

Anreicherung, Isolierung und taxonomische Zuordnung ungewöhnlicher Chloraromaten-Verwerter und ihre Nutzung zum Test von PCR-Primern für den Nachweis von Genen des Chlorbrenzcatechin-Weges

Von der Fakultät für Chemie und Physik der TU Bergakademie Freiberg genehmigte

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von Dipl. Natw. ETH Felipe Wettstein
geboren am 9.9.1969 in Barcelona

Gutachter

Prof. Dr. Michael Schlömann, Freiberg
Prof. Dr. Hauke Harms, Leipzig
PD Dr. Dietmar Pieper, Braunschweig

Tag der Verleihung

10.12.2004

trotz allem

für Jeannine

**Regrets, I've had a few
but then again, too few to mention.**

Frank Sinatra, My way

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden über 100 *Pseudomonas*-ähnliche Bakterienstämme, einige *Bradyrhizobium*-ähnliche und ein *Ralstonia*-ähnlicher Bakterienstamm mit der Fähigkeit zum aeroben Abbau chlorierter Aromaten isoliert. Die *Bradyrhizobium*-ähnlichen Isolate können vermutlich einer neuen Art zugeordnet werden. Die *Pseudomonas*- und *Ralstonia*-ähnlichen Isolate stammen aus einer Umweltprobe und zeigen die sehr geringe Diversität an Schadstoff-Verwertern in einem stark belasteten Standort. Spezifische PCR-Primer für die Gensequenzen der Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenase und Chlormuconat-Cycloisomerasen wurden anhand dieser Isolate überprüft. Diese Ergebnisse bestätigten die Aussagekraft der Primer in Bezug auf die Abbaugene des modifizierten *ortho*-Brenzcatechin-Weges für diesen Taxa. Diese kultivierungsunabhängige Methode ermöglicht die Überwachung des mikrobiellen Schadstoffabbaus in der Umwelt.

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Bioremediation	2
1.1.1	Methoden der Bioremediation	2
1.1.2	Voruntersuchungen zur Mikrobiologie belasteter Standorte	3
1.1.3	Mikrobieller Abbau von Chloraromaten	4
	Frühe Dechlorierung	5
	Späte Dechlorierung	5
	Enzyme des modifizierten <i>ortho</i> -Abbauweges	7
1.2	Ziel dieser Arbeit	10
2	Material und Methoden	13
2.1	Bakterienstämme und Plasmide	13
2.1.1	Bakterienstämme	13
2.1.2	Plasmide	14
2.2	Anreicherung, Isolierung und Kultivierung	14
2.2.1	Anreicherung aus Umweltproben	14
2.2.2	Medien zur Anreicherung von Bakterien	14
	Mineralmedium nach Dorn et al. (1974)	16
	Modifiziertes <i>Azotobacter</i> -Medium nach Holt et al. (1994)	16
	Modifiziertes Malat-Medium (Nfb) nach Holt et al. (1994)	17
	Modifiziertes AGS-Medium nach El-Nakeeb et al. (1963)	18
2.2.3	Methoden zur Anreicherung von Bakterien	19
	Anreicherung und direkte Isolierung auf Mineralmedium nach Dorn et al.	19
	Anreicherung mit modifiziertem <i>Azotobacter</i> -Medium	22
	Anreicherung mit modifiziertem halbfestem Malat-Medium (Nfb)	23
	Anreicherung mit modifiziertem AGS-Medium	24
2.2.4	Medien zur Kultivierung von Bakterien	25
	Mineralmedium nach Dorn et al.	25
	Modifiziertes <i>Rhizobium</i> X-Medium	25
	'Nutrient Broth'-Medium (NB-Medium)	26
	10% 'Tryptic Soy Agar' (TSA-Medium)	26
	Luria-Bertani-Medium (LB- und LB Amp50-Medium)	27
2.2.5	Stammlösungen und Medienzusätze	27
	Chloraromaten	27
	Wachstumsfördernde Zusätze	28
2.2.6	Lagerung der Bakterienstämme	29
	Herstellung von Reinkulturen / Überprüfung der Reinheit	29
	Lagerung von Bakterienisolaten	29
2.3	Charakterisierung der Bakterien	29
2.3.1	Methoden zur Charakterisierung des Wachstums	30
	Lebendzellzahl-Bestimmung	30
	Trübungsmessung	30
	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeits-Chromatografie (RP-HPLC)	30

	Nachweis der Substratverwertung mit Replikaplaten	30
	Nachweis der Substratverwertung in Flüssigkultur	31
	Wachstumskurve	31
2.3.2	Methoden zur taxonomischen Einteilung von Bakterien	32
	Schnellverfahren zur Gram-Bestimmung (KOH-Test)	32
	Charakterisierung der Stämme aufgrund der 16S rDNA	33
2.4	Molekularbiologische Methoden	33
2.4.1	Allgemeine Stammlösungen	33
2.4.2	DNA-Extraktion und Reinigung	34
	'Kochpreparation'	34
	DNA-Extraktion mittels CTAB/Chloroform/Isoamylalkohol	35
	DNA-Extraktion aus Boden	36
	DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen	37
	Plasmidprep zur Extraktion von Plasmiden aus Zellkultur	37
	Ethanol-Fällung	37
	Microcon-PCR zur Reinigung von PCR-Produkten	37
2.4.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
	PCR von Fragmenten der 16S rDNA	38
	PCR von Genen des Chloraromaten-Abbauweges	39
	Nachweis von DNA-Fragmenten mit Agarose-Gelelektrophorese	40
	Restriktionsanalyse der PCR-Produkte	41
	Nachweis der DNA mit Silberfärbung	41
2.4.4	Sequenzierung	42
	Reagenzien und Geräte	42
	Sequenzier-Primer	42
	Sequenzierung	43
2.4.5	'Southern-Blot'	44
	Vorbereitungen zum 'Southern Blot'	44
	DNA-DNA-Hybridisierung	45
	Nachweis der DIG-markierten Sonde	47
	Abschätzung der Fragmentgrösse	48
	Isolierung von Restriktionsfragmenten aus Agarosegelen	48
2.4.6	Klonierungen	49
	Transformationskompetente Zellen	49
	Klonierungsvektor	50
	Ligation und Transformation	50
	Bezeichnung der Klone	51
2.5	Computerprogramme	52
2.5.1	Staden Package	52
2.5.2	ARB	52
	Dendrogramm mit Sequenzen der 16S rDNA	52
	Dendrogramm mit Aminosäuresequenzen	53
	Tabellen und Berechnungen in Excel	54
2.5.3	Restrifind9.pl	54
3	Resultate	55
3.1	Anreicherung mit 2,4-D-Azotobacter-Medium	55
3.1.1	Isolierung	56
3.1.2	Charakterisierung der Isolate	57
	Übersicht	57
	Kultivierung	57
	Dendrogramm	58
	Wachstumskurve	59

3.2	Anreicherung in Arginin-Glycerin-Salz-Medium	62
3.2.1	Isolierung	62
3.2.2	Flüssigkultur in Zellkulturfläschchen	63
3.2.3	Charakterisierung der Isolate	63
3.2.4	Weiterführende Anreicherung	64
3.3	Direkte Isolierung von Chlorbenzol-Verwertern	64
3.3.1	Direkte Isolierung	64
3.3.2	Charakterisierung der Isolate	66
	Diversität	68
	Dendrogramme	69
3.4	Gene des Chloraromaten-Abbauweges	74
3.4.1	Chlormuconat-Cycloisomerase	75
	Stämme der direkten Isolierung in Chlorbenzol-Atmosphäre	75
	Isolate der Anreicherung in <i>Azotobacter</i> -Medium	77
	Dendrogramm	77
	'Southern Blot'	79
3.4.2	Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenase	81
	Stämme der direkten Isolierung in Chloraromaten-Atmosphäre	82
	Isolate der Anreicherung in <i>Azotobacter</i> -Medium	84
	Dendrogramm	84
	Restriktionsanalyse einiger γ -Proteobakterien-ähnlichen Isolate	86
3.4.3	Perl-Programm zur Simulation einer Restriktionsanalyse	88
	Erklärungen zum Protokoll (Ausdruck 1 und 2)	88
	Simulation mit den Enzymen der Restriktionsanalyse	92
	Funktionen des Programms restrifind9.pl	93
4	Diskussion	95
4.1	Nachweis von Abbauprozessen	95
4.1.1	Kultivierungsabhängige Methoden	95
4.1.2	Kultivierungsunabhängige Methoden	97
4.2	Neue Chloraromaten verwertende Isolate aus Anreicherungen	98
4.2.1	Beurteilung der verwendeten Anreicherungsstrategien	98
	Anreicherung in AGS-Medium mit 3-Chloranilin	99
	Anreicherung in <i>Azotobacter</i> -Medium mit 2,4-D	102
	Beurteilung der erfolglosen Anreicherungen	103
4.2.2	<i>Bradyrhizobium</i>-Verwandschaft der 2,4-D Verwerter	104
	Interpretation des Dendrogrammes	104
	Die Familie der 'Bradyrhizobiaceae'	109
	Vergleich der Anreicherungsstrategien, die zu nah verwandten Stämmen führten	113
	Vergleich der nah verwandten 2,4-D-Abbauer	113
	2,4-D-Verwertung als ursprüngliches Merkmal	114
	Physiologie, Kultivierung, 'Quorum sensing'	116
	Bedeutung der Isolate	118
4.2.3	Gene des Chloraromaten-Abbauweges	119
	Dendrogramme zweier Enzyme des <i>ortho</i> -Abbauweges	119
	Vergleich der Gene von α -, β - und γ -Proteobakterien	123
	Rolle des horizontalen Gentransfers	126
4.2.4	Nachweis der katabolen Gene in Umweltproben	127
	Bekannte Strategien	127
	Vorteile des Nachweises der Abbaugene durch PCR	129
	Nachweis von Arten bei Chloraromatenabbau als ursprünglichem Merkmal	130
4.3	Chlorbenzol-Verwerter aus direkter Isolierung	130
4.3.1	Taxonomische Diversität der Isolate	131

Verluste von Stämmen	131
Mögliche Ursachen für den Verlust der Abbau-Fähigkeit	132
Bedeutung der Isolate die nicht mehr Chlorbenzol verwerten	135
Der <i>Ralstonia</i> -ähnliche Stamm M013 wächst mit Chlorbenzol	136
Alle <i>Pseudomonas</i> -ähnlichen Isolate verwerten Chlorbenzol	137
Verwandtschaft der <i>Pseudomonas</i> -ähnlichen Isolate	139
Geringe Diversität unter den Isolaten	140
Bedeutung der <i>Pseudomonas</i> -ähnlichen Isolate	141
4.3.2 Gene des Chlorbrenzcatechin-Weges der direkt isolierten Stämme	142
Geringe Diversität der Enzymsequenzen	142
Erfassung der Gene in der Umwelt	143
5 Thesen	145
6 Literatur	149
7 Anhang	165
7.1 Protein-Sequenzen	165
7.1.1 PCR-Produkte der Chlormuconat-Cycloisomerasen	165
7.1.2 PCR-Produkte der Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen	167
7.2 PCR-Produkte der 16S rDNA	168
7.3 Distanzmatrices	176
8 Abkürzungen	186
Lebenslauf	189
Dank	191

1 Einleitung

Ein grosser Verlierer des Wirtschaftswachstums nach dem zweiten Weltkrieg war die Natur. Von 1950 bis 1970 stieg der Energieverbrauch auf mehr als das Doppelte an. 1969 wurde von Innenminister Hans-Dietrich Genscher der Begriff Umweltpolitik als freie Übersetzung aus dem US-Amerikanischen 'environmental policy' geprägt (Hünemörder 2004). Es trat eine Wende im persönlichen Umgang mit der Natur ein. Ab 1980 regelte schliesslich in Deutschland das Chemikaliengesetz das 'Inverkehrbringen' von neuen Stoffen in Bezug auf Gesundheits-, Arbeits- und Umweltschutz (Waskow und Goel 2000).

Viele giftige und persistente Stoffe wie chlorierte organische Substanzen bleiben für die Industrie allerdings unverzichtbar (Malle 1991). Die Einführung eines Chloratoms in das Kohlenstoffgerüst hat oft eine Verringerung der Brennbarkeit zur Folge. Chlororganika werden deshalb häufig als nicht brennbare organische Lösungsmittel, Hydrauliköle und Kühlmittel, aber auch als Synthesestufen oder Pflanzenschutzmittel eingesetzt (Lyons et al. 1985; Malle 1991). Durch Unfälle und lecke Leitungen wird es deshalb auch in Zukunft zu ungewollten Freisetzungen kommen. Zu den vorhandenen, mit schwer oder nicht abbaubaren Schadstoffen verunreinigten Grundstücken werden neue Standorte dazukommen. Die Sanierung von belasteten Standorten wird daher nicht nur bei Altlasten eine wichtige Aufgabe bleiben (Ghisalba 1983).

Lange Zeit wurde vermutet, es gäbe kaum natürliche Quellen für chlorierte organische Verbindungen. Durch leistungsfähige Analytik gelang allerdings in den letzten Jahren immer öfter der Nachweis von natürlichen Organohalogenen (Hoekstra et al. 1999). Eine wichtige Quelle von natürlich gebildeten, chlorierten aromatischen Verbindungen sind holzabbauende Pilze (de Jong et al. 1994). Inzwischen sind über 3800 Organohalogene natürlichen Ursprungs bekannt (Gribble 2003). Die grosse Diversität der natürlich vorkommenden halogenierten organischen Verbindungen und ihre weite Verbrei-

tung sind sicher ein Grund für die verbreitete Abbaubarkeit der anthropogenen Schadstoffe (Hägglom et al. 2000).

1.1 Bioremediation

Schwer abbaubare Substanzen sind also abbaubar. Chlorierte aromatische Verbindungen gehören ebenfalls zu den schwer abbaubaren, persistenten Substanzen können aber durch Bakterien vollständig mineralisiert werden (Schlömann 1994). Bioremediation, die Sanierung eines mit Schadstoffen belasteten Standortes, mit Unterstützung der belebten Natur ist deshalb ein grosses Forschungsfeld (Pieper und Reineke 2000).

1.1.1 Methoden der Bioremediation

Die einfachste Methode zur Bioremediation basiert auf der Annahme einer 'black box'. Als einziger Parameter wird das Verschwinden der Verunreinigung gemessen. Im Erfolgsfall ist die Methode günstig. Wenn kein Abbau des Schadstoffes messbar ist, kann es hingegen schwer werden, Ursachen für das Ausbleiben einer Veränderung zu finden. Mögliche Ursachen für nicht gemessenen Abbau können unpassende Parameter wie pH, Temperatur, die lokale Bakterienflora oder fehlende Nährstoffe sein. Es ist aber auch möglich, dass kein Abbau gemessen wird, weil der Schadstoff ständig aus einem Reservoir nachgelöst wird, wie dies in Bitterfeld mit dem an Kohlepartikeln adsorbierten Chlorbenzol geschah (Vogt et al. 2004a).

Die mikrobielle Aktivität und damit auch der Schadstoffumsatz am Standort kann durch Zugabe des oft limitierten Stickstoffes erhöht werden. Belüftung kann Sauerstofflimitierung bei aerob abgebauten Schadstoffen verhindern (Hess et al. 1997). Durch Zugabe von spezifischen Elektronenakzeptoren (NO_3^- , Mn^{4+} , Fe^{3+} , SO_4^{2-} , ...) oder Elektronendonatoren (Wasserstoff, Milchsäure, Methanol, Ethanol, Propionsäure, Essigsäure, Fumarat, ...) kann unter anaeroben Bedingungen versucht werden, möglichst nur die am Abbau beteiligte Bakteriengruppe davon profitieren zu lassen (Reineke 2001; El Mamouni et al. 2002).

Bei der *in situ* Bioremediation wird durch Belüftung oder Injektion von Dünger die mit Schadstoffen kontaminierte Umwelt am Ort saniert (Romantschuk et al. 2000). Bei der

ex situ Sanierung wird das verschmutzte Substrat in einen abgeschlossenen Bereich gegeben, um eine weitere Verschleppung der Schadstoffe zu verhindern (Wilson und Jones 1993).

Manchmal wird versucht, Bioremediation mit im Labor kultivierten Organismen zu beschleunigen. Mit der fortschreitenden Erforschung des Abbaupotentials von Mikroorganismen reifte auch der Wunsch auf Konstruktion oder Isolierung eines omnipotenten Bakteriums, das mehrere Schadstoffe abbauen kann (Kröckel und Focht 1987; Ramos et al. 1994; Brazil et al. 1995; Top et al. 1998; Lovley 2003). Aus prinzipiellen Bedenken gegenüber der Freisetzung von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) oder um den rechtlichen Hürden einer entsprechenden Bewilligung aus dem Weg zu gehen, wird diese Methode selten in Betracht gezogen (Molina et al. 1998; Romantschuk et al. 2000). Zur Anreicherung von Abbaugen in einem Bakterienstamm können auch Kreuzungsversuche mit zwei sich ergänzenden Stämmen gemacht werden (Reineke und Knackmuss 1979; Potrawfke et al. 1998a).

Die Beständigkeit von Bakterienkulturen aus dem Labor ist in der Natur allerdings ungewiss. Sowohl GVO-Kulturen, wie auch Kulturen aus Stämmen, die aus dem belasteten Standort selber isoliert wurden, müssen mit der lokalen Bakterienflora konkurrieren können oder ziehen in natürlicher Umgebung andere Substrate vor als im Labor (Goldstein et al. 1985). Für eine effiziente Elimination der Schadstoffe kann es deshalb erforderlich sein, die abbauenden Bakterien mehrmals zu applizieren, was die Kosten der Renaturierung erhöht (Lajoie et al. 1993; Daubaras et al. 1996).

Aus diesen Gründen ist wünschenswert, nicht Laborstämme aussetzen zu müssen, sondern die lokalen Bakterien des belasteten Standortes im Abbau zu überwachen oder gegebenenfalls zu unterstützen.

1.1.2 Voruntersuchungen zur Mikrobiologie belasteter Standorte

Zur Steuerung oder Überwachung des Abbau-Prozesses ist es unerlässlich zu wissen, ob sich überhaupt Bakterienstämme mit den richtigen katabolen Genen in der Umweltprobe befinden, ob die Abbauwege induziert werden, und ob gegebenenfalls die physiologischen Bedingungen so angepasst werden können, dass der Schadstoff effizient mineralisiert wird (Lovley 2003). Erscheint ein Eingriff von aussen notwendig, um eine

weitere Gefährdung der Umwelt zu verhindern, sollte versucht werden, das Gleichgewicht der lokalen Bakterienflora zu Gunsten der Bakterien mit Abbaupotential zu verschieben (Romantschuk et al. 2000).

Um das Abbaupotential eines Standortes bestimmen zu können, sind klassische Kultivierungsmethoden unbefriedigend. Nur ein Bruchteil der in der Natur vorhandenen Mikroorganismen ist unter Laborbedingungen kultivierbar (Amann et al. 1995; Dykhuizen 1998; Bartscht et al. 1999; Lynch 2002). Durch ungünstige Umweltbedingungen kann es vorkommen, dass potente Bakterien am untersuchten Standort nur in geringer Zahl vorhanden sind, was deren Nachweis mit klassischen Kultivierungsmethoden erschwert.

Molekularbiologische Techniken wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder die Hybridisierung von ganzen Zellen ermöglichen einen empfindlichen und kultivierungsunabhängigen Nachweis von DNA in den Umweltproben (Amann et al. 1995). Durch gezielte Suche nach den katabolen 'broad-host-range'-Plasmiden oder -Genen, kann herausgefunden werden, welche Bakterientaxa am Abbau der toxischen Substanzen beteiligt sind (Lovley 2003) oder welches Substratspektrum durch die nachgewiesenen Enzyme abgedeckt wird. Durch Nachweis der entsprechenden mRNA können Aussagen über die Abbauaktivität in der Umweltprobe gemacht werden (Wilson et al. 1999).

1.1.3 Mikrobieller Abbau von Chloraromaten

Seit über 35 Jahren wird der mikrobielle Abbau von Chloraromaten erforscht (Schlömman 2002). Der Abbau von Chlorphenoxyessigsäuren über Chlorbrenzcatechin, wurde erstmals in den späten 1960er Jahren beschrieben (Bollag et al. 1968). Ausser bei cometabolischen Umsätzen wird der bakterielle Chloraromatenabbau als Energie- und Kohlenstoff-Quelle verwendet (Janke und Ihn 1989).

Es sind verschiedene bakterielle Abbaustrategien bekannt geworden. Abhängig vom Zeitpunkt der Elimination des Halogenides werden sie in frühe oder späte Dechlorierung eingeteilt. Bei den Abbauwegen mit frühen Dechlorierungen wird das Chlorid vor der aromatischen Ringöffnung eliminiert. Der Abbauweg über die späte Dechlorierung führt über Chlorbrenzcatechine in den Citronensäurezyklus (Schlömman et al. 1999).

Frühe Dechlorierung

Bei der frühen Dechlorierung eines einfach chlorierten aromatischen Ringes wird der resultierende Aromat über den üblichen Aromatenstoffwechsel abgebaut. Aus mehrfach chlorierten Aromaten entstehen nach der frühen Dechlorierung Chlorhydroxyhydrochinone oder Chlorbrenzcatechine oder Chloroprotocatechuate. Chlorhydroxyhydrochinone werden über den Chlorhydroxyhydrochinon-Abbauweg zerlegt, in dem das Chlorid am Aromaten eliminiert wird (Reineke 2001).

Die **hydrolytische Dechlorierung** wurde an 4-Chlorbenzoesäure aufgedeckt. Sie ist ausschliesslich für *para*-ständig halogenierte Benzoesäuren spezifisch (Marks et al. 1984b). Der Chlorsubstituent wird durch ein Hydroxyl-Anion des Wassers ersetzt (Müller et al. 1984).

Bei der **oxygenolytischen Dechlorierung** wird das aromatische Chlorid durch ein Hydroxyl aus molekularem Sauerstoff ersetzt. Eine Dioxygenase aktiviert den aromatischen Ring zu einem *cis*-Dihydrodiol, so dass zwischenzeitlich eine der beiden Hydroxyl-Gruppen an denselben Kohlenstoff wie das Chlorid gebunden werden. Durch spontane Dehydrohalogenierung wird schliesslich aus diesem instabilen Dihydrodiol ein *ortho*-Diphenol.

Die **reduktive Dechlorierung** ist der erste Schritt beim anaeroben Abbau der chlorierten Aromaten (Sufliata et al. 1982; Boyd et al. 1983; Boyd und Shelton 1984; Gibson und Sufliata 1986). Mit der so genannten 'Halorespiration' können die Bakterien aus der reduktiven Dechlorierung Energie gewinnen, allerdings ist dieser Prozess oft durch andere Elektronenakzeptoren wie SO_4^{2-} oder NO_3^- inhibiert (Hägglom et al. 2000). Mehrfach chlorierte Aromaten werden erst vollständig reduktiv dehalogeniert, bevor sie anschliessend zu CH_4 und CO_2 mineralisiert werden. Der Chloraromat fungiert bei der reduktiven Dechlorierung als Elektronenakzeptor (Sufliata et al. 1982).

Späte Dechlorierung

Bei der späten Dechlorierung von Chloraromaten wird das Chloridion erst nach Auflösung der aromatischen Ringstruktur vom Kohlenstoffgerüst getrennt. Der chlorierte aromatische Ring wird anfangs mit einer sauerstoffabhängigen Dioxygenase oder Monooxygenase zu einem *cis*-Dihydrodiol aktiviert, welches anschliessend durch eine

Dehydrogenase zu entsprechenden Chlorbrenzcatechinen umgesetzt wird. Die Einführung elektronenschiebender Hydroxysubstituenten erhöht die Elektronendichte am Aromaten und aktiviert diesen somit für weitere elektrophile Umsetzungen.

Chlorbrenzcatechine werden entweder zwischen den Kohlenstoffatomen der beiden Hydroxylgruppen gespalten (intradiol) oder unmittelbar daneben (extradiol). Der Abbauweg mit intradioler Ringspaltung wird auch modifizierter *ortho*-Spaltungsweg genannt, in Anlehnung an den *ortho*-Abbauweg von nicht halogenierten Brenzcatechinen. Dies ist der mit Abstand wichtigste Abbauweg für Chloraromaten. Der Abbauweg über die extradiole Ringspaltung ist seltener und wird *meta*-Spaltungsweg genannt (Schlömman 1994; Reineke 2001). Üblicherweise werden Chlorbrenzcatechine in *ortho*-Position geschnitten, während für Methylbrenzcatechine eher die *meta*-Position bevorzugt wird (Rojo et al. 1987; Reineke und Knackmuss 1988; Kaschabek et al. 1998).

Bei der ***meta*-Ringspaltung** wird Brenzcatechin zwischen dem Kohlenstoffatom mit einer Hydroxylgruppe und einem mit Wasserstoff oder anders substituierten Kohlenstoffatom gespalten. Extradiol-Dioxygenasen sind die Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase oder die Protocatechuat-4,5-Dioxygenase (Kaschabek et al. 1998; Mars et al. 1999). In vielen Fällen führt die *meta*-Spaltung von 3-Chlorcatechol zur Suizid-Inaktivierung des Enzymes (Bartels et al. 1984). Die *meta*-Ringspaltung ist aber ein möglicher Weg um Chlorbenzol über 3-Chlorbrenzcatechin zu 2-Hydroxy-*cis,cis*-muconat zu oxidieren und dechlorieren (Mars et al. 1997).

Im **modifizierten *ortho*-Weg** über Brenzcatechine wird der aromatische Ring zwischen den beiden Hydroxylgruppen des Chlorbrenzcatechines geöffnet (**Abbildung 1**). Die Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenase entlässt aus diesem Schritt ein Chlormuconat. Üblicherweise wird dieses Chlormuconat in einem Schritt durch eine Chlormuconat-Cycloisomerase dehalogeniert und in ein Dienlacton überführt (Schmidt und Knackmuss 1980). In *Rhodococcus opacus* 1CP wurde allerdings eine Chlormuconat-Cycloisomerase beschrieben, die zwar zur Dehalogenierung von 3-Chlor- und 2,4-Dichlor-*cis,cis*-muconat fähig ist, nicht aber zur Dehalogenierung von 2-Chlor-*cis,cis*-muconat (Gorlatov et al. 1989; Solyanikova et al. 1995).

Beide alternativen *ortho*-Abbauwege enden in einem *cis*-Dienlacton, welches durch eine normale Dienlacton-Hydrolase in Maleylacetat überführt wird. Je nach Chlorie-

rungsgrad des Brenzcatechines kann das Maleylacetat in diesem Schritt noch einfach chloriert sein, die Maleylacetat-Reduktase eliminiert dieses potentielle Chlorid und reduziert Maleylacetat zu 3-Oxadipat, welches dann endlich durch Spaltung in Acetyl-CoenzymA und Succinyl-CoenzymA in den Citronensäurezyklus führt (Schmidt und Knackmuss 1980).

Enzyme des modifizierten *ortho*-Abbauweges

Die Enzyme des modifizierten *ortho*-Abbauweges wurden charakterisiert (Schlömman 1994, 2002; Solyanikova und Golovleva 2004). Die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der Enzyme von vielen β - und γ -Proteobakterien (Frantz und Chakrabarty 1987) und von wenigen α -Proteobakterien (Thiel 2004) und Actinomyceten (Eulberg et al. 1998; Moiseeva et al. 2002) sind beschrieben worden.

Die Sequenzen der Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen und Chlormuconat-Cycloisomerasen der β - und γ -Proteobakterien sind ziemlich ähnlich mit den entsprechenden Sequenzen der Enzyme für nicht chlorierte Substrate. Diese Ähnlichkeit deutet darauf hin, dass die Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen aus den Brenzcatechin-1,2-Dioxygenasen und die Chlormuconat-Cycloisomerasen aus den Muconat-Cycloisomerasen hervorgegangen sind (Schlömman 1994). Die Dienlacton-Hydrolasen hingegen sind nur extrem entfernt verwandt mit der 3-Oxadipat-enol-lacton-hydrolase, und stammen vermutlich wie die Maleylacetat-Reduktase von einem anderen Abbauweg ab (Schlömman 1994).

Die Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen-Gene der Proteobakterien liegen praktisch alle in einer Gruppe. Die der α -Proteobakterien bilden allerdings eine von den β - und γ -proteobakteriellen Sequenzen paraphyletische Gruppe (Eulberg et al. 1998; Thiel 2004). Der *Rhodococcus*-Chlorbrenzcatechin-Weg ist zwar auch ein Brenzcatechin-Weg, aber offenbar unabhängig vom Proteobakteriellen entstanden (Eulberg et al. 1997). Bei den Chlormuconat-Cycloisomerasen bilden die α -proteobakteriellen Gene mehrere von den übrigen Proteobakterien noch stärker unabhängige Gruppen. Die Chlormuconat-Cycloisomerase TfdDII von pJP4 (*W. eutropha* JMP134) schert völlig aus (Laemmli et al. 2000): Vom beschränkten Substratspektrum her betrachtet, hat sie mehr Ähnlichkeiten mit der Cycloisomerase (ClcB) aus *Rhodococcus opacus* 1CP (Laemmli et al.

2002; Solyanikova et al. 2003), von der Sequenz her gehört sie schon irgendwie zu den übrigen Muconat-Cycloisomerasen, ist aber weit entfernt davon.

Bis jetzt sind in Bezug auf den modifizierten *ortho* Brenzcatechin-Weg einzig die β - und γ -Proteobakterien befriedigend erforscht. Bei den α -Proteobakterien wurden immerhin schon die entsprechenden Enzyme von Isolaten aus mindestens drei Familien gefunden, Actinobakterien sind bis jetzt vor allem durch *Rhodococcus* vertreten worden, *Bacillus* ist bis jetzt auch nur einer beschrieben worden, und aus dem cfb-Cluster (Cytophaga / Flavobacterium / Bacteroidetes) ist noch kein Stamm bekannt, der reproduzierbar Chloraromaten verwerten kann (**Tabelle 1**). Es ist anzunehmen, dass molekulare Methoden zum Nachweis des Chlorbrenzcatechin-Abbauweges, die aufgrund der jetzigen Datenbasis erstellt wurden, die Diversität in der Natur nicht angemessen berücksichtigen.

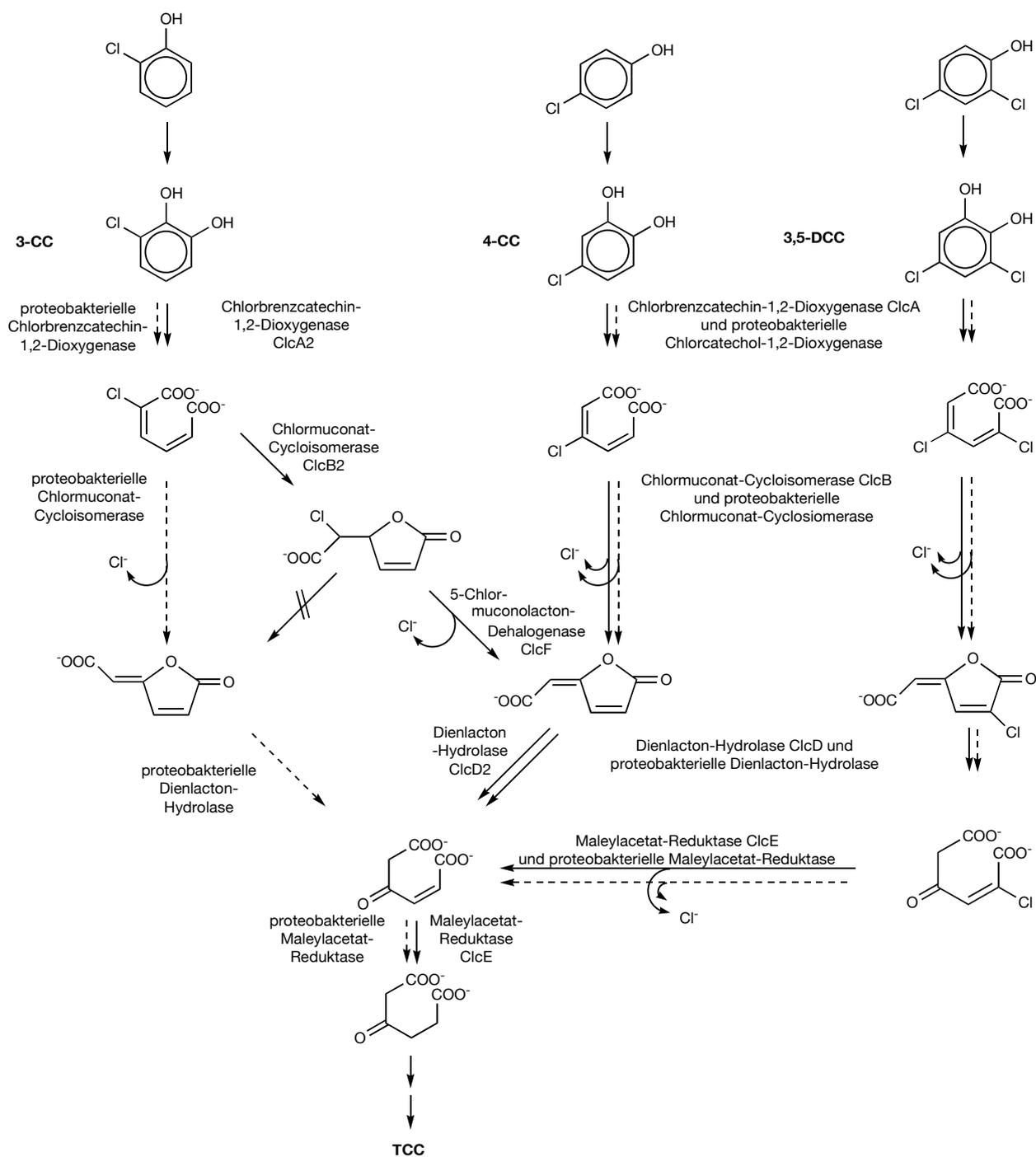


Abbildung 1: Abbauwege für 3-Chlorbrenzcatechin (**3-CC**), 4-Chlorbrenzcatechin (**4-CC**), und 3,5-Dichlorbrenzcatechin (**3,5-DCC**), den zentralen Metaboliten im Chlorphenol-Abbau. Durchgezogene Pfeile entsprechen jüngst identifizierten Enzymschritten in *Rhodococcus opacus* Stamm 1CP, gestrichelte Linien repräsentieren länger bekannte Wege in Proteobakterien. Entnommen aus: (Moiseeva et al. 2002). **TCC:** Zitronensäurezyclus.

1.2 Ziel dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollten neuartige Chloraromaten verwertende Bakterien isoliert werden. Die neuen Isolate sollten Chloraromaten als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle benutzen können und möglichst aus einem in diesem Zusammenhang kaum beschriebenen Phylum stammen (**Tabelle 1**). Die Diversität der bekannten Chloraromaten verwertenden Bakterien sollte mit unüblichen Anreicherungs- und Isolierungsmethoden erweitert werden. Die isolierten Bakterien sollten von kontaminierten und von unberührten Standorten stammen und in Zusammenhang mit Chloraromatenabbau einer möglichst wenig erforschten Gattung oder Klasse angehören. Die am besten untersuchten Bakterien sind die, die sich am einfachsten aus der Umwelt isolieren lassen (Watanabe und Baker 2000).

Klassische Anreicherungsverfahren beinhalten weit verbreitete Medienzusammensetzungen, hohe Substratkonzentrationen und sind auf kurze Generationszeiten ausgelegt. Mit diesen Methoden werden vor allem r-Strategen angereichert (**Tabelle 1**). Dank ihrer kurzen Generationszeiten können r-Strategen sehr schnell ein unbewohntes Biotop besiedeln, wie zum Beispiel ein frisches Kulturmedium. Im Gegensatz dazu sind K-Strategen gut an ihre ökologische Nische angepasst, es sind Spezialisten die sich langsam vermehren und stabile Ökosysteme bewohnen (MacArthur und Wilson 2001).

Anhand der neuen, 'ungewöhnlichen' Isolate sollten kultivierungsunabhängige Methoden zum Nachweis der Gene des modifizierten *ortho*-Abbauweges weiterentwickelt werden, um den Schadstoffabbau effizient in der Umwelt vorhersagen oder überwachen zu können. Diese neuen Informationen sollten dann zur Verfeinerung der molekularbiologischen Methoden zur Bestimmung des Abbaupotentials eines belasteten Standortes genutzt werden.

Die neu isolierten Bakterienstämme sollten charakterisiert werden und die Sequenzen ihrer Chlorbrenzcatechin-katabolen Gene bestimmt werden. Die neuen Daten sollten mit den publizierten Sequenzen verglichen werden, um die Diversität dieser Gene zu bestimmen. Mit den neuen Sequenzdaten sollte die Grundlage dafür geschaffen werden, die Chloraromaten abbauenden Bakterien in einer Umweltprobe umfassender als bisher bestimmen zu können. Die kultivierungsunabhängigen Methoden zum Nachweis

des Chloraromatenabbaus in Umweltproben sollten mit Hilfe dieser Daten verfeinert werden können.

Eine Erweiterung der Datenbank der bekannten Sequenzen würde zum Beispiel die Weiterentwicklung der spezifischen PCR-Primer für die katabolen Gene ermöglichen, womit in der Umweltprobe eine genauere Bestimmung der am Abbau beteiligten katabolen Gene ermöglicht würde (Kleinsteuber et al. 1998; Leander et al. 1998; Cavalca et al. 1999; Thiel 2004). Durch *in situ* Nachweis der mRNA der katabolen Gene könnte eine Aussage über die Abbauaktivität in der Umweltprobe gemacht werden (Madsen 1996; Wilson et al. 1999).

Tabelle 1: Einige bekannte Chloraromaten abbauende Bakterien.

Stamm	Klasse*	Substrat	Literatur
RCO, BTH, HWK 12, HW 13, RD5-C2	α	2,4-D	(Fulthorpe et al. 1996; Kamagata et al. 1997; Itoh et al. 2000)
<i>Sphingomonas</i> sp. TFD43 & -44	α	2,4-D	(Fulthorpe et al. 1995)
<i>Sphingomonas</i> sp. EML146	α	2,4-D	(Amy et al. 1985)
<i>Xanthobacter flavus</i> 14p1	α	1,4-Dichlorobenzol	(Spiess et al. 1995)
<i>Burkholderia</i> sp. LB400	β	3-Chlorbenzoat	(Potrawfke et al. 1998a)
<i>Burkholderia</i> sp. RASC	β	2,4-D	(Suwa et al. 1996)
<i>Burkholderia</i> sp. PS12**	β	1,2,4-Trichlor- und 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol	(Sander et al. 1991)
<i>Delftia acidovorans</i> CA28 **	β	Chloranilin	(Loidl et al. 1990)
<i>Delftia acidovorans</i> MC1	β	2,4-D	(Müller et al. 1999)
<i>Delftia acidovorans</i> BN3.1 **	β	2-Chlor-, 3-Chlor und 4-Chloranilin	(Brunsbach und Reineke 1993)
' <i>Pseudomonas</i> ' sp. P51 ***	β	Chlorbenzol	(van der Meer et al. 1991)
<i>Wautersia eutropha</i> JMP134****	β	2,4-D	(Pemberton et al. 1979)
<i>Wautersia eutropha</i> JMP363-366	β	2,4-D, ausser 363 auch 3-Chlorbenzoat	(Pemberton et al. 1979)
<i>Wautersia eutropha</i> JS705	β	Chlorbenzol	(van der Meer et al. 1998)
<i>Wautersia eutropha</i> NH9*	β	3-Chlorbenzoat	(Ogawa und Miyashita 1995)
<i>Variovorax paradoxus</i> TV1	β	2,4-D	(Vallaey et al. 1998)
<i>Pseudomonas</i> sp. FRB4.5	γ	3-Chlor- und 4-Chloranilin	(Brunsbach und Reineke 1993)
<i>Pseudomonas</i> sp. CBS3	γ	4-Chlorbenzoat	(Klages et al. 1981)
<i>Pseudomonas</i> sp. B13	γ	3-Chlorbenzoat	(Dorn et al. 1974)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> JB2	γ	2-Chlor-, 3-Chlor-, -2,3-Dichlor-, 2,5-Dichlor- und 2,3,5-Trichlorbenzoesäure	(Hickey und Focht 1990)
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> C-0	γ	3-Chlorbenzoat	(Focht und Shelton 1987)
<i>Pseudomonas cepacia</i> CSV90	γ	2,4-D	(Radjendirane et al. 1991)
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> RW71	γ	1,2,3,4-Tetrachlorbenzol	(Potrawfke et al. 1998b)
<i>Pseudomonas putida</i> GJ31	γ	Chlorbenzol	(Mars et al. 1997)
<i>Pseudomonas putida</i> P111	γ	2-Chlor-, 3-Chlor-, 4-Chlor-, -2,3-Dichlor-, 2,4-Dichlor-, 2,5-Dichlor- und 2,3,5-Trichlorbenzoesäure	(Hernandez et al. 1991)
<i>Rhodococcus opacus</i> 1CP	actino	2-Chlor-Phenol, 3-Chlorbenzoat, 4-Chlor- und 2,4-Dichlorphenol	(Gorlatov et al. 1989)
<i>Rhodococcus zopfii</i> sp. nov. T1	actino	Chlorbenzol	(Stoecker et al. 1994)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> CTM	actino	chlorierte Isomere von 2-Methylanilin	(Fuchs et al. 1991)
<i>Cellulomonas turbata</i> B529	actino	Chlorbenzol	(Vogt et al. 2004b)
<i>Paenibacillus polymyxa</i> B550	Bacilli	Chlorbenzol	(Vogt et al. 2004b)

* α , β , γ : α -, β -, γ -Proteobakterien, **actino**: *Actinobacteria*. ** Früher *Pseudomonas*, *** Heute: *Burkholderiales*, *Comamonadaceae* (Acc AF015487), **** Früher *Ralstonia*, noch früher *Alcaligenes eutrophus*.

2 Material und Methoden

2.1	Bakterienstämme und Plasmide	13
2.1.1	Bakterienstämme	13
2.1.2	Plasmide	14
2.2	Anreicherung, Isolierung und Kultivierung	14
2.2.1	Anreicherung aus Umweltproben	14
2.2.2	Medien zur Anreicherung von Bakterien	14
2.2.3	Methoden zur Anreicherung von Bakterien	19
2.2.4	Medien zur Kultivierung von Bakterien	25
2.2.5	Stammlösungen und Medienzusätze	27
2.2.6	Lagerung der Bakterienstämme	29
2.3	Charakterisierung der Bakterien	29
2.3.1	Methoden zur Charakterisierung des Wachstums	30
2.3.2	Methoden zur taxonomischen Einteilung von Bakterien	32
2.4	Molekularbiologische Methoden	33
2.4.1	Allgemeine Stammlösungen	33
2.4.2	DNA-Extraktion und Reinigung	34
2.4.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
2.4.4	Sequenzierung	42
2.4.5	'Southern-Blot'	44
2.4.6	Klonierungen	49
2.5	Computerprogramme	52
2.5.1	Staden Package	52
2.5.2	ARB	52
2.5.3	Restrifind9.pl	54

2.1 Bakterienstämme und Plasmide

2.1.1 Bakterienstämme

Die Bakterienstämme *Escherichia coli* DH5 α und *Rhodococcus opacus* 1CP wurden von der laboreigenen Stammsammlung bezogen (**Tabelle 2**). Die übrigen Stämme wurden in dieser Arbeit isoliert (**Tabelle 2**).

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Eigenschaften	Quelle
<i>Escherichia coli</i> DH5 alpha	Klonierungsstamm, unterstützt blau/weiss Selektion durch α -Komplementation der beta-Galaktosidase	Gibco BRL, heute Invitrogen
<i>Rhodococcus opacus</i> 1CP	Abbau von 2- und 4-Chlorphenol, 2,4-Dichlorphenol und 3-Chlorbenzoat	(Gorlatov et al. 1989)
AZDx	Angereichert in 2,4-D-Medium Abbau von 2,4-D nachgewiesen	Diese Arbeit (Seite 56)
M001-M132	Isoliert in Chlorbenzolatmosphäre Abbau von Chlorbenzol teilweise nachgewiesen	Diese Arbeit (Seite 64)

2.1.2 Plasmide

Der Plasmidvektor pBluescript II SK+ (Stratagene) wurde verwendet, um PCR-Produkte oder genomische DNA-Fragmente in *Escherichia coli* DH5 alpha zu klonieren.

2.2 Anreicherung, Isolierung und Kultivierung

2.2.1 Anreicherung aus Umweltproben

Bakterien wurden aus Umweltproben von verschiedenen Standorten isoliert. Proben wurden von Schlamm, Landwirtschafts- und Walderde, von Flusssediment und von Grundwasser genommen (**Tabelle 3**). Die Probenstandorte waren entweder unberührt oder kontaminiert mit Chloraromaten teilweise auch mit Chloraliphaten oder weiteren anthropogenen Schadstoffen.

2.2.2 Medien zur Anreicherung von Bakterien

Mehrere in der Literatur beschriebene Anreicherungsmedien wurden abgeändert. Die Energie- und Kohlenstoffquelle des ursprünglichen Mediums wurde durch einen Chloraromaten ersetzt. Ausserdem wurde versucht, unerwünschte Bakteriengruppen am Wachstum zu hindern, zum Beispiel durch Zugabe von hemmenden Stoffen, oder durch mechanische Behandlung der Bakterienkultur mit der Schwingmühle.

Tabelle 3: Herkunft der Umweltproben, von denen Bakterien isoliert wurden.

Art, Herkunft (Markierung)	Probenahme Referenz	Kontamination (Konzentration)***	Redoxbedingung	Anreicherungsstrategie***
Boden U (gelb)	Nov 1996*	M. Walters, University of Kent PCB, TCB (5 - 10 mg/kg)	aerob	Azotobacter, MM, Methylrot, Kugelmühle / 2,4-D, 3-CBzt
Boden A (grün)	Nov 1996*	M. Walters, University of Kent PCB, TCB (5 - 10 mg/kg)	aerob	Azotobacter, MM, Methylrot, Kugelmühle / 2,4-D, 3-CBzt
Landw. Erde (rot)	Dez 1996*	M. Walters, University of Kent vermutlich 2,4-D-belastet	aerob	Azotobacter, MM, Methylrot, Kugelmühle / 2,4-D, 3-CBzt
Grundwasser, Bitterfeld Pegel 7, 8, 10, 27,	Apr 1999	M. Höfle, D. Wenderoth Monochlorbenzol, vermutlich Anilin	aerob	AGS / Chlorbenzol, 3-Chloranilin
Boden, MAROC N° 1	Jun 2000	Bioclear** Monochlorethen (0-5 mg/l Grundwasser), BTEX	sulfidogen, methanogen	MM / Chlorbenzol
Schlamm, MAROC N° 4	Jun 2000	Bioclear** Chlorbenzol, Anilin	anaerob	MM / Chlorbenzol
Boden, MAROC N° 5	Jun 2000	Bioclear** Chlorbenzol (1 mg/kg), 1,2,3-Trichlorpropan, Hexachlorbenzen, Tri- und Dichlorbenzen, Biphenyl, Trichlorethylen, Trichlormethan, cis-Dichlorethen	anaerob	MM / Chlorbenzol
Boden, MAROC N° 6	Jun 2000	Bioclear** Chlorbenzol (1 mg/kg), 1,2,3-Trichlorpropan, Hexachlorbenzen, Tri- und Dichlorbenzen, Biphenyl, Trichlorethylen, Trichlormethan, cis-Dichlorethen	anaerob	MM / Chlorbenzol
Boden, MAROC N° 7	Jun 2000	Bioclear** Chlorbenzol (1 mg/kg), 1,2,3-Trichlorpropan, Hexachlorbenzen, Tri- und Dichlorbenzen, Biphenyl, Trichlorethylen, Trichlormethan, cis-Dichlorethen	anaerob	MM / Chlorbenzol
Grundwasser, MAROC N° 12	Jun 2000	Bioclear** Chlorbenzol (5 mg/l), 1,2,3-Trichlorpropan, Hexachlorbenzen, Tri- und Dichlorbenzen, Biphenyl, Trichlorethylen, Trichlormethan, cis-Dichlorethen	anaerob	MM / Chlorbenzol

* Zwei Jahre in geschlossenem Gefäß gelagert (4°C).

** Umweltproben gesammelt und anonymisiert durch Bioclear, Zernikepark 6D, NL-9747AN Groningen.

*** **BTEX:** Benzol/Toluol/Ethylbenzol/Xylol, **AGS:** Arginin-Glycerin-Salz-Medium, **3-CBzt:** 3-Chlorbenzoat, **MM:** Mineralmedium, **PCB:** Polychlorierte Biphenyle, **TCB:** Trichlorbenzol.

Mineralmedium nach Dorn et al. (1974)

Dieses Mineralmedium wurde verwendet, um Bakterien anzureichern, direkt aus Umweltproben zu isolieren oder zur Kultivierung von Bakterien. Als einziges Substrat wurde jeweils ein Chloraromat zugegeben. Bei Verwendung von Chlorbenzol als Anreicherungssubstrat wurde Phosphatpuffer (pH 7) in der ursprünglichen Konzentration von 28 mM eingesetzt (Dorn et al. 1974). Bei Verwendung von 2,4-D, 3-Chlorbenzoat und 3-Chloranilin wurde die Pufferkonzentration zur besseren pH-Stabilisierung verdoppelt (55 mM).

Zusammensetzung

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7.0 g
KH_2PO_4	2.0 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.0 g
$\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.06 g
Fe(III)Ammoniumcitrat·7H ₂ O	0.01 g
Spurenelementlösung SL6 ohne EDTA und FeSO ₄ (Pfennig und Lippert 1966)	1.0 ml
ddH ₂ O	ad 1000 ml

Die Salzlösung wurde in einer 50-fachen Stammlösung hergestellt, sterilfiltriert und im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert. Um die Ausfällung unlöslicher Metallphosphate beim Autoklavieren zu vermeiden, wurden die Pufferkomponenten $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und KH_2PO_4 in Form einer 20-fache Stammlösung getrennt hergestellt und autoklaviert. Je nach Verwendung wurde der Puffer autoklaviert oder unsteril gelagert. 2,4-D, 3-Chlorbenzoat und 3-Chloranilin wurden als sterilfiltrierte Stammlösung (Seite 27) zugegeben. Chlorbenzol wurde in definierten Mengen über die Gasphase zugefüttert (Seite 27).

Modifiziertes *Azotobacter*-Medium nach Holt et al. (1994)

Dieses Medium ist zur Anreicherung von *Azotobacter* beschrieben (Holt und Krieg 1994). Es handelt sich um ein stickstofffreies Minimalmedium. Anstelle des angegebenen Mannitol (10 mM) wurde 2,4-D (1.5, 3.0 und 6.0 mM) als einzige Quelle von Kohlenstoff und Energie zugegeben.

Zusammensetzung

K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g
ddH ₂ O	ad 1000 ml

Die drei Salzlösungen wurden separat in konzentrierten Stammlösungen hergestellt und sterilisiert. Die K₂HPO₄- und MgSO₄·7H₂O-Lösung wurden 200-fach hergestellt, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert. Die FeSO₄·7H₂O-Lösung wurde 50-fach zubereitet und sterilfiltriert (0.22 µm), sie war nur wenige Wochen haltbar. Zur Erhöhung der Haltbarkeit wurde der Eisensulfat-Stammlösung ein Tropfen konzentrierte HCl zugegeben.

Modifiziertes Malat-Medium (Nfb) nach Holt et al. (1994)

Mit halbfestem, stickstofffreiem Mineralmedium (Nfb-Medium) sollten mikroaerophile, stickstofffixierende Bakterien angereichert werden. In der Literatur wird damit die Anreicherung von *Azospirillum* und *Azotobacter* beschrieben (Holt und Krieg 1994). Statt der angegebenen L-Apfelsäure (37 mM) wurden 2,4-D oder 3-Chlorbenzoat in den Konzentrationen 1.5 oder 3.0 mM verwendet.

Zusammensetzung**Fe-EDTA (1.6% Lösung)**

FeCl ₃ ·6H ₂ O	4.8 · 10 ⁻² g
EDTA Na ₂ H ₂ ·2H ₂ O	6.6 · 10 ⁻² g

Spurenlösung

Na ₂ MoO ₂ ·2H ₂ O	2.0 · 10 ⁻³ g
MnSO ₄ ·H ₂ O	2.4 · 10 ⁻³ g
H ₃ BO ₃	2.8 · 10 ⁻³ g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	8.0 · 10 ⁻⁵ g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.4 · 10 ⁻⁴ g

Bromthymolblau (0.1%)

Ethanol 100%	0.1 ml
Bromthymolblau	2.0 · 10 ⁻³ g

Vitaminlösung

Biotin	1.0 · 10 ⁻⁴ g
Pyridoxine·HCl	2.0 · 10 ⁻⁴ g

K ₂ HPO ₄	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.1 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.7 · 10 ⁻² g
Agarose	1.5 g
ddH ₂ O	ad 1000 ml

Die Stammlösungen wurden folgendermassen zubereitet: Von der 1.6% Fe-EDTA-Lösung (w/w) wurden 100 ml hergestellt. Anfangs verfärbte sich die Lösung orange und wurde trüb, löste sich dann aber bei Raumtemperatur über Nacht. Die Vitamine wurden in 100 ml ddH₂O aufgenommen und zum Lösen des Biotins, bis kurz vor Erreichen des Siedepunktes erhitzt. Von der 0.1% Bromthymolblau-Lösung (0.1% (w/w) in 5% (v/v) Ethanol) wurden 10 ml hergestellt, von der Spurenlösung wurden 200 ml hergestellt. Die vier Stammlösungen wurden bei 4°C gelagert.

Abweichend vom Originalrezept wurde auf die Zugabe von 4.0 g KOH (pro Liter Medium) verzichtet, da statt der sauren Apfelsäure die neutralen Stammlösungen der Substrate 2,4-D und 3-Chlorbenzoat zugegeben wurden. Die Kohlenstoffquelle wurde erst nach dem Autoklavieren, kurz vor Erstarren des Mediums zugegeben. Wie beschrieben, wird dem Medium als pH-Indikator Bromthymolblau zugegeben (gelb pH 6.5, grün pH 6.5-7.0, blau pH > 7.0). Ursprünglich war das Medium hellgrün, sollte sich aber bei Mineralisierung der Chloraromaten, bzw. bei der Freisetzung von HCl, gelb verfärben.

Modifiziertes AGS-Medium nach EI-Nakeeb et al. (1963)

Das Arginin-Glycerin-Salz-Medium ist beschrieben zur Anreicherung von aeroben *Actinomyceten* (EI-Nakeeb und Lechevalier 1963). Statt der vorgeschlagenen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen Arginin (5 mM) und Glycerin (136 mM), wurde die Substratkonzentration in 14-tägigen Schritten um 0.1 mM 3-Chloranilin erhöht.

Zusammensetzung

K_2HPO_4	1.0 g
NaCl	1.0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 g
$Fe(III)_2(SO_4)_3 \cdot 6H_2O$	$1.0 \cdot 10^{-2}$ g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	$1.0 \cdot 10^{-3}$ g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	$1.0 \cdot 10^{-3}$ g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	$1.0 \cdot 10^{-3}$ g
ddH ₂ O	ad 1000 ml

Die Salzlösungen wurden einzeln in 100-fachen Stammlösungen hergestellt, autoklaviert und bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert. Die Phosphatlösung wurde auf pH 6.9-7.1 eingestellt. Die Eisensulfat-Lösung wurde jeweils frisch zubereitet, mit einem Tropfen conc. HCl angesäuert und sterilfiltriert. Als einzige Kohlenstoffquelle wurde 3-Chloranilin (0.1 mM/14 d) verwendet. Zur Herstellung des Mediums wurden die einzelnen Stammlösungen in einem mit ddH₂O vorgelegten Kolben steril zusammen gemischt.

2.2.3 Methoden zur Anreicherung von Bakterien

Die beschriebenen Flüssigmedien wurden zur Anreicherung ungewöhnlicher Bakterien, mit der Fähigkeit zum Abbau chloraromatischer Verbindungen verwendet. Falls nicht ausdrücklich vermerkt, wurden alle Kulturen bei Raumtemperatur inkubiert. 10-30 ml Medium wurden aerob in 100-ml-Schüttelkolben mit Schraubverschluss bei 130 UPM gezogen. Zur Stammisolierung wurden die Anreicherungen oder direkt die verdünnten Umweltproben auf Agarplatten (15 g/l) desselben Mediums plattiert. Festes Medium wurde in Plastikpetrischalen (Ø 9.5 cm) gegossen, jede Petrischale fasste zwischen 20 und 25 ml Medium.

Anreicherung und direkte Isolierung auf Mineralmedium nach Dorn et al.

Anreicherung und anschließende Stammisolierung erfolgten mit dem Mineralmedium nach Dorn et al (1974) auf drei Arten: Mehrmalige starke mechanische Behandlung der Kultur mit der **Schwingmühle**, Zugabe von **Methylrot** zum Medium, oder **direkte**

Isolierung von Chloraromatenverwertern durch Ausplattieren einer Umweltprobe auf festes Mineralmedium.

Voranreicherung in Mineralmedium

1 g Erde (Feuchtgewicht) der Proben von Mary Walters (**Tabelle 3**) wurde in 30 ml Mineralmedium (Seite 16) mit 2-fach Phosphatpuffer gegeben. Die Vorkultur wurde sieben Tage lang geschüttelt, 2,4-D oder 3-Chlorbenzoat in den Konzentrationen 1.5 oder 3.0 mM verwendet.

Anreicherung in Mineralmedium mit Schwingmühlenbehandlung

Durch die starken Scherkräfte in der mit Glasperlen gefüllten **Schwingmühle** sollten Bakterienzellen mit dicker Zellwand angereichert werden. Gram-negative Bakterien hingegen, sollten aufgrund ihrer dünneren Zellwand die Prozedur nicht überstehen.

1 ml der Voranreicherung wurde in 10 ml frisches Mineralmedium gegeben (C-Quelle und -konzentration identisch) und weitere 27 Tage bei 130 UPM geschüttelt. Die für den folgenden Zellaufschluss verwendeten, 10 ml fassenden Edelstahlbehälter (Retsch), wurden vor Gebrauch 5 min mit 70% Ethanol sterilisiert. Die gesamte Schwingmühlenbehandlung wurde bei 4°C durchgeführt. Es wurden 3 ml der erhaltenen Kultur zusammen mit etwa 8 ml sterilen Glasperlen (\varnothing 0.2-0.3 mm) in den Edelstahl-Aufschlussbehälter gegeben. Der Metallbehälter wurde bis zum Rand mit 0.85% (w/w) NaCl-Lösung gefüllt und verschlossen. Anschließend wurde mit der Schwingmühle (MM200, Retsch) 10 min mit maximaler Frequenz (30 s^{-1}) homogenisiert.

Der gesamte Inhalt der Metallbehälter wurde anschliessend erst in 10 ml frisches Mineralmedium ohne Chloraromaten gegeben. Um die Behälter vollständig zu entleeren, wurden sie mit 2-3 ml 0.85% NaCl gespült. Eine Lebendzellzahl-Bestimmung der frisch angeimpften Kolben wurde auf 10%-TSA-Platten vorgenommen. Die inokulierten Kolben wurden erst am folgenden Morgen mit den entsprechenden Chloraromaten unter identischen Konzentrationen der Vorkulturen gefüttert. Sechs Tage nach Inokulierung wurde 1 ml der Kultur in 10 ml frisches Medium derselben Bedingungen transferiert. Weitere sechs Tage später wurde eine dezimale Verdünnungsreihe dieser letzten Kultur auf Agarplatten derselben Medien gebracht. Nach weiteren 14 Tagen wurden von jeder Platte einige Kolonien zum Vereinzeln auf frische Platten gestrichen.

Anreicherung in Mineralmedium mit Methylrot

Die Zugabe von **Methylrot** zum Medium soll *Arthrobacter* anreichern. Methylrot (0.16 g / 1000 ml) hemmt das Wachstum von Gram-positiven und -negativen Bakterien, nicht jedoch das von *Arthrobacter* (Holt und Krieg 1994). Das ursprüngliche komplexe Medium basiert auf Hefeextrakt und tryptisch verdauter Soya (Holt und Krieg 1994). Zur Herstellung einer 5-fache Stammlösung wurden 0.16 g Methylrot in 150 ml ddH₂O gelöst. Dazu war es notwendig, mehrmals den pH mit conc. NaOH zwischen 10 und 11 einzustellen. Nach vollständiger Lösung wurde mit HCl auf pH 8 zurücktitriert. Anschliessend wurde die Lösung mit ddH₂O auf 200 ml aufgefüllt, sterilfiltriert (0.22 µm) und dem Medium zugegeben.

1 ml einer sieben Tage alten Vorkultur (Seite 20) wurde als Inokulum verwendet. Die Anreicherung wurde in 10 ml Mineralmedium mit 2-fach Phosphatpuffern und Methylrot (160 mg/l) durchgeführt. Als Substrate wurden 2,4-D oder 3-Chlorbenzoat in den Konzentrationen 1.5 oder 3.0 mM verwendet, entsprechend der Konzentration und des Substrates der Vorkultur. Sieben Tage später wurde 1 ml dieser Kultur in frisches Medium mit denselben Bedingungen gebracht. Nach weiteren 14 Tagen wurden von der Anreicherungskultur 100 µl einer dezimalen Verdünnungsreihe in autoklaviertem ddH₂O auf Festmedien ähnlicher Zusammensetzung (Kohlenstoffquelle 1.5 mM, Rest identisch) plattiert. Nach 13 Tagen wurden von jeder Platte zwei Kolonien auf frischen Mineralmedium-Platten ohne Methylrot vereinzelt (Kohlenstoffquelle 1.5 mM).

Das Wachstum der vereinzelt Kolonien wurde in Zellkulturplatten (Nunclon™ Surface, Nalgene Nunc International) in Flüssigmedium überprüft. Eine Zellkulturplatte hat 24 Gefässe mit jeweils einem Maximalvolumen von 3 ml. Jedes dieser Gefässe wurde mit 2 ml Mineralmedium (2-fach Phosphatpuffer) gefüllt. Die Substrate 2,4-D bzw. 3-Chlorbenzoat entsprachen denen der Anreicherung. Die Zellkulturplatten wurden bei 130 UPM geschüttelt. Innerhalb von 27 Tagen wurde mit der HPLC zweimal die Chloraromatenkonzentration dieser Kulturen gemessen. Die isolierten Bakterienstämme wurden durch einen Gram-Schnelltest (KOH-Test) vorläufig charakterisiert (Süßmuth et al. 1999).

Direkte Isolierung auf Mineralmedium

Unmittelbares Ausplattieren verschiedener Umweltproben (**Tabelle 3**) auf festem Mineralmedium (1-fach Phosphatpuffer) in Gegenwart von Chlorbenzol sollte zur **direkten Isolierung** entsprechender Verwerter führen. Die Proben waren mit einfach chlorierten Aromaten und vermutlich weiteren unbekanntem Umweltgiften belastet, sie wurden im Rahmen des MAROC-Projektes bereitgestellt. 1 g Erdprobe (Feuchtgewicht) oder 1 ml Wasserprobe wurden in 1 ml 0.85% NaCl suspendiert und 1 min auf dem Vortex bei höchster Stufe geschüttelt. Von jeder so resultierenden Schlamm-Probe wurde eine dezimale Verdünnungsreihe in 0.85% NaCl angefertigt. Proben der Verdünnungen wurden parallel auf festem Mineral- und TSA-Medium ausplattiert.

Die Zugabe des Chlorbenzols zu den Plattierungen erfolgte über die Gasphase (Seite 27). Der starke Geruch des Aromaten wurde ausgenutzt, um dessen vollständigen Verbrauch in den luftdicht verschlossenen Inkubationstöpfen nachzuweisen. War kein typischer Aromatenduft mehr auszumachen, wurde mit der ursprünglichen Menge Chlorbenzol nachgefüttert. Bei dieser Gelegenheit wurde das Inkubationsgefäß 30 min bis 1 h unter dem Abzug gelüftet. Dadurch sollte den Kulturen Sauerstoff zugeführt werden sowie allenfalls noch vorhandenes Chlorbenzol vor erneutem Zusatz entfernt werden.

Um Einzelkolonien zu erhalten, wurden nach drei Wochen alle Kolonien der Mineralfestmediumplatten in Dreistrichtechnik auf frische Platten überimpft, und wie beschrieben erneut mit Chlorbenzol inkubiert. Die nach wenigen Tagen erkennbaren einzelnen Kolonien wurden auf NB-Platten transferiert, von wo aus nach einer oder zwei weiteren Wochen einzelne Kolonien wieder zurück auf frisches Mineralmedium mit Chloraroma-ten überimpft wurden. Nach dieser Prozedur waren die meisten Stämme rein und konnten in die Stammsammlung einsortiert werden.

Anreicherung mit modifiziertem *Azotobacter*-Medium

Das *Azotobacter*-Medium (Seite 16) wurde nur während der Anreicherung und Isolierung verwendet, jede weitere Kultivierung der Isolate wurde in Mineralmedium nach Dorn et al. (Seite 16) durchgeführt. Als Inokulum wurde 1 g Bodenprobe (Feuchtgewicht) verwendet (Landwirtschaftliche Erde, Mary Walters, **Tabelle 3**). Die Anreiche-

rungskulturen wurden bei wechselnder 2,4-D Konzentration (1.5 und 3.0 mM resp. 3.0 und 6.0 mM) durchgeführt. Zweimal wurde ein Aliquot der Anreicherungskulturen in frisches Medium überimpft, anschliessend eine Verdünnungsreihe auf Agarplatten ausgestrichen:

Zu Beginn wurden die Umweltproben in 30 ml *Azotobacter*-Anreicherungsmedium mit 2,4-D (1.5 und 3.0 mM) gegeben und während 47 Tagen bei 130 UPM geschüttelt. Je 3 ml dieser ersten Kultur wurden in 10 ml frisches Medium mit verdoppelter 2,4-D Konzentration (3.0 resp. 6.0 mM 2,4-D) gegeben. Von dieser zweiten Anreicherungskultur wurden neun Tage später wiederum je 1 ml in frisches Medium überimpft, diesmal in 10 ml Medium und der ursprünglichen 2,4-D-Konzentration (1.5 mM resp. 3.0 mM 2,4-D). Die dritte Kultur wurde nach 14 Tagen auf Festmedium ausgestrichen (1.5 mM resp. 3.0 mM 2,4-D). Weitere 14 Tage später wurden einzelne Kolonien mit der Dreistrichmethode auf frischen Agarplatten vereinzelt.

Anreicherung mit modifiziertem halbfestem Malat-Medium (Nfb)

1 g (Feuchtgewicht) der Erdprobe (Mary Walters, **Tabelle 3**) wurde auf 30 ml halbfestes Malat-Medium (1.5 und 3.0 mM 2,4-D bzw. 1.5 und 3.0 mM 3-Chlorbenzoat) gelegt. Die Anreicherung wurde in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Wattestopfen mit 130 UPM geschüttelt. Die Erdprobe tauchte dabei nur wenig ins Medium und vorhandene Krümel zersetzten sich kaum. Nach 14 Tagen wurden die Anreicherungen kurz und intensiv von Hand geschüttelt. Mit einer 1000 µl Mikropipette mit abgeschnittener Spitze wurde 1 ml des Breis auf 10 ml frisches Medium derselben Zusammensetzung gegeben. Erneut wurde unter identischen Bedingungen inkubiert. Nach 14 Tagen erschien die Oberfläche des Mediums leicht eingetrocknet, worauf die Kolben wieder kurz und intensiv von Hand geschüttelt wurden. 100 µl der Mischung wurden in einer dezimalen Verdünnungsreihe mit 0.85% NaCl verdünnt. 100 µl der Verdünnungen 10^{-1} - 10^{-3} wurden auf festes Medium identischer Zusammensetzung plattiert. Zur Abschätzung der Anzahl Kolonie-bildender Einheiten wurden 100 µl der Verdünnungen auf 10% TSA plattiert.

Zur Überprüfung des Wachstums der Isolate wurden Einzelkulturen vom festen Medium erneut auf halbfestes Malat-Medium überimpft: 5 ml halbfestes Medium mit der Substratkonzentration entsprechend der Anreicherung, wurde in 15 cm lange

Reagenzgläser mit Aludeckel gegeben. Durch kurzes Schütteln auf dem Vortex wurde das Medium gemischt. Von jeder Agarplatte wurden vier Kolonien mit der Impföse in jeweils eines dieser Röhrchen gegeben. Die Kulturen wurden in einem um 30° angewinkelten Rotator bei 30°C inkubiert. Nach 20 Tagen hatte sich das halbfeste, durchsichtige und hellgrüne Medium bei manchen Kulturen leicht rostbraun verfärbt, bei anderen Kulturen war Wachstum ohne Verfärbung erkennbar.

Anreicherung mit modifiziertem AGS-Medium

In einem 100-ml-Schikanenkolben mit Schraubverschluss wurden 5 ml der dreifach konzentrierten AGS-Stammlösung (Seite 18) mit 10 ml Bitterfelder Grundwasserprobe (**Tabelle 3**) gemischt. Der 3-Chloranilin-Gehalt war anfangs 0.1 mM, aber im Abstand von 14 Tagen wurde jeweils 0.1 mM zugefüttert. Die Kulturen wurden bei 100 UPM geschüttelt.

Nur drei Tage nach der ersten Erhöhung der 3-Chloranilin-Konzentration waren die Kulturen flockig oder homogen trüb. Die Anreicherungen wurden nun in einer dezimalen Verdünnung in 0.85% NaCl auf Festmedium nahezu identischer Zusammensetzung (0.5 mM 3-Chloranilin) gestrichen. In den folgenden Wochen wurden die auftretenden Kolonien auf diesen Platten in regelmässigen Abständen ausgezählt. Anschliessend wurde von einem Grossteil der Kolonien der 3-Chloranilin-Abbau auf Replikplatten geprüft (Seite 30). Nach 54 Tagen wurden einige interessante Stämme in 20-ml-Fläschchen mit 7.5 ml AGS-Medium gegeben (0.1 mM 3-Chloranilin). Ein unbeimpftes Fläschchen diente als Kontrolle. Im Unterschied zur Anreicherung wurde ein Zehntel des ursprünglich beschriebenen Arginins (0.5 mM) und Glycerins (14 mM) beigegeben, dies sollte die Bakterien beim Wachstum unterstützen. Während 35 Tagen wurde alle fünf Tage 0.1 mM 3-Chloranilin zugefüttert. Gelegentlich wurde bei trüben, erkennbar wachsenden Kulturen die Chloraromaten-Konzentration mit der HPLC gemessen. Geeignete Kulturen wurden dann zur Überprüfung der Reinheit auf Mineralmedium nach Dorn et al. (0.5 mM 3-Chloranilin) plattiert und durch Sequenzierung der 16S rDNA phylogenetisch eingeordnet.

Parallel zur Gewinnung von Reinkulturen wurde die ursprüngliche Anreicherung insgesamt fünf Mal alle 14 Tage mit 0.1 mM 3-Chloranilin gefüttert. Dann allerdings wurden die Kulturen viereinhalb Jahre bei 4°C im Dunkeln und ohne Schütteln gelagert. Das

Medium eines Kolbens färbte sich in dieser Zeit leicht braun, von den anderen wurde 1 ml in 10 ml frisches Mineralmedium nach Dorn et al., (1-fach Phosphatpuffer, 0.1 mM 3-Chloranilin) gegeben. Nach zwei Wochen war wieder Wachstum zu erkennen, die Kolben wurden weiter in 0.1 mM Schritten gefüttert.

2.2.4 Medien zur Kultivierung von Bakterien

Mineralmedium nach Dorn et al.

Die isolierten Bakterien wurden meistens in Mineralmedium nach Dorn et al. (Seite 16) kultiviert. Dieses Medium ist geeignet für Kulturen, aus denen später DNA isoliert werden soll. Als Substrat wurde der Chloraromat in der Konzentration verwendet, mit dem die Bakterien isoliert worden waren.

Modifiziertes *Rhizobium X*-Medium

Bradyrhizobium-ähnliche Stämme wurden mit einem auf Erdextrakt basierendem Medium angezogen (Atlas 1995). *Rhizobium X*-Medium wurde nur für die Anzucht von Vorkulturen mit sehr geringen Mengen Inokulum verwendet, zum Beispiel beim Animpfen einer 10 ml Flüssigkultur mit einer einzigen Kolonie. Für die Herstellung von Zellmasse für DNA-Extraktion eignet sich dieses Medium nicht, weil die im Erdextrakt enthaltenen Huminstoffe die DNA-Extraktion und die PCR behindern.

Anfangs wurde dieses Medium mit Zugabe der beschriebenen 55 mM (10 g/l) Mannitol und zusätzlichen 3 mM 2,4-D angewendet. Nach dem ersten Versuch wurde allerdings auf die Zugabe von Mannitol verzichtet. Nach wenigen weiteren Versuchen wurde *Rhizobium X*-Medium nur noch 0.1-fach verdünnt, als Zusatz zum oben beschriebenen Mineralmedium nach Dorn et al. verwendet. Zur Herstellung von 1000 ml Medium wurden also 900 ml Mineralmedium nach Dorn et al. und 100 ml *Rhizobium X*-Medium verwendet. 2,4-D wurde zum Schluss zugegeben.

Zusammensetzung

Erdextrakt		
Erde (Feuchtgewicht)	80 g	
Na ₂ CO ₃	0.2 g	
Mannitol		10 g
Hefeextrakt		1.0 g
ddH ₂ O		ad 1000 ml

Die Erde für den Erdextrakt wurde von der obersten Erdschicht einer Wiese genommen, vorzugsweise von einem Maulwurfshügel. Zur Herstellung des Erdextraktes, wurde Natriumcarbonat mit der Erde und 200 ml ddH₂O vermenget, autoklaviert und 10 min bei 14'000 g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde für das Medium verwendet. Vor dem Autoklavieren des Mediums wurde der pH auf 7.0-7.4 eingestellt.

'Nutrient Broth'-Medium (NB-Medium)¹

NB-Festmedium wurde verwendet, um die Reinheit eines Stammes durch Überimpfen festzustellen oder herzustellen. Weiterhin wurde NB verwendet, um innert kürze Biomasse zu erzeugen, die für PCR verwendet werden kann. Die isolierten Bakterienstämme wurden aus der Stammsammlung direkt auf 'Nutrient Broth'-Festmedium ausgestrichen und wenige Tage bei Raumtemperatur inkubiert.

Zusammensetzung

Pepton	5.0 g
NaCl	5.0 g
Hefeextrakt	2.0 g
ddH ₂ O	ad 1000 ml

10% 'Tryptic Soy Agar' (TSA-Medium)

TSA wurde verwendet, um Lebendzellzahl-Bestimmungen durchzuführen. Die Agarplatten wurden nur mit 10% (w/w) Substrat hergestellt, das entspricht 3 g 'Tryptic soy broth' (Difco) pro 1000 ml Wasser.

¹ NB-Medium wird in jedem Labor anders hergestellt. Es wird deshalb auf eine Quellenangabe verzichtet

Luria-Bertani-Medium (LB- und LB Amp50-Medium)

LB-Medium wurde für die Kultivierung von *Escherichia coli* DH5 alpha verwendet (Sambrook und Russel 2001a). Ampicillin (Anwendungskonzentration: 50 µg/ml) wurde zugegeben, um den Selektionsdruck auf den Vektor pBluescript II SK+ aufrechtzuerhalten (LB Amp50). Üblicherweise wurde Ampicillin (Stammlösung: 50 mg/ml) direkt in die Platten gegossen, die Platten wurden bei 4°C gelagert. Bei Verwendung der LB Amp50 Platten mehr als zwei Wochen nach Herstellung, wurde kurz vorher noch einmal Ampicillin in der Anfangskonzentration gleichmässig auf der Oberfläche verteilt.

