



Universität Hamburg

Charakterisierung eines nicht zur Gattung
Acidithiobacillus gehörenden, acidophilen, Eisen(II)-
Ionen oxidierenden Bakteriums

Diplomarbeit
von
Christian Karsten

Universität Hamburg
Biozentrum Klein Flottbek und Botanischer Garten
Abteilung Mikrobiologie

September 2004

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung.....	3
2.3 Acidithiobacillus	5
2.3.1 SPIII/3	9
2.3.2 DSM 2392	10
2.4 Nevskia.....	11
2.5 Ziel dieser Arbeit.....	11
3. Material und Methoden.....	12
3.1 Bakterien	12
3.2 Medien.....	12
3.3 Kulturführung.....	13
3.3.1 Stammkulturen	13
3.3.2 Arbeitskulturen.....	13
3.3.3 Massenzüchtungen	13
3.3.4 Reinheitskontrollen	14
3.4 Morphologische Untersuchungen	14
3.4.1 Ultradünnschnitte	14
3.4.2 Gram-Eigenschaften.....	17
3.4.3 Begeißelung.....	17
3.5 Analytische Nachweisverfahren.....	17
3.5.1 Eisenbestimmung	17
3.5.2 Sulfatbestimmung.....	18
3.5.3 Zellzahlbestimmung.....	18
3.6 Physiologische Untersuchungen	18
3.6.2 Substratspektrum.....	19
3.6.2.1 Toleranz gegenüber organischen Verbindungen.....	21
3.6.4 Halotoleranz	21
3.6.5 Schwermetall-Toleranz	21
3.6.6 pH-Optimum	21
3.6.7 Temperatur-Optimum.....	22

3.7 Molekularbiologische Untersuchungen.....	22
3.7.1 Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)	22
3.7.1.1 DNA-Extraktion.....	22
3.7.1.2 Polymeraseketten-Reaktion (PCR).....	25
3.7.1.3 Durchführung der DGGE.....	26
3.7.2 Cytochromdifferenz-Spektren.....	28
4. Ergebnisse	30
4.1 Morphologische Untersuchungen	30
4.1.1 Ultradünnschnitte	30
4.1.2 Gram-Eigenschaften.....	33
4.1.3 Begeißelung.....	33
4.2 Physiologische Untersuchungen	34
4.2.1 Substratspektrum.....	34
4.2.2 Halotoleranz	38
4.2.3 Schwermetall-Toleranz	39
4.2.4 pH-Optimum	40
4.2.5 Temperatur-Optimum.....	41
4.3 Molekularbiologische Untersuchungen.....	42
4.3.1 Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese	42
4.3.2 Cytochromdifferenzspektren.....	43
5. Diskussion	44
6. Literaturverzeichnis.....	52

Abkürzungsverzeichnis

A..	<i>Acidithiobacillus</i>
A. deion.	Aqua deionisata
A. dest.	Aqua destilata
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
d	Tag
DEV	Deutsches Einheitsverfahren
DGGE	Denaturierende Gradientengelelektrophorese
d.h.	das heisst
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSM	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPS	extrazelluläre, polymere Substanzen
et al.	et altera
Fa.	Firma
g	Gramm
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
G+C	Guanin + Cytosin
h	Stunde
k...	kilo...
konz.	konzentriert
L	Liter
m	Meter
m...	Milli...
mA	Milli-Ampere
MIC	minimale inhibierende Konzentration
min	Minute
N	Normalität

<i>N.</i>	<i>Nevskia</i>
n...	Nano...
NaOH	Natronlauge
PCR	Polymerase chain reaction
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RuBisCo	Ribulose 1,5-Bisphosphat Carboxylase
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v	Volumen
w	Gewicht
μ...	Mikro...
%	Prozent

1. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen des *Acidithiobacillus ferrooxidans* Stammes SPIII/3 aus der Stammsammlung der AG Geomikrobiologie an der Universität Hamburg morphologisch, physiologisch und molekularbiologisch charakterisiert. Sämtliche Untersuchungen wurden zum Vergleich auch an Zellen des *A. ferrooxidans* Typstammes ATCC 23270 und denen des genetisch mit dem Stamm SPIII/3 sehr eng verwandten Stammes DSM 2392 durchgeführt. Untersucht wurde die Morphologie der Zellen anhand von Ultradünnschnitten und Färbepreparaten. Weiterhin wurden die Stämme auf verwertbare Energiequellen, pH-, Temperatur-Optimum, Halo- und Schwermetalltoleranz untersucht. Molekularbiologisch wurden die verwandtschaftlichen Verhältnisse zwischen den drei Stämmen der Art *A. ferrooxidans* mit Hilfe der DGGE überprüft. Weiterhin wurden die Zellen auf ihren Cytochromgehalt untersucht.

- Die Zellen der drei genannten Stämme sind Gram-negative, monopolar und monotrich begeißelte Stäbchen. Die Zellen der *A. ferrooxidans* Stämme SPIII/3 und DSM 2392 weichen teilweise von dieser Stäbchenform ab und bilden pleomorphe Zellen aus.
- Die Größe der Zellen schwankt bei dem *A. ferrooxidans* Stamm ATCC 23270 zwischen 1-2 µm in der Länge und 0,3-0,5 µm in der Breite. Bei den *A. ferrooxidans* Stämmen SPIII/3 und DSM 2329 können, je nach Wachstumsphase Zellen mit einer Länge von 1 bis 10 µm und 0,5 µm in der Breite beobachtet werden.
- Die Zellen der drei Stämme wachsen obligat autotroph und zeichnen sich durch den Besitz von Carboxysomen aus. Außerdem sind im Cytoplasma der Zellen Polyphosphat-Speichertropfen vorhanden.
- Die *A. ferrooxidans* Stämme ATCC 23270, SPIII/3 und DSM 2392 wachsen chemolithotroph mit dem Substrat Eisen(II)-Ionen. Für die Zellen des Stammes DSM 2392 stellt dies die einzig bekannte Energiequelle dar. Die Zellen des Stammes SPIII/3 können wie der Typstamm ATCC 23270 auch elementaren Schwefel, Pyrit und Chalkopyrit oxidieren. Die Zellen von ATCC 23270 sind zusätzlich zur Oxidation weiterer reduzierter Schwefelverbindungen und von Metallsulfiden wie Galena und Sphalerit befähigt.

- Die Zellen aller drei Stämme werden durch Konzentrationen von 100 μM an organischen Säuren wie Succinat, Pyruvat und Acetat im Wachstum gehemmt. Glucose in der gleichen Konzentration hemmt nicht das Wachstum.
- Eine Natriumchlorid-Konzentration von 270 mM hemmt die Zellen des *A. ferrooxidans* Typstammes ATCC 23270 in ihrem Wachstum. Die Stämme SPIII/3 und DSM 2392 tolerieren 110 bzw. 80 mM Natriumchlorid.
- Kobalt(II)- oder Nickel(II)-Ionen in Konzentration von 10 g/L hemmen die Zellen der Stämme ATCC 23270 und SPIII/3 in ihrem Wachstum. Lediglich der Stamm DSM 2392 kann noch bei einer Kobalt(II)-Konzentration von 14 g/L wachsen, Nickel(II)-Ionen hemmen die Zellen dieses Stammes bei einer Konzentration von 10 g/L. Kupfer tolerieren alle Stämme bis zu einer Konzentration von 30 g/L.
- Das pH-Optimum liegt für die Zellen aller drei Stämme um 2.
- Das Temperatur-Optimum liegt bei den Zellen des Typstammes ATCC 23270 zwischen 32 und 35°C. Bei den Stämmen SPIII/3 und DSM 2392 liegen die Optima bei 28°C bzw. 25°C.
- Die Stämme SPIII/3 und DSM 2392 gehören, mit 99,6 % Homologie in der 16S rDNA, in eine Verwandtschaftsgruppe. Der Stamm ATCC 23270 gehört aufgrund seiner Homologiewerte von 85 % zu den Stämmen SPIII/3 und DSM 2392 in eine andere Verwandtschaftsgruppe.
- Alle drei Stämme besitzen Cytochrom c.
- Fast man die Ergebnisse zusammen, so sind aufgrund der molekularbiologischen, morphologischen und physiologischen Eigenschaften sowie der bei der DSMZ von Prof. Dr. Stackebrandt und Dr. Schumann durchgeführten Untersuchungen die *A. ferrooxidans* Stämme SPIII/3 und DSM 2392 in eine neue Gattung innerhalb der γ -Proteobakterien und nicht bei *A. ferrooxidans* oder *Nevskia ramosa* einzuordnen.

2. Einleitung

Winogradsky (1887, 1922) hat Ende des 19. Jahrhunderts beschrieben, dass es spezialisierten Organismen möglich ist, aus der Oxidation von anorganischen Verbindungen Energie zu gewinnen. Damit hat er die Hypothese der Chemolithotrophie geprägt. Wichtige Vertreter unter den chemolithotrophen Bakterien sind die eisen(II)-ionen- und schwefeloxidierenden Bakterien. Diese stehen seit über 100 Jahren im Fokus der Forschung (Van Niel, 1946), da angenommen wurde, Rückschlüsse auf erdgeschichtlich frühe Biozönosen ziehen zu können. Weiterhin spielen diese Bakteriengruppen in industriellen und biotechnologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Bakterien, wie *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *Leptospirillum ferrooxidans*, sind bevorzugte Forschungsobjekte, wenn es um die Erforschung von Laugungsmechanismen geht (Tuovinen und Kelly 1972, Sand et al. 1992).

Basierte die systematische Einordnung anfangs noch auf klassischen, physiologischen Analysen, so erfuhr die mikrobielle Systematik in den letzten 25 Jahren durch neue molekularbiologische Arbeitstechniken einen beträchtlichen Aufschwung. Diese Techniken ermöglichen zusammen mit den klassischen Methoden vertiefte Einblicke in die verwandtschaftlichen Verhältnisse, die zuvor nicht möglich waren (Johnson 1998). *A. ferrooxidans* wurde aufgrund solcher Untersuchungen phylogenetisch provisorisch in die β -Untergruppe der Proteobakterien eingeordnet (Lane et al. 1992), während *L. ferrooxidans* mit anderen Gattungen eine eigene Klasse bildet (De Wulf-Durand 1997, Hippe 2000). Inzwischen wurde die Art *A. ferrooxidans* in die γ -Untergruppe der Proteobakterien eingeordnet (Kelly und Wood, 2000). Die Gruppe der Proteobakterien wurde von Stackebrandt (1988) etabliert und besteht aus vier Untergruppen. Die Einteilung der Bakterien in die verschiedenen Untergruppen erfolgt anhand vergleichender Untersuchungen ihrer 5S und 16S rDNA. Eisen- und schwefeloxidierende Bakterien sind in den α -, β - und γ -Untergruppen zu finden. Der in dieser Arbeit zu charakterisierende Stamm SPIII/3 wurde anhand seiner physiologischen Eigenschaften bislang der Art *A. ferrooxidans* zugeordnet (Sand et. al 1991, Kinzler 2000). Allerdings hat sich schon in den Arbeiten von Mitchell (2002) und Kock (2003) herausgestellt, dass es sich bei dem Stamm SPIII/3 nicht um einen Angehörigen der Art *A. ferrooxidans* handeln kann und daher eine ausführliche Charakterisierung von Nöten ist. Besonders interessant ist der Stamm SPIII/3, da mit ihm ein weiterer (s.u.) nicht-*Acidithiobacillus ferrooxidans* Stamm existiert, der autotroph und acidophil Eisen(II)-Ionen und Schwefelverbindungen umsetzt.

Weitere mesophile Prokaryoten, die in der Lage sind Eisen(II)-Ionen zu oxidieren und nicht zur Art *A. ferrooxidans* gehören, sind *Metallogenium spec.*, *Gallionella ferruginea*, *Ferromicrobium acidophilum*, *Ferroplasma acidiphilum*, *Ferroplasma acidarmanus* und der noch nicht benannte Stamm CCH7. Vier der hier genannten Stämme wurden erst in den letzten Jahren isoliert und beschrieben. Diese Forschungsaktivitäten unterstreichen die Wichtigkeit dieser Bakteriengruppe.

Ferromicrobium acidophilum wurde das erste Mal von Johnson und Roberto (1997) beschrieben. Es handelt sich hierbei um ein Bakterium, das in der Lage ist Eisen(II)-Ionen zu oxidieren und obligat heterotroph zu wachsen. Die Zellen benötigen Hefeextrakt im Nährmedium um die Eisen(II)-Ionen-Oxidation durchführen zu können. Die Zellen von *F. acidophilum* wachsen bei Temperaturen zwischen 20 und 40°C mit einer optimalen Wachstumstemperatur von 37°C. Der G+C-Wert beträgt 51-55 mol%. Bei dem noch nicht benannten Stamm CCH7 handelt es sich um acidophile, heterotrophe, eisen(II)-ionen-oxidierende Zellen die von Johnson (1993) isoliert wurden. Sie wachsen bei pH-Werten zwischen 2 und 4,4 mit einem Wachstumsoptimum bei 3. Der G+C-Wert beträgt 61 mol%.

Bei *Metallogenium spec.* handelt es sich um einen säuretoleranten, eisen(II)-ionen-oxidierenden Organismus, der zum ersten Mal von Walsh und Mitchell (1972) beschrieben wurde. Die Zellen wachsen bei pH-Werten zwischen 3,5 und 6,8 wobei das Wachstumsoptimum bei 4 liegt. Es ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt ob diese Zellen autotroph oder heterotroph wachsen. Im mikroskopischen Bild verleiht den Zellen eine aufgelagerte Eisenoxidschicht ein charakteristisches Erscheinungsbild.

Mesophil und neutrophil wachsen Zellen der Art *Gallionella ferruginea*. Die Zellen dieser Gattung sind Gram-negativ und nierenförmig. Die Zellen sind durch eine polare Geißel beweglich. Die Energiegewinnung erfolgt chemolithotroph wobei Eisen(II)-Ionen als Elektronen-Donoren fungieren. CO₂ wird über den Calvin-Zyklus assimiliert. Die Optimale Wachstumstemperatur beträgt 17°C und sie wachsen bei pH-Werten zwischen 6 und 7,6. Sie leben meist in Zonen verminderten Sauerstoffpartialdruckes, da nur hier die Eisen(II)-Ionen bei pH-neutralen Milieubedingungen stabil sind.

Die im Reich Archaea eingeordnete Gattung *Ferroplasma* besteht aus zwei mesophile Arten, die beide in der Lage sind Eisen-II-Ionen zu oxidieren. Die beiden Arten der Gattung unterscheiden sich lediglich in ihrem pH-Optimum, so liegt es für die Art *F. acidiphilum* bei 1,7 und für *F. acidarmanus* bei 1,2 (Edwards et al. 2000). Ansonsten wachsen beide Arten acidophil und chemolithotroph. Sie werden nur durch eine periphere Membran begrenzt

(Golyshina et al. 2000). Damit sie in Kultur wachsen können benötigen sie im Nährmedium Spuren von Hefe-Extrakt.

2.3 Acidithiobacillus

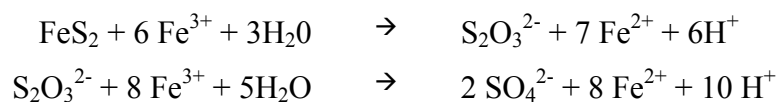
Untersuchungen von Kelly und Woods (2000) bestätigen die umfangreiche physiologische und genetische Heterogenität innerhalb der Gattung *Thiobacillus*, wie sie schon in der ersten Ausgabe des *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (1984) festgestellt wurde. Als Konsequenz dieser Untersuchungen ordneten sie die phylogenetisch eng verwandten Spezies' *Thiobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans*, *Thiobacillus caldus* und *Thiobacillus albertensis* in die Gattung *Acidithiobacillus* ein. Aber auch diese neu vorgenommene Einordnung der Bakterienstämme in die Gattung *Acidithiobacillus* scheint nicht endgültig zu sein, da auch innerhalb der Arten dieser Gattung noch immer eine große Heterogenität herrscht und geeignete physiologische Marker fehlen, um die einzelnen Stämme von einander differenzieren zu können (Kelly und Wood 2000). Die in dieser Gattung zusammengefassten Bakterienarten sind obligat acidophil, Gram-negativ und nutzen reduzierte Schwefelverbindungen und z.T. Eisen(II)-Ionen zur Energiegewinnung. Die Zellen sind stäbchenförmig und durch eine oder mehrere Geißeln zur Fortbewegung befähigt. Die optimale Wachstumstemperatur liegt meist zwischen 30-35°C. In den Zellwänden ist häufig Ubiquinon Q-8 zu finden.

Die Bakterienart *A. ferrooxidans* wurde als *Thiobacillus ferrooxidans* das erste Mal von Colmer (1950) aus sauren Bergbauabwässern isoliert und von Temple und Colmer (1951) beschrieben. Inzwischen wurden weitere Stämme aus unterschiedlichen, natürlichen und industriellen Quellen isoliert. Bei den Zellen der Art *A. ferrooxidans* handelt es sich um Gram-negative, stäbchenförmige Bakterien von 0,5 µm Dicke und einer Länge von 1-3 µm mit polarer Begeißelung (Hensyl und Forlifer, 1994). Dauerformen wurden bisher nicht beobachtet. Die Energiegewinnung erfolgt chemolithotroph durch Oxidation von Eisen(II)-Ionen, Elementarschwefel, Sulfid, Thiosulfat, Polythionaten oder Metallsulfiden (Zenneck 1988, Jensen und Webb 1995). Stoffwechselendprodukte sind Schwefelsäure, Eisen(III)-Ionen und andere Schwermetallionen, die aus der Oxidation von Metallsulfiden stammen. *A. ferrooxidans* oxidiert verschiedene Metallsulfide wie Pyrit (FeS₂), Chalkopyrit (CuFeS₂), Covellin (CuS), Chalkosin (Cu₂S), Sphalerit (ZnS), Arsenopyrit (FeAsS), Kobaltsulfid (CoS) und Galena (PbS) (Silverman und Ehrlich 1964, Ehrlich 2002). Des Weiteren wurde auch die Nutzung von H₂ als Energiequelle beschrieben (Drobner 1990). CO₂ ist die Quelle für

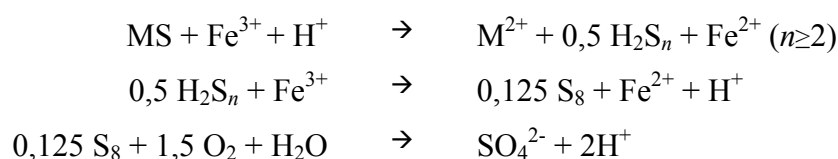
zellulären Kohlenstoff. Die Fixierung erfolgt über den Calvin-Zyklus (DiSpirito und Tuovinen 1982). Einige Stämme wurden beschrieben, die zur Stickstofffixierung befähigt sind (Mackintosh 1978, Stevens et al. 1986). Zellen der Art *A. ferrooxidans* zeichnen sich durch eine hohe Toleranz gegenüber Schwermetallen aus, die es ihnen ermöglicht, in den mit Schwermetall belasteten Laugungsbiotopen zu überleben (Tuovinen et al. 1971, Rehm 1980, Hallmann et al. 1993).

A. ferrooxidans kommt in sauren Bergwerksabwässern vor und ist oft ein dominanter Organismus beim industriellen Laugen von Armerzen. Es werden verschiedene Mechanismen der Laugung von Metallsulfiden durch die Bakterien diskutiert. Nach dem Modell des indirekten Laugungsmechanismus werden Eisen(II)-Ionen zu Eisen(III)-Ionen oxidiert. Die entstandenen Eisen(III)-Ionen lösen ein Metallsulfid (MS) chemisch auf (Silverman 1967; Groudev 1979; Ehrlich 2002). Die Zellen haben hierbei keinen direkten Kontakt zum Metallsulfid, sondern begünstigen diese Reaktion durch die Regeneration von Eisen(III)-Ionen. Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass die Metallsulfide über zwei unterschiedliche Mechanismen, den Thiosulfat- oder den Polysulfid-Mechanismus, oxidiert werden (Moses et al. 1987, Schippers et al. 1996, Sand et al. 1999). Säureunlösliche Metallsulfide wie Pyrit (FeS_2), Molybdänit (MoS_2) und Wolframsulfid (WS_2) werden ausschließlich von Eisen(III)-Ionen angegriffen. Ihr Schwefelanteil wird über Thiosulfat und Polythionate zu Sulfat umgesetzt. Bei den säurelöslichen Metallsulfiden wie Galena, Sphalerit und Chalkopyrit erfolgt der Angriff durch Eisen(III)-Ionen und/oder Protonen. Der Schwefelanteil wird dabei über Polysulfide und anschließend Elementarschwefel zu Sulfat oxidiert.

Thiosulfat-Mechanismus am Beispiel des säureunlöslichen Metallsulfids Pyrit (FeS_2):



Polysulfid-Mechanismus am Beispiel eines säurelöslichen Metallsulfids (MS):



Nach der alten und bereits verworfenen Hypothese (Gehrke et al. 1995, Schippers et al. 1996) der direkten Laugung mussten die Bakterien an der Oberfläche des Metallsulfids angeheftet sein, um es mit einem Enzymsystem angreifen und auflösen zu können. Grund für diese Annahme war die Beobachtung, dass angeheftete Zellen sehr viel effektiver in der Laugung von Metallsulfiden sind als planktonische (Silverman und Ehrlich 1964). Allerdings konnte so ein Enzymsystem nie nachgewiesen werden. Eine erste mögliche Erklärung dieses Widerspruchs lieferte Gehrke (1998). Der Autor schlug vor, dass die Bakterien Eisen(III)-Ionen, die das Endprodukt ihres Stoffwechsels darstellen, in ihren EPS komplexieren. Diese Eisen(III)-Ionen greifen das Metallsulfid nach Art der indirekten Laugung chemisch an. Die dabei entstehenden Eisen(II)-Ionen verbleiben in den EPS und werden vom Bakterium an der Outer-Membrane wieder zu Eisen(III)-Ionen oxidiert. Bei diesem Mechanismus ist daher, ganz wie beim Modell der direkten Laugung, eine Anheftung der Zellen an die Oberfläche des Metallsulfids vonnöten. Dieses Modell wurde von Tributsch (1999) und Rodríguez (2003) aufgegriffen und als „Kontakt-Laugung“ bezeichnet.

