

Thiobacillus ferrooxidans-

Leben in Uranhalden

Von der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie
der Universität Leipzig
genehmigte

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Dipl.-Ing. Sabine Kutschke

geboren am 26.11.1969 in Bautzen

Dekan Prof. Dr. M. Schlegel

Gutachter: Prof. Dr. W. Babel

Prof. Dr. I. Röske

Prof. Dr. W. Reißer

Tag der Verteidigung 01.11.2002

Verzeichnisse	I
Inhaltsverzeichnis	
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Rückstände des Uranbergbaus	1
1.1.1 Situation in Sachsen und Thüringen	1
1.1.2 Beschreibung des Haldenkomplex Haberlandmühle	1
1.1.3 Wechselwirkungen zwischen Abfällen des Uranbergbaus und Mikroorganismen	1
1.1.4 Mikrobielle Population im Ökosystem Uranhalde	2
1.2 Die Art <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	2
1.2.1 Allgemeine Eigenschaften	2
1.2.2 Metabolismus und Wachstum	3
1.2.3 Genetische Eigenschaften	4
1.2.4 Minerale und <i>T. ferrooxidans</i>	5
1.2.5 Einfluss von Metallen auf das Wachstum von <i>T. ferrooxidans</i>	6
1.3 Problemstellung	8
2 Material und Methoden	9
2.1 Kultivierung und Ernte der Bakterien	9
2.1.1 Die verwendeten Stämme der Art <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	9
2.1.2 Anzucht und Ernte	9
2.1.3 Wachstumsuntersuchungen	10
2.1.4 Zellaufschluss zur Analyse von Zellfraktionen und Proteinen	11
2.1.5 Isolierung der bakteriellen DNS	12
2.1.6 Konventionelle Gelelektrophorese	12
2.1.7 Auswertung der Bilddaten	12
2.2 Phylogenetische Untersuchung der <i>T. ferrooxidans</i> - Isolate	13
2.2.1 Template für die Sequenzierung	13
2.2.2 Sequenzierung	14
2.3 Bestimmung von Uran in verschiedenen Zellfraktionen	16
2.4 Untersuchungen der Wechselwirkung zwischen Uran und der Zelle	17

Verzeichnisse	II	
2.5	Untersuchungen zur Struktur der Bindung von Uran mit den Bakterien	17
2.5.1	Probenvorbereitung	18
2.5.2	Durchführung der zeitaufgelösten Laserfluoreszenz-Spektroskopie (TRLFS)	18
2.6	Analyse des Proteinprofils	19
2.6.1	Proteinbestimmung	19
2.6.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	19
2.7	Genetische Fingerabdrücke	21
2.7.1	Genetische Fingerabdrücke durch PCR	22
2.7.2	Genetische Fingerabdrücke durch Gelelektrophorese im gepulsten Feld (PFG)	23
2.8	Chemikalien	26
3	Ergebnisse	27
3.1	Phylogenetische Charakterisierung der Haldenisolate	27
3.2	Wachstum von <i>T. ferrooxidans</i> in Gegenwart und Abwesenheit von Uran	30
3.3	Beschreibung der Bindung zwischen Uran und <i>T. ferrooxidans</i>	32
3.3.1	Sorption von Uran(VI) an unterschiedliche <i>T. ferrooxidans</i> - Stämme	32
3.3.2	Spektroskopische Daten der Bakterien-Uran-Komplexe	34
3.4	Wirkung von Uran auf die Zellen von <i>T. ferrooxidans</i>	35
3.4.1	Bestimmung von Uran in bakteriellen Zellen	35
3.4.2	Einfluss von Uran auf die Proteinsynthese	36
3.4.3	Genetische Fingerabdrücke durch PCR	38
3.4.4	Genetische Fingerabdrücke durch Gelelektrophorese im gepulsten Feld	45
4	Diskussion	48
4.1	Genetische Charakterisierung auf der Grundlage der 16S rDNS-Sequenz	48
4.2	Wachstum und Resistenzuntersuchungen von <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> - Stämmen	49
4.3	Wechselwirkungen zwischen Uran und <i>T. ferrooxidans</i> - Stämmen	51
4.3.1	Uranverteilung und Proteine	51
4.3.2	Sorption und TRLFS	53
4.3.3	Genetische Charakterisierung durch Fingerabdrücke	55
5	Zusammenfassung	57
6	Literaturverzeichnis	59

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Modell für den Elektronentransport durch die Zytoplasmamembran [Elbehti et al. 2000]	4
Abb. 2	Trennung des Rohextraktes in Fraktionen nach Gerhardt et al. (1994)	16
Abb. 3	Mikroheterogenitäten in der 16S rDNS von <i>T. ferrooxidans</i>	29
Abb. 4	Sauerstoffverbrauch von Referenzstämmen auf uranfreien und uranhaltigen Medien	30
Abb. 5	Sauerstoffverbrauch der Haldenisolate auf uranfreien und uranhaltigen Medien	30
Abb. 6	Uranakkumulation der Haldenisolate im Vergleich zu Referenzstämmen in Abhängigkeit von der Uran(VI)-Konzentration in der Lösung	32
Abb. 7	Mit 0,01 M EDTA/TRIS-Lösung extrahierbarer Urananteil der U-beladenen Biomasse	34
Abb. 8	Emissionsspektren des Uranylions und der verschiedenen Bakterien- Uran- Komplexe	35
Abb. 9	PAGE des Rohextrakts verschiedener <i>T. ferrooxidans</i> - Stämme, die mit und ohne Uran im Medium kultiviert wurden	37
Abb. 10	Sauerstoffverbrauch von TFSS 4 und TFSS 6 auf streptomycinhaltigen Medien mit und ohne Uran	37
Abb. 11	Fingerabdrücke durch RAPD- Primer	40
Abb. 12	Dendrogramm aus den RAPD- Fingerabdrücken der untersuchten <i>T. ferrooxi- dans</i> - Stämme	41
Abb. 13	Fingerabdrücke durch repetitive Primer	43
Abb. 14	Dendrogramm aus den rep- Fingerabdrücken der untersuchten <i>T. ferrooxi- dans</i> - Stämme	44
Abb. 15	Schemata nach Verdau der bakteriellen DNS mit den Endonukleasen	46
Abb. 16	Dendrogramm aus den PFG- Fingerabdrücken der untersuchten <i>T. ferrooxi- dans</i> - Stämme	47
Abb. 17	Schema der Ferrooxidase-Reaktion	50

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Zusammensetzung der Bodenproben	9
Tab. 2	Verwendete Primer für PCR der 16S rDNS	14
Tab. 3	Thermozyklen für die PCR von 16S rDNS	14
Tab. 4	Verwendete Primer für Sequenzierreaktion der 16S rDNS	15
Tab. 5	Thermozyklen für die Sequenzierreaktion von 16S rDNS	15
Tab. 6	Zusammensetzung des Probenpuffers für die SDS-PAGE	20
Tab. 7	Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele	20
Tab. 8	Lösungen für die Silbernitratfärbung der Polyacrylamidgele	21
Tab. 9	Primer für die RAPD und rep-APD	22
Tab. 10	Thermozyklen für die RAPD und rep-APD	23
Tab. 11	Lösungen für die PFG	24
Tab. 12	Schritte der PFG	25
Tab. 13	Urankonzentrationen in einzelnen Biomassefraktionen	36

Abkürzungsverzeichnis

ATCC	Amerikanische Stammsammlung (en.: American Type Culture Collection)
ATP	Adenosintriphosphat
Cm	Kanamycin
cyt	Zytochrom
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Didesoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat, N steht für eine der Basen Adenin, Thymin, Guanin, Cytosin
ddNPT	2',3'-Didesoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	Europäisches molekularbiologisches Labor
ICP-MS	Massenspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (en.: inductiv coupled plasma mass spectroscopy)
ISE	Insertions- Sequenz- Element
NAD(P)H	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid(phosphat)
PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (en.: polymerase chain reaction)
PFG	Gelelektrophorese im gepulsten Feld (en.: pulsed field gelectrophoresis)
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
q	Temperatur
RAPD	mit willkürlichen Primern vervielfältigte DNS (en.: Random amplified polymorphic DNA)
rDNS	Gen für die rRNS
rep-APD	mit sich wiederholenden Oligonukleotiden vervielfältigte DNS (en.: repetitive amplified polymorphic DNA)
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNS	Ribonukleinsäure
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sm	Streptomycin
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRLFS	Zeit aufgelöste Laserfluoreszenzspektroskopie (en.: time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy)
vpma	variable Proteine des <i>Mycoplasma agalactiae</i>

1 Einleitung

1.1 Rückstände des Uranbergbaus

1.1.1 Situation in Sachsen und Thüringen

Im Raum Sachsen und Ostthüringen wurden über 40 Jahre Uranerze gewonnen und verarbeitet. 1990 wurde der Uranerzbergbau eingestellt, tiefgreifende Schädigungen in der Umwelt blieben zurück. In den dichtbesiedelten Kulturlandschaften Sachsens und Ostthüringens sind ökologische Probleme dadurch unausweichlich. Zu diesen zählen neben den eingeschränkten Nutzungsmöglichkeiten der beanspruchten Flächen auch die Freisetzung radioaktiver und anderer Schadstoffe in die Umgebung.

1.1.2 Beschreibung des Haldenkomplex Haberlandmühle

Der Haldenkomplex Haberlandmühle befindet sich am nördlichen Rand der Stadt Johanngeorgenstadt und liegt unmittelbar an dem Fluss Schwarzwasser. In diesem Haldenkomplex sind mineralische Rückstände der Urangewinnung aufgehäuft. Dazu zählen pyritführende Phyllite und Amphibolite, Granite und Restmengen an uranhaltigen Erzen. Der Haldenkomplex Haberlandmühle ist mit einer Mineralbodenschicht abgedeckt und bewaldet. In Bodenproben dieser Halde wurde ein pH-Wert von 4,5 bestimmt. Als Hauptkomponenten im Sickerwasser der Halde wurden Aluminium, Kalzium, Sulfat und Silizium nachgewiesen [Fischer-Appelt et al. 1999].

1.1.3 Wechselwirkungen zwischen Abfällen des Uranbergbaus und Mikroorganismen

Durch eindringendes Niederschlagswasser, die damit verbundenen Wechselwirkungen mit der Geomatrix sowie durch biochemische Prozesse können Uran und andere Schadstoffe aus den Erzen herausgelöst und mit dem Sickerwasser verbreitet werden. Zum Beispiel werden aus pyrit- und erzführenden Gesteinen Metalle über indirekte, mehrstufige von Bakterien katalysierte Prozesse mobilisiert. Andere von Mikroorganismen initiierte Vorgänge führen zu einer Ausfällung gelöster Metalle.

Die Zusammensetzung der Uranabfälle und der autochthonen Mikroorganismenpopulation bestimmen, ob die Summe der biochemischen Prozesse zur Mobilisierung von Uran und anderen Stoffen und damit zu einer potenziellen Gefährdung der Umwelt führt.

1.1.4 Mikrobielle Population im Ökosystem Uranhalde

Zur Untersuchung der bakteriellen Population in Minen und Abfallhalden werden verschiedene Methoden verwendet. Zu diesen Methoden zählen die Kultivierung, die mikroskopische Beobachtung der Population, immunologische und molekularbiologische Methoden [West et al. 1985].

Aus Bodenproben von Uranhalden konnten *Thiobacillus ferrooxidans*, *T. thiooxidans*, *T. acidophilus*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Penicillium* sp., *Mucor mucedo*, *Bacillus* sp. und drei weitere moderat thermophile Stämme isoliert werden [de Sioniz et al. 1991]. Aus dem Haldenkomplex Haberlandmühle wurden *T. ferrooxidans*, *L. ferrooxidans*, verschiedene Arten der Gattungen *Desulfovibrio*, *Pseudomonas* und andere Vertreter der α -Proteobakterien angereichert und isoliert [Tzvetkova et al. 2001].

Analysen der 16S ribosomalen RNS-Gene (16S rDNS) von Bodenproben des Haldenkomplexes Haberlandmühle zeigten, dass die gefundenen 16S rDNS-Sequenzen den phylogenetischen Gruppen grüne Bakterien, Purpurbakterien und γ -Proteobakterien angehören [Puers et al. 1999, Flemming et al. 2001]. In diesen Arbeiten zeigte sich die Art *T. ferrooxidans* als dominant in den Bodenproben [Flemming et al. 2001].

1.2 Die Art *T. ferrooxidans*

1.2.1 Allgemeine Eigenschaften

Die Zellen der Art *T. ferrooxidans* sind klein, Gram negativ, oval und monopolar monotrich begeißelt. *T. ferrooxidans* ist obligat chemolithoautotroph und aerophil. Der für das Wachstum benötigte Kohlenstoff wird über den Calvin- Zyklus fixiert. Durch die Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen zu Sulfat gewinnt *T. ferrooxidans* seine Energie. Neben reduzierten Schwefelverbindungen können dieser Art auch Eisen(II)-Verbindungen zur Energiegewinnung dienen. *T. ferrooxidans* wächst im Temperaturbereich von 10°C bis 37°C und im pH-Bereich von 1,3 bis 4,5. Avakian und Karavaiko (1970) untersuchten die Struktur von *T. ferrooxidans*-Zellen. Im Zytoplasma wurden neben Ribosomen und einem wenig kompakten Nukleus strukturierte Einschlüsse gefunden. Auf den Mikrofotografien sind intrazelluläre Membranstrukturen sichtbar.

In der äußeren Membran konnten Eiweiße, die an der Eisen(II)-Oxidation [Mjoli et al. 1988] und andere die an der Schwefeloxidation [Buonfiglio et al. 1993] beteiligt sind, nachgewiesen werden. Auskunft über den Zustand der Zelle geben andere Proteine der äußeren Membran. Ein Mangel an Phosphat führt zu einer erhöhten Expression von mindestens zwei Proteinen auf der Zelloberfläche [Varela et al. 1998]. Kupferkonzentration von 20 g/l veränderten ebenfalls die Zusammensetzung der äußeren Membran von *T. ferrooxidans*-Zellen. Die Zellen werden hydrophober und ihre Oberfläche weniger negativ [Das et al. 1998]. Die Kupferionen werden nicht mehr so stark von der Zelle angezogen. Damit versucht sich die Zelle vor zu hohen Kupferkonzentrationen in ihrer unmittelbaren Umgebung zu schützen.

Die Zellwand von *T. ferrooxidans* ist eine mechanische Begrenzung der Zelle. Durch sie werden Stoffe zwischen der Zelle und ihrer Umgebung ausgetauscht, findet ein Elektronentransport statt, wird ein Protonengradient aufgebaut und werden Schutzmechanismen aktiviert (Kupferstress).

1.2.2 Metabolismus und Wachstum

Die Oxidation von eisenhaltigen Verbindungen (Erzen) durch *T. ferrooxidans* läuft in zwei Teilreaktionen ab. Im ersten Schritt wird zweiwertiges Eisen an der äußeren Membran oxidiert. Das abgegebene Elektron wird über eine Transportkette, bestehend aus einer Fe^{2+} Zytochrom c Oxidoreduktase, Zytochromen, Rustyanin an eine Zytochrom c Oxidase an der Zytoplasmamembran und von dort an den Elektronenakzeptor Sauerstoff übertragen. Die dabei freiwerdende Energie wird in Form von Adenosintriphosphat (ATP) gespeichert und für das Wachstum und den Metabolismus verbraucht. Für die Kohlenstofffixierung über den Calvin-Zyklus wird neben ATP auch reduziertes Nikotinamidadenindinukleotid(phosphat) (NAD(P)H) benötigt. Das NAD(P)H wird durch einen rückläufigen Elektronentransport regeneriert. Dieser Vorgang findet statt, wenn das gebildete ATP nicht verbraucht wird, weil Kohlenstoffintermediate im Zytoplasma fehlen. Die Zytochrom c Oxidase übernimmt dann die Funktion einer ATPase. Dadurch entsteht ein Protonengradient in der Zytoplasmamembran und das für die CO_2 -Fixierung benötigte NAD(P)H wird regeneriert [Elbehti et al. 2000]. In Abbildung 1 sind der exergone und der endergone Weg des Elektronentransports durch die Zytoplasmamembran von *T. ferrooxidans* schematisch dargestellt.

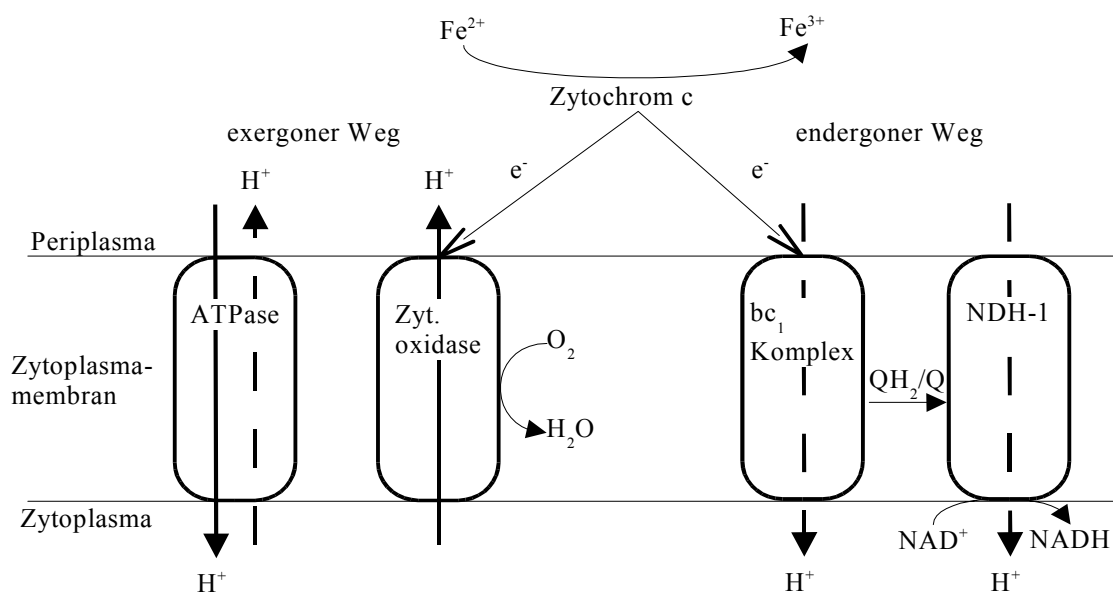


Abbildung 1: Modell für den Elektronentransport durch die Zytoplasmamembran [Elbehti et al. 2000]

Darüber hinaus ist die Art *T. ferrooxidans* fähig, Stickstoff zu fixieren [Mackintosh et al. 1978]. Die Stickstofffixierung verläuft in den Zellen unter mikroaeroben Bedingungen. Diese sind nötig, um die Eisenoxidation und somit die Energiebereitstellung zu ermöglichen. Der aufgenommene Stickstoff wird in Ammonium umgewandelt.

1.2.3 Genetische Eigenschaften

Der Metabolismus von *T. ferrooxidans* wurde von der biochemischen und der genetischen Seite untersucht. In einer Arbeit von Rawlings und Kusano (1994) sind die an der CO₂- und N₂- Fixierung beteiligten Gene beschrieben. Die zur Energiegewinnung und Schwefelassimilation beitragenden Gene sind in dieser Übersicht ebenfalls dargestellt [Rawlings et al. 1994]. Gene, die an der Aminosäuresynthese beteiligt sind, wurden über Sequenzvergleiche mit bekannten Genen ermittelt [Selkov et al. 2000]. Die genetischen Informationen für die ribosomale RNS (rRNS) sind ebenfalls untersucht. Im Genom von *T. ferrooxidans* liegt das rRNS- Operon zwei Mal vor [Salazar et al. 1989]. Beide Operone sind eng miteinander verknüpft und weisen in ihren kodierenden Bereichen eine hohe Sequenzähnlichkeit auf. An Hand der Sequenzen der 16S rRNS-Gene und einiger physiologischer Eigenschaften wurden einige Arten

der Gattung *Thiobacillus* neu klassifiziert [Kelly et al. 2000]¹. Die Einbeziehung der 16S rRNS- Gene in die Taxonomie ist ein Schritt von der künstlichen zur natürlichen Klassifikation von Mikroorganismen. Die Schlüssel zu den verwandtschaftlichen Verhältnissen der Prokaryoten sind für zentrale Funktionen (z.B. rRNS, RNS-Polymerasen) kodierende Gene [Woese 1993]. Durch Untersuchungen der 16S rRNS- Gene sind auch entwicklungsgeschichtliche Stufen innerhalb einer Art nachweisbar. Gegenwärtig werden aus den Gensequenzen für die rRNS Dendrogramme erstellt [Eisen 2000].

Das gesamte Genom von *T. ferrooxidans* wurde mit verschiedenen Fingerabdrucktechniken (RAPD [Novo et al. 1996], PFG [Irazabal et al. 1997]) untersucht. Die mit diesen Methoden bestimmte Größe des Genoms für unterschiedliche *T. ferrooxidans*-Stämme liegt zwischen 2150 kb und 3330 kb [Amils et al. 1998]. Aus den Bandenmustern wurden Dendrogramme errechnet. In diesen bilden sich verschiedene Homologiegruppen. Dadurch zeigt sich die genetische Vielfalt der *T. ferrooxidans*-Stämme. Die Unterschiede im PFG-Profil der chromosomalen DNS sind sowohl stamm- als auch substratspezifisch. Werden verschiedene Reduktionsmittel (FeSO_4 , FeS_2 , S) nacheinander eingesetzt, ändert sich das *Xba* I-Restriktionsprofil der chromosomalen DNS [Кондратева et al. 1996]. Der Einfluss von nicht direkt am Metabolismus beteiligten Verbindungen auf genomische Fingerabdrücke wurde noch nicht untersucht.