2.2.5 Stammlösungen und Medienzusätze

Alle gut wasserlöslichen Chloraromaten wurden in konzentrierten, wässrigen Stammlösungen gelagert. Chlorbenzol wurde aufgrund seiner geringen Wasserlöslichkeit und hohen Flüchtigkeit ausschliesslich über die Gasphase gefüttert. Einigen isolierten und charakterisierten Bakterien wurde das Wachstum durch passende komplexe Medienzusätze erleichtert.

Chloraromaten

Die entsprechende Menge der freien Säuren **2,4-Dichlorphenoxyacetat (2,4-D)** und **3-Chlorbenzoat**, für eine 50 mM Stammlösung, wurde unter Rühren in ddH₂O und durch Zugabe von 1 M NaOH gelöst. Nach vollständiger Lösung wurde pH 7 eingestellt, die Lösung mit ddH₂O auf das gewünschte Volumen aufgefüllt und steril filtriert (0.22 µm) und bei Raumtemperatur gelagert.

Die entsprechende Menge (gewogen) des freien Amins **3-Chloranilin**, für eine 50 mM Stammlösung, wurde unter Rühren und durch Zugabe von konzentrierter Salzsäure gelöst, bis der ölige Film auf der Oberfläche verschwand. Braun-schwarze Klümpchen lösten sich auch nach längerem Rühren nicht und wurden durch steriles Filtrieren (0.22 µm) entfernt. Die rosafarbene, klare Lösung wurde im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert.

Chlorbenzol wurde über die Gasphase gefüttert. Unter Annahme sofortiger Verflüchtigung und vollständiger Verteilung betrug die Konzentration im Gasraum 7.9 mg/l. Dies entspricht unter Annahme eines idealen Gasverhaltens einer Volumenkonzentration von

0.16%. Agarplatten wurden dem Chlorbenzol in einem geschlossenen Glasgefäß ausgesetzt. Die entsprechende Menge Chlorbenzol wurde in ein offenes, an der inneren Glaswand befestigtes, 1.5 ml-Reaktionsgefäß getan. Bei Flüssigkulturen wurde Chlorbenzol über einen im Deckel befindlichen Verdampferaufsatz zugegeben. Das flüssige Chlorbenzol kam zu keinem Zeitpunkt in Kontakt mit der wässrigen Phase des Mediums.

Wachstumsfördernde Zusätze

Mit wachstumsfördernden Zusätzen wurde versucht, langsam wachsende, isolierte und charakterisierte Bakterien im Wachstum zu unterstützen. Durch ein komplexes Substratangebot, oder eine definierte Mischung aus verschiedenen C-Quellen, sollte gewährleistet werden, dass 'für jeden etwas dabei ist'.

Der 1 M **C-Quellenmix** enthält vier verschiedene C-Quellen. Jede der zugegebenen C-Quellen wurde in der Stammlösung auf 250 mM konzentriert und in den Medien mit 0.43 mM angewendet.

Zusammensetzung

Pyruvat	0.44 g
D-Glucose Monohydrat	0.99 g
D-Fructose	0.90 g
Succinat	0.59 g
ddH ₂ O	ad 20 ml

Mit 1 M NaOH wurde der pH zwischen 3 und 4 eingestellt. Die Lösung wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Zur Stimulierung nicht mehr wachsender Actinomyceten-ähnlicher Kulturen wurde verdünnte **Casamino Acids-Lösung** (Difco oder Roth) gefüttert. Die 100-fache Stammlösung enthielt 50 g/l, angewendet wurde die Lösung einfach (0.5 g/l). Die Stammlösung wurde autoklaviert und im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.6 Lagerung der Bakterienstämme

Herstellung von Reinkulturen / Überprüfung der Reinheit

Um Kontaminationen eines Chloraromaten verwertenden Isolates zu erkennen und zu entfernen, wurde eine einzelne Kolonie von Mineralfestmedium auf NB-Festmedium und von da wieder auf Mineralmedium überimpft.

Die Reinheit eines Stammes wurde durch paralleles Ausstreichen auf passendem Mineralmedium und NB-Medium überprüft. Die Kolonien wurden von Auge oder unter dem Mikroskop auf Homogenität überprüft und verglichen. Zum Weiterarbeiten wurden die auf Mineralmedium gewachsenen Kolonien verwendet. Manche Bakterienstämme wuchsen allerdings nicht auf NB, diese wurden dann so lange auf Mineralmedium überimpft, bis nur noch homogene Kolonien auf den Agarplatten erkennbar waren, bzw. bis unter dem Mikroskop nur ein Bakterientyp erkennbar waren.

Lagerung von Bakterienisolaten

Von jedem isolierten Stamm wurde eine Reinkultur der Stammsammlung (-80°C) zugefügt. Die einzufrierenden Stämme wurden auf Mineralfestmedium mit geeigneten Chloraromaten als einzigem Substrat kultiviert. Mit einer Impföse wurden mehrere Kolonien einer Reinkultur auf einmal von der Agarplatte gekratzt und in 1.8 ml 50% (v/v) Glycerin gegeben. Es wurde darauf geachtet, frische, im Wachstum befindliche Kolonien auszuwählen. Die Röhrchen wurden kurz auf dem Vortex gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschliessend in die Stammsammlung einsortiert.

2.3 Charakterisierung der Bakterien

Die frisch isolierten Stämme wurden meist mit dem Schnellverfahren (KOH-Test) zur Gram-Differenzierung grob eingeordnet (Süßmuth et al. 1999). Später wurden alle isolierten Bakterienstämme aufgrund eines Fragmentes der 16S rDNA-Sequenz charakterisiert. Der betriebene Aufwand hing vom Wert des Stammes für die weiteren Arbeiten ab. Interessant waren insbesondere Stämme, die definitiv zum Abbau chloraromatischer Verbindungen befähigt waren, und gleichzeitig Bakteriengruppen ange-

hörten, welche in anderen Arbeiten bezüglich dieser Fähigkeit noch nicht hinreichend untersucht worden waren.

2.3.1 Methoden zur Charakterisierung des Wachstums

Lebendzellzahl-Bestimmung

Die Lebendzellzahl wurde auf 0.1-fach TSA-Festmedium bestimmt. Dazu wurde eine dezimale Verdünnungsreihe (ddH₂O oder 0.85% NaCl) einer bekannten Menge Umweltprobe ausgestrichen.

Trübungsmessung

Die optische Dichte einer Bakterienkultur wurde bei 560 nm und einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Zum Nullabgleich wurde bei Mineralmedien nicht beimpftes Mineralmedium genommen, bei Komplexmedien der zellfreie Überstand der Bakterienkultur. Überstieg die Extinktion den Wert von 0.2, wurde die zu messende Lösung entsprechend verdünnt.

Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeits-Chromatografie (RP-HPLC)

Die 2,4-D und 3-Chlorbenzoat-Konzentration einer Kultur wurde mit Umkehrphasen-HPLC gemessen. Als mobile Phase wurde ein 50% Methanol/Wasser-Gemisch mit 0.1% H₃PO₄ verwendet. Das Säulenmaterial war Eurospher-100 C18 (Partikelgröße 5 µm) in einer Säule von 4 mm x 12 cm Innendurchmesser (Knauer). Zur Berechnung der zu messenden Konzentrationen wurden externe Standards vor und nach der Probe aufgetragen. Als Detektor wurde ein Dionex UVD 340 S Diodenarraydetektor verwendet. Das Signal der Chloraromaten wurde bei einer Wellenlänge von 210 nm gemessen.

Nachweis der Substratverwertung mit Replikplatten

Das Wachstum mit Chloraromaten als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle wurde mit Replikplatten nachgewiesen. Wuchs ein Stamm besser auf Festmedium mit Sub-

strat als ohne, so wurde angenommen, dass dieser Stamm fähig ist, Chloraromaten zu verwerten.

Nachweis der Substratverwertung in Flüssigkultur

Das bakterielle Wachstum mit Chloraromaten als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle wurde auch in Flüssigkultur geprüft. Die Kulturen wurden in 100-ml-Schüttelkolben mit 10 ml Mineralmedium nach Dorn et al. (Seite 16) und der entsprechenden Menge Chloraromaten als einzigem Substrat gezogen. Inokuliert wurde eine Kolonie ab Festmedium. Entweder wurde mit der HPLC der Substratabbau nachgewiesen, oder die Bakterienvermehrung wurde anhand der Trübungsmessung der Kultur nachgewiesen. Es wurde erwartet, dass eine Kultur, die fähig ist mit Chloraromaten als einzigem Substrat zu wachsen, innerhalb von 30 Tagen mindestens eine um 0.05 höhere OD (560) hat.

Bei manchen Stämmen wurden zusätzlich zu den Chloraromaten komplexe Zusätze wie Casamino-Acids ins Medium gegeben (Seite 28). In diesem Fall wurde die OD (560) der Kulturen mit Chloraromaten mit entsprechenden Kulturen ohne Chloraromaten verglichen.

Wachstumskurve

Vom isolierten Stamm AZD10a_EZLN1 wurde eine Wachstumskurve gemessen. Die Vorkultur wurde in zwei Schritten in *Rhizobium* X-Medium hergestellt (RT, 100 UPM, 55 mM Mannitol, 3 mM 2,4-D). 5 ml einer auf *Rhizobium* X-Medium (3 mM 2,4-D) gewachsenen Kultur wurden verwendet, um 50 ml desselben Mediums mit einer zweiten Kultur anzuimpfen.

Nach vier Tagen waren in der zweiten Vorkultur lediglich 25% des ursprünglich beigefügten 2,4-Ds mit HPLC nachzuweisen, die OD (560) betrug 0.37. Es wurden je 5 ml als Inokulum für die verschiedenen Kulturen (**Tabelle 4**) verwendet. 50 ml Medium wurden in 500 ml Schüttelkolben bei 100 UPM, 30°C geschüttelt.

Von den Kulturen wurden in Abständen von wenigen Stunden bis ganzen Tagen jeweils 1 ml-Proben genommen. Von diesen Proben wurde zuerst die Trübung bei 560 nm

gemessen. Anschließend wurde die 2,4-D-Konzentration mit HPLC bestimmt. Die Verdoppelungszeit t_d wurde anhand der folgenden Formel berechnet:

$$t_d = \log(2) / m$$

$\log(2)$ ist der natürliche Logarithmus von 2, m ist die Steigung der Geraden durch die Punkte der halblogarithmischen Wachstumskurve. Die Wachstumskurve wird beschrieben durch die logarithmierten Werte der Optischen Dichte (x-Werte) und die Zeitpunkte der Messung (y-Werte). Die Steigung m wurde mit einer linearen Regression (RGP-Funktion, Excel) bestimmt. Der hier verwendete Wert für die Verdoppelungszeit wurde also nicht als arithmetisches Mittel aus den einzelnen Punktpaaren, sondern über die Steigung der optimalen Geraden für die Punkte der Wachstumskurve im Sinne der kleinsten Fehlerquadrate abgeleitet.

Tabelle 4: Medien in denen eine Wachstumskurve des Stammes AZD10a_EZLN1 gemessen wurde.

Bezeichnung der Kultur	Medium	Mannitol [mM]	2,4-D [mM]
A	<i>Rhizobium X</i>	55.0	5.0
B	<i>Rhizobium X</i>	27.5	5.0
C	<i>Rhizobium X</i>	0.0	5.0
D	<i>Rhizobium X</i>	55.0	3.0
E	<i>Rhizobium X</i>	55.0	10.0
F	Mineralmedium	55.0	5.0
G	Mineralmedium	27.5	5.0
H	Mineralmedium	0.0	5.0
I	Mineralmedium	55.0	10.0

2.3.2 Methoden zur taxonomischen Einteilung von Bakterien

Schnellverfahren zur Gram-Bestimmung (KOH-Test)

In einem Tropfen 3% (w/w) KOH wurde eine frische Kolonie mit der Impföse verrieben. Gram-negative Bakterien sollten lysieren und sich in kurzer Zeit in eine fädige, viskose Masse verwandeln. Gram-positive Bakterien sollten hingegen krümelig bleiben (Süßmuth et al. 1999). Zu Beginn wurde der Test mit bekannten Stämmen durchgeführt. Als Gram-negative Referenz wurde *E. coli* DH5 alpha, als Gram-positive Referenz wurde z.B. *Rhodococcus opacus* 1CP verwendet (**Tabelle 2**). Um genügend Zellmasse für den Test zur Verfügung zu haben, wurden die Kolonien oft auf komplexem Medium, wie 0.1-fach TSA-Medium oder NB-Medium, gezogen.

Charakterisierung der Stämme aufgrund der 16S rDNA

Die PCR-Produkte der 16S rDNA wurden in beide Richtungen sequenziert. Mit dem Sequenzbearbeitungsprogramm 'Staden Package' (Bonfield et al. 2002) wurden die resultierenden Sequenzen zu einer Konsensussequenz zusammengefügt. Die vollständigen Sequenzen wurden mit dem Programm Arb (Ludwig et al. 2004) in eine entsprechende Datenbank integriert und in einem Dendrogramm dargestellt (Seite 52).

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Allgemeine Stammlösungen

Agarose-Gele wurden üblicherweise mit **TAE-Puffer** (Stammlösung: 50-fach, pH 8.5) hergestellt (Moore 2000). Der Puffer wurde 1-fach angewendet.

Zusammensetzung TAE-Puffer (50-fach)

Tris base	242 g
Eisessig	57.1 ml
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.2 g
ddH ₂ O	ad 1000 ml

Polyacrylamid-Gele wurden mit **TBE-Puffer** (Stammlösung: 10-fach, pH 8.0) zubereitet (Moore 2000). Der Puffer wurde 1-fach angewendet.

Zusammensetzung TBE-Puffer (10-fach)

Tris base	108 g
Borsäure	55 g
EDTA-Lösung (0.5 M, pH 8.0)	40 ml
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	186.1 g
NaOH 10 M bis pH 8.0	~50 ml
ddH ₂ O	ad 1000
ddH ₂ O	ad 1000 ml

DNA-Proben wurden mit **Ladepuffer** (Stammlösung 10-fach) auf Agarose- oder Polyacrylamid-Gele geladen. Angewendet wurde der Puffer 1-fach.

Zusammensetzung Ladepuffer (10-fach)

Glycerin	50%
EDTA	0.25 M
Bromphenolblau	0.25%
Xylencycenol	0.25%

2.4.2 DNA-Extraktion und Reinigung

DNA wurde auf zwei Arten gewonnen. Die einfache Methode war die der 'Kochpreparation', alternativ wurde DNA durch konventionelle DNA-Extraktion mittels CTAB/Chloroform/Isoamylalkohol-Methode erhalten.

'Kochpreparation'

'Kochpreparation' ist eine einfache Methode, um aus wenig Zellmasse genügend DNA für PCR zu erhalten (Higuchi 1992). Die zu untersuchenden Bakterienstämme wurden aus der Stammsammlung direkt auf NB-Platten ausgestrichen. Nach wenigen Tagen Wachstum bei Raumtemperatur wurde eine einzelne Kolonie mit der Impföse in 200 µl steril filtriertes ddH₂O transferiert und durch Vortexen suspendiert. Die Suspension wurde im Thermo-cycler 5 min auf 98°C erhitzt, bei -20°C gefroren und erneut 5 min auf 98°C erhitzt. Die 'Kochpreps' wurden bei -20°C gelagert.

Bei Gram-positiven Stämmen wurde mehr Zellmasse verwendet als bei Gram-negativen. Die überschüssige Zellmasse sollte gewährleisten, dass trotz möglicherweise unvollständigem Zellaufschluss genügend DNA für die PCR rausgelöst wird. Vor dem ersten 98°C-Schritt wurde die Biomasse zusätzlich in der Schwingmühle aufgeschlossen. In ein 2-ml-Reaktionsgefäß wurden zwei Spatelspitzen (ca. 400 µl) Glasperlen (Ø 0.1-0.25 mm, unsteril), 1-2 ml steril filtriertes ddH₂O und 5-10 Kolonien von einer Agarplatte gegeben. Die Reaktionsgefäße wurden in der Schwingmühle (MM 200, Retsch) 2 min bei 30 Hz und 4°C geschüttelt. Nach kurzem Zentrifugieren wurde etwa 100 µl Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß gegeben und in 0.1-fach Schritten mit steril filtriertem Wasser verdünnt, bis die Suspension fast klar erschien. Üblicherweise wurde 0.1-0.01-fach verdünnt. Diese Suspension wurde wie für Gram-negative Bakterien beschrieben auf 98°C erhitzt, tiefgefroren und wieder auf 98°C erhitzt.

Für eine erfolgreiche PCR entscheidende Faktoren bei der Kochpreparation sind frische, wachsende Zellen und eine genügend starke Verdünnung der Suspension.

DNA-Extraktion mittels CTAB/Chloroform/Isoamylalkohol

Grössere Mengen DNA wurden aus der Zellmasse von 2-5 ml Flüssigkultur mit der CTAB/Chloroform/Isoamylalkohol-Methode erhalten (Voytas 2000):

Stammlösungen zur DNA-Extraktion

Lysozym	10 mg/ml
TE-Puffer, pH 8 (Moore 2000)	
Tris-HCl	10 mM, pH 8
EDTA	1 mM, pH 8
SDS	10%
Proteinase K	20 mg/ml
NaCl	5 M
CTAB/NaCl-Lösung (10% CTAB, 0.7 M NaCl)	
NaCl	4.1 g
CTAB	10 g
ddH ₂ O	100 ml
Chloroform-Isoamylalkohol	24:1
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	25:24:1
Isopropanol	
Ethanol	70%

1. 1.5 ml einer Bakterienkultur wurden 2 min in der Mikrozentrifuge pelletiert, der Überstand wurde verworfen. Alternativ wurden 0.5 g Erde oder Schlamm verwendet.
2. Das Pellet wurde in 567 µl TE-Puffer (Moore 2000) durch Pipettieren resuspendiert. 30 µl SDS (10%) und 3 µl Proteinase K (20 mg/ml) wurden zugegeben und nach gründlichem Mischen 1 h bei 37°C inkubiert. Sollten Gram-positive Bakterien aufgeschlossen werden, wurde vor der Proteinase K-Behandlung das Pellet in 50 µl Lysozym (10 mg/ml) suspendiert und 15 min inkubiert (RT).
Die Suspension wurde viskos, sobald das Detergenz die Bakterienzellwände lysiert hatte.
3. Zur Suspension wurden 100 µl NaCl-Lösung (5 M) zugegeben und stark vermischt. Das Ziel dieses Schrittes war die Trennung gelöster DNA von Zellwandtrümmern, denaturiertem Protein und mit CTAB komplexierten Polysacchariden. Wenn die

Salz-Konzentration unter 0.5 M (RT) sinkt, bildet sich ein CTAB-Nukleinsäure-Präzipitat, was unerwünscht ist. Die Nukleinsäuren sollten in Lösung bleiben.

4. Der Lösung wurden 80 µl CTAB-NaCl Lösung zugegeben. Es wurde gut vermischt und 10 min bei 65°C inkubiert.
5. Dasselbe Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (0.7-0.8 ml) wurde zugegeben, gut vermischt und 4-5 min in der Mikrozentrifuge zentrifugiert.
In diesem Schritt sollten die CTAB-Protein/Polysaccharid-Komplexe definitiv entfernt werden. Eine weisse Interphase sollte nach der Zentrifugation erkennbar sein.
6. Der viskose aber wässrige Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäss gegeben. Dasselbe Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol wurde zugegeben. Es wurde stark vermischt und 5 min in der Mikrozentrifuge zentrifugiert.
7. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäss gefüllt. Sollte die Probe Huminstoffe enthalten, wurde der Lösung 0.3 Volumen Ammoniumacetat (10 M) zugegeben. Die DNA wurde anschliessend mit 0.7 oder 0.6 Volumen Isopropanol gefällt. Durch einfaches vorwärts und rückwärts Schaukeln des Reaktionsgefässes wurde die DNA als 'Schlieren' in der Lösung sichtbar. In der Mikrozentrifuge wurde die DNA pelletiert (5 min), anschliessend wurde der Überstand verworfen.
8. Um überschüssiges CTAB und Salze zu entfernen, wurde die DNA mit 70% Ethanol gewaschen und 5 min in der Mikrozentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen. Das DNA-Pellet im Reaktionsgefäss konnte kopfüber auf der Laborbank getrocknet werden (10-30 min).
9. Zum Schluss wurden dem DNA-Pellet 100 µl ddH₂O zugegeben und während 2 h bei 65°C gelöst. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

Durch die abschliessende 65°C-Behandlung der DNA wird nicht nur das Lösen der DNA erleichtert, es wird ebenfalls ein Grossteil möglicher DNAsen inaktiviert. Dieser Schritt ist als doppelte Sicherung zu verstehen, da die DNAsen schon in einem früheren Schritt inaktiviert wurden.

DNA-Extraktion aus Boden

Aus Boden wurde die DNA mit zwei verschiedenen Methoden extrahiert. Die erste Methode war aus der oben beschriebenen CTAB/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion abgewandelt: Vor der Nukleinsäurefällung mit Isopropanol wurden die Huminstoffe mit 1 vol 7.5 M Ammoniumacetat gebunden (Miller et al. 1999).

Nach der zweiten Methode wurden die Zellen statt mit Lysozym mit Zirkonium-Perlen aufgeschlossen (Miller et al. 1999) und durch Gelfiltration gereinigt (Tsai und Olson 1992).

Die Tauglichkeit der extrahierten DNA zur PCR wurde mit den universellen Primern 27f und 1522r (Lane 1991) für 16S rDNA getestet.

DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen

Aus Agarose-Gelen wurde die DNA mit EasyPure® DNA Purification Kit (Biozym), gemäss der Vorschrift des Herstellers, isoliert. Die Methode beruht auf DNA-Extraktion mit Glasmilch. Resultierende DNA wurde in 15 µl ddH₂O gelöst und bei -20°C gelagert.

Plasmidprep zur Extraktion von Plasmiden aus Zellkultur

E. coli-Plasmide wurden aus jeweils 3 ml Übernacht-Kultur mit dem FlexiPrep-Kit (Amersham Biosciences) isoliert und gereinigt. Die Methode beruht auf DNA-Extraktion mit Glasmilch (Sephaglas). Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die resultierende DNA wurde in 50 µl ddH₂O gelöst und bei -20°C gelagert.

Ethanol-Fällung

Mit der Ethanol-Fällung kann DNA von Salzen gereinigt werden. Zur DNA-Lösung wurden 0.1 Volumen 3 M Natrium-Acetat (pH 5.2) und 2-2.5 Volumina 100% Ethanol gegeben. Die Lösung wurde 10 min in der Mikrozentrifuge bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert (14'000 g). Anschliessend wurde der Überstand mit der Pipette abgesaugt und es wurden 100 µl 70% Ethanol zugegeben. Die Lösung wurde ein zweites Mal 5 min bei 4°C und voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das DNA-Pellet in der Speedvac (Eppendorf) getrocknet und in 10 µl ddH₂O resuspendiert.

Microcon-PCR zur Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung von PCR-Produkten die zur Klonierung oder Sequenzierung weiterverwendet wurden, erfolgte mit Microcon-PCR-Kit (Millipore) gemäss Herstellerangaben. Bei dieser Methode wird über eine kleine Säule aufgereinigt. Die resultierende DNA wurde in 20 µl ddH₂O eluiert und bei -20°C gelagert.

2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR wurde auf den Thermocyclern T1 und TGradient (Biometra) gemacht, beide mit beheizter Abdeckung, in 200- μ l-PCR-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Taq-Polymerase wurde in der Konzentration 1 Unit pro 50 μ l Reaktion angewendet. Die Temperaturprogramme und Primerkonzentrationen wurden entsprechend der Anwendung gewählt: Amplifizierung der 16S rDNA (unten), Amplifizierung von Genen des Chloraromatenabbauweges (Seite 39).

PCR von Fragmenten der 16S rDNA

Die 16S rDNA wurden mit den Primern 27f und 1522r amplifiziert (Lane 1991). Sollte das PCR-Produkt anschliessend sequenziert werden, wurden 30- μ l-Reaktionsansätze, in den übrigen Fällen 20- oder 15- μ l-Ansätze gemacht. Das Reaktionsgemisch wurde entweder fertig eingekauft (1.1 x PCR-Master Mix (1.5 mM MgCl₂), ABgene®) oder selber pipettiert:

Zusammensetzung

Primer Vorwärts		0.2 μ M
Primer Rückwärts		0.2 μ M
PCR-Puffer (10-fach)		1-fach
Tris·HCl (pH 8.8)	100 mM	
KCl	500 mM	
Nonidet P400	8%	
Mg ²⁺		1.5 mM
dNTP (je Base)		0.15 mM
BSA (Rinder Serum Albumin)		0.1 mg/ml
Taq-Polymerase		1 U/50 μ l
	(Gibco BRL, heute Invitrogen, MBI Fermentas)	

Pro 20 μ l Reaktion wurden 1.0 μ l DNA aus den beschriebenen 'Kochpreps' verwendet (Seite 34), beziehungsweise 0.1 μ g DNA aus konventioneller DNA-Extraktion (Seite 35). Der 10-fache PCR-Puffer wurde mit dem Enzym geliefert (Fermentas). Auf einem Thermocycler (T-Gradient oder T1, Biometra) wurde das folgende Temperaturprogramm verwendet:

Temperaturprogramm

	94°C	180 s
30 x	55°C	30 s
	72°C	60 s
	94°C	30 s
	55°C	30 s
	72°C	120 s
	10°C	Pause

5 µl des PCR-Ansatzes wurden auf einem 1%-Agarose-Gel (w/w) überprüft (Seite 40). Nur PCR-Produkte mit einfachen Banden wurden sequenziert. Bei manchen Stämmen wurde in der PCR zum erwarteten 1'500 bp grossen Fragment ein zusätzliches, etwa 1'200 bp grosses Fragment gebildet. In diesem Fall wurde die 'Annealing'-Temperatur von 55°C auf 58°C angehoben und die PCR wiederholt. Die erhöhte Temperatur im 'Annealing' führte wunschgemäss zu einem einzigen PCR-Produkt.

PCR von Genen des Chloraromaten-Abbauweges

Es wurden Fragmente der Gene der Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenase und Chlor-muconat-Cycloisomerase mit PCR amplifiziert. Die spezifischen Primer sind in **Tabelle 5** aufgelistet. Vorlagen-DNA für die PCR wurde in den meisten Fällen durch 'Kochpreps' (Seite 34) gewonnen. Sollte das PCR-Produkt kloniert werden, wurden Reaktionsansätze zu 30 µl gemacht. In den übrigen Fällen wurden 20 µl Ansätze zubereitet. Die Primer wurden 0.5 µM konzentriert. Das Temperaturprogramm wurde unverändert von Thiel (2004) übernommen:

Temperaturprogramm

	94°C	180 s
10 x	60°C	30 s
	72°C	60 s
	94°C	30 s
20 x	50°C	30 s
	72°C	60 s
	94°C	30 s
	55°C	30 s
	72°C	120 s
	10°C	Pause

Als Reaktionsgemisch wurde 1.1 x PCR-Master Mix (1.5 mM MgCl₂, ABgene®) verwendet, alternativ wurde der Reaktionsansatz mit denselben Konzentrationen selber zusammengemischt.

Tabelle 5: Bezeichnung und Spezifität der Primer, die verwendet wurden, um Genfragmente von Enzymen des modifizierten *ortho*-Chloraromaten-Abbauweges zu amplifizieren (Thiel 2004).

Bezeichnung	Spezifität*	Sequenz (5'→ 3')	Produktgrösse (bp)
fw-diox-gram(-)	diox, proteo	ATC GAY RTS TGG CAY TCS ACI C	270
rev-diox-gram(-)		TCR AAG TAG TAY TGS GTS GTC AI	
fw-diox-gram-rhod	diox, actino	TGC CGA TGC GSG MWG ACG AG	270
rev-diox-gram-rhod		CTC GAA GTA SAG CTG GGT SRT CA	
FwClCyclChpA	cyclo, proteo	CAA GGT CAT CAT CGA CTG CTA YYT NGC NCC	810
RevClCyclChpJ		CAC CCA CGG GCC GAT CAR YTC RCA	
FwClCyclChpF	cyclo, proteo	GAC CGG CAA CTA CTC CGC NAA RGC NGC	810
RevClCyclChpD		TGG TGG AGT CCA GCA TGG TNC CNC CRT A	

* Zielsequenz der Primer: **diox**: Chlorbrenocatechin-1,2-Dioxygenase, **cyclo**: Chlormuconat-Cycloisomerase, **actino**: Actinomyceten, **proteo**: Proteobakterien.

Der Nachweis des PCR-Produktes erfolgte mit Agarose-Gelelektrophorese. Nach dem ersten Schritt war allerdings oft kein oder nur ein schwaches PCR-Produkt erkennbar. In diesem Fall wurde 1 µl der ersten PCR als Vorlage für eine Reamplifikation unter identischen Bedingungen verwendet. Alternativ wurde das Volumen der Reaktion mit Reaktions-Puffer verdoppelt und soviel Taq-Polymerase zugegeben, dass die Konzentration des frischen Enzyms der ursprünglich eingesetzten entsprach (doppelt soviel Enzym wie in der ersten Reaktion).

Nachweis von DNA-Fragmenten mit Agarose-Gelelektrophorese

Extrahierte genomische DNA und DNA-Fragmente aus Restriktionsversuchen und PCR wurden mit Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Von PCR-Proben wurden jeweils 5-10 µl, von frisch extrahierter DNA jeweils 1 µl 0.1-fach und 0.01-fach verdünnter DNA verwendet. Die Agarose-Gele wurden in 1-fach TAE-Puffer (Seite 33) hergestellt und entsprechend der erwarteten Grösse des nachzuweisenden Fragmentes konzentriert. Bei Fragmenten der Grösse 200-3'000 bp wurde die Agarose 1.5% (w/w) angewendet. Für den Nachweis von grösseren Fragmenten wurde die Agarose 1% konzentriert. Üblicherweise wurden die Proben bei 1.3-2 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel, wurde die Menge 10-facher Ladepuffer zugegeben, um eine 1-fach konzentrierte Ladepuffer-Lösung zu erhalten.

Restriktionsanalyse der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte der Gene der Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenase wurden mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Die entstandenen Fragmente wurden untereinander verglichen. Um möglichst häufiges Schneiden in kleinen PCR-Fragmenten zu garantieren, wurden Restriktionsenzyme mit 4-Basenpaar-Erkennungssequenz ausgesucht: *Bsh1236I* (CG[^]CG), *BsuRI* (GG[^]CC), *MboI* ([^]GATC), *TaqI* (T[^]CGA) und *TruI* (T[^]TAA) (alle Fermentas). Restriktionsverdauungen wurden mit 15 µl eines nicht gereinigten PCR-Ansatzes nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Proben wurden auf einem 20%-Polyacrylamidgel (v/v) in 1-fachen TBE-Puffer (Seite 33) aufgetrennt (200 x 200 x 0.8 mm). Die Polymerisation der Monomere wurde durch Zugabe von 10 µl 10% APS (Ammoniumperoxodisulfat) und 1 µl TEMED (Tetramethylethyldiamin) pro ml Gellösung eingeleitet. Die Proben wurden so auf das Gel aufgetragen, dass jeweils vier Proben von zwei Molekulargewichtsmarkern umrahmt wurden. Der Ladepuffer wurde als 10-fache Stammlösung gelagert und 1-fach angewendet (Seite 33). Das Gel wurde mit einem Kühlaggregat (F12-EC, Julabo) oder im Kühlraum auf 4°C gekühlt und über Nacht bei 10 mA laufen gelassen.

Nachweis der DNA mit Silberfärbung

Aufgetrennte DNA-Fragmente wurden durch Silberfärbung sichtbar gemacht (Bassam et al. 1991). Alle Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser hergestellt, das Gel wurde in einer wenig grösseren Wanne leicht geschüttelt (50-70 UPM).

Stammlösungen zur Silberfärbung von DNA-Gelen

Fixierlösung

Ethanol (techn.)	10% (v/v)
Essigsäure	0.5% (v/v)

Silberfärbelösung 0.19%

AgNO ₃	0.19% (w/v)
-------------------	-------------

Entwicklerlösung

NaOH	1.5%
Formaldehyd	0.15% (v/v)

Stop-Lösung

NaHCO ₃	0.75% (w/v)
--------------------	-------------

DNA Fixieren: Das Gel wurde 10 min in Fixierlösung inkubiert. **Silberfärbung:** Das Gel wurde 20 min in Färbelösung inkubiert und anschliessend kurz mit doppelt destilliertem Wasser gewaschen. **Entwicklung:** Abhängig von der Intensität der sichtbaren Banden wurde das Gel in Entwicklerlösung geschwenkt, üblicherweise etwa 20 min. **Abbruch der Entwicklung:** Der Entwicklungsvorgang wurde durch 15 min Inkubation in Stop-Lösung abgebrochen. **Lagerung:** Das Gel wurde nass in Plastikfolie eingeschweisst und im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert. Die Färbelösung wurde mehrmals verwendet.

2.4.4 Sequenzierung

Reagenzien und Geräte

Die Sequenzierungs-PCR wurde mit einem der folgenden 'Kits' durchgeführt: Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP (Amersham Biosciences) oder CycleReader™ Auto DNA Sequencing Kit (Fermentas). Die Proben wurden mit einem Sequencer (Long reader 4200, Li-Cor) auf einem 66 cm langen und 0.22 mm dicken Polyacrylamidgel aufgetrennt:

Zusammensetzung Sequenziergel

Harnstoff	21.0 g
TBE-Puffer (10-fach)	5.0 ml
ddH ₂ O	30.0 ml
Rapid gel XL (40%, Amersham Biosciences)	5.8 ml

Die Polymerisation wurde mit 350 µl 10% APS (Ammoniumperoxodisulfat) eingeleitet, und mit 75µl TEMED (Tetramethylethylendiamin) verstärkt.

Sequenzier-Primer

PCR-Produkte von 16S rDNA-Fragmenten wurden direkt sequenziert, passend zur Sequenz der 16S rDNA wurden IRD-800-markierte Primer bestellt (MWG-Biotech). In den anderen Fällen wurden PCR-Produkte zuerst in den Vektor pBluescript II SK+ kloniert und mit den IRD-800-markierten Primern T3 und T7 (MWG-Biotech) sequenziert (**Tabelle 6**).

Tabelle 6: Sequenzen der IRD-800-markierten Sequenzier-Primer.

Name* **	Bestimmung	Sequenz 5' -> 3'	Quelle
T3	T3 Promotorsequenz	CGC GCA ATT AAC CCT CAC TAA AG	Fermentas, Produkt-Katalog
T7	T7 Promotorsequenz	GCG CGT AAT ACG ACT CAC TAT AG	Fermentas, Produkt-Katalog
27f	16S rDNA	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	(Lane 1991)
1387r	16S rDNA	GGG CGG WGT GTA CAA GGC	(Marchesi et al. 1998)
1522r	16S rDNA	AAG GAG GTG ATC CAN CCG CA	(Lane 1991)

* Die Primer T3 und T7 sind komplementär zur entsprechenden RNA Polymerase Promotor Region auf dem verwendeten pBluescript II SK+ Vektor.

** Die Primer 27f - 1522r benennen die *E. coli* Position auf der 16S rDNA, an denen die Primer binden. 'f' und 'r' beschreiben Vorwärts- und Rückwärtsprimer).

Sequenzierung

Die Konzentration der gereinigten PCR-Produkte oder Plasmidpreps wurde nur grob auf einem Agarose-Gel bestimmt. Entsprechend der Stärke der Bande und eigenen Erfahrungen, wurde 5-8 µl der gereinigten DNA (Seite 37) als Vorlage in der Sequenzierungs-PCR verwendet. Die markierten Primer und Sequenzierreagenzien wurden nach Angaben des Herstellers zugesetzt. Das Gerät wurde unter folgenden Bedingungen benutzt:

Datenspeicherung

Signal Filter	3
Bin Size	17
Pixel Size	16
Images (beobachtete Wellenlänge)	800 nm
Motor Speed	3

Laufbedingungen

Dauer Vorlauf	10 min
Dauer Hauptlauf	13 h
Spannung	2800 V
Stromstärke	40 mA
Leistung	55 W
Temperatur	45°C

Die zu untersuchenden DNA-Fragmente wurden in beiden Richtungen sequenziert. Die Rohdaten wurden mit dem Programm eSeq (V1.1 und V1.2) ausgewertet. Die resultierenden Sequenzen wurden anschliessend mit dem Staden Package (Bonfield et al. 2002) zusammengefügt.

Zur vorläufigen Einordnung der Sequenziergebnisse wurden die partiellen Sequenzen oft mit BLAST (Altschul et al. 1990) mit der NCBI-Datenbank verglichen. Sequenzen der 16S rDNA wurden mit Hilfe von Blastn, potentielle Gensequenzen mit Hilfe von Blastx verglichen. In beiden Fällen wurde die zusammengefasste Datenbank 'nr' gewählt (All GenBank, RefSeq Nucleotides, EMBL, DDBJ, PDB).

2.4.5 'Southern-Blot'

Auf dem 'Southern-Blot' wird das gesamte Genom eines Organismus mit einer kurzen DNA-Sonde hybridisiert. Die Methode wird üblicherweise zum Nachweis von Genen verwendet. Das zu untersuchende Genom wird mit einem Restriktionsenzym in verschieden grosse Fragmente zerschnitten und im Agarose-Gel aufgetrennt. Die DNA wird auf eine Nylonmembran transferiert, immobilisiert und mit einer markierten Sonde hybridisiert und nachgewiesen. Die Auftrennung der Genom-Fragmente nach Grösse ermöglicht es, aus einem identischen Agarose-Gel, DNA-Fragmente derselben Grösse wie die mit der Sonde hybridisierten, zu isolieren.

Vorbereitungen zum 'Southern Blot'

Je 1 µg gereinigte genomische DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Es wurden Enzyme mit 6-bp-Erkennungssequenz verwendet, die in der 'multiple cloning site' des Vektors pBluescript II SK+ schneiden: *Bam*HI, *Xho*I, *Sal*I, *Pst*I, *Hind*III und *Eco*RI. Die Ansätze wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Verdaute DNA wurde auf einem 15 cm langen Agarose-Gel (0.8%, TAE-Puffer, Seite 33) über Nacht (12-14 h) mit 1.3 V/cm aufgetrennt. Als Molekulargewichtsmarker wurde mit *Hind*III und *Eco*RI verdaute lambda-Phagen-DNA verwendet (Enzyme und Phagen-DNA: Gibco BRL, heute Invitrogen). Dieser Standard hat Fragmente der Grössen: 21'226, 5'148, 4'973, 4'268, 2'022, 1'904, 1584, 1'375, 947, 831 und 564 bp. In späteren Versuchen wurde zur präziseren Bestimmung der Fragmente über 5 kb DIG-markierte, *Hind*III-verdaute lambda-Phagen-DNA verwendet (23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564, 125 bp, Boehringer Mannheim). Die mit Ethidiumbromid im Gel nachgewiesene DNA wurde fotografisch dokumentiert. Der DNA-Transfer vom Gel auf die Nylonmembran wurde gemäss Anleitung durchgeführt (Brown 2000).

Stammlösungen für 'Southern Blot'(Brown 2000)

HCl-Lösung		0.25 M
Denaturierungslösung		
NaCl	1.5 M	
NaOH	0.5 M	
Neutralisierungslösung		
NaCl	1.5 M	
Tris·HCl	0.5 M, pH 7.0	
SSC (sodium chloride/sodium citrate)		20-fach
NaCl	3 M	
Na ₃ Citrat·2H ₂ O	0.3 M	
pH 7.0 mit 1 M HCl eingestellt		
SSC		2-fach
SSC 20-fach	10% (v/v)	

Vorbereitung des Agarose-Gels: Das Gel wurde 10-30 min in der HCl-Lösung geschwenkt, wodurch die DNA partiell depurinert wurde. Als Folge der Depurinierung entstehen Einzelstrangbrüche, wodurch die DNA einfacher auf die Membran transferiert wird. Anschliessend wurde das Gel 10 min mit doppelt destilliertem Wasser gewaschen und 2 mal 15 min in der Denaturierungslösung geschwenkt. Einzelsträngige DNA bindet einfacher an die Sonde als doppelsträngige. Daraufhin wurde der pH des Agarose-Gels 2 mal 15-20 min in der Neutralisierungslösung neutralisiert. **Vorbereitung der Nylonmembran:** Die positiv geladene Nylonmembran (HybondTM-N⁺, Amersham Biosciences) wurde 5 min in doppelt destilliertem Wasser getränkt und anschliessend 5 min in Neutralisierungslösung äquilibriert. **DNA-Transfer durch Kapillarkräfte:** Das **Agarose-Gel** wurde auf eine Glasplatte gelegt, darauf kam die Membran, darüber 15 Whatman 3M Filterpapiere, mehrere Lagen Papierhandtücher und ein Gewicht (~1 kg) zum Andrücken. Nach etwa 3 h wurde die Membran kurz in 2-fachem SSC-Puffer gewaschen, luftgetrocknet und durch 4-stündige Inkubation bei 70°C immobilisiert. Wie später in Erfahrung gebracht wurde, ist die Immobilisierung der DNA bei 70°C mit der verwendeten Membran nicht notwendig.

DNA-DNA-Hybridisierung

Die DNA auf dem 'Southern Blot' wurde mit einer DIG-markierten Sonde hybridisiert. Um grosse Mengen Sonden-DNA zu erhalten, wurde das PCR-Produkt in den Vektor

pBluescript II SK+ eingefügt und in *E.coli* DH5 alpha vermehrt. Das gesuchte Stück DNA wurde durch Plasmidprep (Seite 37) aus der Zellmasse isoliert, mit dem Restriktionsenzym *PvuII* (Fermentas) rausgeschnitten, durch Agarose-Gelelektrophorese (Seite 40) von den Vektorrückständen befreit und schliesslich durch Extraktion vom Agarose-Gel gereinigt (Seite 37).

Die Sonden-DNA wurde in einer Klenow-Reaktion gemäss Herstellerangaben markiert (DIG DNA Labeling Mix, Boehringer Mannheim: Mit Hexanukleotidmix, Klenow Enzym, dNTP, DIG-dUTP). Die Prähybridisierung, Hybridisierung, das anschliessende Waschen, und die Detektion der Sonde wurde wie in Miltenburg et al. (1995) beschrieben durchgeführt.

Lösungen für Hybridisierung (Miltenburg et al. 1995)

SSC-Puffer		20-Fach
NaCl	3 M	
Natriumcitrat	0.3 M	
pH wurde auf 7.0, die Lösung autoklaviert		
Hybridisierungslösung (frisch zubereitet)		
SSC-Puffer	5-fach	
Blockingreagenz	1% (w/v)	
N-Lauroylsarcosin	0.1% (w/v)	
SDS	0.02% (w/v)	
Waschlösung A (frisch zubereitet)		
SSC-Puffer	2-fach	
SDS	0.1% (w/v)	
Waschlösung B (frisch zubereitet)		
SSC-Puffer	0.5-fach	
SDS	0.1% (w/v)	

Prähybridisierung: Die Membran wurde mit der Hybridisierungslösung zusammen in einen Plastikbeutel eingeschweisst und im Wasserbad mindestens 3 h inkubiert. Gelegentlich wurde der Plastikbeutel etwas geschwenkt. Die Hybridisierungstemperatur betrug 61°C. Später stand ein Hybridisierungsofen (HB-1000 Hybridizer, UVP) mit rotierenden Glaszylindern zur Verfügung. **Hybridisierung:** Der Plastikbeutel wurde an einer Ecke leicht geöffnet, um die frisch denaturierte, markierte Probe zugeben zu können. Anschliessend wurde der Plastikbeutel wieder verschweisst. Der Glaszylinder

mit Schraubverschluss wurde entsprechend kurz geöffnet, um die Sonde zuzugeben. Hybridisiert wurde über Nacht, ebenfalls im Wasserbad bzw. im Hybridisierungssofen bei 61°C. **Waschen:** Am nächsten Tag wurde bei Raumtemperatur zunächst die nicht gebundene Sonde mit der Waschlösung A weggespült. Dann wurde mit der Waschlösung B zwei mal 15 min bei 61°C stringent gewaschen.

Nachweis der DIG-markierten Sonde

Die Sonde wurde mittels Niederschlagsmethode durch mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Anti-DIG-Antikörpern (DIG Nucleic Acid Detection Kit, Boehringer Mannheim, heute Roche Applied Science) nachgewiesen. Als Farbstoff wurde 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat (BCIP) verwendet, das nach seiner Dephosphorylierung oxidativ in einen blauen Indigofarbstoff überführt wird. Als Oxidationsmittel diente Nitroblau-Tetrazoliumsalz (BNT), welches bei dieser Reaktion ebenfalls zu einem blauen Farbstoff reagiert. Dabei wurde die Farbintensität verstärkt, und die Detektion wurde sensitiver.

Lösungen für den Nachweis der Sonde (Miltenburg et al. 1995)

Waschpuffer

Maleinsäure	0.1 M
NaCl	0.15 M, pH 7.5
Tween	0.3% (v/v)

Maleinsäurepuffer

Maleinsäure	0.1 M
NaCl	0.15 M, pH 7.5

Detektionspuffer

Tris-HCl	0.1 M
NaCl	0.1 M, pH 9.5

Blockierungsstammlösung 10-fach

Blockierungsreagenz	10% (w/v)
in Maleinsäurepuffer zubereitet	

Blockierungslösung 1-fach (frisch zubereitet)

10-fach Blockierungslösung	10% (w/v)
in Maleinsäurepuffer zubereitet	

Farbsubstratlösung (frisch zubereitet)

NBT/BCIP	200 µl
Detektionspuffer	ad 10 ml
wurde lichtgeschützt aufbewahrt	

Vorbereitung: Die Membran wurde kurz in Waschpuffer gewaschen und anschliessend 30 min in 100 ml Blockierungslösung inkubiert. **Antikörper:** Anschliessend wurde 30 min in 20 ml Antikörperlösung inkubiert, 2 mal 15 min in 100 ml Waschpuffer gewaschen und anschliessend 2-5 min in 20 ml Detektionspuffer äquilibriert. **Färbung:** Die Membran wurde in 10 ml frisch hergestellte Farbsubstratlösung gegeben und in einem Gefäss im Dunkeln inkubiert. Während der Farbentwicklung wurde das Gefäss nicht geschüttelt. **Abbruch der Färbung:** Das Farbpräzipitat bildete sich in wenigen Minuten. Die Reaktion wurde mit doppelt destilliertem Wasser gestoppt, sobald die Signale befriedigend stark waren.

Abschätzung der Fragmentgrösse

Die **Fragmentgrösse** auf dem 'Blot' wurde mit Hilfe einer Näherungsformel anhand des Längenstandards abgeschätzt (Sambrook et al. 1989):

$$\text{Distanz} = \text{Dilatation} * (4 - \log(\text{Fragmentgrösse}))$$

bzw: $\text{Fragmentgrösse} = 10^{\text{exp}(4 - \text{Distanz}/\text{Dilatation})}$

Distanz ist der Abstand der betrachteten Bande vom Ladeort. **Dilation** (Ausdehnung) ist ein Summenfaktor für die Laufbedingungen des Gels, dessen Wert sich aus einem Wertepaar des Markers (Fragmentgrösse und Distanz) mit der genannten Formel berechnen lässt. In den betrachteten Gelen zeigte sich, dass sich die Dilation noch besser mit einer linearen Regression durch alle Wertepaare (für Fragmentgrösse < 10'000) des Längenmarkers annähern lässt (Berechnungen mit Microsoft Excel).

Isolierung von Restriktionsfragmenten aus Agarosegelen

Zur genauen Bestimmung der Genomfragmente, die mit der Sonde hybridisiert haben, wurden entsprechende DNA-Fragmente aus einem zweiten Agarose-Gel isoliert. Hierzu wurde die genomische DNA mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten und unter möglichst identischen Bedingungen, wie auf dem 'Southern Blot', elektrophoretisch

aufgetrennt. Aus dem zweiten Gel sollten Fragmente derselben Grösse isoliert werden wie die im 'Southern Blot' gefundenen. Zur genaueren Untersuchung sollten die Fragmente in einen Sequenziervektor, wie pBluescript II SK+, kloniert werden.

Nach Färbung des zweiten Agarose-Gels mit Ethidiumbromid wurde der Bereich mit den DNA-Fragmenten der richtigen Grösse mit Hilfe des Molekulargewichtsmarkers abgeschätzt (Seite 48). Vorzüglicherweise wurde derselbe Molekulargewichtsmarker wie für den 'Southern Blot' verwendet. Auf dem UV-Tisch wurde dann möglichst zügig ein 0.5-1 cm langes Agarblöckchen in der Breite der Spur ausgeschnitten, in dem das Fragment der bekannten Länge erwartet wurde. Anschliessend wurde die gesuchte DNA aus der Agarose isoliert (Seite 37) und in einen Sequenzierungsvektor kloniert (unten).

2.4.6 Klonierungen

Transformationskompetente Zellen

Zum Transformieren wurde *E. coli* DH5 alpha (Gibco BRL, heute Invitrogen) verwendet. Der Stamm wurde aus der Stammsammlung direkt auf LB-Agarplatten ohne Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C gezogen. Ausgehend von einer Kolonie dieser Platte wurden die transformationskompetenten Zellen zubereitet (Seidman 1997). Die kompetenten Zellen wurden bei -80°C gelagert.

Lösungen zur Transformation

CaCl₂-Lösung, eiskalt

CaCl ₂	60 mM
Glycerin	15%
PIPES	10 mM, pH 7
(Piperazin-N,N'-bis(2-hydroxypropansulfonsäure))	

1. Eine einzelne Kolonie des Stammes *E. coli* DH5 alpha wurde in 50 ml LB-Medium inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert (250 UPM).
2. Am Morgen wurden von dieser Kultur 4 ml in 400 ml frisches LB-Medium transferrt. Die frische Kultur wurde bis zu einer OD (590) von 0.375 kultiviert (37°C, 250 UPM).

3. Die Kultur wurde in acht vorgekühlte 50-ml-Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und 5-10 min auf Eis gekühlt.
4. Die Zellen wurden 7 min zentrifugiert (4°C, 1600 g), der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 10 ml eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert.
5. Ein zweites Mal wurden die Zellen 5 min zentrifugiert (4°C, 1100 g), der Überstand wurde verworfen und das Pellet noch einmal in 10 ml eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert.
6. Die resuspendierten Zellen wurden 30 min auf Eis gelagert und danach ein drittes mal 5 min zentrifugiert (4°C, 1100 g), der Überstand wurde wieder verworfen, das dritte Mal wurden die Zellen nur in 2 ml eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert.
In diesem Schritt ist es sehr wichtig, alle Zellen zu resuspendieren, die Zellen können aber einige Tage auf Eis gelagert werden. Die Kompetenz der Zellen ist am höchsten nach 12-24 h Lagerung auf Eis.
7. Die Zellen wurden in vorgekühlten Reaktionsgefässen in 500 µl Aliquots verteilt und sofort bei -80°C gelagert.

Klonierungsvektor

Der Plasmidvektor pBluescript II SK+ (Stratagene) wurde verwendet, um PCR-Produkte oder genomische DNA-Fragmente zu klonieren. Der Vektor wurde aus einer 10-ml-Kultur des Stammes *E. coli* DH5 alpha (pBluescript II SK+) gewonnen (Seite 37). Das gereinigte Plasmid wurde bei -20°C gelagert.

Um **PCR-Produkte** effizient zu ligieren, wurde dem *EcoRV*-geschnittenen pBluescript II SK+ an den 3'-Enden mindestens ein dThymidin angehängt (Finney 2000). Der so zubereitete T-Vektor wurde mit Microcon-PCR gereinigt (Seite 37). Zur **Ligation genomischer Restriktionsfragmente** wurde pBluescript II SK+ mit dem entsprechenden Restriktionsenzym geschnitten. Um die Religation des geöffneten Vektors zu verhindern, wurden die 5'-Enden mit Alkalischer Shrimp Phosphatase (Boehringer Mannheim, heute Roche Applied Science) gemäss den Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Die Phosphatase wurde anschliessend 15 min bei 65°C deaktiviert. Der Vektor wurde mit Microcon-PCR gereinigt (Seite 37).

Ligation und Transformation

DNA-Fragment und Vektor wurden mit T4 DNA Ligase (MBI Fermentas) nach Herstellerangaben ligiert. Kompetente *E. coli* DH5 alpha-Zellen (Seite 49) wurden mit dem Vektor durch Hitzeschock transformiert (Struhl 1987; Seidman 1997).

Verwendete Lösungen (Struhl 1987; Seidman 1997).

X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside)	20 mg/ml
in DMSO	
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)	1 M
in doppelt destilliertem Wasser	

1. 10 ng DNA (10-25 μ l) aus einer Ligation von Vektor mit gesuchter DNA wurden in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und auf Eis gelagert.
2. Die kompetenten Zellen (Seite 49) wurden aufgetaut und sofort wieder auf Eis gelagert. 200 μ l davon wurden in die Reaktionsgefäße gegeben, die Gefäße wurden leicht geschüttelt und 10 min auf Eis gelagert.
Überschüssige kompetente Zellen wurden nicht weiter verwendet, sondern fortgeworfen.
3. Die Zellen mit Vektor wurden 2 min im 42°C warmen Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt.
4. In jedes Reaktionsgefäß wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und es wurde 1 h bei 37°C und 250 UPM geschüttelt.
5. In der Zwischenzeit wurde jede LB-Amp50 Platte mit 3.3 μ l IPTG- und 40 μ l X-Gal-Lösung bestrichen (Sambrook und Russel 2001b).
IPTG und X-Gal werden zur blau/weiss Selektion der transformierten Kolonien eingesetzt. Diese Methode erlaubt auf einfache Weise, transformierte Kolonien mit leerem Vektor (blau) von solchem mit DNA-Fragment im Vektor (weiss) zu unterscheiden.
Die Methode beruht auf alpha-Komplementation der beta-Galaktosidase: Die beta-Galaktosidase im verwendeten *E. coli* Stamm trägt eine Deletion und ist erst mit dem auf dem Vektor codierten alpha-Peptid funktionsfähig. Dieses Peptid kann allerdings nur in Plasmiden ohne 'Insert' richtig transkribiert werden.
Das zugegebene IPTG fungiert als Induktor der chromosomal codierten beta-Galaktosidasen-Untereinheit. X-Gal ist die Vorstufe eines Indigo-Farbstoffes und wird durch beta-Galaktosidase aktiviert.
6. Die transformierten Zellen wurden in zwei verschiedenen Verdünnungen auf die vorbereiteten LB-Amp50 Platten gestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.
7. Am folgenden Tag wurden nach Ausbildung der blauen Farbe (nach 12-16 h) die nicht blau gefärbten Kolonien (die weissen) weiterverwendet.

Bezeichnung der Klone

Zur einfachen Identifikation der hergestellten Klone, wurden die drei wichtigsten Eigenschaften in deren Bezeichnung festgehalten. Diese Eigenschaften sind: Das untersuchte Gen (cyclo, diox), der Bakterienstamm von dem die ursprüngliche DNA

stammt (AZDx, Mxxx) und ein Buchstaben aus dem lateinischen Alphabet (a, b, ..). Beispiele sind: `cyclo_M013_b`, `diox_AZD9W2_c`, `cyclo_M054_c`.

2.5 Computerprogramme

2.5.1 Staden Package

Die DNA-Sequenzen wurden mit Staden Package, Version 2002.0 (Bonfield et al. 2002) auf Mac OS 10.2 bearbeitet. Mit Pregap4 1.3 wurden die Rohdaten von Vektorsequenzen und Sequenzen schlechter Qualität bereinigt. Mit Gap4 4.7 wurden Sequenzabschnitte zu zusammenhängenden Konsenssequenzen zusammengefügt. Die vom Programm errechnete Konsenssequenz wurde überprüft und von Hand korrigiert.

2.5.2 ARB

Alle Dendrogramme wurden mit ARB (Ludwig et al. 2004) erstellt. Die Berechnungen wurden auf der Programmversion 03_02_04 auf Mac OS 10.2 gemacht.

Dendrogramm mit Sequenzen der 16S rDNA

Die auf der 16S rDNA beruhenden Dendrogramme wurden mit der ARB-Datenbank (12. Juni 2002) erstellt. Bei Bedarf wurde diese mit Sequenzen aus der GenBank (Burks et al. 1985) ergänzt. In der Datenbank sind die Sequenzen aufgrund ihrer Sekundärstruktur untereinander ausgerichtet ('aligned'). Die importierten Sequenzen wurden unter die vorhandenen Sequenzen ausgerichtet.

Die Dendrogramme wurden mit der 'maximum likelihood'-Methode gerechnet, kurze Sequenzen (< 1350 bp) wurden dem fertig gerechneten Dendrogramm mit der 'Parsimony'-Methode zugefügt. Als Parameter wurden die Filter für die betrachtete Bakteriengruppe und die Anfangs- und Endposition der kürzesten beteiligten Sequenz eingegeben. Es wurden die in der Datenbank vorhandenen Filter verwendet (**Tabelle 7**). Ein Filter gibt an, welche Nukleotidpositionen bei der Berechnung der Ähnlichkeit der Sequenzen berücksichtigt werden sollen und wird eingesetzt um den Einfluss von hochvariablen Positionen zu verringern. Die Filter wurden mit der Datenbank geliefert,

sie wurden errechnet aus der Häufigkeit der homologen Nukleotide: Ein Nukleotid wird bei der kommenden Berechnung des Dendrogrammes berücksichtigt werden, wenn es in mindestens 50% der bei der Berechnung des Filters vorkommenden Sequenzen aufgetreten ist. Die Distanzmatrices wurden ohne Filter gerechnet, jedoch beschränkt auf die grösste gemeinsame Sequenz der beteiligten Sequenzen.

Tabelle 7: Zur Berechnung der Dendrogramme hinzugezogene Filter aus dem Programm ARB.

Filter	Berücksichtigte Bakteriengruppe
alphaproteobacteria_rr5_may02	alpha-Proteobakterien
betaproteobacteria_rr5_may02	beta-Proteobakterien
gammaproteobacteria_rr5_may02	gamma-Proteobakterien
actinobacteria_rr5_may02	Gram-positive Bakterien

Dendrogramm mit Aminosäuresequenzen

Es wurde je eine ARB-Datenbank für die Aminosäuresequenzen der Chlormuconat-Cycloisomerasen und der Chlorbrenzcatechin-1,2-dioxygenasen erstellt. Die Sequenzen wurden von GenBank (Burks et al. 1985) bezogen. Von 'Pfam' (Bateman et al. 2002) wurde ein 'family alignment' der entsprechenden Proteinfamilie geladen. In diesen Alignments werden die Aminosäuren aufgrund ihrer Funktion im Protein untereinander gestellt. Mit dem Programm Cn3D v4.1 (Hogue 1997) wurden diese Alignments um weitere Sequenzen ergänzt (BLAST Algorithmus). Von den eigenen Isolaten wurden die Sequenzen von klonierten PCR-Produkten erhalten, diese wurden mit dem genetischen Code N° 11 für Bakterien (Nakamura et al. 2000) in Aminosäuresequenzen übersetzt.

Die Dendrogramme wurden mit der 'maximum likelihood'-Methode berechnet (Jones-Taylor-Thornton Wahrscheinlichkeitsmodell). Für das Chlormuconat-Cycloisomerasen-Dendrogramm wurden die Sequenzen auf der Länge der PCR-Produkte berücksichtigt (251 AS = 65% der Gesamtproteinlänge). Als 'Outgroup' wurden die Sequenzen von Chlormuconat-Cycloisomerasen ähnlichen, hypothetischen Proteinen von *Bacillus subtilis* und *Halobacterium* sp. NBC1 verwendet.

Für das Dendrogramm der Chlorbrenzcatechin-1,2-dioxygenasen wurden die Sequenzen auf der vollen Länge der Enzymsequenzen (242 AS) gerechnet. Die Sequenzen der PCR-Produkte (75 AS 31% = der Gesamtproteinlänge) wurden dann mit 'Quick add

using Parsimony' dazugerechnet. Als 'Outgroup' wurden Sequenzen, oder Sequenzhomologe der Hydroxyhydrochinon-1,2-Dioxygenasen von *Agrabacterium tumefaciens* C58, *Burkholderia cepacia* AC1100 und *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 gewählt.

Tabellen und Berechnungen in Excel

HPLC Messungen und Daten der Wachstumskurve wurden mit MS Excel erfasst und verrechnet.

2.5.3 Restrifind9.pl

Es wurde ein Programm geschrieben zur Unterstützung der Planung eines RFLP Experimentes: Das Programm restrifind9.pl hilft, die Diversität von homologen Gensequenzen zu untersuchen. Es findet die Unterschiede in DNA-Sequenzen und sucht die Restriktionsenzyme, die diese Polymorphismen in einer Gelelektrophorese aufzeigen würden.

Als Eingabe wird eine Datei mit den zu untersuchenden Sequenzen erwartet. Ausgegeben wird neben einer Liste aller Restriktionsenzyme, die bei den untersuchten Sequenzen einzigartige Muster produzieren, auch die Simulationen von entsprechenden RFLP-Bildern. Das Programm wurde in Perl geschrieben und verwendet Module von bioperl 1.2 (Stajich et al. 2002). Das Bioperl Modul Bio::Tools::Run::Alignment::Clustalw 'aligned' die Sequenzen mit dem Programm Clustalw (Thompson et al. 1994).

3 Resultate

3.1	Anreicherung mit 2,4-D-Azotobacter-Medium	55
3.1.1	Isolierung	56
3.1.2	Charakterisierung der Isolate	57
3.2	Anreicherung in Arginin-Glycerin-Salz-Medium	62
3.2.1	Isolierung	62
3.2.2	Flüssigkultur in Zellkulturfläschchen	63
3.2.3	Charakterisierung der Isolate	63
3.2.4	Weiterführende Anreicherung	64
3.3	Direkte Isolierung von Chlorbenzol-Verwertern	64
3.3.1	Direkte Isolierung	64
3.3.2	Charakterisierung der Isolate	66
3.4	Gene des Chloraromaten-Abbauweges	74
3.4.1	Chlormuconat-Cycloisomerase	75
3.4.2	Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenase	81
3.4.3	Perl-Programm zur Simulation einer Restriktionsanalyse	88

3.1 Anreicherung mit 2,4-D-Azotobacter-Medium

Azotobacter-Medium ist ein stickstofffreies Mineralmedium zur Anreicherung von Stickstoff-Fixierern. *Azotobacter* sind stickstofffixierende γ -Proteobakterien. Zur Anreicherung von Chloraromatenabbauern wurde das vorgeschlagene Mannitol (Holt und Krieg 1994) durch 2,4-D ersetzt. Von der ersten Anreicherungskultur bis zu den ersten Reinkulturen von 2,4-D-Abbauern vergingen über 10 Monate. Die Kulturen und die isolierten Bakterien wuchsen ausgesprochen langsam.

Unabhängig von der Verdünnung, mit der die dritte Anreicherungskultur schliesslich auf *Azotobacter*-Festmedium plattiert wurde (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}), konnten nach einer Woche nur ein bis zwei Kolonien pro Platte gezählt werden. Eine weitere Woche später wurden alle diese Kolonien mit der Dreistrichmethode auf frischen Platten vereinzelt.

3.1.1 Isolierung

Insgesamt wurden 22 Kolonien auf 2,4-D-haltigem Mineral-Festmedium vereinzelt. Der Gram-Schnelltest (KOH-Test) und ein Replikatest zum Wachstum auf 2,4-D deuteten auf 2,4-D-abhängiges Wachstum und auf Gram-positives Verhalten einiger Isolate hin. Allerdings stellte sich wenig später heraus, dass es sich bei den meisten untersuchten mutmasslichen Isolaten um Mischkulturen handelte, den Ergebnissen des Gram-Schnelltests konnte also keine grössere Beachtung geschenkt werden. In flüssigem Mineralmedium (1.5 mM oder 3.0 mM 2,4-D) angezogen, hatten die Isolate mit der höchsten Abbaurate das verfügbare 2,4-D in 40 Tagen vollständig abgebaut. Kulturen hingegen, die in 40 Tagen weniger als 25% des Substrates abgebaut hatten, wurden nicht weiter untersucht (**Tabelle 8**).

Sechs Kulturen waren für weitere Untersuchungen interessant. Bis Reinkulturen vorlagen, mussten diese Stämme allerdings noch mehrmals auf festes Mineralmedium überimpft werden. Bei einigen Kulturen wurden Kolonien mit unterschiedlichem Erscheinungsbild erkannt. Die sich morphologisch unterscheidenden Kolonien wurden nochmals einzeln auf 2,4-D-Abbau getestet. Die Bezeichnung für das unterschiedliche Aussehen floss in den Stammnamen ein: Beige (B), Weiss (W), Glatt (G).

Tabelle 8: Ergebnisse der Anreicherung in *Azotobacter*-Medium mit 2,4-D als einzigem Substrat*.

Inokulum	Kontamination	Anreicherung 2,4-D [mM]**	Mischkultur	Abbau [%/40 d]***	Reine Stämme
Boden U	PCB, TCB	3.0/6.0	AZD5	100	AZD5_G10
Boden U	PCB, TCB	3.0/6.0	AZD8	100	AZD8_5
Boden U	PCB, TCB	3.0/6.0	AZD9	56	AZD9_B1 AZD9_B2 AZD9_W1 AZD9_W2
Boden U	PCB, TCB	3.0/6.0	AZD10	27	AZD10a_EZLN1 AZD10a_EZLN2
Boden U	PCB, TCB	3.0/6.0	AZD11	29	AZD11_3

* Nicht aufgeführt sind Isolate, die in Replikatests negative Ergebnisse lieferten, sowie Isolate, die in 40 Tagen in Flüssigkultur weniger als 25% des zugegebenen 2,4-D abgebaut hatten. ** 2,4-D-Konzentration der drei folgenden Anreicherungskulturen: 3.0, 6.0, 3.0 mM. . *** Gemessen nach 40 d in Flüssigkultur in % der ursprünglich eingesetzten Menge.

Insgesamt wurden neun Reinkulturen isoliert, die mit 2,4-D als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen. Die Stämme wurden folgendermassen benannt: AZD5_G10, AZD8_5, AZD9_B1, AZD9_B2, AZD9_W1, AZD9_W2, AZD10a_EZLN1, AZD10a_EZLN2 und AZD11_3. Die Stämme AZD10a_EZLN1 und AZD10a_EZLN2

stammen jedoch nicht von zwei verschiedenen Kolonien einer Agarplatte, sondern wurden von einer Reinkultur zu verschiedenen Zeitpunkten isoliert und der Stammsammlung zugeführt. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die beiden Stämme identisch sind. Um sie jedoch in der Stammsammlung unterscheiden zu können, wurden sie nummeriert.

Alle Stämme wurden aus der Anreicherungskultur mit den 2,4-D-Konzentrationen 3.0 - 6.0 - 3.0 mM, aus Landwirtschaftserde isoliert. Aus den Umweltproben Boden U und Boden A (**Tabelle 3**, Seite 15), sowie von den Anreicherungen mit den von 1.5 mM auf 3.0 mM wechselnden 2,4-D-Konzentrationen, konnten letztlich keine Reinkulturen von 2,4-D-Abbauern isoliert werden.

Wurden die Isolate aus der Stammsammlung (-80°C) direkt auf 2,4-D-haltiges Mineral-Festmedium gestrichen, dauerte es mindestens zwei Wochen, bis kleine Kolonien erkennbar waren. Im beobachteten Zeitraum von einem Monat, konnte bei keinem der isolierten Stämme Wachstum auf NB- oder TSA- Komplexmedium beobachtet werden.

3.1.2 Charakterisierung der Isolate

Übersicht

Alle Isolate der *Azotobacter*-Anreicherung wurden aufgrund ihrer 16S rDNA taxonomisch zugeordnet. Der Sequenzvergleich erlaubte die Einteilung zu den *Afipia*- bzw. *Bradyrhizobium*-ähnlichen α -Proteobakterien.

Kultivierung

Die Bakterien wuchsen auf Mineralmedium-Agar mit konstanter Geschwindigkeit. Die Kultivierung der Isolate AZDx wurde aber durch das langsame Wachstum erschwert. Etwa 10 Tage nach Ausstreichen der Stämme aus den Glycerinröhrchen der Stammsammlung ausgestrichen waren, wurden die ersten kleinen Kolonien entdeckt, eine Woche später konnten diese Einzelkulturen auf frische Platten überimpft werden. Bei Animpfung einer dieser Zweit-Generation-Einzelkulturen in 10 ml Flüssigmedium derselben Zusammensetzung hingegen, wurden Lag-Phasen von bis zu 40 Tagen

beobachtet. In dieser Zeit war kein 2,4-D-Abbau messbar und keine Trübung feststellbar.

Dendrogramm

Es wurde ein Dendrogramm mit den 16S rDNA-Sequenzen der Isolate AZDx, zusammen mit solchen von nah verwandten Typstämmen, Umweltisolaten und nicht kultivierten Bakterien gerechnet. Das 'maximum likelihood'-Dendrogramm wurde über fast die gesamte Länge (92%) der 16S rDNA Sequenz gerechnet (**Abbildung 2**).

Die Isolate AZDx bilden ein 'Cluster' mit dem 'Unidentified Bacterium RCO' (Acc D89030) und dem Stamm *Bradyrhizobium* sp. 1 (Acc AY238503). Die Stämme RCO (Fulthorpe et al. 1996) und *Bradyrhizobium* sp. 1 (Macur et al. 2003) sind in Zusammenhang mit mikrobiellen Untersuchungen zu 2,4-D im Boden isoliert worden, beim Stamm RCO wurde 2,4-D-Abbau nachgewiesen. Ein paarweiser Vergleich der Sequenzen dieses 'Clusters' mit den anderen Sequenzen im Dendrogramm offenbart, dass die erwähnten Umweltisolate die geringste Distanz zum Typstamm *Bradyrhizobium elkanii* USDA 76 (Acc U35000) haben.

Zwischen den drei erwähnten 'Clustern' liegen vom Verzweigungsmuster und von der Distanz her betrachtet, einige unvollständig dokumentierte Umweltisolate. Von diesen Isolaten wurden vier als 2,4-D-Abbauer charakterisiert: Die Stämme BTH (Acc D89029), HWK12 (Acc D89028), RD5C2 (Acc AB035489) und HW13 (Acc D89027) (**Abbildung 2**, mit * markiert). Eine Distanzmatrix zum Dendrogramm ist im Anhang aufgeführt (**Tabelle 17**, Seite 178).

Der Unterschied der Isolate AZD10a_EZLN1 und AZD10a_EZLN2 beruht auf einem einzigen Nukleotid der 16S rDNA an der *E. coli*-Position 932. Diese Sequenz liegt in der fraglichen Region nur einfach vor, es wird vermutet, dass es sich beim Sequenzunterschied um einen Artefakt handelt: AZD10a_EZLN1 (CGGGGGCCCGC), AZD10a_EZLN2 (CGGGGGCC_GC).

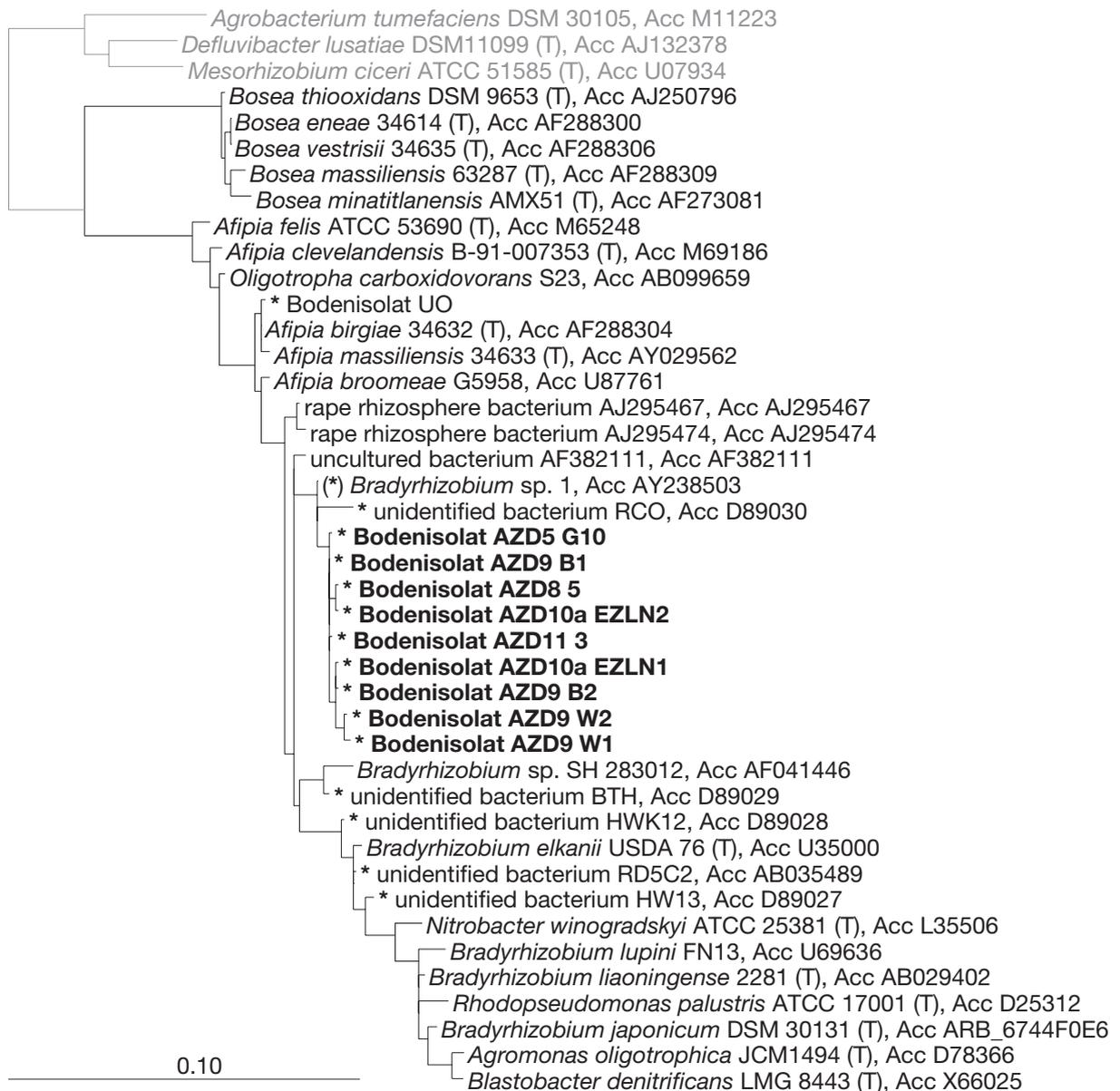


Abbildung 2: 'Maximum likelihood'-Dendrogramm zum Vergleich der isolierten *Bradyrhizobium*-ähnlichen Stämme mit nah verwandten Typstämmen, Umweltisolaten und nicht kultivierten Bakterien. * 2,4-D-abbauende Stämme. (*) 2,4-D-Abbau nicht erwiesen, aber vermutet. (T) Typstämmen. Filter: alphaproteobacteria_rr5_may02 (*E. coli*-Position 83-1477). **Abbildung 16** (Seite 108) vergleicht dieselben Sequenzen anhand der 'Neighbor-Joining'-Methode. Die Stämme Bodenisolat UO und rape rhizosphere bacterium AJ2954 wurden mit 'Quick add using parsimony' eingefügt. *Oligotropha carboxidovorans* S23, *Afipia broomeae* G5958 und *Blastobacter denitrificans* LMG8443 sind keine Typstämmen. *Bradyrhizobium lupini* FN13 ist noch kein gültig publizierter Name (August 2004).

Wachstumskurve

Vom Stamm AZD10a_EZLN1 wurde eine Wachstumskurve angefertigt. Dieser Stamm wurde ausgesucht, weil er als Erster in Reinkultur vorlag. Die Wachstumskurve wurde

insgesamt in zehn Ansätzen gemessen: In komplexem *Rhizobium* X-Medium, in Mineralmedium (ohne Bodenextrakt) und mit unterschiedlichen 2,4-D-Konzentrationen zwischen 3.0 und 10 mM. Die Daten wurden über einen Zeitraum von drei Tagen gesammelt (**Abbildung 3**). Die Verdoppelungs- und Halbwertszeiten wurden anhand der Daten zwischen der 21. und der 63. Stunde berechnet.