Die Habitate der Stämme unterscheiden sich in ihren physiko-chemischen Bedingungen wie pH oder Temperatur und dem Gehalt an toxischen Verbindungen z.T. stark. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die immer wieder beobachteten großen Unterschiede in Bezug auf ihre physiologischen Vorlieben – wie etwa die Toleranz gegenüber verschiedenen Schwermetallen – (Tuovinen et al. 1973; Harrison, 1982; Leduc und Ferroni, 1994; Chisholm et al. 1998; Frattini et al. 2000; Ageeva et al. 2001) und genotypischen Eigenschaften (Martin et al. 1981; Harrison, 1982; Kondratyeva et al. 1993, 1995; Rawlings und Kusano, 1994; Rawlings 1999) sein. Vergleichende, genetische Untersuchungen, die von Mitchell (2002) an 44 Stämmen der Art *A. ferrooxidans* durchgeführt wurden, bestätigten diese Beobachtungen. Bei diesen Untersuchungen wurde die 16S rDNA dieser Stämme mittels PCR amplifiziert und die so gewonnenen Fragmente in der denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) aufgrund unterschiedlicher G+C-Gehalte im Harnstoff-Formamid-Gradienten aufgetrennt. Die Stämme von *A. ferrooxidans* wurden in fünf verschiedene Subgruppen aufgeteilt. Der in der vorliegenden Diplomarbeit als Vergleichsstamm dienende *A. ferrooxidans* Typstamm ATCC 23270 wurde in die erste Subgruppe eingeordnet, SPIII/3 in die fünfte Subgruppe und stellte damit gleichzeitig deren einzigen Vertreter dar. Die Sequenzierung der 16S rDNA ergab, dass der Stamm SPIII/3 nur eine Übereinstimmung von unter 85% mit dem Typstamm aufweist und zu 99,6% mit dem Stamm DSM 2392 (s.u.) identisch ist. In der Abbildung 1 sind die verwandtschaftlichen Verhältnisse zwischen den für diese Arbeit wichtigen Bakterienstämmen in einem Stammbaum zusammengefasst.

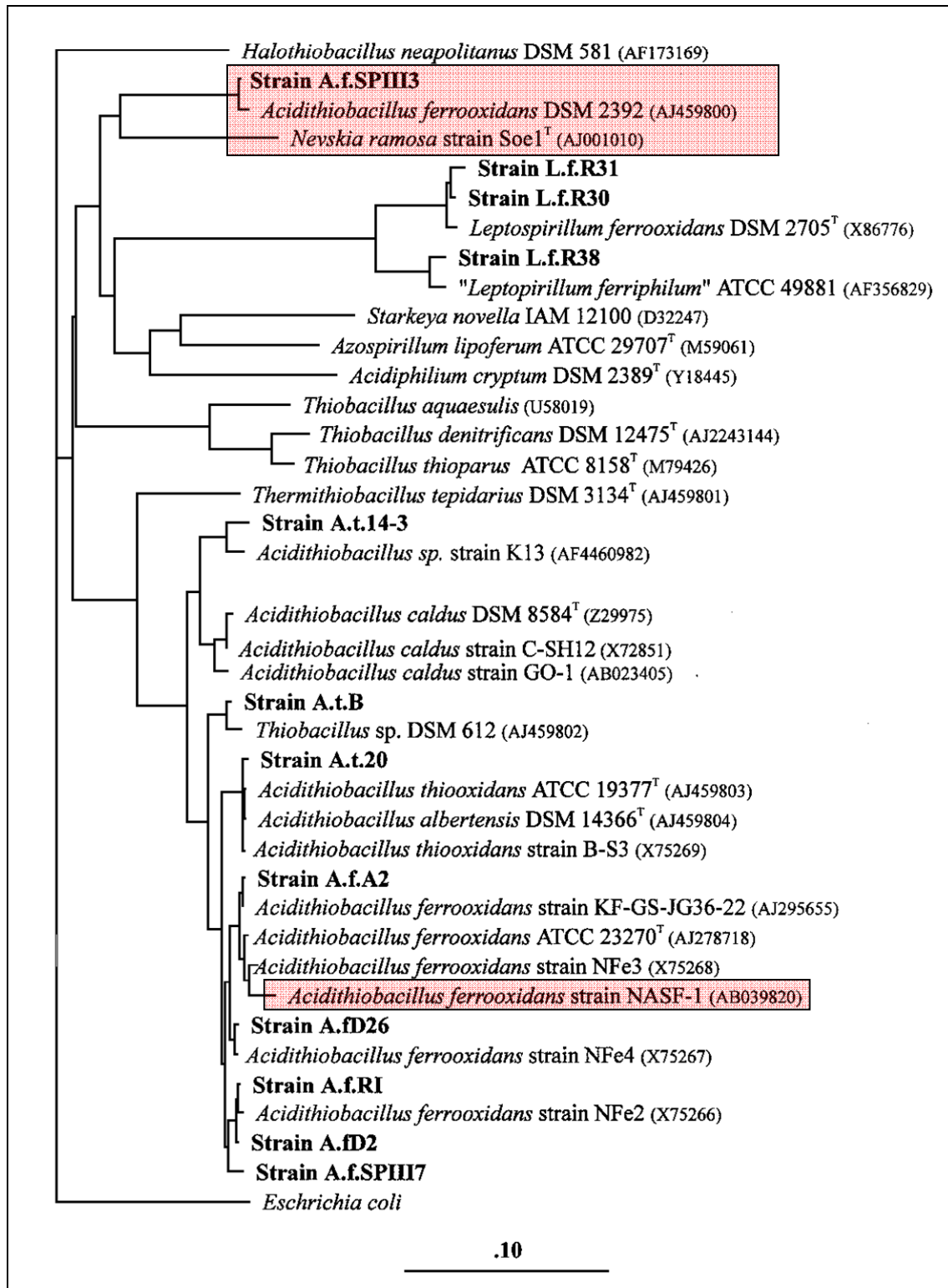


Abbildung 1: Stammbaum für die Stammsammlung der AG Geomikrobiologie an der Universität Hamburg (nach Stackebrandt). Die roten Markierungen kennzeichnen die für diese Arbeit relevanten Bakterienstämme.

2.3.1 SPIII/3

Der hier zu untersuchende, acidophile, Eisen(II)-Ionen oxidierende *A. ferrooxidans* Stamm SPIII/3 rührt aus einer Beprobung in der Bergbauregion La Union bei Cartagena in der Provinz Murcia im Südosten Spaniens (Abb. 2) her. Dort wurde eine Probe aus einer Pyritspalte an einem Felshang 300 m südlich vom Tagebau Brunita (Abb. 3) entnommen und der Stamm daraus mittels Verdünnungsreihen isoliert (Sand pers. comm).

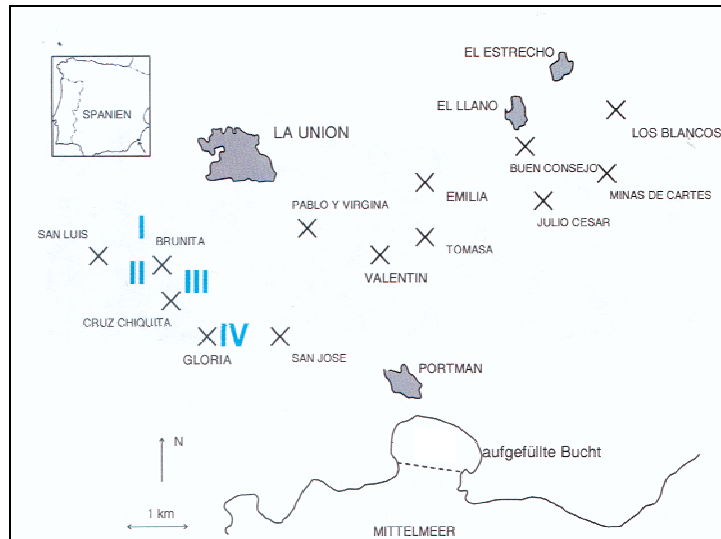


Abbildung 2: Kartenskizze der Bergbauregion La Union (nach Oen et al. 1990) (I-IV = Standorte der Probennahmen im zeitlichen Verlauf, graues Gebiet = Stadt, X = Tagebau). Das Symbol III bezeichnet den Ort, aus dem die Proben für Zellen des Stammes SPIII/3 entnommen wurden.



Abbildung 3: Pyritspalte am Probeort III bei Cartagena, Spanien, aus der der Stamm SPIII/3 isoliert wurde. Sie befindet sich an einem nach Norden gerichteten Felshang ca. 300 m südlich von Tagebau Brunita.

In dieser Region wurde seit mehr als 2500 Jahren intensiv Bergbau betrieben, hauptsächlich zur Gewinnung von Eisen, Blei, Silber, Kupfer, Zink, Mangan und Zinn (Manteca 2002). Die

Zellen des aus der Spalte isolierten Stammes sind Gram-negativ und stäbchenförmig. Teilweise konnten Zellen mit einer von der Stäbchenform abweichenden Morphologie beobachtet werden, die von Kock (2003) als pleomorph beschrieben wurde. Die Zellen des Stammes SPIII/3 gewinnen ihre Energie aus der Oxidation von Eisen(II)-Ionen (Kock 2003). Kinzler (2000) hat für Zellen von SPIII/3 im Vergleich mit denen verschiedener Stämme der Art *A. ferrooxidans* festgestellt, dass die Zellen dieses Stammes die geringste Oxidationsrate für Pyrit und Eisen(II)-Ionen aufweisen. Der Stamm unterschied sich auch bei der Bildung von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) von den Vergleichsstämmen. Er bildet wenig EPS, die einen Eisenionen-Gehalt von 2,7 nmol (0,5% W/W) und einen Uronsäure-Gehalt von 3,5 nmol (1,9% w/w) aufweisen. Damit weicht er von dem für andere *A. ferrooxidans* Stämme bestimmten Eisenionen/Uronsäure-Verhältnis von 2:1 ab (Gehrke 1998). Die Uronsäuren sollen für die Komplexierung der Eisenionen eine wichtige Rolle spielen. Diese Ergebnisse erlauben den Schluss, dass sich die genetischen Unterschiede (Mitchell, 2002) teilweise auch in den physiologischen Eigenschaften der Zellen manifestieren. Dies zeigte sich auch in Untersuchungen zur Anheftungskinetik der Zellen des Stammes SPIII/3 an unterschiedliche Oberflächen. So zeigte Kock (2003), dass die Zellen des Stammes SPIII/3 trotz des relativ geringen EPS-Gehaltes eine hohe Anheftungsgeschwindigkeit auf Pyrit aufweisen. Nach 5 min waren 80% der Zellen an die Pyritoberfläche angeheftet. Allerdings war ein Unterschied zu den Stämmen der Art *A. ferrooxidans* festzustellen. Die Zellen des Stammes SPIII/3 hefteten sich auch an Quarzsand unspezifisch zu ca. 50% an. Die Anheftungsgeschwindigkeit war langsamer als bei den Sulfidmineralen. Ebenso hefteten sich die Zellen des Stammes SPIII/3 an die Glaswände der Versuchsgefäße an.

2.3.2 DSM 2392

Der mit dem Stamm SPIII/3 zu 99,6 % verwandte Stamm DSM 2392 wurde von Jarvis aus Bergbauabwässern eines 40 Jahre alten Kohlebergwerkes in Calloway County, Missouri, USA, als m-1 isoliert. Sie gewinnen ihre Energie aus der Oxidation von Eisen(II)-Ionen. Im Gegensatz zu anderen *Acidithiobacillus*- und *Thiobacillus*-Arten sind die Zellen dieses Stammes nicht in der Lage, elementaren Schwefel zur Energiegewinnung zu nutzen. Die Zellen dieses Stammes haben einen G+C-Gehalt von 65,3 mol % (Harrison 1982). Sie wiesen nur geringe DNA-DNA-Homologien von < 20 % zu anderen Zellen der Gattung *Acidithiobacillus* auf (Harrison 1982). Untersuchungen von Lane (1992) zu den verwandtschaftlichen Verhältnissen zwischen eisen-(II)-ionen- und schwefeloxidierenden

Bakterien führten ursprünglich dazu, dass die Zellen des Stammes DSM 2392 in eine andere Untergruppe der Proteobakterien eingeordnet wurden, als die anderen Stämme der Gattung *Acidithiobacillus*. Die Zellen des Stammes wurden in die γ -Untergruppen eingeordnet, wohingegen die Zellen anderer Stämme von *Acidithiobacillus* ursprünglich nur in der β -Untergruppe zu finden waren (Lane et al. 1992). Inzwischen wurde nach neueren Untersuchungen die Gattung *Acidithiobacillus* auch in die γ -Untergruppe der Proteobakterien verschoben (Kelly und Wood 2000). Dennoch gehören die Zellen der Stämme DSM 2392 und SPIII/3 nicht zur Art *A. ferrooxidans*, sondern zu einer eigenen Gruppe innerhalb der γ -Proteobakterien, deren nächster genetischer Verwandter in der Gattung *Nevskia* zu finden ist (Stackebrandt 2002, Mitchell 2002).

2.4 Nevskia

Der nächste genetische Verwandte der Stämme SPIII/3 und DSM 2392 ist *Nevskia ramosa*, wengleich sich die genetischen Ähnlichkeiten nicht im Phänotyp manifestieren. Die Art *Nevskia ramosa* wurde das erste Mal von Famintzin (1892) beschrieben. Die Zellen dieser Art sind bis zu 12 μm lang, stäbchenförmig, mesophil, aerob und Gram-negativ. Während ihres Wachstums sezernieren die Zellen lateral Schleim, der sich bei der Teilung der Zellen dichotom mitteilt, dabei bilden sich die für *Nevskia* typischen Kolonien in Rosettenform aus (Babenzien, H-D 1965, 1967, 1970; Pladdies et al. 2004). Sie leben chemoorganotroph. Als Substrate dienen ihnen hierbei beispielsweise Acetat und Lactat (Stürmeyer et al. 1998). Sie bevorzugen neutrale bis leicht saure Habitats mit einem pH zwischen 6 und 7. Die Zellen kommen vornehmlich in den oberen Schichten von Gewässern vor und zeichnen sich durch den Besitz einer hohen UV-Toleranz aus (Stürmeyer et al. 1998). Da die Zellen der Art *N. ramosa* weder chemolithotroph noch acidophil wachsen und auch nicht in der Lage sind Eisen(II)-Ionen zu oxidieren, wurde *N. ramosa*, obwohl phylogenetisch der nächste bekannte Verwandte, nicht mit in die vergleichenden Untersuchungen an den Zellen der Stämme ATCC 23270, SPIII/3 und DSM 2392 einbezogen.

2.5 Ziel dieser Arbeit

Um eine Reklassifizierung und Charakterisierung der Stämme SPIII/3 und DSM 2392 vornehmen zu können, wurden in dieser Arbeit vergleichende Untersuchungen zwischen den Zellen der Stämme ATCC 23270, SPIII/3 und DSM 2392 durchgeführt. Die drei Stämme wurden aus diesem Grunde auf Schwermetall- und Halotoleranz, pH-Optimum, Temperatur-Optimum und verwertbare Energiequellen untersucht.

3. Material und Methoden

3.1 Bakterien

Die Charakterisierung des bislang unter der Art *A. ferrooxidans* eingeordneten Stammes SPIII/3 wurden zum Vergleich parallel an einem engen Verwandten DSM 2392 und dem *A. ferrooxidans* Typstamm ATCC 23270 durchgeführt. Die Bakterienstämme werden in der Stammsammlung der AG Geomikrobiologie am Biozentrum Klein Flottbek und Botanischer Garten kultiviert. Folgende Stämme wurden verwendet:

Art	Stamm	Herkunft und Referenz
<i>A. ferrooxidans</i>	ATCC 23270	Kohleabraum (Temple and Colmer, 1951)
noch nicht eingeordnet	DSM 2392	Kohleabraum, USA, Mississippi, Calloway county, ehemals <i>A. ferrooxidans</i> m-1 (Leathen and Braley 1953)
noch nicht eingeordnet	SPIII/3	Cartagena, Spanien, als <i>A. ferrooxidans</i> SPIII/3 (Sand 1991, Kinzler 2000, Mitchell 2002, Kock 2003)

3.2 Medien

Für die Anzucht der Bakterien wurde eine Nährlösung modifiziert nach Mackintosh (1978) verwendet (s.u.). Das Medium wurde im Autoklaven sterilisiert. Bei Volumen kleiner als fünf Liter erfolgte die Sterilisation bei 112°C und 0,5 bar Überdruck für 30 min, für Volumen, die größer als fünf Liter waren, wurde die Sterilisationsdauer auf 1 h erhöht.

Tabelle 1: Nährmedium nach Mackintosh (1978) und Mineralsalzlösung

Lösung A:	(NH ₄) ₂ SO ₄	132,20	mg	Lösung B:	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	10	g
	H ₂ SO ₄ konz.	0,53	ml		Aqua dest.	ad 100	mL
	KH ₂ PO ₄	27,20	mg	Wasch- bzw. Mineralsalzlösung:			
	MgCl ₂ x 6H ₂ O	25,40	mg		Lösung A	900	mL
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	147,00	mg		Aqua dest.	100	mL
	MnCl ₂ x 4H ₂ O	120,00	µg	Nährlösung			
	ZnCl ₂	70,00	µg		Lösung A	900	mL
	CoCl ₂	120,00	µg		Lösung B	100	mL
	H ₃ BO ₃	32,00	µg				
	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	12,10	µg				
	CuCl ₂ x 2H ₂ O	85,20	µg				
	Aqua dest.	ad 900	mL				

Um eine Autoxidation des Eisens während des Autoklavierens der Lösung B zu verhindern, wurde sie mit konzentrierter Schwefelsäure auf einen pH von ca. 1,2 eingestellt. Die Lösungen A und B wurden getrennt voneinander autoklaviert und erst nach dem Abkühlen vereinigt. Der pH der fertigen Nährlösung betrug ca. 2,0. Ohne Eisen-(II)-Sulfat wurde die Lösung als Wasch- bzw. Mineralsalzlösung bei der Zellernte und für die Versuche auf verwertbare Energiequellen mit festen Substraten verwendet.

Reinheitskontrollen erfolgten mit den Nährmedien für die Anzucht von acidophilen, chemoorganotrophen Mikroorganismen nach Harrison jr. (1981) und für die Anzucht von neutrophilen, chemoorganotrophen Mikroorganismen (Merck 10685, DEV 1966).

3.3 Kulturführung

3.3.1 Stammkulturen

Die Stammkulturen wurden in einem 100 mL Erlenmeyerkolben mit 50 mL Nährlösung bei 28°C angezogen. Die Stammkulturen wurden mit 10% Inoculum (v/v) des jeweiligen Stammes aus der Stammsammlung beimpft. Die Inkubation erfolgte drei bis vier Tage im Dunkeln auf einem Bodenschüttler (Infors AG; 130 RPM). Die Kulturen galten als bewachsen, wenn die ursprünglich grünliche Lösung, durch die beginnende Eisen(II)-Oxidation, eine leichte Braunfärbung annahm. Diese Kulturen wurden anschließend für 3 bis 4 Wochen bei 17°C im Dunkeln gelagert (Friedrich 1991). Nach dieser Ruhephase wurden sie erneut überimpft.

3.3.2 Arbeitskulturen

Die Arbeitskulturen wurden in 1 L Erlenmeyerkolben mit 500 mL Nährlösung bei 28°C angezogen. Sie wurden mit 10% Inoculum v/v aus den Stammkulturen beimpft. Auch hier erfolgte die Inkubation bei 28°C im Dunkeln auf einem Bodenschüttler. Die Dauer der Inkubation richtete sich wie auch bei den Stammkulturen nach der Färbung der Kulturlösung. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Arbeitskulturen nicht gelagert, sondern gleich als Inokulum für die Untersuchungen genutzt.

3.3.3 Massenanzuchten

Die Massenanzucht der Bakterienstämme erfolgte in 5 L- oder 10 L-Steilbrustflaschen mit 4,5 L bzw. 9 L Nährlösung und 5% Inoculum aus den Zwischenkulturen bei 28°C mit aktiver Belüftung im Dunkeln. Die Inkubationszeiten entsprachen denen der Stammkulturen.

Anschließend wurden die Bakterienkulturen mittels Dialysefilter (Ultrafilter von Fresenius, Deutschland) durch Druckfiltration auf ein Volumen von 1 L eingengt (Gehrke 1998) und anschließend von ausgefallenen Oxidationsprodukten befreit (Heraeus, Biofuge A, 2 min bei 1000 x g), pelletiert (Heraeus, Biofuge A, 10 min bei 10000 x g) und anschließend in Mineralsalzlösung resuspendiert.

3.3.4 Reinheitskontrollen

Eine Kontrolle der Kulturen auf Kontaminanten erfolgte lichtmikroskopisch bei 800facher Vergrößerung. Als Kriterium hierbei galt, dass die sich im Sichtfeld befindlichen Bakterienzellen ein einheitliches Aussehen aufzuweisen hatten. Weiterhin wurden Proben aus der Kultur auf Harrison- und DEV-Agar (s.u.) überimpft und so speziell auf chemoorganotrophe, neutrophile und acidophile Verunreiniger überprüft. Die Inkubation der Platten erfolgte über einen Zeitraum von 14-21 Tage bei 28°C im Dunkeln bis zur Auswertung.

3.4 Morphologische Untersuchungen

3.4.1 Ultradünnschnitte

Um auch morphologische Hinweise auf die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den drei Stämmen zu bekommen, wurden transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von diesen Bakterien angefertigt.