1.2.4 Minerale und *T. ferrooxidans*

Durch die Oxidation von Schwefel, reduzierten Schwefelkomponenten und Eisen(II) kann *T. ferrooxidans* Minerale auflösen. Die Art und Weise des Bioleachings durch *T. ferrooxidans* wird mit Biokorrosion, einem direkten oder indirekten Vorgang erklärt. In einer aus verschiedenen Erzen gebildeten natürlichen galvanischen Zelle findet die Biokorrosion statt. Durch die metabolische Aktivität der Mikroorganismen entsteht ein Elektrolyt (z.B. Schwefelsäure), der das Erz mit dem geringeren elektrochemischen Potential auflöst [Hutchins et al. 1986]. Bei der direkten Laugung werden das Metall und die sulfidische Komponente des Erzes gleichzeitig oxidiert [Sand et al. 1995]. Die indirekte Laugung ist ein mehrstufiger Prozess. Als Zwischenprodukte können bei diesem Vorgang Thiosulfat oder Polysulfate entstehen. Beim Thiosulfatmechanismus werden säureunlösliche Metallsulfide ausschließlich

¹ In der vorgelegten Arbeit wird die Klassifizierung nach Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [Kelly et al. 1989] vorgenommen.

durch Eisen(III)-Ionen oxidiert. Mit dem Polysulfidmechanismus werden säurelösliche Metallsulfide von Eisen(III)-Ionen und/oder Protonen attackiert. Beide Vorgänge werden durch *T. ferrooxidans* katalysiert [Schippers et al. 1999].

1.2.5 Einfluss von Metallen auf das Wachstum von *T. ferrooxidans*

Die bei der Erzlaugung freigesetzten Metallionen üben in bakteriellen Zellen verschiedene Funktionen aus oder sie beeinträchtigen das Wachstum der Zellen. Uran besitzt toxische Eigenschaften und beeinflusst, wie andere Metalle (Nickel, Kupfer), den Metabolismus von *T. ferrooxidans*. Durch die zweiwertigen Kationen wird die Eisenoxidation und die Kohlendioxidfixierung verringert [Tuovinen et al. 1974b], bis in höheren Metallkonzentrationen kein Wachstum mehr möglich ist. Es wurde festgestellt, dass abgetötete Zellen eine größere Menge an Uran aufnehmen als metabolisch aktive. Untersuchungen von DiSpirito et al. (1983) zeigten, dass vermehrungsfähige *T. ferrooxidans*-Zellen das aufgenommene Uran hauptsächlich in der Zellwand und der Zytoplasmamembran einlagern. In mit KCN behandelten Zellen, also abgetöteten Zellen, wurde das Uran sowohl in der Zellwand und der Zytoplasmamembran als auch im Zytoplasma nachgewiesen. Es stellt sich die Frage, wodurch das Eindringen von Uran in das Zytoplasma aktiver Zellen verhindert wird. Interessant ist, dass einige *T. ferrooxidans*-Isolate eine größere Toleranz z.B. gegenüber Uran zeigen als Referenzstämme [Martin et al. 1983]. Bei Wachstumsuntersuchungen von *T. ferrooxidans* wurde gezeigt, dass urantolerante Stämme in Anwesenheit von Uran eine längere lag-Phase benötigen als in uranfreien Medien. In dieser Zeit, so erklären die Autoren [Tuovinen et al. 1971], könnte ein membrangebundenes Schutzsystem, das eine Aufnahme von Uran in die Zelle verhindert, entwickelt werden.

Bekannte Resistenzmechanismen von Bakterien gegen Metalle sind Effluxpumpen, enzymatische Umwandlungen und Metallthioneinen [Silver et al. 1996]. Ist dieses membrangebundene Schutzsystem ein bisher nicht bekannter Resistenzmechanismus? Die erforschten Resistenzmechanismen sind auf extrachromosomalen Elementen (Transposon, Plasmid) und/oder im Chromosom verankert. Die Arsen(III)- und die Arsen(V)-Resistenz von *T. ferrooxidans* ist sowohl auf Plasmiden [Rawlings et al. 1983] als auch im Chromosom [Butcher et al. 2000] kodiert. Die Untersuchung der Quecksilberresistenzgene zeigte, dass sie ursprünglich auf einem extrachromosomalen Element lagen und nachträglich in das *T. ferrooxidans*-Chromosom einge-

baut wurden [Inoue et al. 1989].

1.3 Problemstellung

Obwohl *T. ferrooxidans* bei der industriellen Laugung von Uranerzen eingesetzt wird [Berthelot et al. 1994, Bosecker et al. 1997, Cerda et al. 1993, Edwards et al. 1999], ist nur wenig über den Resistenzmechanismus bekannt. Der Uranresistenzmechanismus von *T. ferrooxidans* kann durch die Untersuchung der charakteristischen, biochemischen Vorgänge und ihrer genetischen Determinanten aufgeklärt werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, den Uranresistenzmechanismus von *T. ferrooxidans* und seine genetischen Grundlagen zu beschreiben. Für die Untersuchungen wurden Isolate aus mit Uran kontaminierten Böden des Haldenkomplexes Haberlandmühle verwendet. In den natürlich mit Uran kontaminierten Habitaten bedeutet die Resistenz eines Isolates gegen Uran einen Selektionsvorteil in der Biozönose.

Durch einen Vergleich der 16S rRNS- Gene ist die Verwandtschaft der Isolate untereinander zu untersuchen. Mit dieser Methode können einzelne Stämme einer Art differenziert werden. Dadurch kann die Zahl der weiter zu untersuchenden Isolate auf sich unterscheidene Stämme beschränkt werden.

Das Wachstumsverhalten in uranfreier und uranhaltiger Umgebung sowie die Uranresistenz von verschiedenen Referenzstämmen und Haldenisolaten sind zu bestimmen.

Eine Beschreibung der Wechselwirkungen von Uran mit den Zellen von *T. ferrooxidans* sollte über die Art dieser Auskunft geben. Mit Sorptions-/Desorptionsuntersuchungen ist die Umkehrbarkeit der Bindung von Uran an die Zellen und mit Laserspektroskopie ist die Art der Bindung zu untersuchen.

Durch einen Vergleich des Zellextraktes von uranhaltigen und uranfreien Kulturen ist festzustellen, ob Uran eine biochemische Reaktion in der Zellen hervorruft. Mit Hilfe von genetischen Fingerabdrücken sind Veränderungen im Genom uranresistenter Zellen im Vergleich zu uransensitiven Zellen aufzuzeigen.

Mit den Ergebnissen zu von Uran induzierten biochemischen Vorgängen und genetischen Unterschieden zwischen uranresistenten und uransensitiven Zellen werden erste Aussagen über einen Resistenzmechanismus und seine genetischen Hintergründe erwartet.

2 Material und Methoden

2.1 Kultivierung und Ernte der Bakterien

2.1.1 Die verwendeten Stämme der Art *T. ferrooxidans*

Für die durchgeführten Untersuchungen wurden natürliche Isolate und Referenzstämmen der Art *T. ferrooxidans* verwendet. Die natürlichen Isolate wurden aus Bodenproben des Haldenkomplexes Haberlandmühle nahe Johanngeorgenstadt gewonnen und von dem Fachbereich für Allgemeine und Industrielle Mikrobiologie der Universität von Sofia (Bulgarien) zur Verfügung gestellt. Die Bodenproben stammen aus einer Tiefe von 0 m bis 1 m (Probe 1) und einer Tiefe von 2 m bis 3 m (Probe 2). Aus der Probe 1 wurden die Stämme TFSS 1, TFSS 2, TFSS 6 und aus der Probe 2 die Stämme TFSS 3, TFSS 4, TFSS 5 isoliert. Als Referenzstämmen wurden die *T. ferrooxidans*-Stämme ATCC 19859, ATCC 21834, ATCC 23270 und ATCC 33020 verwendet.

In der Abteilung Analytik des Institutes für Radiochemie am Forschungszentrum Rossendorf e.V. wurden die Bodenproben nach einem Hochdruckaufschluss mit Salpetersäure und Fluorwasserstoff auf den Gehalt verschiedener Metalle analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Bodenproben

Element	Al	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Sr	Mo	Cd	Pb	U
	g/kg	mg/kg	g/kg	g/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	g/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Probe 1	7,40	87,00	0,76	51,82	14,20	139,61	119,68	0,35	135,90	2,03	4,35	2,17	43,60	13,10
Probe 2	9,00	73,00	1,32	70,70	50,00	104,00	167,00	0,68	145,00	4,70	6,66	4,45	56,60	27,10

Die Bodenprobe aus einer Tiefe bis 1 m enthält im Vergleich zur Probe aus 2-3 m Tiefe einen höheren Gehalt an Chrom und Nickel. Alle anderen bestimmten Metalle sind in der Probe aus 2-3 m Tiefe in einer höheren Konzentration als in der Probe von bis 1 m Tiefe enthalten.

2.1.2 Anzucht und Ernte

Die mikrobiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die dafür benötigten Geräte, das Zubehör und die hitzestabilen Bestandteile der Nährmedien wurden vor dem Gebrauch bei 121 °C autoklaviert. Thermolabile Substanzen (FeSO_4 -Lösung, NaHCO_3 -Lösung, $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ -Lösung) wurden durch Fil-

tration sterilisiert. Dafür wurde ein Filtrationssystem MF75 mit einer Kapazität von 500 ml (Nalgene, Deutschland) eingesetzt.

Als Nährlösung wurde das Medium 9K nach Silvermann [Silvermann et al. 1959] verwendet. Der pH-Wert des Mediums betrug 2,5. Die Stämme wurden unter aeroben Bedingungen bei 30 °C kultiviert. Vor der Ernte der bakteriellen Zellen wurden die während des Wachstums entstehenden Partikel durch niedertourige Zentrifugation (100*g, 15 min) entfernt. Aus dem Überstand wurden die Mikroorganismen durch Zentrifugation (12800*g, 60 min) geerntet.

2.1.3 Wachstumsuntersuchungen

Es sind verschiedene Methoden zur Untersuchung des mikrobiellen Wachstums bekannt. Mit Hilfe des Koloniebildungsvermögens einer Bakterienkultur ist es möglich, die vermehrungsfähigen Zellen zu erfassen. Für *T. ferrooxidans* sind diesem Verfahren Grenzen durch den geringen pH- Wert des Mediums und durch die Zersetzung des Geliermittels in der Petrischale gesetzt. Durch den pH- Wert des Mediums von 2,5 sinkt die Gelierfähigkeit der Agarose. Das Nährmedium in der Petrischale bleibt weich. Des Weiteren zersetzt sich die Agarose. Die dabei entstehenden Monomere hemmen das Wachstum von *T. ferrooxidans* [Johnson 1995]. Weitere Methoden zur Verfolgung des Wachstums sind die Bestimmung der Anzahl von Mikroorganismen in Thoma-Zählkammern, der optischen Dichte einer Kultur und der Biotrockenmasse. Die Bakterien in *T. ferrooxidans*-Kulturen befinden sich sowohl in Suspension als auch auf der Oberfläche der gebildeten Partikel. Es ist dadurch nicht möglich, eine repräsentative Probe aus diesen Kulturen für ein Auszählen in der Thoma-Zählkammer zu erhalten. Bei der Messung der optischen Dichte und bei der Biotrockenmassebestimmung stellen die Partikel eine Fehlerquelle dar. Das Wachstum aerophiler Mikroorganismen kann alternativ über den Sauerstoffverbrauch verfolgt werden.

Für die Wachstumsuntersuchungen wurden die *T. ferrooxidans*-Stämme in geschlossenen Gefäßen kultiviert. Das während des Wachstums entstehende Kohlendioxid wurde durch Kaliumhydroxid gebunden. In den Gefäßen entsteht dadurch ein Unterdruck. Diese Druckdifferenz wurde während der Versuchsdauer gemessen und anschließend in den verbrauchten Sauerstoff umgerechnet. Die eingesetzten Gefäße (AQUALYTIC, Deutschland) wurden mit 70 ml 9K- Medium gefüllt. In den Köcher des Druck-Sensors wurde 1 ml 45%ige KOH gegeben. Die Flaschen wurden ver-

geschlossen und bei 30 °C inkubiert. Als Kohlenstoffquelle wurden je Liter Nährmedium 8,92 g NaHCO₃ zugegeben.

Durch die Zugabe von Uran in einer Konzentration von 10⁻⁷ mol/l UO₂(NO₃)₂ wurde der Einfluss dieses Metalls auf das Wachstum getestet. Durch die Unterdrückung der Proteinsynthese in uranhaltigen Medien sollte untersucht werden, ob Proteine zur Uranresistenz von *T. ferrooxidans*-Stämmen beitragen. Durch das Antibiotikum Streptomycin wird die Proteinsynthese von Prokaryoten unterbrochen. Eine Streptomycin-Konzentration von 100 µg/ml führt nicht zum Absterben von *T. ferrooxidans*-Zellen [Butcher et al. 2000]. Dazu wurde das Zellpellet aus 2 l uranfreier Vorkultur in ein uran- und streptomycin enthaltendes frisches Medium überführt und der Sauerstoffverbrauch in dieser Umgebung verfolgt.

2.1.4 Zellaufschluss zur Analyse von Zellfraktionen und Proteinen

Für die Untersuchungen einzelner Zellfraktionen hinsichtlich ihres Urangehalts und des Proteinprofils in Abhängigkeit von der Nährmedienzusammensetzung wurde das aus den Kulturen erhaltene Zellpellet mit einer Schwingmühle (Retsch, Deutschland) aufgeschlossen.

Das Pellet wurde 3x mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen und 30 min bei 12800*g zentrifugiert. Das gewaschene Zellpellet wurde in 2 ml 50 mmol/l Phosphatpuffer (pH 7,5) mit 1 mmol/l MgCl₂ und 3 mmol/l NaN₃ resuspendiert. Der Zellmasse wurden je 1 mg DNaseII, RNase und PMSF zugegeben. Die Zugabe von DNase und RNase vermindert die Viskosität und das PMSF inaktiviert zelleigene Enzyme in der Suspension nach erfolgtem Zellaufschluss. Diese Masse wurde in den Mahlbecher gegeben und mit Glasperlen (Durchmesser von 0,1-0,11 mm) vermischt bis die Masse eine honigartige Konsistenz hatte. Die Masse wurde 3 min bei maximaler Amplitude der Schwingmühle unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff aufgeschlossen. Das Gemenge wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und 4 min bei 1000*g und 4 °C zentrifugiert. Die Proteine befinden sich im Überstand, er wurde sofort bei -20 °C tiefgefroren. Das Sediment wurde verworfen.

2.1.5 Isolierung der bakteriellen DNS

Aus 20 ml Kultur wurde die DNS isoliert. Die Zellen wurden wie üblich geerntet, die Pellets mit TE-Puffer (10 mmol/l TRIS-HCl, 1 mmol/l EDTA, pH 8) gewaschen und durch Zentrifugation (12800*g, 30 min) erneut sedimentiert. Die DNS wurde mit Hilfe des NucleoSpin C+T Kits (Macherey Nagel GmbH, Deutschland) isoliert. Bei dieser Isolationsmethode wird das Zellysate auf eine DNS-bindende Matrix gegeben. Die anderen Zellbestandteile werden von der Matrix gespült. Die Elution der DNS erfolgt mit einer schwach sauren Lösung. In Abweichung dessen wurde bei der Elution von *T. ferrooxidans*- DNS steriles dH₂O verwendet. Die Qualität der erhaltenen DNS- Lösungen wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft. Anschließend wurden die DNS-Lösungen bei -20 °C gelagert.

2.1.6 Konventionelle Gelelektrophorese

Die qualitative und quantitative Charakterisierung von DNS erfolgte mit Agarosegelelektrophoresen. Dabei kamen horizontale submarine Gele mit einer Agarosekonzentration von 1 % zum Einsatz. Die Trennung erfolgte im elektrischen Feld (17 V/cm; PowerPac 200, BioRad, Deutschland). Als Elektrolyt wurde TRIS-Borat-Puffer (0,09 mol/l TRIS, 0,09 mol/l Borsäure, 0,004 mol/l EDTA) verwendet. Nach der Trennung wurden die Gele mit einer Ethidiumbromidlösung (0,1 mg/ml) 20 min gefärbt.

Zur Bestimmung der Längenpolymorphismen wurden horizontale submarine Gele mit einer Agarosekonzentration von 2 % eingesetzt. Der während des Auflösens entstehende Wasserdampfverlust wurde mit der entsprechenden Masse an dH₂O ausgeglichen. Die Fragmente wurden im elektrischen Feld (6 V/cm) über 4 h 20 min getrennt. Die Gele wurden in einer wässrigen Ethidiumbromidlösung (0,1 mg/ml) 30 Minuten gefärbt. Die gefärbten Gele wurden im UV-Licht dargestellt, die Bilddaten wurden mit dem GelPrint 2000i (MWG Biotech, Deutschland) aufgenommen und digitalisiert.

2.1.7 Auswertung der Bilddaten

Die digitalisierten Bilddaten wurden mit Hilfe des Programms RFLPscan (Scanalytics, USA) in eine Datenbank überführt. RFLPscan stellt eine Software zur Analyse von eindimensional getrennten Banden in Elektrophoresegele dar. Zur automa-

tischen Bandenerkennung berechnet das Programm von jeder Spur des Gels ein Heligkeitsprofil im rechten Winkel zur vorgegebenen Spurweite. Jedes negative lokale Maximum der zweiten Ableitung wird als Bande betrachtet.

Die Größe der DNS in den Banden kann durch im Gel mitgeführte Größenstandards mit Hilfe des Programmes definiert werden. Für jedes Gel wurden die verschiedenen Banden in Gruppen mit einer maximalen Größendifferenz von 2 % eingeteilt und in eine Matrize überführt. Die Matrizen verschiedener Gele eines Experiments wurden in einer Datenbank zusammengefasst.

Die Datenbank wurde mit Hilfe des Programms TREECON [van de Peer et al. 1994] weiter bearbeitet. Die genetische Distanz zwischen den verschiedenen Bandenmustern der einzelnen Stämme in einem Experiment wurde nach der Formel

$$GD_{xy} = \frac{N_x + N_y}{N_x + N_y + N_{xy}}$$

GD_{xy}-genetische Distanz zwischen X und Y, N_x-Anzahl der Banden in X,
N_y-Anzahl der Banden in Y, N_{xy}-Anzahl der gemeinsamen Banden

berechnet. Die dadurch entstandene Distanzmatrix wird für die Gruppierung der einzelnen Stämme in einem Dendrogramm herangezogen. Dabei werden jeweils die Stämme mit der geringsten Distanz zueinander verbunden.

2.2 Phylogenetische Untersuchung der *T. ferrooxidans*-Isolate

Eine Untersuchung der Sequenzunterschiede in Genen, die für zentrale Funktionen kodieren, ermöglicht eine phylogenetische Unterscheidung der Stämme [Olsen et al. 1993]. Dafür wurde das 16S rRNS-Gen verwendet.

Zur Vervielfältigung des 16S rRNS-Gens wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) genutzt. Dabei wird die DNS *in vitro* durch Inkubation mit Primern, die das gewünschte Fragment (16S rDNS) begrenzen, DNS-Polymerasemolekülen und Nukleotiden amplifiziert.

2.2.1 Template für die Sequenzierung

Für die Sequenzierung der 16S rDNS wurden entsprechende PCR-Produkte der Stämme hergestellt. Dazu wurden die Primer 16S 7f und 16S 1492r verwendet (Tabelle 2).

Tabelle 2: Verwendete Primer für PCR der 16S rDNS

Primer	Sequenz
Primer 16S 7f	5'-AAGAGTTTGAT(CT)(AC)TGGCTCAG-3'
Primer 16S 1492r	5'-TACGG(CT)TACCTTGTACGACTT-3'

Für die PCR der 16S rDNS wurden folgende Komponenten und Konzentrationen eingesetzt: 50 mmol/l KCl; 10 mmol/l TRIS-HCl (pH 9,0); 0,1% Triton®X-100; 2 mmol/l MgCl₂; je 0,1 mmol/l der vier dNTP's; je 0,5 mmol/l Primer und 0,5 Einheiten/µl Taq-Polymerase (Promega, USA) sowie genomische DNS der entsprechenden Stämme. Die Reaktionsbedingungen der PCR sind in der Tabelle 3 dargestellt.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit Quantum Prep PCR Clean Spin Columns (BioRad, Deutschland) von Primern, dNTPs und genomischer DNS gereinigt.

Tabelle 3: Thermozyklen für die PCR von 16S rDNS

Schritt des Thermozyklus	q in °C	Zeit in s	Anzahl der Zyklen
Vorheizen	95	180	1
Denaturierung der DNS	95	90	5
Hybridisierung der Primer an der DNS	59	40	
DNS-Synthese	72	90	
Denaturierung der DNS	95	60	25
Hybridisierung der Primer an der DNS	55	40	
DNS-Synthese	72	90	
DNS-Synthese	72	1200	1

2.2.2 Sequenzierung

Die Sequenzierung des 16S rRNS-Gens erfolgte nach dem Sanger-Verfahren [Old et al. 1992]. Der Kettenabbruch in der PCR wurde mit Hilfe von 2',3'-Dideoxy-Nukleosid-5'-Triphosphaten (ddNTPs) erreicht. Durch den Einbau von ddNTPs bei der Primerverlängerung bricht die Reaktion ab, da am 3'-Ende der synthetisierten DNS-Kopie keine Hydroxy-Gruppe für eine weitere Kettenverlängerung zur Verfügung steht. Die Kettenabbruchreaktion der amplifizierten 16S rRNS-Gene der einzelnen Stämme wurde mit dem PRISMBigDyeTerminator Kit (Perkin Elmer, USA) und den Primern 16S 7f, 16S 342f, 16S 458r und 16S 1492r (Tabelle 4) durchge-

führt. Durch diese Primerauswahl wurde erreicht, dass die jeweiligen 16S rRNS- Gene sowohl in 3'-Richtung als auch in die Gegenrichtung komplett durchsequenziert werden konnten. Dadurch wurde die Fehlerwahrscheinlichkeit gesenkt.

