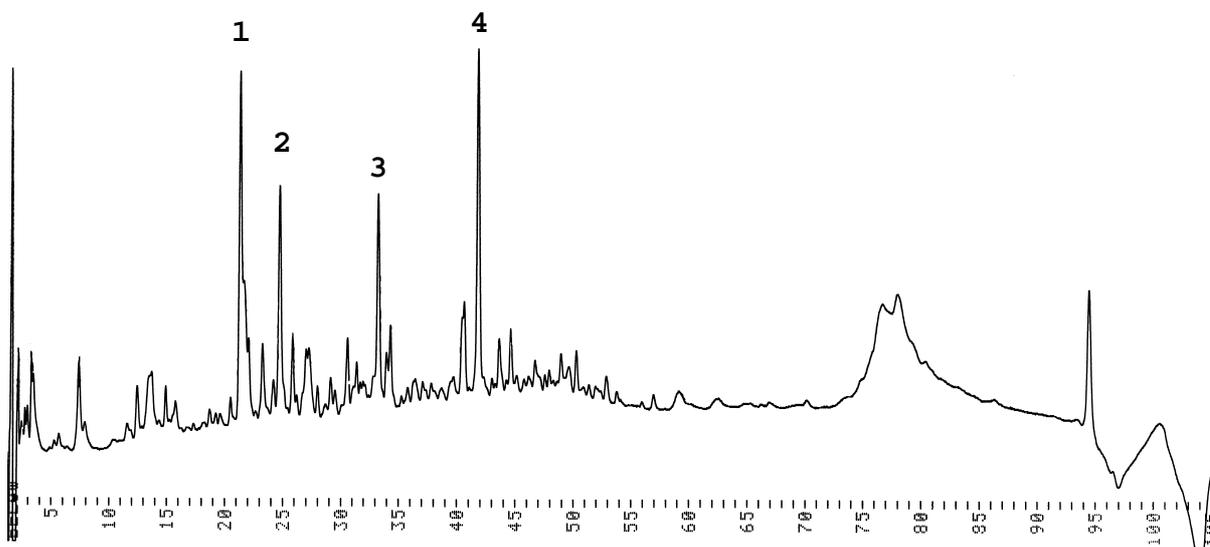


Abb. 3.9: Chromatogramm der HPLC-Auftrennung des Oligonukleotidgemisches aus der Proteolyse der Methylmercaptan-Oxidase durch Trypsin (Kap. 2.14)

Die einzelnen Oligopeptide wurden gesammelt, lyophilisiert und N-terminal sequenziert. Die Sequenz des Fragmentes 1 (SAYPGQITSN) zeigte eine 100%ige Identität zu der Sequenz von Trypsin, d.h. bei dieser Fraktion handelt es sich um eine Verunreinigung durch das bei der Proteolyse eingesetzte Enzym, so daß diese Sequenz nicht zur Ableitung eines Oligonukleotids herangezogen wurde. Die Sequenzen der Fragmente 2 und 4 konnten nicht eindeutig bestimmt werden, da bei der Sequenzierung Nebensequenzen auftraten.

Bei Fragment 3 konnte eine eindeutige Sequenz (GTSYPDVL) bestimmt werden. Diese Sequenz zeigt im Datenbankvergleich keine Ähnlichkeiten zu einer bekannten Sequenz.

3.2.3 Amplifizierung und Klonierung eines für die Methylmercaptan-Oxidase kodierenden DNA-Abschnittes

Aus der N-terminalen Sequenz der Methylmercaptan Oxidase wurden 2 Oligonukleotide (KKC1 und KKC2; Tab. 2.3) und aus der N-terminalen Sequenz des Fragmentes 3 wurde ein Oligonukleotid (KKC23; Tab. 2.3) zur Amplifizierung eines für die Methylmercaptan Oxidase kodierenden DNA-Abschnittes abgeleitet.

Zur Ableitung eines Oligonukleotids von 20 Basen wurden aus der N-terminalen

Sequenz der Methylmercaptan Oxidase solche Bereiche gewählt, in denen die Anzahl der sogenannten „wobbles“ in dem abgeleiteten Oligonukleotid, bedingt durch die Degeneration des genetischen Codes, so gering wie möglich war.

Es wurden Amplifikationen mit den Primerkombinationen KKC1/KKC23 und KKC2/KKC23 durchgeführt. Wie in Abbildung 3.10 zu erkennen ist, konnte mit beiden Primerkombinationen ein etwa 900 bp großes Amplifikat bei einer Annealingtemperatur von 48°C beim Einsatz von DNA aus *Hyphomicrobium* EG erhalten werden. Diese beiden PCR-Produkte wurden in den Vektor pUC18 kloniert und anschließend sequenziert.

Die ermittelte DNA-Sequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt Abbildung 3.11.

Dieses 900 bp große PCR-Produkt konnte weder durch den Einsatz von DNA aus den Hyphomicrobien Stämmen, die kein DMSO verwenden können, noch durch Einsatz von DNA aus den Stämmen *E. coli* JM83, *Pseudomonas* sp. B13 oder *Streptomyces griseus* N2-3-11 in einer PCR erhalten werden.

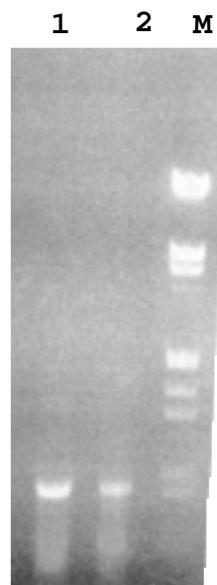


Abb. 3.10: Gelbild einer Agarosegelelektrophorese von PCR-Experimenten zur Amplifizierung eines für die Methylmercaptan-Oxidase kodierenden DNA-Abschnittes

In der PCR eingesetzte DNA: *Hyphomicrobium* EG

Spur 1: Amplifikat einer PCR mit den Primern KKC1 und KKC23

Spur 2: Amplifikat einer PCR mit den Primern KKC2 und KKC23

Spur M: Standardlängenmarker (*Eco*RI/*Hind*III-Lysat des λ -Phagen)

```

1/1                               31/11                               61/21
D E T W N S P Y T S A L I K G Q E D F L H V W T L G E V G I
GACGAGACCTGGAATTCGCCGTACACCAGCGCCTTGATTAAGGGGCAGGAGGACTTCTCCATGTGTGGACCCTTGGAGAGGTCGGAATT
      KKC1                               KKC2
91/31                               121/41                               151/51
G D E S D K L V T I D V Q P N S P T Y G K V I H S V S V G G
GGTGACGAATCCGACAAACTCGTAACCATCGACGTTTCAGCCGAACCTCGCCACCTACGAAAGGTCATCCATTCGGTGTCCGTTGGCGGA

181/61                               211/71                               241/81
R G E A H H T G F T D D R R F L W A G R L D D N K I F I F D
CGCGCGAGGCGCATCACACCGGCTTCACCGACGACCGCGCTTCTGTGGGCAGGTCGTCTCGACGACAACAAGATCTTCATTTTCGAT

271/91                               301/101                               331/111
L V D P S K P K V V K T I T D F A E K T G F V G P H T F Y A
CTGGTTGACCCGTCGAAGCCGAAAGTCGTCAAACCATTACCGACTTCGCCGAGAAGACCGGCTTCGTCGGACCGCACACGTTCTATGCC

361/121                               391/131                               421/141
T A G R M M I Q A L S N P K T H D G Q T G I A V Y N N A G E
ACGGCAGGCCGCATGATGATTAGGCCCTGTGCAACCCCAAGACCCACGACGGTCAGACGGGCATCGCCGCTATAACAACGCTGGCGAA

451/151                               481/161                               511/171
L V S T H A M P L V D G G D G Y G Y D I G I N P A Q N V M L
CTTGCTCAACGCATGCAATGCCGCTGGTGGATGGCGGTGACGGTACGGCTACGACATCGGTATCAACCCTGCCAGAACGTCATGCTG

541/181                               571/191                               601/201
T S S F T G W T N Y M M D L G Q M V K D P E A M K R F G K S
ACGTCGAGCTTACCGGCTGGACGAACTACATGATGGACCTCGGCCAGATGGTCAAAGATCCTGAAGCAATGAAGCGCTTCGGCAAATCG

631/211                               661/221                               691/231
M V M W D Y K S M K P I K T M E V P G A P L E I R W S L K P
ATGGTCATGTGGATTACAAGTCCATGAAGCCCATCAAGACGATGGAAGTCCCAGGTGCACCGCTCGAAATCCGTTGGTCTGAAGCCG

721/241                               751/251                               781/261
E D N G R S P R R S L T S K L W L V K Q D E K G E W Q A K D
GAAGATAATGGGCGATCACCGCGACGGTCACTGACGTCCAAACTTGGCTTGTGAAGCAGGACGAAAAGGGCGAATGGCAGGCTAAGGAC

811/271                               841/281                               871/291
V G N I G D P S K V P L P V D I S I T A D G K G L W V N T F
GTCGGCAATATTGGCGATCCTTCGAAAGTTCGGCTGCCGGTCGACATCTCCATCACCGCTGACGGCAAGGGCCTCTGGGTCAACACCTTC

901/301
L D G T S Y P D V L
TTGGACGGCACCTCCTACCCAGATGT
      KKC23

```

Abb. 3.11: DNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der klonierten Amplifikate aus der PCR mit den Primern KKC1/KKC23 und KKC2/KKC23

Die Lage der verwendeten Primer ist unterstrichen. Die aus der gereinigten Methylmercaptan-Oxidase N-terminal sequenzierten Aminosäuren, sowie die Aminosäuren aus dem sequenzierten Fragment 3 sind kursiv eingezeichnet.

3.2.4 Ableitung einer für den DMSO-Abbau durch *Hyphomicrobium* EG spezifischen Gensonde

Der in Abbildung 3.11 dargestellte DNA-Abschnitt der Methylmercaptan Oxidase wurde in Hybridisierungsexperimenten als Sonde mit Gesamt-DNA aus *Hyphomicrobium* EG, *Hyphomicrobium* sp. 1564, *Hyphomicrobium* sp. 1565 und *Hyphomicrobium* sp. 1566 eingesetzt.

Wie in Abbildung 3.12 zu sehen ist, wurden nur bei der DNA aus *Hyphomicrobium* EG Hybridisierungssignale erhalten. Dies zeigt eindeutig, daß es sich bei dem amplifizierten DNA-Abschnitt um einen für den Stamm *Hyphomicrobium* EG spezifischen Abschnitt handelt.

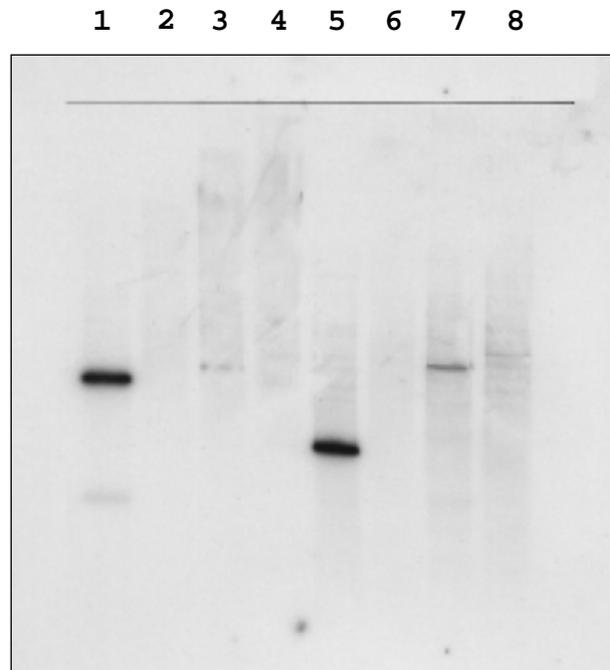


Abb. 3.12: Autoradiogramm einer radioaktiv durchgeführten Hybridisierung

eingesetzte Sonde: Amplifikat der PCR mit den Primern KKC1 und KKC23

Spuren 1-4: DNA hydrolysiert mit dem Restriktionsenzym *Eco*RI

Spuren 5-8: DNA hydrolysiert mit dem Restriktionsenzym *Hinc*II

eingesetzte DNA:

Spur 1 und 5: *Hyphomicrobium* EG; Spur 2 und 6: *Hyphomicrobium* sp. 1564; Spur 3 und 7:

Hyphomicrobium sp. 1565; Spur 4 und 8: *Hyphomicrobium* sp. 1566

Um den für den Stamm *Hyphomicrobium* EG spezifischen Abbau von DMSO auch mit Hilfe der PCR-Technik nachweisen zu können, wurden aus der Sequenz aus Abbildung 3.11 zwei Oligonukleotide (KKC29 und KKC30; Tab 2.3) abgeleitet, die dann in einer PCR bei einer Annealingtemperatur von 57°C mit DNA unterschiedlicher Herkunft eingesetzt wurden (Abb. 3.13). Die Lage der Oligonukleotide liegt zwischen Nukleotid 57–76 (KKC29) und 906–887 (KKC30) des in Abbildung 3.11 dargestellten DNA-Abschnittes der Methylmercaptan Oxidase. Es konnte nur in den Proben ein Amplifikat von ca. 850 bp erhalten werden, in denen auch der Stamm *Hyphomicrobium* EG vorhanden war. In den Wasserproben, die in Kapitel 3.1.4 mit Hilfe der stammspezifischen Gensonde für *Hyphomicrobium* EG untersucht worden waren, konnte das Enzym ebenso nicht nachgewiesen werden, wie auch nicht in den Stämmen *Hyphomicrobium* sp. 1564, *Hyphomicrobium* sp. 1565, *Hyphomicrobium* sp. 1566, *E. coli* JM83, *Pseudomonas* sp. B13 und *Streptomyces griseus* N2-3-11.