Für die Kulturen in Mineralmedium wurden geringere Verdoppelungszeiten ausgerechnet als für die Kulturen in Komplexmedium, sie betragen 17-21 h. In *Rhizobium* X-Medium betragen die Verdoppelungszeiten 29-32 h (**Tabelle 9**). Die Verdoppelungszeiten in 10 mM 2,4-D unterschieden sich kaum von denen in 3.0 mM. Die geringste Verdoppelungszeit unter allen Kulturen wurde in Mineralmedium mit hoher Mannitol-Konzentration (55 mM) und geringer 2,4-D-Konzentration (5 mM) gemessen.

Ein Vergleich dreier Kulturen mit variierender Mannitol-Konzentration (55, 28 und 0 mM), bei gleich bleibender 2,4-D-Konzentration (5 mM), lieferte in *Rhizobium* X-Medium andere Ergebnisse als in Mineralmedium. Während im Komplexmedium die Halbwertszeit für 2,4-D mit sinkendem Mannitol-Gehalt ebenfalls sank, war die 2,4-D-Halbwertszeit in Mineralmedium ohne Mannitol leicht grösser als mit Mannitol.

Der schnellste 2,4-D-Abbau fand in beiden Medien bei 5 mM 2,4-D statt, die Halbwertszeit betrug dann 16 h. In *Rhizobium* X-Medium bauten die Kulturen 2,4-D allerdings am schnellsten ohne Mannitol ab, in Mineralmedium brauchte es für schnellen Abbau Mannitol (28 mM oder 55 mM). Die grösste Halbwertszeit für 2,4-D wurde in den Medien mit hoher 2,4-D-Konzentration (10 mM) gemessen: 77 h in Mineralmedium, 107 h in komplexem *Rhizobium* X-Medium.

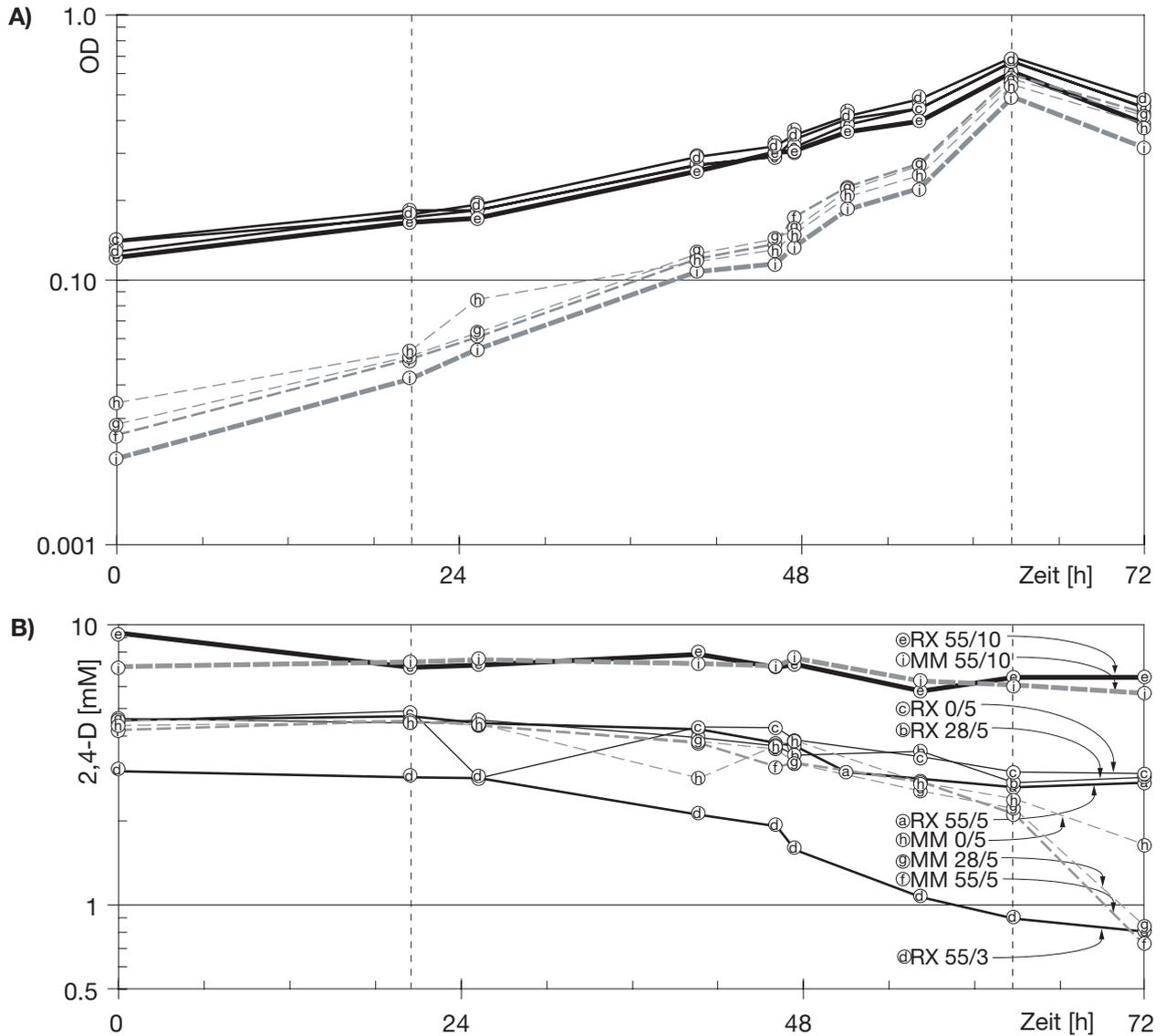


Abbildung 3: Wachstumskurven des Stammes AZD10a_EZLN1 in verschiedenen Medien. **A)** Trübungsmessung bei 560 nm (OD₅₆₀). **B)** Rückgang der 2,4-D-Konzentration. **Schwarz:** *Rhizobium* X-Medium (RX), **Grau:** Mineralmedium (MM). Vertikale gestrichelte Linien begrenzen den Zeitabschnitt für Berechnung der Verdopplungs- und Halbwertszeit (Stunde 21-63, **Tabelle 9**). Jede Linie steht für eine Kultur, unterschieden nach der ursprünglichen Mannitol- sowie 2,4-D-Konzentrationen (mM): a) RX 55/5, b) RX 28/5, c) RX 0/5, d) RX 55/3, e) RX 55/10, f) MM 55/5, f) MM 28/5, g) MM 0/5, h) MM 55/10, siehe auch **Tabelle 4** (Seite 32).

Tabelle 9: Wachstumsparameter des Isolates AZD10a_EZLN1 in 2,4-D-haltigem *Rhizobium* X-Medium und Mineralmedium: Verdopplungsrate (t_d) und Halbwertszeit von 2,4-D ($t_{1/2}$).

Medium	<i>Rhizobium</i> X Medium					Mineralmedium			
	55	28	0	55	55	55	28	0	55
Mannitol [mM]	55	28	0	55	55	55	28	0	55
2,4-D [mM]	5	5	5	3	10	5	5	5	10
t_d (OD 560) [h]	30	29	32	29	31	17	18	21	18
$t_{1/2}$ (2,4-D) [h]	23	19	16	42	107	16	16	18	77

Zur Ermittlung der Verdopplungs- und Halbwertszeiten wurden die Werte der Optischen Dichte (560 nm), und der 2,4-D-Konzentration zwischen der 21. und der 63. Stunde berücksichtigt (**Abbildung 3**).

3.2 Anreicherung in Arginin-Glycerin-Salz-Medium

Das Arginin-Glycerin-Salz-Medium (AGS-Medium) ist für die Anreicherung aerober Actinomyceten geeignet. In dieser Anreicherung wurde 3-Chloranilin statt des ursprünglich beschriebenen Arginins verwendet (El-Nakeeb und Lechevalier 1963). 3-Chloranilin wurde als einzige Stickstoff-, Kohlenstoff- und Energiequelle angewendet. In Arginin kommt Stickstoff ebenfalls als Aminogruppe vor, es wurde erwartet, dass die Substitution von Arginin mit 3-Chloranilin den Selektionsdruck von Actinomyceten auf Chloranilin-abbauende Actinomyceten erhöht.

Als Inokulum wurde mit Chlorbenzol verunreinigtes Grundwasser aus Bitterfeld-Wolfen verwendet (Safira-Pilotanlage). Im Wasser der Safira-Brunnen wurde kein Chloranilin entdeckt, hingegen in benachbarten Brunnen von Bitterfeld-Wolfen (Franke et al. 2004). 15 Tage nach Ansetzen der Anreicherungskulturen in 0.1 mM 3-Chloranilin AGS-Medium wurde der 3-Chloranilin-Gehalt um 0.1 mM erhöht. Zwei Tage später zeigten die Anreicherungskulturen eine leichte Trübung. Spätere Messungen des 3-Chloranilin-Gehaltes enthüllten allerdings nur bei Pegel 27 einen bedeutsamen Abbau von Chloraromaten.

3.2.1 Isolierung

Von jeder Anreicherung wurden, 18 Tage nach Inokulierung, 100 µl der Verdünnungen 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} auf Festmedium derselben Zusammensetzung (0.5 mM 3-Chloranilin) plattiert. Die Kolonien der Verdünnung 10^{-3} wurden während drei Wochen viermal ausgezählt. Auf der Agarplatte von Pegel 27 sind zwischen dem elften und dreizehnten Tag etwa 180 Kolonien gewachsen. Auf den anderen Agarplatten stieg die Koloniezahl stetig an (2 - 3 Kolonien pro Tag, **Abbildung 4**).

Es wurden 80 Kolonien, repräsentativ für den Zeitpunkt ihres Erscheinens, auf die Fähigkeit zum 3-Chloranilin-Abbau geprüft. Dazu wurde das Wachstum von Kolonien auf 3-Chloranilin-haltigem Festmedium mit dem auf Kontrollplatten ohne Substrat verglichen. Als Ergebnis wurde von 69 Stämmen 3-Chloranilin-Verwertung nicht ausgeschlossen, 11 Stämme wuchsen eindeutig schlechter mit Substrat als ohne.

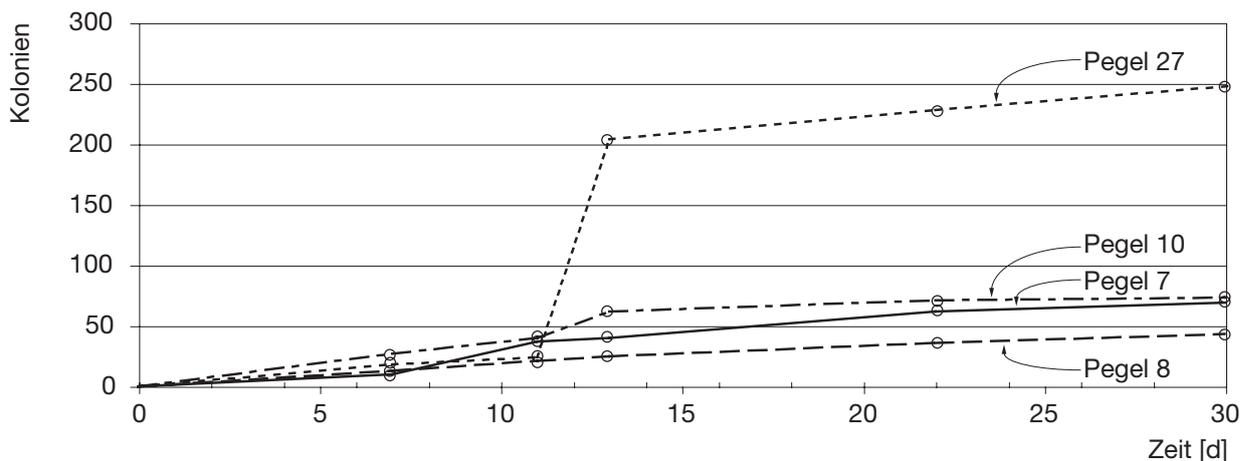


Abbildung 4: Zeitlicher Verlauf der Anzahl detektierbarer Kolonien nach dem Plattieren der 3-Chloranilin-Anreicherungen. Pro Anreicherung wurde eine Platte mit 100 μl der Verdünnung 10^{-3} ausgezählt. **Pegel 7 / 8 / 10 / 27:** Bitterfelder Grundwasserproben, die als Inokulum verwendet wurden.

3.2.2 Flüssigkultur in Zellkulturfläschchen

Insgesamt wurden 41 Isolate in 20-ml-Fläschchen kultiviert (0.1 mM 3-Chloranilin, 0.5 mM Arginin, 14 mM Glycerin). Nach 30 Tagen waren 24 Kulturen sichtbar gewachsen. Allerdings konnten nur bei drei gewachsenen Kulturen mit der HPLC ein Rückgang der 3-Chloranilin-Konzentration detektiert werden. Gegenüber der sterilen Kontrolle wurde 3-Chloranilin durch Isolat AGS_CI_20 zu 30%, durch Isolat AGS_CI_21 zu 45% und durch Isolat AGS_CI_22 zu 100% abgebaut. Alle diese drei Kulturen stammten ursprünglich aus der Anreicherung von Pegel 8.

Fünf Monate später wurde noch einmal der 3-Chloranilin-Gehalt aller 42 Kulturen gemessen. In der sterilen Kontrolle war nur noch 40% der anfänglich gemessenen Menge 3-Chloranilin nachweisbar. In 14 Fläschchen war die 3-Chloranilin-Konzentration hingegen über 30% geringer als in der sterilen Kontrolle. Je vier Kulturen stammten von Pegel 7 und 10, fünf von Pegel 8 (inkl. die drei oben erwähnten) und eine war aus der Anreicherung von Pegel 27.

3.2.3 Charakterisierung der Isolate

Entsprechend eines amplifizierten Bereichs der 16S rDNA gehören die Stämme AGS_CI_20 und AGS_CI_21 zu den *Pseudomonas*-ähnlichen γ -Proteobakterien und der Stamm AGS_CI_22 zu den *Agrobacterium*-ähnlichen *Rhizobien*. Leider gelang es in

keiner neuerlichen Kultivierung dieser Stämme, einen Abbau von 3-Chloranilin zu beobachten. Weder die Zugabe von *Rhizobium* X-Medium, noch von 'Casamino Acids', stimulierten die Isolate zum Chloraromatenabbau. Auf eine Einordnung der betreffenden Stämme in die Stammsammlung wurde daher verzichtet.

3.2.4 Weiterführende Anreicherung

Nach der Isolation der oben beschriebenen Stämme, wurde den Anreicherungskulturen noch drei Mal 0.1 mM 3-Chloranilin zugegeben. Anschliessend wurden die Kulturen viereinhalb Jahre bei 4°C im Dunkeln und ohne Schütteln gelagert. Das Medium des Kolbens mit Grundwasser von Pegel 8 färbte sich in dieser Zeit leicht braun, von den anderen Kolben wurde 1 ml Anreicherungskultur in 10 ml frisches Mineralmedium nach Dorn et al., (1-facher Phosphatpuffer, 0.1 mM 3-Chloranilin) gegeben. Nach zwei Wochen war wieder Wachstum zu erkennen, den Kolben wurde weiterhin in 0.1 mM Schritten 3-Chloranilin zugegeben. Die Verantwortung für die Anreicherungskulturen trägt jetzt Frau Jana Seifert.

3.3 Direkte Isolierung von Chlorbenzol-Verwertern

3.3.1 Direkte Isolierung

Die direkte Isolierung von Chlorbenzol-verwertenden Bakterien sollte deren Diversität in der untersuchten Umweltprobe aufzeigen. Weiterhin sollte die Ergebnisse der direkten Isolierung als positive Kontrolle für die nachfolgenden genetischen Untersuchungen verwendet werden. Anhand der Isolate sollten anschliessend molekularbiologische Methoden entwickelt oder verfeinert werden, um die für den Abbau verantwortlichen Gene in der betrachteten Umweltprobe nachweisen zu können. Ein Ziel war, Aussagen über die Rolle der einzelnen Bakterien am Chlorbenzol-Abbau in der Umweltprobe machen zu können. Anhand einer Quantifizierung der für den Abbau verantwortlichen Gene in der Umweltprobe sollte schliesslich ein Bezug zwischen den Daten der direkten Isolierung und den mit molekularbiologischen Methoden erhobenen Daten hergestellt werden.

Die direkte Isolierung auf Mineralfestmedium, in Gegenwart von Chlorbenzol in der Gasphase, wurde zweimal mit den Proben MAROC N° 1, 5, 6, 7, 12 durchgeführt. Lediglich aus der Probe N° 5 wurden Chlorbenzol-verwertende Stämme isoliert (6×10^3 cfu/g Boden). Bei den übrigen Umweltproben wurden höchstens einzelne Kolonien auf dem Festmedium beobachtet, die sich jedoch anschliessend nicht erfolgreich auf frisches Medium überimpfen liessen (**Tabelle 10**).

Die mit Chlorbenzol inkubierten Platten der Probe N° 6 verfärbten sich vermutlich aufgrund der Bildung von Chlorbrenzcatechinen braun, in Grösse und Zahl der Kolonien war allerdings kein weiterer Unterschied zu den Kontroll-Platten ohne Chlorbenzol erkennbar. Bei den MAROC-Proben N° 1, 7, und 12 unterschieden sich die Kontrollplattierungen, auch nach mehrwöchiger Inkubation, von Auge nicht von den mit Chlorbenzol inkubierten. Unabhängig von der Verdünnung dieser Umweltproben, wurde nach einer Woche nicht mehr als ein grauer durchsichtiger Rasen erkennbar, durchbrochen von wenigen mageren Kolonien.

Aus der Probe MAROC N° 5 wurden 129 Bakterienstämme in die Stammsammlung eingeordnet. Von den übrigen MAROC-Proben konnte kein Isolat der Stammsammlung zugefügt werden. Die wenigen in Frage kommenden Isolate der Proben MAROC N° 4, 7 und 12 zeigten nach Überimpfen auf frisches Medium kein Wachstum mehr in Gegenwart von Chlorbenzol. Bei keinem dieser Isolate gelang es daher, eine Reinkultur herzustellen. Im Gegensatz zu allen anderen MAROC-Proben war N° 1 nicht mit Chloraromaten, sondern mit Chlorethen und BTEX (Benzol, Toluol, Ethylbenzol und Xylol) kontaminiert. Aufgrund dieser Tatsache überraschte auch nicht, dass von dieser Probe gar keine Chloraromaten-Abbauer isoliert werden konnten, sie wurde als Negativkontrolle verwendet (**Tabelle 10**).

Die Lebendzellzahl-Bestimmung auf 0.1-fach TSA-Medium ergab für Proben MAROC N° 1, 5, 6, 7, 12 Werte zwischen 5×10^5 cfu/ml (Grundwasser) und $2 - 30 \times 10^6$ cfu/g (Boden).

Tabelle 10: Lebendzellzahlen verschiedener MAROC-Proben auf 0.1-fach TSA-Medium und auf Mineralfestmedium in Gegenwart von Chlorbenzol.

Umweltprobe	Kontamination *	0.1-fach TSA cfu/g oder cfu/ml	MM + CB ** cfu
MAROC N° 1	Boden: Monochlorethen (0-5 mg/l Grundwasser), BTEX	2×10^6	zk
MAROC N° 4	Schlamm: Chlorbenzol, Anilin	3×10^7	1 (†)
MAROC N° 5	Boden: Chlorbenzol (1 mg/kg), 1,2,3-Trichlorpropan, Hexachlorbenzol, Tri- und Dichlorbenzol, Biphenyl, Trichlorethylen, Trichlormethan, <i>cis</i> -Dichlorethen	1×10^7	152
MAROC N° 6	Boden: Chlorbenzol (1 mg/kg), 1,2,3-Trichlorpropan, Hexachlorbenzol, Tri- und Dichlorbenzol, Biphenyl, Trichlorethylen, Trichlormethan, <i>cis</i> -Dichlorethen	2×10^7	zk, B
MAROC N° 7	Boden: Chlorbenzol (1 mg/kg), 1,2,3-Trichlorpropan, Hexachlorbenzol, Tri- und Dichlorbenzol, Biphenyl, Trichlorethylen, Trichlormethan, <i>cis</i> -Dichlorethen	1×10^7	1 (†)
MAROC N° 12	Grundwasser: Chlorbenzol (5 mg/l), 1,2,3-Trichlorpropan, Hexachlorbenzol, Tri- und Dichlorbenzol, Biphenyl, Trichlorethylen, Trichlormethan, <i>cis</i> -Dichlorethen	5×10^5	17 (†)

* **BTEX:** Benzol/Toluol/Ethylbenzol/Xylol. ** † Konnte nicht weiter kultiviert werden. **B** Agarplatte braun gefärbt. **zk** Zu klein: Keine Kolonie gross genug, um Wachstum auf Substrat annehmen zu können.

3.3.2 Charakterisierung der Isolate

Von der Probe MAROC N° 5 wurden alle 152 Kolonien isoliert, die in Chlorbenzol-Atmosphäre gewachsen waren. Das entspricht 6×10^3 cfu pro Gramm Erde. Zur Herstellung von Einzelkulturen wurden diese Kolonien erst auf NB und anschliessend wieder auf Mineral-Festmedium mit Chlorbenzol-Atmosphäre überimpft. Nach diesen zwei Bearbeitungsschritten handelte es sich beim grössten Teil der Kulturen um Reinkulturen. Die übrigen wurden mit der Dreistrich-Methode so lange auf Mineral-Festmedium in Chlorbenzol-Atmosphäre überimpft, bis auch sie rein waren. Anschliessend bildeten noch 129 Isolate Kolonien in Gegenwart von Chlorbenzol. Sie wurden in die Stammsammlung (-80°C) aufgenommen und anhand der 16S rDNA-Sequenz phylogenetisch untersucht.

Bei späteren Versuchen stellte sich heraus, dass von den 129 Isolaten in der Stammsammlung noch 123 Isolate kultiviert werden konnten. Allerdings wuchsen nur 107 davon problemlos mit Chlorbenzol, und diese sind bis auf einen *Ralstonia*-ähnlichen Stamm alle *Pseudomonas*-ähnlich. Diese Stämme wurden von M001 bis M109 nummeriert, der *Ralstonia*-ähnliche Stamm wurde mit M013 bezeichnet. Bei diesen Stämmen wurden keine Unterschiede beobachtet, wenn das Substrat auf Brombenzol derselben Konzentration gewechselt wurde.

Die Stämme mit den Bezeichnungen M110 bis M134 wuchsen im Vergleich zu den Stämmen M001-M109 schlechter mit Chlorbenzol. Deshalb wurden von allen diesen Stämmen, Kontrollausstriche auf Mineral-Festmedium ohne Chlorbenzol gemacht. Einige Stämme wuchsen von Anfang an mit Chlorbenzol schlechter als ohne, die anderen hatten nach dem Einfrieren in die Stammsammlung die Eigenschaft der Chlorbenzol-Verwertung verloren (**Tabelle 11**). Die Stämme wurden trotzdem weiter untersucht, es wurde angenommen, dass Kolonien die auf Mineral-Festmedium mit Chlorbenzol-Atmosphäre isoliert wurden, Chlorbenzol als Substrat verwerten können und deshalb von Interesse sein könnten.

Es wurde in Betracht gezogen, dass bei den Stämmen M110-M131 Chloraromaten-Abbau über 'Quorum Sensing' gesteuert wird. Um auszuschliessen, dass eine zu geringe Zelldichte die Bakterien am Wachstum hindert, wurden die zwei Stämme M121 und M131 in Mineralmedium mit 10% Casamino-Acids-Lösung angezogen. Um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten, wurde in den 100-ml-Schüttelkolben 1 µl Chlorbenzol über die Gasphase zugegeben. Die Kulturen wuchsen schnell an, aber noch nach mehreren Monaten war Chlorbenzol in den Kulturen nachweisbar. Es blieben auch die Versuche erfolglos, diese dicht angewachsenen Kulturen in reines Mineralmedium mit Chlorbenzol zu inokulieren. Dieses Ergebnis machte es unwahrscheinlich, dass die Bakterien aufgrund von 'Quorum Sensing' nicht mehr bereit waren Chlorbenzol abzubauen. Die Bakterien waren in genügender Zellzahl vorhanden, um im mit wenig Komplexmedium versetztem Mineralmedium zu wachsen. Es wurde deshalb angenommen, dass die Bakterien nicht mehr fähig waren, Chlorbenzol zu verwerten.

Tabelle 11: Wachstumsverhalten und phylogenetische Einteilung der direkt auf Chlorbenzol isolierten Stämme.

Stamname	Wachstum mit Chlorbenzol *			Nächster verwandter Typstamm
	urspr. Isolat	Isolat aus Stammsammlung		
	Festmedium	Festmedium	Flüssigkultur	
M001 - M012	+	+	+	<i>Pseudomonas jessenii</i> CIP 105274
M013	+	+	+	<i>Ralstonia solanacearum</i> ATCC 1696
M014 - M035	+	+	+	<i>Pseudomonas jessenii</i> CIP 105274
M036	+	+	+	<i>Pseudomonas resinovorans</i> LMG 2274
M037	+	+	n.b.	<i>Pseudomonas mevalonii</i> **
M038 - M080	+	+	+	<i>Pseudomonas jessenii</i> CIP 105274
M081	+	+	n.b.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> **
M082 - M090	+	+	+	<i>Pseudomonas jessenii</i> CIP 105274
M091	+	-	n.b.	n.b.
M092 - M093	+	+	+	<i>Pseudomonas jessenii</i> CIP 105274
M094	+	+	n.b.	<i>Pseudomonas resinovorans</i> LMG 2274
M095 - M103	+	+	+	<i>Pseudomonas jessenii</i> CIP 105274
M104	+	-	n.b.	n.b.
M105 - M109	+	+	+	<i>Pseudomonas jessenii</i> CIP 105274
M110	=	=	-	<i>Micrococcus luteus</i> DSM 20030
M111	-	=	n.b.	<i>Sphingomonas herbicidovorans</i> 11019
M112	+	+	-	<i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277
M114	=	-	n.b.	<i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277
M115	=	-	n.b.	<i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277
M116	-	-	n.b.	<i>Microbacterium luteolum</i> DSM 20143
M117	-	=	n.b.	<i>Sphingomonas herbicidovorans</i> 11019
M118	=	=	-	n.b.
M119	=	-	-	n.b.
M120	=	-	n.b.	<i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277
M121	+	=	-	<i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277
M122	=	-	-	n.b.
M123	=	=	n.b.	<i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277
M124	-	-	n.b.	<i>Pedobacter africanus</i> DSM 12126
M125	-	-	n.b.	<i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277
M126	+	=	-	<i>Micrococcus luteus</i> DSM 20030
M127	=	-	n.b.	uncultured actinomycete **
M128	+	-	-	<i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277
M129	=	=	n.b.	<i>Microbacterium luteolum</i> DSM 20143
M130	=	-	-	n.b.
M131	+	=	-	<i>Brevibacterium casei</i> NCDO 2048
M134	-	-	n.b.	<i>Sphingomonas herbicidovorans</i> 11019

* In Mineralmedium mit Chlorbenzol-Atmosphäre. **Festmedium:** Bei Unklarheiten wurden Kontrollausstriche auf Platten ohne Substrat gemacht: +/=/- = besseres / vergleichbares / schlechteres Wachstum in Gegenwart von Chlorbenzol als in Kontrolle ohne Substrat. **n.b.** nicht bestimmt. ** Nur BLAST Vergleich (Altschul et al. 1990) mit 400 bp Sequenz. **grau:** Kein Wachstum mehr auf keinem Medium.

Diversität

Unter den 123 Isolaten der Probe MAROC N° 5 waren vor allem *Pseudomonas*-ähnliche γ -Proteobakterien. Es wurden aber auch Actinobakterien und *Bakteroidetes* isoliert (Tabelle 12).

Tabelle 12: Zusammenfassende taxonomische Klassifizierung (Garrity und Holt 2001) der Isolate M001-M134 anhand eines Sequenzfragmentes der 16S rDNA.

Phylum	Klasse	Ordnung	Familie	Nächst verwandte Art	Isolate			
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardiaceae	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	8			
			Brevibacteriaceae	<i>Brevibacterium casei</i>	1			
			Micrococcaceae	<i>Micrococcus luteus</i>	2			
			Microbacteriaceae	<i>Microbacterium luteolum</i>	2			
Proteobacteria	'Alphaproteobacteria'	'Sphingomonadales'	'Sphingomonadaceae'	<i>Sphingomonas herbicidovorans</i>	3			
				'Betaproteobacteria'	'Burkholderiales'	'Ralstoniaceae'	<i>Ralstonia solanacearum</i>	1
							'Gammaproteobacteria'	'Pseudomonadales'
	<i>Pseudomonas resinovorans</i>	2						
	<i>Pseudomonas mevalonii</i>	1						
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1						
	Bacteroidetes	'Sphingobacteria'	'Sphingobacteriales'	'Sphingobacteriaceae'	<i>Pedobacter heparinus</i>	1		

Alle Isolate stammen aus der Umweltprobe MAROC N°5 und wurden im Rahmen einer direkten Isolierung auf Mineralfestmedium mit Chlorbenzol als einzigem Substrat erhalten.

Dendrogramme

Es wurden fünf Dendrogramme erstellt, um die Isolate aus der Umweltprobe MAROC N° 5 phylogenetisch einzuordnen. Die Dendrogramme wurden für folgende Bakteriengruppen erstellt: *Sphingomonas*-ähnliche α -Proteobakterien (**Abbildung 6**), *Ralstonia*-ähnliche β -Proteobakterien (**Abbildung 7**), *Pseudomonas*-ähnliche γ -Proteobakterien (**Abbildung 8**), Actinomyceten (**Abbildung 5**) und Bacteroidetes (CFB-Cluster) (**Abbildung 10**). In **Tabelle 12** werden die zu den Isolaten am nächsten verwandten Typstämme aufgelistet: Der grösste Teil (101 Stämme) der isolierten γ -Proteobakterien kann zu einer eigenen Gruppe zusammengefasst werden, die sehr nah zum Typstamm *P. jessenii* CIP 105274 steht. Die Isolate M036 und M094 hingegen, stehen näher beim Typstamm *P. resinovorans* LMG 2274, noch einiges näher allerdings zum Umweltisolat *Pseudomonas* sp. PCP2, das aus 'creek sediment' isoliert wurde. Die Distanzmatrices der Dendrogramme stehen im Anhang (Seite 95).

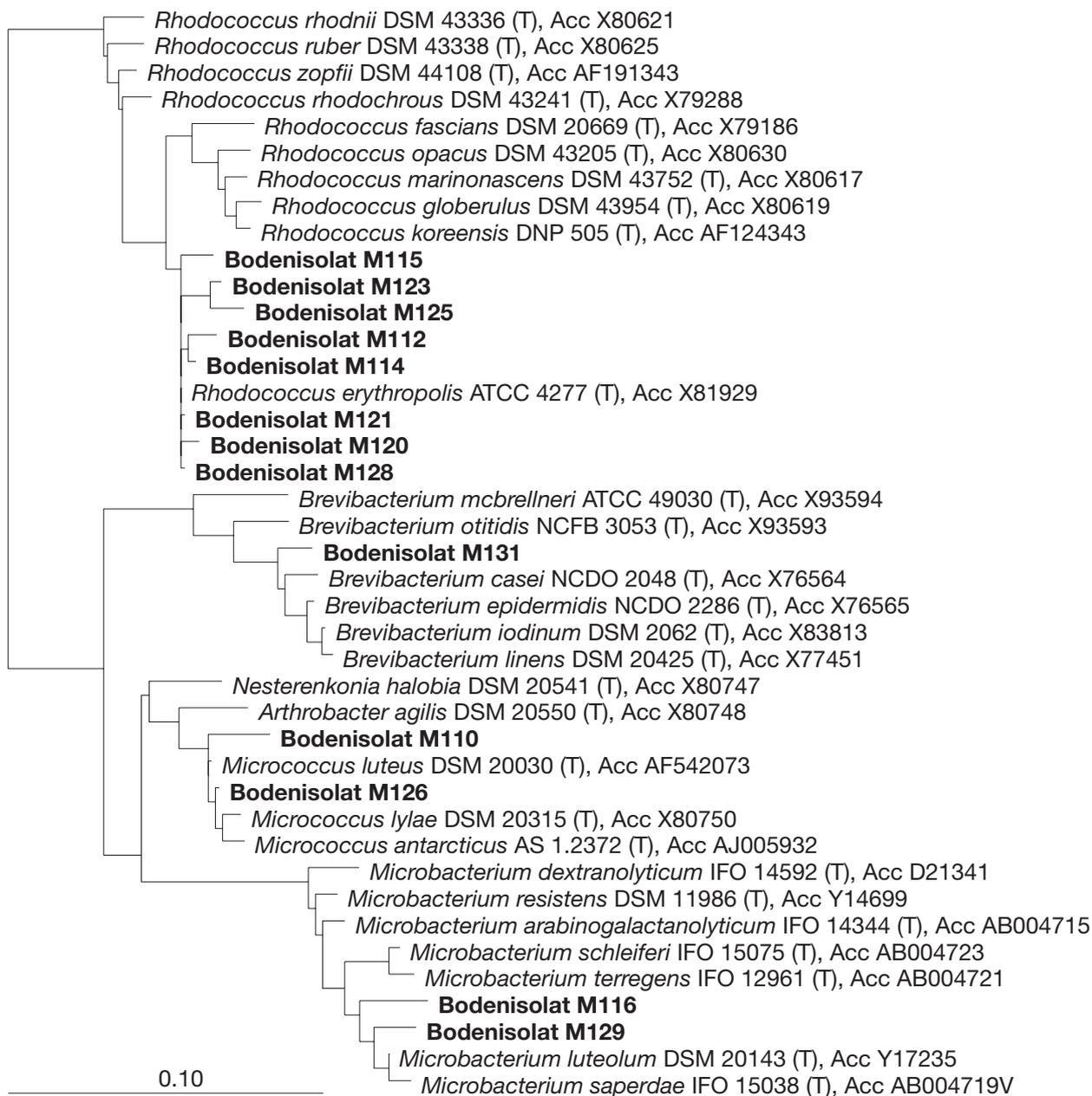


Abbildung 5: Dendrogramm der isolierten Actinomyceten (**M110, M112, M114, M115, M116, M120, M121, M123, M125, M126, M128, M129, M131**). Berechnungsmethode: 'Maximum likelihood', Filter: actinobacteria_rr5_may02 (*E. coli*-Position 113-1034). Die Sequenzen der Isolate M110, M112, M115, M116, M129 und M131 wurden mit 'Quick add using Parsimony' eingefügt (selber Filter wie oben). Distanzmatrices ab Seite 179.

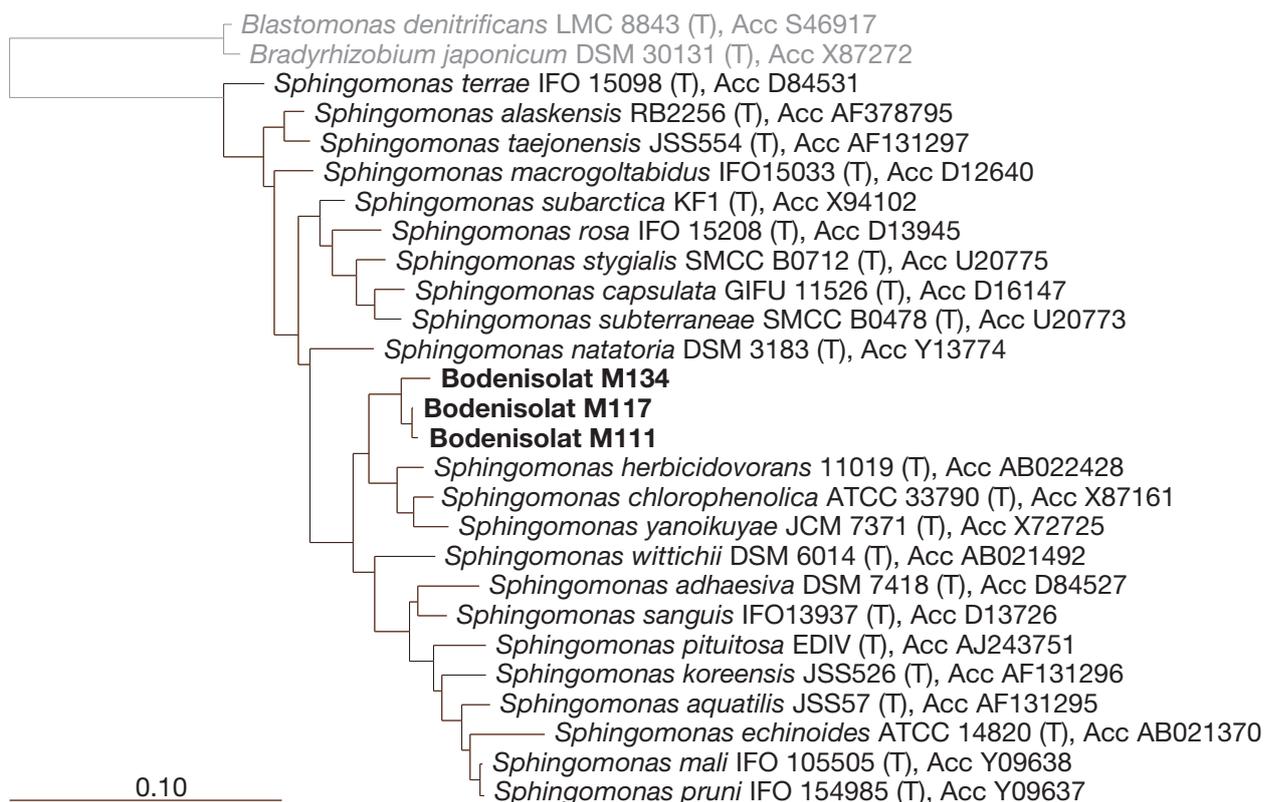


Abbildung 6: Dendrogramm der isolierten *Sphingomonas*-ähnlichen Isolate (**M111**, **M117** und **M134**). **Grau:** Outgroup. Berechnungsmethode: 'Maximum likelihood', Filter: *aphaproteobacteria_rr5_may02*, ganze Länge. Alle Referenzstämme sind Typstämme. Die Sequenzen der Isolate wurden anschliessend mit 'Quick add using Parsimony' dazugerechnet (selber Filter wie oben). Distanzmatrix auf Seite 184.

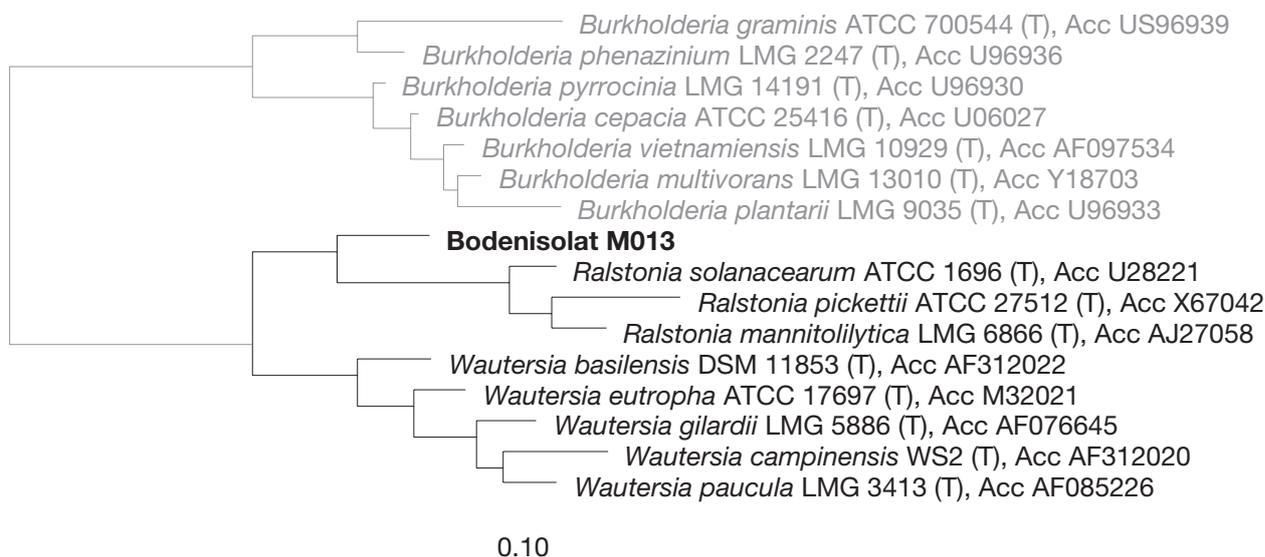


Abbildung 7: Dendrogramm für den isolierten Stamm **M013**. **Grau:** Outgroup. Berechnungsmethode: 'Maximum likelihood', Filter: *betaproteobacteria_rr5_may02* (*E. coli*-Position 73-1479). Die *Wautersia*-Stämme waren früher unter dem Namen *Ralstonia* bekannt (Vaneechoutte et al. 2004). Distanzmatrix auf Seite 183.

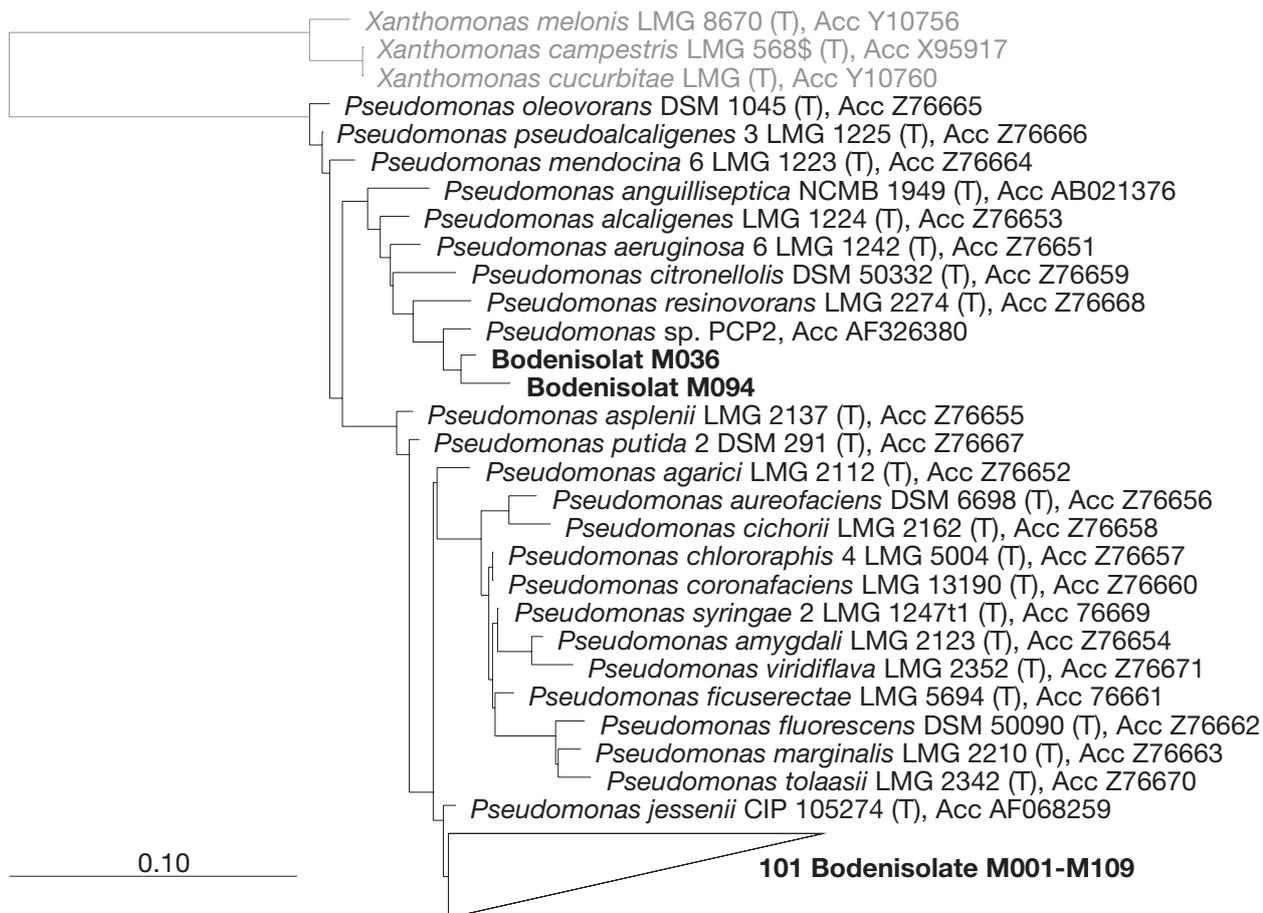


Abbildung 8: Dendrogramm für die isolierten γ -Proteobakterien. 101 Sequenzen der Isolate **M001-M109** liegen im selben 'Cluster' und sind zusammengefasst, das vollständige Dendrogramm in **Abbildung 9**. **Grau:** Outgroup. Berechnungsmethode: 'Maximum likelihood', Filter: gammaproteobacteria_rr5_may02 (*E. coli*-Position 135-1252) für Typstämme und Isolate **M043G**, **M054**, **M056**, **M067**, **M075**, **M080**, **M094**. Die Sequenzen der übrigen Bodenisolate wurden mit 'Quick add using Parsimony' eingefügt (selber Filter wie oben, volle Länge). Die Distanzmatrix ist auf Seite 177.

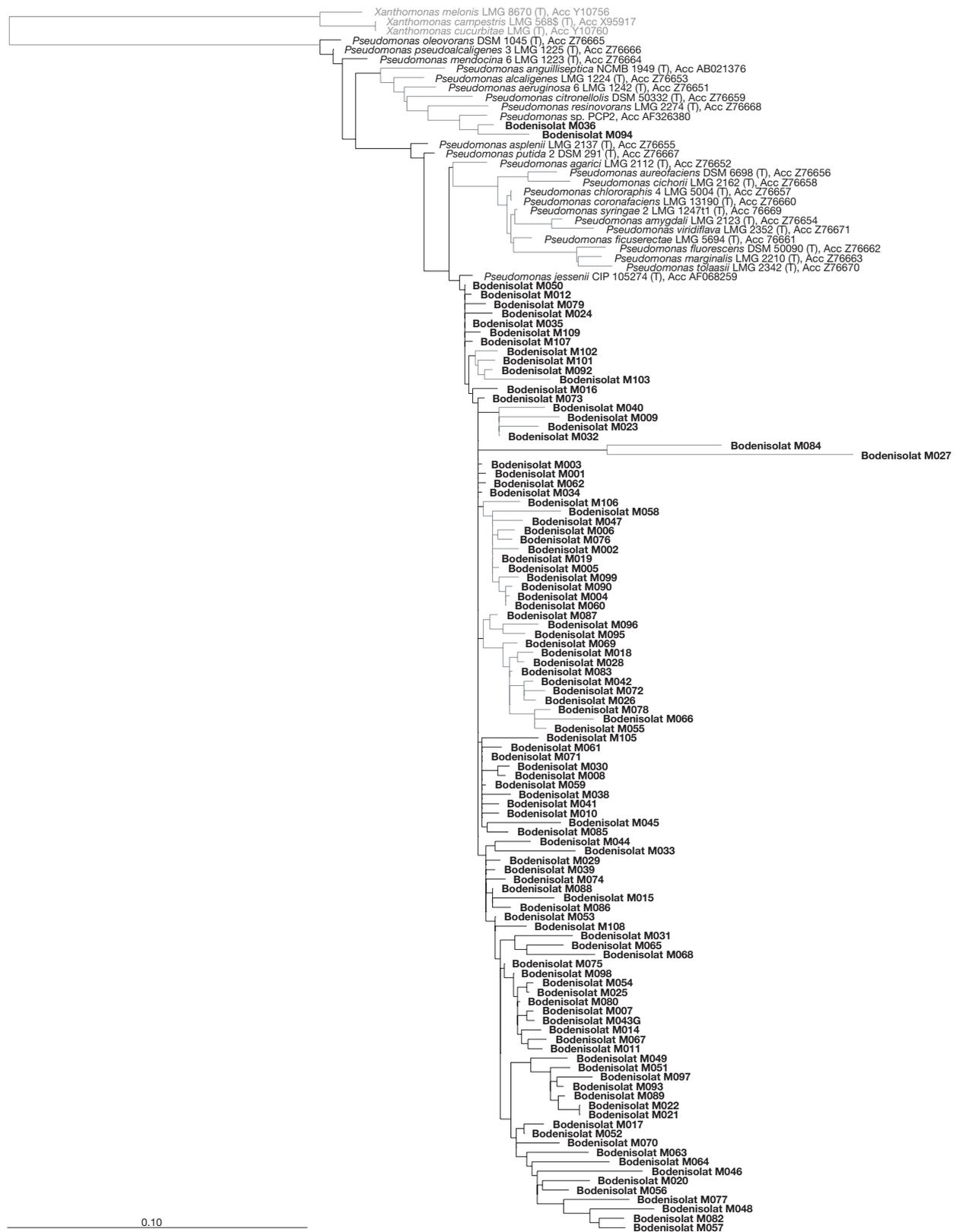


Abbildung 9: Dasselbe Dendrogramm wie in **Abbildung 8**. Die Gruppe der Umweltisolate ist nicht zusammengefasst.

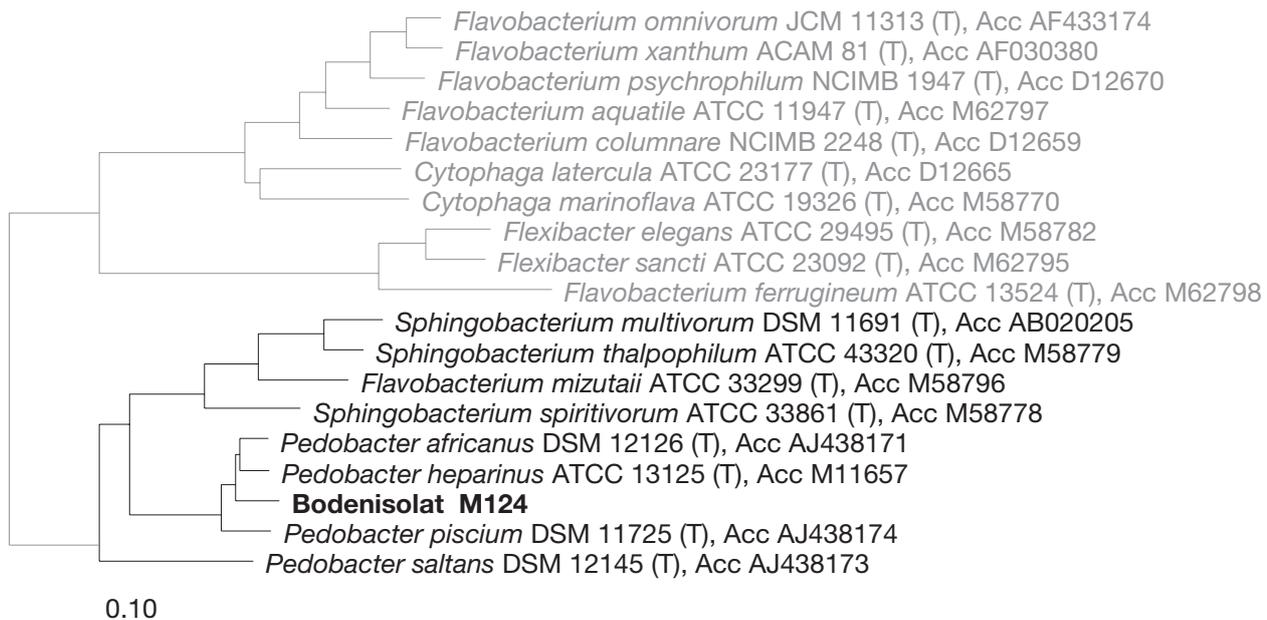


Abbildung 10: Dendrogramm für den isolierten Stamm **M124**. **Grau:** Outgroup. Berechnungsmethode: 'Maximum likelihood', kein Filter (*E. coli*-Position 111-1376). Die Sequenz des Isolates M124 wurde mit 'Quick add using Parsimony' zum Dendrogramm hinzugefügt (*E. coli*-Position 533-1069). Die Distanzmatrix ist auf Seite 185.

3.4 Gene des Chloraromaten-Abbauweges

Es sollte untersucht werden, welcher Abbauweg in den neuen Isolaten für die Chloraromaten-Verwertung verantwortlich ist und es sollte sichergestellt werden, dass die entsprechenden Gene erfasst werden können. Die Sequenzen der für den Abbau verantwortlichen Gene sollten bestimmt und mit bekannten Sequenzen verglichen werden. Am besten dokumentiert ist der *ortho*-Chlorbrenzcatechin-Abbauweg (Schlömman 1994, 2002; Solyanikova und Golovleva 2004). Es wurde deswegen zunächst versucht, die Gene dieses Abbauweges nachzuweisen. Vom *ortho*-Chlorbrenzcatechin-Abbauweg sind PCR-Primer für die Gene der Chlormuconat-Cycloisomerase und Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenase bekannt (Thiel 2004). Mit diesen Primern wurden PCR-Produkte der erwarteten Grösse produziert, diese wurden kloniert und sequenziert. Die neuen Daten wurden mit den publizierten Sequenzen verglichen, schliesslich war das Ziel, die Diversität der Gene des Chlorbrenzcatechin-Abbauweges in der Umweltprobe, sowie in Vergleich mit vorhandenen Sequenzen bestimmen zu können.

3.4.1 Chlormuconat-Cycloisomerase

Mit PCR wurden die isolierten Bakterien auf die Existenz von Chlormuconat-Cycloisomerase-Genen geprüft. Das PCR-Primerpaar fwClCyclChpA / revClCyclChpJ (Thiel 2004) wurde verwendet, um entsprechende Gen-Fragmente durch Amplifikation nachzuweisen. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden anschliessend kloniert und sequenziert.

Stämme der direkten Isolierung in Chlorbenzol-Atmosphäre

Von den Umweltisolaten der Bodenprobe MAROC N° 5 wurden sieben Stämme repräsentativ für die Gruppe der γ -Proteobakterien-ähnlichen sowie der eine β -Proteobakterium-ähnliche Stamm genauer betrachtet. Mit den sieben *P. jessenii*-ähnlichen Isolaten M034, M038, M039, M043k, M053, M054 und M058 und dem *Ralstonia*-ähnlichen Stamm M013 wurde PCR mit Primern für die Chlormuconat-Cycloisomerase durchgeführt. In einer ersten PCR wurden keine auf dem Agarose-Gel sichtbaren PCR-Produkte gebildet. Eine darauf folgende PCR, die statt mit genomischer DNA mit einem Aliquot der ersten Reaktion durchgeführt wurde, lieferte bei allen Isolaten ein einziges Produkt von 780 bp Länge.

Dieses PCR-Produkt wurde in den Sequenziervektor pBluescript SK II eingefügt und in *E. coli* DH5 α kloniert. Um potentielle Sequenzunterschiede in möglicherweise mehrfach auftretenden Genkopien in den Isolaten zu erkennen, wurden je zwei Klone von PCR-Produkten der Isolate M034, M053 und M058 sequenziert, von den übrigen Isolaten nur je einer. Vom *Ralstonia*-ähnlichen Isolat M013 wurde mit denselben Primern ebenso erst in der zweiten PCR ein auf dem Agarose-Gel erkennbares Produkt gebildet. Von den ebenfalls 780 bp grossen Fragmenten wurden drei Klone sequenziert. Die 13 Klone mit dem PCR-Produkt von mutmasslichen Chlormuconat-Cycloisomerase-Genen, wurden mindestens einmal in jede Richtung sequenziert und mit dem genetischen Code N° 11 (Nakamura et al. 2000) in Aminosäure-Sequenzen übersetzt.

Alle untersuchten Sequenzen sind auf dem 248 AS langen Fragment nahezu identisch mit den Sequenzen der Stämme *P. aeruginosa* JB2 (Acc AAC69475) und *Burkholderia fungorum* Bcep138 (Acc ZP_00028110), die Distanzen variieren zwischen 0 und 1.2%. Durchschnittlich gibt es auf jeder der 248 Aminosäuren (AS) langen Sequenz etwa eine

Unsicherheit, bedingt durch schlechte Qualität der Sequenzierung. Drei sich unterscheidende Aminosäurereste der *Pseudomonas*-ähnlichen Isolate sind jedoch gesichert, zwei treten nur an einer Sequenz auf, ein Unterschied kommt in den beiden Sequenzen vor, die vom selben Isolat stammen:

Die zwei Klone M034_klon_a und M034_klon_c unterscheiden sich untereinander in der AS-Position 137², in der Sequenz von M034_klon_a steht ein Arginin-, in der von M034_klon_c ein Alanin-Rest. Zu den anderen Sequenzen unterschieden sich die beiden Klone gemeinsam in der AS-Position 201 durch einen eindeutigen Alanin-Rest in M034_klon_b bzw. eine Unsicherheit (Alanin/Glycin) von M034_klon_a. Bei allen anderen Sequenzen steht an dieser Stelle ein Glycin-Rest. Es wird angenommen, dass die beiden Klone von verschiedenen Genen stammen.

Die Klone M058_klon_a und M058_klon_b unterschieden sich gemeinsam von den anderen Sequenzen, in Position 216 durch einen Phenylalanin- statt einem Serin-Rest. Zwei weitere Unterschiede zwischen M058_klon_a und M058_klon_b beruhen vermutlich auf schlechter Qualität der Sequenz von M058_klon_a. Es wird angenommen, dass beide Klone identisch sind.

Die drei Unterschiede zwischen den Klonen M053_klon_b und M053_klon_c beruhen auf Unsicherheiten in der Interpretation der Sequenzdaten.

Die Sequenz von M054_klon_b unterscheidet sich eindeutig von der Konsensus-Sequenz der anderen Fragmente in Position 96, wo ein Histidin- statt einem Arginin-Rest steht.

Die Sequenzen der Klone M013_klon_2[abc] sind 1.6 bis 2.7% von der entsprechenden Sequenz von *Wautersia eutropha* NH9 (Acc BAA74531) (früher *Ralstonia*) entfernt. Untereinander sind die Sequenzen M013_klon_2b und M013_klon_2c vermutlich identisch, sie unterscheiden sich an AS-Position 13 in einer Sequenz-Unsicherheit. Im Unterschied dazu, hat M013_klon_2a an AS-Position 139 einen Prolin- statt, wie die anderen zwei, einen Leucin-Rest.

² Die Aminosäure-Position beginnt bei den transkribierten PCR-Fragmenten ohne Primer-Sequenz zu zählen, so wie sie für die Berechnung des Dendrogrammes benutzt wurden.

Isolate der Anreicherung in *Azotobacter*-Medium

Bei allen Isolaten AZDx konnten mit dem Primerpaar fwGICyclChpA / revGICyclChpJ PCR-Produkte von 780 bp Grösse produziert werden. Stellvertretend für alle isolierten α -Proteobakterien wurden PCR-Produkte von den Stämmen AZD5_G10, AZD9_B2 und AZD9_W2 kloniert und sequenziert. Auch bei diesen Isolaten musste eine doppelte PCR durchgeführt werden, um Produkte in genügender Menge für die Klonierung zu erhalten. Zur Vermeidung von Unsicherheiten in der Sequenz wurden diese Klone mindestens drei Mal sequenziert, mindestens einmal in jede Richtung.

Zur nächst gelegenen Sequenz des ebenfalls *Bradyrhizobium*-ähnlichen Bodenisolates UO sind die Aminosäure-Sequenzen der Isolate AZDx 2.5-3.3% entfernt, zu der des zweitnächst gelegenen α -Proteobakteriums *Sphingomonas* sp. TFD44 immerhin 38-40%.

Die Sequenz des Klones AZD5_G10_klon_1 unterscheidet sich in sechs Aminosäure-Resten von der Konsensus-Sequenz der anderen Isolate AZDx. Am zweitstärksten unterscheidet sich die Sequenz AZD9_W2_klon_6b von den übrigen, sie ist an drei Positionen von den anderen verschieden, also auch von der anderen Sequenz desselben Stammes, AZD9_W2_klon_6c. Die Sequenzen von AZD9_W2_klon_6c und AZD9_B2_klon_4c entsprechen der Konsensus-Sequenz.

Dendrogramm

Das 'maximum-likelihood'-Dendrogramm wurde mit den Aminosäuresequenzen der Muconat- und Chlormuconat-Cycloisomerasen gerechnet. Die Sequenzen der PCR-Produkte wurden ebenfalls in Proteinsequenzen übersetzt und mit 'Quick add using Parsimony' in das Dendrogramm eingeordnet (**Abbildung 11**).

Das Dendrogramm teilt die Enzymsequenzen in mehrere Gruppen ein, die sowohl taxonomische, als auch ihrer Funktion entsprechende Einheiten bilden. Die Sequenzen der Enzyme für nicht chlorierte Substrate mischen sich nicht mit den entsprechenden Sequenzen der Enzyme für chlorierte Substrate. Die Sequenzen der α -Proteobakterien erscheinen als eine taxonomische Einheit, die andere Einheit wird durch die Gruppe der β - und γ -proteobakteriellen Sequenzen gebildet. Allerdings lassen sich nicht die

gesamten proteobakteriellen Sequenzen in eine monophyletische Gruppe zusammenfassen, das Actinobakterien-'Cluster' liegt dazwischen.

Die Gruppe der α -proteobakteriellen Muconat-Cycloisomerasen ist lediglich aufgrund von Sequenzhomologien bestimmt worden, es fehlen eindeutige Daten zur Funktion dieser Enzyme, sie werden deshalb im Dendrogramm nicht aufgeführt. Dasselbe Dendrogramm, jedoch mit zusammengefassten Enzymgruppen, ist in der Diskussion abgebildet (**Abbildung 20**).

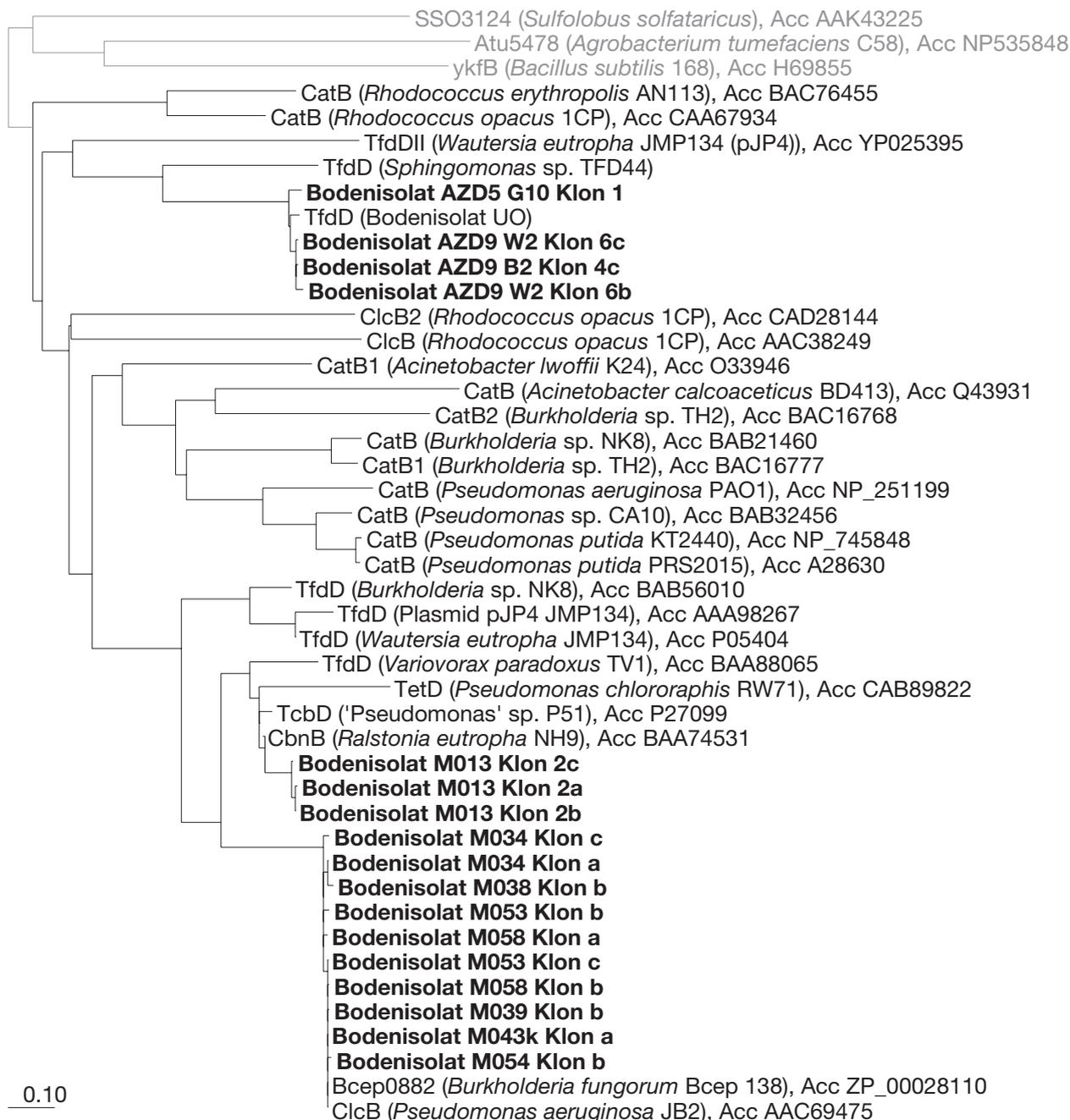


Abbildung 11: 'Maximum likelihood'-Dendrogramm der vollständigen Aminosäure-Sequenzen der Chloromuconat- und Muconat-Cycloisomerasen. **CbnB**, **ClcB**, **ClcB2**, **TcbD**, **TfdD**, oder **TfdD**: Chloromuconat-Cycloisomerasen. **CatB**, **CatB1**, **CatB2**: Muconat-Cycloisomerasen. **Outgroup: MdiA**, **SSO4124**: Mandelat Racemase, **RspA**: Starvation sensing protein, **Atu5478**, **YkfB**: Homologe Sequenz zu Chloromuconat-Cycloisomerase. Übersetzte Sequenzen der eigenen Bodenisolate (PCR-Produkte) wurden mit 'Quick add using Parsimony' hinzugerechnet.

'Southern Blot'

Natürlich interessiert viel mehr das gesamte Gen, beziehungsweise das Operon eines Abbauweges, als das PCR-Produkt eines Gen-Fragmentes. Mit Hilfe eines 'Southern

Blot' wurde versucht, das vollständige Gen der Chlormuconat-Cycloisomerase des Stammes AZD10a_EZLN1 zu isolieren, um es sequenzieren zu können. Der 'Southern Blot' wurde verwendet, um die Grösse des Genomfragmentes bestimmen zu können, damit anschliessend das Fragment der richtigen Grösse zur Klonierung auszuwählen. Das mit Restriktions-Endonukleasen verdaute Genom des Stammes AZD10a_EZLN1, wurde mit einer DNA-Sonde des Chlormuconat-Cycloisomerase-Gens hybridisiert. Als DNA-Sonde wurde ein DIG-markiertes, kloniertes PCR-Produkt verwendet. Vor der Herstellung der Sonde wurde die Sequenz des PCR-Produktes bestimmt und als genügend ähnlich zu bekannten Chlormuconat-Cycloisomerasen deklariert, um damit homologe Gen-Sequenzen zu finden.

Die genomische DNA des Stammes wurde mit den Enzymen *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *Sall*, *XhoI* und *BamHI* verdaut. Die Sonde wurde durch PCR eines Chlormuconat-Cycloisomerase-Gens aus dem Stamm AZD10a_EZLN1 gewonnen, kloniert und DIG markiert. Sie hybridisierte bei 61°C gut auf die genomische DNA desselben Stammes. Die DIG-Niederschlagsmethode führte in den verschiedenen Restriktionsansätzen zum Nachweis hybridisierender Banden (Angaben in kb): *EcoRI*, 5.9; *HindIII*, 4.2; *PstI*, 5.9 (schwach), 5.2 (stark); *Sall*, 5.8 (schwach), 4.7 (wegen Luftblase schlecht erkennbar); *XhoI*, 5.7; *BamHI*, 6.5 (**Abbildung 12**). Die Abschätzung der Fragmentgrössen zwischen 5.1 kb und 21 kb war mit dem verwendeten Molekulargewichtsmarker (*HindIII* und *EcoRI* verdaute Lambda-Phagen-DNA) unbefriedigend. In einem späteren Blot wurde die Bande in der *EcoRI*-Spur mit nur *HindIII* verdaulichem Lambda-DNA-Marker auf 6.9 kb geschätzt.

Auch die genomische DNA der anderen *Bradyrhizobium*-ähnlichen Isolate (Stämme AZD5, AZD7, AZD9 und AZD11) wurde nach Restriktion mit den Enzymen *BamHI*, *Sall*, *PstI* und *HindIII*, mit dieser Sonde hybridisiert. Für alle Stämme wurde hierbei dasselbe Bandenmuster wie beim Stamm AZD10a_EZLN1 erhalten (ohne Abbildung).

Es wurde versucht, die Region um das Chlormuconat-Cycloisomerase-Gen des Stammes AZD10a_EZLN1, durch Klonierung genomischer Fragmente zu isolieren, um damit die Grundlage für eine Sequenzanalyse zu schaffen. Nach acht erfolglosen Versuchen, die 6.1 kb und 4.2 kb Fragmente der Restriktionsenzyme *EcoRI* bzw. *HindIII* zu klonieren, wurde der Versuch eingestellt. Inzwischen war es im selben Labor J. Gröning

gelungen, das gesamte Operon des *ortho*-Chlorbrenzcatechin-Abbauweges des ebenfalls *Bradyrhizobium*-ähnlichen Stammes UO zu sequenzieren.

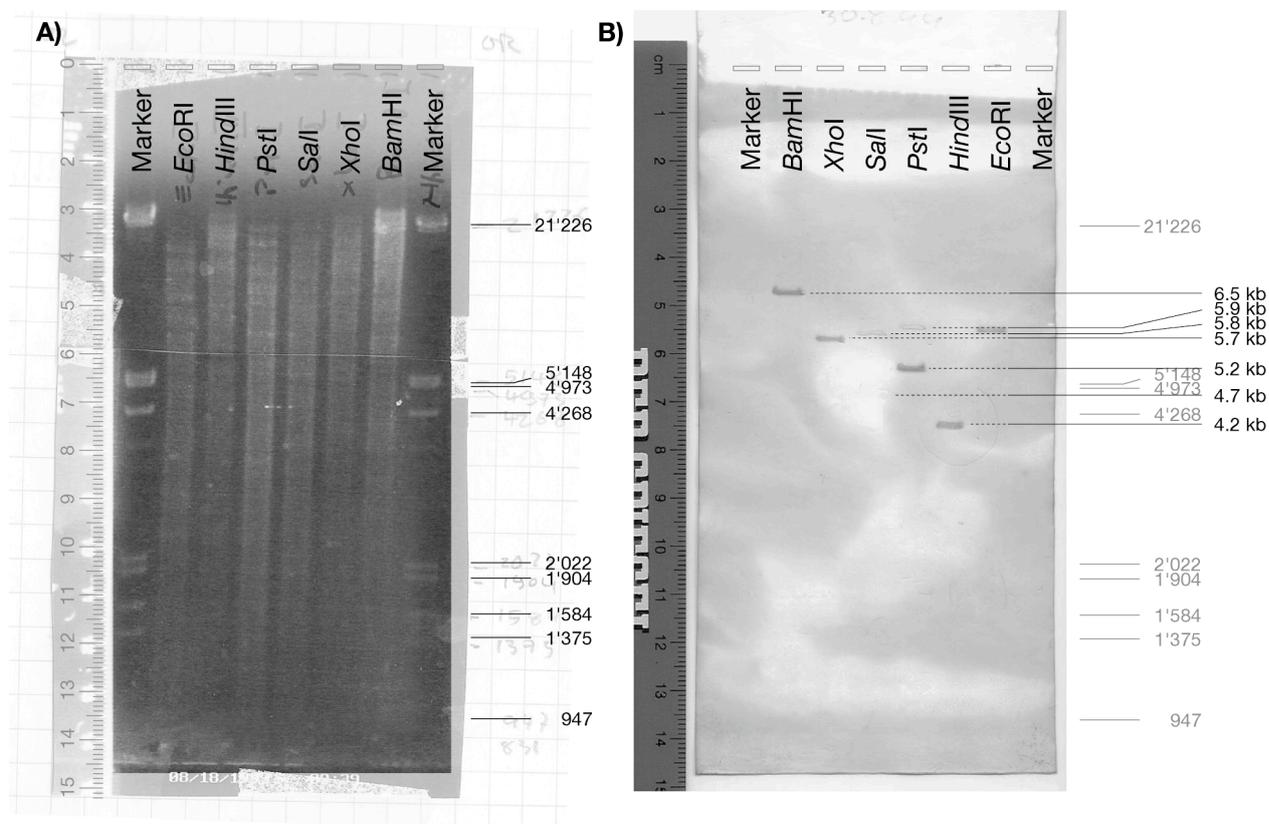


Abbildung 12: A) Agarose-Gel-Elektrophorese unterschiedlich verdauter genomischer DNA des Stammes AZD10a_EZLN1. **B)** 'Southern-Blot' desselben Geles. Als Sonde wurde ein DIG-markiertes PCR-Produkt eines Chlormuconat-Cycloisomerase-Gens desselben Stammes verwendet und mit Niederschlagsmethode nachgewiesen. Molekulargewichtsmarker war *HindIII*- und *EcoRI*-verdaute lambda-Phagen-DNA, Fragmentgrößen sind in Basenpaaren (bp) angegeben. Der Massstab neben dem Agarosegel und die Ladeorte wurden wegen der schlechten Bildqualität nachgezeichnet.

3.4.2 Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenase

Wie bei den Chlormuconat-Cycloisomerasen wurden die Umweltisolate in Bezug auf das Vorhandensein und auf die Diversität der Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen mit PCR und anschließender Sequenzierung untersucht. PCR wurden mit dem Primerpaar fw-diox-gram(-) / rev-diox-gram(-) (Thiel 2004) durchgeführt, die PCR-Fragmente von einigen Umweltisolaten wurden kloniert und sequenziert.

Stämme der direkten Isolierung in Chloraromaten-Atmosphäre

Von den Umweltisolaten der Bodenprobe MAROC N° 5 wurden, repräsentativ für die ganze Gruppe der isolierten γ -Proteobakterien, acht *Pseudomonas*-ähnliche Isolate sowie das eine β -Proteobakterium-ähnliche Isolat M013 für weitere Untersuchungen ausgewählt. Die ausgewählten acht *Pseudomonas*-ähnlichen Stämme waren M006, M016, M021, M034, M038, M039, M043k und M053.

Wiederum wurden mit keinem der Isolate in einer ersten PCR, auf dem Agarose-Gel sichtbare PCR-Produkte gebildet. Eine darauffolgende PCR, die statt mit genomischer DNA mit einem Aliquot der ersten Reaktion durchgeführt wurde, lieferte allerdings mit allen Isolaten ein einziges Produkt von 270 bp Länge.

Von den γ -Proteobakterium-ähnlichen Isolaten, wurden insgesamt 19 Klone mit den PCR-Produkten sequenziert. Vom *Ralstonia*-ähnlichen β -Proteobakterium M013 wurde lediglich ein Klon sequenziert. Um potentielle Sequenzunterschiede in möglicherweise mehrfach auftretenden Genkopien in den Isolaten zu erkennen, wurden von den meisten Isolaten drei verschiedene Klone mit PCR-Produkten sequenziert. Von M043k wurden nur zwei Klone sequenziert, von M038 nur einer.