Tabelle 4: Verwendete Primer für Sequenzierreaktion der 16S rDNS

Primer	Sequenz
Primer 16S 7f	5'-AAGAGTTTGAT(CT)(AC)TGGCTCAG-3'
Primer 16S 342f	5'-CTACGGGAGGCAGCGTGGG-3'
Primer 16S 458r	5'-GGGTTCTAATAACAATCTGCT-3'
Primer 16S 1492r	5'-TACGG(CT)TACCTTGTTACGACTT-3'

Für einen Reaktionsansatz wurden 50 ng Template-DNS aus der PCR (siehe Punkt 2.2.1), 2 µl Premix aus dem PRISMBigDyeTerminator Kit (Perkin Elmer, USA), 10 pmol/l eines Primers eingesetzt. Der Ansatz wurde mit dH₂O auf 10 µl aufgefüllt. Das Thermozykler-Protokoll für die Reaktion ist in der folgenden Tabelle 5 dargestellt:

Tabelle 5: Thermozyklen für die Sequenzierreaktion von 16S rDNS

Schritt des Thermozyklus	θ in °C	Zeit in s	Anzahl der Zyklen
Vorheizen	96	120	1
Denaturierung der DNS	96	30	30
Hybridisierung der Primer an der DNS	55	15	
DNS-Synthese	60	480	

Nach Ende der PCR wurde der Ansatz durch eine Ethanol-fällung nach diesem Schema gereinigt und für die Sequenzierung vorbereitet:

Zu 10 µl Reaktionsansatz wurden 80 µl dH₂O, 10 µl 3 mol/l Natriumazetat-lösung (pH 4,6) und 250 µl 96 %iges Ethanol gegeben. Dieser Ansatz wurde 15 min bei 12800*g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 250 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Der Ansatz wurde 5 min bei 12800*g zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt, das Pellet 10 min getrocknet und in 25 µl „TSR“ aus dem PRISMBigDyeTerminator Kit (Perkin Elmer, USA) aufgenommen. Für die Sequenzierung wurden diese Proben 2 min bei 90 °C denaturiert und sofort

auf 0 °C abgekühlt. Die Proben wurden im ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer, USA) in einer Kapillare (Durchmesser 50 µm, Länge 61 cm) mit „POP6“ als Trenngel getrennt. Die Kapillare wurde automatisch mit „POP6“ aus dem Vorratsgefäß gefüllt. Nach einer kurzen Vorelektrophorese zur Polymerisation des Trenngels wurden die Proben elektrokinetisch während 30 s in die Kapillare injiziert. Die Trennung fand bei 50 °C statt und dauerte 40 min. Die Auswertung der Sequenzierungsdaten erfolgte mit der DNA Sequencing Software und dem Autoassembler von Perkin Elmer, USA.

2.3 Bestimmung von Uran in verschiedenen Zellfraktionen

Nach erfolgtem Wachstum auf uranhaltigen Medien wurde die aus 4 l Kulturflüssigkeit erhaltene Menge an Zellen des Stammes TFSS 4 nach 2.1.4 aufgeschlossen. Die Zellen von 4 l einer TFSS 6-Kultur aus uranfreien Medium wurden 2 Tage mit 10^{-7} mol/l $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ unter Schütteln inkubiert, geerntet und nach 2.1.4 aufgeschlossen. Der erhaltene Rohextrakt wurde in Zellfraktionen getrennt (Abbildung 2).

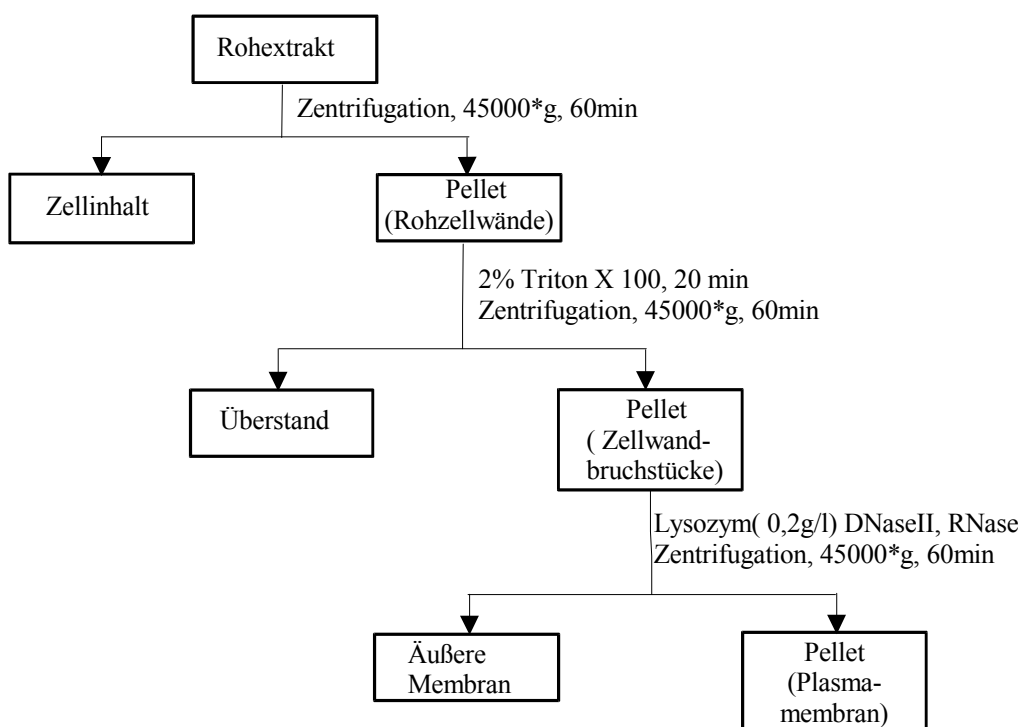


Abbildung 2: Trennung des Rohextraktes in Fraktionen nach [Gerhardt et al. 1994]

Das Uran in den einzelnen Zellfraktionen wurde durch Massenspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) von der Abteilung Analytik des Institutes für Radiochemie am Forschungszentrum Rossendorf e.V. bestimmt. Durch Trocknung

von jeweils 5 ml der Fraktion bis zur Massenkonzanz wurde die Trockensubstanz der jeweiligen Fraktion bestimmt.

2.4 Untersuchungen der Wechselwirkung zwischen Uran und der Zelle

Die Wechselwirkungen zwischen Uran und der Zelloberfläche wurden durch Sorptions- und Desorptionsexperimente untersucht. Es konnten quantitative Informationen über die Bindung zwischen Uran und der Zelle gewonnen werden.

Für diese Untersuchungen wurden jeweils 2 l Kultur vorbereitet. Die Zellen wurden wie unter Punkt 2.1.2 beschrieben geerntet. Die in den Pellets noch enthaltenen Medienbestandteile wurden durch dreimaliges Waschen mit jeweils 30 ml H_2SO_4 (0,016 mol/l) vollständig entfernt. Abschließend wurden die Zellen in 10 ml H_2SO_4 (0,016 mol/l) resuspendiert.

Zur Durchführung der Sorptionsexperimente wurde in den Bakteriensuspensionen eine Uranylkonzentration von 2,4 mg/l; 4 mg/l; 8,75 mg/l; 13 mg/l; 17 mg/l und 24,75 mg/l eingestellt. (Speziationsrechnungen für die Uranylionen in der Suspension ohne Bakterien ergaben eine Grenzkonzentration von 7,9 mg/l. Lösungen mit höheren Konzentrationen sind nicht stabil, das heißt es fallen verschiedene Uranspezies aus und stehen in der Suspension nicht mehr zur Verfügung.) Diese Proben wurden 2 Tage bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Abtrennen der Bakterien (12800*g, 30 min) wurde die Uran(VI)-Konzentration der überstehenden Lösung durch ICP-MS bestimmt. Parallel zu den Proben mit Biomasse wurden Blindproben ohne Biomasse mit den selben Urankonzentrationen vorbereitet und gemessen.

Um Informationen über die Reversibilität der Uranbindung an den Zellen zu erhalten, wurde die mit Uran beladene Biomasse für 3 Stunden mit 0,01 mol/l EDTA/TRIS-Lösung unter Schütteln extrahiert. (EDTA ist ein starker Komplexbildner für U(VI) und kann lose an die Zellen gebundenes U(VI) ablösen.) Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (12800*g, 30 min) abgetrennt. Die Urankonzentration der überstehenden Lösung wurde durch ICP-MS bestimmt.

2.5 Untersuchungen zur Struktur der Bindung von Uran mit den Bakterien

Die Art und die Stärke der entstandenen Bindung wurden mit Hilfe der zeitaufgelösten Laserfluoreszenzspektroskopie (TRLFS) untersucht. Die TRLFS ist eine sehr empfindliche Methode für die Charakterisierung des Komplezzustandes von Uran(VI). Ohne Beeinflussung des chemischen Gleichgewichtes können aus den

Ergebnissen der TRLFS über den exponentiellen Abfall der Fluoreszenzintensität sowie über die spektrale Zerlegung des emittierten Lichts (Emissionsspektren) und das Verhalten der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit vom Liganden (Fluoreszenzausbeute) die Anzahl und die Verhältnisse der vorliegenden Uranylspezies bestimmt werden. Bei hydratisierten Uranylionen liegt die Nachweisgrenze bei ca. 10^{-7} mol/l.

2.5.1 Probenvorbereitung

Die Bakterienpellets wurden wie unter Punkt 2.1.2 beschrieben gewonnen. Die Pellets wurden dreimal mit H_2SO_4 (0,016 mol/l) gewaschen. Nach diesen Schritten sind alle Partikel aus den Proben entfernt. Anschließend wurden die Pellets in HClO_4 (0,032 mol/l) resuspendiert. In allen Proben wurde eine optische Dichte von 0,5 bei 650 nm eingestellt. Dadurch wurde in allen Proben die gleiche Menge an Zellen eingesetzt. Diese Bakteriensuspensionen wurden bei pH 1,5 mit einer Uranylнитratlösung bis zu einer U(VI)-Endkonzentration von $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l versetzt und zwei Tage bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Abtrennen des in der Lösung befindlichen U(VI) durch Zentrifugation wurde die Biomasse mit 5 ml HClO_4 (0,032 mol/l) gewaschen. Das an der Oberfläche schwach sorbierte U(VI) wurde durch Extraktion mit 10 ml 0,01 mol/l EDTA/TRIS-Lösung entfernt. Die Bakterien wurden dreimal mit HClO_4 (0,032 mol/l) gewaschen und in 10 ml HClO_4 (0,032 mol/l) resuspendiert. Die so vorbereitete Probe wurde in die Küvette des Spektrometers gegeben. Die Küvette wurde in den Laserstrahlengang gebracht. Nach dieser Vorschrift wurden für jeden untersuchten Stamm zwei Proben aus verschiedenen Kulturen vorbereitet und gemessen.

2.5.2 Durchführung der zeitaufgelösten Laserfluoreszenz-Spektroskopie

Für die TRLFS wurde ein Laserpuls eines Nd-YAG-Lasers (GCR 230, Spectra Physics, USA) verwendet. Die Anregungswellenlänge betrug 266 nm mit einer Anregungsenergie zwischen 400 μJ und 600 μJ . Das Fluoreszenzsignal wurde senkrecht zum Anregungspuls über ein Glasfaserkabel in einem 500 mm Spektrographen (M1235, EG&G, USA) mit einer spektralen Auflösung von 0,32 nm fokussiert, spektral zerlegt und danach mit einem Vielkanaldiodenarray (M 1475A, EG&G, USA) gemessen. Über einen Delay-Generator (EG&G, USA) ist eine Verschiebung des Zeitfensters gegenüber dem anregenden Puls für die zeitaufgelösten Messungen möglich. Das Zeitfenster des Diodenarrays betrug 2000 ns. Die aufgezeichneten

Spektren wurden über drei Spektren pro Zeitfenster gemittelt und zwischen 0 μs und 5 μs nach der Laserpulsanregung gemessen. Die Spektren wurden über 100 Laserschuss akkumuliert und auf die Anregungsenergie korrigiert.

Die gesammelten Daten wurden mit den Programmen ORIGIN 4.1 (Microcal Software Inc., USA) und Excel 97 (Microsoft Inc., USA) ausgewertet.

2.6 Analyse des Proteinprofils

Mikroorganismen können sich der Umgebung durch Veränderungen der Proteinsynthese anpassen. Die Gesamtheit der Proteine von *T. ferrooxidans*-Stämmen, die unter verschiedenen Bedingungen wuchsen, wurde mit Hilfe einer SDS-PAGE untersucht. Die erhaltenen Proteinprofile von jeweils zwei Proben wurden miteinander verglichen und auf mögliche Veränderungen untersucht.

2.6.1 Proteinbestimmung

Ein Vergleich der einzelnen Proteinprofile im Polyacrylamidgel nach erfolgter Trennung und Färbung ist nur möglich, wenn die Proteinkonzentration in den einzelnen aufgetragenen Proben in einem geringen Maße schwankt.

Die Proteinbestimmung (dreifach) wurde mit Hilfe des Protein Assay Kit (P 5656, Sigma Diagnostics, Deutschland) durchgeführt. Für die Eichkurve wurden jeweils 1ml Proteinstandardlösungen mit Proteinkonzentrationen von 50 $\mu\text{g/ml}$ bis 400 $\mu\text{g/ml}$ in 50 $\mu\text{g/ml}$ -Schritten verwendet.

2.6.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das aufzutragende Probenvolumen wurde so berechnet, dass jeweils 250 ng Protein enthalten waren. Die Proben wurden zu gleichen Teilen mit dem Probenpuffer (siehe Tabelle 6) vermischt und denaturiert.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Probenpuffers für die SDS-PAGE

Substanz	Eingesetztes Volumen in ml
0,5 mol/l TRIS-HCl (pH 6,8)	3,1
100% Glycerol	6,25
10% SDS	5
0,5% Bromphenolblau	0,5
β -Mercaptoethanol	0,42
dH ₂ O	9,73

Die SDS-PAGE wurde als vertikale Plattenelektrophorese im diskontinuierlichen Puffersystem durchgeführt. Die Trennung erfolgte in der Mini-PROTEAN II Elektrophoresekammer (BioRad, USA) unter Verwendung der in Tabelle 7 aufgeführten Sammel- und Trenngel.

Tabelle 7: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngel

Substanz	Konzentration im	
	Sammelgel	Trenngel
TRIS-HCl, pH 8,8	0,375 mol/l	-----
TRIS-HCl, pH 6,8	-----	0,125 mol/l
SDS	0,1 %	0,1 %
30% Acrylamid/10% Bisacrylamid	4 %	10 %
Ammoniumperoxodisulfat	0,325 %	1,4 %
TEMED	1 μ l/ml	0,5 μ l/ml

Das polymerisierte Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingebracht, die Pufferkammern wurden mit Laufpuffer (0,1% SDS, 0,192 mol/l Glycin, 0,025 mol/l TRIS) gefüllt. Die Proben wurden mit einer Mikroliterspritze in die Probenaschen des Sammelgels aufgetragen. Die Elektrophorese im Sammelgel erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA/Gel, bis die Bromphenolblaufront die Trennlinie zwischen Sammel- und Trenngel erreicht hatte. Danach wurde bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA/Gel die Elektrophorese fortgesetzt. Sie wurde beendet, sobald die Bromphenolblaufront das Ende des Gels (Anode) erreicht hatte.

Anschließend wurden die Gele mit Silbernitrat gefärbt. Dafür wurden die in Tabelle 8 aufgeführten Lösungen benötigt. Das zu färbende Gel wurde in Entfärbe-Lösung I gegeben und 30 min vorsichtig geschüttelt. Dieser Schritt wurde mit Entfärbe-Lösung II wiederholt. Die Entfärbe-Lösung wurde entfernt und das Gel wurde wei-

tere 30 min in Vernetzer-Lösung bewegt. Die Vernetzer-Lösung wurde entfernt und das Gel vier mal jeweils 30 min in dH₂O gewaschen. Das Wasser wurde durch die DTT-Lösung ersetzt.

Tabelle 8: Lösungen für die Silbernitratfärbung der Polyacrylamidgele

Lösung	Zusammensetzung
Entfärbe-Lösung I	40 % Methanol
	7 % Essigsäure
Entfärbe-Lösung II	5 % Methanol
	7 % Essigsäure
Vernetzer-Lösung	10 % Glutaraldehyd
DTT-Lösung	5 µg/ml Dithiothreitol (DTT)
Silbernitrat-Lösung	0,1 % Silbernitrat
Natriumkarbonat-Lösung	3 % Natriumkarbonat
Entwickler-Lösung	3 % Natriumkarbonat
	0,019 % Formaldehyd

Nach 30 min wurde die DTT-Lösung verworfen. Dann wurde das Gel 30 min mit Silbernitrat-Lösung geschüttelt. Die Silbernitrat-Lösung wurde entfernt. Das Gel wurde unter fließendem dH₂O kurz gewaschen. Es wurde etwas Entwickler-Lösung zugegeben, das Gel wurde darin kurz geschwenkt und die Entwickler-Lösung wurde verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt. Danach wurde das Gel in der Entwickler-Lösung belassen bis die gewünschte Färbung erreicht wurde. Die Entwickler-Lösung wurde entfernt und das Gel kurz mit dH₂O gewaschen. Abschließend wurde Entfärbe-Lösung II auf das Gel gegeben. Das Gel mit den Proteinprofilen wurde mit dem GelPrint 2000i (MWG Biotech, Deutschland) fotografiert und die Bilddaten digitalisiert.

2.7 Genetische Fingerabdrücke

Die genetische Variabilität der einzelnen Isolate wurde mit Hilfe von genetischen Fingerabdrücken untersucht. Zu diesem Zweck wurden verschiedene PCR-Fingerabdrucktechniken und die Gelelektrophorese im gepulsten Feld (PFG) eingesetzt.

Als Gen-Marker in der PCR wurden willkürliche nichtpalindromische (arbiträre Primer) sowie sich wiederholende konservative Sequenzen (repetitive Primer) eingesetzt, und in der PFG wurden selten schneidende Restriktionsendonukleasen ver-

wendet. Diese Untersuchungen wurden jeweils zweimal durchgeführt.

2.7.1 Genetische Fingerabdrücke durch PCR

Für die PCR-Polymorphismen wurden willkürliche und repetitive Primer verwendet. Als willkürliche Primer werden kurze DNS-Fragmente ohne vorliegende Sequenzinformationen mit einem GC-Gehalt von mindestens 50% ausgewählt. Die Hybridisierungstemperatur in der PCR wird so gewählt, dass die Primer unspezifisch an die genomische DNS binden. Der nach erfolgter PCR erhaltene Längenpolymorphismus (RAPD) kann in der Elektrophorese getrennt werden [von Eggeling et al. 1995].

In prokaryotischen Genomen wurden kurze, sich wiederholende und konservative DNS-Abschnitte gefunden. Werden diese Fragmente als Primer in der PCR eingesetzt, entstehen DNS-Fragmente unterschiedlicher Länge. Nach einer Elektrophorese werden die entsprechenden Banden (rep-APD) sichtbar [Versalovic et al. 1994].

Die verwendeten willkürlichen und repetitiven Primer sind in Tabelle 9 zusammengestellt. Diese Primer wurden von der Firma MWG-Biotech GmbH (Deutschland) bezogen. Die PCR erfolgte im T3 Thermocycler von Biometra (Deutschland).

Tabelle 9: Primer für die RAPD und rep-APD

Typ	Bezeichnung	Sequenz
RAPD	Primer 17	5'-CAGGCCCTTC-3'
RAPD	Primer 21	5'-CACACGCACACGGAAGAA-3'
RAPD	Primer 22	5'-CACGCACACGCACAGAGAG-3'
rep-APD	Primer 14	5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGC-3'
rep-APD	Primer 16	5'-(TCA)CG(TCA)CTTATC(TCA)GGCCTAC-3'
rep-APD	Primer 20	5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGAC-3'

Für die RAPD-Untersuchungen wurden die Komponenten in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 16,5 mmol/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 67 mmol/l TRIS-HCl (pH 8,8); 3,5 mmol/l MgCl_2 ; 6,7 $\mu\text{mol/l}$ EDTA; 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Rinderserumalbumin; je 1 mmol/l der vier dNTPs, 80 $\mu\text{mol/l}$ Primer und 0,02 Einheiten/ μl Taq-Polymerase (Promega, USA). In den Reaktionsansätzen für die rep-APD bleiben die oben angegebenen Konzentrationen mit einer Änderung gleich. Es wurde 6 mmol/l MgCl_2 für die rep-APD eingesetzt.

Die Profile der entsprechenden Thermozyklen sind in der Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Thermozyklen für die RAPD und rep-APD

Schritt des Thermozyklus	Primer 14 und 20			Primer 16			Primer 17, 21 und 22		
	θ in °C	Zeit in min	Anzahl der Zyklen	θ in °C	Zeit in min	Anzahl der Zyklen	θ in °C	Zeit in min	Anzahl der Zyklen
Denaturierung der DNS	95	7	1	95	6	1	95	5	1
Denaturierung der DNS	94	1	35	94	1	35	94	1	45
Primerhybridisierung an der DNS	52	1		40	1		36	1	
DNS-Synthese	65	8		65	8		72	2	
DNS-Synthese	68	16	1	65	16	1	72	7	1

2.7.2 Genetische Fingerabdrücke durch Gelelektrophorese im gepulsten Feld

Für die PFG wurden die Zellen der Isolate in Agaroseblöckchen eingebettet und in ihnen lysiert. Die erhaltene genomische DNS wurde mit selten schneidenden Restriktionsendonukleasen verdaut. Die entstehenden DNS-Fragmente sind meistens größer als 20 kb. In der PFG orientieren sich die Moleküle entsprechend der Polarität des elektrischen Feldes. Je größer das Molekül, um so länger dauert die Umorientierung und um so kürzer ist die Zeit für die elektrophoretische Wanderung der Moleküle im Gel [Westermeier et al. 1990]. Für die PFG wurden die in Tabelle 11 aufgeführten Lösungen benötigt. Die eingesetzten Restriktionsnukleasen waren *Pac* I, *Pme* I, *Spe* I und *Xba* I.

Die Schritte für die Vorbereitung, den Einschluss der bakteriellen Zellen und den Verdau des Genoms sind in der Tabelle 12 aufgezeigt. Nach Beendigung des Verdaus wurden die entstandenen DNS-Fragmente in einem 1 %igen Agarosegel in TBE-Puffer aufgetrennt. Während das Agarosegel für die Auftrennung der entstandenen DNS-Fragmente vorbereitet wurde, wurden die Gelblöckchen mit den Fragmenten in 1 ml TBE-Puffer bei Raumtemperatur eine Stunde geschüttelt und anschließend in die Taschen des Gels eingebracht, die dann mit einer 1 %igen Agaroselösung verschlossen wurden.