Folgende Lösungen wurden für die Präparation der zu untersuchenden Stämme verwendet:

Na-Cacodylatpuffer:

Cacodylsäure Natriumsalz-Trihydrat	100 mM
Aqua dest.	250 mL
pH mit KOH auf 7,0	

Glutaraldehyd-Lösung (2,5% v/v)

Glutaraldehyd-Lösung (25%)	10 mL
Na-Cacodylatpuffer	90 mL

Agar-Agar-Lösung (2%)

Agar-Agar	2 g
Na-Cacodylatpuffer	100 mL

Nach dem Zusammengeben wurde die Lösung aufgeköcht. Nach Abkühlung auf ca. 60°C konnte die Lösung verwendet werden.

Osmiumtetraoxid-Lösung (1%)

Osmiumtetraoxid-Lösung (2%)	5 mL
Cacodylsäure Natriumsalz-Trihydrat-Lösung (200 mM, in Aqua dest., pH mit KOH auf 7,0)	5 mL

Spurr-Kunstharzgemisch (Spurr, 1969 modifiziert):

ERL 4221 D (Vinylcyclohexendioxid)	5 g
D.E.R. 736 (Diglycidäther von Propylenglycol)	3 g
NSA (Nonenyl-Bernsteinsäureanhydrid)	13 g
DMAE (Dimethylaminoäthanol)	0,2 g

Uranylacetat-Lösung (gesättigt):

Uranylacetat (Merck) bis zur Sättigung	
Aqua dest.	10 mL

Bleicitrat-Lösung nach Reynolds (1963):

Bleinitrat	1,33 g
Tri-Natriumcitrat-dihydrat	1,76 g
1N NaOH	8 mL
Aqua dest.	80 mL

Zur Herstellung des Spurr-Kunstharzgemisches wurden zunächst ERL 4221 D, der Weichmacher D.E.R. 736 und der Härter NSA gut vermischt, danach wurde der Beschleuniger DMAE zugegeben. Das Gemisch wurde 30 min gründlich durchmischt und konnte im Gefrierfach (-20°C) mehrere Monate oder bei Raumtemperatur 2 bis 3 Tage aufbewahrt werden.

Zur Herstellung von Ultradünnschnitten für die Transmissionselektronenmikroskopie wurden die Bakterienzellen fixiert und entwässert (Sabatini et al. 1963). Die Zellen stammten aus verschiedenen Arbeitskulturen, die 5 Tage mit Eisen(II)-Sulfat bzw. 2 Monate mit elementarem Schwefel als Substrat bei 28°C auf einem Schüttler im Dunkeln inkubiert worden waren. Bei der Kultur die mit Eisen(II)-Sulfat gewachsen war, wurde zunächst ausgefallenes Eisenhydroxyd abzentrifugiert (Heraeus, Biofuge A, 2 min bei 1000 x g). Die Zellen aus den verschiedenen Kulturen wurden pelletiert (10 min bei 10000 x g), die Pellets in Mineralsalzlösung gewaschen und anschließend in 10 mL Mineralsalzlösung resuspendiert. Aus der Zellsuspension wurden je 1,5 mL in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 8000 x g für 10 min zentrifugiert (Heraeus, Biofuge A). Die Pellets wurden in einer Lösung aus gleichen Teilen Mineralsalzlösung und Glutaraldehyd-Lösung (2,5%) resuspendiert und für 30 min inkubiert. Dieser Schritt sollte einen pH-Schock der Zellen vermeiden, da das

Glutaraldehyd einen neutralen pH von 6,80 hatte. Nach den 30 min wurden die Proben erneut zentrifugiert (10 min bei 8000 x g) und der Überstand verworfen. Diesmal wurden die Pellets in unverdünnter Glutaraldehyd-Lösung resuspendiert. Glutaraldehyd bewirkt eine Vernetzung von Zellproteinen und dient der Erhaltung und Stabilisierung von Zellstrukturen. Nach weiteren 90 min wurde das Glutaraldehyd durch dreimaliges Waschen der Zellen mit Na-Cacodylatpuffer wieder entfernt (8000 x g, je 10 min). Die Zellpellets wurden anschließend in die Agar-Agar-Lösung überführt, mit einer Pasteurpipette auf Parafilm ausgeblasen und nach Erstarren in kleine Stücke geschnitten. Die Agarstücke wurden für die Kontrastierung über Nacht in Osmiumtetroxid-Lösung gelegt. Osmiumtetroxid lagert sich an Doppelbindungen membrangebundener, ungesättigter Fettsäuren, wodurch die Zellstrukturen durch Kontrasterhöhung sichtbar gemacht werden. Nach viermaligem Waschen in Na-Cacodylatpuffer wurden die Zellen mittels einer aufsteigenden Acetonreihe entwässert:

- Einwirkzeit - je 10 min bei 4°C in 15%, 30%, 50%, 70%, 90% und 100% Aceton
- je 2 x 10 min bei Raumtemperatur in 100% Aceton

Die Proben wurden dann sukzessiv in Spurr-Kunstharzgemisch überführt:

- 2 h: Spurr-Kunstharzgemisch + 100% Aceton (1:2, v/v),
- 2 h: Spurr-Kunstharzgemisch + 100% Aceton (1:1, v/v),
- über Nacht: Spurr-Kunstharzgemisch + Aceton 100% (2:1, v/v),
- 4 h: reines Spurr-Kunstharzgemisch.

Anschließend wurden die Proben in die Einbettungsformen (Fa. Sigma, 26-2x) überführt. Die Polymerisation erfolgte über einen Zeitraum von 24 h bei 70°C.

Die Ultradünnschnitte wurden an einem Ultramikrotom (Fa. Reichert-Jung, Ultracut E) mit einem Diamantmesser (Fa. Diatome) angefertigt. Die 70 bis 90 nm dünnen Schnitte wurden anschließend auf Kupfernetze (Fa. Veco) aufgenommen, die mit einem Kunststoff (0,25% Movital in Chloroform) beschichtet waren.

Die Nachkontrastierung der Schnitte erfolgte für 10 min mit Uranylacetat-Lösung und danach für 10 min mit Bleicitrat-Lösung. Uranylacetat lagert sich unter anderem an die Phosphatgruppen der Nucleinsäuren und an Proteinen, Bleicitrat bewirkt eine Kontrasterhöhung von Membranen, Proteinen und Nucleinsäuren, indem das Bleikation an Phosphat-, Carboxyl- und Sulfhydrylgruppen sowie an Osmiumoxide bindet.

Mikroskopiert und fotografiert wurden die Schnitte am Transmissionselektronenmikroskop der Firma Leica-Zeiss (Leo 906E).

3.4.2 Gram-Eigenschaften

Zur Bestimmung der Gram-Eigenschaften wurden die zu färbenden Zellen in einem kleinen Wassertropfen auf einen Objektträger gegeben. Weiterhin wurden *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* als Referenzbakterien auf den Objektträger aufgetragen. Bei der Gramfärbung werden die Zellen durch Karbolgentianaviolett und Lugol'sche Lösung dunkelviolett gefärbt, gramnegative Zellen entfärben sich beim differenzieren mit Ethanol schneller als die grampositiven, diese bleiben dunkelviolett. Um die entfärbten gramnegativen Bakterien im Mikroskop besser sehen zu können, werden sie mit Safranin gegengefärbt. Die gefärbten Präparate wurden unter einem Lichtmikroskop bei 800-facher Vergrößerung mit Immersionsöl betrachtet (Madigan 2003).

3.4.3 Begeißelung

Bei der Geißelfärbung nach Blenden und Goldberg (Blenden und Goldberg, 1965) werden die während der log-Phase geerntet Bakterienzellen, auf einen Objektträger aufgetragen und luftgetrocknet. Anschließend werden die Geißeln der Bakterien mit einer Beizlösung zum Quellen gebracht, um sie für eine mikroskopische Untersuchung sichtbar zu machen. Um diesen Effekt noch zu verstärken wurde in einem zweiten Schritt die gequollene Geißel zur Kontrasterhöhung mit einer Silbernitratlösung gefärbt. Die Proben wurden unter einem Lichtmikroskop bei 800-facher Vergrößerung auf Geißeln untersucht.

3.5 Analytische Nachweisverfahren

Um die Stoffwechselaktivität bzw. das Wachstum der Bakterienkulturen zu überwachen, wurden verschiedene Techniken angewandt. Soweit möglich, wurde der Substratverbrauch als Parameter für die Aktivität der Bakterienstämme herangezogen.

3.5.1 Eisenbestimmung

Die Eisenbestimmung erfolgte nach den Deutschen Einheitsverfahren zur Wasseruntersuchung (DEV 1984) mit Hilfe des Phenanthrolin-Tests. Eisen-(II)-Ionen bilden mit 1,10-Phenanthrolin einen roten Farbkomplex, der spektrophotometrisch quantifizierbar ist (Metrohm 622 Photometer, 492 nm). Die Konzentration von Eisen-(III)-Ionen wurde aus dem Gesamtgehalt an Eisenionen errechnet, der zuvor an Parallelproben nach Reduktion mit Hydroxylamin zu ermitteln war. Als Eichstandard diente Eisen-(II)-Sulfat-Heptahydrat (Eichbereich 0-40 mg Eisen-(II)-Ionen/L).

3.5.2 Sulfatbestimmung

Für die Ionenaustausch-Chromatografie wurden aus den zu untersuchenden Kulturen Proben entnommen und diese 1:10 mit Aqua bideion. verdünnt (v/v). Anschließend wurden die Proben 1:1 mit Phosphatpuffer (40% 50 mM KH_2PO_4 , 60% 50 mM K_2HPO_4 , pH 7) versetzt und abzentrifugiert, um einen pH-bedingten Ausfall von Salzen in den Säulen zu vermeiden. Der Überstand wurde zur Messung der Anionen (IC DX 500, Gradientenpumpe GP 40, Autosampler AS 3500, Suppressor ASRS-1, Detektor CD 20 (Leitfähigkeit), Software Peak Net Version 4.3, Dionex) verwendet. Die stationäre Phase bestand aus einer Vorsäule (AG9-SC/4 mm) und 2 Trennsäulen (AS9-SC/4mm). Das Injektionsvolumen betrug 50 μl . Verwendet wurden Methoden, wie sie für dieses Trennsystem zur Messung von Standardionen (Chlorid, Nitrit, Nitrat, Phosphat und Sulfat) vom Hersteller (Dionex) vorgeschlagen werden. Das Laufmittel (Eluent) besteht aus in Aqua bideion. gelösten 1,8 mM Na_2CO_3 und 1,7 mM NaHCO_3 . Der pH dieser Lösungen liegt zwischen 10,5 und 11. Die Durchflussrate beträgt 1,50 mL/min, und die Hintergrundleitfähigkeit des Eluenten wird durch den Suppressor bei einer Stromstärke von 100 mA auf etwa 21 μS reduziert. Die Laufzeiten liegen für Nitrit bei 3,2 min, für Nitrat bei 3,6 min, für Sulfat bei 5,6 min. Zur Eichung wurden wässrige Standards (Aqua bideion.) der Kalium- oder Natriumsalze mit Konzentrationen von 100-300 μM verwendet.

3.5.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde in einer Thoma-Zählkammer (Tiefe: 0,02 mm; Fl. Kleinquadrat: 0,0025 mm^2) bei einer Vergrößerung von 320x unter einem Lichtmikroskop bestimmt.

3.6 Physiologische Untersuchungen

Für die Beschreibung einer Art ist es notwendig, neben den morphologischen Untersuchungen auch die physiologischen Charakteristika zu bestimmen. Sämtliche physiologischen Untersuchungen wurden in 100 mL Erlenmeyerkolben mit 50 mL einer modifizierten Nährlösung durchgeführt (s.u.). Die Zellen der Arbeitskultur wurden nach der Inkubationszeit mit der Zentrifuge (Kontron/Hermile: Centikon H-401; Rotor: Kühl-Zentrifugenrotor KA-12.500; bei 10°C, 10.000 x g für 10 min) geerntet und das Pellet zweimal mit Mineralsalzlösung gewaschen. Alle Versuchskolben für die physiologischen Tests wurden mit 1×10^6 Zellen pro mL beimpft. Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Inkubation bei 28°C im Dunkeln auf einem Bodenschüttler bei 130 Upm. Alle Experimente wurden an zwei

bis drei Parallelen durchgeführt, eine unbeimpfte Kontrolle wurde jeweils mit untersucht. Sofern nicht anders erwähnt, wurden sämtliche Lösungen vor ihrer Verwendung 30 Minuten lang bei 112°C und 0,5 bar Überdruck autoklaviert.

3.6.2 Substratspektrum

Als Grundlage für die Versuche zum Substratspektrum diente die Lösung A (s. Tabelle 1) ohne Eisen(II)-Sulfat bzw. die Mineralsalzlösung. Diese Lösungen wurden durch verschiedene potentielle Nährstoffe ergänzt. Hierbei handelte es sowohl um organische als auch anorganische Substrate.

Organische Substrate:

Die organischen Substrate wurden in einer sehr geringen Konzentration der Lösung A zugesetzt (1 mM), da sie in einer zu hohen Konzentration möglicherweise einen hemmenden Effekt auf die Bakterien haben können. Die organischen Substrate wurden in einer 10fach konzentrierten Stammlösung angesetzt, der pH dieser Lösung betrug 2,00. Es wurden je 5 mL aus dieser Stammlösung steril den 45 mL der Lösung A anstatt des Eisen(II)-Sulfates zugesetzt:

Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	29,41 g/L
Na-Formiat	6,80 g/L
Na-Succinat	27,01 g/L
Na-Pyruvat	11,01 g/L
D-Glucose-Monohydrat	19,82 g/L
Na-Acetat	8,20 g/L

Die Stammlösungen wurden autoklaviert und bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Der Nachweis des Wachstums erfolgte mit Hilfe der Zellzahlbestimmung.

Anorganische Substrate:

Die löslichen, anorganischen Substrate wurden im gleichen molaren Verhältnis wie die Eisen(II)-Ionen der Nährlösung zugesetzt. Erneut wurde hier eine 10fach konzentrierte Stammlösung hergestellt. Es wurden je 5 mL aus dieser Stammlösung statt des Eisen(II)-Sulfates den 45 mL der Lösung A hinzugefügt.

K-Thiocyanat	20,72 g/L
Na-Thiosulfat	69,00 g/L
Na-Sulfit	35,04 g/L
Na-Tetrathionat	84,09 g/L

Die anorganischen Stammlösungen wurden steril filtriert (Syr. Filter 0,22µ; ETO Steril 10/00; CAT. MSP000910; LOT. ROMN09634).

Als weitere anorganische Substrate wurden folgende Feststoffe verwendet:

Elementar Schwefel	10,00	g/L
Pyrit (FeS ₂)	10,00	g/L
Chalkopyrit (CuFeS ₂)	10,00	g/L
Galena (PbS)	10,00	g/L
Sphalerit (ZnS)	10,00	g/L

Der elementare Schwefel wurde direkt in Kolben mit der Mineralsalzlösung eingewogen. Die Kolben wurden anschließend autoklaviert und nach dem Abkühlen beimpft. Die Kontrolle des Wachstums erfolgte über Zellzahlbestimmung und Sulfatbestimmung. Um sicherzugehen, dass die Bakterienstämme tatsächlich in der Lage waren, mit elementarem Schwefel als Energiequelle zu wachsen, wurden sie mehrmals auf neues Schwefelmedium überimpft und regelmäßig Reinheitskontrollen durchgeführt.

Die Sulfidminerale wurden als Einzelkristalle bezogen und hatten je eine Kornfraktionsgröße von 50 bis 125 µm. Die Minerale mussten vor ihrer Verwendung von Oxidationsprodukten und Schwefelverbindungen befreit werden. Das säureunlösliche Mineral Pyrit wurde hierzu 30 min lang in 6 N HCl gekocht und je drei Mal mit A. dest. und Aceton gewaschen (Moses et al. 1987 modifiziert, Boon et al. 1995, Schippers et al. 1999). Die säurelöslichen Minerale Chalkopyrit, Galena und Sphalerit wurden mit doppeltem Volumen Waschlösung (0,1 M EDTA und 0,4 M NaOH w/v) überschichtet und für 10 min gerührt. Anschließend wurde die Waschlösung abgegossen und jedes Mineral drei Mal mit doppeltem Volumen Aqua dest. gewaschen. Im Anschluss wurde es noch zwei Mal mit doppeltem Volumen Aceton gewaschen (Bauer und Caude, 1985). Nach ihrer Behandlung wurden alle Minerale luftgetrocknet und anschließend 48 h lang bei 115°C in luftdicht verschlossenen, mit Stickstoff begasten Schottflaschen sterilisiert. Die so vorbereiteten Minerale konnten in den Vakuumflaschen bis zu ihrer Verwendung gelagert werden, da in diesen keine Oxidation durch Luftsauerstoff stattfindet. Die sterilisierten Feststoffsubstrate wurden unter sterilen Bedingungen in die autoklavierten Kolben mit 50 mL der Mineralsalzlösung gegeben. Der Nachweis des Wachstums erfolgte durch eine Bestimmung der Zellzahl und indirekt durch die Messung der Oxidationsrate mit Hilfe der Eisenbestimmung (Pyrit, Chalkopyrit) bzw. Sulfatbestimmung (S⁰, Sphalerit).

3.6.2.1 Toleranz gegenüber organischen Verbindungen

In Ergänzung zu den Versuchen zum Substratspektrum wurde untersucht, in wie weit die Bakterien-Stämme überhaupt in der Lage sind, in der Gegenwart von organischen Verbindungen ihre Stoffwechselaktivität aufrecht zu erhalten. Um dies zu überprüfen, wurde die Nährlösung nach Mackintosh (1978) jeweils mit 100 bzw. 500 µm Glucose, Acetat, Succinat, Pyruvat bzw. Citrat versehen. Da die Toxizität der organischen Säuren auf ihrem pk-Wert beruht (Pronk, et. al, 1991), wurden neben den verschiedenen Konzentrationen auch verschiedene pH-Werte eingestellt (pH 1,66 bzw. 2,10). Die Kontrolle des Wachstums erfolgte indirekt über die Messung der Oxidationsrate mit Hilfe der Eisenbestimmung, stichprobenartig wurden parallel dazu die Zellzahlen bestimmt.

3.6.4 Halotoleranz

Zur Bestimmung der Halotoleranz wurden die verschiedenen Stämme unterschiedlichen Konzentrationen (10-5000 mM) von Natriumchlorid ausgesetzt. Als Medium diente die nach Mackintosh (1978) modifizierte Nährlösung mit Natriumchlorid. Die Kontrolle des Wachstums erfolgte indirekt durch die Messung der Oxidationsrate mit Hilfe der Eisenbestimmung, stichprobenartig wurden parallel dazu die Zellzahlen bestimmt.

3.6.5 Schwermetall-Toleranz

Als Basis für die Versuche zur Ermittlung der Schwermetall-Toleranz diente die Nährlösung nach Mackintosh (1978). Bei diesen Schwermetallen handelte es sich um Kobalt(II)-, Kupfer(II)-, und Nickel(II)-Ionen. Die Metallionen wurden in Form von Sulfaten den Lösungen beigefügt. Es wurden verschiedene Konzentrationen der Schwermetalle getestet. Diese lagen zwischen 1 und 60 g pro Liter. Die Kontrolle auf Oxidationsrate erfolgte zunächst über Sichtkontrolle und in einem zweiten Schritt über die Eisenbestimmung. Bei der Sichtkontrolle galt als Kriterium für eine noch tolerierte Konzentration des jeweiligen Metallions, dass es im Kolben durch Oxidation der Eisen(II)-Ionen zu einem Farbumschlag der Kultur von grün nach braun kam.

3.6.6 pH-Optimum

Als Grundmedium wurde die Nährlösung nach Mackintosh (1978) eingesetzt. Es wurden verschiedene pH zwischen 1,00 und 2,40 untersucht. Eingestellt wurde der pH des zu beimpfenden Mediums mit Schwefelsäure bzw. Kalilauge. Die Kontrolle des Wachstums

erfolgte indirekt über die Messung der Oxidationsrate mit Hilfe der Eisenbestimmung, stichprobenartig wurden parallel dazu die Zellzahlen bestimmt.

3.6.7 Temperatur-Optimum

Als Grundmedium wurde die Nährlösung nach MacKintosh (1978) eingesetzt. Die Versuche zum Temperatur-Optimum wurden mit Hilfe temperierbarer Schüttel-Wasserbädern durchgeführt. Die untersuchten Temperaturen für die Versuche lagen zwischen 4°C und 42°C. Die Kontrolle des Wachstums erfolgte indirekt über die Messung der Oxidationsrate mit Hilfe der Eisenbestimmung, stichprobenartig wurden parallel dazu die Zellzahlen bestimmt.

3.7 Molekularbiologische Untersuchungen

3.7.1 Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)

Die DGGE kann herangezogen werden, um verwandtschaftliche Beziehungen zwischen Bakterien zu analysieren. Dabei werden genetische Unterschiede zwischen verschiedenen Bakterienstämmen anhand distinkter DNA-Banden im Gel sichtbar. Aus der genomischen DNA wird mit Hilfe ausgewählter Primer mit der PCR-Technik ein bis zu 500 Basenpaar langes 16S rDNA-Fragment amplifiziert. In einem Polyacrylamidgel mit einem linearen Harnstoff-Formamid-Gradienten können die erhaltenen Amplifikate nach ihren sequenzabhängigen Schmelzeigenschaften aufgetrennt werden (Fisher und Lermann, 1979; Fisher und Lermann, 1983).