Die 19 Klone mit dem PCR-Produkt von mutmasslichen Chlormuconat-Cycloisomerase-Genen wurden mindestens einmal in jede Richtung sequenziert und mit dem genetischen Code N° 11 (Nakamura et al. 2000) in Aminosäure-Sequenzen übersetzt.

Die Sequenzen der Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen-Gen-Fragmente sind weniger als ein Drittel so lang wie die Chlormuconat-Cycloisomerasen-Sequenzen, dementsprechend einfacher wurden klare Ergebnisse erhalten. In den 19 Sequenzen findet sich nur eine Unsicherheit im Aminosäure-Rest.

In den 19 Sequenzen wurden drei Polymorphismen gefunden. Einer betrifft alle Klone und tritt im Verhältnis 7:12 auf. Zwei Polymorphismen betreffen nur die verschiedenen Klone eines Isolates.

In der Aminosäure-Position 29³ befindet sich bei sieben Klonen ein Tyrosin- statt eines Phenylalanin-Restes. Der AS-Unterschied beruht auf ein Ersetzen von T durch A im Codon TTT (Phe, F) zu TAT (Tyr, Y) oder umgekehrt. Bei M006, M034 und M039 sind die unterschiedlichen Sequenzen desselben Isolates von diesem Polymorphismus betroffen. Mit einem Tyrosin-Rest an Position 29 wurden folgende Klone beobachtet: M006_klon_5b, M016_klon_7b, M034_klon_2b, M039_klon_4a, M053_klon_5a, M053_klon_5b, M053_klon_5c. An derselben Position haben folgende Klone ein Phenylalanin: M006_klon_5a, M006_klon_5c, M021_klon_8a, M021_klon_8c, M021_klon_21, M034_klon_2a, M034_klon_2c, M038_klon_3b, M039_klon_4b, M039_klon_4d, M043k_klon_1a, M043k_klon_1b. Aufgrund der Tatsache, dass dieser Polymorphismus quer durch die untersuchten Isolate geht, kann angenommen werden, dass die Isolate mehr als eine Kopie des Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen-Genes haben, oder mindestens mehr als eine Kopie des Gen-Fragmentes, das mit den verwendeten Primern amplifiziert werden kann. Dieser F/Y-Polymorphismus tritt auch bei mindestens sieben weiteren bekannten Sequenzen auf. Bei *Ralstonia* sp. C-0 (Acc AAC35835) und bei *Ralstonia* sp. JS705 (Acc CAA06968) tritt ebenfalls ein Phenylalanin-Rest auf, bei *Pseudomonas putida* JB2 (Acc AAC69474), *P. putida* AC866 (Acc P11451) und weiteren *Pseudomonas*-Sequenzen ein Tyrosin-Rest. Die untersuchten Sequenzen der Umweltisolate sind bis auf zwei weitere Auffälligkeiten der Stämme M034 und M053 identisch mit diesen sieben Sequenzen.

Von drei untersuchten Sequenzen des Isolates M034 haben zwei eine 'Nonsense'-Mutation an der AS-Position 59, die Sequenzen von M034_klon_2a und -2c. Bei der Stopp-Mutation wurde ein Tryptophan-Rest (TGG) durch Amber (TAG) ersetzt. Beide Sequenzen sind unüblich kurz, der Rückwärtsprimer wird nur zur Hälfte wiedergefunden. Für das Dendrogramm spielt dies allerdings keine Rolle, da hierfür die Primersequenzen sowieso abgeschnitten wurden. Dieselben zwei Sequenzen mit der Stopp-Mutation haben an Position 29 ein Phenylalanin, während die dritte Sequenz des Isolates M034 (M034_klon_2b) an dieser Stelle ein Tyrosin stehen hat.

³ Die Aminosäure-Position beginnt bei den transkribierten PCR-Fragmenten ohne Primer-Sequenz zu zählen, so wie sie für die Berechnung des Dendrogrammes benutzt wurden.

Der dritte Polymorphismus innerhalb der γ -proteobakteriellen Sequenzen betrifft nur das Isolat M053. An der AS-Position 68 von M053_klon_5a steht statt eines Alanin-Restes (GCG), wie bei allen anderen Sequenzen, ein Valin-Rest (GTG).

Die eine Sequenz des Isolates M013 (M013_klon_6a) ist auf dem kurzen Stück von 75 Aminosäuren identisch mit denen von sechs bekannten Stämmen, darunter zum Beispiel *Ralstonia eutropha* NH9 (Acc BAA74530), *Achromobacter xylosoxidans* A8 (Acc CAD56206) oder *Delftia acidovorans* P4a (Acc AAC35836).

Isolate der Anreicherung in *Azotobacter*-Medium

Auch bei den isolierten α -Proteobakterien der *Azotobacter*-Anreicherung lieferte die PCR in zwei Schritten von allen Isolaten gute Ergebnisse der erwarteten Grösse. Es wurden die PCR-Produkte von den Stämmen AZD5_G10 und AZD9_W1 kloniert. Die Klone AZD5_G10_klon_14, AZD9_W1_klon_5a wurden sequenziert. Beide Sequenzen unterscheiden sich auf dem 75 Aminosäuren langen Stück nicht von der entsprechenden Sequenz des ebenfalls *Bradyrhizobium*-ähnlichen Bodenisolates UO.

Dendrogramm

Das 'maximum-likelihood'-Dendrogramm wurde mit den vollständigen Aminosäuresequenzen der Brenzcatechin- und Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenase gerechnet, als Outgroup wurden Sequenzen oder Sequenzhomologe der Hydroxyhydrochinon-1,2-Dioxygenasen von *Agrobacterium tumefaciens* C58, *Burkholderia cepacia* AC1100 und *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 gewählt. Die in Aminosäuresequenzen übersetzten PCR-Produkte der Isolate wurden mit 'Quick add using Parsimony' dem Dendrogramm hinzugefügt. Das gesamte Protein ist 242 AS lang, die PCR-Fragmente 75 AS, was 31% der Gesamtproteinlänge ausmacht.

Die untersuchten Sequenzen der PCR-Produkte der γ -Proteobakterien-ähnlichen Isolate Mxxx liegen im Dendrogramm neben den Sequenzen ClcA von *Ralstonia* sp. JS705 (Acc Caa06968) und ClcA von *Pseudomonas aeruginosa* JB2 (AccT44616), mit denen sie fast identisch sind. Die Sequenzen der PCR-Produkte der Isolate AZD9_W1 und AZD5_G10 treten im selben 'Cluster' mit dem ebenfalls *Bradyrhizobium*-ähnlichen Bodenisolat UO auf (**Abbildung 13**).

Restriktionsanalyse einiger γ -Proteobakterien-ähnlichen Isolate

Da die Sequenzierung von klonierten PCR-Produkten sowohl arbeits- wie auch geldintensiv ist, wurde alternativ versucht, die Diversität der Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenase-Gene mit einer Restriktionsanalyse zu untersuchen. Anhand des erhaltenen Musters sollte auch gleich überprüft werden können, ob das PCR-Produkt von den gesuchten Genen stammt. Wiederum liess sich von allen ausgewählten *Pseudomonas*-ähnlichen Isolaten, in einer doppelten PCR ein PCR-Produkt mit dem Primerpaar fw-diox-gram(-) / rev-diox-gram(-) (Thiel 2004) gut herstellen. Dieses Produkt wurde anschliessend mit Restriktions-Endonukleasen verdaut, mit dem Ziel, für unterschiedliche Isolate unterschiedliche Bandenmuster zu erhalten. Insgesamt wurden die PCR-Produkte von 30 Isolaten mit den Restriktionsendonukleasen *TaqI*, *BsuRI* und *Bsh1236I* verdaut und die entstandenen Fragmente gelelektrophoretisch verglichen. Es wurden Nukleasen mit einer 4 bp Erkennungssequenz ausgewählt, um die maximale Wahrscheinlichkeit einer Schnittstelle im 260 Nukleotide grossen PCR-Produkt zu erhalten. Bei der Auswahl dreier Enzyme wurden möglichst preislich günstige Nukleasen verwendet (**Abbildung 14**).

Die Restriktionsendonuklease *TaqI* schnitt das PCR-Produkt aller *Pseudomonas*-ähnlichen Isolate in drei Fragmente. Eine Doppelbande war zwischen 200 und 250 bp sichtbar, eine kleine Bande war leicht grösser als 20 bp. Die grössere Doppelbande war kleiner als die des unverdauten PCR-Produktes. Die Summe der Fragmentgrössen war nicht teilbar durch die gesamte Länge des PCR-Produktes, es fehlten etwa 30 bp, um die vollständige DNA von zwei PCR-Fragmenten zu erhalten ($215+225+30=470$). Das legte den Schluss nahe, dass zwei unterschiedliche Sequenzen verdaut wurden, und dass beim Verdauen mindestens ein weiteres kleines Fragment entstand, welches der Detektion entging. Bei Wiederholungen tauchten auch verschwommene Banden bei 100, 50, 35 und 20 bp auf, diese waren aber nicht reproduzierbar.

Das Enzym *BsuRI* schnitt das PCR-Produkt aller *Pseudomonas*-ähnlichen Isolate in drei Fragmente der Grösse 145, 90 und 20 bp. Diese drei Fragmente waren bei allen Isolaten deutlich zu erkennen, und deren Summe entspricht der Länge des unverdauten PCR-Produktes. Daneben tauchten verschwommene, nicht reproduzierbare Banden bei 70, 50, 35 und 30 bp auf.

Das Enzym *Bsh1236I* schnitt das PCR-Produkt aller *Pseudomonas*-ähnlichen Isolate in drei Fragmente der Grösse 160, 75, und 40 bp; zusammen entspricht dies auch der Grösse des unverdauten PCR-Produktes. Banden zwischen 60 und 20 bp stellten sich als nicht reproduzierbar heraus.

Innerhalb der untersuchten Isolate fand sich mit den getesteten Restriktionsenzymen keine Diversität. Beobachtete Polymorphismen beruhen vermutlich auf Artefakten, bedingt durch unspezifische PCR-Produkte um 50 bp Grösse. Das unverdaute PCR-Produkt wird auf dem Polyacrylamid-Gel als Bande um 260 bp detektiert. Bei genauerer Betrachtung erkennt man noch eine weitere unscharfe und weniger ausgeprägte Bande um 50 bp Grösse.

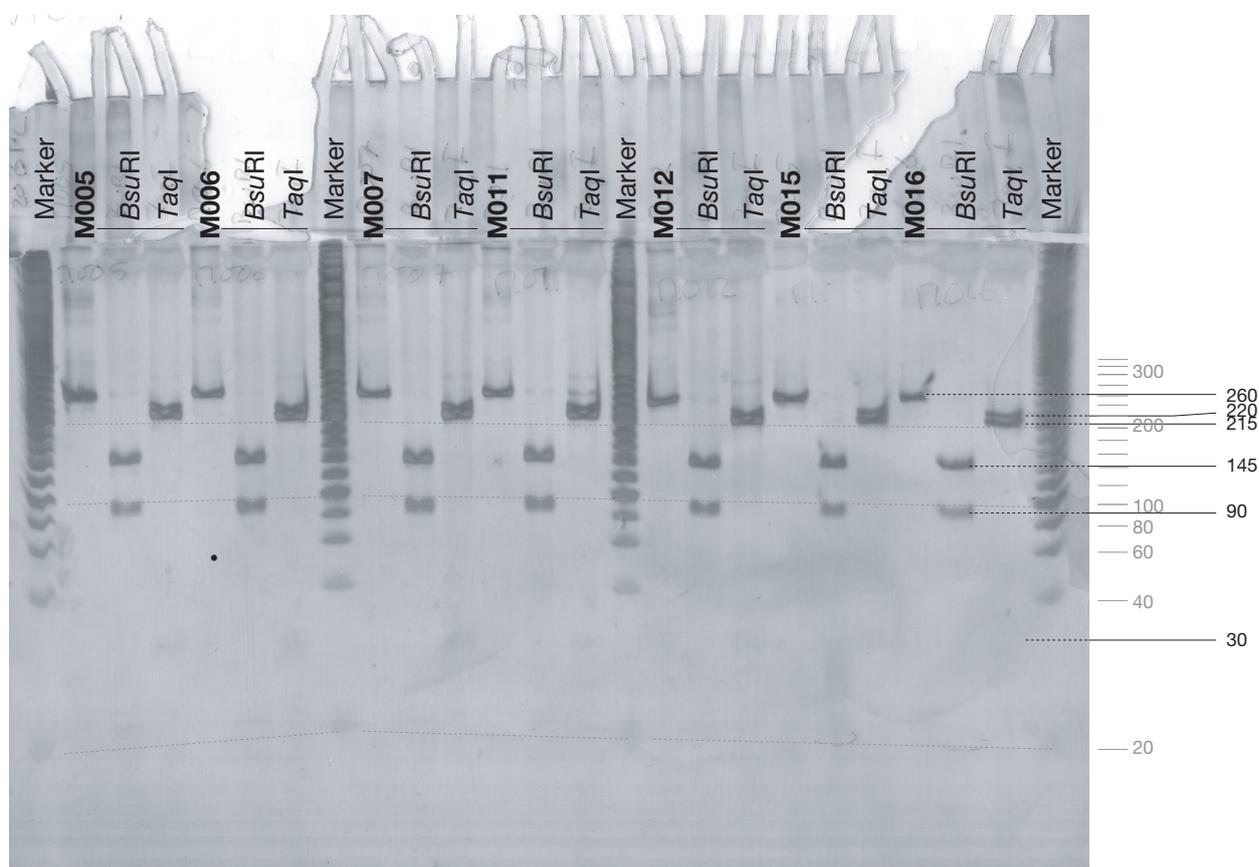


Abbildung 14: Mit den Restriktionsendonukleasen geschnittene PCR-Produkte einiger *Pseudomonas*-ähnlicher Isolate (**Mxxx**). Die PCR-Produkte wurden mit den Primern fw-diox-gram(-) / rev-diox-gram(-) für Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen hergestellt (Thiel 2004). Je drei Spuren wurden für eine Probe verwendet, von links nach rechts: Unverdaut (Mxxx), *BsuRI*, *TaqI*. Perl-Programm zur Planung eines RFLP-Experimentes

3.4.3 Perl-Programm zur Simulation einer Restriktionsanalyse

Die Diversität von PCR-Produkten kann unter Umständen zu gering sein, um mit zufällig ausgesuchten Restriktions-Endonukleasen die vorhandenen Polymorphismen aufdecken zu können. Es wurde deshalb ein Perl-Programm geschrieben, welches in einer Auswahl von homologen Nukleotid-Sequenzen Unterschiede findet und Nukleasen vorschlägt, die diese Unterschiede in einer Gel-Elektrophorese aufzeigen würden. Zur Visualisierung der Tauglichkeit dieser Enzyme werden von dem Programm anschliessend die ursprünglich eingesetzten DNA-Sequenzen mit eben diesen gefundenen Enzymen verdaut und damit Bilder einer simulierten Gel-Elektrophorese gezeichnet (**Abbildung 15**).

Von den 19 Sequenzen klonierter PCR Produkte der Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenase von acht *Pseudomonas*-ähnlichen MAROC N° 5 Isolaten, wurden die fünf einzigartigen Sequenzen ausgesucht und mit dem Programm 'restrifind9.pl' verglichen. Genauer untersucht wurden die Sequenzen: M006_klon_5a, M006_klon_5b, M034_klon_2a, M034_klon_2b und M053_klon_5a (**Ausdruck 1**).

Die Ausgabe des Programms über die Kommandozeile dient nur als momentane Statusangabe und kurzer Überblick. Es werden zusätzlich noch eine Textdatei mit dem 'Alignment' der untersuchten Sequenzen ausgegeben (**Ausdruck 2**) und eine Textdatei mit den errechneten Fragmentgrössen (**Ausdruck 3**). Für jede untersuchte Sequenz wird eine Abbildung generiert, die eine Gel-Elektrophorese mit den verdauten Sequenzen simuliert (**Abbildung 15**).

Erklärungen zum Protokoll (**Ausdruck 1 und 2**)

Die fünf Sequenzen unterscheiden sich in den Nukleotid-Positionen 90, 107, 197 und 224. Gesucht wurden 4-bp-Cutter, deren Erkennungssequenzen genau in diesen Positionen jeder einzelnen der untersuchten Sequenzen liegen. Da die Länge der verwendeten Primer angegeben wurde, wurde die Primer-Region nicht bei der Suche nach Sequenzunterschieden berücksichtigt (**Ausdruck 1**).

Für die Sequenzen M006_klon_5a und M006_klon_5b wurden keine Enzyme aufgelistet. Dies ist ernüchternd, weil der Unterschied zwischen den beiden Sequenzen den Aminosäure-Rest an Position 29 (Nukleotid-Position 107) betrifft. Das ist der einzige in

den untersuchten PCR-Produkten gefundene Polymorphismus, der auch in veröffentlichten Sequenzen präsent ist. Ein anderer Durchgang zeigte, dass auch keine handelsübliche Endonuklease mit 6-bp-Erkennungssequenz gefunden wurde, die den Tyrosin/Phenylalanin-Polymorphismus aufzeigen könnte. Die Datenbank der bekannten Nukleasen berücksichtigt alle Enzyme der bekannten Hersteller (bioperl 1.4.0).

Für die Mutation der Sequenz M034_klon_2b in Nukleotid-Position 90 wurde ebenfalls kein passendes Enzym gefunden. Diese Mutation von G zu C betrifft nur diese Sequenz und hat keinen Einfluss auf die damit codierte Aminosäure.

Für die Sequenz M053_klon_5a wurden hingegen gleich mehrere Enzyme gefunden, deren Erkennungssequenz in der fraglichen Region von Nukleotid-Position 224 liegt (*AccII*, *AspLEI*, *Hin6I*, *SelI*). Nach der betreffenden Nukleotid-Position, wird die gesamte mögliche Erkennungssequenz in Klammern aufgeführt. Das fragliche Nukleotid ist unterstrichen. Darauf folgen die Bezeichnungen der Enzyme mit ihren Isoschizomeren. In diesem Fall schneiden in der untersuchten Position vier verschiedene Enzyme, alle mit derselben Erkennungssequenz, aber unterschiedlichen Schnittstellen. Unter allen 19 sequenzierten PCR-Produkten tritt diese Mutation nur in Sequenz M053_klon_5a auf.

Es wurde auch ein Enzym gefunden, das die 'Nonsense'-Mutation der Sequenz M034_klon_2a, in Nukleotid-Position 197 von anderen Sequenzen unterscheiden hilft (*BfaI*). Auch diese Mutation wurde nur beim Isolat M034 beobachtet.

Auffallend am 'Alignment' (**Ausdruck 2**) ist die verkürzte Sequenz von M034_klon_2a. Die Sequenz des Rückwärts-Primers ist nicht vollständig, da aber die Länge der Primer angegeben werden konnte, hat das Programm restrifind9.pl in diesem Sequenz-Abschnitt nicht nach Nukleasen gesucht.

```

Maria:~ felipe$ ./restrifind9.pl
align 5 sequences ...
percent identity: 98.403

```

```

Primer-length is defined: Missmatches are only considered between 21 - 246
@not_equal: 90.107.197.224

```

```

looking for enzymes...
range of interest: 4 bp cutters

```

```

      spot (SITE):          EnzyME (CLEA^VAGE)
-----
M006_klon_5a
M006_klon_5b
M034_klon_2b
M053_klon_5a
  in 224 (AGGCGCG):      AccII Bsh1236I BstFNI BstUI FnuDII MvnI ThaI (CG^CG)
                        AspLEI BstHHI CfoI HhaI (GCG^C)
                        Hin6I HinP1I HspAI (G^CGC)
                        SclI (CGCG)
M034_2a
  in 197 (CCTAGCG):      BfaI MaeI XspI (C^TAG)
interesting enzyme(s):  Hin6I AspLEI SclI AccII BfaI

```

Ausdruck 1: Protokoll des Programms restrifind9.pl auf der Kommandozeile. Nur für die Sequenzen M053_5a und M034_2a werden sich mit Endonukleasen eindeutige Bandenmuster herstellen lassen. Die letzte Zeile (Interesting enzymes) gibt alle Enzyme an, mit denen sich die Sequenzen unterscheiden lassen, ohne Isoschizomere.

CLUSTAL W(1.81) multiple sequence alignment

```

M006_5a/1-269  ATCGACGTGTGGCATTTCGACGCCTGATGGCTTGTACAGCGGGATCCACGACAACATCCCC
M006_5b/1-269  ATCGACGTGTGGCATTTCGACGCCTGATGGCTTGTACAGCGGGATCCACGACAACATCCCC
M034_2b/1-269  ATCGATGTGTGGCACTTCGACGCCTGATGGCTTGTACAGCGGGATCCACGACAACATCCCC
M053_5a/1-269  ATCGATGTGTGGCACTCCACGCCTGATGGCTTGTACAGCGGGATCCACGACAACATCCCC
M034_2a/1-254  ATCGATATGTGGCACTTCGACGCCTGATGGCTTGTACAGCGGGATCCACGACAACATCCCC
*****
      _      * _
M006_5a/1-269  GTGGACTACTACCGCGGAAAACCTCGTGACGGATTCCCAGGGCAACTTTCGCGTGCGCACC
M006_5b/1-269  GTGGACTACTACCGCGGAAAACCTCGTGACGGATTCCCAGGGCAACTATCGCGTGCGCACC
M034_2b/1-269  GTGGACTACTACCGCGGAAAACCTCGTGACAGATTCCCAGGGCAACTATCGCGTGCGCACC
M053_5a/1-269  GTGGACTACTACCGCGGAAAACCTCGTGACGGATTCCCAGGGCAACTATCGCGTGCGCACC
M034_2a/1-254  GTGGACTACTACCGCGGAAAACCTCGTGACGGATTCCCAGGGCAACTTTCGCGTGCGCACC
*****
      _
M006_5a/1-269  ACGATGCCAGTGCCATACCAGATCCCCTACGAGGGGCCGACTGGGCGTCTGCTGGGCCAC
M006_5b/1-269  ACGATGCCAGTGCCATACCAGATCCCCTACGAGGGGCCGACTGGGCGTCTGCTGGGCCAC
M034_2b/1-269  ACGATGCCAGTGCCATACCAGATCCCCTACGAGGGGCCGACTGGGCGTCTGCTGGGCCAC
M053_5a/1-269  ACGATGCCAGTGCCATACCAGATCCCCTACGAGGGGCCGACTGGGCGTCTGCTGGGCCAC
M034_2a/1-254  ACGATGCCAGTGCCATACCAGATCCCCTACGAGGGGCCGACTGGGCGTCTGCTGGGCCAC
*****

```

```

M006_5a/1-269 CTGGGCAGCCATACCTGGCGTCCGGCGCACGTGCACTTCAAGGTGCGCAAGGACGGTTTC
M006_5b/1-269 CTGGGCAGCCATACCTGGCGTCCGGCGCACGTGCACTTCAAGGTGCGCAAGGACGGTTTC
M034_2b/1-269 CTGGGCAGCCATACCTGGCGTCCGGCGCACGTGCACTTCAAGGTGCGCAAGGACGGTTTC
M053_5a/1-269 CTGGGCAGCCATACCTGGCGTCCGGCGCACGTGCACTTCAAGGCGCGCAAGGACGGTTTC
M034_2a/1-254 CTGGGCAGCCATACCTAGCGTCCGGCGCACGTGCACTTCAAGGTGCGCAAGGACGGTTTC
*****
                _
M006_5a/1-269 GAACCGCTGACCACCCAGTACTACTTTCGA
M006_5b/1-269 GAACCGCTGACCACCCAGTACTACTTTCGA
M034_2b/1-269 GAACCGCTGACCACCCAGTACTACTTTCGA
M053_5a/1-269 GAACCGCTGACCACCCAGTACTACTTTCGA
M034_2a/1-254 GAACCGCTGACCAA.....
*****
                _____
    
```

Ausdruck 2: 'Alignment' der untersuchten Sequenzen (hier in ClustalW-Format). Die Lücken in der untersten Linie geben die Sequenz-Unterschiede an. Eine Linie ist 60 Nukleotide breit.

ENZYME	FRAGMENTS			
-----	-----			
M006_klon_5a				
AccII	74	36	159	
Hin6I	114	91	20	44
SelI	72	36	161	
AspLEI	116	91	20	42
BfaI	269			
M006_klon_5b				
AccII	74	36	159	
Hin6I	114	91	20	44
SelI	72	36	161	
AspLEI	116	91	20	42
BfaI	269			
M053_klon_5a				
AccII	74	36	115	44
Hin6I	114	91	18	46
SelI	72	36	115	46
AspLEI	116	91	18	44
BfaI	269			
M034_klon_2b				
AccII	74	36	159	
Hin6I	114	91	20	44
SelI	72	36	161	
AspLEI	116	91	20	42
BfaI	269			

M034_klon_2a

AccII	74	36	144	
Hin6I	114	91	20	29
SelI	72	36	146	
AspLEI	116	91	20	27
BfaI	195	59		

SITE ISOSCHIZOMER

CG^CG	AccII Bsh1236I BstFNI BstUI FnuDII MvnI ThaI
G^CGC	Hin6I HinP1I HspAI
^CGCG	SelI
GCG^C	AspLEI BstHHI CfoI HhaI
C^TAG	BfaI MaeI XspI

Ausdruck 3: Erwartete Fragmentgrößen der untersuchten Sequenzen nach Verdau mit den gefundenen Nukleasen. Zuunterst sind zur besseren Übersicht die einzelnen Enzyme mit ihren Isoschizomeren angegeben.

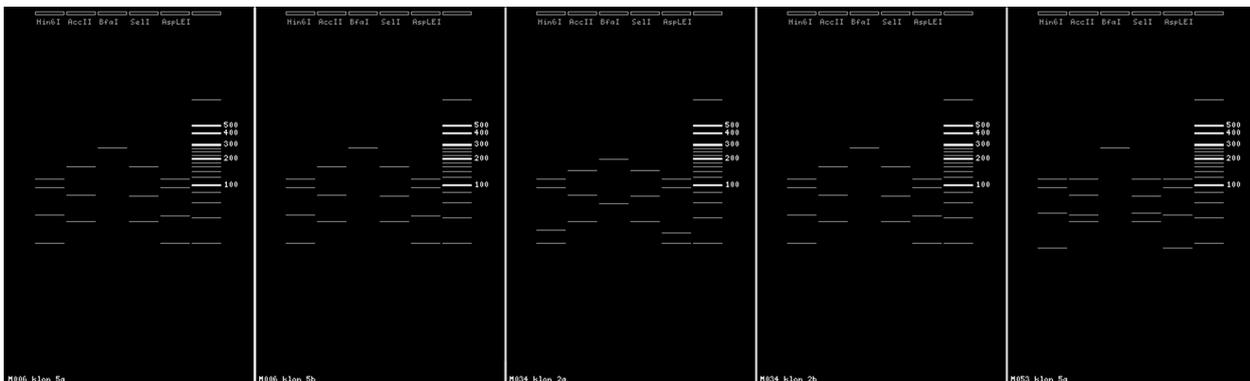


Abbildung 15: Mit dem Programm restrifind9.pl generierte Bilder. Von links nach rechts sind die simulierten Gel-Elektrophorese-Bilder der Sequenzen M006_klon_5a, M006_klon_5b, M034_klon_2a, M034_klon_2b und M053_klon_5a. Die Sequenzen wurden mit den Enzymen *Hin6I*, *AccII*, *BfaI*, *SelI* und *AspLEI* verdaut.

Simulation mit den Enzymen der Restriktionsanalyse

Die untersuchten Sequenzen wurden in einer Simulation auch mit den Enzymen *BsuRI*, *TaqI* verdaut. Ein simulierter Verdau der 269 bp langen Sequenzen offenbart, dass die Doppelbande, die mit *TaqI* zwischen 200 und 250 bp entsteht (**Abbildung 14**), aus Fragmenten von 223 und 237 bp von zwei unterschiedlichen Sequenzen besteht. Der Polymorphismus beruht aber auf den degenerierten Primern. Je nach Primer entstehen folgende Fragmente: (2, 237, 26 bp) und (2, 14, 223, 26 bp).

Funktionen des Programms restrifind9.pl

Das Programm restrifind9.pl wurde mit einigen Funktionen ausgestattet, die die Benutzung vereinfachen sollten.

1. Revers komplementäre Sequenzen werden erkannt und nach Bedarf umgedreht.
2. Ungleich lange Sequenzen können auf ihre kürzeste gemeinsame Sequenz beschnitten werden. Mit dieser Option ist es möglich, einer grossen Menge Sequenzen die Primer- oder Vektorsequenzen gemäss einer Vorlage wegzuschneiden.
3. Für eine bessere Simulation der Restriktionsanalyse, kann die Länge der Primer definiert werden. Damit ist es möglich, die Primer-Sequenzen nur bei der simulierten Restriktion und Gel-Elektrophorese zu berücksichtigen, nicht aber bei der Suche nach Sequenzunterschieden.
4. Auf den simulierten Gel-Bildern wird zur Orientierung ein Molekulargewichtsmarker mit eingezeichnet. Beliebige Banden des Markers können gekennzeichnet und beschriftet werden.
5. Die Sequenzen können in vielen verschiedenen Formaten importiert oder exportiert werden, unter anderem in Fasta, Nexus, Phylip, msf (GCG).
6. Es wird die redundante Restriktionsenzymdatenbank von bioperl verwendet. Beim Programmieren wurde darauf geachtet, die unterschiedlich benannten Enzyme mit gleicher Erkennungssequenz als Einheit zu behandeln. Damit wird nicht nur Rechenzeit eingespart, sondern vor allem wird der Ausdruck übersichtlicher. Um die anschliessende Suche im Katalog zu erleichtern, werden die Isoschizomere im Anhang aufgelistet.
7. Das Programm ist ein 'SourceForge'-Projekt, aktuelle Versionen können von der folgenden Web-Seite geladen werden: <http://restrifind.sourceforge.net> .

4 Diskussion

4.1	Nachweis von Abbauprozessen	95
4.1.1	Kultivierungsabhängige Methoden	95
4.1.2	Kultivierungsunabhängige Methoden	97
4.2	Neue Chloraromaten verwertende Isolate aus Anreicherungen	98
4.2.1	Beurteilung der verwendeten Anreicherungsstrategien	98
4.2.2	<i>Bradyrhizobium</i> -Verwandschaft der 2,4-D Verwerter	104
4.2.3	Gene des Chloraromaten-Abbauweges	119
4.2.4	Nachweis der katabolen Gene in Umweltproben	127
4.3	Chlorbenzol-Verwerter aus direkter Isolierung	130
4.3.1	Taxonomische Diversität der Isolate	131
4.3.2	Gene des Chlorbrenzcatechin-Weges der direkt isolierten Stämme	142

4.1 Nachweis von Abbauprozessen

Das Ziel der Arbeit war die Weiterentwicklung von kultivierungsunabhängigen Methoden zum Nachweis von Chloraromaten-Abbau in einer Umweltprobe. Diese Techniken sollten helfen, einen verunreinigten Standort in Bezug auf die bestehenden Abbauprozesse einschätzen und kontrollieren zu können. Es sollte ermöglicht werden, einen Überblick über die vorhandenen Schadstoff abbauenden Gene zu erhalten, zu beobachten, wie sie sich entwickeln, und herauszufinden, unter welchen Bedingungen sie induziert werden.

4.1.1 Kultivierungsabhängige Methoden

Schadstoff-Abbau wurde traditionell über kultivierungsabhängige Methoden nachgewiesen werden. Techniken dazu sind die Anreicherung oder die direkte Isolierung von Schadstoff-Verwertern. Beide Methoden haben gegenüber einem kultivierungsunabhängigen Ansatz beträchtliche Nachteile, sind aber unerlässlich, um neue Stämme mit den gesuchten katabolen Genen zu erhalten.

Die Anreicherung in einem Schüttelkolben selektioniert die Bakterien auch auf ihre Toleranz zum Wachstum unter Laborbedingungen (Watanabe und Baker 2000). Beim Überimpfen oder bei Substratzugabe werden die Bakterien sprunghaften Veränderungen wichtiger Mediumsparameter ausgesetzt. Dazu zählen die Zelldichte, der pH-Wert, die Konzentrationen von Nähr- und Giftstoffen, von Signalmolekülen und von osmotisch aktiven Verbindungen. Dieser Selektionsdruck behindert das Wachstum von schwer kultivierbaren Bakterien, es setzen sich vor allem Stämme durch, die diesem Stress standhalten. Die Zugabe von Nährstoffen hat einen starken Einfluss auf die Diversität der in Kultur befindlichen Bakterien, üblicherweise hin zu γ -Proteobakterien, weshalb dieses Phänomen auch ' γ -shift' genannt wird (Amann et al. 1995).

Bei der direkten Isolierung findet Selektion hingegen allein durch das Festmedium und die Umgebungsbedingungen statt. Das verdünnte Inokulum wird direkt auf geeignetes Festmedium ausgestrichen. Jede Bakterienzelle, die auf diesem Medium zur Koloniebildung fähig ist, wird auch eine Kolonie bilden. Bei Verwendung einer chloraromatischen Verbindung als einziger Kohlenstoffquelle sollten dementsprechend nur solche Bakterien wachsen, die diese Verbindung als Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen können. Allerdings mindern bioverfügbare Bestandteile des Agars, potentielle Substrate der Umweltprobe und autotrophes Wachstum zahlreicher Bakterien den Selektionsdruck durch die zugefügte Kohlenstoffquelle und verfälschen so die Auswahl der wachsenden Kolonien. Die Wahl der richtigen Verdünnung ist für den Erfolg einer direkten Isolierung wichtig. Zu starke Verdünnung der Umweltprobe verhindert tendenziell die Detektion seltener Bakterien. Bei zu niedriger Verdünnung hingegen, spielen die mit dem Inokulum eingebrachten Nährstoffe der Umweltprobe eine grössere Rolle. Bei niedrigen Verdünnungen werden die Agarplatten bald mit schnell wachsenden Kolonien besiedelt und die langsameren Bakterien werden durch Hemmstoffe oder Substratmangel am Wachstum gehindert.

Die direkte Isolierung auf Festmedium bringt im Vergleich zur Anreicherungs-Kultur eine grosse Diversität unter den Isolatoren hervor (Dunbar et al. 1997; Marchesi und Weightman 2003). Es kann allerdings sein, dass es schwierig wird, daraus Reinkulturen herzustellen. Marchesi, aber auch Lilley et al., beschreiben, wie Bakterien nach der direkten Isolierung auf weiteres Wachstum 'verzichteten' (Lilley et al. 1996). Marchesi et al. machten dafür einen Mangel an Wachstumsfaktoren im frischen Medium verant-

wortlich, die im ursprünglichen Aliquot vorhanden waren. Lilley et al. beobachteten in diesem Zusammenhang signifikant weniger Kolonien auf Medien ohne CSE (Cold Soil Extract), als auf solchen mit CSE.

Es kann ziemlich aufwändig sein, in einer Kultivierung natürliche Bedingungen nachzubilden. Zum Beispiel bilden Oberflächen von Festkörpern einzigartige ökologische Nischen für bakterielles Wachstum (Ellwood et al. 1982). Brown gab in einer von zwei verglichenen Anreicherungen mit Flusswasser Stückchen von Aluminium-Folie zu, und fand in der Anreicherung mit Aluminium-Folie eine viel grössere bakterielle Diversität. Die wenigsten Isolate waren aber anschliessend kultivierbar (Brown et al. 1977).

Ein Problem bei Anreicherung oder direkten Isolierung sind die unterschiedlichen Wachstumsraten von Bakterien. Bei den üblichen Kultivierungsmethoden können Bakterien mit einer geringen Teilungsrate, von den 'schnelleren' Stämmen 'überwachsen' werden. Erst kürzlich wurde ein neuer Weg zur Isolierung von langsam wachsenden Bakterien beschrieben. Bei der 'filtration-acclimatization method' (FAM) werden durch Filterung einer Wasserprobe (0.2 µm) erst die in hoch konzentrierten Medien schnell wachsenden Bakterien ausgeschieden. Der anschliessende Akklimatisierungsschritt erhöht die Nährstoff-Konzentration im Medium langsam auf die von Standard-Medien. Mit dieser Methode wurden von 65 isolierten Reinkulturen, 88% nicht beschriebene gefunden. Die isolierten Stämme gehören zu den Actinomyceten, α - und β -Proteobakterien, *Bacteroidetes* und *Spirochaeta*, wachsen auch mit hohen Substratkonzentrationen und bilden auf Festmedium Kolonien (Hahn et al. 2004). Es wäre sicher sehr interessant, diese Technik für die Isolierung von Schadstoff-Abbauern zu anzuwenden.

Bis jetzt wurden mit den Methoden der Anreicherung und der direkten Isolierung von Chloraromaten-Verwertern, ausser wenigen Actinomyceten, vor allem Proteobakterien erfasst (**Tabelle 1**, Seite 11).

4.1.2 Kultivierungsunabhängige Methoden

Weder die Anreicherung, noch die direkte Isolierung von Bakterien können die Abbauvorgänge im Boden genügend genau abbilden, um damit Schadstoffabbau zu überwachen. Um den Nachteilen der Isolierung von Chloraromaten-abbauenden Bakterien zu

entgehen und mit steigender Kenntnis über die genetischen Zusammenhänge wurden kultivierungsunabhängige Ansätze immer wichtiger (Pieper et al. 2004). Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten dazu beitragen die kultivierungsunabhängigen Methoden zu verfeinern. Genetische Methoden setzen voraus, dass die verwendeten Sonden hinreichend spezifisch für die gesuchte Aktivität sind. So sollten zum Beispiel Brenzcatechin- von Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen unterschieden werden können. Andererseits sollten die verwendeten Sonden genügend unspezifisch sein, um die in der Natur vorkommende Diversität der untersuchten Enzyme zu berücksichtigen.

In dieser Arbeit sollten aus Umweltproben Bakterienstämme isoliert werden, die bis heute als Chloraromaten-Verwerter unbekannt sind. Ungewöhnliche Anreicherungs-Methoden sollten zur Isolierung von möglichst ungewöhnlichen Chloraromaten-Verwerter führen. Die verfügbaren PCR-Primer zur Amplifizierung von Fragmenten der Chlormuconat-Cycloisomerasen und Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen sollten dann an den in dieser Arbeit isolierten Bakterien-Stämmen getestet werden.

Die direkte Isolierung von Chloraromaten-Verwertern aus einer kontaminierten Umweltprobe sollte sicherstellen, dass alle dort vorkommenden kultivierbaren Bakterien erfasst werden. Mit der direkten Isolierung sollte die Abbaufähigkeit in der Probe mit herkömmlichen Methoden abgeschätzt und mit den Ergebnissen der genetischen Methoden verglichen werden. Sollten mit der direkten Isolierung Stämme erhalten werden, deren Gene sich mit den bekannten PCR-Primern nicht oder nur schwer amplifizieren lassen, sollte eine Sequenzierung dieser Gene zur Erhöhung der Sequenzdatenbasis beitragen.

4.2 Neue Chloraromaten verwertende Isolate aus Anreicherungen

4.2.1 Beurteilung der verwendeten Anreicherungsstrategien

Es ist sehr wahrscheinlich, mit Anreicherungskulturen häufig beschriebene Organismen zu isolieren (Watanabe und Baker 2000; Marchesi und Weightman 2003). Die Methode der Anreicherung in Flüssigkultur führt oft nur zu einem oder wenigen sehr ähnlichen

Stämmen. Dem Problem der geringen Diversität in einer Anreicherungskultur kann begegnet werden, indem mehrere Ansätze parallel durchgeführt werden, üblicherweise wird aber trotz dieser Massnahme die Diversität geringer sein, als sie durch direkte Isolierung auf Festmedium erreicht werden kann (Dunbar et al. 1997). Für eine Anreicherung in Flüssigkultur sprechen die Isolation von 'robusten' Laborstämmen (Marchesi und Weightman 2003) und die sich prinzipiell von der direkten Isolierung unterscheidenden Bedingungen. In der Flüssigkultur können Bakterien wachsen, die nicht fähig sind, auf Agarplatten Kolonien zu bilden (Dunbar et al. 1997).

Anreicherung in AGS-Medium mit 3-Chloranilin

Aniline und Derivate werden zur Herstellung von Farbstoffen, Pestiziden, Kunststoffen, Pharmazeutika und anderen Stoffen verwendet (Gheewala und Annachatre 1997). Aufgrund der Carzinogenität der Aniline (Lyons et al. 1985) wurde schon öfters versucht, Chloranilin-abbauende Stämme zu isolieren (Dejonghe et al. 2002). Bis auf eine Ausnahme wurden allerdings bis jetzt nur proteobakterielle Chloranilin abbauende Stämme beschrieben. Es wäre interessant, Chloranilin degradierende Actinomyceten zu isolieren.

Mit Ausnahme von *Rhodococcus rhodochrous* CTM sind alle isolierten Chloranilin-abbauenden Stämme Proteobakterien. Der Stamm *R. rhodochrous* CTM kann allerdings 2-Methylanilin und einige chlorinierte Isomere nur mit Ethanol als Substrat cometabolisch abbauen (Fuchs et al. 1991). Die restlichen bekannten Isolate sind Proteobakterien: *Moraxella* (früher *Pseudomonas*) sp. Stamm G wurde im Chemostaten angereichert (Zeyer und Kearney 1982), *Pseudomonas* sp. Stamm JL2, JL4, JL5 durch Anreicherung in Co-Kultivierung mit *Pseudomonas acidovorans* B13 (Dorn et al. 1974), *Brevundimonas* (früher *Pseudomonas*) *diminuta* INMI KS-7 (Surovtseva et al. 1986), *Delftia* (früher *Pseudomonas*) *acidovorans* CA28, isoliert aus Anreicherung (Loidl et al. 1990) und *Delftia* (früher *Pseudomonas*) *acidovorans* BN3.1 (Brunsbach und Reineke 1993), *Aquaspirillum* sp. Stamm 2CA und *Paracoccus denitrificans* Stamm 3CA (Surovtseva et al. 1996), *Comamonas testosteroni* Stamm I2, isoliert aus Anreicherungskultur (Boon et al. 2000).

Das Arginin-Glycerin-Salz-Medium (AGS-Medium) ist für die Anreicherung aerober Actinomyceten geeignet (El-Nakeeb und Lechevalier 1963). Die Autoren bemerken in

ihrer Veröffentlichung, dass das beschriebene Medium bei der direkten Isolierung von Actinomyceten sehr gute Ergebnisse liefert. Sie betonen, dass die Mediumszusammensetzung als Ganzes ausgereift ist und jede Änderung schlechtere Ergebnisse liefert. Interessanterweise führen sie allerdings auch auf, dass beim Weglassen der Kohlenstoff- und Stickstoffquellen Glycerin und Arginin nur die Gesamtzahl der isolierten Bakterien, nicht aber der Actinomyceten-Anteil verringert wird. Dank dieser Tatsache schien es Erfolg versprechend Arginin durch 3-Chloranilin zu ersetzen und Glycerin ganz wegzulassen. Immerhin liegt bei 3-Chloranilin der Stickstoff wie bei Arginin in derselben Reduktionsstufe vor, nämlich als Aminogruppe. Aufgrund der geringen Glycerin-Konzentration (136 mM = 1.3% (w/w)) wird davon ausgegangen, dass die selektive Wirkung von Glycerin als Kohlenstoffquelle, nicht aber von seiner hygroskopischen Eigenschaft ausgeht.

Eine Schwierigkeit bei der Isolierung und beim Nachweis der Verwertung einer bestimmten Kohlenstoffquelle von Actinomyceten sind ihre geringen Substratansprüche. Actinomyceten können sehr gut mit Verunreinigungen des Agars wachsen (El-Nakeeb und Lechevalier 1963). Aus diesem bescheidenen Umgang mit dem Substrat folgt, dass es schwierig ist, mit der Energie- und Kohlenstoffquelle einen Selektionsdruck auf Actinomyceten auszuüben. Obwohl in der ursprünglichen Veröffentlichung des AGS-Mediums die Actinomyceten direkt auf Festmedium isoliert wurden, schien es in diesem Fall angebracht, die Stamm-Isolierung erst nach kurzer Anreicherung in Flüssigmedium, also ohne potentiell alternatives Substrat durchzuführen.

Das AGS-Flüssigmedium wurde mit Grundwasser aus dem Bitterfelder SAFIRA-Projekt inokuliert. Zwei Tage nach Erhöhung der Substratkonzentration auf 0.2 mM zeigten die Anreicherungskulturen eine leichte Trübung, nach weiteren zwei Tagen (18 Tage nach Inokulum) wurden die Kulturen auf AGS-Festmedium (0.5 mM) ausplattiert.

Von 80 Kolonien wurde schliesslich auf Replikplatten das Wachstum mit 3-Chloranilin überprüft, aus den 69 potentiell 3-Chloranilin-abbauenden Stämmen wurden dann 41 in Flüssigkultur angezogen. Nur drei dieser Kulturen hatten allerdings nach 30 Tagen über 30% des zugefügten 3-Chloranilines abgebaut. Diese Isolate wurden als *Pseudomonas*-ähnliche γ -Proteobakterien charakterisiert. Ärgerlicherweise versagten diese nach kurzer Zeit das weitere Wachstum auf 3-Chloranilin.

Es wurde erwartet, dass Chloranilin-Verwertung nachgewiesen werden konnte. Das Bitterfelder Grundwasser in der Umgebung der SAFIRA-Brunnen war zwar in der jüngeren Geschichte vor allem mit Chlorbenzol belastet worden. Chloranilin-Verunreinigungen wurden aber in der Nähe der SAFIRA-Brunnen gefunden (Franke et al. 2004). Es konnte angenommen werden, dass sich in den benutzten Umweltproben einige Chloranilin-Abbauer befinden würden, schliesslich war Bitterfeld der frühere Standort der Firma AGFA (Aktien-Gesellschaft für Anilin-Fabrikation) und Chloraniline sind Zwischenstufen in der Synthese von Diazofarbstoffen (Mitteilung S. Kaschabek). Aufgrund der Anreicherungs- und Isolierungs-Bedingungen wurde erwartet, dass sich unter den verwertenden Stämmen einige Actinomyceten befinden. Trotz der geringen Nährstoffkonzentration von 0.1-0.2 mM 3-Chloranilin in Flüssigmedium, bzw. 0.5 mM in Festmedium, wurden nur drei γ -Proteobakterien-ähnliche Bakterien isoliert.

Von der Molarität her gesehen war die Stickstoffquelle (Arginin) im ursprünglichen Medium über 10-fach stärker konzentriert (5 mM). Es wird deshalb nicht angenommen, dass in der Anreicherung der so genannte ' γ -shift' eine Rolle gespielt hat. Als ' γ -shift' bezeichnet man die beobachtete überproportionale Vermehrung der γ -Proteobakterien in einer Anreicherung bei Zugabe von Nährstoffen (Amann et al. 1995). Es wird vielmehr angenommen, dass sich viele der auf Festmedium isolierten Bakterien auf Grund der veränderten Umweltbedingungen nicht mehr in Flüssigmedium kultivieren liessen. Erklärungen für die Unfähigkeit, in Flüssigmedium zu wachsen, können mangelnde Oberflächen (Brown et al. 1977), fehlende Wachstumsfaktoren (Lilley et al. 1996; Marchesi und Weightman 2003) oder oft beobachtete Schwierigkeiten bei der Kultivierung von Actinomyceten (El-Nakeeb und Lechevalier 1963) sein.

Die 69 auf Festmedium isolierten Stämme, bei denen nach einem ersten Replikatest 3-Chloranilin-Verwertung nicht ausgeschlossen werden konnte, waren in Kolonie-Farbe und -Grösse sehr divers. Sie sollten aber erst nach dem definitiven Nachweis der 3-Chloranilin-Verwertung in Flüssigmedium genauer untersucht werden. Es kann deshalb nicht geklärt werden, ob die Anreicherung von 3-Chloraromaten verwertenden Actinomyceten mit AGS-Medium erfolgreich war, die Actinomyceten jedoch anschliessend die Fähigkeit verloren, in Flüssigmedium zu wachsen und 3-Chloranilin zu verwerten. Der Verlust der Fähigkeit zum Chloraromaten-Abbau ist immerhin schon an anderer Stelle beobachtet worden (Kamagata et al. 1997), es kann deshalb nicht aus-

geschlossen werden, dass AGS-Medium ohne Arginin und Glycerin, aber mit 3-Chloranilin ein geeignetes Medium zur Anreicherung von Chloraromaten verwertenden Bakterien ist.

Anreicherung in *Azotobacter*-Medium mit 2,4-D

Dieses Medium besteht nur aus den drei Salzen $MgSO_4$, K_2HPO_4 und $FeSO_4$. Mannitol ist die einzige Kohlenstoffquelle, Stickstoff und Spurenelemente fehlen, das verwendete Wasser soll destilliert sein (Holt und Krieg 1994). Die Salze wurden rein (99%) verwendet. Die angereicherten Bakterien mussten sich mit den Spurensalzen aus dem Inokulum begnügen und selber Stickstoff unter aeroben Bedingungen und nicht symbiotisch fixieren. Für die Anreicherung von Chloraromaten-Verwertern wurde Mannitol durch 2,4-D ersetzt.

Die mit diesem Medium angereicherten Stämme AZDx gehören gemäss 16S rDNA-Analyse alle zu den *Bradyrhizobium*-ähnlichen α -Proteobakterien. Diese werden als langsam wachsende⁴, oligotrophe, Stickstoff fixierende Leguminosen-Symbionten beschrieben. Das verwendete *Azotobacter*-Medium ist nicht selektiv für oligotrophe Bedingungen. Wird Oligotrophie definiert als die Fähigkeit, mit höchstens 1-15 mg Kohlenstoff pro Liter Medium wachsen zu können (Kuznetsov et al. 1979), so überschreitet 3.0 mM 2,4-D diese Minimalmenge um ein 20-faches (290 mg Kohlenstoff / l Medium). Aerobe, nicht-symbiotische Stickstoff-Fixierung stimmen hingegen mit den Anreicherungsbedingungen überein. Manche *Bradyrhizobium*-Stämme sind nämlich auch zu frei lebender Stickstoff Fixierung fähig (Jordan 1984; Kuykendall et al. 1992). Im 16S rDNA-Dendrogramm der *Bradyrhizobium*- und *Blastobacter*-Spezies findet man in derselben monophyletischen Gruppe mit *Agromonas* auch noch weitere frei lebenden Stickstoff-Fixierer (Sawada et al. 2003). Interessanterweise können *Bradyrhizobium* Spezies ebenfalls Mannitol verwerten (Jordan 1984), das ursprüngliche Substrat des verwendeten Anreicherungsmediums.

Obwohl das Medium zur Anreicherung von *Azotobacter* beschrieben ist (aerobe, Stickstoff fixierende *Pseudomonadales*, γ -Proteobakterien), wurden *Bradyrhizobium*-

⁴ Griechisch: bradys = langsam

ähnliche Isolate erhalten. *Bradyrhizobium*-Arten sind für ausgesprochen langsames Wachstum bekannt, nach 5-7 Tagen haben Kolonien immer noch weniger als 1 mm Durchmesser (Jordan 1984), bei *Azotobacter* hingegen sind auf stickstofffreiem Mineralmedium schon nach 48 h Kolonien erkennbar (Tchan und New 1984). Es wird deshalb angenommen, dass sich in einer Anreicherung in *Azotobacter*-Medium *Azotobacter*-Stämme vor den *Bradyrhizobium*-Stämmen durchsetzten (sonst würde das Medium vermutlich *Bradyrhizobium*-Medium heissen). Daraus wird gefolgert, dass sich in der Bodenprobe keine 2,4-D-verwertenden *Azotobacter* befunden haben.

Normalerweise wird in stickstofffreien Anreicherungsmedien nur kurze Zeit inkubiert. Dadurch soll verhindert werden, dass der durch die erwünschten Stickstoff-Fixierer angebotene Stickstoff auch anderen Bakterien das Wachstum ermöglicht. Beim *Azotobacter*-Medium (Holt und Krieg 1994) ist keine Inkubationszeit vorgeschrieben. Es steht nur, man soll regelmässig mikroskopisch nach langen, eiförmigen Zellen mit einem Durchmesser über 2 µm suchen, einmal in frisches Medium überimpfen und anschliessend auf *Azotobacter*-Festmedium plattieren. Da offensichtlich keine 2,4-D abbauenden *Azotobacter* gewachsen sind, hätte diese Vorgehensweise im vorliegenden Fall vermutlich zu keinen Ergebnissen geführt.

Beurteilung der erfolglosen Anreicherungen

Zur Isolierung von neuen Chloraromaten-abbauenden Stämmen, wurden einige Anreicherungsstrategien ausgetestet. Zum Beispiel wurde eine Anreicherungskultur in 2,4-D und 3-Chlorbenzoat, mit der Schwingmühle zwei mal homogenisiert, um die Bakterien mit dünner Zellwand durch den mechanischen Stress zu lysieren. Es wurde auch versucht, mit Antibiotika oder hemmenden Stoffen wie Methylrot gewisse unerwünschte Bakteriengruppen abzutöten, um den gewünschten Bakterien mehr Raum zu geben.

Aber die meisten Versuche blieben erfolglos. Je mehr Zeit damit verbracht wurde, Reinkulturen herzustellen oder in vergleichenden Wachstumstests, mit und ohne Substrat, den Abbau nachzuweisen, desto weniger Isolate überlebten. Je länger die Versuche dauerten, desto weniger Stämme schienen zu wachsen. Mit jedem Transfer auf frisches Festmedium verloren die Stämme an Vitalität. Es wurde bewusst viel Zeit investiert in Stämme, die nicht gut wuchsen, um die 'unüblichen' unter den Chloraro-

maten-Verwertern zu erhalten. Um schlecht wachsende Bakterien zu kultivieren, wurden sie in Zellkulturplatten in Flüssigmedium gezogen, oder es wurden zusätzliche Kohlenstoffquellen beigegeben, oder geringe Mengen von Komplexmedien.

Auf jeden Fall hat die Wahl des Chloraromaten einen starken Einfluss auf den Erfolg. Wie Kamagata et al. beobachtet hatten, wurden zum Beispiel mit 2,4-D viel weniger, dafür andere Chloraromaten-Verwerter gefunden als mit 3-Chlorbenzol (Fulthorpe et al. 1996; Kamagata et al. 1997). Bei der Anreicherung in *Azotobacter*-Medium mit 2,4-D konnten dafür nur aus der Anreicherung mit 3.0/6.0/3.0 mM 2,4-D, Stämme isoliert werden. Eine parallele Anreicherung mit 3-Chlorbenzoat lieferte keine Ergebnisse, ebenfalls wurden keine Stämme aus der Anreicherung mit 1.5/3.0/1.5 mM 2,4-D erhalten.

4.2.2 *Bradyrhizobium*-Verwandschaft der 2,4-D Verwerter

Die Isolate AZDx wurden in einer Studienarbeit taxonomisch genauer untersucht (Glöckner 2004). Glöckner kommt aufgrund von Unterschieden in den ITS-Fragmentlängen (Internal Transcribed Spacer) und chemotaxonomischen Untersuchungen zum Schluss, dass es sich bei den Isolaten wahrscheinlich um Vertreter einer neuen Spezies des *Bradyrhizobium*-Genus handelt. Aufgrund von Ganzzell-Proteingelen und Box-PCR konnten die Isolate in zwei Gruppen geteilt werden. Sie vermutete, dass es sich bei allen Isolaten um nur zwei unterschiedliche Stämme handelte. Die ITS-Sequenzen wiesen hingegen eine grössere Diversität auf, worauf Glöckner vermutete, dass es sich bei den meisten Isolaten um unterschiedliche Stämme handelt.

Zusätzlich zu diesen Arbeiten wurde in der vorliegenden Arbeit die nächste Verwandtschaft der Stämme AZDx auch noch mit Hilfe eines 'maximum likelihood' und eines 'neighbor joining'-Dendrogrammes beleuchtet.

Interpretation des Dendrogrammes

Der Hauptzweck des 16S rDNA-Dendrogrammes lag darin, die phylogenetischen Beziehungen zu anderen Umweltisolaten und Typstämmen auf eine einprägsame Art darzustellen. Alle Isolate AZDx stammen aus der Anreicherung in *Azotobacter*-Medium mit 2,4-D. Bei all diesen Isolaten wurde 2,4-D-Verwertung nachgewiesen, und sie wurden alle mit Hilfe eines 16S rDNA-Dendrogrammes als *Bradyrhizobium*-ähnlich

eingeordnet. Bis zum endgültig abgebildeten 'maximum likelihood'-Dendrogramm (**Abbildung 2**, Seite 59) wurden probeweise unterschiedliche Sequenzen als 'Outgroup' mitgerechnet, oder es wurden das *Bosea*-'Cluster' und verschiedene Umweltisolate in die Berechnung miteinbezogen oder weggelassen. Es fiel auf, dass das Verzweigungsmuster der Typstämme mit jeder Berechnung leicht variierte. Diese Unsicherheit bei der Deutung der genauen phylogenetischen Beziehungen aufgrund eines 16S rDNA-Dendrogrammes war innerhalb der 'Bradyrhizobiaceae' schon früher aufgefallen (van Berkum und Eardly 2002). Gerade das 'Cluster' der Sequenzen der 2,4-D-abbauenden Umweltisolate änderte oft seine Nachbarschaft zu den Typstämmen in Abhängigkeit der miteinbezogenen Sequenzen. In keinem Fall gelang es allerdings, mit der 'maximum likelihood'-Methode dieselbe Struktur wie Itoh et al. (2000) oder Sawada et al. (2003) zu erhalten (**Abbildung 17**, Seite 109), in beiden Publikationen sind 'bootstrap'-Dendrogramme abgebildet. Zum Vergleich wurde deshalb zusätzlich eine auf 'neighbor joining'-Berechnungen basierende 'bootstrap'-Analyse durchgeführt (**Abbildung 16**, Seite 108).

Sowohl im 'bootstrap'- als auch im 'maximum likelihood'-Dendrogramm bildeten die Sequenzen der Bodenisolate AZDx ein 'Cluster' mit denen der Umweltisolate *Bradyrhizobium* sp. 1 (Acc AY238503), Stamm RCO (Acc D89030) und des nicht kultivierten Bakteriums AF382111 (Acc AF382111). Bei beiden Dendrogrammen lagen auch die Sequenzen der Stämme *Bradyrhizobium* sp. SH28301 (Acc AF041446) und BTH (Acc D89029) in derselben monophyletischen Gruppe, allerdings eine Verzweigung weiter entfernt von den Isolaten AZDx. Eine weitere Verzweigung näher zum Ursprung hin, wurden die Unterschiede zwischen dem 'maximum likelihood'- und dem 'bootstrap'-Dendrogramm offenbar: Im 'bootstrap'-Dendrogramm hatten *Bradyrhizobium elkanii* USDA76 (Acc U35000) und die Umweltisolate HW13 (Acc D89027), HWK12 (Acc D89028), RD5C2 (Acc AB035489) zusammen mit den Stämmen AZDx einen gemeinsamen Vorfahren, der unabhängig war von den übrigen Typstämmen der 'Bradyrhizobiaceae'. Im 'maximum likelihood'-Dendrogramm hingegen war das 'Cluster' der verschiedenen Umweltisolate um die Stämme AZDx nur Teil einer grossen monophyletischen Gruppe, die alle 'Bradyrhizobiaceae' ausser *Bosea* enthielt. Vom Ursprung des 'maximum likelihood'-Dendrogrammes her betrachtet, zweigten von diesem grossen 'Cluster' erst die Typstämme von *Afipia* und *Oligotropha* ab, dann das 'Cluster' um die

Stämme AZDx und zum Schluss die Typstämme von *Bradyrhizobium*, *Nitrobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Agromonas* und *Blastobacter*.

Die Verzweigungen des 'bootstrap'-Dendrogramms (**Abbildung 16**) stimmen überein mit denen der Dendrogramme von Sawada et al. (2003) (**Abbildung 17 A**) und Itoh et al. (2000) (**Abbildung 17 B**). Charakteristisch an allen drei Dendrogrammen ist die Position des Typstammes von *B. elkanii* USD76, der in 100% der berechneten Bäume vom 'Cluster' der übrigen 'Bradyrhizobiaceae' abzweigt. Im Dendrogramm von Itoh et al. (2000) liegen die 2,4-D-abbauenden Umweltisolate BTH, RCO, HWK12 und HW13, RD5C2 ebenfalls mit *B. elkanii* in einem 'Cluster' (**Abbildung 17 B**). Die Positionen der übrigen 'Bradyrhizobiaceae' in Ito's Dendrogramm lassen sich im Unterschied zu denen in Sawada's Dendrogramm allerdings schlecht mit denen in **Abbildung 16** vergleichen, weil es sich nur bei den wenigsten um Typstämme handelt.

Im paarweisen Vergleich, ohne Anwendung von Filtern, haben die Sequenzen des AZDx-'Clusters' die geringste Distanz zu den Sequenzen des Typstammes *Afipia birgiae* 34632 (Acc AF288304), 2.1-2.2%, gefolgt von *B. elkanii* USDA76 und *A. bromeae* G5958 (Acc U87761), beide 2.3-2.4%, gefolgt von und *A. massiliensis* 63287 (Acc AF288309), 2.7-2.8% (**Tabelle 17**).

Aufgrund der grossen Ähnlichkeiten der 16S rDNA Sequenzen wurde von Willems et al. (2001) in Betracht gezogen, alle Gattungen des grossen 'Clusters' mit *Afipia*, *Bradyrhizobium*, *Nitrobacter* und *Rhodopseudomonas* zusammenzufügen. Die Idee wurde aber mit dem Hinweis verworfen, dass die einzelnen Gattungen ja gut durch hohe 'bootstrap'-Werte voneinander unterschieden werden können und die phänotypischen Beobachtungen, die zur Bildung dieser Gattungen führten, ihre Gültigkeit behalten haben (Willems et al. 2001a).

Interessant im Zusammenhang mit der grossen ökologischen Diversität der 'Bradyrhizobiaceae' sind die Versuche von van Berkum et al. (2002) mit *Blastobacter*, einem Süsswasserbakterium. Aufgrund der grossen Übereinstimmung der 16S rDNA von *Blastobacter denitrificans* mit *Bradyrhizobium*-ähnlichen Isolaten aus Wurzelknöllchen von *Aeschynomene indica* wurde vermutet, dass *Blastobacter denitrificans* ebenfalls zu Symbiose mit *A. indica* fähig ist, was dann auch tatsächlich im Experiment bestätigt werden konnte. Aufgrund dieser Beobachtung wurde wieder in Betracht gezogen, *Blastobacter denitrificans* in eine eigene *Bradyrhizobium*-Art neben *B. japonicum*,

B. elkanii, und *B. liaoningense* umzubenennen (van Berkum und Eardly 2002). Das Ergebnis ist übrigens bemerkenswert, weil damit gelungen war, ein Indiz aus molekularen phylogenetischen Untersuchungen zur Vorhersage eines Phänotyps zu benutzen.

Zur groben Einteilung ist die Sequenz des 16S rDNA-Genes ideal, weil es funktionell konserviert ist und in allen Bakterien vorkommt. Für die eindeutige Zuordnung eines Stammes sind jedoch weitere Abklärungen empfohlen. 16S rDNA kann in verschiedener Kopienzahl vorkommen, es wurde auch über Transfer und Rekombination der ribosomalen Gene berichtet (van Berkum et al. 2003). Durch den genauen Vergleich von 16S rDNA-Sequenzen aus *B. elkanii* USDA76 und *B. japonicum* USDA6 wurde gezeigt, dass mögliche, kurze und umgedrehte Gen-Fragmente von *B. japonicum* einen Einfluss auf seine Position im Dendrogramm haben. Wurde hingegen das besagte Gen-Fragment bei der Berechnung des Dendrogrammes nicht berücksichtigt, reihte sich *B. japonicum* im 16S rDNA-Dendrogramm genau so ein wie aufgrund des ITS- oder 23S rDNA-Dendrogrammes erwartet (van Berkum et al. 2003).

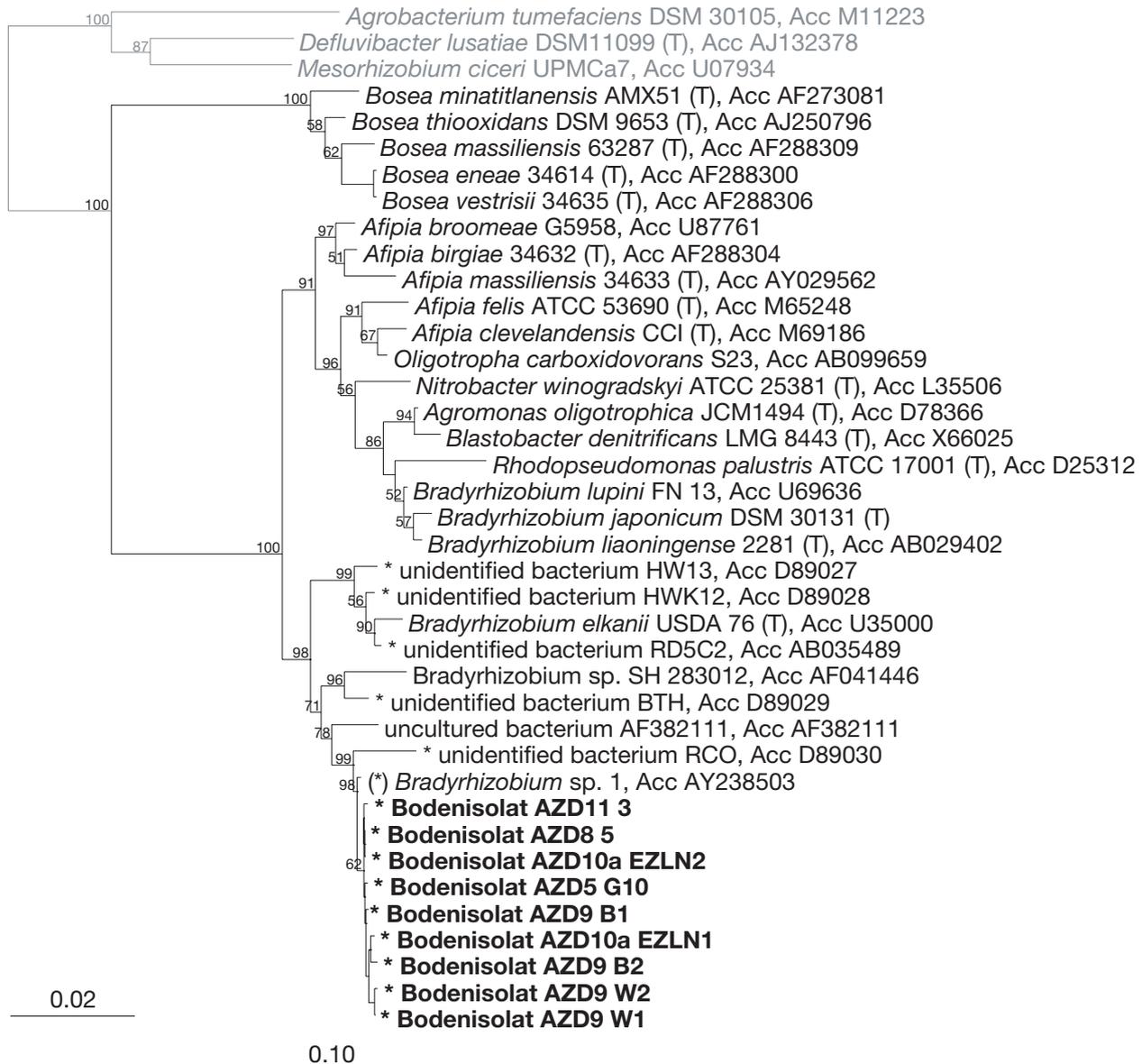


Abbildung 16: 'Neighbor-joining'-Dendrogramm aufgrund der 16S rDNA der 'Bradyrhizobiaceae' und verwandter Bodenisolate AZDx. **Abbildung 2** (Seite 59) vergleicht dieselben Sequenzen anhand der 'maximum likelihood'-Methode. Mit * markiert sind Isolate die zu 2,4-D-Abbau fähig sind, bei (*) wird 2,4-D-Abbau vermutet. Typstämme sind mit (T) markiert. 'Bootstrap'-Werte sind in % und basieren auf 1087 Rechnungen. Werte unter 50% sind nicht angegeben. **Grau:** 'Outgroup'.

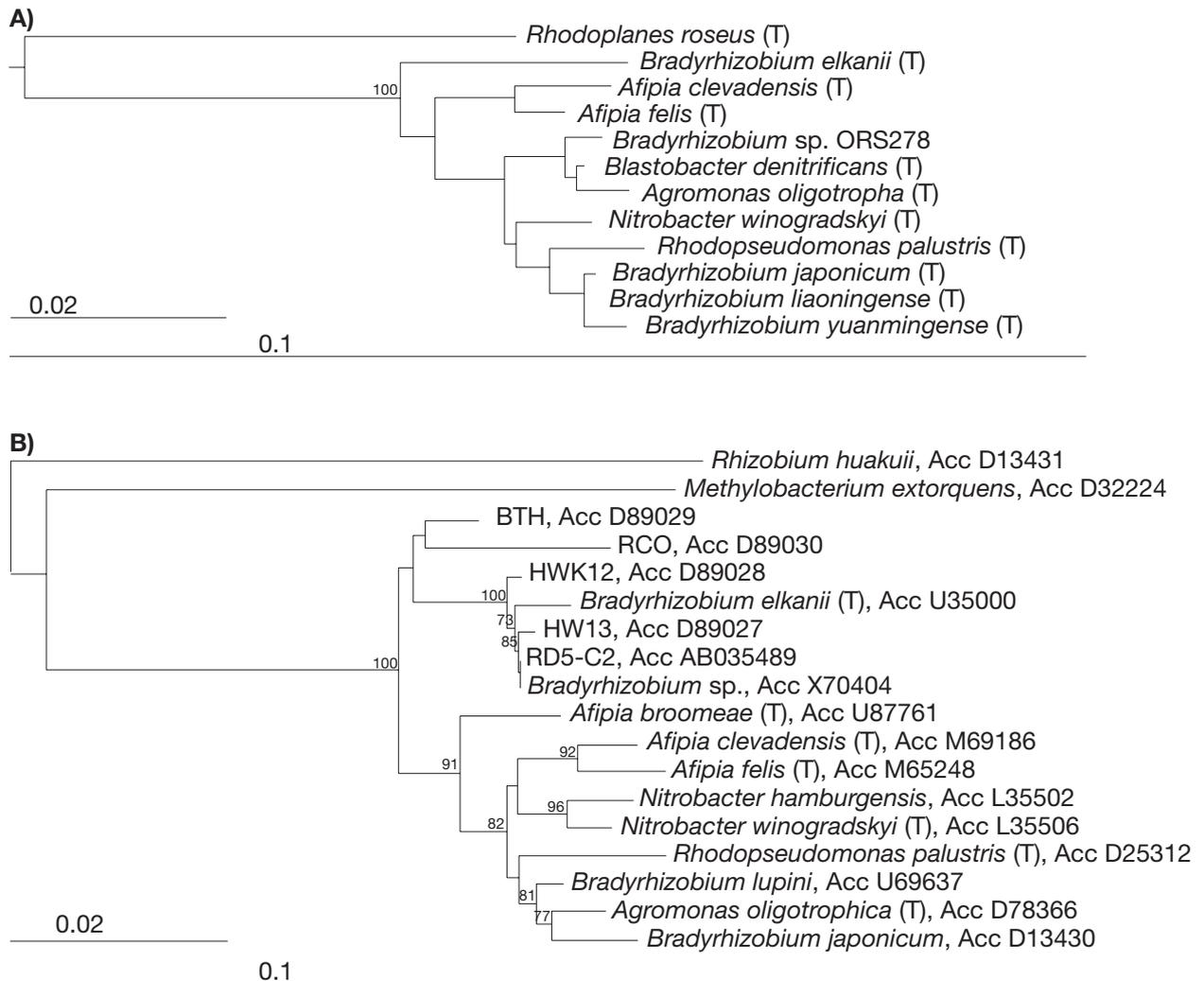


Abbildung 17: 'Neighbor-joining'-Dendrogramm aufgrund der 16S rDNA der 'Bradyrhizobiaceae' aus Sawada et al. (2003) (**A**, Ausschnitt) und Itoh et al. (2000) (**B**). Die Dendrogramme wurden vom Original abgezeichnet und auf dieselbe Grösse skaliert. Bei A) wurden die 'bootstrap'-Werte unter 100% nicht angegeben, bei B) die unter 50% nicht.

Die Familie der 'Bradyrhizobiaceae'

Zur Gattung *Bradyrhizobium* gehören Stickstoff fixierende Leguminosen-Symbionten. Kürzlich wurde ein neues Konzept zur Einteilung der Stickstoff fixierenden Leguminosen-Symbionten vorgestellt (Sawada et al. 2003). Leguminosen-Symbionten sind derzeit in 44 Arten in 12 Gattungen geordnet. Bei 16S rDNA-Dendrogrammen werden aber nur neun monophyletische Gruppen gebildet, zwei in der Klasse der β -Proteobakterien und sieben bei den α -Proteobakterien. Sawada et al. schlugen vor, aus jeder monophyletischen Gruppe eine neue Gattung zu bilden. Die den Bodenisolaten AZDx am nächsten verwandten Gattungen *Afipia*, *Blastobacter* und *Bradyrhizobium* befinden sich in der Gruppe Nummer 4. Diese Gruppe wird an anderer Stelle BANA-Cluster

genannt, *Bradyrhizobium-Agromonas-Nitrobacter-Afipia* (Itoh et al. 2000) oder auch die Familie der 'Bradyrhizobiaceae' (Ludwig und Klenk 2001).

Die Vertreter dieser Familie haben sehr unterschiedliche Eigenschaften: Säugetierpathogen (*Afipia*) (Brenner et al. 1991), frei lebende Stickstoff-Fixierung (*Agromonas*) (Ohta und Hattori 1983), Vorkommen in Süßwasser (*Blastobacter*) (Hirsch und Müller 1985; Willems und Collins 1992), heterotrophe Thiosulfat-Oxidation (*Bosea*) (Das et al. 1996), symbiotische und frei lebende Stickstoff Fixierung (*Bradyrhizobium*) (Jordan 1984), chemolithoautotrophe Nitrit-Oxidation (*Nitrobacter*) (Bock und Koops 1992) und Photosynthese (*Rhodopseudomonas*) (Eaglesham et al. 1990). In anderen Parametern finden sich in dieser Gruppe starke Ähnlichkeiten: G+C Gehalt, Genomgröße, Wachstumsrate, Oberflächenladung, Gram-Färbung und Hitzeresistenz (Hattori et al. 1997).

Trotz der starken phänotypischen Unterschiede innerhalb der 'Bradyrhizobiaceae' wurde aufgrund der grossen Übereinstimmung der 16S rDNA-Sequenzen schon früh vorgeschlagen, einige Gattungen zusammenzulegen, ohne allerdings einen Namen zu empfehlen (Willems und Collins 1992). Die Zusammenlegung einiger Gattungen innerhalb der 'Bradyrhizobiaceae' wurde in den folgenden Jahren immer wieder diskutiert (Willems et al. 2001a; van Berkum und Eardly 2002; Sawada et al. 2003; van Berkum et al. 2003). Diese Spekulationen endeten allerdings immer wieder in einem gut dokumentierten 'Lamento' über die aufzuwendende Sorgfalt bei den notwendigen Umbenennungen und der Unerlässlichkeit der über die 16S rDNA-Sequenzen hinausgehenden Daten. Es wurde bemerkt, dass *B. japonicum* Stämme zu divers sind, um in einer Art zusammengefasst zu werden (Sawada et al. 2003). Zudem gibt es viele nicht weiter klassifizierte Umweltisolate, aus denen neue Arten gebildet werden müssten. Die isolierten Stämme AZDx bilden eine monophyletische Gruppe mit zwei anderen kultivierbaren Stämmen (*Bradyrhizobium* sp. 1 und Stamm RCO). In nächster Nachbarschaft von *Bradyrhizobium elkannii* USDA 76 aber in sicherer Distanz zu den Isolaten AZDx befinden sich weitere nicht näher definierte 2,4-D-Abbauer (Stämme BTH, HWK 12, HW 13 und RD5-C2).