Tabelle 11: Lösungen für die PFG

Bezeichnung der Lösung	Enthaltene Substanzen	Konzentration
TE	TRIS	10 mmol/l
	EDTA	0,1 mmol/l
TE mit Phenylmethanesulfonylfluorid (PMSF)	TRIS	10 mmol/l
	EDTA	0,1 mmol/l
	PMSF	1 mmol/l
PettIV-Puffer	TRIS-HCl	10 mmol/l
	NaCl	1 mol/l
EC-Puffer	TRIS-HCl	6 mmol/l
	NaCl	1 mol/l
	EDTA	100 mmol/l
	Desoxycholat	0,20%
	N-Lauroylsarcosin	0,50%
EC-Lyse-Puffer (angegebene Substanzen werden in EC-Puffer gelöst)	RNase	1,62 U/ml
	Lysozym	1,00%
ESP-Puffer	EDTA	0,5 mol/l
	N-Lauroylsarcosin	10 mg/ml
	Proteinase K	1 mg/ml
Restriktionsgemisch (wird mit dH ₂ O aufgefüllt)	Restriktionspuffer	einfach
	Rinderserumalbumin	0,01 µg/ml
	β-Mercaptoethanol (1:140)	1% (v/v)
	Restriktionsendonukleasen	0,1 U/µl
TBE	TRIS-Puffer	100 mmol/l
	Borsäure	100 mmol/l
	EDTA	1 mmol/l
Ethidiumbromidlösung in dH ₂ O	Ethidiumbromid	5 mg/ml

Für die Elektrophorese wurde das Gel in die Elektrophoresekammer überführt. Die Fragmente wurden mit Pulsintervallen von 3-40 s über 20 Stunden bei einer Spannung von 200 V und einer Temperatur von 14 °C getrennt. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel 30 min in einer Ethidiumbromidlösung (5 µg/ml) gefärbt, anschließend für 30 min entfärbt und fotografiert (Gel Print 2000i, MWG-Biotech GmbH, Deutschland).

Tabelle 12: Schritte der PFG

Ziel	Zugabe		Inkubation		Schütteln	Zentri- fugation	Kommentar
	Kompo- nente	Volumen in μl	θ in $^{\circ}\text{C}$	Zeit in min			
Vorbereiten der Zellen	9K mit 180 $\mu\text{g/ml}$ Cm	a	30	120	ja		Erhalt zellwandgeschädigter Zellen
				30		12800*g	Ernte der Zellen
	PettIV	5000	4	5	ja		Waschen der Zellen
				30		12800*g	Ernte der Zellen
Einschluß der Zellen	PettIV	b	37		ja		Einstellen der Biomassekonzentration
	1% Agarose	c	37				Mischen der Biomasse mit Agarose
		100	37				Füllen der Formen
			4	30			Aushärten
Lyse der Zellen	EC-Lyse-Puffer	300	37	960	ja		Blöckchen in Reaktionsgefäß überführen
	ESP	200	50	1440	ja		Verdau von Proteinen und Enzymen
	ESP	200	50	1440	ja		
	TE mit PMSF	500	37	120	ja		Inaktivieren der Proteinase
	TE	500	37	720	ja		Auswaschen von PMSF aus den Blöckchen
	TE	500	37	120	ja		
	TE	500	37	120	ja		
Verdau	Restriktionspuffer	200	RT	30	ja		Äquilibrieren der Blöckchen
	Restriktionsgemisch	200	0	60	ja		Gleichmäßiges Durchdringen der Blöckchen
			37	1080	ja		Verdau der DNS
	ESP	1000	50	120	ja		Stoppen der Reaktion

- (a) Es wird ein Zehntel des Volumens der Ausgangskultur an frischem 9K-Medium mit 180 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin (Cm) zugegeben.
- (b) Es wird soviel PettIV zugegeben, dass bei 550 nm eine optische Dichte der Lösung von 0,5 erreicht wird. Damit wird die DNS-Konzentration in verschiedenen Blöckchen angeglichen.
- (c) Das Volumen der zugegebenen Agaroselösung ist gleich dem Volumen der eingesetzten Baktériensuspension.

2.8 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, falls im Text nicht extra vermerkt, von den Firmen Merck, Sigma und Roth bezogen. Die Chemikalien wurden vorwiegend mit der Qualität „zur Analyse“ eingesetzt. Zur Herstellung von wässrigen Lösungen wurde, wenn nicht anders angegeben, destilliertes Wasser verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Phylogenetische Charakterisierung der Haldenisolate

Innerhalb der Art *T. ferrooxidans* sind verschiedene Genotypen bekannt. Harrison et al. (1982) beschrieben in einer Gruppe von 23 *T. ferrooxidans*- Stämmen 7 verschiedene DNS-Homologiegruppen. Sie schlussfolgerten, dass die verschiedenen Genotypen von den entsprechenden Mikroumgebungen der einzelnen Stämme abhängig sind [Harrison et al. 1982]. Des Weiteren wird in dieser Arbeit eine Korrelation von DNS- Homologiegruppen und verschiedenen Phänotypen beschrieben. Dazu zählen Wachstum bei höheren Temperaturen (40°C) und die Unfähigkeit elementaren Schwefel zu verwerten. Die Arbeitsgruppe von Selenska-Pobell [Selenska-Pobell et al. 1998] beschrieb, dass die genotypischen Unterschiede auch in den konservativen Regionen der 16S rDNS zu beobachten sind.

An Hand von RFLP-Untersuchungen [Kutschke et al. 1999] wurden die Stämme ATCC 23270, ATCC 33020, TFSS 4 und TFSS 6 für weitere Untersuchungen ausgewählt. Das 16S rRNS-Gen der Stämme wurde zwischen den Basenpaaren 7 und 1492 sequenziert. Die erhaltenen Daten sind in der folgenden Abbildung 3 dargestellt. Als Vergleichssequenz wurde in der Abbildung die Sequenz der 16S rDNS des Stammes *T. ferrooxidans* DSM 9465 aus der EMBL-Datenbank verwendet. Die sich unterscheidenden Basen wurden unterstrichen dargestellt.

ATCC 33020	AAGTCGAACGGTAAACAGGTCTTCGGATGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCGTA
ATCC 23270	AAGTCGAACGGTAAACAGGTCTTCGGATGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCGTA
TFSS 4	AAGTCGAACGGTAAACAGGTCTTCGGATGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCGTA
TFSS 6	AAGTCGAACGGTAAACAGGTCTTCGGATGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCGTA
DSM 9465	AAGTCGAACGGTAAACAGGTCTTCGGATGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCGTA
ATCC 33020	GGAATCTGTCTTTTAGTGGGGGACAACCCAGGGAAACTTGGGCTAATACCGCATGAGCCC
ATCC 23270	GGAATCTGTCTTTTAGTGGGGGACAACCCAGGGAAACTTGGGCTAATACCGCATGAGCCC
TFSS 4	GGAATCTGTCTTTTAGTGGGGGACAACCCAGGGAAACTTGGGCTAATACCGCATGAGCCC
TFSS 6	GGAATCTGTCTTTTAGTGGGGGACAACCCAGGGAAACTTGGGCTAATACCGCATGAGCCC
DSM 9465	GGAATCTGTCTTTTAGTGGGGGACAACCCAGGGAAACTTGGGCTAATACCGCATGAGCCC
ATCC 33020	TGAGGGGGAAAGCGGGGGATCTTCGGACCTCGCGCTAAGGGAGGAGCCTACGTCTGATTA
ATCC 23270	TGAGGGGGAAAGCGGGGGATCTTCGGACCTCGCGCTAAGAGAGGAGCCTACGTCCGATTA
TFSS 4	TGAGGGGGAAAGCGGGGGATCTTCGGACCTCGCGCTAAGAGAGGAGCCTACGTCCGATTA
TFSS 6	TGAGGGGGAAAGCGGGGGATCTTCGGACCTCGCGCTAAGGGAGGAGCCTACGTCTGATTA
DSM 9465	TGAGGGGGAAAGCGGGGGATCTTCGGACCTCGCGCTAAGAGAGGAGCCTACGTCCGATTA
ATCC 33020	GCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATC <u>AG</u> TAGCTGGTCTGAGAGGACGA
ATCC 23270	GCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATC <u>CG</u> TAGCTGGTCTGAGAGGACGA
TFSS 4	GCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATC <u>CG</u> TAGCTGGTCTGAGAGGACGA
TFSS 6	GCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATC <u>AG</u> TAGCTGGTCTGAGAGGACGA
DSM 9465	GCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATC <u>CG</u> TAGCTGGTCTGAGAGGACGA
	↪ 285
ATCC 33020	CCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATT
ATCC 23270	CCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATT
TFSS 4	CCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATT
TFSS 6	CCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATT
DSM 9465	CCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATT

ATCC 33020	TTTTCGCAATGGGGGCAACCCGTGACGAAGCAATGCCGCGTGGATGAAGAAGGCCTTCGGGT
ATCC 23270	TTTTCGCAATGGGGGCAACCCGTGACGAAGCAATGCCGCGTGGATGAAGAAGGCCTTCGGGT
TFSS 4	TTTTCGCAATGGGGGCAACCCGTGACGAAGCAATGCCGCGTGGATGAAGAAGGCCTTCGGGT
TFSS 6	TTTTCGCAATGGGGGCAACCCGTGACGAAGCAATGCCGCGTGGATGAAGAAGGCCTTCGGGT
DSM 9465	TTTTCGCAATGGGGGCAACCCGTGACGAAGCAATGCCGCGTGGATGAAGAAGGCCTTCGGGT
ATCC 33020	TGTAAAGTCCTTTCGTGGAGGACGAAAAGGCGGGTTCTAATACAATCTGCTGTTGACGTG
ATCC 23270	TGTAAAGTCCTTTCGTGGAGGACGAAAAGGCGGGTTCTAATACAATCTGCTATTGACGTG
TFSS 4	TGTAAAGTCCTTTCGTGGAGGACGAAAAGGCGGGTTCTAATACAATCTGCTATTGACGTG
TFSS 6	TGTAAAGTCCTTTCGTGGAGGACGAAAAGGCGGGTTCTAATACAATCTGCTGTTGACGTG
DSM 9465	TGTAAAGTCCTTTCGTGGAGGACGAAAAGGCGGGTTCTAATACAATCTGCTGTTGACGTG ↪457 ↪478
ATCC 33020	AATCCAAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGGGGTGCA
ATCC 23270	AATCCAAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGGGGTGCA
TFSS 4	AATCCAAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGGGGTGCA
TFSS 6	AATCCAAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGGGGTGCA
DSM 9465	AATCCAAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGGGGTGCA
ATCC 33020	AGCGTTAATCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTACGTTAGGTCTGTCTGTG
ATCC 23270	AGCGTTAATCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTACGTTAGGTCTGTCTGTG
TFSS 4	AGCGTTAATCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTACGTTAGGTCTGTCTGTG
TFSS 6	AGCGTTAATCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTACGTTAGGTCTGTCTGTG
DSM 9465	AGCGTTAATCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTACGTTAGGTCTGTCTGTG
ATCC 33020	AAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAATGGCGGTGAAAACCGGCGGACTAGAGTATGGGAGAG
ATCC 23270	AAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAATGGCGGTGAAAACCGGCGGACTAGAGTATGGGAGAG
TFSS 4	AAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAATGGCGGTGAAAACCGGCGGACTAGAGTATGGGAGAG
TFSS 6	AAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAATGGCGGTGAAAACCGGCGGACTAGAGTATGGGAGAG
DSM 9465	AAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAATGGCGGTGAAAACCGGCGGACTAGNATATGGGAGAG ↪ 649
ATCC 33020	GGTGGTGGAAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAACATCAGTGGC
ATCC 23270	GGTGGTGGAAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAACATCAGTGGC
TFSS 4	GGTGGTGGAAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAACATCAGTGGC
TFSS 6	GGTGGTGGAAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAACATCAGTGGC
DSM 9465	GGTGGTGGAAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAACATCAGTGGC
ATCC 33020	GAAGGCGGCCACCTGGCCCAATACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
ATCC 23270	GAAGGCGGCCACCTGGCCCAATACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
TFSS 4	GAAGGCGGCCACCTGGCCCAATACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
TFSS 6	GAAGGCGGCCACCTGGCCCAATACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
DSM 9465	GAAGGCGGCCACCTGGCCCAATACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
ATCC 33020	ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGAATACTAGATGTTTGGTGCCACGCG
ATCC 23270	ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGAATACTAGATGTTTGGTGCCTAGCG
TFSS 4	ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGAATACTAGATGTTTGGTGCCTAGCG
TFSS 6	ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGAATACTAGATGTTTGGTGCCACGCG
DSM 9465	ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGAATACTAGATGTTTGGTGCCACGCG ↪842
ATCC 33020	TACTGAGTGTCTGCTAGCTAACGCGATAAGTATTCCGCCTGGGAAGTACGGCCGCAAGGTTA
ATCC 23270	TACTGAGTGTCTGCTAGCTAACGCGATAAGTATTCCGCCTGGGAAGTACGGCCGCAAGGTTA
TFSS 4	TACTGAGTGTCTGCTAGCTAACGCGATAAGTATTCCGCCTGGGAAGTACGGCCGCAAGGTTA
TFSS 6	TACTGAGTGTCTGCTAGCTAACGCGATAAGTATTCCGCCTGGGAAGTACGGCCGCAAGGTTA
DSM 9465	TACTGAGTGTCTGCTAGCTAACGCGATAAGTATTCCGCCTGGGAAGTACGGCCGCAAGGTTA
ATCC 33020	AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATG
ATCC 23270	AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATG
TFSS 4	AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATG
TFSS 6	AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATG
DSM 9465	AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATG
ATCC 33020	CAACGCGAAGAACCCTTACCTGGGCTTGACATGTCCGGAATTCTGCAGAGATGCGGGAGTG
ATCC 23270	CAACGCGAAGAACCCTTACCTGGGCTTGACATGTCCGGAATTCTGCAGAGATGCGGGAGTG
TFSS 4	CAACGCGAAGAACCCTTACCTGGGCTTGACATGTCCGGAATTCTGCAGAGATGCGGGAGTG
TFSS 6	CAACGCGAAGAACCCTTACCTGGGCTTGACATGTCCGGAATTCTGCAGAGATGCGGGAGTG
DSM 9465	CAACGCGAAGAACCCTTACCTGGGCTTGACATGTCCGGAATTCTGCAGAGATGCGGGAGTG ↪1020

ATCC 33020	CCCTTCGGGGAATCGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATG
ATCC 23270	CCCTTCGGGGAATCGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATG
TFSS 4	CCCTTCGGGGAATCGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATG
TFSS 6	CCCTTCGGGGAATCGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATG
DSM 9465	CCCTTCGGGGAATCGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATG
ATCC 33020	TTGGGTAAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTTAGTTGCCAGCGGTTCCGCCGGG
ATCC 23270	TTGGGTAAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTTAGTTGCCAGCGGTTCCGCCGGG
TFSS 4	TTGGGTAAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTTAGTTGCCAGCGGTTCCGCCGGG
TFSS 6	TTGGGTAAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTTAGTTGCCAGCGGTTCCGCCGGG
DSM 9465	TTGGGTAAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTTAGTTGCCAGCGGTTCCGCCGGG
ATCC 33020	CACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCA
ATCC 23270	CACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCA
TFSS 4	CACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCA
TFSS 6	CACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCA
DSM 9465	CACTCTAGGGAGACTGCC –GTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCA
ATCC 33020	TGGCCTTTATGTCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGAAGCCAAGC
ATCC 23270	TGGCCTTTATGTCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGAAGCCAAGC
TFSS 4	TGGCCTTTATGTCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGAAGCCAAGC
TFSS 6	TGGCCTTTATGTCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGAAGCCAAGC
DSM 9465	TGGCCTTTATGTCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGAAGCCAAGC
ATCC 33020	CGCGAGGTGGAGCAGACCC CAGAAAGCGCGTCGTAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACTCGA
ATCC 23270	CGCGAGGTGGAGCAGACCC CAGAAAGCGCGTCGTAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACTCGA
TFSS 4	CGCGAGGTGGAGCAGACCC CAGAAAGCGCGTCGTAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACTCGA
TFSS 6	CGCGAGGTGGAGCAGACCC CAGAAAGCGCGTCGTAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACTCGA
DSM 9465	CGCGAGGTGGAGCAGACCC CAGAAAGCGCGTCGTAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACTCGA
ATCC 33020	CTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCC
ATCC 23270	CTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCC
TFSS 4	CTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCC
TFSS 6	CTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCC
DSM 9465	CTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCC
ATCC 33020	GGGCCTTGTTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGATGGTACCAGAAGCAGCTAG
ATCC 23270	GGGCCTTGTTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGATGGTACCAGAAGCAGCTAGCC
TFSS 4	GGGCCTTGTTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGATGGTACCAGAAGCAGC
TFSS 6	GGGCCTTGTTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGATGGTACCAGAAGCAGCTAGC
DSM 9465	GGGCCTTGTTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGATGGTACCAGAAGCAGCTAGCC

↪1426

Abbildung 3: Mikroheterogenitäten in der 16S rDNS-Sequenz von *T. ferrooxidans*

Die in den Stämmen auftretenden Veränderungen befinden sich an den Positionen 457 und 478 auf der Helix 18, an den Positionen 649 und 651 auf der Helix 23, an den Positionen 842 und 843 auf der Helix 27, an der Position 1020 auf der Helix 37 sowie an der Position 1426 auf der Helix 49. Die aufgeführten Helices, mit Ausnahme der Helix 27, gehören zu den variablen Regionen der 16S rDNS [van de Peer et al. 1996].

Die erhaltenen Sequenzen bilden zwei Cluster. Die Sequenzen der Stämme ATCC 33020 und TFSS 6 sowie des *T. ferrooxidans*- Stammes DSM 9465 stimmen überein. Zwischen diesen Stämmen und den Stämmen ATCC 23270 und TFSS 4 besteht eine Sequenzhomologie von 96,3%.

3.2 Wachstum von *T. ferrooxidans* in Gegenwart und Abwesenheit von Uran

Das Wachstum wurde auf uranfreien und uranhaltigen Nährmedien untersucht. Der Sauerstoffverbrauch wurde aus der gemessenen Druckabnahme nach der Formel

$$r_{O_2} = \frac{M_{O_2}}{R * T_{inc}} * F * digit$$

r_{O_2} ...Sauerstoffverbrauch, M_{O_2} ...molare Masse von Sauerstoff, R ...universelle Gaskonstante, T_{inc} ...Inkubationstemperatur, F ...interner Umrechnungsfaktor, $digit$...Sensormatanzeige

berechnet. Die errechneten Daten für den Sauerstoffverbrauch der Referenzstämmen und der Haldenisolate in uranfreien und uranhaltigen Medien sind in Abbildung 4 und Abbildung 5 grafisch dargestellt.

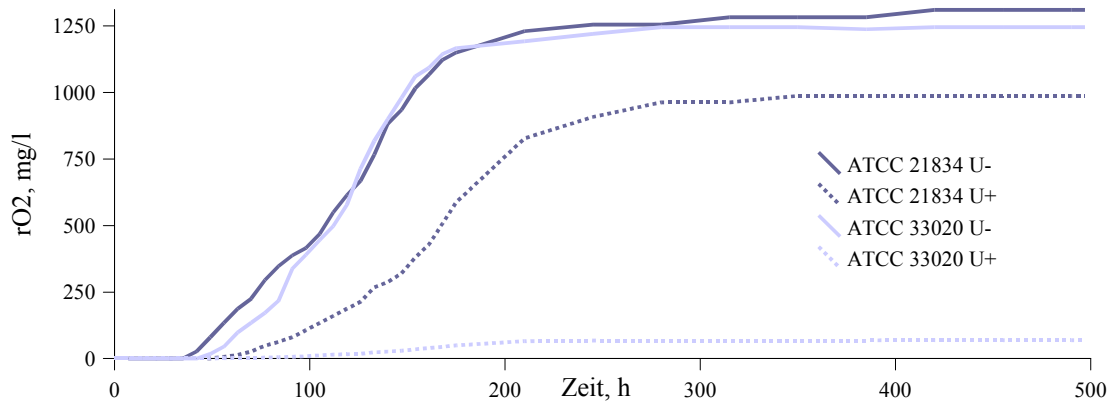


Abbildung 4: Sauerstoffverbrauch von Referenzstämmen auf uranfreien und uranhaltigen Medien

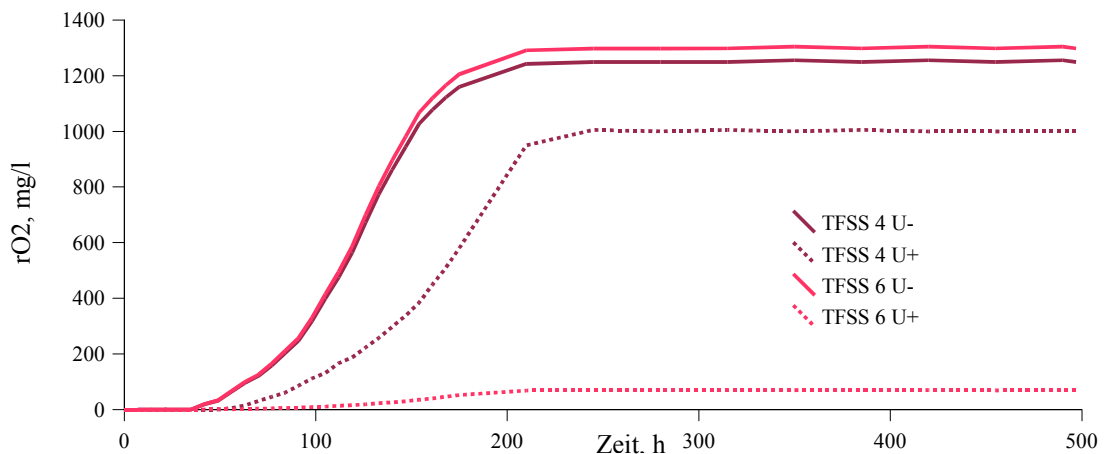


Abbildung 5: Sauerstoffverbrauch der Haldenisolate auf uranfreien und uranhaltigen Medien

Die Sauerstoffverbrauchskurven verlaufen für die untersuchten Referenzstämmen und Haldenisolate auf uranfreiem Medium nahezu gleich. Nach zirka 48 h ging die lag-Phase in eine exponentielle Phase über. Der maximale Sauerstoffverbrauch wurde

nach 220 h erreicht. Der Stamm TFSS 4 verbrauchte in dieser Zeit 1,25 g und der Stamm TFSS 6 1,29 g O_2/l Medium. Die Referenzstämme ATCC 21834 und ATCC 33020 verbrauchten während ihres Wachstums 1,31 g beziehungsweise 1,24 g O_2/l Medium.