3.7.1.1 DNA-Extraktion

Für die Durchführung der DGGE wurde aus den zu untersuchenden Stämmen die DNA isoliert. Die geschah nach der Methode von Jayarao et al. (1991). Dazu wurden folgende Lösungen verwendet, die, wenn nicht anders erwähnt, für 30 min bei 112°C und 0,5 bar im Autoklaven sterilisiert wurden:

TE-Pufferlösung

Tris-HCl (Serva)	2,42	g
Na-EDTA (Merck)	73,00	g
MilliQ-Wasser	ad	1000 mL
pH 7,8 mit 10 N HCl		

Lysozymlösung (wurde durch einen Spritzenfilter (Roth, 0,2 µm Porenweite) sterilfiltriert)

Lysozym (Sigma)		10,00	mg
MilliQ-Wasser	ad	1,00	mL

1x TAE-Pufferlösung

Tris-HCl		9,69	g
Na-Acetat (Merck)		1,64	g
Na-EDTA		14,61	mg
MilliQ-Wasser	ad	1000	mL
pH 8,0 mit Essigsäure			

SDS-Lösung

Natriumdodecylsulfat		20,00	g
1 x TAE-Puffer	ad	100	mL

Proteinase K-Lösung (wurde durch einen Spritzenfilter (Roth, 0,2 µm Porenweite) sterilfiltriert)

Proteinase K (Peqlab)		20,00	mg
MilliQ-Wasser	ad	1,00	mL

NaCl-Lösung

NaCl		292,00	g
MilliQ-Wasser	ad	1000	mL

Na-Acetat-Lösung

Na-Acetat		82,03	g
MilliQ-Wasser	ad	1000	mL

Agarose-Gel (0,8%)

1x TAE-Pufferlösung		100	mL
Low EEO Agarose		0,80	g

Schwerelösung (wurde durch einen Spritzenfilter (Roth, 0,2 µm Porenweite) sterilfiltriert)

Bromphenolblau		0,25	g
Saccharose		40,00	g
MilliQ-Wasser	ad	100	mL

Ethidiumbromid-Färbelösung (wurde im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert)

Ethidiumbromid		300,00	µg
MilliQ-Wasser	ad	100	mL

Weiterhin wurden eine Phenol-Chloroform-Lösung im Verhältnis 1:1 (v/v) und eine Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung im Verhältnis 24:1 (v/v) angesetzt. Zur Herstellung von 70%igem Ethanol wurde Ethanol reinst mit MilliQ-Wasser verdünnt.

Bei der Methode nach Jayarao (1991) handelte es sich um eine enzymatische Zellyse mit anschließender, alkoholischer Fällung der DNA. Dazu wurden aus der zu untersuchenden Kultur 1,5 mL Kulturflüssigkeit entnommen, in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und in einer Tischzentrifuge (Heraeus Sepatech, Biofuge A) für 5 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis sich im Reaktionsgefäß ein gut sichtbares Zellpellet zeigte. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1 mL TE-Pufferlösung gewaschen und dann in 325 µl TE-Pufferlösung resuspendiert.

Um die bakteriellen Zellwände zu lysieren, wurden nun 25 µl Lysozymlösung hinzugefügt und dieser Ansatz für 30 min bei 37°C in einem Heizblock inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden 40 µl SDS-Lösung und 6 µl Proteinase K-Lösung hinzu gegeben und der Ansatz erneut auf den Heizblock (37°) gestellt, diesmal für 60 min. Die Proteinase K führt unter anderem zum Abbau von DNA assoziierten Proteinen. Um nach der Lysis der Zellen und dem proteolytischen Verdau der Zellproteine störende Zelltrümmer auszufällen, wurden 212 µl einer 5 M Natriumchlorid-Lösung hinzugegeben. Diese wurden anschließend in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (10 min bei 10000 x g). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 650 µl einer Phenol-Chloroform-Lösung vermischt. Der Ansatz wurde mehrmals umgeschüttelt und 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die Oberphase wurde ein weiteres Mal in ein neues Reaktionsgefäß überführt, und mit 600 µl der Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung vermischt, um überschüssiges Phenol zu extrahieren, anschließend erneut 10 min lang bei 10000 x g zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um die DNA zu fällen, wurden nun 1,5 Volumenanteile eiskalten Ethanols reinst und 30 µl Na-Acetatlösung hinzu gegeben. Um eine möglichst hohe Ausbeute an DNA zu erhalten, wurde dieser Ansatz über Nacht bei -20°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Ansatz 30 min bei 12000 g zentrifugiert, um die DNA zu pelletieren. Die DNA wurde dann einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 15 µl des TAE-Puffers aufgenommen und bis zu seiner Verwendung bei -20°C gelagert. Die Kontrolle des Erfolges der DNA-Extraktion erfolgte mit Hilfe eines Agarose-Gels (0,8%). Zum Gießen des Gels wurde die Agarose zunächst verflüssigt und anschließend in einem temperierten Wasserbad auf 60°C abgekühlt.

Gegossen wurde das Gel in eine horizontale Elektrophoresekammer (Biorad, Wide Mini-Sub Cell) mit Gelkamm (Biorad). Nach Aushärten des Gels wurde die Kammer mit 1x TAE-Puffer gefüllt und der Kamm vorsichtig entfernt. In die Geltaschen wurde jeweils ein Gemisch aus 1 µL Schwerelösung und 1,5 µL DNA-Extrakt pipettiert. Zur Auftrennung der DNA-Extrakte wurde die Gelkammer an eine Spannungsquelle (Biorad, 3000xi) angeschlossen und für 45 min eine Spannung von 68 V angelegt. Zum Detektieren der Banden wurde das Gel nach der Elektrophorese zunächst für 20 min in einem Ethidiumbromid-Färbebad inkubiert. Die Banden wurden anschließend auf einem Transilluminator (Phase, TFX 35-M) sichtbar gemacht und mit einer Digitalkamera (Sony, Variocam) erfasst und auf Fotopapier ausgedruckt (Sony, Video Graphic Printer VP-890-CE).

3.7.1.2 Polymeraseketten-Reaktion (PCR)

Die PCR wurde in einem 0,5 mL PCR-Tube (Peqlab, ThermoTube PCR Tube) durchgeführt. Dazu wurde in jedes PCR-Tube das Reaktionsgemisch bestehend aus Primer, Taq-Polymerase (Peqlab, SAWADY Taq-DNA-Polymerase), Desoxynukleosidtriphosphaten (Peqlab, peqGold dNTP-Mix), Reaktionspuffer Y (Peqlab) und PCR-Wasser (Sigma) in folgenden Konzentrationen vorgelegt:

1x Reaktionsgemisch

10x Reaktionspuffer Y	5,0 µl
dNTP-Mix (10mM pro Nukleotid)	1,0 µl
MgCl ₂ -Lösung (Peqlab, 25 mM)	2,0 µl
Oligonukleotidprimer 907 R (25 pmol/µl)	2,0 µl
Oligonukleotidprimer 341 F GC (25 pmol/µl)	2,0 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
Insgesamt:	12,5 µl

Für die Durchführung der PCR wurden nun in das PCR-Tube neben den 12,5 µl des 1x Reaktionsgemisches noch 33,5 µl PCR-Wasser vorgelegt und mit 2 µl DNA-Extraktes des jeweiligen Bakterienstammes vermischt. Genauere Angaben zum Primer und den theoretischen Hintergründen zur PCR sind in der Diplomarbeit von Mitchell (2002) nachzulesen. Bei dem verwendeten Programm für die PCR handelte es sich um ein so genanntes Touch-down-Programm:

1-5. Zyklus:	2 min	95°C
	40 s	64°C
	1 min	72°C
6-16. Zyklus	40 s	95°C
	40 s	65°C (je Zyklus -1°C)
	1 min	72°C
17-30. Zyklus	40 s	95°C
	1 min	55°C
	1 min	72°C
31. Zyklus	45 s	92°C
	1 min	55°C
	5 min	72°C

Zur Kontrolle der PCR wurden die amplifizierten Fragmente auf ein 2%iges Agarose-Gel aufgetragen. Hierfür wurden folgende Lösungen verwendet:

Agarose-Gel (2,0 %)

1x TAE-Puffer	100	mL
Low EEO Agarose	2,00	g

Neben den PCR-Produkten wurde noch eine DNA-Leiter auf das Gel aufgetragen (Amresco, PCR DNA-Marker). Diese Leiter repräsentiert auf dem Gel Basenpaar-Längen zwischen 50 und 2000 bp. Zur Durchführung wurden 1,5 µL Schwerelösung und 1,5 µL des jeweiligen PCR-Produktes zusammen in eine Tasche des Agarose-Geles pipettiert und für 65 min eine Spannung von 68 V angelegt. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte, wie es schon für die Kontrolle der DNA-Extraktion beschrieben worden ist.

3.1.7.3 Durchführung der DGGE

Für die Vorbereitung des DGGE-Gels wurden folgende Lösungen benötigt:

Stammlösung 1 (Acrylamidlösung mit 0% Harnstoff-Formamid):

40% Acrylamidlösung (Amresco, 37,5 AA :1 BIS)	15,00	mL
1x TAE-Puffer	85,00	mL

Stammlösung 2 (Acrylamidlösung mit 100% Harnstoff-Formamid):

40% Acrylamidlösung (Amresco, 37,5 AA :1 BIS)	15,00 mL
Formamid (Applichem)	40,00 mL
Harnstoff (Merck)	42,00 g
1x TAE-Pufferlösung	35,00 mL

Ammoniumpersulfatlösung (APS)

Ammoniumpersulfat (Serva)	1 g
MilliQ-Wasser	10 mL

Für das Beladen der Geltaschen wurde weiterhin ein DGGE-Ladepuffer benötigt:

Bromphenolblau	0,05 g
Saccharose	40,00 g
Na-EDTA	2,92 g
Natriumdodecylsulfat	0,50 g
MilliQ-Wasser	ad 100 mL

Beide Acrylamidstammlösungen wurden vor ihrer Verwendung filtriert und anschließend 10 min lang im Vakuum entgast.

Die Berechnung der einzusetzenden Volumina der Stammlösungen für die Erstellung eines 40-70%igen Gradienten erfolgt mit Hilfe der standardisierten Formel nach Muyzer et al. (1998):

$$\frac{(100 - X) \times V}{100} + \frac{X \times V}{100} = V_{\text{Stammlösung 1}} + V_{\text{Stammlösung 2}} = V_{X\%}$$

wobei X jeweils den minimalen bzw. den maximalen Wert des Gradienten in Prozent angibt. Da das Gelvolumen insgesamt 42,0 mL betrug, wurde je ein Ansatz mit 21,0 mL 40%iger Acrylamidlösung (12,6 mL Stammlösung 1 + 8,4 mL Stammlösung 2) und ein Ansatz mit 21 mL 70%iger Acrylamidlösung (6,3 mL Stammlösung 1 + 14,7 mL Stammlösung 2) in Greiner-Röhrchen vorgelegt. Für die DGGE wurde eine vertikale Pufferkammer (Biorad, Protean II) verwendet, die in einem 10 L Wasserbad installiert war. Die verwendeten Glasplatten, Spacer und der Gelkamm (Biorad, 25 Taschen 1,5 mm) der Anlage wurden vor Beginn der Versuche mit Ethanol gereinigt. Die auf Eis gelagerten Greiner-Röhrchen mit den beiden vorgelegten Acrylamid-Lösungen wurden nach Zugaben von 50 µL APS und 10 µL N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED, gebrauchsfertig bezogen von Biorad) in den Gradientenmischer gegeben. Nachdem der Gradient durch einen Schlauch mit aufgesetzter

Injektionsnadel zwischen die Glasplatten eingelaufen war, konnten 10 mL Sammelgel mit 30 μ L APS und 15 μ L TEMED vermengt und vorsichtig über das noch flüssige Trenngel geschichtet werden. Das Sammelgel entsprach in seiner Zusammensetzung der Stammlösung I. Nach 120 min bei Raumtemperatur war das Gel auspolymerisiert. Um ein Einstürzen der fragilen Gel-Taschen beim Entfernen des Gelkammes zu verhindern, wurde 1x TAE-Puffer am oberen Rand zwischen die Glasplatten pipettiert. Die Geltaschen wurden nun mit 15 μ L des PCR-Produktes und 30 μ L DGGE-Ladepuffer befüllt. Leere Taschen wurden mit 25 μ L des DGGE-Ladepuffers befüllt, um eine gleichmäßige Verteilung der Ionenkonzentration über das gesamte Gel zu gewährleisten. Das mit den Proben beladene Gel wurde nun langsam in die bereits auf 60°C temperierte Pufferkammer eingesetzt. Nun konnte die Spannungsquelle (Biorad, 3000xi) angeschlossen werden. Um ein Ausspülen der Proben zu verhindern, wurde die Elektrophorese 10 min bei 200 V durchgeführt. Nachdem die DNA-Moleküle in das Gel eingelaufen waren, erfolgte eine Absenkung der Spannung auf 100 V und eine peristaltische Pumpe (Masterflex) wurde zur Durchmischung des Puffers zugeschaltet. Die angelegte Spannung wurde über einen Zeitraum von 18 Stunden konstant gehalten.

Nach Beendigung der Gelelektrophorese konnte die obere Glasplatte unter Verwendung von Aqua dest. vorsichtig entfernt werden. Um ein Einreißen des Gels zu vermeiden, wurden danach überstehende Taschenelemente abgetrennt. Das Gel konnte nun zur Anfärbung der Banden im Ethidiumbromid-Färbebad 10 min lang inkubiert werden. Nach kurzem Schwenken in einem Aqua dest.-Bad wurde das Gel zur Betrachtung und Fotografie auf den Transilluminatortisch gebracht.

3.7.2 Cytochromdifferenz-Spektren

Mit Hilfe von Cytochromdifferenz-Spektren sollte untersucht werden, inwieweit sich die drei Bakterienstämme in ihrer Cytochrom-Ausstattung unterscheiden. Hierfür wurden zunächst Massenzüchtungen der jeweiligen Bakterienstämme durchgeführt (siehe 3.3.3). Für den Zellaufschluss wurden folgende Lösungen verwendet:

Lösung 1:	Tris	1,21	g
	Saccharose	256,0	g
	NH ₄ CL	0,535	g
	DTE	0,154	g
	Aqua dest.	ad	1000 mL
	pH-Wert mit 1N HCl auf pH 7,5		

Lösung 2:	Lysozym		8,0	mg
	Aqua dest.	ad	1	mL
Lösung 3:	Na ₂ EDTA		37,22	mg
	Aqua dest.	ad	10	mL
	pH-Wert mit 1n HCl auf pH 7,5			

Die Bakterienzellen aus den Massenanzuchten (ca. 5×10^{12} Zellen) wurden wie oben beschrieben geerntet und anschließend pelletiert (Heraeus, Biofuge A, 10 min bei 10000 x g). Die Pellets wurden in 861 μ L der Lösung 1 resuspendiert und mit 56 μ L von Lösung 2 und 82,5 μ L von Lösung 3 versetzt. Die Proben wurden anschließend für 30 min auf Eis gestellt. Der endgültige Zellaufschluss wurde nach den 30 min mit einer French-Press (American-Instrument Company) mit der kleinen Druckzelle bei 100 MPa durchgeführt (3-4x). Nach dem Zellaufschluss wurden Zelltrümmer mit einer Tischzentrifuge bei 13.000 x g für 30 min sedimentiert. Die Cytochromdifferenz-Spektren wurden in dem Zweistrahlphotometer MPS 2000 (Shimadzu) aufgenommen. Das Spektrum wurde für einen Wellenlängenbereich von 390 bis 700 nm aufgenommen. Anschließend wurde die gleiche Probe durch Zugabe einiger Kristalle Na-Dithionit reduziert und das Spektrum erneut aufgezeichnet. Zum Vergleich wurden auch Cytochromdifferenz-Spektren von intakten Zellen aufgenommen.

4. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur physiologischen, morphologischen und molekularbiologischen Charakterisierung des in der Stammsammlung der AG Geomikrobiologie an der Universität Hamburg als *A. ferrooxidans* eingeordneten Stammes SPIII/3 und seines genetisch nahen Verwandten Stamm DSM 2392 durchgeführt. Die physiologischen Untersuchungen sollten Ergebnisse liefern, die eine Unterscheidung zwischen Zellen des Stammes SPIII/3 und denen des *A. ferrooxidans* Typstammes ATCC 23270 ermöglichen. Die Morphologie der Zellen wurde mittels mikroskopischer Techniken untersucht. Mit Hilfe molekularbiologischer und biochemischer Methoden wurde nach Unterschieden der Zellen bezüglich der 16S rDNA und der Cytochromausstattung gesucht.

4.1 Morphologische Untersuchungen

4.1.1 Ultradünnschnitte

Von Zellen der *A. ferrooxidans* Bakterienstämme SPIII/3, DSM 2392 und ATCC 23270 wurden Ultradünnschnitte angefertigt und mit dem Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) untersucht, um Zellformen sowie -strukturen sichtbar zu machen.

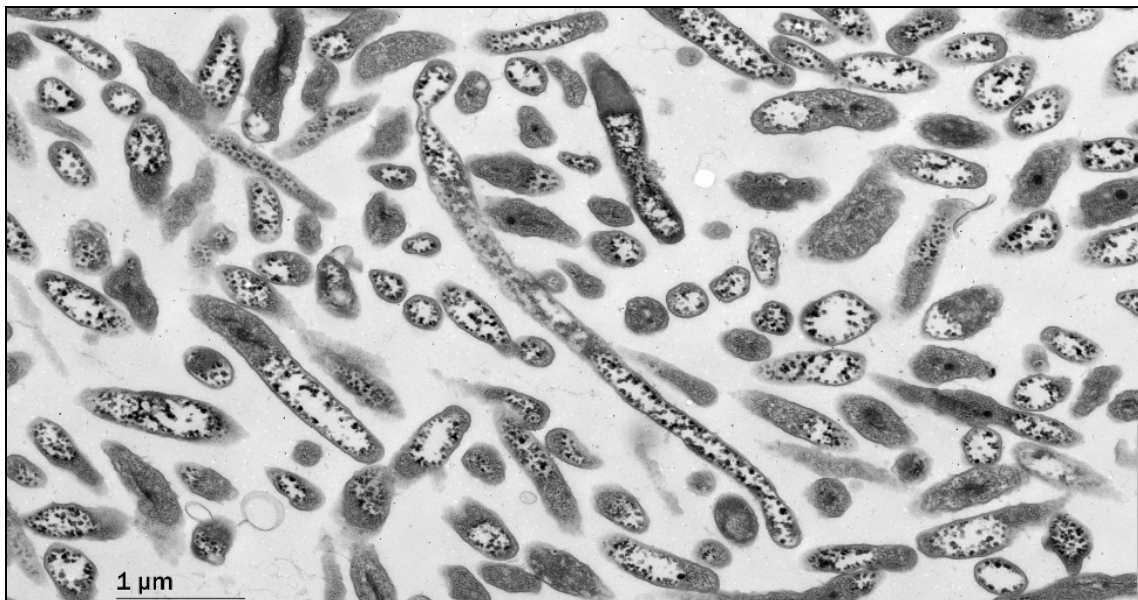


Abbildung 4: Transmissionselektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme eines Ultradünnschnittes durch Zellen vom *A. ferrooxidans* Stamm SPIII/3. Die Zellen wurden 7 Tage bei 28°C im Dunkeln mit Eisen(II)-Ionen als Substrat auf einem Bodenschüttler (125 UPM) inkubiert. Sie wurden anschließend mit Glutaraldehyd fixiert, in Spurr eingebettet, geschnitten und mit Osmiumtetroxid, Bleicitrat und Uranylacetat kontrastiert.

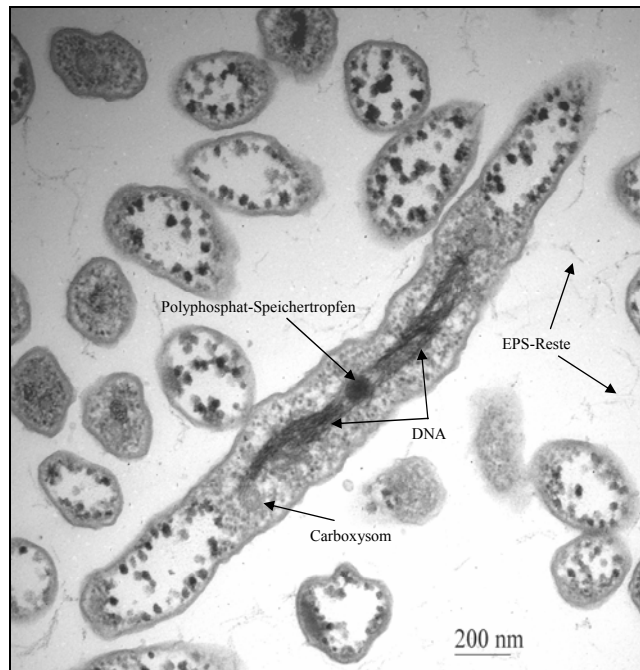


Abbildung 5: Transmissionselektronmikroskopische Detailaufnahme eines Ultradünnschnittes durch Zellen vom *A. ferrooxidans* Stamm SPIII/3. Die Zellen wurden 7 Tage bei 28°C im Dunkeln mit Eisen(II)-Ionen als Substrat auf einem Bodenschüttler (125 Upm) inkubiert. Sie wurden anschließend mit Glutaraldehyd fixiert, in Spurr eingebettet, geschnitten und mit Osmiumtetroxid, Bleicitrat und Uranylacetat kontrastiert.

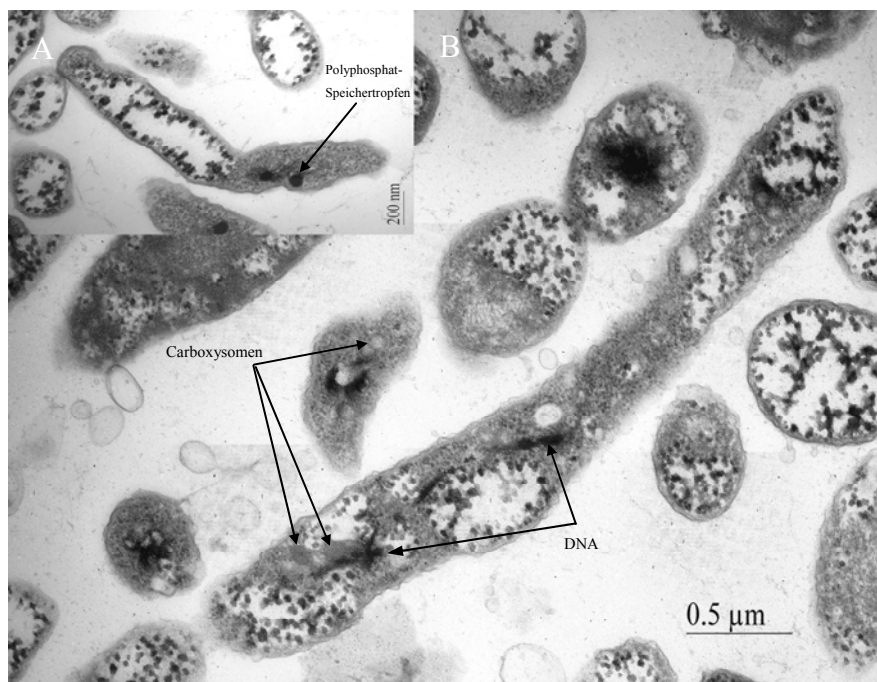


Abbildung 6 A und B: Transmissionselektronmikroskopische Detailaufnahme eines Ultradünnschnittes durch Zellen vom *A. ferrooxidans* Stamm DSM 2392. Die Zellen wurden 7 Tage bei 28°C im Dunkeln mit Eisen(II)-Ionen als Substrat auf einem Bodenschüttler (125 Upm) inkubiert. Sie wurden anschließend mit Glutaraldehyd fixiert, in Spurr eingebettet, geschnitten und mit Osmiumtetroxid, Bleicitrat und Uranylacetat kontrastiert.

