

Lehrstuhl für Wassergüte- und Abfallwirtschaft  
der Technischen Universität München

Plasmid-vermittelte Bioaugmentation und  
Populationsdynamik von xenobiotikabelasteten  
mikrobiellen Abwasserbiozözen

Stephan Bathe

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Bauingenieur- und Vermessungswesen  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Martin Faulstich

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr.-Ing., Dr. h. c. Peter A. Wilderer, i. R.
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Karl-Heinz Schleifer
3. Assistant Prof. Dr. rer. nat. Martina Hausner,  
Northwestern University, USA

Die Dissertation wurde am 07.09.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Bauingenieur- und Vermessungswesen am 29.11.2004 angenommen.

## **KURZFASSUNG**

Die als Bioremediation bezeichnete Nutzung des metabolischen Potentials von Mikroorganismen zur Reinigung von schadstoffbelasteten Umgebungen stellt eine mögliche Alternative gegenüber physikalisch-chemischen Reinigungsmethoden dar. Insbesondere eine so erreichte Implementation von Xenobiotika-Abbau in biologische Reinigungsstufen von Abwasserreinigungsanlagen könnte eine kostengünstige Möglichkeit sein, zusätzliche Verfahrensschritte zu vermeiden.

In der vorliegenden Arbeit wird die Möglichkeit untersucht, mikrobielle Abwasserbiozönosen durch horizontalen Transfer von katabolischen Plasmiden direkt in Modellreaktoren genetisch zu modifizieren und so einen Xenobiotikaabbau herbeizuführen. Hierzu wurde ein *Pseudomonas putida* Stamm mit einem katabolischen Plasmid als Donororganismus zu mikrobiellen Lebensgemeinschaften von schubweise beschickten Biofilmreaktoren (SBBR) im Labormaßstab zugegeben. Der konjugative Transfer der Plasmide in den mikrobiellen Biozönosen der Reaktoren wurde mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen und PCR-basierenden Methoden verfolgt und mit dem Abbauverhalten der Reaktoren in Bezug auf das jeweilige Modellxenobiotikum verglichen. Das Wirtsspektrum der Plasmide wurde durch Isolation und phylogenetische Analyse von Transkonjugantenstämmen analysiert.

Während das erste eingesetzte Plasmid pJP4 ein gut untersuchtes Modellplasmid für den Abbau von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) ist, wurde die Beteiligung des zweiten untersuchten Plasmids pNB2 am Abbau von 3-Chloranilin (3CA) in dieser Arbeit erstmals nachgewiesen. Mit beiden Plasmiden konnte durch den oben skizzierten Ansatz ein mit dem Auftreten von Transkonjuganten korrelierender Abbau von 2,4-D bzw. 3CA in den Labormaßstabsreaktoren erreicht werden. Für pNB2 konnte *Comamonas testosteroni* als im Reaktor aktive 3CA abbauende Transkonjugantenspezies identifiziert werden, während unklar ist, welches die dominanten 2,4-D abbauenden Transkonjuganten im Fall des Reaktorversuchs mit pJP4 waren.

Horizontaler Gentransfer von katabolischen Plasmiden stellt daher eine Möglichkeit für die Bioaugmentation der Mikroorganismenpopulationen von Biofilmreaktoren dar. Pilotmaßstabs- und Langzeituntersuchungen sollten Stabilität der eingeführten metabolischen Funktionen unter praxisnahen Bedingungen analysieren.

## **ABSTRACT**

Bioremediation – the utilization of the metabolic potential of microorganisms to clean up contaminated environments – represents a possible alternative to physico-chemical treatment processes. In particular, an implementation of xenobiotic degradation into the biological process steps of wastewater treatment units using this approach could be a cost effective possibility to circumvent additional process steps.

This work investigates the possibility of genetically modifying microbial wastewater biocoenoses by horizontal gene transfer directly within model reactors to introduce xenobiotic degrading capabilities. For this reason, a *Pseudomonas putida* strain containing a catabolic plasmid was added to the microbial communities of laboratory-scale sequencing batch biofilm reactors (SBBR). The conjugal transfer of the respective plasmid was followed by microscopical and PCR-based methods and compared with reactor performance regarding the degradation of the applied xenobiotic substance.

In contrast to the first of the investigated plasmids, pJP4, which is a well-studied model plasmid for the degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), this study shows for the first time the participation of the second plasmid under investigation, pNB2, in degradation of 3-chloroaniline (3CA). Both plasmids could be successfully applied for bioaugmentation of the microbial communities of lab-scale reactors, and the appearance of transconjugants could be correlated with an onset of the degradation of 2,4-D or 3CA, respectively. *Comamonas testosteroni* could be identified as the dominant 3CA-degrading pNB2 transconjugant species active in the reactor, whereas the identity of the dominant 2,4-D degrading transconjugants in the reactor experiment with pJP4 remained unclear.

The results of this study show that horizontal gene transfer of catabolic plasmids represents a possibility for the bioaugmentation of microbial populations in biofilm reactors. Pilot-scale and long-term investigations should be conducted to analyse the stability of the introduced metabolic functions under application-oriented conditions.

## INHALTSVERZEICHNIS

|             |   |           |
|-------------|---|-----------|
| <b>1.</b>   | <b>EINLEITUNG</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2.</b>   | <b>STAND DES WISSENS</b>  | <b>3</b>  |
| <b>2.1.</b> | <b>Xenobiotika</b>  | <b>3</b>  |
| <b>2.2.</b> | <b>Biologische Abwasserreinigung</b>  | <b>4</b>  |
| 2.2.1.      | Mikrobielle Aggregate (Flocken, Biofilm, aerobe Granula)  | 4         |
| 2.2.2.      | Belebungs- und SBR-Verfahren  | 5         |
| 2.2.3.      | Bioaugmentation   | 6         |
| <b>2.3.</b> | <b>Bakterielle Taxonomie und Identifizierung</b>  | <b>7</b>  |
| 2.3.1.      | Genetische Methoden   | 8         |
| 2.3.2.      | Phänotypische Methoden  | 9         |
| 2.3.3.      | Artdefinition   | 10        |
| <b>2.4.</b> | <b>Methoden der bakteriellen Populationsanalyse</b>   | <b>11</b> |
| 2.4.1.      | Kultivierung  | 12        |
| 2.4.2.      | Kulturunabhängige rRNA- und rDNA-basierende Methoden  | 13        |
| 2.4.2.1.    | Hybridisierungsmethoden   | 13        |
| 2.4.2.2.    | PCR-basierende Methoden   | 14        |
| 2.4.3.      | Nachweis von bestimmten Genen bzw. Organismen in einer bakteriellen Mischpopulation                                       | 17        |
| 2.4.4.      | Identifizierung von Phylogenie-/Funktionsbeziehungen  | 18        |
| <b>2.5.</b> | <b>Mikrobielle Anpassung durch Mutationen und horizontalen Gentransfer</b>  | <b>21</b> |
| <b>2.6.</b> | <b>Mobile genetische Elemente</b>   | <b>22</b> |
| <b>3.</b>   | <b>ARBEITSHYPOTHESE</b>   | <b>25</b> |
| <b>4.</b>   | <b>MATERIAL UND METHODEN</b>  | <b>27</b> |
| <b>4.1.</b> | <b>Bakterienstämme</b>  | <b>27</b> |
| <b>4.2.</b> | <b>Medien</b>   | <b>28</b> |
| <b>4.3.</b> | <b>Kulturbedingungen und –handhabungen</b>  | <b>30</b> |
| <b>4.4.</b> | <b>Einführung von Genen für fluoreszierende Proteine in Mikroorganismen</b>   | <b>30</b> |
| 4.4.1.      | Chromosomale Markierung von <i>Pseudomonas putida</i> SM1443 mit <i>gfp</i>   | 30        |
| 4.4.2.      | Markierung der Plasmide pWW0, pJP4 und pNB2 mit <i>dsRed</i>  | 31        |
| <b>4.5.</b> | <b>Mikroskopie</b>  | <b>31</b> |
| 4.5.1.      | Epifluoreszenzmikroskopie   | 31        |
| 4.5.2.      | Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie  | 31        |
| <b>4.6.</b> | <b>Konjugation von <i>P. putida</i> SM1443::<i>gfp2x</i> – pWW0::<i>dsRed</i> mit <i>P. putida</i> DSM 291</b>            | <b>32</b> |
| 4.6.1.      | Auf Agaroberflächen   | 32        |
| 4.6.2.      | In Biofilmen auf Objektträgern  | 32        |
| <b>4.7.</b> | <b>Erstellung von definierten Zellsuspensionen zur Optimierung der Multiplex-PCR-Analyse von horizontalem Gentransfer</b> | <b>32</b> |
| <b>4.8.</b> | <b>Chemische Analysen</b>   | <b>33</b> |
| 4.8.1.      | Chemischer Sauerstoff-Bedarf  | 33        |
| 4.8.2.      | Photometrische Messung der Konzentrationen von 2,4-D und 3-Chloranilin  | 33        |
| <b>4.9.</b> | <b>Wirtsspektrums-Untersuchungen der Plasmid pJP4 und pNB2</b>  | <b>33</b> |
| 4.9.1.      | Plasmid pJP4  | 33        |
| 4.9.2.      | Plasmid pNB2  | 34        |

|              |  |            |
|--------------|--|------------|
| <b>4.10.</b> | <b>Durchführung der Reaktorversuche und Probenahmen</b>  | <b>35</b>  |
| 4.10.1.      | Bioaugmentationsversuch mit pJP4   | 35         |
| 4.10.2.      | Bioaugmentationsversuch mit pNB2   | 35         |
| <b>4.11.</b> | <b>Erstellung von Template-DNA für PCR-Analysen</b>  | <b>37</b>  |
| <b>4.12.</b> | <b>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</b>   | <b>37</b>  |
| 4.12.1.      | Primer   | 37         |
| 4.12.2.      | Protokolle für konventionelle PCR  | 38         |
| 4.12.3.      | Real-time PCR  | 40         |
| <b>4.13.</b> | <b>Gelelektrophoretische Analysen</b>  | <b>41</b>  |
| 4.13.1.      | Agarose-Gelelektrophorese und Quantifizierung von DNA  | 41         |
| 4.13.2.      | DGGE   | 41         |
| 4.13.3.      | RISA   | 42         |
| <b>4.14.</b> | <b>Vorbereitung von PCR-Produkten für Sequenzierungen</b>  | <b>42</b>  |
| <b>4.15.</b> | <b>Fluoreszenz in situ Hybridisierung</b>  | <b>42</b>  |
| <b>4.16.</b> | <b>Quantitative Bildanalyse</b>  | <b>43</b>  |
| <b>4.17.</b> | <b>Bioinformatische Methoden</b>   | <b>44</b>  |
| <br>         |  |            |
| <b>5.</b>    | <b>ERGEBNISSE</b>  | <b>45</b>  |
| <b>5.1.</b>  | <b>Kulturunabhängiger Nachweis von konjugativem Plasmidtransfer</b>                                  | <b>45</b>  |
| 5.1.1.       | Nachweis durch Einsatz fluoreszierender Proteine   | 46         |
| 5.1.2.       | Nachweis durch PCR   | 48         |
| <b>5.2.</b>  | <b>Plasmid pJP4</b>  | <b>52</b>  |
| 5.2.1.       | Wirtsspektrum von pJP4 in Klärschlamm  | 52         |
| 5.2.2.       | Bioaugmentation der mikrobiellen Biozönose eines SBBR mit pJP4                                       | 55         |
| <b>5.3.</b>  | <b>Plasmid pNB2</b>  | <b>60</b>  |
| 5.3.1.       | Analyse der Beteiligung von pNB2 am 3-Chloranilin Abbau  | 61         |
| 5.3.2.       | Entwicklung von Nachweismethoden für <i>Comamonas testosteroni</i>                                   | 63         |
| 5.3.3.       | Bioaugmentation der mikrobiellen Biozönosen von Modell-SBBRs mit pNB2                                | 68         |
| <br>         |  |            |
| <b>6.</b>    | <b>DISKUSSION</b>  | <b>77</b>  |
| <b>6.1.</b>  | <b>Kulturunabhängiger Nachweis von konjugativem Plasmidtransfer</b>                                  | <b>77</b>  |
| <b>6.2.</b>  | <b>Transkonjuganten-Diversitäten der Plasmide pJP4 und pNB2</b>                                      | <b>81</b>  |
| <b>6.3.</b>  | <b>Bioaugmentation von mikrobiellen Biozönosen in Modellreaktoren durch horizontalen Gentransfer</b> | <b>83</b>  |
| <b>6.4.</b>  | <b>Überlegungen zur praktischen Anwendbarkeit des Verfahrens</b>                                     | <b>85</b>  |
| <br>         |  |            |
| <b>7.</b>    | <b>ZUSAMMENFASSUNG</b>   | <b>87</b>  |
| <br>         |  |            |
| <b>8.</b>    | <b>LITERATUR</b>   | <b>89</b>  |
| <br>         |  |            |
| <b>9.</b>    | <b>ANHANG</b>  | <b>98</b>  |
| <b>9.1.</b>  | <b>In Kap. 5.2.2. ermittelte 16S-rRNA Sequenzen</b>  | <b>98</b>  |
| <b>9.2.</b>  | <b>Standardkurven für die real-time PCR</b>  | <b>99</b>  |
| 9.2.1.       | Gentransfer-Quantifizierung  | 99         |
| 9.2.2.       | Quantifizierung von <i>C. testosteroni</i>   | 100        |
| <b>9.3.</b>  | <b>Abkürzungen</b>   | <b>100</b> |
| <br>         |  |            |
| <b>10.</b>   | <b>PUBLIKATIONEN</b>   | <b>103</b> |
| <br>         |  |            |
|              | <b>DANKSAGUNG</b>  | <b>104</b> |

## **1. EINLEITUNG**

Die Industrialisierung hat zur Freisetzung einer Vielzahl von umweltschädlichen Substanzen durch den Menschen und damit zu einer Kontamination von vielen aquatischen und terrestrischen Umgebungen geführt. Die Beobachtung, dass in solcherart kontaminierten Lebensräumen nach sehr unterschiedlichen Anpassungszeiträumen ein biologischer Abbau oder eine Inaktivierung von solchen Substanzen stattfinden kann, hat zu der These geführt, dass die für diese Prozesse relevanten Mikroorganismen bzw. ihre Gene für die gezielte Entfernung von Schadstoffen aus der Umwelt genutzt werden können. Viele der betroffenen Lebensräume sind für eine ex situ Behandlung – also eine Entfernung des kontaminierten Mediums und Reinigung in einer speziellen Umgebung – nicht zugänglich, oder eine solche Behandlung ist mit hohen Kosten verbunden. Daher ist eine Reinigung vor Ort mit Hilfe von mikroskopisch kleinen Katalysatoren, die nur geringe Zugangsprobleme zum jeweiligen Schadstoff haben, als ökologisch und wirtschaftlich attraktive Alternative wünschenswert. Ebenso ist ein Auftreten von Schadstoffen in Abwasserreinigungsanlagen als Endstationen kommunaler und industrieller Abwässer sehr wahrscheinlich. Gleichzeitig ist eine Beeinträchtigung der Prozessleistung hier aus umweltschutztechnischen und Kostengründen nicht akzeptabel. Da in biologischen Reinigungsstufen bereits eine hochdiverse mikrobielle Lebensgemeinschaft vorliegt, ist eine Implementation von zusätzlichen metabolischen Fähigkeiten eine potentiell gangbare Lösung, mit der die Einführung von separaten Behandlungsschritten und –methoden für spezielle Inhaltsstoffe umgangen werden könnte.

Inzwischen sind eine Vielzahl von Mikroorganismen isoliert worden, die solche Stoffe als Nahrungs- und Energiequellen nutzen oder kometabolisch transformieren können. Das Studium der jeweiligen Stoffwechselwege und der daran beteiligten Proteine und Gene hat das Wissen um die biologische Transformierbarkeit und Stabilität der oben genannten chemischen Substanzen stark erweitert. Der Vergleich der kinetischen Parameter beim Abbau von Schadstoffen direkt im beobachteten Lebensraum mit den Daten der daraus isolierten Mikroorganismen hat jedoch meist Unterschiede gezeigt, die annehmen lassen, dass die erhaltenen Isolate nicht oder jedenfalls nicht allein für den in situ Abbau verantwortlich sind. Auch die seit Anfang 1990 entwickelten Methoden zur direkten molekularbiologischen Analyse von mikrobiellen Population in komplexen Umgebungen haben häufig große Unterschiede in der in situ Populationszusammensetzung und –dynamik im Vergleich zu parallelen kulturabhängigen Untersuchungen gezeigt. Zusätzlich ist häufig das Auftreten von Mikroorganismen nachgewiesen worden, die nicht in Kultur isoliert worden sind. Insgesamt

---

zeigt dieses Bild, dass sich die ökologischen Rahmenbedingungen in einem gegebenen Lebensraum stark von den normalerweise zur Isolierung und Untersuchung von Mikroorganismen angewandten Laborbedingungen unterscheiden und die Rückübertragung von Labordaten auf die praktische Anwendung nur sehr eingeschränkt möglich ist.

Um daher Bioremediation – die Nutzung des metabolischen Potentials von Mikroorganismen für die Reinigung kontaminierter Umgebungen – gezielt und effizient einsetzen zu können, ist eine genaue Kenntnis der in situ Ökologie des jeweiligen Lebensraumes nötig. Dafür müssen Methoden zur Detektion und Quantifizierung von schadstoffabbauenden Mikroorganismen und ihren katabolischen Genen sowie Möglichkeiten zur Feststellung ihrer katabolischen Aktivität verfügbar sein. Weiterhin sollten Daten über die chemisch-physikalischen Rahmenbedingungen wie Feuchte, Temperatur, Salzgehalt, pH-Wert, Bioverfügbarkeit und Konzentration von Nährstoffen sowie der vorliegenden Schadstoffe, Sauerstoffgehalt u. ä. verfügbar gemacht werden. Auf Grundlage solcher Daten kann dann zunächst ermittelt werden, ob potentielle Schadstoffabbauer vorliegen, die durch Änderung ihrer Umgebungsbedingungen zum Abbau angeregt werden können (Biostimulation) oder ob eine Einführung neuer metabolischer Fähigkeiten durch Zugabe von Mikroorganismen oder genetischer Information (Bioaugmentation) notwendig ist. Die Kenntnis solcher ökologischer Rahmenbedingungen kann dann bei der Auswahl eines entsprechenden Inokulums hilfreich sein, um eine stabile Etablierung der neu eingeführten metabolischen Fähigkeiten zu erreichen.

Die vorliegende Arbeit liefert einen Beitrag zu diesem sehr breiten Themengebiet. Es wird hier die Möglichkeit untersucht, eine Bioaugmentation der Mikroorganismenpopulationen von Abwasserreinigungsreaktoren durch die Einführung von Xenobiotika-Abbaugenen auf mobilen genetischen Elementen herbeizuführen.

---

## **2. STAND DES WISSENS**

### **2.1. Xenobiotika**

Als Xenobiotika werden im engeren Sinne chemische Substanzen bezeichnet, die nicht natürlich in der Umwelt vorkommen. Diese Definition ist oftmals erweitert worden auf die Gesamtheit der durch anthropogene Prozesse entstandenen Substanzen, die nach einer Freisetzung eine sehr lange Aufenthaltszeit (Persistenz) in der Umwelt haben. Als Beispiele für Xenobiotika sind polyaromatische Kohlenwasserstoffe, halogenierte aromatische und aliphatische Kohlenwasserstoffe sowie Pestizide zu nennen, die in industriellen Fertigungsprozessen (pharmazeutische Chemie, Farbstoff- und Textilindustrie, Petrochemie), als Bestandteile von synthetischen Kunststoffen, in der Landwirtschaft und anderen Bereichen eingesetzt werden (Dellweg et al. 1992, Rippen 1992). Xenobiotika sind in vielen Fällen nicht oder nur sehr langsam biologisch abbaubar. Abbau und Transformierbarkeit von Xenobiotika durch Mikroorganismen wird seit ca. 1970 intensiv untersucht (Cerniglia 1984, Reineke und Knackmuss 1988, van der Meer et al. 1992).

Wegen ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften sind Xenobiotika in vielen Fällen lipophil und nur wenig wasserlöslich. Dies vermindert ihre Bioverfügbarkeit und kann zu einer Akkumulation in lipophilen Bestandteilen von Lebewesen (Membranen, Fettgewebe) und nachfolgend zu einer Anreicherung in Nahrungsketten führen. Ihre schädigenden Wirkungen hängen von der Einzelsubstanz ab und sind oft nicht genau untersucht. Auf zellulärem Niveau kann es zur Inaktivierung von essentiellen Enzymsystemen (z. B. Glykolyse oder Hämbiosynthese), zu Membraninteraktionen (Zusammenbruch von Transmembrangradienten) sowie zur Interaktion mit Nukleinsäuren (Interkalierung und Bildung von DNA-Addukten mit nachfolgender Bildung von Mutationen) kommen (Forth et al. 2001, Knippers 1997).

Solche Substanzen können mit kommunalen und insbesondere industriellen Abwasserströmen zu Abwasserreinigungsanlagen gelangen. Hier ist nicht nur ihre schwere Abbaubarkeit per se problematisch, sondern auch ihre möglichen nachteiligen Wirkungen auf die Gesamtleistung des Prozesses durch die Schädigung der beteiligten Mikroorganismen. So kann es zur Beeinträchtigung von Nitrifikation und Denitrifikation, der biologischen Phosphatelimination und auch zur Verschlechterung des Absetzverhaltens des Belebtschlammes kommen.



## 2.2. Biologische Abwasserreinigung

Die Entwicklung der Abwassertechnik begann in England in der Mitte des 19. Jahrhunderts. Hier wurden zur Vermeidung von in Ballungsräumen auftretenden Seuchen Kanäle zur Ableitung der Siedlungsabfälle und –abwässer in die nächstgelegenen Flussläufe angelegt. Die dadurch resultierende Belastung von Oberflächengewässern führte zu einer Zerstörung ihres ökologischen Gleichgewichts und auch dazu, dass in Siedlungsnähe entnommenes Flusswasser als Trink- und Brauchwasser nicht mehr verwendbar war. Zur Lösung dieses Problems wurde der Ansatz entwickelt, die biologischen Prozesse, die zur Selbstreinigung von Gewässern führen, in technischen Anlagen unter kontrollierten Bedingungen zu imitieren (Wilderer 2004). In diesen Anlagen werden die im Abwasser partikulär oder gelöst vorliegenden Inhaltsstoffe durch Mikroorganismen zur Energie- und Biomasseerzeugung verwendet. Das so gereinigte Wasser kann dann in den natürlichen Wasserkreislauf zurückgeführt werden. Diese Idee hat im späten 19. Jahrhundert zunächst zur Entwicklung von Tropfkörpern und zu Beginn des 20. Jahrhunderts dann zur Einführung des Belebungsverfahrens geführt (Gujer 1999). Heute existiert eine Vielzahl von Anlagen- und Verfahrenstypen, die in der biologischen Abwasserreinigung zum Einsatz kommen (Tchobanoglous et al. 2003).

### 2.2.1. Mikrobielle Aggregate in der biologischen Abwasserreinigung

Die in biologischen Abwasserreinigungsanlagen auftretenden mikrobiellen Aggregate setzen sich aus einer Mischung von pro- und eukaryontischen Zellen zusammen, die in einer von ihnen selbst produzierten Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet sind (Lemmer et al. 1996), weisen aber auch Freiräume auf, durch die ein diffusiver und zum Teil auch ein konvektiver Massentransport stattfinden kann. Bei den freischwimmenden Aggregaten bilden filamentöse Mikroorganismen ein Rückgrat, das die Struktur des Aggregats verstärkt (Schmid et al. 2003). Zusätzlich können auch partikuläre Substanzen in die Matrix eingebettet und somit einem biologischen Abbau leichter zugänglich gemacht werden.

Man unterscheidet generell drei Typen von Aggregaten, nämlich Flocken, Biofilme sowie Granula (Nicolella et al. 2000).

Flocken sind relativ lockere, freischwimmende Aggregate niedriger Dichte, die in Abhängigkeit von den hydraulischen Bedingungen reversibel aggregieren können. Man kann deshalb eine Flocke nicht als eine fest definierte Einheit betrachten. Im Gegensatz hierzu ist ein Biofilm eine grenzflächenassoziiert wachsende Mikroorganismengesellschaft (Wagner et al. 2002). Hier liegen durch den Kontakt mit den beiden unterschiedlichen Grenzflächen und abhängig von der Dicke des Biofilms oft starke chemische Konzentrationsgradienten vor, die eine Bildung von positionsabhängig sehr verschiedenen ökologischen Mikronischen im Biofilm erlauben. Granula sind ebenfalls wie Flocken freischwimmende Aggregate, weisen aber im Vergleich zu Flocken eine sehr viel kompaktere Struktur auf (Etterer und Wilderer 2001), weswegen sie auch als "self-supporting biofilms" bezeichnet werden können. Die bei Flocken beobachtete Koaggregation tritt bei Granula nicht auf. Während Granula in anaeroben Abwasserreinigungsreaktoren bereits eine weit verbreitete Anwendung finden (Skiadas et al. 2003), ist die Untersuchung von aeroben Granula noch weitgehend im Stadium der Grundlagenforschung (Beun et al. 2002).

### 2.2.2. Belebungs- und SBR-Verfahren

Beim Belebungsverfahren wird die Abwasserreinigung in einem Reaktorraum mit suspendierter Biomasse durchgeführt. Das Abwasser wird hier kontinuierlich zugeführt, ebenso findet eine kontinuierliche hydraulische Verdrängung des Belebtschlamm-Abwasser-Gemisches ("mixed liquor") aus dem Belebungsbecken statt. In einem nachgeschalteten Nachklärbecken wird dann die Biomasse vom geklärten Wasser durch Sedimentation getrennt und teilweise wieder in den Reaktorraum zurückgeführt. Durch diese Schlammrückführung kann die Biomassekonzentration und –verweildauer im Belebungsbecken unabhängig vom Abwasserfluss kontrolliert werden. In diesem Prozess sind also die einzelnen Stadien der Abwasserreinigung (Reaktionsphasen, Trennung der Biomasse von der wäßrigen Phase) räumlich voneinander getrennt, während ein kontinuierlicher Fluß des Wassers durch das System stattfindet (Gujer 1999, Verstraete und van Vaerenbergh 1986).

Eine zeitliche Trennung dieser Stadien liegt beim "Sequencing Batch Reactor" (SBR) – Verfahren zusammen mit einer diskontinuierlichen Prozessführung vor. Hier wird der Reaktorraum während einer Füllphase mit frischem Abwasser beschickt. Nachfolgend finden durch Durchmischung und Belüftung oxische bzw. durch Durchmischung ohne Belüftung anoxische Reaktionsphasen statt. In den letzten Schritten des Verfahrens wird nach einer nicht

durchmischten Phase, in der sich die Biomasse absetzen kann, das geklärte Wasser im Überstand abgezogen. Danach kann dann ein neuer Reaktorzyklus beginnen (Wilderer et al. 2001).

Während beide vorgestellten Verfahren in ihrer ursprünglichen Form mit flockulierter Biomasse betrieben werden, kann durch Einbringen entsprechender Trägermaterialien in den Reaktorraum auch ein Übergang zu Biofilmverfahren erreicht werden (Tchobanoglous et al. 2003, Wilderer 1992). Die Dichte und Partikelgröße des Biofilmträgermaterials sowie die Prozessführung bestimmen hier darüber, ob es sich um ein Festbettverfahren mit einem unbeweglichen Trägermaterial oder um ein Wirbelbettverfahren mit suspendiert vorliegenden Biofilmträgern handelt. Auch Kombinationen von Verfahren mit immobilisierter und suspendierter Biomasse treten auf (Tchobanoglous et al. 2003).

Belebungs- und SBR-Verfahren können zur Elimination von Kohlenstoffverbindungen sowie zur N- und P-Elimination aus Abwasser genutzt werden. Wichtig für die Funktion des Gesamtsystems ist auch eine effiziente Abtrennung der Biomasse vom geklärten Wasser nach der Reaktionsphase. Hierfür ist die Absetzeffizienz und –geschwindigkeit der Bioaggregate von großer Bedeutung.

### 2.2.3. Bioaugmentation

Bioaugmentation ist die gezielte Einführung von Mikroorganismen bzw. genetischer Information in eine mikrobielle Biozönose mit dem Ziel, vorhandene Prozessleistungen zu stabilisieren oder zu beschleunigen oder neue Prozessleistungen zu etablieren. Im Falle von Abwasserreinigungsanlagen kann es sich hierbei sowohl um den Abbau von speziellen Xenobiotika als auch um die Einführung und Stabilisierung von N- und P-Elimination oder die Verbesserung der Schlamm-Absetzeigenschaften handeln (van Limbergen et al. 1998). In vielen Fällen handelt es sich beim biologischen Agenz der Bioaugmentation um eine Reinkultur von Mikroorganismen, aber auch Mischkulturen kommen hier zum Einsatz. Diese Versuche reichen in ihren Dimensionen von Labormaßstabs-Untersuchungen bis hin zu Vorhaben im Grossmaßstab (Major et al. 2002) und haben bisher einen wechselnden Erfolg von der gelungenen Neueinführung von katabolischen Eigenschaften (Watanabe et al. 2002) bis hin zum Verschwinden des neu eingeführten Stammes gezeigt (Bouchez et al. 2000).

Die Beobachtung, dass eingeführte Bakterienstämme möglicherweise nicht in der Lage sind, sich an die neue Umgebung anzupassen und deshalb wieder aus der Biozönose verschwinden,

hat zu einer Weiterentwicklung des Bioaugmentationsansatzes geführt: Da Gene für den Abbau von Xenobiotika häufig auf mobilen genetischen Elementen (MGEs, s. Kap. 2.5.) kodiert sind, die zwischen Bakterienzellen auch über Spezies- und Gattungsgrenzen hinweg übertragen werden können, sind in einer Biozönose bereits auftretende endogene Bakterienstämme durch Aufnahme eines solchen mobilen genetischen Elements möglicherweise in der Lage, den Abbau eines Xenobiotikums zu "erlernen". Bereits um 1980 ist durch die Einführung von katabolischen Genen, die in ein Plasmid inkloniert wurden, das Substratspektrum von Xenobiotika-abbauenden Bakterien erweitert worden (Lehrbach et al. 1984). Infolgedessen könnte die gezielte Einführung von solchen MGEs in eine xenobiotikabelastete Biozönose zur in situ genetischen Modifikation der Bakterienpopulation und damit zum nachfolgenden Abbau der Substanz führen (Pepper et al. 2002, Top und Springael 2003, Top et al. 2002). Für die Bioaugmentation von Bodenmikrokosmen ist ein solcher horizontaler Gentransfer bereits erfolgreich nachgewiesen und mit einem einsetzenden Schadstoffabbau korreliert worden (Dejonghe et al. 2000, Newby et al. 2000a). Auch in Abwasser-Modellreaktoren sind solche Versuche durchgeführt worden. Es wurden Gentransferereignisse detektiert (Nancharaiyah et al. 2003, Rubio und Wilderer 1989) und auch eine Neueinführung von Abbaufähigkeiten (Boon et al. 2002, Boon et al. 2000) bzw. eine Verkürzung der Adaptionszeit und Erhöhung der Prozessstabilität nach Einführung eines Plasmid-tragenden Bakterienstamms in einen Reaktor nachgewiesen (Wilderer et al. 1991), aber eine eindeutige Verbindung des Gentransfers mit einem Abbau eines Xenobiotikums durch entsprechende Empfängerorganismen konnte bisher nur in einem Fall festgestellt werden (Springael et al. 2002).

### **2.3. Bakterielle Taxonomie und Identifizierung**

Die Klassifizierung von Mikroorganismen ist geprägt von Konzepten, die sich mit zunehmender Kenntnis von bakterieller Physiologie, Genetik und Evolution vermehrt gewandelt haben (Cohan 2002). Ein heute allgemein akzeptiertes Konzept für die Klassifizierung von Mikroorganismen – die polyphasische Taxonomie – beruht auf der Erkenntnis, dass nur bei gleichzeitiger Betrachtung einer ausreichenden Zahl von sowohl genetischen als auch physiologischen Parametern eine hinreichende Datenmenge zur Zuordnung von bakteriellen Isolaten zu bestehenden Bakterienarten bzw. zur Begründung

einer neuen Art besteht (Vandamme et al. 1996). Im nachfolgenden soll eine Auswahl dieser Parameter genauer erläutert werden.

### 2.3.1. Genetische Methoden

Diese Methoden beruhen generell auf der Analyse der DNA eines Isolats. Die erste Möglichkeit liegt hierbei in der Ermittlung von DNA-Summenparametern, die eine charakteristische Aussage über ein Isolat ermöglichen. Hierbei soll zunächst die Ermittlung des GC-Gehalts der gesamten DNA erwähnt werden. Diese Analyse beruht auf der Tatsache, dass das Molverhältnis der Basen Guanin und Cytosin zu Adenin und Thymin, beschrieben als GC-Gehalt in %, innerhalb der Prokaryonten von 20 bis 80 % schwanken kann und innerhalb einer gewissen Schwankungsbreite charakteristisch für eine Art ist (Rosselló-Mora und Amann 2001). Die zweite dieser Gesamtanalysen ist die DNA-DNA-Hybridisierung und basiert auf der Annahme, dass zwei bakterielle Isolate mit zunehmendem Verwandtschaftsgrad auch eine zunehmende Menge von identischen DNA-Sequenzen in ähnlicher Anordnung besitzen. Bei einer Mischung von Einzelstrang-DNAs dieser zwei Isolate wird dies durch das Ausmaß, in dem sich bei einer Reassoziaton der Einzelstränge wieder doppelsträngige DNA bildet, reflektiert. Hierbei wird die Reassoziaton einer Mischung von zwei identischen DNA-Proben des zu untersuchenden Isolats als 100%-Wert festgesetzt. Eine vergleichende paarweise Analyse von mit dem Isolat näher verwandten Stämmen lässt dann eine genauere phylogenetische Zuordnung des Isolats zu (Rosselló-Mora und Amann 2001). Eine weitere Möglichkeit zur Typisierung von Gesamt-DNA eines Bakterienstammes ist die Durchführung einer PCR (s. Kap. 2.4.2.2.) mit Primern, die mehrere über ein Bakteriengenom verteilte Bindestellen besitzen. Hierbei wird durch nachfolgende elektrophoretische Auftrennung der Produkte ein für das jeweilige Isolat spezifisches Bandenmuster, ein "genetischer Fingerabdruck" erzeugt (Schloter et al. 2000). Auch hier erlaubt ein Vergleich mit Bandenmustern verwandter Stämme wieder eine phylogenetische Zuordnung.

Im Gegensatz zu Gesamt-DNA-Analysen wird bei der Sequenzanalyse der ribosomalen RNA Gene ein in allen Lebewesen ubiquitär vorhandener Satz von Genen untersucht, die wegen ihrer zentralen Bedeutung für die Proteinbiosynthese hochkonserviert sind und wegen ihrer Länge einen hohen genetischen Informationsgehalt besitzen (Woese 1987). Es sind hier evolutionär bedingte Sequenzveränderungen aufgetreten, die die Identifizierung von

Abschnitten mit unterschiedlicher phylogenetischer Auflösung zulassen (Ludwig und Schleifer 1994). Insbesondere die Analyse der 16S-rDNA bildet mit momentan ca. 100,000 verfügbaren Sequenzen die momentane Basis für eine phylogenetische Einteilung der Prokaryonten. In den meisten Fällen hat die Untersuchung ähnlich hoch konservierter Gene die durch 16S-Analyse ermittelten Verwandtschaftsverhältnisse bestätigt (Daubin et al. 2002). Während GC-Gehalt-Analyse und DNA-DNA-Hybridisierung eine Zuordnung von bakteriellen Isolaten auf Genus- und Speziesebene ermöglichen, ist das genetische Fingerprinting vor allem zur Differenzierung auf Spezies- und Subspezieslevel geeignet (Schloter et al. 2000). Die ribosomale Sequenzanalyse bietet den breitesten Auflösungsbereich, mit der 16S-Sequenz kann hier von Familien- über Genus- bis auf Speziesebene differenziert werden (Vandamme et al. 1996). Für Unterscheidungen auf dem Subspezieslevel ist hier allerdings die phylogenetische Information der 16S-rDNA nicht mehr ausreichend, hier muss dann auf die 23S-rDNA (Ludwig und Schleifer 1994) bzw. falls möglich den "Internal transcribed Spacer" (ITS)-Bereich zwischen 16S- und 23S-rDNA (Houpikian und Raoult 2001) zurückgegriffen werden .

### 2.3.2. Phänotypische Methoden

Bei diesen Methoden handelt es sich um Untersuchungen von Komponenten und Eigenschaften von Bakterienzellen, bei denen es sich nicht um Nukleinsäuren handelt. Diese Parameter sind häufig durch den physiologischen Zustand der Zelle beeinflusst und müssen daher unter standardisierten Kulturbedingungen durchgeführt werden, um eine Vergleichbarkeit der gefundenen Daten untereinander und insbesondere mit Daten anderer Studien zu ermöglichen (Vandamme et al. 1996).

Mit zu den phänotypischen Methoden gehören die meisten klassischen Parameter der bakteriellen Systematik, so z. B. Morphologie der Einzelzellen sowie von ganzen Kolonien, Wachstumsabhängigkeit des Isolats von pH, Temperatur, Sauerstoff- und Salzgehalt, Antibiotikaresistenzen, klassische Enzymtests. Darüber hinaus werden aber auch sog. chemotaxonomische Techniken als Klassifizierungsmethoden herangezogen. Dies sind Untersuchungen von chemischen Substanzklassen (Fettsäuren und Phospholipide, Chinone, Polyamine), die nach Extraktion aus einer Kultur chromatographisch aufgetrennt und somit bzgl. ihrer Zusammensetzung analysiert werden (Rosselló-Mora und Amann 2001). Eine weitere Technik, die jedoch nur zur vergleichenden Analyse von Isolaten angewendet wird,

---

ist die elektrophoretische Analyse von Zellproteinen (Vandamme et al. 1996). In der mikrobiologischen Routineanalytik vor allem im klinischen Bereich haben sich kommerziell erhältliche, auf Substratnutzungsanalysen beruhende Tests durchgesetzt (z. B. BIOLOG, API), die verstärkt auch in der Untersuchung von Umweltisolaten eingesetzt werden. Diese Tests sind eine Weiterentwicklung der klassischen substratabhängigen Wachstumsanalysen und beruhen auf einer parallelen Untersuchung der Metabolisierung einer Vielzahl von Kohlenstoffquellen. Ein Vergleich des ermittelten Substratnutzungsprofils mit einer Datenbank lässt wiederum Rückschlüsse auf die phylogenetische Identität eines Isolats zu, die allerdings durch den Umfang und der Qualität der Datenbank sowie die Eignung des gewählten Substratspektrums für die Analyse des jeweiligen Isolats begrenzt sind (Rosselló-Mora und Amann 2001).

Auch die phänotypischen Methoden haben unterschiedliche phylogenetische Auflösungsvermögen: Substratnutzungsanalysen ermöglichen Einteilungen bis hin zur Speziesebene, ebenso wie Fettsäure-, Phospholipid- und Chinonanalysen, während Proteinanalysen wiederum eine Differenzierung auf dem Subspezieslevel ermöglichen (Vandamme et al. 1996).

### 2.3.3. Artdefinition

Basierend auf den durch polyphasische Analysen gefundenen Daten lässt sich folgende, als phylo-phenetisches Artkonzept bezeichnete Definition für eine Art festlegen: "Eine Art ist eine monophyletische und genomisch kohärente Gruppe von Organismen, die eine hohe Ähnlichkeit bezüglich einer Vielzahl von unabhängigen Parametern aufweisen und durch definierte phänotypische Eigenschaften als zu dieser Art gehörig erkannt werden können." (Rosselló-Mora und Amann 2001)

Ausgehend von dieser Definition ist erkennbar, dass das Ausmaß der Ähnlichkeit insgesamt, aber insbesondere von einzelnen Parametern, variieren kann und nur in Abhängigkeit einer Betrachtung von ausreichend vielen Eigenschaften jeweils für eine bestimmte Art fest definiert werden kann. Ebenso ist wegen der Bedeutung von vergleichenden Analysen die Einbeziehung einer ausreichend hohen Zahl der nächstverwandten Organismen in die Analyse unbedingt notwendig.

Als allgemein gültige genomische Grundlagenparameter, von denen ausgehend eine experimentelle Neufestlegung einer Art getroffen werden kann, sind momentan eine

Ähnlichkeit der DNA-DNA-Hybridisierungswerte von >70% sowie ein Unterschied der GC-Gehalte von <5% als empirisch gefundene Richtwerte akzeptiert. Daraus ableitend weisen Organismen einer Art in der Regel eine Identität ihrer 16S-rRNA Gene von >97% auf, wobei allerdings auch starke Abweichungen auftreten können. Insbesondere der Umkehrschluss, dass zwei Isolate mit einer 16S-rDNA Ähnlichkeit von >97% zur selben Art gehören, ist nicht a priori zulässig und sollte durch die Analyse zusätzlicher Parameter erhärtet bzw. widerlegt werden (Forney et al. 2004).

#### **2.4. Methoden der bakteriellen Populationsanalyse**

Um eine Aussage über Prozesse in der Umwelt und Biotechnologie treffen zu können, bei denen Mikroorganismen beteiligt sind, ist eine vertiefte Analyse der beteiligten Organismen und damit eine phylogenetische Charakterisierung von gemischten bakteriellen Lebensgemeinschaften notwendig. Dies ist eine Grundlage sowohl für die Herstellung von Phylogenie-/Funktionsbeziehungen ("Wer tut was?") als auch für die Erforschung von ökologischen Rahmenbedingungen, die für das Wachstum bestimmter Mikroorganismen mit wünschenswerten physiologischen Eigenschaften notwendig sind.

Aufgrund der morphologischen Ähnlichkeit der meisten Mikroorganismen untereinander waren traditionelle Mikrobiologen in ihren Untersuchungen auf die Charakterisierung von in Reinkultur erhaltbaren Mikroorganismen beschränkt. Das in Kap. 2.3. für Reinkulturen skizzierte Methodenspektrum wurde teilweise jedoch auch direkt für die Untersuchung von mikrobiellen Mischkulturen angewendet und weiterentwickelt. Die Optimalvorstellung hierbei ist allerdings, einen ermittelten (Teil-)parametersatz auch direkt mit einer in der Population vorliegenden Spezies korrelieren zu können, weshalb Methoden zur Bestimmung von Gesamtparametern (DNA-DNA-Hybridisierung, GC-Gehalt, Proteinprofile) hier nicht oder nur sehr beschränkt zum Einsatz kommen. Weitere Methoden wie Substratnutzungsanalysen sowie DNA-Fingerprint-Techniken lassen ebenfalls eine Korrelation mit Einzelspezies nicht zu, werden jedoch in manchen Fällen zur Untersuchung von Änderungen der physiologischen oder genetischen Diversität der Gesamtpopulation herangezogen (Guieysse et al. 2001, Müller et al. 2002, van Heerden et al. 2001). Die meisten Methoden zur Diversitätsanalyse basieren jedoch auf der Untersuchung von ribosomalen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere der 16S-rDNA oder -rRNA (Dahllöf 2002). Hier ist dann eine Korrelation zu einer bestimmten Spezies innerhalb der Population im Rahmen des



phylogenetischen Auflösungsvermögens der ribosomalen Nukleinsäureanalyse möglich (Forney et al. 2004). Aber auch funktionelle Markergene, die charakteristisch für jeweils relevante Teilpopulationen sind, werden untersucht (Dahllöf 2002).