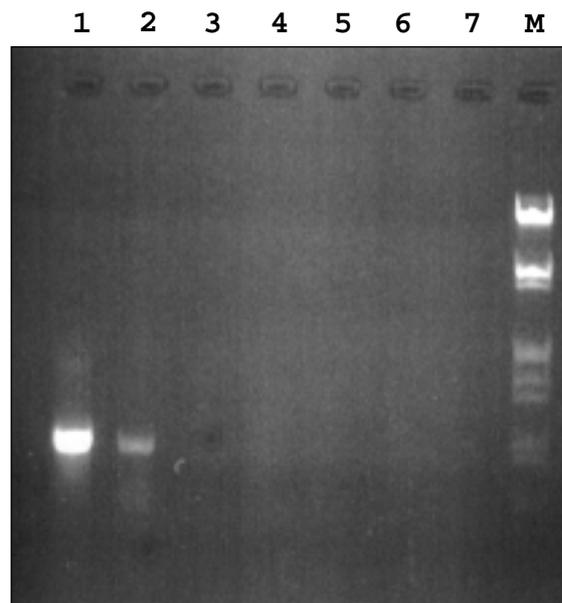


Abb. 3.13: Gelbild einer Agarosegelelektrophorese von PCR-Experimenten zum Nachweis des Enzyms Methylmercaptan-Oxidase in verschiedenen DNA-Proben

Alle Amplifikationen wurden mit der Primerkombination KKC29/KKC30 durchgeführt.

In der PCR eingesetzte DNA:

Spur 1: *Hyphomicrobium* EG

Spur 2: Mischung aus *Hyphomicrobium* sp. 1564, *Hyphomicrobium* sp. 1565 und *Hyphomicrobium* sp. 1566 in gleicher Konzentration und *Hyphomicrobium* EG in einer Verdünnung von 1:10

Spur 3: Mischung aus *Hyphomicrobium* sp. 1564, *Hyphomicrobium* sp. 1565 und *Hyphomicrobium* sp. 1566 in gleicher Konzentration ohne *Hyphomicrobium* EG

Spur 4: Wasserprobe (1000 ml) aus Abwassertank einer chemischen Fabrik

Spur 5: Wasserprobe (1000 ml) aus einem Gartenteich

Spur 6: Wasserprobe (100 ml) aus Abwassertank der Universität

Spur 7: Wasserprobe (3 ml) aus Belebbecke einer Kläranlage

Spur M: Standardlängenmarker (*Eco*RI/*Hind*III-Lysat des λ -Phagen)

3.3 Entwicklung einer Gensonde für die anaerobe Reduktion von DMSO durch unspezifische Reduktasen

Im aeroben Abbau von DMSO durch *Hyphomicrobium* EG oder *Thiobacillus* MS1 wird im 1. Schritt DMSO durch eine DMSO-Reduktase zu DMS umgesetzt. Die Reduktion von DMSO wird aber auch in verschiedenen fakultativ oder obligat anaeroben Mikroorganismen durch eine unspezifische Reduktase katalysiert, die aber nicht den Abbau von DMSO einleitet, sondern die dem Organismus lediglich ermöglicht, unter anaeroben Bedingungen weiterhin Energie über Elektronentransportphosphorylierung zu gewinnen. Diese Reduktase reduziert neben DMSO auch N-Oxide, wie Trimethylamin-N-Oxid. Das Gen, das diese unspezifische DMSO-Reduktase kodiert, ist bereits in verschiedenen Bakterienstämmen untersucht worden. Die aus den Genen abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigen homologe Bereiche (Abb. 3.14). Diese Bereiche wurden zur Ableitung ver-

schiedener Oligonukleotide herangezogen. Mit Hilfe dieser Oligonukleotide sollte die unspezifische Reduktion von DMSO zu DMS unter anaeroben Bedingungen in den Wasserproben nachgewiesen werden.

Die Oligonukleotide KKC18 und KKC19 (Tab. 2.3), abgeleitet aus dem in Abbildung 3.14 dargestellten DMSO-Reduktasevergleich, wurden in einer PCR bei einer Annealingtemperatur von 56°C mit DNA unterschiedlicher Herkunft eingesetzt (Abb. 3.15). Mit DNA, welche aus Hyphomicrobien Stämmen isoliert wurde, konnte kein Amplifikat erhalten werden, ebenso gelang keine Amplifikation mit DNA aus den Stämmen *Pseudomonas* sp. B13 und *Streptomyces griseus* N2-3-11. Bei einer Probe, die DNA aus *Escherichia coli* JM83 enthielt, konnte ein Amplifikat in der zu erwarteten Größe von 1200 bp erhalten werden, ebenso wie aus der DNA, welche aus den Wasserproben aus dem Abwassertank der Universität, dem Belebtecken der Kläranlage und dem Abwasserkanal der chemischen Fabrik isoliert wurde.

Die Amplifikate aus *E. coli* JM83 und den Abwasserproben aus der Universität und dem Belebtecken der Kläranlage wurden in pUC18 kloniert und ansequenziert. Alle Sequenzen entsprachen einem Teil der bei Bilous et al. (1988) angegebenen Sequenz des *dmsABC* Operons für die DMSO-Reduktase aus *E. coli*.

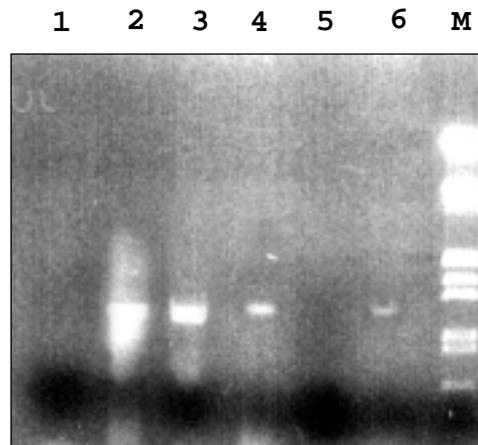


Abb. 3.15: Gelbild einer Agarosegelelektrophorese von PCR-Experimenten zum Nachweis des Enzyms DMSO-Reduktase in verschiedenen DNA-Proben

Alle Amplifikationen wurden mit der Primerkombination KKC18/KKC19 durchgeführt.

In der PCR eingesetzte DNA:

Spur 1: *Hyphomicrobium* EG

Spur 2: *Escherichia coli* JM83

Spur 3: Wasserprobe (3 ml) aus Belebtecken einer Kläranlage

Spur 4: Wasserprobe (100 ml) aus Abwassertank der Universität

Spur 5: Wasserprobe (1000 ml) aus einem Gartenteich

Spur 6: Wasserprobe (1000 ml) aus Abwassertank einer chemischen Fabrik

Spur M: Standardlängenmarker (*EcoRI/HindIII*-Lysat des λ -Phagen)

Teil II

Untersuchungen an den Genen des β -Ketoacidweges in *Pseudomonas* sp. B13

3.4 Versuche zur Lokalisierung des Gens für die 3-Oxoacid: Succinyl-CoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13

Zur Lokalisierung des Gens für die 3-Oxoacid: Succinyl-CoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13 standen die N-terminalen Sequenzen der Untereinheiten A und B aus diesem Enzym zur Verfügung (Kaschabek, persönliche Mitteilung). Ein Vergleich dieser Sequenzen mit dem Programm BLASTP gegen die Datenbank zeigten die in Abb. 3.16 und Tab. 3.3 dargestellten Ähnlichkeiten zu verschiedenen CoA-Transferasen.

Untereinheit A:

```
(A)  -AE--LLTLREAVRFVNDGT-VALEGFT-
(B)  MSK--VMTLKDAIAKYVHSGDHIALGGFTT
(C)  MINKTYESIASAVEG-ITDGSTIMVGGFGT
(D)  MIDKSAATLTEALSQ-IHDGATILIGGFGT
      .. * . . * . . **
```

Untereinheit B:

```
(A)  ----SAYSTNEMMTVAAARRLKNGAVVFV-
(B)  MADYTNNTNKEMQAVTIAKQIKNGQVVTVG
(C)  MT-ITKKLSRTEMAQRVAADIQEGAYVNLG
(D)  MS-Y-HKLTRDQIAQRVAQDIPEGSYVNLG
(E)  MI-NDKNLAKEIIAKRVARELKNQQLVNLG
      . * . . * * .
```

Abb. 3.16 Sequenzvergleich der N-terminalen Sequenzen der Untereinheiten A und B verschiedener CoA-Transferasen

Sterne zeigen gleiche Aminosäuren an, Punkte ähnliche Aminosäuren. Gedankenstriche zeigen eine Lücke an. (A): *Pseudomonas* sp. B13 (Kaschabek, persönliche Mitteilung); (B): *Acidaminococcus fermentans* (Mack et al., 1994); (C): *Pseudomonas putida* (Parales et al., 1992); (D): *Acinetobacter calcoaceticus* (Hartnett et al., 1990); (E): *Clostridium acetobutylicum* (Petersen et al., 1993)

Tab. 3.3: Vergleich der N-terminalen Sequenzen der Untereinheiten A und B der 3-Oxoadipat:Succinyl-CoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13 gegen andere CoA-Transferasen

	% Identität zur Untereinheit A der 3-Oxoadipat:Succinyl-CoA-Transferase aus <i>Pseudomonas</i> sp. B13
Glutaconat-CoA-Transferase aus: <i>Acidaminococcus fermentans</i> (Untereinheit A)	40
β-Ketoadipat:Succinyl-CoA-Transferase aus: <i>Pseudomonas putida</i> (PcaI)	28
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (CatI)	32
	% Identität zur Untereinheit B der 3-Oxoadipat:Succinyl-CoA-Transferase aus <i>Pseudomonas</i> sp. B13
Glutaconat-CoA-Transferase aus: <i>Acidaminococcus fermentans</i> (Untereinheit B)	44
β-Ketoadipat:Succinyl-CoA-Transferase aus: <i>Pseudomonas putida</i> (PcaJ)	16
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (CatJ)	16
Acetoacetyl-CoA:acetat/butyrat:CoA-Transferase aus: <i>Clostridium acetobutylicum</i>	32

Aus den N-terminalen Sequenzen der Untereinheiten A und B der 3-Oxoadipat:Succinyl-CoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13 wurden zwei Oligonukleotide (SK-A/SK-B; Tab. 2.3) abgeleitet. Aufgrund der bei Harwood et al. (1996) beschriebenen Anordnung der *pca* und *cat* Gene in verschiedenen Bakterien und der bekannten Molekulargewichte der Untereinheiten A und B in *Pseudomonas* sp. B13 wurde für den Einsatz der Primerkombination SK-A/SK-B in einer PCR ein Amplifikat in der Größenordnung von etwa 800 bp erwartet.

Bei einer Annealingtemperatur von 57°C konnte aus genomischer DNA von *Pseudomonas* sp. B13 ein Amplifikat von 800 bp erhalten werden. Dieses Amplifikat wurde in pUC18/*Sma*I kloniert und sequenziert (pKSC1; Tab. 2.2).

Die Sequenzanalyse zeigte jedoch, daß es sich bei dem PCR-Produkt nicht um ein Amplifikat der Untereinheit A der 3-Oxoadipat:Succinyl-CoA-Transferase handelte. Das Produkt wies auf beiden Seiten den Primer SK-A auf.

Im Vergleich dieser Sequenz mit dem Programm BLASTX gegen die Datenbank zeigte der Anfang der Sequenz große Ähnlichkeit zu der Proteinsequenz der

β -Ketoacyl-CoA-Thiolase aus *Acinetobacter calcoaceticus* (CatF und PcaF) und *Pseudomonas putida* (PcaF) und das Ende der Sequenz zeigte Ähnlichkeit zu der β -Ketoacyl-Enol-Lacton-Hydrolase aus *Bradyrhizobium japonicum* (PcaD; Lorite et al., 1997)

Da die Enzyme β -Ketoacyl-CoA-Thiolase und β -Ketoacyl-Succinyl-CoA-Transferase im β -Ketoacylweg eine Abbausequenz bilden, wurde davon ausgegangen, daß ihre Gene als Gencluster angeordnet sind. Das oben beschriebene PCR-Amplifikat wurde deshalb als Gensonde eingesetzt.

3.5 Versuche zur Identifikation eines Genclusters für die Gene des β -Ketoacylweges in *Pseudomonas* sp. B13

Das unter 3.4 beschriebene PCR-Amplifikat aus *Pseudomonas* sp. B13 wurde in einem Hybridisierungsexperiment als Sonde gegen genomische DNA aus *Pseudomonas* sp. B13 eingesetzt, welche mit verschiedenen Restriktionsenzymen hydrolisiert wurde. Aus der DNA, welche mit den Restriktionsenzymen *Pst*I, *Hinc*II und *Eco*RI hydrolisiert wurde, konnten Hybridisierungssignale zwischen 2 kb und 4 kb erhalten werden (Abb. 3.17).