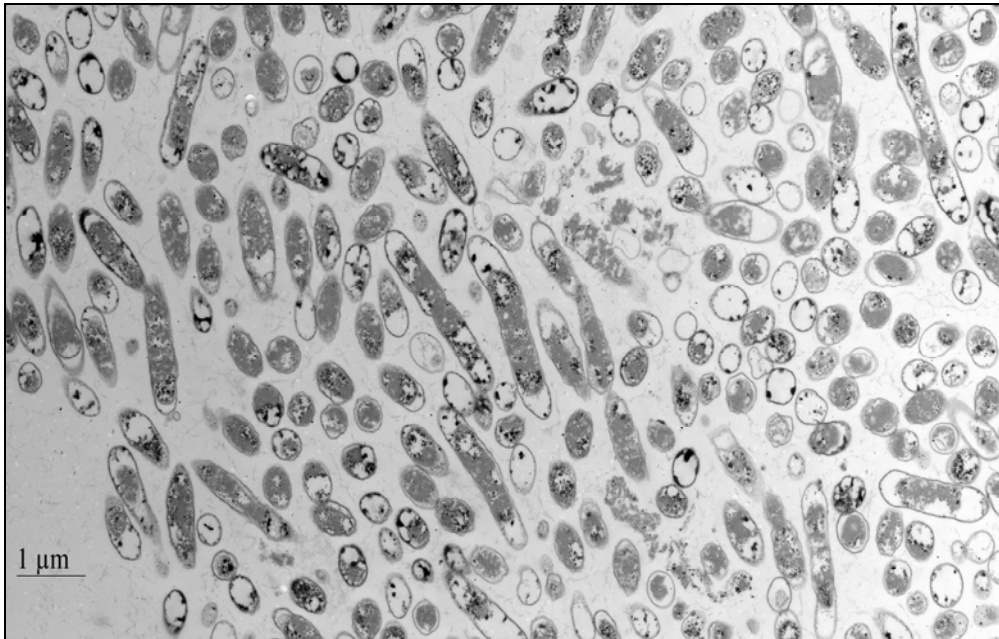


Abbildung 7: Transmissionselektronmikroskopische Übersichtsaufnahme eines Ultradünnschnittes durch Zellen vom *A. ferrooxidans* Stamm ATCC 23270. Die Zellen wurden 7 Tage bei 28°C im Dunkeln mit Eisen(II)-Ionen als Substrat auf einem Bodenschüttler (125 Upm) inkubiert. Sie wurden anschließend mit Glutaraldehyd fixiert, in Spurr eingebettet, geschnitten und mit Osmiumtetroxid, Bleicitrat und Uranylacetat kontrastiert.

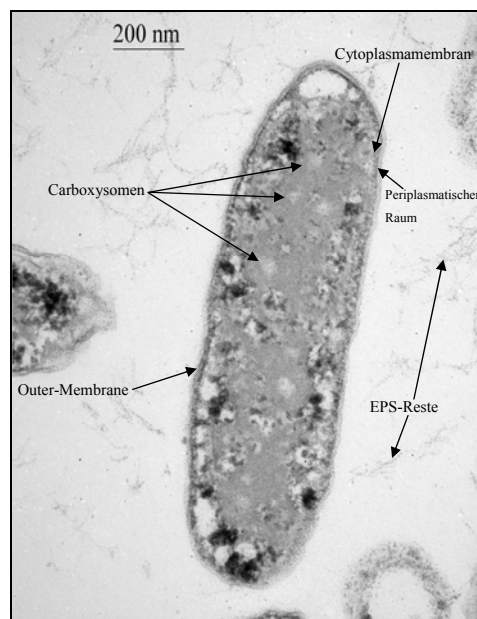


Abbildung 8: Transmissionselektronmikroskopische Übersichtsaufnahme eines Ultradünnschnittes durch Zellen vom *A. ferrooxidans* Stamm ATCC 23270. Die Zellen wurden 7 Tage bei 28°C im Dunkeln mit Eisen(II)-Ionen als Substrat auf einem Bodenschüttler (125 Upm) inkubiert. Sie wurden anschließend mit Glutaraldehyd fixiert, in Spurr eingebettet, geschnitten und mit Osmiumtetroxid, Bleicitrat und Uranylacetat kontrastiert.

Die Zellen der Bakterienstämme SPIII/3 und DSM 2392 sind stäbchenförmig und zum Teil etwas pleomorph. Sie sind zwischen 1 und 10 µm lang und 0,3 bis 0,5 µm breit. Die Zellen des Stammes ATCC 23270 sind stäbchenförmig und 1-2 µm lang und 0,5 µm breit. In den Zellen der drei Stämme konnten Carboxysomen, die das Enzym Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase enthalten, beobachtet werden. Darüber hinaus sind in den Zellen der Stämme von *A. ferrooxidans* SPIII/3 und DSM 2392 Polyphosphat enthaltende Speichertröpfchen sichtbar. Die Membran-Strukturen aller Stämme zeigen den typischen Aufbau einer Gram-negativen Zellwand.

4.1.2 Gram-Eigenschaften

Mit Hilfe der klassischen Gramfärbung wurde für die Zellen der Bakterienstämme ATCC 23270, DSM 2392 und SPIII/3 festgestellt, dass sie Gram-negative Zellwände besitzen.

4.1.3 Begeißelung

Die Geißelfärbung nach Blenden und Goldberg (1965) ergab, dass die Zellen der Stämme ATCC 23270, SPIII/3 und DSM 2392 monotrich polar begeißelt sind (nicht dargestellt).

4.2 Physiologische Untersuchungen

4.2.1 Substratspektrum

Alle getesteten Bakterien-Stämme waren in der Lage, mit Eisen(II)-Ionen als einziger Energiequelle zu wachsen. Speziell für die Stämme ATCC 23270 und SPIII/3 ließ sich das Substratspektrum um Schwefel, Pyrit und Chalkopyrit erweitern. Der Stamm ATCC 23270 war darüber hinaus auch zur Oxidation von Sphalerit, Galena und Thiosulfat befähigt.

Die Kultivierung der Stämme mit Thiocyanat führte zu einer Ansäuerung der Nährlösung ohne Zunahme der Zellzahl. Die Verbindungen Na-Sulfit, Tetrathionat, D-Glucose-Monohydrat, Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, Na-Succinat, Na-Pyruvat, Na-Acetat und Na-Formiat konnten nicht als Energiequelle genutzt werden. Die Substratspektren sind in der Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Wachstum der *A. ferrooxidans* Bakterienstämme SPIII/3, DSM 2392 und ATCC 23270 mit verschiedenen Substraten.

Substrat	ATCC 23270	SPIII/3	DSM 2392
Eisen(II)-Sulfat	+++	+++	+++
S ⁰	++	+	-
Pyrit (FeS ₂)	++	+	-
Chalkopyrit (CuFeS ₂)	+	+	-
Sphalerit (ZnS)	+	-	-
Galena (PbS)	+	-	-
Na-Thiosulfat	+	-	-
Na-Sulfit	+	-	-
K-Thiocyanat	-*	-*	-*
Tetrathionat	-	-	-
D-Glucose-Monohydrat	-	-	-
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	-	-	-
Na-Succinat	-	-	-
Na-Pyruvat	-	-	-
Na-Acetat	-	-	-
Na-Formiat	-	-	-

Legende: +++ sehr gutes Zellwachstum, ++ gutes Zellwachstum, + langsames Zellwachstum, - kein Zellwachstum, -* Zellabhängiger Umsatz des Substrates ohne Zellvermehrung

In den Abbildungen 9 und 10 sind die zeitlichen Verläufe der Substrat-Oxidation am Beispiel von Eisen(II)-Sulfat und Pyrit dargestellt. Die Oxidationsraten wurden indirekt durch Messung der in die Kulturlösung abgegebenen Eisen(III)-Ionen bestimmt.

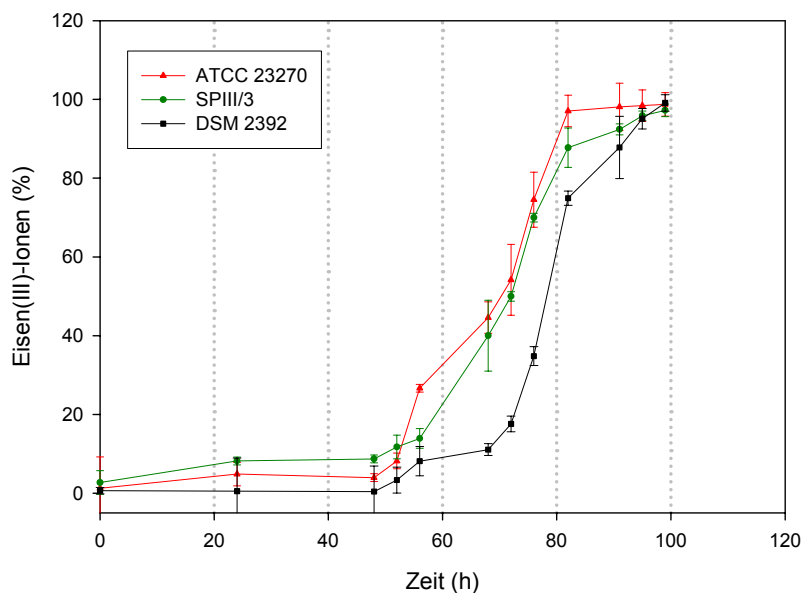


Abbildung 9: Oxidation von Eisen(II)-Sulfat durch Zellen der *A. ferrooxidans* Stämme ATCC 23270, SPIII/3 und DSM 2392. Die Oxidation wurde anhand des prozentualen Anteils von Eisen(III)-Ionen am Gesamteisenionengehalt in der Kulturlösung verfolgt. Als Inokulum dienen 1×10^6 Zellen pro mL. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei 28°C auf einem Bodenschüttler (125 Upm). Es sind die Mittelwerte zweier Versuchsansätze gezeigt. \bar{I} = Standardabweichung

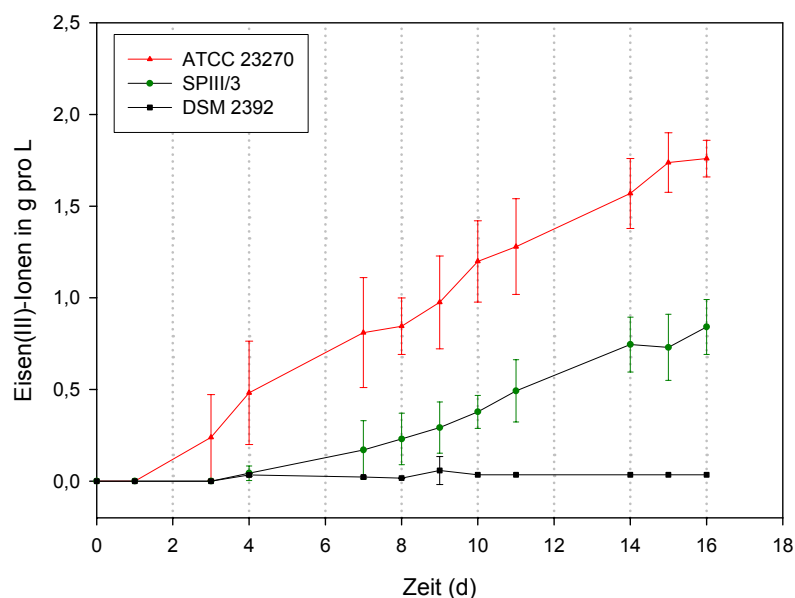


Abbildung 10: Pyritoxidation durch Zellen der *A. ferrooxidans* Stämme ATCC 23270, SPIII/3 und DSM 2392. Die Oxidation wurde anhand der Zunahme der Konzentration von Eisen(III)-Ionen in der Kulturlösung verfolgt. Als Inokulum dienen 1×10^6 Zellen pro mL. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei 28°C auf einem Bodenschüttler (125 Upm). Es sind die Mittelwerte dreier Versuchsansätze gezeigt. \bar{I} = Standardabweichung

Mit Eisen(II)-Ionen als Energiequelle war bei den Zellen aller Stämme die lag-Phase nach ca. 2 Tagen beendet. Die Eisen(II)-Ionen wurden von den Zellen des Stammes ATCC 23270 mit einer Rate von 35 mg/d oxidiert, bei den Bakterien des Stammes SPIII/3 betrug die Oxidationsrate 34 mg/d und bei denen des Stammes DSM 2392 betrug sie 31 mg/d. In der

unbeimpften Kontrolle konnte während des Versuchszeitraumes keine erhöhte Konzentration an Eisen(III)-Ionen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Bei den Bakterien des Stammes ATCC 23270 dauerte die lag-Phase beim Wachstum auf Pyrit ca. einen Tag. Die Zellen des Stammes SPIII/3 wiesen eine lag-Phase von ca. 3 Tagen auf. Bei den Zellen beider Stämme nimmt die Eisen(III)-Ionen-Konzentration während der log-Phase in der Nährlösung gleichmäßig zu. Die Zellen des Stammes ATCC 23270 oxidierten die Eisen(II)-Ionen des Metallsulfids mit einer Rate von 6,14 mg pro Tag bei denen des Stammes SPIII/3 betrug die Rate 0,06 mg pro Tag. In den Versuchsansätzen mit Zellen des Stammes DSM 2392 konnte keine gegenüber der Kontrolle erhöhte Freisetzung von Eisen(III)-Ionen beobachtet werden.

In der Abbildung 11 ist der zeitliche Verlauf der Oxidation des Substrates Elementarschwefel für die Zellen aller drei Stämme abgebildet.

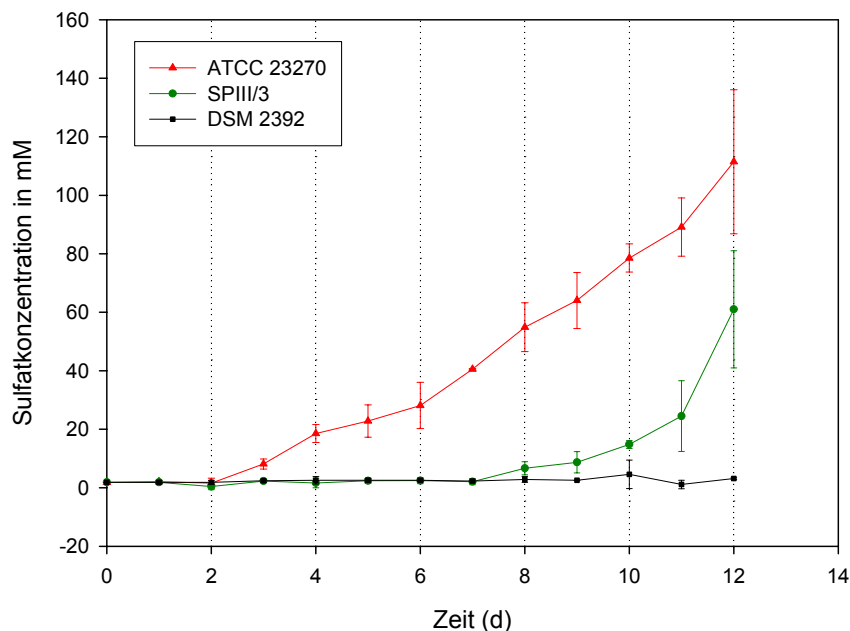


Abbildung 11: Oxidation von Elementarschwefel durch Zellen der Stämme *A. ferrooxidans* ATCC 23270, SPIII/3 und DSM 2392. Die Oxidation wurde anhand der Zunahme der Konzentration von Sulfat-Ionen in der Kulturlösung verfolgt. Als Inokulum dienten 1×10^6 Zellen pro mL. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei 28°C auf einem Bodenschüttler (125 Upm). Es sind die Mittelwerte zweier Versuchsansätze gezeigt. I = Standardabweichung

Beim Wachstum mit elementarem Schwefel als Substrat wiesen die Zellen des Stammes ATCC 23270 mit zwei Tagen die kürzeste lag-Phase auf. Eine fünf Tage längere Adaptationsphase ließ sich für die Zellen des Stammes SPIII/3 beobachten. Bestimmungen der Gesamtzellzahl zeigten, dass während der Bildung von Sulfat die Anzahl der planktonischen Zellen der Stämme ATCC 23270 (von 1×10^6 auf 5×10^8) und SPIII/3 (von 1×10^6 auf 4×10^8) zunahm (Daten nicht gezeigt). Die Zellen des Stammes ATCC 23270

oxidierten den Schwefel mit einer Rate von 12,21 mM/d, für Zellen des Stammes SPIII/3 betrug die Oxidationsrate 9,76 mM/d. In den Ansätzen mit den Zellen des Stammes DSM 2392 und in der Steril-Kontrolle konnte nach 20 Tagen kein Sulfat-Anstieg nachgewiesen werden.

In Ergänzung zu den Untersuchungen zum Substratspektrum wurde überprüft, ob die Bakterien in der Lage sind, in Gegenwart organischer Substanzen mit Eisen(II)-Ionen als Energiequelle zu wachsen. Im Falle der organischen Säuren Acetat, Citrat, Succinat und Pyruvat wurde festgestellt, dass schon geringe Mengen von 100 μ M ausreichen, um das Wachstum der Zellen vollständig zu hemmen. Diese Hemmung trat sowohl bei pH 1,6 als auch bei pH 2,1 auf. Für Glucose konnte bei den Konzentrationen 100 und 500 μ M eine Hemmung des Wachstums nicht beobachtet werden. Der zeitliche Verlauf der Eisen(II)-Oxidation von Zellen der Stämme ATCC 23270, SPIII/3 und DSM 2392 in Ab- und Anwesenheit von Glucose ist in Abbildung 12 dargestellt.

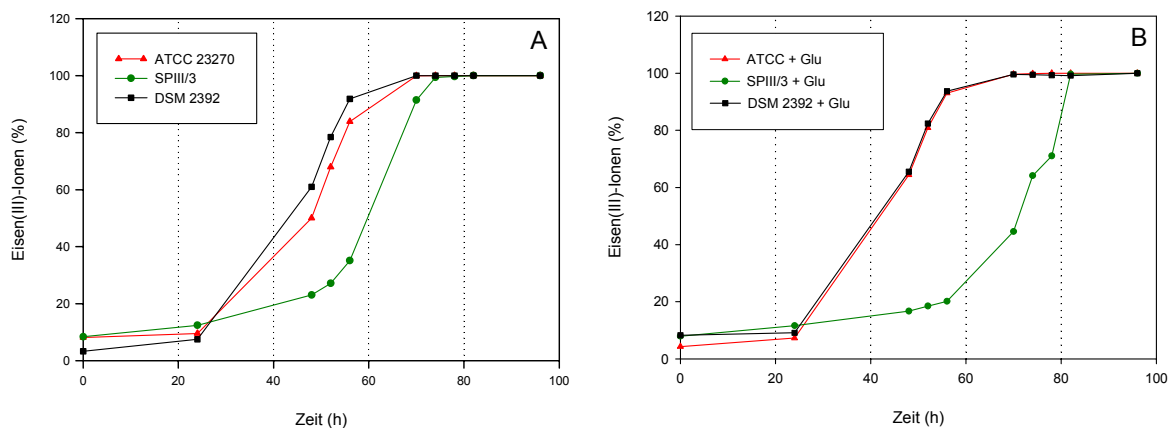


Abbildung 12: Eisen(II)-Oxidation durch Zellen der *A. ferrooxidans* Stämme ATCC 23270, SPIII/3 und DSM 2392 ohne (A) und mit (B) Glucose Zusatz von Glucose. Die Oxidation wurde anhand des prozentualen Anteils von Eisen(III)-Ionen am Gesamteisenionengehalt in der Kulturlösung verfolgt. Als Inokulum dienten 1×10^6 Zellen pro mL. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei 28°C auf einem Bodenschüttler (125 Upm).

Die log-Phase beginnt bei den Zellen der Stämme ATCC 23270 und DSM 2392 in den Versuchen mit oder ohne Zusatz von Glucose nach ca. 24 Stunden und endet nach ca. 56 Stunden. Danach gehen die Zellen in die stationäre Phase über. Bei den Zellen des Stammes SPIII/3, die ohne Glucose wachsen, beginnt die log-Phase am zweiten Tag und geht nach 70 Stunden in die stationäre Phase über. Bei den Zellen des Stammes SPIII/3, die in Gegenwart von Glucose gewachsen sind, beginnt die log-Phase nach 56 Stunden und geht nach 80 Stunden in die stationäre Phase über. Die Zellen des Stammes ATCC 23270 oxidierten die Eisen(II)-Ionen mit oder ohne Zusatz von Glucose mit einer Rate von 32 bzw. 33 mg pro Tag,

für die Zellen des Stammes SPIII/3 betragen die Oxidationsraten für die Eisen(II)-Ionen mit oder ohne Zusatz von Glucose 30 bzw. 25 mg pro Tag und bei den Zellen des Stammes DSM 2392 betragen sie 30 bzw. 32 mg pro Tag.