Durch solche kulturunabhängigen Analysen konnten bisher innerhalb der Domäne Bacteria insgesamt 52 verschiedene Phyla identifiziert werden. In Reinkultur liegen bisher nur Vertreter aus der Hälfte dieser Phyla vor (Rappé und Giovannoni 2003). Weiterhin hat ein Vergleich von mikroskopischen Zellzählungen zu Werten, die durch Kultivierung der entsprechenden Proben auf Festmedien erhalten wurden, ergeben, dass nur eine Minderheit der vorliegenden Bakterienzellen kultivierbar ist, während der Rest als so genannte "viable but nonculturable" Mikroorganismen bezeichnet wird (Amann et al. 1995). Insgesamt hat die kulturunabhängige Betrachtung mikrobieller Lebensgemeinschaften also sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Verfälschung des sich durch Kultivierungen ergebenden Bilds der mikrobiellen Biodiversität aufgedeckt. Trotzdem bieten Kultivierungsmethoden die meisten Möglichkeiten zur physiologischen Charakterisierung einer bakteriellen Spezies, weshalb der Versuch zur Isolierung von einer als relevant identifizierten Art immer unternommen werden sollte.

#### 2.4.1. Kultivierung

Die kultivierungsabhängige Analyse von Mikroorganismen durch Wachstum in/auf Flüssig- oder Festmedien bietet den Vorteil, daß sie einen relativ geringen Arbeitsaufwand bzgl. der Probenvorbereitung und auch geringe apparative Voraussetzungen erfordert. Durch die Auswahl von geeigneten Selektivmedien können Gruppen mit sehr unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften untersucht werden, wobei auch eine Quantifizierung über einen sehr weiten Bereich möglich ist. Weiterhin eröffnen Kultivierungen einen direkten Zugang zu Reinkulturen für detailliertere physiologische und phylogenetische Charakterisierungen.

Während Kultivierungen weite Möglichkeiten zur physiologischen Charakterisierung mikrobieller Lebensgemeinschaften bieten, sind direkte Aussagen über die phylogenetische Zusammensetzung der untersuchten Lebensgemeinschaften aufgrund meist ähnlicher physiologischer Eigenschaften phylogenetisch unterschiedlicher Mikroorganismen sowie der bereits erwähnten Nichtkultivierbarkeit meist nur sehr begrenzt möglich.

### 2.4.2. Kulturunabhängige rRNA- und rDNA-basierende Methoden

Zur Analyse herangezogen werden hier sowohl die ribosomalen RNA Gene, d. h. also DNA, als auch direkt die ribosomale RNA. Während die rRNA in den Ribosomen in einigen tausend Kopien pro Zelle vorliegen kann (Amann et al. 1995), ist die Kopienzahl der ribosomalen RNA Operons sehr viel geringer und liegt bei maximal 15 rRNA Operons pro bakteriellem Genom (Klappenbach et al. 2000). Hybridisierungsmethoden (s. Kap. 2.4.2.1.) sind, da sie keinen Signalverstärkungsschritt mit einbeziehen, im Fall der Untersuchung von Nucleinsäuren aus gemischten mikrobiellen Populationen daher meist auf die Analyse von RNA-Spezies beschränkt. Im Gegensatz hierzu können mit PCR-basierenden Methoden (s. Kap. 2.4.2.2.) sowohl DNA als auch RNA untersucht werden. Ein Vergleich von DNA- und RNA-Untersuchungen derselben Probe ermöglicht hier sogar eine Aussage über das Ausmaß der metabolischen Aktivität von Teilpopulationen, da stoffwechselaktive Mikroorganismen über eine höhere Ribosomenzahl verfügen als ruhende Zellen (Ravenschlag et al. 2000).

#### 2.4.2.1. Hybridisierungsmethoden

In diesen Methoden findet eine direkte Hybridisierung von in der Umweltprobe vorliegenden Nucleinsäuren mit DNA-Sonden statt, die spezifisch für phylogenetische Subgruppen sind. Da hier keine vorherige Amplifikation der verwendeten Nucleinsäuren vorgeschaltet ist, werden hierzu relativ große Nucleinsäuremengen benötigt, weshalb diese Methoden in den meisten Fällen auf die Analyse von isolierten ribosomalen RNAs beschränkt sind, weil nur diese in ausreichend großer Menge in der Umweltprobe vorliegen. Vorteil dieser Methoden ist allerdings die Möglichkeit zur Quantifizierung der untersuchten phylogenetischen Gruppen über den Mengenanteil der an die jeweilige Sonde gebundenen RNA bzw. die Möglichkeit zur Analyse der Probe auf Einzelzellebene. Allerdings können hier nur Subgruppen analysiert werden, für die dementsprechende DNA-Sonden vorliegen.

Bei der Dot-Blot-Methode wird aus der Umweltprobe isolierte RNA punktförmig ("Dot") an ein Filtermaterial gebunden. Anschließend wird eine Hybridisierung mit unterschiedlichen DNA-Sonden durchgeführt und die Menge an die RNA gebundene DNA-Sonde nach mehreren Waschschritten quantifiziert (Egli et al. 2003).

Die DNA-Microarray-Methode ist im Prinzip eine Weiterentwicklung der Dot-Blot-Methode und ermöglicht eine simultane Analyse einer Umweltprobe mit einer Vielzahl von DNA-

Sonden im Hochdurchsatz-Verfahren (Ye et al. 2001). Hierbei sind eine Vielzahl unterschiedlicher DNA-Sonden nebeneinander angeordnet an ein Trägermaterial gebunden, und die Hybridisierung wird mit der in Flüssigphase vorliegender RNA-Probe durchgeführt. Wiederum ist nach Detektion der an die Sonden gebundenen RNA eine Aussage über die An- bzw. Abwesenheit von den durch die Sonden repräsentierten phylogenetischen Gruppen möglich (Loy et al. 2002). Die Menge an benötigten DNA-Sonden bzw. Umweltprobe wird hierbei durch eine mikroskopische Ausführung des Trägermaterials und der DNA-Sondenspots so gering wie möglich gehalten, reduziert aber die Möglichkeiten zur Quantifizierung der jeweiligen Subgruppe.

Eine weitere Hybridisierungsmethode ist die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) von ganzen Bakterienzellen (Amann et al. 1995, Moter und Göbel 2000). Hierbei wird eine mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Oligonukleotidsonde direkt in fixierten Bakterienzellen mit der jeweiligen rRNA hybridisiert. Nur Zellen, die in ihrer rRNA die Komplementärsequenz zur jeweils eingesetzten Sonde aufweisen, binden diese und emittieren bei epifluoreszenzmikroskopischer Untersuchung dann ein Fluoreszenzsignal. Mit Hilfe dieser Methode können durch Zellzählungen bzw. Bestimmung des Flächenanteils von sondenmarkierten Zellen an der Gesamtzellfläche ebenfalls Teilpopulationen quantifiziert werden (Daims et al. 2001).

#### 2.4.2.2. PCR-basierende Methoden

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die Vervielfältigung von DNA-Teilstücken aus einer DNA-Umweltprobe, wobei durch Vorschaltung einer reversen Transkription, in der RNA in DNA überführt wird, auch die Analyse von isolierter RNA ermöglicht wird. Die Auswahl des Zielfragments wird hierbei durch die Verwendung von zwei Oligonukleotiden getroffen, deren Basenabfolgen komplementär zu den Enden dieser DNA-Sequenz sind und als Startstellen (Primer) für die enzymatische DNA-Synthese dienen. Die Durchführung einer bestimmten Zahl von Reaktionszyklen führt zu einer exponentiellen Amplifikation der gewünschten Sequenz. In der sog. konventionellen PCR wird der Prozess nach einer bestimmten Zyklenzahl beendet und der Reaktionsansatz auf An- bzw. Abwesenheit eines Produkts und damit Präsenz der Zielsequenz in der ursprünglichen Probe (template-DNA) untersucht, wobei eine Quantifizierung meist nur sehr begrenzt über Bestimmung der Menge an produziertem PCR-Produkt möglich ist. Im Gegensatz hierzu wird in der real-time-PCR

nach jedem Reaktionszyklus die Menge an produziertem PCR-Produkt gemessen. Durch Bestimmung der Zyklenzahl, bei der die Produktmenge einen bestimmten Grenzwert überschreitet, kann die ursprüngliche Kopienzahl der Zielsequenz in der template-DNA sehr genau quantifiziert werden (Ahmed 2002).

Ähnlich wie bei der Auswahl von zur Hybridisierung verwendeten DNA-Sonden können hier auch 16S-rDNA-spezifische PCR-Primer eingesetzt werden, die in der Lage sind, 16S-Fragmente von unterschiedlichen phylogenetischen Gruppen zu amplifizieren (Widmer et al. 1998). Je nach Einsatz in der konventionellen bzw. real-time PCR können somit ebenfalls die untersuchten phylogenetischen Gruppen detektiert oder quantifiziert werden (Smits et al. 2004).

Da bei Einsatz von gruppenspezifischen 16S-rDNA PCR-Primern aus einer Umweltprobe eine Mischung von sequenzverschiedenen Produkten amplifiziert werden kann (Watanabe et al. 2001), bieten PCR-basierende Verfahren die Möglichkeit, die phylogenetische Auflösung der Untersuchung durch eine Trennung und evtl. nachfolgende Sequenzanalyse der Einzelsequenzen zu erhöhen, was bei einer Hybridisierungsmethode nur durch die Verwendung unterschiedlicher DNA-Sonden erreicht werden kann.

Bei der Klonierung von 16S-PCR-Fragmenten erreicht man eine Trennung der Sequenzen durch die Tatsache, daß bei Transformation der in einen Vektor einligierten Produkte in der Regel pro transformierter Zelle nur jeweils ein Plasmidmolekül aufgenommen wird, so dass jede nach der Transformation anwachsende Kolonie nur Plasmide mit einem einzigen PCR-Produkt enthält. Durch Sammeln einer ausreichend großen Anzahl von Klonen kann so eine große Zahl unterschiedlicher 16S-PCR-Produkte aus einer Umweltprobe zugänglich gemacht werden. In der Regel werden dann die DNA-Sequenzen der PCR-Produkte entweder von einer Auswahl oder von allen gesammelten Klonen bestimmt (Snaidr et al. 1997). Diese Methode hat den Vorteil, dass auf diese Weise fast vollständige 16S-Gensequenzen bestimmt werden können, ist aber arbeitsintensiv und teuer, so dass nur eine sehr limitierte Anzahl von Proben mit ihr bearbeitet werden können.

Eine größere Zahl von Proben lässt sich mit Verfahren bearbeiten, die eine gelelektrophoretische Trennung von einer PCR-Produkt-Population herbeiführen und somit einen so genannten "Community fingerprint", ein für die jeweilige Probe charakteristisches Bandenprofil erstellen. Hierbei ist zu beachten, dass die meisten dieser Verfahren entweder mehrere Banden für einen Organismus produzieren können bzw. dass PCR-Produkte von verschiedenen Organismen im Gel möglicherweise komigrieren und deswegen hier nur eine

Bande gebildet wird. Für weitergehende Untersuchungen können dann Banden von Interesse aus dem Gel eluiert und ihre Sequenz bestimmt werden.

In der denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) (Muyzer et al. 1993, Muyzer und Smalla 1998) wird eine Trennung von sequenzverschiedenen PCR-Produkte gleicher Länge dadurch herbeigeführt, daß man die elektrophoretische Auftrennung entlang eines Harnstoff-Formamid-Gradienten durchführt, der zu einer partiellen Denaturierung des doppelsträngigen Produktes führt. Produkte unterschiedlicher Sequenz denaturieren bei verschiedenen Konzentrationen des Denaturierungsmittels, also an unterschiedlichen Positionen innerhalb des Gels. Da die Denaturierung zu einer stark verminderten elektrophoretischen Mobilität des Produkts führt, wird so eine Trennung unterschiedlicher Sequenzen erreicht. Nachteil dieser Methode ist die Limitierung der PCR-Produkt-Länge auf ca. 600 bp und die damit verbundene Limitierung der verfügbaren Sequenzinformation.

Eine weitere Möglichkeit zur Auflösung von 16S-Sequenzdiversität innerhalb einer Probe bietet sich durch die Spaltung der PCR-Produkte mit Restriktionsenzymen: da Produkte unterschiedlicher Sequenz eine variable Anzahl von Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme an unterschiedlichen Stellen innerhalb des Produkts aufweisen, kann ein PCR-Produkt in mehrere DNA-Stücke unterschiedlicher Länge aufgespalten werden, die wiederum gelelektrophoretisch differenziert werden können. In der sog. ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis) werden alle dieser Fragmente analysiert. Da hier aber für eine Sequenz mehrere Banden gebildet werden, wird diese Technik meist zur Differenzierung von Reinkulturen (Brim et al. 1999) sowie zur Unterteilung von Klonbibliotheken in unterschiedliche taxonomische Gruppen eingesetzt (Bakermans und Madsen 2002). Im T-RFLP (terminalen Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus) wird durch Einsatz eines fluorophormarkierten PCR-Primers erreicht, daß von einer Sequenz nur jeweils die terminalen Restriktionsfragmente in die Diversitätsanalyse mit einbezogen werden. Somit ist sichergestellt, daß für ein PCR-Produkt nur eine Bande produziert wird, was die Methode wiederum geeignet für die Analyse der Diversität von komplexen Umweltproben macht (Osborn et al. 2000). Allerdings ist durch den Einsatz der fluoreszenzmarkierten Primer eine entsprechende Elektrophoreseausrüstung erforderlich, in den meisten Fällen ein Kapillarelektrophoresegerät.

Während die Zielsequenz für Klonbibliotheken, DGGE, ARDRA und T-RFLP meist das 16S-rRNA Gen ist, wird in der RISA (ribosomal intergenic spacer analysis) die sog. ITS-Region (internal transcribed spacer) zwischen 16S und 23S rRNA Gen für die Diversitätsanalyse herangezogen. Während in den meisten bakteriellen Phyla die Anordnung 16S-ITS-23S

innerhalb eines *rrn* Operons konserviert ist, weisen die ITS-Regionen unterschiedlicher Spezies, Subspezies und manchmal auch verschiedener *rrn*-Operons eines Stammes meist einen ausgeprägten Längenpolymorphismus auf. Bei einer PCR mit Einsatz von Primern, die am Ende der 16S-rDNA und am Beginn der 23S-rDNA binden, wird deshalb aus einer Umweltprobe eine Population von längenunterschiedlichen PCR-Produkten produziert, die dann mit einer entsprechenden Agarose- oder Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt werden können (Garcia-Martinez et al. 1999).

#### 2.4.3. Nachweis von bestimmten Genen bzw. Organismen in einer bakteriellen

##### Mischpopulation

Die oben genannten Hybridisierungs- und PCR-basierenden Methoden sind in ihrer Anwendung nicht beschränkt auf ribosomale Nukleinsäuren, sondern sind auch zur Detektion von funktionellen Genen und Nachverfolgung von in die Umweltpopulation eingeführten Organismen eingesetzt worden. Hybridisierungsmethoden werden hier allerdings aufgrund ihrer relativ geringen Empfindlichkeit nur selten eingesetzt, stattdessen findet hier die PCR wegen ihrer hohen Sensitivität eine breite Anwendung. Auch hier ist wiederum über die Untersuchung der entsprechenden mRNA eine Aussage über den Aktivitätszustand der jeweiligen Gene möglich.

Wiederum durch den Einsatz entsprechend ausgewählter PCR-Primer können hier Gene, die für an wichtigen Stoffumsätzen beteiligte Proteine kodieren, detektiert und somit ebenfalls eine Aussage über die zugehörige Population getroffen werden. Quantifizierungen durch den Einsatz von real-time PCR sind ebenso möglich wie Diversitätsanalysen der funktionellen Gene durch die nachfolgende Analyse von Klonbibliotheken oder den Einsatz von Fingerprint-Techniken wie DGGE und (T-)RFLP. In Umweltproben häufig untersuchte Beispiele sind Oxygenase-Gene, die beim Abbau von Kohlenwasserstoffen beteiligt sind (Junca und Pieper 2003), die am Stickstoff-Kreislauf beteiligten Gene *amoA* (Nicolaisen und Ramsing 2002), *nirK* (Avrahami et al. 2002), *nirS* (Taroncher-Oldenburg et al. 2003) und *nosZ* (Rich et al. 2003) sowie die beim der Methanstoffwechsel relevanten *pmoA* (Hoffmann et al. 2002) und *mxoF* (Fjellbirkeland et al. 2001) Gene.

Eine andere Anwendung der PCR ist die Nachverfolgung eines bestimmten Organismus, der zu einer Umweltprobe z. B. für die Bioaugmentation zugegeben wurde und dessen Populationsgröße bestimmt werden muss, damit diese mit der Leistungscharakteristik des

untersuchten Systems korreliert werden kann (Widada et al. 2002). Hierbei sind phylogenetische Marker wie ribosomale Gene nur begrenzt geeignet, da in der Umweltprobe auch ähnliche Spezies bereits vorhanden sein können, die dann nicht vom zugegebenen Organismen unterschieden werden können. Wünschenswert für eine genaue Bestimmung der Zielorganismus ist hier ein spezifisches Reporterogen, dessen natürliches Auftreten in der Probe unwahrscheinlich ist. Häufig wird ein solches Reporterogen erst durch genetische Manipulation in den Organismus eingeführt, so z. B. die Gene für die rot und grün fluoreszierenden Proteine *dsRed* (Steidle et al. 2001) und *gfp* (Casavant et al. 2003), die auch in dieser Arbeit eingesetzt werden.

Die erwähnten Reporterogene sowie auch noch eine Reihe weiterer, viel verwendeter Gene, darunter *luxAB* (Elvang et al. 2001), *lacZ* (Dejonghe et al. 2000) u. a. werden auch unabhängig von Hybridisierungen bzw. PCR als Reporterkonstrukte durch die von ihnen kodierten Proteine benutzt und können z. B. durch ihre Eigenfluoreszenz (GFP und dsRed), die Entwicklung von Chemolumineszenz (LuxAB) oder durch die Produktion chromogener Substrate (LacZ) detektiert und quantifiziert werden. Auch die vorliegende Arbeit zeigt Beispiele für den Einsatz von GFP und DsRed auf mikroskopischer Ebene.

#### 2.4.4. Identifizierung von Phylogenie-Funktions-Beziehungen

Ein grundlegendes Problem der Betrachtung von gemischten Populationen von Mikroorganismen ist die Korrelation der durch die Population laufenden Stoffstrom-Teilflüsse mit der Phylogenie der an den jeweiligen Umsetzungen beteiligten Organismen. Da nur in seltenen Fällen eine direkte Beziehung zwischen Phylogenie und Physiologie eines Mikroorganismus – so z. B. im Falle von Ammonium und Nitrit oxidierenden Bakterien – besteht und sehr viele Spezies eine hohe physiologische Versatilität aufweisen, ist die Klärung der Frage "Wer tut was?" eine der größten Herausforderungen der mikrobiellen Ökologie (Gray und Head 2001). Dies gilt insbesondere dann, wenn auch kultivierungsabhängige Untersuchungen keinen Erfolg aufweisen. Allerdings müssen auch aus gelungenen Kultivierungsversuchen getroffene Aussagen über die in situ Physiologie einer bakteriellen Mischgesellschaft mit Vorsicht bewertet werden: die traditionelle Annahme, dass *Nitrobacter* spp. die dominanten Nitrit oxidierenden Bakterien (NOB) in Belebtschlamm sind, beruht auf der Tatsache, daß diese am häufigsten in den mit hohen Nitrit-Konzentrationen versetzten Kulturmedien aus Belebtschlamm isoliert werden konnten. In einem Belebungsbecken liegen

allerdings meist nur sehr niedrige *steady-state*-Konzentrationen von Nitrit vor, und FISH-basierende in situ Analysen zeigten auch, dass oft die bei diesen Verhältnissen schneller wachsenden *Nitrospira* spp. die dominanten NOB-Populationen bilden (Wagner et al. 2002). Auch für Ammoniumoxidierer konnte gezeigt werden, dass *Nitrosomonas europaea* nicht immer die dominante AOB-Spezies in Belebtschlamm ist, sondern auch andere Nitrosomonaden (Juretschko et al. 1998, Regan et al. 2003, Rowan et al. 2003) sowie in manchen Fällen auch *Nitrospira* spp. (Coskuner und Curtis 2002) nachgewiesen werden können.

Es sind inzwischen einige Methoden entwickelt worden, die die Aufklärung solcher Phylogenie-Funktionsbeziehungen ermöglichen. Die meisten davon beruhen auf der Inkorporation von mit einer C-Quelle aufgenommenen Schwerisotopen – in den meisten Fällen  $^{13}\text{C}$  und  $^{14}\text{C}$  – in Biomasse oder Nukleinsäuren. Diese Inkorporation findet zunächst nur bei den Organismen statt, die die entsprechende C-Quelle verwerten können. In einem nachfolgenden Schritt werden dann die isotopenangereicherten Nukleinsäuren isoliert und somit kann dann die phylogenetische Identität der Verwerter aufgeklärt werden, bzw. es wird mit einer Kombination von Autoradiographie und Hybridisierung eine phylogenetische Analyse der markierten DNA oder Biomasse durchgeführt.

Die erste der hier diskutierten Techniken ist das "Stable isotope probing" (SIP). Hierbei werden mit dem Stabilisotop  $^{13}\text{C}$  angereicherte Substrate zu einer Mischpopulation zugegeben. Nach Inkorporation wird dann die von den Substratverwertern mit  $^{13}\text{C}$  angereicherte RNA, die eine höhere Dichte aufweist als die unmarkierte RNA von Nicht-Verwertern, mittels einer Dichtegradientenzentrifugation von dieser unmarkierten RNA physikalisch getrennt. Die so gewonnene, im Optimalfall nur von den Substratverwertern stammende RNA kann dann mit PCR-basierenden Methoden der bakteriellen Populationsanalyse untersucht werden (Manefield et al. 2002, Radajewski et al. 2000, Radajewski et al. 2003).

Bei der Fluoreszenz in situ Hybridisierung in Kombination mit Mikroautoradiographie (FISH-MAR) werden mit radioaktiven Isotopen ( $^{14}\text{C}$ ,  $^{33}\text{P}$ ) markierte Substrate verwendet, die in die Biomasse der Substratverwerter inkorporiert werden. Nach Auftragen einer so behandelten Bakteriensuspension auf ein Deckglas können Substratverwerter auf Einzelzellebene bzw. auf Ebene von Zellclustern mit Hilfe einer Mikroautoradiographie detektiert werden. Eine gleichzeitige FISH gibt Informationen über die phylogenetische Identität der beteiligten Organismen (Gray et al. 2000, Lee et al. 1999).



Auf einem ähnlichen Prinzip basiert die sog. "Isotope Array-Technik": auch hier müssen Radioisotope aus zugegebenen Substraten in die RNAs der Substratverwerter eingebaut werden. Die phylogenetische Diversität der Gesamtprobe wird dann mit einem phylogenetischen Microarray untersucht, während eine nachfolgende Autoradiographie des Arrays dann zeigt, welche der phylogenetisch identifizierten RNA-Proben Radioisotope trägt und somit einem Substratverwerter zuzuordnen ist (Adamczyk et al. 2003).

Es sollen noch einige weitere kulturunabhängige Techniken erwähnt werden, die eine funktionelle Charakterisierung von Mischpopulationen in Verbindung mit phylogenetischen Untersuchungen zulassen. Die erste verwendet die Inkorporation von Brom-Desoxyuridin in zelluläre RNA von nach Substratzugabe schnell wachsenden Zellen. Die so markierte RNA kann dann durch Antikörperbindung der bromierten Base isoliert und analog zum SIP weiter untersucht werden (Artursson und Jansson 2003, Borneman 1999, Urbach et al. 1999). Der Unterschied zu SIP liegt hierbei nicht in der spezifischen Inkorporation von markierten Substratomen in die RNA, sondern es wird durch die Substratzugabe lediglich eine Wachstumserhöhung der Substratverwerter erreicht, die zu einer beschleunigten Inkorporation eines markierten Nukleotids führt. Die zweite hier erwähnenswerte Technik ist die physikalische Isolierung von FISH-markierten Einzelzellen oder Mikrokolonien. Durch eine solche Isolierung ist es gelungen, durch nachfolgende RT-PCR eine fast vollständige 16S-rRNA Sequenz eines neuen denitrifizierenden Bakteriums zu ermitteln (Thomsen et al. 2004). Möglicherweise ist diese Vorgehensweise auch auf funktionelle Gene übertragbar.

Eine weitere Möglichkeit zur physikalischen Isolierung von hybridisierten Zellen ist kürzlich von Zwirgmaier et al. (2004a) vorgestellt worden. Allerdings wird hier mit Polynukleotidsonden hybridisiert, mit deren Hilfe auch Einzelkopie-Gene und damit funktionelle Gene als Zielsequenzen für die Hybridisierung gewählt werden können. Die in Mikrotiterplatten isolierten Zellen konnten nachfolgend mit FISH wieder phylogenetisch analysiert werden. Die hier vorgestellte Möglichkeit des Einzelkopie-Gennachweises durch Polynukleotidsonden ist auch bereits analog zu konventioneller FISH mit fluoreszenzmarkierten Sonden durchgeführt worden und hat so die Fluoreszenzmarkierung und nachfolgende mikroskopische Identifizierung von Einzelzellen mit bestimmten funktionellen Genen ermöglicht (Zwirgmaier et al. 2004b). Bisher ist die Polynukleotidsonden-Technologie allerdings nur mit Reinkulturen und definierten Mischungen von Zellen erprobt worden, und weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob eine Übertragung auf komplexe Umweltproben möglich ist.

## 2.5. Mikrobielle Anpassung durch Mutationen und horizontaler Gentransfer

Mikrobielle Lebensgemeinschaften in der Umwelt unterliegen einer Reihe von Stresseinflüssen wie wechselnden Substratbedingungen sowie Substratlimitation, Temperaturänderungen und zeitweilige oder dauerhafte Exposition gegenüber toxischen Substanzen. Sowohl die einzelne Bakterienspezies wie auch eine Mischpopulation als Ganzes haben eine Reihe von Anpassungsmethoden entwickelt, die eine Nutzbarmachung neuer Substrate sowie einen Schutz vor schädigenden Umwelteinflüssen ermöglichen und – in Bezug auf einen längeren Zeitraum – die molekularen Grundlagen für ihre Evolution darstellen.

Zunächst hat eine Exposition einer Mischgesellschaft gegenüber einem neuen potentiellen Substrat nur eine Auswirkung auf die Teilpopulationen, die a priori in der Lage zur Verwertung dieses Substrats sind. Bei diesen Teilpopulationen kommt es zunächst zur Induktion der Enzyme zum Abbau dieses Substrats, gefolgt von einem durch die neue Energie- und Biomassequelle getriebenem präferentiellen Wachstum der Subpopulation. Im Falle einer Abwesenheit von solchen abbauenden Subpopulationen bzw. bezogen auf andere Subpopulationen kommt es durch Mutationen oder den Erwerb neuer genetischer Information zur Entstehung eines neuen Phänotyps, der wiederum in der Lage zur Nutzung des neuen Substrats ist. Diese Vorgänge benötigen einen längeren Zeitraum als die vorher erwähnten Prozesse von Induktion und präferentiellen Wachstum und werden als die hauptsächlichsten Vorgänge bei der Entstehung von Xenobiotika-Abbaufähigkeiten angesehen (van der Meer et al. 1992).

Bei DNA-Neuanordnungen kommt es zur Neuzusammensetzung von Genen, die für einen Abbauweg benötigt werden bzw. zur Erweiterung des Gensatzes für einen bestehenden Abbauweg, der dann eine erweiterte Substratspezifität erhalten kann. Neue Einzelgene, die für Proteine mit veränderten Substratspezifitäten und veränderten Katalysefähigkeiten kodieren, können entweder durch Punktmutationen oder durch die Neukombination unterschiedlicher funktioneller Domänen entstehen. Weiterhin kann die Neuaufnahme von DNA aus der Umwelt oder von anderen Bakterienzellen ebenfalls im Zusammenspiel mit der vorherigen genetischen Ausstattung der Zelle zu einer Neubildung eines Abbauwegs und damit zur Verwertung eines neuen Substrats führen (Arber 1990, van der Meer et al. 1992, van der Meer und Sentschilo 2003).

Bei der Aufnahme von DNA durch eine Bakterienzelle spielen verschiedene Mechanismen eine Rolle. Während die Aufnahme von freien DNA-Molekülen aus der Umgebung als

Transformation bezeichnet wird, ist Konjugation die Übertragung von genetischer Information von Bakterienzelle zu Bakterienzelle. Weiterhin wird die als Transduktion bezeichnete Übertragung von DNA durch bakterielle Viren (Bakteriophagen), die auf diesem Weg Teile des Genoms ihrer vorigen Wirtszellen auf den neu infizierten Mikroorganismus übertragen, als Möglichkeit des Erwerbs neuer genetischer Information diskutiert. Diese Einführung neuer genetischer Information in bereits bestehende Zellen wird als horizontaler Gentransfer (HGT) bezeichnet, im Gegensatz zum vertikalen Gentransfer, bei dem genetische Information durch Vererbung weitergegeben wird (Wuertz 2002). Man nimmt an, dass die in mikrobiellen Aggregaten vorliegenden geschützten Mikroumgebungen einen horizontalen Gentransfer durch bessere physische Kontaktmöglichkeiten zwischen Bakterienzellen bzw. DNA und Bakterienzellen stark erleichtern, weshalb insbesondere Biofilme als "Hot spots" für den HGT angesehen werden. Weitere Untersuchungen deuten darauf hin, dass sich HGT wiederum in einer Rückkopplung als stabilisierend auf die Biofilmstruktur auswirken kann (Ghigo 2001, Molin und Tolker-Nielsen 2003).

## 2.6. Mobile genetische Elemente (MGEs)

Der horizontale Genpool, also die Menge an genetischer Information, die zwischen Bakterienzellen übertragen werden kann, stellt für die mikrobielle Evolution ebenso wie für den nicht-permanenten Austausch von genetischer Information zwischen Bakterienzellen über einen weiten phylogenetischen Bereich hinweg eine wichtige Komponente dar. So wird z. B. angenommen, dass 24% des Genoms von *Escherichia coli* durch horizontalen Gentransfer aufgenommen und nachfolgend in das bestehende Genom einrekombiniert wurde. Mobile genetische Elemente sind definiert als DNA-Moleküle ohne festen Aufenthalt, die nicht in der Lage sind, außerhalb eines Wirtsorganismus zu replizieren (Turner et al. 2002). Nachfolgend sollen einige Formen von mobilen genetischen Elementen genauer betrachtet werden.

Plasmide bilden die wohl bekannteste Gruppe von mobilen genetischen Elementen und werden auch für gen- und biotechnische Zwecke weit genutzt. Sie sind DNA-Moleküle mit einer Größe von wenigen bis hin zu einigen hundert kbp, die über eigenständige Replikations- und Segregationssysteme verfügen. In den meisten Fällen bilden sie ringförmig geschlossene Strukturen, es sind jedoch auch lineare Plasmide gefunden worden. In einer Bakterienzelle treten sie normalerweise als vom Genom getrennt vorliegende Moleküle auf. Typisiert werden Plasmide häufig nach ihrer Inkompatibilitätsgruppe. Zwei Plasmide werden als inkompatibel

(d. h. zur selben Inkompatibilitätsgruppe gehörig) bezeichnet, wenn sie ähnliche molekulare Systeme der Replikation und Partitionierung besitzen und deshalb untereinander um eine stabile Vererbung konkurrieren, was ohne einen Selektionsdruck zum Verlust eines der Plasmide führt. Inzwischen sind einige Inkompatibilitäts (Inc)-Gruppen bekannt geworden, die sich auch in ihrem potentiellen Wirtsspektrum unterscheiden. Während z. B. Inc P, N, W und Q Plasmide einen allgemein breiten Wirtskreis innerhalb der gram-negativen Bakterien besitzen, sind Plasmide der Gruppen F und I auf eine enge phylogenetische Gruppe begrenzt (Novick 1987, Pukall et al. 1996). Weiterhin unterscheiden sich Plasmide dadurch, ob sie selbst-übertragbar (konjugativ) zwischen bestehenden Bakterienzellen sind, durch Gene des Wirtsorganismus zur Übertragung mobilisiert werden können, jedoch nicht selbst die genetische Ausstattung dafür besitzen (mobilisierbar), oder gar nicht auf diese Weise übertragen werden können. Die konjugativen Plasmide, die gleichzeitig das breiteste Wirtsspektrum aufweisen, gehören zur Klasse IncP1- $\beta$ . Hierunter fallen auch die meisten Plasmide, die Gene für den Abbau für xenobiotische Substanzen tragen (Top et al. 2002).

Im Gegensatz zu Plasmiden sind Transposons genetische Elemente, die in das Genom der Wirtszelle selbst integriert werden. Sie sind mobile genetische Elemente in dem Sinn, dass sie in der Lage sind, sich von einer genomischen Position zu einer anderen zu bewegen, ohne dass eine genetische Homologie zwischen Donor- und Akzeptorstelle bestehen muss. Eine vom Transposon kodierte Transposase katalysiert hier sowohl das Ausschneiden des Transposons an spezifischen Endsequenzen als auch eine Spaltung der Zielstelle, an der es wieder eingefügt wird. Diese Zielstelle kann bei einigen Transposons zufällig gewählt werden, bei anderen aber auch wiederum aus einer definierten Zielsequenz bestehen. Die kleinstmögliche Form eines Transposons besteht aus Transpositionsgenen, die von den entsprechenden Erkennungssequenzen flankiert sind und wird auch als IS (Insertions)-Element bezeichnet. Während Klasse-I-Transposons aus einer Genregion bestehen, die von zwei vollständigen IS-Elementen eingerahmt ist, sind Klasse-II-Transposons eher mit IS-Elementen zu vergleichen, die zusätzlich zu den Transpositionsgenen auch noch weitere genetische Information innerhalb der Erkennungssequenzen für die Transposition tragen (Knippers 1997). Auch hier sind wiederum eine Reihe von Transposons bekannt, die katabolische Gene tragen (Tsuda et al. 1999). Ebenso sind die auf Plasmiden liegenden katabolischen Genkluster häufig Teile von Transposons (Tan 1999). Dies zeigt, dass auch diese MGEs selber durch Transposonintegration modifiziert werden können und weist gleichzeitig auf einen Weg hin, wie Transposons zwischen Bakterienzellen übertragen können.

---

Als letztes Beispiel für MGEs sollen hier noch integrative konjugative genetische Elemente (ICE-lands, genomic islands) erwähnt werden. Hier handelt es sich um eine Mischform zwischen Transposon und Plasmid: Es tritt bei diesen Elementen sowohl eine chromosomal integrierte Form als auch eine plasmidartige, ringförmig geschlossene Form auf, die durch konjugativen Transfer zwischen Bakterienzellen übertragen werden kann. Ebenso wie bei Plasmiden und Transposons gibt es auch hier Beispiele von ICE-lands, die Gene für den Katabolismus von Xenobiotika tragen (Springael und Top 2004, van der Meer und Sentchilo 2003).

### **3. ARBEITSHYPOTHESE**

Aus den vorangegangenen Ausführungen wird klar, dass es eine Reihe von Möglichkeiten gibt, neue metabolische Funktionen in mikrobiellen Lebensgemeinschaften einzuführen und zu etablieren. Für Bioremediation in der praktischen Anwendung werden diejenigen Möglichkeiten erfolgreich sein, die über einen breiten Anwendungsbereich hinweg mit möglichst wenig Modifikationen und geringem apparativem Aufwand einsetzbar sind. Hier bietet sich eine genetische Modifikation der bereits vorliegenden mikrobiellen Biozönose an, die auch möglichst direkt im jeweils vorliegenden biologischen System, also vor Ort, durchgeführt werden kann. Von Vorteil ist hier die Beobachtung, dass die genetische Information für den Abbau von xenobiotischen Substanzen häufig auf mobilen genetischen Elementen (MGEs) kodiert ist, die zwischen bestehenden Bakterienzellen ausgetauscht werden können. So kann ein Bakterium in die Lage versetzt werden, den Abbau eines Xenobiotikums durch Aufnahme eines MGEs zu "erlernen". Vielversprechende MGEs sind hier Plasmide der Gruppe IncP1- $\beta$ , da sie einen breiten Wirtsbereich besitzen, selbstübertragbar sind und bereits eine Reihe von katabolischen Plasmiden dieser Gruppe beschrieben ist.

Horizontaler Transfer von IncP1- $\beta$  Plasmiden ist bereits in vielen Modellsystemen nachgewiesen worden. Allerdings korrelieren nur wenige Untersuchungen ein Auftreten von Transkonjuganten erfolgreich mit einem Xenobiotikaabbau, für Abwasser-Modellreaktoren gibt es hier nur eine Studie (Springael et al. 2002). Da immobilisierte Bakteriengesellschaften als Umgebung angesehen werden, in der es häufig zu Gentransfer-Ereignissen kommt, wird folgende Arbeitshypothese aufgestellt:

Aufgrund der hohen mikrobiellen Diversität in Abwasserbiozönosen und ihrer Organisation in immobilisierten mikrobiellen Aggregaten sollte eine plasmid-vermittelte Bioaugmentation von Biofilm-Abwasserreinigungsreaktoren mit katabolischen Plasmiden der Klasse IncP1- $\beta$  erfolgreich durch einfache Zugabe von Plasmid-Donoren durchführbar sein.

Aus dieser Hypothese können dann folgende Anforderungen abgeleitet werden, denen entsprochen werden muss, um eine erfolgreiche experimentelle Betrachtung der Arbeitshypothese zu gewährleisten:

- 
- Verwendung von Plasmiden, die Gene für den partiellen oder vollständigen Abbau von entsprechenden Substanzen tragen.
  - Voruntersuchungen sollten Aufschluss über das mögliche Wirtsspektrum für das jeweilige Plasmid in der untersuchten Abwasserbiozönose geben.
  - Das jeweilige Modellxenobiotikum sollte im Interesse der experimentellen Handhabbarkeit einfach nachweisbar und quantifizierbar sein und in vollständig gelöster Form im Reaktor vorliegen.
  - Es sollte kein Abbau der Modellsubstanz durch natürliche Adaption der vorliegenden Bakteriengesellschaft im betrachteten Zeitraum stattfinden, oder es sollten zumindest deutlich unterschiedliche Abbaukinetiken vorliegen, um einen Abbau durch Transkonjuganten sicher nachweisen zu können.
  - Aus demselben Grund sollte der Plasmid-Donor ebenfalls nicht in der Lage sein, das Modellxenobiotikum im Reaktor abzubauen.
  - Eine kulturunabhängige Detektion und Quantifizierung des Plasmidtransfers im Reaktor sollte möglich sein, um das in situ Verhalten des Plasmids analysieren zu können.
  - Parallel dazu sollten kulturabhängige Analysen der Transkonjugantenpopulationen durchgeführt und nach Möglichkeit mit den kulturunabhängigen Untersuchungen verglichen werden.

In der vorliegenden Arbeit werden zwei Modellsysteme mit unterschiedlichen Plasmiden und Modellxenobiotika (Plasmid pJP4 und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure sowie Plasmid pNB2 und 3-Chloranilin) in Bezug auf die aufgestellte Hypothese untersucht. Da Arbeiten von Wilderer et al. (1989) gezeigt haben, dass es bei Behandlung xenobiotikabelasteter Deponiesickerwässer zu Biomasseverlusten in Suspensions-SBRs kommen kann, werden in den hier beschriebenen Versuchen Biofilm-Modellreaktoren eingesetzt, um dies zu vermeiden. Zusätzliche Begleituntersuchungen werden zur Bearbeitung der sich aus den obigen Anforderungen ergebenden Fragestellungen und Probleme durchgeführt.

## 4. MATERIAL UND METHODEN

### 4.1. Bakterienstämme

| Stamm  | Herkunft         |
|--|------------------|
| <i>Escherichia coli</i> CC118 $\lambda$ pir – pUTgfp2x | J. K. Jansson    |
| <i>Escherichia coli</i> CC118 $\lambda$ pir – pUTdsRed | S. Molin         |
| <i>Escherichia coli</i> HB101 – pRK2013                | WGA              |
| <i>Pseudomonas putida</i> mt-2 DSM3931                 | DSM              |
| <i>Pseudomonas putida</i> KT2442                       | S. Molin         |
| <i>Pseudomonas putida</i> SM1443                       | S. Molin         |
| <i>Pseudomonas putida</i> SM1443::gfp2x                | diese Arbeit     |
| <i>Pseudomonas putida</i> SM1443::gfp2x – pWW0::dsRed  | diese Arbeit     |
| <i>Pseudomonas putida</i> SM1443::gfp2x – pJP4::dsRed  | diese Arbeit     |
| <i>Pseudomonas putida</i> SM1443::gfp2x – pNB2::dsRed  | diese Arbeit     |
| <i>Pseudomonas putida</i> KT2442 – pJP4::dsRed         | diese Arbeit     |
| <i>Pseudomonas putida</i> KT2442 – pNB2::dsRed         | diese Arbeit     |
| <i>Ralstonia eutropha</i> JMP134 DSM4058               | DSM              |
| <i>Comamonas testosteroni</i> DSM 38                   | TU Mikrobiologie |
| <i>Comamonas testosteroni</i> DSM 1455                 | DSM              |
| <i>Comamonas testosteroni</i> DSM 1622                 | DSM              |
| <i>Comamonas testosteroni</i> DSM 6781                 | DSM              |
| <i>Comamonas testosteroni</i> DSM 11414                | DSM              |
| <i>Comamonas testosteroni</i> DSM 12678                | DSM              |
| <i>Comamonas testosteroni</i> DSM 50241                | DSM              |
| <i>Comamonas testosteroni</i> DSM 50242                | DSM              |
| <i>Comamonas testosteroni</i> DSM 50244                | DSM              |
| <i>Comamonas testosteroni</i> I2 LMG 19554             | LMG              |
| <i>Comamonas aquatica</i> ATCC 11330                   | TU Mikrobiologie |
| <i>Comamonas nitratorans</i> DSM 13191                 | DSM              |
| <i>Delftia acidovorans</i> ATCC 15668                  | TU Mikrobiologie |
| <i>Pseudomonas putida</i> DSM 291                      | WGA              |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1                     | H.-C. Flemming   |
| <i>Novosphingobium capsulatum</i> DSM 30196            | DSM              |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> DSM 30187                  | DSM              |
| <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$                   | WGA              |
| <i>Serratia ficaria</i> ATCC 33105                     | L. Eberl         |
| <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> BD413               | WGA              |
| <i>Ralstonia eutropha</i> DSM 531                      | WGA              |
| <i>Burkholderia cepacia</i> H111                       | L. Eberl         |

Weiterhin wurden im Rahmen dieser Arbeit insgesamt 25 Transkonjugantenstämme des Plasmids pJP4::dsRed sowie 13 Transkonjugantenstämme des Plasmids pNB2::dsRed aus Klärschlamm isoliert und durch partielle Sequenzierung ihrer 16S-rRNA Gene identifiziert (s. Kap. 5.2.1. sowie 5.3.1. und 5.3.3.)