Die Betrachtung der Sauerstoffverbrauchskurven auf uranhaltigen Medien läßt folgende Aussagen zu. Die Kurven für die Kulturen der Stämme TFSS 4, ATCC 21834 und TFSS 6, ATCC 33020 unterscheiden sich. Bei den uranhaltigen Kulturen der Stämme TFSS 4 und ATCC 21834 wurde Sauerstoff verbraucht. Nach etwa 120 h nahm die Kurve einen exponentiellen Charakter an. Diese Phase endete für den Stamm TFSS 4 nach 92 h (entspricht einer Kultivierungsdauer von 212 h) in einem Plateau. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden 0,99 g O_2/l Medium verbraucht. Das Wachstum des Referenzstammes ATCC 21834 erreicht nach einer Gesamtkultivierungsdauer von 280 h auf uranhaltigen Nährmedium eine stationäre Phase. Die Kultur des Stammes ATCC 21834 verbraucht in dieser Zeit 0,98 g O_2/l Medium. Für die entsprechende Kultur des Stammes TFSS 6 wurde Folgendes beobachtet. Es gab eine Phase mit geringem Sauerstoffverbrauch (0,07 g O_2/l Medium) von 218 h, die direkt in ein Plateau überging. Im gesamten Beobachtungszeitraum konnte kein weiterer Sauerstoffverbrauch festgestellt werden. Ähnliche Aussagen können auch für das Wachstumsverhalten des Stammes ATCC 33020 getroffen werden. Nach 210 h erreicht der Sauerstoffverbrauch ein Plateau bei einem Sauerstoffverbrauch von 0,07 g O_2/l Medium.

Diese Wachstumsuntersuchungen zeigten, dass alle vier Stämme auf uranfreiem Medium wachsen. Im Vergleich zu dem Wachstum von uranfreien Kulturen der Stämme TFSS 4, ATCC 21834 und TFSS 6, ATCC 33020 wurde auf uranhaltigen Medien ein unterschiedliches Wachstum beobachtet. Durch die Zugabe von Uran verringerte sich der Sauerstoffverbrauch der Stämme TFSS 4 und ATCC 21834. Der Stamm TFSS 6 und der Stamm ATCC 33020 verbrauchte im uranhaltigen Medium fast keinen Sauerstoff mehr.

Die Stämme TFSS 4, ATCC 21834 wachsen auf uranhaltigem Medium, die Stämme TFSS 6, ATCC 33020 dagegen nicht.

3.3 Beschreibung der Bindung zwischen Uran und *T. ferrooxidans*

Durch Sorptions- und Desorptionsuntersuchungen sowie durch spektroskopische Untersuchungen wurde die Bindung zwischen Uran und den Zellen von *T. ferrooxidans* untersucht. Die Sorptions-/ Desorptionsexperimente geben Auskunft über die Menge an gebundenen Uran. Die TRLFS erlaubt Aussagen über die Art der Bindung von Uran an die Zellen.

3.3.1 Sorption von Uran(VI) an unterschiedliche *T. ferrooxidans*- Stämme

Diese Untersuchungen geben Auskunft über die an die Zelloberfläche gebundene Uranmenge. Das schwach gebundene Uran wurde mit einer EDTA-Lösung von der Zelloberfläche extrahiert. Abbildung 6 zeigt die Sorptionskurven der *T. ferrooxidans*-Isolate sowie der Referenzstämmen ATCC 23270 und ATCC 33020.

Die Haldenisolate zeigen im Vergleich zu dem Referenzstamm ATCC 23270 eine höhere Uransorption. Die Sorptionskurven der Haldenisolate unterscheiden sich in den Mengen an U(VI), die pro g Trockenbiomasse an die Zellen gebunden werden. Während bei den Referenzstämmen im untersuchten Konzentrationsbereich die Menge an akkumuliertem Uran proportional der zugegebenen U(VI)-Konzentration ist, nähern sich die Kurven der Haldenisolate für hohe Urankonzentrationen einem Grenzwert. Insbesondere für das Haldenisolat TFSS 4 nähert sich die Menge an akkumuliertem Uran für Urankonzentrationen über 10 mg/l schnell an einen Grenzwert an. Die Kurve des Haldenisolats TFSS 6 zeigt eine Zunahme des akkumulierten Urans mit steigender Anfangskonzentration und strebt weitaus langsamer ihrem Sättigungswert zu.

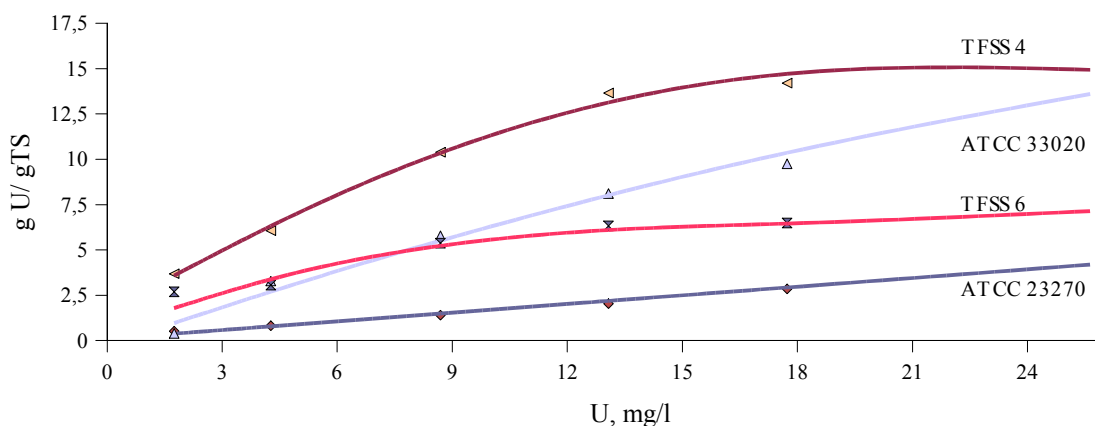


Abbildung 6: Uranakkumulation der Haldenisolate im Vergleich zu Referenzstämmen in Abhängigkeit von der U(VI)-Konzentration in der Lösung

Innerhalb des untersuchten Konzentrationbereiches (von 0 mg U/l bis 26,07 mg U/l) zeigen die Sorptionskurven der Referenzstämme einen linearen Verlauf. Die Kurve für den Referenzstamm ATCC 33020 verläuft steiler als die des Referenzstammes ATCC 21834. Die Sorptionskurven der Haldenisolate nähern sich asymptotisch einem Maximalwert an. Die Sorptionskurve des Haldenisolates TFSS 4 erreicht den Maximalwert an immobilisierten Uran je Gramm Trockensubstanz bei höheren Gleichgewichtskonzentrationen (17,73 mg U/l) als die des Stammes TFSS 6 (Gleichgewichtskonzentration bei Erreichen der maximalen Beladung 13,08 mg U/l). In Abbildung 7 ist der extrahierbare Anteil des an die Zellen gebundenen Urans bei den Stämmen dargestellt. Die Desorptionsuntersuchungen erfolgten mit 0,1 M EDTA/ TRIS-Lösung. Der Anteil des extrahierbaren Urans von den Referenzstämmen ist gering und sinkt mit zunehmender Urankonzentration auf Werte von 10 % (ATCC 33020) und 17 % (ATCC 23270). Die Untersuchung der Haldenisolate hat ergeben, dass der Anteil an schwach gebundenem Uran höher ist. Bei dem Haldenisolat TFSS 6 nimmt ähnlich den Referenzstämmen der extrahierbare Anteil mit zunehmender Urankonzentration von 48 % auf 31 % ab. Bei dem Haldenisolat TFSS 4 ist der extrahierbare Anteil etwa konstant und beträgt zirka 48 %.

Der Anteil des mit EDTA/TRIS extrahierbaren Urans nimmt für die Stämme ATCC 21834, ATCC 33020 und TFSS 6 mit zunehmender Urankonzentration ab. Der Anteil des von dem Stamm TFSS 4 extrahierbaren Urans bleibt für alle Urankonzentrationen gleich.

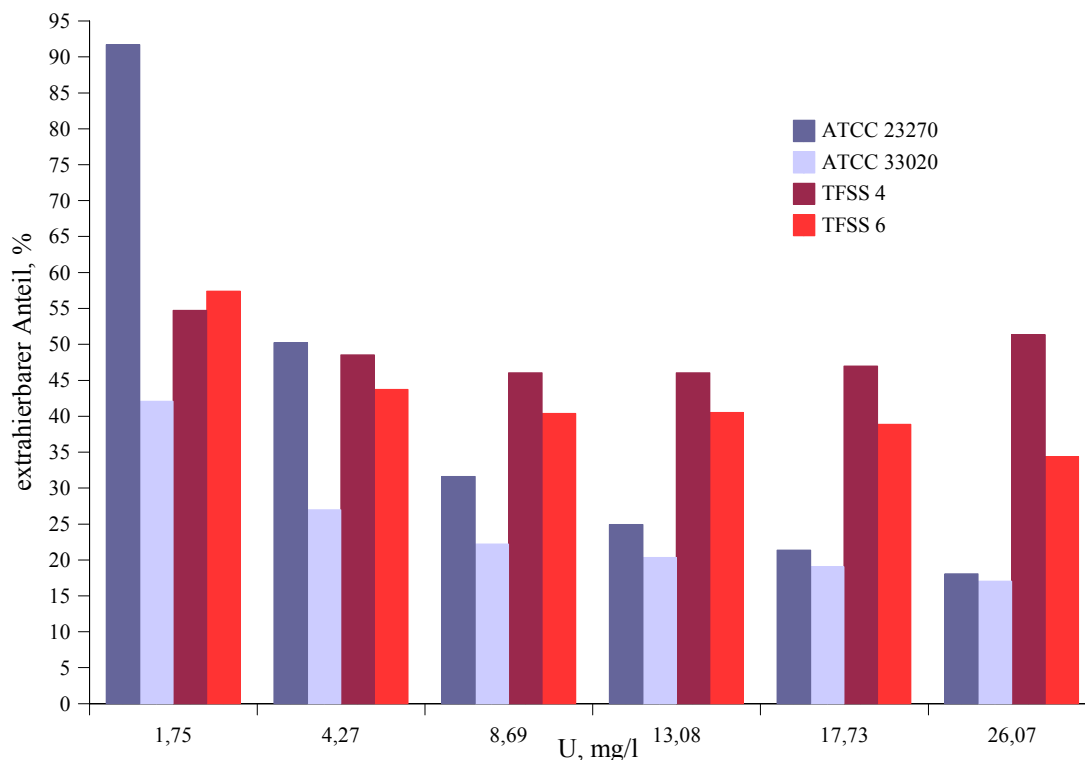


Abbildung 7: Mit 0,01 M EDTA/TRIS-Lösung extrahierbarer Urananteil der U-beladenen Biomasse

3.3.2 Spektroskopische Daten der Bakterien-Uran-Komplexe

Um Informationen über die Art und Stärke der Komplexe zu erhalten, wurden Untersuchungen mit der TRLFS durchgeführt. Die erhaltenen Spektren der Bakterien-Uran-Komplexe wurden mit dem Spektrum des freien Uranylions verglichen. Die Emissionsspektren der verschiedenen Bakterien-Uran-Komplexe im Vergleich zu dem des Uranylions bei einer Anregungswellenlänge von 266 nm nach einer Verschiebung des Zeitfensters von 100 ns zeigt Abbildung 8.

Die Maxima der Fluoreszenzbanden im Spektrum der Bakterien-Uran-Komplexe weisen gegenüber denen in dem Spektrum der Referenzlösung starke bathochrome Verschiebungen für den Komplex mit den Zellen des Stammes TFSS 4 zwischen 2,3 nm und 9,5 nm und den Komplex mit den Zellen des Stammes TFSS 6 zwischen 1,8 nm und 5,5 nm sowie eine Erhöhung der Halbwertsbreiten auf bis zum Doppelten des freien Uranylions auf.

Diese signifikante Rotverschiebung unter gleichzeitiger Erhöhung der Halbwertsbreiten deutet auf eine starke Wechselwirkung des Uranylions mit den Bakterien unter Ausbildung von „inner sphere“ Komplexen hin.

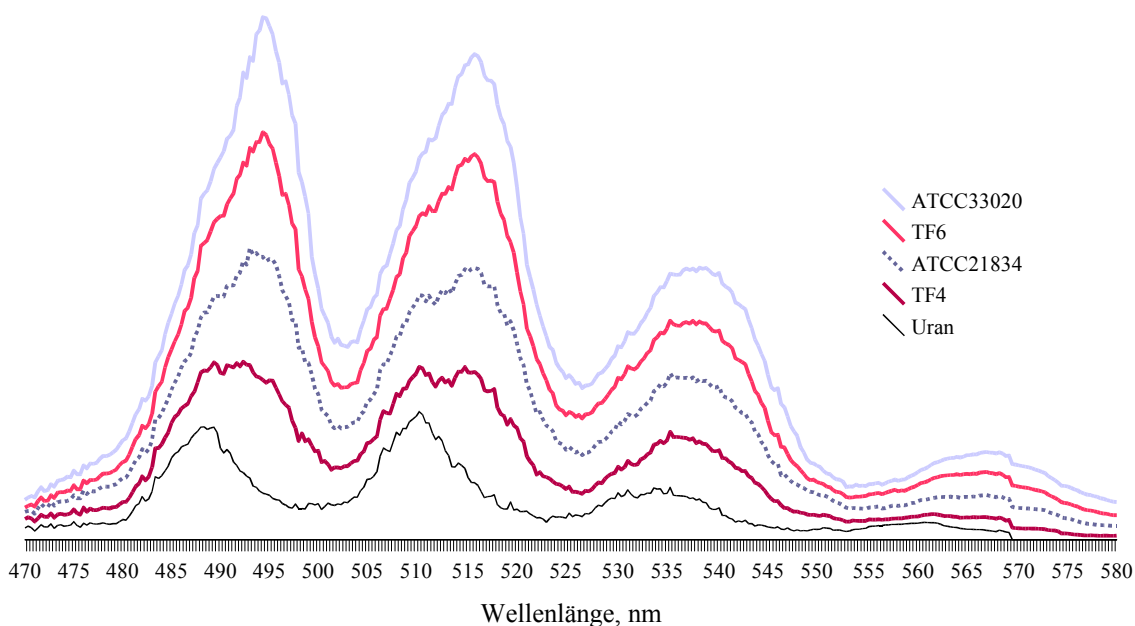


Abbildung 8: Emissionsspektren des Uranylions und der verschiedenen Bakterien-Uran-Komplexe nach Anregung bei 266 nm

3.4 Wirkung von Uran auf die Zellen von *T. ferrooxidans*

Diese Untersuchungen umfassen die Quantifizierung des in die Zelle aufgenommenen Urans, die Beschreibung des Uraneinflusses auf die Proteinsynthese sowie genetische Fingerabdrücke von verschiedenen Stämmen der Art *T. ferrooxidans*.

3.4.1 Bestimmung von Uran in bakteriellen Zellen

Die Zellen des Stammes TFSS 4 wurden aus einer uranhaltigen Kultur wie unter 2.1.2 beschrieben gewonnen. Da der Stamm TFSS 6 nicht tolerant gegenüber einer Urankonzentration von 10^{-7} mol/l ist, wurde er auf uranfreiem Medium kultiviert und nach Beendigung des Wachstums mit Uran inkubiert. Die Ernte der Zellen erfolgte wie unter 2.1.2 beschrieben. Die geernteten Zellen wurden gewaschen, mit Hilfe einer Schwingmühle aufgeschlossen und in verschiedene Fraktionen getrennt. In den Fraktionen wurden die Urankonzentrationen durch ICP-MS und die Trockensubstanz bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 13 dargestellt.

Für den Stamm TFSS 4 wurde die höchste Urankonzentration bezogen auf die Trockensubstanz in der Fraktion der Zellwand (äußere Membran, Periplasma, Zytoplasmamembran) bestimmt. Im Inneren der Zellen wurde nur eine sehr geringe Urankonzentration nachgewiesen. Der überwiegende Teil des an die Biomasse gebundenen Urans ist demnach in der Zellwand zu finden. In allen Fraktionen des

Stammes TFSS 6 wurde etwa die gleiche Menge an Uran bezogen auf die Trockensubstanz gefunden.

Tabelle 13: Urankonzentrationen in einzelnen Biomassefraktionen
TS-Trockensubstanz

Zellfraktion	Stamm TFSS 4			Stamm TFSS 6		
	Uran, µg	TS, mg	U/TS, µg/mg	Uran, µg	TS, mg	U/TS, µg/mg
ganze Zellen	76,6	54,6	1,4	80,2	28,9	2,77
Zellwandbruchstücke	69,6	5,9	11,79	9,4	3,4	2,69
Zytoplasmamembran	5,9	3,3	1,79	5,3	1,9	2,78
Zellinhalt	0,4	43,7	0,01	62,7	22,6	2,74

Die Verteilung von Uran in der Biomasse von TFSS 4 und TFSS 6 unterscheidet sich. Die hohe Urankonzentration in der Zellwandfraktion von TFSS 4 zeigt, dass die Zellwand Uran zurückhält. Die Inkubation der Zellen von TFSS 6 mit Uran führt zum Eindringen von Uran in die gesamte Zelle.

3.4.2 Einfluss von Uran auf die Proteinsynthese

Verschiedene Autoren [Buonfiglio et al. 1999, Amaro et al. 1991] beschrieben, dass Veränderungen der Energiequelle (FeSO_4 , S) und des pH-Wertes (1,5 bzw. 3,5) Effekte auf die Proteinsynthese von *T. ferrooxidans* haben. Deshalb wurde untersucht, ob durch die Zugabe von Uran zum Nährmedium Veränderungen in der Proteinsynthese der Haldenisolate entstehen. Nach Kultivierung der Stämme ATCC 21834, ATCC 33020 TFSS 4 und TFSS 6 auf uranfreien sowie der Stämme ATCC 21834 und TFSS 4 auf uranhaltigen Medien wurden Rohextrakte (siehe 2.3) der Stämme gewonnen und im SDS-PAGE die jeweiligen Proteinprofile sichtbar gemacht. Abbildung 9 zeigt diese Proteinprofile.

Im mit Silbernitrat gefärbten SDS-Polyacrylamidgel sind Unterschiede in einem Größenbereich von 14,3 kDa bis 43 kDa zwischen den Profilen der uranfreien und uranhaltigen Kulturen festzustellen. Für die Stämme TFSS 4 und ATCC 21834 sind in den Profilen der uranfreien Kultur gegenüber der Profile der entsprechenden uranhaltigen Kultur eine geringere Anzahl von Proteinbanden in diesem Größenbereich vorhanden.

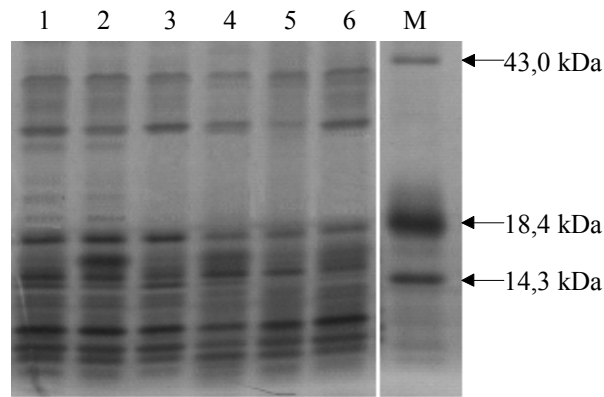


Abbildung 9: PAGE des Rohextrakts verschiedener *T. ferrooxidans*- Stämme, die mit und ohne Uran im Medium kultiviert wurden

Beschreibung: M... Größenmarker, 1-TFSS 4 mit Uran im Medium, 2-ATCC 21834 mit Uran im Medium, 3-TFSS 4 ohne Uran im Medium, 4-ATCC 21834 ohne Uran im Medium, 5-TFSS 6 ohne Uran im Medium, 6-ATCC 33020 ohne Uran im Medium

Die Profile der uranhaltigen Kulturen von TFSS 4 und ATCC 21834 enthalten eine größere Anzahl von Proteinbanden. Eine genaue Aussage über die Funktion dieser zusätzlichen Proteine ist aus der SDS-PAGE nicht möglich. Sind diese zusätzlichen Proteine für ein Wachstum auf uranhaltigen Medien erforderlich, ist nach der Hemmung der Proteinsynthese ein Rückgang des Sauerstoffverbrauchs gegenüber der ungehemmten Kultur zu erwarten. Dazu wurden die Bakterien in ein streptomycinhaltiges Medium überführt. Der Sauerstoffverbrauch wurde verfolgt. In Abbildung 10 ist der Sauerstoffverbrauch von TFSS 4 und TFSS 6 auf streptomycinhaltigen Medien mit und ohne Uran dargestellt.

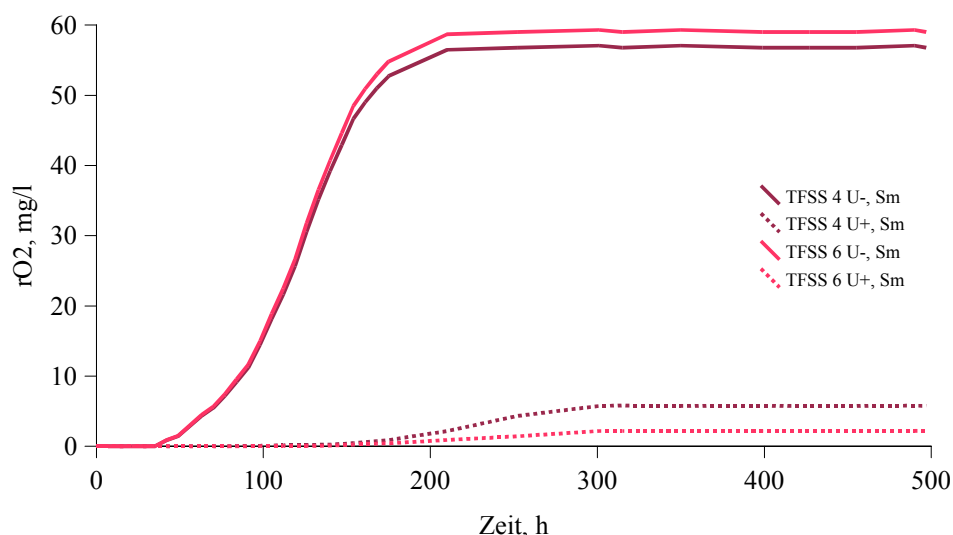


Abbildung 10: Sauerstoffverbrauch von TFSS 4 und TFSS 6 auf streptomycinhaltigen Medien mit und ohne Uran

Die Kulturen deren Proteinsynthese durch Streptomycin unterbrochen wurde, zeigten nur einen sehr geringen Sauerstoffbedarf. Dieser beträgt für den Stamm TFSS 4 ca.