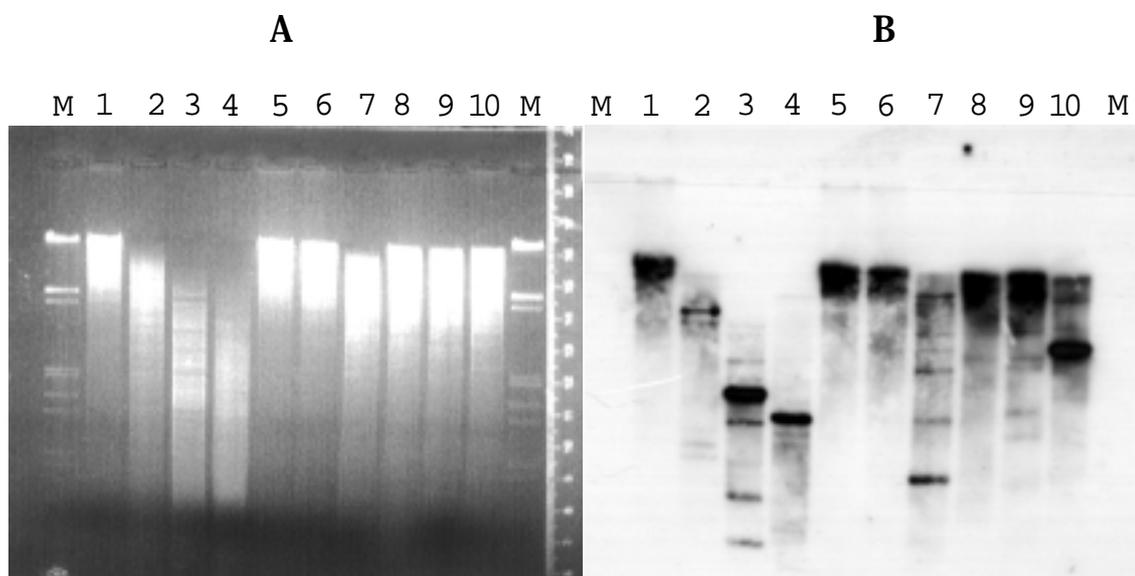


Abb. 3.17 Gelbild einer Agarosegelelektrophorese (A) von DNA aus *Pseudomonas* sp. B13 und Autoradiogramm (B) einer radioaktiv durchgeführten Hybridisierung mit PCR-Amplifikat aus Kap. 3.4 als Sonde

DNA wurde hydrolisiert mit: Spur 1: *Hind*III; Spur 2: *Sph*I; Spur 3: *Pst*I; Spur 4: *Hinc*II; Spur 5: *Xba*I; Spur 6: *Bam*HI; Spur 7: *Sma*I; Spur 8: *Kpn*I; Spur 9: *Sst*I; Spur 10: *Eco*RI; Spuren M: Standardlängenmarker (*Eco*RI/*Hind*III-Lysat des λ -Phagen)

DNA aus *Pseudomonas* sp. B13 wurde erneut mit den Restriktionsenzymen *Pst*I, *Hinc*II und *Eco*RI hydrolisiert und mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die Bereiche, in denen Hybridisierungssignale aufgetreten waren, wurden aus dem Gel geschnitten und in kleinere Teile unterteilt, um die DNA-Menge pro Gelstück zu reduzieren. Die DNA wurde mit JetSorb (Kap. 2.17.3) aus dem Gel eluiert und 3 μ l aus jeder Elution wurden zur Denaturierung der DNA mit dem gleichen Volumenanteil NaOH (0,4 M) vermischt. Die denaturierte DNA wurde auf eine Nylonmembran pipettiert und erneut einer Hybridisierung mit dem PCR-Amplifikat unterzogen. Mit DNA aus allen drei Ansätzen wurden Hybridisierungssignale erhalten. Die DNA aus dem Bereich der Hybridisierungssignale wurde in den mit den entsprechenden Restriktionsenzymen hydrolisierten Vektor pUC18 ligiert und nach Transformation konnten ca. 450 Transformanten erhalten werden. Diese Transformanten wurden für ein schnelleres Screening auf eine Nylonmembran gebロットet (Kap. 2.13.2) und erneut einer Hybridisierung mit dem PCR-Amplifikat unterzogen. Es konnte bei einem Transformanten ein positives Signal erhalten werden. Es handelte sich dabei um ein rekombinantes Plasmid mit einem 2,3 kb großen *Pst*I-Fragment aus *Pseudomonas* sp. B13 (pKSC2, Tab. 2.2). Dieses rekombinante Plasmid wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Hinc*II, *Eco*RI und *Sma*I subkloniert (pKSC2-1 bis pKSC2-7; Tab. 2.2) und vollständig sequenziert.

Die Sequenzanalyse deutet darauf hin, daß das isolierte *Pst*I-Fragment aus *Pseudomonas* sp. B13 das vollständige Gen für die Kodierung der β -Ketoacyl-CoA-Thiolase enthält, sowie Teile der Gene für die Kodierung der β -Ketoacyl-Succinyl-CoA-Transferase und der β -Ketoacyl-Enol-Lacton-Hydrolase. Den genauen Aufbau des Genclusters zeigt Abbildung 3.18. Die Leserahmen der möglichen β -Ketoacyl-Succinyl-CoA-Transferase und der β -Ketoacyl-CoA-Thiolase überschneiden sich in 4 bp, während sich zwischen den vermutlichen Genen für die Kodierung der β -Ketoacyl-CoA-Thiolase und der β -Ketoacyl-Enol-Lacton-Hydrolase ein nichtkodierender Bereich von 155 bp befindet.

Einen schematischen Aufbau des 2,3 kb großen *Pst*I-Fragmentes, sowie Aminosäurevergleiche der daraus abgeleiteten Proteinsequenz zu bekannten Proteinen zeigt Abbildung 3.19. Die Aminosäurevergleiche zeigen die in Tabelle 3.4 aufgelisteten prozentualen Ähnlichkeiten. Mit der Glutaconat-CoA-Transferase aus *Acidaminococcus fermentans* liegt eine 36%ige Ähnlichkeit in den letzten 165 Aminosäuren dieses Enzyms zu der abgeleiteten Aminosäuresequenz zu Beginn des 2,3 kb großen Fragmentes aus *Pseudomonas* sp. B13 vor. Die Ähnlichkeiten zu den β -Ketoacyl-CoA-Thiolasen aus *Pseudomonas putida* und *Acinetobacter calcoaceticus* liegen über die gesamten 400 Aminosäuren dieser Enzyme zwischen 66% und 83% zu dem kompletten Leserahmen in der Mitte des 2,3 kb großen Fragmentes aus *Pseudomonas* sp. B13. Mit den ersten 144 Aminosäuren der β -Ketoacyl-Enol-Lacton-Hydrolase aus *Bradyrhizobium japonicum* liegt eine 52%ige Ähnlichkeit zu dem letzten Proteinabschnitt des 2,3 kb großen Fragmentes aus *Pseudomonas* sp. B13 vor.

GAC GTC GGT TTC CTG GGC GCG GCC CAG GTC GAC CGC TTC GGC AAC ATC AAC ACC ACC GTC ATC GGC GAC TAC AAC AAG CCG AAA GTG CGC CTG CCC GGC GCC GGC GGC GCC CCG
D V G F L G A A Q V D R F G N I N T T V I G D Y N K P K V R L P G A G G A P
GAG ATC GCC GGT TCC GCC AAG GAA GTG CTG ATC ATC CTC AAG CAG TCG CAC CGT ACC TTC GTC GAC AAG CTG GCC TTC ATC ACC TCG GTC GGC CAC GGC GAA GGC GGC GAC CAC
E I A G S A K E V L I I L K Q S H R T F V D K L A F I T S V G H G E G G D H
CGC AAG CAG CTC GGC CTG CCG GGC AAG GGT CCG GTG GCG ATC ATC ACC GAC CTC TGC ATC ATG GAG CCG GAA GCC GGC AGC AAC GAA TTC ATC GTA CAC TTC GCT GCA CCC GGG
R K Q C G L P G K G P V A I I T D L C I M E P E A G S N E F I V H F A A P G
TGT AAC CQC GAG CAA GTG ATC GAG AAC ACC GCG TGG GCG ATC CGC TTC GCC GAG CAG GTC AAG GAA ACC GCC GCG CCC ACC GAG GTC GAG CTG GAA GCC CTG CGC GCC CTG GAA
C N R E Q V I E N T G W A I R F A E Q V K E T A A P T E V E L E A L R A L E
GCC CGC ACC GCG GCC GCC CAC GGC CAG CAA GGG GGT GAG GAA TGA
A R T A A A H G Q Q G G E E * Stop pcaJ
ATG AGC CGC GAA GTC TAC ATC TGC GAC GCC GTG CGC ACG CCG ATC GGC CGC TTC GGC GGT TCG CTC GCG GCG
Start pcaF M S R E V Y I C D A V R T P I G R F G G S L A A
GTG CGC GCC GAC GAC CTG GCC GCC GTG CCG GTC AAG GCC CTG GTC GAG CGC AAC CCG CAG GTC GAC TGG AGC CAG CTG GAC GAG GTC TAC CTC GGC TGC GCC AAC CAG GCC GGC
V R A D D L A A V P V K A L V E R N P Q V D W S Q L D E V Y L G C A N Q A G
GAA GAC AAC CGC AAC GTC GCG CGC ATG GCG CTG CTG CTG GCC GGC CTG CCG GAC AGC GTG CCC GGC GTG ACC CTG AAC CGC CTC TGT GCC TCG GGC ATG GAC GCC GTG GGC ACG
E D N R N V A R M A L L L A G L P D S V T G V T L N R L C A S G M D A V G T
GCC TTC CGC GCC ATC GCC AGC GGC GAG GCC GAG CTG GTC ATC GCC GCG GGC GTC GAG TCG ATG TCC CGC GCG CCT NAT GTC ATG GGC AAG GGC GAC AGC GCC TTC CGT GGC
A F R A I A S G E A E L V I A G G V E S M S R A P Y V M G K A D S A F G R G
CAG AAG ATC GAG GAC ACC ACC ATC GGC TGG CGC TTC ATC AAC CCG CTG ATG AAG GCC CAG TAC GGC GTG GAC GCC ATG CCG GAA ACC GCC GAC AAC GTC GCC GAC GAC TAC AAG
Q K I E D T T I G W R F I N P L M K A Q Y G V D A M P E T A D N V A D D Y K
GTC AGC CGC GCC GAC CAG GAC GCC TTC GCC CTG CGC AGC CAG CAG CTG GCC GGG CGC GCC CAG GCC GCC GGC TAC TTC GCC GAG GAA ATC GTC CCG GTG GTG ATC AAG GGC AAG
V S R A D Q D A F A L R S Q Q L A G R A Q A A G Y F A E E I V P V V I K G K
AAG GGT GAA ACC GTG GTG GAT GCC GAC GAG CAT CTG CGC CCG GAC ACC ACC CTC GAA GCC CTG GCC AAA CTC AAA CCG GTC GAC GGC CCG GAC AAG ACG GTC ACC GCC GGC AAC
K G E T V V D A D E H L R P D T T L E A L A K L K P V D G P D K T V T A G N
GCC TCG GGT GTA AAC GAC GGC TCG GTG GCG CTG ATC CTG GCC TCC GCC GAA GCG GTG AAA AAG CAC GGC CTG AAA GCT CGC GCG AAA GTG CTG GGC ATG GCC AGC GCC GGC GTC
A S G V N D G S V A L I L A S A E A V K K H G L K A R A K V L G M A S A G V
GCG CCG CGC GTG ATG GGC ATC GGC CCG GTG CCG GCC GTG GCG AAG CTG CTG GAA CGC CTG AAC CTG TCG GTC GCC GAC TTC GAC GTC ATC GAA CTG AAC GAA GCC TTC GCT GCC
A P R V M G I G P V P A V R K L L E R L N L S V A D F D V I E L N E A F A A
CAG GGC CTG GCC GTG ACC CGC GAA CTG GGT ATC GCC GAC GAC GAC GCC CGG GTG AAC CCG AAC GGC GGC GCC ATC GCC CTC GGC CAC CCG CTG GGC GCC AGC GGC GCA CGC CTG
Q G L A V T R E L G I A D D D A R V N P N G G A I A L G H P L G A S G A R L
GTC CTG ACC GCC GTG CAC CAG TTG GAG AAG AGC GGC GGC CAG CGC GGC CTG TGC ACC ATG TGC GTG GGC GTG GGG CAG GGC GTG GCC CTG GCT GTC GAG CGC GTT TGAGGCTGTCG
V L T A V H Q L E K S G G Q R G L C T M C V G V G Q G V A L A V E R V * Stop pcaF
AGCGCGTTTGAGGCTGTTTGCTGGGTTCCGGTTCGGAATGAGCCCGCATATTGAATGTGTCATCCCGCGAACCGGGGACCCAGAAAAAGCAATATCCGGCGCCCGCTTCGAGCGGGCGCCGTTTCATGATCAACGGGAGTTCCCG ATG
Start pcaD M
CCT ACC GTC AAA CTC GCC GAC GGC GAA CTG AAC TAC CTC CTC GAA GGC CCC GCC GGC GCG CCT GTG CTG GTG CTG TCC AAC TCG CTG GGC ACC GAC CTG CAT ATG TGG GAC GCG
P T V K L A D G E L N Y L L E G P A G A P V L V L S N S L G T D L H M W D A
CAG GTT CCG GCC TTC ACC CAA CAC TTC CAG GTG CTG CGC TAC GAC ACC CGC GGC CAC GGT GCC TCG CTG GTG ACC GAA GGC CCC TAC AGC ATC GAG CAG AAT GGT CGC GAC GTG
Q V P A F T Q H F Q V L R Y D T R G H G A S L V T E G P Y S I E Q N G R D V
CTG GCC TTG CTG GAC GCG CTG GAT ATC GCC AAG GCG AGC TTC TGC GGC CTG TCC ATG GGC GGC CTG ATC GGC CAG TGG CTG GCG ATC AAC GCG CCC GAG CGC ATC GAG CGT CTG
L A L L D A L D I A K A S F C G L S M G G L I G Q W L A I N A P E R I E R L
GTG CTG TGC AAC ACC GCC GCC AAG ATC GGC ACC CCG GAG GTC TGG AAC CCG CGA ATC GAC ACC GTG CTG GCC GGC GGT CTG CAG
V L C N T A A K I G T P E V W N P R I D T V L A G G L Q

Abb. 3.18: DNA-Sequenz und abgeleitete Proteinsequenz des 2,3 kb großen *PstI*-Fragmentes aus *Pseudomonas* sp. B13

Die Sequenz des zur Hybridisierung eingesetzten PCR-Amplifikat ist unterstrichen. Sternchen zeigen Stop-Codons an.

Tab. 3.4: Prozentuale Ähnlichkeiten der in Abb. 3.19 dargestellten Aminosäurevergleiche

	% Identität zur 3-Oxoadipat:Succinyl-CoA-Transferase aus <i>Pseudomonas</i> sp. B13
Glutaconat-CoA-Transferase aus: <i>Acidaminococcus fermentans</i>	36
	% Identität zur β-Ketoacyl-CoA-Thiolase aus <i>Pseudomonas</i> sp. B13
β -Ketoacyl-CoA-Thiolase aus: <i>Pseudomonas putida</i> (PcaF)	83
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (PcaF)	66
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (CatF)	66
	% Identität zur β-Ketoacyl-CoA-Enol-Lacton-Hydrolase aus <i>Pseudomonas</i> sp. B13
β -Ketoacyl-CoA-Enol-Lacton-Hydrolase aus: <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (PcaD)	52

4 Diskussion

4.1 Nachweisverfahren für methylo trope Bakterien

4.1.1 Entwicklung stammspezifischer Gensonden und ihre Anwendungsmöglichkeiten

Die geschichtliche Entwicklung der Untersuchungen am genetischen Material der Bakteriengattung *Hyphomicrobium* läßt sich in zwei Abschnitte unterteilen.