Um aus Klärschlamm abgeleitete bakterielle Mischkulturen zur Verfügung zu haben, wurde Belebtschlamm aus dem Belebungsbecken der kommunalen Kläranlage Grüneck bei München entnommen. Dieser Schlamm wurde mehrfach mit PBS gewaschen und schließlich wurde Glycerin auf eine Konzentration von 30% (v/v) zugegeben. Nach Aliquotierung



wurden die Schlammproben in einer im Vergleich zur Originalprobe 5fach höheren Biomassekonzentration bei -80°C gelagert. Zur Erstellung einer Mischkultur wurden dann bei Bedarf 0,2 ml Klärschlamm-Glycerinstock in 50 ml synthetisches Abwasser inokuliert und über Nacht bei 30°C und 150 Upm inkubiert.

## 4.2. Medien

### LB-Bouillon/-Agar (Atlas 1993)

|             |          |
|-------------|----------|
| Trypton     | 10,0 g/l |
| Hefeextrakt | 5,0 g/l  |
| NaCl        | 5,0 g/l  |

### Nährbouillon/-agar (Fertigpräparation von Merck) (Atlas 1993)

|                 |          |
|-----------------|----------|
| Pepton          | 5,0 g/l  |
| Fleischextrakt  | 3,0 g/l  |
| Agar (optional) | 15,0 g/l |

### R2A Agar (Fertigpräparation von Difco) (Atlas 1993)

|                                 |          |
|---------------------------------|----------|
| Hefeextrakt                     | 0,5 g/l  |
| Pepton                          | 0,5 g/l  |
| Casaminosäuren                  | 0,5 g/l  |
| Dextrose                        | 0,5 g/l  |
| lösliche Stärke                 | 0,5 g/l  |
| Natriumpyruvat                  | 0,3 g/l  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0,3 g/l  |
| MgSO <sub>4</sub>               | 0,3 g/l  |
| Agar                            | 15,0 g/l |

### MMN-/MMO-Medium (Boon et al. 2001)

|   |            |
|---|------------|
| MMN-Phosphatpufferlösung 100x:                        |            |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                      | 141,96 g/l |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 136,09 g/l |
| MMN-Salzlösung 200x:                                  |            |
| MgSO <sub>4</sub>                                     | 19,7 g/l   |
| CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O                | 1,18 g/l   |
| H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>                        | 0,23 g/l   |
| FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O                | 0,56 g/l   |
| ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O                | 0,23 g/l   |
| MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O                  | 0,34 g/l   |
| CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O                | 0,08 g/l   |
| CoCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O                | 0,05 g/l   |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O | 0,02 g/l   |
| Na <sub>2</sub> EDTA                                  | 0,64 g/l   |

Erstellung einer 1x Phosphatpufferlösung mit dH<sub>2</sub>O (optional: Zugabe von hochreinem Agar auf 15 g/l), die dann autoklaviert wird. Nach dem Autoklavieren Zugabe der entsprechenden Menge sterilfiltrierter 200x Salzlösung. Als Stickstoffquelle wurde (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf eine Endkonzentration von 2,5 mM (das Medium wurde dann als MMO-Medium bezeichnet) bzw. NH<sub>4</sub>Cl auf eine Konzentration von 1 mM zugegeben, falls nicht im Falle von Anilin und 3-

Chloranilin die gleichzeitige Nutzung dieser Substanzen als Stickstoffquelle untersucht werden sollte. Die Zugabe von Kohlenstoffquellen erfolgte anschließend, wobei im Fall von Anilin und 3-Chloranilin sowie Benzylalkohol die gewünschte Menge direkt auf 200-500 mg/l bzw. 5 mM zupipettiert wurde, im Fall von Natriumcitrat die Zugabe auf 2 g/l aus einer 20%igen sterilfiltrierten Stammlösung erfolgte, im Fall von 2,4-D die Zugabe aus einer autoklavierten 100 mM Lösung auf 5 mM erfolgte.

Biomasse, die in dieses Medium inokuliert wurde, wurde vorher zur Entfernung von Restnährstoffquellen und/oder Antibiotika mit PBS gewaschen und in PBS resuspendiert.

#### **2,4-D Indikatormedium** (DiGiovanni et al. 1996)

|   |            |
|---|------------|
| MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O                | 112, mg/l  |
| ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O                | 5,0 mg/l   |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O | 2,5 mg/l   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 340,0 mg/l |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                      | 355,0 mg/l |
| CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O                | 14,0 mg/l  |
| FeCl <sub>3</sub> * 6 H <sub>2</sub> O                | 0,2 mg/l   |
| NH <sub>4</sub> Cl                                    | 500,0 mg/l |
| 2,4-D   | 500,0 mg/l |
| Bromthymolblau  | 40,0 mg/l  |

Nach Erstellung wurde der pH-Wert auf 6,8 eingestellt und die Lösung sterilfiltriert. Das fertige Medium zeigte eine blaugrüne Farbe. Abbau von 2,4-D führt zu einer Ansäuerung der Lösung und wird durch einen Farbumschlag des Indikators nach gelb angezeigt.

Auch hier wurde in dieses Medium inokulierte Biomasse vorher zur Entfernung von Nährstoff-/Antibiotikaresten gewaschen, hier allerdings mit 0,85% KCl, um ein Eintragen von Puffersubstanzen zu vermeiden.

#### **Synthetisches Abwasser** (Nancharaiyah et al. 2003)

|   |          |
|---|----------|
| <b>Organische Substratlösung 500x</b>               |          |
| Natriumacetat wasserfrei                            | 64,0 g/l |
| Zitronensäure                                       | 66,8 g/l |
| Natriumgluconat                                     | 62,0 g/l |
| Glucose wasserfrei                                  | 47,0 g/l |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O | 33,0 g/l |
| KCl   | 18,0 g/l |
| <b>Salzlösung 80x</b>                               |          |
| NaHCO <sub>3</sub>                                  | 22,1 g/l |
| MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O              | 11,4 g/l |
| NH <sub>4</sub> Cl                                  | 8,6 g/l  |

In Kap. 5.2.2. wurde statt Natriumacetat, Zitronensäure, Gluconat und Glucose in der zweiten Phase des Versuchs 2 mM 2,4-D und in Kap. 5.3.1. 100 mg/l 3-Chloranilin als einzige Kohlenstoffquelle verwendet. In Kap. 5.3.3. wurde zusätzlich zu den o. a. Kohlenstoffquelle 100 mg/l 3-Chloranilin eingesetzt. Für die Zubereitung dieses Abwassers wurde normales Leitungswasser verwendet.

### 4.3. Kulturbedingungen und –handhabungen.

Alle Kultivierungen wurden, soweit nicht anders erwähnt, in einem Brutschrank bei 30°C durchgeführt. Flüssigmedien wurden mit 150 Upm geschüttelt. Zentrifugationen von Zellen wurden für 2 min. bei 15,000 g durchgeführt. Waschungen zur Entfernung von Antibiotika und Medienresten wurden je nach weiterem Verwendungszweck mit PBS (10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2 / 130 mM NaCl), 0,85% (w/v) KCl oder frischem Medium durchgeführt. Zur dauerhaften Lagerung von Kulturen wurden diese mit 1 vol. sterilem 87%igem Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

### 4.4. Einführung von Genen für fluoreszierende Proteine in Mikroorganismen

Generell wurde die Markierung von Mikroorganismen mit fluoreszierenden Proteinen mittels zufälliger Transposonmutagenese mit den auf dem Transposon Tn5 basierenden Suizidvektoren der pUT-Serie durchgeführt (de Lorenzo et al. 1990, Herrero et al. 1990). Diese Vektoren tragen eine Antibiotikaresistenzkassette sowie eine NotI-Schnittstelle, die von Tn5-Erkennungssequenzen umrahmt sind. In die NotI-Schnittstelle können zusätzliche Gene, mit denen ein Organismus markiert werden soll, einkloniert werden. Außerhalb der Tn5-Erkennungssequenzen auf dem Plasmid liegt das Tn5-Transposasegen. Das Plasmid selbst kann nur in Bakterienstämmen replizieren, die das spezielle, aus dem Phagen  $\lambda$  stammende Replikationsprotein  $\pi$  produzieren (sog. *E. coli*  $\lambda$ pir Stämme). Es ist jedoch mittels eines Helferplasmids mobilisierbar. Durch eine triparentale Kreuzung von einem *E. coli*  $\lambda$ pir Stamm mit pUT-Plasmid, einem *E. coli* Stamm mit einem Helferplasmid sowie dem eigentlichen Zielstamm der Transposonmutagenese kann das pUT-Plasmid in Zellen des Zielstamms übertragen werden, wo es bei Abwesenheit des  $\pi$ -Proteins allerdings nicht replikationsfähig ist. Es kommt hier in einem Teil der Zielzellen dann zu einer Transposition des artifiziellen Transposons (Antibiotikaresistenz mit in NotI-Stelle einklonierten Genen innerhalb von Tn5-Erkennungssequenzen) in genetische Information des Zielstammes. Bei Selektion von antibiotikaresistenten Zielstamm-Zellen können so Transposon-Mutanten isoliert werden.

#### 4.4.1. Chromosomale Markierung von *Pseudomonas putida* SM1443 mit *gfp*

Zur Einführung von *gfp* in *Pseudomonas putida* SM1443 analog zu Christensen et al. (1998) wurde das pUT-Derivat pUT*gfp*2x verwendet, das zusätzlich zu einer Kanamycin-Resistenzkassette zwei Kopien des Wildtyp-GFP-Gens von *Aequorea victoria* unter Kontrolle eines konstitutiven *psbA*-Promotors trug (Unge et al. 1997). Je 1 ml Übernachtskultur aus LB des Transposondonorstammes *E. coli* CC118  $\lambda$ pir – pUT*gfp*2x, des Helferstammes *E. coli* HB101 – pRK2013 sowie des Transposonrezipienten *Pseudomonas putida* SM1443 wurden abzentrifugiert, mit PBS gewaschen, gemischt und schließlich in 100  $\mu$ l PBS resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde dann auf eine LB-Agarplatte aufgetropft und zur Konjugation über Nacht inkubiert. Danach wurden die Zellen des Konjugationsansatzes von der Platte abgekratzt, wieder mit PBS gewaschen und zur Selektion von Transposon-Mutanten auf MMO-Medium mit 0,2% Citrat sowie 100  $\mu$ g/ml Kanamycin ausplattiert, auf dem die aminosäureauxotrophen *E. coli* Stämme nicht wachsen konnten. Eine grün fluoreszierende Einzelkolonie wurde ausgewählt und als *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp*2x weiterverwendet.

#### 4.4.2. Markierung der Plasmide pWW0, pJP4 und pNB2 mit *dsRed*

Die Einführung von *dsRed* in die hier verwendeten Plasmide wurde ebenfalls über Transposonmutagenese (Christensen et al. 1998) durchgeführt, wobei eine *P<sub>lac</sub>-dsRed* Expressionskassette (Tolker-Nielsen et al. 2000) verwendet wurde, die in ein pUT-Plasmid mit Gentamycin-Resistenz inkloniert war (pUT*dsRed*). Hierfür wurde wie in 2.4.1. zunächst eine Konjugation zwischen *E. coli* CC118  $\lambda$ pir – pUT*dsRed*, *E. coli* HB101 – pRK2013 sowie je einem der drei Wildtyp-Plasmidwirte *Pseudomonas putida* mt-2 (für pWW0), *Ralstonia eutropha* JMP134 (für pJP4) oder *Comamonas testosteroni* I2 (für pNB2) durchgeführt. Nach Inkubation über Nacht auf LB-Medium wurde der gesamte Zellansatz auf einer MMO-Medienplatte mit Citrat und 25  $\mu$ g/ml Gentamycin ausplattiert und für 2 Tage inkubiert. Der gewachsene Bakterienrasen bestand dann aus *Pseudomonas* bzw. *Ralstonia* bzw. *Comamonas* Zellen, die das *dsRed*-Transposon entweder in ihrem Chromosom oder in ihrem jeweiligen Plasmid enthielten. Zur Isolierung von *dsRed*-markierten Plasmiden wurde dann der komplette Bakterienbewuchs von der MMO-Gentamycin-Platte abgekratzt und eine zweite Konjugation mit je 1 ml LB-Kultur von *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp2x* als Rezipienten auf LB-Medium durchgeführt. Eine nachfolgende Plattierung des Konjugationsansatzes auf MMO-Medium mit Citrat, 25  $\mu$ g/ml Gentamycin und 100  $\mu$ g/ml Kanamycin führte dann zur Selektion von Zellen von *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp2x*, die das jeweilige Plasmid mit *dsRed*-Markierung trugen. Es wurde jeweils eine Kolonie von *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp2x* – pWW0::*dsRed*, – pJP4::*dsRed* und – pNB2::*dsRed* ausgewählt.

Alle 3 Isolate zeigten bei mikroskopischer Beobachtung eine konstitutive Grünfluoreszenz, während die Expression von DsRed durch die Wirkung des von SM1443 chromosomal kodierten Lac-Repressors unterdrückt war, jedoch durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert werden konnte. Die konstruierten Stämme zeigten chromosomale Resistenzen gegenüber 100  $\mu$ g/ml Rifampicin und 100  $\mu$ g/ml Kanamycin sowie plasmidgebundene Resistenzen gegenüber 25  $\mu$ g/ml Gentamycin sowie im Fall von pJP4 und pNB2 5  $\mu$ g/ml HgCl<sub>2</sub> bei Wachstum auf LB-Medium. Während *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp2x* – pJP4::*dsRed* Wachstum auf MMO-Medium mit 5 mM 2,4-D sowie eine positive Reaktion in dem 2,4-D Indikatormedium zeigte, war *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp2x* – pNB2::*dsRed* nicht in der Lage, auf MMO-Medium mit Anilin oder 3-Chloranilin als Kohlenstoffquelle zu wachsen.

### **4.5. Mikroskopie**

#### 4.5.1. Epifluoreszenzmikroskopie

Für die schnelle Analyse der GFP-/DsRed-Fluoreszenz von Bakterienstämmen wurden 3  $\mu$ l einer Bakteriensuspension in PBS bzw. dem jeweiligen Medium auf eine Aussparung eines 6-Loch-Objekträgers aufgebracht. Die Proben wurden dann mit einem Leitz Aristoplan Mikroskop mit Fluoreszenzmodul zur Detektion von UV-, Rot- und Grünfluoreszenz visuell untersucht.

#### 4.5.2. Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

Zur Bildaufnahme sowie zur quantitativen Bildanalyse wurden die konfokalen Laser-Scanning Mikroskope Zeiss LSM 410 sowie LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Jena) verwendet. Die folgenden Einstellungen wurden zur Detektion von den nachfolgend aufgeführten Fluorophoren verwendet:

| Fluorophor   | Anregungslaser | Detektionsfilter                        |
|--------------|----------------|---|
| GFP          | 488 nm         | BP 515-540 nm                           |
| DsRed, Cy3   | 543 nm         | LP 570 nm (LSM410) bzw. 560 nm (LSM510) |
| Syto 60, Cy5 | 633 nm         | LP 665 nm (LSM410) bzw. 650 nm (LSM510) |

#### 4.6. Konjugation von *P. putida* SM1443::*gfp2x* – pWW0::*dsRed* mit *P. putida* DSM 291

##### 4.6.1. Auf Agaroberflächen

Hierzu wurden je 1 ml Übernachtskultur der beiden Stämme aus LB-Medium gewaschen, gemischt und in 100 µl PBS resuspendiert, die auf die Oberfläche einer MMO-Benzylalkohol-Medienplatte aufgebracht wurden. Nach 3 Tagen Inkubation wurden Zellen des Konjugationsansatzes von der Agaroberfläche abgekratzt und in PBS resuspendiert. Zur Gegenfärbung wurde der Nukleinsäurefarbstoff Syto 60 (Molecular Probes, Oregon, USA) in einer 1:1000 Verdünnung zugegeben. Nach 10 min. Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen gewaschen und eine Probe auf einen Objektträger zur mikroskopischen Analyse aufgetropft.

##### 4.6.2. In Biofilmen auf Objektträgern

Hierzu wurden autoklavierte Objektträger verwendet, die in eine Petrischale mit 20 ml MMO-Benzylalkohol-Medium lagen. Diese Petrischalen wurden bei Raumtemperatur auf einem Wipptisch mit 30 Bewegungen pro Minute inkubiert. Zur Bildung eines Rezipientenbiofilms wurden in PBS resuspendierte Zellen von *P. putida* DSM 291 aus 1 ml LB-Übernachtskultur zugegeben. Nach Inkubation über Nacht wurde der Objektträger in eine Petrischale mit frischem Medium überführt und es wurden in PBS resuspendierte Zellen von *P. putida* SM1443::*gfp2x* – pWW0::*dsRed* aus 0,5 ml LB-Übernachtskultur zugegeben. Die Biofilme wurden weiterhin für 7 Tage inkubiert, wobei die Objektträger täglich in frische mediengefüllte Petrischalen überführt wurden.

Zur mikroskopischen Untersuchung der Objektträger wurden diese aus der Schale herausgenommen und auf der Unterseite trockengewischt. Zur Gegenfärbung wurden auf den oberseitigen Biofilm 1 ml einer 1:1000 Verdünnung von Syto 60 in PBS gegeben und für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Objektträger für 15 min. durch Einlegen in eine Schale mit PBS gewaschen. Abschließend wurde der Biofilm mit einem Deckglas abgedeckt, das zum Austrocknungsschutz und als Abstandhalter an den Rändern eine dünne Schicht aus Hochvakuum-Silikonfett trug. Die Biofilme wurden dann direkt mikroskopisch untersucht.

#### 4.7. Erstellung von definierten Zellsuspensionen zur Optimierung der Multiplex-PCR-Analyse von horizontalem Gentransfer

Um zur Optimierung dieser PCR-Analysen Zellsuspensionen mit einer definierten Zusammensetzung zur Verfügung zu haben, wurden durch Konjugation von *P. putida* SM1443::*gfp2x* – pJP4::*dsRed* bzw. pNB2::*dsRed* mit einer Nalidixinsäure-resistenten Spontanmutante von *P. putida* KT2442 auf LB-Medium mit nachfolgender Selektion von Transkonjuganten auf LB mit 100 µg/ml Nalidixinsäure und 25 µg/ml Gentamycin zunächst Reinkulturen von *P. putida* KT2442 – pJP4::*dsRed* bzw. – pNB2::*dsRed* als Modell-

Transkonjugantenstämme isoliert. Als Rezipientenstamm wurde *P. putida* KT2442 verwendet.

Rezipientenstamm sowie Donoren- und Transkonjugantenstämme wurden getrennt in flüssigem LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika kultiviert, schließlich geerntet, mit 0,85% KCl gewaschen und schließlich in TE-Puffer resuspendiert und ihre optischen Dichte bestimmt, wobei als Maß für eine OD-Einheit bei 600 nm  $10^9$  Zellen/ml angenommen wurden (Ausubel et al. 1999). Ausgehend von den so über ihre optische Dichte quantifizierten Zellsuspensionen wurden dann artifizielle Mischungen von Donor-, Transkonjuganten- und Rezipientenzellen erstellt, die als Template-DNA in der Optimierung der Multiplex-PCR-Reaktionen eingesetzt wurden.

## 4.8. Chemische Analysen

### 4.8.1. Chemischer Sauerstoff-Bedarf

Der CSB wurde mit handelsüblichen Küvettentests (Dr. Bruno Lange GmbH, Düsseldorf) bestimmt. Die Proben wurden durch Filtration mit einem Spritzenfilter für die Analyse vorbereitet. Da in dieser Arbeit nur mit synthetischem Abwasser definierter Zusammensetzung gearbeitet wurde ist der CSB hier ein Maß für die Gesamtmenge an löslichen organischen Kohlenstoffverbindungen in der Probe.

### 4.8.2. Photometrische Messung der Konzentrationen von 2,4-D und 3-Chloranilin

Die Konzentrationen von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und 3-Chloranilin wurden durch Messung der Absorptionen ihrer aromatischen Ringsysteme bei 230 nm bzw. bei 235 nm analog zu DiGiovanni et al. (1996) bestimmt. Bei Abwesenheit anderer aromatischer Substanzen war dadurch eine sensitive und spezifische Konzentrationsbestimmung des jeweiligen Modellxenobiotikums in Reaktor- und Medienproben durch photometrische Vermessung der Medienabsorption nach Entfernung von Partikeln durch Zentrifugation oder Filtration möglich. Die Absorptionsverläufe erwiesen sich bis zu einem Absorptionswert von 3 als linear mit der Konzentration. Es ergaben sich folgende molare Extinktionskoeffizienten:

$$\begin{aligned} 2,4\text{-D: } \epsilon_{230} &= 8600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \\ 3\text{CA: } \epsilon_{235} &= 7905 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \end{aligned}$$

## 4.9. Wirtsspektrums-Untersuchungen der Plasmide pJP4 und pNB2

### 4.9.1. Plasmid pJP4

Als Rezipientengesellschaft in diesem Experiment wurden 4 ml einer Klärschlamm-Mischkultur (s. Kap. 4.1.) eingesetzt. Diese wurde mit 1 ml LB-Übernachtskultur von *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp2x* – pJP4::*dsRed* gemischt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in 100  $\mu$ l PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf die Oberfläche einer R2A-Agarplatte aufgetropft und über Nacht inkubiert. Um die Entwicklung von Rotfluoreszenz in Transkonjuganten sicher zu stellen, wurde die Platte dann für 14 Tage bei 4°C gelagert. Parallel dazu wurde ein Kontrollansatz durchgeführt, in dem Klärschlamm-Zellen ohne den Donorstamm ebenso inkubiert wurden.

Eine mikroskopische Analyse zeigte das Auftreten von rot fluoreszierenden Zellen im Testansatz, jedoch nicht im Kontrollansatz, der deshalb nicht weiter untersucht wurde. Alle

Zellen des Konjugationsansatzes wurden dann in 1 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurde eine präparative Durchflußzytometrie zum Aussortieren rot fluoreszierender Bakterienzellen durchgeführt (Dr. J. W. Ellwart, GSF-Forschungszentrum, München). Proben dieser Durchflußzytometrie wurden auf R2A Agar mit 10 µg/ml HgCl<sub>2</sub> ausgestrichen. Eine Auswahl der resultierenden Kolonien wurden auf R2A Agar mit 25 µg/ml Gentamycin überimpft. Kolonien, die ein Wachstum auf beiden Medien zeigten, wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Schließlich wurden insgesamt 56 rot fluoreszierende, Gentamycin- und Quecksilber-resistente Transkonjugantenkolonien isoliert. Diese Kolonien wurden mittels genetischem Fingerprinting durch (GTG)<sub>5</sub>-PCR untersucht und 24 Isolate mit unterschiedlichen Profilen wurden ausgewählt, ihre 16S-rRNA Gene mit PCR (Primer 341F/907R) partiell amplifiziert und sequenziert.

Diese Isolate wurden dann bzgl. ihres Wachstum in MMN-Medium mit 1 mM NH<sub>4</sub>Cl und 5 mM 2,4-D sowie in 2,4-D Indikatormedium untersucht.

Um das Vorhandensein von pJP4-Plasmiden und deren Integrität bzgl. ihrer katabolischen Funktionen zu überprüfen, wurde die Präsenz zumindest eines Teils des *tfdB*-Gens in allen sequenzierten Isolaten mittels PCR überprüft (Kap. 4.11.2.). Weiterhin wurden die Plasmide von jedem sequenzierten Isolat, das kein Wachstum auf 2,4-D haltigen Medien zeigte, durch Konjugation auf R2A-Agar in *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp2x* überführt. Plasmidtragende SM1443-Zellen wurden dann durch Ausstreichen der Konjugationsansätze auf MMN-Medium mit 0,2% Citrat, 1 mM NH<sub>4</sub>Cl, 25 µg/ml Kanamycin, 25 µg/ml Gentamycin und 50 µg/ml Rifampicin isoliert. Die Integrität der Plasmide bzgl. des 2,4-D Abbaus in den so erhaltenen *P. putida* Zellen wurde dann durch Wachstum in 2,4-D Indikatormedium überprüft.

#### 4.9.2. Plasmid pNB2

In diesem Versuch wurde untersucht, ob konjugativer Transfer von pNB2 zum 3-Chloranilin Abbau in Anreicherungskulturen beitragen kann und welche Spezies zu den relevanten Transkonjugantenarten gehören.

Hierzu wurde zunächst eine Konjugation von *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp2x* – pNB2::*dsRed* mit Bakterien aus Klärschlamm durchgeführt, wobei 1 ml LB-Übernachtskultur dieses Donorstammes mit 2 ml Klärschlamm-Mischkultur gemischt, mit PBS gewaschen und in 100 µl PBS resuspendiert wurden. Diese Suspension wurde dann auf die Oberfläche einer R2A-Agarplatte aufgetropft und über Nacht inkubiert. Kontrollansätze, die entweder nur aus Donorzellen oder nur aus Klärschlammzellen bestanden, wurden ebenso behandelt. Jede Ansatzserie wurde in 3 Parallelen durchgeführt.

Anschließend wurden die Konjugations- und Kontrollansätze in je 25 ml synthetischem Abwasser mit 100 mg/l 3-Chloranilin als einziger Kohlenstoffquelle resuspendiert und bei Raumtemperatur und 200 Upm auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Alle 2 Tage wurden je 500 µl Probe zur Messung der 3-Chloranilin Konzentration entnommen.

Nach 16 Tagen wurden Zellen aus einer der Konjugationsansatz-Anreicherungskulturen auf R2A-Agar mit 25 µg/ml Gentamycin ausplattiert und für 3 Tage inkubiert. 36 Kolonien wurden zufällig ausgewählt und mit PCR bzgl. des *tdnQ*-Gens auf das Vorhandensein von pNB2 untersucht, von denen 14 Isolate ein PCR-Produkt zeigten. Mikroskopische Analyse zeigte für 12 dieser Isolate morphologisch einheitliche Populationen aus rot fluoreszierenden Transkonjugantenzellen, während ein weiteres Isolat der Donorstamm war und die verbleibende Kolonie eine Mischung aus Donor- und Transkonjugantenzellen zeigte. Von diesen 12 Isolaten wurden genetische Fingerprintanalysen mit BOX-PCR durchgeführt, die insgesamt 4 unterschiedliche Profiltypen ergaben. Von jedem Profiltyp wurde ein Isolat für weitere Analysen ausgewählt. Ein weiteres Isolat aus einer Profilgruppe wurde

hinzugenommen, weil die beiden Isolate dieser Gruppe unterschiedliche Koloniemorphotypen aufwiesen. Die 16S-rRNA Gene dieser 5 Stämme wurden mit den Primern 27F/1492R partiell amplifiziert und die PCR-Produkte sequenziert. Zusätzlich wurde Wachstum der Stämme in MMN-Medium mit 200 mg/l Anilin oder 3-Chloranilin untersucht.

#### 4.10. Durchführung der Reaktorversuche und Probennahmen

##### 4.10.1. Bioaugmentationsversuch mit pJP4

Für diesen Teil der Arbeit wurden zwei Labormaßstabs-SBBRs verwendet, die aus 2000 ml Glas-Meßzylinder bestanden. Diese waren zu 75% mit Glaskugeln (8,5 mm Durchmesser) als Biofilmträgermaterialien gefüllt und hatten ein verbleibendes Flüssigkeitsvolumen von 1000 ml. Belüftet wurden diese Reaktoren über einen Belüfterstein, der am Boden des Zylinders untergebracht wurde. Weiterhin wurde der Reaktorinhalt mit 0,1 l/min rezirkuliert. Zur Inokulation wurden 25 ml Klärschlamm-Glycerinstock in 500 ml synthetischem Abwasser über Nacht vorkultiviert und je 250 ml der resultierenden Mischkultur in jeden Reaktor gefüllt.

In der Startphase wurden die Reaktoren in einem 8 h Zyklus mit 100% Volumenaustausch betrieben, als Reaktorzulauf wurde synthetisches Abwasser mit Acetat, Gluconat, Glucose und Citrat (entsprechend je 100 mg/l CSB) als Kohlenstoffquellen verwendet. Am Tag 8 nach Inokulation wurde *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp2x* – pJP4::*dsRed* auf eine Zelldichte von  $10^8$  Zellen/ml zu einem der Reaktoren (bioaugmentierter Reaktor) zugegeben, während der zweite Reaktor (Kontrollreaktor) unverändert blieb. Beide Reaktoren wurden zunächst mit synthetischem Abwasser mit Acetat, Gluconat, Glucose und Citrat weiter betrieben bis zum Tag 15 des Versuchs. Hier wurde dann auf 2 mM 2,4-D als einzige Kohlenstoffquelle im Reaktorzulauf gewechselt. Für die folgenden 8 Tage (Tage 15-23) wurden die Reaktoren weiterhin mit einem 8 h Zyklus betrieben, während in den Tagen 23-28 sowie 28-32 die Reaktorfüllung nicht ausgetauscht wurde, also hier zwei Zyklen von je 90 h Dauer vorlagen. Der Versuch wurde dann am Tag 32 beendet.

Zur Vermessung von CSB und 2,4-D Konzentration wurden je 10 ml des Reaktorüberstandes entnommen, filtriert (0,45 µm) und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Biofilmproben wurden durch Entnahme von Glasperlen aus der Mitte der Reaktoren genommen. Diese Glasperlen wurden in ein 50 ml Falcon-Gefäß gefüllt. Danach wurde Wasser bis zur Füllhöhe der Glasperlen zugegeben und der den Perlen anhaftende Biofilm wurde durch Vortexen für 1 min. resuspendiert. Schließlich wurde die Biofilmsuspension von den Glasperlen abgegossen, der Biofilm durch Zentrifugation pelletiert, zweimal mit 0,85% KCl gewaschen und als Pellet bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zur Isolierung von 2,4-D abbauenden Mikroorganismen wurde eine Verdünnungsreihe der Reaktorbiofilme vom Tag 32 auf MMN-Medium mit 1 mM NH<sub>4</sub>Cl und 5 mM 2,4-D ausplattiert.

##### 4.10.2. Bioaugmentationsversuch mit pNB2

Die Ausführung der in diesem Versuch eingesetzten 4 Modellreaktoren orientierte sich an den von Boon et al. (2002, 2000, 2003) eingesetzten semicontinuous activated sludge reactors (SCAR). Sie bestanden aus Glas-Erlenmeierkolben mit einem Gesamtvolumen von 1000 ml. Diese enthielten je 10 g Sägespäne als Biofilmträgermaterial und waren mit je 500 ml synthetischem Abwasser gefüllt. Die Reaktoren wurden mit einer dynamischen Zyklusdauer betrieben, die sich an der 3-Chloranilin Abbauleistung der beiden bioaugmentierten Reaktoren



orientierte. Beim Zykluswechsel wurden 100% des flüssigen Reaktorinhalts ausgetauscht. Durchmischung und Belüftung der Reaktoren fand durch Schütteln der Kolben mit 120 Upm auf einem Rotationsschüttler statt, wobei pro Tag eine Ruheperiode von 3 h ohne Schütteln durchgeführt wurde.

Für die Inokulierung der Reaktoren wurde folgendes Animpfschema gewählt. Während der Tage -2 und -1 wurden die Reaktoren mit synthetischem Abwasser mit Acetat, Glucose, Gluconat und Citrat als Kohlenstoffquellen betrieben. Zykluswechsel fanden hier vor Zugabe der Biomassen am Tag -1 sowie am Tag 0 statt. Bei den Reaktoren D und K sollte untersucht werden, ob sich Unterschiede zwischen der Vorkultivierung eines Rezipienten- bzw. eines Donorbiofilms ergaben.

|        | Reaktor D                         | Reaktor K                         | Reaktor P                             | Reaktor N |
|--------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-----------|
| Tag -2 | Donor<br>$4 \cdot 10^7$ Zellen/ml | Schlamm                           | Schlamm                               | Schlamm   |
| Tag -1 | Schlamm                           | Donor<br>$7 \cdot 10^7$ Zellen/ml | Stamm SB3<br>$2 \cdot 10^8$ Zellen/ml |           |

Der Schlamm für die Inokulierung der Reaktoren K, P und N am Tag -2 bestand aus einer Übernachtskultur von 10 ml Klärschlamm-Glycerinstock, die in 500 ml synthetischem Abwasser vorkultiviert, dann abzentrifugiert und in 1,5 l synthetischem Abwasser resuspendiert worden war. Je 500 ml wurden pro Reaktor inokuliert.

Der Schlamm für die Inokulierung von Reaktor D am Tag -1 bestand aus der Biomasse von 500 ml des gemischten Reaktorablaufs der Reaktoren K, P und N, die abzentrifugiert und in 500 ml synthetischem Abwasser resuspendiert worden war.

Mit "Donor" ist *Pseudomonas putida* SM1443::gfp2x – pNB2::dsRed gemeint. Es soll hier nochmals erwähnt werden, dass dieser Stamm nicht in der Lage zum Abbau von 3-Chloranilin ist.

Mit "Stamm SB3" ist der in Kap. 5.3.1. isolierte, 3-Chloranilin abbauende pNB2-Transkonjugantenstamm *Comamonas testosteroni* SB3 gemeint.

Ab Tag 0 wurde dem synthetischen Abwasser zusätzlich zu den o. a. Kohlenstoffquellen noch 3-Chloranilin auf eine Konzentration von 80-100 mg/l zugegeben.

In Abständen wurden den Reaktoren je 5 ml des Mediums entnommen, filtriert (0,22 µm) und dann CSB sowie 3-Chloranilin Konzentration gemessen.

Zur Entnahme von Biofilm-Proben wurde ein abgesetztes Volumen von ca. 30 ml Sägespäne zusammen mit Reaktormedium entnommen, in ein 50 ml Falcon-Gefäß gefüllt und der Biofilm durch 5 min. intensives Vortexen von den Sägespänen abgelöst. Die Biomassesuspension wurde dann von den Sägespänen abgossen, die Biomasse durch Zentrifugation pelletiert, zweimal mit 0,85% KCl gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Am dritten Probenametag wurde zusätzlich Biomasse zur Untersuchung mit Fluoreszenz in situ Hybridisierung mit PFA fixiert (Kap. 2.14.).

Die Dauer eines einzelnen Reaktorzyklus wurde der 3-Chloranilin Abbauleistung der Reaktoren D und K angepasst: ein Zykluswechsel wurde nach Abbau von 90% des vorhandenen 3-Chloranilins durchgeführt. Es wurden insgesamt 6 Reaktorzyklen mit Dauern von 18, 5, 4, 5, 2 und 2 Tagen durchgeführt. Probenamen von Biomasse wurden an den Tagen 0, 18 (zu Beginn und Ende des ersten Zyklus mit 3-Chloranilin) sowie am Tag 29 nach Etablierung eines stabilen 3-Chloranilin Abbaus durchgeführt. Verdünnungen der Reaktorbiofilme an diesem Tag wurden auf MMO-Medium mit 250 mg/l 3-Chloranilin ausplattiert, um 3-Chloranilin abbauende Mikroorganismen zu isolieren.

Der Versuch wurde dann am Tag 33 beendet.

#### 4.11. Erstellung von Template-DNA für PCR-Analysen

Für PCR-basierende Analysen von mikrobiellen Reinkulturen wurde keine gesonderte DNA-Extraktion durchgeführt. Zellen der jeweiligen Kultur wurden von einer Agarplatte abgekratzt und in 100 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert, so dass eine Trübung erkennbar war. Diese Zellsuspension wurde dann bei -20°C gelagert und bei Bedarf direkt als Template-DNA für die PCR-Reaktion eingesetzt.

Für die Extraktion von DNA aus Belebtschlamm- und Reaktorproben wurde ein Protokoll zur Minipräp von genomischen DNA aus Bakterien verwendet (Ausubel et al. 1999). Es wurden ca. 50 mg Biomasse in 567 µl TE Puffer (10 mM Tris-HCl / 1 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert. Danach wurden 30 µl 10% SDS sowie 3 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben und die Probe für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl 5 M NaCl sowie 80 µl 10% CTAB / 0,7 M NaCl zugegeben, gut gemischt und für 10 min. bei 65°C inkubiert. Die Lösung wurde dann mit je 1 Vol. Chloroform, Phenol-Chloroform (1:1) und wiederum Chloroform extrahiert. Aus der gereinigten wässrigen Phase wurde dann die DNA durch Zugabe von 0,6 Vol. Isopropanol ausgefällt und für 15 min. bei 15.000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde noch mal mit 70% Ethanol gewaschen und schließlich in 50-100 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst. Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

#### 4.12. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

##### 4.12.1. Primer

In der nachfolgenden Tabelle sind alle in dieser Arbeit verwendeten PCR-Primer aufgeführt. Die Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) produziert.

| Name               | Sequenz 5'-3'                   | T <sub>M</sub> | Referenz                                     |
|--------------------|---------------------------------|----------------|--|
| GFPwt-for          | TTT CAA GAG TGC CAT GCC CGA AGG | 64,4           | Diese Arbeit, basierend auf GenBank M62653   |
| GFPwt-rev          | CTG GTA AAA GGA CAG GGC CAT CGC | 66,1           |  |
| tfdB-for           | GCT GAC GGC GTG TCG TCG CG      | 67,6           | (Neilson et al. 1992)                        |
| tfdB-rev           | GAT GGA CGA TGC GCG ACG TA      | 61,4           | (Neilson et al. 1992)                        |
| tdnQ-for           | GCG CAG CAT CGA GGA TGA ATT G   | 62,1           | Diese Arbeit, basierend auf GenBank AF315641 |
| tdnQ-rev           | GAT GCC AGC CCG AGA CCA AG      | 63,5           |  |
| DsRed-for          | TTG AAG ACG GTG GCG TCG TTA C   | 62,1           | Diese Arbeit, basierend auf GenBank AF168419 |
| DsRed-rev          | CCT TTC AAC ACG CCA TCA CGA G   | 62,1           |  |
| CteA1-for          | CGA AAA GCC TGG GGC TAA TAT     | 57,9           | Diese Arbeit                                 |
| CteA1-rev          | CCA TCT CTG GTA AGT TCC TGC     | 59,8           | Diese Arbeit                                 |
| CteA2-for          | TTG ACA TGG CAG GAA CTT ACC     | 57,9           | Diese Arbeit                                 |
| CteA2-rev          | TCC CAT TAG AGT GCT CAA CTG     | 57,9           | Diese Arbeit                                 |
| 27F                | AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG      | 55,3           | (Devereux und Willis 1995)                   |
| 341F               | CCT ACG GGA GGC AGC AG          | 60,0           | (Muyzer et al. 1997)                         |
| 517F               | GCC AGC AGC CGC GGT AAT AC      | 63,5           | 518R modifiziert                             |
| 518R               | ATT ACC GCG GCT GCT GG          | 57,6           | (Muyzer et al. 1997)                         |
| 534R               | ATT ACC GCG GCT GCT GGC         | 60,5           | (Smits et al. 2004)                          |
| 907F               | AAA CTC AAA (GT)GA ATT GAC GG   | 52,2           | Revers-komplementär zu 907R                  |
| 907R               | CCG TCA ATT C(AC)T TTG AGT TT   | 52,2           | (Muyzer et al. 1997)                         |
| 1072R              | CGA GCT GAC GAC AGC CAT GC      | 63,5           | (Gillan et al. 1998) modifiziert             |
| 1406F              | TG(CT) ACA CAC CGC CCG T        | 55,6           | (Borneman und Triplett 1997)                 |
| 1492R              | GGT ACC TTG TTA CGA CTT         | 51,4           | (Devereux und Willis 1995)                   |
| 23SR               | GGG TT(GCT) CCC CAT TC(AG) G    | 54,7           | (Borneman und Triplett 1997)                 |
| BoxA1R             | CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G   | 67,7           | (Rademaker et al. 1998)                      |
| (GTG) <sub>5</sub> | GTG GTG GTG GTG GTG             | 53,3           | (Baleiras Couto et al. 1996)                 |

#### 4.12.2. Protokolle für konventionelle PCR

Die konventionellen PCR-Reaktionen in dieser Arbeit wurden mit Qiagen HotStarTaq DNA-Polymerase sowie Reagenzien der Firma Qiagen (Hilden) in einem Eppendorf-Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Soweit nicht anders erwähnt wurden folgende Konzentrationen in 1x Qiagen-PCR-Puffer für die Reaktionen verwendet: PCR-Primer je 0,2  $\mu\text{M}$ , dNTPs je 0,2 mM,  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM, Taq-Polymerase 0,02 U/ $\mu\text{l}$ . Als Template-DNAs wurden entweder 1  $\mu\text{l}$  bakterielle Zellsuspension oder 10-50 ng aufgereinigte DNA pro 20-50  $\mu\text{l}$  Ansatz verwendet. In Reaktionen, in denen sich die DNA-Konzentration als relevant für die Qualität der Ergebnisse erwies, wird dies gesondert erwähnt.

##### **Multiplex-PCR zur Analyse des Transfers von pJP4 (Kap. 5.1.2. und 5.2.2.):**

Der Reaktionsansatz enthielt je 0,1  $\mu\text{M}$  *tfdB*-for/*tfdB*-rev, 1,0  $\mu\text{M}$  *GFPwt*-for/*GFPwt*-rev sowie 0,25  $\mu\text{M}$  517f/1072r. Es wurden je 10 ng Template-DNA in einem 20  $\mu\text{l}$  PCR-Ansatz mit 2,0 mM  $\text{MgCl}_2$  eingesetzt.

| Schritt                  | T ( $^{\circ}\text{C}$ ) | Zeit (min.) | Zykluszahl |
|--------------------------|--------------------------|-------------|------------|
| Anfangsdenaturierung     | 95                       | 15          |            |
| Denaturierung            | 95                       | 0,5         | 28         |
| Annealing                | 62                       | 1           |            |
| Elongation               | 72                       | 2           |            |
| Abschließende Elongation | 72                       | 7           |            |

##### **Multiplex-PCR zur Analyse des Transfers von pNB2 (Kap. 5.1.2. und 5.3.3.):**

Es wurden je 0,2  $\mu\text{M}$  *tdnQ*-for/*tdnQ*-rev sowie *GFPwt*-for/*GFPwt*-rev und 0,1  $\mu\text{M}$  517f/517r zusammen mit 10 ng Template-DNA in einem 20  $\mu\text{l}$  Ansatz mit 2,0 mM  $\text{MgCl}_2$  eingesetzt.

| Schritt                  | T ( $^{\circ}\text{C}$ ) | Zeit (min.) | Zykluszahl |
|--------------------------|--------------------------|-------------|------------|
| Anfangsdenaturierung     | 95                       | 15          |            |
| Denaturierung            | 95                       | 0,5         | 28         |
| Annealing                | 60                       | 1           |            |
| Elongation               | 72                       | 2           |            |
| Abschließende Elongation | 72                       | 7           |            |

##### **Genetisches Fingerprinting von pJP4-Transkonjuganten mit Primer (GTG)<sub>5</sub> (Kap. 5.2.):**

Es wurden 0,2  $\mu\text{M}$  des Primers (GTG)<sub>5</sub> in einem 20  $\mu\text{l}$  Ansatz mit 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$  mit je 0,5  $\mu\text{l}$  Zellsuspension als Template-DNA verwendet. Protokoll nach Baleiras Couto et al. (1996).

| Schritt                  | T ( $^{\circ}\text{C}$ ) | Zeit (min.) | Zykluszahl |
|--------------------------|--------------------------|-------------|------------|
| Anfangsdenaturierung     | 95                       | 15          |            |
| Denaturierung            | 95                       | 0,25        | 40         |
| Annealing                | 45                       | 0,75        |            |
| Elongation               | 72                       | 1,5         |            |
| Abschließende Elongation | 72                       | 5           |            |

##### **Amplifizierung partieller 16S-rRNA Gene aus pJP4-Transkonjuganten (Kap. 5.2.1.):**

Es wurden die Primer 341F und 907R verwendet.

| Schritt                  | T ( $^{\circ}\text{C}$ ) | Zeit (min.) | Zykluszahl |
|--------------------------|--------------------------|-------------|------------|
| Anfangsdenaturierung     | 95                       | 15          |            |
| Denaturierung            | 95                       | 0,5         | 30         |
| Annealing                | 55                       | 1           |            |
| Elongation               | 72                       | 2           |            |
| Abschließende Elongation | 72                       | 7           |            |

**Nachweis des *tfdB*-Gens in pJP4-Transkonjuganten (Kap. 5.2.1.):**

Hierfür wurden die Primer *tfdB*-for und *tfdB*-rev in einem Volumen von 20 µl mit je 1 µl Zellsuspension als Template-DNA eingesetzt. Protokoll nach Neilson et al. (1992).

| Schritt                  | T (°C) | Zeit (min.) | Zykluszahl |
|--------------------------|--------|-------------|------------|
| Anfangsdenaturierung     | 95     | 15          |            |
| Denaturierung            | 94     | 1,5         | 25         |
| Annealing und Elongation | 72     | 1           |            |
| Abschließende Elongation | 72     | 7           |            |

**PCR für die DGGE-Analyse von Reaktorproben (Kap. 5.2.2.):**

Hierfür wurden die Primer 341F und 518R (je 0,25 µM) eingesetzt, wobei 341F einen 5'-terminalen GC-Clamp trug (Sequenz CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G) (Muyzer et al. 1997). Es wurden je 50 ng Template-DNA sowie 3 mM MgCl<sub>2</sub> in einem 50 µl Ansatz eingesetzt. Protokoll nach Röling et al. (2001).

| Schritt                  | T (°C) | Zeit (min.) | Zykluszahl |
|--------------------------|--------|-------------|------------|
| Anfangsdenaturierung     | 95     | 15          |            |
| Denaturierung            | 94     | 0,5         | 35         |
| Annealing                | 54     | 1           |            |
| Elongation               | 72     | 1           |            |
| Abschließende Elongation | 72     | 5           |            |

Dasselbe Programm wurde auch zur Amplifikation von DNA aus ausgeschnittenen DGGE-Banden für nachfolgenden DNA-Sequenzierung verwendet, wobei der Primer 341F ohne GC-Clamp eingesetzt wurde.