Die meisten bekannten *Afipia* (*A. birgiae*, *A. broomeae*, *A. felis*, *A. massiliensis*) wurden aus menschlichen klinischen Proben isoliert. *Afipia felis* ist als möglicher Erreger der Katzenkratz-Krankheit bekannt geworden. Inzwischen wird aber vor allem

Bartonella henselae dafür verantwortlich gemacht (Giladi et al. 1998; Windsor 2001). Eine einzige Geißel macht *Afipia* motil (Brenner et al. 1991). Als einziger kann *A. felis* Nitrat reduzieren. Von keinem *Afipia* wurde über Phototrophie berichtet. Aufgrund ihrer möglichen oder opportunistischen Pathogenität werden alle *Afipia* in Deutschland in die Risikogruppe 2 eingeordnet.

Agromonas oligotrophica ist die einzige Art der Gattung *Agromonas*. Sie werden wie *Bradyrhizobium* als aerobe, oligotrophe, Stickstoff fixierende Bakterien beschrieben, eine polare Geißel verleiht ihnen Mobilität. Auf normalem NB-Agar wird kein Wachstum beobachtet, auf 0.1-0.001-fach verdünntem NB kann *Agromonas* wachsen (Ohta und Hattori 1983).

Die Gattung ***Blastobacter*** ist eine künstlich definierte, polyphyletische Gruppe (Sawada et al. 2003). Zu *Blastobacter* werden im Wasser lebende, Haufen bildende Bakterien gezählt. ***B. denitrificans*** ist die einzige Art innerhalb der 'Bradyrhizobiaceae' (Sawada et al. 2003), die übrigen *Blastobacter*-Arten werden zu den *Rhizobiaceae* gezählt (Young et al. 2001). Die 16S rDNA Sequenzen von *B. denitrificans* sind fast identisch mit denen mancher *Bradyrhizobium*-Stämme die aus den Wurzelknöllchen von *Aeschynomene indica* isoliert wurden (van Berkum und Eardly 2002). Es wurde auch schon gezeigt, dass der Typstamm von *Blastobacter denitrificans* zu Symbiose mit *A. indica* fähig ist (van Berkum und Eardly 2002). Für die Phylogenetik wurden Sequenzen der ITS Region und von 16S rDNA genommen, es wurde aber vorgeschlagen, zusätzliche Sequenzen von *B. denitrificans* mit entsprechenden Sequenzen aus der Gattung *Bradyrhizobium* zu vergleichen, bevor *B. denitrificans* endgültig zur Gattung *Bradyrhizobium* gezählt wird (van Berkum und Eardly 2002).

Die Gattung ***Bosea*** (***B. eneae***, ***B. massiliensis***, ***B. minatitlanensis***, ***B. thiooxidans*** und ***B. vestrisii***) enthält chemolithoheterotrophe, strikt aerobe Bakterien, sie können nicht in Mineralmedien mit Ammonium oder Nitrat als einziger Stickstoffquelle wachsen. Eine polare Geißel verleiht ihnen Motilität (Das et al. 1996). *Bosea* wachsen auf NB, nicht aber auf NB mit 6% NaCl (La Scola et al. 2003). Ursprünglich war *B. thiooxidans* die einzige Art der Gattung *Bosea*, und Thiosulfat-Oxidation wurde als phänotypisches Merkmal der gesamten Gattung beschrieben. Seit der Bestimmung weiterer *Bosea*-Arten wird Thiosulfat-Oxidation nur noch zur Beschreibung von *B. thiooxidans*

verwendet. *B. massiliensis*, *B. eneeae* und *B. vestrisi* wurden aus dem Leitungswasser eines Spitals, in Co-Kultur mit Amöben isoliert (La Scola et al. 2003).

Die Gattung ***Bradyrhizobium*** (*B. elkanii*, *B. japonicum*, *B. liaoningense*, *B. lupini*) enthält oligotrophe, Stickstoff fixierende Leguminosen-Symbionten (Jordan 1984). *B. elkanii* ist auch zu nicht symbiotischer Stickstoff Fixierung fähig, dies im Unterschied zu *B. japonicum* (Kuykendall et al. 1992). Oligotrophie ist die Fähigkeit, mit höchstens 1-15 mg Kohlenstoff pro Liter Medium wachsen zu können (Kuznetsov et al. 1979). Manche Bradyrhizobien haben ein breites Wirtsspektrum, andere können nur mit bestimmten Pflanzenarten zusammenleben, die Zugehörigkeit zu einer Art ist unabhängig von der Wirtsspezifität (Young und Haukka 1996), aber sowohl *B. japonicum* als auch *B. elkanii* sind Soja-Symbionten. Es gibt im Genus *Bradyrhizobium* sehr viele nicht klassifizierte Wildstämme, die aufgrund ihrer 16S rDNA als eine neue Art eingeteilt werden müssten (Sawada et al. 2003). Die hier isolierten Stämme AZDx würden vermutlich auch in eine neue Art gezählt und sich aufgrund der 16S rDNA zusammen mit anderen 2,4-D-abbauenden Isolaten in denselben Zweig mit *B. elkanii* einordnen (**Abbildung 16**). Aufgrund des Dendrogrammes wird angenommen, dass in diesem Zweig 2,4-D-Abbau ein ursprüngliches Merkmal ist, die neuen Arten könnten als oligotrophe, nicht obligat symbiotisch Stickstoff fixierende 2,4-D-Abbauer beschrieben werden. Alle *Bradyrhizobium*-Isolate, die mit der Sojabohne eine Symbiose eingehen können, wurden zu *B. japonicum* gezählt, phylogenetische Analysen aufgrund von DNA-DNA Hybridisierungen und der 16S rDNA haben allerdings ergeben, dass die vielen bekannten *B. japonicum* Stämme zu divers sind, um in eine Art eingeteilt zu werden (Young und Haukka 1996; Willems et al. 2001b). 1995 wurde die neue Art *B. liaoningense* vorgestellt, interessanterweise unterscheidet sich diese von den anderen *Bradyrhizobium*-Arten durch ausgesprochen langsames Wachstum (Xu et al. 1995).

Rhodopseudomonas palustris (früher *Photorhizobium thompsonum*) ist eine ziemlich spezielle Gattung. Sie können mit verschiedenen *Aeschynomene*-Arten in Symbiose leben, bilden da aber am Stamm und nicht an der Wurzel die symbiotischen Knöllchen zur Fixierung von Stickstoff (Eaglesham et al. 1990). In einem hell / dunkel Wechsel unter aeroben Bedingungen in Flüssigmedium bilden diese Bakterien photosynthetische Aktivität, sie sind aber auch fähig, unter anaeroben Bedingungen photoautotroph

zu wachsen (Molouba et al. 1999). Kürzlich wurden einige *R. palustris* Isolate beschrieben, die unter anoxischen Bedingungen 2- und 3-Chlorbenzoat cometabolisch abbauen können. Als Substrat wurde Benzoat benötigt, nach 1-5 Monaten waren allerdings alle Isolate fähig, die chlorierten Benzoate als einzige Kohlenstoffquelle zu verwenden (Oda et al. 2003).

Vergleich der Anreicherungsstrategien, die zu nah verwandten Stämmen führten

Im Unterschied zu den Isolatzen AZDx, wurden die Stämme RCO und BTH (Fulthorpe et al. 1996) von unberührten Standorten und unter sehr milden Bedingungen isoliert. Die Anreicherung erfolgte in der ursprünglichen Erde, und es wurden nur geringe Mengen 2,4-D gefüttert. Um die Bakterien nicht alleine mit den Chloraromaten 'darben' zu lassen, wurden sogar kleine Mengen Casamino Acids und Hefeextrakt dazugegeben. In der bis zu 60 Tage dauernden Anreicherung mit acht Bodenproben gelang es, aus einer Auswahl von anschliessend 610 isolierten 2,4-D-Abbauern nur insgesamt fünf 2,4-D-Abbauer weiter zu kultivieren. Die übrigen 2,4-D-abbauenden Stämme des besprochenen 'Clusters', HW13, HWK12 (Kamagata et al. 1997) und RD5-C2 (Itoh et al. 2000) wurden in Bezug auf die Zugabe von 2,4-D, ebenfalls sehr schonend aus Erde isoliert, die nie mit 2,4-D in Berührung gekommen war.

Im Gegensatz dazu wurde die Anreicherung der Stämme AZDx im *Azotobacter*-Medium bewusst mehrmals 0.1-fach verdünnt, um mögliche alternative Energie- und Kohlenstoffquellen des Inokulums zu verdünnen. 2,4-D wurde 10-mal stärker konzentriert (mind. 3 mM) als in Fulthorpes Versuchen, und während der Anreicherung wurden keine Hilfsstoffe zugegeben. Die sechs isolierten Stämme AZDx sind aber auch die einzigen 2,4-D-Abbauer, die aus drei verschiedenen Umweltproben isoliert werden konnten. Die Anreicherung hat ähnlich lange gedauert (70 Tage).

Vergleich der nah verwandten 2,4-D-Abbauer

Der zu den Isolatzen AZDx nächst verwandte und beschriebene Stamm RCO (Kamagata et al. 1997) wird sehr ähnlich beschrieben: Generationszeit $t_d = 16-30$ h (AZD10a_EZLN1: 17-31 h), kein Wachstum auf reichen Medien wie LB oder NB, 2,4-D-Abbau. Im Dendrogramm liegen auf demselben Ast mit den Isolatzen AZDx weitere Stämme, die im Zusammenhang mit 2,4-D isoliert wurden (**Abbildung 16**, 2,4-D-Abbau

mit * markiert). Die Stämme BTH, HWK 12, HW 13 und RD5-C2 wachsen ebenfalls mit 2,4-D (Kamagata et al. 1997; Itoh et al. 2000). Vom Stamm *Bradyrhizobium* sp. 1 wurde nur die 16S rDNA-Sequenz veröffentlicht, der Genbank-Eintrag (Acc AY238503) deutet aber auf Abbaufähigkeit hin: Molecular analysis of 2,4-D driven shifts in soil microbial communities (Macur et al. 2003).

Die Isolate RCO, BTH, HWK 12, HW 13 und RD5-C2 waren die ersten bekannten langsam wachsenden 2,4-D-Abbauer, sie wurden aus unberührten Standorten isoliert (Fulthorpe et al. 1996; Kamagata et al. 1997). Aus diesen Erkenntnissen postulierte Kamagata, dass der Typ der langsam wachsenden oligotrophen Bakterien in unberührten Standorten dominant ist. In Industrie- und Landwirtschaftsböden sollen seiner Meinung nach andere Bakterien vorherrschen (Kamagata et al. 1997). Die Isolierung der Stämme AZDx aus 2,4-D-belasteter Landwirtschaftserde stellt diese Aussage in Frage.

2,4-D-Verwertung als ursprüngliches Merkmal

Die 16S rDNA-Sequenzen der Nicht-typstämme des Dendrogramms (**Abbildung 16**, Seite 108) wurden nach zwei Kriterien ausgewählt: 1) Die Sequenzen waren gemäss einer BLAST-Suche (Altschul et al. 1990) in der NCBI-Nukleotid-Datenbank am ähnlichsten zu denen der Isolate AZDx. 2) Bezüglich des Verzweigungsmusters eines vorläufigen Dendrogrammes gliederten sich die ausgewählten 16S rDNA-Sequenzen näher zu den untersuchten Sequenzen als die des zweitnächsten Typstammes. Damit sollte gewährleistet werden, dass nur die Sequenzen der Nicht-Typstämme im Dendrogramm erscheinen, die eine minimale Relevanz für die Charakterisierung der untersuchten Stämme haben.

Von den über 100'000⁵ publizierten 16S rDNA Sequenzen fanden sich in nächster Nachbarschaft zu den isolierten AZDx sechs Umweltisolate, die mit 2,4-D Abbau in Verbindung gebracht werden konnten, der Typstamm *B. elkanii* und zwei Umweltisolate, die nicht auf 2,4-D-Abbau untersucht wurden. Die meisten Stämme dieses

⁵ Am 29.9.2004 wurden in der RDP-Datenbank 108'781 16S rDNA Sequenzen gezählt. In der redundanten Nukleotid-Datenbank von 'Entrez-Nucleotide' (NCBI) wurden am selben Tag mit ((16s[Title] AND rRNA[Title]) OR (16s[Title] AND ribosomal[Title] AND RNA[Title])) 162'752 Einträge gefunden.

Clusters wurden in den letzten Jahren aus unberührten Standorten isoliert (Kamagata et al. 1997; Itoh et al. 2000). Beim Betrachten des Dendrogrammes (**Abbildung 16**, Seite 108) drängte sich die Vermutung auf, dass alle Stämme dieses 'Clusters' 2,4-D abbauen können. Es wird vermutet, dass 2,4-D-Abbau in diesem 'Cluster' ein ursprüngliches Merkmal ist.

Eine Erklärung für das potentiell ursprüngliche Merkmal des 2,4-D-Abbaus könnte in der Fähigkeit vieler 'Bradyrhizobiaceae' zu Symbiose mit Leguminosen liegen (Jordan 1984; Sawada et al. 2003). Es ist vorstellbar, dass bei der Symbiose eine zu 2,4-D ähnliche Verbindung eine Rolle spielt. 2,4-D ist ein Dikotyledonen-Herbizid, es wird auch als synthetisches Auxin (Pflanzenhormon) bezeichnet (Mohr und Schopfer 1992). Die Wirkung als Herbizid entfaltet 2,4-D, indem es viel stärker wirkt als die pflanzen-eigene Indol-3-essigsäure (IAA, **Abbildung 18**) (Mohr und Schopfer 1992).



Abbildung 18: A) Indol-3-essigsäure, **B)** 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D).

Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass die potentiell ursprüngliche 2,4-D-Abbaufähigkeit mit seiner zu IAA analogen Wirkungsweise zusammenhängt. Beide Strukturen haben zwar eine genügend grosse sterische Affinität, um in der Pflanze gleich zu wirken, es ist aber ausgeschlossen, dass sie über denselben Abbauweg mineralisiert werden. 2,4-D ist ein Aromat und IAA ein Heteroaromat (Indol). Konsequenterweise könnte man in diesem Fall auch annehmen, dass alle Leguminosen-Symbionten 2,4-D abbauen können, weil IAA in allen Dikotyledonen vorkommt. Bis jetzt ist allerdings nicht aufgefallen, dass unter den symbiotisch Stickstoff fixierenden 'Bradyrhizobiaceae' besonders viele 2,4-D-Verwerter sind. Sollte bei den diskutierten Isolaten der Chloraromaten-Abbauweg mit der Fähigkeit zur Symbiose zusammenhängen, dann könnte dies mit der Wirtsspezifität zu tun haben. Es ist vorstellbar, dass eine zu 2,4-D ähnliche Substanz in der Wirtspflanze hergestellt und dann in den Bakterien abgebaut wird.

Bis jetzt wurde in der Natur keine zu 2,4-D ähnliche Substanz gefunden (Ka et al. 1994a; Fulthorpe et al. 1995; Top et al. 1995; McGowan et al. 1998). Aber es wurde

das erste Zwischenprodukt, das beim Abbau von 2,4-D entsteht, gefunden, 2,4-Dichlorphenol ist schon länger als Naturstoff bekannt (Ando et al. 1970; de Jong und Field 1997; Hoekstra et al. 1999). Da 2,4-D-Abbauer viel schwieriger aus unbelasteten Böden zu isolieren sind als 3-Chlorbenzoat-Abbauer, wurde postuliert, dass in unberührten Standorten andere Bakterien für den 2,4-D-Abbau zuständig sind als in belasteten (Kamagata et al. 1997).

Aus Ergebnissen von 'mating'-Experimenten zur Untersuchung der Übertragbarkeit der Gene des 2,4-D-Abbauweges wurde schon früher vermutet, dass der 2,4-D-Abbauweg von α -Proteobakterien nicht auf Plasmiden lokalisiert ist (McGowan et al. 1998). Gewissheit über den allenfalls ursprünglichen 2,4-D-Abbau dieser Bakteriengruppe kann durch Kultivierungsversuche mit 2,4-D als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle gegeben werden. Am interessantesten wäre es, den Stamm *Bradyrhizobium* sp. 1 zu testen, aber auch die etwas weiter entfernten Stämme *B. elkanii* USDA76 (T), oder *Bradyrhizobium* sp. SH283012 sollten untersucht werden. Interessante Ergebnisse sind auch von PCR-Versuchen zum Nachweis der Gene der Chlormuconat-Cycloisomerasen oder Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen von diesen zu den Isolaten AZDx nah verwandten Bakterienstämmen zu erwarten.

Physiologie, Kultivierung, 'Quorum sensing'

Mit der Messung verschiedener Wachstumskurven mit unterschiedlichen Substratangeboten sollten die optimalen Kulturbedingungen der Stämme AZDx bestimmt werden. Die Isolate schienen in Mineralmedium generell schneller zu wachsen als im komplexen *Rhizobium* X-Medium (**Tabelle 9**, Seite 61). Interessant war auch, wie hohe 2,4-D-Konzentrationen keinen hemmenden Einfluss auf die Verdoppelungszeit hatten, in 10 mM 2,4-D unterschieden sich die Verdoppelungszeiten kaum von denen in 3 mM. Die geringste Verdoppelungszeit wurde trotzdem in höchster Mannitol-Konzentration und mittlerer 2,4-D-Konzentration gemessen.

Interessant war auch die Halbwertszeit von 2,4-D. In *Rhizobium* X-Medium waren die Kulturen am schnellsten ohne Mannitol, in Mineralmedium brauchte es für den schnellen Abbau Mannitol (28 mM oder 55 mM). Die grösste Halbwertszeit für 2,4-D wurde in den Medien mit hoher 2,4-D-Konzentration (10 mM) gemessen: 77 h in Mineralmedium, 107 h in komplexem *Rhizobium* X-Medium. Das kann so gedeutet werden, dass zwar

2,4-D in hohen Konzentrationen nicht das Wachstum behindert, aber offenbar den 2,4-D-Abbau. In Kulturen mit gleich viel Mannitol (55 mM), aber weniger 2,4-D (5 mM), war die Halbwertszeit bedeutend geringer (16 h in Mineralmedium).

Aus diesen Ergebnissen können zwei Schlüsse gezogen werden: Sollen die Bakterien möglichst schnell anwachsen, sollte Mineralmedium mit hoher Mannitolkonzentration (55 mM) und moderater 2,4-D-Konzentration (5 mM) gewählt werden. Sollte möglichst schnell 2,4-D abgebaut werden, kann komplexes Medium ohne Mannitol-Zusatz gewählt werden, oder Mineralmedium mit Mannitol (28 oder 55 mM), die 2,4-D-Konzentration sollte nicht zu hoch sein (5 mM).

Aus den Wachstumskurven (**Abbildung 3**, Seite 61) konnte zudem herausgelesen werden, dass die Bakterien bei einer gewissen optischen Dichte eine Sättigung erfahren haben. Ausser dem pH des Mediums, der konstant bei 7 lag und den angegebenen Werte für OD und 2,4-D-Konzentration lagen aber keine weiteren Daten vor. Es ist denkbar, dass die Zelldichte eine wichtige Rolle für das weitere Wachstum spielt. Von Auge betrachtet wuchsen die Stämme AZDx auf Mineralmedium-Agar kontinuierlich. Nach Inokulierung in Flüssigmedium ab Einzelkolonie von Festmedium wurden aber Lag-Phasen von bis zu 40 Tagen beobachtet. In dieser Zeit waren kein 2,4-D-Abbau und keine Trübung messbar. Da Bakterienkonzentration unter 10^7 Zellen pro ml Medium mittels Trübungsmessung nicht nachweisbar sind (Brenner et al. 1993), wird angenommen, dass in den ersten 40 Tagen die Bakterienkonzentration nicht über 10^7 Zellen pro ml Medium gestiegen ist.

Eine mögliche Erklärung für die sehr lange Lag-Phase bietet der 'Quorum Sensing' genannte Mechanismus (Hussain et al. 1998; Wisniewski-Dye und Downie 2002). 'Quorum Sensing' kann mit 'Gruppen-Sinn' wiedergegeben werden. Dieser Mechanismus ermöglicht den Bakterien, eine koordinierte Reaktion zu starten, sobald die Bakterien 'Gewissheit' haben, dass sie in genügender Zelldichte vorhanden sind, um die Reaktion wirkungsvoll zu starten. Mit Rezeptoren messen sie die Konzentration von selbst ausgeschiedenen Signalmolekülen. Durch Autoinduktion der Signalmoleküle wird bei ausreichender Zelldichte sehr schnell ein Schwellenwert erreicht. Auf die Überschreitung dieses Schwellenwertes reagieren alle beteiligten Bakterien gleichzeitig auf eine bestimmte Art (Wisniewski-Dye und Downie 2002).

Als Signalmoleküle wurden verschiedene N-Acyl-L-homoserinlactone gefunden (Hussain et al. 1998). Der Mechanismus wurde ursprünglich bei *Vibrio* beobachtet in Zusammenhang mit Biolumineszenz, bei einigen pathogenen Mikroorganismen wie *Pseudomonas aeruginosa* und *Erwinia carotovora* in Zusammenhang mit der Synthese von Exoenzymen. Bei verschiedenen *Rhizobium*-Arten wurde beobachtet, wie dieser Mechanismus das Wachstum von anfälligen Bakterien behindert oder die Expression von Nodulationsgenen steuert (Wisniewski-Dye und Downie 2002). 'Quorum sensing' ermöglicht es den Bakterien, zu wachsen, wenn sie eine erhöhte Chance auf Erfolg haben. Es ist nicht auszuschliessen, dass über diesen Mechanismus auch das Wachstum in Kulturen mit sehr geringer Zelldichte geregelt wird.

Bedeutung der Isolate

Die isolierten Stämme AZDx sind für weitere Arbeiten interessant. Mögliche Bedeutungen haben sie bei weiteren Untersuchungen der Diversität der Gene des Chlorbrenzkatechin-Abbaupfades, bei der genaueren taxonomischen Beschreibung der Familie der 'Bradyrhizobiaceae' und bei der Bioremediation.

Bis jetzt wurden erst wenige Chloraromaten-Abbaugene von α -Proteobakterien beschrieben. Es wurden zwar schon einige andere Chloraromaten-abbauende α -Proteobakterien isoliert, von den meisten wurden aber keine Sequenzen des Abbaupfades publiziert, unter ihnen die Stämme *Xanthobacter flavus* 14p1 (1,4-Dichlorbenzol-Abbau) (Spiess et al. 1995), oder die Stämme RCO, BTH, HWK 12, HW 13 (2,4-D-Abbau) (Kamagata et al. 1997; Itoh et al. 2000). Vom Stamm RD5-C2 wurde immerhin die Sequenz einer (2,4-D)/ α -Ketoglutarat-Dioxygenase (TfdA) beschrieben (Itoh et al. 2002). Bis jetzt wurden nur sechs Sequenzen der **Chlorbrenzkatechin-1,2-Dioxygenase** publiziert, sie stammen von vier verschiedenen Stämmen: *Defluviobacter lusatensis* S1 (Acc CAD60254), *S. herbicidovorans* MH (Acc AJ628863), *Sphingomonas* sp. EML146 (AAC23511), *Sphingomonas* sp. TFD44 (AAT99373 und AAT99364). Aus unserem Labor wurde eine weitere Sequenz des Stammes *Sphingomonas* sp. TFD44 bestimmt (Thiel 2004) und eine weitere des *Bradyrhizobium*-ähnlichen Stammes UO (J. Gröning, unveröffentlicht). Von den **Chlormuconat-Cycloisomerasen**-Genen wurde bis jetzt nur die Sequenz des Stammes *Sphingomonas* sp. TFD44 publiziert (Acc AAT99367), vom *Bradyrhizobium*-ähnlichen Stamm UO steht eine weitere unpublizierte

Sequenz (J. Gröning) zur Verfügung. Einige Chlormuconat-Cycloisomerasen-Sequenzen wurden aus Genomsequenzierungen aufgrund von Sequenzhomologien bestimmt, diese unterscheiden sich in der Sequenz aber stark von den richtig charakterisierten, erwähnten Sequenzen.

Wie bei der Diskussion der Dendrogramme erwähnt, sind die isolierten Bakterienstämme AZDx sicher auch interessant in Bezug auf die Charakterisierung einer neuen Gattung innerhalb der 'Bradyrhizobiaceae'.

Eine weitere Bedeutung haben die isolierten AZDx als mögliche Leguminosen-Symbionten. Damit würden sie sich nämlich als Rhizosphären-Bakterien im metabolisch aktivsten Bereich des Bodens aufhalten und wären dadurch besonders gut geeignet zur Bioremediation (Brazil et al. 1995).

4.2.3 Gene des Chloraromaten-Abbauweges

Dendrogramme zweier Enzyme des *ortho*-Abbauweges

Es wurde je ein Dendrogramm für die Aminosäure-Sequenzen der Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen und der Chlormuconat-Cycloisomerasen erstellt. Im folgenden Abschnitt wurden die einzelnen Sequenzen der Dendrogramme in monophyletischen Gruppen zusammengefasst (**Abbildung 19** und **Abbildung 20**). Die Darstellung in monophyletischen Gruppen soll die Interpretation vereinfachen. Die Verzweigungsmuster basieren auf den selben Berechnungen wie die der Dendrogramme in **Abbildung 13** (Seite 85) und **Abbildung 11** (Seite 79).

Die meisten Sequenzen liessen sich erwartungsgemäss in Gruppen einteilen, geordnet nach Funktion und Taxonomie. Sowohl aus den β - und γ -proteobakteriellen Sequenzen der Brenzcatechin- und der Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen, als auch aus denen der Muconat- und Chlormuconat-Cycloisomerasen liess sich je eine monophyletische Gruppe bilden. Eine Ausnahme bildete allerdings die Chlormuconat-Cycloisomerasen-Sequenz TfdDII des Stammes *Wautersia* (früher *Ralstonia*) *eutropha* JMP134 (pJP4, Acc YP025395), diese Sequenz bildete unüblicherweise mit den entsprechenden Sequenzen der α -Proteobakterien eine paraphyletische Gruppe. Durch die stark unterschiedliche Sequenz, den unterschiedlichen GC-Gehalt und die unübliche An-

ordnung des Genes *tfdDII* im Operon auf pJP4 wurde schon früher auf eine unterschiedliche evolutionäre Herkunft der beiden Gene *tfdDII* und *tfdD* geschlossen (Eulberg et al. 1998; Laemmli et al. 2000).

Das Verzweigungsmuster von **Abbildung 20** darauf hin, dass sich die Muconat-Cycloisomerasen der β - und γ -Proteobakterien und der Actinomyceten divergent aus einem gemeinsamen Vorfahren für chlorierte Substrate entwickelt haben. Aufgrund von fehlenden Sequenzen von α -proteobakteriellen Muconat-Cycloisomerasen und einer geringen Datenbasis von solchen Enzymen der Actinomyceten ist diese Aussage aber ziemlich spekulativ. Auch wenn eine breitere Datenbasis oder andere Berechnungsmethoden das Verzweigungsmuster verschieben können (Ludwig und Klenk 2001), ist es unwahrscheinlich, dass die noch zu findenden, α -proteobakteriellen Sequenzen von Muconat-Cycloisomerasen sich so im Dendrogramm anordnen würden, dass sich die beiden 'Cluster' der α -proteobakteriellen Muconat- und Chlormuconat-Cycloisomerasen neben die entsprechenden Enzyme der β - und γ -Proteobakterien gliedern würden, vergleichbar mit der Anordnung im Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen-Dendrogramm.

Aufgrund des Dendrogrammes in **Abbildung 19** kann ebenfalls vermutet werden, dass sich die proteobakteriellen Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen einmal von einem gemeinsamen Vorläufer von der Entwicklung der Brenzcatechin-1,2-Dioxygenasen getrennt haben. Allerdings könnte auch hier das Auftreten von α -proteobakteriellen Brenzcatechin-1,2-Dioxygenasen-Sequenzen in dem bis jetzt homogenen 'Cluster' von proteobakteriellen Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen die These in Frage stellen. Eine sichere Interpretation der Entwicklung der Gene dieser zwei Enzyme des *ortho*-Chlorbrenzkatechin-Abbauweges ist mit der jetzigen Datenlage nicht möglich. Horizontaler Gentransfer, wie es auch im Fall des Genes *tfdDII* vermutet wird (Laemmli et al. 2000), kann diese Interpretation etwas erschweren. Die Sequenz TfdDII ist etwa gleich weit entfernt von homologen Sequenzen im *Bradyrhizobium*-ähnlichen Isolat UO wie von Sequenzen anderer β -Proteobakterien (61 PAM, **Tabelle 14**).

Von der Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenase wurden zwei und von der Chlormuconat-Cycloisomerase wurden vier Sequenz-Fragmente der *Bradyrhizobium*-ähnlichen Isolate AZDx in das entsprechende Dendrogramm integriert. Sowohl die Sequenzen der Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen als auch die der Chlormuconat-Cycloisomera-

sen gliederten sich erwartungsgemäss neben die entsprechenden Sequenzen des *Bradyrhizobium*-ähnlichen Stammes UO. Beim Dioxygenasen-Dendrogramm liess sich mit den übrigen α -proteobakteriellen Sequenzen nur zusammen mit den Sequenzen der β - und γ -Proteobakterien eine paraphyletische Gruppe bilden. Im Chlormuconat-Cycloisomerasen-Dendrogramm hingegen liess sich mit den übrigen α -proteobakteriellen Sequenzen eine klare monophyletische Gruppe abspalten.

Bei der Auswahl der verwendeten Sequenzen für das Dendrogramm wurden zwei proteobakterielle Sequenzen bewusst weggelassen. Sie reihten sich nicht erwartungsgemäss ein, vermutlich weil sie falsch bestimmt wurden: *Variovorax paradoxus* TV1 (Acc BAA88069) und 'Pseudomonas' sp. P51 (Acc A43673). Die zweite Sequenz wurde März 2004 noch mal einmal publiziert als Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenase, ohne allerdings die alte zu widerrufen. Die Bezeichnung der ersten Sequenz hingegen wurde bis jetzt nicht widerrufen, aufgrund der eindeutigen Lage innerhalb der Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen wird aber angenommen, dass es sich um eine Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenase und nicht wie angegeben um eine Brenzcatechin-1,2-Dioxygenase handelt.

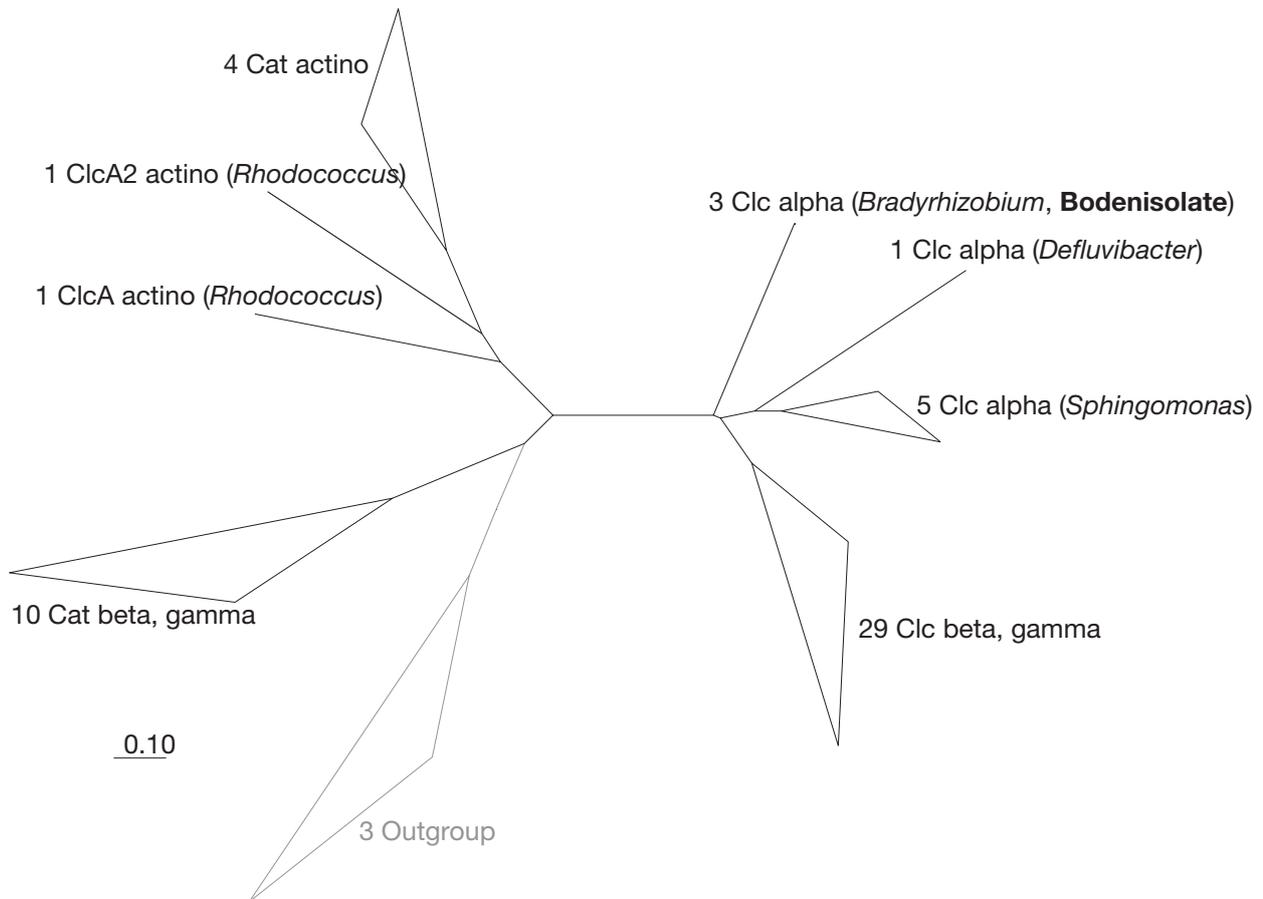


Abbildung 19: Dendrogramm der Brenzcatechin- und Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen, identisch mit **Abbildung 13** (Seite 85), aber in Gruppen zusammengefasst. Die Zahl gibt an, wieviele Sequenzen zusammengefasst sind. **Cat** und **Clc**: Brenzcatechin- und Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen, **alpha**, **beta** und **gamma**: α -, β - und γ -Proteobakterien, **actino**: Actinobakterien, **Outgroup**: Hydroxyquinol-1,2-Dioxygenasen. Die 'Accession-Numbers' der verwendeten Sequenzen und weitere Details zur Berechnung sind bei **Abbildung 13** aufgeführt.

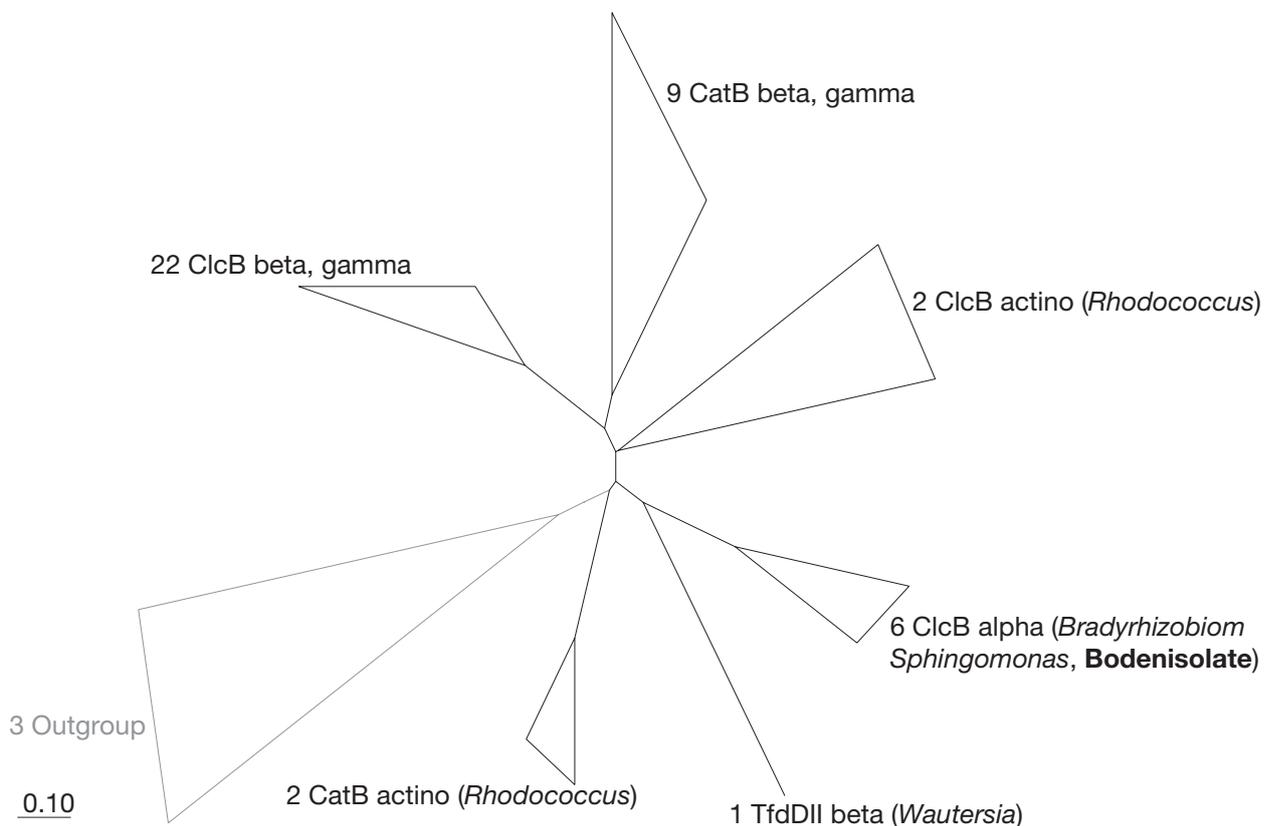


Abbildung 20: Dendrogramm der Muconat- und Chlormuconat-Cycloisomerasen, identisch mit **Abbildung 11** (Seite 79), aber in Gruppen zusammengefasst. Die Zahl gibt an, wieviele Sequenzen zusammengefasst sind. **CatB** bzw. (**ClcB** und **TfdDII**): Muconat- bzw. Chlormuconat-Cycloisomerasen, **alpha**, **beta** und **gamma**: α -, β - und γ -Proteobakterien, **actino**: Actinobakterien. **Outgroup**: Mandelatra-cemase von *Sulfolobus* (*Archaea*) und put. Chlormuconat-Cycloisomerasen von *Bacillus* und *Agromonas*. Die 'Accession-Numbers' der verwendeten Sequenzen und weitere Details zur Berechnung sind bei **Abbildung 11** aufgeführt.

Vergleich der Gene von α -, β - und γ -Proteobakterien

Die fünf Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenase Sequenzen von *Sphingomonas* sind untereinander etwa so divers wie alle 29 Sequenzen der β - und γ -Proteobakterien zusammen. Innerhalb der Sequenzen von α -Proteobakterien wurde eine maximale Distanz von 25 PAM (percent accepted mutations) berechnet (Stamm UO - *Defluviobacter lusatiensis* S1, ClpC, **Tabelle 13**). Dagegen betrug die längste Distanz innerhalb des β - und γ -Proteobakterien-Zweiges nur gerade 19 PAM (*W. eutropha* JMP134, TfdC - 'Pseudomonas' sp. P51, TcbC). Dies entspricht nicht den bekannten Mustern des 16S rDNA-Dendrogramms, wo die grössten Distanzen innerhalb der α -Proteobakterien insgesamt kleiner sind als die innerhalb der β - und γ -Proteobakterien (**Tabelle 15**). Wird die α -Proteobakterien-ähnliche Sequenz TfdDII von *W. eutropha* JMP134 nicht be-

rücksichtigt, kann im Cycloisomerasen-Dendrogramm dasselbe beobachtet werden (**Tabelle 14**). Die Distanz zwischen den zwei TfdD-Sequenzen von *Sphingomonas* sp. TFD44 und dem *Bradyrhizobium*-ähnlichen Bodenisolat UO beträgt 33 PAM, während innerhalb des β - γ -'Clusters' die grösste Distanz mit 30 PAM geringer ist (**Tabelle 14**). Aufgrund der 16S rDNA sind β - und γ -Proteobakterien zwar phylogenetisch auch nicht einfach zu trennen, aber γ -Proteobakterien bilden ein Paraphylum, zu dem die β -Proteobakterien als eine von vielen klar abtrennbaren Gruppen dazugehören (Ludwig und Klenk 2001). Bei den Genen des *ortho*-Chlorbrenzkatechin-Abbauweges lassen sich die Sequenzen der β - und γ -Proteobakterien überhaupt nicht voneinander trennen (mit Ausnahme von *tfdDII* aus *W. eutropha* JMP134).

Es wurde die Vermutung geäussert, dass die β - und γ -Proteobakterien leicht übertragbare Chloraromaten-Abbaugene haben, während die von α -Proteobakterien fest im Genom verankert sind (Kamagata et al. 1997). Die Sequenzen des Genes von verschiedenen Proteobakterien der α -Ketoglutarat-abhängigen 2,4-D-Dioxygenase (TfdA) wurden verglichen und daraus gefolgert, dass die Häufigkeit, mit der diese Gene zwischen der Klasse der β - und γ -Proteobakterien transferiert werden, höher sein muss als die Häufigkeit in der Mutationen anfallen (McGowan et al. 1998). Mit den *Sphingomonas*-Sequenzen, die seitdem gefunden wurden (Thiel 2004), sind weitere Sequenzen der Abbaugene von α -Proteobakterien bekannt geworden, die diese Anomalie der Distanzen zwischen dem 16S rDNA- und dem Chlorbrenzkatechin-1,2-Dioxygenase-Dendrogramm bestätigen.

Die zwei *Rhodococcus*-Sequenzen der Chlorbrenzkatechin-1,2-Dioxygenasen bildeten ebenfalls eine paraphyletische Gruppe, allerdings nicht mit den Chlorbrenzkatechin-1,2-Dioxygenasen-Sequenzen anderer Klassen, sondern mit den Brenzkatechin-1,2-Dioxygenasen-Sequenzen anderer Actinomyceten.

Tabelle 13: Distanzmatrix zum Dendrogramm der Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen (**Abbildung 19**). Aufgelistet ist nur eine Auswahl der Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen von α -, β - und γ -Proteobakterien. Berechnet mit der PAM-Ersetzungsmatrix, Angaben in PAM (percent accepted mutations). Die Sequenzen der eigenen Umweltisolate wurden nicht mitgerechnet, weil sich die Sequenzen nicht stark von den publizierten unterscheiden, aber einiges kürzer sind.

	Bodenisolat UO	<i>D. lusatiensis</i> S1	<i>Sphingomonas</i> sp. TFD44 TfdC	<i>Sphingomonas</i> sp. TFD44 TfdCII	<i>Sphingomonas</i> sp. EML146 TfdCII	<i>D. acidovorans</i> P4a	<i>B. cepacia</i> 2A	<i>Burkholderia</i> sp. NK8	' <i>Pseudomonas</i> ' sp. P51	<i>W. eutropha</i> JMP134, TfdC	<i>W. eutropha</i> JMP134, TfdCII	<i>Ralstonia</i> sp. JS705	<i>P. aeruginosa</i> JB2	<i>P. chlororaphis</i> RW71	<i>P. putida</i> (pEST 4011)
α Bodenisolat UO	0	25	21	23	21	20	21	22	20	22	21	21	21	20	21
<i>Deffluviobacter lusatiensis</i> S1, Acc CAD60254	25	0	22	21	22	22	23	22	23	23	23	22	22	22	23
<i>Sphingomonas</i> sp. TFD44 TfdC	21	22	0	15	2	20	21	19	20	19	20	21	21	20	20
<i>Sphingomonas</i> sp. TFD44 TfdCII	23	21	15	0	15	20	20	21	21	20	20	22	22	20	20
<i>Sphingomonas</i> sp. EML146 TfdCII	21	22	2	15	0	21	21	20	21	19	20	22	22	21	21
β <i>Delftia acidovorans</i> P4a, Acc AAC35836	20	22	20	20	21	0	14	16	2	18	12	15	14	0	14
<i>Burkholderia cepacia</i> 2A, Acc AAK81678	21	23	21	20	21	14	0	18	14	18	4	15	15	15	0
<i>Burkholderia</i> sp. NK8, Acc BAB56009	22	22	19	21	20	16	18	0	17	6	17	15	16	16	18
' <i>Pseudomonas</i> ' sp. P51, Acc P27098 *	20	23	20	21	21	2	14	17	0	19	13	15	15	3	14
<i>Wautersia eutropha</i> JMP134, TfdC, Acc AAA98262	22	23	19	20	19	18	18	6	19	0	17	16	16	18	18
<i>Wautersia eutropha</i> JMP134, TfdCII, Acc AAC44730	21	23	20	20	20	12	4	17	13	17	0	16	15	13	4
<i>Ralstonia</i> sp. JS705, Acc CAA06968	21	22	21	22	22	15	15	15	15	16	16	0	0	15	15
γ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> JB2, Acc T44616	21	22	21	22	22	14	15	16	15	16	15	0	0	15	15
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> RW71, Acc CAB52140	20	22	20	20	21	0	15	16	3	18	13	15	15	0	15
<i>Pseudomonas putida</i> (pEST 4011), Acc JC5014	21	23	20	20	21	14	0	18	14	18	4	15	15	15	0

* Heute *Comamonadaceae* (Tchelet et al. 1997).

Tabelle 14: Distanzmatrix zum Dendrogramm der Chlormuconat-Cycloisomerasen (**Abbildung 20**). Weitere Angaben wie in **Tabelle 13**.

	Bodenisolat UO	<i>Sphingomonas</i> sp. TFD44	<i>Burkholderia</i> sp. NK8	' <i>Pseudomonas</i> ' sp. P51	<i>V. paradoxus</i> TV1	<i>W. eutropha</i> JMP134 (pJP4)	<i>W. eutropha</i> JMP134	<i>W. eutropha</i> NH9	<i>P. aeruginosa</i> JB2	<i>P. chlororaphis</i> RW71
α Bodenisolat UO	0	33	55	54	55	61	52	53	55	58
<i>Sphingomonas</i> sp. TFD44, TfdD	33	0	65	57	60	69	63	56	62	63
β <i>Burkholderia</i> sp. NK8, TfdD, Acc BAB56010	55	65	0	24	26	62	8	25	26	30
' <i>Pseudomonas</i> ' sp. P51, ClcB, Acc P27099 *	54	57	24	0	12	61	26	2	16	10
<i>Variovorax paradoxus</i> TV1, TfdD, Acc BAA88065	55	60	26	12	0	65	29	12	19	19
<i>Wautersia eutropha</i> JMP134, TfdDII (pJP4), Acc YP025395	61	69	62	61	65	0	62	61	63	65
<i>Wautersia eutropha</i> JMP134, TfdD, (pJP4), Acc P05404	52	63	8	26	29	62	0	25	27	31
<i>Wautersia eutropha</i> NH9, CbnB, Acc BAA74531	53	56	25	2	12	61	25	0	16	8
γ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> JB2, ClcB, Acc AAC69475	55	62	26	16	19	63	27	16	0	22
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> RW71, TetD, Acc CAB89822	58	63	30	10	19	65	31	8	22	0

* Heute *Comamonadaceae* (Tchelet et al. 1997).

Tabelle 15: Distanzmatrix der 16S rDNA möglichst vergleichbarer Stämme wie in **Tabelle 13**. Angaben in % Unterschied, Berechnung ohne Korrektur und ohne Filter.

	Bodenisolat UO	Bodenisolat AZD9 W1	<i>D. lusatae</i> DSM11099 (T)	<i>Sphingomonas</i> sp. S213	<i>Burkholderia</i> sp. TH2	<i>B. cepacia</i> ATCC25416 (T)	<i>W. eutropha</i> JS705	<i>W. eutropha</i> JMP134	Bodenisolat M013	' <i>Pseudomonas</i> ' sp. P51	<i>D. acidovorans</i> ACM489 (T)	<i>P. putida</i> DSM291 (T)	<i>P. aeruginosa</i> LMG1242 (T)	<i>P. chlororaphis</i> LMG5004 (T)	Bodenisolat M043G	Bodenisolat M016
α Bodenisolat UO	0	1	10	15	22	20	20	21	21	20	22	20	20	20	20	20
Bodenisolat AZD9 W1	1	0	10	13	21	20	20	20	20	20	20	19	19	19	19	20
<i>Defluviobacter lusatae</i> DSM11099 (T), Acc 132378	10	10	0	13	21	20	20	20	20	22	22	18	19	18	18	20
<i>Sphingomonas</i> sp. S213, Acc AB018439	15	13	13	0	21	20	19	20	21	19	18	17	18	18	17	21
β <i>Burkholderia</i> sp. TH2, Acc AB041772	22	21	21	21	0	4	9	8	8	11	12	17	17	17	17	23
<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC25416 (T), AM22518	20	20	20	20	4	0	8	8	8	11	10	16	16	15	16	20
<i>Wautersia eutropha</i> JS705, Acc AF027407	20	20	20	19	9	8	0	3	4	10	10	17	17	17	16	21
<i>Wautersia eutropha</i> JMP134, Acc AF027047	21	20	20	20	8	8	3	0	4	11	9	18	18	17	17	21
Bodenisolat M013	21	20	20	21	8	8	4	4	0	12	11	17	16	16	15	21
' <i>Pseudomonas</i> ' sp. P51, Acc Af015487 *	20	20	22	19	11	11	10	11	12	0	6	18	18	18	17	23
<i>Delftia acidovorans</i> ACM489 (T), Acc AF0788774	22	20	22	18	12	10	10	9	11	6	0	16	17	16	16	23
γ <i>Pseudomonas putida</i> DSM291 (T), Acc Z76667	20	19	18	17	17	16	17	18	17	18	16	0	5	3	2	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LMG1242 (T), Z776651	20	19	19	18	17	16	17	18	16	18	17	5	0	6	5	7
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> LMG5004 (T), Z776657	20	19	18	18	17	15	17	17	16	18	16	3	6	0	2	5
Bodenisolat M043G	20	19	18	17	17	16	16	17	15	17	16	2	5	2	0	3
Bodenisolat M016	20	20	20	21	23	20	21	21	21	23	23	4	7	5	3	0

* Heute *Comamonadaceae* (Tchelet et al. 1997).

Rolle des horizontalen Gentransfers

Bis jetzt gibt es mehrere Hinweise dafür, dass innerhalb der β - und γ -Proteobakterien horizontaler Gentransfer des *ortho*-Chlorbrenzcatechin-Abbaupweges eine wichtige Rolle spielt (Kamagata et al. 1997; McGowan et al. 1998). In den meisten Fällen wurden die Gene von nah verwandten Arten aufgenommen; allerdings gibt es auch Hinweise dafür, dass β - und γ -Proteobakterien auch Gene von weiter entfernten Arten aufgenommen haben (Laemmli et al. 2000). Hingegen wurde bis jetzt noch kein horizontaler Gentransfer innerhalb der α -Proteobakterien beobachtet (Itoh et al. 2002). Die grosse Variabilität der wenigen α -proteobakteriellen Sequenzen innerhalb der zwei hier berechneten Dendrogramme, deutet ebenfalls darauf hin, dass in diesem Fall Mutation häufiger geschieht als Transfer.

Die bis jetzt nicht beobachtete Übertragung der Gene innerhalb der Klasse der α -Proteobakterien, bzw. die beobachtete Übertragung innerhalb der β - und γ -Proteobakterien, kann ihren Ursprung in der Art haben, wie diese Gene hauptsächlich im Bakterium lokalisiert sind. Bei der Untersuchung von 47 2,4-D-abbauenden Stämmen wurden

interessante Verteilungen der Plasmide in den Proteobakterien gefunden (Ka et al. 1994a). Mit Hybridisierungsversuchen bestimmten Ka et al. die Ähnlichkeit der katabolen Gene zu denen des Plasmides pJP4 (*W. eutropha*) und zu solchen aus *Sphingomonas paucimobilis*. In der Gruppe mit starken Ähnlichkeiten zu den *tfd* Genen aus pJP4, waren alle Stämme β - und γ -Proteobakterien, 75% dieser Gene waren auf Plasmiden lokalisiert. In der Gruppe, die mit der Sonde aus *S. paucimobilis* hybridisiert hatte, waren nur *Sphingomonas*-ähnliche α -Proteobakterien und in diesen Bakterien waren fast keine Plasmide vorhanden. In anderen Untersuchungen zur Lokalisierung der Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen-Gene (*tfdC*) in β - und γ -Proteobakterien, wurden 87% der katabolen Gene auf Plasmiden vorgefunden. Es wurde ebenfalls eine gute Übertragbarkeit der besprochenen Gene vermutet, da überhaupt keine Korrelation zwischen den verschiedenen, stark homologen oder identischen *tfdC*-Genen und den ARDRA-Gruppen der untersuchten Bakterien gefunden wurde (Cavalca et al. 1999); diese Ergebnisse bestätigten die vorangehenden Versuche von McGowan et al.

Es gibt weiterhin keinen Grund zur Annahme, dass der horizontale Gentransfer der α -proteobakteriellen katabolen Gene eine entscheidende Rolle spielt. Das Verzweigungsmuster der Dendrogramme, die nicht beobachteten Gen-Transfers, die seltene Lokalisierung der Gene auf Plasmiden und die starke Diversität der α -proteobakteriellen Gen-Sequenzen untermauern diese These.

4.2.4 Nachweis der katabolen Gene in Umweltproben

Eines der Ziele dieser Arbeit war die Verfeinerung von Methoden zum Nachweis von Genen des *ortho*-Chlorbrenzcatechin-Abbaupotentials in Umweltproben. Zum Nachweis der Gene oder des Abbaupotentials eines Standortes sind verschiedene Methoden möglich. Die Aussagekraft, oder die Anwendbarkeit der einzelnen Methoden hängen stark vom über den Abbaupotential zur Verfügung stehenden Wissen ab.

Bekannte Strategien

Für die Untersuchung der Diversität der Chloraromaten-Abbauer in einer Umweltprobe, wurden früher **Bakterien aus einer Umweltprobe isoliert**, um deren DNA mit Sonden bekannter Abbaugene zu hybridisieren (Fulthorpe et al. 1995). Es wurde aber auch

schon **DNA aus Boden isoliert** und mit **Gen-Sonden hybridisiert** (Holben et al. 1992). Mit der Isolierung von Bakterien ist es immerhin gelungen, in verschiedenen Umweltproben unterschiedliche Vorherrschaften der Proteobakterien-Klassen nachzuweisen (Ka et al. 1994b). Ein grosser Nachteil der vorangehenden Isolierung ist aber die Ungewissheit über den Einfluss der Isolierungsmethode auf die Diversität der Isolate ('Kultivierungsabhängige Methoden', Seite 95). Beide Methoden sind anfällig auf die Auswahl der zur Verfügung stehenden Sonden, die die Vielfalt der nachweisbaren katabolen Gene einschränkt. Bei Holben et al. (1992) und Fulthorpe et al. (1995) wurde nur eine β -proteobakterielle Sonde mit den *tfd*-Genen aus pJP4 verwendet. Bei Ka et al. (1994) wurde zusätzlich eine α -proteobakterielle Sonde (*Spa*) verwendet, mit den nachzuweisenden katabolen Genen aus dem Genom von *Sphingomonas paucimobilis*.

Eine weitere Möglichkeit bietet die Methode der **PCR mit spezifischen Primern** und aus der Umweltprobe extrahierter DNA (Leander et al. 1998; Cavalca et al. 1999). Ist die Methode der PCR einmal etabliert, kann sie relativ schnell durchgeführt werden. Vorausgesetzt, es gelingt, von allen in der Umweltprobe befindlichen Bakterien, DNA in guter Qualität zu extrahieren, erlaubt die PCR im Prinzip einen repräsentativen Einblick in die Diversität der vorhandenen Gene in der Umweltprobe. Im Unterschied zur Hybridisierung einer Sonde mit aus Boden isolierter DNA, wird zudem für eine PCR nur sehr wenig DNA benötigt. Gut funktionierende PCR-Primer binden spezifisch an die konservierten Regionen der gesuchten Gene. Das setzt voraus, dass genügend Sequenzen bekannt sind, um die konservierten Regionen beschreiben zu können.

Mit Hilfe der nicht geglückten Klonierung des Chlormuconat-Cycloisomerasen-Genes des Bodenisolates AZD10a_EZLN1 hätte die genaue Sequenz der konservierten Primer-Region bestimmt werden können. Dadurch hätten möglicherweise die Primersequenzen angepasst werden können, um je nach Wunsch ein mehr oder weniger breiteres Spektrum von Genen damit zu erfassen. Die weitere Suche wurde allerdings aufgegeben, als es J. Gröning im selben Labor gelang, aus dem nah verwandten *Bradyrhizobium*-ähnlichen Stamm UO, mehrere Gene des *ortho*-Chlorbrenzkatechin-Abbauweges zu charakterisieren.

Vorteile des Nachweises der Abbaugene durch PCR

Interessant an der Methode der PCR ist die Möglichkeit, mit unterschiedlichen Primern die Spezifität des Nachweises der katabolen Gene zu variieren. Je nach Wissensstand und Wunsch, können Primer **spezifisch** für **verschiedene Taxa** oder **verschiedene Enzyme** hergestellt werden. Zur Überwachung oder Beurteilung eines kontaminierten Standortes kann es entscheidend sein, die richtigen Gene nachzuweisen. Zum Beispiel kann es aufgrund des unterschiedlichen Substratspektrums verschiedener Chlormuconat-Cycloisomerasen unerlässlich sein zu wissen, welcher Typ vorherrscht. Der Stamm *Rhodococcus opacus* 1CP kann 2,4-Dichlor-, 3-Chlor- und 4-Chlorphenol, nicht aber 2-Chlorphenol umsetzen (Gorlatov et al. 1989). Der Grund hierzu liegt in der Chlormuconat-Cycloisomerase ClcB, die zwar zur Dehalogenierung von 3-Chlor- und 2,4-Dichlor-*cis,cis*-muconat fähig ist, nicht aber zur Dehalogenierung von 2-Chlor-*cis,cis*-muconat (Gorlatov et al. 1989; Solyanikova et al. 1995). Vergleichbar dazu ist die Chlormuconat-Cycloisomerase TfdDII aus *Wautersia* (früher *Ralstonia*) *eutropha* JMP134 (pJP4) ebenfalls nur eingeschränkt zur Umsetzung von 2-Chlor-*cis,cis*-muconat fähig (Laemmlli et al. 2002). Das 'normale' Enzym TfdD aus JMP134, ClcB2 aus *R. opacus* 1CP (Moiseeva et al. 2001; Solyanikova et al. 2003) und auch die meisten beschriebenen β - und γ -proteobakteriellen Chlormuconat-Cycloisomerasen sind nicht so spezifisch und können auch 2-Chlor-*cis,cis*-muconat dehalogenieren.

Die starken Sequenz-Unterschiede, die bis jetzt unter den Abbaugenen der verschiedenen α -Proteobakterien beobachtet wurden, entsprechen innerhalb dieser Klasse den taxonomischen Strukturen. Das heisst, die Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen der *Sphingomonas* Stämme bilden eine Gruppe, die eine *Defluviobacter*-Sequenz und die *Bradyrhizobium*-ähnlichen eine andere (**Abbildung 19**, Seite 122). Unter diesem Gesichtspunkt erstaunt es auch wenig, wenn es mit der *Sphingomonas*-Sonde nur gelang, die Abbaugene von *Sphingomonas*-ähnlichen Bakterien nachzuweisen (Ka et al. 1994b) und nicht diejenigen anderer Bakterien-Taxa. Es wird deshalb angenommen, dass auch spezifische Primer zum Nachweis dieser Enzyme in engen taxonomischen Gruppen hergestellt werden könnten. Aufgrund der Austauschbarkeit dieser Gene bei den β - und γ -Proteobakterien hingegen, wird es nicht möglich sein, von diesen Abbaugenen auf die vorherrschende Art der Chloraromaten abbauenden Bakterien zu schliessen.

Nachweis von Arten bei Chloraromatenabbau als ursprünglichem Merkmal

Ein Nachweis des Abbaupotentials einer Umweltprobe auf Basis der 16S rDNA wäre von der Methode her einfacher als ein Nachweis der katabolen Gene. Die 16S rDNA kommt oft in mehrfacher Kopienzahl vor und Arbeiten mit 16S rDNA gehören in vielen Labors zu den Standardmethoden. Sollte sich bestätigen, dass 2,4-D-Abbau für die nächste Verwandtschaft der Isolate AZDx ein ursprüngliches Merkmal ist, könnte ein Nachweis der 16S rDNA-Gene dieser Bakteriengruppe verwendet werden, um das 2,4-D-Abbaupotential einer Umweltprobe nachzuweisen.

Methoden, die sich zum Nachweis von Arten eignen, zielen auf die hochvariablen Regionen der 16S rDNA. Zur Unterscheidung von *Rhizobium*-Stämmen wurde von Eardly et al. die 16S rDNA-Sequenz von *E. coli* Position 20-361 zu Hilfe genommen (Eardly et al. 1992). Mehrere solche Methoden sind denkbar: *In situ* Hybridisierung mit Fluoreszenzmarkierung (Amann et al. 1995) und 'nested PCR' (Degrange und Bardin 1995; Löffler et al. 2000). Weitere bekannte Methoden eignen sich vor allem zur Unterscheidung von bestimmten Stämmen, sind also nicht unbedingt geeignet, um unbekannte, aus der Umwelt isolierte DNA zu untersuchen. Sie können aber durchaus sinnvoll zur Überwachung eines Standortes sein, in dem einige vorkommende Stämme bekannt sind. Die nicht 16S rDNA basierenden Methoden, sind 'REP'- oder 'ERIC'-Fingerprinting. Bei beiden Methoden wird das Bandenmuster nach einer PCR von repetitiven Sequenzen verglichen. Beide Nachweismethoden erlauben eine Unterscheidung von Bakterien auf der Ebene von Stämmen, Arten und Gattungen (de Bruijn 1992).

4.3 Chlorbenzol-Verwerter aus direkter Isolierung

Aus mehreren, hauptsächlich mit Chlorbenzol kontaminierten Umweltproben sollten Bakterien direkt isoliert werden. Die Isolate sollten als positive Kontrolle für den genetischen Nachweis erhalten, aber es sollte damit auch ein Einblick in die vorherrschende Diversität der Chlorbenzol abbauenden Bakterien erhalten werden. Durch die direkte Isolierung werden wie erwähnt (Kultivierungsabhängige Methoden, Seite 95) Anreicherungseffekte vermieden und damit ist eine quantitative Abschätzung der Diversität von Abbaustämmen in den verschiedenen kontaminierten Proben möglich.

Ein weiteres Ziel war die Isolierung zusätzlicher Chloraromaten abbauender Stämme. Diese Isolate sollten für eine Weiterentwicklung der PCR-Primer zum Nachweis der katabolen Gene des Chlorbrenzkatechin-Abbauweges, direkt in natürlichen Lebensgemeinschaften verwendet werden.

4.3.1 Taxonomische Diversität der Isolate

Anfangs war die Diversität der Isolate der direkten Anreicherung in Chlorbenzol-Atmosphäre bemerkenswert (**Tabelle 12**, Seite 69). In über 120 Isolaten waren Proteobakterien, Actinomyceten und zu *Bacteroidetes* gehörende Bakterien isoliert. Innerhalb der Proteobakterien wurden Bakterien in den drei verbreiteten Klassen der α -, β - und γ -Proteobakterien isoliert.

Wurden allerdings nur die Stämme gezählt, die ihre Fähigkeit zum Chloraromaten-Abbau behalten haben, sieht es schon ganz anders aus: Über 99% der Stämme sind *Pseudomonas*-ähnliche γ -Proteobakterien und nur ein einziger Vertreter der β -Proteobakterien wurde isoliert. Innerhalb der Familie der *Pseudomonas* wurden nur zwei Gruppen gebildet, deren Diversität mit zwei zu 100 Isolaten äusserst gering ist.

Verluste von Stämmen

19 Bakterien-Stämme aus der direkten Isolierung mit Chlorbenzol konnten schliesslich Chlorbenzol nicht mehr verwerten. Die Stämme wurden anfänglich als Chlorbenzol-Verwerter angesehen, da Versuche darauf hindeuteten, dass die Isolate auf Festmedium besser in Chlorbenzol-Atmosphäre wuchsen als ohne. Wenige Monate später allerdings verweigerten sie das Wachstum mit Chlorbenzol als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle.

Eine mögliche Ursache für den Verlust der Chlorbenzol-Verwertung kann in der Methode der Herstellung von Reinkulturen liegen. Um Kontaminationen nach Möglichkeit auszuschliessen, wurden die Kulturen einmal auf NB-Agar kultiviert, also auf Komplexmedium ohne Selektionsdruck. Als anschliessend festgestellt wurde, dass die Bakterien nicht mehr mit Chlorbenzol wuchsen, wurden die folgenden Versuche mit den ursprünglichen Kolonien gemacht. Allerdings waren diese ein bis zwei Monate im 4°C Raum ohne Chlorbenzol-Atmosphäre gelagert worden.

Manche Stämme (M121 und M131) wurden in Flüssigkultur, in Mineralmedium, mit 10% Casamino-Acid-Lösung und der üblichen Menge Chlorbenzol angezogen. Die Kolonien wuchsen, Chlorbenzol wurde aber auch nach mehreren Monaten nicht abgebaut. Um sicher zu gehen, dass nicht fehlende komplexe Zusätze die Chlorbenzol-Verwertung behinderten, wurden die vergleichenden Wachstumsversuche (mit und ohne Chlorbenzol) auch auf Mineral-Festmedium mit wenig Casamino-Acid durchgeführt. Tatsächlich bildeten die Isolate schöne Kolonien, allerdings waren keine Unterschiede zu erkennen zwischen den Stämmen die zusätzlich Chlorbenzol zur Verfügung hatten und den anderen.

Der Verlust einer Substrat-Verwertung wurde in Zusammenhang mit Chloraromaten schon öfters beobachtet. Auch in anderen Labors wurde schon erfolglos versucht, die Stämme mit geringen Mengen Casamino-Acids oder Hefe-Extrakt wieder zum Abbau von chloraromatischen Verbindungen zu bewegen (Kamagata et al. 1997).

Erwähnenswert ist auch der Stamm *Arthrobacter fluorescens* DL-1 (DSMZ 3680) (Cacciari et al. 1971) und Stamm *Arthrobacter* sp. HEID (Hofmann 1998) die in unserem Labor nicht mehr auf den Substraten wuchsen, auf denen sie früher wuchsen (2,4-D, bzw. 4-Chlorphenol, mündliche Mitteilung J. Gröning).

Mögliche Ursachen für den Verlust der Abbau-Fähigkeit

Eine mögliche Erklärung für den Verlust der Abbau-Fähigkeit oder die Weigerung, mit Chloraromaten zu wachsen, könnte der '**Quorum Sensing**' genannte Mechanismus sein (Physiologie, Kultivierung, 'Quorum sensing', Seite 116). In *Micrococcus luteus* (*Actinomycetales*) wurde das Wachstum steuernde Protein Rpf isoliert und charakterisiert (Mukamolova et al. 1998; Mukamolova et al. 2002). Rpf ist das Protein, das 'schlafende' Zellen wieder zum Leben erweckt: Resuscitation-promoting factor. Es wurde beobachtet, wie gewaschene oder in geringer Zelldichte in Mineralmedium inkubierte Bakterien nicht mehr wuchsen. Der Zustand von niedriger metabolischer Aktivität hilft den Bakterien, längere Zeiten in nicht idealen Wachstumsbedingungen zu überleben (Kaprelyants et al. 1994). 'Viable' (metabolisch aktive) Zellen konnten aber die nicht kultivierbaren Zellen wieder zum Leben erwecken (Votyakova et al. 1994; Kaprelyants und Kell 1996; Batchelor et al. 1997). Interessanterweise kann Rpf von einem Stamm auch das Wachstum von anderen *Micrococcus*-Arten stimulieren.

Ähnliche Gene wurden auch unter vielen anderen Gram-positiven hoch-GC-haltigen Bakterien gefunden, unter ihnen sind einige *Mycobacterium*, *Corynebacterium* und *Streptomyces* (Mukamolova et al. 1998). Nachdem die Stämme M121 und M131 in Flüssigkultur mit wenig 'Casamino-Acids' wachsen konnten, hätte die Bakterien-Dichte genügend gross sein sollen, um auf mögliche 'Quorum sensing'-Signale angemessen zu reagieren zu können. Da die Bakterien trotzdem nicht Chlorbenzol verwerteten, wird nicht weiter vermutet, dass 'Quorum sensing' bei diesen Isolaten eine Rolle in Zusammenhang mit dem Abbau spielt.

Fähigkeiten, die Bakterien nicht ständig brauchen, werden oft **extrachromosomal** auf **Plasmiden** beherbergt (Nojiri et al. 2004). Auf Plasmiden werden zum Beispiel Resistenzmechanismen gegen Schwermetalle oder Antibiotika kodiert, oder es werden exotische Abbauewege, wie jene des Chloraromaten-Abbaueweges oder anderer Xenobiotika darauf gespeichert. Ohne Selektionsdruck können die Nachkommen das Plasmid sehr schnell verlieren (Bhat et al. 1994). Die Bakterien behalten auf diese Weise ein schlankes Genom und können sich schnell reproduzieren. Sollten sich die Umweltbedingungen so verändern, dass die Information auf den Plasmiden einen Selektionsvorteil bietet, vermehren sich die wenigen Bakterien, die das Plasmid noch besitzen schneller und verteilen es im Fall konjugativer Plasmide unter verwandten Arten oder solchen, zu denen sie kompatibel sind. Plasmide ermöglichen eine rasche Adaption an veränderte Umweltbedingungen (Nojiri et al. 2004).

Das bekannteste Plasmid mit Genen des Chloraromaten-Abbaues ist pJP4, ursprünglich aus *Wautersia eutropha* JMP134 isoliert (Don und Pemberton 1981). Es wurde eine Reihe anderer Plasmide mit vergleichbaren Abbaugen beschrieben: pTV1 kodiert 2,4-D-Abbau und wurde aus *Variovorax paradoxus* isoliert (Vallaeyts et al. 1998), pEST 4011 kodiert ebenfalls 2,4-D-Abbau und wurde aus *Pseudomonas putida* isoliert (Ausmees und Heinaru 1990), pMAB1 wurde aus *Burkholderia cepacia* CSV90 isoliert und kodiert auch 2,4-D-Abbau (Bhat et al. 1994). Die Liste von Plasmiden mit katabolen Genen des Chloraromaten-Abbaus ist schon seit längerer Zeit ziemlich gross (Schlömman 1995). Interessanterweise wurden Plasmide mit Chloraromaten-Abbauewegen öfter aus β - oder γ -Proteobakterien isoliert als aus α -Proteobakterien (Ka et al. 1994a). Erst kürzlich wurde das lineare Mega-Plasmid p1CP aus *Rhodococcus opacus*

1CP mit verschiedenen Genen des Chlorbrenzcatechin-Abbauweges beschrieben (König et al. 2004).

Da Plasmide bei mangelndem Selektionsdruck oder bei Stress verloren gehen können (Nojiri et al. 2004), liefert dies eine denkbare Erklärung für den schnellen Verlust der Chloraromaten-Abbaugene der Isolate M110-M131. Allerdings erstaunt es in diesem Zusammenhang, dass sich keine einzige Zelle manifestieren konnte, die noch eine Kopie des Plasmids besass (Brenner et al. 1993). Deshalb ist auch noch nach anderen möglichen Erklärungen zu suchen.

Die Stabilität von Abbaugenen wird ebenfalls stark von **Transposons** beeinflusst (Brenner et al. 1993). Seit immer mehr vollständige Genome sequenziert sind, wird immer offensichtlicher, wie viele Mikroorganismen Teile ihres Genoms untereinander ausgetauscht haben. Durch den Vergleich der Genom-Sequenzen verschiedener Bakterien, wird deutlich wie durch Austausch und Rekombination von Genen sich die Bakterien entwickelt haben und an veränderte Umweltbedingungen anpassungsfähig blieben (van der Meer und Sentchilo 2003). Interessanterweise entwickeln sich manche Bakterien sogar weiter, indem sie ausgewählte Gene verlieren (Ochman und Moran 2001).

An beiden Enden von Chlorbrenzcatechin-Genclustern wurden schon identische IS ('insertions sequences') gefunden, die zusammen ein Transposon bilden (Brenner et al. 1993). Leveau und van der Meer beschreiben, wie sie im Stamm *W. eutropha* JMP134 identische Kopien eines 0.9 kb-Fragmentes des Plasmides im Chromosom gefunden haben, umgeben von IS Elementen (Leveau und van der Meer 1997). Brenner et al. beschreiben, wie im Stamm *Pseudomonas putida* P111 das Plasmid pPB111, das für den Abbau der Chloraromaten über den *ortho*-Chlorbrenzcatechin-Abbauweg kodiert, in den Kulturen verloren ging, wenn die Kulturen auf Substraten ohne *ortho*-ständiges Chlor kultiviert wurden (3- und 4-Chlorbenzoat, Benzoat). Das Plasmid verblieb allerdings in den Zellen, wenn der Stamm auf Substanzen mit *ortho*-ständigem Chlorsubstituent kultiviert wurden (verschieden substituierte 2-Mono, Di- und Trichlorbenzoate). Interessanterweise gelang es ihnen, eine Mutante zu isolieren, die bei Kultivierung ohne *ortho*-ständigem Chlor, die Fähigkeit darauf zu wachsen, nicht mehr verlor. Die Mutante hatte das entsprechende Operon ins Chromosom integriert und

kopierte offenbar nach Bedarf das entsprechende Gencluster auf das Plasmid zurück (Brenner et al. 1993).

Der Verlust von degradativen Operons ist nicht gut beschrieben, dafür das wieder Auftreten eines Phänotyps. In *E. coli* wurden 'silent' oder 'cryptic catabolic operons' beobachtet, die in 90% der Wildstämme vorkamen, zum Beispiel das β -Glucosid-Operon. Die 'abgeschalteten' Operons trugen nichts zum Phänotyp der untersuchten Bakterien bei, gingen aber beim Wachstum auf anderen Substraten nicht als 'unnötiger Ballast' verloren. Nach Hungersituationen wurden diese Gene dann gezielt durch kleine 'transposable elements' eingeschaltet und zwar in manchen Fällen sogar nur, wenn das angebotene Substrat auch den abgeschalteten Genen entsprach (Hall 1999).

Aufgrund dieser Erkenntnisse sollte vielleicht einmal versucht werden, die Isolate M110-M131 in Flüssigkultur längere Zeit aushungern zu lassen, ohne irgend ein Substrat anzubieten. Nach einer Weile könnte dann versucht werden, die Bakterien mit geringen Chlorbenzol-Konzentrationen 'aufzuwecken'.

Bedeutung der Isolate die nicht mehr Chlorbenzol verwerten

Die Stämme M110-M131 liessen sich taxonomisch einordnen in die Gruppen *Sphingomonas*-ähnliche α -Proteobakterien, Actinomyceten und *Bacteroidetes*. Die Actinomyceten bilden mit den Isolat M110, M112, M114, M115, M116, M120, M121, M123, M125, M128, M129 und M131 die grösste Gruppe (**Abbildung 5**, Seite 70). Es wurden acht *Rhodococcus*-ähnliche Stämme isoliert, ein *Brevibacterium*-ähnlicher, zwei *Micrococcus*-ähnliche und zwei *Microbacterium*-ähnliche. Die Isolate M111, M117 und M134 sind *Sphingomonas*-ähnliche α -Proteobakterien (**Abbildung 6**, Seite 71). Stamm M124 wurde als *Pedobacter*-ähnliches Bakterium zu den *Bacteroidetes* eingeordnet (**Abbildung 10**, Seite 74). Eine genauere taxonomische Bestimmung der Isolate ist mit den zugrunde liegenden 16S rDNA Sequenzen nicht möglich. Zum Teil sind die Sequenzen nur wenig länger als 250 bp und mit vielen Unsicherheiten belegt. Die Dendrogramme widerspiegeln grob die taxonomische Einteilung, die Distanzen zwischen den vollständig und den unvollständig und schlecht sequenzierten 16S rDNA-Sequenzen sind allerdings unüblich länger als dies bei längeren Sequenzen besserer Qualität der Fall wäre.