56,5 mg O₂/l Medium und für den Stamm TFSS 6 ca. 59 mg O₂/l Medium. Diese Werte liegen erheblich unter den in Abschnitt 3.2 erhaltenen Werten für den Sauerstoffverbrauch. Befinden sich die Zellen der Stämme TFSS 4 und TFSS 6 in streptomycin- und uranhaltigen Medien werden 5,7 mg O₂/l Medium bzw. 2,2 mg O₂/l Medium verbraucht. Ein Sauerstoffverbrauch und damit eine Eisen(II)-Oxidation unter diesen Bedingungen konnte in streptomycinhaltigen und uranhaltigen Medien für keinen der Stämme TFSS 4 und TFSS 6 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass die auf uranhaltigen Medium neu gebildeten Proteine des Stammes TFSS 4 das Wachstum auf uranhaltigen Medien erst ermöglichen

3.4.3 Genetische Fingerabdrücke durch PCR

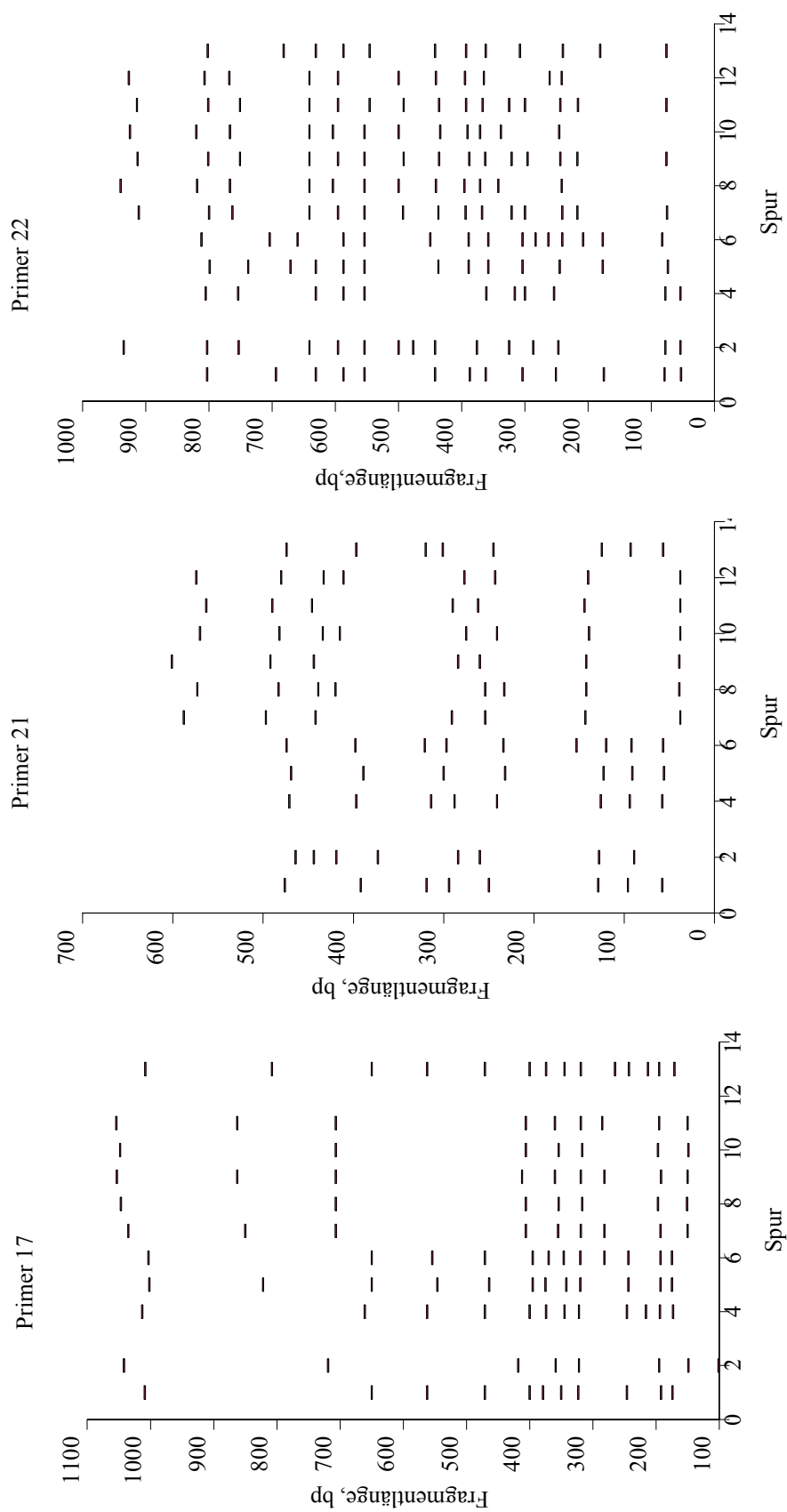
Die gewählten Fingerabdrucktechniken (siehe 2.7.1) nutzen willkürliche Primer und repetitive DNS-Elemente ohne spezifische Informationen [von Eggeling et al. 1995, Versalovic et al. 1994]. Mit diesen Techniken werden Informationen über alle Bereiche des Genoms erhalten.

In Abbildung 11 sind die RAPD-Fingerabdrücke dargestellt. In der folgenden Beschreibung der Fingerabdruck-Schemata werden die charakteristischen Banden der einzelnen Profile hervorgehoben.

Die mit dem Primer 22 amplifizierten Fragmente der bakteriellen DNS sind zwischen 50 bp und 1000 bp groß. Die Bandenmuster der einzelnen Stämme bilden zwei Gruppen. Die Größenverteilung der erhaltenen Produkte von den Stämmen ATCC 19859, ATCC 33020, TFSS 1, TFSS 2 und TFSS 6 (Gruppe 1) ist sehr ähnlich. Die Fingerabdrücke der Haldenisolate weisen Banden mit einer Größe von 815 ± 7 bp auf, die in den Fingerabdrücken der Referenzstämmen nicht vorhanden sind. Außerdem sind von der DNS der Gruppe Fragmente mit einer Größe von 587 bp, 178 ± 3 bp und 631 bp amplifiziert worden. Die zweite Gruppe von Bandenmustern wird von dem Referenzstamm ATCC 21834 und den Stämmen TFSS 3, TFSS 4, TFSS 5 gebildet. Die Fingerabdrücke dieser 4 Stämme besitzen charakteristische Banden bei 923 ± 12 bp, 641 ± 0 bp, 600 ± 4 bp, und 494 ± 4 bp. Diese Fragmente sind in den Mustern der anderen Gruppe nicht enthalten. Die aus der DNS der uranfreien Kulturen der Stämme TFSS 3, TFSS 4 und TFSS 5 erzeugten Fingerabdrücke enthalten Fragmente der Größe 323 ± 2 bp, 298 ± 2 bp und 217 ± 1 bp, die von der DNS der uranhaltigen Kulturen dieser Stämme nicht amplifiziert wurden.

Fragmente mit einer Größe von 30 bp- 600 bp wurden bei der PCR mit dem Primer 21 von der DNS der *T. ferrooxidans*- Stämme erhalten. Die amplifizierten Bandenmuster können in zwei Gruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe wird von den Stämmen ATCC 19859, ATCC 33020, TFSS 1, TFSS 2 und TFSS 6 gebildet. PCR-Produkte mit einer Größe von 395 ± 4 bp, 310 ± 10 bp, 93 ± 3 bp und 57 ± 1 bp sind für diese Gruppe charakteristisch. In den Fingerabdrücken der Referenzstämmen wurde zusätzlich eine Bande von 127 ± 2 bp und in den Fingerabdrücken der Haldenisolate wurden Banden von 238 ± 5 bp und 123 bp erhalten. Von den Stämmen ATCC 21834, TFSS 3, TFSS 4 und TFSS 5 wird eine zweite Gruppe gebildet. Die Muster der Haldenisolate enthalten charakteristische Banden von 482 ± 18 bp, 440 ± 6 bp und 141 ± 2 bp. Von der DNS der uranhaltigen Kulturen wurden Fragmente von 572 ± 2 bp, 415 ± 5 bp und 238 ± 5 bp amplifiziert. PCR-Produkte dieser Größe fehlen in den Fingerabdrücken der uranfreien Kulturen.

Als dritter RAPD-Primer wurde Primer 17 verwendet. In der PCR mit diesem Primer wurden von der bakteriellen DNS Produkte mit einer Größe von 100 bp bis 1055 bp erhalten. In allen Fingerabdrücken sind Banden mit 367 ± 7 bp, 320 ± 3 bp und 194 ± 2 bp enthalten. Die DNS der Referenzstämmen ATCC 19859 und ATCC 33020 sowie der Haldenisolate TFSS 1, TFSS 2 und TFSS 6 zeigt nach der PCR ein nahezu identisches Bandenmuster. Diese Fingerabdrücke bilden eine Gruppe mit einer sehr hohen Ähnlichkeit. Die Bandenmuster der Stämme ATCC 21834, TFSS 3, TFSS 4 und TFSS 5 unterscheiden sich deutlich davon. Sie bilden eine eigene Gruppe. Die Fingerabdrücke von der DNS der uranfreien Kulturen in dieser Gruppe weisen zwei Fragmente (856 ± 6 bp, 283 ± 2 bp) auf, die in den Banden der entsprechenden Fingerabdrücke der uranhaltigen Kulturen fehlen.



Beschreibung: 1- ATCC19859, 2- ATCC21834, 3- ATCC23270, 4- ATCC33020, 5-TFSS1, 6- TFSS2, 7- TFSS3, 8- TFSS3 mit Uran im Medium, 9- TFSS4, 10- TFSS4 mit Uran im Medium, 11- TFSS5, 12- TFSS5 mit Uran im Medium, 13- TFSS6

Abbildung 11: Fingerabdrücke durch RAPD- Primer

Durch mathematisch-statistische Verfahren wurden die erhaltenen Daten hierarchisch in homogene Klassen strukturiert. In Abbildung 12 ist das aus den Fingerabdrücken erstellte Dendrogramm dargestellt. Die untersuchten *T. ferrooxidans*- Stämme bilden zwei genetisch nah verwandte Gruppen. Eine Gruppe wird von den Stämmen ATCC 21834, TFSS 3, TFSS 4 und TFSS 5 gebildet. Die einzelnen Stämme dieser Gruppe sind untereinander zu 32 % ähnlich. Betrachtet man dieses Cluster als eigenständiges Dendrogramm, bilden die Haldenisolate TFSS 3, TFSS 4 und TFSS 5 eine Gruppe mit einer Distanz von 44 %. Innerhalb dieser Gruppe sind auch die Fingerabdrücke der DNS der Kulturen von uranhaltigen Medien (TFSS 3u, TFSS 4u, TFSS 5u) zu finden. Sie weisen zu den entsprechenden Fingerabdrücken der DNS der Kulturen von uranfreien Medien Unterschiede von 53,6 % für den Stamm TFSS 3, 54,8 % für den Stamm TFSS 4 und für TFSS 5 von 57,6 % auf.

Die zweite Gruppe wird von den Stämmen ATCC 19859, ATCC 33020, TFSS 1, TFSS 2 und TFSS 6 gebildet. Die Fingerabdrücke dieser Gruppe sind einander zu 30 % ähnlich.

Mit allen drei RAPD-Primern (unterschiedlich in Länge und GC-Gehalt) wurden die untersuchten Stämme in zwei Gruppen getrennt. In einer Gruppe wurden die Stämme ATCC 19859 , ATCC 33020, TFSS 1, TFSS 2, TFSS 6 und in der anderen die Stämme ATCC 21834, TFSS 3, TFSS 4 und TFSS 5 zusammengefasst.

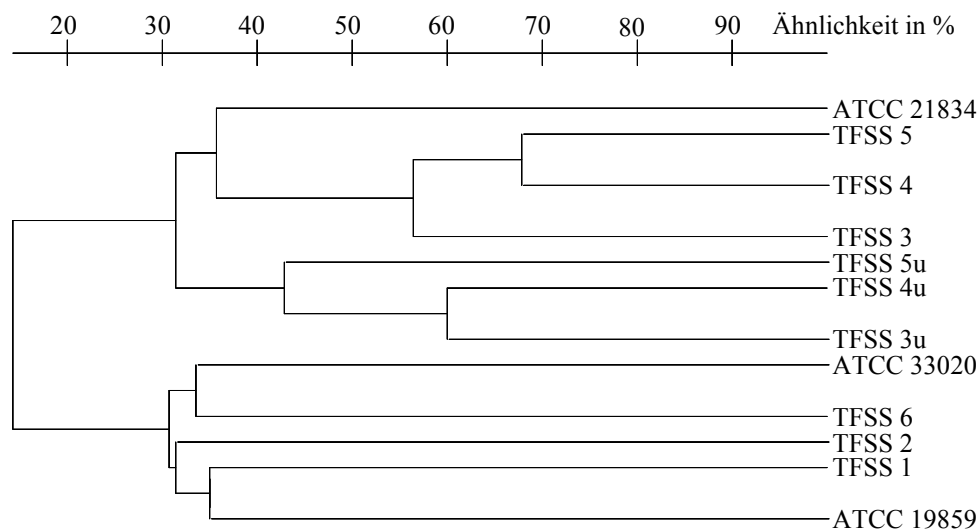


Abbildung 12: Dendrogramm aus den RAPD Fingerabdrücke der untersuchten *T. ferrooxidans*- Stämme

Die mit den repetitiven Primern erhaltenen Fingerabdrücke sind in Abbildung 13 dargestellt. Die PCR wurde mit der DNS aus den Referenzstämmen, den Haldenisolaten und den uranhaltigen Kulturen der Haldenisolate wie unter 2.7.1 beschrieben durchgeführt. Bei der Beschreibung der entstandenen Schemata wird auf die charakteristischen Fragmente der einzelnen Profile hingewiesen.

Die bei der PCR mit dem Primer 14 erhaltenen Fragmente sind zwischen 1750 bp und 125 bp groß. Von der DNS aller untersuchten Stämme wurden Fragmente mit einer Länge von 378 ± 4 bp, 234 ± 5 bp und 189 ± 4 bp amplifiziert. 8 weitere Banden teilen die Fingerabdrücke in zwei Gruppen. PCR-Produkte von 904 ± 13 bp, 517 ± 10 bp, 449 ± 9 bp, 303 ± 3 bp und 268 ± 4 bp wurden von der DNS der Referenzstämmen ATCC 23270, ATCC 33020 und der Haldenisolate TFSS 1, TFSS 2 und TFSS 6 erhalten. Diese Stämme können durch ihre Bandenmuster in einer Gruppe zusammengefasst werden. Die zweite Gruppe der Fingerabdrücke wird durch die erhaltenen Bandenmuster der Stämme TFSS 3, TFSS 4 und TFSS 5 gebildet. Für diese Gruppe sind Banden von 362 ± 5 bp, 323 ± 2 bp, 289 ± 3 bp im Fingerabdruck charakteristisch. Durch die PCR der DNS von uranhaltigen und uranfreien Kulturen der Haldenisolate TFSS 3, TFSS 4 und TFSS 5 konnten keine Unterschiede im Fingerabdruck festgestellt werden. Die Referenzstämmen ATCC 19859 und ATCC 21834 konnten keiner der Gruppen eindeutig zugeordnet werden.

Fragmente von 220 bp bis 860 bp wurden von der DNS bei der PCR mit dem Primer 16 erhalten. Banden mit 595 ± 6 bp, 452 ± 7 bp und 231 ± 5 bp sind in den Fingerabdrücken der Stämme ATCC 19859, ATCC 23270, ATCC 33020, TFSS 1 und TFSS 6 enthalten und treten in den Fingerabdrücken der anderen Stämme nicht auf. Die Fingerabdrücke der Stämme ATCC 21834, TFSS 3, TFSS 4 und TFSS 5 bilden eine Gruppe. Alle Bandenmuster dieser Gruppe besitzen ein Fragment von 574 ± 5 bp. Von der DNS der uranhaltigen Kulturen der Haldenisolate TFSS 3, TFSS 4 und TFSS 5 wurde ein Fragment der Größe 244 ± 1 bp amplifiziert. Dieses Fragment grenzt die Fingerabdrücke der DNS der uranhaltigen Kulturen von den Fingerabdrücken der DNS der uranfreien Kulturen der zweiten Gruppe ab.

Eine Unterscheidung der Fingerabdrücke, die mit dem Primer 20 erhalten wurden, ist kaum möglich. Die Bandenmuster der einzelnen Stämme sind weniger unterschiedlich. Am auffälligsten ist das Fragment mit einer Größe von 241 ± 1 bp, das nur bei den Fingerabdrücken der DNS von uranhaltigen Kulturen erhalten wurde.

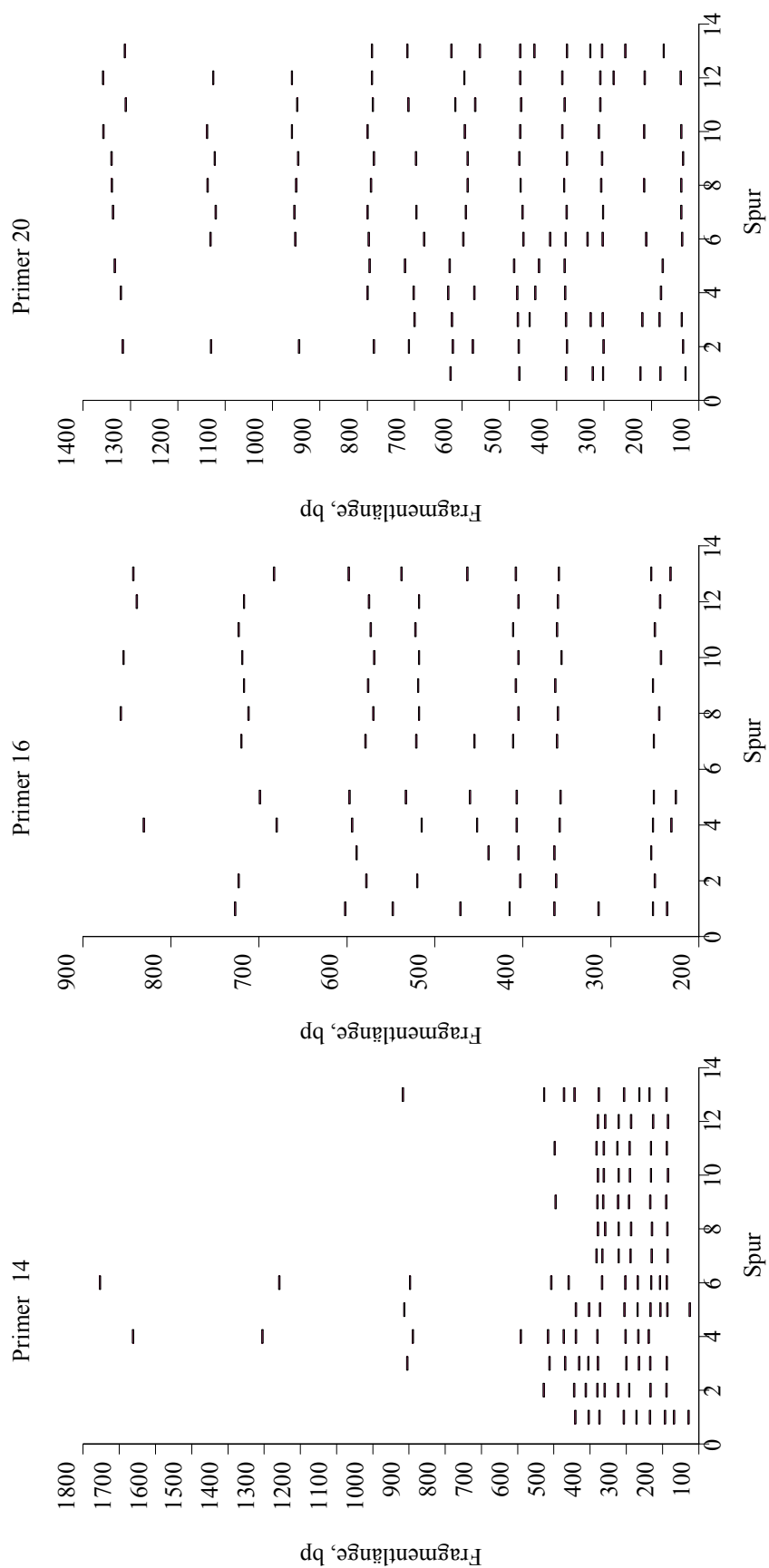


Abbildung 13: Fingerabdrücke durch repetitive Primer

Beschreibung: 1- ATCC19859, 2- ATCC21834, 3- ATCC23270, 4- ATCC33020, 5-TFSS1, 6- TFSS2, 7- TFSS3, 8- TFSS3 mit Uran im Medium, 9- TFSS4, 10- TFSS4 mit Uran im Medium, 11- TFSS5, 12- TFSS5 mit Uran im Medium, 13- TFSS6

In Abbildung 14 ist das aus den Fingerabdrücken der verwendeten repetitiven Primern erstellte Dendrogramm gezeigt. Der Referenzstamm ATCC 19859 stellt eine Außengruppe, die mit den anderen Gruppen eine Ähnlichkeit von 39 % aufweist, dar. Im Dendrogramm sind darüber hinaus zwei weitere genetisch nah verwandte Gruppen zu sehen. Diese beiden Gruppen sind einander zu 49 % ähnlich. Eine Gruppe wird von den Stämmen ATCC 21834, TFSS 3, TFSS 4 und TFSS 5 gebildet. Die einzelnen Stämme dieser Gruppe besitzen eine Distanz von 35 %. Die Kulturen, die mit Uran (VI) im Nährmedium kultiviert wurden, bilden die zweite Gruppe mit einer Ähnlichkeit von 79,2 %. Diese Gruppe weist zu den Kulturen, die ohne Uran im Nährmedium gewachsen sind, einen Unterschied von 46,6 % auf. Die dritte Gruppe wird von den Stämmen ATCC 33020, TFSS 1 und TFSS 6 gebildet. Die Fingerabdrücke dieser Gruppe sind einander zu 61 % ähnlich.