4.2.2 Halotoleranz

Die zeitlichen Verläufe der Oxidation von Eisen(II)-Ionen und die Oxidationsraten von Zellen der Stämme *A. ferrooxidans* ATCC 23270, SPIII/3 und DSM 2392 in Abhängigkeit von Konzentrationen an Natriumchlorid von 50 bis 200 mM sind in der Abbildung 13 dargestellt.

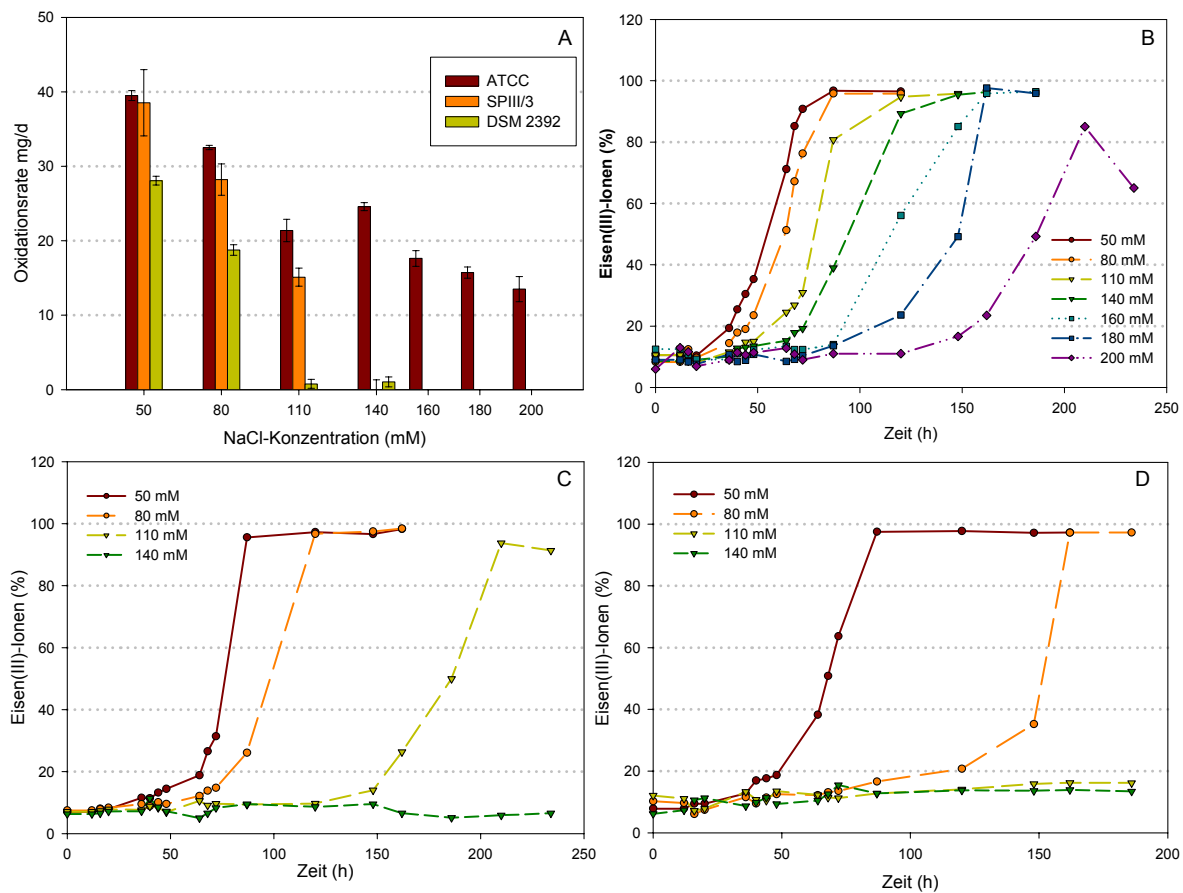


Abbildung 13: Ermittlung der Halotoleranz für Zellen der *A. ferrooxidans* Stämme ATCC 23270, SPIII/3 und DSM 2392. (A) Oxidationsraten in Abhängigkeit von der Kochsalz-Konzentration in der Nährlösung. Zeitlicher Verlauf der Oxidation von Eisen(II)-Sulfat durch die Zellen der *A. ferrooxidans* Stämme ATCC 23270 (B), SPIII/3 (C) und DSM 2392 (D) bei verschiedenen Kochsalz-Konzentrationen. Die Oxidation wurde anhand des prozentualen Anteils von Eisen(III)-Ionen am Gesamteisenionengehalt in der Kulturlösung verfolgt. Als Inokulum dienten 1×10^6 Zellen pro mL. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei 28°C auf einem Bodenschüttler (125 Upm).

In Abbildung 13 (A) ist zu erkennen, dass die Zellen des Stammes ATCC 23270 in der Lage sind, bis zu Natriumchlorid-Konzentrationen von 200 mM zu wachsen. Bei Konzentrationen ≥ 270 mM (nicht dargestellt) konnte keine Oxidationsraten mehr gemessen werden. Die Zellen des Stammes SPIII/3 konnten ihre Oxidations-Aktivität bis zu einer Natriumchlorid-

Konzentration von 110 mM aufrechterhalten und die Zellen des Stammes DSM 2392 bis zu einer Natriumchlorid-Konzentration von 80 mM. Bei den Zellen aller Stämme ist eine direkte Abhängigkeit zwischen den Oxidationsraten und der Natriumchlorid-Konzentration zu beobachten. Je höher die Kochsalz-Konzentration liegt, desto niedriger ist die Oxidationsrate. In den Abbildungen 13 (B-D) ist zu erkennen, dass mit steigender Konzentration an Kochsalz die Dauer der lag-Phase zunimmt. In den sterilen Kontrollen war über den gesamten Versuchszeitraum keine Zunahme an Eisen(III)-Ionen messbar (Daten nicht gezeigt).

4.2.3 Schwermetall-Toleranz

Die Toleranz der drei Stämme gegenüber verschiedenen Schwermetallen wurde für Kobalt, Kupfer und Nickel untersucht. Hierzu wurde das jeweilige Schwermetall in unterschiedlichen Konzentrationen der Nährlösung nach Mackintosh (1978) hinzugefügt. Die Ergebnisse für das Schwermetall Kobalt sind in der Abbildung 14 zusammengefasst.

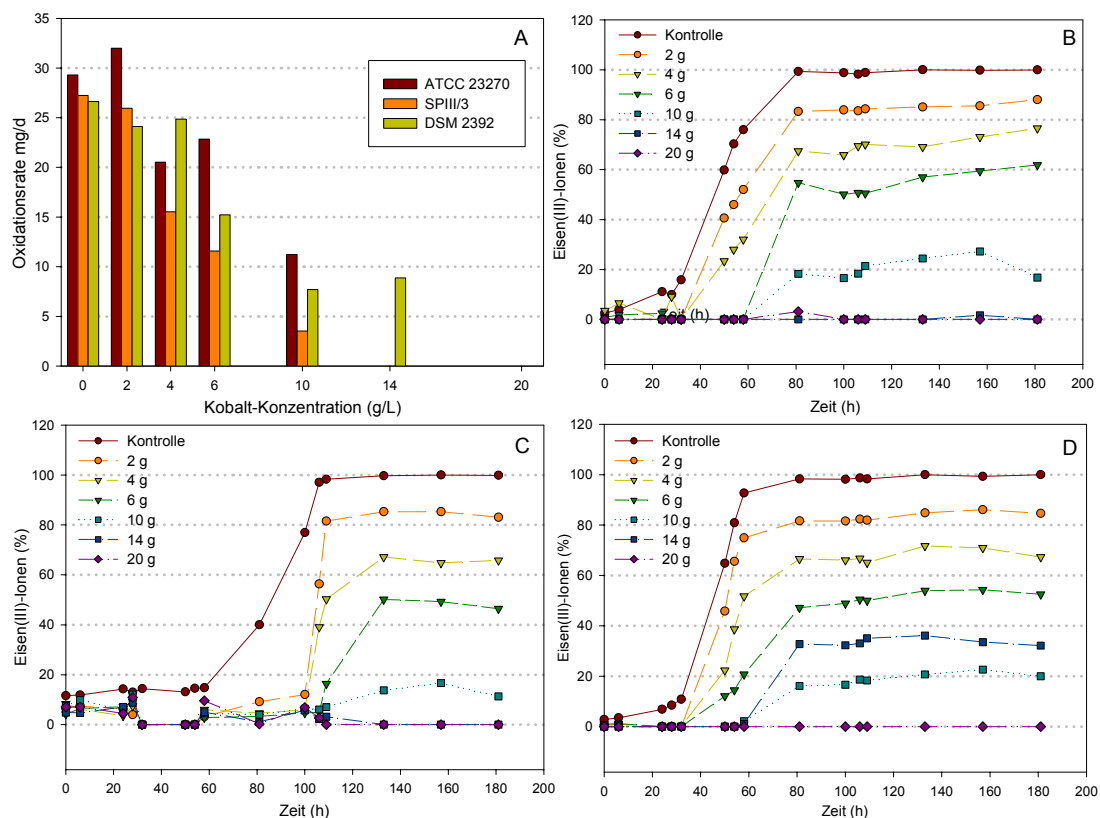


Abbildung 14: Einfluss von Kobalt auf die Oxidation von Eisen(II)-Ionen durch Zellen der *A. ferrooxidans* Stämme ATCC 23270, SPIII/3 und DSM 2392. (A) Oxidationsraten in Abhängigkeit von der Kobalt-Konzentration. Zeitlicher Verlauf der Oxidation von Eisen(II)-Ionen durch die Zellen der Stämme ATCC 23270 (B), SPIII/3 (C) und DSM 2392 (D) bei verschiedenen Kobalt-Konzentrationen. Die Oxidation wurde anhand des prozentualen Anteils von Eisen(III)-Ionen am Gesamteisenionengehalt in der Kulturlösung verfolgt. Als Inokulum dienten 1×10^6 Zellen pro mL. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei 28°C auf einem Bodenschüttler (125 Upm).

Bei den Zellen aller Stämme konnte beobachtet werden, dass die Oxidationsrate mit steigender Konzentration des Schwermetalls abnimmt (Abb. 14 A). In der Kulturlösung mit den Bakterien der Stämme ATCC 23270 und SPIII/3 konnte ab einer Konzentration von 10 g/L Kobalt keine Oxidations-Aktivität mehr gemessen werden. Bei den Zellen des Stammes DSM 2392 war noch bis zu einer Kobalt-Konzentration von 14 g/L Oxidations-Aktivität nachweisbar. Bei allen Stämmen konnte beobachtet werden, dass bei Kobaltzusatz das Substrat nicht quantitativ oxidiert wurde (Abb 14. B-D). Je höher der Kobaltzusatz war, desto weniger Eisen(II)-Ionen wurden oxidiert. So werden beispielsweise bei der letzten, noch tolerierten Kobalt-Konzentration von 10 bzw. 14 g/L nur ca. 20% des Substrates oxidiert. Bei dem Schwermetall Kupfer lag die minimale inhibierende Konzentration (MIC) für die Zellen aller Stämme bei 30 g/L (nicht dargestellt). Für Nickel konnte ebenfalls für alle Stämme die gleiche MIC von 10 g/L gemessen werden (nicht dargestellt).

4.2.4 pH-Optimum

Der optimale pH-Wert für die biologische Oxidation von Eisen(II)- zu Eisen(III)-Ionen oder Elementarschwefel zu Sulfat lag bei allen drei *A. ferrooxidans* Stämmen um 2 (Daten nicht gezeigt). Die Zellen der Stämme DSM 2392 und SPIII/3 konnten Eisen(II)-Ionen unterhalb eines pH von 1,5 nicht oxidieren. Die Zellen des Stammes ATCC 23270 wiesen eine Oxidations-Aktivität noch bei pH 1,2 auf.

4.2.5 Temperatur-Optimum

Die zeitlichen Verläufe der Oxidation von Eisen(II)-Ionen und die Oxidationsraten für die *A. ferrooxidans* Stämme ATCC 23270, SPIII/3 und DSM 2392 in Abhängigkeit von der Temperatur im Bereich von 17 bis 38°C sind in der Abbildung 15 dargestellt.

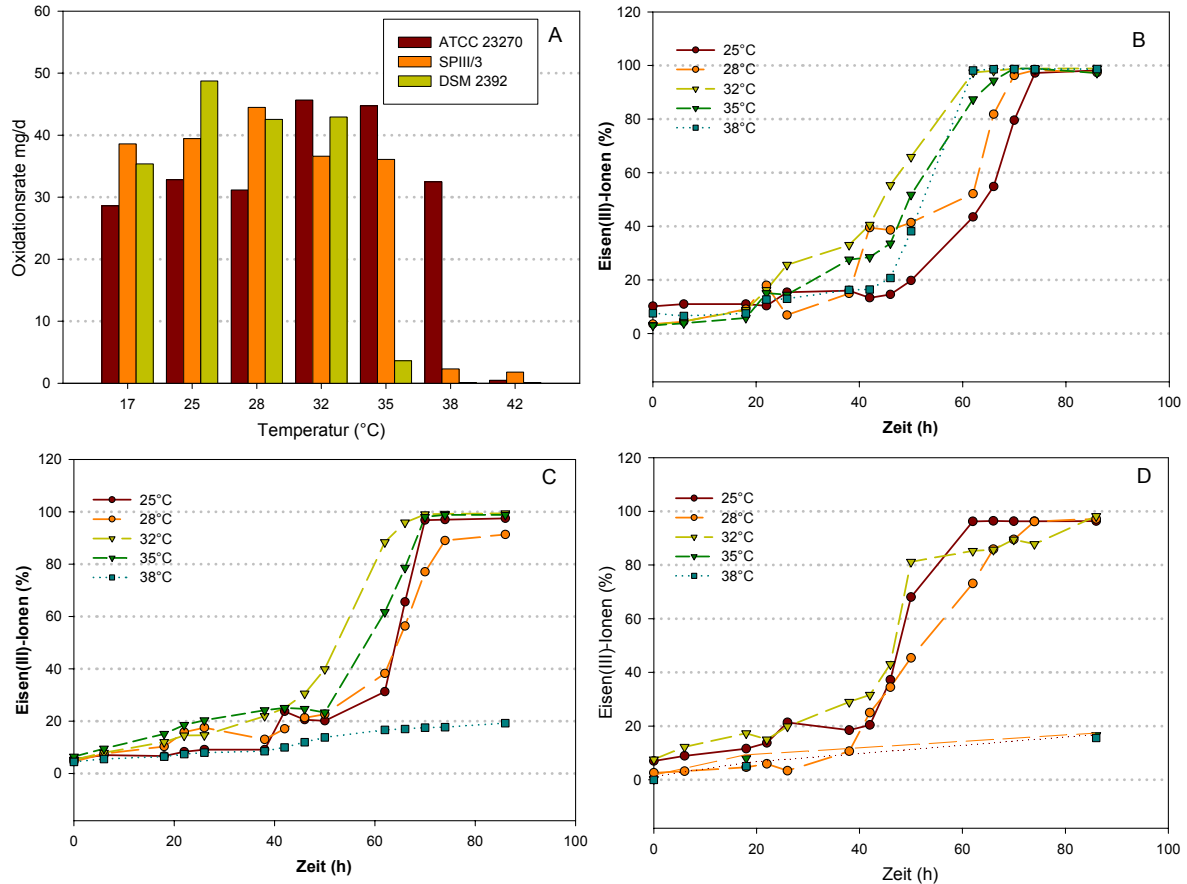


Abbildung 15: Temperaturoptimum für die Oxidation von Eisen(II)-Ionen für die Zellen der *A. ferrooxidans* Stämme ATCC 23270, SPIII/3 und DSM 2392. (A) Oxidationsraten in Abhängigkeit von der Temperatur. Zeitlicher Verlauf der Oxidation von Eisen(II)-Sulfat durch die Zellen der Stämme ATCC 23270 (B), SPIII/3 (C) und DSM 2392 (D) bei verschiedenen Temperaturen. Die Oxidation wurde anhand des prozentualen Anteils von Eisen(III)-Ionen am Gesamteisenionengehalt in der Kulturlösung verfolgt. Als Inokulum dienten 1×10^6 Zellen pro mL. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln in verschiedenen temperierten Schüttel-Wasserbädern.

Bei Zellen des Stammes ATCC 23270 wurden die höchsten Werte für die Oxidationsraten im Temperaturbereich zwischen 32 und 35°C gemessen. In diesem Temperaturbereich wurden die Eisen(II)-Ionen mit einer Rate von 45 mg pro Tag oxidiert. Bei den Temperaturen 25, 28 und 38°C lag die Oxidationsrate bei Werten um 32 mg Eisen(II)-Ionen pro Tag. Unterhalb von 10°C und oberhalb von 38°C konnte keine Oxidation von Eisen(II)-Ionen gemessen werden (Daten nicht gezeigt).

Die Zellen des Stammes SPIII/3 zeigten ihre maximale Oxidationsrate bei 28°C mit 44 mg Eisen(II)-Ionen pro Tag. Eine Oxidationsrate von 2 mg Eisen(II)-Ionen pro Tag wurde für die

Temperatur von 38°C bestimmt. Oberhalb von 38°C wie auch unterhalb von 10°C war eine Oxidation von Eisen(II)-Ionen nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Zellen des Stammes DSM 2392 wiesen bei 25°C die höchste Oxidationsrate mit 48 mg Eisen(II)-Ionen pro Tag auf. Bei 38°C war eine Oxidationsrate von nur noch 0,1 mg Eisen(II)-Ionen pro Tag messbar. Es konnten keine Oxidations-Aktivitäten für Temperaturen über 38°C und unter 10°C gemessen werden (Daten nicht gezeigt).

4.3 Molekularbiologische Untersuchungen

4.3.1 Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese

Die Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) wurde im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt, um Informationen über die verwandtschaftlichen Verhältnisse zwischen den *A. ferrooxidans* Stämmen ATCC 23270, DSM 2392 und SPIII/3 zu bekommen.

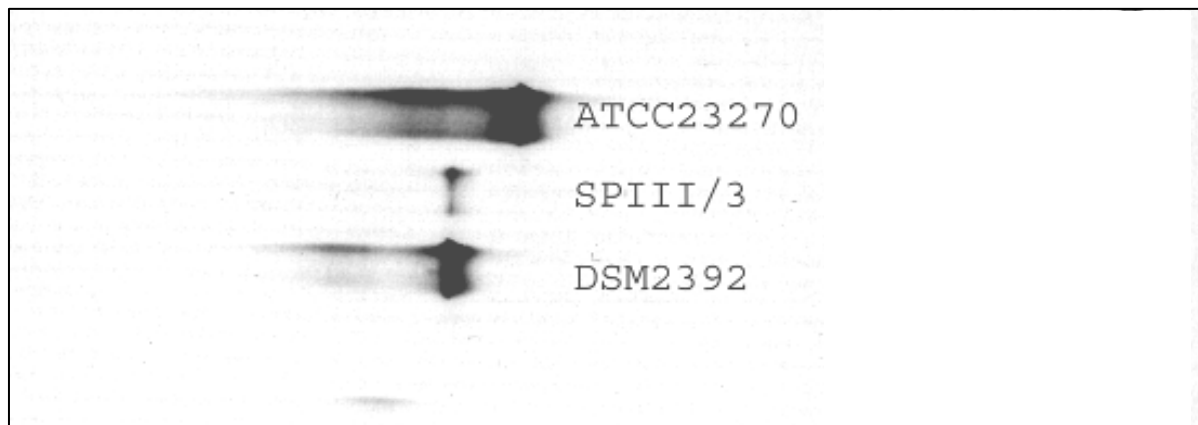


Abbildung 16: DGGE-Bandenmuster von etwa 620 bp langen, PCR-amplifizierten 16S rDNA-Fragmenten (Position 341-907 im 16S rRNA-Gen bei *E. coli* + GC-Klammer) von den *A. ferrooxidans* Stämmen ATCC 23270, SPIII/3 und DSM 2392; Zuordnung der Banden zu den Stämmen siehe Gel; DGGE-Gel mit einem Harstoff-Formamid-Gradienten von 40-70%; Laufzeit 18 Stunden bei 100 V.

In der Abbildung 16 sind im DGGE-Gel die Banden der 16S rDNA aus Zellen der *A. ferrooxidans* Stämme ATCC 23270, SPIII/3 und DSM 2392 dargestellt. Die Banden der Stämme SPIII/3 und DSM 2392 weisen im Gel die gleiche elektrophoretische Mobilität auf, die DNA des Stammes ATCC 23270 legt im Gel einen weiteren Weg zurück als die der beiden anderen Stämme.

4.3.2 Cytochromdifferenzspektren

Zum Nachweis des Vorkommens verschiedener Cytochrome wurden Cytochromdifferenzspektren von den Zellextrakten aller drei *A. ferrooxidans*-Stämme aufgenommen. In allen Zellen war Cytochrom c nachweisbar. Die Cytochrom-Spektren waren vergleichbar. In der Abbildung 17 ist ein ausgewähltes Cytochromspektrum von Zellen des Stammes ATCC 23270 dargestellt. Die Absorptions-Maxima bei 551, 522 und 416 nm treten als distinkte Banden auf und entsprechen den alpha-, beta- und gamma-Absorptionsbanden von Cytochrom c.