Bis jetzt sind sehr wenige Chloraromaten verwertende Gram-positive Stämme intensiver untersucht worden. Lange Zeit war der Stamm *Rhodococcus opacus* 1CP, der einzige bekannte *Rhodococcus* mit bekanntem Chlorbrenzcatechin-Weg (Gorlatov et al. 1989). Inzwischen sind aber weitere solche Stämme bekannt geworden: *Rhodococcus zopfii* T1 baut Chlorbenzol und einige nicht mit Chlor substituierte Aromaten ab (Stoecker et al. 1994) und *Rhodococcus rhodochrous* CTM baut 2-Methylanilin und chlorierte Isomere ab (Fuchs et al. 1991), *Cellulomonas turbata* B529 baut Chlorbenzol ab (Vogt et al. 2004b). Kürzlich wurde sogar mit *Paenibacillus polymyxa* B550 ein zu den *Firmicutes* gehörendes Chlorbenzol abbauendes Isolat beschrieben (Vogt et al. 2004b). Auch α -Proteobakterien mit Chlorbrenzcatechin-Abbauweg wurden schon erwähnt: *Xanthobacter flavus* 14p1 baut 1,4-Dichlorobenzol ab (Spiess et al. 1995). Bis jetzt (September 2004) sind allerdings nur die entsprechenden Gene des Stammes *R. opacus* 1CP veröffentlicht worden (Eulberg und Schlömann 1998; Seibert et al. 1998; Moiseeva et al. 2002).

Für eine vollständige Beschreibung der Rolle der einzelnen Arten im Chloraromaten-Abbau wäre es wünschenswert, weitere Bakterien mit dieser Fähigkeit zu kennen. Interessant wären insbesondere Actinomyceten oder Bakterien des diesbezüglich kaum erforschten CFB-Clusters (Cytophaga - Flavobacterium - Bacteroidetes). Die vorliegenden Stämme, von denen anfangs einige positive Ergebnisse bei den Replikaversuchen lieferten, hätten diesbezüglich interessante Ergebnisse liefern können. Leider ist es nicht gelungen, diese Bakterien wieder zur Verwertung von Chloraromaten zu bewegen.

Der *Ralstonia*-ähnliche Stamm M013 wächst mit Chlorbenzol

Trotz all der Isolate die plötzlich nicht mehr Chlorbenzol verwerteten, darf nicht vergessen werden, dass der grösste Teil der Isolate problemlos mit Chlorbenzol wuchs. Zu diesen Isolaten gehörte das Isolat M013, ein *Ralstonia*-ähnliches β -Proteobakterium. Von der taxonomischen Einteilung her betrachtet, ist M013 also nichts aussergewöhnliches, es wurden schon einige β -proteobakterielle Chloraromaten-Verwerter beschrieben (**Tabelle 1**, Seite 11). Der Stamme M013 wuchs etwas langsamer als die *Pseudomonas*-ähnlichen Stämme Mxxx, bereitete aber genauso wenige Probleme bei den Versuchen eine Reinkultur zu erhalten und bei der DNA-Extraktion. Wurde zuviel

Chlorbenzol gefüttert, verfärbte sich das Medium ebenfalls braun und die Kultur wuchs nach Transfer in frisches Medium nicht mehr an (Interpretation auf Seite 138).

Im 16S rDNA-Dendrogramm liegen auf demselben Zweig mit M013 die Typstämme von ***R. solanacearum***, ***R. mannitolilytica*** und ***R. picketti***. Es wurden keine Umweltisolate gefunden, die näher an diesem Isolat liegen als der Typstamm *R. solanacearum*. Wegen der Tiefe der Abzweigung (**Abbildung 7**, Seite 71), dürfte der Stamm M013 eine neue *Ralstonia*-Art repräsentieren. Die publizierten Chloraromaten-Verwerter *Wautersia eutropha* JMP134, *W. paucula* LMG 3413, *W. eutropha* JS705 und der nicht weiter definierte '2,4-D-degrading bacterium TFD43' liegen aufgrund der 16S rDNA auf dem anderen Zweig des Dendrogrammes und hiessen noch anfangs dieses Jahres, ebenfalls *Ralstonia* (Vanechoutte et al. 2004).

R. solanacearum war früher als *Pseudomonas solanacearum* oder *Burkholderia solanacearum* bekannt und ist ein Pflanzenpathogen (Poussier et al. 2003; Vanechoutte et al. 2004). Es befällt vor allem die Wurzeln von Tomaten, Kartoffeln und Tabak (*Solanacea*) aber auch Bananen und Erdnusspflanzen. Durch das Xylem wandern die sich vermehrenden Bakterien bis an die Spitze der Pflanze. Sie verstopfen den wichtigen Transportweg, verursachen erst Welke und anschliessend den Tod der Pflanze (Poussier et al. 2003). ***R. mannitolilytica*** und ***R. pickettii*** wurden schon aus den Atemwegen von cystischer Fibrose-Patienten isoliert (Coenye et al. 2002). Als einzige *Ralstonia*-Art versauert *R. mannitolilytica* das Medium bei Mannitol oder D-Arabinol als Substrat. Von dieser Eigenschaft leitet sich der Name ab (De Baere et al. 2001).

Alle *Pseudomonas*-ähnlichen Isolate verwerten Chlorbenzol

Aus der direkten Isolierung mit Chlorbenzol sind über 100 *Pseudomonas*-ähnliche γ -Proteobakterien hervorgegangen, die problemlos mit Chlorbenzol als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle leben können (**Abbildung 8**, Seite 72).

Keiner der *Pseudomonas*-ähnlichen Stämme bereitete Mühe bei der Kultivierung. Ausstriche von den Glycerin-Röhrchen aus der Stammsammlung, wuchsen in zwei Tagen zu stattlichen Kolonien auf Mineralmedium mit Chlorbenzol als einzigem Substrat. Eine einzelne Kolonie von Agarplatte konnte 10 ml Flüssigmedium über Nacht in

eine trübe Kultur verwandeln. Nach 24 h konnte an der Kultur kein Chlorbenzol mehr gerochen werden.

Bei der Herstellung von Reinkulturen wurde zum Teil dreimal hintereinander auf reichhaltigem Medium wie NB überimpft, was bei keinem der Stämme zum Verlust der Chlorbenzol-Abbaufähigkeiten führte. Diese Beobachtung könnte als Hinweis dafür gewertet werden, dass die Chloraromaten-Abbaugene nicht auf Plasmiden gespeichert sind, könnte aber auch bedeuten, dass ein vorhandenes Plasmid stabil in den Stämmen weitergegeben wird.

Wurde allerdings eine Kultur zu schnell hintereinander mit Chlorbenzol gefüttert, **verfärbten** sich das Medium und die Zellen **braun oder dunkelviolet**t. Dies deutet darauf hin, dass sich Chlorbrenzcatechin und Autooxidationsprodukte davon akkumuliert hatten. Die Autooxidationsprodukte entstehen dann, wenn die (Chlor-) Brenzcatechine nicht sofort durch die Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenase oxidiert werden können. Ursachen für diesen Engpass sind wahrscheinlich Sauerstoffmangel, abhängig von der Anzahl der Proteine und deren katalytischen Parametern (k_m , k_{cat}) für organische Substrate und O_2 . (Mars et al. 1997), oder Substratinhibition (Kaschabek et al. 1998). Diese Engpässe können bei der initialen Dioxygenase (Chlorbenzol-Dioxygenase) und bei der Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenase auftreten.

Für einen Sauerstoffengpass bei Kulturen gibt es drei Erklärungen: Wenn der verfügbare Sauerstoff nicht schnell genug im Medium gelöst werden kann, wenn der Sauerstoff von den Zellen nicht schnell genug aufgenommen werden kann oder wenn im geschlossenen Kulturgefäß zu wenig Sauerstoff zur Verfügung steht. Geht man davon aus, dass ein geschlossener 100 ml Schikanenkolben ein totales Volumen von 110 ml hat, der Versuch bei Standardbedingungen stattfindet und Sauerstoff ein ideales Gas ist, so könnten in einem unbelüfteten Kolben bis zu 16 μ l Chlorbenzol vollständig verbrannt werden⁶. In einem 100 ml Kolben trat der Effekt der Braunverfärbung ein, wenn innerhalb von zwei Tagen 6-8 μ l Chlorbenzol verfüttert wurden. Es wird angenommen, dass in der exponentiellen Wachstumsphase, der Sauerstoff nicht schnell genug im Medium nachgelöst werden konnte.

⁶ 100 ml Luft \rightarrow 21 ml O_2 \rightarrow $9.4 \cdot 10^{-4}$ mol O_2 \rightarrow $1.6 \cdot 10^{-4}$ mol CB = 16 μ l CB.

Verwandtschaft der *Pseudomonas*-ähnlichen Isolate

Für eine grobe Einteilung der Isolate sind 16S rDNA-Sequenzen gut geeignet. Zum Abgleich mit den eigenen Sequenzen steht eine grosse Datenbank zu Verfügung (Cole et al. 2003). Für die Feinauflösung bestimmter Taxa hat aber die Gruppe der *Pseudomonas* eine zu geringe Diversität innerhalb der 16S rDNA Gene. Sequenzen von weniger konservierten Genen wären besser geeignet, um die Verwandtschaft unter den verschiedenen *Pseudomonas*-Arten wiederzuspiegeln (Yamamoto et al. 2000). In *Pseudomonas* ist die ribosomale DNA stärker konserviert, als gewisse ubiquitäre Proteinsequenzen, für präzise Dendrogramme wird unter anderem vorgeschlagen, Sequenzen der Gyrase zu verwenden (Yamamoto et al. 2000).

Obwohl schon sehr viele *Pseudomonas*-ähnliche Chloraromaten-Verwerter bekannt sind (**Tabelle 1**, Seite 11), wurden erstaunlicherweise wenige 16S rDNA-Sequenzen von Stämmen gefunden, deren Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen Gene bekannt sind. Viele *Pseudomonas*-ähnliche Chloraromaten-Verwerter wurden in den 70er und frühen 80er Jahren gefunden und publiziert, als taxonomische Zuordnung aufgrund der 16S rDNA noch unüblich war. Wenn mit den Stämmen heute noch gearbeitet wird, so wird manchmal erkannt, dass die Isolate im Grunde β -Proteobakterien sind (*Burkholderia* sp. PS12, *Delftia acidovorans* CA28, 'Pseudomonas' sp. P51, **Tabelle 1**, Seite 11).

101 Isolate bilden eine monophyletische Gruppe mit dem Typstamm *P. jessenii*. Kein Umweltisolat liegt näher an den hier besprochenen Stämmen (Abbildung 8, Seite 72). *P. jessenii* unterscheidet sich von den anderen Pseudomonaden unter anderem durch die Fähigkeit zur Denitrifizierung und zu Wachstum zwischen 4 und 41°C (Verhille et al. 1999). Etwas weiter entfernt, aber auf dem selben Zweig liegen *P. agarici*, *P. putida*, *P. asplenii*, *P. cichorii*, *P. chloraphis* und noch etwas weiter entfernt schliesslich *P. fluorescens*, um nur einige dieser grossen Gruppe zu nennen.

Die Isolate M036 und M094 liegen auf dem anderen *Pseudomonas*-Zweig. Zusammen mit den Typstämmen *P. anguilliseptica*, *P. alcaligenes*, *P. aeruginosa*, *P. citronellolis* und *P. resinovorans*. Gleich neben den Stämmen M036 und M094 liegt das Umweltisolat *Pseudomonas* sp. PCP2, ein Mn(II) oxidierendes Bakterium (Francis und Tebo 2001). Der Stamm *P. resinovorans* CA10 ist interessanterweise bekannt für

'Carbazole'-Abbau über 'Anthranil-säure', zu Brenzcatechin und weiter zu *cis,cis*-Muconat (Kimura et al. 1996). 29 Stämme von *P. citronellolis* wurden aus verschiedenen, mit Mineralöl kontaminierten Standorten isoliert. Mineralöl-Kontaminationen bestehen zu einem gewissen Teil aus verschiedenen polycyclischen aromatischen Verbindungen, *P. citronellolis* ist fähig, manche solcher Verbindungen vollständig abzubauen (Bhattacharya et al. 2003).

Geringe Diversität unter den Isolaten

Es wurde erwartet, dass die Methode der direkten Isolierung die Diversität der Chlorbenzol-Verwerter in der Umweltprobe gut wiedergibt. Die grosse Überzahl von *Pseudomonas*-ähnlichen γ -Proteobakterien in der direkten Isolierung erinnert stark an ein vergleichbares Projekt, in dem drei verschieden stark mit BTEX kontaminierte Grundwasser über längere Zeit beobachtet wurden (Junca und Pieper 2003). Das Ziel jenes Versuches war die Beobachtung einer Verschiebung der bakteriellen Zusammensetzung ('shift') in Proben mit unterschiedlichen Schadstoff-Konzentrationen. Von direkten Isolierungen auf unspezifischem R2A-Festmedium von verschieden stark mit BTEX kontaminierten Umweltproben, wurde die Bakterien-Stämme nachträglich durch einen colorimetrischen Nachweis für die gesuchte Stoffwechselaktivität ausgewählt. Von den 30 näher betrachteten Isolaten der stark verunreinigten Umwelt-Probe, erwiesen sich alle als *Pseudomonas*-ähnlich (Junca und Pieper 2004).

Die direkte Isolierung auf Mineralmedium mit Chlorbenzol hat in diesem Fall sehr klar die Dominanz der *Pseudomonas*-ähnlichen Stämme beim Abbau von Xenobiotika in der Umwelt gezeigt. Auch wenn Bakterienstämme aus anderen Taxa isoliert wurden, die anfangs ebenfalls zu Chlorbenzol-Verwertung fähig waren, so waren diese trotzdem von Anfang an in der Minderzahl. Das Ergebnis bestätigt die Theorie vom ' γ -shift' genannten Effekt (Amann et al. 1995), der im Fall eines grossen Substratangebotes die Isolierung einer Überzahl von γ -Proteobakterien beschreibt. Die starke Verunreinigung der Bodenprobe mit Chlorbenzol (**Tabelle 3**), oder im oben beschriebenen Fall von BTEX (Junca und Pieper 2003), ist ja für die Schadstoff-Verwerter nichts anderes als eine hohe Substratkonzentration.

Es gilt aber zu bedenken, dass trotz dieser Ergebnisse davon ausgegangen werden kann, dass es in der Vielfalt der ökologischen Nischen in der Natur Platz für eine

grössere Anzahl von Arten gibt. Es ist bekannt, dass mit den heutigen Methoden nur 1% der Bakterienflora einer Umweltprobe kultiviert werden kann und anscheinend hat es in nur 30 g Walderde über eine halbe Million Bakterienarten (Dykhuisen 1998). Die direkte Plattierung auf Mineralmedium-Agar mit einfachem Phosphatpuffer und einer beträchtlichen Menge Chlorbenzol favorisierte schnell wachsende Bakterien, die ohne Vitamine gedeihen können. Langsam wachsende Bakterien wurden von den schnelleren verdeckt oder durch Hemmstoffe am Wachstum gehindert.

Die gezählten koloniebildenden Einheiten auf den Festmedium-Platten verhielten sich nicht proportional zur aufgetragenen Verdünnung. Auf Platten mit stärker verdünnten Proben wurden im Verhältnis mehr Kolonien gezählt als auf Platten mit geringerer Verdünnung. Diese unübliche Feststellung deutet auf sich verdeckende Kolonien oder Hemmhöfe von Kolonien, die auf den dicht besiedelten Platten den sensitiven Bakterien das Wachstum erschweren. Es wäre interessant, eine andere Isolierungsstrategie auszuprobieren, zum Beispiel die kürzlich vorgestellte 'filtration-acclimatization method' (FAM) (Hahn et al. 2004), mit der eine Reihe neuer Arten gefunden wurden, die leicht und in konzentrierten Nährstoff-Lösungen zu kultivieren waren, aber langsam wuchsen.

Bedeutung der *Pseudomonas*-ähnlichen Isolate

Pseudomonas sind sehr interessante Bakterien. Sie sind bekannt für ein sehr breites und ausgefallenes Substratspektrum und wurden schon oft von mit Chemikalien belasteten Standorten isoliert (Nojiri et al. 2004). Einzelne Pseudomonaden sind aber auch wichtige Pathogene für Menschen, Tiere und Pflanzen. (Yamamoto et al. 2000). *Pseudomonas* sind anspruchslose, schnell wachsende Bakterien, was sie für die Biotechnologie oder für Arbeiten im Labor prädestiniert. Das schnelle Wachstum der Kulturen erleichtert die Planung von Experimenten und behindert Kontaminationen in den Kulturen. Als Proteobakterien haben sie eine nicht zu stabile Zellwand, und die meisten üblichen Laborprotokolle zur Extraktion von DNA oder Proteinen führen ohne Umstände zum Erfolg.

Ein Hinweis, wie pflegeleicht *Pseudomonas*-ähnliche Isolate sind, liefern die verwendeten Stammmamen. Jede reine Einzellzellkolonie, deren Wachstum auf Chlorbenzol geprüft worden war, wurde von M001 beginnend mit einer fortlaufenden Nummer

versehen. Die *Pseudomonas*-ähnlichen Isolate erhielten die Bezeichnungen M001-M109. Von den restlichen Stämmen (α -Proteobakterien, Actinomyceten, Bacteroidetes) wurde eine Reinkultur erst nach mehreren Schritten erhalten.

Das Ziel dieser Arbeit war jedoch nicht, möglichst anspruchslose Bakterien zu isolieren, sondern auch einen direkten Einblick in die Diversität der Chloraromaten verwertenden Bakterien einer stark kontaminierte Umweltprobe zu erhalten. Dies ist gelungen und wird durch die Erwartungen oder andere Versuche bestätigt (Junca und Pieper 2004).

Leider muss davon ausgegangen werden, dass die Diversität in der Umweltprobe in Bezug auf die Chloraromaten-Verwerter gering und die beteiligten Bakterien wohlbekannt waren. Ein Blick auf das Dendrogramm der Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen (**Abbildung 13**) oder Chlormuconat-Cycloisomerasen (**Abbildung 11**) genügt, um Gewissheit zu erhalten, dass es mit den vielen *Pseudomonas*-ähnlichen Isolaten nicht gelungen war, die Sequenzdatenbank der Gene des modifizierten Brenzcatechin-Abbauweges wirklich zu bereichern. Interessant ist das Ergebnis allerdings in Bezug auf die Diversität der Chlorbenzol verwertenden Bakterien der untersuchten Umweltprobe.

4.3.2 Gene des Chlorbrenzcatechin-Weges der direkt isolierten Stämme

Durch die direkte Isolierung sollte die Diversität der Chlorbenzol verwertenden Stämme in der kontaminierten Umweltprobe aufgezeigt werden. Es interessierte aber auch die Diversität der Gene des Chlorbrenzcatechin-Weges, um die molekulargenetischen Methoden zum Nachweis dieser Gene testen zu können. Die Isolate sollten als positive Kontrolle für den genetischen Nachweis verwendet werden können. Bei allen untersuchten Chlorbenzol verwertenden Isolate der direkten Isolierung wurden mit den entsprechenden PCR-Primern Produkte erhalten.

Geringe Diversität der Enzymsequenzen

Bei den Dendrogrammen der Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen (**Abbildung 13**, Seite 85) und Chlormuconat-Cycloisomerasen (**Abbildung 11**, Seite 79) fielen in Bezug

auf die Sequenzen der direkt isolierten Stämme Mxxx zwei Punkte auf: 1) Alle Sequenzen der *Pseudomonas*-ähnlichen Isolate lagen in einer Gruppe zusammen mit den jeweiligen Sequenzen des Stammes *Pseudomonas aeruginosa* JB2 (ClcA und ClcB). 2) Die Sequenzen des *Ralstonia*-ähnlichen Isolates M013 hingegen, lagen in beiden Dendrogrammen in einer Gruppe mit den Sequenzen des Stammes 'Pseudomonas' sp. P51 (TcbC und TcbD) und *Pseudomonas chloraphis* RW71 (TetC und TetD). Bei beiden Gattungen waren also die betrachteten Enzyme je zu den entsprechenden Enzymen der selben Stämme nächst verwandt. Diese gleichartige Anordnung in den beiden Dendrogrammen liess vermuten, dass nicht nur die Gene der Isolate zu den Stämmen P51 bzw. RW71 nah verwandt waren, sondern das gesamte Operon des Chlorbrenzcatechin-Weges.

Schliesslich fiel noch die sehr geringe Sequenzdiversität der Sequenzen der *Pseudomonas*-ähnlichen Isolate auf, in der Proteinsequenz der Chlormuconat-Cycloisomerasen wurden in 248 Aminosäure-Resten drei Polymorphismen gezählt. In der ein drittel so langen Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen-Sequenz wurden ebenfalls drei Polymorphismen gezählt. Interessant war der Polimorphismus an Aminosäure-Position 29 des PCR-Produktes, wo sich bei sieben Sequenzen ein Tyrosin- statt eines Phenylalanin-Restes befand. Dieser Unterschied war nicht nur in den verschiedenen Sequenzen eines Isolates nachzuweisen, sondern trat ebenfalls in etwa demselben Verhältnis in den anderen veröffentlichten Sequenzen auf. Durch die Verbreitung des Polymorphismus bei veröffentlichten Sequenzen etwa im Verhältnis 1:1 wird ausgeschlossen, dass es sich bei den Sequenzen Mxxx um einen methodenbedingten Artefakt handelt. Da der Polymorphismus in unterschiedlichen Sequenzen desselben Organismus auftrat, wurde angenommen, dass die Isolate Mxxx mindestens zwei unterschiedliche Kopien der Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen-Sequenz besitzen, vermutlich mindestens zwei Kopien des Chlorbrenzcatechin-Weg-Operons.

Erfassung der Gene in der Umwelt

Die sehr geringe Diversität der Chlorbenzol-Verwerter in der Umweltprobe und die ebenfalls sehr geringe Diversität innerhalb der katabolen Gene dieser Stämme, erleichtert deren Nachweis mit kultivierungsunabhängigen Methoden in der Umweltprobe. Mit einigen Actinomyceten der direkten Isolierung, die das Wachstum auf Chlorbenzol

verweigerten, wurde versucht, PCR zum Nachweis der katabolen Gene zu machen. Es wurde zwar mit manchen Stämmen ein PCR-Produkt erhalten, das Produkt lag aber nicht im Rahmen der erwarteten Grösse. Die von der anschliessenden Sequenzierung erhaltenen Sequenzen der PCR-Produkte hatten keine Ähnlichkeit zu bekannten Enzymen des Chlorbrenzcatechin-Weges. Es konnte also nicht gezeigt werden, dass diese Stämme 'schlafende' oder 'ausgeschaltene' Gene hatten. Sollten diese direkt isolierten, nicht zu den Proteobakterien gehörenden Stämme beim Chlorbenzol-Abbau in der Umweltprobe eine Rolle spielen, so werden sie aufgrund der fehlenden Vergleichssequenzen bis auf weiteres nicht nachweisbar sein.

Die PCR mit den Primern für die Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenase und Chlor-muconat-Cycloisomerase der γ -Proteobakterien hat hingegen immer PCR-Produkte ergeben. Inzwischen ist es Jana Seifert in unserem Labor sogar gelungen, das PCR-Programm durch Erhöhung der Zyklen-Zahl so anzupassen, dass die Reaktion in einem Durchlauf gute Ergebnisse liefert. Die von Thiel (2004) hergestellten Primer sind gut geeignet, um die zwei besprochenen Gene des modifizierten *ortho*-Brenzkatechin-Weges nachzuweisen, es wird aber davon ausgegangen, dass damit die proteobakteriellen Sequenzen gut nachzuweisen sind.

5 Thesen

1. Für eine möglichst effiziente Steuerung von Prozessen des mikrobiellen Schadstoff-Abbaus sowie für eine Vorhersage der Sanierbarkeit eines Schadens durch biologische Verfahren ist es wünschenswert, Informationen zur Häufigkeit von Mikroorganismen mit dem entsprechenden Abbaupotenzial in der Lebensgemeinschaft zu haben. Da die Mehrzahl der in der Natur vorkommenden Mikroorganismen mit gängigen Methoden nicht kultiviert werden kann, bietet sich für derartige Untersuchungen die Verwendung kultivierungsunabhängiger, molekulargenetischer Methoden wie Hybridisierung oder Polymerase-Kettenreaktion (PCR) an.
2. Voraussetzung für die Aussagekraft molekulargenetischer Analysen des Abbaupotenzials ist die Verfügbarkeit von Gensonden oder PCR-Primerpaaren, die einerseits hinreichend spezifisch für die gesuchte Abbauleistung sind, andererseits aber auch der in der Natur vorkommenden Sequenzdiversität für diesen Phänotyp in ausreichendem Masse Rechnung tragen. Entsprechende Gensonden oder Primerpaare sollten also an möglichst unterschiedlichen Mikroorganismen, die über die gesuchte Abbauleistung verfügen, überprüft werden.
3. Um neue Mikroorganismen mit der Fähigkeit zum aeroben Abbau chlorierter Aromaten isolieren zu können, wurden im Rahmen der Dissertation mehrere Anreicherungen durchgeführt, die so angelegt waren, dass sie eher ungewöhnliche Mikroorganismen mit der Fähigkeit zum Chloraromatenabbau bevorzugen sollten.
4. Aus einer Anreicherungskultur in stickstofffreiem Medium mit 2,4- Dichlorphenoxyacetat (2,4-D) als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wurden neun Bakterienstämme isoliert, die 2,4-D verwerten können. Alle neun Isolate wurden durch Analyse ihrer 16 S rRNA taxonomisch eingeordnet und erwiesen sich als mit einander nah verwandte *Bradyrhizobium*-ähnliche Stämme. Diese Isolate sind zu nicht-symbiotischer Stickstoff-Fixierung fähig. Im Unterschied zu den nächst

verwandten Isolaten, die von unberührten Standorten ohne früheren Kontakt zu 2,4-D stammen, wurden die vorliegenden Stämme aus landwirtschaftlicher Erde isoliert.

5. Es ist davon auszugehen, dass die neuen 2,4-D verwertenden Stämme zusammen mit anderen Umweltisolaten einer neuen, noch nicht beschriebenen Art der Gattung *Bradyrhizobium* zugeordnet werden sollten. In einem auf 16S rRNA-Sequenzen beruhenden Dendrogramm mit 'bootstrap'-Analyse wurde der nächst verwandte Typstamm, *Bradyrhizobium elkanii* USDA 76, in 98% der gerechneten Dendrogramme in einen stark abgegrenzten, benachbarten Zweig eingeteilt.
6. Aufgrund des 16S rRNA-Dendrogrammes wird angenommen, dass 2,4-D-Verwertung bei der neu zu beschreibenden *Bradyrhizobium*-Art, ein ursprüngliches Merkmal ist. In nächster Nachbarschaft zu den neuen Isolaten befinden sich mehrere weitere 2,4-D-Verwerter. Auf demselben Zweig liegen nur zwei Sequenzen von deren Stämmen 2,4-D-Verwertung nicht bestimmt wurde, eine stammt von einem nicht kultivierten Bakterium.
7. Mit PCR konnten Fragmente der Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenase- und der Chlormuconat-Cycloisomerase-Gene der neuen *Bradyrhizobium*-ähnlichen Isolate amplifiziert werden. Deren Sequenzen unterschieden sich stark von den entsprechenden Sequenzen der im Hinblick auf den Chloraromaten-Abbau gut untersuchten β - und γ -Proteobakterien. In einem Dendrogramm gliederten sich die Sequenzen der PCR-Produkte der neuen Isolate eindeutig in einen Ast mit anderen homologen α -proteobakteriellen Sequenzen. Während im Zweig der β - und γ -Proteobakterien, die Protein-Sequenzen nicht nach deren Klasse unterschieden werden konnten, bildeten die Proteine der α -Proteobakterien eine nach Familien geordnete monophyletische Gruppe. Aufgrund des klaren Verzweigungsmusters des α -Proteobakterien-Zweiges wird angenommen, dass horizontaler Gentransfer über die Gattungs-Grenze bei den katabolen Gene der α -Proteobakterien keine wichtige Rolle spielt.
8. Durch direkte Isolierung wurden von einer stark mit Chlorbenzol belasteten Umweltprobe 123 Bakterien-Stämme isoliert. Auch diese Stämme wurden durch

Analyse der 16S rRNA taxonomisch zugeordnet. Unter den Chlorbenzol-Abbauern waren etwa 100 *Pseudomonas*-ähnliche γ -Proteobakterien, ein *Ralstonia*-ähnliches β -Proteobakterium, drei *Sphingomonas*-ähnliche α -Proteobakterien, einige *Actinomycetales* und ein den '*Sphingobacteriales*'-ähnliches Bakterium aus der Gruppe der *Bacteroidetes*. Nach kurzer Zeit konnten aber nur noch die β - und γ -Proteobakterien Chlorbenzol verwerten.

9. Der Verlust der katabolen Gene bei den nicht β - oder γ -Proteobakterien ist ein bekanntes Phänomen. Er könnte eventuell mit dem Verlust eines katabolen Plasmides oder der Ausschaltung der Gene durch Transposons erklärbar sein.
10. Aufgrund der schon anfangs geringen Diversität zugunsten der γ -Proteobakterien wird angenommen, dass durch die starke Chlorbenzol-Belastung in der Umweltprobe der so genannte ' γ -shift', eine Anreicherung der γ -Proteobakterien, stattgefunden hat. Für Chloraromaten-Verwerter ist die hohe Chlorbenzol-Belastung lediglich eine hohe Substrat-Konzentration. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen vergleichbarer Versuche anderer Arbeitsgruppen überein.
11. Bei der direkten Isolierung auf Festmedium mit Chlorbenzol als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle spielen Anreicherungseffekte zu Gunsten schneller Bakterien mit hohen Substratansprüchen eine geringe Rolle. Deshalb könnte es sein, dass die isolierten Bakterien die Verteilung der kultivierbaren Chloraromaten-Verwerter in der Umweltprobe relativ gut repräsentieren.
12. Die Gene der Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen und Chlormuconat-Cycloisomerasen der *Pseudomonas*-ähnlichen Isolate und des *Ralstonia*-ähnlichen Isolates, liessen sich gut mit PCR amplifizieren. Es bestehen insofern gute Chancen, am Standort die für den Chloraromaten-Abbau relevanten Gene mit kultivierungsunabhängigen Methoden zu erfassen.
13. Die untersuchten katabolen Gene der *Pseudomonas*-ähnlichen Isolate waren untereinander beinahe identisch. In den Aminosäure-Sequenzen der Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen wurde aber ein Polymorphismus entdeckt, der etwa im selben Verhältnis in anderen, veröffentlichten Sequenzen auftritt. Interessanterweise trat der Polymorphismus aber auch innerhalb der verschiedenen Sequen-

zen eines Stammes auf. Daraus wird geschlossen, dass in den Stämmen der direkten Isolierung mindestens zwei Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen-Gene vorhanden sind, vermutlich sind es aber zwei Operone des Chlorbrenzcatechin-Weges.

6 Literatur

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers und D. J. Lipman (1990). "Basic local alignment search tool." *Journal of Molecular Biology* **215**(3): 403-10.

Amann, R. L., W. Ludwig und K.-H. Schleifer (1995). "Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation." *Microbiological Reviews* **59**(1): 143-69.

Amy, P. S., J. W. Schulke, L. M. Frazier und R. J. Seidler (1985). "Characterization of aquatic bacteria and cloning of genes specifying partial degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid." *Applied and Environmental Microbiology* **49**(5): 1237-45.

Ando, K., A. Kato und S. Suzuki (1970). "Isolation of 2,4-dichlorophenol from a soil fungus and its biological significance." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **39**(6): 1104-7.

Atlas, R. M. (1995). *Rhizobium X Medium*. Handbook of media for environmental microbiology. Boca Raton, USA, CRC Press: 393.

Ausmees, N. R. und A. L. Heinaru (1990). "New plasmids of herbicide 2,4-D degradation." *Genetika* **26**: 770-2.

Bartels, I., H. J. Knackmuss und W. Reineke (1984). "Suicide Inactivation of Catechol 2,3-Dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by 3-Halocatechols." *Applied and Environmental Microbiology* **47**(3): 500-5.

Bartscht, K., H. Cypionka und J. Overmann (1999). "Evaluation of cell activity and of methods for the cultivation of bacteria from a natural lake community." *FEMS Microbiology Ecology* **28**(3): 249-59.

Bassam, B. J., G. Caetano-Anolles und P. M. Gresshoff (1991). "Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels." *Analytical Biochemistry* **196**(1): 80-3.

Batchelor, S. E., M. Cooper, S. R. Chhabra, L. A. Glover, G. S. Stewart, P. Williams und J. I. Prosser (1997). "Cell density-regulated recovery of starved biofilm populations of ammonia-oxidizing bacteria." *Applied and Environmental Microbiology* **63**(6): 2281-6.

Bateman, A., E. Birney, L. Cerruti, R. Durbin, L. Etwiller, S. R. Eddy, S. Griffiths-Jones, K. L. Howe, M. Marshall und E. L. Sonnhammer (2002). "The Pfam protein families database." *Nucleic Acids Research* **30**(1): 276-80.

Bhat, M. A., M. Tsuda, K. Horiike, M. Nozaki, C. S. Vaidyanathan und T. Nakazawa (1994). "Identification and characterization of a new plasmid carrying genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate from *Pseudomonas cepacia* CSV90." *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 307-12.

- Bhattacharya, D., P. M. Sarma, S. Krishnan, S. Mishra und B. Lal** (2003). "Evaluation of genetic diversity among *Pseudomonas citronellolis* strains isolated from oily sludge-contaminated sites." *Applied and Environmental Microbiology* **69**(3): 1435-41.
- Bock, E. und H.-P. Koops** (1992). The genus *Nitrobacter* and related genera. The Prokaryotes. A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K.-H. Schleifer. New York, USA, Springer-Verlag. **3**: 2302-9.
- Bollag, J.-M., G. G. Briggs, J. E. Dawson und M. Alexander** (1968). "2,4-D metabolism. Enzymatic degradation of chlorocatechols." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **16**: 829-33.
- Bonfield, J., K. Beal, Y. Cheng, M. Jordan und R. Staden** (2002). Staden Package, V. 2002.0 (Pregap4 1.3, Trev 1.7, Gap4 4.7, Spin 1.1).
- Boon, N., J. Goris, P. De Vos, W. Verstraete und E. M. Top** (2000). "Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-degrading *Comamonas testosteroni* strain, I2gfp." *Applied and Environmental Microbiology* **66**(7): 2906-13.
- Boyd, S. A. und D. R. Shelton** (1984). "Anaerobic biodegradation of chlorophenols in fresh and acclimated sludge." *Applied and Environmental Microbiology* **47**(2): 272-7.
- Boyd, S. A., D. R. Shelton, D. Berry und J. M. Tiedje** (1983). "Anaerobic biodegradation of phenolic compounds in digested sludge." *Applied and Environmental Microbiology* **46**(1): 50-4.
- Brazil, G. M., L. Kenefick, M. Callanan, A. Haro, V. de Lorenzo, D. N. Dowling und F. O'Gara** (1995). "Construction of a rhizosphere pseudomonad with potential to degrade polychlorinated biphenyls and detection of *bph* gene expression in the rhizosphere." *Applied and Environmental Microbiology* **61**(5): 1946-52.
- Brenner, D. J., D. G. Hollis, C. W. Moss, C. K. English, G. S. Hall, J. Vincent, J. Radosevic, K. A. Birkness, W. F. Bibb, F. D. Quinn und et al.** (1991). "Proposal of *Afipia* gen. nov., with *Afipia felis* sp. nov. (formerly the cat scratch disease bacillus), *Afipia clevelandensis* sp. nov. (formerly the Cleveland Clinic Foundation strain), *Afipia broomeae* sp. nov., and three unnamed genospecies." *Journal of Clinical Microbiology* **29**(11): 2450-60.
- Brenner, V., B. S. Hernandez und D. D. Focht** (1993). "Variation in chlorobenzoate catabolism by *Pseudomonas putida* P111 as a consequence of genetic alterations." *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 2790-4.
- Brown, C. M., D. C. Ellwood und J. R. Hunter** (1977). "Growth of bacteria at surfaces: Influence of nutrient limitation." *FEMS Microbiology Letters* **1**: 163-6.
- Brown, T.** (2000). Southern blotting. *Current protocols in molecular biology*. F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston et al. USA, John Wiley & Sons. **1**: 2.9.1-2.9.15.
- Brunsbach, F. R. und W. Reineke** (1993). "Degradation of chloroanilines in soil slurry by specialized organisms." *Applied Microbiology and Biotechnology* **40**(2/3): 402-7.
- Burks, C., J. W. Fickett, W. B. Goad, M. Kanehisa, F. I. Lewitter, W. P. Rindone, C. D. Swindell, C. S. Tung und H. S. Bilofsky** (1985). "The GenBank nucleic acid sequence database." *Computer Applications in the Biosciences* **1**(4): 225-33.

- Cacciari, I., G. Giovannozzi-Sermanni, A. Grappelli und D. Lippi** (1971). "Nitrogen fixation by *Arthrobacter* sp. I. Taxonomic study and evidence of nitrogenase of two new strains." *Ann. Microbiol.* **21**: 97-105.
- Cavalca, L., A. Hartmann, N. Rouard und G. Soulas** (1999). "Diversity of *tfdC* genes: distribution and polymorphism among 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degrading soil bacteria." *FEMS Microbiology Ecology* **29**(1): 45-58.
- Coenye, T., P. Vandamme und J. J. LiPuma** (2002). "Infection by *Ralstonia* species in cystic fibrosis patients: identification of *R. pickettii* and *R. mannitolilytica* by polymerase chain reaction." *Emerging Infectious Diseases* **8**(7): 692-6.
- Cole, J. R., B. Chai, T. L. Marsh, R. J. Farris, Q. Wang, S. A. Kulam, S. Chandra, D. M. McGarrell, T. M. Schmidt, G. M. Garrity und J. M. Tiedje** (2003). "The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy." *Nucleic Acids Research* **31**(1): 442-3.
- Das, S. K., A. K. Mishra, B. J. Tindall, F. A. Rainey und E. Stackebrandt** (1996). "Oxidation of thiosulfate by a new bacterium, *Bosea thiooxidans* (strain BI-42) gen. nov., sp. nov.: Analysis of phylogeny based on chemotaxonomy and 16S ribosomal DNA sequencing." *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**(4): 981-7.
- Daubaras, D. L., C. E. Danganan, A. Hubner, R. W. Ye, W. Hendrickson und A. M. Chakrabarty** (1996). "Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by *Burkholderia cepacia* strain AC1100: evolutionary insight." *Gene* **179**(1): 1-8.
- De Baere, T., S. Steyaert, G. Wauters, De V. P., G. J., T. Coenye, T. Suyama, V. G. und M. Vaneechoutte** (2001). "Classification of *Ralstonia pickettii* biovar 3/'thomasi' strains (Pickett 1994) and of new isolates related to nosocomial recurrent meningitis as *Ralstonia mannitolytica* sp. nov." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 547-58.
- de Bruijn, F. J.** (1992). "Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria." *Applied and Environmental Microbiology* **58**(7): 2180-7.
- de Jong, E. und J. A. Field** (1997). "SULFUR TUFT AND TURKEY TAIL: Biosynthesis and Biodegradation of Organohalogens by Basidiomycetes." *Annual Review of Microbiology* **51**: 375-414.
- de Jong, E., J. A. Field, H.-E. Spinnler, J. B. P. A. Wijnberg und J. A. M. De Bont** (1994). "Significant biogenesis of chlorinated aromatics by fungi in natural environments." *Applied and Environmental Microbiology* **60**(1): 264-70.
- Degrange, V. und R. Bardin** (1995). "Detection and counting of *Nitrobacter* populations in soil by PCR." *Applied and Environmental Microbiology* **61**(6): 2093-8.
- Dejonghe, W., J. Goris, A. Dierickx, V. De Dobbeleer, K. Crul, P. De Vos, W. Verstraete und E. M. Top** (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 Microbiology Ecology* **42**(2): 315-25.
- Don, R. H. und J. M. Pemberton** (1981). "Properties of 6 pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*." *Journal of Bacteriology* **145**(2): 681-6.

- Dorn, E., M. Hellwig, W. Reineke und H. J. Knackmuss** (1974). "Isolation and characterization of a 3-chlorobenzoate degrading pseudomonad." *Archives of Microbiology* **99**(1): 61-70.
- Dunbar, J., S. White und L. Forney** (1997). "Genetic diversity through the looking glass: Effect of enrichment bias." *Applied and Environmental Microbiology* **63**(4): 1326-31.
- Dykhuisen, D. E.** (1998). "Santa Rosalia revisited: Why are there so many species of bacteria?" *Antonie van Leeuwenhoek* **73**: 25-33.
- Eaglesham, A. R. J., J. M. Ellis, W. R. Evans, D. E. Fleischman, M. Hungria und R. W. F. Hardy** (1990). *The first photosynthetic N₂-fixing Rhizobium: Characteristics. Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives.* P. M. Gresshoff, L. E. Roth, G. Stacey und W. L. Newton. New York, USA, Chapman and Hall: 805-11.
- Eardly, B. D., J. P. Young und R. K. Selander** (1992). "Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. strain Or 191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes." *Applied and Environmental Microbiology* **58**(6): 1809-15.
- El Mamouni, R., R. Jacquet, P. Gerin und S. N. Agathos** (2002). "Influence of electron donors and acceptors on the bioremediation of soil contaminated with trichloroethene and nickel: Laboratory- and pilot-scale study." *Water Science and Technology* **45**(10): 49-54.
- El-Nakeeb, M. A. und H. A. Lechevalier** (1963). "Selective isolation of aerobic *Actinomycetes*." *Applied Microbiology* **11**: 75-7.
- Ellwood, D. C., C. W. Keevil, P. D. Marsh, C. M. Brown und J. N. Wardell** (1982). "Surface-associated growth." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **297**(1088): 517-32.
- Eulberg, D., L. A. Golovleva und M. Schlömann** (1997). "Characterization of catechol catabolic genes from *Rhodococcus erythropolis* 1CP." *Journal of Bacteriology* **179**(2): 370-81.
- Eulberg, D., E. M. Kourbatova, L. A. Golovleva und M. Schlömann** (1998). "Evolutionary relationship between chlorocatechol catabolic enzymes from *Rhodococcus opacus* 1CP and their counterparts in proteobacteria: sequence divergence and functional convergence." *Journal of Bacteriology* **180**(5): 1082-94.
- Eulberg, D. und M. Schlömann** (1998). "The putative regulator of catechol catabolism in *Rhodococcus opacus* 1CP--an IclR-type, not a LysR-type transcriptional regulator." *Antonie van Leeuwenhoek* **74**(1-3): 71-82.
- Finney, M.** (2000). *Molecular cloning of PCR Products. Current protocols in molecular biology.* F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston et al. USA, John Wiley & Sons. **3**: 15.7.1-.7.1.
- Focht, D. D. und D. Shelton** (1987). "Growth kinetics of *Pseudomonas alcaligenes* C-0 relative to inoculation and 3-chlorobenzoate metabolism in soil." *Applied and Environmental Microbiology* **53**(8): 1846-9.
- Francis, C. A. und B. M. Tebo** (2001). "*cumA* multicopper oxidase genes from diverse Mn(II)-oxidizing and non-Mn(II)-oxidizing *Pseudomonas* strains." *Applied and Environmental Microbiology* **67**(9): 4272-8.

- Franke, S., N. Heinzl, M. Specht und W. Francke** (2004). Organische Schadstoffe im Gebiet der Unteren Mulde - Non Target Screening: Analytik von Wasser, Grundwasser und Sediment - Ergebnisse und Konsequenzen. BMBF Endbericht. W. Geller, K. Ockenfeld, M. Böhme und A. Knöchel.
- Frantz, B. und A. M. Chakrabarty** (1987). "Organization and nucleotide sequence determination of a gene cluster involved in 3-chlorocatechol degradation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 4460-4.
- Fuchs, K., A. Schreiner und F. Lingens** (1991). "Degradation of 2-methylaniline and chlorinated isomers of 2-methylaniline by *Rhodococcus rhodochrous* strain CTM." *Journal of General Microbiology* **137**: 2033-9.
- Fulthorpe, R. R., C. McGowan, O. V. Maltseva, W. E. Holben und J. M. Tiedje** (1995). "2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria contain mosaics of catabolic genes." *Applied and Environmental Microbiology* **61**(9): 3274-81.
- Fulthorpe, R. R., A. N. Rhodes und J. M. Tiedje** (1996). "Pristine soils mineralize 3-chlorobenzoate and 2,4-dichlorophenoxyacetate via different microbial populations." *Applied and Environmental Microbiology* **62**(4): 1159-66.
- Garrity, G. M. und J. G. Holt** (2001). Taxonomic outline of the *Archaea* and *Bacteria*. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. D. R. Boone, R. W. Castenholz und G. M. Garrity. New York, USA, Springer-Verlag. **1**: 155-66.
- Gheewala, S. H. und A. P. Annachhatre** (1997). "Biodegradation of aniline." *Water Science and Technology* **36**(10): 53-63.
- Ghisalba, O.** (1983). "Chemical wastes and their biodegradation - an overview." *Experientia* **39**: 1247-57.
- Gibson, S. A. und J. M. Suflita** (1986). "Extrapolation of biodegradation results to groundwater aquifers: reductive dehalogenation of aromatic compounds." *Applied and Environmental Microbiology* **52**(4): 681-8.
- Giladi, M., B. Avidor, Y. Kletter, S. Abulafia, L. N. Slater, D. F. Welch, D. J. Brenner, A. G. Steigerwalt, A. M. Whitney und M. Ephros** (1998). "Cat scratch disease: the rare role of *Afipia felis*." *Journal of Clinical Microbiology* **36**(9): 2499-502.
- Glöckner, J.** (2004). Studienarbeit: Taxonomische Untersuchungen zu 2,4-Dichlorphenoxyacetat abbauenden Stämmen aus dem *Bradyrhizobium*-Verwandtschaftskreis. Institut für Bakteriologie, Mykologie und Hygiene. Wien, Österreich, Veterinärmedizinische Universität.
- Goldstein, R. M., L. M. Mallory und M. Alexander** (1985). "Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation." *Applied and Environmental Microbiology* **50**(4): 977-83.
- Gorlatov, S. N., O. V. Maltseva, V. I. Shevchenko und L. A. Golovleva** (1989). "Degradation of chlorophenols by a culture of *Rhodococcus erythropolis*." *Mikrobiologiya (english)* **58**(5): 802-6.
- Gribble, G. W.** (2003). "The diversity of naturally produced organohalogens." *Chemosphere* **52**(2): 289-97.
- Hägglom, M. M., V. K. Knight und L. J. Kerkhof** (2000). "Anaerobic decomposition of halogenated aromatic compounds." *Environmental Pollution* **107**: 199-207.

- Hahn, M. W., P. Stadler, Q. L. Wu und M. Pöckla** (2004). "The filtration–acclimatization method for isolation of an important fraction of the not readily cultivable bacteria." *Journal of Microbiological Methods* **57**(3): 379-90.
- Hall, B. G.** (1999). "Transposable elements as activators of cryptic genes in *E. coli*." *Genetica* **107**(1-3): 181–7.
- Hattori, T., H. Mitsui, H. Haga, N. Wakao, S. Shikano, K. Gorlach, Y. Kasahara, A. el-Beltagy und R. Hattori** (1997). "Advances in soil microbial ecology and the biodiversity." *Antonie van Leeuwenhoek* **72**(1): 21-8.
- Hernandez, B. S., F. K. Higson, R. Kondrat und D. D. Focht** (1991). "Metabolism of and inhibition by chlorobenzoates in *Pseudomonas putida* P111." *Applied and Environmental Microbiology* **57**(11): 3361-6.
- Hess, A., B. Zarda, D. Hahn, A. Haner, D. Stax, P. Hohener und J. Zeyer** (1997). "In situ analysis of denitrifying toluene- and m-xylene-degrading bacteria in a diesel fuel-contaminated laboratory aquifer column." *Applied and Environmental Microbiology* **63**(6): 2136-41.
- Hickey, W. J. und D. D. Focht** (1990). "Degradation of mono-di, and trihalogenated benzoic acids by *Pseudomonas aeruginosa* JB2." *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 3842-50.
- Higuchi, R.** (1992). Simple and rapid preparation of samples for PCR. PCR technology: Principles and applications for DNA amplification. H. A. Erlich. New York, USA, W. H. Freeman and Company: 31-8.
- Hirsch, P. und M. Müller** (1985). "*Blastobacter aggregatus* sp. nov., *Blastobacter capsulatus* sp. nov., and *Blastobacter denitrificans* sp. nov., new budding bacteria from freshwater habitats." *Systematic and Applied Microbiology* **6**: 281-6.
- Hoekstra, E. J., H. De Weerd, E. W. B. De Leer und U. A. T. Brinkman** (1999). "Natural formation of chlorinated phenols, dibenzo-p-dioxins, and dibenzofurans in soil of a Douglas fir forest." *Environmental Science & Technology* **33**(15): 2543-9.
- Hofmann, G.** (1998). Dissertation: Synergistische und antagonistische Effekte beim bakteriellen Abbau von Chlorphenolen in Boden und Flüssigkultur. Biotransformation und Biosensorik. Hamburg, Deutschland, Technische Universität Hamburg-Harburg.
- Hogue, C. W.** (1997). "Cn3D: a new generation of three-dimensional molecular structure viewer." *Trends in Biochemical Sciences* **22**(8): 314-6.
- Holben, W. E., B. M. Schroeter, V. G. M. Calabrese, R. H. Olsen, J. K. Kukor, V. O. Biederbeck, A. E. Smith und J. M. Tiedje** (1992). "Gene probe analysis of soil microbial populations selected by amendment with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid." *Applied and Environmental Microbiology* **58**(12): 3941-8.
- Holt, J. G. und N. R. Krieg** (1994). Enrichment and isolation. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood und N. R. Krieg. Washington, USA, American Society for Microbiology: 179-215.
- Hünemörder, K. F.** (2004). Dissertation: Die Frühgeschichte der globalen Umweltkrise und die Formierung der deutschen Umweltpolitik (1950 - 1973). Stuttgart, Deutschland, Franz Steiner Verlag: 386.

Hussain, N. H., M. Goodson und R. J. Rowbury (1998). "Recent advances in biology: Intercellular communication and quorum sensing in micro-organisms." *Science Progress* **81** (1): 69-80.

Itoh, K., R. Kanda, Y. Sumita, H. Kim, Y. Kamagata, K. Suyama, H. Yamamoto, R. P. Hausinger und J. M. Tiedje (2002). "tfdA-like genes in 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria belonging to the *Bradyrhizobium-Agromonas-Nitrobacter-Afipia* cluster in alpha-Proteobacteria." *Applied and Environmental Microbiology* **68**(7): 3449-54.

Itoh, K., R. Kanda, M. Yoshio, Y. Sumita, Y. Kamagata, K. Suyama und H. Yamamoto (2000). "Presence of 2,4-D-catabolizing bacteria in Japanese arable soil that belong to BANA (*Bradyrhizobium-Agromonas-Nitrobacter-Afipia*) Cluster in alpha-Proteobacteria." *Microbes and Environments* **15**(2): 113-7.

Janke, D. und W. Ihn (1989). "Cometabolic turnover of aniline, phenol and some of their monochlorinated derivatives by the *Rhodococcus* mutant strain AM 144." *Archives of Microbiology* **152**: 347-52.

Jordan, D. C. (1984). Genus II. *Bradyrhizobium* Jordan 1982, 137^{VP}. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. N. R. Krieg und J. G. Holt. Baltimore, USA, Williams & Wilkins. **1**: 242-4.

Junca, H. und D. H. Pieper (2003). "Amplified functional DNA restriction analysis to determine catechol 2,3-dioxygenase gene diversity in soil bacteria." *Journal of Microbiological Methods* **55**(3): 697-70.

Junca, H. und D. H. Pieper (2004). "Functional gene diversity analysis in BTEX contaminated soils by means of PCR-SSCP DNA fingerprinting: comparative diversity assessment against bacterial isolates and PCR-DNA clone libraries." *Environmental Microbiology* **6**(2): 95-110.

Ka, J. O., W. E. Holben und J. M. Tiedje (1994a). "Genetic and phenotypic diversity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-degrading bacteria isolated from 2,4-D-treated field soils." *Applied and Environmental Microbiology* **60**(4): 1106-15.

Ka, J. O., W. E. Holben und J. M. Tiedje (1994b). "Use of gene probes to aid in recovery and identification of functionally dominant 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading populations in soil." *Applied and Environmental Microbiology* **60**(4): 1116-20.

Kamagata, Y., R. Fulthorpe, K. Tamura, H. Takami, L. J. Forney und J. M. Tiedje (1997). "Pristine environments harbor new group of oligotrophic 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria." *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 2266-72.

Kaprelyants, A. S. und D. B. Kell (1996). "Do bacteria need to communicate with each other for growth?" *Trends in Microbiology* **4**(6): 237-42.

Kaprelyants, A. S., G. V. Mukamolova und D. B. Kell (1994). "Estimation of dormant *Micrococcus luteus* cells by penicillin lysis and by resuscitation in cell-free spent culture medium at high dilution." *FEMS Microbiology Letters* **115**(2-3): 347-52.

- Kaschabek, S. R., T. Kasberg, D. Müller, A. E. Mars, D. B. Janssen und W. Reineke** (1998). "Degradation of chloroaromatics: purification and characterization of a novel type of chlorocatechol 2,3-dioxygenase of *Pseudomonas putida* GJ31." *Journal of Bacteriology* **180**(2): 296-302.
- Kimura, T., Y. Zhang, T. Kodama und T. Omori** (1996). "Isolation and characterization of Tn 5-induced mutants deficient in carbazole catabolism." *FEMS Microbiology Letters* **135**: 65-70.
- Klages, U., A. Markus und F. Lingens** (1981). "Degradation of 4-chlorophenylacetic acid by a *Pseudomonas* species." *Journal of Bacteriology* **146**: 64-8.
- Kleinstauber, S., D. Hoffmann, R. H. Müller und W. Babel** (1998). "Detection of chlorocatechol 1,2-dioxygenase genes in proteobacteria by PCR and gene probes." *Acta Biotechnologica* **18**(3): 231-40.
- König, C., D. Eulberg, J. Gröning, S. Lakner, V. Seibert, S. R. Kaschabek und M. Schlömann** (2004). "A linear megaplasmid, p1CP, carrying the genes for chlorocatechol catabolism of *Rhodococcus opacus* 1CP." *Microbiology* **150**: 3075-87.
- Kröckel, L. und D. D. Focht** (1987). "Construction of chlorobenzene-utilizing recombinants by progenitive manifestation of a rare event." *Applied and Environmental Microbiology* **53**(10): 2470-5.
- Kuykendall, L. D., B. Saxena, T. E. Devine und S. E. Udell** (1992). "Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov." *Canadian Journal of Microbiology* **38**: 501-5.
- Kuznetsov, S. I., G. A. Dubinina und N. A. Lapteva** (1979). "Biology of oligotrophic bacteria." *Annual Review of Microbiology* **33**: 377-87.
- La Scola, B., M.-N. Mallet, P. A. D. Grimont und D. Raoult** (2003). "*Bosea eneeae* sp. nov., *Bosea massiliensis* sp. nov. and *Bosea vestrisii* sp. nov., isolated from hospital water supplies, and emendation of the genus *Bosea* (Das et al. 1996)." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 15-20.
- Laemmli, C., J. H. Leveau, A. J. Zehnder und J. R. van der Meer** (2000). "Characterization of a second *tfd* gene cluster for chlorophenol and chlorocatechol metabolism on plasmid pJP4 in *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4)." *Journal of Bacteriology* **182**(15): 4165-72.
- Laemmli, C. M., R. Schönenberger, M. Suter, A. J. B. Zehnder und J. R. van der Meer** (2002). "TfdD(II), one of the two chloromuconate cycloisomerases of *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4), cannot efficiently convert 2-chloro- *cis*, *cis*-muconate to trans-dienelactone to allow growth on 3-chlorobenzoate." *Arch Microbiol.* **178**(1): 13-25.
- Lajoie, C. A., G. J. Zylstra, M. F. DeFlaun und P. F. Strom** (1993). "Development of field application vectors for bioremediation of soils contaminated with polychlorinated biphenyls." *Applied and Environmental Microbiology* **59**(6): 1735-41.
- Lane, D. J.** (1991). 16S/23S sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. E. Stackebrandt und M. Goodfellow. Chichester, UK, John Wiley & Sons: 115-75.

- Leander, M., T. Vallaey und R. Fulthorpe** (1998). "Amplification of putative chlorocatechol dioxygenase gene fragments from alpha- and beta-Proteobacteria." *Canadian Journal of Microbiology* **44**(5): 482-6.
- Leveau, J. H. J. und J. R. van der Meer** (1997). "Genetic characterization of insertion sequence ISJP4 on plasmid pJP4 from *Ralstonia eutropha* JMP134." *Gene* **202**(1-2): 103-14.
- Lilley, A. K., J. C. Fry, M. J. Bailey und M. J. Day** (1996). "Comparison of aerobic heterotrophic taxa isolated from four root domains of mature sugar beet (*Beta vulgaris*)." *FEMS Microbiology Ecology* **21**(3): 231-42.
- Löffler, F. E., Q. Sun, J. Li und J. M. Tiedje** (2000). "16S rRNA gene based detection of tetrachloroethene-dechlorinating *Desulfuromonas* and *Dehalococcoides* species." *Applied and Environmental Microbiology* **66**(4): 1369-74.
- Loidl, M., C. Hinteregger, G. Ditzelmüller, A. Ferschl und F. Streichsbier** (1990). "Degradation of aniline and monochlorinated anilines by soil-born *Pseudomonas acidovorans* strains." *Archives of Microbiology* **155**: 56-61.
- Lovley, D. R.** (2003). "Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation." *Nature Reviews Microbiology* **1**(1): 35-44.
- Ludwig, W. und H.-P. Klenk** (2001). Overview: A phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. D. R. Boone, R. W. Castenholz und G. M. Garrity. New York, USA, Springer-Verlag. **1**: 49-65.
- Ludwig, W., O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, Yadhukumar, A. Buchner, T. Lai, S. Steppi, G. Jobb, W. Förster, I. Brettske, S. Gerber, A. W. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. König, T. Liss, R. Lüßmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reichel, R. Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke¹, T. Ludwig, A. Bode und K.-H. Schleifer** (2004). "ARB: a software environment for sequence data." *Nucleic Acids Research* **32**(4): 1363-71.
- Lynch, J. M.** (2002). "Resilience of the rhizosphere to anthropogenic disturbance." *Biodegradation* **13**(1): 21-7.
- Lyons, C. D., S. E. Katz und R. Bartha** (1985). "Persistence and Mutagenic Potential of Herbicide-Derived Aniline Residues in Pond Water." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **35**(5): 696-703.
- MacArthur, R. H. und E. O. Wilson** (2001). *The theory of island biogeography*. Princeton and Oxford, Princeton University Press.
- Macur, R. E., M. D. Burr, T. R. McDermott und W. P. Inskeep** (2003). Molecular analysis of 2,4-D driven shifts in soil microbial communities. Genebank: AY238503, **2003**: 16S ribosomal DNA.
- Madsen, E. L.** (1996). A critical analysis of methods for determining the composition and biogeochemical activities of soil microbial communities in situ. *Soil Biochemistry*. G. Stotzky und J.-M. Bollag. New York, USA, Marcel Dekker, Inc. **9**: 287-370.
- Malle, K.-G.** (1991). "Was bedeutet Chlor für die chemische Industrie heute und in Zukunft?" *GIT Labor-Fachzeitschrift* **35**: 757-65.

Marchesi, J. R., T. Sato, A. J. Weightman, T. A. Martin, J. C. Fry, S. J. Hiom und W. G. Wade (1998). "Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA." *Applied and Environmental Microbiology* **64**(2): 795-9.

Marchesi, J. R. und A. J. Weightman (2003). "Comparing the dehalogenase gene pool in cultivated alpha-halocarboxylic acid-degrading bacteria with the environmental metagene pool." *Applied and Environmental Microbiology* **69**(8): 4375-82.

Marks, T. S., A. R. W. Smith und A. V. Quirk (1984b). "Degradation of 4-chlorobenzoic acid by *Arthrobacter* sp." *Applied and Environmental Microbiology* **48**: 1020-5.

Mars, A. E., T. Kasberg, S. R. Kaschabek, M. H. van Agteren, D. B. Janssen und W. Reineke (1997). "Microbial degradation of chloroaromatics: use of the *meta*-cleavage pathway for mineralization of chlorobenzene." *Journal of Bacteriology* **179**(14): 4530-7.

Mars, A. E., J. Kingma, S. R. Kaschabek, W. Reineke und D. B. Janssen (1999). "Conversion of 3-chlorocatechol by various catechol 2,3-dioxygenases and sequence analysis of the chlorocatechol dioxygenase region of *Pseudomonas putida* GJ31." *Journal of Bacteriology* **181**(4): 1309-18.

McGowan, C., R. Fulthorpe, A. Wright und J. M. Tiedje (1998). "Evidence for interspecies gene transfer in the evolution of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degraders." *Applied and Environmental Microbiology* **64**(10): 4089-92.

Miller, D. N., J. E. Bryant, E. L. Madsen und W. C. Ghiorse (1999). "Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples." *Applied and Environmental Microbiology* **65**(11): 4715-24.

Miltenburg, R. v., B. Ruger, S. Grünewald-Janho, M. Leons und C. Schröder (1995). *The DIG System User's Guide for Filter Hybridization*. Mannheim, Deutschland, Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica.

Mohr, H. und P. Schopfer (1992). *Pflanzenphysiologie*. Heidelberg, Deutschland, Springer-Verlag.

Moiseeva, O. V., O. V. Belova, I. P. Solyanikova, M. Schlömann und L. A. Golovleva (2001). "Enzymes of a new modified *ortho*-pathway utilizing 2-chlorophenol in *Rhodococcus opacus* 1CP." *Biochemistry Moscow* **66**(5): 548-55.

Moiseeva, O. V., I. P. Solyanikova, S. R. Kaschabek, J. Gröning, M. Thiel, L. A. Golovleva und M. Schlömann (2002). "A new modified *ortho* cleavage pathway of 3-chlorocatechol degradation by *Rhodococcus opacus* 1CP: Genetic and biochemical evidence." *Journal of Bacteriology* **184**(19): 5282-92.

Molina, L., C. Ramos, M. C. Ronchel, S. Molin und J. L. Ramos (1998). "Construction of an efficient biologically contained *Pseudomonas putida* strain and its survival in outdoor assays." *Applied and Environmental Microbiology* **64**(6): 2072-8.

Molouba, F., J. Lorquin, A. Willems, B. Hoste, E. Giraud, B. Dreyfus, M. Gillis, P. de Lajudie und C. Masson-Boivin (1999). "Photosynthetic *Bradyrhizobia* from *Aeschynomene* spp. are specific to stem-nodulated species and form a separate 16S ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism group." *Applied and Environmental Microbiology* **65**(7): 3084-94.

- Moore, D. D.** (2000). Commonly used reagents and equipment: Buffers and stock solutions. Current protocols in molecular biology. F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston et al. USA, John Wiley & Sons. **4**: Appendix 2.
- Mukamolova, G. V., A. S. Kaprelyants, D. I. Young, M. Young und D. B. Kell** (1998). "A bacterial cytokine." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(15): 8916-21.
- Mukamolova, G. V., O. A. Turapov, K. Kazarian, M. Telkov, A. S. Kaprelyants, D. B. Kell und M. Young** (2002). "The *rpf* gene of *Micrococcus luteus* encodes an essential secreted growth factor." Molecular Microbiology **46**(3): 611-21.
- Müller, R., J. Thiele, U. Klages und F. Lingens** (1984). "Incorporation of [¹⁸O]water into 4-hydroxybenzoic acid in the reaction of 4-chlorobenzoate dehalogenase from *Pseudomonas* spec. CBS3." Biochemical and Biophysical Research Communications **124**: 178-82.
- Müller, R. H., S. Jorks, S. Kleinsteuber und W. Babel** (1999). "*Comamonas acidovorans* strain MC1: a new isolate capable of degrading the chiral herbicides dichlorprop and mecoprop and the herbicides 2,4-D and MCPA." Microbiological Research **154**(3): 241-6.
- Nakamura, Y., T. Gojobori und T. Ikemura** (2000). "Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: Status for the year 2000." Nucleic Acids Research **28**(1): 292.
- Nojiri, H., M. Shintani und T. Omori** (2004). "Divergence of mobile genetic elements involved in the distribution of xenobiotic-catabolic capacity." Applied Microbiology and Biotechnology **64**(2): 154-74.
- Ochman, H. und N. A. Moran** (2001). "Genes lost and genes found: Evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis." Science **292**(5519): 1096-8.
- Oda, Y., W. G. Meijer, J. L. Gibson, J. C. Gottschal und L. J. Forney** (2003). "Analysis of diversity among 3-Chlorobenzoate-degrading strains of *Rhodopseudomonas palustris*." Microbial Ecology **47**: 68-79.
- Ogawa, N. und K. Miyashita** (1995). "Recombination of a 3-chlorobenzoate catabolic plasmid from *Alcaligenes eutrophus* NH9 mediated by direct repeat elements." Applied and Environmental Microbiology **61**(11): 3788-95.
- Ohta, H. und T. Hattori** (1983). "*Agromonas oligotrophica* gen. nov., sp. nov., a nitrogen-fixing oligotrophic bacterium." Antonie van Leeuwenhoek **49**: 429-46.
- Pemberton, J. M., B. Corney und R. H. Don** (1979). Evolution and spread of pesticide degrading ability among soil micro-organisms. Plasmids of medical, environmental and commercial importance. K. N. Timmis und A. Puhler. Amsterdam, Holland, Elsevier/ North Holland Biomedical Press: 287-99.
- Pfennig, N. und K. D. Lippert** (1966). "Über das Vitamin B12-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien." Archiv für Mikrobiologie **55**: 245-56.
- Pieper, D. H., V. A. M. dos Santos und P. N. Golyshin** (2004). "Genomic and mechanistic insights into the biodegradation of organic pollutants." Current Opinion in Biotechnology **15**(3): 215-24.
- Pieper, D. H. und W. Reineke** (2000). "Engineering bacteria for bioremediation." Current Opinion in Biotechnology **11**(3): 262-70.

- Potrawfke, T., T.-H. Löhnert, K. N. Timmis und R.-M. Wittich** (1998a). "Mineralization of low-chlorinated biphenyls by *Burkholderia* sp. strain LB400 and by a two-membered consortium upon directed interspecies transfer of chlorocatechol pathway genes." *Applied Microbiology and Biotechnology* **50**: 440-6.
- Potrawfke, T., K. N. Timmis und R. M. Wittich** (1998b). "Degradation of 1,2,3,4-tetrachlorobenzene by *Pseudomonas chlororaphis* RW71." *Applied and Environmental Microbiology* **64**(10): 3798-806.
- Poussier, S., P. Thoquet, D. Trigalet-Demery, S. Barthelet, D. Meyer, M. Arlat und A. Trigalet** (2003). "Host plant-dependent phenotypic reversion of *Ralstonia solanacearum* from non-pathogenic to pathogenic forms via alterations in the *phcA* gene." *Molecular Microbiology* **49**(4): 991-1003.
- Radjendirane, V., M. A. Bhat und C. S. Vaidyanathan** (1991). "Affinity purification and characterization of 2,4-dichlorophenol hydroxylase from *Pseudomonas cepacia*." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **288**(1): 169-76.
- Ramos, J. L., E. Diaz, D. Dowling, V. de Lorenzo, S. Molin, F. O'Gara, C. Ramos und K. N. Timmis** (1994). "The behavior of bacteria designed for biodegradation." *Biotechnology* **12**(13): 1349-56.
- Reineke, W.** (2001). Aerobic and anaerobic biodegradation potentials of microorganisms. The handbook of environmental chemistry. O. Hutzinger. Berlin, Deutschland, Springer-Verlag. **2K**: 1-161.
- Reineke, W. und H.-J. Knackmuss** (1979). "Construction of haloaromatics utilising bacteria." *Nature* **277**(5695): 385-6.
- Reineke, W. und H.-J. Knackmuss** (1988). "Microbial degradation of haloaromatics." *Annual Review of Microbiology* **42**: 263-87.
- Rojo, F., D. H. Pieper, K. H. Engesser, H. J. Knackmuss und K. N. Timmis** (1987). "Assemblage of ortho cleavage route for simultaneous degradation of chloro- and methylaromatics." *Science* **238**(4832): 1395-8.
- Romantschuk, M., I. Sarand, T. Petanen, R. Peltola, M. Jonsson-Vihanne, T. Koivula, K. Yrjala und K. Haahtela** (2000). "Means to improve the effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches." *Environmental Pollution* **107**(2): 179-85.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis** (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*. New York, USA, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sambrook, J. und D. W. Russel** (2001a). *Liquid media for E. coli*. *Molecular cloning, a laboratory manual*. New York, USA, Cold Spring harbor laboratory press. **3**: A2.
- Sambrook, J. und D. W. Russel** (2001b). *Screening bacterial colonies using X-gal and IPTG: alpha-complementation*. *Molecular cloning, a laboratory manual*. New York, USA, Cold Spring harbor laboratory press. **1**: 1.123-1.5.
- Sander, P., R.-M. Wittich, P. Fortnagel, H. Wilkes und W. Francke** (1991). "Degradation of 1,2,4-trichloro- and 1,2,4,5-tetrachlorobenzene by *Pseudomonas* strains." *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 1430-40.
- Sawada, H., L. D. Kuykendall und J. M. Young** (2003). "Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts." *Journal of General and Applied Microbiology* **49**(3): 155-79.

- Schlömann, M.** (1994). "Evolution of chlorocatechol catabolic pathways. Conclusions to be drawn from comparisons of lactone hydrolases." *Biodegradation* **5**(3-4): 301-21.
- Schlömann, M.** (1995). *Habil: Die Evolution des bakteriellen Chloraromaten-Abbaus: Untersuchungen zum Chlorbrenzkatechin-Zweig des 3-Oxo adipat-Weges.* Stuttgart, Deutschland, Universität Stuttgart: 115.
- Schlömann, M.** (2002). "Two chlorocatechol catabolic gene modules on plasmid pJP4." *Journal of Bacteriology* **184**(15): 4049-53.
- Schlömann, M., S. R. Kaschabek und W. Reineke** (1999). *Pathways of bacterial degradation of chloroaromatic compounds - Special aspects of chlorocatechol pathways of Rhodococcus. Behandlung von Abwässern mit halogenorganischen Verbindungen (Treatment of wastewaters with halogenated organic compounds),* Berlin, Deutschland, Technische Universität Berlin.
- Schmidt, E. und H.-J. Knackmuss** (1980). "Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Conversion of chlorinated muconic acids into maleoylacetic acid." *Biochemical Journal* **192**: 339-47.
- Seibert, V., E. M. Kourbatova, L. A. Golovleva und M. Schlömann** (1998). "Characterization of the maleylacetate reductase MacA of *Rhodococcus opacus* 1CP and evidence for the presence of an isofunctional enzyme." *Journal of Bacteriology* **180**(14): 3503-8.
- Seidman, C. E.** (1997). *Introduction of plasmid DNA into cells. Current protocols in molecular biology.* F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston et al. USA, John Wiley & Sons. **1**: 1.8.1-8.3.
- Solyanikova, I. P. und L. Golovleva** (2004). "Bacterial degradation of chlorophenols: pathways, biochemica, and genetic aspects." *Journal of Environmental Science and Health. Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* **39**(3): 333-51.
- Solyanikova, I. P., O. V. Maltseva, M. D. Vollmer, L. A. Golovleva und M. Schlömann** (1995). "Characterization of muconate and chloromuconate cycloisomerase from *Rhodococcus erythropolis* 1CP: indications for functionally convergent evolution among bacterial cycloisomerases." *Journal of Bacteriology* **177**(10): 2821-6.
- Solyanikova, I. P., O. V. Moiseeva, S. Boeren, M. G. Boersma, M. P. Kolomytseva, J. Vervoort, I. M. C. M. Rietjens, L. A. Golovleva und W. J. H. v. Berkel** (2003). "Conversion of 2-Fluoromuconate to cis-Dienelactone by Purified Enzymes of *Rhodococcus opacus* 1cp." *Applied and Environmental Microbiology* **69**(9): 5636-42.
- Spiess, E., C. Sommer und H. Gorisch** (1995). "Degradation of 1,4-dichlorobenzene by *Xanthobacter flavus* 14p1." *Applied and Environmental Microbiology* **61**(11): 3884-8.
- Stajich, J. E., D. Block, K. Boulez, S. E. Brenner, S. A. Chervitz, C. Dagdigian, G. Fuellen, J. G. Gilbert, I. Korf, H. Lapp, H. Lehvaslaiho, C. Matsalla, C. J. Mungall, B. I. Osborne, M. R. Pocock, P. Schattner, M. Senger, L. D. Stein, E. Stupka, M. D. Wilkinson und E. Birney** (2002). "The Bioperl toolkit: Perl modules for the life sciences." *Genome Research* **12**(10): 1611-8.
- Stoecker, M. A., R. P. Herwig und J. T. Staley** (1994). "*Rhodococcus zopfii* sp. nov. a toxicant-degrading bacterium." *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**(1): 106-10.

- Struhl, K.** (1987). Subcloning of DNA Fragments. Current protocols in molecular biology. F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston et al. USA, John Wiley & Sons. **1**: 3.16.1-3..3.
- Suflita, J. M., A. Horowitz, D. R. Shelton und J. M. Tiedje** (1982). "Dehalogenation: A novel pathway for the anaerobic biodegradation of haloaromatic compounds." *Science* **218**(4577): 1115-7.
- Surovtseva, E. G., V. S. Ivoilov und Y. N. Karasevich** (1986). "Metabolism of chlorinated anilines by *Pseudomonas diminuta*." *Mikrobiologiya* **55**: 591-5. *Microbiology* **55**: 459-63.
- Surovtseva, E. G., V. S. Ivoilov, G. K. Vasileva und S. S. Belyaev** (1996). "Degradation of chlorinated anilines by certain representatives of the genera *Aquaspirillum* and *Paracoccus*." *Microbiology* **65**: 553-9.
- Süßmuth, R., J. Eberspächer, R. Haag und W. Springer** (1999). Schnellverfahren zur Gram-Differenzierung. Mikrobiologisch - Biochemisches Praktikum. Stuttgart, Deutschland, Georg Thieme: 58-9.
- Suwa, Y., A. D. Wright, F. Fukimori, K. A. Nummy, R. P. Hausinger, W. E. Holben und L. J. Forney** (1996). "Characterization of a chromosomally encoded 2,4-dichlorophenoxyacetic acid/alpha-ketoglutarate dioxygenase from *Burkholderia* sp. strain RASC." *Applied and Environmental Microbiology* **62**(7): 2464-9.
- Tchan, Y.-T. und P. B. New** (1984). Genus I. *Azotobacter* Beijerinck 1901, 567^{AL}. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. N. R. Krieg und J. G. Holt. Baltimore U.S.A., Williams & Wilkins. **1**: 220-9.
- Tchelet, R., R. Meckenstock, P. Steinle, M. Snozzi und J. R. van der Meer** (1997). Survival and activity of *Pseudomonas* sp. strain P51, which degrades chlorinated benzenes, in a model sewage sludge system and in a Soil column. Genbank: AF015487.1, GI:2384724, **2004**: 16S ribosomal RNA.
- Thiel, M.** (2004). Dissertation: Entwicklung von PCR-Primern zum Nachweis von Genen des Chloraromaten-Abbaus in mikrobiellen Lebensgemeinschaften. IÖZ / Umweltmikrobiologie. Freiberg, TU-Bergakademie Freiberg.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins und T. J. Gibson** (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." *Nucleic Acids Research* **22**(22): 4673-80.
- Top, E. M., P. V. Daele, N. D. Saeyer und L. J. Forney** (1998). "Enhancement of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) degradation in soil by dissemination of catabolic plasmids." *Antonie van Leeuwenhoek* **73**: 87-94.
- Top, E. M., W. E. Holben und L. J. Forney** (1995). "Characterization of diverse 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmids isolated from soil by complementation." *Applied and Environmental Microbiology* **61**(5): 1691-8.
- Tsai, Y.-L. und B. H. Olson** (1992). "Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction." *Applied and Environmental Microbiology* **58**(7): 2292-5.