**Nachweis des *tdnQ*-Gens in pNB2-Transkonjuganten (Kap. 5.3.):**

Hierfür wurden die Primer *tdnQ*-for und *tdnQ*-rev in einem Volumen von 20 µl mit je 1 µl Zellsuspension als Template-DNA eingesetzt.

| Schritt                  | T (°C) | Zeit (min.) | Zykluszahl |
|--------------------------|--------|-------------|------------|
| Anfangsdenaturierung     | 95     | 15          |            |
| Denaturierung            | 95     | 0,5         | 30         |
| Annealing                | 62     | 0,5         |            |
| Elongation               | 72     | 1           |            |
| Abschließende Elongation | 72     | 4           |            |

**Genetisches Fingerprinting von pNB2-Transkonjuganten mit BOX-PCR (Kap. 5.3.):**

Für diese Analyse wurden folgende Konzentrationen verwendet: 6 µM Primer BoxA1R, 10% DMSO, 6,35 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25 mM jedes dNTPs, 0,06 U Tag/µl sowie jeweils 2 µl Zellsuspension in einem Ansatzvolumen von 25 µl. Protokoll nach Rademaker et al. (1998).

| Schritt                  | T (°C) | Zeit (min.) | Zykluszahl |
|--------------------------|--------|-------------|------------|
| Anfangsdenaturierung     | 95     | 15          |            |
| Denaturierung            | 94     | 0,75        | 25         |
| Annealing                | 50     | 1,5         |            |
| Elongation               | 65     | 8           |            |
| Abschließende Elongation | 65     | 16          |            |

**Amplifizierung partieller 16S-rRNA Gene aus pNB2-Transkonjuganten (Kap. 5.3):**

Es wurden die Primer 27F und 1492R verwendet.

| Schritt                  | T (°C) | Zeit (min.) | Zykluszahl |
|--------------------------|--------|-------------|------------|
| Anfangsdenaturierung     | 95     | 15          |            |
| Denaturierung            | 95     | 0,5         | 30         |
| Annealing                | 50     | 1           |            |
| Elongation               | 72     | 2           |            |
| Abschließende Elongation | 72     | 8           |            |

**Detektion von *C. testosteroni* 16S-rRNA Genen (Kap. 5.3.):**

Es wurden die Primer CteA1-for und CteA1-rev bzw. CteA2-for und CteA2-rev verwendet. Bei der Primerevaluierung in Kap. 5.3.2. wurde jeweils eine PCR mit den Primern 341F und 534R als Positivkontrolle mitgeführt.

| Schritt                  | T (°C) | Zeit (min.) | Zykluszahl |
|--------------------------|--------|-------------|------------|
| Anfangsdenaturierung     | 95     | 15          |            |
| Denaturierung            | 95     | 0,5         | 30         |
| Annealing                | 58     | 1           |            |
| Elongation               | 72     | 2           |            |
| Abschließende Elongation | 72     | 8           |            |

**RISA-PCR (Kap. 5.3.3.):**

Es wurden die Primer 1406F und 23SR verwendet. Ein 50 µl Ansatz enthielt hier 6,5 mM MgCl<sub>2</sub> sowie 0,5 ng Template-DNA.

| Schritt                  | T (°C) | Zeit (min.) | Zykluszahl |
|--------------------------|--------|-------------|------------|
| Anfangsdenaturierung     | 95     | 15          |            |
| Denaturierung            | 95     | 0,5         | 28         |
| Annealing                | 55     | 1           |            |
| Elongation               | 72     | 2           |            |
| Abschließende Elongation | 72     | 8           |            |

**4.12.3. Real-time PCR**

Die Real-time PCR Reaktionen wurden mit einem ABI GeneAmp 5700 Gerät (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Für die Analysen wurde das Quantitect SYBR-Green PCR Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Ein PCR-Ansatz hatte ein Gesamtvolumen von 25 µl und enthielt 12,5 µl PCR-Fertigmix, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2µM jedes Primers sowie 5 µl Template-DNA mit ca. 0,5 ng DNA.

Folgende Primerpaare wurden in der Real-time PCR verwendet:

- 341F/534R zur Gesamtquantifizierung eubakterieller 16S-rRNA Gene in der Probe
- dsRed-for/dsRed-rev zur Quantifizierung der pNB2-Menge in der Probe
- GFPwt-for/GFPwt-rev zur Quantifizierung von SM1443::*gfp2x*-Donorzellen
- CteA2-for/CteA2-rev zur Quantifizierung von *C. testosteroni*

Die PCR-Reaktionen wurden mit folgendem thermalen Protokoll durchgeführt:

| Schritt                  | T (°C) | Zeit (min.) | Zykluszahl |
|--------------------------|--------|-------------|------------|
| Anfangsdenaturierung     | 95     | 15          |            |
| Denaturierung            | 95     | 0,25        | 40         |
| Annealing und Elongation | 60     | 1           |            |

Es wurden jeweils 2- oder 3-fach Bestimmungen durchgeführt. Im Anschluss an die Reaktion wurde eine DNA-Dissoziationsanalyse durchgeführt. Proben, die eine vom gewünschten

Produkt abweichende Dissoziationstemperatur aufwiesen, wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Die durchgeführten Quantifizierungen relativ zum 16S-rDNA Gehalt der Probe erforderten nicht die Verwendung eines quantitativ exakten Standards in dem Sinne, dass im Standard eine bekannte Kopienzahl an Genen vorlag. Daher wurden als Standards DNA-Proben verwendet, in denen alle in einer Analyse untersuchten Gene vorlagen. Diese DNA-Proben wurden dann in serieller 10facher Verdünnung eingesetzt. Einzige Vorbedingung hierbei ist dann, dass die gemessenen Probenwerte innerhalb der Werte der so erstellten Eichkurve liegen, um eine lineare Quantifizierung zu ermöglichen.

Für die Quantifizierung des Gentransfers von pNB2 wurde isolierte genomische DNA von *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp2x* – pNB2::*dsRed* zur Erstellung einer Eichkurve eingesetzt. Für die Quantifizierung wurde als Richtwert das Vorliegen von einer 16S-rDNA-Kopie pro Mbp DNA bzw. pro fg DNA angenommen, ebenso wie für die Kopienzahlen von *dsRed*- sowie *gfp*-Gen. Dies spiegelt die realen Kopienzahlverhältnisse zwar nicht wieder, bietet aber den Vorteil, dass die Plasmidkopienzahl direkt auf die Kopienzahl von Donor-16S-rDNA bzw. *gfp*-Zahl bezogen wird, so dass aus einem Überschuss von Plasmidkopienzahl über *gfp*-Zahl direkt das Vorliegen von Plasmiden in Transkonjuganten gefolgert werden kann. Ebenso wurde für die Quantifizierung von *C. testosteroni* eine Verdünnungsreihe von genomischer DNA von *C. testosteroni* SB3 verwendet. Da mit beiden eingesetzten Primerpaaren 341F/534R und CteA2-for/CteA2-rev jeweils 16S-rDNA quantifiziert wurde, ist hier ein gleiches Kopienzahlverhältnis der beiden quantifizierten Gene gegeben.

### 4.13. Gelelektrophoretische Analysen

#### 4.13.1. Agarose-Gelelektrophorese und Quantifizierung von DNA

Die Auftrennung von DNA aus PCR-Reaktionen erfolgte in einer Horizontal-Gelelektrophorese Apparatur mit 1x TAE-Puffer (Ausubel et al. 1999) in 2%igen TAE-Agarosegelen von 12 cm Breite und 14 cm Länge (Gelvolumen 80 ml). Die Separation erfolgte für 1 h bei 100 V, abgesehen von der Auftrennung von Produkten aus BOX-PCR-Reaktionen, bei denen die Auftrennung für 2,5 h durchgeführt wurde.

Genomische DNA-Präparationen wurden in 0,8% Gelen analysiert.

Die Gele wurden anschließend für 20 min. in Ethidiumbromid (1 µg/ml) gefärbt, mit nachfolgendem 30 min. Entfärben in Wasser. DNA wurde dann unter UV-Licht (302 nm) detektiert und mit Hilfe eines Geldokumentationssystems (biostep Labor- und Systemtechnik, Jahnsdorf) dokumentiert.

Quantifizierung von DNA erfolgte durch densitometrische Analyse von Bandenintensitäten relativ zu Intensitäten von Standardbanden bekannten DNA-Gehalts mit Hilfe des Programms Phoretix-1D (Nonlinear Dynamics, Newcastle, England).

#### 4.13.2. DGGE

Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese wurde in einem DCode System der Firma BioRad (Hercules, USA) durchgeführt. Es wurden Gele mit einem Format von 16 x 16 x 0,1 cm verwendet, die aus 8% Acrylamid (Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1) in 1x TAE-Puffer mit einem Denaturierungsmittel-Gradienten von 40-80% (Abb. 5.2.c) bzw. 40-60% (Abb. 5.2.f) bestanden, wobei 100% Denaturierungsmittel als 40% Formamid / 7 M Harnstoff definiert sind. Der Gellauf wurde für 16 h bei 60°C und 60 V durchgeführt. Im Anschluss an den Lauf wurden die Gele mit SYBR-Gold (Molecular Probes, Eugene, USA) in 1x TAE pH 7,5 für 30

min. gefärbt und wieder für 30 min. im selben Puffer entfärbt und DNA wie in 4.12.1. beschrieben detektiert und dokumentiert.

DGGE-Banden von Interesse wurden mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und durch Überschichten mit 25 µl ddH<sub>2</sub>O über Nacht bei 30°C wieder aus dem Gel eluiert. Je 2 µl des Überstands wurden als Template-DNA zur Reamplifikation durch PCR eingesetzt. Die Sequenzreinheit des Produkts wurde nochmals durch DGGE überprüft und die Bande, wenn nötig, nochmals aufgereinigt. Zeigte sich nur eine Bande in der DGGE, wurde das Produkt zum Sequenzieren mit Primern ohne GC-Clamp reamplifiziert.

#### 4.13.3. RISA

PCR-Produkte aus einer RISA-Reaktion wurden durch Auftrennung in 2% MetaPhor-Agarose (Cambrex Co., New Jersey, USA) in 0,5x TBE (Ausubel et al. 1999) analysiert. Die Laufzeit betrug hier 15 h bei 35 V. Im Anschluß wurden die Gele mit SYBR-Gold in 0,5x TBE pH 7,5 gefärbt, entfärbt und die DNA wie beschrieben detektiert und dokumentiert.

#### 4.14. Vorbereitung von PCR-Produkten für Sequenzierungen

Sequenzreine PCR-Produkte wurden mit Hilfe des NucleoSpin Extract Kit (Macherey und Nagel, Oensingen, Schweiz) direkt aufgereinigt und in ddH<sub>2</sub>O eluiert. Nach Bestimmung der DNA-Konzentration (Kap. 4.12.1.) wurden pro Sequenzierreaktion je 20 ng DNA pro 100 bp PCR-Produkt in einer SpeedVak-Zentrifuge getrocknet. Die Sequenzierungen wurden dann bei der Firma MWG Biotech (Ebersberg) in Auftrag gegeben. Als Sequenzierprimer wurden die Primer 341F (Kap. 5.2.) sowie für Vollsequenzierungen zusätzlich 518R und 907F verwendet, von denen pro Reaktion 5 µl einer 10 µM Lösung beigelegt wurden.

#### 4.15. Fluoreszenz in situ Hybridisierung

FISH wurde generell nach dem Protokoll von Amann et al. (1995) durchgeführt. Hier ist nur das in Bezug auf die Formamidkonzentration optimierte Protokoll für die Hybridisierung von Proben mit der für *C. testosteroni* spezifischen Sonde CteA (in dieser Arbeit entwickelt) simultan mit der allgemeinen eubakteriellen Sonde Eub338 (Amann et al. 1990) angegeben. Die Sonden hatten folgende Sequenzen und Fluorophore und wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) produziert:

| Name   | Sequenz 5'-3'              | Fluorophor |
|--------|----------------------------|------------|
| CteA   | CAT GAC CCG GGG ATA TTA GC | Cy3        |
| Eub338 | GCT GCC TCC CGT AGG AGT    | Cy5        |

PFA-Lösung:

- 4% Paraformaldehyd in PBS, sterilfiltriert

Hybridisierungspuffer mit 30% Formamid:

- 20 mM Tris-HCl pH 8,0
- 30% Formamid
- 0,01% SDS
- 900 mM NaCl

Waschpuffer für 30% Formamid:

- 20 mM Tris-HCl pH 8,0
- 102 mM NaCl
- 5 mM EDTA pH 8,0
- 0,01% SDS

Zur Fixierung der Probe wurde diese zunächst in PBS gewaschen. Danach wurde 1 Vol. Probe mit 3 Vol. PFA-Lösung vermischt und 1-3 h bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen für 5 min. bei 5000 g abzentrifugiert, in PBS gewaschen, wiederum für 5 min. bei 5000 g abzentrifugiert und schließlich in PBS resuspendiert. Abschließend wurde 1 Vol. Ethanol abs. zugegeben und die Probe in dieser Ethanol/PBS-Lösung bei -20°C gelagert.

Für die Hybridisierung wurden 5-10 µl Probe in eine Aussparung eines 6-Feld-Objektträgers pipettiert und bei 46°C getrocknet. Danach wurde die Probe durch je 3 min. lagern des Objektträgers in 50, 80 und 100% Ethanol dehydriert und wiederum getrocknet.

Danach wurde pro Aussparung 20 µl Hybridisierungspuffer mit je 5 ng/µl der Sonden CteA und Eub338 pipettiert. Der Objektträger wurde in ein 50 ml Falcon-Gefäß, das eine mit 2 ml Hybridisierungspuffer getränkte Zewa-Papierlage enthielt, waagrecht eingelegt und für 90 min. bei 46°C hybridisiert. Danach wurde die Hybridisierungslösung mit 5 ml 48°C warmen Waschpuffer vorsichtig abgespült, der Objektträger in ein mit Waschlösung gefülltes Falcon-Gefäß gelegt und für 15 min. bei 48°C inkubiert. Zur Entfernung von Salzresten wurde der Träger dann kurz in dH<sub>2</sub>O eingetaucht und wiederum bei 46°C getrocknet. Anschließend wurde die hybridisierte Probe zur Verzögerung des Ausbleichens bei der Mikroskopie mit Citifluor AF1 (Citifluor, Leicester, England) überschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt und das Deckglas an den Rändern mit farblosem Nagellack abgedichtet und fixiert.

#### 4.16. Quantitative Bildanalyse

Für eine flächenbasierende Quantifizierung von CteA-markierten Zellen im Vergleich zur von Eub338 gefärbten Zellfläche wurden von einer Probe je 20 mikroskopische Gesichtsfelder mit einer Kantenlänge von 92 µm im CLSM (Kap. 4.4.2.) aufgenommen und als TIFF-RGB-Bilder gespeichert, wobei je ein Farbkanal dem Signal einer Sonde zugeordnet war. Diese Bilder wurden in das Bildanalyse-System Quantimet Q500W (Leica, Cambridge, England) eingelesen. Anhand eines Makros wurden die Signale jeder Sonde digitalisiert und ihr Bedeckungsanteil an der Gesamtbildfläche bestimmt. Zusätzlich wurde der Flächenanteil bestimmt, der sowohl von CteA- als auch von Eub338-Sonde eingenommen wurde. Der Anteil von CteA-markierten Zellen im Vergleich zur Gesamtzellfläche wurde dann definiert als

$$\text{CteA-Anteil \%} = 100 * (\text{Flächen\% CteA+Eub338}) / (\text{Flächen\% Eub338})$$

Die angegebenen Flächenwerte sind Mittelwerte der aus der Analyse der 20 Gesichtsfelder bestimmten Daten mit Angabe der Standardabweichung der Gesamtprobe.



#### 4.17. Bioinformatische Methoden

Die phylogenetischen Zuordnungen von sequenzierten 16S-rRNA Sequenzen wurden durch Suchen nach ähnlichen Sequenzen in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) sowie in RDP-II (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>) untersucht.

Diese beiden Datenbanken wurden auch für die Untersuchung der Spezifität der in dieser Arbeit entwickelten Oligonukleotide für PCR und FISH benutzt.

Der in Kap. 5.2.1. dargestellte phylogenetische Baum aus pJP4-Transkonjugantensequenzen wurde von Dr. Michael Lebuhn (WGA) unter Verwendung des GENIUSnet HUSAR Computers (<http://genome.dkfz-heidelberg.de/biounit/>) erstellt. Hierzu wurden aus der EMBL-Datenbank mit FASTA-Suche eine Auswahl von ähnlichen Sequenzen getroffen und nach einem Sequenzvergleich mit dem Programm Clustree sowie Treeview (Page 1996) der phylogenetische Baum konstruiert.

In allen weiteren in dieser Arbeit durchgeführten phylogenetischen Analysen wurde für Sequenzvergleiche das Programm ClustalX 1.81 eingesetzt, mit dem auch phylogenetische Bäume nach der Neighbour-joining-Methode berechnet werden und mit dem Programm NJ-Plot grafisch dargestellt werden können (Thompson et al. 1997).

Die grafische Bearbeitung der phylogenetischen Bäume erfolgt in CorelDraw 11.

Die Clusteranalyse der (GTG)<sub>5</sub>-Profile von pJP4-Transkonjuganten erfolgte durch Vergleich der Bandenprofile mittels des Pearson-Korrelationskoeffizienten mit dem Programm GelCompar II (Applied Maths, Gent, Belgien).

## **5. ERGEBNISSE**

### **5.1. Kulturunabhängiger Nachweis von konjugativem Plasmidtransfer**

Eine der Fragestellungen der vorliegenden Arbeit war der Nachweis des Plasmidtransfers durch Konjugation direkt in der Umweltprobe, ohne einen vorherigen Kultivierungsschritt. Generell sind zur Detektion und Quantifizierung von Plasmidtransfers die Analyse von drei unterschiedlichen Populationen von Bakterienzellen notwendig:

- die Rezipientenpopulation, d. h. die Population der Zellen, die als mögliche Empfänger des Plasmids funktionieren können. Alternativ hierzu ist es auch möglich, die Gesamtzellzahl der Probe zu bestimmen. Die phylogenetische Diversität kann hierbei von einer Art bzw. einem Bakterienstamm in Reinkultorexperimenten bis hin zur hochdiversen Population einer Umweltprobe schwanken.
- die Donorpopulation, d. h. die Population der Zellen, die ursprünglich das Plasmid enthalten und von denen es zu den Rezipienten weitergegeben wird. Im Falle eines Reinkulturversuchs ebenso wie bei einem Versuch mit einer phylogenetisch gemischten Rezipientenpopulation wird es sich hierbei um eine Monokultur von Zellen handeln.
- die Transkonjugantenpopulation, d. h. die Teilpopulation der Rezipientenzellen, die in der Probe wirklich das Plasmid erhalten haben. Ihre mögliche phylogenetische Diversität orientiert sich zunächst an der Diversität der Rezipientenpopulation, wird aber auch von der Inkompatibilitätsgruppe des Plasmids sowie von vor- oder nachteiligen Auswirkungen der auf dem Plasmid enthaltenen genetischen Information, die möglicherweise nicht für alle Transkonjugantenspezies nutzbar ist, beeinflusst.

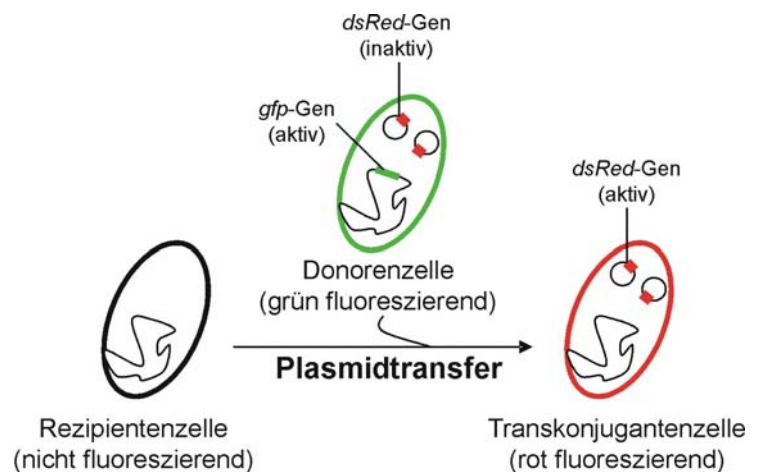
Eine Alternativmöglichkeit zur Bestimmung der Transkonjugantenpopulation ist die Quantifizierung der Gesamtpopulation von plasmidtragenden Zellen, d. h. von Donoren und Transkonjuganten zusammen, von denen dann die Zahl der Donorzellen abgezogen wird. Hierbei kann ein sicherer Nachweis von konjugativen Plasmidtransfer wahrscheinlich nur bei einem großen Überschuss von Transkonjugantenzellen über Donorzellen geführt werden.

Die nachfolgenden zwei Kapitel demonstrieren zwei Möglichkeiten des kulturunabhängigen Nachweises von konjugativem Plasmidtransfer, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurden.

### 5.1.1. Nachweis durch Einsatz fluoreszierender Proteine

Hierbei wurde ein ursprünglich von Christensen et al. (1998) entwickeltes System eingesetzt, das eine mikroskopische Detektion von Transkonjugantenzellen in einer Probe dadurch ermöglicht, dass Transkonjuganten ein auf dem Plasmid kodiertes *gfp*-Gen exprimieren und dadurch eine grüne Fluoreszenz entwickeln, während dieses *gfp*-Gen in Donorzellen abgeschaltet bleibt, wodurch diese fluoreszenzmikroskopisch nicht detektiert werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses System mit einem *dsRed*-Gen verwendet und zusätzlich dadurch erweitert, dass Donorzellen chromosomal mit einem *gfp*-Gen markiert wurden. Hierdurch wurde eine simultane Detektion von Donorzellen (grün fluoreszierend), Transkonjugantenzellen (rot fluoreszierend) sowie von Rezipientenzellen (nicht fluoreszierend) ermöglicht. Abbildung 5.1.a) zeigt eine schematische Darstellung des Systems.

Abbildung 5.1.a):  
Schematische Darstellung der  
Gentransfer-Visualisierung



Zunächst wurden in den Donorstamm *Pseudomonas putida* SM1443 (Christensen et al. 1998) durch Transposonmutagenese mit dem Plasmid pUT*gfp*2x (Unge et al. 1997) zwei Kopien des Wildtyp *gfp*-Gens unter Kontrolle eines *psbA*-Promotors eingeführt. Der resultierende Stamm *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp*2x zeigte eine konstitutive grüne Fluoreszenz.

Dann wurden die in dieser Arbeit verwendeten Modellplasmide pWW0, pJP4, sowie pNB2 mit einem *dsRed*-Gen unter Kontrolle eines *lac*-Promotors markiert und in den neu konstruierten Donorstamm eingeführt. Hierzu wurden Transposonmutagenesen mit den ursprünglichen Wirtsstämmen der drei Plasmide (*Pseudomonas putida* mt-2, *Ralstonia eutropha* JMP134, *Comamonas testosteroni* I2) sowie dem Transposonplasmid pUTGm-*P<sub>lac</sub>*-*dsRed* durchgeführt, was in einer Mischung von diesen Wirtsstämmen resultierte, die das

*dsRed*-Transposon sowohl im Chromosom als auch auf den Plasmiden trugen. *DsRed*-markierte Plasmide wurden dann durch konjugativen Transfer von den markierten Wirtsstämmen in den Donorstamm *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp2x* isoliert.

Die resultierenden Stämme *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp2x* mit den Plasmiden pWW0::*dsRed*, pJP4::*dsRed* oder pNB2::*dsRed* zeigten alle eine konstitutive grüne Fluoreszenz. Die Expression des plasmidkodierten *dsRed*-Gens ist normalerweise durch die Wirkung des von SM1443 produzierten LacI-Proteins reprimiert, kann jedoch durch die Zugabe des Allolactose-Analogons IPTG induziert werden, was zur Entwicklung einer roten Fluoreszenz führt. Abbildung 5.1.b) zeigt jeweils Aufnahmen von 24 h alten Reinkulturbiofilmen von *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp2x* - pWW0::*dsRed*, die entweder ohne oder mit Zugabe von IPTG kultiviert wurden.

Abbildung 5.1.b):

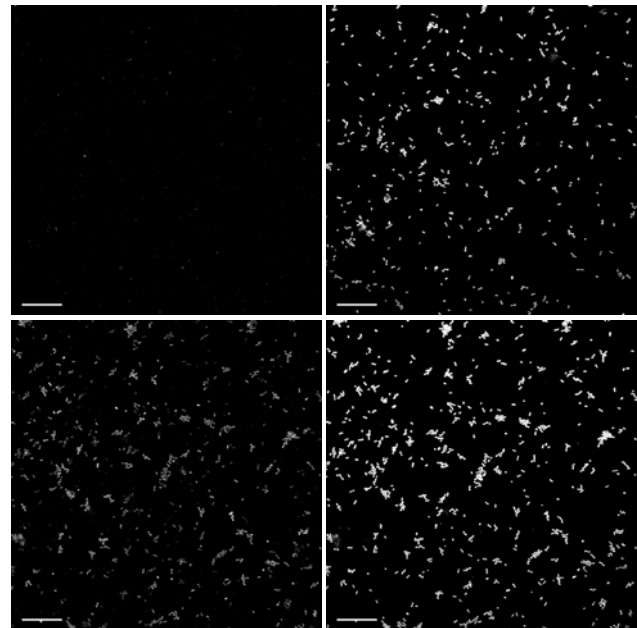
CLSM-Aufnahme von Objektträger-biofilmen von *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp2x* - pWW0::*dsRed* nach 24 h Kultivierung ohne (obere Reihe) sowie mit 0,5 mM IPTG (untere Reihe) im Kulturmedium.

In der rechten Reihe wird Rotfluoreszenz, in der linken Reihe Grünfluoreszenz detektiert. Die Aufnahmen zeigen jeweils dasselbe mikroskopische Feld.

(rechte Seite) Anregung bei 543 nm, Detektion von Wellenlängen >570 nm.

(linke Seite) Anregung bei 488 nm, Detektion von Wellenlängen im Bereich 515-540 nm.

Balkenlänge: 20 µm



Die Eignung des entwickelten Donorstammes mit den entsprechenden Plasmiden zur Visualisierung des horizontalen Gentransfers wurde zunächst in Reinkulturversuchen erprobt. Abbildung 5.1.c) zeigt Zellen aus einem Agar plate mating von *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp2x* - pWW0::*dsRed* mit *Pseudomonas putida* DSM 291 als Rezipienten. Es ist eine gute Differenzierung von rund bis oval geformten Donorzellen (grün bzw. türkis dargestellt) und stäbchenförmigen Transkonjuganten- (rot bzw. pink dargestellt) sowie Rezipientenzellen (blau dargestellt) möglich.

Abbildung 5.1.c):

CLSM-Aufnahme von resuspendierten Zellen aus einem Agar-surface-mating Ansatz von *P. putida* SM1443::*gfp2x* - pWW0::*dsRed* mit *P. putida* DSM 291.

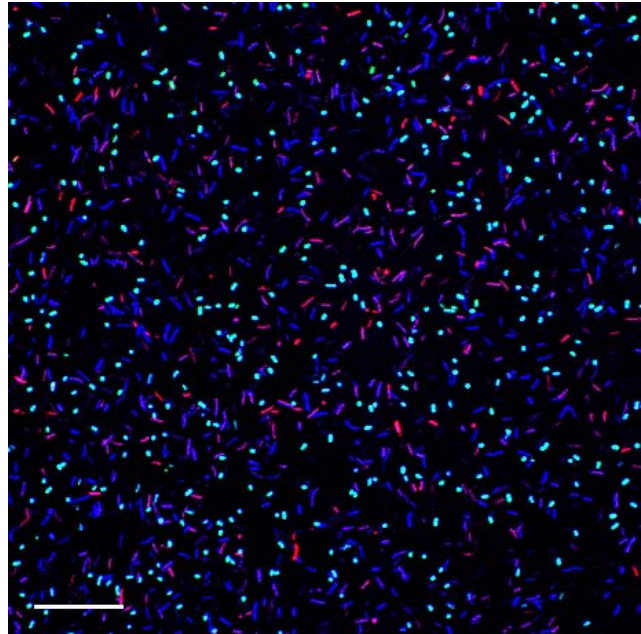
Der Biofilm ist mit dem allgemeinen Nukleinsäurefarbstoff Syto 60 gefärbt worden, um alle Zellen sichtbar zu machen.

Grün/Türkis: Donorzellen

Rot/Pink: Transkonjugantenzellen

Blau: Syto 60-Färbung

Balkenlänge: 20 µm



Ebenso zeigt Abbildung 5.1.d) einen auf Objektträgern gebildeten Modellbiofilm von *Pseudomonas putida* DSM 291, dem nach 1 Tag Vorkultivierung *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp2x* - pWW0::*dsRed* zugegeben wurde. Auch hier sind Donoren (grün), Transkonjuganten (rot) sowie Rezipienten (blau) gut zu unterscheiden.

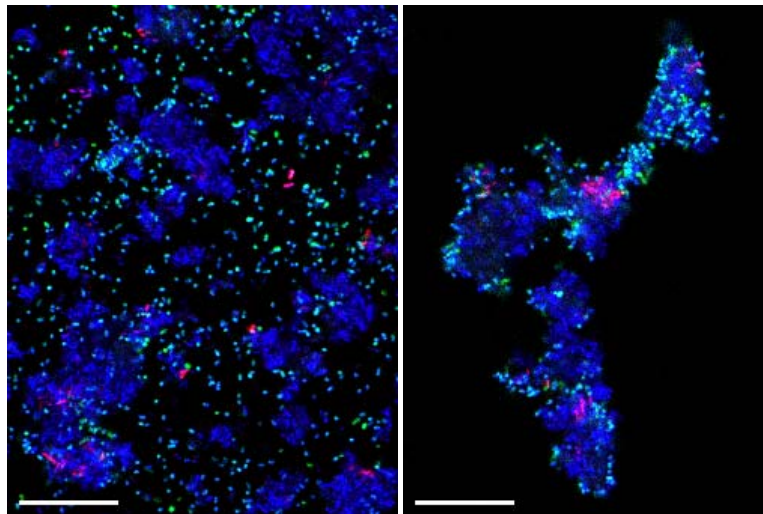
Abbildung 5.1.d):

CLSM-Aufnahmen eines 8 Tage alten Biofilms von *P. putida* DSM 291 7 Tage nach Zugabe von *P. putida* SM1443::*gfp2x* - pWW0::*dsRed*.

Farbmarkierungen: s. Abb. 5.1.c) (rechts) xy-Schnitt durch eine Biofilmschicht in der Nähe der Aufwuchsfläche

(links) Schnitt durch eine Mikrokolonie in einer höheren, mehr dem Medium zugewandten Biofilmschicht.

Balkenlänge: 20 µm



### 5.1.2. Nachweis durch PCR

Ein auf Multiplex-PCR basierender Nachweis zur qualitativen Einschätzung von konjugativem Plasmidtransfer wurde für die beiden Plasmide pJP4 sowie pNB2, ausgehend von *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp2x* als Donorstamm entwickelt. Es wurden Primerpaare

für die folgenden Markergene entwickelt: für das 16S-rRNA Gen als Marker für die Gesamtzellzahl, das *gfp*-Gen als Marker für die Donorzellzahl sowie für das *tfdB*-Gen auf pJP4 bzw. das *tdnQ*-Gen auf pNB2 als Marker für die Anzahl von plasmidtragenden Zellen.

In der angestrebten Multiplex-PCR sollten Produkte von allen drei Markergenen simultan amplifiziert werden und bei einer nachfolgenden Gelelektrophorese gut unterscheidbare Größen aufweisen, um eine simultane Identifikation zu ermöglichen. Hierbei wurde eine Abschätzung von Gentransfer durch Intensitätsunterschiede bzw. An- oder Abwesenheit der sich im Agarosegel befindlichen Banden angestrebt: während eine reine Donorzellkultur Banden von allen drei PCR-Produkten in gleicher Intensität aufweisen sollte, sollte bei einer Zunahme von Transkonjuganten die Intensität der Plasmid-Bande relativ zur Intensität der vom *gfp*-Gen resultierenden Bande ansteigen. Ebenso sollten die Verhältnisse von Plasmid- zu 16S-Bande sowie von *gfp*- zu 16S-Banden eine relative Aussage über den Anteil von Donor- bzw. Transkonjugantenpopulationen an der Gesamtzellpopulation ermöglichen.

Tabelle 5.1.a) gibt eine Übersicht über die verwendeten PCR-Primer. Insgesamt wurde bei allen Primern eine vergleichbare Schmelztemperatur angestrebt. Die hier angegebenen Primer 517f und 1072r für das 16S-rRNA Gen sind publizierte Primer (Gillan et al. 1998, Muyzer und Smalla 1998), deren Sequenzen entsprechend modifiziert wurden, was die Spezifität der Primer bzgl. der Proteobakterien jedoch nicht ändert. Abweichende Schmelztemperaturen weisen nur die Primer für das *tfdB*-Gen von pJP4 auf, bei denen ebenfalls bereits publizierte Oligonukleotide (Neilson et al. 1992) unverändert verwendet wurden.

Tabelle 5.1.a): Für die kulturunabhängige Analyse von horizontalem Gentransfer verwendete PCR-Primer.

| Name      | Sequenz 5'-3'                   | T <sub>M</sub> | Produktlänge |
|-----------|---------------------------------|----------------|--------------|
| 517F      | GCC AGC AGC CGC GGT AAT AC      | 63,5           | 556 bp       |
| 1072R     | CGA GCT GAC GAC AGC CAT GC      | 63,5           |              |
| GFPwt-for | TTT CAA GAG TGC CAT GCC CGA AGG | 64,4           | 341 bp       |
| GFPwt-rev | CTG GTA AAA GGA CAG GGC CAT CGC | 66,1           |              |
| tfdB-for  | GCT GAC GGC GTG TCG TCG CG      | 67,6           | 206 bp       |
| tfdB-rev  | GAT GGA CGA TGC GCG ACG TA      | 61,4           |              |
| tdnQ-for  | GCG CAG CAT CGA GGA TGA ATT G   | 62,1           | 191 bp       |
| tdnQ-rev  | GAT GCC AGC CCG AGA CCA AG      | 63,5           |              |
| dsRed-for | TTG AAG ACG GTG GCG TCG TTA C   | 62,1           | 181 bp       |
| dsRed-rev | CCT TTC AAC ACG CCA TCA CGA G   | 62,1           |              |
| 341F      | CCT ACG GGA GGC AGC AG          | 60,0           | 194 bp       |
| 534R      | ATT ACC GCG GCT GCT GGC         | 60,5           |              |

Für die Entwicklung des Assays wurden zunächst Mischungen von definierten Zellzahlen des jeweiligen Donorstammes sowie von *Pseudomonas putida* KT2442 ohne bzw. mit dem

jeweiligen Plasmid als Rezipienten und Transkonjuganten eingesetzt. Sowohl für pJP4 (Primerpaare 517F/1072R, GFPwt, tfdB) als auch für pNB2 (Primerpaare 517F/1072R, GFPwt, tdnQ) konnte nach einer Optimierung durch Variation der MgCl<sub>2</sub>- und Primerpaar-Konzentrationen sowie der PCR-Zyklenzahl eine simultane Amplifikation aller drei PCR-Produkte erreicht werden. Abbildung 5.1.e) zeigt Agarosegele, auf denen PCR-Produkte von Testansätzen für die pNB2-spezifische Multiplex-Reaktion aufgetrennt wurden.

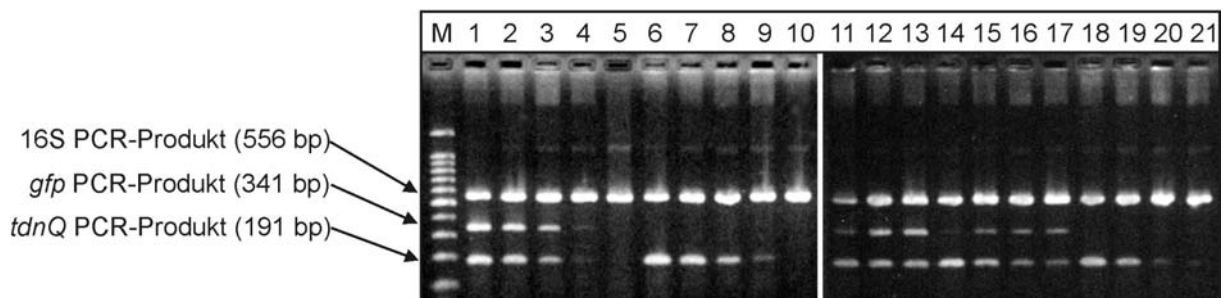


Abbildung 5.1.e): Auftrennung von Testansätzen für die pNB2-spezifische Multiplex-PCR-Reaktion in einem 2% TAE-Agarosegel. M: 100 bp Leiter, die Nummern der Testansätze sind in Tabelle 5.1.b) erläutert.

In Tabelle 5.1.b) sind die jeweiligen Zellzahlen von Rezipienten (*P. putida* KT2442), Donoren (*Pseudomonas putida* SM1443::*gfp2x* – pNB2::*dsRed*) sowie von Transkonjuganten (*P. putida* KT2442 – pNB2::*dsRed*) angegeben, die pro Reaktionsansatz eingesetzt wurden.

Tabelle 5.1.b): Zusammensetzung der Zellsuspensionen, die für die in Abb. 5.1.e) gezeigten Testreaktionen als Template-DNAs verwendet wurden.

|        |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
|--------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Ansatz | 1               | 2               | 3               | 4               | 5               | 6               | 7               | 8               | 9               | 10              |                 |
| Rez.   | -               | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>6</sup> | -               | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>6</sup> |                 |
| Don.   | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>5</sup> | 10 <sup>4</sup> | 10 <sup>3</sup> | 10 <sup>2</sup> | -               | -               | -               | -               | -               |                 |
| TK.    | -               | -               | -               | -               | -               | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>5</sup> | 10 <sup>4</sup> | 10 <sup>3</sup> | 10 <sup>2</sup> |                 |
| Ansatz | 11              | 12              | 13              | 14              | 15              | 16              | 17              | 18              | 19              | 20              | 21              |
| Rez.   | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>6</sup> |
| Don.   | 10 <sup>5</sup> | 10 <sup>5</sup> | 10 <sup>5</sup> | 10 <sup>4</sup> | 10 <sup>4</sup> | 10 <sup>4</sup> | 10 <sup>4</sup> | 10 <sup>3</sup> | 10 <sup>3</sup> | 10 <sup>3</sup> | 10 <sup>3</sup> |
| TK.    | 10 <sup>5</sup> | 10 <sup>4</sup> | 10 <sup>3</sup> | 10 <sup>5</sup> | 10 <sup>4</sup> | 10 <sup>3</sup> | 10 <sup>2</sup> | 10 <sup>5</sup> | 10 <sup>4</sup> | 10 <sup>3</sup> | 10 <sup>2</sup> |

Die Spuren 1-5 bzw. 6-10 zeigen serielle 10fache Verdünnungen des Donor- bzw. Transkonjugantenstammes in einer Suspension von Rezipientenzellen. Aus dem Gel ist ersichtlich, dass ein Populationanteil von 0,1% von Donoren bzw. Transkonjuganten noch detektierbar ist (Spuren 4 und 9). Weiterhin zeigen Spuren 1-4 jeweils gleiche Intensitäten von GFP- bzw. tdnQ-Bande, was zeigt, dass die Amplifikationseffizienzen von GFP- bzw.

tdnQ-Produkt über den gesamten detektierbaren Bereich ähnlich sind. Dies ist notwendig, um falschpositive Ergebnisse über das Stattfinden von Gentransfer zu vermeiden.

In den Spuren 11-21 werden definierte Mischungen von Donoren, Transkonjuganten sowie Rezipientenzellen analysiert. Hierbei ist ersichtlich, dass bei einem 1:1 Verhältnis von Transkonjuganten zu Donoren (Spuren 11 und 15) die tdnQ-Bande eine höhere Intensität als die GFP-Bande aufweist, was in einem realen Experiment auf horizontalen Gentransfer hindeuten würde. Bei einem 1:10 Verhältnis von Transkonjuganten zu Donoren (Spuren 12 und 16) ist kein Intensitätsunterschied mehr festzustellen, während bei einem 10:1 Verhältnis (Spur 14) die GFP-Bande kaum noch detektierbar ist. Spuren 18-21 zeigen, dass bei einem niedrigen Anteil des Donors an der Gesamtpopulation sowie einem Überschuss an Transkonjuganten durch präferentielle Amplifikation des tdnQ-Produkts möglicherweise kein GFP-Produkt mehr detektierbar ist.

In einem nachfolgendem Versuch wurde die Übertragbarkeit von PCR-basierender Gentransferanalyse von pNB2 auf die quantitative real-time PCR untersucht. Hierfür wurden die Primer 341F/534R (Smits et al. 2004) zur Bestimmung der Gesamtzahl an 16S-rRNA Genen, dsRed-for/dsRed-rev zur Bestimmung der Plasmidkopienzahl sowie GFPwt-for/GFPwt-rev als Marker für die Donorhäufigkeit eingesetzt. Eine Verdünnungsreihe von genomischer DNA von *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp2x* – pNB2::*dsRed* im Bereich von 0,001 bis 10 ng wurde als Standard eingesetzt und zeigte in diesem Konzentrationsbereich eine lineare Beziehung ( $R^2$ -Werte  $> 0,995$ ) zwischen  $\log(\text{DNA-Menge})$  sowie den entsprechenden Ct-Werten, bei denen die Menge an produziertem PCR-Produkt einen gesetzten Schwellenwert übersteigt. Insgesamt eignet sich diese Methode also ebenfalls zur Quantifizierung von Plasmid- und Donor-DNA relativ zur Gesamtzahl an 16S-rRNA Genen in der Probe. Allerdings muss hier erwähnt werden, dass die Amplifikationseffizienz für das GFP-Produkt wahrscheinlich aufgrund der höheren Produktlänge sehr viel schlechter war als für dsRed- und 16S-rDNA-Produkte.