Ende der 70er, Anfang der 80er Jahre wurden zahlreiche Hyphomicrobien-Stämme anhand ihres GC-Gehaltes der DNA, der Nukleotidverteilung in der DNA, ihrer Genomgröße sowie durch rRNA Cistron-Vergleiche und durch Hybridisierungsexperimente in verschiedenen Gruppen eingeteilt (Moore, 1977; Gebers et al., 1985; Kölbel-Bölke et al., 1985; Gebers et al., 1986; Roggentini et al., 1989). Phylogenetische Stammbäume wurden Ende der 80er Jahre durch Sequenzierung der 5S RNA, durch Katalogisierung der 16S rRNA und durch vollständige Sequenzierung der 16S rRNA aus *Hyphomicrobium vulgare* erstellt (Stackebrandt et al., 1988; Bulygina et al., 1990; Nikitin et al., 1990). All diese Untersuchungen dienten zur besseren Einteilung der Gattung *Hyphomicrobium* in den phylogenetischen Stammbaum der Bakterien.

In den 90er Jahren wurden erstmals speziesspezifische Genproben zum Nachweis von methylo trophen Bakterien entwickelt.

Über 12 Monate lang untersuchten Holm et al. (1996) die Zusammensetzung und die Veränderungen einer *Hyphomicrobium*-Population in einer Kläranlage durch die most-probable-number-Methode (MPN). Sie unterschieden 6 morphologische Gruppen und teilten mit Hilfe der dot-blot-Hybridisierung 671 Isolate in 30 Hybridisierungsgruppen ein.

Fesefeldt et al. (1997a) nutzten als Hybridisierungssonde ein mit Hilfe der PCR-Technik amplifiziertes Fragment der α -Untereinheit der Methanol-Dehydrogenase (*mx*aF) zum Nachweis von Hyphomicrobien-Spezies. In Hybridisierungsexperimenten konnten sie zeigen, daß zwischen verschiedenen Hyphomicrobien ein großer Sequenzunterschied innerhalb dieses Gens besteht. Mit Hilfe der denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese konnten sie einzelne Hybridisierungsgruppen unterscheiden. Es gelang mit dieser Methode jedoch nicht, verschiedene Umweltproben zu analysieren oder stammspezifische Nachweise zu führen. Dafür wäre eine Sequenzanalyse des *mx*aF Gens erforderlich gewesen.

Gliesche et al. (1997) und Fesefeldt et al. (1997b) entwickelten durch den Einsatz der inversen PCR eine Gensonde aus einer Tn5-132 Insertionsmutante von *Hyphomicrobium* sp. B 69, welche einen Defekt in der Methanoxidation besaß. Mit Hilfe dieser Genprobe, welche spezifisch für *Hyphomicrobium* spp. der sogenannten Hybridisierungsgruppe 27 war, soll nun die Ökologie der denitrifizierenden Population von Hyphomicrobien in Erde und Schlamm beobachtet werden.

Stammspezifische Gensonden lagen zu Beginn dieser Arbeit für einen Vertreter der Gattung *Hyphomicrobium* noch nicht vor. Zur Entwicklung einer stammspezifischen Gensonde für *Hyphomicrobium* EG mußte daher von verschiedenen Hyphomicrobien Stämmen die 16 S rDNA analysiert werden.

Die in dieser Arbeit analysierten Sequenzen der 16S rDNA verschiedener Hyphomicrobienstämme können jedoch nicht nur, wie in der vorliegenden Arbeit geschehen, zur Entwicklung von stammspezifischen Gensonden für Hyphomicrobien genutzt werden, sondern auch zur Erstellung weiterer phylogenetischer Einordnungen dienen. Abb.4.1 zeigt einen solchen phylogenetischen Stammbaum. Zur Erstellung dieses Stammbaums mit Hilfe der Programme CLUSTAL V und PAUP 3.1 wurden die in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen der 16S rDNA (Kap. 3.1.2) der Stämme *Hyphomicrobium* EG, *Hyphomicrobium* sp. 1564, *Hyphomicrobium* sp. 1565 und *Hyphomicrobium* sp. 1566, sowie die bereits beschriebenen 16S rDNA-Sequenzen aus *Hyphomicrobium vulgare* MC-750 (Stackebrandt et al. (1988)) und dem *Hyphomicrobium*-ähnlichen Bakterium US-353 (Becker, 1994) herangezogen.

Desweiteren wurden in den Stammbaum noch die vier typischen Vertreter der vier Untereinheiten der Purpurbakterien (s. Abb. 3.3 auf Seite 43) aufgenommen.

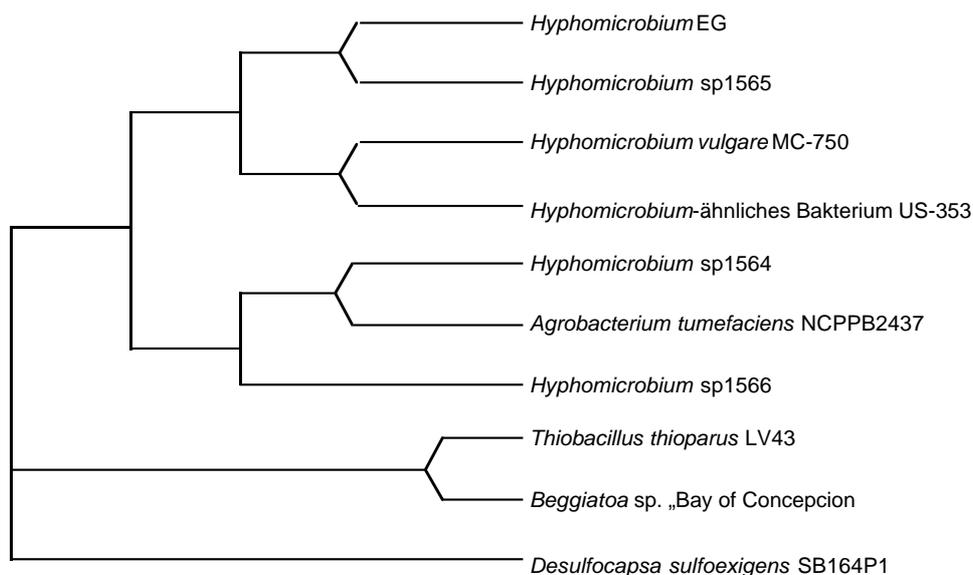


Abb. 4.1: Phylogenetischer Stammbaum abgeleitet aus den 16S rDNA-Sequenzen aus Abbildung 3.3

Stackebrandt et al. (1988) stellten bei ihrer phylogenetischen Einordnung der knospenden und/oder prosthekativen Bakterien die Frage, ob Pedomicrobien eine eigene Gattung beanspruchen können, da sie in einem 16S rRNA Dendrogramm in den Zweigen der Hyphomicrobien verschmolzen waren. Diese Fragestellung griffen Cox et al. (1997) bei ihren phylogenetischen und taxonomischen Untersuchungen an Pedomicrobien Stämmen wieder auf. Sie ermittelten von 6 Pedomicrobien Stämmen die Sequenz der 16 S rDNA und erstellten daraus phylogenetische Stammbäume. Es zeigte sich eine Abgrenzung der Pedomicrobien von den anderen Vertretern der alpha-Untereinheit der Purpurbakterien. Da ihnen aus der Gattung *Hyphomicrobium* jedoch nur die Sequenz von *Hyphomicrobium vulgare* zur Verfügung stand, weisen die Autoren darauf hin, daß erst mit weiteren Daten von Hyphomicrobien eine klare Aussage bezüglich der Eigenständigkeit der Gattung *Pedomicrobium* getroffen werden kann.

Abb. 4.2 zeigt einen Stammbaum mit den Stämmen aus Abb. 4.1 erweitert um die von Cox et al. ermittelten Sequenzen der Pedomicrobien und weiterer Vertreter der Untereinheiten der Purpurbakterien.

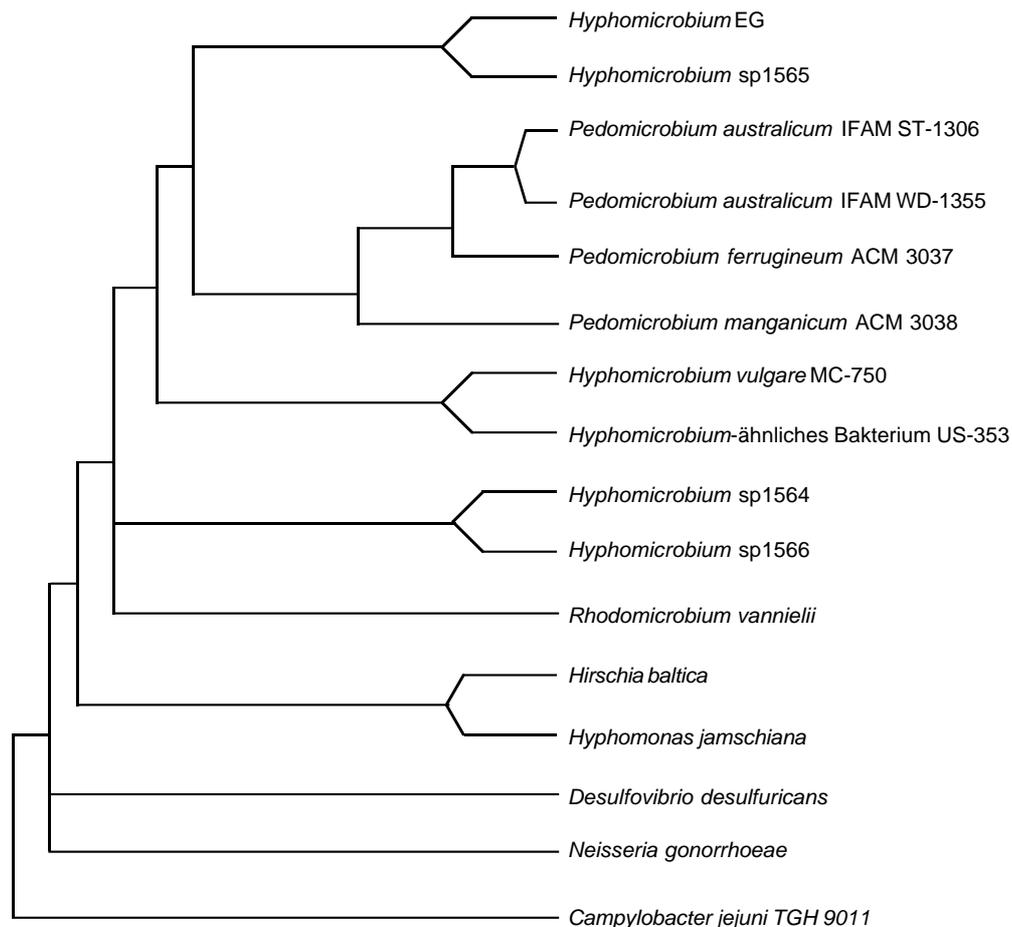


Abb. 4.2: Phylogenetischer Stammbaum abgeleitet aus den 16S rDNA-Sequenzen aus verschiedenen Hyphomicrobien- und Pedomicrobienstämmen, sowie weiteren Vertretern der Untereinheiten der Purpurbakterien

In diesem Stammbaum ist zwar ein Cluster der Pedomicrobien zu erkennen, es liegt jedoch eingebettet zwischen den Hyphomicrobien Stämmen. Insgesamt ist in diesem Stammbaum keine klare Abgrenzung einzelner Gattungen der α -Untereinheit der Purpurbakterien zu erkennen.

4.1.2 Einsatz stammspezifischer Gensonden in verschiedenen Wasserproben und ihre Nachweisgrenzen

Die in dieser Arbeit entwickelten stammspezifischen Gensonden für den Stamm *Hyphomicrobium* EG wurden zum Nachweis in verschiedenen Wasserproben nach der sogenannten „nested PCR“ (Ludwig et al., 1996) eingesetzt. Bei dieser Methode wird erstmal ein größerer Genabschnitt amplifiziert. Dabei kann es sich durchaus um einen konservativen Bereich handeln, der in vielen Bakterien verbreitet ist. In der vorliegenden Arbeit war dies die beinahe vollständige 16S rDNA, amplifiziert mit den Primern pA und pH*. Durch die Amplifikation eines solchen Genbereichs kann gezeigt werden, daß generell eine PCR-Amplifikation aus dem aufbereiteten Umweltmedium möglich ist. Der amplifizierte Genbereich wird dann als Target zur stammspezifischen Amplifizierung verwendet. Zum Nachweis von *Hyphomicrobium* EG wurde die beinahe vollständig amplifizierte 16S rDNA mit den Primern pH* und KKC22 umgesetzt. Der Vorteil besteht in der hohen Spezifität dieser PCR. Kapperud et al. (1993) konnten zeigen, daß durch diese Methode die nicht-spezifischen Amplifikationen stark zurückgingen. Dies ist ein wichtiges Kriterium für den stammspezifischen Nachweis von Bakterien, besonders aus Umweltmedien, da es hier eine große Konzentration an nicht bekannten Bakterienstämmen gibt. Die Nachweisgrenze, der nach dieser Methode durchgeführten stammspezifischen Gensondenanalytik für den Stamm *Hyphomicrobium* EG lag bei 100 Keimen pro ml Wasserprobe. Dies liegt im Bereich der in Tabelle 1.2 angegebenen Nachweisgrenze für die PCR-Methode. Der natürliche Hintergrund, d.h. die Gesamtkeimzahl in den Wasserproben ermittelt durch Bestimmung der Kolonienzahl auf NB-Medium, lag in der vorliegenden Arbeit zwischen 10^3 – 10^6 Keime/ml Probe. Diese Varianz in der Gesamtkeimzahl hatte jedoch keinen Einfluß auf die Nachweisgrenze für den Stamm *Hyphomicrobium* EG in den einzelnen Wasserproben. Der Stamm konnte immer dann nachgewiesen werden, wenn eine Konzentration von 100 Keimen/ml gegeben war.