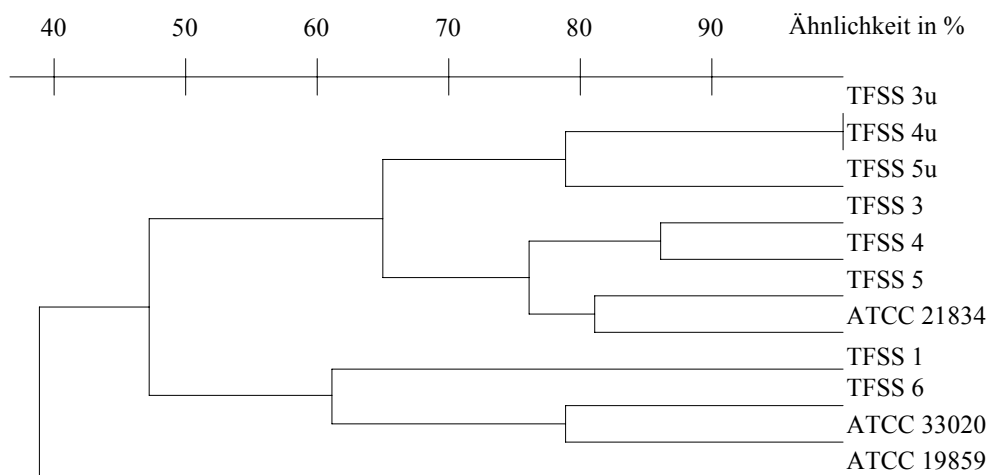


Abbildung 14: Dendrogramm aus den rep- Fingerabdrücke der untersuchten *T. ferrooxidans*-Stämme

Die Ergebnisse der beiden Methoden, RAPD- und rep-PCR, können wie folgt zusammengefasst werden: Der Referenzstamm ATCC 21834 und die Haldenisolate TFSS 3, TFSS 4, TFSS 5 werden in einem anderen Cluster zusammengefasst als der Referenzstamm ATCC 33020 und die Haldenisolate TFSS 1, TFSS 6. Des Weiteren unterscheiden sich die Fingerabdrücke der Haldenisolate aus uranhaltigen und uranfreien Medien.

3.4.4 Genetische Fingerabdrücke durch Gelelektrophorese im gepulsten Feld

Die Gelelektrophorese von DNS-Fragmenten im gepulsten Feld stellt eine weitere molekulare Typisierungsmethode dar. Die bei dieser Methode erhaltenen Restriktionsprofile sind sehr reproduzierbar und diskriminativ [Siegrist et al. 1995].

In der vorliegenden Arbeit wurden die Endonukleasen *Xba* I, *Spe* I, *Pme* I und *Pac* I eingesetzt. In der Abbildung 15 sind die Schemata der entsprechenden Elektropherogramme dargestellt. Charakteristische Fragmente werden im folgenden beschrieben.

Die erhaltenen Fragmente im *Xba* I-Restriktionsprofil variieren in einem Bereich von 6200 bp bis 950 bp. Drei dieser DNS-Stücke (4423 bp, 3766 bp, 3285 bp) sind in den Fingerabdrücken aller Stämme enthalten. Nur die Profile der Referenzstämme enthalten eine Bande von 984 ± 4 bp. Bei der Hydrolyse der DNS von Haldenisolaten entstand ein Fragment von 1216 bp. Die Fingerabdrücke der uranhaltigen Kulturen der Haldenisolate besitzen darüber hinaus noch eine weitere Bande von 3080 bp.

In den *Spe* I-Fingerabdrücken aller Stämme sind Fragmente von 464 bp, 1309 bp und 2989 bp enthalten. DNS-Stücke mit einer Größe von 935 bp und 1680 bp entstanden bei der Hydrolyse der DNS von den Stämmen ATCC 19859, ATCC 21834, ATCC 23270, TFSS 1, TFSS 2 und TFSS 6. Die DNS der uranhaltigen Kulturen der Haldenisolate TFSS 3, TFSS 4 und TFSS 5 werden durch *Spe* I in Fragmente mit 2516 bp, 4289 bp und 7534 bp geschnitten. Die Restriktionsprofile der DNS der uranfreien Kulturen der Haldenisolate TFSS 3, TFSS 4 und TFSS 5 zeigen eine charakteristische Bande bei 2362 bp.

Für den *Pme* I-Verdau liegen die erhaltenen Fragmente zwischen 830 bp und 88 bp. Ein Fragment mit einer Größe von 783 bp wurde von der DNS aller untersuchten Stämme erhalten. Die Haldenisolate TFSS 1, TFSS 2 und TFSS 6 besitzen darüber hinaus Fragmente von 730 bp und 463 bp. DNS-Stücke von 681 bp und 100 bp sind in den Fingerabdrücken der Haldenisolate TFSS 3, TFSS 4 und TFSS 5 erhalten worden.

Das *Pac* I-Restriktionsprofil enthält einige charakteristische Fragmente. Alle Fingerabdrücke der Referenzstämme enthalten ein 782 bp großes und die der Haldenisolate ein 112 bp großes Fragment. In den Restriktionsprofilen der DNS von TFSS 3, TFSS 4 und TFSS 5 ist eine Bande von 200 bp vorhanden. Die entsprechenden Fingerabdrücke von der DNS der uranhaltigen Kulturen der Haldenisolate TFSS 3, TFSS 4 und TFSS 5 enthalten dieses Fragment nicht, aber ein 727 bp großes Frag-

ment. DNS-Stücke mit einer Größe von 602 bp und 89 bp sind bei dem Verdau der DNS der uranhaltigen Kulturen der Haldenisolate und der uranfreien Kulturen der Haldenisolate TFSS 3, TFSS 4 und TFSS 5 entstanden.

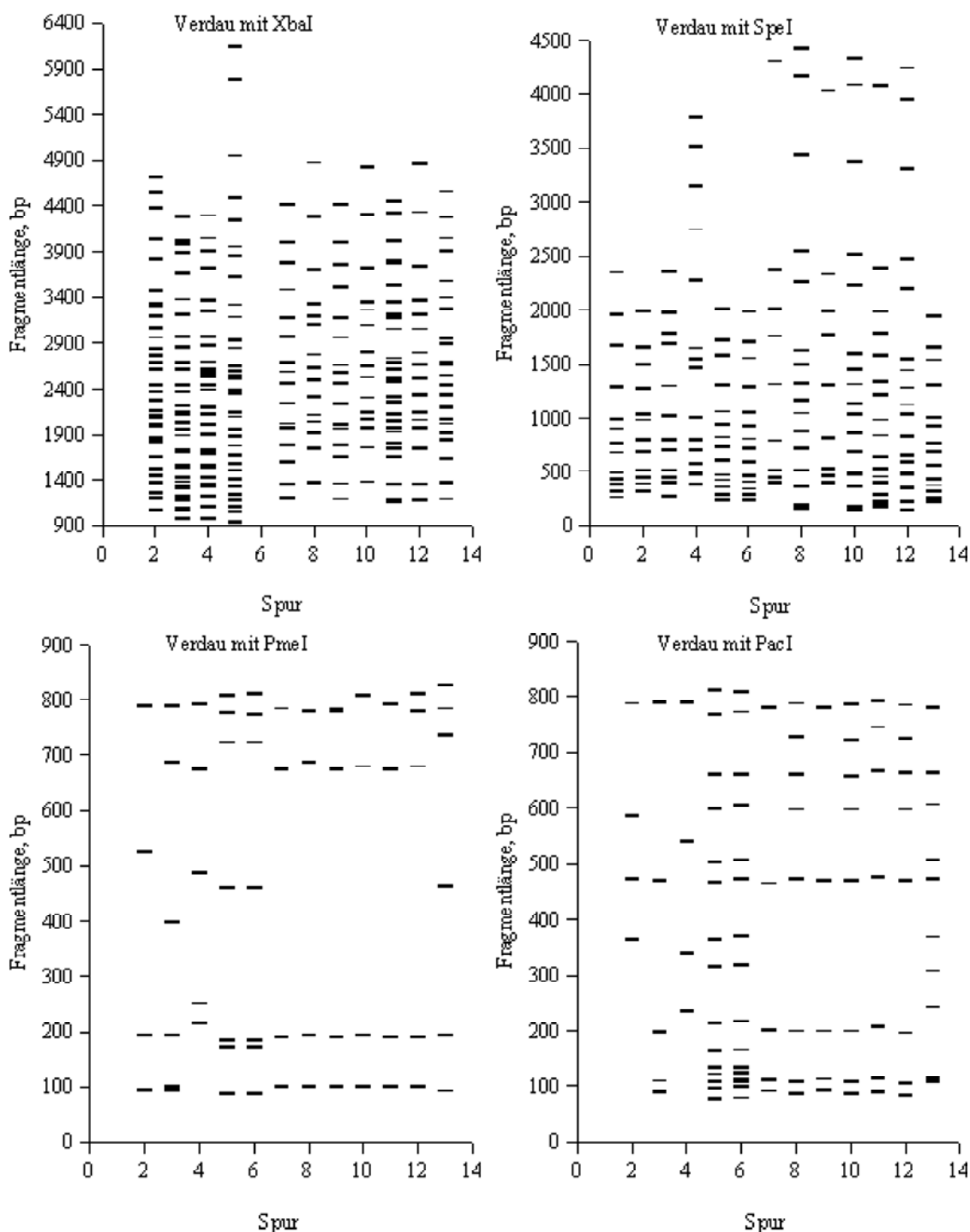


Abbildung 15: Schemata nach Verdau der bakteriellen DNS mit den Endonukleasen *Xba* I, *Spe* I, *Pme* I, *Pac* I

Beschreibung: 1-ATCC 19859, 2-ATCC 21834, 3-ATCC 23270, 4-ATCC 33020, 5-TFSS 1, 6-TFSS 2, 7-TFSS 3, 8-TFSS 3 mit Uran im Medium, 9-TFSS 4, 10-TFSS 4 mit Uran im Medium, 11-TFSS 5, 12-TFSS 5 mit Uran im Medium, 13-TFSS 6

In Abbildung 16 ist das aus den *Xba* I-, *Spe* I-, *Pme* I- und *Pac* I- PFG- Fingerabdrücken errechnete Dendrogramm dargestellt. Bei der Berechnung des Dendrogramms wurden drei verwandte Gruppen ermittelt.

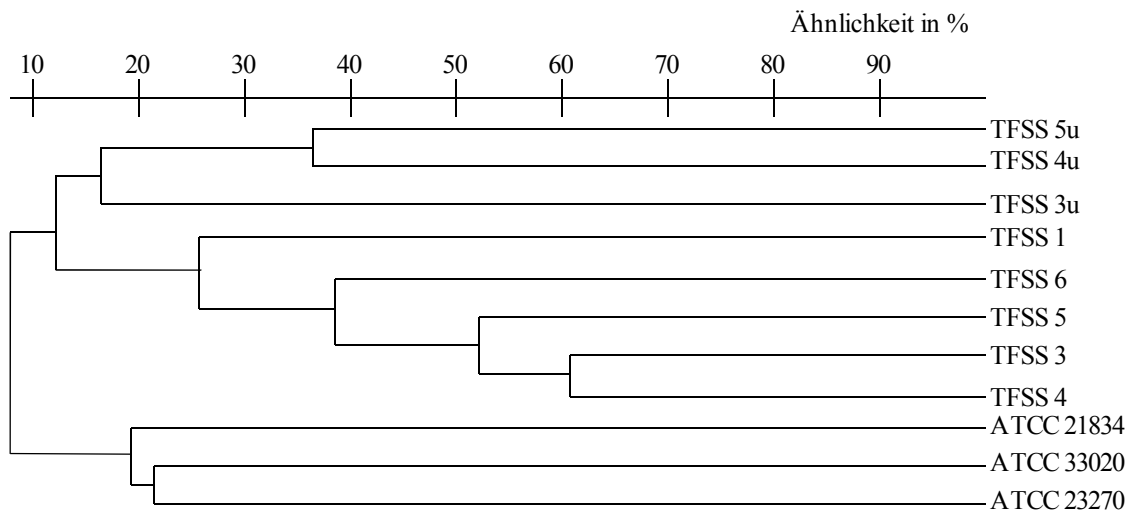


Abbildung 16: Dendrogramm aus den PFG Fingerabdrücke der untersuchten *T. ferrooxidans*- Stämme

Die Referenzstämme ATCC 21834, ATCC 23270, und ATCC 33020 bilden eine Gruppe. Diese Gruppe weist eine Ähnlichkeit von ca. 20 % auf. In der zweiten Gruppe sind die Haldenisolate zusammengefasst. Diese Gruppe unterteilt sich noch einmal in die auf uranfreiem und die in auf uranhaltigen Medien gewachsenen Kulturen. Die beiden letzt genannten Gruppen unterscheiden sich zu 88 %. Die Fingerabdrücke der Haldenisolate stimmen zu ca. 26 % überein. Nach erfolgter Kultivierung der Haldenisolate auf Uran entsprechen die Fingerabdrücke der Kulturen einander zu ca. 16 %.

Durch die PFG- Fingerabdrücke konnten die Referenzstämme von den Haldenisolaten unterschieden werden. Des weiteren wurde nachgewiesen, dass Uran im Nährmedium die Häufigkeit der Schnittstellen der Endonukleasen in der DNS der Haldenisolate beeinflusst.

Ein Vergleich der Dendrogramme aus PCR- und PFG- Fingerabdrücke (Abb. 12, 14, 16) zeigt, dass die Unterschiede im Genom der Stämme mit allen Methoden nachgewiesen werden konnten. Die Ähnlichkeitsniveaus der einzelnen Gruppen variieren mit der Methode. Dieses ist mit der unterschiedlichen Schärfe der Methoden zu erklären.

4 Diskussion

4.1 Genetische Charakterisierung auf der Grundlage der 16S rDNS-Sequenz

Zur Charakterisierung von Mikroorganismen werden physiologische Eigenschaften der verschiedenen Arten genutzt. Für die Art *T. ferrooxidans* sind das die Fähigkeit bei niedrigen pH- Werten (zwischen 1,5 und 3) zu wachsen, Schwefel, Thiosulfat, Tetrathionat oder Eisen(II)- Verbindungen als Energiequelle zu nutzen, 3-Hydroxytetradekansäure, das Ubiquinon Q-8 zu enthalten und einen GC-Gehalt zwischen 56 % und 59 % in der DNS zu besitzen [Kelly et al. 1989]. Diese Eigenschaften spiegeln nicht die verwandtschaftlichen Beziehungen innerhalb dieser Art und Gattung wider.

Durch die Einbeziehung der rRNS-Gene in die Taxonomie können diese verwandtschaftlichen Beziehungen erforscht werden. Die DNS, RNS und Polypeptide dokumentieren die evolutionäre Geschichte der lebenden Materie [Zuckerkanndl et al. 1965]. Die Verwandtschaftsverhältnisse unter den Prokaryoten können an Hand von Molekülen mit zentraler Funktion innerhalb der Zelle (rRNS, RNS-Polymerasen, Elongationsfaktor G, protonentranslozierenden ATPasen) untersucht werden [Olsen et al. 1993]. Die primäre Struktur von 16S rRNS-Molekülen besitzt mehr oder weniger konservative und sehr variable Regionen. Damit variiert die Häufigkeit der Veränderungen in der Nukleotidabfolge. Diese Tatsache erlaubt es, die phylogenetischen Abstände zwischen Domänen und einzelnen Arten zu untersuchen [Ludwig et al. 1994]. Mit Hilfe der kleinen Untereinheit der ribosomalen RNS werden detaillierte und umfassende Stammbäume erstellt.

Die genetische Diversität verschiedener *T. ferrooxidans*- Stämme ist mehrfach beschrieben [Harrison 1982, Kelly et al. 1989]. Die *T. ferrooxidans*- Stämme wurden von diesen beiden Autoren in 7 verschiedene Homologiegruppen eingeteilt. Die phylogenetische Einordnung der Gattung *Thiobacillus* erfolgte mit Hilfe der 5S rRNS und der 16S rRNS [Lane et al. 1992]. Nach dieser Klassifikation gehört die Gattung *Thiobacillus* der Proteobakterien-Domäne an, Stämme der Art *T. ferrooxidans* sind sowohl in der β - als auch in der γ -Subdivision zu finden. Diese Heterogenitäten führten zur Reklassifizierung einzelner Arten und Stämme in neue Gattungen [Kelly et al. 2000]. 8 von 13 *Thiobacillus*- Arten wurden in andere Gattungen innerhalb der γ -Subdivision eingeordnet. Diese Gattungen sind:

- *Thermithiobacillus* (moderat thermophil, unfähig Fe(II) zu oxidieren) mit der Art *T. tepidarius*

- *Halobacillus* (halophil, unfähig Fe(II) und Thiozyanat zu oxidieren) mit den Arten *H. neapolitanus*, *H. halophilus*, *H. hydrothermalis*
- *Acidithiobacillus* (mesophil und moderat thermophil) mit den Arten *A. thiooxidans*, *A. caldus* und einigen Stämmen der Art *Thiobacillus ferrooxidans*.

Die Ergebnisse zu den *T. ferrooxidans* der vorliegenden Arbeit sowie die in Selenska-Pobell et al. [Selenska-Pobell et al. 1998] dargestellten RFLP-Ergebnisse der untersuchten *T. ferrooxidans*-Referenzstämme zeigen ebenfalls die Heterogenität in den Sequenzen der 16S rDNS. In den 16S rDNS-Sequenzen sind die Unterschiede zwischen den Stämmen TFSS 4, ATCC 21834 und den Stämmen TFSS 6, ATCC 33020 auf der Helix 27 interessant. Diese Helix zählt zu den konservierten Bereichen der Sequenz. Ein Unterschied in dieser Region der 16S rDNS deutet auf eine Verzweigung in der Entwicklung der Art hin. Die unterschiedlichen Metallkonzentrationen in der natürlichen Umgebung dieser Stämme, für den Stamm TFSS 4 deutlich höher (siehe 2.1.1), können ein Grund für diese Verzweigung sein.

4.2 Wachstum und Resistenzuntersuchungen von *Thiobacillus ferrooxidans*-Stämmen

Die untersuchten *T. ferrooxidans*-Stämme ATCC 21834, ATCC 33020, TFSS 4 und TFSS 6 zeigen unterschiedliche Toleranzen gegen Uranylionen. Die Stämme ATCC 33020 und TFSS 6 sind gegen eine Urankonzentration von 10^{-7} mol/l sensitiv. Bei dieser Urankonzentration wachsen die Stämme ATCC 21834 und TFSS 4 mit einer verlängerten lag-Phase gegenüber uranfreiem Medium. Ähnliche Verzögerungen beobachteten Martin et al. (1983) bei Untersuchungen von *T. ferrooxidans*-Stämmen auf uranhaltigen Medien.

Ein Wachstum der chemolithoautotrophen Art *T. ferrooxidans* ist an die Oxidation von Fe(II) zu Fe(III) und die dadurch mögliche Energiegewinnung für synthetische Prozesse gebunden. Die Oxidation von Fe(II) findet an der äußeren Membran der Zellwand statt. Ein mögliches Schema dieser Reaktion ist in Abbildung 17 dargestellt. Befinden sich im Nährmedium zweiwertige Uranylionen (UO_2^{2+}), konkurrieren diese mit den Fe(II)-Ionen um das aktive Zentrum der Fe^{2+} -Oxidoreduktase. Die Uranylionen binden an das aktive Zentrum der Fe^{2+} -Oxidoreduktase, dadurch wird weniger Fe^{2+} zu Fe^{3+} umgesetzt. Die Fe(II)-Oxidation wird verlangsamt und es steht weniger ATP für den Metabolismus zur Verfügung.

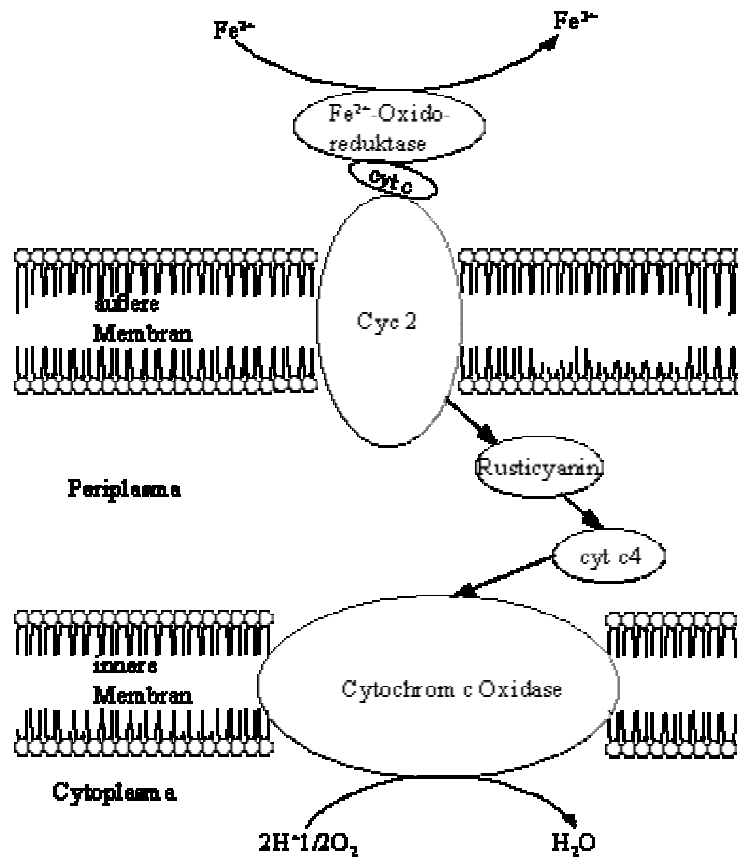


Abbildung 17: Schema der Ferroxidase-Reaktion nach Appia-Ayme et al. (1999)

In der verlängerten lag-Phase der TFSS 4-Kultur wird möglicherweise ein membrangebundenes Schutzsystem gegen Metallkationen entwickelt [Tuovinen et al. 1971]. In diesem Schutzsystem könnte ähnlich wie bei *Citrobacter* sp. [Macaskie et al. 2000] eine Phosphatase in der äußeren Membran der Zelle eingebunden sein. Bei der enzymatischen Hydrolyse von Phosphorsäureestern entstehen Phosphatgruppen. Durch Wechselwirkung zwischen den gelösten Uranylionen und den Phosphatgruppen entsteht ein Kristallkeim. An diesen Keim lagern sich weitere Phosphatgruppen an und an diese weitere Uranylionen. Die so entstehende Uran-Phosphat-Verbindung verhindert ein Diffundieren des Urans in die Zellen von *Citrobacter* sp. und ermöglicht damit ein Überleben der Zellen in uranhaltigen Umgebungen [Macaskie et al. 2000].