Insgesamt zeigen die durchgeführten Versuche, dass durch die PCR-basierende Abschätzung der Häufigkeiten von Donor-, Plasmid- und Gesamtzellzahl-spezifischen Genfragmenten eine kulturunabhängige Detektion und Quantifizierung von konjugativem Plasmidtransfer vorgenommen werden kann.



## 5.2. Plasmid pJP4

Das Plasmid pJP4 ist eines der am längsten bekannten und auch am besten charakterisierten katabolischen Plasmide. Es trägt Gene für den Abbau des Herbizids 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure sowie für den Abbau von 3-Chlorbenzoat. Zusätzlich ist auf dem Plasmid ein Quecksilberresistenz-Operon kodiert.

### 5.2.1. Wirtsspektrum von pJP4 in Klärschlamm

Für eine detaillierte Untersuchung des Wirtsspektrum von pJP4 in Klärschlamm wurde eine Konjugation von *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp2x* – pJP4::*dsRed* mit einer phylogenetisch diversen Rezipientengesellschaft, die aus Klärschlamm bestand, der über Nacht in einem synthetischen Abwasser vorkultiviert wurde, durchgeführt. Aus diesem Ansatz wurden rot fluoreszierende Zellen mittels Durchflußzytometrie angereichert (Durchführung von Dr. J. W. Ellwart, GSF-Forschungszentrum München). Mikroskopische Analyse der Zielfraktion dieser Sortierung zeigte, dass nicht rot fluoreszierende Einzelzellen, sondern Zellkluster bestehend aus Transkonjuganten, Donoren sowie nicht fluoreszierenden Zellen aussortiert wurden. Um Transkonjuganten-Reinkulturen zu erhalten, wurde diese Zielfraktion auf Medien ausplattiert, die das Antibiotikum Gentamycin sowie Quecksilberchlorid enthielten, um auf plasmidhaltige Zellen zu selektieren. Schließlich wurden 56 aus rot fluoreszierenden Transkonjugantenzellen bestehende Einzelkolonien isoliert.

Zur Analyse der genetischen Diversität dieser Isolate wurde eine PCR mit dem Primer (GTG)<sub>5</sub> durchgeführt, der für eine Kultur spezifische Bandenmuster ("genetischer Fingerabdruck") produziert. Abbildung 5.2.a) zeigt eine mit dem Programm GelCompar II durchgeführte Clusteranalyse dieser Bandenmuster.

Auf Grundlage dieser Fingerprints wurde eine Auswahl genetisch unterschiedlicher Isolate getroffen, deren 16S-rRNA Gene partiell sequenziert wurden (in Abbildung 5.2.a) markiert). Abbildung 5.2.b) zeigt einen aus den 16S-Sequenzen erstellten phylogenetischen Baum (Erstellung: Dr. Michael Leuhn, WGA), der auch Datenbanksequenzen von ähnlichen Bakterienstämmen sowie von bereits bekannten pJP4-Transkonjugantengenera (Daane et al. 1996, DiGiovanni et al. 1996, Don und Pemberton 1981, Goris et al. 2002, Kleinsteuber et al.

2001, Neilson et al. 1994, Newby et al. 2000a, Newby und Pepper 2002, Schmidt-Eisenlohr et al. 2001) enthält.

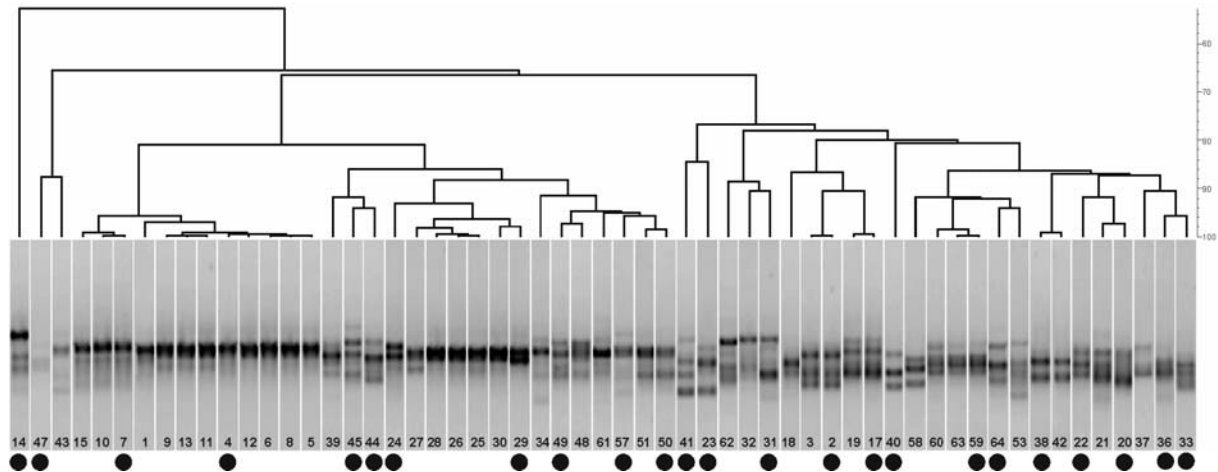


Abbildung 5.2.a):

GelCompar II Clusteranalyse von  $(GTG)_5$ -Profilen der aus Klärschlamm isolierten pJP4-Transkonjugantenstämme. Für die 16S-Sequenzierung ausgewählte Isolate sind durch Punkte markiert.

Alle 24 Isolate gehörten zu den Proteobakterien und zeigten eine breite taxonomische Verteilung innerhalb dieser Gruppe. Die meisten Isolate gehörten zu den *Rhizobiaceae* (8 Isolate), den *Comamonadaceae* (4 Isolate) oder den  $\gamma\beta$ -Proteobakterien (7 Isolate). Weiterhin zeigten die meisten Isolate eine Sequenzidentität von mehr als 99% zur nächstähnlichen Datenbanksequenz.

Weiterhin wurden die sequenzierten Isolate auf ihre Fähigkeit untersucht, 2,4-D als Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen. Dafür wurden die Stämme bzgl. ihres Wachstums in MMN-Medium mit 2,4-D als einziger Kohlenstoffquelle sowie Wachstum in einem Indikatormedium untersucht. Nur die beiden *Pseudomonas putida* Stämme TK20 und TK38 sowie die *Delftia* Stämme TK31 und TK36 zeigten Wachstum in beiden Medien.

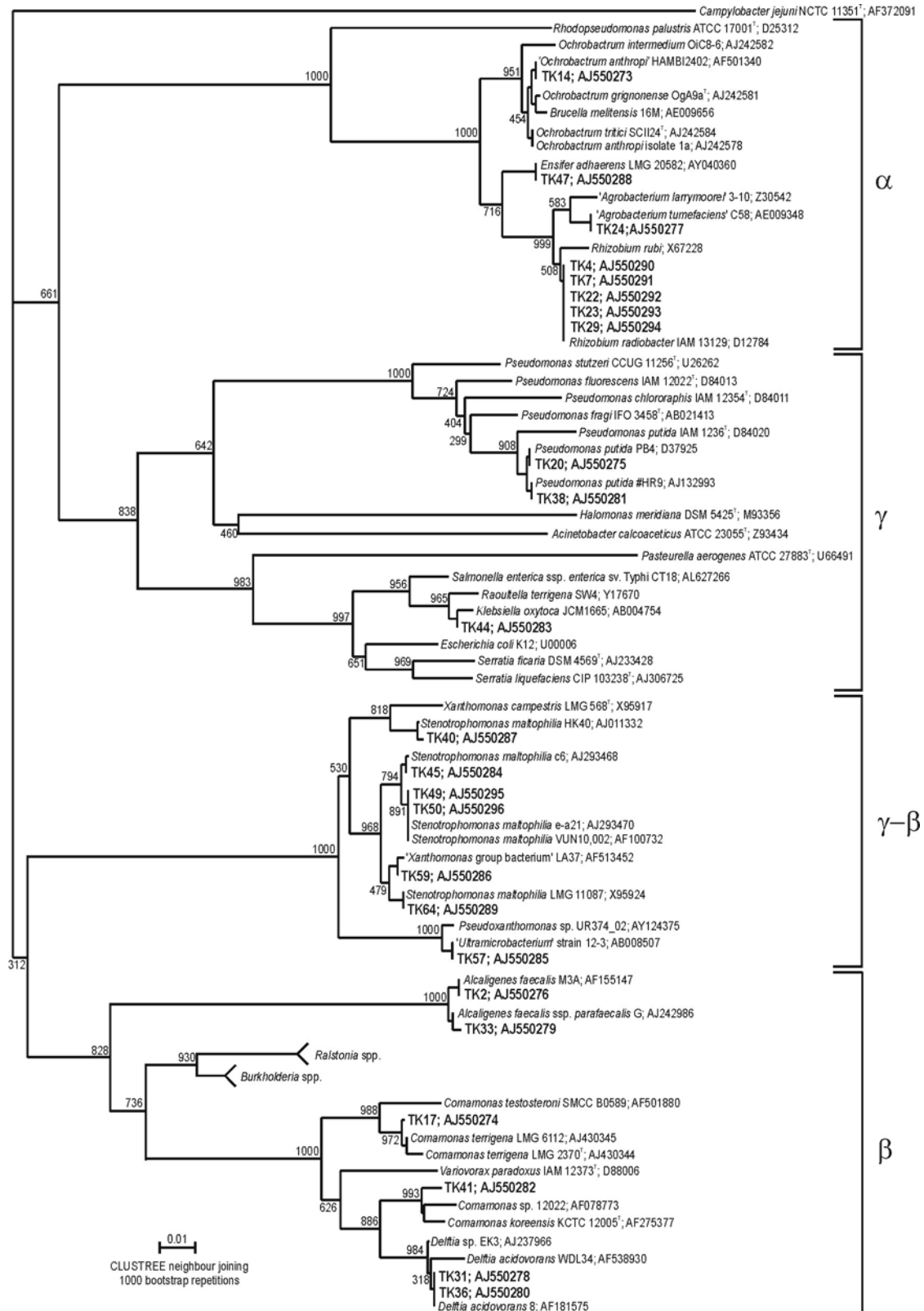


Abbildung 5.2.b):

Nach der Neighbour-joining-Methode berechneter phylogenetischer Baum, der aus partiellen 16S-rRNA-Sequenzen (ca. 550 bp, *E. coli* Positionen 367-913) von den hier isolierten pJP4-Transkonjugantenstämmen (fett gedruckt), ähnlichen Datenbanksequenzen sowie Arten bereits bekannter pJP4-Transkonjugantengenera (*Rhodopseudomonas*, *Ochrobactrum*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Pasteurella*, *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Serratia*, *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Burkholderia*) erstellt wurde.

Da pJP4 selbst auch mobile genetische Elemente enthält, könnte es möglicherweise auch seine katabolischen Gene verlieren. Die Integrität der Plasmide in den sequenzierten Transkonjuganten bzgl. des 2,4-D Abbaus wurde deshalb mit 2 Methoden überprüft:

- Alle sequenzierten Isolate zeigten ein PCR-Produkt nach einer PCR mit Primern für das am 2,4-D Abbau beteiligte *tfdB*-Gen.
- Alle Plasmide aus den Isolaten, die kein Wachstum auf 2,4-D zeigten, konnten durch Konjugation wieder in den plasmidfreien Stamm *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp2x* als Rezipienten übertragen werden. Dieser Stamm ist ohne Plasmid nicht in der Lage, auf 2,4-D zu wachsen, zeigte aber nach Übertragung der Plasmide aus den Transkonjuganten in jedem Fall ein Wachstum auf 2,4-D als Kohlenstoffquelle.

#### 5.2.2. Bioaugmentation der mikrobiellen Biozönose eines SBBR mit pJP4

Für diesen Versuch wurde ein Aufbau von zwei Sequencing Batch Biofilm Reaktoren (SBBRs) verwendet, die ein Gesamtvolumen von 2 l und ein Flüssigkeitsvolumen von 1 l aufwiesen. Als Biofilmträgermaterial wurden Glasperlen mit einem Durchmesser von 8 mm eingesetzt. In der Einfahrphase wurden beide Reaktoren zunächst mit einer gemischten Bakterienkultur aus Klärschlamm, der über Nacht vorkultiviert wurde, inokuliert und dann mit einer Zyklusdauer von 8 Stunden betrieben. Als Medium wurde ein synthetisches Abwasser mit Acetat, Glucose, Gluconat und Citrat als Kohlenstoffquellen eingesetzt. 7 Tage nach Beginn des Versuchs wurden zu einem der beiden Reaktoren (bioaugmentierter Reaktor) *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp2x* – pJP4::*dsRed* auf eine Zelldichte von  $10^8$  Zellen/ml zugegeben, während der andere Reaktor (Kontrollreaktor) unbehandelt blieb. Danach wurde bis zum Tag 15 das unveränderte synthetische Abwasser weiter als Reaktormedium verwendet. Ab Tag 15 wurden dann die Kohlenstoffquellen im Medium durch 2 mM 2,4-D als einzige C-Quelle ersetzt. Bis zum Tag 23 wurden die Reaktoren weiterhin mit einem 8 Stunden Zyklus betrieben. Da kein 2,4-D Abbau beobachtet wurde, wurden zwei Zyklen mit 90 Stunden Dauer (Tage 23-28 und 28-32) durchgeführt, um eine möglicherweise zu langsame Abbaukinetik von 2,4-D mit einzubeziehen. Abbildung 5.2.c) zeigt die Abbaukinetiken der Kohlenstoffquellen am Tag 14 vor Wechsel zu 2,4-D als C-Quelle und während des zweiten 90 Stunden Zyklus (Tage 28-32).

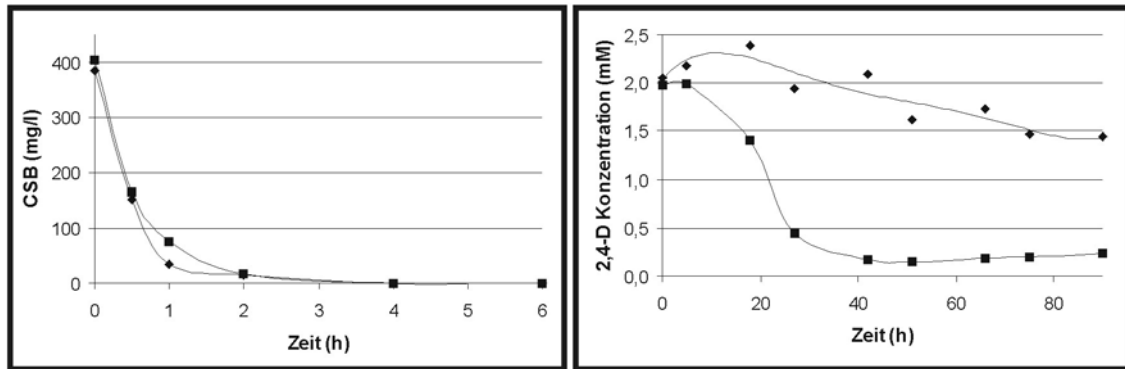


Abbildung 5.2.c):

(links) CSB-Abbau während eines Zyklus in beiden Reaktoren am Tag 14.

(rechts) Verlauf der 2,4-D Konzentrationen während der Tage 28-32 des Versuchs.

(■) Bioaugmentierter Reaktor, (◆) Kontrollreaktor.

Die Daten zeigen, dass vor Wechsel zu 2,4-D beide Reaktoren eine ähnliche Kinetik bzgl. des CSB-Abbaus mit einem fast vollständigen Abbaus des Gesamt-CSBs innerhalb der ersten zwei Stunden des Zyklus aufweisen. Der Verlauf der 2,4-D Konzentrationen in den beiden Reaktoren am Ende des Versuchs zeigt, dass der bioaugmentierte Reaktor 90% des Herbizids innerhalb von 40 Stunden abbaut, während im Kontrollreaktor nach 90 Stunden noch 60% der anfänglichen 2,4-D Konzentration vorlag.

Die eubakterielle Populationsdynamik in den beiden Reaktoren wurde mittels PCR-DGGE analysiert (Abbildung 5.2.c)).

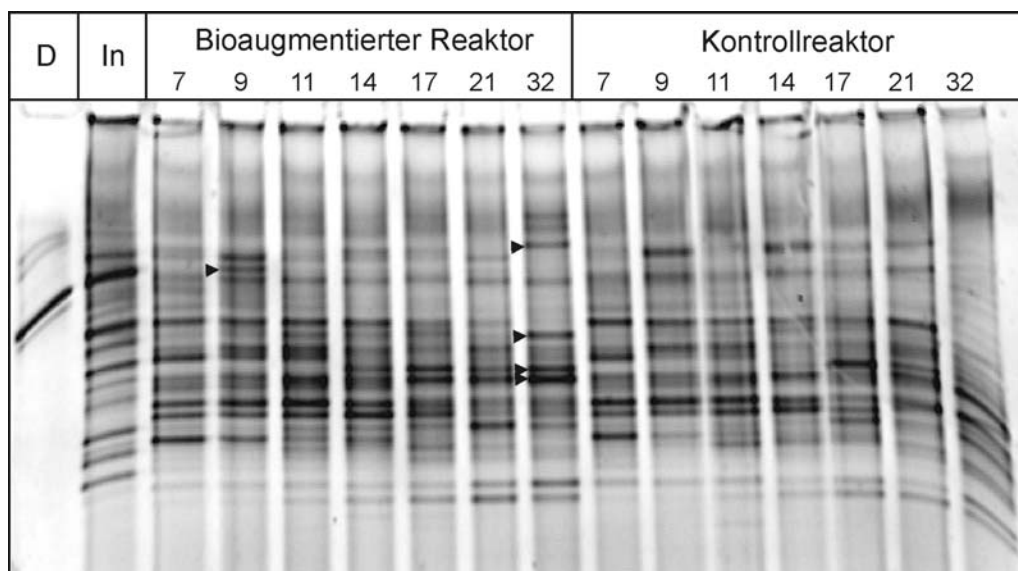


Abbildung 5.2.c):

Analyse der eubakteriellen Populationsdynamik mittels PCR-DGGE von 16S-rRNA Genen. D: Donorstamm, In: Inokulum, die Zahlen geben die Versuchstage an. Der Pfeilkopf bei der Probe von Tag 9 des bioaugmentierten Reaktors zeigt auf die Bande des Donorstammes; die Pfeilköpfe bei der Probe des Tags 32 zeigen auf die Banden, die ausgeschnitten und sequenziert wurden (von oben nach unten: Banden 1a/b, 2, 3 und 4).

Aus dem Gel ist ersichtlich, dass sich die Populationsstruktur der zur Inokulation der Reaktoren verwendeten Klärschlammkultur deutlich von der Struktur der sich in den Reaktoren etablierenden Biofilmgesellschaften unterschied. Die Proben von den Tagen 1-14 während der Verwendung von synthetischem Abwasser mit gemischten C-Quellen als Medium zeigen eine sich in beiden Reaktoren mit der Zeit verändernde Populationsstruktur, jedoch zeigen Proben von gleichen Tagen ein ähnliches Bandenmuster bei Vergleich von den beiden Reaktoren untereinander. Dies deutet auf einen ähnlichen Verlauf der Populationsentwicklung in beiden Reaktoren hin.

In der Probe vom Tag 9 des bioaugmentierten Reaktors ist eine zusätzliche, vom Donorstamm resultierende Bande zu erkennen, die beim Kontrollreaktor nicht auftritt. In Proben von späteren Zeitpunkten ist diese Bande nicht mehr vorhanden, was auf eine Größenabnahme der Donorpopulation unter das Detektionslimit der Methode hindeutet.

Nach Wechsel zu 2,4-D als Kohlenstoffquelle am Tag 15 entwickelten sich die Bandenmuster der beiden Reaktoren auseinander und zeigten einen unterschiedlichen Entwicklungsverlauf der Bakteriengesellschaften in den Reaktoren an. Die Probe des 2,4-D abbauenden Biofilm des bioaugmentierten Reaktors zeigt ein deutlich unterschiedliches Bandenmuster im Vergleich zur korrespondierenden Probe des Kontrollreaktors. Dominante Banden dieser Probe wurden ausgeschnitten und sequenziert, um eine phylogenetische Zuordnung der zugehörigen Organismen vornehmen zu können (Tabelle 5.2.a)). Während Bande 1 im Kontrollreaktor nicht auftritt, sind Banden 2 und 3 hier vorhanden, jedoch mit geringerer Intensität. Bande 4 ist in beiden Reaktoren die jeweils dominanteste Bande.

Tabelle 5.2.a): Phylogenetische Zuordnung der ausgeschnittenen DGGE-Banden

| Bande | Ähnlichste Datenbanksequenz                  | Phylogen. Gruppe          | Identität |
|-------|--|---------------------------|-----------|
| 1a    | Unkultivierter Klon S36, AY171312            | <i>Cytophaga</i> Gruppe I | 112/127   |
| 1b    | <i>Comamonas</i> sp. MBIC3885, AB008429      | Genus <i>Acidovorax</i>   | 141/143   |
| 2     | Unkultivierter Klon RB9C10, AF407397         | <i>PVX</i> -Zweig*        | 142/144   |
| 3     | Unklassifiziertes Bakterienisolat D8, Y11465 | <i>PVX</i> -Zweig*        | 144/144   |
| 4     | <i>Comamonas aquatica</i> LMG2370T, AJ430344 | Genus <i>Comamonas</i>    | 139/144   |

\* *Polaromonas-Variovorax-Xylophilus*-Zweig innerhalb der *Comamonadaceae* (Wen et al. 1999)

Abgesehen von der Bandensequenz 1a gruppieren die Sequenzen der ausgeschnittenen DGGE-Banden in der zu den  $\beta$ -Proteobakterien gehörenden Familie *Comamonadaceae* und zeigen somit eine relativ enge phylogenetische Verteilung.

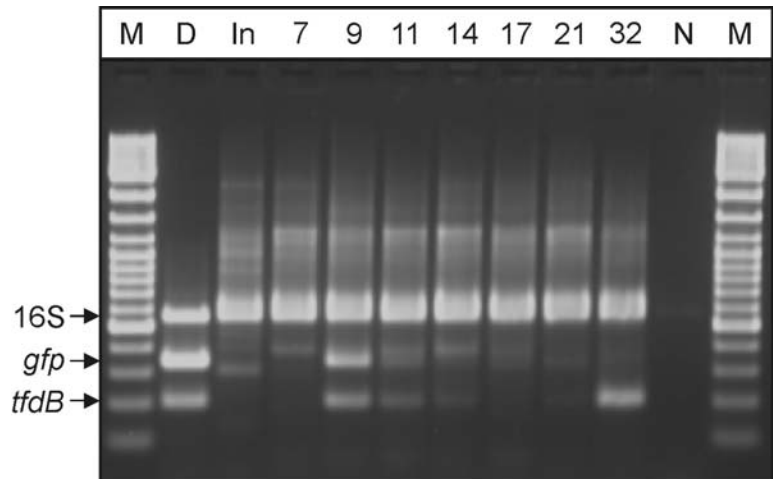
Um die Relevanz des horizontalen Gentransfers von pJP4 für den 2,4-D Abbau im bioaugmentierten Reaktor bewerten zu können, wurden die relativen Anteile von Donor- und

plasmidtragenden Zellen an der Gesamtpopulation des bioaugmentierten Reaktors mittels der in Kapitel 5.1.2. beschriebenen Multiplex-PCR für pJP4 analysiert (Abbildung 5.2.d)).

Abbildung 5.2.d):

Agarosegel mit Produkten der Multiplex-PCR von Proben des bioaugmentierten Reaktors bzgl. 16S-rDNA als Gesamtzellmarker, des *gfp*-Gens als Marker für Donorzellen und des *tfdB*-Gens als Plasmid-Marker.

M: 100 bp Leiter; D: Donorstamm; In: Reaktor-Inokulum, die Zahlen geben die Versuchstage an; N: Negativkontrolle.



Die Proben des Reaktor-Inokulums und des Biofilms am Tag 7 vor Zugabe des Donorstamms zeigten keine von *gfp*- oder *tfdB*-Gen resultierenden PCR-Produkte. Im Gegensatz hierzu zeigten sich in der Probe vom Tag nach Donorzugabe (Tag 9) diese beiden Produkte in vergleichbaren Intensitäten. Sie konnten mit abnehmenden Intensitäten auch in den Proben der Tage 11 und 14 detektiert werden, jedoch nicht in den darauffolgenden Proben der Tage 17 und 21. Die Probe vom Versuchstag 32 schließlich zeigte eine intensive, vom *tfdB*-Gen PCR-Produkt resultierende Bande, wies jedoch kein *gfp*-Amplifikat auf.

Diese Daten deuten darauf hin, dass nach Zugabe des Donorstamms zunächst eine hohe Zahl an plasmidtragenden Donorzellen vorhanden war, diese Zellzahl dann aber abnahm und schließlich unter das Detektionslimit der Methode fiel. Zwischen den Tagen 21 und 32 stieg dann die Zahl von plasmidtragenden Zellen wieder an. Hierbei muss es sich um Transkonjuganten handeln, da eine von Donorzellen resultierende *gfp*-Bande in der Probe vom Tag 32 nicht auftritt, was von den DGGE-Daten unterstützt wird, da auch hier keine Donor-spezifische Bande in dieser Probe zu erkennen ist (Abbildung 5.2.c)).

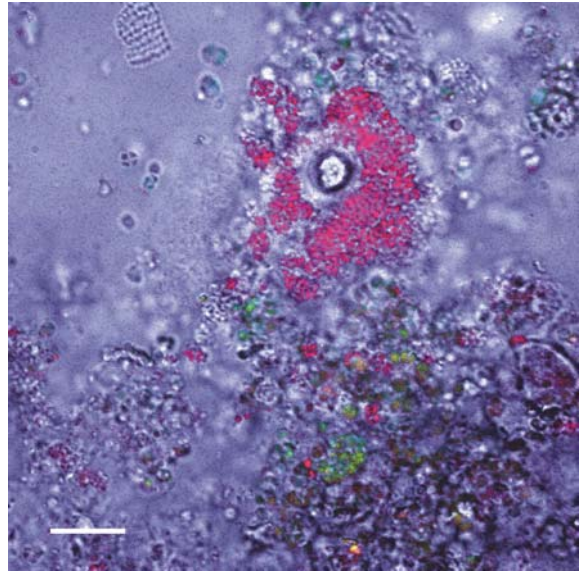
Weiterhin besteht auch eine gute Korrelation dieser Daten mit dem Abbauverhalten des Reaktors bzgl. 2,4-D: kein Abbau zwischen den Tagen 15 und 22, dann aber Einsatz des 2,4-D Abbaus während der beiden 90 Stunden Zyklen in den Tagen 23-32.

Eine mikroskopische Untersuchung des 2,4-D abbauenden Biofilms vom Tag 32 schließlich zeigte rot fluoreszierende Zellen in dieser Probe (Abbildung 5.2.e)), was ebenfalls die Präsenz von Transkonjuganten zeigt.

Abbildung 5.2.e):

Mikroskopische Aufnahme einer Biofilmprobe des bioaugmentierten Reaktors vom Tag 32. Gezeigt ist eine Überlagerung von CLSM-Aufnahmen (Rot: Anregung bei 543 nm, Detektion von Wellenlängen >570 nm. Grün: Anregung bei 488 nm, Detektion von Wellenlängen im Bereich 515-540 nm.) mit einer transmissionsmikroskopischen Aufnahme desselben Feldes.

Balkenlänge: 20 µm



Hier soll noch darauf hingewiesen werden, dass in Proben des Kontrollreaktors weder *tfdB*-spezifische PCR-Produkte noch rot fluoreszierende Zellen auftraten, also eine Detektion von falschpositiven Signalen im bioaugmentierten Reaktor auszuschließen ist.

Schließlich wurde versucht, Transkonjuganten durch Ausplattieren von Proben des Tags 32 aus dem bioaugmentierten Reaktor zu isolieren. Als Medium wurde hierzu MMN Medium mit 2,4-D als einziger Kohlenstoffquelle verwendet. Nach einer Woche Inkubation hatten sich drei verschiedene Kolonie-Morphotypen auf den Agarplatten gebildet, die mikroskopisch untersucht wurden. Zwei dieser Morphotypen bestanden aus eukaryontischen Zellen, die auch auf Platten des Kontrollreaktors wuchsen. Der dritte Morphotyp bestand aus rot fluoreszierenden Transkonjugantenzellen, die nur in der Probe des bioaugmentierten Reaktors, jedoch nicht in der des Kontrollreaktors auftraten.

Eine Untersuchung von 13 dieser Transkonjugantenkolonien mittels (GTG)<sub>5</sub>-PCR zeigte identische Bandenmuster für alle Kolonien, was darauf hindeutete, dass nur ein Bakterienstamm isoliert wurde. Die partielle 16S-rDNA Sequenz dieses Stammes war zu 98% identisch mit der Datenbanksequenz von *Ralstonia* sp. AU3369 (Genbank AF500587).

Abbildung 5.2.f) zeigt eine PCR-DGGE-Analyse der Bandenpositionen einer Zellsuspension von einer 2,4-D Medienplatte und des isolierten Transkonjugantenstamms im Vergleich zur Probe der bioaugmentierten Reaktors vom Tag 32.

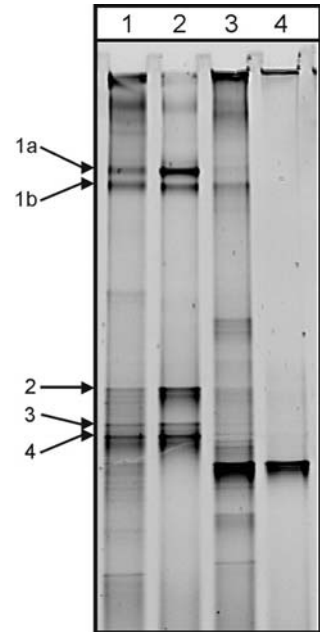


Abbildung 5.2.f):

Analyse des Transkonjuganten-Kultivierungsversuchs aus dem bioaugmentierten Reaktor im Vergleich zur Population der ausplattierten Reaktorprobe mit PCR-DGGE von eubakteriellen 16S-rRNA Genen.

Spur 1: Probe des bioaugmentierten Reaktors vom Tag 32; Spur 2: Mischung von PCR-Produkten der ausgeschnittenen und sequenzierten DGGE-Banden (s. auch Abbildung 5.2.c) und Tabelle 5.2.a)); Spur 3: Zellsuspension von einer 2,4-D Medienplatte, auf der eine Reaktorprobe des bioaugmentierten Reaktors vom Tag 32 ausplattiert wurde; Spur 4: PCR-Produkt der isolierten Transkonjugante.

Die Bandenpositionen und -benennungen der in Spur 2 aufgetragenen ausgeschnittenen DGGE-Banden sind an der linken Seite mit Pfeilen markiert.



Dieser Vergleich zeigt, dass die Position der Bande der isolierten Transkonjugante unterhalb der Positionen der in Abbildung 5.2.c) ausgeschnittenen dominanten Banden lag und das an dieser Stelle keine dominante Bande in der Reaktorprobe auftrat. Ein Vergleich der Spuren 3 und 4 zeigt allerdings, dass diese Transkonjugante den dominanten Stamm der auf den 2,4-D Agarplatten gewachsenen Kolonien repräsentierte. In der Spur 3 ist weiterhin eine Bande auf Höhe der ausgeschnittenen Bande 1b gut zu erkennen.

### 5.3. Plasmid pNB2

Plasmid pNB2 ist erstmals in dem Stamm *Comamonas testosteroni* I2 nachgewiesen worden, einem Anilin- und 3-Chloranilin-abbauenden  $\beta$ -Proteobakterium, das bereits in Bioaugmentationsversuchen verwendet worden ist (Boon et al. 2002, Boon et al. 2000, Boon et al. 2003). Transfer dieses Plasmids zu *Ralstonia eutropha* JMP228n versetzte diesen Stamm in die Lage, ebenfalls auf Anilin, jedoch nicht auf 3-Chloranilin zu wachsen (Boon et al. 2001). Dieser Teil der vorliegenden Arbeit untersucht die Verwendbarkeit des Plasmids pNB2 für die Etablierung von 3-Chloranilin-Katabolismus in bakteriellen Abwasserbiozösen.

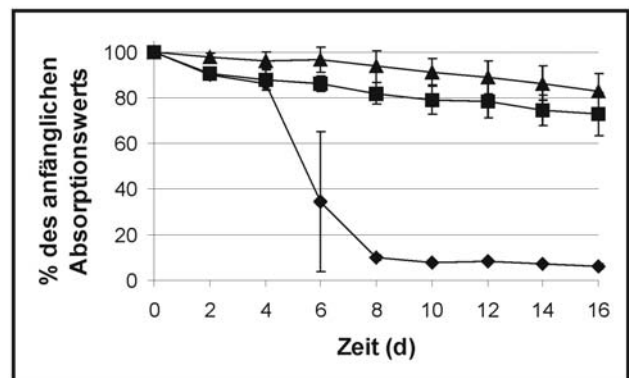
### 5.3.1. Analyse der Beteiligung von pNB2 am 3-Chloranilin-Abbau

Um die Beteiligung von pNB2 am 3-Chloranilin-Abbau zu untersuchen, wurde wiederum ein Agar-surface-mating von *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp2x* – pNB2::*dsRed* mit einer Klärschlammkultur durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen dieses Konjugationsansatzes in Anreicherungskulturen mit synthetischem Abwasser, das 3-Chloranilin als einzige Kohlenstoffquelle enthielt, inokuliert. Parallel dazu wurden Kontrollkulturen mit Donorzellen und Klärschlammzellen beimpft. Aus diesen Kulturen wurden dann regelmäßig Proben entnommen, in denen dann die 3-Chloranilin-Konzentration gemessen wurde. Abbildung 5.3.a) zeigt den Verlauf der 3-Chloranilin-Konzentrationen in den Anreicherungskulturen.

Abbildung 5.3.a):

Verlauf der 3-Chloranilin-Konzentrationen in den Anreicherungskulturen. (◆) Kulturen mit den Konjugationsansätzen; (▲) Donorzellkulturen; (■) Klärschlammkulturen.

Die Werte geben das arithmetische Mittel aus je 3 Kulturen an. In einigen Fällen sind die Fehlerbalken zu klein, um sichtbar zu werden.



Die Abbildung zeigt, dass nur in den mit den Konjugationsansätzen inokulierten Anreicherungskulturen eine wesentliche Änderung der 3-Chloranilin-Konzentration stattfindet. Während die Konzentrationen in den Anreicherungskulturen der Kontrollansätze über das gesamte Experiment hinweg bei über 70% der anfänglichen Werte lagen, nahmen die Konzentrationen in den Konjugationsansatz-Kulturen zwischen den Tage 4 und 8 des Versuchs auf weniger als 10% der Anfangswerte ab.

Mikroskopische Untersuchung der Kulturen zeigte das Auftreten von rot fluoreszierenden Transkonjuganten in den Konjugationsansatz-Kulturen, während keine rot fluoreszierenden Zellen in den Kontrollkulturen beobachtet wurden.

Zur Isolierung von Transkonjuganten wurden Proben aus einer der Konjugationsansatz-Kulturen auf R2A-Agar mit Gentamycin ausplattiert. Von 36 untersuchten Kolonien zeigten 14 ein PCR-Produkt in einer PCR bzgl. des auf pNB2 gelegenen *tdnQ*-Gens. Mikroskopische Untersuchung dieser 14 Kolonien ergab, dass eine Kolonie aus Donorzellen, eine andere aus einer Mischung von Donor- und Transkonjugantenzellen bestand. Die verbleibenden 12

Kolonien bestanden aus rot fluoreszierenden Zellen und wurden als Transkonjugantenkolonien angesehen. Diese 12 Isolate produzierten 4 unterschiedliche Profile in einem genetischen Fingerprinting durch BOX-PCR (s. Abbildung 5.3.b)). Ein für jedes Profil repräsentatives Isolat wurde für die weitere Analyse ausgewählt. Ausnahme war einer der Profiltypen, für den zwei Kolonien ausgewählt wurden, weil sie sich in ihren Koloniemorphotypen unterschieden und unterschiedliche Mengen an EPS bei Wachstum auf R2A Medium produzierten.

Abbildung 5.3.b):

Darstellung der von den 12 Transkonjugantenkolonien produzierten unterschiedlichen BOX-Profilen.

M: 100 bp Leiter

1: *Comamonas testosteroni* I2

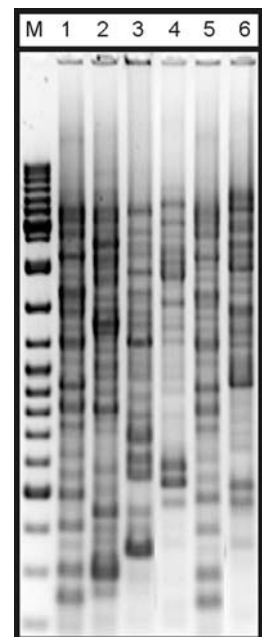
2: *P. putida* SM1443::*gfp2x* – pNB2::*dsRed*

3: Isolat SB1

4: Isolat SB2

5: Isolate SB3 und SB4

6: Isolat SB5



Weiterhin ist aus Abbildung 5.3.b) erkennbar, dass das von diesen beiden Isolaten SB3 und SB4 produzierte Profil eine große Ähnlichkeit zu dem BOX-Profil von *Comamonas testosteroni* I2, dem ursprünglichen Wirtsstamm des Plasmids pNB2, aufweist.

Die Sequenzierung der 16S-rRNA Gene der Isolate zeigte, dass alle zur Familie *Comamonadaceae* innerhalb der  $\beta$ -Proteobakterien gehörten. Abbildung 5.3.c) zeigt die Positionen der Isolate innerhalb dieser Familie.

Untersuchung der 5 Isolate hinsichtlich ihres Wachstums auf Anilin bzw. 3-Chloranilin als einzige Kohlenstoff- und Stickstoffquellen zeigt, dass nur Isolate SB3 und SB4 in der Lage sind, beide Substanzen als Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequellen zu nutzen. Die Isolate SB1 und SB5 konnten auf Anilin, jedoch nicht auf 3-Chloranilin wachsen, während Isolat SB2 keine der Substanzen nutzen konnte.

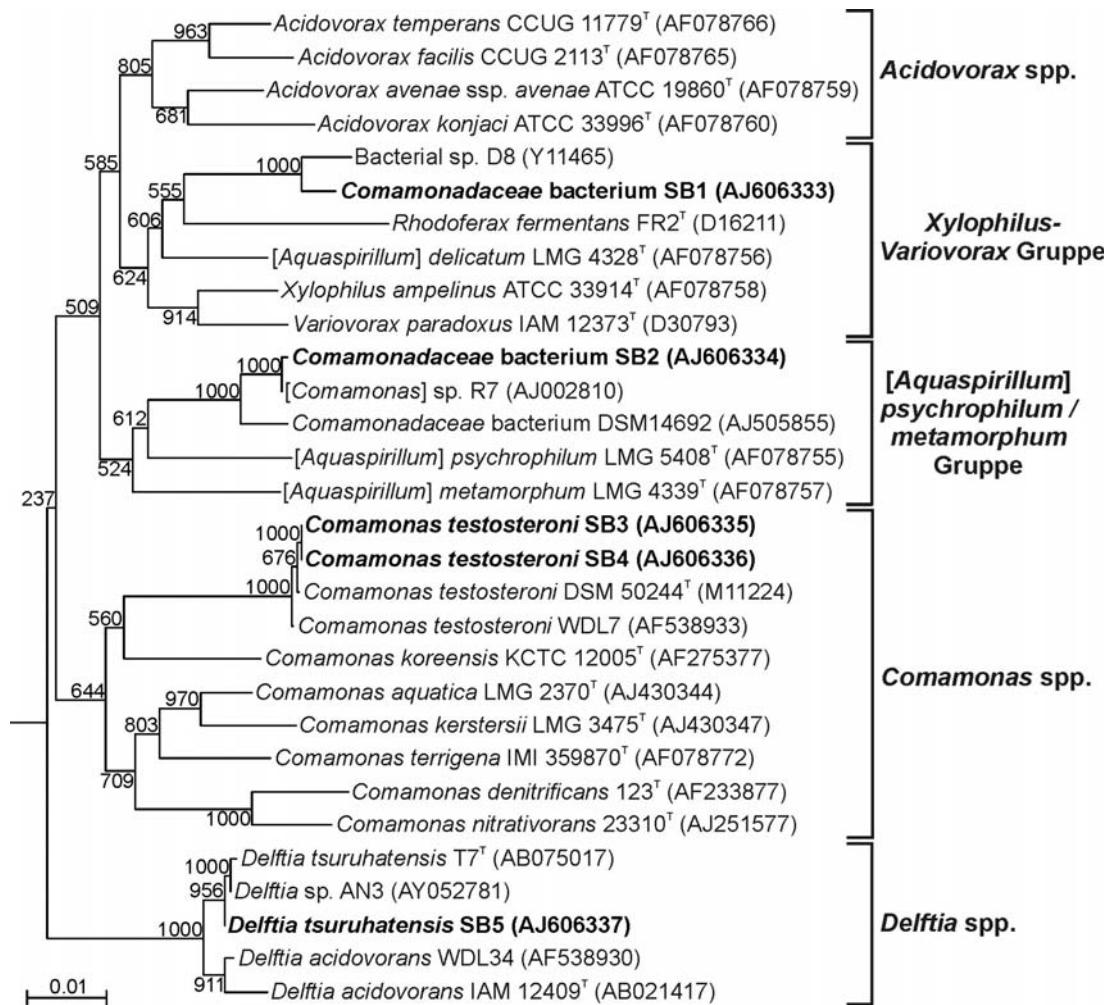


Abbildung 5.3.c):

Nach der Neighbour-joining-Methode berechneter phylogenetischer Baum, der aus partiellen 16S-rRNA Sequenzen (*E. coli* Positionen 104-1378) von den hier isolierten pNB2-Transkonjugantenstämmen (fett gedruckt) sowie aus ausgewählten Sequenzen der Familie *Comamonadaceae* erstellt worden ist. Bootstrap-Werte von 1000 Wiederholungen sind an den Knoten angegeben. Die Gattungsnamen von misklassifizierten Sequenzen sind in eckigen Klammern dargestellt. Als Außengruppe wurde die Sequenz von *Ideonella dechloratans* CCUG 30898<sup>T</sup> (Genbank X72724) verwendet.

### 5.3.2. Entwicklung von Nachweismethoden für *Comamonas testosteroni*

Die Ergebnisse von Kapitel 5.3.1. legen nahe, dass nur Stämme von *Comamonas testosteroni* in der Lage sind, nach Aufnahme von pNB2 3-Chloranilin abzubauen. Aus diesem Grund erschien die Möglichkeit einer kulturunabhängigen Detektion und Quantifizierung von *Comamonas testosteroni* in einer Umweltprobe als wünschenswert. Ziel des vorliegenden Abschnitts der Arbeit war deshalb, für diese Spezies spezifische PCR-Primer und FISH-Sonden zu entwickeln.