Der Stamm konnte jedoch nicht in Wasserproben nachgewiesen werden, die der Umwelt entnommen worden waren. Ein Nachweis gelang nur dann, wenn die Wasserprobe mit einer definierten Menge an *Hyphomicrobium* EG versetzt wurde. Dies zeigt, daß der Stamm *Hyphomicrobium* EG in den untersuchten Wasserproben nicht weitverbreitet ist. Eine Anreicherung des Stammes zum biologischen Abbau von DMSO aus Abwässern wäre wünschenswert.

Durch diese Anreicherung könnte ein unspezifischer Abbau von DMSO verhindert werden. Der Verbleib des Stammes nach erfolgter Anreicherung in der Wasserprobe könnte durch die in dieser Arbeit entwickelten Gensondenanalytik verfolgt werden.

4.2 Gensondenanalytik für den Nachweis einer Stoffwechseleigenschaft

4.2.1. Nachweis des DMSO-Abbaus unter aeroben Bedingungen

Um die Abbauleistung für DMSO in einem Abwasser unter aeroben Bedingungen analysieren zu können, mußte in der vorliegenden Arbeit ein Gen für ein typisches Enzym dieses Abbauweges herangezogen werden. Die Methylmercaptan-Oxidase wurde schon von Suylen et al. (1987) als ein Schlüsselenzym des aeroben Abbaus von DMSO durch *Hyphomicrobium* EG beschrieben.

Über die Anreicherung des Enzyms in der hier vorliegenden Arbeit und die Ermittlung von Teilsequenzen der Aminosäuresequenz konnte das Enzym fast vollständig sequenziert werden. Aus dieser Sequenz konnten dann Gensonden abgeleitet werden, die zum Nachweis des aeroben Abbaus von DMSO durch *Hyphomicrobium* EG eingesetzt werden konnten.

Kloos et al. (1995) konnten durch eine ähnliche Vorgehensweise die Denitrifikation und Stickstofffixierung durch Hyphomicrobien in einer Kläranlage nachweisen. Sie zogen dafür allerdings bekannte Sequenzen von Enzymen dieser Stoffwechseleigenschaften aus anderen Bakterienstämmen heran. Aus den Sequenzen der Gene der Nitratreduktase aus *E. coli* K12 (*narG*), der Nitritreduktase aus *Pseudomonas aeruginosa* DSM 6195 (*nirS*) und aus *Alcaligenes xylosoxidans* NCIMB 11015 (*nirK*), der Nitrogenase aus *Azospirillum brasilense* Sp7 (*nifH*), der N₂O-Reduktase aus *Pseudomonas stutzeri* ZoBell (*nosZ*) und der Ammoniummonooxygenase aus *Nitrosomonas europaea* (*amoA*) wurden Oligonukleotide abgeleitet, die in verschiedenen PCRs zur Amplifizierung von größeren Fragmenten aus diesen Stämmen verwendet wurden. Diese Gensonden wurden in Hybridisierungsexperimenten zum Nachweis der Stoffwechseleigenschaften der Stickstofffixierung und der Denitrifikation in verschiedenen Hyphomicrobienstämmen eingesetzt.

Die in dieser Arbeit entwickelte Gensonde für den vollständigen Abbau von DMSO unter aeroben Bedingungen durch *Hyphomicrobium* EG und das oben geschilderte Beispiel von Kloos et al. (1995) zeigen, daß durch eine gezielte Analyse der für eine Mineralisation von Schadstoffen wichtigsten Enzyme, der Weg des Abbaus in einem Umweltmedium exakt bestimmt werden kann. Die Abnahme der DMSO-Konzentration aus einem Ab-

wasser ist nicht ausreichend, um von einer Mineralisation von DMSO sprechen zu können. Um genaue Aussagen über die Art der Mineralisation treffen zu können, müssen die Abbaupotentiale im Abwasser überprüft werden. Im Fall des DMSO-Abbaus kann der Nachweis der Methylmercaptan-Oxidase aus *Hyphomicrobium* EG durch die hier entwickelte Gensonde in einem Abwasser ein Beweis für das Vorhandensein eines aeroben Abbaupotentials und damit eine vollständige Mineralisation von DMSO sein.

Weiterhin ist aber auch wichtig, gleichzeitig das anaerobe Abbaupotential für diesen Stoff in einem Abwasser zu bestimmen.

4.2.2 Nachweis des DMSO-Abbaus unter anaeroben Bedingungen

Die DMSO-Reduktase aus *Hyphomicrobium* EG wurde von Hatton et al. (1994) als periplasmatisches Enzym identifiziert. Die Autoren erhielten Crossreaktionen eines Polypeptids mit einem Molekulargewicht von ca. 80.000 Dalton aus der periplasmatischen Fraktion von Zellen von *Hyphomicrobium* EG mit Antikörpern der DMSO-Reduktase aus *Rhodobacter capsulatus*. Dieses Enzym stellt ebenso wie das aus *Hyphomicrobium* EG ein periplasmatisches Enzym dar mit der Größe von 82.000 Dalton (McEwan et al., 1991). Im Gegensatz dazu existiert noch die DMSO-Reduktase aus *Escherichia coli*. Dieses Enzym stellt ein membrangebundenes Enzym dar mit dem katalytischen Zentrum im Cytoplasma (Bilous et al., 1988). Die Enzyme aus *Escherichia coli* und *Rhodobacter capsulatus* unterscheiden sich jedoch nicht in ihrer Funktion. Beide Enzyme werden nur unter Sauerstoff-limitierten Bedingungen exprimiert und nutzen DMSO als terminalen Elektronenakzeptor bei der anaeroben Atmung. Neben DMSO werden von diesen Enzymen auch verschiedene N-Oxide wie z. B. Trimethylamin-N-Oxid als Substrate umgesetzt. Das bei der Verwendung von DMSO als terminalen Elektronenakzeptor entstehende DMS kann von diesen Bakterien nicht weiter umgesetzt werden und wird ausgeschieden. Die Problematik für die Umwelt durch das ausgeschiedene DMS beschreibt der Zeitungsartikel in Abb. 1.1.

Wie aus den Experimenten aus Kapitel 3.3 zu erkennen ist, unterscheiden sich die Enzyme aus *Rhodobacter capsulatus* und *Escherichia coli* zwar durch ihre Lage in der Zelle, da sie sich jedoch in ihrer Funktionalität sehr ähneln, sind auch ihre Aminosäuresequenzen sehr ähnlich (Abb. 3.14). Dies trifft vermutlich jedoch nicht für die DMSO-Reduktase aus *Hyphomicrobium* EG zu. Dieses Enzym ist zwar wie die DMSO-Reduktase aus *Rhodobacter capsulatus* im Periplasma lokalisiert, es scheint jedoch ein großer Sequenzunterschied zwischen den DMSO-Reduktasen der anaeroben Atmung und der aeroben Atmung zu bestehen. Es gelang nicht, aus den bekannten Sequenzen von DMSO-Reduktasen aus der anaeroben Atmung, Oligonukleotide für die Amplifizierung von Genbereichen aus der DMSO-Reduktase von *Hyphomicrobium* EG abzuleiten. Die eingesetzten Oligonukleotide

zeigten jedoch, wie weit verbreitet die DMSO-Reduktasen der anaeroben Atmung sind. Sie konnten sowohl im Abwasser der Kläranlage, als auch in Industrieabwasser und dem Abwasser der Universität nachgewiesen werden. Lediglich im sauberen Teichwasser konnte keine DMSO-Reduktase-Aktivität nachgewiesen werden. Diese Tatsache macht deutlich, wie problematisch eine als ansonsten harmlos angesehene Substanz wie DMSO in einem Ökosystem werden kann. Durch die unspezifische Verwertung dieser Substanz durch weitverbreitete Bakterien wie z. B. *Escherichia coli* können weitaus giftigere Substanzen in die Umwelt gelangen. Es ist daher falsch, wenn bei der Freigabe zum Einlassen einer Substanz wie DMSO in das Abwasser, von behördlicher Seite nur die Giftigkeit dieser Substanz betrachtet wird, das Zusammenspiel des gesamten Ökosystem jedoch völlig ausser Acht gelassen wird. Das Ergebnis ist in diesem Beispiel ein Ausscheiden einer giftigen Substanz in die Atmosphäre und eine starke Geruchsbelästigung der Bevölkerung. Der Abtransport des Abwassers direkt in die Kläranlage macht auch keinen Sinn, da auch hier nachweislich eine Vielzahl an Mikroorganismen vorhanden ist, die in anaeroben Prozessen DMSO zu DMS umsetzen. Die einzig sinnvolle Lösung der Beseitigung von DMSO aus Industrieabwasser scheint der biologische Abbau durch Bakterien, wie z.B. *Hyphomicrobium* EG zu sein. Daß dies möglich ist, wurde durch verschiedene Experimente in unserer Arbeitsgruppe gezeigt (Kassel, 1993).

Das hier beschriebene Beispiel macht deutlich, daß durch die Entwicklung von Gensonden ein schnelles Nachweissystem entwickelt werden kann, um die Zusammenhänge beim Abbau einer Substanz in einem Ökosystem beobachten zu können. Zeitaufwendig ist die Entwicklung der Gensonden, ihr Einsatz ermöglicht später jedoch ein schnelles Analyseverfahren. Es ist daher notwendig, viele Gensonden zu entwickeln, um sie später in vielleicht heute noch nicht bekannten Problematiken einsetzen zu können. Die Entwicklung von stammspezifischen Gensonden hat in den letzten Jahren durch die immer weiter fortschreitenden Analysen von 16S rDNA-Sequenzen große Fortschritte gemacht. Durch die Sequenzierung von Schlüsselenzymen von Abbauwegen, können auch für den Abbau eines Xenobiotiums spezifische Gensonden entwickelt werden.

4.3 Die Gene des β -Ketoacidweges in *Pseudomonas* sp. B13

Molekulare Untersuchungen des β -Ketoacidweges, durchgeführt an den Bakterienstämmen *Pseudomonas putida* (Frazee et al., 1993; Harwood et al., 1994; Houghton et al. 1995; Parales et al., 1992; Williams et al., 1992), *Acinetobacter calcoaceticus* (Elsemore et al., 1994 und 1995; Hartnett et al., 1990 und 1994; Kowalchuk et al., 1994; Neidle et al. 1988, 1991 und 1992; Shanley et al., 1994) und *Agrobacterium tumefaciens* (Parke, 1995) haben gezeigt, daß sich molekulare Unterschiede, wie sie sich z.B. in unterschiedlichen Induktionsmustern zeigen, durch unterschiedliche Genorganisation und transkriptionaler Regulation bedingt sind. Wie schon in Abb. 1.5 gezeigt, liegen die *pca*- und *cat*-Gene zwar in den Mikroorganismen weitestgehend in Clustern vor, die Anordnung der einzelnen Gene variiert jedoch stark von Bakterium zu Bakterium.

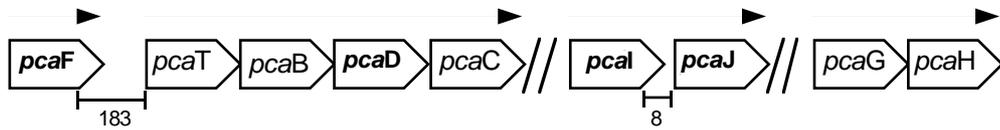
Abb. 4.3 zeigt nochmals besonders die unterschiedlichen Anordnungen der Gene *pcaD*, *pcaF* und *pcaI* sowie der Gene *catD*, *catF* und *catI* in den Bakterienstämmen *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter calcoaceticus* und *Agrobacterium tumefaciens*. Auch bei diesen 3 Genen liegen in allen drei Bakterienstämmen unterschiedliche Muster vor. In *Pseudomonas putida* liegen diese drei Gene jeweils auf getrennten transkriptionalen Einheiten. Während die Gene *pcaF* und *pcaD* noch in Nachbarschaft zueinander liegen, ist der Abstand zu den Genen *pcaI* nicht bekannt. In *Acinetobacter calcoaceticus* liegen sowohl die *cat*-Gene als auch die *pca*-Gene für die Gene *pcaD*, *pcaF* und *pcaI* auf einer transkriptionalen Einheit. Die Reihenfolge der Gene innerhalb dieser transkriptionalen Einheit unterscheiden sich jedoch auch in diesem Bakterium. In dem Stamm *Agrobacterium tumefaciens* sind bislang nur die Gene *pcaI* und *pcaD* untersucht. Diese Gene liegen auf unterschiedlichen transkriptionalen Einheiten, getrennt durch die *pob*-Gene. *pobA* ist das Gen für die 4-Hydroxybenzoat-Hydroxylase und *pobR* ist ein Regulatorgen.

Das in dieser Arbeit isolierte 2,3 kb große *PstI*-Fragment aus *Pseudomonas* sp. B13 zeigt in 3 Bereichen große Ähnlichkeiten zu den oben beschriebenen Genen. Eine Ähnlichkeit zwischen 66% und 83% über 400 Aminosäuren zu den *pca*- bzw. *catF*-Genen aus *Pseudomonas putida* und *Acinetobacter calcoaceticus* läßt darauf schließen, daß das isolierte Fragment das komplette Gen für die β -Ketoacid-CoA-Thiolase aus *Pseudomonas* sp. B13 enthält. Auch die Übereinstimmungen der beiden Endbereiche des Fragmentes zu den Genen aus den beiden genannten Stämmen weist stark darauf hin, daß das Fragment noch Teile der *pcaD*- und *pcaI*-Gene aus *Pseudomonas* sp. B13 enthält.