- Vallaeyts, T., L. Albino, G. Soulas, A. D. Wright und A. J. Weightman** (1998). "Isolation and characterization of a stable 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degrading bacterium, *Variovorax paradoxus*, using chemostat culture." *Biotechnology Letters* **20**(11): 1073-6.
- van Berkum, P. und B. D. Eardly** (2002). "The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*." *Applied and Environmental Microbiology* **68**(3): 1132-6.
- van Berkum, P., Z. Terefework, L. Paulin, S. Suomalainen, K. Lindstrom und B. D. Eardly** (2003). "Discordant phylogenies within the *rrn* loci of Rhizobia." *Journal of Bacteriology* **185**(10): 2988-98.
- van der Meer, J. R., A. C. Frijters, J. H. Leveau, R. I. Eggen, A. J. Zehnder und W. M. de Vos** (1991). "Characterization of the *Pseudomonas* sp. strain P51 gene tcbR, a LysR-type transcriptional activator of the tcbCDEF chlorocatechol oxidative operon, and analysis of the regulatory region." *Journal of Bacteriology* **173**(12): 3700-8.
- van der Meer, J. R. und V. Sentchilo** (2003). "Genomic islands and the evolution of catabolic pathways in bacteria." *Current Opinion in Biotechnology* **14**(3): 248-54.
- van der Meer, J. R., C. Werlen, S. F. Nishino und J. C. Spain** (1998). "Evolution of a pathway for chlorobenzene metabolism leads to natural attenuation in contaminated groundwater." *Applied and Environmental Microbiology* **64**(11): 4185-93.
- Vaneechoutte, M., P. Kampfer, T. De Baere, E. Falsen und G. Verschraegen** (2004). "*Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts et al. 1990) comb. nov." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**(Pt 2): 317-27.
- Verhille, S., N. Baida, F. Dabboussi, D. Izard und H. Leclerc** (1999). "Taxonomic study of bacteria isolated from natural mineral waters: proposal of *Pseudomonas jessenii* sp. nov. and *Pseudomonas mandelii* sp. nov." *Systematic and Applied Microbiology* **22**(1): 45-58.
- Vogt, C., A. Alfreider, H. Lorbeer, D. Hoffmann, L. Wuensche und W. Babel** (2004a). "Bioremediation of chlorobenzene-contaminated ground water in an in situ reactor mediated by hydrogen peroxide." *J Contam Hydrol* **68**(1-2): 121-41.
- Vogt, C., D. Simon, A. Alfreider und W. Babel** (2004b). "Microbial degradation of chlorobenzene under oxygen-limited conditions leads to accumulation of 3-chlorocatechol." *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**(2): 265-70.
- Votyakova, T. V., V. Artzatbanov, G. V. Mukamolova und A. S. Kaprelyants** (1994). "On the relationship between bacterial cell integrity and respiratory chain activity: A fluorescence anisotropy study." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **314**(2): 280-3.
- Voytas, D.** (2000). *Agarose Gel Electrophoresis. Current protocols in molecular biology.* F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston et al. USA, John Wiley & Sons. **1**: 2.5A.1-2.5A.9.
- Waskow, F. und A. Goel** (2000). *Chemikaliengesetz. Umweltlexikon.* Köln, Deutschland, Katalyse, Institut für angewandte Umweltforschung e. V. <http://www.umweltlexikon-online.de>, **2004**.

- Watanabe, K. und P. W. Baker** (2000). "Environmentally relevant microorganisms." *Journal of Bioscience and Bioengineering* **89**(1): 1-11.
- Willems, A. und M. D. Collins** (1992). "Evidence for a close genealogical relationship between *Afipia* (the causal organism of cat scratch disease), *Bradyrhizobium japonicum* and *Blastobacter denitrificans*." *FEMS Microbiology Letters* **96**(2-3): 241-6.
- Willems, A., R. Coopman und M. Gillis** (2001a). "Phylogenetic and DNA-DNA hybridization analyses of *Bradyrhizobium* species." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**(Pt 1): 111-7.
- Willems, A., F. Doignon-Bourcier, J. Goris, R. Coopman, P. de Lajudie, P. De Vos und M. Gillis** (2001b). "DNA-DNA hybridization study of *Bradyrhizobium* strains." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**(Pt 4): 1315-22.
- Wilson, M. S., C. Bakermans und E. L. Madsen** (1999). "In situ, real-time catabolic gene expression: Extraction and characterization of naphtalene dioxygenase mRNA transcripts from groundwater." *Applied and Environmental Microbiology* **65**(1): 80-7.
- Wilson, S. C. und K. C. Jones** (1993). "Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic-hydrocarbons (Pahs) - a review." *Environmental Pollution* **81**(3): 229-49.
- Windsor, J. J.** (2001). "Cat-scratch disease: Epidemiology, aetiology and treatment." *British Journal of Biomedical Science* **58**(2): 101-10.
- Wisniewski-Dye, F. und J. A. Downie** (2002). "Quorum-sensing in *Rhizobium*." *Antonie van Leeuwenhoek* **81**(1-4): 397-407.
- Xu, L. M., C. Ge, Z. Cui, J. Li und H. Fan** (1995). "*Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov. isolated from the root nodules of soybeans." *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**(4): 706-11.
- Yamamoto, S., H. Kasai, D. L. Arnold, R. W. Jackson, A. Vivian und S. Harayama** (2000). "Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: Intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes." *Microbiology* **146** (Pt 10): 2385-94.
- Young, J. M., L. D. Kuykendall, E. Martínez-Romero, A. Kerr und H. Sawada** (2001). "A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 89-103.
- Young, J. P. W. und K. E. Haukka** (1996). "Diversity and phylogeny of *Rhizobia*." *New Phytologist* **133**(1): 87-94.
- Zeyer, J. und P. C. Kearney** (1982). "Microbial degradation of *para*-chloroaniline as sole carbon and nitrogen-source." *Pesticide Biochemistry and Physiology* **17**(3): 215-23.

7 Anhang

7.1	Protein-Sequenzen	165
7.1.1	PCR-Produkte der Chlormuconat-Cycloisomerasen	165
7.1.2	PCR-Produkte der Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen	167
7.2	PCR-Produkte der 16S rDNA	168
7.3	Distanzmatrices	176

7.1 Protein-Sequenzen

Von den 16S rDNA Sequenzen der *Pseudomonas*-ähnlichen Isolate Mxxx wurden repräsentativ einige ausgesucht, der Rest ist sehr ähnlich.

7.1.1 PCR-Produkte der Chlormuconat-Cycloisomerasen

>Bodenisolat AZD5 G10 Klon 1

LLMGRNVFAY	EALLTAMDRA	ASHNQFAKAA	VDVALHDLVG	RLLDIPVAVL	YGGRVRESIP	VLWALAAATF
EADVEDATRQ	LEQRYHRFFK	IKIGKGDPA	EAQRAIKTAE	AIRNISNEAT	FSVDLNQAWD	EPTAAKLLPR
FQDAGFSLIE	QPVSHWNVAA	MSRLAARLDM	PILSDESLWD	FHDVFDAAAR	RSTDVYAVKI	AKGGGIRRAY
KGAAVAEAAG	LPLYGGMALE	SSLGTAAGLQ	LFSALAGLPW			

>Bodenisolat AZD9 B2 Klon 4c

LVMGRNVFAY	EALLTAMDRA	ASHNQFAKAA	VDVALHDLVG	RLLNIPVAVL	YGGRIRESIP	VLWALAAATF
DADVEDARRQ	LEQRYHRFFK	IKIGKGDPA	EAQRAIKTAE	AIRNISNEAT	FSVDLNQAWD	EPTAAMLLPR
FQDAGFSLIE	QPVPHWNVAA	MSRLAARLDM	PILSDESLWD	FHDVFDAAAR	RSTDVYAVKI	AKGGGIRRAY
KGAAVAEAAG	LPLYGGMALE	SSLGTAAGLQ	LFSALAQLPW			

>Bodenisolat AZD9 W2 Klon 6b

LIMGRNVFAY	EALLTAMDRA	ASHNQFAKAA	VDVALHDLVG	RLLNIPVAVL	YGGRIRESIP	VLWALAAATF
DADVEDVRRQ	LEQRYHRFFK	IKIGKGDPA	EAQRAIKTAE	AIRNISNEAT	FSADLNQAWD	EPTAAMLLPR
FQDAGFSLIE	QPVPHWNVAA	MSRLAARLDM	PILSDESLWD	FHDVFDAAAR	rSTDVYAVKI	AKGGGIRRAY
KGAAVAEAAG	LPLYGGMALE	SSLGTAAGLQ	LFSALAQLPW			

>Bodenisolat AZD9 W2 Klon 6c

LLMGRNVFAY	EALLTAMDRA	ASHNQFAKAA	VDVALHDLVG	RLLNIPVAVL	YGGRIRESIP	VLWALAAATF
DADVEDARRQ	LEQRYHRFFK	IKIGKGDPA	EAQRAIKTAE	AIRNISNEAT	FSVDLNQAWD	EPTAAMLLPR
FQDAGFSLIE	QPVPHWNVAA	MSRLAARLDM	PILSDESLWD	FHDVFDAAAR	RSTDVYAVKI	AKGGGIRRAY
KGAAVAEAAG	LPLYGGMALE	SSLGTAAGLQ	LFSALAQLPW			

>Bodenisolat M013 Klon 2a

LLIGKDASNL	SDRRALMDRA	VTGNLSAKAA	IDIALHDLKA	RALNLSIADL	IGGTMRSIP	IAWTLASGDT
ARDIDSALEM	IEARRHNRFK	VKLGARTPAQ	DLEHIRSIVK	AVGDKASVRV	DVNQQWDEQT	ASIWIPRPEE
AGVELVEQPV	PRANFGALRR	LTEQNGVAIL	ADESLSLSS	AFELAPTRAV	DAFSLKLCNM	GGIANTLKVA
AIAEAAGISS	YGGTMLDSTV	GTXXALHVYA	TLPSLI			

```

>Bodenisolat M013 Klon 2b
LLIGKDasNL SDRRALMDRA VTGNLSAKAA IDIALHDLKA RALNLSIAdL IGGTMRKSIP IAWTLASGDT
ARDIDSALEM IEARRHNRfK VKLGARTPAQ DLEHIRSIVK AVGDkASVRV DVNQGWDEQT ASIWIPLREE
AGVELVEQPv PRANFGaLRr LTEQNGVAIL ADESLSSLSS AFELAPTRAV DAFSLKLCNM GGIANTLKVA
AIAEAAGISS YGGTMLDSTV GTXAALHVYA TLPSLl

>Bodenisolat M013 Klon 2c
LLIGKDasNL SDERALMDRA VTGNLSAKAA IDIALHDLKA RALNLSIAdL IGGTMRKSIP IAWTLASGDT
ARDIDSALEM IEARRHNRfK VKLGARTPAQ DLEHIRSIVK AVGDkASVRV DVNQGWDEQT ASIWIPLREE
AGVELVEQPv PRANFGALRR LTEQNGVaIL ADESLSSLSS AFELApTRAV DAFSLKLCNM GGIANTLKVA
AIAEAAGISS YGGTMLDSTV GTXAALHVYA TLPSLl

>Bodenisolat M034 Klon a
LLIGKDATNL RELQHLMERA VTGNYSAKAA IDVALHDLKA RSLNLPLSDl IGGAIQQGIP IAWTLASGDT
QRDIAIAEEM IERRRHNRfK IKLGVRSPAD DLRHIEKIIe RVGDRAAVRV DINQAWDENT ASVWIPLREa
AGVELVEQPv ARSNFDALRR LSADNGVAIL ADESLSSLAS AFELARHHCV DAFSLKLCNM XgVANTLKVA
AIAEASGIAS yGGTMLDSSI GTAAALHVYA TLPTMP

>Bodenisolat M034 Klon c
LLIGKDATNL RELQHLMERA VTGNYSAKAA IDVALHDLKA RSLNLPLSDl IGGAIQQGIP IAWTLASGDT
QRDIAIAEEM IERRRHNRfK IKLGVRSPAD DLRHIEKIIe RVGDRAAVRV DINQAWDENT ASVWIPLREa
AGVELVEQPv ARSNFDALRX LSADNGVAIL ADESLSSLAS AFELARHHCV DAFSLKLCNM AGVANTLKVA
AIAEASGIAS yGGTMLNsSi GTAAALHVYA TLPTMP

>Bodenisolat M038 Klon b
PLIGKDATNL RELQHLMERA VTGNYSAKAA IDVALHDLKA RSLNLPLSDl IGGAIQQGIP IAWTLASGDT
QRDIAIAEEM IERRRHNRfK IKLGVRSPAD DLRHIEKIIe RVGDRAAVRV DINQAWDENT ASVWIPLREa
AGVELVEQPv ARSNFDALRR LSADNGVAIL ADESLSSLAS AFELARHHCV DaFSLKLCNM GGVANTLKVA
AIAEASGIPS YGGTMLDSSS GTAAALHVYA TLPTMP

>Bodenisolat M039 Klon b
LLIGKDaTNI RELQHLMERA VTGNYSAKAA IDVALHDLKA RSLNLPLSDl IGGAIQQGIP IAWTLASGDT
qRDIAIAEEM IERRRHNRfK IKLGVRSPAD DLRHIEKIIe RVGDRAAVRV DINQAWDENT ASVWIPLREa
AgVELVeQPv ARSNFDALRR LSADNGVAIL ADESLSSLAS AFELARHHCV DaFSLKLCNM GGAaNTLKVA
AIAEaSGIAS YGGTMLDSSi GTAAALHvYA tLPTMP

>Bodenisolat M043k Klon a
LLIGKDATNL RELQHLMERA VTGNYSAKAA IDVALHDLKA RSLNLPLSDl IGGAIQQGIP IAWTLASGDT
QRDIAIAEEM IERRRHNRfK IKLGVRSPAD DLRHIEKIIe RVGDRAAVRV DINQaWDENT ASVWIPLREa
AGVELVEQPv ARSNFdALRR LSADNGVAIL ADESLSSLAS AFELARHHCV DAFSLKLCNM GGVANTLKVA
AIAEASGIAS YGGTMLDSSI GTAAALHVYA TLPTMP

>Bodenisolat M053 Klon b
VLIgKDATNL RELQHLMERA VTGNYSAKAA IDVALHDLKA RSLNLPLSDl IGGAIQQGIP IAWTLASGDT
QRDIAIAEEM IERRRHNRfK IKLGVRSPAD DLRHIEKIIe RVGDRAAVRV DINQAWDENT ASVWIPLREa
AGVELVEQPv ARSNFDALRR LSADNGVAIL ADESLSSLAS AFELARHHCV DaFSLKLCNM GGVANTLKVA
AIAEASGIPS YGGTMLDSSN GTAAALHVYA TLPTMP

>Bodenisolat M053 Klon c
LLIGKDaTNI RELQHLMERA VTGNYSAKAA IDVALHDLKA RSLNLPLSDl IGGAIQQGIP IAWTLASGDT
QRDIAIAEEM IERRRHNRfK IKLGVRSPAD DLRHIEKIIe RVGDRAAVRV DINQAWDENT ASVWIPLREa
AGVELVEQPv ARSNFDALRR LSADNGVAIL ADESLSSLAS AFELARHHCV DAFSLKLCNM GGVANTLKVA
AIAEASGIAS YGGTMLDSSI GTAAALHVYA TLPTMP

>Bodenisolat M054 Klon b
LLIGKDGtNL RELQHLMERA VTGNYSAKAA IDVALHDLKA RSLNLPLSDl IGGAIQQGIP IAWTLASGDT
QRDIAIAEEM IERRRHNRfK IKLGvHSPAD DLRHIEKIIe RVGDRAAVRV DINQAWDENT ASVWIPLREa
AGVELVEQPv ARSNFDALRR LSADNGVAIL ADESLSSLAS AFELARHHCV DAFSLKLCNM GGvaNTLKVA
XIAEASGIaS YGGTMLDSSX GTAAALHVYA tLPTMP

>Bodenisolat M058 Klon a
LLIGKDATNL RELQHLMERA VTGNYSAKAA IDVALHDLKA RSLNLPLSDl IGGAIQQGIP IAWTLASGDT
QrDIAIAEEM IERRRHNRfK IKLGVRSPAD DLRHIEKIIe RVGDRAAVRV DINQAWDENT ASVWiprLEa
AGVELVEQPv ARSNFDsLRr lSADNGVAIL ADESLSSLAS AFELARHHCV DAFSLKLCNM GGVANTLKVA
AIAEAPGIAS YGGTMLDSSI GTAAALHVYA TLPTMP

```

>Bodenisolat M058 Klon b
 LLIGKDATNL RELQHLMERA VTGNYSAKAA IDVALHDLKA RSLNLPLSDL IGGAIQQGIP IAWTLASGDT
 QRDIAIAEEM IERRRHNRFK IKLGVRSPAD DLRHIEKIEE RVGDRAAVRV DINQAWDENT ASVWIPRLEA
 AGVELVEQPV ARSNFDALRR LSADNGVAIL ADESLSSLAS AFELARHHCV DAFSLKLCNM GGVANTLKVA
 AIAEAPGIAS YGGTMLDSSI GTAAALHVYA TLPTMp

7.1.2 PCR-Produkte der Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen

>Bodenisolat AZD5_G10 Klon 14
 PDGAYAGIHK GIPAEFYRGR LKTGADGKFE IATTLVPVYT IPDKGPV GAL ITMMGHHTWR PAHVHFKVRK
 DGFRE

>Bodenisolat AZD9_W1 Klon 5a
 VWHSTPDGAY AGIHKGIPAE FYRGRLKTA DGKFEIATTL PVPYTIPdKG PVGALITMMG HHTWRPAHVH
 FKVRK DGFRE

>Bodenisolat M006 Klon 5a
 PdGLYSGIHD NIPVDYYRGK LVTDSQGNFR VRTTMPVPYQ IPYEGPTGRL LGHLGSHTWR PAHVHFKVRK
 DGFEP

>Bodenisolat M006 Klon 5b
 PdGLYSGIHD NIPVDYYRGK LVTDSQGNFR VRTTMPVPYQ IPYEGPTGRL LGHLGSHTWR PAHVHFKVRK
 DGFEP

>Bodenisolat M006 Klon 5c
 PdGLYSGIHD NIPVDYYRGK LVTDSQGNFR VRTTMPVPYQ IPYEGPTGRL LGHLGSHTWR PAHVHFKVRK
 DGFEP

>Bodenisolat M013 Klon 6a
 PDGKYSGFHD QIPTDLYRGK VVADAQGKYA VRTTMPAPYQ IPNKGPTGVL LEMMGSHtWR PAHVHFKVRK
 DGFVP

>Bodenisolat M016 Klon 7b
 PdGLYSGIHD NIPVDYYRGK LVTDSQGNFR VRTTMPVPYQ IPYEGPTGRL LGHLGSHTWR PAHVHFKVRK
 DGFEP

>Bodenisolat M021 Klon 21
 PdGLYSGIHD NIPVDYYRGK LVTDSQGNFR VRTTMPVPYQ IPYEGPTGRL LGHLGSHTWR PAHVHFKVRK
 DGFEP

>Bodenisolat M021 Klon 8a
 PdGLYSGIHD NIPVDYYRGK LVTDSQGNFR VRTTMPVPYQ IPYEGPTGRL LGHLGSHTWR PAHVHFKVRK
 DGFEP

>Bodenisolat M021 Klon 8c
 PdGLYSGIHD NIPVDYYRGK LVTDSQGNFR VRTTMPVPYQ IPYEGPTGRL LGHLGSHTWR PAHVHFKVRK
 DGFEP

>Bodenisolat M034 Klon 2a
 PdGLYsGIHd NIPVDYYrGK LVtDSQGNFR VRTTMPVPYQ IPYEGPTGRL LGHLGSHT*R PAHVHFKVRK
 DGFEP

>Bodenisolat M034 Klon 2b
 PdGLYSGIHD NIPVDYYRGK LVTDSQGNFR VRTTMPVPYQ IPYEGPTGRL LGHLGShtWR PAHVHFKVRK
 DGFEP

>Bodenisolat M034 Klon 2c
 PdGLYSGIHD NIPVDYYRGK LVTDSQGNFR VRTTMPVPYQ IPYEGPTGRL LGXLGSHT*R PAHVHFKVRK
 DGFEP

>Bodenisolat M038 Klon 3b
 PdGLYSGIHD NIPVDYYRGK LVTDSQGNFR VRTTMPVPYQ IPYEGPTGRL LGHLGSHTWR PAHVHFKVRK
 DGFEP

>Bodenisolat M039 Klon 4a
 PdGLYSGIHD NIPVDYYRGK LVTDSQGNFR VRTTMPVPYQ IPYEGPTGRL LGHLGSHTWr PAHVHFKVRK
 DGFEP

```

>Bodenisolat M039 Klon 4b
PDGLYSGIHD NIPVDYYRGK LVTDSQGNFR VRTTMPVPYQ IPYEGPTGRL LGHLGSHTWR PAHVHFKVRK
DGFEP
>Bodenisolat M039 Klon 4d
PDGLYSGIHD NIPVDYYRGK LVTDSQGNFR VRTTMPVPYQ IPYEGPTGRL LGHLGSHTWR PAHVHFKVRK
DGFEP
>Bodenisolat M043k Klon 1a
PDGLYSGIHD NIPVDYYRGK LVTDSQGNFR VRTTMPVPYQ IPYEGPTGRL LGHLGSHTWR PAHVHFKVRK
DGFEP
>Bodenisolat M043k Klon 1b
PDGLYSGIHD NIPVDYYRGK LVTDSQGNFR VRTTMPVPYQ IPYEGPTGRL LGHLGSHTWR PAHVHFKVRK
DGFEP
>Bodenisolat M053 Klon 5a
PDGLYSGIHD NIPVDYYRGK LVTDSQGNFR VRTTMPVPYQ IPYEGPTGRL LGHLGSHTWR PAHVHFKARK
DGFEP
>Bodenisolat M053 Klon 5b
PDGLYSGIHD NIPVDYYRGK LVTDSQGNFR VRTTMPVPYQ IPYEGPTGRL LGHLGSHTWR PAHVHFKVRK
DGFEP
>Bodenisolat M053 Klon 5c
PDGLYSGIHD NIPVDYYRGK LVTDSQGNFR VRTTMPVPYQ IPYEGPTGRL LGHLGSHTWR PAHVHFKVRK
DGFEP

```

7.2 PCR-Produkte der 16S rDNA

```

>Bodenisolat AZD10A EZLN2
CTTGCTCAGA GCGAACGCTG GCGGCAGGCT TAACACATGC AAGTCGAGCG GCGGTAGCAA TACGTCAGCG GCAGACGGGT GAGTAACGCG
TGGAACGTA CCTTTTGGTT CGGAACAACA CAGGAAACT TGTGCTAATA CCGGATAAGC CCTTACGGGG AAAGATTAT CGCCGAAAGA
TCGGCCCGCG TCTGATTAGC TAGTTGGTGA GGTAACGGCT CACCAAGCGC ACGATCAGTA GCTGGTCTGA GAGGATGATC AGCCACATTG
GGACTGAGAC ACGGCCCAAA CTCCTACGGG AGGCAGCAGT GGGGAATATT GGACAATGGG CGCAAGCCTG ATCCAGCCAT GCCCGGTGAG
TGATGAAGGC CCTAGGGTTG TAAAGCTCTT TTGTGCGGGA AGATAATGAC GGTACCGCAA GAATAAGCCC CGGCTAACTT CGTGCCAGCA
GCCGCGGTAA TACGAAGGGG GCTAGCGTTG CTCGGAATCA CTGGGCGTAA AGGTGCGTA GGCGGGTCTT TAAGTCAGGG GTGAAATCCT
GGAGCTCAAC TCCAGAAGCTG CCTTTGATAC TGAGGATCTT GAGTTCGGGA GAGGTGAGTG GAACTGCGAG TGTAGAGGTG AAATTCGTAG
ATATTCGCAA GAACACCAGT GGCGAAGGCG GCTCACTGGC CCGATACTGA CGCTGAGGCA CGAAAGCCTG GGGAGCAAAC AGGATTAGAT
ACCCTGGTAG TCCACGCCGT AAACGATGAA TGCCAGCCGT TGGGGAGTTT ACTCTTCAGT GGCGCAGTTA ACGCTTTAAG CATTCCGCCT
GGGAGTACG GTCGCAAGAT TAAAACCTCAA AGGNATTGAC GGGGGCCGCA CAAGCGGTGG AGCATGTGGT TTAATTCGAC GCAACGCGCA
GAACCTTACC AGCCCTTGAC ATCCCGGTCG CGGTTTCCAG AGATGGATTC CTTCAGTTCG GCTGGACCGG TGACAGGTGC TGCATGGCTG
TCGTCAGCTC GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCACA ACCAGCGCAA CCCCCTCCT TAGTTGCTAC CATTTAGTTG AGCACTCTAA
GGAGACTGCC GGTGATAAGC CGCGAGGAAG GTGGGGATGA CGTCAAGTCC TCATGCCTTA CGGGCTGGGC TACACACGTG CTACAATGGC
GGTGACAATG GGACGCAAAG GCGCAAAGCC TAGCAAATCT CAAAAAGCCG TCTCAGTTCG GATTGGGCTC TGCAACTCGA GCCCATGAAG
TTGGAATCGC TAGTAATCGT GGATCAGCAT GCCACGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT GGGAGTTGGT
TTTACCTGAA GACGGTGCGC TAACC CGCAA GGGAGGCAGC CGGCCACGGT AGGTCAGCGC ACTGGGGTGA A

```

```

>Bodenisolat AZD10A EZLN1
TCCTGGCTCA GAGCGAACGC TGGCGGCAGG CTTAACACAT GCAAGTCGAG CGGGCGTAGC AATACGTCAG CGGCAGACGG GTGAGTAACG
CGTGGGAACG TACCTTTTGG TTCGGAACAA CACAGGGA AAA CTTGTGCTAA TACCGGATAA GCCCTTACGG GGAAAGATTT ATCGCCGAAA
GATCGGCCCG CGTCTGATTA GCTAGTTGGT GAGGTAACGG CTCACCAAGG CGACGATCAG TAGCTGGTCT GAGAGGATGA TCAGCCACAT
TGGGACTGAG ACACGGCCCA AACTCCTACG GGAGGCAGCA GTGGGGAATA TTGGACAATG GGCGCAAAGC TGATCCAGCC ATGCCCGGTG
AGTGATGAAG GCCCTAGGGT TGTAAGGCTC TTTTGTGCGG GAAGATAATG ACGGTACCGC AAGAATAAGC CCCGGCTAAC TTCGTGCCAA
CAGCCCGCGT AATACGAAGG GGGCTAGCGT TGCTCGGAAT CACTGGGCGT AAAGGGTGGC TAGGCGGGTC TTTAAGTCAG GGGTGAAATC
CTGGAGCTCA ACTCCAGAAC TGCCTTTGAT ACTGAGGATC TTGAGTTCGG GAGAGGTGAG TTGAACTGCG AGTGTAGAGG TGAATTCGT
AGATATTCGC AAGAACAACA GTNCGAAGG CGGCTCACTG CCGCGATACT GACGCTGAGG CACGAAAGCG TGGGGAGCAA ACAGGATTAG
ATACCCTGGT AGTCCACGCC GTAAACGATG AATGCCAGCC GTTGGGGAGT TTAAGTCTCA GTGGCGCAGT TAACGCTTTA AGCATTCCGC
CTGGGGAGTA CGGTGCGAAG ATAAAACCTC AAAGGAATTG ACGGGGGCCC GCACAAGCGG TGGAGCATGT GGTTTAATTC GACGCAACGC
GCAGAACCTT ACCAGCCCTT GACATCCCGG TCGCGGTTTC CAGAGATGGA TTCCTTCAGT TCGGCTGGAC CGGTGACAGG TGCTGCATGG
CTGTCGTCAG CTCGTGTCGT GAGATGTTGG GTTAAAGTCCC GCAACGAGCG CAACCCCGCT CCTTAGTTGC TACCATTTAG TTGAGCACTC
TAAGGAGACT GCCCGTGATA AGCCGCGAGG AAGGTGGGGA TGACGTCAAG TCCTCATGCC TTACGGGCTG GGCTACACAC GTGCTACAAT
GGCGGTGACA ATGGGACGCA AAGGCACAAG CCCTAGCAAA TCTCAAAAAG CCGTCTCAGT TCGGATTGGG CTCTGCAACT CGAGCCCATG
AAGTTGGAAT CGTAGTAAT CGTGGATCAG CATGCCACGG TGAATACGTT CCCGGGCCCT GTACACACCG CCCGTCACAC CATGGGAGTT
GGTTTTACCT GAAGACGGTG CGCTAACCCG CAAGGGAGGC AGCCGGCCAC GGTAGGGTCA GCGACTGG

```

>Bodenisolat AZD9 W2

AGAGCGAACG	CTGGCGGCAG	GCTTAACACA	TGCAAGTCGA	GCGGGCGTAG	CAATACGTCA	GCGGCAGACG	GGTGAGTAAC	GCGTGGGAAC
GTACCTTTTT	GTTCCGAACA	ACACAGGGAA	ACTTGTGCTA	ATACCGGATA	AGCCTTACGG	GGAAAGATTT	ATCGCCGAAA	GATCGGCCCG
CGTCTGATTA	GCTAGTTGGT	GAGGTAAACG	CTCACCAAGG	CGACGATCAG	TAGCTGGTCT	GAGAGGATGA	TCAGCCACAT	TGGGACTGAG
ACACGGCCCA	AACTCCTACG	GGAGGCAGCA	GTGGGGAATA	TTGGACAATG	GGCGCAAGCC	TGATCCAGCC	ATGCCCGGTG	AGTGATGAAG
GCCCTAGGGT	TGTAAGAGTC	TTTTGTGCGG	GAAGATAATG	ACGGTACCGC	AAGAATAAGC	CCCGGCTAAC	TTCGTGCCAG	CAGCCCGGTT
AATACGAAGG	GGGCTAGCGT	TGCTCGGAAT	CACTGGGCGT	AAAGGGTGCG	TAGGCGGGTC	TTTAAGTCAG	GGTGAAATC	CTGGAGCTCA
ACTCCAGAAC	TGCCTTTGAT	ACTGAGGATC	TTGAGTTCGG	GAGAGGTGAG	TGGAACCTCG	AGTGTAGAGG	TGAAATTCGT	AGATATTCGC
AAGAACACCA	GTNGCGAAGG	CGGCTCACTG	GCCCCATACT	GACGCTGAGG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT
AGTCCACGCC	GTA AACGATG	AATGCCAGCC	GTTGGGGAGT	TTACTCTTCA	GTGGCGCAGT	TAACGCTTTA	AGCATTCCGC	CTGGGGAGTA
CGGTGCGAAG	ATTA AAACTC	AAAGGAATTG	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GACGCAACGC	GCAGAACCTT
ACCAGCCCTT	GACATCCCGG	TCGCGGTTTT	CAGAGATGGA	TTCCCTTCAGT	TCGGCTGGAC	CGGTGACAGG	TGCTGCATGG	CTGTCTGCAG
CTCGTGTCTG	GAGATGTTGG	GTTAAGTCCC	GCAACGAGCG	CAACCCCGCT	CCTTAGTTGC	TACCATTTAG	TTGAGCACTC	TAAGGAGACT
GCCGGTGATA	AGCCGCGAGG	AAGGTGGGGA	TGACGTCAAG	TCCTCATGCC	TTACGGGCTG	GGCTACACAC	GTGCTACAAT	GCGGGTGACA
ATGGGACGCA	AAGGCGCAAG	CCCTAGCAA	TCTCAAAAAG	CCGTCCTCAGT	TCGGATTGGG	CTCTGCAACT	CGAGCCCATG	AAGTTGGAAT
CGCTAGTAAT	CGTGGATCAG	CATGCCACGG	TGAATACGTT	CCCGGGCCTT	GCCGACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGTT	GGTTTTACCT
GAAGACGGTG	CGCTAACCCG	CAAGGGAGGC	AGCCGGCCAC	GGTAGGGTCA	GCGACAGGGG			

>Bodenisolat AZD9 W1

GAACGCTGGC	GGCAGGCTTA	ACACATGCAA	GTCGAGCGGG	CGTAGCAATA	CGTCAGCGGC	AGACGGGTGA	GTAACGCGTG	GGAACGTACC
TTTTGGTTTC	GAACAACACA	GGGAAACTTG	TGCTAATACC	GGATAAGCCT	TACGGGGAAA	GATTTATCGC	CGAAAGATCG	GCCCCGTCT
GATTAGTAGG	TTGGTGTAGT	AACGGCTCAC	CAAGGCGACG	ATCAGTAGCT	GGTCTGAGAG	GATGATCAGC	CACATGGGGA	CTGAGACACG
GCCCAAACCT	CTACGGGAGG	CAGCAGTGGG	GAATATTGGA	CAATGGGCGC	AAGCCTGATC	CAGCCATGCC	CGGTGAGTGA	TGAAGGCCCT
AGGGTTGTAA	AGCTCTTTTT	TGCGGGAAGA	TAATGACGGT	ACCGCAAGAA	TAAGCCCCGG	CTAACTTCGT	GCCAACAGCC	GCGGTAATAC
GAAGGGGGCT	AGCGTTGCTC	GGATCACTG	GGCCTAAAGG	GTGCGTAGGC	GGGTCTTTAA	GTCAGGGGTG	AAATCTGGA	GCTCAACTCC
AGAACTGCCT	TGATACTGA	GGATCTTGAG	TTCCGGAGAG	GTAGTGGAA	CTGCGAGTGT	AGAGGTGAAA	TTCTGTGATA	TTCCGAAGAA
CACCACTGGC	GAAGGCGGCT	CACTGGCCCG	ATACTGACGC	TGAGGCACGA	AAGCGTGGGG	AGCAAACAGG	ATTAGATACC	CTGGTAGTCC
ACGCCGTAAG	CGATGAATGC	CAGCCGTTGG	GGAGTTTACT	CTTCAGTGGC	GCAGTTAAGC	CTTTAAGCAT	TCCGCCTGGG	GAGTACGGTC
GCAAGATTA	AACTCAAAGG	AATTGACGGG	GGCCGCACAA	GCGGTGGAGC	ATGTGGTTTA	ATTTCGACGA	ACGCCGAGAA	CCTTACCAGC
CCTTGACATC	CCGGTGCAGG	TTTCCAGAGA	TGGATTCCTT	CAGTTCGGCT	GGACCCGGTA	CAGGTGCTGC	ATGGGCTCGC	TCAGCTGTG
TCGTGAGATG	TTGGGTTAAG	NCCCGCAACG	AGCGCAACCC	CCGTCTTAG	TTGCTACCAT	TTAGTTGAGC	ACTCTAAGGA	GACTGCCGGT
GATAAGCCCG	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAGTCCCTA	TGCCTTACGG	GCTGGGGTAC	ACACGTGCTA	CAATGGCGGT	GACAATGGGA
CGCAAAGCCG	CAAGCCATAG	NAAATCTCAA	AAAGCCGTCT	CAGTTCGGAT	TGGGCTCTGC	AACTCGAGCC	CATGAAGTTG	GAATCGCTAG
TAATCGTGG	TCAGCATGCC	ACGGTGAATA	CGTTCCCGGG	CCTTGTACAC	ACCGCCCTGC	ACACCATGGG	AGTTGGTTTT	ACCTGAAGAC
GGTGCCTAA	CCCACAAGGG	AGGCAGCCGG	CCACGGTAGG	GNCAGCGACN	GGGGTGAAG			

>Bodenisolat AZD9 B2

ATCCTGGCTC	AGAGCGAACG	CTGGCGGCAG	GCTTAACACA	TGCAAGTCGA	GCGGGCGTAG	CAATACGTCA	GCGGCAGACG	GGTGAGTAAC
GCGTGGGAAC	TTGCTTTTTG	GTTCCGGAACA	ACACAGGGAA	ACTTGTGCTA	ATACCGGATA	AGACCTTACG	GGGAAAGATT	TATCGCCGAA
AGATCGGCC	GCGTCTGATT	AGCTAGTTGG	TGAGGTAACG	GCTCACCAAG	GCGACGATCA	GTAGCTGGTC	TGAGAGGATG	ATCAGCCACA
TTGGGACTGA	GACACGGCCC	AAACTCCTAC	GGGAGGCAGC	AGTGGGGAAT	ATTGGACAAT	GGGCGCAAGC	CTGATCCAGC	CATGCCCGGT
GAGTGTAGAA	GGCCCTAGGG	TTGTAAAGCT	CTTTTTGCGG	GGAAGATAAT	GACGGTACCG	CAAGAATAAG	CCCCGGCTAA	CTTCGTGCCA
AAACACCGCG	TAATACGAA	GGGGCTAGCG	TTGCTGGGAA	TACTGTCGAA	TAAAGGGTGC	GTAGGCGGGT	CTTTAAGTCA	TTGGGTAAAT
CCTGGAGCTC	AACTCCAGAA	CTGCCCTTGA	TACTGAGGAT	CCTGAGTNCG	GGAGAGGTGA	GTGGAACATG	GAGTGTAGAG	GTGAAATTCG
TAGATATTCC	CAAGAACACC	AGTGGCGAAG	GCGGCTCACT	GGCCCGATAC	TGACGCTGAG	GCACGAAAGC	GTGGGGAGCA	AACAGGATTA
GATACCCTGG	TAGTCCACGC	CGTAAACGAT	GAATGCCAGC	CGTTGGGGAG	TTTACTCTTC	AGTGGCGCAG	TTAACGCTTT	AAGCATTCCG
CCTGGGGAGT	ACGGTCGCAA	GATTA AAAT	CAAAGGAATT	GACGGGGGCG	TTACCAACAG	GTGGAGCATG	GGTGAATTCG	GACGCGAACG
CGCAGAACCT	TACCAGCCCT	TGACATCCCG	GTCGCGGTTT	CCAGAGATGG	ATTCCTTCAG	TTCGGCTGGA	CCGGTGACAG	GTGCTGCATG
GCTGTGCTCA	GCTCGTGTGC	TGAGATGTTG	GGTAAAGTCC	CGCAACGAGC	GCAACCCCGG	TCCTTAGTTG	CTACCATTTA	GTTGAGCACT
CTAAGGAGAC	TGCCGGTGAT	AAGCCGCGAG	GAAGGTGGGG	ATGACGTCAA	GTCCTCATGC	CTTACGGGCT	GGGCTACACA	CGTGCTACAA
TGGCGGTGAC	AATGGGACGC	AAAGGCGCAA	GCCCTAGCAA	ATCTCAAAA	GCCGTCTCAG	TTCGGATTGG	GCTCTGCAAC	TGAGGCCCAT
GAAGTTGGAA	TCGCTAGTAA	TCGTGGATCA	GCATGCCACG	GTGAATACGT	TCCCGGGCCT	TGTACACACC	GCCCGTCACA	CCATGGGAGT
TGGTTTTACC	TGAAGACGGT	GCCTAACCC	GCANGGGAGG	CAGCCGGCCA	CGGTAGGGTC	AGCGACGTGG	GGTGAAG	

>Bodenisolat AZD11 3

CTGGCGGCAG	GCTTAACACA	TGCAAGTCGA	GCGGGCGTmG	AATACGTGAG	CGGCAGACGG	GTGAGTAACG	CGTGGGAACG	TACCTTTTTGG
TTCCGGAACAA	CACAGGGAAA	CTTGTGCTAA	TACCGGATAA	GCCCTTACGG	GGAAAGATTT	ATCGCCGAAA	GATCGGCCCG	CGTCTGATTA
GCTAGTTGGT	GAGGTAACGG	CTCACCAAGG	CGACGATCAG	TAGCTGGTCT	GAGAGGATGA	TCAGCCACAT	TGGGACTGAG	ACACGGCCCA
AACTCCTACG	GGAGGCAGCA	GTGGGGAATA	TTGGACAATG	GGCGCAAGCC	TGATCCAGCC	ATGCCCGGTG	AGTGATGAAG	GCCTTAGGGT
TGTAAGGCTC	TTTTGTGCGG	GAAGATAATG	ACGGTACCGC	AAGAATAAGC	CCCGGCTAAC	TTCTGTGCCAG	CAGCCCGGTT	AATACGAAGG
GGGCTAGCGT	TGCTCGAAAT	CACTGGGCGT	AAAGGGTGCG	TAGGCGGGTC	TTTAAGTCAG	GGGTGAAATC	CTGGAGTCA	ACTCCAGAAC
TGCCCTTTGAT	ACTGAGGATC	TTGAGTTCGG	GAGAGGTGAG	TGGAAGTGGC	AGTGTAGAGG	TGAAATTCGT	AGATATTCGC	AAGAACACCA
GTGGCGAAGG	CGGCTCACTG	GCCCGATACT	NACGCTGAGG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC
GTAACGATG	AATGCCAGCG	GTTGGGGAGT	TTACTCTTCA	GTGGGCGAGT	TAACGCTTTA	AGCATTCCGC	CTGGGGAGTA	CGGTGCGAAG
ATTA AAACTC	AAAGGAATTG	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GACGCAACGC	GCAGAACCTT	ACCAGCCCTT
GACATCCCGG	TCGCGGTTTT	CAGAGATGGA	TTCTTTCAGT	TCGGCTGGAC	CGGTGACAGG	TGCTGCATGG	CTGTGCNACG	CTCGTGTCTG
GAGATGTTGG	GTTAAGTCCC	GC AACGAGCG	CAACCCCGT	CCTTAGTTGC	TACCATTTAG	TTGAGCACTC	TAAGGAGACT	GCCGGTGATA
AGCCGCGAGG	AAGGTGGGGA	TGACGTCAAG	TCCTCATGGC	CTTACGGGCT	GGGCTACACA	CGTGCTACAA	TGGCGGTGAC	AATGGGACGC
AAAGGCGCAA	GCCCTAGCAA	ATCTCAAAA	GCCGTCTCAG	TTCCGATTGG	GCTCTGCAAC	TCGAGCCCAT	GAAGTTGGAA	TCGCTAGTAA
TCGTGGATCA	GCATGCCACG	GTGAATACGT	TCCCGGGCCT	TGTACACACC	GCCCGTCACA	CCATGGGAGT	TGGTTTTACC	TGAAGACGGT
GCGCTAACCC	GCAAGGGAGG	CAGCCGGCCA	CGGTAAGGGT	CAGCGACTGG	GGT			

>Bodenisolat AZD9 B1

CAGAGCGAAC GCTGGCCGCA GGCTTAACAC ATGCAAGTCG AGCGGGCGTA GCAATACGTC AGCGGCAGAC GGGTGAGTAA CGCGTGGGAA
 CGTACCTTTT GGTTCCGGAAC AACACAGGGA AACTTGTGCT AATACCGGAT AAGCCCTTAC GGGGAAAGAT TTATCGCCGA AAGATCGGCC
 CGCGTCTGAT TAGCTAGTTG GTGAGGTAAC GGCTACCAA GGCACGATC AGTAGCTGGT CTGAGAGGAT GATCAGCCAC ATTGGGACTG
 AGACACGGCC CAAACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA TATTGGACAA TGGGCGCAAG CCTGATCCAG CCATGCCGCG TGAGTGATGA
 AGGCCCTAGG GTTGTAAGC TCTTTTGTGC GGGAAAGATAA TGACGGTACC GCAAGAATAA GCCCCGCTA ACTTCGTGCC AGCAGCCGCG
 GTAATACGAA GGGGGCTAGC GTTGCTCGGA ATCACTGGGC GTAAAGGGTG CGTAGGCCGG TCTTTAAGTC AGGGGTGAAA TCCTGGAGCT
 CAACTCCAGA AACTGCCTTG AACTAGGGA TCTTGAGTTC GGGAGAGGTG AGTNGAACTG CGAGTGTAGA GGTGAAATTC GTAGATATTC
 GCAAGAACAC CAGTGGCGAA GGCGGCTCAC TGGCCCGATA CTGACGCTGA GGCACGAAAG CGTGGGGAGC AAACAGGATT AGATACCTG
 GTAGTCCACG CCGTAAACGA TGAATGCCAG CCGTTGGGGA GTTTACTCTT CAGTGGCGCA GTTAACGCTT TAAGCATTCC GCCTGGGGAG
 TACGGTCCGA AGATTAACAA TCAAAGGAAT TGACGGGGGC CCGCACAAGC GGTGGAGCAT GTGGTTTAA TCGACGCAAC GCGCAGAAC
 TTACCAGCCC TTAGACATCCC GGTCGCGGTT TCCAGAGATG GATTCTTTCA GTTCGGCTGG ACCGGTGACA GGTGCTGCAT GGCTGTCTC
 AGCTCGTGTC GTGAGATGTT GGGTTAAGNC CCGCAACGAG CGCAACCCCTC GTCCTTAGTT GCTACCATT AGTTGAGCAC TCTAAGGAGA
 CTGCCGGTGA TAAGCCGCGA GGAAGGTGGG GATGACGTCA AGTCTCATG GCCTTACGGG CTGGGCTACA CACGTGCTAC AATGGCGGTG
 ACAATGGGAC GCAAAGGCGC AAGCCCTAGC AAATCTCAA AATCCGCTC AGTTCGGATT GGGCTCTGCA ACTCGAGCCC ATGAAGTTGG
 AATCGTAGT AATCGTGGAT CAGCATGCCA CGGTGAAATC GTTCCCGGGC CTTGTACACA CACCATGGGA GTTGGTTTTA
 CCTGAAGACG GTGCGCTAAC CCGCAAGGGA GGCAGCCGGC CACGGTAGGG TCAGCGACNG GGGTGAAG

>Bodenisolat AZD8 5

GGCGGCAGGC TTAACACATG CAAGTCGAGC GGGCGTAGAD TACGTACGCG GCAGACGGGT GAGTAACGCG TGGGAACGTA CCTTTTGGTT
 CGGAACAACA CAGGGAACCT TGTGCTAATA CCGGATAAGC CTTACGGGG AAAGATTTAT CGCCGAAAGA TCGGCCGCG TCTGATTAGC
 TAGTTGGTGA GGTAAACGGCT CACCAAGCGC ACGATCAGTA GCTGGTCTGA GAGGATGATC AGCCACATTG GGACTGAGAC ACGGCCAAA
 CTCCTACGGG AGGCAGCAGT GGGGAATATT GGACAATGGG CGCAAGCCTG ATCCAGCCAT GCCCGGTGAG TNATGAAGGC CCTAGGGTTG
 TAAAGCTCTT TTTGTCCGGA AGATAATGAC GGTACCGCAA GAATAAGCCC CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCCGGTA TACGAAGGGG
 GCTAGCCTTG CTCGGAATCA CTGGGCGTAA AGGGTGCCTA GGGCGGCTT TAAGTCAGG GTGAAATCTT GGAGCTCAAC TCCAGAATG
 CCTTTGATAC TGAGGATCTT GAGTTCCGGA GAGGTGAGTG GAACTGCGAG TGTAGAGGTG AAATTCGTAG ATATTGCAA GAACACACAGT
 GGCGAAGGCG GCTCACTGGC CCGATACTGA CGCTGAGGCA CGAAAGCGTG GGGAGCAAAC AGGATTAGAT ACCCTGGTAG TCCACGCCGT
 AAACGATGAA TGCCAGCCGT TGGGGAGTTT ACTTCTCAGT GGGCAGTTA ACGCTTTAAG CATTCCGCTT GGGGAGTACG GTCGCAAGAT
 TAAAACCTAA AGGAATTGAC GGGGGCCGCA CAAGCGGTGG AGCATGTGGT TTAATTCGAC GCAACGCGCA GAACCTTACC AGCCCTTGAC
 ATCCCGGTCG CGGTTCCAG AGATTGATTCT CTTCACTGCG GCTGGAGGTC TGACAGGTCG TGCATGGCTG TGCTCAGCT GATCGGTGAG
 ATGTTGGGTT AAGTCCCGCA NTCGAGCGCA ACCCCCGTCC TTAGTTGCTA CCATTTAGTT GAGCACTCTA AGGAGACTGC CGGTGATAAG
 CCGCGAGGAA GGTGGGGATG ACGTCAAGTC CTCATGGCCT TACGGGCTGG GCTACACACG TGCTACAATG GCGGTGACAA TGGGACGCAA
 AGGCGAAGC CTTAGCAAAAT CTCAAAAAGC CGTCTCAGTT CAGGATTGGGC TCTGCAACTC TAGCCCATGA AGTTGGAATC GCTAGTAATC
 GTGGATCAGC ATGCGACGGT GAATACGTTT CCGGGCCTTG TACACACCGC CCGTACACCC ATGGGAGTTG GTTTTACCTG AAGACGGTGC
 GCTAACCCGC AAGGGAGGCA GCCGGCCACG GTAGGGTACG CGACTG

>Bodenisolat AZD5 G10

GTTTGATCCT TGCTCAGAGC GAACGCTGGC GGCAGGCTTA ACACATGCAA GTCGAGCGGG CGTAGCAATA CGTCAGCGGC AGACGGGTGA
 GTAACCGGTG GGAACGTACC TTTTGGTTCC GAACAACACA GGGAAACTTG TGCTAATACC GGATAAGCCC TTACGGGGAA AGATTATTCG
 CGAAAGATC GGCCCGCTC TGATTAGCTA GTTGGTGAGG TAACGGCTCA CCAAGGCGAC GATCAGTAGC TGGTCTGAGA GGATGATCAG
 CCACATTGGG ACTGAGACAC GGCCAAACT CCTACGGGAG GCAGCAGTGG GGAATATTGG ACAATGGGCG CAAGCCTGAT CCAGCCATGC
 CGCGTAGTG ATGAAGGCC TAGGTTGTA AAGCTCTTT GTGCGGGAAG ATAATGACGG TACCGCAAAGA ATAAGCCCCG GCTAACTTGG
 TGCCAGCAGC CGCGTAAATA GGAAGGGGGC TAGCTTGTCT CGGAATCACT GGGCGTAAAG GGTGCTGAGG CCGTCTTTA ACTGGGCTG
 GAAATCCTGG AGCTCAACTC CAGAACTGCC TTTGATACTG AGGATCTTGA GTTCCGGAGA GGTGAGTGA ACTGCGAGTG TAGAGGTGAA
 ATTCTGATG ATTCGCAAGA ACACCAAGTGG CGAAGGCGGC TCACTGGCCC GATACTGACG CTGAGGACAG AAAGCGTGGG GAGCAAACAG
 GATTAGATAC CCTGGTAGT CACGCCGTAA ACGATGAATG CCAGCCGTTG GGGAGTTTAC TCTTCACTGG CGCAGTTAAC GCTTTAAGCA
 TTCCGCCTGG GGAGTACGGT CGCAAGATTA AAACCTCAAAG GAATGACGG GAATGACGG AAGCCCGCAC AAGCGGTGGA GCATGTGGTT TAATTCGACG
 CAACGCGCAG AACCTTACCA GCCCTTGACA TCCCGGTCGC GGTTCAGAG GATGGATTCC TTCAGTTCGG CTGGACCCTG GACAGGTGCT
 GCATGGCTGT CGTCAGCTCG TGTCGTGAGA TGTTGGGTTA AGTCCCGCAA CGAGCGCAAC CCCCGTCTT AGTTGCTACC ATTTAGTTGA
 GCACTCTAAG GAGACTGCCG GTGATAAGCC GCGAGGAAG TGGGGATGAC GTCAAGTCTT CATGGCCTTA CCGGCTGGG TACACACGTG
 CTACAATGGC GGTGACAATG GGACGCAAAG GCGCAAGCCC TAGAAAATCT CAAAAGCCG TCTCAGTTCC GATTGGGCTC TGCAACTCGA
 GCCCATGAAG TTGGAATCGC TAGTAATCGT GGATCAGCAT GCCACGGTGA ATACGTTCC GGGCCTTGTA CACACCCGCC CGTCACACCA
 TGGGAGTTGG TTTTACCTGA AGACGGTGGC CTAACCCGCA AGGGAGGCG CCGGCCACGG TAGGGT

>Bodenisolat M006

AGCTTGCTCT CTGATTCAGC GGGCGACGGG TGAGTAATGC CTAGGAATCT GCCTGGTAGT GGGGGACAAC GTCTCGAAAG GGACGCTAAT
 ACCGCATACG TCCTACGGGA GAAAGCAGGG GACCTTCGGG CCTTGCCTA TCAGATGAGC CTAGGTCGGA TTAGCTAGTT GGTGAGGTAA
 TGGCTACCA AGGCGACGAT CCGTAACTGG TCTGAGAGGA TGATCAGTCA CACTGGAAC GAGACACGGT CCAGACTCCT ACGGGAGGCA
 GCAGTGGGGA ATATTGACA ATGGGCGAAA GCNTGATCCA GCCATGCCG GTGTGTGAAG AAGGTCTTCG GATTGTAAG CACTTTAAGT
 TGGGAGGAA GGCAGTAAAT TAATACTTTG CTGTTTTGAC GTTACCGACA GAATAAGCAC CGGCTAACTC TGTGCCAGCA CCGCGGTA
 TACAGAGGGT GCAAGCTTAA ATCGGAATTA CTGGGCGTAA AGCGCGCTGA AGCGGTTTGT TAAGTTGGAT GTGAAATCCC GGGCTCAAC
 CTGGGAACCTG CATTCAAAC TGACAAGCTA GAGTATGGTA GAGGGTGGTG GAATTTCTCTG TGTAGCGGTG AAATGCGTAG ATATAGGAAG
 GAACACCAAGT GGCGAAGGCG ACCACCTGGA CTGATACTGA CACTGAGGTG CGAAAGGTGG GGGAGCAAAC AGGATTAGAT ACCCTGGTAG
 TCCACGCCGT AAACGATGTC AACTAGCCGT TGGGAGCCTT GAGCTCTTAG TGCGCAGTA ACGCATTTAA GTTGACCCG TGGGAGTAC
 GGNCGAAAG TTAAACTCA AATGAATTNA CGGGGCCCCG CACAAGCGGT GGAGCATGTG GTTTAATTT GGAGCAACGG GGAGAACCTT
 ACCNGGCCCT TNA

>Bodenisolat M013

CACGGGTGCT TGACNNGGT GGCGTGTGGC GAACGGGTGA GTAATATATC GGAACGTGCC CTGTAGTGGG GGATAACTAG TCGAAAGATT
 AGCTAATACC GCATACGACC TGAGGGTGAA AGTGGGGGAC CGCAAGGCCT CACGCTATAG GAGCGGCCGA TATCTGATTA GCTAGTTGGT
 GGGGTAAAGG CCCACCAAGG CGACGATCAG TAGCTGGTCT GAGAGGACGA TCAGCCACAC TGGGACTGAG ACACGGCCCA GACTCCTACG
 GGAGGCAGCA GTGGGAATT TTGGACAATG GGGGCAACCC TGATCCAGCA ATGCCCGGTG TGTNAAGAAG GCCTTCGGGT TGTAAGCAC
 TTTTGTCCGG AAAGAAATCC CCTGGGATAA TACCTCGGGG GGATGACGGT ACCGGAAGAA TAAGGACCGG CTAACTACGT GCCAGCAGCC
 GCGGTAATAC GTAGGTCCG AGCGTTAATC GGAATTAAGT GGCCTAAAGC GTGCGCAGGC GGTTTTGTAA GACAGATGTG AAATCCCCGG
 GCTCAACCTG GGAATTGCAT TTGTACTGTC AAGGCTAGAG TGTGTCAAGAG GGGGGTAGAA TTCCACGTGT AGCAGTGAAA TGCGTAGAGA
 TGTGGAGGAA TACCATGGC GAAGGCAGCC CCCTGGGATA ACACCTGACGC TCATGCACGA AAGCGTGGGG AGCAAACAGG ATTAGATACC
 CTGGTAGTCC ACGCCTAAA CGATGTCAAC TAGTTGTTGG GGATTCATTT CCTTAGTAAC GAAGCTAACG CATGAAGTTG ACCGCTGGG
 GAGTACGGTC GCAAGATTA AACTCAAAGG AATTGACGGG GACCCGACAA CCGGTGGATG ATGTGGATTA ATTCGATGCA ACGCGAAAAA
 CCTTACCTAC CCTTGACATG CCACTAACGA AGCAGAGATG CATTAGGTGC CCGAAAGGGA AAGTGGACAC AGGTGCTGCA TGCTGTCTGT
 CAGCTCGTGT CGTGAGATGT TGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCCT TGCTTTTGTG TGCTACGCAA GAGCACTCTA GAGAGACTGC
 CGGTGACAAA CCGGAGGAAG GTGGGGATGA CGTCAAGTCC TCATGGCCCT TATGGGTAGG GCTTCACACG TCATACAATG GTGCATACAG
 AGGGTTGCCA AGCCGCGAGG TGGAGCTAAT CCCAGAAAAA GCATCGTAGT CCGGATCGTA GTCTGCAACT CGACTACGTG AAGCTGGAAT
 GCTAGTAAT CGCCGATCAG CATGCCGCGG TGAATACGTT CCCGGTCTTT GTACACACCG CCGCTCACAC CATGGGAGTG GCCTTTACCA
 GAAGTAGTTA GCCTAACCGC AAGGAGGGCG ATTACCACGG TAGGGTTCAT GAC

>Bodenisolat M014

TGAAGAGAGC TTGCTCTCTG ATTCAGCGGC GGACGGGTGA GTAATGCCTA GGAATCTGCC TGGTAGTGGG GGACAACGTT TCGAAAGGAA
 CGCTAATACC GCATACGTC TACGGGAGAA AGCAGGGGAC CTCGGGCCT TCGCCTATCA GATGAGCCTA GTGCGGATTA GCTAGTTGGT
 GGGGTAATAG CTTACCAAGG CGACGATCCG TAACCTGGTCT GAGAGGATGA TCAGTCACAC TGGAACTGAG ACACGGTCCA GTATGTTGTT
 TGTTAAGTTG AATGTGAAAT CCCCGGCTCA ACCTGGAAC GCATTCAAAA CTGACAAGCT AGAGTATGGT AGAGGGTGGT GGAATTTCTT
 GTGTAGCGGT GAAATGCGTA GATATAGGAA GGAACACCCG TGGCGAAGGC GACCACCTGG ACTGATACCT ACCTAGAGT GCGAAAGCGT
 GGGGAGCAAA CAGGATAGA TACCCTGGTA GTCCACGCCG TAAACGATGT CAACTAGCCG TTGGGAGCCT TGAGCTTTA TTGGCGCAT
 AACGCATTA GTTGACCGCC TGGGGAGTAC GGCCGCAAGG TTAATACTCA AATGAATTGA CCGGGGCCGC ACAGCGGTG GAGCATGTGG
 TTTAATTCGA AGCAACCGCA AGAACCTTAC CAGGCCTTGA CATCCAATGA ACTTTCCAGA GATGGATTGG TGCTTCGGGA ACATTGAGAC
 AGGTGCTGCA TGGCTGTGCT CAGCTCGTGT CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGTAACGA GCGCAACCCCT TGCTCTTAGT TACCAGACG
 TTATGCTGGC CACTCTAAGG AGACTGCCGG TGACAAAACCG GAGGAAGGTG GGGTAGACGT CAAGTCATCA TGCCCTTAC GGCTGGGTG
 ACACAGGTGC TACAAGGTTC TATTANNAGAG GGTGCGCAAG CCGCGAAGGT GAGCTAATCC CATAAAAACCG ATCGATTTCC GGTACCGAGT
 CTGCAACTCG ACTGCGTGAA GTCGGAATCG CTAGTAATCG CGAATCAGAA TGTGCGGGTG AATACGTTCC CCGGCTTGT ACACACCGCC
 CGTACACCA TGGGAGTGGG TTGACCACGA AGTAGCTAGT CTAACCTCGG GAGGACGGTT ACCACG

>Bodenisolat M019

GAGCTTGCT TCTGATTCAG CGGCGGACGG GTGAGTNATG CCTAGGAATC TGCCTGGTAG TGGGGACAA CGTCTCGAAA GGGACGCTAA
 TACCGCATA GTCCTACGGG AGAAAAGCAGG GGACCTTCGG GCCTTGGCCT ATCAGATGAG CTTAGGTCCG ATTAGCTAGT TGGTGAGGTA
 ATGGCTACC AAGCGGACGA TCCGTAATCG GTCTGAGAGG ATGATCAGTC AACTGGAAC TGAGACACGG TCCAGACTCC TACGGGAGGC
 AGCAGGTGGG GAATATTGGA CAATGGGCGA AAGCNTGATC CAGCCATGCC CGGTGTGTA AGAAGGTCTT CCGATTGTAA AGCACTTTAA
 GTTGGGAGGA AGGCGAGTAA ATTAATACTT TGCTTGTITG ACGTATTACGA CAGAATAAGC ACCGGCTAAC CTTGTGCCAG GACCCGCGGT
 AAATAACAAG AGGGTGAAAG CGTTAATTCG GAATGATTCG GCGTAAAGCG CCGGTAGGTG GTTTGTTAAG TTGGATGTGA AATCCCCGGG
 CTAACCTGG GAACTGCATT CAAAACCTGAC AAGCTAGAGT ATGGTAGAGG GTGGTGGAA TCCCTGTGTA GCGGTGAAAT GCGTAGATAT
 AGGAAGGAA ACCAGTGGCG AAGGCGACCA CCTGGACTGA TACTGACAT GAGGTGCGAA AGCGTGGGGA GCAAACAGGA TTAGATACCC
 TGGTAGTCCA TAAAGCTAAG ATGTCAACT AGCCTTGGG AGCCTTAGG TCTTAGTGGC TCTTAGTGGC CANTAACGC ATTAAGTTGA CCGCCTGGG
 AGTACGGCG CAAGGTTAAA ACTCAAATGA ATTGACGGGG GCCCGACAA GCGGTGGNGC ATGTGGTTTA ATTCGAAGCA ACGCGAAGAN
 CCTNCCAGG CCTTGACATC CAATGAACCT TCCAGAGATG GATTGTTGCT TCGGGAACAT TGAGACAGGT GCTGCAT

>Bodenisolat M025

GCGGACGGGT GAGTAATGCC TAGGAATCTN CCTGGTAGTG GGGGACAACG TTTCGAAAGG AACGCTAATA CCGCATACTG CCTACGGGAG
 AAAGCAGGGG ACCTTCGGGC CTTGCGCTAT CAGATGAGCC TAGGTCCGAT TAGCTAGTTG GTGGGTAAT GGCTCACCAA GCGCAGATC
 CGTAACTGGT CTGAGAGGAT GATCAGTCAC ACTGGAACG AGACACGGTC CAGACTCCTA CCGGAGGCAG CAGTGGGGA TATTGGACAA
 TGGCGGAAAG CTGAATCCAG CCATGCCGCG TGTGTGAAGA AGGTCTTCGG ATTGTAAAGC ACTTTAAGTT GGGAGGAAAG GTTGTAGATT
 AATACTCTG AATTTTTACG TTACCCAGAC AATAAGCACG GGCTAACTCT GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACAGAGGGTG CAAGCGTTAA
 TCGGAATTAC TGGGCGTAAA GCGCGCTAG GTGTTTITG AAGTTGGATG TGAATCCCC GGCTCAACC TTGGAACTGC ATTCAAAAC
 GACAAAGTAG AGTATGGTAG AGGGTGGTGG AATTTCTCTGT GTAGCGGTGA AATGCGTAGA TATAGGAAAG AACACCAGTG GCGAAGGCGA
 CCACCTGGAC TGATACTGAC ACTGAGGTGC GAAANCGTGG GGAGCAACA GGATTAGATA CCTGGTAGT CCACGCCGTA AACGATGTCA
 ACTAGCCGTT GGGAGCCTTG AGCTCTTAGT GGCGCCACTA ACGCATTAAG TTGACCCGCT GGGGAGTACG GCCGCAAGT TAAAACCTAA
 ATGAATTGAC GGGGCGCGCA CAAGCGGTGG AGCATGTGGT TTAATTCGAA GCAACGCGAA GAACCTTACC GAACCTTACC ATCCAATGAA
 CTTCCAGAG ATGGATTGGT GCTTCGGGAA CATTGAGACA GGTGCTGCAT GGCTGTGCTC AGCTCGTGTG GTGAGATGTT GGGTTAAGTC
 CCGTAACGAG CGCAACCCCTT GTCCTTAGTT ACCAGCAANT TATGGTGGGC ACTCTAAGGA GACTGCCGCT GACAAACCGG AGGAAGGTGG
 GGATGACGTC AAGTCATCAT GGCCTTACG GCCTGGGCTA CACACGTGCT ACAAATGGTCG GTACAGAGGG TTGCCAAGCG GCGAGGTGGA
 GCTAATCCCA TAAAACCGAT CTAGTCCGG ATCGCAGTCT GCAACTCGAC TGCCTGAAAGT CCGAATCGCT AGTAATCGCG AATCAGAATG
 TCGCGGTGAA TACGTTCCCG GGCCTGTGAC ACACCGCCG TCACACCATG GGAGTGGGTG CACCAGAAGT AGCTAGTCTA ACTTCGGGAG
 GACGGTTACC ACGTGTGAT TCATGACTGT

>Bodenisolat M038

AGAGCTTGCT CTCTGATTCA GCNCGCGGAC GGTGAGTAAT GCCTANGAAT CTGCCTGGTA GTGGGGGACA ACGTCTCNAA AGGGACGCTA
 ATACCGCATA CGTCTACGG GAGAAAAGCAG GGGACCTTCG GGCCTTGGCG TATCAGATGA GCCTAGGTGCG GATTAGCTAG TTGGTGAGGT
 AATGGCTCAC CAAGGCGACN ATCCGTAAC GGTCTGAGAG GATGATCAGT CACACTGGAA CTGAGACACG GTNCAGANTN NTACGGGAGG
 NAGNAGTGGG GAATATTGGA CAATGGGCGA AAGCCTGATC CAGCCATGCC GCGTGTGTA AGAAGGTCTT CCGATTGTAA AGCACTTTAA
 GTTGGGAGGA AGGGCAGTAA ATTAATACTT TGNNGTTTTG AGGTTAGNAG GAGAATAAGN ACCGGCTAAC TCTGTGCCAG CAGCCGCGGN
 AATACAGAGG GTGCAAGCGT TAATCGAAT TACTGGGCGT AAAGCGCGCG TAGGTGTTTT GTTAAGTTGG GTTAAGTAAATC CCGGGCTCA
 ACCTGGGAAC TGCATTCAA ACTGACAAGC TAGAGTATGG TAGAGGGTGG TGGAAATTTCC TGTGTAGCGG TGAATGCGTA GATATAGGAA
 GGAACACCAG TGGCGAAGGC GACCACCTGG ACTGATACTG ACACCTGAGGT GCGAAAGCGT GGGGGAGCAA ACAGGATTAG ATACCCTGGT
 AGTCCACGCC GTAAACNNTG TCAACTAGCC GTTGGGAGCC TTGAGCTCTT AGTGGCGNAN TAACGCATTT AGTTGACCGC CTGGGGAGTA
 CGGCCGCAAG GTTTACGACT CAAATGAATT GACGGGGGCC CGCACAAAGC GTGGAGCATG TGGTTAATT CGAAGCAACG CGAA

>Bodenisolat M043G

CAGCGGCGGA CGGGTGAGTA ATGCCTAGGA ATCTGCCTGG TAGTGGGGGA CAACGTCTCG AAAGGGACGC TAATACCGCA TACGTCTAC
GGNGAAAGC AGGGGACCTT CGGGCCTTGC GCTATCAGAT GAGCCTAGGT CGGATTAGCT AGTTGGNGAG GTAATGGCTC ACCAAGGCGA
CGATCCGTAA CTGGTCTGAG AGGATGATCA GTCACACTGG AACTGAGACA CCGTCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTG GGGAAATATTG
GACAATGGGC GAAAGCTGAT CCAGCCATGC CGCGTGTGTN AAGAAGGTCT TCGGATTGTA AAGCATTTA AGTTGGGAGG AAGGGCAGTA
AATTAATACT TTGCTGTTTT GACGTTACCG ACAGAATAAG CACCGGCTAA CTCTGTGCCA GCAGCCGCGG TAATACAGAG GGTGCAAGCG
TTAATCGGAA TTAAGGGGCG TAAAGCGCGC GTAGGTGGTT TGTTAAGTTG GATGTNAAAT CCCC GGCTC AACCTGGGAA CTGCATTCAA
AACTGACAAG CTAGAGTATG GTAGAGGGTG GTGGAATTTT CTGTGTAGCG GTGAAAATGCG TAGATATAGG AAGGAACACC AGTGGCGAAG
GCGACCACCT GGACTGATAC TGACACTGAG GTGCGAAAGC GTGGGGGAGC AAACAGGATT AGATACCCTG GTAGTCCACG CCGTAAACGA
TGTCAACTAG CCGTTGGGAG CTTTGAGCTC TTAGTGGCGC CANNAACGCA TTAAGTTGAC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC AAGGTTAAAA
CTCAAATGAA TTGACGGGGG CCGNACAAGC GGTGGAGCAT GTGGTNTAAT TCGAAGCAAC CCGAAGAACC TTACCAGGCC TTGACATCCA
ATGAACCTTC CAGAGATGGA TTGGTGCTTC GGGAAACATTG AGACAGGTGC TGCATGGCTG TCGTCAGCTC GTGTCTGTAG ATGTTGGGTT
AAGTCCCGTA ACGAGCGCAA CCCTTGTCTT TAGTTACCAG CACGNAATGG TGGGCACTCT AAGGAGACTG CCGGTGACAA ACCGGAGGAA
GGTGGGGATG ACGTCAAGTC ATCATGGCCC TTACGGCCTG GGCTACACAC GTGCTACAAT GGTCGGTACA GAGGGTTGCC AAGGCCGCGAG
GTGGAGCTAA TCCCAATAAAA CCGATCGTAG TCCGGATCGC AGTCTGCAAC TCGACTGCGT GAAGTCGGAA TCGCTAGTAA TCGCGAATCA
GAATGTGCGG GTGAATAACGT TCCCGGGCCT TGTACACACC GCCCCTCACA CCATGGGAGT GGGTGACCCA GAAAGTAGCTA GCT

>Bodenisolat M045

ATGAAGAGAG CTTNCTCTCT GAATTCANNN NCGGNCGGGT TGAGTAATGC CTAGGAATCT GCCTNGTATG GGGGACAACG TCTTNAAAGG
GACGNTAATA CCGCATACGT CCTACGGGAG AAAGCAGGGG ACCTTCGGGC CTTGCGNTAT CAGATNAGCC TAGGTCGGAT TAGCTAGTTG
GTGAGGTAAT GGCTCACCAA GTCGACNATC CGTAACTGGT CTGAGAGTAC GATCAGTCC ACTGGAAGTCT AGCACCAGTCT CAGACTCCTA
CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA TATTGGACAA TTGGCGAAGG CTTAGATCCAG CCATGCCGCG TGTGTGAAGA AGGTCTTTCGG ATTTGTAAGC
ANTTTAAGTT GGGAGGAAGG GCAGTAAATT AATACTTTGC TGTTTTGACG TTACCGACAG AATAAGCACC GGCTAACTCT GTGCCAGCAG
CCGCGGTAAT ACAGAGGGTG CAAGCGTTAA TCGGAATTAC TGGGCGTAAA GCGCGCGTAG GTGGTTTTGT AAGTTGGATG TGAATCCCC
GGCTCAACC TGGGAAGTGC ATTNAAAATC GACAAGNTAG AGTATGGTAG AGGGTGGNGG AATTTCTGTG GTAGNNGTGA AATCGGTAGA
TATAGGAAGG AACACCAATG GCGAAGGCGA CCACCTGGAC TGATACTGAN ACTGAGGTGC GAAAGGTGGG GAGCAAAACAG GATTAGATAC
CNTNGTAGTG CACGCTTCCA AGCCTTGACA TCCAATAACT TTCCAGAGCT GGATTGGTCC TTGGGAACAT TGAGAGAGGT GCTGCATGGC
TGTCGTACAG TCGTGTGCGTA GATGTTGGGT TAAGTCCCCT AACGAGCGCA ACCCTTGTCC TTAGTTACCA GCACGTAAATG GTGGGCGAGT
TCAGGAGACT GCCGTGACA AACCCGAGGA AGGTGGGATG ACGTCAATTC CTATGGCCCG TTCCGGACCT TCCGACACAA CGTGTACAA
TGAGTACGGT ACCGGAGGGT TGCCAAAGCC GCGAGGTGGAG CTAATCCCAT AAAACCGAAC GAAAGTCCGGA TCGCAAAACAG CAACTCGACT
GCGTGAAGTC GGAATCGCTA GTAATCGCGA ATCAGAATGT CCGGTGAAT TCGTTCCCGG GCCTTGTACA CACCGCCCGT CACACCATGG
GAGAGGGT

>Bodenisolat M054

CCTGGTAGTG GGGGACAACG TTTCGANAGG AACGCTAATA CCGCATACTG CCTACGGGAG AAAGCAGGGG ACCTTCGGGC CTTGCNCTAT
CAGATGAGCC TAGGTCGGAT TAGCTAGTTG GTGGGGTAAT GGCTCACCAA GCGCAGCATC CGTAACNTGT CTGAGAGGAT GATCAGTCAC
ACTGGAACNT AGACACGGTC CAGACTCCTA CCGGAGGCAG CAGTGGGGAA TATTGGACAA TGGGCGAAGG CTGATCCAGC CATGCCGCGT
GTNTNAAAGAA GGTCTTCGGA TTGTNAAAGCA CTTTAAAGTTG GGAGGAAGGG TTGTAGATTA ATACTCTGCA ATTTTACGT TACCAGACA
ATAAGACCCG GCTTAAGTCTG TGCCAGCAGC CGCGGTAAATA CAGAGGGTGC CAGACGGTGC AAGCNTTAACT CGGAATTACT GGGCCTAAGG CCGNCTAGG
TGGTTTTGTTA AGTTGGATGT GAAATCCCCG GGCTCAACCT GGGAACTGCA TTCAAAACTG ACAAGCTAGA GTATGGTAGA GGGTGGTGGG
ATTTCTCTGT TAGCGGTGAA ATGCGTAGAT ATAGGAAGGA ACACCAAGTG CCGCAGGTTA ACAGAGGCGAC CACCTGGACT GATACGTACA CTGAGGTGCG
AAANCCTGGG GAGCAAAACG GATTAGATAC CCTGGTAGTC CCGCCGTTAA ACAGTGTCAA CTAGCCGTTG GGAGCCTTGA GCTCTTAGTG
GCGCCACTAA GCATTAAGT TGCCAGCCTG GGGAGTACCG CAGCAAGTAA TGAATGACG TGAATGACG GAGGCGCAGC AAGCGGTGGA
GCATGTGGTT TAATTCGAAG CAACCGCAAG AACCTTACCA GGCTTGTACA TCCAATGAAC TTTCCAGAGA TGGATTGGTG CTTCCGGGAAC
ATTGAGACAG GTGCTGCATG GCTGTGCTCA GCTGTGTGCG TGAGATGTTG GGTAAAGTCC CGTAACGAGC GCAACCTTGG TCCTTAGTTA
CCAGCACNTT ATGGTGGGCA CTCTAAGGAG ACTGCCGGTG ACAAACCGGA GGAAGGTGGG GATGACGTCA AGTCATCATG GCCCTTACGG
CCTGGGCTAC ACACGTGCTA CAATGGTCTG TACAGAGGGT TCCCAAGCCG CAGAGGTGGAG CTAATCCCAT AAAACCGAAC GATAGTCCGGA
TCGCACTCTG CAACTCGACT CGCTGAAGTC GGAATCGCTA GTAATCGCGA ATCAGAATGT CCGCGTGAAT ACCTTCCCGG GCCTTGTACA
CACCGCCCGT CACACCATGG GAGTGGGTGC ACCAGAAGTA GCTAGTCTAA CTTCCGGGAG ACAGTTACCA CCGGTGTAT