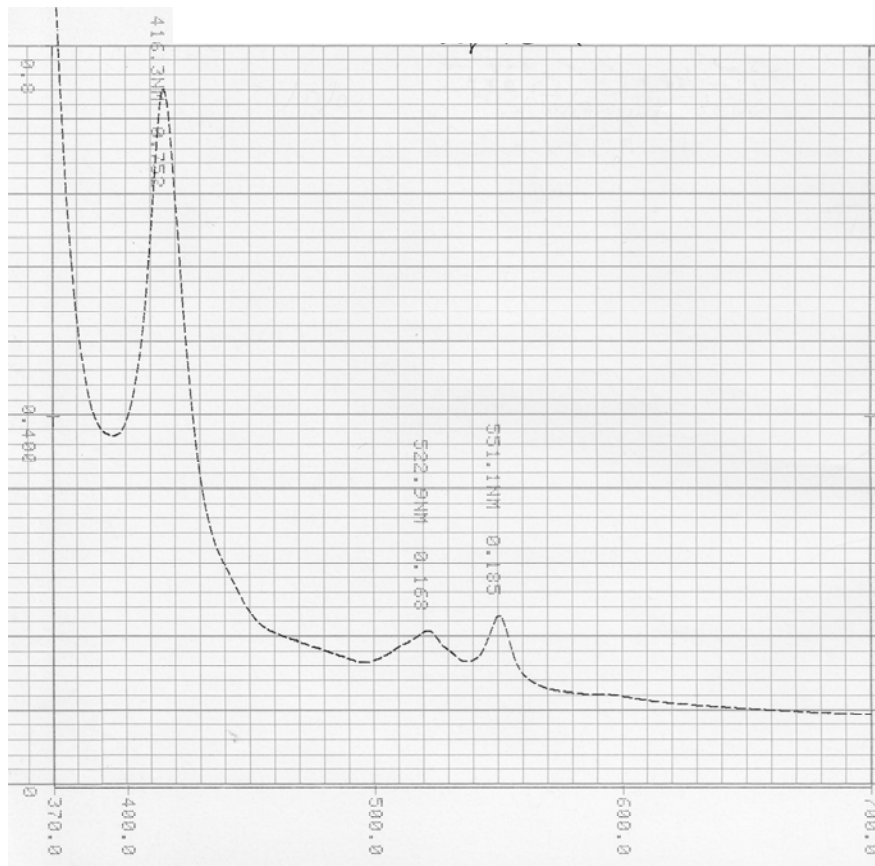


Abbildung 17: Ausgewähltes Cytochromdifferenzspektrum eines Zellextraktes von 5×10^{12} Zellen des *A. ferrooxidans* Stammes ATCC 23270 nach einer Anzucht mit Eisen(II)-Ionen als Substrat. Die Inkubation erfolgte bei 28°C mit aktiver Belüftung im Dunkeln. Aufgenommen wurde das Spektrum in einem Wellenlängenbereich von 370-700 nm mit dem Zweistrahlphotometer MPS 2000 (Shimadzu).

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit wurde zum Zwecke der Charakterisierung der als *A. ferrooxidans* bezeichneten Stämme der SPIII/3 und DSM 2392 angefertigt. Dies geschah mit Hilfe morphologischen, physiologischen und molekularbiologischen Methoden. Dabei sollte geklärt werden, ob die beiden letztgenannten Stämme in eine neue Gattung einzuordnen sind. Ferner sollte festgestellt werden, ob die beiden *A. ferrooxidans* Stämme SPIII/3 und DSM 2392 zur selben Art gehören.

Unterschiede ergaben sich zum Einen bei den Untersuchungen zur Morphologie der Zellen. Während die Zellen des *A. ferrooxidans* Typstammes ATCC 23270 eine typische Stäbchenform aufweisen (Kelly und Harrison 1989, Kelly und Wood 2000), ist bei den Zellen der Stämme SPIII/3 und DSM 2392 keine einheitliche Zellform zu beobachten. Die Zellform der letztgenannten Stämme wich teilweise erheblich von der eines Stäbchens ab. Kock (2003) bezeichnete diese Zellform bei ihren Untersuchungen an den Zellen des Stammes SPIII/3 als pleomorph. Neben der Zellform gab es auch Unterschiede in der Größe der Zellen. Für die Zellen des *A. ferrooxidans* Typstammes wurde regelhaft eine typische Länge von 1-2 µm ermittelt (Jensen und Webb 1995, Kelly und Wood 2000). Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen an den Zellen der Stämme SPIII/3 und DSM 2392 traten Zellen mit Längen von bis zu 10 µm auf. Auch Kock (2003) hat für Zellen des *A. ferrooxidans* Stammes SPIII/3 die gleiche Beobachtung gemacht. Somit sind Zellform und -größe Unterscheidungsmerkmale zwischen Zellen dieser Stämme.

Zum Anderen konnten bei den Untersuchungen im Zellwandaufbau elektronenmikroskopisch keine Unterschiede festgestellt werden. Bei allen drei Stämmen zeigte sich der typische Aufbau einer Gram-negativen Zellwand. Biochemische Untersuchungen des Zellwandaufbaus zeigten, dass den Zellen des Stammes SPIII/3 die für Gram-negative Zellen typische meso-Diaminopimelinsäure (Lengeler 1999, Madigan 2003) zur Quervernetzung der einzelnen Peptidoglycan-Stränge fehlt (Stackebrandt und Schumann pers. comm). Da zum *A. ferrooxidans* Typstamm ATCC 23270 und dem Stamm DSM 2392 solche Untersuchungen nicht vorliegen, lässt sich hieraus kein Unterscheidungsmerkmal herleiten. Ebenso wenig wie

durch die Tatsache, dass alle drei Stämme der Art *A. ferrooxidans* monotrich, polar begeißelt sind.

Polyphosphat-Speichertropfen konnten in den Zellen der Stämme SPIII/3 und DSM 2392 beobachtet werden. Dieser Befund deckt sich mit anderen Untersuchungen, die an verschiedenen Stämmen von *A. ferrooxidans* durchgeführt wurden (Howard und Lundgren 1970, Merroun 2001). Das Fehlen dieser Speichertropfen in den Zellen des Stammes ATCC 23270 heißt nicht, dass diese generell nicht vorhanden sind. Andere Autoren haben Polyphosphat-Speichertropfen auch für die Zellen dieses Stammes nachgewiesen (Alvarez und Jerez 2004). Polyphosphate können von den Zellen als ATP-Ersatz oder allgemein als Energiequelle verwendet werden. Weiterhin können sie als Chelator für bivalente Metallionen dienen (Dunn et al. 1994). Keasling (1996) schlug vor, dass die intrazelluläre Chelatbildung mit Polyphosphaten ein passiver Schutzmechanismus gegenüber Schwermetallen darstellen könnte. Die Bildung der Polyphosphate hängt allerdings nur vom Organismus und dessen Wachstumsphase ab und nicht von der Gegenwart von Schwermetallen.

Carboxysomen waren in den Zellen aller drei *A. ferrooxidans* Stämme identifizierbar. Das bestätigt Beobachtungen, wie sie von Cannon (2001) an Zellen des *A. ferrooxidans* Typstammes und von Kock (2003) an den Zellen des Stammes SPIII/3 gemacht wurden. In den Carboxysomen ist das Schlüsselenzym des Calvin-Zyklus RuBisCo gespeichert. Das Vorhandensein der Carboxysomen spricht dafür, dass die Zellen obligat autotroph wachsen, da in fakultativ autotroph wachsenden Bakterien bisher keine Carboxysomen nachgewiesen wurden (Madigan 2003).

Zum Dritten wurden im Rahmen der physiologischen Untersuchungen signifikante Unterschiede zwischen den Zellen der drei hier untersuchten *A. ferrooxidans* Stämme auch bei der Nutzung von Substraten festgestellt. Keiner der Stämme war in der Lage organotroph oder mixotroph zu wachsen. Daher handelt es sich bei allen Stämmen um obligat chemolithotrophe Bakterien, was schon für Stämme der Art *A. ferrooxidans* bekannt ist (Jensen und Webb 1995, Ageeva 2001, Kelly und Wood 2000). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass die Zellen der *A. ferrooxidans* Stämme ATCC 23270, SPIII/3 und DSM 2392 nicht in der Lage sind in Gegenwart geringer Konzentrationen an organischen Säuren –

wie Citrat, Pyruvat, Succinat, oder Acetat – zu wachsen. Dieser wachstumshemmende Effekt der niedermolekularen organischen Säuren ist bekannt (Pronk et al. 1991). Durch den niedrigen pH-Wert des Mediums liegen die meisten organischen Säuren in undissoziierter Form vor. In dieser Form können sie leicht durch die Cytoplasmamembran ins Cytoplasma diffundieren. Da der interne pH der Bakterien beinahe neutral ist (Cobley 1983), dissoziieren die Säuremoleküle im Cytoplasma, was mit einem Abfall des intrazellulären pH verbunden ist. Dadurch bricht als Konsequenz der transmembrane pH-Gradient zusammen, der für das Wachstum in sauren Habitaten essentiell ist (Ingledeew 1982, Alexander et al. 1987). Die pH-Abhängigkeit der Wachstumshemmung konnte auch von Sasaki (1999) beobachtet werden. Der Autor stellte fest, dass der inhibierende Effekt bei niedrigen pH-Werten stärker ausgeprägt ist als bei höheren.

Ein wachstumshemmender Effekt auf die Bakterien konnte für die Zuckerverbindung Glucose nicht nachgewiesen werden. Dies steht im Widerspruch zu Beobachtungen von Marchand (2003) der allerdings mit einer höheren Konzentration an Glucose als ich in meinen Versuchen (500 mM) gearbeitet hat. Barreto und Holmes (pers. comm) konnten zeigen, dass Zellen des *A. ferrooxidans* Typstammes nicht generell durch die Gegenwart von organischen Substanzen in ihrem Wachstum gehemmt werden. Zellen des *A. ferrooxidans* Typstammes sind im Besitz des Enzyms β -Galaktosidase, und weisen in Gegenwart von Galaktose eine erhöhte EPS-Produktion auf.

Des Weiteren zeigte sich in den Versuchen, dass die Zellen des *A. ferrooxidans* Typstammes ATCC 23270 ein arttypisches Substratspektrum aufweisen und Eisen(II)-Ionen, reduzierte Schwefelverbindungen und Metallsulfide als Energiequellen nutzen können (Zenneck 1988, Jensen und Webb 1995, Kelly und Wood 2000). Die Substratspektren der Stämme SPIII/3 und DSM 2392 wichen von diesem, für Stämme der Art *A. ferrooxidans* typischem Spektrum ab. So nutzen die Zellen des Stammes SPIII/3 Eisen(II)-Ionen, elementaren Schwefel, Pyrit und Chalkopyrit als Energiequellen, aber keine der anderen reduzierten Schwefelverbindungen. Die Zellen des Stammes DSM 2392 können lediglich Eisen(II)-Ionen als Energiequelle nutzen, jedoch keine Schwefelverbindungen oder Metallsulfide. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Harrison (1982) für den Stamm DSM 2392.

Dieser Unterschied in der Nutzung von Schwefelverbindungen kann ebenfalls zur Unterscheidung der drei Stämme genutzt werden.

Im Bezug auf die Halotoleranz zeigt sich eine Übereinstimmung zwischen den Zellen der Stämme SPIII/3 und DSM 2392 mit denen von Stamm ATCC 23270. Bei dem letztgenannten Stamm lag die minimale inhibierende Konzentration (MIC) für Natriumchlorid, bei 270 mM (ca. 15 g/L), wohingegen die Zellen der anderen beiden Stämme mit 110 bzw. 80 mM deutlich weniger tolerierten. Die Adaptations-Zeiten an erhöhte Natriumchlorid-Konzentrationen der Zellen des *A. ferrooxidans* Typstammes waren darüber hinaus wesentlich kürzer als die der anderen Stämme. Auch wenn die MIC für Natriumchlorid bei dem *A. ferrooxidans* Typstamm deutlich über der für die beiden anderen Stämme liegt und dadurch hoch zu sein scheint, kann man diesen Stamm nicht als halotolerant bezeichnen. Kieft und Spence (1988), die für die Art *A. ferrooxidans* ebenfalls eine MIC für Natriumchlorid von 15 g/L festgestellt haben, schlossen dies aus. Dennoch bleibt festzuhalten, dass sich die beiden Stämme SPIII/3 und DSM 2392 deutlich in ihrer Toleranz gegenüber Natriumchlorid von der des *A. ferrooxidans* Typstammes unterscheiden.

Bei der Toleranz gegenüber Schwermetallen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellen der einzelnen Stämme festgestellt werden. Alle Stämme wiesen hohe Toleranzen gegenüber Schwermetallen auf, was für Laugungsbakterien typisch ist (Tuovinen et al. 1971, Hallmann et al. 1993, Leduc und Ferroni 1994, Dopson et al. 2003). Die MIC für Kobalt und Nickel lag bei jeweils 10 g/L für die Stämme SPIII/3 und ATCC 23270, und liegt damit bei einem Wert, wie ihn Hallmann (1993) für die Stämme R1 und R7 von *A. ferrooxidans* gemessen hat. Lediglich die Zellen des Stammes DSM 2392 tolerierten eine etwas höhere Kobalt-Konzentration von 14 g/L, bei Nickel gab es keinen Unterschied zu den beiden anderen Stämmen. Das sich die Toleranzen gegenüber den Schwermetallen Nickel und Kobalt wenig unterscheiden, liegt daran, dass die Toleranz gegenüber Kobalt mit der Toleranz gegenüber Nickel gekoppelt ist. So zeigte sich beispielsweise, dass an hohe Nickelkonzentrationen adaptierte Zellen wesentlich toleranter gegenüber Kobalt sind, als nicht an Nickel adaptierte Zellen (Liesegang et al. 1993, Schmidt und Schlegel 1989, 1994).

Aus Abbildung 14 ist zu entnehmen, dass die Zellen aller drei Stämme nicht in der Lage sind, die Eisen(II)-Ionen bei steigenden Kobalt-Konzentrationen quantitativ zu oxidieren. Die Ähnlichkeit der bivalenten Eisen(II)-, Kobalt(II)- und Nickel(II)-Ionen, mit einem ungefähr gleichen Durchmesser von 138 -160 pm könnte darauf schließen lassen, dass Kobalt(II)- und Nickel(II)-Ionen direkt mit dem eisenoxidierenden Enzym interagieren und es u.U. blockieren. Es könnte sich auch um einen additiven Effekt handeln, da die Zellen der Art *A. ferrooxidans* auch durch Eisen(III)-Ionen, ihrem Stoffwechselendprodukt, gehemmt werden (Kawabey 2003).

Das pH-Optimum lag bei den Zellen aller drei Stämme um 2. Dieser Wert liegt somit im Rahmen dessen, was für Stämme von *A. ferrooxidans* charakteristisch ist (Jensen und Webb, 1995). Allerdings ist das pH-Optimum auch stark von der Vorkultur abhängig, wie Krulwich und Guffanti (1983) in ihren Versuchen zeigten, und somit oft als adaptiver Wert anzusehen.

Für die Zellen des Stammes SPIII/3 wurde ein Temperatur-Optimum um 28°C bestimmt. Das Optimum der Zellen des *A. ferrooxidans* Typstammes war mit 32 bis 35°C etwas erhöht. Das deckt sich mit den Angaben von Kelly und Wood (2000), die als optimale Wachstumstemperatur für Stämme der Art *A. ferrooxidans* 30 bis 35°C angeben. Für den Stamm DSM 2392 lag das Temperaturoptimum mit 25°C etwas unter dem von Stamm SPIII/3. Auch hier muss, wie bei dem pH-Optimum, die Vorkultur berücksichtigt werden. Stamm DSM 2392 wurde bezogen und war dort bei einer Temperatur von 25°C kultiviert worden. Auch das Temperaturoptimum ist als adaptiver Wert anzusehen.

Bei den Untersuchungen der Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den hier untersuchten drei *A. ferrooxidans* Stämmen zeigte sich, dass die Stämme SPIII/3 und DSM 2392 in die gleiche DGGE-Subgruppe gehören und sich von Stamm ATCC 23270 unterscheiden. Dieser Befund stimmt mit Mitchell (2002) überein, der Autor hat die gleiche Untersuchung für die Stämme ATCC 23270 und SPIII/3 durchgeführt. Da der Stamm DSM 2392 mehr Übereinstimmungen in der 16S rDNA zu dem Stamm SPIII/3 aufweist (99,6 %) als zum Stamm ATCC 23270 (<85 %) kann das als wichtiges Abgrenzungsmerkmal der beiden Stämme SPIII/3 und DSM 2392 gegen den *A. ferrooxidans* Typstamm ATCC 23270 herangezogen werden. Bereits Lane (1992) hat gezeigt, dass der Stamm DSM 2392 nicht mit dem *A. ferrooxidans* Typstamm

ATCC 23270 verwandt ist, so hat er beide Stämme anfangs in unterschiedliche Untergruppen der Proteobakterien platziert. Als weiteres Abgrenzungsmerkmal kann der G+C-Wert herangezogen werden, dieser lag beim Stamm SPIII/3 bei 64,5 mol% (Stackebrandt und Schumann pers. comm), beim Stamm DSM 2392 bei 65 mol% (Harrison 1982) und beim Stamm ATCC 23270 zwischen 58 und 59 mol% (Kelly und Wood 2000).

Ein wichtiges systematisches Werkzeug zur Identifizierung von Bakterien ist das Fettsäuremuster, das arttypische Profile liefert: „Fingerabdrücke“. Das Fettsäuremuster des Stammes SPIII/3 (Stackebrandt und Schumann, pers. comm) weist zu keinem bekannten Vergleichsorganismus Ähnlichkeiten auf. Allerdings müssen für die Interpretation des Fettsäuremusters die Anzuchtbedingungen berücksichtigt werden. Es kann unter veränderten Umweltbedingungen zu signifikanten Veränderungen im Fettsäuremuster kommen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Fettsäuremuster des *A. ferrooxidans* Stammes SPIII/3 (Stackebrandt und Schumann, pers. comm) nach Anzucht der Zellen bei 28°C mit dem Substrat Eisen(II)-Sulfat.

C-Kettenlänge von gesättigten n-alkyl Fettsäuren (Systematische Bezeichnung / Trivialbezeichnung)	% an den Gesamt-Fettsäuren
10:0 (decanoic / Capric acid)	2,53
11:0 (undecanoic /Undecylic Acid)	0,12
12:0 (dodecanoic / Lauric Acid)	7,69
14:0 (tetradecanoic / Myristic Acid)	0,12
16:0 (hexadecanoic / Palmitic Acid)	36,38
17:0 (heptadecanoic / Margaric Acid)	0,22
18:0 (octadecanoic / Stearic Acid)	0,26
C-Kettenlänge von zyklischen Fettsäuren (Systematische Bezeichnung)	
17:0 / CYCLO (cyclo-heptadecanoic)	2,81
C-Kettenlänge von ungesättigten n-alkyl Fettsäuren (Systematische Bezeichnung / Trivialbezeichnung)	
15:1 (pentadecenoic acid)	0,19
16:1 (9-hexadecenoic acid / Palmitoleic Acid)	0,36
18:1 (9-octadecenoic acid / Oleic Acid)	0,67
C-Kettenlänge von Hydroxy-Fettsäuren (Systematische Bezeichnung / Trivialbezeichnung)	
12:0 / 2xOH (hydroxy-dodecanoic / hydroxylauric acid)	0,36
16:0 / 2xOH (hydroxy-hexadecanoic / hydroxypalmitic acid)	1,63
10:0 / 3xOH (hydroxy-decanoic / hydroxycapric acid)	0,07

An polaren Lipiden wurden Phosphatidylglycerol, Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamin und zwei unbekannte Aminophospholipide gefunden (Stackebrandt und Schumann, pers. comm).

Bei den Untersuchungen der Cytochromspektren konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Stämmen festgestellt werden. Die Detektion der Absorptions-Peaks der meisten Cytochrome fällt bei dieser Methode schwer, da diese in den Peaks des Cytochrom c nur als Schultern zu sehen sind (Kirstein 1986). Somit ist es möglich, dass auch andere Cytochrome vorhanden sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Stämme SPIII/3 und DSM 2392 aufgrund der morphologischen, molekularbiologischen und physiologischen Unterschiede zum Typstamm ATCC 23270 nicht zur Art *A. ferrooxidans* gezählt werden können. Vorhandene physiologische Ähnlichkeiten etwa im pH-Optimum oder der Schwermetall-Toleranz, reichen nicht aus, um sie weiter bei *A. ferrooxidans* einzuordnen. So diskutieren Ludwig und Schleifer (1994), dass Unterschiede in der 16S rDNA schwerer wiegen als Ähnlichkeiten im Stoffwechsel. Letztere können im Laufe der Zeit z.B. durch lateralen Gentransfer bewirkt worden sein und lassen daher nicht zwangsläufig auf gleiche Herkunft schließen. Es ist nicht verwunderlich, dass die beiden Stämme SPIII/3 und DSM 2392 bisher der Art *A. ferrooxidans* zugeordnet wurden, da die Zellen beider Stämme in der Lage sind, acidophil mit Eisen(II)-Ionen als Energiequelle zu wachsen.

Physiologisch konnten keine Ähnlichkeiten zu anderen mesophilen aus der Literatur bekannten Organismen, die Eisen(II)-Ionen oxidieren, entdeckt werden. So scheidet eine Verwandtschaft mit der Gattung *Ferroplasma* aus, da diese Gattung dem Reich Archaea angehört (Edwards et al. 2000, Golyshina et al. 2000) und außerdem zum Wachstum Spuren von Hefe-Extrakt benötigt. *Ferromicrobium* wächst obligat heterotroph, die Zellen benötigen Hefe-Extrakt um Eisen(II)-Ionen oxidieren zu können (Johnson und Roberto 1997). Eine Verwandtschaft zur Gattung *Metallogenium* ist ebenfalls ausgeschlossen, da die Zellen dieser Gattung zum Einen nur säuretolerant und nicht acidophil sind und zum Anderen weil nie, die für *Metallogenium* charakteristischen, Eisenoxid-Auflagerungen (Walsh und Mitchell 1972)

auf den Zellen beobachtet werden konnten. *Gallionella ferruginea* wächst ebenfalls nicht acidophil, sondern bevorzugt pH-Werte zwischen 6 und 7,6.

Weiterhin wurden erwartungsgemäß (s.o.) keine Übereinstimmungen zur Art *N. ramosa* bezüglich der Physiologie festgestellt. Neben der Tatsache, dass *N. ramosa* neutrophil wächst, spricht hierfür vor allem die Fähigkeit von *N. ramosa* mit Acetat oder Lactat als Energiequelle zu wachsen, da diese beiden organischen Säuren schon in geringer Konzentration das Wachstum der Stämme SPIII/3 und DSM 2392 vollständig hemmen. Auch Morphologisch konnten hier keine Übereinstimmungen festgestellt werden, so bildet keiner der beiden Stämme zu keinem Zeitpunkt die für *N. ramosa* typischen rosettenförmige Kolonien aus.