Die Anordnung dieser 3 Gene würden dann in *Pseudomonas* sp. B13 der Anordnung der *cat*-Gene in *Acinetobacter calcoaceticus* entsprechen. Das *pcaI*-Gen überschneidet sich in *Pseudomonas* sp. B13 jedoch um 4 Basenpaare mit dem *pcaF*-Gen und der Abstand zwischen dem *pcaF*-Gen und dem *pcaD*-Gen beträgt 155 bp in *Pseudomonas* sp. B13. Die Ab-

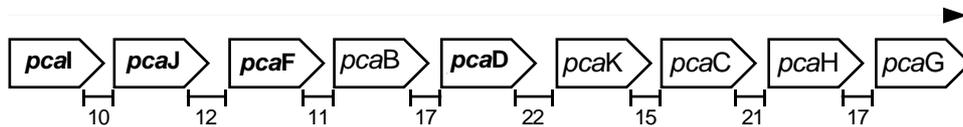
Pseudomonas putida

pca-Gene

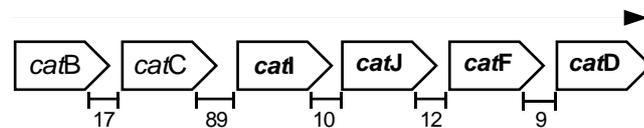


Acinetobacter calcoaceticus

pca-Gene



cat-Gene



Agrobacterium tumefaciens

pca/pob Gene

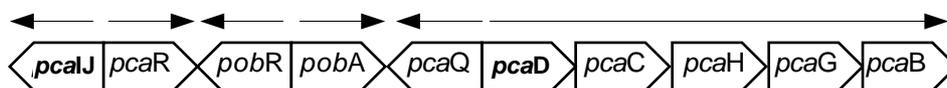


Abb. 4.3: *pca*- und *cat*-Genorganisation in *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter calcoaceticus* und *Agrobacterium tumefaciens* (Harwood et al., 1996)

Die Zahlen zwischen den Genen geben die Abstände in bp an, die horizontalen Pfeile symbolisieren transkriptionale Einheiten. Die beiden Schrägstriche (//) stellen unbekannte Genabstände dar. Die Lage der Gene *pcaD*, *pcaF*, *pcaI*, *catD*, *catF* und *catI* sind hervorgehoben.

folge der Gene entspricht jedoch genau der Abfolge der *cat*-Gene in *Acinetobacter calcoaceticus*.

Da der biologische Unterschied der Gattungen *Acinetobacter* und *Pseudomonas* sehr groß ist, wurde früher angenommen, daß sich der β -Ketoacidweg in jeder biologischen Gruppe unabhängig voneinander entwickelt hat (Stanier et al., 1973). Diese Annahme basierte auf der unterschiedlichen transkriptionalen Kontrolle der Strukturgene dieses Abbauweges (Canovas et al., 1967).

Hartnett et al. (1990) weisen bei einem Vergleich der Aminosäuresequenzen der α - und β -Untereinheiten der Protocatechuat-3,4-Dioxygenase aus *Acinetobacter calcoaceticus* und *Pseudomonas putida* darauf hin, daß diese Theorie nicht länger haltbar ist. Der Vergleich der beiden Enzyme zeigt eine 50%ige Identität zueinander.

Hartnett et al. (1990) erwähnen weiterhin, daß Aminosäuresequenzvergleiche der γ -Carboxymuconolacton-Decarboxylase und der Muconolacton-Isomerase (Yeh et al., 1981; Yeh et al., 1980a; Yeh et al., 1980b) auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung für die Isoenzyme aus *Acinetobacter calcoaceticus* und *Pseudomonas putida* hinweisen.

Darauf deuten auch die in dieser Arbeit erhaltenen Sequenzen aus *Pseudomonas* sp. B13 hin. Der Sequenzvergleich zeigt zwar mehr Ähnlichkeit zu *Pseudomonas putida* (83 % für die β -Ketoacid-CoA-Thiolase), die Abfolge der Gene entspricht jedoch der Abfolge der *cat*-Gene aus *Acinetobacter calcoaceticus*.

Eine Möglichkeit für einen gemeinsamen Ursprung der Isoenzyme ist das sogenannte „patchwork assembly“. Reineke (1998) beschreibt darunter eine Möglichkeit, aus existierenden Abbauwegen neue Stämme zum Abbau von Chloraromaten zu entwickeln. Dies geschieht durch konjugativen Gentransfer von zusätzlichen Abbaugen in einen geeigneten Wirtsorganismus. Dies würde z.B. bedeuten, daß Stämme mit den Genen des Aromatenabbaus, wie z.B. den *cat*-Genen, Wirtsstamm für einen Gentransfer von Chloraromaten genen gewesen sein könnten.

Dies könnte eine Möglichkeit gewesen sein, wie es in *Pseudomonas* sp. B13 zum einem zu einer hohen Sequenzidentität zu *Pseudomonas putida* kommt, zum anderen aber manche Genen die gleiche Anordnung wie in *Acinetobacter calcoaceticus* besitzen.

Abschnitte des in dieser Arbeit untersuchten Fragmentes aus *Pseudomonas* sp. B13 könnten in Zukunft auch dafür genutzt werden, Gensonden zu entwickeln, um das Abbaupotential von *Pseudomonas* sp. B13 in einer Mischkultur zu verfolgen. Mit Hilfe dieser Gensonden könnte man spezifisch den Aromatenabbau durch *Pseudomonas* sp. B13 verfolgen, z.B. in Konkurrenz zu anderen aromatenverwertenden Stämmen. Mit Hilfe von stamm-spezifischen Gensonden, entwickelt aus der 16S rDNA, könnte dann noch der Verbleib des Stammes in einer Mischkultur verfolgt werden, bzw. es könnte untersucht werden, ob es zu einem Gentransfer kommt.

5 Zusammenfassung

1. Zur Entwicklung einer Gensonde für den Abbau von DMSO durch *Hyphomicrobium* EG wurden die 16S rDNA von *Hyphomicrobium* EG, *Hyphomicrobium* sp1564, *Hyphomicrobium* sp1565 und *Hyphomicrobium* sp1566 amplifiziert, kloniert und sequenziert.
2. Aus einer variablen Region der Sequenzvergleiche der 16S rDNA konnte ein stammspezifischer Primer für *Hyphomicrobium* EG abgeleitet werden. Dieser konnte erfolgreich in PCR-Experimenten zum Nachweis von *Hyphomicrobium* EG in verschiedenen Bakterienmischungen eingesetzt werden.
3. Es konnte aus verschiedenen Wasserproben DNA isoliert werden. Diese DNA wurde in PCR-Experimenten eingesetzt, um *Hyphomicrobium* EG in den Wasserproben nachzuweisen. Dies gelang nur, wenn den Abwässern eine definierte Menge an *Hyphomicrobium* EG zugesetzt wurde. Die Nachweisgrenze für *Hyphomicrobium* EG lag bei 100 Keime/ml.
4. Das Schlüsselenzym des DMSO-Abbaus durch *Hyphomicrobium* EG, die Methylmercaptan Oxidase, konnte aufgereinigt und N-terminal ansequenziert werden. Desweiteren wurde das Protein mit Trypsin in Peptide gespalten, welche ebenfalls sequenziert wurden. Aus den Aminosäuresequenzen konnten Oligonukleotide abgeleitet werden, die zur Amplifizierung des beinahe vollständigen Methylmercaptan Oxidase Gens eingesetzt wurden. Aus diesem Genabschnitt konnten Primer abgeleitet werden, die zum Nachweis des spezifischen DMSO-Abbaus durch *Hyphomicrobium* EG eingesetzt werden konnten.
5. Zum Nachweis der anaeroben Reduktion von DMSO durch unspezifische Reduktasen konnten aus bekannten Sequenzen des Enzyms DMSO-Reduktase Oligonukleotide hergeleitet werden, die in PCR-Experimenten mit DNA aus Abwasserproben eingesetzt wurden. Dabei konnten unspezifische DMSO-Reduktase Aktivitäten in verschiedenen Abwässern nachgewiesen werden.
6. Aus dem Stamm *Pseudomonas* sp. B13 konnte mit Hilfe der N-terminalen Sequenzen der Untereinheiten der 3-Oxoacetyl-CoA-Succinyl-CoA-Transferase ein 2.3 kbp großes DNA-Fragment isoliert und sequenziert werden. Die Sequenzanalyse deutet darauf hin, daß das Fragment das Gen der kompletten β -Ketoacetyl-CoA-Thiolase, sowie Teile der Gene der β -Ketoacetyl-CoA-Succinyl-CoA-Transferase und der β -Ketoacetyl-CoA-Enol-Lacton-Hydrolase enthält.

6 Literatur

Alef, K. und Kleiner, D. **1989** „Rapid and sensitive determination of microbial activity in soils and in soil aggregates by dimethylsulfoxide reduction“ *Biol. Fertil. Soils* **8**, 349-355

Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. **1990** „Basic local alignment search tool.“ *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410

Amman, R.I.; Binder, B.J.; Olsen, R.J.; Chisholm, S.W.; Devereux, R. und Stahl, D.A. **1990** „Combination of 16S rRNA-targetted oligonucleotide probes with flow cytometry for analysing mixed microbial populations“ *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1919-1925

Andreae, M.O. **1980** „Determination of trace quantities of dimethylsulfoxide in aqueous solutions“ *Anal. Chem.* **52**, 150-153

Andreae, M.O. und Raemdonck, H. **1983** „Dimethyl-sulphide in the surface ocean and the marine atmosphere: a global view“ *Science* **221**, 744-747

Atlas, R.M. **1983** „Use of microbial diversity measurements to assess environmental stress“ In: *Current Perspectives in Microbial Ecology* pp. 540-545. Edited by M.J. Klug und C.A. Reddy, Washington, DC: American Society for Microbiology

Banwart, W.L. und Bremner, J.M. **1976** „Evolution of volatile sulfur compounds from soil treated with sulfur-containing organic materials“ *Soil Biol. Biochem.* **8**, 439-443

Barry, T.; Powell, R. und Gannon, F. **1990** „A general method to generate DNA probes for microorganisms“ *Bio/Technology* **8**, 233-236

Becker, M.L. **1994** Accession U06473

Bej A.K.; Mahbubani, M.H. und Atlas R.M. **1991** „Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications“ *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **26** (3/4) 301-334

Birnboim, H.C. und Doly, J. **1979** „A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA“ *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513

Bulygina, E.S.; Galchenko, V.F.; Govorukhina, N. I.; Netrusov, A. I.; Nikitin, D. I.; Trotsenko, Y. A. und Chumakov, K.M. **1990** „Taxonomic studies on methylotrophic bacteria by 5S ribosomal RNA sequencing“ *J. Gen. Microbiol.* **136**, 441-446

- Canovas, J.L.; Ornston, L.N. und Stanier, R.Y. **1967** „Evolutionary significance of metabolic control systems.“ *Science* 156, 1695-1699
- Cox, T.L.; und Sly, L.I. **1997** „Phylogenetic relationships and uncertain taxonomy of *Pedomicrobium* Species“ *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 (2), 377-380
- de Bont, J.A.M.; van Dijken, J.P. und Harder, W. **1981** „Dimethyl sulphoxide and dimethyl sulphide as a carbon, sulphur and energy source of *Hyphomicrobium* S“ *J. Gen. Microbiol.* 127, 315-323
- Degrange, V. und Bardin, R. **1995** „Detection and counting of *Nitrobacter* populations in soil by PCR“ *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (6), 2093-2098
- Dorn, E.; Hellwig, M.; Reineke, W. und Knackmuss, H.-J. **1974** „Isolation and characterization of a 3-chlorbenzoate degrading Pseudomonad“ *Arch. Microbiol.* 99, 61-70
- Doten, R.C.; Ngai, K.L.; Mitchell, D.J. und Ornston, L.N. **1987a** „Cloning and genetic organization of the *pca* gene cluster from *Acinetobacter calcoaceticus*“ *J. Bacteriol.* 169, 3168-3174
- Doten, R.C.; Gregg, L.A. und Ornston, L.N. **1987b** „Influence of the *catBCE* sequence on the phenotypic reversion of a *pcaE* mutation in *Acinetobacter calcoaceticus*“ *J. Bacteriol.* 169, 3175-3180
- Edwards, U.; Rogal, T.; Böcker, H.; Emde, M. und Böttger, E. **1989** „Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes characterization of a gene coding for 16S ribosomal DNA“ *Nucleic Acid Res.* 17, 7843-7853
- Elsemore, D.A. und Ornston, L.N. **1994** „The *pca-pob* supraoperonic cluster of *Acinetobacter calcoaceticus* contains *quiA*, the structural gene for quinate-shikimate dehydrogenase“ *J. Bacteriol.* 176, 7659-7666
- Elsemore, D.A. und Ornston, L.N. **1995** „ Unusual ancestry of dehydratases associated with quinate catabolism in *Acinetobacter calcoaceticus*“ *J. Bacteriol.* 177, 5971-5978
- Fesefeldt, A. und Gliesche, C.G. **1997a** „Identification of *Hyphomicrobium* spp. using PCR-amplified fragments of the *mxoF* gene as a molecular marker“ *Syst. Appl. Microbiol.* 20, 387-396
- Fesefeldt, A.; Poetsch, M. und Gliesche, C.G. **1997b** „Development of a species-specific gene probe for *Hyphomicrobium facilis* with the inverse PCR“ *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1), 335-337