Abbildung 5.3.d) zeigt einen phylogenetischen Baum des Genus *Comamonas*, der eine größere Anzahl von 16S-rRNA Sequenzen von *C. testosteroni* enthält.

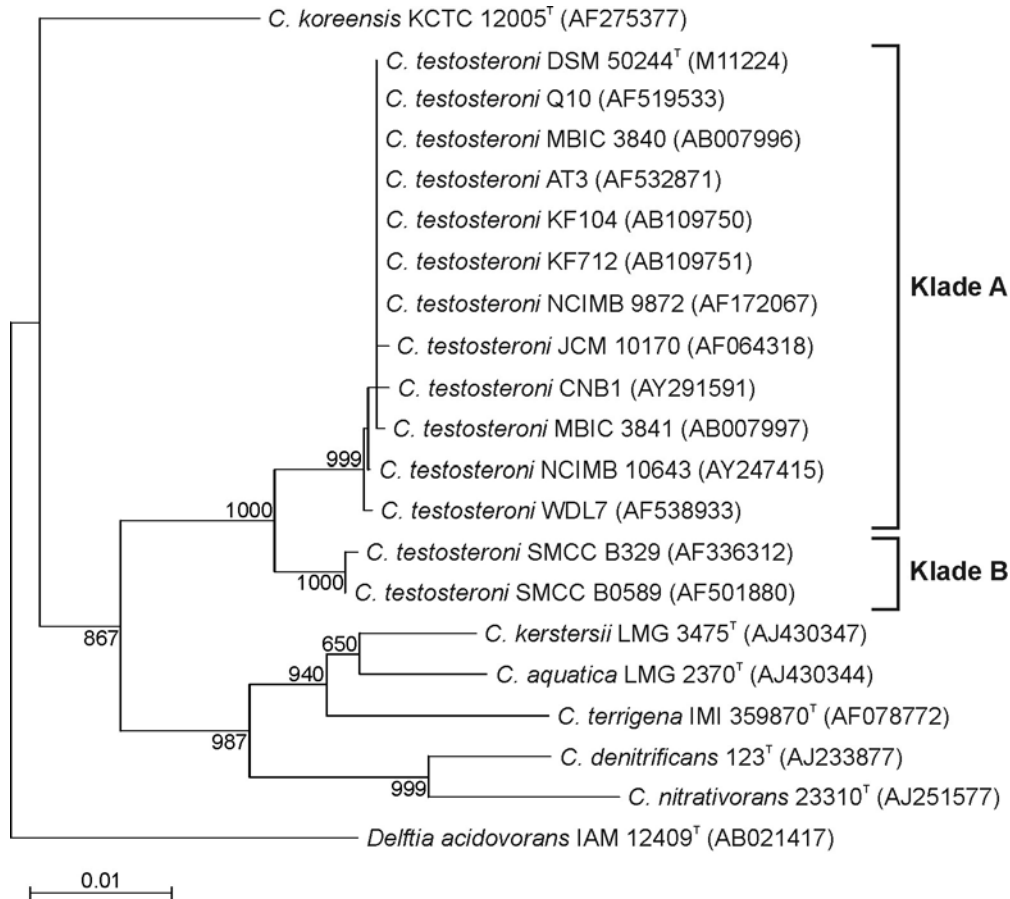


Abbildung 5.3.d):

Nach der Neighbour-joining-Methode berechneter phylogenetischer Baum, der aus partiellen 16S-rRNA Sequenzen (*E. coli* Positionen 144-1353) von ausgewählten Sequenzen des Genus *Comamonas* erstellt worden ist. Bootstrap-Werte von 1000 Wiederholungen sind an den Knoten angegeben.

Die Abbildung zeigt, dass die *C. testosteroni* zugeordneten Sequenzen in 2 Kladen fallen, deren Sequenzen eine Identitätsdifferenz von ca. 1% aufweisen. Klade A enthält weitaus mehr Sequenzen als Klade B. Auch die Sequenzen der beiden pNB2-Transkonjuganten SB3 und SB4 gehören zur Klade A, weshalb sich auf diese Untergruppe von *C. testosteroni* konzentriert wurde.

Es konnten mehrere Sequenzbereiche in den 16S-rDNA Sequenzen von *C. testosteroni* der Klade A identifiziert werden, die als Zielstellen für Spezies-spezifische Oligonukleotidsonden geeignet sind. Anhand dieser Sequenzbereiche wurden mehrere PCR-Primer und eine FISH-Sonde erstellt und anhand von Reinkulturen evaluiert. Tabelle 5.3.a) gibt einen Überblick über die Oligonukleotide:

Tabelle 5.3.a):

Für *Comamonas testosteroni* spezifische Oligonukleotidsonden, die in dieser Arbeit entwickelt wurden.

| Name       | Sequenz (5'-3')             | Bindestelle | T <sub>M</sub> / FA |
|------------|-----------------------------|-------------|---------------------|
| CteA1-for  | CGA AAA GCC TGG GGC TAA TAT | 449-469     | 57,9°C              |
| CteA1-rev  | CCA TCT CTG GTA AGT TCC TGC | 1019-999    | 59,8°C              |
| CteA2-for  | TTG ACA TGG CAG GAA CTT ACC | 991-1011    | 57,9°C              |
| CteA2-rev  | TCC CAT TAG AGT GCT CAA CTG | 1157-1136   | 57,9°C              |
| CteA-Sonde | CAT GAC CCG GGG ATA TTA GC  | 481-462     | 30%                 |

Abbildung 5.3.e) zeigt eine Übersicht über die Zielsequenzen der fünf entwickelten Oligonukleotide auf dem 16S-rRNA Gen von *Comamonas testosteroni* sowie einen Vergleich mit den entsprechenden Sequenzabschnitten der anderen Arten der Genera *Comamonas* und *Delftia*. In den beiden Primerpaaren sowie in der FISH-Sonde sind jeweils 3 oder mehr Fehlpaarungen mit Sequenzen von Nicht-Zielorganismen, so dass bei ausreichender Stringenz der Reaktionen keine Spezifitätsprobleme zu erwarten sind.

| Organismus                                | CteA1-for                    | CteA1-rev (rev. kompl.)      |
|---|------------------------------|------------------------------|
| <i>C. testosteroni</i> Klade A (M11224)   | <b>CGAAAAGCCTGGGGCTAATAT</b> | <b>GCAGGAACCTACCAGAGATGG</b> |
| <i>C. testosteroni</i> Klade B (AF501880) | .....TCT.....C               | TAC....G.....                |
| <i>C. nitrativorans</i> (AJ251577)        | .....CTCT.....               | TAC...TCCTTT.....A.          |
| <i>C. denitrificans</i> (AJ233877)        | .....T..T...T...C            | TAT...TCCTTT.....A           |
| <i>C. aquatica</i> (AJ430344)             | .....CT...T...C              | TAC...TCCTTT.....A.          |
| <i>C. kerstersii</i> (AJ430347)           | .....T.C...T...C             | .....TCCTTT.....A.           |
| <i>C. terrigena</i> (AF078772)            | .....T.C...T...C             | TAC...TCCTTT.....A.          |
| <i>C. koreensis</i> (AF275377)            | .....A.NTTTT.....A           | TAC....G.G.....              |
| <i>D. acidovorans</i> (AB021417)          | .....G..TCTC.....C           | .....G..T.....               |
| <i>D. tsuruhatensis</i> (AB075017)        | .....AGC.CCTT.....C          | .....G..T.....               |

| Organismus                                | CteA2-for                    | CteA2-rev (rev. kompl.)      |
|---|------------------------------|------------------------------|
| <i>C. testosteroni</i> Klade A (M11224)   | <b>TTGACATGGCAGGAACCTACC</b> | <b>CAGTTGAGCACTCTAATGGGA</b> |
| <i>C. testosteroni</i> Klade B (AF501880) | .....TAC....G....            | .....                        |
| <i>C. nitrativorans</i> (AJ251577)        | .....TAC....TCCTTT           | .GAAA.G.....                 |
| <i>C. denitrificans</i> (AJ233877)        | .....TAT....TCCTTT           | .GAAA.G.....                 |
| <i>C. aquatica</i> (AJ430344)             | .....TAC....TCCTTT           | .GAAA.G.....                 |
| <i>C. kerstersii</i> (AJ430347)           | .....ATAC....TCCTTT          | .GAAA.G.....                 |
| <i>C. terrigena</i> (AF078772)            | .....ATAC....TCCTTT          | .GAAA.G.....                 |
| <i>C. koreensis</i> (AF275377)            | .....TAC....G.GA..           | .GAAA.G.....                 |
| <i>D. acidovorans</i> (AB021417)          | .....G..T..                  | T.....G.....A..              |
| <i>D. tsuruhatensis</i> (AB075017)        | .....G..T..                  | .....A..                     |

| Organismus                                | Sonde CteA (rev. kompl.)    |
|---|-----------------------------|
| <i>C. testosteroni</i> Klade A (M11224)   | <b>GCTAATATCCCCGGGTCATG</b> |
| <i>C. testosteroni</i> Klade B (AF501880) | .....C...G.A.....           |
| <i>C. nitrativorans</i> (AJ251577)        | T.....AGGG...G..            |
| <i>C. denitrificans</i> (AJ233877)        | .T....C..TG..A....          |
| <i>C. aquatica</i> (AJ430344)             | .T....C..TG.....            |
| <i>C. kerstersii</i> (AJ430347)           | .T....C..TG.A.....          |
| <i>C. terrigena</i> (AF078772)            | .T....C..TG.A.....          |
| <i>C. koreensis</i> (AF275377)            | T.....AAGAG..TC....         |
| <i>D. acidovorans</i> (AB021417)          | C.....CGAGA..CCAT..         |
| <i>D. tsuruhatensis</i> (AB075017)        | T.....CAGGG..CCC...         |

Abbildung 5.3.e):

Zielsequenzen der entwickelten Oligonukleotide auf dem 16S-rRNA Gen von *C. testosteroni* sowie Vergleich mit den entsprechenden Sequenzen von *Comamonas* und *Delftia* spp. Punkte repräsentieren identische Nukleotide, während Fehlpaarungen durch das veränderte Nukleotid angezeigt sind.

Die Evaluierung der Primerpaare an Zellsuspensionen von Reinkulturen (s. Tabelle 5.3.b)) ergab ein positives Signal für insgesamt 12 getestete Stämme von *C. testosteroni*. Es ist deswegen anzunehmen, dass diese Stämme alle in die Klade A fallen. Für alle als Negativkontrollen mitgeführten Testkulturen (insgesamt 15 Proteobakterien-Stämme) ergab die PCR mit beiden Primerpaaren kein Produkt.

Tabelle 5.3.b):

Reinkulturen, die bei der Evaluierung der für *C. testosteroni* entwickelten PCR-Primerpaare eingesetzt wurden.

| Stamm                                       | PCR-Primerpaar |       |
|---|----------------|-------|
|   | CteA1          | CteA2 |
| <i>Comamonas testosteroni</i> DSM 38        | +              | +     |
| <i>Comamonas testosteroni</i> DSM 1455      | +              | +     |
| <i>Comamonas testosteroni</i> DSM 1622      | +              | +     |
| <i>Comamonas testosteroni</i> DSM 6781      | +              | +     |
| <i>Comamonas testosteroni</i> DSM 11414     | +              | +     |
| <i>Comamonas testosteroni</i> DSM 12678     | +              | +     |
| <i>Comamonas testosteroni</i> DSM 50241     | +              | +     |
| <i>Comamonas testosteroni</i> DSM 50242     | +              | +     |
| <i>Comamonas testosteroni</i> DSM 50244     | +              | +     |
| <i>Comamonas testosteroni</i> LMG 19554     | +              | +     |
| <i>Comamonas testosteroni</i> strain SB3    | +              | +     |
| <i>Comamonas testosteroni</i> strain SB4    | +              | +     |
| <i>Comamonas aquatica</i> ATCC 11330        | -              | -     |
| <i>Comamonas nitratorans</i> DSM 13191      | -              | -     |
| <i>Comamonas koreensis</i> strain TK17      | -              | -     |
| <i>Comamonas terrigena</i> strain TK41      | -              | -     |
| <i>Delftia acidovorans</i> ATCC 15668       | -              | -     |
| <i>Delftia tsuruhatensis</i> strain SB5     | -              | -     |
| <i>Pseudomonas putida</i> DSM 291           | -              | -     |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1          | -              | -     |
| <i>Novosphingobium capsulatum</i> DSM 30196 | -              | -     |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> DSM 30187       | -              | -     |
| <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$        | -              | -     |
| <i>Serratia ficaria</i> ATCC 33105          | -              | -     |
| <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> BD413    | -              | -     |
| <i>Ralstonia eutropha</i> DSM 531           | -              | -     |
| <i>Burkholderia cepacia</i> H111            | -              | -     |

Zusätzlich zur Verwendung in der konventionellen PCR wurde Primerpaar CteA2 auch bzgl. seiner Anwendbarkeit in der real-time PCR basierenden Quantifizierung von *C. testosteroni* 16S-rRNA Genen relativ zur Gesamtzahl an eubakteriellen 16S-rRNA Genen analog zu Smits et al. (2004) getestet. Hier wurde eine Verdünnungsreihe von genomischer DNA von *Comamonas testosteroni* SB3 im Bereich von 0,001 bis 10 ng zur Erstellung einer Standardkurve für beide Primerpaare eingesetzt. Beide Primerpaare zeigten fast identische Amplifikationseffizienzen mit einer linearen Abhängigkeit ( $R^2 > 0,993$ ) des Ct-Werts von

log(DNA-Menge) in diesem Konzentrationsbereich und erwiesen sich dadurch als geeignet für die PCR-basierende Quantifizierung von *C. testosteroni* in einer Umweltprobe. Allerdings sollte hier beachtet werden, dass das gemessene 16S-rRNA Gen Kopiezahlverhältnis nur dann mit dem Zellzahlanteil von *C. testosteroni* an der Gesamtzellzahl übereinstimmt, wenn die durchschnittliche Zahl an 16S-rRNA Genen pro Eubakterienzelle in der Gesamtprobe identisch ist mit der Zahl von *rrn* Operons pro Zelle von *Comamonas testosteroni* SB3.

Die für die Klade A entwickelte FISH-Sonde wurde mit einer Cy3-Fluoreszenzmarkierung verwendet und in Simultanhybridisierung mit der Sonde Eub338 mit Cy5-Markierung evaluiert. Hybridisierung nach der Standardmethode ergab hier ein gutes Signal bis zu einer Formamidkonzentration von 30%. Höhere Konzentrationen führten zu verminderten Signalintensitäten. Als Negativkontrolle wurde hier eine Kultur von *Comamonas aquatica* ATCC 11330 verwendet. Abbildung 5.3.f) zeigt Beispiele für eine Reinkulturmischung sowie für eine Probe aus einem Reaktor.

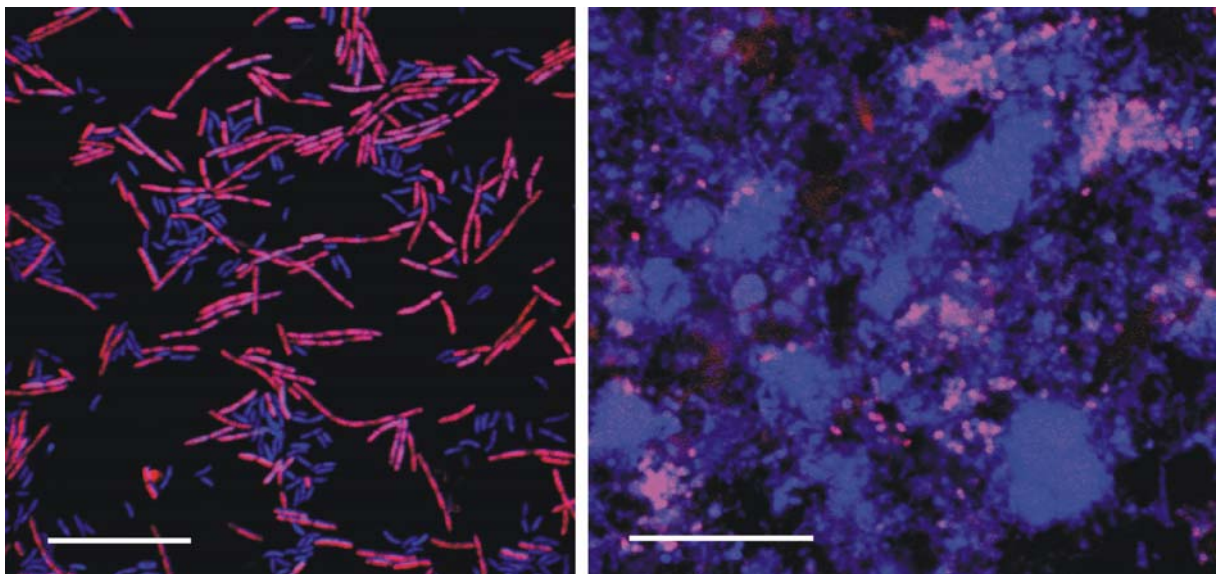


Abbildung 5.3.f):

Simultane FISH mit den Sonden CteA-Cy3 (rot) und Eub338-Cy5 (blau).

(links) Mischung aus *C. testosteroni* LMG 19554 und *C. aquatica* ATCC 11330.

(rechts) Probe aus einem der in Kap. 5.3.3. eingesetzten Modellreaktoren.

Balkenlängen: 20  $\mu\text{m}$



### 5.3.3. Bioaugmentation der mikrobiellen Biozönosen von Modell-SBBRs mit pNB2

Für den Einsatz von pNB2 zur Bioaugmentation von Belebtschlamm wurde ein ähnlicher Ansatz wie in Kap. 5.2.2. gewählt. Insgesamt wurde mit einem Setup von 4 mit einer Klärschlammkultur inokulierten Modellreaktoren gearbeitet, die Sägespäne als Biofilmträgermaterial enthielten. Zwei dieser Reaktoren erhielten *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp2x* – pNB2::*dsRed* als pNB2-Donorstamm, von den beiden anderen Reaktoren erhielt einer als Positivkontrolle die 3-Chloranilin-abbauende pNB2-Transkonjugante *Comamonas testosteroni* SB3 (s. Kap. 5.3.1.), während der andere als Negativkontrolle keinen zusätzlichen Bakterienstamm erhielt. Während der Inokulationsphase wurden die Reaktoren mit synthetischem Abwasser ohne 3-Chloranilin betrieben.

- Reaktor D wurde zunächst mit einer Kultur von *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp2x* – pNB2::*dsRed* auf eine Dichte von  $4 \cdot 10^7$  Zellen/ml beimpft. Nach 24 h Inkubation wurde ein Zykluswechsel durchgeführt, eine Klärschlammkultur als Rezipientengesellschaft zugegeben und wiederum 24 h Kontaktzeit gelassen.
- Reaktor K wurde als erstes mit einer Klärschlammkultur beimpft. Nach 24 h Inkubation wurde dann ein Zykluswechsel durchgeführt und *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp2x* – pNB2::*dsRed* auf eine Dichte von  $7 \cdot 10^7$  Zellen/ml zugegeben. Auch hier folgte dann eine Kontaktzeit von 24 h.
- Reaktor P wurde ebenfalls zunächst mit einer Klärschlammkultur beimpft und für 24 h inkubiert. Nach einem Zykluswechsel wurde dann eine Kultur von *Comamonas testosteroni* SB3 auf eine Dichte von  $2 \cdot 10^8$  Zellen/ml zugegeben und erneut für 24 h inkubiert.
- Reaktor C erhielt zur Inokulierung eine Klärschlammkultur. Nach 24 h wurde dann ein Zykluswechsel durchgeführt und weitere 24 h inkubiert.

Nach Beendigung dieser Inokulationsphase wurde dann zu allen Reaktoren zusätzlich 3-Chloranilin mit in das synthetische Abwasser gegeben. Die Dauer des ersten Zyklus mit 3-Chloranilin wurde ausgedehnt, bis ein Unterschied zwischen den Konzentrationen in den Reaktoren D und K im Vergleich zum Reaktor C auf einen einsetzenden Abbau hindeutete. Danach wurde die Zyklusdauer jeweils so gewählt, bis sich in den Reaktoren D und K die 3CA-Konzentration um >90% verringert hatte. Die Reaktoren wurden in Zusammenarbeit mit Dipl.-Ing. Norbert Schwarzenbeck, WGA, betrieben.

Abbildung 5.3.g) gibt einen Überblick über den Verlauf des CSB sowie der 3-Chloranilin-Konzentrationen in den 4 Reaktoren während des gesamten Versuchsablaufs.

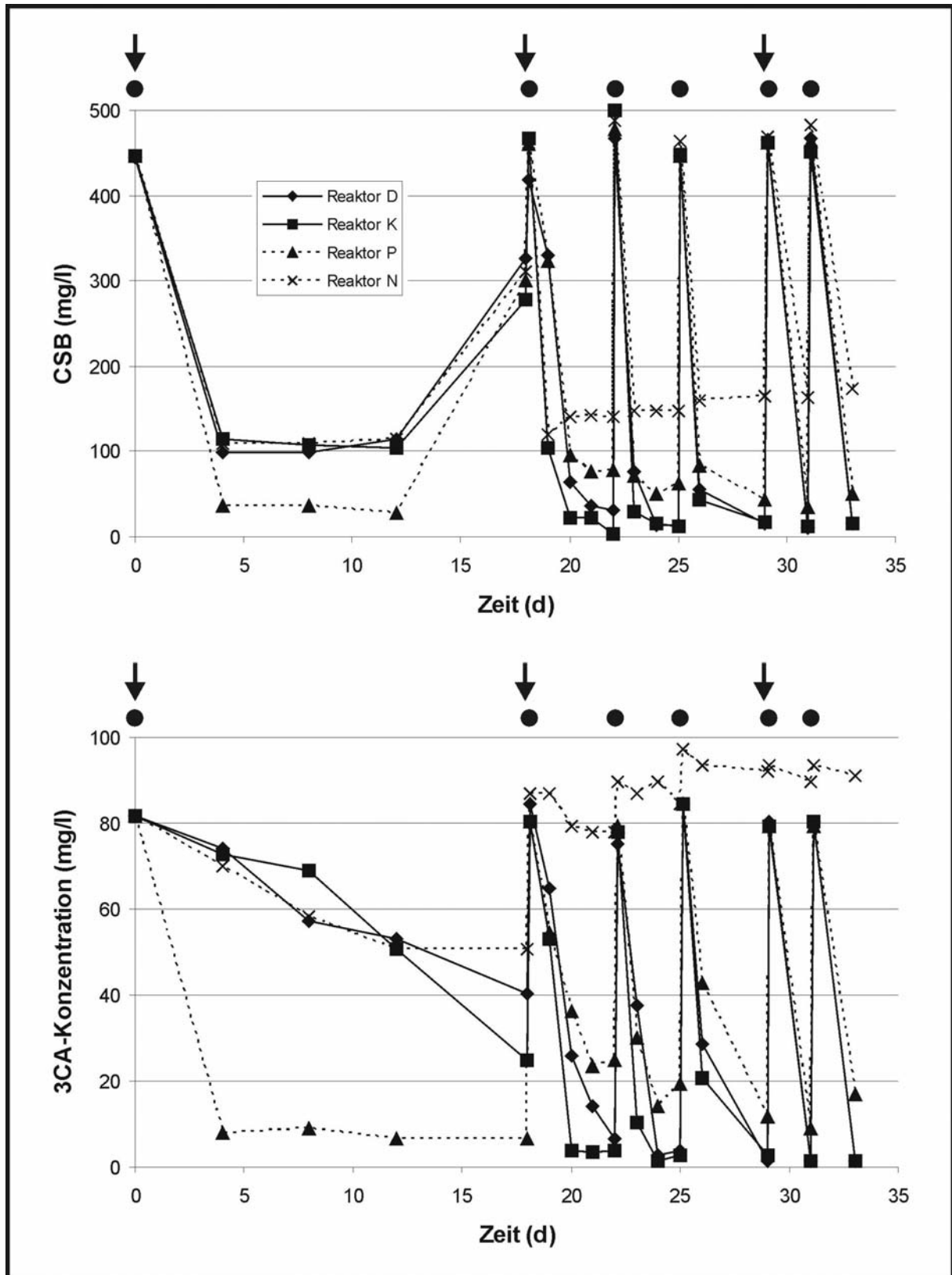


Abbildung 5.3.g):

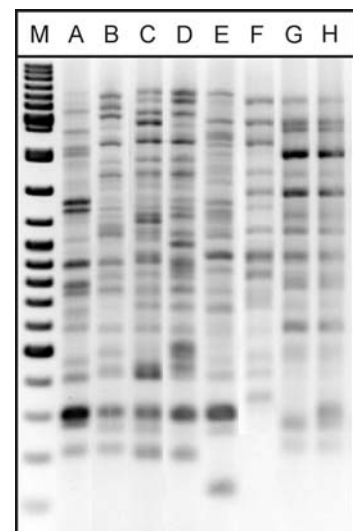
Verlauf von CSB (oben) sowie der 3-Chloranilinkonzentrationen (unten) in den 4 Reaktoren während des Versuchs. Zykluswechsel sind jeweils durch Punkte, biologische Probenahmen durch Pfeile über den Diagrammen markiert.

Die Abbildung zeigt für den als Positivkontrolle eingesetzte Reaktor P nach 4 Tagen einen weitgehenden CSB- und 3-Chloranilin-Abbau. Im Gegensatz hierzu verwerfen die restlichen Reaktoren zwar die im synthetischen Abwasser enthaltenen leicht abbaubaren Kohlenstoffquellen Glucose, Gluconat, Acetat und Citrat, jedoch nicht 3-Chloranilin innerhalb dieser Zeit. Erst in der Zeit zwischen den Tagen 12 und 18 des Versuchs ist in den bioaugmentierten Reaktoren D und K eine höhere Abnahme der 3-Chloranilin-Konzentration zu erkennen als in der Negativkontrolle N, weshalb am Tag 18 der erste Zykluswechsel durchgeführt wurde. Die nachfolgenden Zyklen konnten von anfangs 5 auf schließlich 2 Tage Dauer verkürzt werden, in denen die Reaktoren D und K jeweils einen vollständigen 3-Chloranilin-Abbau zeigten, wobei Reaktor K zunächst eine schnellere Kinetik aufwies als Reaktor D.

Zur Analyse des Plasmidtransfers sowie der bakteriellen Populationsdynamik wurden zu Beginn des Versuchs (Tag 0), am Ende des ersten Zyklus (Tag 18) sowie nach Einsatz eines stabilen 3-Chloranilin-Abbaus (Tag 29) Biofilmproben genommen, aus denen dann DNA für PCR-basierende Untersuchungen extrahiert wurde. Am Tag 29 wurden zusätzlich Biofilmproben für Plattierungen sowie für FISH genommen.

Plattierung von Biofilmproben des Tags 29 auf Medium mit 3-Chloranilin zeigten nur bei den Reaktoren D, K und P ein deutliches Koloniewachstum, jedoch nicht bei Reaktor N. Von jeweils 100 Kolonien aus den Reaktoren D und K zeigten in beiden Fällen 94% der Isolate ein Wachstum auf R2A-Agar mit Gentamycin und HgCl<sub>2</sub>, was darauf hinwies, dass es sich hierbei um pNB2-Transkonjuganten handeln könnte. Mit einer zufälligen Auswahl von Kolonien wurde dann ein genetisches Screening mittels BOX-PCR durchgeführt. Insgesamt 48 untersuchte Kolonien zeigten 8 verschiedene BOX-Profile (Abbildung 5.3.h).

Abbildung 5.3.h):  
BOX-Profile der aus den Reaktoren D und K isolierten 3-Chloranilin-Abbauern.  
M: 100 bp Leiter; A-H: BOX-Profiltypen



Die Verteilung der Isolate mit den unterschiedlichen BOX-Profilen über die beiden Reaktortypen ist in Tabelle 5.3.c) angegeben.

Tabelle 5.3.c):

Verteilung und Häufigkeiten von Isolaten mit den unterschiedlichen BOX-Profilen über die beiden Reaktoren D und K.

| BOX-Profil: | A  | B | C | D | E | F | G  | H | Σ  |
|-------------|----|---|---|---|---|---|----|---|----|
| Reaktor D   | 22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1  | 0 | 23 |
| Reaktor K   | 0  | 1 | 1 | 2 | 6 | 1 | 13 | 1 | 25 |

Es ist deutlich erkennbar, dass die Diversität der kultivierten 3-Chloranilin-abbauenden Mikroorganismen im Reaktor K höher ist als im Reaktor D. Während im Reaktor D nur 2 verschiedene Profiltypen auftreten, von denen Typ G nur mit einem Isolat vertreten ist, treten im Reaktor K 7 unterschiedliche Profiltypen auf, davon sind die Typen E und G mit mehr als zwei Isolaten vertreten. Weiterhin fällt auf, dass nur Profiltyp G in beiden Reaktoren auftritt.

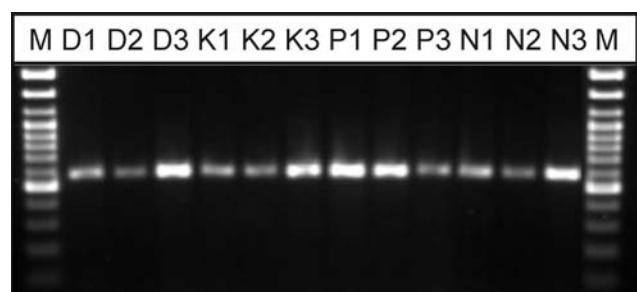
Ein Isolat aus jedem Profiltyp wurde detaillierter analysiert: alle Isolate zeigten PCR-Produkte in Reaktionen mit den Primerpaaren CteA1 und tdnQ sowie mit für das *dsRed*-Gen spezifischen Primern. Weiterhin zeigten alle diese Isolate bei mikroskopischer Untersuchung eine rote Fluoreszenz. Dies zeigt, dass es sich bei allen Isolaten und damit bei allen isolierten 3-Chloranilinabbauern der verschiedenen BOX-Profiltypen um unterschiedliche pNB2-Transkonjugantenstämme von *C. testosteroni* der Klade A handelt, was durch partielle Sequenzierung der 16S-rRNA Gene der repräsentativen Isolate bestätigt wurde.

Das Auftreten von *C. testosteroni* in den Reaktorproben wurde zunächst durch konventionelle PCR mit dem CteA1-Primerpaar bei allen 3 Probenameterminen untersucht. Abbildung 5.3.i) zeigt die PCR-basierende Analyse der Reaktorproben mit den CteA1-Primern.

Abbildung 5.3.i):

Elektrophoretische Auftrennung von PCR-Reaktionen mit den CteA1-Primern. Es wurden je ca. 10 ng an Template-DNA eingesetzt.

M: 100 bp Leiter; D, K, P, N: Reaktorproben; 1, 2, 3: 1., 2., bzw. 3. Probenahmedatum (Tage 0, 18, und 29).



Die Abbildung zeigt in allen Reaktorproben ein PCR-Produkt. Dies zeigt, dass zu Beginn des Versuchs zunächst eine ausreichend große Rezipientenpopulation für pNB2 vorliegt. In den Proben D3 und K3 tritt das PCR-Produkt mit einer höheren Intensität als in den zeitlich davor

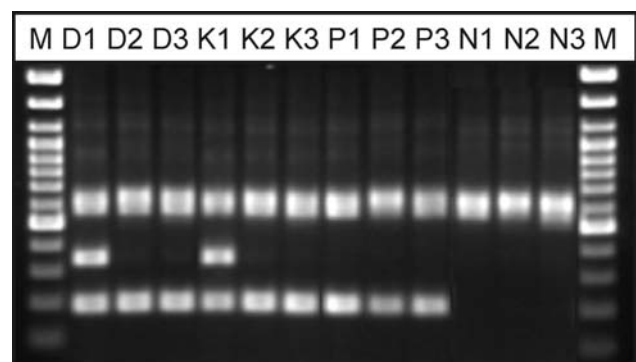
liegenden Proben auf, was anzeigt, dass die Dichte der *C. testosteroni* Population möglicherweise zunimmt. Dies kann aber nicht direkt mit dem vermehrten Auftreten von pNB2-Transkonjuganten korreliert werden, da auch Probe N3 ein intensiveres PCR-Produkt zeigt als Proben N1 und N2. Im Gegensatz hierzu zeigt Reaktor P durch die Zugabe von *C. testosteroni* SB3 zu Beginn des Versuchs direkt ein intensives PCR-Produkt, allerdings scheint die Populationsdichte in Probe P3 geringer als in den vorigen Proben zu sein.

Der Transfer des Plasmids pNB2 in den Reaktoren wurde zunächst mit Hilfe der in Kap. 5.1.2. entwickelten Multiplex-PCR Methode evaluiert (s. Abb. 5.3.j)).

Abbildung 5.3.j):

Multiplex-PCR Analyse des Transfers vom Plasmid pNB2 in den Reaktoren. Es wurden je 10 ng Template-DNA in den Analysen eingesetzt.

M: 100 bp Leiter; D, K, P, N: Reaktorproben; 1, 2, 3: 1., 2., bzw. 3. Probenahmedatum (Tage 0, 18, und 29).



Die Abbildung zeigt, ein Auftreten des Plasmid-PCR-Produkts in allen Proben der Reaktoren D, K und P. Da nur in den Proben D1 und K1 jeweils eine vom *gfp*-Gen resultierende PCR-Bande vorliegt, muss zwischen den Versuchstagen 0 und 18, d. h. innerhalb des ersten Reaktorzyklus, ein Transfer von pNB2 von den eingeführten Donorzellen zu Rezipienten des Klärschlamm-biofilms stattgefunden haben. Gleichzeitig sind die Populationsdichten der Donorzellen auf ein Niveau unterhalb des Detektionslimits der Methode abgesunken. Ein durchgängiges Auftreten der Plasmidbande in allen 3-Chloranilin abbauenden Reaktoren lässt auf eine Korrelation von der Präsenz des Plasmids zum 3-Chloranilin Abbau schließen.

Um einen besseren Eindruck der relativen Häufigkeiten von Donorstamm, Plasmid sowie *C. testosteroni* Populationen zu erhalten, wurden die Anteile von entsprechenden Marker-Genen (*gfp*, *dsRed*, *C. testosteroni* 16S-rRNA Gen) relativ zum Gesamtgehalt von eubakteriellen 16S-rRNA Genen mittels quantitativer real-time-PCR bestimmt. Abbildung 5.3.k) gibt einen Überblick über die relativen Anteile von *dsRed*- und *gfp*-Gen relativ zu eubakterieller DNA von *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp2x* – pNB2::*dsRed* sowie des *C. testosteroni* 16S-rRNA Gens relativ zu eubakterieller DNA von *C. testosteroni* SB3 angegeben. Zusätzlich ist vom 3. Probenahmezeitpunkt (Tag 29) der Anteil von *C. testosteroni* an der Gesamtpopulation mittel quantitativer FISH bestimmt und vergleichend mit der *C. testosteroni* Quantifizierung über PCR dargestellt worden.

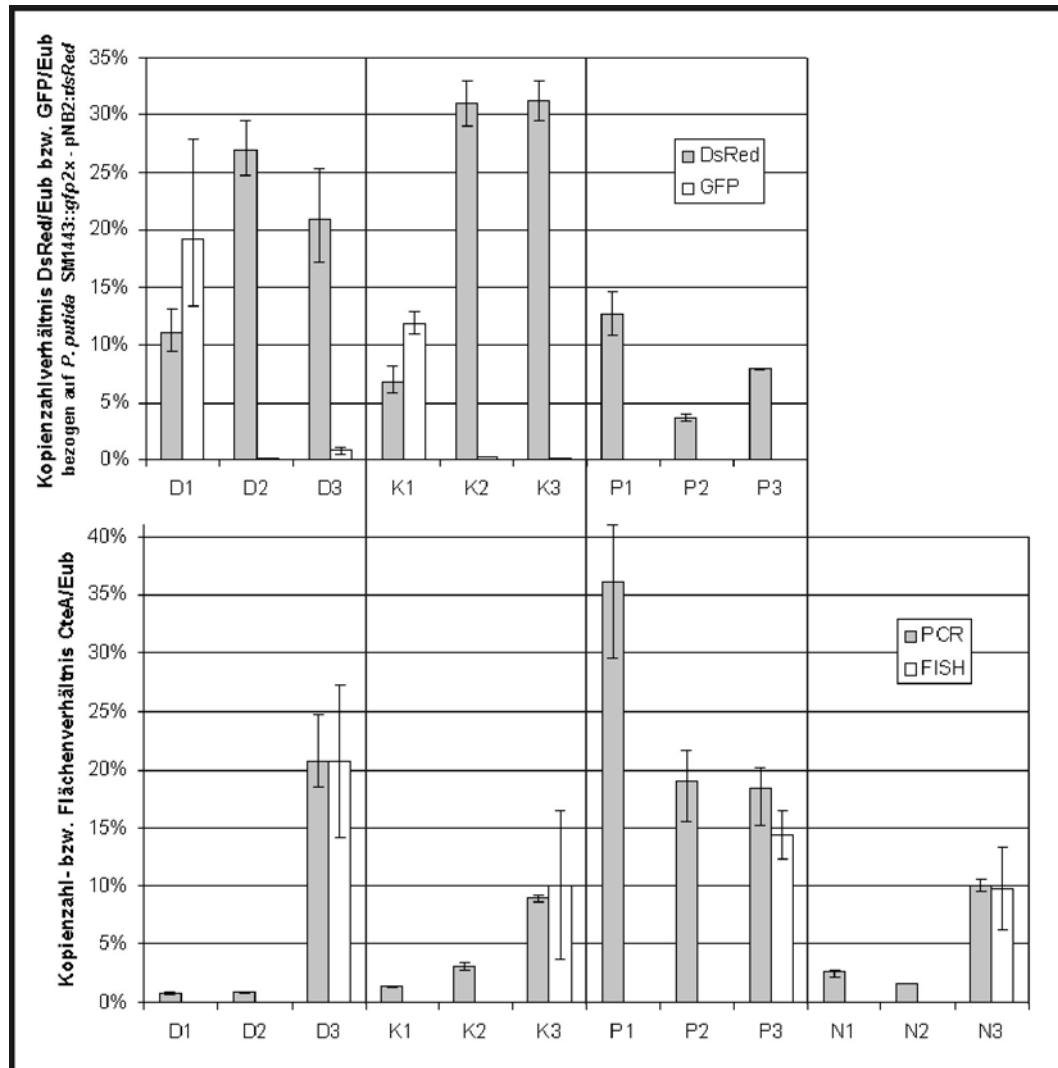


Abbildung 5.3.k):

Quantifizierung des Donorstamms (*gfp*), des Plasmids pNB2 (*dsRed*) (oberes Diagramm) sowie von *Comamonas testosteroni* (unteres Diagramm) durch real-time-PCR in den Reaktoren. Für die jeweils 3. Probe (Tag 29) wurde *C. testosteroni* zusätzlich mittels FISH (Flächenverhältnis CteA-Sonde zu Eub338-Sonde) quantifiziert.

Für die Gentransfer-Quantifizierung im oberen Diagramm wurde eine Verdünnungsreihe genomischer DNA von *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp2x* – pNB2::*dsRed* als Standard verwendet, wodurch das Kopienzahlverhältnis von *dsRed:gfp*:16S-Genen für diesen Stamm auf 1:1:1 gesetzt wurde. Für die Quantifizierung von *C. testosteroni* wurde eine Verdünnungsreihe von genomischer DNA von *C. testosteroni* SB3 als Standard verwendet.

Ausgehend von der hier dargestellten relativen Quantifizierung lassen sich folgende Aussagen machen:

- Die Häufigkeit des Plasmids in den Proben D1 und K1 ist geringer als die des Donorstamms. Da die Zahlenwerte theoretisch bei 1:1 liegen sollten, liegt hier entweder ein teilweiser Plasmidverlust des Donors oder eine Messungenauigkeit vor, was wegen sehr unterschiedlicher Amplifikationseffizienzen der beiden Produkte gut möglich ist.

- Nur in den Proben D1 und K1 kann eine größere Menge an Donor-DNA detektiert werden, in den folgenden Zeitpunkten liegt der Anteil unter 1%.
- Während in den Proben D2 und K2 im Vergleich zu den vorigen Proben die Plasmid-Kopienzahl ansteigt und danach konstant bleibt (K3) bzw. leicht absinkt (D3), ist in Proben P2 und P3 ein Absinken der Plasmidkopienzahl im Vergleich zu P1 festzustellen.
- Abgesehen von Reaktor P, dem *C. testosteroni* zugesetzt wurde, ist der Anteil an *C. testosteroni* in den ersten Proben zunächst gering und steigt dann im 3. Probenahmezeitpunkt auf Werte von 10 bis 20% an. Ein Anstieg der *C. testosteroni* Populationen ist also auch in Reaktor N festzustellen, obwohl hier kein 3-Chloranilin-Abbau stattfindet.
- Es besteht eine gute Übereinstimmung zwischen den durch PCR und durch FISH ermittelten Häufigkeitswerten für *C. testosteroni*. Diese eher zufällige Übereinstimmung der absoluten Zahlenwerte beruht wahrscheinlich darauf, dass die Zahl der ribosomalen Operons in *C. testosteroni* zufällig mit dem Durchschnittswert in der hier vorliegenden Bakteriengesellschaft übereinstimmt.
- In den Proben D2 und K2 fällt auf, dass eine hohe Plasmidkopienzahl bei gleichzeitig geringen Häufigkeiten von sowohl Donorzellen als auch *C. testosteroni* vorliegt. Es ist hier also möglich, dass zunächst ein Transfer des Plasmids zu phylogenetisch unterschiedlichen Rezipienten stattgefunden hat, von denen dann die 3-Chloranilin-abbauenden *C. testosteroni* Transkonjuganten einen Selektionsvorteil zwischen dem 2. und 3. Probenahmezeitpunkt hatten.

Um abschließend einen Gesamteindruck von der eubakteriellen Populationsdynamik in den Reaktoren zu erhalten, wurde eine Fingerprint-Analyse der mikrobiellen Diversität mittels RISA durchgeführt (s. Abbildungen 5.3.1) und 5.3.m)).

In Abbildung 5.3.1) sind in Spur R zusätzlich RISA-Produkte der beiden zu den Reaktoren D und K sowie zu P zugesetzten Stämme *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp2x* – pNB2::*dsRed* sowie von *Comamonas testosteroni* SB3 gezeigt. Dünn gezeichnete Rahmen geben die Positionen dieser Banden in den Reaktorproben wieder. In den Proben D1 und K1 ist jeweils eine vom pNB2-Donorstamm resultierende Bande deutlich zu erkennen, die allerdings schon in den Proben D2 und K2 nicht mehr auftritt. In Probe K3 ist wieder eine entsprechende Bande detektierbar, allerdings ist unklar, ob diese wirklich vom Donorstamm oder von einem anderen Stamm mit einer ähnlich langen ITS-Region stammt. Im Gegensatz hierzu ist in allen

drei Proben von Reaktor P deutlich eine wahrscheinlich von *Comamonas testosteroni* SB3 resultierende Bande zu erkennen.

Abbildung 5.3.l):

RISA-Analyse der bakteriellen Diversität in den Reaktoren.

M: 100 bp Leiter; D, K, N, P: Reaktorproben; 1, 2, 3: 1., 2., bzw. 3. Probennahmedatum (Tage 0, 18, und 29). R: Mischung von RISA-Produkten des pNB2-Donorstamms (untere Bande) und von *Comamonas testosteroni* SB3 (obere Bande).