>Bodenisolat M067

GAGCGGATGA NGAGAGCTTN CTCTCTGATT CAGCGGCGGA CGGGNGAGTA ATGCCTAGGA ATCTGCCTGG TAGTGGGGGA CAACGTTTTG
AAAGGAACGC TAATACCGCA TACGTCTTAC GGGAGAAAGC AGGGGACCTT CCGGCCCTTG GCTATCAGAT GAGCCTAGGT CCGATTAGCT
AGTTGGTGGG GTAATGGCTC ACCAAGGCGA CGATCCGTAA CTGGTCTGAG AGGATGATCA GTCACACTGG AACTGAGACA CCGTCCAGAC
TCCTACGGGA GGCAGCAGTG GGGAAATATTG GACAATGGGC GAAAGCTGAT CCAGCCATGC CGCGTGTGTN AAGAAGGTCT TCGGATTGTA
AAGCACTTTA AGTTGGGAGG AAGGGTTGTA GATTAATACT CTGCAATTTT GACGTTACCG ACAGAATAAG CACCGGCTAA CTCTGTGCCA
GCAGCCGCGG TAATACAGAG GGTGCAAGCG TTAATCGGAA TTACTGGGCG TAAAGCGCGC GTAGGTGGTT TGTTAAGTTG GATGTGAAAT
CCCCGGGCTC AACCTGGGAA CTGCATTCAA AACTGACAAG CTAGAGTATG GTAGAGGGTG GTGGAATTTT CTGTGTAGCG GTGAAATGCG
TAGATATAGG AAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGACCACCT GGACTGATAC TGACACTGAG GTGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA
GATACCTTGG TAGTCCACGC CGTAAACGAT GTCAACTAGC CGTTGGGAGC CTTGAGCTCT TAGTGGCGCA CTAACCGCAT TAAGTTGACC
GCCTGGGGAG TACGGGCCGA AGGTTAAAAC TAAAATGAAT TNACGGGGGC CCGAACAAGC GGTGGAGCAT GTGGTNTAAT TCGAAGCAAC
GCGAAGAACC TTACCAGGCC TTGACATCCA ATGAACCTTC CAGAGATGGA TTGGTGCTTC GGGAACATTG ANACAGGTGC TGCATGGCTG
TCGTCAGCTC GTGTCTGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCCTA ACGAGNGCAA CCCTTGTCTT TAGTTACCAG CACGTTATGG TGGGCACTCT
AAGGAGACTG CCGGTTNACA ACCGGAGGAA GGTGGGGATG ACGTCAAGTC ATCATGGCCC TTACGGCCTG GGCTACACAC GTGCTACAAT
GGTCGGTACA GAGGGTTGCC AAGCCGCGAG GTGGAGCTAA TCCATAAAA CCGATCGTAG TCCGGATAGC AGTCTGCAAC TCGACTCGCT
GAAGTCGGAA TCGCTAGTAA TCGCGAATCA GAATGTGCGG GTGAATACGT TCCCGGGCCT TGTACACACC GCCCCTCACA CCATGGGAGT
GGTTGNCNC TGNNGTAGCT AGTCTTANCT TCGGGAGGAA GGTACCACG GTGTGATTNA TGAAGT

>Bodenisolat M075

GGCGGACGGG TGAGTAATGC CTAGGAATCT GCCTGGTAGT GGGGGACAAC GTTTCGAAAG GAACGCTAAT ACCGCATACG TCCTACGGGA
 GAAAGCAGGG GACCTTCGGG CCTTGCGCTA TCAGATGAGC CTAGGTCGTG ATTAGCTAGT TGGTGGGGTA ATGGCTCACC AAGGCGACGA
 TCCGTAACAGT GATCTGAGAGG ATGATCAGTC ACACCTGGAAC TGAGACACCG TCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG AATATTGGAC
 AATGGGCGAA AGCTGATCCA GCCATGCCGC GTGTGTGAAG AAGGCTCTCG GATTGTAAAG CACTTTAAGT TGGGAGGAAG GGTTGTAGAT
 TAATACTCTG CAATTTTGAC GTTACCGACA GAATAAGCAC CGGCTAACTC TGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACAGAGGGT GCAAGCGTTA
 ATCGGAATTA CTGGGCGTAA AGCGCGCGTA GGTGGTTTTG TAAAGTTGNGA TGTGAAATCC CCGGGCTCAA CCTGGGAACT GCATTCAAAA
 CTGACAAGCT AGAGTATGGT AGAGGGTGGT GGAATTTCTT GTGTAGCGGT GAAATGCCTA GATATAGGAA GGAACACCAG TGGCGAAGGC
 GACCACCTGG ACTGATACTG ACACTGAGGT GCGAAAGCGT GGGGAGCAAA CAGGATTAGA TACCCTGGTA GTCCACGCCG TAAACGATGT
 CAACTAGCCG TTGGGAGCCT TGAGCTCTTA GTGGCGCACT AACGCATTA GTTGACCGCC TGGGGAGTAC GGCCGCAAGG TTAACAACCTA
 AATGAATTTA CGGGGGCCCG CACAAGCGGT GGAGCATGTG GTTTAATTCG AAGCAACCGG AAGAACCTTA CCAGGCCCTT ACATCCAATG
 AACTTTCCAG AGATGGATTG GTGCCCTTCG GAAACATTGAG ACAGGTGCTG CATGGCTGTC GTCACTCGT GTCTGTAGAT GTTGGGTTAA
 GTCCCGTAAC GAGCGCAACC CTTGTCTTTA GTTACCAGCA CGTTATGGTG GGCACCTCAA GGAGACTGCC GGTGACAAAC CGGAGGAAGG
 TGGGGATGAC GTCAAGTCAT CATGGCCCTT ACGGCCCTGG CTACACACGT GCTACAATGG TCGGTACAGA GGGTTGCCAA GCCGCGAGGT
 GGAGCTAATC CCATAAAACC GATCGTAGTC CGGATCGCAN TCTGCAACTC GACTGCGTGA AGTCGGAATC GCTAGTAATC GCGAATCAGA
 ATGTCGCGGT GAATACGTTT CCGGGCCTTG TACACACCGC CCGTACACAC ATGGGAGTGG NTGCACCAGA AGTAGCTAGT CTAACCTCGG
 GAGGAC

>Bodenisolat M080

CGGGTGAGTA ATGCTTAGGA NTCTTCTCTG TAGTGGGGGA CAACGTTTTG AAAGGNACGC TAATACCAGCA TACGTCTTAC GGGAGAANGC
 AGGGGACCTT CCGGCCCTTG NCTATCAGAT GAGCCTAGGT CGGATTAGCT AGTTGGTGGG GTAATGGCTC ACCAAGGCGA CGATCCGTAA
 CTNGTCTGAG AGGATGTACA GTCCACACTGG AACTNAGACA CGGTCACAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTG GGGAAATTG GACAATGGGC
 GAAAGCTGAT CCAGCCATGC CGCGTGTNTN AAGAAGGTCT TCGGATTGTA AAGCACTTTA AGTTGGGAGG AAGGGTTGTA GATTAATACT
 CTGCAATTTT NACGTTACCG ACAGANTAAG CACCGGCTAA CTCTGTGCCA GCAGCCGCGG TAATACAGAG GGTGCAAGCN TTAATCGGAA
 TTACTNGGCG TAAAGCGCGG GTAGTGGTT TGTAAAGTTG GATGTNAAAT CCCCAGGCTC AACCTGGGAA TGCATTCAA AACTGCAAG
 CTAGAGATAG GTAGAGGGTG GTGGAATTTN CTGTGTAGCG NTGAAATGCG TAGATATAGG AAGGAACACC AGTGGCAGAA GCGACCACCT
 GGACTGATAC TGACTGAG GTGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTNG TAGTCCACGC CGTAAACGAT GTCAACTAGC
 CGTTGGGAGC CTTGAGCTCT TAGTGGGCGA CTAACGCATT AAGTTGACCG CCTGGGGAGT ACCGGCCGAA GGTAAACCT CAATGAATT
 GACGGGGGCC GNACAACCGG TGGAGCATGT GGTTTAATTC GAAGCAACGC GAAAGAACCTT ACCAGGCCCTT GACATCCAAT GAATTTTCAA
 NAGATGGATT GGTGCTTCGG GAACATTGAN ACAGGTGCTG CACTGGCTGTC GTACGCTCGT GTCTGTAGAT GTTGGGTTAA GTCCCGTAAAC
 GAGCGCAACC CTTGTCTTTA GTTACCAGCA CNTTATGGTG GGCACCTCAA GGAGACTGCC GGTGACAAAC CGGAGGAAGG TGGGGATGAC
 GTCAAGTCAT CATGGCCCTT ACGGCCTGGG CTACACACGT GCTACAATGG TCGGTACAGA GGGTTGCCAA GCCGCGAGGT GGAGCTAATC
 CCATAAAACC GATCGTAGTC CGGATCGCAG TCTGCAACTC GACTGCGTGA AGTCGGAATC GCTAGTAATC CCGAATCAGA ATGTCGCGGT
 GAATACGTTT CCGGGCCTTG TACACACCGC CCGTACACAC ATGGGAGTGG GTGCAACAGA AGTAGCTAGT CTAACCTCGG GAGGACGGTT
 ACCACGGTGT GATTCTGAC TG

>Bodenisolat M094

CTGCTNNGC CTCTNCTGG TAGTGGGGGA CAACGTTTTG NCGGNACGCT AATTCCGCAT ACCTCTACG GGAGANAGCA GGGGACCTTC
 GGCCATTGCG CTATCAGATG AGCCTAGGTC GGATTAGCTA GTTGGTGGGG TAAAGGCTCA CCAAGGCGAC GNTCCGTAAC TGGTCTGAGA
 GGATGATGAG TCACACTGGA ACTGAGACAC GGTCCAGACT CCTANGGGAG GCAGCAGTGG GGAATATTGG ACAATGGGCG AAAGCCTGAT
 CCAGCCATGC CGCGTGTGTG AAGAAGGTNT TCGGATTGTA AAGCACTTTA AGTTGGGAGG AAGGGCATT AACTAATACG TTAGTGTITT
 GACGTTACCG ACAGAATAAG CACCGGCTAA CTTCGTGCCA GCAGCCGCGG TAATACGAAG GGTGCAAGCG TTAATCGGAA TTAGTGGGCG
 TAAAGCGCGC GTAGGCTGTT GAGCAAGTTG GATGTNAAAT CCCCAGGCTC AACCTGGGAA CTGCATCCA AACTACTGAG CTAGAGTATG
 GTAGAGGGTG GTGGAATTTT CTGTGTAGCG GTGAAATGCG TAGATATAGG AAGGAACACC AGTGGCAGAA GCGACCACCT GGACTGATAC
 TGACTGAG GTGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC CGTAAACGAT GTCAACTAGT TGTGGGTTT
 CTTGAGAATC TAGTAACGAA GCTAACCGCA TAAAGTTGAC CGCTGGGGAG TACGGCCGCA AGGTTAAAC TCAATGAAT TGACGGGGCG
 CGCACCAAGC GTGGAGCATG TGGTTAATT GGAAGCAACG CGAAGCAACT TACCCTGGCT TGACATGCTG AGAATTTTCC AGAGATGGAT
 TGGTGTCTTG GGAACTCAGA CACAGGTGCT GCATGGCTGT CGTCAAGCTG TGTCGTGAGA TGTGGGTTA AGTCCCGTAA CGAGCGCAAC
 CCTGTGCTT AGTTACCAGC AGTGNATGGT GGGCACTCTA AGGAGACTGC CGGTACAAA CCGGAGGAAG GTGGGGATGA CGTCAAGTCA
 TCATGGCCCT TACGGCCAGG GCTACACACG TGCTACAATG GTCGGTACAG AGGTTGGCCA AGCCGCGAGG CCGAGCTAAT CTCACAAAAC
 CGATCGTAGT CCGGATCGCA GTCTGCAACT CGACTGCGTG AAGTGGAACT CGCTAGTAAT GCTGAATCAG AATGTCACGG TGAATCGCTT
 CCCGGCCTT GTACACACCG CCCGTACAC CATGGGAGTG GGTGCTCANN GAAAGTAGCTA GTCTAATCTT TTNGGGGGAC GGTACCACG
 GAGTGATT

>Bodenisolat M107

TGAGTAATGC CTAGGNATCT GCCTGGTAGT GGGGGACAAC GTTTCGAAAG GAACGCTAAT ACCGCATACG TCCTACGGGA GAAAGCAGGG
 GACCTTCGGG CCTTGCGCTA TCAGATGAGC CTAGGTCGGA TTAGCTAGTT GGTGGGGTAA TGGCTACCA AGGCGACGAT CCGTAACCTGG
 TCTGAGAGGA TGATCAGTCA CACTGGAACT GAGACACGGT CCAGACTCCT ACGGGAGGCA GCAGTGGGGA ATATTGGACA ATGGGCGAAA
 GCCTGATCCA GCCATGCCGC GTGTGTNAAG AAGGCTCTCG GATTGTAAAG CACTTTAAGT TGGGAGGAAG GGTGTAGAT TAATACTCTG
 CAATTTTGAC GTTACCGACA GAATAAGCAC CGGCTAACTC TGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACAGAGGGT GCAAGCGTTA ATCGGAATTA
 CTGGGCGTAA AGCGCGCGTA GGTGGTTTTG TAAAGTTGAT GTGAAATCCC CTGGCTCAAC CTGGGAACTG CATTCAAAC TGACAAGCTA
 GAGTATGGTA GAGGGTGGTG GAATTTCTCT GTAGCGGTG AAATGCGTAG ATATAGGAAG GAACACCAGT GGCGAAGGCG ACCACCTGGA
 CTGATACTGA CACTGAGGTG CGAAAGCGTG GGGAGCAAAC AGGGTTAGAT ACCCTGGTAG TCCACGCCGT AAACGATGTC AACTAGCCGT
 TGGGAGCCTT GAGCTCTTAG TGGCGAGTAA ACGCATTAA TTAGCCGCTT GGGGAGTACG GCCNCAAGGT TAAAA

>Bodenisolat M108

GTGAGCGGA TGAAGAGAGC TTGCTCTCTG ATTCAGCGGC GGACGGGTGA GTAATGCCTA GGAATCTGCC TGGTAGTGGG GGACAACGTT
 TCGAAAGGAA CGCTAATACC GCATACGTCC TACGGGAGAA AGCAGGGGAC CTTCGGGCTT TGGCTATCA GATGAGCCTA GGTGGGATTA
 GCTAGTTGGT GGGTAATGG CTACCAAGG CGACGATCCG TAACCTGGTCT GAGAGGATGA TCAGTCACAC TGGAACTGAG ACACGGTCCA
 GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTGGGGAATA TTGGACAATG GGGCAAGGCT GNATCCAGCC ATGCCGCGTG TGTAAAGAA GTCTTCGGAT
 TGTAAGCAC TTTAAGTTGG GAGGAAGGGT TGTAGATTAA TACTCTGCAA TTTTGACGTT ACCGACAGAA TAAGCACCGG CTAACCTGTG
 GCCAGCAGCC GCGGTAATAC AGAGGGTGA ACGTGAATC GGAATTACTG GCGGTAAGC GCGGCTAGGT GGTGTTGTTA GTTGGATGTG
 AAATCCCGG GCTCAACCTG GGAACCTCAT TCAAACTGA CAAGCTAGAG TATGGTAGAG GGTGGTGGAA TTTCTGTGT ACGGGTAAA
 TGCGTAGATA TAGGAAGGAA CACCAGTTG GAAGGCGACC ACCTGGACTG ATACTGACAC TGAGGTGCGA AAGCGTGGGG GAGCAAACAG
 GATTAGATAC CCTGGTAGTC CACGCCGTAA ACGATGTCAA CTAGCCGTTG TTTTGACGTT ACCGACAGAA TAAGCACCGG CTAATTAAGT
 GACCNCCTGG GGAGTACGGC CGCAAGTTA AAACCTAAAT GAATTGACGG GGGCCNCAC AAGCGGTGGA GCATGTNGTT TAATTCGAAG
 CAACGCGGAG AACCTTACCA GGCCTTGACA TNCAATGAAC TTTCCAGAGA TGGATTGGTG CCTTCGGGAA CATTGAGACA GGTGCTGCAT
 NGCTTCTGTC ANTCGGTGTG GTGAGATGTT TGTGTTAA

>Bodenisolat M109

CGAGCGGATG AAGAGAGCTT GCTCTCTGAT TCAGCGGGCGG ACGGGTGAGT AATGCCTAGG AATCTGCCTG GTAGTGGGGG ACAACGTTTC
 GAAAGGAACG CTAATACCGC ATACGTCTCA CGGGAGAAAG CAGGGGACCT TCGGGCCTTG CGCTATCAGA TGAGCCTAGG TCGGATTAGC
 TAGTTGGTGG GGTAAATGGCT CACCAAGGCC ACGATCCGTA ACTGGTCTGA GAGGATGATC AGTCACACTG GAACTGAGAC ACGGTCCAGA
 CTCCTACGGG AGGCAGCAGT GGGGAATATT GGACAATGGG CGAAAGCCTG ATCCAGCCAT GCCCGGTGTG TGAAGAAGGT CTTCGGATTG
 TAAAGCACTT TAAGTTGGGA GGAAGGGTTG TAGATTAATA CTCTGCAATT TTGACGTTAC CGACAGAATA AGCACC GGCT AACTCTGTGC
 CAGCAGCCCG GGTAAATACAG AGGGTGCAAG CGTTAATCGG AATTACTGGG CGTAAAGCGC GCGTAGGTGG TTTNNTAAGT TGGATGTGAA
 ATCCCCGGGC TCAACCTGGG AACTGCATTC AAAACTGACA AGCTAGAGTA TGGTAGGAGG GTGTGGGAATT TCCTGTGTAG CGGTGAATG
 CGTAGATATA GGAAGGAACA CCAGTNGCGA AGGCNACCAC CTGGACTGAT ACTGACACTG AGGTGCGAAA CNNGGNNAG CAAACAGGNT
 TAGATACCTT GGTAGTCCAC GNCGTA AACG ATGTC AACCTN AGCNTTGGGA GCCTTG

>Bodenisolat M110

TAACCTGCC TAACTCTGG GATAAGCCTG GAAACTGGG TCTAATACCG GATAGNGCG TCNACC GCAT GGNGGGTGT GGAAGATTT
 ATCGGTTTTG GATGGACTCG NGGCCTATCA GCTTGTGGT GAGGTAATGG CTCACCAAGG CGACGACGGG TAGCCGGCCT GAGAGGGTGA
 CCNGCCACAC TGGGACTGAG ACACGGCCCA GACTNCTACG GGAGGCAGCA GTGGGGAATA TTGCACAATG GGCGCAACTG GATGCAGCNA
 CGCCGCGTGA GGGATGACGN CCTTCGGGTT GTAAACCTCT TTNAGTAGGG AAGAAGCGAA AGTTACGGTA CCTGCAGAAG AAGCACCNNC
 TAACTACGTG CCAGCAGCCG CGGTAATACG TAGGGTGCGA GCNTTATCCG GAATTATTNG GCGTAAAGAG CTCGTAGGCN GTTTGTACAN
 TCTCTCNTGA AAGTCTGGG NNTAACCCNT GATCTNNGT GGGTAC

>Bodenisolat M111

GGAGGGNGCT ACGGTTGTTC GGGGAATTAC TGGGCGTAAA GCGCACGTAG GCGGCNATTT AAGTCAGAGG TGAAAGCCCG GGGCTCAACC
 CCGNACTCG CTTTGAGACT GGATTGCTAG AATCTTGNAG AGGCGAGTGG AATTCCGAGT GTAGAGGTGA AATTCGTAGA TATTCGGAAG
 AACACCACTG GCGAAGGCNG CTCGCTGNAC AAGTATTGAC GCTNAGGTGC GAAAGCCTGG GGNGCAAACA GNTTGTAGA CCCTGGTAGT
 CCACGCCGTA AACGATGATA ACTNGCTGCT GGGGCACATG GTGTTTCGTT GCGGCNCTAA CGCATTAAAGT TATCCGCTG GGGAGACCGG
 TCGCAAGATT AANACTCAA GGAATTNACG GGNGCCTGCA CAAGCNGTGG NGCATGTGGT TTAATTCGAA GCAACGCGCA GAACCTTACC
 AGCGTTTAC ATCCTCATCG CGNATNTCAG AGATGATTTT CTTCAGTTTC GCTGGATGAG TNACAGGTGC TGCATNGCTG TC

>Bodenisolat M112

CTNANACAG GCCCANAACT CTACGGGAGG CAGCAGTGGG NAATATTGCA CAATGGGCGA AAGCCTGATG CAGCGACGCC GCGTGAGGGA
 TGACGGCTTC GGGTTGTAAA CCTCTTTCAG CAGGGACNAA GCGCAAGTGA CCGTACCTGC AGAAGAAGCA CCGGCTAACT ACGTGCCAGC
 AGCCGCGGTA ATACGTAGGG TGCAAGCGTT GTCCGGAATT ACTGGGCGTA AAGAGTTCGT AGNCGGTTTG TCGCGTCTGT TGTGAAAACC
 AGCAGCTCAA CTGTGGCTT GCAGGCGATA CGGGCAGACT TGAGTACTGC AGGGGAGACT GGAATTCCTG GTGTAGCGGT GAAATGCGCA
 GATATCAGGN GGAACACCGG TGGCGAAGGC GGGTCTCTGG GCAGTAACTG ACGCTGAGGA ACGAANGCGT GGGTAGCGAA CAGGATTAGA
 TACCCTGGTA GTCCACGCCG TAAACGGTGG GCGCTAGGTG TGGTTCCTT CCACGGAATC CGTGCCCGTA CTAACGCATT AAGCGCCCCG
 CCTGGGGAGT ACGGCCGCAA GGCTAAAACCT CAAAGGAATT GACGGGGGCC CGCACAAAGCN GCGGNGCATG TGGATTAATT CGATGCAACG
 CGAAGAACCT TACCTGGGTT TGACATATAC CGGAAAAGCTG CAGAGATGTG GCCCCCCTTG TGGTCCG

>Bodenisolat M114

AGTCGAGCGG TAAGCCCTTT CGGGGTACAG AGCGGNNAA GGGTGAGTAA CACGTGGGTG ATCTGCCCTG CACTTCGGGA TAAGTCTGGG
 AAACCTGGTC TAATACCGGA TATGACTCTA GGTTCATGN NTNGGGGTGG AAAGATTTAT CCGTGACAGGA TGGGCCCGCG GCCTATCAGC
 TTGTTGGTGG GGTAAATGGC TACCAAGGCG ACGACGGGTA GCCGACCTGA GAGGGTGACC GGCCACACTG GACTGAGAC ACGGCCNAGA
 CTCTACGGG AGGCAGCAGT GGGGAATATT GCACAATGGG CGAAAGCCTG ATGCAGCGAC GCCCGGTGAG GGTAGACGGC CTTCGGGTTG
 TAAACCTCTT TCAGCAGGGA CGGAAGCGAA GTGACGGTAC CTGCAGAAGA AGCACCGGCT AACTACGTGC CAGCAGCCGC GGTAATACGT
 AGGGTGCAAG CTTTGTCCGG AATTACTGGG CGTAAAGAGT TCGTAGGGCG TTTGTCCGCT CGTTTTGTGAA AACCAGCAGC TCAACTGCTG
 GCTTGACGGC GATACGGGCA GACTTGAGTA CTGCAGGGGA GACTGGAATT CCTGGTGTAG CCGTNAATG CGCAGATATC AGNNNNNACA
 CCGGTGGCGA AGGCGGGTCT CTGGGCGAGT ACTGACGCTG AGGAACGAAN NCGTGGGTNG CGAACAGNNT NNGATACCTC GGTAGTCCAC
 CCGGTAACAG GTGGGCGCTN GGTGTGGGTT CCTTCGCGG AATCCGTGCC GTTNNTAACG CATTAAAGCGC CCCGCTNCG GGTACCGGCC
 GCAAGGCTAA AACTCAAAGG AATTGACGGG GGCCCGCACA AGCNGCGGNG CATGTGGATT AATTTCGATG AACCGGAAGA ACCTTACCTG
 GGTTTGACAT ATACCGGAAA GCTGCAGAGA TGTGGCCCCC CCTTGTGGTC GGCCTACNAG GTGGTGCA

>Bodenisolat M115

ATTAAGGGG GTAAAGAGTT CGTAGGCGGT TTTGTCGCTC GTTTGTGAAA ACCAGCAGCT TAACTGCTGG CTTTCAGGGC ATACGGGCAG
 ACTTGAGTAC TGCAGGGGAG TTNCTGGTGT AGCGGTGAAA TGCGCAGATA TCAGGAGGAA CACCGGTGGC GAAGGCGGGT CTCTGGGCAG
 TAACTTACGC TGAGGAACGA AAGCGTGGGT AGCGAANCAG GATTAGATAC CCTGGTAGTC CACGCCGTAA ACGGTGGGCC GCTAGGTGTG
 GGTTCTTCC ACGGAATCCG TGCCGTAGCT AACG

>Bodenisolat M116

GATGGGATCA GTGGCGAAGC GGTGAGTAA CAGTGAGCAA CCTGCCCTG ACTCTGGGAT AAGCGCTGGA AACGGCGTCT AATACTGGAT
 ATGTGACGTG ACCGCATGG CTGCGTCTGG AAAGAATTTT GGGTGGGGAT GGGCTCGCGG CCTATCAGCT TGTGGTGTAG GTAATGGCTC
 ACCAAGGCGT CGACGGGTAG CCGGCCTGAG AGGGTGACCG GCCACACTGG GACTGAGACA CGGCCACAGC TCCTACGGGA GGCAGCAGTG
 GGAATATTG CACAATGGG GCAAGCCTGA TGCAGCAACG CCGCGTGAGG GACGACGGCC TTGCGGGTTG GTAAACCTCT TTTAGCAGGG
 AAGAAGCGAA AGTGACGGTA CCTGCAGAAA AAGCGCCGGC TAACTACGTG CCAGCAGCCG CCGGTAATTA CGTAGGGGCG CAANCGTTTA
 TCCGGAATTA TTGGGCTGAA AGACGCTTCG TAGGCGGGTT TTGTCCGCTG CTGCTGGTGA AATTCGGAG GCCTCAACT CCGGCCTGCA
 GTGGGGTACG GGCAGACTAG AGTGCGGTAG GGGAGATTGG AATTCCTGGT GTAGCGGTGG AATGCGCAGA TNTCAGGAAG TTGTGGGNNC
 ATTCCACGGA TTCGTGACGC CANCTAACGC ATTTAAGTTC CCGCNTGGGG AGTACGGCGC AAGGCTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGA
 CCCCNGACAA GCGGNGGAGC ATGCGGATTA ATTCGATGCA ACCCGAAGAA CCTTACCAAG GCTTGACATA TACGAGAACC GGCCAGAAAT
 GGTCAACTCT TTNACACTC GTAAACA

>Bodenisolat M117

GCTAGCGTTG TTCGGAATTA CTGGGCGTAA AGCGCACGTA GCGGCGGATT TAAGTCAGAG GTGAAAGCCC GGGGCTCAAC CCCGGAAGTG
 CCTTTGAGAC TGGATTGCTA GAATCTTGN GAGGCGAGTG GAATTCAGG TGTAGAGGTG AAATTCGTAG ATATTCGGA GAACACCAGT
 GGCGAAGGCG GCTCGCTGNA CAAGTATTGA CGCTNAGGTG CGAAAGCCTG GGGAGCAAAC AGGATTAGAT ACCCTGGTAG TCCACGCCGT
 AAACGATGAT NACTNGCTGC TGGGGCACAT GGTGTTTCGG TGGCGCANTA ACGCATTAAG TTATCCGCTT GGGGAGTACG GTCGCAAGAT
 TAAAACCTCAA AGGAATTNAC GGGGGCTGCA ACAAGCGGTG GNGCATGTGG TTTAATTCGA AGCAACGCGC AGAACCTTAC CAGCGTTTNA
 CATCCTCATC GCGGATNTCA GAGATGATTN CCTTCAGTTC GGCTGGATGA GTGACAGGTG CTGCATGGCT GTCGTACG

>Bodenisolat M120

GCGGTAAGGC TTNGGGGTA CACGAGCGGC GAACGGGTGA GTAACACGTG GGTGATCTGC CCTGCACTTC GGGATAAGCC TGGGAACTG
 GGTCTAATAC CGGATATGAC CTCAGGTTGC ATGATTTGGG GTGGAAAGAT TTATCGGTGC AGGATGGGCC CGCGCCATAT CAGCTTGTG
 GTGGGGTAAT GGCCTACCAA GGCGACGAC GGTAGCCGAC CTGAGAGGGT GACCCGGCCAC ACTGGGACTG AGACACGGCC CAGACTCCTA
 CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA TATTGCACAA TGGGCGAAAG CGTGATGCAG CGACGCCCGC TGAGGGATNA CGGCCCTTCG GTTGTAAACC
 TCTTTCAGCA GGGACGAAGC GCAAGTGACG GTACCTGCAG AAGAAGCACC GGCTAACTAC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACGTAGGGTG
 CAAGCGTTGT CCGGAATTAC TGGGCGTAAA GAGTTCGTAG GCGGTTTGTG GCGTCGTTG TGA AAAACCAG CAGCTCAAT GCTGGCTTG
 AGGCAGTACG GGCAGACTTG AGTACTGCAG GGGAGACTGG AATTCCTGGT GTAGCGGTGA AATGCGCAGA TATCAGGAG AACACCGGTG
 GCGAAGCGCG GTCTCTGGGC AGTAACTGAC GCTGAGGAAC GAAAGCGTGG GTAGCGAACA GGATTAGATA CCCTGGTAGT CCACGCCGTA
 AACGGTGGGC GCTAGGTGTG GGTTCCTTCC ACGGAATCGT GCCGTAATAA CGCATTAAAG GCCCCGCCCTG GGGAGTACGG CCGCAAGGCT
 AAAACTCAA GGAATTGACG GGGGCCCGCA CAAGCGCGCG NGCATGTGGA TTAATTCGAT GCAACCGCAA GACACCTTTC ACCTGGGTTT
 GACATATACC GGAAGACTGN AGAGATGTGG CCCCCCTTGT GGTCGGNATA CAGGTGGTGA TN

>Bodenisolat M121

GGTAAGGCC TTCGGGGTAT GNGCGGATA CGGGTGAGTA ACACGTGGGT GATCTGCCCT GCACTTCGGG ATAAGCCTGG GAAACTGGT
 CTAATACCGG ATATGACCTC AGGTTGATG ANTTGGGGTG GAAAGATTTA TCGGTGCAGG ATGGGCCCGC GGCCATACAG CTTGTTGGTG
 GGGTAATGGC CTACCAAGGC GACGACGGT AGCCGACCT AGAGGGTGAC CGGCCACACT GGGACTGAGA CACGGCCAG ACTCCTACGG
 GAGGCAGCAG TGGGAATAT TGCACAATGG GCGAAAACCT GATGCAGCGA CGCCCGCTGA GGGATGACGG CTTTCGGGTT GTAAACCTCT
 TTCAGCAGGG ACGAAGCGCA AGTGACGGTA CCTGCAGAA AAGCACCGGC TAACTACGTG CCAGCAGCCG CGGTAATACG TAGGGTGCAA
 GCGTTGTCCG GAATTACTGG GCGTAAAGAG TTCGTAGCGC GTTTGTCCGG TCGTTTGTGA AAACCAGCAG CTAACCTGCT GCCTTGCAAG
 CGATACGGGC AGACTTGTAG NCTGCAGGG AGACTGGAAT TCCTGGTGA GCGGTGAAAT GCGCAGATAT CAGGAGGAAC ACCGGTGGCG
 AAGCGGGTCT TCTGGGAGT NACTGACGG GAGGAACGAA AGCTGGGTA GCGAACAGGA GCGAACAGGA TTAGATAACC TGGTAGTCCA CCGCGTAAAC
 GGTGGGGCCT AGGTGTGGGT TCCTTCCACG GAATCCGTGC CGTAGCTAAN GCATTAAGCG CCCCCTGG GGAGTACGGC CGCAAGGCTA
 AAACCTCAA GGAATTGACG GGGCCGACA AGCGGGGNG CATGTGGATT AATTCGATGC AACGCGAAGA ACCTTACCTG GTTTGCATC
 ATACCGGAAA GCTGCAGAGA TGTGGCCCC CTTGTGG

>Bodenisolat M123

GTGAGTAACA CGTGGGTGTA TCTGCCCTGC ACTTCGGGAT AAGNCTGAGG AAACCTGGGT TAATACCGGA TATNACCTCC TATCGCANGG
 TGGGTGNGTG GAAAGATTTA TCGGTGCAGG ATNNGNCCC CGGCTATCAG CTTGTTGGTG GGGTAATGGC CTACCAAGGC GACGACGGGT
 AGCCGACCTG AGAGGGTGAC CGGCCACANT GGGACTGAGA CACGGCCAC ACTNCTACGG GAGGCAGCAG TGGGGAATAT TGCACAATGG
 GCGAAAGCCT GATGCAGCGA GCCCGGTGA GGGATGACGG CCTTCGGGTT GTAAACCTCT TTCAGCAGGG ACGAAGCGCA AGTNACGGTA
 CCTGCAGAA GAGCACCAGG TAACACGTG CCAGCAGCCG CGGTAAACG TAGGGTGCAA GCGTTGTCCG GAATTACTGG GCGTAAAGAG
 TTCGTAGCGC GTTTGTCCGG TCGTTTGTGA AAACCAGCAG CTAACCTGCT GGCTTGCAGG CGATACGGGC AGACTTGAGT ACTGCAGGGG
 AGACTGGAAT TCCTGGTGA GCGGTGAAAT GCGCAGATAT CAGGAGGAAC ACCGGTGGCG AAGGCGGGTC TCTGGGCACT NACTGACGCT
 GAGGAACGAA NCGTGGGTG GCGAACGGA TTAGATACC TTGAGTCCA CCGTAACAGC GTGGGCGCTA GTGGGCGTAA GGTGTGGGTT CTTCCACGG
 AATCCGTGCC GTANTAAGC ATTAAGCGCC CCGCCTGGG AGTACGGCCG CAAGGCTAAA ACTCAAAGGA ATTGACGGGG GCCGACAAG
 CGGCGGNGCA TGTGGATTA TTCGATGCAA CCGAAGAAC CTTACCTGGG TTTGACATAT ACCGAAAGC TGCAGAGATG TGGCCCCCT
 TGTGGTCGGT ATACAGGTGG TG

>Bodenisolat M124

ATACGGAGGA TCCAAGCGTT ATCCGGATT ATTGGGTTTA AAGGGTGCCT AGGCGGCTTA TTAAGTCAGG GGTGAAAGAC GGTGGCTCAA
 CCATCGCAGT GCCCTTGATA CTGATGAGCT TGAATGGACT AGAGGTAGGC GGAATGTGAC AAGTAGCGGT GAAATGCATA GATATGTAC
 AGAACACCGA TTGCGAAGGC AGCTTACTAT GGTTTTATTG ACGCTGAGGC ACGAAAGCGT GGGGATCAAA CAGGATTAGA TACCCTGGTA
 GTCCACGCC TAAACGATGA ATACTCGCTG TTAGCGATAT ACAGTTAGCG GCTAAGCGAA AGCGTTAAGT ATTCCACCTG GGGAGTACGC
 CCGCAAGGGT GAAACTCAA GGAATTGACG GGGGCCCGCA CAAGCGGAGG AGCATGTGGT TTAATTCGAT GATACCGCAG GAACCTTACC
 CGGGCTTGAA AGTTAGTGAC GATACTAGAG ATAGTATTTT GAGCAACTAC ACGAAACTAG GTGTGTCATG GCTGTCTGCA GC

>Bodenisolat M125

GCGGTAAGGC CTTTCGGGGT ACACGNGCGG NGNACGGGTG AGTAACACGT GGGTNNNTCT GCCCTGCACT TCGGGATAAG CCTGGGAAAC
 TGGGTCTAAT ACCGGATATG ACCTCCTAT GCATGGTGGG TGGTGGAAAG ATTTATCGGT GCAGGATGGG CCCGCGGCTA TCAGCTTGT
 GGTGGGGTAA TGGCCTACCA AGGCGACGAC GGGTAGCCGA CCTGAGAGGG TGACNCCCA CAATNGGACT GAGACACGGC CCAGACTCCT
 ACGGGAGGCA GCAGTNGGGA ATATTGCACA ATGGGCGAAA GCCTGATGCA GCGACGCCCG GTGAGGGATG ACGGCCTTCG GGTGTAAAC
 CTCCTTACAG AGGGACGAAG CGCAAGTTAC GTTACCTGCA GAAGAAGCAC CGGCTAACTA CGTGCCAGCA GCCCGGTAAT TACGTAGGGT
 GCAAGCNTT TCCGGAATTA CTGGGCGTAA AGAGTTCGTA GGCGGTTTGT GCGCTNNTT GTGAAAACCA GCAGCTCAAC TGCTGGCTTG
 CAGGCATAC GGGCANACTT GAGTACTGCA GGGGAGACTG GAATTCCTGG TGTAGCGGTG AAATGCGCAG ATATCAGGAG GAACACCNCT
 GGCGAAGCGG GGTCTCTGGG CAGTAACTGA CGCTGAGAAA CNAAGCGTG GNTAGCGAAC AGNNTTAGAT ACCCTGGTAG TCCACGCCNT
 AAACGGTGN CGTAGNTGT GNNTCCCTNC CACGGAATCN TGCCGTANTA ACGCATTAAG CNCCCCGNT GGGGAGTACG GCCGNAAGGC
 TAAAACCTCAA AGGAATTNAC GGGGNCGCCA CAANNCNCG NNCATGTNNA TTAATTCGAT GCAACGCNAA NAACCTTACC TGGNTTAAAC
 ATATACCGNA AAGTGAANA NATGTGGCCC CCCCCTTGTG TCGNTATACA GGTGGTGCAT

>Bodenisolat M126

CGNTGAAGCC CAGCTTGCTG GTTGGTATTA NTGGCGAAC GGTGAGTAAC ACGTNGTAA CCTGCCCTTA ACTCTGGGAT AAGCCTGGGA
 AACTAGGCT AATACCGGAT AGGAGCGTCC ACCGCATGGT GGGTGTGGGA AAGATTTATC GGTTTTGGAT GGACTCGCGG CCTATCAGCT
 TGTTGGTGAG GTAATGGCTC ACCAAGCGCA CGACGGGTAG CCGGCCTNAN AGGGTGACCN GCCACACTGG NACTGAGACA CGGCCANAC
 TCCTACGGGA GGCAGCAGTG GGAATATTG CACAATGGG GAAAGCNTGA TGCACGACG CCGCGTGAAG GATNACGGCC TTCGGGTTGT
 AAACCTCTTT CAGTAGGGAA GAAGCGAAG TNACGGTACC TGCAGAAGAA GCACCGGCTA ACTACGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGTA
 GGGTGCAGC GTTATCCGGA ATTATTGGG GTAAAGAGCT CGTAGGCGGT TTGTGCGCTC TGTNGTAAA GTCCGGGCT TAACCCCGGA
 TCTGCGGTGG GTACGGGAC ACTAGAGTNC AGTAGGGGAG ACTGGAATTC CTGGTGTAGC GGTGGAATNC GCAGATATCA GGAGGAACAC
 CGATGGCGAA GGCAGGTCTC TNGGCTGTAA CTNACGCTGA CTGAGGAAAG CATAGGGGAGC GATAGGGGAGC GAACANGATT AGATACCCTN
 CCGTAAACNT TGGNCACTAN GTNTGGGGAC CATTCCACGG TTTCCGCGCC NCAGNTAAC CATTAAAGTNC CCCGNTGGG GAGTACGGCC
 GCAAGGCTAA AACTCAAAGG AATTGACGGG GGGCCGACA AGCGCGGNG CATGCGGATT AATTCGATGC AACGCGAAGA ACCTTACCAA
 GGCTTGACAT GTTCTGCATC GCCGTAGAGA TACGGTTTCC CTTGGGGGCG GGGTTCACAG GTGGTGCAT

>Bodenisolat M128

```

GCGGTAAGGC TTTCGGGGTA CACGAGCGGC GAACGGGTGA GTAACACGTG GGTGATCTGC CCTGCACTTC GGGATAAGCC TGGGAAACTG
GNTCTAATAC CGGATATGAC CTCAGGTTGC ATGACTTGGG GTGAAAAGAT TTATCGGTGC AGGATGGGCC CGCGGCCTAT CAGCTTGTGG
GTGGGGTAAT GGCCTACCAA GGCGACGACG GGTAGCCGAC CTGAGAGGGT GACCGGCCAC ACTGGGACTG AGACACGGCC CAGACTCCTA
CTGGGAGGCA GCAGTGGGGA ATATTGCACA ATGGGCGAAA GCCTGATGCA GCGACGCCGC GTGAGGGATN ACGGCCTTCG GGTGTGAAAC
CTCTTTCAGC AGGGACGAAAG CGCAAGTGAC GGTACTTGCA GAAGAAGCAC CGCTAACTA CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGTAGGGT
GCAAGCGTTG TCCGGAATTA CTGGGCGTAA AGAGTTCGTA GCGGTTTTGT CCGTCGTTT GTGAAAACCA GCAGCTCAAC TGCTNGCTTG
CAGGCGATAC GGGCANACTT GAGTACTGCA GGGGAGACTG GAATTCCTGG TGTAGCGGTG AAATGCGCAG ATATCAGGAG GAACACCGGT
GGCGAAGCGG GGTCTCTGGG CAGTCACTGA CGCTGAGGAA CGAAAGCGTG GGTAGCGAAC AGGATTAGAT ACCCTGGTAG TCCACGCCGT
AAACGGTGGG CGCTAGGTGT GGGTNCCTTC CACGGAATCC GTGCCGTANT AACGCATTAA GCGCCCCGCC TGGGGAGTAC GGCCGCAAGG
CTAAAACCTA AAGGAATTGA CGGGGGCCCC CACAAGCGGC GNGCATGTG GATTAATTCG ATGCAACGCG AAGAACCTTA CCTGGGTTTG
ACATATACCG GAAAGCTGCA GAGATGTGGC CNCCCTTGT GGTGCGTATA CAGGTGGTGC AT

```

>Bodenisolat M129

```

CGGTGAACAC GGAGCTTGCT CTGTGGGNTC AGTGGCGAAC GGGTGAGTAA CACGTGAGCA ACCTGCCCTT GACTCTGGGA TAAGCGCTGG
AAACGGCGTC TAATACTGGA TATGTGACGT GACCGCATGG TCTGCGTCTG GAAAGAATTT CGGTTGGGGA TGGGCTCGCG GCCTATCAGC
TTGTTGGTGA GGAATGGCT CACCAAGGCG TCGACGGGTA GCCGGCTGA GAGGGTGACC GGCCACACTG GGACTGAGAC ACGGCCANA
CTCCTACGGG AGGCAGCAGT NGGGAATATT GCACAATGGG CGCAAGCTGA ATGCAGCAAC GCCGCGTGAG GGACGACGGC CTTCCGGGTTG
TAAACCTCTT TTAGCAGGGA AGAAGCGAAA GTNACGGTAC CTGCAGAAAA AGCGCCGGCT AACTACGTNC CANCNGCCGC GGTAAATACGT
AGGGCGCAAG GTTATCCGGA ATTATTGGGC GTNAAGAGCT CGTAGGCGGT TTGTCGCGTC TTCTGTGAAA NCCGGAGGCT CAACCTCCGG
CCTGCAGTNG GTACGGGACG ACTAGAGTTC GGTAGGGGGA GATTGGAATT CTTGGTGTAG CGNNGTGAAT GCGCAATATN CAGGAGGAAC
ACCGATGGCG AANGCAGATC TCTGGGCCGT AACTNACGCT GAGGAGCGAA A

```

>Bodenisolat M131

```

TCCGGAATTA TTNGGCGTAA AGAGCTCGTA GGTGTTGGTC ACGTCTGCTG TGAAAACGAA ACGGCTTAAC GTTGCGCGTG CAGTGGGTAC
GGGCTGACTN GAGTGCAGTA GGGGGAGTCT GGAATTCCTG GTGTAGCGGG TGAATGCGC AGATATCAGG AGGAACACCG GTGGCGAAGG
CGGNACTCT GGGCTGTAAC TGACACTGAG GAGCGAAAAG ATGGGGAGCG AACAGGATTN GATACCCTGG TAGTCCATGC CGTAAACGTT
GGGCACTAGG TGTGGGGNAC ATTCCACGTT CTCCGCGCGG TNNTAACGCA TTAAGTGCCC CGCCTGGGGA GTACGGTCCG AAGGCTAAAA
CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGCGGNGCA TGGCGATTAA TTCGATGCAA CGCGAAGAAC CTTACCAAGG CTTACATAC
ACTGGANACG TTCTGGA AACGTTCTTCT CTTTGGAGCT GGTGTACAGG TGGTGCAT

```

>Bodenisolat M134

```

GGACTTAGAC ACGGCCANA CTCTACGGGA NGCAGCAGTA GGGAAATTG GACAATGGGC GAAAGCCTGA TCCAGCAATG CCGCGTGAGT
GATGAAGGCC TTAGGGTTGT AAAGCTNTTT TACCCGAGAT GATAATNACA GTATCGGGAG AATAAGCTCC GGCTAACTCC GTGCCAGCAG
CCGCGGTAAT ACGGAGGGNG CTAGCGTTGT TCGGAATTAC TGGGCGTAAA GCGCACGTAG GCGGCGATTT AAGTCAGAGG TGAAAGCCCG
GGGCTCAACC CCGGAAGTGC CTTTGAGACT GGGATTGCTA GAATCTTGNA GAGGCGAGTG GAATTCGAG TG TAGAGGTG AAATTCGTAG
ATATTCGAA GAACACAGT GCGGAAGGCG GCTCGTGGGA CAAGTATTGA CGTGAAGTG CGAAAGCGTG GGGAGCAAC AGGATTAGAT
ACCCTGGTAG TCCACGCCGT AAACGATGAT AACTNGCTGC TGGGCGACAT GGTGTTTCGG TGGCGCANTA ACGCATTAAG TTATCCGCCT
GGGGAGTACG GTCGCAAGAT TAAAACCTCA AGGAATTGAC GGGGCGCTGC ACAAGCGGTG GAGCATGTGG TTTAATTCGA AGCAACGCGC
AGAACCTTAC CAGCGTTTGA CATCCTCATC GCGGATTTCA GAGATGATTN CCTTCAGTTC GGCTGGATGA GTGACAGGTG CTGCAT

```

7.3 Distanzmatrices

Tabelle 17: Distanzmatrix* zum 16S rDNA-Dendrogramm einiger α -Proteobakterien (Abbildung 2, Seite 59).

<i>B. thiooxidans</i> DSM 9653 (T), Acc AU250796	0	8.4	8.5	8.4	8	7.9	8.2	8.7	8.6	8.5	8.4	9.0	8.0	8.0	8.6	8.7	8.0	8.1	8.0	8.1	8.1	8.5
<i>A. broomeae</i> G5958, Acc U87761	8.4	0	0.6	1.4	2.6	1.8	2.5	2.4	2.2	2.4	3.0	3.3	2.4	2.0	2.0	3.3	2.2	2.4	2.3	2.3	2.3	2.6
<i>A. birgiae</i> 34632 (T), Acc AF288304	8.5	0.6	0	1.1	2.4	1.6	2.4	2.6	2.6	3.1	2.7	3.7	2.6	2.1	2.1	3.2	2.1	2.2	2.1	2.1	2.1	2.8
<i>A. massiliensis</i> 34633 (T), Acc AY029562	8.4	1.4	1.1	0	3	2.4	2.5	2.6	3.1	3.2	3.0	3.7	2.9	2.9	2.9	3.7	2.6	2.8	2.7	2.7	2.7	3.3
<i>A. felis</i> ATCC 53690 (T), Acc M65248	8.0	2.6	2.4	3	0	1.2	2.3	2.9	2.7	4.2	4.5	4.1	4.1	3.5	3.9	3.8	2.7	2.9	2.8	2.8	2.8	4.2
<i>A. carboxidovorans</i> S23, Acc AB099659	7.9	1.8	1.6	2.4	1.2	0	1.7	2.5	2.0	3.5	3.8	3.4	3.4	3.5	2.9	3.4	2.4	2.5	2.4	2.4	2.4	3.5
<i>N. winogradskyi</i> ATCC 25381 (T), Acc L3506	8.2	2.5	2.4	2.5	2.3	1.7	0	2.4	2.0	3.1	3.2	3.1	3.4	3.4	3.7	4.0	3.0	3.2	3.1	3.1	3.1	3.2
<i>A. oligotrophica</i> JCM1494 (T), Acc D78366	8.7	2.4	2.6	2.6	2.9	2.5	2.4	0	1.1	2.8	3.1	2.7	3.7	3.1	3.3	4.4	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	2.7
<i>B. japonicum</i> DSM 30131 (T)	8.7	2.2	2.6	3.1	2.7	2.0	2.0	1.1	0	2.8	2.9	2.7	4.2	3.5	3.6	4.5	3.5	3.7	3.6	3.6	3.6	2.6
unidentified bacterium HWK12, Acc D89028	8.6	2.4	2.5	3.2	4.2	3.5	3.1	2.8	2.8	0	0.7	0.4	2.6	1.8	1.8	2.7	1.6	1.8	1.7	1.7	1.7	0.4
<i>B. elkanii</i> USDA 76 (T), Acc U35000	8.5	3.0	3.1	3.0	4.5	3.8	3.2	3.1	2.9	0.7	0	0.5	2.9	2.2	2.2	3.1	2.2	2.4	2.3	2.3	2.3	0.4
unidentified bacterium RD5-C2, Acc AB035489	8.4	2.6	2.7	3.2	4.1	3.4	3.1	2.7	2.7	0.4	0.5	0	2.7	2	2.1	2.9	1.8	2.0	1.9	1.9	0.2	0.2
<i>Bradyrhizobium</i> sp. SH 283012, Acc AF041446	9.0	3.3	3.7	3.7	4.7	4.1	4.3	3.7	4.2	2.6	2.9	2.7	0	1.5	2.6	3.0	2.0	2.1	2.1	2.1	2.1	2.6
unidentified bacterium BTH, Acc D89029	8.0	2.4	2.6	2.9	4.1	3.5	3.4	3.1	3.5	1.8	2.2	2.0	1.5	0	1.5	2.5	1.4	1.5	1.5	1.5	1.9	1.9
unidentified bacterium Acc AF382111	8.6	2.0	2.1	2.9	3.9	2.9	3.7	3.3	3.6	1.8	2.2	2.1	2.6	1.5	0	2.3	1.2	1.3	1.3	1.2	1.2	1.8
unidentified bacterium RCO, AccD89030	8.7	3.3	3.2	3.7	3.8	3.4	4.0	4.4	4.5	2.7	3.1	2.9	3	2.5	2.3	0	1.1	1.2	1.2	1.2	1.2	1.9
<i>Bradyrhizobium</i> sp. 1, Acc AY238503	8.0	2.2	2.1	2.6	2.7	2.4	3.0	3.3	3.5	1.6	2.2	1.8	2.0	1.4	1.2	1.1	0	0.1	0.1	0.1	0.1	2.9
Bodenisolat AZD11 3	8.1	2.4	2.2	2.8	2.9	2.5	3.2	3.3	3.7	1.8	2.4	2.0	2.1	1.5	1.3	1.2	0.1	0	0.1	0.1	0.1	2.1
Bodenisolat AZD8 5	8.0	2.3	2.1	2.7	2.8	2.4	3.1	3.3	3.6	1.7	2.3	1.9	2.1	1.5	1.3	1.2	0.1	0.1	0	0	0	2.0
Bodenisolat AZD10a EZLN2	8.1	2.3	2.1	2.7	2.8	2.4	3.1	3.3	3.6	1.7	2.3	1.9	2.1	1.5	1.2	1.2	0.1	0.1	0	0	0	2.0
<i>Bradyrhizobium</i> sp. LMG 9580, Acc X70404	8.5	2.6	2.8	3.3	4.2	3.5	3.2	2.7	2.6	0.4	0.4	0.2	2.6	1.9	1.8	2.9	1.9	2.1	2.0	2.0	2.0	0

* Gerechnet von *E. coli*-Position 83-1477, ohne Filter, Angaben in %.

Tabelle 18: Distanzmatrix* zum 16S rDNA-Dendrogramm der *Rhodococcus*-ähnlichen Isolate (**Abbildung 5**, Seite 70).

<i>R. rhodnii</i> DSM 43336 (T), Acc X80621	0	4.8	4.5	5.2	4.8	5	4.3	4.6	5.5	6	9.7	6.3	7.1	4.4	5.2	4.9	5.1
<i>R. ruber</i> DSM43338 (T), Acc X80625	4.8	0	2.7	7.3	6.2	6.3	6.7	6.3	4.1	6.5	11.8	6	8.4	6	6.2	6	6.6
<i>R. zopfii</i> DSM 44108 (T), Acc AF191343	4.5	2.7	0	6.4	4.8	4.9	5.5	3.9	4.1	5.3	10.6	4.8	7.6	5.2	5.4	5.2	5.8
<i>R. fascians</i> DSM 20669 (T), Acc X79186	5.2	7.3	6.4	0	5.1	4.6	4.6	4.2	6.6	6.1	9.8	6.2	6.8	4.3	4.7	4.4	5
<i>R. opacus</i> DSM 43205 (T), Acc X80630	4.8	6.2	4.8	5.1	0	2.5	3.4	2.4	6.9	5.5	9.3	5.7	6.5	3.9	4.7	4.3	4.5
<i>R. marinonascens</i> DSM 43752 (T), Acc X80617	5	6.3	4.9	4.6	2.5	0	3	2	4.4	4.3	8.3	3.7	5.3	2.6	3.4	3.1	3.3
<i>R. globerulus</i> DSM 43954 (T), Acc X80619	4.3	6.7	5.5	4.6	3.4	3	0	2.3	5.1	3.3	6.7	4.5	5.4	2.8	3.6	3.1	3.6
<i>R. koreensis</i> DNP505 (T), Acc AF124343	4.6	6.3	3.9	4.2	2.4	2	2.3	0	4.8	4.7	8.4	4.5	6	3.4	4.1	3.5	4.1
Bodenisolat M115	5.5	4.1	4.1	6.6	6.9	4.4	5.1	4.8	0	3.1	7.4	4.1	8	1.7	2.7	1.7	3.4
Bodenisolat M123	6	6.5	5.3	6.1	5.5	4.3	3.3	4.7	3.1	0	6	2.5	3.9	2.7	2.6	2.6	3.1
Bodenisolat M125	9.7	11.8	10.6	9.8	9.3	8.3	6.7	8.4	7.4	6	0	7.7	7.8	6.5	6.9	6.4	6.7
Bodenisolat M112	6.3	6	4.8	6.2	5.7	3.7	4.5	4.5	4.1	2.5	7.7	0	3.9	2.5	2.5	2.4	3
Bodenisolat M114	7.1	8.4	7.6	6.8	6.5	5.3	5.4	6	8	3.9	7.8	3.9	0	3.5	3.4	3.4	3.5
<i>R. erythropolis</i> ATCC 4277 (T), Acc X81929	4.4	6	5.2	4.3	3.9	2.6	2.8	3.4	1.7	2.7	6.5	2.5	3.5	0	1.4	1.2	1.5
Bodenisolat M121	5.2	6.2	5.4	4.7	4.7	3.4	3.6	4.1	2.7	2.6	6.9	2.5	3.4	1.4	0	1.5	1.8
Bodenisolat M120	4.9	6	5.2	4.4	4.3	3.1	3.1	3.5	1.7	2.6	6.4	2.4	3.4	1.2	1.5	0	1.1
Bodenisolat M128	5.1	6.6	5.8	5	4.5	3.3	3.6	4.1	3.4	3.1	6.7	3	3.5	1.5	1.8	1.1	0

* Gerechnet von *E. coli*-Position 113-1034. Angaben in %.

Tabelle 19: Distanzmatrix* zum 16S rDNA-Dendrogramm des *Brevibacterium*-ähnlichen Isolates M131 (Abbildung 5, Seite 70).

	<i>B. mcbrellneri</i> ATCC 49030 (T)	<i>B. otitidis</i> A37/73 (T)	Bodenisolat M131	<i>B. casei</i> NCDO 2048 (T)	<i>B. epidermidis</i> NCDO 2286 (T)	<i>B. iodinum</i> DSM 2062 (T)	<i>B. linens</i> DSM 20425 (T)
<i>Brevibacterium mcbrellneri</i> ATCC 49030 (T), Acc X93594	0	6.6	8	7.9	7.7	7.5	7.5
<i>Brevibacterium otitidis</i> A37/73 (T), Acc X93593	6.6	0	6.9	6.2	6.4	6.7	6.8
Bodenisolat M131	8	6.9	0	3.7	1.8	2	2.9
<i>Brevibacterium casei</i> NCDO 2048 (T), Acc X76564	7.9	6.2	3.7	0	2.7	2.9	3.3
<i>Brevibacterium epidermidis</i> NCDO 2286 (T), Acc X76565	7.7	6.4	1.8	2.7	0	1.2	1.8
<i>Brevibacterium iodinum</i> DSM 2062 (T), Acc X83813	7.5	6.7	2	2.9	1.2	0	1
<i>Brevibacterium linens</i> DSM 20425 (T), Acc X77451	7.5	6.8	2.9	3.3	1.8	1	0

* Gerechnet von *E. coli*-Position 40-1431. Angaben in %.

Tabelle 20: Distanzmatrix* zum 16S rDNA-Dendrogramms der Micrococcaceae-ähnlichen Isolate (**Abbildung 5**, Seite 70).

	<i>N. halobia</i> DSM 20541 (T)	<i>A. agilis</i> DSM 20550 (T)	Bodenisolat M110	<i>M. luteus</i> ATCC 4698 (T)	Bodenisolat M126	<i>M. lylae</i> DSM 20315 (T)	<i>M. antarcticus</i> AS1.2372 (T)
<i>Nesterenkonia halobia</i> DSM 20541 (T), Acc X80747	0	6.6	12.1	6.4	10.2	6.1	6.8
<i>Arthrobacter agilis</i> DSM 20550 (T), Acc X80748	6.6	0	11.6	5.3	9.7	5.5	5.6
Bodenisolat M110	12.1	11.6	0	5.5	7	7.5	7.3
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698 (T), Acc AF542073	6.4	5.3	5.5	0	3.3	1.8	1.5
Bodenisolat M126	10.2	9.7	7	3.3	0	4.9	4.5
<i>Micrococcus lylae</i> DSM 20315 (T), Acc X80750	6.1	5.5	7.5	1.8	4.9	0	2.4
<i>Micrococcus antarcticus</i> AS 1.2372 (T), Acc AJ005932	6.8	5.6	7.3	1.5	4.5	2.4	0

* Gerechnet von *E. coli*-Position 67-1412. Angaben in %.

Tabelle 21: Distanzmatrix* zum 16S rDNA-Dendrogramm der *Microbacterium*-ähnlichen Isolate M116 und M129 (**Abbildung 5**, Seite 70).

	<i>M. dextranolyticum</i> IFO 14592 (T)	<i>M. resistens</i> DMNZ 1710 (T)	<i>M. arabinogalactanolyticum</i> IFO 14344 (T)	<i>M. schleiferi</i> IFO 15075 (T)	<i>M. terregens</i> IFO 12961 (T)	Bodenisolat M116	Bodenisolat M129	<i>M. luteolum</i> DSM 20143 (T)	<i>M. saperdae</i> IFO 15038 (T)
<i>Microbacterium dextranolyticum</i> IFO 14592 (T), Acc D21341	0	2	3.5	3.1	2.8	6.7	7.8	3.1	3.2
<i>Microbacterium resistens</i> DMNZ 1710 (T), Acc Y14699	2	0	3.2	2.9	3.1	5.2	6.8	2.4	2.5
<i>Microbacterium arabinogalactanolyticum</i> IFO 14344 (T), Acc AB004715	3.5	3.2	0	3.6	4.1	6.1	7.5	3.3	3.1
<i>Microbacterium schleiferi</i> IFO 15075 (T), Acc AB004723	3.1	2.9	3.6	0	1.9	6.1	7.7	2.9	3
<i>Microbacterium terregens</i> IFO 12961 (T), Acc AB004721	2.8	3.1	4.1	1.9	0	6.4	7.7	3.3	3.4
Bodenisolat M116	6.7	5.2	6.1	6.1	6.4	0	5.5	4.2	4.3
Bodenisolat M129	7.8	6.8	7.5	7.7	7.7	5.5	0	4.4	4.9
<i>Microbacterium luteolum</i> DSM 20143 (T), Acc Y17235	3.1	2.4	3.3	2.9	3.3	4.2	4.4	0	1.3
<i>Microbacterium saperdae</i> IFO 15038 (T), Acc AB004719	3.2	2.5	3.1	3	3.4	4.3	4.9	1.3	0

* Gerechnet von *E. coli*-Position 45-1471. Angaben in %.

Tabelle 22: Distanzmatrix* zum 16S rDNA-Dendrogramm des *Burkholderiaceae*-ähnlichen Isolates M013 (Abbildung 7, Seite 71).

<i>Wautersia basiliensis</i> DSM 11853 (T), Acc AF312022	0	2.1	2.3	3.6	3	3.7	5	5.4	5.3	5.5	5.2
<i>Wautersia eutropha</i> ATCC 17697 (T), Acc M32021	2.1	0	2	3.2	2.2	4.1	4.5	4.2	4.7	4.3	4.4
<i>Wautersia campinensis</i> WS2 (T), Acc AF312020	2.3	2	0	3.1	2.2	4	3.9	4.2	4.5	4.1	4.3
<i>Wautersia gilardii</i> LMG 5886 (T), Acc AF076645	3.6	3.2	3.1	0	2.8	5.1	5.5	6.2	5.6	5.5	5.3
<i>Wautersia paucula</i> LMG 3413 (T), Acc AF085226	3	2.2	2.2	2.8	0	4.3	4.8	5.1	4.8	4.8	4.6
Bodenisolat M013	3.7	4.1	4	5.1	4.3	0	3.6	3.7	3.1	3.9	3.4
<i>Ralstonia insidiosa</i> LMG 21421 (T), Acc AF488779	5	4.5	3.9	5.5	4.8	3.6	0	1.4	2.3	2.8	2
<i>Ralstonia pickettii</i> ATCC 27512 (T), Acc X67042	5.4	4.2	4.2	6.2	5.1	3.7	1.4	0	2.2	2.2	2.4
<i>Ralstonia syzygii</i> .ATCC 49543 (T), Acc AB021403	5.3	4.7	4.5	5.6	4.8	3.1	2.3	2.2	0	1.8	0.9
<i>Ralstonia mannitolilytica</i> LMG 6866 (T), Acc AJ270258	5.5	4.3	4.1	5.5	4.8	3.9	2.8	2.2	1.8	0	1.7
<i>Ralstonia solanacearum</i> ATCC 1696 (T), Acc U28221	5.2	4.4	4.3	5.3	4.6	3.4	2	2.4	0.9	1.7	0
<i>W. basiliensis</i> DSM 11853 (T)											
<i>W. eutropha</i> ATCC17697 (T)											
<i>W. campinensis</i> WS2 (T)											
<i>W. gilardii</i> LMG 5886 (T)											
<i>W. paucula</i> LMG 3413 (T)											
Bodenisolat M013											
<i>R. insidiosa</i> LMG 21421 (T)											
<i>R. pickettii</i> ATCC 27512 (T)											
<i>R. syzygii</i> .ATCC 49543 (T)											
<i>R. mannitolilytica</i> LMG 6866 (T)											
<i>R. solanacearum</i> ATCC 1696 (T)											

* Gerechnet von *E. coli*-Position 73-1485. Angaben in %.

Tabelle 23: Distanzmatrix* zum 16S rDNA-Dendrogramm der *Sphingomonas*-ähnlichen Isolate M111, M117 und M134 (Abbildung 6, Seite 71).

<i>S. terrae</i> IFO 15098 (T)	0	5.4	7.3	8.1	9.4	8.1	7.5	9	11.6	8.2	8.3	8.3	8.2	8	7.3	7.5	7.2	7.5	7.5	7.2	7.5	6.6	6.9
<i>S. taejonensis</i> JSS-54 (T)	5.4	0	6.2	8.2	8.2	7.3	6.4	7.6	10.3	7	8.2	8.5	7.4	8.9	9.4	7.7	9.7	9.2	7.7	9.7	9.2	9.2	9.4
<i>S. subarctica</i> KF1 (T)	7.3	6.2	0	5.1	4.4	5.7	7.8	9.7	11.8	7.5	7.4	7.4	8.6	8.6	8.7	7.7	7.7	8.2	7.7	7.7	8.2	7.6	7.7
<i>S. rosa</i> IFO 15208 (T)	8.1	8.2	5.1	0	5	6.8	6.4	7.8	10.3	8.4	7.8	8.3	9.6	8.9	8.4	7.5	7.2	8.4	7.5	7.2	8.4	7.4	7.6
<i>S. capsulata</i> GIFU 11526 (T)	9.4	8.2	4.4	5	0	6.1	9.1	11.1	13.1	9.4	9.5	8.7	8.9	9	9.2	7.7	7.6	8.7	7.7	7.6	8.7	7.8	8.1
<i>S. natatoria</i> DSM 3183 (T)	8.1	7.3	5.7	6.8	6.1	0	8	9.7	11.6	7.2	7.7	7.6	7.6	8.2	8.8	6.2	6.8	7.4	6.2	6.8	7.4	6.5	6.9
Bodenisolat M134	7.5	6.4	7.8	6.4	9.1	8	0	1.6	4.1	5.8	6.7	6.9	9.1	10.2	9.6	9.2	9.6	10.9	9.2	9.6	10.9	9.9	10.2
Bodenisolat M117	9	7.6	9.7	7.8	11.1	11.6	4.1	3.3	0	9.7	10.7	9.9	13.4	14.9	13.9	11.5	12.6	14.5	13.9	14.8	16.8	15.3	13.3
Bodenisolat M111	11.6	10.3	11.8	10.3	13.1	11.6	4.1	3.3	0	9.7	10.7	9.9	13.4	14.9	13.9	11.5	12.6	14.5	13.9	14.8	16.8	15.3	13.3
<i>Sphingomonas herbicidovorans</i> 11019 (T), Acc AB022428	8.2	7	7.5	8.4	9.4	7.2	5.8	7.2	9.7	0	2.5	4.7	5.6	8.6	8.6	7.2	7.5	8.9	7.2	7.5	8.9	7.8	8.1
<i>Sphingomonas chlorophenolica</i> ATCC 33790 (T), Acc X87161	8.3	8.2	7.4	7.8	9.5	7.7	6.7	8.2	10.7	2.5	0	4.4	6.6	8.4	8.2	7.8	7.9	9.2	7.8	7.9	9.2	7.7	7.8
<i>Sphingomonas yanokuyae</i> JCM 7371 (T), Acc X72725	8.3	8.5	7.4	8.3	8.7	7.6	6.9	8.3	9.9	4.7	4.4	0	6.8	8.4	8.3	7.4	7.3	9.2	7.4	7.3	9.2	7.6	8
<i>Sphingomonas wittichii</i> RW1 (T), Acc AB021492	8.2	7.4	8.6	9.6	8.9	7.6	9.1	11	13.4	5.6	6.6	6.8	0	5.8	6.4	5.8	7.3	7.6	6.4	5.8	7.3	7.6	7.3
<i>Sphingomonas sanguis</i> IFO13937 (T), Acc D13726	8	8.9	8.6	8.9	9	8.2	10.2	12.2	14.9	8.6	8.4	8.4	5.8	0	4.5	4	4.3	6.2	4	4.3	6.2	4.5	4.8
<i>Sphingomonas pituitosa</i> EDIV (T), Acc AJ243751	7.3	9.4	8.7	8.4	9.2	8.8	9.6	11.9	13.9	8.6	8.2	8.3	6.4	4.5	0	4	4	6.3	4	4	6.3	4	4
<i>Sphingomonas koreensis</i> JSS-26 (T), Acc AF131296	7.5	7.7	7.7	7.5	7.7	6.2	9.2	11.5	13.9	7.2	7.8	7.4	5.8	4	4	0	3.1	4.7	0	3.1	4.7	2.3	2.6
<i>Sphingomonas aquatilis</i> JSS-7 (T), Acc AF131295	7.2	9.7	7.7	7.2	7.6	6.8	9.6	12.6	14.8	7.5	7.9	7.3	7.3	4.3	4	3.1	0	4.6	4	0	4.6	1.9	2.2
<i>Sphingomonas echinoides</i> ATCC 14820 (T), Acc AB021370	7.5	9.2	8.2	8.4	8.7	7.4	10.9	14.5	16.8	8.9	9.2	9.2	7.6	6.2	6.3	4.7	4.6	0	6.3	4.7	0	4.3	4.4
<i>Sphingomonas mali</i> IFO 10550 (T), Acc Y09638	6.6	9.2	7.6	7.4	7.8	6.5	9.9	13.1	15.3	7.8	7.7	7.6	7	4.5	4	2.3	1.9	4.3	4	2.3	1.9	0	0.4
<i>Sphingomonas pruni</i> IFO 15498 (T), Acc Y09637	6.9	9.4	7.7	7.6	8.1	6.9	10.2	13.3	15.5	8.1	7.8	8	7.3	4.8	4	2.6	2.2	4.4	4	2.6	2.2	0.4	0

* Gerechnet von *E. coli*-Position 49-1477. Angaben in %.

Tabelle 24: Distanzmatrix* zum 16S rDNA-Dendrogramm des *Sphingobacteriaceae*-ähnlichen Isolates M124 (**Abbildung 10**, Seite 74).

<i>Sphingobacterium multivorum</i> DSM 11691 (T), Acc AB020205	0	3.1	10.5	8.8	9.6	10.9	10.3
<i>Sphingobacterium thalophilum</i> ATCC 43320(T), Acc M58779	3.1	0	9.2	8.6	12.7	12.7	11.3
<i>Flavobacterium mizutaii</i> ATCC 33299 (T), Acc M58796	10.5	9.2	0	8.8	14.9	14.5	13.6
<i>Shingobacterium spiritivorum</i> ATCC 33861 (T), Acc M58778	8.8	8.6	8.8	0	12.4	13.3	14.5
<i>Pedobacter africanus</i> DSM 12126 (T), Acc AJ438171	9.6	12.7	14.9	12.4	0	2.7	11.3
<i>Pedobacter heparinus</i> ATCC (T), Acc M11657	10.9	12.7	14.5	13.3	2.7	0	4.3
Bodenisolat M124	10.9	14	14.9	13.8	2.7	4.1	5.1
<i>Pedobacter piscium</i> DSM 11725 (T), Acc AJ438174	11.3	13.6	14.5	11.3	4.3	4.5	0
<i>Pedobacter saltans</i> DSM 12145 (T), Acc AJ438173	10.3	12.2	10.7	10	9.6	9.4	8.8
<i>S. multivorum</i> DSM 11691 (T)							
<i>S. thalophilum</i> ATCC 43320 (T)							
<i>F. mizutaii</i> ATCC 33299 (T)							
<i>S. spiritivorum</i> ATCC 33861 (T)							
<i>P. africanus</i> DSM 12126 (T)							
<i>P. heparinus</i> ATCC (T)							
Bodenisolat M124							
<i>P. piscium</i> DSM 11725 (T)							
<i>P. saltans</i> DSM 12145 (T)							

* Gerechnet von *E. coli*-Position 533-1069. Angaben in %.

8 Abkürzungen

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyacetat
AGS	Arginin-Glycerin-Salz-Medium
Amp	Ampicillin
Amp50	Ampicillin (50 µg/ml)
AS	Aminosäure
BANA	<i>Bradyrhizobium-Agromonas-Nitrobacter-Afipia</i>
bp	Basenpaar
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
BNT	Nitroblau-Tetrazoliumsalz
BTEX	Benzol, Toluol, Ethylbenzol und Xylen
cfu	Koloniebildende Einheiten (engl. colony forming units)
CSE	Cold Soil Extract
CB	Chlorbenzol
ddH ₂ O	deionisiertes Wasser (15 µS)
DIG	Digoxygenin-dUTP
DNA	Desoxyribnukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid 5'-Triphosphat
GVO	Gentechnisch veränderter Organismus
IAA	Indol-3-essigsäure
ITS	Internal transcribed spacer
kb	Kilobasen (1 kb = 1000 Basen)
LB	Luria-Bertani Medium für <i>E. coli</i>
NA	Nutrient Agar

OD	Optische Dichte
PAM	Percent Accepted Mutations
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PCB	Polychloriertes Biphenyl
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RT	Raumtemperatur
TCB	Trichlorbenzol
t_d	Verdoppelungszeit
TE	Tris-EDTA, Puffer mit HCl titriert auf pH 7 oder 8
TAE	Tris-Acetat-EDTA, Puffer für Gelelektrophorese
TBE	Tris-Borsäure-EDTA Puffer für Gelelektrophorese
TSA	Tryptic Soy Agar
UPM	Umdrehungen pro Minute

Lebenslauf

- 1969 Geburt, 9. September, Barcelona
- 1975 - 1978 Escuela Suiza, Barcelona
- 1978 - 1981 Primarschule, Churwalden
- 1981 - 1984 Sekundarschule, Churwalden
- 1984 - 1989 Kantonsschule, Chur
Naturwissenschaftlich Technische Matur
- 1990 - 1996 Naturwissenschaftliches Studium, ETH Zürich
Fachrichtung Biotechnologie, Vertiefung Phytopathologie
Dipl. Natw. ETH
- 1998 - 2000 Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart
- 2000 - 2004 IÖZ Umweltmikrobiologie, TU Bergakademie Freiberg
Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Schlömann

Dank

Ich danke Herrn Prof. Dr. Schlömann für die Betreuung dieser Arbeit und das interessante Thema. Frau Dr. Margit Mau und Herrn Dr. Stefan Kaschabek danke ich herzlich für die Freundschaft und für die wissenschaftlichen Anregungen und Korrekturen. Ich danke Herrn Dr. Patrick Frost für die Freundschaft und die starke Intervention zugunsten der Fertigstellung. Fürs Korrekturlesen und die gute Freundschaft danke ich Dr. Andrea Schnyder-Krieg und Dr. Christoph Schlupe-Meier.

Jana Seifert, Antje Lindner, Janosch Gröning und Beate Eler und Isabel Weißbach danke ich herzlich für die Unterstützung in schwierigen Zeiten und die gemeinsame Freude in guten Zeiten. Ich danke Monika Thiel für die wertvolle Zusammenarbeit. Weiterhin gilt mein Dank allen Angehörigen der Institute für Mikrobiologie in Stuttgart und Freiberg.

Ich danke all meinen Freunden für die Unterstützung (in beliebiger Reihenfolge:) Nico Hübner, Rudi Grimm, Bernhard Fürst, Simon Spalinger, Yves Roth, Stefan Kraft, Beat Schnyder-Krieg. Und natürlich danke ich Daniel Burckhardt für die Vermittlung der Deutschen Wissenschafts-Kultur.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern und an Carmen und Wolfgang.