- Ferguson, R.L.; Buckley, E.N. und Palumbo, A.V. **1984** „Response of marine bacterioplankton to differential centrifugation and confinement“ *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 49-55
- Finster, K.; Liesack, W. und Thamdrup, B. **1998** „Elemental sulfur and thiosulfate disproportionation by *Desulfocapsa sulfoexigens* sp. nov., a new anaerobic bacterium isolated from marine surface sediment“ *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1), 119-125
- Ford, S. und Olson, B. **1988** „Methods for detecting genetically engineered microorganisms in the Environment“ *Adv. Microb. Ecol.* 10, 45-79
- Fraze, R.W.; Livingston, D.M.; LaPorte, D.C. und Lipscomb, J.D. **1993** „Cloning, sequencing, and expression of the *Pseudomonas putida* protocatechuate 3,4-dioxygenase genes“ *J. Bacteriol.* 175, 6194-6202
- Fredrickson, J.K.; Bezdicek, D.F.; Brickman, F.J. und Li, S.W. **1988** „Enumeration of Tn5 mutant bacteria in soil by using a most-probable-number DNA hybridization technique and antibiotic resistance“ *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (2), 446-453
- Gebers, R.; Wehmeyer, U.; Roggentin, T.; Schlesner, H.; Kölbel-Boelke, J. und Hirsch, P. **1985** „Deoxyribonucleic acid base compositions and nucleotide distributions of 65 Strains of Budding Bacteria“ *Int. J. Sys. Bacteriol.* 35 (3), 260-269
- Gebers, R.; Martens, B.; Wehmeyer, U. und Hirsch, P. **1986** „Deoxyribonucleic acid homologies of *Hyphomicrobium* spp., *Hyphomonas* spp., and other hyphal, budding bacteria“ *Int. J. Sys. Bacteriol.* 36 (2), 241-245
- Ghisalba, O. und Küenzi, M. **1983** „Biodegradation and utilization of monomethyl sulfate by specialized methylotrophs“ *Experientia* 39, 1257-1263
- Ghisalba, O.; Heinzer, F. und Küenzi, M. **1985** „Microorganisms of the genus *Hyphomicrobium* and process for degrading compounds which contain methyl groups in aqueous solutions“ United States Patent No 4492756
- Ghisalba, O., Küenzi, M.; Ramos Tombo, G.M. und Schär, H-P. **1986** „Biodegradation and utilization of methylphosphates and methylphosphonates by specialized methylotrophs“ Abstracts of the 5th International Symposium on Microbial Growth on C1 compounds, 7-4, Groningen, Haren (The Netherlands), 169
- Giovannoni, S.J.; Britschgi, T.B.; Moyer, C.L. und Field, K.G. **1990** „Genetic diversity in Saragossa Sea bacterioplankton“ *Nature* 345, 60-63
- Gliesche, C.G.; Menzel, M. und Fesefeldt, A. **1997** „A rapid method for creating species-specific gene probe for methylotrophic bacteria“ *J. Microbiol. Meth.* 28, 25-34

- Grimont, F und Grimont, P.A.D. **1991** „DNA Fingerprinting“ In: Stackebrandt, E.; Goodfellow, M. (eds.) „Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics“ John Wiley & Sons; Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, pp 249-279
- Gurtler, V.; Wilson, V.A. und Mayall, B.C. **1991** „Classification of medically important clostridia using restriction endonuclease site differences of PCR-amplified 16S rDNA“ J. Gen. Microbiol. 137, 2673-2679
- Harder, W. und Attwood, M.M. **1978** „Biology, physiology and biochemistry of *Hyphomicrobia*“ Adv. Microbiol. Physiol. 17, 303-359
- Hartnett, C.; Neidle, E.L.; Ngai, K.-L. und Ornston, L.N. **1990** „DNA sequences of genes encoding *Acinetobacter calcoaceticus* protocatechuate 3,4-dioxygenase: evidence indicating shuffling of genes and of DNA sequences within genes during their evolutionary divergence“ J. Bacteriol. 172, 956-966
- Hartnett, G.B. und Ornston, L.N. **1994** „Acquisition of apparent DNA slippage structures during extensive evolutionary divergence of *pcaD* and *catD* genes encoding identical catalytic activities in *Acinetobacter calcoaceticus*“ Gene 142, 23-79
- Harwood, C.S.; Nichols, N.N.; Kim, M.-K.; Ditty, J.L. und Parales, R.E **1994** „Identification of the *pcaRKF* gene cluster from *Pseudomonas putida*: involvement in chemotaxis, biodegradation, and transport of 4-hydroxybenzoate“ J. Bacteriol. 176, 6479-6488
- Harwood, C.S. und Parales, R.E **1996** „The β -Ketoacid pathway and the biology of self-identity“ Annu. Rev. Microbiol. 50, 553-590
- Herbert, R.A. **1990** „Methods for enumerating microorganisms and determining biomass in natural environments“ Methods in Microbiology 19, 1-40
- Herrick, J.B.; Madsen, E.L.; Batt, C.A. und Ghiorse, W.C. **1993** „Polymerase chain reaction amplification of Naphthalene-Catabolic and 16S rRNA gene sequences from indigenous sediment bacteria“ Appl. Environ. Microbiol. 59 (3), 687-694
- Higgins, D.; Bleasby, A. und Fuchs, R. **1991** „ClustalV: improved software for multiple sequence alignment“
- Hirsch, P. **1989** „Genus *Hyphomicrobium*“ In: Staley, J.T.; Bryant, M.P.; Pfennig, N. Holt, J.G. (eds.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 3, Williams and Wilkins, Baltimore, Hong Kong, London, Sidney, pp 1895-1904
- Holben, W.E.; Jansson, J.K.; Chelm, B.K. und Tiedje, J.M. **1988** „DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil community“ Appl. Environ. Microbiol. 54, 703-711

- Holm, N.C.; Gliesche, C.G. und Hirsch, P. **1996** „Diversity and structure of *Hyphomicrobium* populations in a sewage treatment plant and its adjacent receiving lake“ Appl. Environ. Microbiol. 62 (2), 522-528
- Holloway, B.W.; Römling, U. und Tümmler, B. **1994** „Genomic mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO“ Microbiology 140, 2907-2929
- Hope, H.-G. **1978** „Relationships between active bacteria and heterotrophic potential in the sea“ Netherlands Journal of Sea Research 12, 78-98
- Houghton, J.E.; Brown, T.M.; Appel, A.J.; Hughes, E.J. und Ornston, L.N. **1995** „Discontinuities in the evolution of *Pseudomonas putida cat* genes“ J. Bacteriol. 177, 401-412
- Jain, R.K.; Burlage, R.S. und Sayler, G.S. **1988** „Methods for detecting recombinant DNA in the environment“ Crit. Rev. Biotech. 8, 33-84
- Jayarao, B.M.; Doré, J.J.E.; Baumbach, G.A.; Matthews, K.R. und Oliver, S.P. **1991** „Differentiation of *Streptococcus uberis* from *Streptococcus parauberis* by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA“ J. Clin. Microbiol. 29, 2774-2778
- Johnson, B.F. und Stanier, R.Y. **1971** „Regulation of the β -ketoacid pathway in *Alcaligenes eutrophus*“ J. Bacteriol. 107, 476-485
- Jones, J.G. **1970** „Studies on freshwater bacteria: effect of medium composition on methods of estimation of bacterial populations“ J. Appl. Bacteriol. 33, 679-687
- Jonkers, H.M.; van der Maarel, M.J.E.C.; van Gemerden, H. und Hansen, T.A. **1996** „Dimethylsulfoxide reduction by marine sulfate-reducing bacteria“ FEMS Microbiol. Lett. 136, 283-287
- Kanagawa, T. und Kelly, D.P. **1986** „Breakdown of dimethylsulfide by mixed cultures and by *Thiobacillus thioparus*“ FEMS Microbiol. Lett. 34, 13-19
- Kapperud, G.; Vardunf, T.; Skjerve, E.; Hornes, E. und Michaelsen, T. **1993** „Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in foods and water by immunomagnetic separation, nested polymerase chain reaction and colorimetric detection of amplified DNA“ Appl. Environ. Microbiol. 59, 2938-2944
- Kassel, K. **1993** „Biologische Abbaubarkeit von DMSO unter praxisorientierten Bedingungen“ Diplomarbeit, Bergische Universität Gesamthochschule Wuppertal

- Kelly, D.P.; Malin, G. und Wood, A.P. **1993** „Microbial transformations and biogeochemical cycling of one-carbon substrates containing sulphur, nitrogen or halogens“ In: Murrel, J.C.; Kelly, D.P. (eds.) „Microbial Growth on C1 compounds“ Intercept Ltd, Andover, UK, pp47-64
- Kiene, R.P.; Oremland, R.S.; Catena, A.; Miller, L.G. und Capone, D.G. **1986** „Metabolism of reduced methylated sulfur compounds in anaerobic sediments and by pure cultures of an estuarine methanogen“ *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 1037-1045
- Kim, N.W.; Gutell, R.R. und Chan, V.L. **1995** „Complete sequences and organization of the *rrnA* operon from *Campylobacter jejuni* TGH9011 (ATCC43431)“ *Gene* 164 (1), 101-106
- Kloos, K.; Fesefeldt, A.; Gliesche, C.G.; M. und Bothe, H. **1995** „DNA-probing indicates the occurrence of denitrification and nitrogen fixation genes in *Hyphomicrobium*. Distribution of denitrifying and nitrogen fixing isolates of *Hyphomicrobium* in a sewage treatment plant“ *FEMS Microbiol. Ecol.* 18, 205-213
- Köbel-Boelke, J.; Gebers, R. und Hirsch, P. **1985** „Genome size determinations for 33 strains of budding bacteria“ *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35 (3), 270-273
- Kowalchuk, G.A.; Hartnett, G.B.; Benson, A.; Houghton, J.E.; Ngai K.L. und Ornston, L.N. **1994** „Contrasting patterns of evolutionary divergence within the *Acinetobacter calcoaceticus pca* operon“ *Gene* 146, 23-30
- Laemmli, U.K. **1970** „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4“ *Nature* 227, 680-685
- Lafay, B.; Ruimy, R.; de Trautenberg, C.R.; Breittmayer, V.; Gauthier, M.J. und Christen, R. **1995** „*Roseobacter algicola* sp. nov., a new marine bacterium isolated from the phycosphere of the toxin-producing dinoflagellate *Prorocentrum lima*“ *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45 (2), 290-296
- Large, P.J. und Bamforth, C.W. **1988** „Methylotrophy and biotechnology“ Longman, Wiley, New York
- Leach, J.M. und Chung, L.T.K. **1982** „Gas concentrations and occupational health in kraft mills“ *Tappi J.* 65 (11), 95-98
- Leake, C.C. **1967** „Introductory remarks“ *Annals of the New York Academy of Sciences* 141, 1-3
- Lebedinskii, A.V. und Vedenina, J. Y. **1981** „Production of nitrous and nitric oxides by methylotrophic denitrifying bacteria“ *Mikrobiologiya* 50, 753-762 (engl. transl. 555-559)

- Liessens, J. **1993** „Removing nitrate with a methylotrophic fluidized bed: microbiological quality“ J. Am. Wat. Assoc. 85, 155-161
- Lorite, M.J.; Velasco, L.; Sanjuan, J.; Olivares, J. und Bedmar, E.J. **1997** Accession Y10223
- Lovelock, J.E.; Maggs, R.J. und Rasmussen, R.A. **1972** „Atmospheric dimethyl-sulfide and the natural sulphur cycle“ Nature 237, 452-453
- Ludwig, W.E.; Brockmann, E.; Beimfohr, C.; Hertel, C.; Jacobsen, B. und Schleifer, K. **1996** „Nucleic acid based detection systems for genetically modified bacteria“ Sytem. Appl. Microbiol. 18, 477-485
- Mack, M.; Bendrat, K.; Zelder, O.; Eckel, E.; Linder, D. und Buckel, W. **1994** „Location of the two genes encoding glutaconate coenzyme A-transferase at the beginning of the hydroxyglutarate operon in *Acidaminococcus fermentans*“ Eur. J. Biochem. 226 (1), 41-51
- Marck, C. **1988** „DNA-strider: a C program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Macintosh family of computers“ Nucleic Acid Res. 16, 1829-1836
- Mason, J. und Burns, R.G. **1990** „Production of a monoclonal antibody specific for a *Flavobacterium* species isolated from soil“ FEMS Microbiol. Lett. 73, 299-308
- Matsudaira, P. **1990** „Limited N-terminal sequence analysis“ In: Guide to Protein Purification Deutscher P.M. (Hrsg.) Academic Press, San Diego
- McEwan, A. G.; Ferguson, S. J. und Jackson, J. B. **1991** „Purification and properties of dimethyl sulphoxide reductase from *Rhodobacter capsulatus*“ Biochem. J. 274, 305-307
- McSweeney, C.S.; Mackie, R.I.; Odenyo, A.A. und Stahl, D.A. **1993** „Development of an Oligonucleotide Probe Targeting 16S rRNA and its Application for Detection and Quantitation of the Ruminal Bacterium *Synergistes jonesii* in a Mixed-Population Chemostat“ Appl. Environ. Microbiol. 59 (5), 1607-1612
- Mhatre, S.S; Chetty, K.G. und Pradhan, D.S. **1983** „Uncoupling of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria following the administration of dimethyl-sulphoxide“ Biochem. Biophys. Res. Commun. 110, 325-331
- Moore, R.L. **1977** „Ribosomal ribonucleic acid cistron homologies among *Hyphomicrobium* and various othe bacteria“ Can. J. Microbiol. 23, 478-481
- Morgan, J.A.W.; Winstanley, C.; Pickup, R.W. Jones, J.G. und Saunders, J.R. **1989** „Direct phenotypic and genotypic detection of a recombinant *Pseudomonad* population in lake water“ Appl. Environ. Microbiol. 55, 2537-2544