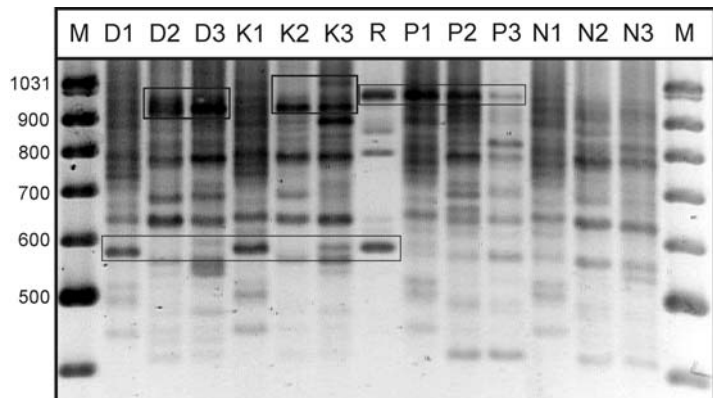
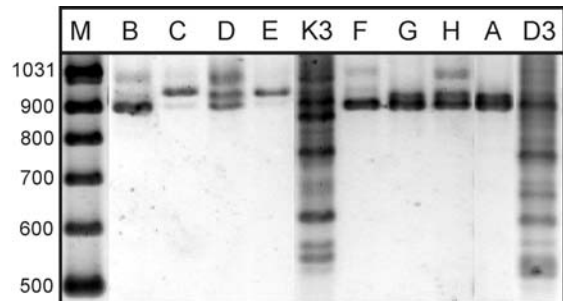


Abbildung 5.3.m):

RISA-Fingerprints der in Abbildung 5.3.h) gezeigten Isolate mit unterschiedlichen BOX-Profilen zusammen mit den Profilen der Reaktorproben K3 und D3, aus denen diese Stämme isoliert wurden.



Die in Abbildung 5.3.l) fett gezeichneten Rahmen bei den Proben D2, D3, K2 und K3 geben die Höhe von Banden an, die den Höhen von ITS-Produkten der von den 8 aus diesen Reaktoren isolierten pNB2-Transkonjugantenstämmen entspricht. Während wegen der hohen Häufigkeit von *C. testosteroni* in den Proben D3 und K3 davon ausgegangen werden kann, daß diese Banden von *C. testosteroni* resultieren, ist dies für die Proben D2 und K2 eher unwahrscheinlich. Es liegen hier wohl eher ITS-Produkte von anderen Spezies mit gleichen ITS-Längen vor. In Abbildung 5.3.m) sind Produkte dieser Isolate nochmals im Vergleich mit den Reaktorproben D3 und K3 aufgetragen. Die Isolate zeigen jeweils eine bis drei Banden unterschiedlicher Höhe. Während in Probe K3 drei Banden identifizierbar sind, die ähnliche Positionen wie die von den Isolaten B-H produzierten Banden einnehmen, zeigt Probe D3 nur eine intensive Bande, deren Höhe mit der des von Isolat A erzeugten Produktes übereinstimmt. Es soll hier noch darauf hingewiesen werden, daß in den Proben von Reaktor N keine intensiven Banden im Größenbereich von 900 bis 1000 bp auftreten, obwohl PCR und FISH eine ähnlich große *C. testosteroni* Population wie in den anderen Reaktoren zeigen. Der Grund hierfür ist unklar.

Insgesamt betrachtet zeigen die Reaktoren zwar eine zeitliche Änderung ihrer Bandenprofile, aber abgesehen von den *Comamonas testosteroni* –spezifischen Bereichen sowie den Donorstammpositionen sind in den Reaktorproben aus gleichen Zeitpunkten ähnlich



Bandenprofile zu beobachten, was darauf hindeutet, daß sich die Bakterienpopulationen in den Reaktoren in ähnlicher Weise entwickeln. Allerdings zeigen die sich mit der quantitativen PCR ergebenden Differenzen, dass RISA-beruhende Diversitätsprofile eher als Maß für eine allgemeine Diversitätsveränderung zu betrachten sind und eine direkte Zuordnung einzelner Banden zu entsprechenden Spezies nur nach Aufklärung und Zuordnung der DNA-Sequenz einer solchen Bande vorgenommen werden sollte.

## **6. DISKUSSION**

### **6.1. Kulturunabhängiger Nachweis von konjugativem Plasmidtransfer**

Da die Untersuchung von mikrobiellen Population aus natürlichen und industriell relevanten Umgebungen in verstärktem Maße mit kulturunabhängigen molekularbiologischen Methoden durchgeführt werden, lag ein Ziel dieser Arbeit darin, entsprechende kulturunabhängige Methoden zur Detektion und Quantifizierung des horizontalen Gentransfers zu entwickeln und auch in einer phylogenetisch diversen Bakterienbiozönose zum Einsatz zu bringen. Es muss angenommen werden, dass auch bei Empfängern eines mobilen genetischen Elements das Phänomen der Nichtkultivierbarkeit (Rappé und Giovannoni 2003) auftritt und somit durch eine rein kulturabhängige Analyse einer Transkonjugantenpopulation nur ein verzerrtes Bild ihrer Diversität und der Häufigkeit des horizontalen Gentransfers auftritt.

Die entwickelten Methoden zeigten in Modellversuchen eine gute Detektierbarkeit des horizontalen Gentransfers. Bei Übertragung auf Labormaßstabs-Reaktorversuche wurden jedoch einige Vor- bzw. Nachteile deutlich.

Bei dem ersten der vorgestellten Systeme, in dem eine Doppelmarkierung von Donoren und Transkonjuganten durch fluoreszierende Proteine zum Einsatz kam, sind einige Punkte zu beachten, die nachfolgend diskutiert werden.

Die mikroskopische Detektierbarkeit der jeweiligen Zelltypen ist sowohl von der sich entwickelnden Fluoreszenzintensität als auch von der Maturationszeit der fluoreszierenden Proteine, also von der Geschwindigkeit, mit der sich in einer Zelle ein Fluoreszenzsignal ausbildet, abhängig. Weiterhin sind bei der mikroskopischen Analyse von Umweltproben oft Autofluoreszenzen zu beobachten, die eine sichere Detektion der Proteinfluoreszenzen erschweren können. Im vorliegenden Fall erwies sich die von den Donorzellen entwickelte Grünfluoreszenz oft als zu schwach, um über eine längere Zeit in der Umweltprobe detektiert zu werden. Während dies für DsRed im Fall von pJP4 nicht beobachtet wurde, konnte ein *in situ* Nachweis von pNB2-Transkonjuganten jedoch nur sehr begrenzt getroffen werden, weil die hier entwickelten Rotfluoreszenzen zu schwach waren und sehr schnell ausbleichten. Weiterhin war bei DsRed die lange Maturationszeit (Bevis und Glick 2002) auffällig: auch in Agar-surface-matings unter guten Bedingungen war eine Inkubationszeit der Platten von ca. 2 Tagen notwendig, um eine Rotfluoreszenz in Transkonjuganten zu detektieren. Diese lange Maturationszeit macht eine zeitaufgelöste Analyse von Plasmidtransfer auf mikroskopischer Basis fast unmöglich. Nach Plattierungen ermöglichte die eingesetzte Doppelmarkierung

jedoch eine schnelle mikroskopische Identifizierung von Transkonjuganten-Isolaten. Die Probleme bzgl. Detektierbarkeit und Maturationszeit können in der Praxis möglicherweise durch die Auswahl geeigneterer Kombinationen von fluoreszierenden Proteinen, die zu Beginn dieser Arbeit noch nicht zur Verfügung standen, gelöst werden: mittlerweile sind schnell maturierende Varianten von DsRed verfügbar (Bevis und Glick 2002), weiterhin sind auch Gene für fluoreszierende Proteine unterschiedlicher Farbgebung, so z. B. für HcRed, ein im Infrarot-Bereich fluoreszierendes Protein (Gurskaya et al. 2001), isoliert worden. Eine Farbkombination von Rot für Donorzellen und Grün für Transkonjuganten wurde in ähnlicher Weise wie in der vorliegenden Arbeit in einer neueren Publikation von Molbak et al. (2003) zur Analyse von Gentransfer in pflanzlichen Wurzelspitzen eingesetzt. Ebenso wurde eine Doppelmarkierung zum Nachweis von Transfer der TOL-Plasmids in Reinkulturen und Reaktorproben verwendet (Nancharaiah et al. 2003), jedoch wurde hier die Plasmidfluoreszenz in Donorzellen nicht unterdrückt, so dass in dieser Arbeit Donoren sowohl rot als auch grün fluoreszierten, während Transkonjuganten nur eine Grünfluoreszenz entwickelten. Eine solche Überlagerung von Fluoreszenzen erschwert die Differenzierung zwischen Donoren und Transkonjuganten.

Zusätzlich problematisch bei der Verwendung von fluoreszierenden Proteinen ist außerdem die Notwendigkeit zur genetischen Modifikation der eingesetzten Stämme und Plasmide. Die Integration von genetischem Material könnte zu einer Veränderung sowohl der Transfer- als auch der katabolischen Eigenschaften sowohl von Donor als auch von Plasmid im Vergleich zu den unmodifizierten Derivaten führen. Für die hier verwendeten Konstrukte wurde jeweils sichergestellt, daß die zum Einsatz kommenden Plasmide sowohl transferierbar waren als auch in einer gemischten Rezipientengesellschaft den gewünschten katabolischen Phänotyp hervorriefen. Weiterhin problematisch ist für dementsprechend modifizierte Organismen jedoch eine mögliche Toxizität des produzierten Proteins für die jeweilige Zelle, die möglicherweise zu einer reduzierten Kompetitivität gegenüber unmarkierten Organismen führen (Füchslin et al. 2003, Hendrickx 2002). Für die Übertragbarkeit in die Praxis ist außerdem eine mögliche Freisetzung von genetisch modifizierten Organismen als problematisch anzusehen.

In gemischten Rezipientengesellschaften wurde außerdem eine hohe Variation der Fluoreszenzintensitäten unterschiedlicher Transkonjugantenzellen beobachtet, die auch schon, wenn auch in reduzierter Form, in Reinkulturen auftrat. Die Untersuchung der pJP4-Transkonjugantenisolate in Kap. 5.2.1. ergab für die isolierten  $\alpha$ -Proteobakterien sehr viel höhere Fluoreszenzintensitäten als für die restlichen Isolate. Dies zeigt, daß in Versuchen mit

---

Umweltproben sowohl mit einer vom physiologischen Zustand als auch von der phylogenetischen Identität der jeweiligen Transkonjugantenzelle abhängigen Variation der Fluoreszenzintensität zu rechnen ist, was zu einer Verfälschung von quantitativen Aussagen und zu einer Über- bzw. Unterrepräsentation bestimmter phylogenetischer Gruppen führen kann. Es ist zusätzlich nicht auszuschließen, dass bestimmte Transkonjugantengruppen überhaupt nicht in der Lage zur Expression der plasmidkodierten Fluoreszenzprotein-Gene sind.

Trotz der hier dargestellten Probleme bietet die mikroskopische Untersuchung von fluoreszenten Zellen als bildgebendes Verfahren unbestreitbare Vorteile, die jedoch in dieser Arbeit nicht genutzt werden konnten. So ist es prinzipiell möglich, sowohl zeit- als auch raum aufgelöste Untersuchungen der Dynamik des Plasmidtransfers z. B. in Fließkanalbiofilmen durchzuführen und diese in Beziehung zu den Umweltbedingungen zu setzen (Christensen et al. 1998, Hausner und Wuertz 1999, Wuertz et al. 2001). Falls die Fluoreszenzintensitäten von Transkonjuganten die entsprechende Behandlung zulassen, ist weiterhin eine phylogenetische Einordnung der Transkonjuganten durch FISH möglich. Dies wurde von Geisenberger et al. (1999) für den Transfer des Plasmids RP4 gezeigt. Weiterhin wären Untersuchungen der *in situ* Physiologie von Transkonjuganten mittels Mikroautoradiographie (MAR) denkbar.

Im Gegensatz zu den auf fluoreszierenden Proteinen beruhenden Methoden zeigen die PCR-gestützten Verfahren, die in dieser Arbeit getestet wurden, andere Vor- und Nachteile. Bei einer gelungenen DNA-Extraktion aus der entsprechenden Probe ist hier nicht im gleichen Maße wie bei den mikroskopischen Verfahren mit probenabhängigen Schwierigkeiten zu rechnen. Prinzipiell ist man hier nicht auf eine genetische Modifikation zur Detektion von Plasmid und Donor angewiesen, solange es möglich ist, für das Plasmid und den Donor spezifische PCR-Primer zu entwickeln. Die entwickelte Multiplex-PCR-Methode ist geeignet für ein schnelles Screening von vielen Proben, wenn auch mit einer geringen Sensitivität. Zusätzlich ist durch Einsatz der quantitativen PCR eine genauere Quantifizierung der Plasmidmenge in einer Probe möglich, als dies wahrscheinlich mit den stark variierenden Fluoreszenzintensitäten in einer Umweltprobe erreicht werden kann. Nachteil der PCR-Methoden ist allerdings, dass Transkonjuganten nur zusammen mit Donoren erfasst werden können, so dass ein Gentransfer bei einem niedrigem Zahlenverhältnis von Transkonjuganten zu Donoren im Gegensatz zur mikroskopischen Methode nicht sicher erfasst werden kann. Weiterhin ist zu beachten, dass bei der PCR-Methode nicht zwischen frei in der Probe vorliegender Plasmid-DNA und Plasmid innerhalb von Zellen unterschieden werden kann.

---

Ein weiteres Problem bzgl. der Quantifizierung ist, dass nur die Gesamtzahl der Plasmidkopien in der Probe bestimmt werden kann, während die Kopienzahl eines Plasmids in einer Bakterienzelle wiederum abhängig von deren physiologischen Zustand und möglicherweise ihrer phylogenetischen Identität schwanken kann. Insofern ist also die direkte Bestimmung einer Konjugationsrate im Sinne eines Zellzahlverhältnisses mit der PCR nicht möglich. Auch ist hier die weitergehende Analyse der phylogenetischen Identität von Transkonjuganten mittels FISH bzw. physiologische Untersuchungen mittels MAR nicht möglich.

Insgesamt betrachtet sind beide der hier untersuchten Verfahren nur in bestimmten Bereichen zur Untersuchung des horizontalen Gentransfers geeignet: während die mikroskopischen Methoden eine nicht-destruktive in situ Analyse der Probe mit nachfolgenden phylogenetischen und physiologischen Untersuchungen zulassen, bieten die PCR-gestützten Analysen bessere Möglichkeiten zur Quantifizierung des Gentransfers sowie für die Untersuchung von großen Probenzahlen. Die Weiterentwicklung der hier dargestellten sowie die Entwicklung neuer Methoden sind hier wünschenswert. So wäre z. B. auch der Nachweis von Transkonjuganten mittels der kürzlich entwickelten RING-FISH, mit der auch einzelne Gene nachgewiesen werden können (Zwirgmaier et al. 2004b), denkbar. Auch eine Transkonjugantendetektion von pJP4-Transkonjuganten durch Antikörper wurde bereits durchgeführt (Schmidt-Eisenlohr et al. 2001) und könnte dementsprechend weiterentwickelt werden. Eine physikalische Trennung von fluoreszenzmarkierten Zellen von der Restpopulation wurde in dieser Arbeit mit eingeschränktem Erfolg versucht und könnte Möglichkeiten zur nachfolgenden physiologischen und/oder phylogenetischen Charakterisierung der erhaltenen Zellen eröffnen. Sørensen et al. (2003) setzten Durchflußzytometrie erfolgreich zur Quantifizierung von Transkonjuganten in Bodenmikrokosmen ein, während Thomsen et al. (2004) eine phylogenetische Analyse einer FISH-markierten Mikrokolonie, die durch Mikromanipulation isoliert wurde, durchführten.

## 6.2. Transkonjuganten-Diversitäten der Plasmide pJP4 und pNB2

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der Untersuchungen ein für beide Plasmide breites Wirtsspektrum, wobei sich hier aber die unterschiedlichen Bedingungen der Transkonjugantenisolierungen widerspiegeln.

Im Falle von pJP4 wurde eine Strategie gewählt, die auf Transkonjuganten-Selektionsmarkern beruht, die unabhängig von den katabolischen Eigenschaften des Plasmids sind. Somit wurde zunächst eine Transkonjuganten-Verteilung erhalten, die hauptsächlich durch die Transfer- und Replikationsfunktionen, also von der Inkompatibilitätsgruppe des Plasmids, bestimmt wird. Hiermit wurden insgesamt 24 genetisch unterschiedliche Transkonjugantenstämme erhalten, die 18 in ihren 16S-rDNA Sequenzen unterschiedliche Gruppen bildeten. Die Isolate wiesen eine breite Verteilung innerhalb der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien auf, was mit vorher gewonnenen Informationen über das Wirtsspektrum des Plasmids pJP4 (Daane et al. 1996, DiGiovanni et al. 1996, Don und Pemberton 1981, Goris et al. 2002, Kleinsteuber et al. 2001, Neilson et al. 1994, Newby et al. 2000a, Newby und Pepper 2002, Schmidt-Eisenlohr et al. 2001) und auch allgemein über IncP1- $\beta$  Plasmide (Pukall et al. 1996) gut übereinstimmt. Allerdings wiesen nur 4 der 24 Isolate die Fähigkeit auf, mit 2,4-D als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle zu wachsen. Bei den zwei *Pseudomonas putida* Stämmen stimmt dies gut mit den Literaturdaten überein, in denen *Pseudomonas* spp. oft als 2,4-D abbauende pJP4-Transkonjuganten aus Boden isoliert wurde (DiGiovanni et al. 1996, Goris et al. 2002, Newby et al. 2000a, Newby und Pepper 2002). Im Falle der beiden *Delftia*-Isolate liegt keine entsprechende Information aus der Literatur vor, die auf 16S-Ebene nächst verwandten 2,4-D Abbauer gehören zu den Genera *Ralstonia* und *Burkholderia* (Goris et al. 2002, Newby et al. 2000b). Hier fällt auf, dass keine Isolate von diesen Genera erhalten wurden, was möglicherweise ihre unterschiedlichen Häufigkeiten in den Habitaten Belebtschlamm (hier untersucht) und Boden, wo die meisten Untersuchungen über die Ökologie von pJP4 durchgeführt wurden, reflektiert. Allerdings wurde im Reaktor-Bioaugmentationsexperiment (Kap. 5.2.2.) ein *Ralstonia* Stamm als pJP4-Transkonjugante isoliert, wenn auch unklar ist, ob dieser auch in situ zu den dominanten Abbauern des Herbizids gehörte. Dies ist ein Problem, dass allerdings auch in den meisten vorigen Studien nicht untersucht wurde. Als weitere Transkonjuganten-Gruppe wurden Isolate von *Stenotrophomonas maltophilia* erhalten, die jedoch nicht in der Lage waren, 2,4-D abzubauen. Dies steht im Gegensatz zu einer neueren Arbeit von Goris et al. (2002), in der mehrere 2,4-D abbauende *Stenotrophomonas maltophilia* Stämme als pJP4-Transkonjuganten isoliert wurden. Insgesamt beeinflusst wurde

die erhaltene Transkonjuganten-Diversität sicherlich durch die Wahl der Methodologie, insbesondere die Auswahl des Medientyps (Festmedium) sowie der Medienart (R2A), was durch eine ähnliche Studie kürzlich gezeigt wurde. Hier erhielten Goris et al. (2003) bei Untersuchung der Transkonjugatendiversität der Plasmid pC1gfp aus flüssigem Belebtschlamm *Delftia* spp. bei 15 von 20 Isolaten, während von LB-Medium 53 von 67 Isolate zu *Aeromonas* spp. gehörten. Außerdem haben die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten der Isolate möglicherweise zu einer Überrepräsentation von  $\alpha$ -Proteobakterien, die aufgrund einer intensiven Fluoreszenz wahrscheinlich präferentiell im Durchflußzytometrieschritt angereichert worden sind. Tatsächlich zeigen insgesamt 23 von den 56 Isolaten ähnliche (GTG)<sub>5</sub>-Profile wie die *Rhizobium*-Stämme TK4, TK7 und TK23.

Da die Isolierung von pNB2-Transkonjuganten entweder aus einer Anreicherungskultur mit 3-Chloranilin als einziger Kohlenstoffquelle (Kap. 5.3.1.) oder auf Festmedien mit 3-Chloranilin als einziger Kohlenstoffquelle (Kap. 5.3.3.) stattfand, ist hier natürlich eine starke Verschiebung des Transkonjugantenspektrums hin zu Isolaten zu erwarten, die zum Wachstum auf 3-Chloranilin (im Falle von Festmedien) befähigt sind oder möglicherweise Zwischenprodukte des 3CA-Abbaus als Kohlenstoff- oder Energiequellen für sich nutzen können. Es ist jedoch zu erwarten, dass das Plasmid prinzipiell ein ähnliches Gesamtwirtsspektrum wie pJP4 aufweist, da es ebenfalls zu Inkompatibilitätsgruppe IncP1- $\beta$  gehört. Bisher sind *Pseudomonas putida* und mehrere Vertreter der Familie *Comamonadaceae* (diese Arbeit) sowie *Ralstonia eutropha* (Boon et al. 2001) als pNB2-Transkonjugantenstämme isoliert worden. Von diesen ist allerdings nur *Comamonas testosteroni* in der Lage 3-Chloranilin abzubauen. Für *Delftia* sp. SB5 und Isolat SB1 (diese Arbeit) sowie für *Ralstonia eutropha* (Boon et al. 2001) wurde gezeigt, dass diese Stämme sowie *Comamonas testosteroni* Anilin als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle nutzen können. Insgesamt deutet dies darauf hin, dass nur  $\beta$ 1-Proteobakterien und insbesondere Vertreter der *Comamonadaceae* in der Lage sind, alle oder einen Teil der auf dem Plasmid kodierten katabolischen Gene zu nutzen, auch wenn die Anzahl und phylogenetische Verteilung der Isolate für eine gesicherte diesbezügliche Aussage nicht ausreicht. Der Grund hierfür könnte entweder sein, dass nur diese Gruppe zur Expression der plasmidkodierten Gene in der Lage ist, oder dass die plasmidkodierten Gene nur einen Teil des gesamten Abbauwegs für 3-Chloranilin bilden, so dass eine Komplementierung durch die jeweilige Wirtszelle unbedingt erforderlich ist.

### 6.3. Bioaugmentation von mikrobiellen Biozönosen in Modellreaktoren durch horizontalen Gentransfer

Beide in dieser Arbeit untersuchten Modellsysteme zeigen nach Einführung eines Donorstammes mit einem entsprechenden katabolischen Plasmid ein Auftreten von Transkonjuganten parallel zu einem Abbau des jeweiligen Modellxenobiotikums. Dies wurde sowohl kulturunabhängig als auch durch Isolierung von Plasmidtranskonjuganten gezeigt, die in der Lage waren, 2,4-D bzw. 3-Chloranilin als einzige Energie- und Kohlenstoffquellen zu nutzen. Ein vergleichbares Abbauverhalten war bei den nicht-bioaugmentierten Kontrollreaktoren nicht zu beobachten. Zusätzlich waren die Plasmid-Donorstämme im Falle von *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp2x* – pNB2::*dsRed* überhaupt nicht in der Lage zum Wachstum auf 3-Chloranilin, während *Pseudomonas putida* SM1443::*gfp2x* – pJP4::*dsRed* auf MMO-Medium mit 2,4-D als einziger C-Quelle zwar Wachstum zeigte, dies jedoch nicht in dem im Reaktorversuch verwendeten synthetischen Abwasser mit 2,4-D tat. Insgesamt betrachtet zeigt dies eine durch horizontalen Gentransfer der zugefügten Plasmide hervorgerufene gelungene Bioaugmentation der mikrobiellen Biozönosen der Reaktoren.

Im Falle von pJP4 war es jedoch nicht möglich, die dominanten 2,4-D abbauenden Mikroorganismen im bioaugmentierten Reaktor zu identifizieren. Der aus dem Reaktor als einzige Transkonjugante isolierte *Ralstonia* Stamm schien nach der DGGE-Analyse der mikrobiellen Population nicht zu den dominanten Spezies im Reaktor zu gehören, wobei hier allerdings beachtet werden sollte, dass quantitative Verhältnisse aufgrund möglicherweise unterschiedlicher Amplifikationseffizienzen während der PCR in der DGGE eventuell stark verzerrt wiedergegeben werden können. Allerdings ist aufgrund der Tatsache, dass in der zweiten Versuchshälfte 2,4-D als einzige exogene Kohlenstoffquelle zugegeben wurde, zu erwarten, dass die 2,4-D abbauenden Teilpopulationen mit dieser Methode detektiert werden sollten. Dies ist möglicherweise der Fall für die dem Genus *Acidovorax* zugeordnete dominante Bande 1b des Reaktor-Biofilms, die auch in einer Zellsuspension von einer 2,4-D Medienplatte detektiert werden konnte (s. Abbildung 5.2.f)). Eine sichere Aussage über die phylogenetische Identität der 2,4-D Abbauer im Reaktorbiofilm kann jedoch nicht getroffen werden.

Im Gegensatz hierzu wurden aus dem Bioaugmentationsversuch mit pNB2 eine Anzahl von 3-Chloranilin abbauenden Transkonjuganten isoliert, die als *Comamonas testosteroni* identifiziert werden konnten. Quantitative PCR sowie RISA-Analysen von Reaktorproben zeigten eine Zunahme der Populationsgrößen sowie schließlich eine Dominanz (10-20%) von



*Comamonas testosteroni* in den abbauenden Reaktoren. Hier muss allerdings erwähnt werden, dass der als Negativkontrolle eingesetzte Reaktor einen ähnlichen Verlauf der *C. testosteroni* Populationen zeigte wie der Reaktor K, so dass wohl auch eine Auswirkung der allgemeinen Versuchsbedingungen auf diese Art besteht. Da aber im Gegensatz zu pJP4 *C. testosteroni* die einzige pNB2-Transkonjugantenart zu sein scheint, die durch Aufnahme des Plasmids die Fähigkeit zur Verwertung von 3-Chloranilin als Kohlenstoffquelle erlangt, kann hier davon ausgegangen werden, dass diese Art die dominante 3-Chloranilin abbauende Spezies in den untersuchten Reaktoren darstellte. Erwähnenswert ist hier noch, dass insgesamt aus den Reaktoren 8 verschiedene *C. testosteroni* Stämme isoliert werden konnten, 2 aus Reaktor D und 7 aus Reaktor K. Während es bei Reaktor D also möglicherweise nur einen initialen Transfer von pNB2 zu 2 verschiedenen Stämmen gegeben hat, deren Populationen anschließend größer geworden sind, haben für die Bildung der Transkonjugantenpopulationen in Reaktor K zumindest eine höhere Anzahl von Transferereignissen eine Rolle gespielt. Ob für diesen Unterschied und die unterschiedliche Entwicklung der *C. testosteroni* Populationen sowie der Plasmiddichten die Vorkultivierung von Donorzellen in Reaktor D bzw. einer Rezipientenbiozönose in Reaktor K verantwortlich ist, ist nicht klar. Insgesamt verhalten sich die beiden Reaktoren in Funktion und Populationszusammensetzung ähnlich, so dass eine Verbindung hier jedenfalls nicht eindeutig nachgewiesen werden kann. Weiterhin ist interessant, dass in den Reaktoren D und K beim zweiten Probenahmezeitpunkt eine hohe Plasmiddichte bei gleichzeitig niedrigen Populationsgrößen von sowohl Donorstamm als auch *C. testosteroni* vorzuliegen scheint und auch in der jeweils dritten Probe eine größere Plasmidkonzentration als Dichte von *C. testosteroni* gemessen wird. Allerdings sollte hier in Betracht gezogen werden, dass die Plasmidkopienzahl pro Bakterienzelle sowohl in Abhängigkeit vom jeweiligen Wirtsorganismus als auch von seinem physiologischen Zustand schwanken kann. Trotzdem deuten die gemessenen Werte darauf hin, dass hier eine Transkonjugantenpopulation vorliegt, die nicht aus *C. testosteroni* besteht. Die Beteiligung von dieser Population am 3-Chloranilin Metabolismus im Reaktor ist nicht bekannt. Weiterhin soll hier darauf hingewiesen werden, dass in den Reaktoren D und K zwischen den Zeitpunkten 1 und 2 insgesamt eine Zunahme der Plasmiddichte gemessen wird, während diese im Reaktor P abnimmt. Dies könnte mehrere Ursachen haben. In Betracht kommen hier die Verfügbarkeit einer Kohlenstoffquelle (3-Chloranilin) in den Reaktoren D und K, während im Reaktor P alle verfügbaren C-Quellen schon verwertet sind. Weiterhin findet in den Reaktoren D und K eindeutig ein horizontaler Gentransfer statt, während dies im Reaktor P zumindest nicht in diesem Maße der Fall zu sein scheint. Dies könnte daran liegen, dass das

Plasmid von *P. putida* als initialem Donor in Reaktoren D und K mit höherer Effizienz weitergegeben wird als von *C. testosteroni* SB3 in Reaktor P. Weiterhin könnte dieser Unterschied in verschiedenen Transfereffizienzen von nicht abbauenden (*P. putida*) und abbauenden (*C. testosteroni*) Wirten liegen bzw. dadurch bedingt sein, dass abbauende Plasmiddonoren sich bildenden Transkonjugantenpopulationen einen höheren Konkurrenzdruck entgegen setzen.

Zusammenfassend betrachtet konnte eine erfolgreiche Bioaugmentation sowohl in einem Festbett-Biofilmreaktor (pJP4) als auch in Wirbelbett-Biofilmreaktoren (pNB2) durchgeführt werden. Bei pNB2 erwies sich allerdings ein vorheriger Versuch als nicht erfolgreich. Hier wurde von Beginn an alle 2 Tage ein Zykluswechsel durchgeführt und ansonsten der Reaktor durchgängig mit 180 Upm geschüttelt. Trotz durchgängiger Präsenz von Donorzellen wurde nach 3 Wochen Betrieb keine funktionelle Bioaugmentation erreicht. Im nachfolgenden Versuch mit erfolgreicher Bioaugmentation wurde die Schüttelfrequenz auf 120 Upm reduziert und pro Tag eine Ruhephase von 3 Stunden Dauer eingeführt. Außerdem wurde hier der erste Reaktorzyklus mit 3-Chloranilin haltigem Abwasser solange ausgedehnt, bis sich ein Abbau der Substanz in den bioaugmentierten Reaktoren andeutete. Auch beim Versuch mit pJP4 zeigte erst eine Ausdehnung der Zyklusdauer auf 90 Stunden den gewünschten Effekt. Insgesamt scheinen also sowohl eine ausgedehnte Anfangsinkubation als auch nicht zu hohe Scherkräfte für eine erfolgreiche Plasmid-vermittelte Bioaugmentation von Relevanz zu sein.

#### **6.4. Überlegungen zur praktischen Anwendbarkeit des Verfahrens**

Die Eignung von horizontalem Gentransfer als Mittel zur Bioaugmentation von Abwasserreinigung in der Praxis ist hier gezeigt worden, bedarf aber noch der weitergehenden Untersuchung in Pilot- und Langzeitversuchen. Im Gegensatz zu definierten Laborversuchen treten Xenobiotika in Abwasserreinigungsanlagen eher schubweise und oft in sehr geringen Konzentrationen auf. Weitere Versuche sollten klären, ob eine stabile Etablierung der gewünschten Abbaufähigkeiten in Abhängigkeit von stark wechselnden Xenobiotika-Gesamtkonzentrationen sowie deren Konzentrationsverhältnissen zu weiteren Kohlenstoffquellen etabliert werden können. Da weiterhin nur selten mit dem Auftreten nur einer definierten Substanz zu rechnen ist, ist die Isolation oder Konstruktion von Plasmiden, die Gene für den Abbau einer möglichst großen Zahl von Substanzen tragen, notwendig. Im Fall von chlorierten Anilinen liegen allerdings schon einige Isolate vor (Boon et al. 2001,

Dejonghe et al. 2002), weshalb hier eine Weiterverfolgung des Ansatzes aussichtsreich zu sein scheint. Zusätzliche Untersuchungen in Bezug auf die Auswahl von geeigneten Donorstämmen sowie der experimentellen Bedingungen sollten klären, wie eine möglichst hohe Transkonjugantendiversität im Rahmen des Wirtsspektrums des jeweiligen Plasmids erreicht werden kann.

Ausgehend von der momentanen Situation lassen sich folgende Empfehlungen treffen:

- Ein möglichst schneller Einsatz von Xenobiotikaabbau sollte primär durch eine Zellbioaugmentation, d. h. durch Zugabe von Zellen, die bereits in der Lage zum Abbau der fraglichen Substanz sind, versucht werden.
- Für die dauerhafte Etablierung von Abbaufähigkeiten ist möglicherweise ein Gentransferansatz ausgehend von nicht abbauenden Donorzellen erfolgreicher. Aufgrund des hohen Zeitbedarfs zur Etablierung von katabolisch aktiven Transkonjugantenpopulationen sollte eine solche Modifikation aber eher ex situ bzw. in einem Nebenstrom zur eigentlichen Abwasserreinigungsanlage durchgeführt werden. Die so modifizierte Biozönose kann dann zur Bioaugmentation der eigentlichen Anlage genutzt werden.
- Plasmid-vermittelte Bioaugmentation könnte sich zur Konstruktion von spezialisierten Abwasserbiozönosen zur Behandlung von industriellen Abwässern mit einer relativ definierten Zusammensetzung, geringer chemischer Diversität sowie hohen Konzentrationen der entsprechenden Xenobiotika eignen.
- Systeme mit einer hohen Biomasseretentionszeit und eher geringen physikalischen Perturbation (geringe Durchmischung bzw. Scherkräfte) scheinen sich zur Plasmid-vermittelten Bioaugmentation besser zu eignen als voll durchmischte Biomassesuspensionsreaktoren. Mögliche Zielsysteme sind hier also Biofilmreaktoren und Membran-Bioreaktoren, die einen guten Rückhalt der Biomasse im System gewährleisten. Auch die Einführung von trägergebundenen Transkonjuganten in Systeme mit suspendierter Biomasse kann hier in Betracht gezogen werden, was auch eine attraktive Möglichkeit für den Einsatz von aeroben mikrobiellen Granula sein könnte. Durch Übertragung von Plasmiden auf die Populationen in Granula könnte hier ein makroskopisches Plasmidreservoir entstehen, vorausgesetzt, es sind geeignete Rezipientenpopulationen vorhanden.

## **7. ZUSAMMENFASSUNG**

Horizontaler Gentransfer in mikrobiellen Lebensgemeinschaften ist ein Mechanismus, der sowohl an der schnellen Adaption mikrobieller Biozöten an wechselnde Umweltbedingungen wie auch langfristig an der mikrobiellen Evolution beteiligt ist. Untersuchungen des bakteriellen Xenobiotika-Katabolismus haben gezeigt, dass Gene für den Abbau von xenobiotischen Substanzen häufig auf konjugativen Plasmiden mit einem breiten Wirtsspektrum lokalisiert sind und somit eine plasmidvermittelte Einführung neuer Abbaufähigkeiten in vorher nicht abbauende Mikroorganismen möglich ist.

In dieser Arbeit wurde anhand von den beiden IncP1- $\beta$  Modellplasmiden pJP4 und pNB2, die Gene für den Katabolismus von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure bzw. 3-Chloranilin tragen, die Möglichkeit einer Bioaugmentation von mikrobiellen Abwasserbiozöten durch konjugativen Transfer dieser Plasmide von einem *Pseudomonas putida* Donorstamm zu Abwasserbakterien untersucht.

In einem ersten Teil wurden Methoden für den kulturunabhängigen Nachweis von konjugativem Plasmidtransfer in einer gemischten, nicht definierten Bakterienpopulation basierend auf der Bestimmung der Gesamtzellzahl sowie den Häufigkeiten von Plasmid-Donoren und –Transkonjuganten entwickelt. Die eine dieser Methoden basiert auf der Expression der fluoreszierenden Proteine GFP (in Donoren) sowie DsRed (in Transkonjuganten) mit einer nachfolgenden mikroskopischen Detektion von fluoreszierenden Zellen, während die andere Methode auf der Amplifikation von zelltypspezifischen PCR-Produkten in einer Multiplex-PCR-Reaktion oder einer quantitativen PCR beruht.

Im Anschluss daran wurde die Eignung der Plasmide für die Gentransfer-vermittelte Bioaugmentation von Abwasserbiozöten evaluiert. Hierzu wurden zunächst Untersuchungen zum kultivierbaren Wirtsspektrum beider Plasmide in Abwasserbakterien durchgeführt. Für das Plasmid pJP4 zeigte sich ein insgesamt breites Wirtsspektrum innerhalb der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien, allerdings beschränkten sich die 2,4-D abbauenden Transkonjugantenisolate auf Stämme der Genera *Pseudomonas* und *Delftia*. Für das Plasmid pNB2 wurde in diesen Untersuchungen erstmals seine Beteiligung am 3-Chloranilinabbau gezeigt und eine Reihe von Anilin- und 3-Chloranilin-abbauenden Transkonjugantenstämmen der Familie *Comamonadaceae* isoliert, wobei nur *Comamonas testosteroni* als 3-Chloranilinabbauer erhalten wurde. Aus diesem Grund wurden PCR-Primer sowie eine FISH-Sonde für die Detektion und Quantifizierung von *C. testosteroni* in Umweltproben entwickelt und evaluiert.

---

Nachfolgend wurde mit beiden Plasmiden eine Bioaugmentation von Labormaßstabs-SBBRs durchgeführt. Bei beiden Plasmiden konnte das Auftreten von Transkonjuganten mit einem Einsatz des 2,4-D bzw. des 3-Chloranilinabbaus korreliert und xenobiotikaabbauende Transkonjuganten aus den Reaktoren isoliert werden. Im Falle von pJP4 ist jedoch nicht klar, ob der isolierte *Ralstonia*-Stamm auch in situ den dominanten 2,4-D Abbauer des bioaugmentierten Reaktors stellte, da dieser nach DGGE-Analyse nicht zu den dominanten Spezies im Reaktorbiofilm gehörte. Im Gegensatz hierzu trat in den Biozönosen der pNB2-bioaugmentierten Reaktoren *C. testosteroni* mit Häufigkeiten von 10-20% auf, weshalb eine Beteiligung dieser Art am 3-Chloranilin-Abbau auch in situ wahrscheinlich ist. Eine Untersuchung der Häufigkeiten von Donoren, pNB2 sowie *C. testosteroni* mit real-time PCR lässt allerdings darauf schließen, dass es nach Zugabe der Plasmiddonoren zu den Reaktoren zunächst auch zu einer Übertragung des Plasmids auf andere Arten gekommen ist, von denen *C. testosteroni* Transkonjuganten aufgrund ihrer Befähigung zum 3-Chloranilin-Abbau dann einen selektiven Vorteil hatten.

Insgesamt wurde in dieser Arbeit eine Plasmid-vermittelte Bioaugmentation von mikrobiellen Abwasserbiozönosen mit zwei Modellsystemen erfolgreich durchgeführt und der Abbau der Modell-Xenobiotika mit dem Auftreten von Plasmid-Transkonjuganten korreliert. Die Übertragbarkeit dieses Ansatzes auf die Praxis erscheint möglich und wird diskutiert.

## **8. LITERATUR**

- Adamczyk J, Hesselsoe M, Iversen N, Horn M, Lehner A, Nielsen PH, Schloter M, Roslev P, Wagner M.** 2003. The isotope array, a new tool that employs substrate-mediated labeling of rRNA for determination of microbial community structure and function. *Appl Environ Microbiol* 69: 6875-87.
- Ahmed FE.** 2002. Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends Biotechnol* 20: 215-23.
- Amann RI.** 1995. In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. In *Molecular Microbial Ecology Manual*, ed. ADL Akkermans, JD van Elsas, FJ de Bruijn. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.
- Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA.** 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* 56: 1919-25.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH.** 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59: 143-69.
- Arber W.** 1990. Mechanisms in microbial evolution. *J Struct Biol* 104: 107-11.
- Artursson V, Jansson JK.** 2003. Use of bromodeoxyuridine immunocapture to identify active bacteria associated with arbuscular mycorrhizal hyphae. *Appl Environ Microbiol* 69: 6208-15.
- Atlas RM.** 1993. *Handbook of Microbiological Media*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K.** 1999. *Short protocols in molecular biology*. New York, USA: Wiley and Sons.
- Avrahami S, Conrad R, Braker G.** 2002. Effect of soil ammonium concentration on N<sub>2</sub>O release and on the community structure of ammonia oxidizers and denitrifiers. *Appl Environ Microbiol* 68: 5685-92.
- Bakermans C, Madsen EL.** 2002. Diversity of 16S rDNA and naphthalene dioxygenase genes from coal-tar-waste-contaminated aquifer waters. *Microb Ecol* 44: 95-106.
- Baleiras Couto MM, Eijmsa B, Hofstra H, Huis in't Veld JH, van der Vossen JM.** 1996. Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl Environ Microbiol* 62: 41-6.
- Beun JJ, van Loosdrecht MC, Heijnen JJ.** 2002. Aerobic granulation in a sequencing batch airlift reactor. *Water Res* 36: 702-12.
- Bevis BJ, Glick BS.** 2002. Rapidly maturing variants of the Discosoma red fluorescent protein (DsRed). *Nat Biotechnol* 20: 83-7.
- Boon N, De Gelder L, Lievens H, Siciliano SD, Top EM, Verstraete W.** 2002. Bioaugmenting bioreactors for the continuous removal of 3-chloroaniline by a slow release approach. *Environ Sci Technol* 36: 4698-704.
- Boon N, Goris J, De Vos P, Verstraete W, Top EM.** 2000. Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-degrading *Comamonas testosteroni* strain, I2gfp. *Appl Environ Microbiol* 66: 2906-13.
- Boon N, Goris J, De Vos P, Verstraete W, Top EM.** 2001. Genetic diversity among 3-chloroaniline- and aniline-degrading strains of the *Comamonadaceae*. *Appl Environ Microbiol* 67: 1107-15.
- Boon N, Top EM, Verstraete W, Siciliano SD.** 2003. Bioaugmentation as a tool to protect the structure and function of an activated-sludge microbial community against a 3-chloroaniline shock load. *Appl Environ Microbiol* 69: 1511-20.
- Borneman J.** 1999. Culture-independent identification of microorganisms that respond to specified stimuli. *Appl Environ Microbiol* 65: 3398-400.