Um die Stämme SPIII/3 und DSM 2392 eindeutig identifizieren zu können, sollte die Fähigkeit zum Wachstum auf schwefelhaltigen Substraten herangezogen werden. Weiterhin bieten sich mikroskopische Techniken an, um zwischen den Stämmen SPIII/3 oder DSM 2392 und dem *A. ferrooxidans* Typstamm ATCC 23270 zu unterscheiden, da die Morphologie charakteristisch für die Zellen der Stämme SPIII/3 und DSM 2392 ist. Sollte es zur Einordnung der beiden Stämme in eine neue Gattung kommen, müssten beide auf Grund der hohen Übereinstimmung in der 16S rDNA in die gleiche Art eingeordnet werden. Nach Stackebrandt und Goebel (1994) deutet eine Sequenzähnlichkeit der 16S rDNA von >93 % auf die Zugehörigkeit zur selben Gattung hin. Liegt diese Ähnlichkeit bei über 97 % müssen die beiden Organismen der gleichen Art zugeordnet werden.

6. Literaturverzeichnis

Ageeva, S. N., T. F. Kondratéva und G. I. Karavaiko 2001. Phenotypic characteristics of Thiobacillus ferrooxidans Strains. *Microbiology* **70**: 226-234.

Alexander, B., S. Leach und W. J. Ingledeu 1987. The relationship between chemiosmotic parameters and sensitivity to anions and organic acids in the acidophile Thiobacillus ferrooxidans. *J. Gen. Microbiol.* **133**:1171-1179.

Alvarez S., C. A. Jerez 2004. Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in Acidithiobacillus ferrooxidans. *App. Environ. Microbiol.* **70**: 5177-5182.

Babenzien, H-D. 1965. Über Vorkommen und Kultur von Nevskia ramosa. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1(Suppl 1)*:111–116

Babenzien, H-D. 1967. Zur Biologie von Nevskia ramosa. *Z Allg Mikrobiol* **7**: 89–96

Babenzien, H-D, W. Schwartz 1970. Studien zur Mikrobiologie des Neustons. *Limnologica* **7**: 247–272

Bauer, D. und M. Caude. 1985. Determination of fixation of thiol collectors isotherms on galena using a dynamic method = chromatographic saturation front analysis, S. 81-89. *In* K. S. E. Forssberg (Hrsg.), Flotation of sulfide minerals. Elsevier, Amsterdam.

Blenden, D. C., M. S. Goldberg 1965. Silver impregnation stain for Leptospira and flagella. *J. Bacteriol.*, **89**: 899-900.

Boon, M., G. S. Hansford und J. J. Heijen. 1995. The role of bacterial ferrous iron oxidation in the biooxidation of pyrite, S. 153-163. *In* T. Vargas et al. (Hrsg.), Biohydrometallurgical processing Vol. I. University of Chile, Santiago, Chile.

Cannon, G. C., C. E. Bradburne, H. C. Aldrich, S. H. Baker, S. Heinhorst, J. M. Shively 2001. Microcompartments in Prokaryotes: Carboxysomes and Related Polyhedra. *App. Environ. Microbiol.* **67**: 5351-5361.

Chisholm, I. A., L. G. Leduc und G. D.Ferroni 1998. Metal resistance and plasmid DNA in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**, 245-254.

Cobley, J. G., and J. C. Cox. 1983. Energy conservation in acidophilic bacteria. *Microbiol. Rev.* **47**:579-595.

Colmer, A. R., K. L. Temple und H. E. Hinkle. 1950. An iron-oxidizing bacterium from the acid drainage of some bituminous coal mines. *J. Bacteriol.* **59**: 317-328.

De Wulf-Durand, P., Bryant, L. J. und Sly, L. I. 1997. PCR-Mediated detection of acidophilic, bioleaching-associated bacteria. *App. Environ. Microbiol.* **63**: 2944-2948.

DEV - Deutsche Einheitsverfahren zur Wasseruntersuchung. 1966. Verlag Chemie, Weinheim.

DEV - Deutsche Einheitsverfahren zur Wasseruntersuchung. 1984. Bestimmung von Eisen, E1, S. 1-10. In *Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung* Verlag Chemie, Weinheim.

DiSpirito, A. A. und O. H. Tuovinen. 1982. Uranous ion oxidation and carbon dioxide fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Arch. Microbiol.* **133**: 28-32.

Drobner, E., H. Huber und K. O. Stetter. 1990. *Thiobacillus ferrooxidans*, a facultative hydrogen oxidizer. *App. Environ. Microbiol.* **56**: 2922-2923.

Dopson, M. 2003. Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms. *Microbiology* **149**: 1959-1970

Dunn T., K. Gable, T. Beeler 1994. Regulation of cellular Ca^{2+} by yeast vacuoles. *J Biol Chem.* **10**: 7273-8

Edwards, K. J., P. L. Bond, T. M. Gihring and J. F. Banfield 2000. An Archaeal Iron-Oxidizing Extreme Acidophile Important in Acid Mine Drainage. *Science* **287**: 1796-1799.

Ehrlich, H. L. 2002. *Geomicrobiology*. 4th edition Marcel Dekker, New York.

Famintzin, A. 1892. Eine neue Bakterienform: *Nevskia ramosa*. *Bull. Acad. Imp. Sci. St Petersburg, New Ser.* **234**: 481–468

Fisher, S. G. und L. S. Lerman 1979. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two dimensional gel electrophoresis. *Cell* **16**: 191-200.

Fisher, S. G. und L. S. Lerman 1983. DNA fragments differing by single basepair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**: 1579-1583.

Frattini C. J., L. G. Leduc, G. D. Ferroni 2000. Strain variability and the effects of organic compounds on the growth of the chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **77**: 57-64.

Friedrich, A. 1991. Untersuchung zur Überlebensrate ruhender Zellen bei stark acidophilen Bakterien. Diplomarbeit, Universität Hamburg.

Gehrke, T., R. Hallmann und W. Sand. 1995. Importance of exopolymers from *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* for bioleaching. S. 1-11. In t. Vargas et al. (Hrsg.), *Biohydrometallurgical processing Vol. I*. University of Chile, Santiago, Chile.

Gehrke, T. 1998. Bedeutung extrazellulärer polymerer Substanzen von *Thiobacillus ferrooxidans* für die Besiedlung und Laugung von Pyrit und Schwefel. Doktorarbeit, Universität Hamburg.

Gehrke, T., J. Telegdi, D. Thierry und W. Sand. 1998. Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. Appl. Environ. Microbiol. **64**:2743

Golyshina O. V., Pivovarova T. A., Karavaiko G. I., Kondrateva T. F., Moore E. R., Abraham W. R., Lunsdorf H., Timmis K. N., Yakimov M. M., Golyshin P. N. 2000. *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the *Ferroplasmaceae* fam. nov., comprising a distinct lineage of the Archaea. Int J Syst Evol Microbiol. **50(3)**:997-1006.

Groudev, S. N. 1979. Mechanism of bacterial oxidation of pyrit. Mikrobiologiya **16**: 75-87.

Hallmann, R., A. Friedrich, H.-P. Koops, A. Pommerening-Röser, K. Rhode, C. Zenneck und W. Sand. 1993. Physiological characteristics of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* and physicochemical factors influence microbial metal leaching. Geomicrobiol. J. **10**: 193-206.

Harrison jr., A. P. 1981. *Acidiphilium cryptum* gen. nov., sp. nov., heterotrophic bacterium from acidic mineral environments. Int. J. Syst. Bacteriol. **31**: 327-332.

Harrison jr., A. P. 1982. Genomic and Physiological diversity amongst strains of *Thiobacillus ferrooxidans* and genomic comparison with *Thiobacillus thiooxidans*. Arch. Microbiol. **131**: 68-76.

Harrison jr., A. P. 1983. Genomic and physiological comparisons between heterotrophic Thiobacilli and *Acidiphilium cryptum*, *Thiobacillus versutus* sp. nov., Thiobacillus acidophilus nom. Rev. Int. J. Sys. Bacteriol. **33**: 211-217.

Hensyl, W. R. und L. E. Forlifer (Hrsg.). 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9. Ausg., Williams & Wilkins Company, Baltimore.

Hippe, H. 2000. *Leptospirillum* gen. nov. (ex Markosyan 1972), nom. rev., including *Leptospirillum ferrooxidans* sp. Nov. (ex Markosyan 1972), nom. rev. and *Leptospirillum thermoferrooxidans* sp. Nov. (Golovacheva et al. 1992). Int. J. Sys. Evol. Microbiol. **50**: 501-503.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T., 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1st Ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

Howard, A. and D. G. Lundgren, 1970. Inorganic pyrophosphatase from *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*). Can. J. Biochem. **48**:1302-1307.

Ingledeu, W. J. 1982. *Thiobacillus ferrooxidans*: the bioenergetics of an acidophilic chemolithotroph. Biochim. Biophys. Acta **683**:89-117.

Jayarao, B. M., Dore, J. J., Baumbach, G. A., Matthews, K. R. und Oliver, S. P. 1991. Differentiation of *Streptococcus uberis* from *Streptococcus parauberis* by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of 16S ribosomal DNA. J. Clin. Microbiol. **12**: 2774-2778.

Jensen, A. B. und C. Webb. 1995. Ferrous sulphate oxidation using *Thiobacillus ferrooxidans*: a review. Process. Biochem. **30**: 225-236.

Johnson B., F. F. Roberto 1997. Heterotrophic acidophiles and their roles in the bioleaching of sulfide minerals. In: Rawlings DE (ed) Biomining: theory, microbes and industrial processes. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 259–279

Johnson, D. B. 1998. Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. FEMS Microbiol. Ecol. **27**: 307-317.

Kawabey, Y., C. Inove, K. Suto und T. Chida 2003. Inhibitory effect of high concentrations of ferric ions on the activity of *A. ferrooxidans*. J. Biosci. Bioeng. **96/4**: 375-379.

Keasling J. D., G. A. Hupf 1996. Genetic manipulation of polyphosphate metabolism affects cadmium tolerance in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* **62(2)**:743-6.

Kelly, D. P. und A. P. Harrison jr. 1989. Genus *Thiobacillus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1st edn, vol. 3, pp 1458-1842. Edited by J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig and J. G. Holt. Baltimore: Williams and Wilkins.

Kelly, D. P. und A. P. Wood. 2000. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **50**: 511-516.

Kieft T.L., S.D. Spence 1988. Osmoregulation in *Thiobacillus ferrooxidans*: stimulation of iron oxidation by proline and betaine under salt stress. *Curr. Microbiol.* **17**: 255-258.

Kinzler, K. 2000. Einfluss der extrazellulären, polymeren Substanzen (EPS) auf den Substratumsatz Eisen und Schwefel oxidierender Bakterien. Diplomarbeit, Universität Hamburg.

Kirstein K. O., E. Bock, D. J. Miller und D. J. D Nicholas 1986. Membrane-bound b-type cytochromes in *Nitrobacter*. *FEMS Microbiology Letters* **36**: 63-67.

Kock, D. 2003. Untersuchungen zur Anheftung von *Acidithiobacillus ferrooxidans* an verschiedene Minerale, Diplomarbeit, Universität Hamburg.

Kondratyeva, T. F., L. N. Muntyan und G. I. Karavaiko 1995. Zinc- and arsenic-resistant strains of *Thiobacillus ferrooxidans* have increased copy numbers of chromosomal resistance genes. *Microbiology* **141**: 1157-1162.

Krulwich, T. A., und A. A. Guffanti 1983. Physiology of acidophilic and alkalophilic bacteria. *Adv. Microbiol. Phys.* **24**:173-214

Lane, D. J., A. P. Harrison jr., D. Stahl, B. Pace, S. J. Giovanni, G. J. Olsen und N. R. Pace. 1992. Evolutionary relationships among sulfur- and iron-oxidizing eubacteria. *J. Bacteriol.* **174**: 269-278.

Leathen, W. W., S. A. Braley und L.D. McIntyre 1953. The role of bacteria in the formation of acid from certain sulphuric constituents associated with bituminous coal. II. Ferrous iron oxidizing bacteria. *Appl. Microbiol.* **1**: 65-68

Leduc L. G. und G. D. Ferroni 1994. The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Rev.* **14**: 103-120

Lengeler J. W., G. Drews und H. G. Schlegel 1999. *Biology of the prokaryotes*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany.

Liesegang, H., K. Lemke, R. A. Siddiqui, und H. G. Schlegel. 1993. Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J Bacteriol* **175**(3): 767-78.

Ludwig, W. und K. H. Schleifer, 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Rev.***15**: 155-173

Mackintosh, M. E. 1978. Nitrogen fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Microbiol.* **105**: 215-218.

Madigan, M.T., J. M. Martinko, und J. Parker, 2003. *Brock Biology of microorganisms*. Prentice-Hall, Inc. Ed., Englewood Cliffs, N.J. USA

Manteca, J. I. 2002. Universidad Politécnica de Cartagena

Marchand E.A., J. Silverstein 2003. The Role of Enhanced Heterotrophic Bacterial Growth on Iron Oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **20**: 231-244

McDonald, I. R., P. D. Kelly, J. C. Murrell und A. P. Wood 1997. Taxonomic relationship of *Thiobacillus halophilus*, *T. aquaesulis*, and other species of *Thiobacillus*, as determined using 16S rDNA sequencing. *Arch. Microbiol.* **166**: 394-398.

Martin, P. A. W., P. R. Dugan, und O. H. Tuovinen, 1981. Plasmid DNA in acidophilic, chemolithotrophic *thiobacilli*. *Can J Microbiol.* **27**: 850–853.

Merroun M., C. Hennig, A. Rossberg, G. Geipel, T. Reich und S. Selenska-Pobell, 2001 Molecular and atomic analysis of uranium complexes formed by three eco-types of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biochem. Soc. Trans.* **30**: 669–672

Mitchell, D. 2002. Untersuchungen zum Verwandtschaftsverhältnis verschiedener Stämme von *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* und *Leptospirillum ferrooxidans*, Diplomarbeit, Universität Hamburg.

Moses, C. O., D. K. Nordstrom, J. S. Herman und A. L. Mills. 1987. Aqueous pyrite oxidation by dissolved oxygen and ferric iron. *Geochem. Cosmochem. Acta* **51**: 1561-1571.

Muyzer, G., T. Brinkhoff, U. Nübel, C. Santegoeds, H. Schäfer und C. Wawer, 1998. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. *Mol. Microbial Ecol. Manual* **3.4.4**: 1-27.

Oen I. S., J. C. Fernández, und J. I. Manteca 1990. The Lead-Zinc and associated ores of La Union Sierra de Cartagena, Spain. *Econ. Geology* **70**: 1259-1278.

Pladdies T., H. D. Babenzien, H. Cypionka 2004. Distribution of *Nevskia ramosa* and Other Rosette-Forming Neustonic Bacteria. *Microbial Ecology* **47**: 218-223

Pronk J. T. , W. M. Meijer, W. Hazeu , J. P. van Dijken, P. Bos, und J. G. Kuenen 1991. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on formic acid. *Appl Environ Microbiol.* **57 (7)**: 2057–2062

Rawlings, D. E. und T. Kusano, 1994. Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. Microbiol. Rev. **58**: 39-55.

Rawlings, D. E., Tributsch, H. und Hansford, G. S. 1999. Reasons why '*Leptospirillum*'-like species rather than *Thiobacillus ferrooxidans* are the dominant iron-oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores. Microbiology **145**: 5-13.

Rehm, H. J. 1980. Mikroorganismen bei Metall- und Ölgewinnung – Laugung (leaching) von Metallen. Industrielle Mikrobiologie, Springer Verlag, Berlin.

Reynolds, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. Cell. Biol. **18**: 208-212.

Rodríguez, Y., A. Ballester, M. L. Blázquez, F. González und J. A. Muñoz. 2003. Study of bacterial attachment during the bioleaching of pyrite, chalcopyrite and sphalerite. Geomicrobiol. J. **20**: 131-141.

Sabatini, D. D., K. Bensch und R. J. Barnett. 1963. Cytochemistry and electron microscopy for the preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. J. Cell. Biol. **17**: 19-58.

Sand, W., Rohde, K., Sobotke, B. und Zenneck, C. 1992. Evaluation of *Leptospirillum ferrooxidans* for leaching. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 2930-2935.

Sand, W., T. Gehrke, P.-G. Jozsa und A. Schippers. 1999. Direct versus indirect bioleaching, Teil A S. 27-49. In R. Amilis und A. Ballester (Hrsg.), Biohydrometallurgy and the environment towards the mining of the 21st century. Processings of the International Symposium San Lorenzo de El Escorial 1999. Madrid, Spain.

Sasaki, K., Tsunekawa, M., Tanaka, S., Fukushima, M. und Konno, H. 1999. Inhibiting effect of natural organic acids on microbially mediated dissolution of pyrite in acidic environments", J. Min. and Mater. Process. Inst. Japan, 115:233-239

Schippers, A., P.-G. Jozsa und W. Sand. 1996. Sulfur chemistry in bacterial leaching of pyrite. Appl. Environ. Microbiol. **62**: 3424-3431.

Schippers, A., T. Rohwerder und W. Sand. 1999. Intermediary sulfur compounds in pyriteoxidation: implications for bioleaching and biodepyritization of coal. Appl. Microbiol. Biotechnol. **52**: 104-110.

Schmidt, T., und H. G. Schlegel. 1989. Nickel and cobalt resistance of various bacteria isolated from soil and highly polluted domestic and industrial wastes. FEMS Microbiol Ecol **62**: 315-328.

Schmidt, T., und H. G. Schlegel. 1994. Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the *ncc* locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A. J Bacteriol **176(22)**: 7045-54.

Silverman, M. P. 1967. Mechanism of bacterial pyrite oxidation. J. Bacteriol. **94**: 1064-1051.

Silverman, M. P. und H. L. Ehrlich. 1964. Microbial formation and degradation of minerals. Adv. Appl. Microbiol. **6**: 153-206.

Spurr, A. R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastr. Res. **26**: 31-43.

Stackebrandt, E., R. G. E. Murray und H. G. Trüper, 1988. Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the „purple bacteria and their relatives.“ Int. J. Syst. Bacteriol. **38**: 321-325

Stackebrandt, E. und B. M. Goebel, 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* **44**: 846-849

Stevens, C. J., P. R. Dungan und O. H. Tuovinen. 1986. Acetylene reduction (nitrogen fixation) by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **8**: 351-359.

Stürmeyer, H., J. Overmann, H. D. Babenzien, H. Cypionka 1998. Ecophysiological and Phylogenetic Studies of *Nevskia ramosa* in Pure Culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1890-1894.

Temple K. A. und A. R. Colmer. 1951. The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **62**: 605-611.

Tributsch, H. 1999. Direct versus indirect bioleaching, Teil A S. 51-60. *In* R. Amilis und A. Ballester (Hrsg.), *Biohydrometallurgy and the environment towards the mining of the 21st century*. Processings of the International Symposium San Lorenzo de El Escorial 1999. Madrid, Spain.

Tuovinen, O. H., S. I. Niemelä und H. G. Gyllenberg. 1971. Tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans* to some metals. *Antonie von Leeuwenhoek* **37**: 489-496.

Tuovinen, O. H. und D. P. Kelly, 1972. Biology of *Thiobacillus ferrooxidans* in relation to the microbiological leaching of sulfide ores. *Z. Allg. Microbiol.* **12**: 311-346.

Tuovinen, O. H. und D. P. Kelly, 1973. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans* I. Use of membrane filters and ferrous iron agar to determine viable numbers, and comparison with ¹⁴CO₂-fixation and iron oxidation as measures of growth. *Arch. Microbiol.* **88**: 285-298

Van Niel, C. B. 1946. The classification and natural relationships of bacteria. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **11**: 285-301

Walsh, F. and R. Mitchell, 1972, A pH dependent succession of iron bacteria, environmental science and technology, v6, n9, p.809-812

Winogradsky, S. 1887. Über Schwefelbakterien. Botanische Zeitung **45**: 489-600, 606-616

Winogradsky, S. 1922. Eisenbakterien als Anorgoxydanten. Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Abt. 2 **57**: 1-21

Zenneck, C. 1988. Mikrobiologische Bestandsaufnahme in zwei rumänischen Erzbergwerken und Charakterisierung der lithotrophen Flora. Diplomarbeit, Universität Hamburg.

Diese Arbeit wurde in der Zeit vom 12. November 2003 bis zum 17. September 2004 in der mikrobiologischen Abteilung des Biozentrums Klein Flottbek und Botanischer Garten der Universität Hamburg durchgeführt.

Danksagung

Herrn **Priv.-Doz. Dr. Wolfgang Sand** möchte ich für die Themenstellung, die Betreuung und sein Interesse an dieser Arbeit danken. Seine Anregungen und Ratschläge zur Versuchsdurchführung und zum literarischen Hintergrund haben mir sehr geholfen.

Herrn **Priv.-Doz. Dr. Hartmut Quader** danke ich für die Hilfsbereitschaft und Ratschläge zur Elektronenmikroskopie.

Für die Betreuung am TEM danke ich **Irmhild Wachholz** und **Elke Woelken**.

Kerstin Harneit danke ich für die wertvollen Tipps zur Versuchsdurchführung, der ständigen Hilfsbereitschaft und das kritische Lesen. **Dr. Tilman Gehrke** und **Florian Brill** danke ich für das kritische Lesen und ihre Bereitschaft zur Diskussion. Außerdem danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Sand für die angenehme Atmosphäre und das gute Arbeitsklima.

Mashal Alawi danke ich für seine wertvolle Unterstützung bei der Durchführung der DGGE und seine ständige Hilfsbereitschaft.

Für Ratschläge zur Elektronenmikroskopie und Interpretation der TEM-Aufnahmen danke ich **Eva Spieck**.

Außerdem danke ich meiner **Familie** und meiner Freundin **Pamela** für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Mit einer Ausleihe meiner Arbeit in der Bibliothek bin ich einverstanden.

Ich versichere an Eides statt, dass zur Durchführung und Abfassung dieser Diplomarbeit keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet wurden.

Hamburg, den 17. September 2004

Christian Karsten