- Mouncey, N.J.; Choudhary, M. und Kaplan, S. **1997** „Characterization of genes encoding dimethyl sulfoxide reductase of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1T: an essential metabolic gene function encoded on chromosome II“ J. Bacteriol. 179 (24), 7617-7624
- Neidle, E.L.; Hartnett, C.; Bonitz, S. und Ornston, L.N. **1988** „DNA sequence of the *Acinetobacter calcoaceticus* catechol 1,2-dioxygenase I structural gene *catA*: evidence for evolutionary divergence of intradiol dioxygenases by acquisition of DNA sequence repetitions“ J. Bacteriol. 170, 4874-4880
- Neidle, E.L.; Hartnett, C.; Ornston, L.N.; Bairoch, A.; Rekik, M. und Harayama, S. **1991** „Nucleotide sequences of the *Acinetobacter calcoaceticus* *benABC* genes for benzoate 1,2-dioxygenase reveal evolutionary relationships among multicomponent oxygenases“ J. Bacteriol. 173, 5385-5395
- Neidle, E.L.; Hartnett, C.; Ornston, L.N.; Bairoch, A.; Rekik, M. und Harayama, S. **1992** „Cis-diol dehydrogenases encoded by the TOL (pWWO) plasmid *xyiL* gene and the *Acinetobacter calcoaceticus* chromosomal *benD* gene are members of the short-chain alcohol dehydrogenase superfamily“ Eur. J. Biochem. 204, 113-120
- Nguyen, B.C.; Gaudry, A.; Bonsang, B. und Lambert, G. **1978** „Reevaluation of the role of dimethyl-sulphide in the sulphur budget“ Nature 275, 637-639
- Nikitin, D.I.; Vishnewetskaya, O.Y.; Chumakov, K.M. und Zlatkin, I.V. **1990** „Evolutionary relationship of some stalked and budding bacteria (genera *Caulobacter*, „*Hyphobacter*“, *Hyphomonas* and *Hyphomicrobium*) as studied by the new integral taxonomical method“ Arch. Microbiol. 153, 123-128
- Nurse, G.R. **1980** „Denitrification with methanol: Microbiology and biochemistry“ Wat. Res. 14, 531-537
- Ogram, A.; Sayler, G.S. und Barkay, T. **1988** „DNA extraction and purification from sediments“ J. Microbiol. Meth. 7, 57-66
- Ornston, L.N. **1966** „The conversion of catechol and protocatechuate to β -keto adipate by *Pseudomonas putida*. IV. Regulation“ J. Biol. Chem. 241, 3800-3810
- Oyaizu, H. und Woese, C.R. **1985** „Phylogenetic relationships among the sulfate respiring bacteria, myxobacteria and purple bacteria“ Syst. Appl. Microbiol. 6, 257-263
- Parke, D. **1995** „Supraoperonic clustering of *pca* genes for catabolism of the phenolic compound protocatechuate in *Agrobacterium tumefaciens*“ J. Bacteriol. 177, 3808-3817
- Parales, R.E. und Harwood, C.S. **1992** „Characterization of the genes encoding β -Keto adipate: Succinyl-Coenzyme A Transferase in *Pseudomonas putida*“ J. Bacteriol. 174 (14), 4657-4666

- Pearson, W. und Lipmann, D. **1988** „Improved tools for biological sequence analysis“ Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444-2448
- Petersen, D.J. und Bennett, G.N. **1993** „Sequence and arrangement of genes and coding enzymes of the acetone production pathway of *Clostridium butylicum* ATCC 824“ Gene 123, 93-97
- Pfennig, N. und Lippert, K.D. **1966** „Über das Vitamin B12-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien“ Arch. Microbiol. 55, 245-256
- Pickup, R.W.; Simon, B.M.; Jones, J.G.; Saunders, J.R.; Carter, J.K.; Morgan, J.A.W.; Winstanley, C. und Raitt, F.C. **1990** „Survival of laboratory and freshwater bacteria carrying an extrachromosomal *xyE* gene in freshwater microcosms“ In: „Bacterial Genetics in Natural Environments“ pp 89-99 Edited by J.C. Fry & M.J. Day, London: Chapman & Hall
- Pickup, R.W. **1991** „Development of molecular methods for the detection of specific bacteria in the environment“ J. Gen. Microbiol. 137, 1009-1019
- Plane, J.M.C. **1989** „Gas-phase atmospheric oxidation of biogenic sulfur compounds; a review“ in: Biogenic Sulfur in the Environment Saltzman E.S.; Cooper, W.J. (eds.) ACS Symp. Serie 393, Am. Chem. Soc., Washington
- Ratray, E.A.; Prosser, J.I.; Killham, K. und Glover, L.A. **1990** „Luminescence-based nonextractive technique for in situ detection of *Escherichia coli* in soil“ Appl. Environ. Microbiol. 56, 3368-3374
- Reineke, W. **1998** „Development of hybrid strains for the mineralization of chloraromatics by patchwork assembly“ Annu. Rev. Microbiol. 52, 287-331
- Roggentin, T. und Hirsch, P. **1989** „Ribosomal RNA cistron similarities among *Hyphomicrobium* species and several other hyphal, budding bacteria“ Sys. Appl. Microbiol. 11, 140-147
- Rossau, R.; Heyndrickx, L. und Van Heuverswyn, H. **1988** „Nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Neisseria gonorrhoeae*“ Nucleic Acids Res. 16 (13), 6227
- Rozsak, D.B. und Colwell, R.R. **1987** „Survival strategies of bacteria in the natural environment“ Microbiol. Rev. 51, 365-379
- Sambrock, J.; Fritsch, E.F. und Maniatis, T. **1989** „Molecular cloning - a laboratory manual“ Cold Spring Harbor Laboratory Press USA

- Sanger, F.; Nicklan, S. und Coulson, A.R. 1977 „DNA Sequencing with chain determining inhibitors“ Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467
- Sawada, H.; Ieki, H.; Oyaizu, H. und Matsumoto, S. 1993 „Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*“ Int. J. Syst. Bacteriol. 43 (4), 694-702
- Sayler, G.S. und Layton A.C. 1990 „Environmental Application of Nucleic Acid Hybridization“ Annu. Rev. Microbiol. 44, 625-648
- Schleifer, K.H. und Ludwig, W 1989 „Phylogenetic relationships among bacteria“ In: Fernholm, B.; Bremer, K. und Jörnwall, H. (eds.) „The hierarchy of life“ Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp 103-117
- Schmider, F. und Ottow, J.C.G. 1986 „Charakterisierung der denitrifizierenden Mikroflora in den verschiedenen Reinigungsstufen einer biologischen Kläranlage“ Arch. Hydrobiol. 106, 497-512
- Shanley, M.S.; Harrison, A.; Parales, R.E.; Kowalchuk, G.; Mitchell, D.J. und Ornston, L.N. 1994 „Unusual G + C content and codon usage in *cadJF*, a segment of the ben-cat supra-operonic cluster in the *Acinetobacter calcoaceticus* chromosome“ Gene 138 (1-2), 59-65
- Shaw, A.L.; Hanson, G.R.; und McEwan, A.G. 1996 „Cloning and sequence analysis of the dimethylsulfoxide reductase structural gene from *Rhodobacter capsulatus*“ Biochim. Biophys. Acta 1276 (3), 176-180
- Sivelä, S. 1980 „Dimethyl sulphide as a growth substrate for an obligately chemolithotrophic *Thiobacillus*“ Commentationes physico-mathematicae dissertationes (Helsinki) 1, 1-69
- Sivelä, S. und Sundman, V. 1975 „Demonstration of *Thiobacillus*-type bacteria which utilize methyl sulphides“ Archives of Microbiology 103, 303-304
- Sommerville, C.; Knight, I.T.; Straube, W.L. und Colwell, R.R. 1989 „Simple rapid method for the direct isolation of nucleic acids from aquatic environments“ Appl. Environ. Microbiol. 55, 548-554
- Southern, E.M. 1975 „Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis“ J. Mol. Biol. 98, 503-517

- Stackebrandt, E.; Fischer, A.; Roggentin, T.; Wehmeyer, U.; Bomar, D. und Smida, J. **1988** „A phylogenetic survey of budding, and/or prostecate, non-phototrophic eubacteria: membership of *Hyphomicrobium*, *Hyphomonas*, *Pedomicrobium*, *Filomicrobium*, *Caulobacter* and „*Dichtomicrobium*“ to the alphy-subdivision of purple non-sulfur bacteria“ Arch. Microbiol. 149, 547-556
- Stahl, D.A. und Amann, R.I. **1991** „Development and application of nucleic acid probes“ In: Stackebrandt, E. und Goodfellow, M. (eds.) „Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics“ John Wiley & Sons, Chichester, Englanf, pp 205-248
- Stahl, D.A., Key, R., Flesher, B. und Smit, J. **1992** „The phylogeny of marine and freshwater caulobacters reflects their habitat“ J. Bacteriol. 174, 2193-2198
- Stanier, R.Y. und Ornston, L.N. **1973** „The β -keto adipate pathway“ Adv. Microb. Physiol. 9, 89-151
- Steffan, R.J. und Atlas, R.M. **1988** „DNA amplification to enhance the detection of genetically engineered bacteria in environmental samples“ Appl. Environ. Microbiol. 54, 2185-2191
- Steffan, R.J. und Atlas, R.M. **1990** „Solution hybridization assay for detecting genetically engineered microorganisms in environmental samples“ Biotechniques 8, 316-318
- Steffan, R.J. und Atlas, R.M. **1991** „Polymerase chain reaction: applications in environmental microbiology“ Annu. Rev. Microbiol. 45, 137-161
- Steffan, R.J.; Goksoyr, J.; Asim, K.B. und Atlas, R.M. **1988** „Recovery of DNA from soil and sediments“ Appl. Environ. Microbiol. 54, 2908-2915
- Süßmuth, R.; Eberspächer, J.; Haag, R. und Springer, W. **1987** „Biochemisch-mikrobiologisches Praktikum“ Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Suylen, G.M.H. und Kuenen, J.G. **1986** „Chemostat enrichment and isolation of *Hyphomicrobium* EG“ Antonie van Leeuwenhoek 52, 281-293
- Suylen, G.M.H.; Large, P.J.; van Dijken, J.P. und Kuenen, J.G. **1987** „Methyl mercaptan oxidase, a key enzyme in the metabolism of methylated sulphur compounds by *Hyphomicrobium* EG“ J. Gen. Microbiol. 133, 2989-2997
- Suylen, G.M.H.; Steffers, G.C. und Kuenen, J.G. **1986** „Chemolithrophic potential of a *Hyphomicrobium* species, capable of growth on methylated sulphur compounds“ Arch. Microbiol. 146, 192-198
- Taylor, B.F. und Kiene, R.P. **1989** „Microbial metabolism of dimethyl sulfide“ in: Biogenic Sulfur in the Environment Saltzman E.S.; Cooper, W.J. (eds.) ACS Symp. Serie 393, Am. Chem. Soc., Washington

- Teske, A.; Sogin, M.L. und Jannasch, H.W. **1997** Accession AF035956
- Timmermanns, P. und van Haute, A. **1983** „Denitrification with methanol - Fundamental study of the growth and denitrification capacity of *Hyphomicrobium* sp.“ *Wat. Res.* 17, 1249-1255
- Uebaysi, M. und Tonomura, K. **1976** „Denitrification by *Hyphomicrobium* capable of utilizing methanol“ *J. Ferment. Technol.* 54, 885-890
- Vanechoutte, M.; Rossau, R.; de Vos, P.; Gillis, M.; Janssens, D.; Paepe, N.; de Rouck, A.; Fiers, T.; Claeys, G. und Kersters, K. **1992** „Rapid identification of bacteria of the *Comamonadaceae* with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA)“ *FEMS Microbiol. Lett.* 93, 227-234
- Vieira, J.; und Messing, J. **1982** „The pUC plasmids and M13 mp7-derived systems for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers“ *Gene* 19, 259-268
- Vlasceanu, L.; Popa, R. und Kinkle, B.K. **1997** „Characterisation of *Thiobacillus thioparus* LV43 and its distribution in a chemoautotrophically based groundwater ecosystem“ *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (8), 3123-3127
- Ward, D.B.; Weller, R. und Bateson, M.M. **1990** „16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community“ *Nature*, 345, 63-65
- Williams, S.E.; Woolridge, E.M.; Ransom, S.C.; Landro, J.A.; Babbit, P.C. und Kozarich, J.W. **1992** „3-Carboxy-*cis,cis*-muconate lactonizing enzyme from *Pseudomonas putida* is homologous to the class II fumerase family: a new reaction in the evolution of a mechanistic motif“ *Biochemistry* 31, 9768-9776
- Wilson, K. **1990** „Preparation of genomic DNA from bacteria“ In: Ausubel F.A., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Smith J.A., Seidmann J.G., und Struhl K. (Hrsg.) *Protocol molecular microbiology* Greene Publishing & Wiley Interscience New York
- Woese, C.R. **1987** „Bacterial evolution“ *Microbiol. Rev.* 51, 221-271
- Yamamoto, I.; Wada, N.; Ujiye, T.; Tachibana, M.; Matsuzaki, M.; Kajiwara, H.; Watanabe, Y.; Hirano, H.; Okubo, A.; Satoh, T. und Yamazaki, S. **1995** „Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding dimethyl sulfoxide reductase from *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. denitrificans“ *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59 (10), 1850-1855
- Yanish-Perron, C.; Vieira, J.; und Messing, J. **1985** „Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequence of the M13 mp18 and pUC 19 vectors“ *Gene* 33, 103-113

Yeh, W.K., Durham, D.R., Fletcher, P. und Ornston, L.N., **1981** „Evolutionary relationships among γ -carboxymuconolactone decarboxylases.“ J. Bacteriol. 146, 233-238

Yeh, W.K., Fletcher, P. und Ornston, L.N., **1980a** „Evolutionary divergence of coselected β -keto adipate enol-lactone hydrolases in *Acinetobacter calcoaceticus*“ J. Biol. Chem. 255, 6342-6346

Yeh, W.K., Fletcher, P. und Ornston, L.N., **1980b** „Homologies in the NH₂-terminal amino acid sequence of γ -carboxymuconolactone decarboxylases and muconolactone isomerases“ J. Biol. Chem. 255, 6347-6354

Zeyer, J.; Eicher, P.; Wakeham, S.G. und Schwarzenbach, R.P. **1987** „Oxidation of dimethyl sulfide to dimethyl sulfoxide by phototropic purple bacteria“ Appl. Environ. Microbiol. 53, 2026-2032

Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
B	Benzoat
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-propan-1-sulfonsäure
3CB	3-Chlorbenzoat
cpm	Anzahl Umdrehungen pro Minute
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
DEAE	Diethylaminoethyl
DMS	Dimethylsulfid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	2'-Desoxynukleotid-Mix
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
FPLC	schnelle Proteinflüssigkeitschromatographie
GVO	gentechnisch veränderter Organismus
kb	Kilo-Base
LB	Luria-Broth
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
rDNA	ribosomale Desoxyribonucleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp.	Art
SSC	Natriumchlorid/Trinatriumcitrat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
%(v/v)	Volumenprozent
%(w/v)	Gewichtsprozent