- Borneman J, Triplett EW.** 1997. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl Environ Microbiol* 63: 2647-53.
- Bouchez T, Patureau D, Dabert P, Juretschko S, Dore J, Delgenes P, Moletta R, Wagner M.** 2000. Ecological study of a bioaugmentation failure. *Environ Microbiol* 2: 179-90.
- Brim H, Heyndrickx M, de Vos P, Wilmotte A, Springael D, Schlegel HG, Mergeay M.** 1999. Amplified rDNA restriction analysis and further genotypic characterisation of metal-resistant soil bacteria and related facultative hydrogenotrophs. *Syst Appl Microbiol* 22: 258-68.
- Casavant NC, Thompson D, Beattie GA, Phillips GJ, Halverson LJ.** 2003. Use of a site-specific recombination-based biosensor for detecting bioavailable toluene and related compounds on roots. *Environ Microbiol* 5: 238-49.
- Cerniglia CE.** 1984. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Adv Appl Microbiol* 30: 31-71.
- Christensen BB, Sternberg C, Andersen JB, Eberl L, Moller S, Givskov M, Molin S.** 1998. Establishment of new genetic traits in a microbial biofilm community. *Appl Environ Microbiol* 64: 2247-55.
- Cohan FM.** 2002. What are bacterial species? *Annu Rev Microbiol* 56: 457-87.
- Coskuner G, Curtis TP.** 2002. In situ characterization of nitrifiers in an activated sludge plant: detection of *Nitrobacter* spp. *J Appl Microbiol* 93: 431-7.
- Daane LL, Molina JA, Berry EC, Sadowsky MJ.** 1996. Influence of earthworm activity on gene transfer from *Pseudomonas fluorescens* to indigenous soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 62: 515-21.
- Dahllöf I.** 2002. Molecular community analysis of microbial diversity. *Curr Opin Biotechnol* 13: 213-7.
- Daims H, Ramsing NB, Schleifer KH, Wagner M.** 2001. Cultivation-independent, semiautomatic determination of absolute bacterial cell numbers in environmental samples by fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* 67: 5810-8.
- Daubin V, Gouy M, Perriere G.** 2002. A phylogenomic approach to bacterial phylogeny: evidence of a core of genes sharing a common history. *Genome Res* 12: 1080-90.
- de Lorenzo V, Herrero M, Jakubzik U, Timmis KN.** 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* 172: 6568-72.
- Dejonghe W, Goris J, Dierickx A, de Dobbeleer V, Crul K, De Vos P, Verstraete W, Top EM.** 2002. Diversity of 3-chloroaniline and 3,4-dichloroaniline degrading bacteria isolated from three different soils and involvement of their plasmids in chloroaniline degradation. *FEMS Microbiol Ecol* 42: 315-25.
- Dejonghe W, Goris J, El Fantroussi S, Hofte M, De Vos P, Verstraete W, Top EM.** 2000. Effect of dissemination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) degradation plasmids on 2,4-D degradation and on bacterial community structure in two different soil horizons. *Appl Environ Microbiol* 66: 3297-304.
- Dellweg H, Schmid RD, Trommer WE, eds.** 1992. *Römpp Lexikon Biotechnologie*. Stuttgart - New York: Thieme Verlag. 882 pp..
- Devereux R, Willis SG.** 1995. Amplification of ribosomal RNA sequences. In *Molecular Microbial Ecology Manual*, ed. ADL Akkermans, JD van Elsas, FJ de Bruijn. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.
- DiGiovanni GD, Neilson JW, Pepper IL, Sinclair NA.** 1996. Gene transfer of *Alcaligenes eutrophus* JMP134 plasmid pJP4 to indigenous soil recipients. *Appl Environ Microbiol* 62: 2521-6.
- Don RH, Pemberton JM.** 1981. Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* 145: 681-6.

- Egli K, Bosshard F, Werlen C, Lais P, Siegrist H, Zehnder AJ, Van der Meer JR.** 2003. Microbial composition and structure of a rotating biological contactor biofilm treating ammonium-rich wastewater without organic carbon. *Microb Ecol* 45: 419-32.
- Elvang AM, Westerberg K, Jernberg C, Jansson JK.** 2001. Use of green fluorescent protein and luciferase biomarkers to monitor survival and activity of *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 cells during degradation of 4-chlorophenol in soil. *Environ Microbiol* 3: 32-42.
- Etterer T, Wilderer PA.** 2001. Generation and properties of aerobic granular sludge. *Water Sci Technol* 43(3): 19-26.
- Fjellbirkeland A, Torsvik V, Ovreas L.** 2001. Methanotrophic diversity in an agricultural soil as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis profiles of *pmoA*, *mxoF* and 16S rDNA sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 79: 209-17.
- Forney LJ, Zhou X, Brown CJ.** 2004. Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. *Curr Opin Microbiol* 7: 210-20.
- Forth W, Rummel W, Henschler D, Starke K, Förstermann U.** 2001. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*: Verlag Urban und Fischer. 1280 Seiten.
- Füchslin HP, Ruegg I, Van Der Meer JR, Egli T.** 2003. Effect of integration of a GFP reporter gene on fitness of *Ralstonia eutropha* during growth with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Environ Microbiol* 5: 878-87.
- Garcia-Martinez J, Acinas SG, Anton AI, Rodriguez-Valera F.** 1999. Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *J Microbiol Methods* 36: 55-64.
- Geisenberger O, Ammendola A, Christensen BB, Molin S, Schleifer KH, Eberl L.** 1999. Monitoring the conjugal transfer of plasmid RP4 in activated sludge and in situ identification of the transconjugants. *FEMS Microbiol Lett* 174: 9-17.
- Ghigo JM.** 2001. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* 412: 442-5.
- Gillan DC, Speksnijder AG, Zwart G, De Ridder C.** 1998. Genetic diversity of the biofilm covering *Montacuta ferruginosa* (Mollusca, bivalvia) as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and cloning of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 64: 3464-72.
- Goris J, Boon N, Lebbe L, Verstraete W, De Vos P.** 2003. Diversity of activated sludge bacteria receiving the 3-chloroaniline degradative plasmid pC1gfp. *FEMS Microbiol Ecol* 46: 221-30.
- Goris J, Dejonghe W, Falsen E, De Clerck E, Geeraerts B, Willems A, Top EM, Vandamme P, De Vos P.** 2002. Diversity of transconjugants that acquired plasmid pJP4 or pEMT1 after inoculation of a donor strain in the A- and B-horizon of an agricultural soil and description of *Burkholderia hospita* sp. nov. and *Burkholderia terricola* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 25: 340-52.
- Gray ND, Head IM.** 2001. Linking genetic identity and function in communities of uncultured bacteria. *Environ Microbiol* 3: 481-92.
- Gray ND, Howarth R, Pickup RW, Jones JG, Head IM.** 2000. Use of combined microautoradiography and fluorescence in situ hybridization to determine carbon metabolism in mixed natural communities of uncultured bacteria from the genus *Achromatium*. *Appl Environ Microbiol* 66: 4518-22.
- Guieysse B, Wickstrom P, Forsman M, Mattiasson B.** 2001. Biomonitoring of continuous microbial community adaptation towards more efficient phenol-degradation in a fed-batch bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 56: 780-7.
- Gujer W.** 1999. *Siedlungswasserwirtschaft*. Berlin Heidelberg: Springer Verlag. 410 Seiten.



- Gurskaya NG, Fradkov AF, Terskikh A, Matz MV, Labas YA, Martynov VI, Yanushevich YG, Lukyanov KA, Lukyanov SA. 2001. GFP-like chromoproteins as a source of far-red fluorescent proteins. *FEBS Lett* 507: 16-20.
- Hausner M, Wuertz S. 1999. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Appl Environ Microbiol* 65: 3710-3.
- Hendrickx L. 2002. *Natural genetic transformation in Acinetobacter sp. BD413 biofilms: introducing natural genetic transformation as a tool for bioenhancement of biofilm reactors*. Dissertation, Technische Universität München. 163 Seiten.
- Herrero M, de Lorenzo V, Timmis KN. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 172: 6557-67.
- Hoffmann T, Horz HP, Kemnitz D, Conrad R. 2002. Diversity of the particulate methane monooxygenase gene in methanotrophic samples from different rice field soils in China and the Philippines. *Syst Appl Microbiol* 25: 267-74.
- Houpikian P, Raoult D. 2001. Molecular phylogeny of the genus *Bartonella*: what is the current knowledge? *FEMS Microbiol Lett* 200: 1-7.
- Junca H, Pieper DH. 2003. Amplified functional DNA restriction analysis to determine catechol 2,3-dioxygenase gene diversity in soil bacteria. *J Microbiol Methods* 55: 697-708.
- Juretschko S, Timmermann G, Schmid M, Schleifer KH, Pommerening-Roser A, Koops HP, Wagner M. 1998. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl Environ Microbiol* 64: 3042-51.
- Klappenbach JA, Dunbar JM, Schmidt TM. 2000. rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl Environ Microbiol* 66: 1328-33.
- Kleinstaub S, Müller RH, Babel W. 2001. Expression of the 2,4-D degradative pathway of pJP4 in an alkaliphilic, moderately halophilic soda lake isolate, *Halomonas* sp. EF43. *Extremophiles* 5: 375-84.
- Knippers R. 1997. *Molekulare Genetik*. Stuttgart - New York: Georg Thieme Verlag. 508 Seiten.
- Lee N, Nielsen PH, Andreasen KH, Juretschko S, Nielsen JL, Schleifer KH, Wagner M. 1999. Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography-a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Appl Environ Microbiol* 65: 1289-97.
- Lehrbach PR, Zeyer J, Reineke W, Knackmuss HJ, Timmis KN. 1984. Enzyme recruitment in vitro: use of cloned genes to extend the range of haloaromatics degraded by *Pseudomonas* sp. strain B13. *J Bacteriol* 158: 1025-32.
- Lemmer H, Griebe T, Flemming H-C. 1996. *Ökologie der Abwasserorganismen*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 313 Seiten.
- Loy A, Lehner A, Lee N, Adamczyk J, Meier H, Ernst J, Schleifer KH, Wagner M. 2002. Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. *Appl Environ Microbiol* 68: 5064-81.
- Ludwig W, Schleifer KH. 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Rev* 15: 155-73.
- Major DW, McMaster ML, Cox EE, Edwards EA, Dworatzek SM, Hendrickson ER, Starr MG, Payne JA, Buonamici LW. 2002. Field demonstration of successful bioaugmentation to achieve dechlorination of tetrachloroethene to ethene. *Environ Sci Technol* 36: 5106-16.

- Manefield M, Whiteley AS, Griffiths RI, Bailey MJ.** 2002. RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to phylogeny. *Appl Environ Microbiol* 68: 5367-73.
- Molbak L, Licht TR, Kvist T, Kroer N, Andersen SR.** 2003. Plasmid transfer from *Pseudomonas putida* to the indigenous bacteria on alfalfa sprouts: characterization, direct quantification, and in situ location of transconjugant cells. *Appl Environ Microbiol* 69: 5536-42.
- Molin S, Tolker-Nielsen T.** 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr Opin Biotechnol* 14: 255-61.
- Moter A, Göbel UB.** 2000. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J Microbiol Methods* 41: 85-112.
- Müller E, Kriebitzsch K, Wilderer PA, Wuertz S.** 2002. Community structure of micro- and macroflocs in pin-point sludge and the influence of sludge age and potassium addition on microfloc formation. *Water Sci Technol* 46(1-2): 405-12.
- Muyzer G, Brinkhoff T, Nübel U, Santegoeds CM, Schäfer H, Wawer C.** 1997. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In *Molecular Microbial Ecology Manual*, ed. ADL Akkermans, JD van Elsas, FJ de Bruijn. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.
- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59: 695-700.
- Muyzer G, Smalla K.** 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73: 127-41.
- Nancharaiah YV, Wattiau P, Wuertz S, Bathe S, Mohan SV, Wilderer PA, Hausner M.** 2003. Dual labeling of *Pseudomonas putida* with fluorescent proteins for in situ monitoring of conjugal transfer of the TOL plasmid. *Appl Environ Microbiol* 69: 4846-52.
- Neilson JW, Josephson KL, Pepper IL, Arnold RB, Di Giovanni GD, Sinclair NA.** 1994. Frequency of horizontal gene transfer of a large catabolic plasmid (pJP4) in soil. *Appl Environ Microbiol* 60: 4053-8.
- Neilson JW, Josephson KL, Pillai SD, Pepper IL.** 1992. Polymerase chain reaction and gene probe detection of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation plasmid, pJP4. *Appl Environ Microbiol* 58: 1271-5.
- Newby DT, Gentry TJ, Pepper IL.** 2000a. Comparison of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation and plasmid transfer in soil resulting from bioaugmentation with two different pJP4 donors. *Appl Environ Microbiol* 66: 3399-407.
- Newby DT, Josephson KL, Pepper IL.** 2000b. Detection and characterization of plasmid pJP4 transfer to indigenous soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 66: 290-6.
- Newby DT, Pepper IL.** 2002. Dispersal of plasmid pJP4 in unsaturated and saturated 2,4-dichlorophenoxyacetic acid contaminated soil. *FEMS Microbiol Ecol* 39: 157-64.
- Nicolaisen MH, Ramsing NB.** 2002. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *J Microbiol Methods* 50: 189-203.
- Nicolella C, van Loosdrecht MC, Heijnen JJ.** 2000. Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *J Biotechnol* 80: 1-33.
- Novick RP.** 1987. Plasmid incompatibility. *Microbiol Rev* 51: 381-95.
- Osborn AM, Moore ER, Timmis KN.** 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ Microbiol* 2: 39-50.

- Page RD.** 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12: 357-8.
- Pepper IL, Gentry TJ, Newby DT, Roane TM, Josephson KL.** 2002. The role of cell bioaugmentation and gene bioaugmentation in the remediation of co-contaminated soils. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 6: 943-6.
- Pukall R, Tschäpe H, Smalla K.** 1996. Monitoring the spread of broad host and narrow host range plasmids in soil microcosms. *FEMS Microbiol Ecol* 20: 53-66.
- Radajewski S, Ineson P, Parekh NR, Murrell JC.** 2000. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* 403: 646-9.
- Radajewski S, McDonald IR, Murrell JC.** 2003. Stable-isotope probing of nucleic acids: a window to the function of uncultured microorganisms. *Curr Opin Biotechnol* 14: 296-302.
- Rademaker JLW, Louws FJ, de Bruijn FJ.** 1998. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In *Molecular Microbial Ecology Manual*, ed. ADL Akkermans, JD van Elsas, FJ de Bruijn. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.
- Rappé MS, Giovannoni SJ.** 2003. The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol* 57: 369-94.
- Ravenschlag K, Sahn K, Knoblauch C, Jorgensen BB, Amann R.** 2000. Community structure, cellular rRNA content, and activity of sulfate-reducing bacteria in marine arctic sediments. *Appl Environ Microbiol* 66: 3592-602.
- Regan JM, Harrington GW, Baribeau H, De Leon R, Noguera DR.** 2003. Diversity of nitrifying bacteria in full-scale chloraminated distribution systems. *Water Res* 37: 197-205.
- Reineke W, Knackmuss H-J.** 1988. Microbial degradation of haloaromatics. *Annu Rev Microbiol* 42: 263-87.
- Rich JJ, Heichen RS, Bottomley PJ, Cromack K, Jr., Myrold DD.** 2003. Community composition and functioning of denitrifying bacteria from adjacent meadow and forest soils. *Appl Environ Microbiol* 69: 5974-82.
- Rippen G, ed.** 1992. *Handbuch Umweltchemikalien*. Landsberg am Lech: ecomed Verlag.
- Röling WF, van Breukelen BM, Braster M, Lin B, van Verseveld HW.** 2001. Relationships between microbial community structure and hydrochemistry in a landfill leachate-polluted aquifer. *Appl Environ Microbiol* 67: 4619-29.
- Rosselló-Mora R, Amann R.** 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 25: 39-67.
- Rowan AK, Moser G, Gray N, Snape JR, Fearnside D, Curtis TP, Barer MR, Head IM.** 2003. A comparative study of ammonia-oxidizing bacteria in lab-scale industrial wastewater treatment reactors. *Water Sci Technol* 48(3): 17-24.
- Rubio MA, Wilderer PA.** 1989. Process Strategies to enhance transfer of plasmid coded degradative properties for chlorinated hydrocarbons in sequencing batch reactors. In *Biotechnology Applications in Hazardous Waste Treatment*, ed. GA Lewandowsky, P Armenante, B Baltzis, Seiten 395-402. New York: Engineering Foundation.
- Schlöter M, Leuhn M, Heulin T, Hartmann A.** 2000. Ecology and evolution of bacterial microdiversity. *FEMS Microbiol Rev* 24: 647-60.
- Schmid M, Thill A, Purkhold U, Walcher M, Bottero JY, Ginestet P, Nielsen PH, Wuertz S, Wagner M.** 2003. Characterization of activated sludge flocs by confocal laser scanning microscopy and image analysis. *Water Res* 37: 2043-52.
- Schmidt-Eisenlohr H, Rittig M, Preithner S, Baron C.** 2001. Biomonitoring of pJP4-carrying *Pseudomonas chlororaphis* with Trb protein-specific antisera. *Environ Microbiol* 3: 720-30.

- Skiadas IV, Gavala HN, Schmidt JE, Ahring BK.** 2003. Anaerobic granular sludge and biofilm reactors. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 82: 35-67.
- Smits TH, Devenoges C, Szynalski K, Maillard J, Holliger C.** 2004. Development of a real-time PCR method for quantification of the three genera *Dehalobacter*, *Dehalococcoides*, and *Desulfitobacterium* in microbial communities. *J Microbiol Methods* 57: 369-78.
- Snaidr J, Amann R, Huber I, Ludwig W, Schleifer KH.** 1997. Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Appl Environ Microbiol* 63: 2884-96.
- Sorensen SJ, Sorensen AH, Hansen LH, Oregaard G, Veal D.** 2003. Direct detection and quantification of horizontal gene transfer by using flow cytometry and gfp as a reporter gene. *Curr Microbiol* 47: 129-33.
- Springael D, Peys K, Ryngaert A, Van Roy S, Hooyberghs L, Ravatn R, Heyndrickx M, van der Meer JR, Vandecasteele C, Mergeay M, Diels L.** 2002. Community shifts in a seeded 3-chlorobenzoate degrading membrane biofilm reactor: indications for involvement of in situ horizontal transfer of the clc-element from inoculum to contaminant bacteria. *Environ Microbiol* 4: 70-80.
- Springael D, Top EM.** 2004. Horizontal gene transfer and microbial adaptation to xenobiotics: new types of mobile genetic elements and lessons from ecological studies. *Trends Microbiol* 12: 53-8.
- Steidle A, Sigl K, Schuegger R, Ihring A, Schmid M, Gantner S, Stoffels M, Riedel K, Givskov M, Hartmann A, Langebartels C, Eberl L.** 2001. Visualization of N-acetylhomoserine lactone-mediated cell-cell communication between bacteria colonizing the tomato rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* 67: 5761-70.
- Tan HM.** 1999. Bacterial catabolic transposons. *Appl Microbiol Biotechnol* 51: 1-12.
- Taroncher-Oldenburg G, Griner EM, Francis CA, Ward BB.** 2003. Oligonucleotide microarray for the study of functional gene diversity in the nitrogen cycle in the environment. *Appl Environ Microbiol* 69: 1159-71.
- Tchobanoglous G, Burton FL, Stensel HD.** 2003. *Wastewater Engineering, Treatment and Reuse*. New York: McGraw-Hill. 1819 Seiten.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG.** 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-82.
- Thomsen TR, Nielsen JL, Ramsing NB, Nielsen PH.** 2004. Micromanipulation and further identification of FISH-labelled microcolonies of a dominant denitrifying bacterium in activated sludge. *Environ Microbiol* 6: 470-9.
- Tolker-Nielsen T, Brinch UC, Ragas PC, Andersen JB, Jacobsen CS, Molin S.** 2000. Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. *J Bacteriol* 182: 6482-9.
- Top EM, Springael D.** 2003. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. *Curr Opin Biotechnol* 14: 262-9.
- Top EM, Springael D, Boon N.** 2002. Catabolic mobile genetic elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soils and waters. *FEMS Microbiol Ecol* 42: 199-208.
- Tsuda M, Tan HM, Nishi A, Furukawa K.** 1999. Mobile catabolic genes in bacteria. *J Biosci Bioeng* 87: 401-10.
- Turner SL, Bailey MJ, Lilley AK, Thomas CM.** 2002. Ecological and molecular maintenance strategies of mobile genetic elements. *FEMS Microbiol Ecol* 42: 177-85.
- Unge A, Tombolini R, Müller A, Jansson JK.** 1997. Optimization of GFP as a marker for detection of bacteria in environmental samples. In *Bioluminescence and Chemiluminescence: Molecular reporting with Photons*, ed. JW Hastings, LJ Kricka, PE Stanley, Seiten 391-4. Sussey, UK: Wiley and Sons.

- Urbach E, Vergin KL, Giovannoni SJ.** 1999. Immunochemical detection and isolation of DNA from metabolically active bacteria. *Appl Environ Microbiol* 65: 1207-13.
- van der Meer JR, de Vos WM, Harayama S, Zehnder AJ.** 1992. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol Rev* 56: 677-94.
- van der Meer JR, Sentchilo V.** 2003. Genomic islands and the evolution of catabolic pathways in bacteria. *Curr Opin Biotechnol* 14: 248-54.
- van Heerden J, Ehlers MM, Cloete TE.** 2001. Biolog for the determination of microbial diversity in activated sludge systems. *Water Sci Technol* 43(1): 83-90.
- van Limbergen H, Top EM, Verstraete W.** 1998. Bioaugmentation in activated sludge: current features and future perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 50: 16-23.
- Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kersters K, Swings J.** 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* 60: 407-38.
- Verstraete W, van Vaerenbergh E.** 1986. Aerobic Activated Sludge. In *Microbial Degradations*, ed. W Schönborn, Seiten 43-112. Weinheim: VCH.
- Wagner M, Loy A, Nogueira R, Purkhold U, Lee N, Daims H.** 2002. Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 665-80.
- Watanabe K, Kodama Y, Harayama S.** 2001. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. *J Microbiol Methods* 44: 253-62.
- Watanabe K, Teramoto M, Harayama S.** 2002. Stable augmentation of activated sludge with foreign catabolic genes harboured by an indigenous dominant bacterium. *Environ Microbiol* 4: 577-83.
- Wen A, Fegan M, Hayward C, Chakraborty S, Sly LI.** 1999. Phylogenetic relationships among members of the *Comamonadaceae*, and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tamaoka et al. 1987) gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49: 567-76.
- Widada J, Nojiri H, Omori T.** 2002. Recent developments in molecular techniques for identification and monitoring of xenobiotic-degrading bacteria and their catabolic genes in bioremediation. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 45-59.
- Widmer F, Seidler RJ, Gillevet PM, Watrud LS, Di Giovanni GD.** 1998. A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 64: 2545-53.
- Wilderer PA.** 1992. Sequencing Batch Biofilm Reactor Technology. In *Harnessing Biotechnology for the 21st Century*, ed. MR Ladisch, A Bose, Seiten 475-9: Am. Chem. Soc..
- Wilderer PA.** 2004. Abwassertechnik am Scheideweg - Entsorgung oder Wertstoffgewinnung? *Akademie-Journal: Magazin der Union der deutschen Akademien der Wissenschaften* Heft 1/2004: 43-7.
- Wilderer PA, Irvine RL, Goronszy MC, eds.** 2001. *Sequencing batch reactor technology*. London, UK: IWA.
- Wilderer PA, Krebs H, Sekoulov I, Rubio MA, von Hoyningen-Huene E.** 1989. Neue Verfahren und Methoden zur Sanierung von Altlasten am Beispiel der Deponie Georgswerder, Teilvorhaben 2: Behandlungssysteme für die Staufflüssigkeiten aus der Deponie Georgswerder. In *Forschungsbericht Technologische Forschung und Entwicklung, Bundesministerium für Forschung und Technologie*..
- Wilderer PA, Rubio MA, Davids L.** 1991. Impact of the addition of pure cultures on the performance of mixed culture reactors. *Water Res* 25: 1307-13.
- Woese CR.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51: 221-71.
- Wuertz S.** 2002. Gene exchange in biofilms. In *Encyclopedia of Environmental Microbiology*, ed. G Bitton, Seiten 1408-20. New York: John Wiley and Sons.

- 
- Wuertz S, Hendrickx L, Kuehn M, Rodenacker K, Hausner M.** 2001. In situ quantification of gene transfer in biofilms. *Methods Enzymol* 336: 129-43.
- Ye RW, Wang T, Bedzyk L, Croker KM.** 2001. Applications of DNA microarrays in microbial systems. *J Microbiol Methods* 47: 257-72.
- Zwirgmaier K, Ludwig W, Schleifer KH.** 2004a. Improved method for polynucleotide probe-based cell sorting, using DNA-coated microplates. *Appl Environ Microbiol* 70: 494-7.
- Zwirgmaier K, Ludwig W, Schleifer KH.** 2004b. Recognition of individual genes in a single bacterial cell by fluorescence in situ hybridization - RING-FISH. *Mol Microbiol* 51: 89-96.

## 9. ANHANG

### **9.1. In Kap. 5.2.2. ermittelte 16S-rRNA Sequenzen**

#### DGGE-Bandensequenz 1a:

1 CTGATCCAGC CATGCCGCGT GCAGGATGAC TGCCCTATGG GTTGTAAGCT GCTTTTATAC  
 61 TAGAATAATA GGCTTTTACG TGTASAAGTA TGAATGTATA GTATGAATAA GGATCCGGCTA  
 121 ACTCCGTG

#### DGGE-Bandensequenz 1b:

1 ATGGGCGCAA GCCTGATCCA GCAATGCCGC GTGCAGGATG AAGGCCTTCG GGTTGTAAAC  
 61 TGCTTTTGTA CGGAACGAAA NGGCTCTGGC TAATACCTGG GGCTTATGAC GGTACCGTAA  
 121 GAATAAGCAC CGGCTAACTA CGTG

#### DGGE-Bandensequenz 2:

1 ATGGGCGCAA GCCTGATCCA GCAATGCCGC GTGCAGGATG AAGGCCTTCG GGTTGTAAAC  
 61 TGCTTTTGTA CGGAACGAAA CGGTTCTCTC TAATACAGGG GGCTAATGAC GGTACCGTAA  
 121 GAATAAGCAC CGGCTAACTA CGTG

#### DGGE-Bandensequenz 3:

1 ATGGGCGCAA GCCTGATCCA GCAATGCCGC GTGCAGGATG AAGGCCTTCG GGTTGTAAAC  
 61 TGCTTTTGTA CGGAACGAAA GGGCTCTGGT TAATACCTGG GGCATATGAC GGTACCGTAA  
 121 GAATAAGCAC CGGCTAACTA CGTG

#### DGGE-Bandensequenz 4:

1 ATGGGCGCAA GCCTGATCCA GCAATGCCGC GTGCAGGACG AAGGCCTTCG GGTTGTAAAC  
 61 TGCTTTTGTA CGGAACGAAA AGCTCTGGGC TAATACCCTG GAGTGATGAC GGTACCGTAA  
 121 GAATAAGCAC CGGCTAACTA CGTG

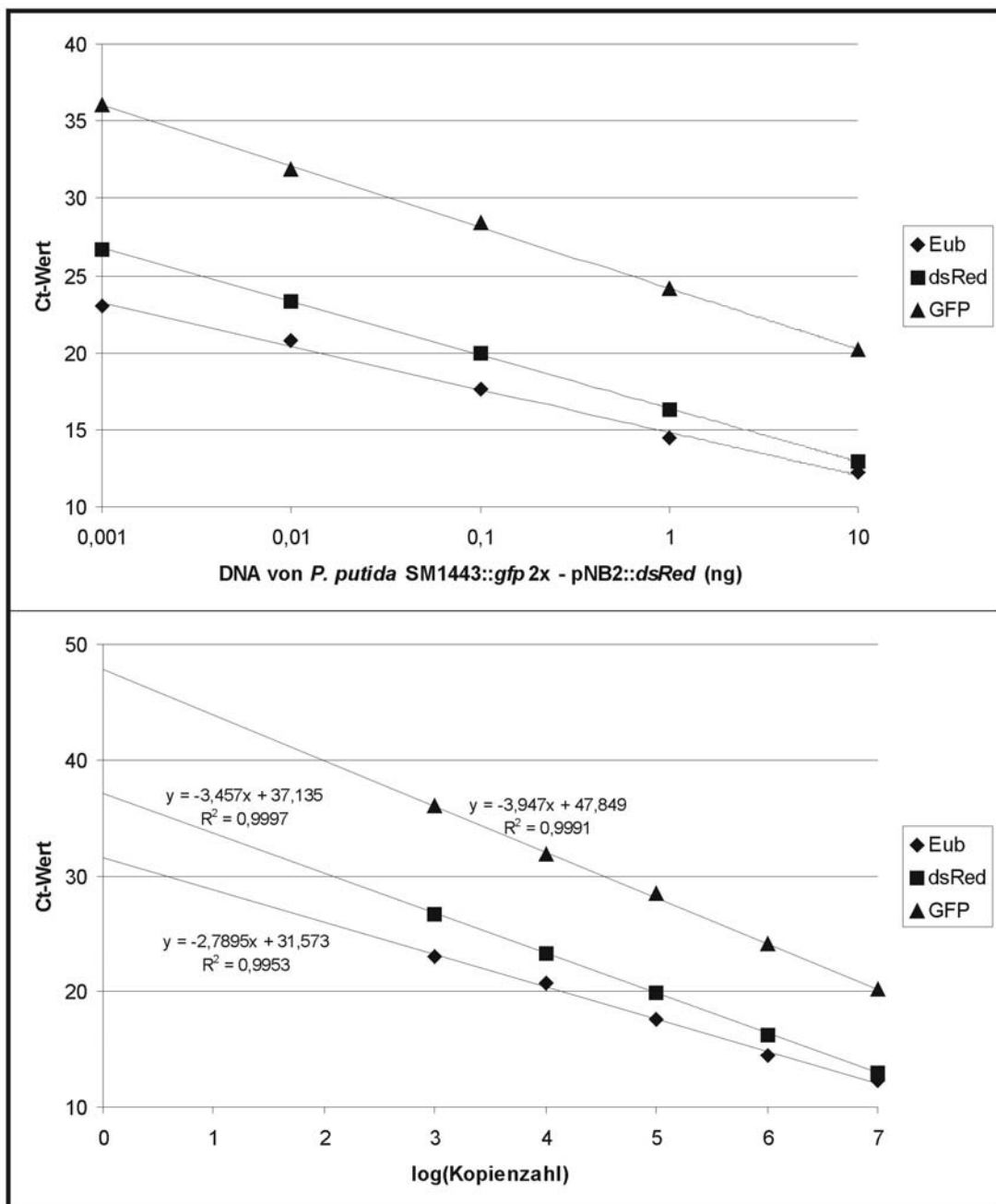
#### Sequenz der aus dem bioaugmentierten Reaktor isolierten pJP4-Transkonjugante:

1 TGGGGGCAAC CCTGATCCAG CAATGCCGCG TGTGTGAAGA AGGCCTTCGG GTTGTAAGAC  
 61 ACTTTTGTCC GGAAAGAAAT CGCTTCGGTT AATACCTGGG GTGGATGACG GTACCGGAAG  
 121 AATAAGCACC GGCTAACTAC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACGTAGGGTG CGAGCGTTAA  
 181 TCGGAATTAC TGGGCGTAAA GCGTGCAGCAG GCGGTTTTGT AAGACAGGCG TGAATCCCC  
 241 GAGCTCAACT TGGGAATTGC GCTTGTGACT GCAAGGCTAG AGTATGTCAG AGGGGGGTAG  
 301 AATTCCACGT GTAGCAGTGA AATGCGTAGA GATGTGGAGG AATACCGATG GCGAAGGCAG  
 361 CCCCTGGGA CGTCACTGAC GCTCATGCAC GAAAGCGTGG GGAGCAAACA GGATTAGATA  
 421 CCCTGGTAGT CCACGCCCTA AACGATGTCA ACTAGTTGTT GGGGATTCAT TTCTTCAGTA  
 481 ACGTAGCTAA CGCGTGAAGT TGACCGCCTG GGGAGTACGG TCGCAAGATT AAAACTCAAA  
 541 GGAATTGACG GGGACCCGCA CAAGCGGTGG ATGATGTGGA TTAATTTCGAT GCAACGCGAA  
 601 AAACCTTACC TACCCTTGAC ATGCCACTAA CGAAGCAGAG ATGCATCAGG TGCCCGAAAG  
 661 GGAAAGTGGA CACAGGTGCT GCATGGCTGT CGTCAGCTCG TGTCGTGAGA TGTGGGTTA  
 721 AGTCCCACAA CGAGCGCAAC CCTTATCTTT AGTTGCTACG CAAGGGCACT CTAGAGAGAC  
 781 TG

## 9.2. Standardkurven für die real-time PCR

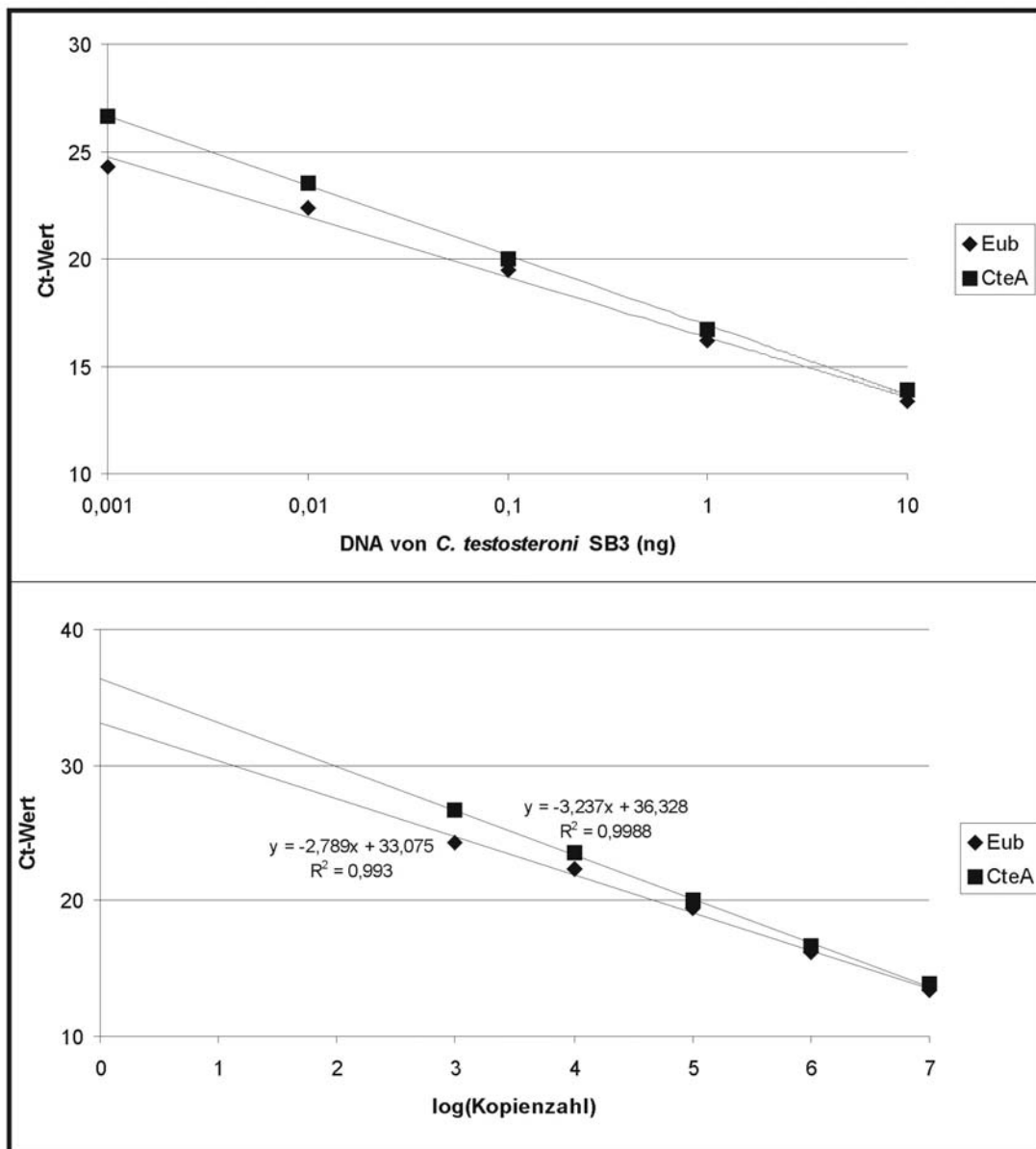
Es sind jeweils auf DNA-Mengen bezogene sowie auf (aus den DNA-Mengen abgeschätzte) Kopiezahl bezogene Standardkurven gezeigt. Die Berechnung von Kopiezahlen und Kopiezahlverhältnissen wurde basierend auf den angegebenen Gleichungen durchgeführt.

### 9.2.1. Gentransfer-Quantifizierung (Kap. 5.1.2. und 5.3.3.)





### 9.2.2. Quantifizierung von *C. testosteroni* (Kap. 5.3.2. und 5.3.3.)



### 9.3. Abkürzungen

(d)dH<sub>2</sub>O deionisiertes (d) bzw. hochreines (dd) Wasser

μ mikro

2,4-D 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure

3CA 3-Chloranilin

AOB Ammonium oxidierende Bakterien

ARDRA amplified ribosomal DNA restriction analysis

---

|       |  |
|-------|--|
| bp    | Basenpaare   |
| c     | centi  |
| C     | Kohlenstoff  |
| CLSM  | konfokales Laser-Scanning Mikroskop                                    |
| CSB   | chemischer Sauerstoff-Bedarf   |
| CTAB  | Cetyltrimethylammoniumbromid   |
| d     | Tag  |
| DGGE  | denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese                            |
| DMSO  | Dimethylsulfoxid   |
| DNA   | Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)                         |
| dNTP  | Deoxynucleosidtriphosphat  |
| DSM   | Deutsche Sammlung für Mikroorganismen                                  |
| DsRed | rot fluoreszierendes Protein   |
| EMBL  | European Molecular Biology Laboratory                                  |
| EPS   | extrazelluläre polymere Substanzen                                     |
| f     | femto  |
| FA    | Formamid   |
| FISH  | Fluoreszenz in situ Hybridisierung                                     |
| g     | Gramm bzw. Erdbeschleunigung (bei Zentrifugationen)                    |
| GFP   | grün fluoreszierendes Protein  |
| h     | Stunde   |
| HGT   | horizontaler Gentransfer   |
| ICE   | integrative and conjugative element                                    |
| IPTG  | Isopropyl-Thiogalactosid   |
| IS    | insertion sequence   |
| ITS   | internal transcribed spacer  |
| k     | kilo   |
| l     | Liter  |
| LMG   | Stammsammlung des Labors für Mikrobiologie, Universität Ghent, Belgien |
| M     | Mega   |
| m     | milli bzw. Meter   |
| M     | Mol pro Liter  |
| MAR   | Mikroautoradiographie  |
| MGE   | mobiles genetisches Element  |

---

|        |   |
|--------|---|
| min.   | Minute  |
| mRNA   | Boten-RNA (messenger RNA)   |
| n      | nano  |
| N      | Stickstoff  |
| NOB    | Nitrit oxidierende Bakterien  |
| OD     | optische Dichte   |
| P      | Phosphor  |
| PBS    | phosphate buffered saline   |
| PCR    | Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)                     |
| PFA    | Paraformaldehyd   |
| rDNA   | ribosomales RNA-Gen   |
| RDP    | ribosomal database project  |
| RFLP   | Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus                                 |
| RISA   | ribosomal intergenic spacer analysis                                      |
| RNA    | Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)                                       |
| rRNA   | ribosomale RNA  |
| RT-PCR | reverse transcription PCR   |
| SBBR   | schubweise beschickter Biofilm-Reaktor (sequencing batch biofilm reactor) |
| SBR    | schubweise beschickter Reaktor (sequencing batch reactor)                 |
| SCAR   | semicontinuous activated sludge reactor                                   |
| SIP    | stable isotope probing  |
| T-RFLP | terminaler RFLP   |
| Upm    | Umdrehungen pro Minute  |
| UV     | ultraviolett  |
| Vol.   | Volumen   |
| WGA    | Lehrstuhl für Wassergüte- und Abfallwirtschaft, TU München                |

## **10. PUBLIKATIONEN**

### **Publikationen im Zusammenhang mit dieser Arbeit:**

**Bathe S, Lebuhn M, Ellwart JW, Wuertz S, Hausner M.** 2004. High phylogenetic diversity of transconjugants carrying plasmid pJP4 in an activated sludge-derived microbial community. *FEMS Microbiol Lett* 235: 215-9.

**Bathe S, Lebuhn M, Wuertz S, Hausner M.** 2004. Diversity of pJP4-transconjugants from activated sludge. In *Proceedings of the European Symposium on Environmental Biotechnology 2004*, ed. W Verstraete, pp. 87-90, Oostende, Belgium April 25-28, 2004. (ISBN 90-5809-653-X).

**Bathe S, Mohan TVK, Wuertz S, Hausner M.** 2004. Bioaugmentation of a sequencing batch biofilm reactor by horizontal gene transfer. *Water Sci Technol.* 49(11-12): 337-44.

**Bathe S.** 2004. Conjugal transfer of plasmid pNB2 to activated sludge bacteria leads to 3-chloroaniline degradation in enrichment cultures. *Lett Appl Microbiol* 38: 527-31.

### **Weitere Publikationen:**

**Stach JE, Bathe S, Clapp JP, Burns RG.** 2001. PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. *FEMS Microbiol Ecol* 36: 139-51.

**Griesbeck C, Schütz M, Schödl T, Bathe S, Nausch L, Mederer N, Vielreicher M, Hauska G.** 2002. Mechanism of sulfide-quinone reductase investigated using site-directed mutagenesis and sulfur analysis. *Biochemistry* 41: 11552-65.

**Nancharaiah YV, Wattiau P, Wuertz S, Bathe S, Wilderer PA, Hausner M.** 2003. Dual labeling of *Pseudomonas putida* with fluorescent proteins for in situ monitoring of conjugal transfer of the TOL plasmid. *Appl Environ Microbiol* 69: 4846-52.

**Hausner M, Bathe S, Lebuhn M, Müller E, Raizada N, Wilderer PA.** 2003. How can engineers profit from the application of modern microscopic and molecular biology techniques to wastewater and waste treatment? In *Conference Proceedings, Wastewater 2003, 5th International Biennial Conference and Exhibition of the Association of Wastewater Treatment Experts of the Czech Republic*, eds. J Wanner, V Sykora, pp. 123-30. Olomouc, Czech Republic, May 13-15, 2003. (ISBN 80-239-0573-2).

---

**Danke ...**

... an Herrn Prof. Wilderer für seine Betreuung und sein Interesse an meiner Arbeit. Die für Deutschland seltene Kombination von Wissenschaftlern unterschiedlicher Fachrichtungen am Lehrstuhl, die große Freiheit in der Durchführung ihrer Arbeit haben, macht das Arbeiten zwar nicht immer einfach, aber auf jeden Fall abwechslungsreich und hat sicherlich stark zur Erweiterung meines Horizonts beigetragen.

... an Martina Hausner für ihre stete Unterstützung, Toleranz, Freundschaft und Bereitschaft zum Zuhören und zur Diskussion während meiner gesamten Zeit hier am Lehrstuhl, die ich in Zukunft sehr vermissen werde.

... an Michael Lebuhn, der immer bereit war, sein Wissen über bakterielle Taxonomie und PCR weiterzugeben und auch sonst ein netter Gesprächs- und Heimfahrpartner war.

... an Stefan Wuertz für anregende Diskussionen und die unvergesslichen Wochen in seiner Gruppe in Davis.

... an Norbert Schwarzenbeck, ohne den meine Zeit hier am Lehrstuhl viel langweiliger gewesen wäre. Unsere Versuche, die biologische Abwasserreinigung neu zu erfinden, waren zwar nicht immer erfolgreich, haben aber den Spass an der Arbeit deutlich erhöht und meine Ausflüge in die Ingenieurwissenschaften sehr erleichtert.

... an Rita Hilliges, Ioanna Letsiou, Konstantinos Athanasiadis, Belinda McSwain, Elisabeth Müller, Thilo Kötzle, Stefania Paris und alle anderen Kollegen und Mitarbeiter des Lehrstuhls für viele schöne Momente und die Schaffung eines Arbeitsumfeldes, an das ich mich gern erinnern werde.

... an meine Familie für ihre Begleitung und Unterstützung in allen Lebenslagen, die es mir erst ermöglicht hat, bis hierhin zu kommen.

... an meine Frau Friederike für die Bereicherung aller Teile meines Lebens.