Verschiedene Arbeitsgruppen beschreiben Veränderungen der Zellwandzusammensetzung von *T. ferrooxidans* in Abhängigkeit von der zur Verfügung stehenden Energiequelle. Bei der Kultivierung von *T. ferrooxidans* auf Medien mit Pyrit wird ein Oberflächenprotein synthetisiert, das die Adsorption der Zellen an die unlösliche Energiequelle unterstützt [Buonfiglio et al. 1999]. In *T. ferrooxidans*-Zellen, die in schwefelhaltigen Medien kultiviert wurden, konnten Oberflächenproteine mit einer

hohen Konzentration von Thiolgruppen nachgewiesen werden. In schwefelfreien Medien wurden diese Proteine nicht synthetisiert [Ohmura et al. 1996].

Eine andere Klasse von Proteinen, die Metallothioneine, wird in einigen Bakterien durch Metalle induziert. Diese cysteinreichen Proteine sind in der äußeren Membran zu finden. Zwischen den Metallothioneinen und den in der Umgebung befindlichen Metallionen werden Komplexe gebildet. Die Metallionen werden gebunden und sind physiologisch nicht mehr zugänglich [Mejára et al. 2001].

Unabhängig davon, ob eine Phosphataseaktivität oder Metallothioneine an der äußeren Membran von uranresistenten *T. ferrooxidans*- Stämmen das Uran binden, wird es als konkurrierendes Substrat um das aktive Zentrum der Fe^{2+} -Oxidoreduktase entzogen. Durch die Eisen(II)-Oxidation kann weiterhin Energie für die Zelle gewonnen werden. Besteht keine andere Beeinträchtigung für das Wachstum der Zellen können diese weiter wachsen und sich vermehren.

Im Gegensatz zum Wachstum von TFSS 4 steht die Sensitivität der TFSS 6-Kultur gegen eine Uranylkonzentration von 10^{-7} mol/l. Am wahrscheinlichsten ist, dass es in dieser Kultur nicht zu der Ausbildung des membran- und/oder enzymgebundenen Schutzsystems kommt. Das Uran inhibiert die Eisen(II)-Oxidation. Es entsteht an der äußeren Membran der Zelle kein Elektron. Die Elektronentransportphosphorylierung kann nicht stattfinden und es wird kein ATP gebildet. Damit steht auch für die Kohlenstofffixierung und das Wachstum keine Energie zur Verfügung. Darüber hinaus wird durch die fehlende Elektronentransportkette der Protonentransport aus der Zelle gestört. Der pH-Wert in der Zelle sinkt. Intrazelluläre Enzyme und Vorgänge können gehemmt werden. Zwischen den Zellen und ihrer Umgebung findet ein passiver Stoffaustausch statt. Uranionen könnten in die Zelle eindringen und im Zytoplasma mit geeigneten Liganden Komplexe bilden.

4.3 Wechselwirkungen zwischen Uran und *T. ferrooxidans*- Stämmen

4.3.1 Uranverteilung und Proteine

Bakterien widerstehen toxischen Metallen durch sehr spezifische Resistenzsysteme. Die Wirkung dieser Systeme beruht häufig auf einer intrazellulären enzymatischen Detoxifikation mit einem anschließenden Ausschleusen der toxischen Ionen oder der gebildeten Verbindungen aus der Zelle [Ji et al. 1995]. So wird in die Zellen von *T. ferrooxidans* aufgenommenes Arsenat mit Hilfe einer Arsenatreduktase zu Arsenit umgewandelt. Das Arsenit wird mit einer spezifischen Permease aus der Zelle aus-

geschleust [Butcher et al.2000]. Einige Mikroorganismen verhindern die schädliche Wirkung von Metallen auf den Metabolismus, in dem sie diese an die Zellwand binden bzw. die Aufnahme durch Membranporen blockieren [Silver et al. 1989].

Das während des Wachstums auf uranhaltigen Medien in die Zellen von TFSS 4 aufgenommene Uran befindet sich in der Zellwandfraktion. Das Uran konnte nicht in die Zelle eindringen und durch seine chemischen Eigenschaften die Stoffwechselfvorgänge der Zelle hemmen. Die mit Uran inkubierten Zellen des Stammes TFSS 6 enthielten Uran in allen untersuchten Zellfraktionen. Das Uran gelangte in die Zelle und reagierte dort mit verschiedenen Gruppen (vermutlich Phosphat-, Karboxyl-, Thiolgruppen). Diese Beobachtungen wurden auch bei anderen *T. ferrooxidans*-Stämmen beschrieben. DiSpirito et al. (1983) zeigten, dass vermehrungsfähige *T. ferrooxidans*-Zellen weniger Uran aufnehmen als abgetötete. In vermehrungsfähigen Zellen wurde Uran hauptsächlich in der Zellwand und der Zytoplasmamembran nachgewiesen. In toten Zellen wurde Uran in der Zellwand, der Zytoplasmamembran und dem Zytoplasma in ähnlichen Konzentrationen gefunden.

Ein Vergleich der Proteinprofile von TFSS 4-Zellen aus uranfreien und uranhaltigen Medien zeigte, dass in uranhaltigen Medien zusätzliche Proteine synthetisiert wurden. Das Auftreten zusätzlicher Proteine an der Zelloberfläche in *T. ferrooxidans*-Stämmen wurde bei kupfertoleranten Stämmen beobachtet [Das et al. 1998]. Auch in *Pseudomonas syringae* ist die Kupferresistenz mit Proteinen des Periplasmas und der äußeren Membran verbunden. Diese Proteine binden das Kupfer außerhalb des Zytoplasmas. Damit wird die Detoxifikation erreicht [Cha et al. 1991]. In einer anderen *Pseudomonas*-Art, *P. aeruginosa*, wurde eine Ni²⁺-Anreicherung im Zellwandbereich beobachtet. Sar et al. (2001) bestimmten die chemische Natur dieser Anreicherung als Nickelphosphide und Nickelkarbide. Bei einem weiteren Gram negativen Bakterium, *Citrobacter* sp., wurde festgestellt, dass die Uranakkumulation mit der Phosphataseaktivität der Zellen verbunden ist. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde die Phosphatase im periplasmatischen Raum, an der äußeren Membran und teilweise außerhalb der Zelle lokalisiert. Wurden die Zellen mit Uranylionen inkubiert, konnte das gebildete Uranylphosphat an der Zelloberfläche nachgewiesen werden [Jeong et al. 1997].

Durch die Unterdrückung der Proteinsynthese in Gegenwart von Uran sollte untersucht werden, ob die zusätzlich gefundenen Proteine in den Zellen des Stammes TFSS 4 am Uranresistenzmechanismus beteiligt sind. Es wurde festgestellt, dass die Unterdrückung der Proteinsynthese durch Streptomycin in uranhaltigen *T. ferrooxi-*

dans-Kulturen den Sauerstoffverbrauch, ein indirektes Maß für die Eisen(II)-Oxidation, durch die Zellen, im Vergleich zu uranhaltigen Kulturen ohne Streptomycin deutlich verringerte. Ein ähnliches Verhalten von *T. ferrooxidans*-Kulturen wurde in kupferhaltigen Medien beobachtet [Das et al. 1998]. In kupferhaltigen Medien verläuft die Eisen(II)-Oxidation mit an Kupfer angepassten *T. ferrooxidans*-Zellen sechsmal schneller als mit kupfersensitiven Zellen. Bei den kupferresistenten Zellen wurden spezifische Proteine auf der Zelloberfläche nachgewiesen. Durch diese Proteine wird die Oberflächenladung der Zelle positiver und die elektrostatische Anziehung der Kupferionen nimmt ab. Erst durch die Ausbildung dieser Proteine, so wird vermutet, können die *T. ferrooxidans*-Kulturen Eisen(II) in kupferhaltigen Medien oxidieren [Das et al. 1998].

Bei den uransensitiven *T. ferrooxidans*-Stämmen ATCC 33020 und TFSS 6 werden keine Proteine gebildet, die die Wirkung der Uranylionen auf die Zellen abschwächen. Die Uranylionen können ungehindert mit der Zelloberfläche wechselwirken. Es kommt zur Hemmung der Eisen(II)-Oxidation. Durch eine verringerte Eisen(II)-Oxidation sinkt der Sauerstoffverbrauch, wie in uranhaltigen Medien für diese Stämme beobachtet, im Vergleich zur ungehemmten Eisen(II)-Oxidation. Da Eisen(II)-Sulfat die einzige Energiequelle im Nährmedium 9K ist, wird nicht mehr ausreichend Energie für die zellinternen Prozesse erzeugt. Die in der Zellwand vorhandenen energieabhängigen spezifischen Transportsysteme fallen aus. Es findet ein passiver Stoffaustausch zwischen der Zelle und der Umgebung statt. Das Uran kann in das Zytoplasma diffundieren und dort mit weiteren Zellbestandteilen wechselwirken. Die Zellen werden irreversibel geschädigt und sind nicht mehr vermehrungsfähig.

4.3.2 Sorption und TRLFS

Informationen über die Natur der Wechselwirkung zwischen Zelle und Uran wurden durch Sorptions- und Desorptionsexperimente sowie durch TRLFS erhalten. Bei der Biosorption, als Sorption und/oder Komplexbildung von gelösten Metallen an mikrobielle Biomasse zu verstehen, wirken Ionenaustausch, Chelatbildung, Adsorption und Einschluss in Zellwände und Zellmembranen. Für das Verhältnis der einzelnen Prozesse bei der Biosorption ist, neben der Art der Biomasse, die chemische Spezies des gelösten Metalls wichtig [Volesky et al. 1995].

Für *Citrobacter* sp. wurde nachgewiesen, dass Uran in Form von Phosphatkomplexen teilweise mit Natriumionen akkumuliert wird. Die Uranyl-Phosphatkomplexe wurden in der Zellwand (äußere Membran, Lipopolysaccharide, extrazelluläre Polysaccharide) lokalisiert [Macaskie et al. 2000]. Bei einer anderen Gram negativen Art, *P. aeruginosa*, konnten mit mikroskopischen Techniken Ni^{2+} -Ionen als elektronendichte Ablagerungen an der Zellbegrenzung nachgewiesen werden [Sar et al. 2001]. Röntgenbeugungsanalysen zeigten darüber hinaus, dass das Ni^{2+} an Phosphat- bzw. Karboxyl-Gruppen der Zellwand gebunden wurde. Schon 1974 beschrieb Tuovinen [Tuovinen et al. 1974a] das Bindungsverhalten von Uranylionen an *T. ferrooxidans*-Zellen. Lebende Zellen zeigten im Vergleich zu abgetöteten Zellen eine geringere Bindungsfähigkeit. Die Unterschiede werden auf die unterschiedliche Anzahl von Bindungsstellen an den Zellen zurückgeführt. Auf der Oberfläche der lebenden Zellen ist nur eine begrenzte Anzahl an Bindungsstellen verfügbar. Die abgetötete Biomasse präsentiert darüber hinaus weitere funktionelle Gruppen für eine Uranyl-Komplexierung [Tuovinen et al. 1974a].

In früheren Arbeiten der mikrobiologischen Arbeitsgruppe des Forschungszentrums Rossendorf e.V. [Panak et al. 1998, Panak et al. 1999] wurden Sorptions- und Desorptionsuntersuchungen mit *T. ferrooxidans*- Stämmen unterschiedlicher Herkunft durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass Stämme, die in ihrer natürlichen Umgebung einer höheren Urankonzentration ausgesetzt waren

- eine größere Menge Uran akkumulierten,
- das Uran in Komplexen an die Biomasse binden,
- teilweise irreversible Komplexe mit Uran bilden.

TRLFS- Untersuchungen [Panak et al. 1999, Merroun et al. 2000] bestätigen die Vermutung, dass zwischen Uran und Bakterium ein „inner sphere“-Komplex gebildet wird. Dabei werden Wassermoleküle der inneren Koordinationssphäre des Metalls durch Liganden (z.B. Karboxyl-, Phosphatgruppen) ausgetauscht. Eine „inner sphere“-Komplexierung des Uranylions führt aufgrund einer verstärkten Kristallfeldaufspaltung des emittierten Niveaus zu einer Verschiebung der Fluoreszenzbanden (Rotverschiebung) und zu einer Verlängerung der Fluoreszenzlebensdauer. Durch Infrarot-Spektroskopie und EXAFS-Untersuchungen wurde gezeigt, dass Phosphatgruppen und/oder schwefelhaltigen Gruppen der Zelloberfläche von *T. ferrooxidans* in die Bildung dieses „inner sphere“-Komplexes eingehen [Merroun et al. 2000].

Die für beide Stämme ähnlichen TRLF-Spektren zeigen eine signifikante Rotverschiebung und eine Erhöhung der Halbwertsbreiten der Emissionsmaxima. Diese

Veränderung der Peaklage und der Peakform sind auf eine Verschiebung der Energieniveaus im Kristallfeld zurückzuführen. Dafür können ein inter- oder intramolekularer Energietransfer vom Liganden auf das Metallion und/oder eine Ausbildung von „inner sphere“-Komplexen mit dem Liganden verantwortlich sein [Panak 1996]. In Übereinstimmung mit vorangegangenen Untersuchungen [Panak et al. 1999] ist die Verdrängung von Wassermolekülen aus der inneren Koordinationssphäre durch den Liganden am wahrscheinlichsten.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch Sorptionsuntersuchungen für den Stamm TFSS 4 gezeigt, dass die zur Verfügung stehenden Bindungsstellen, wahrscheinlich Karboxyl-Gruppen und/oder Phosphatgruppen [Merroun et al. 2000], belegt sind. Die Uranylionen bilden mit diesen Bindungsstellen eine Oberflächenspezies, die für sich neu bildende Komplexe als Zentralatom dienen können.

Dem gegenüber stehen die Ergebnisse über das Sorptionsverhalten von Uranyl an der Biomasse des Stammes TFSS 6. Die steigende Menge an sorbierten Uran mit steigender Uran-Konzentration im Medium zeigt, dass die zur Verfügung stehenden Bindungsstellen nicht gesättigt sind. Die Inhibierungskonzentration für diesen Stamm liegt bei 1,25 mg Uran/l [Merroun et al. 2002]. Die eingesetzten Urankonzentrationen übersteigen diese Konzentration um das 4-fache. Die Desorptionsergebnisse zeigen darüber hinaus, dass eine sich vergrößernde Anzahl an Bindungsstellen mit wachsender Uranylkonzentration zur Verfügung steht. Es ist wahrscheinlich, dass die Zellen abgetötet sind.

4.3.3 Genetische Charakterisierung durch Fingerabdrücke

Die durch rep-APD, RAPD und PFG erhaltenen Fingerabdrücke der Haldenisolate spiegeln die Ergebnisse der RFLP [Kutschke et al. 1999] und der Sequenz der 16S rRNS-Gene wider. Auch hier sind die Fingerabdrücke in Gruppen geteilt. Die Gruppe 1 wird von den Stämmen TFSS 1, TFSS 2, TFSS 6 und die Gruppe 2 von den Stämmen TFSS 3, TFSS 4, TFSS 5 gebildet. Alle Stämme der Gruppe 1 wurden aus der Bodenprobe 1 und alle Stämme der Gruppe 2 aus der Bodenprobe 2 isoliert. Die unterschiedlichen Eigenschaften des natürlichen Habitats -in dieser Arbeit wurden die Metallkonzentrationen beschrieben- führten zu verschiedenen Populationen von *T. ferrooxidans*. Die unterschiedlichen Phänotypen (Metallresistenz, 3.2) sind ebenfalls im Genotyp feststellbar. Werden die Stämme der Gruppe 2, also die Stämme, die gegen eine Urankonzentration von 10^{-7} mol/l resistent sind und aus der

Bodenprobe mit höheren Metallkonzentrationen isoliert wurden, sind Modifizierungen in den Fingerabdrücke zu beobachten.

Kondrat'eva et al. [Кондратьева et al. 1996] zeigten, dass sich das Fragmentmuster von *T. ferrooxidans* in der PFG mit dem Elektronendonator im Kulturmedium verändert. Auch bei der Art *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* konnten DNS-Rearrangierungen festgestellt werden. Diese Art oxidiert in stark saurer Umgebung Fe(II), S(0) oder reduzierte Schwefelverbindungen, ähnlich der Art *T. ferrooxidans*. Der Stamm *S. thermosulfidooxidans* 41 zeigt in Abhängigkeit von den zur Verfügung stehenden Elektronendonatoren ein anderes Restriktionsprofil in der PFG [Кондратьева et al. 1998].

Jolivet-Gougeon et al. (2000) beschrieben genetische Umordnungen im Genom von *Escherichia coli* H 10407, die durch osmotischen Stress verursacht wurden. Ein weiteres Beispiel für die Rearrangierungen im Genom ist die Multigenfamilie der variablen Oberflächenproteine von *Mycoplasma agalactiae* [Glew et al. 2000]. Die Mutationsereignisse innerhalb des *vpma*-Locus (*vpma*...variable Proteine des *M. agalactiae*) treten spontan auf und stimmen mit dem Ein- und Ausschalten der *vpma*-Expression überein.

Im Zusammenhang mit den verschiedenen Erscheinungsformen von prokaryotischen Zellen sind einige Vorgänge für die DNS-Rearrangierungen bekannt. Dazu zählen die Transposition von Insertions-Sequenz-Elementen (ISE), die chromosomale Duplikation, die homologe Rekombination und die regulierte Rearrangierung [Dybvig 1993]. Der letzt genannte Vorgang läuft nicht spontan ab. Er ist eine Antwort der bakteriellen Zellen auf Umwelteinflüsse (z.B. Nährstofflimitation). Die Umstrukturierung der genomischen DNS kann auch durch Aktivierung eines stillen Gens, durch einen aktiven Mechanismus, z.B. eine ortsbezogene Rekombinaseaktivität [Glew et al. 2000] oder durch eine mobile sich wiederholende DNS-Sequenz [Кондратьева et al. 1996] hervorgerufen werden. Zwei verschiedene Familien von ISE wurden in *T. ferrooxidans* gefunden und analysiert [Yates 1987]. Bisher, so ergab eine Literaturrecherche, wurde noch keine ortsbezogene Rekombinase für *T. ferrooxidans* beschrieben. Die Expression von stillen Genen durch eine Konformitätsänderung des Genoms unter bestimmten Voraussetzungen, z.B. die Anwesenheit von Uran, stellt eine Alternative zu den ISE dar. Werden die genetischen Rearrangierungen mit den Ergebnissen der Proteinanalyse (Synthese zusätzlicher Proteine in uranhaltigen Medien) verknüpft, scheint diese Theorie am wahrscheinlichsten.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden charakteristische, biochemische Reaktionen von *T. ferrooxidans*- Stämmen auf Uran gefunden. Es konnte nachgewiesen werden, dass in uranhaltigen Medien Proteine induziert werden, die für ein Wachstum der *T. ferrooxidans*- Zellen unter diesen Bedingungen notwendig sind. Die Neubildung dieser Proteine verlängert die lag- Phase der urantoleranten Stämme TFSS 4 und ATCC 21834 auf etwa das 2,5fache der uranfreien Kulturen dieser Stämme. Wird die Synthese der uraninduzierten Proteine unterdrückt, reagieren die *T. ferrooxidans*- Stämme TFSS 4 und ATCC 21834 auf Uran (10^{-7} mol/l) sensitiv. Das während des Wachstums aufgenommene bzw. sorbierte Uran wird von der Zellwand (äußere Membran, Periplasma, Zytoplasmamembran) zurückgehalten. Es ist möglich, dass die induzierten Proteine sich in der Zellwand befinden und Uran an freie Karboxyl- und/oder Phosphatgruppen der Proteine gebunden wird. Diese reaktiven Gruppen an der Zelloberfläche dringen in die innere Koordinationssphäre des Uranylions ein. Dadurch bildet sich ein stabiler Bakterien-Uran-Komplex. Durch diese Urankomplexierung an der Zelloberfläche können die Uranylionen die Fe^{2+} - Oxidoreduktase nicht hemmen und sie liegen in für die Zelle nicht toxischer Form vor.

Bei den uransensitiven *T. ferrooxidans*- Stämmen TFSS 6 und ATCC 33020 konnten keine durch Uran induzierte Proteine nachgewiesen werden. In uranhaltigen Medien wuchsen diese Stämme nicht. Nach der Inkubation der uransensitiven Stämme mit Uran wurde das Metall sowohl in der Zellwand (äußere Membran, Periplasma, Zytoplasmamembran) als auch im Zytoplasma nachgewiesen. Das Uran wurde nicht an der Zellbegrenzung wie bei den urantoleranten Stämmen detoxifiziert. Die Zellen sterben ab.

Des Weiteren wurden im Chromosomen der urantoleranten *T. ferrooxidans*- Stämmen (TFSS 3, TFSS 4, TFSS 5, ATCC 21834) einige spezifische Faktoren gefunden. Durch verschiedene Fingerabdrucktechniken (RAPD, rep-APD, PFG) wurden Unterschiede im Genom zwischen den urantoleranten und -sensitiven Zellen festgestellt. Im Chromosom der urantoleranten Stämme gibt es feste Bereiche, die mit der Uranresistenz verknüpft sind. Durch die Zugabe von Uran werden Veränderungen in den Fingerabdrücken induziert. Diese Rearrangements können zufällig durch mobile Elemente oder regulierte Umstrukturierungen im Genom erfolgt sein. Diese Umstrukturierungen könnten die Voraussetzungen für die bei urantoleranten Stämmen beobachteten Proteine bilden.

Die genetischen Unterschiede zwischen den urantoleranten und uransensitiven *T. ferrooxidans*- Stämmen spiegeln sich auch in Genen, die für zentrale Funktionen kodieren wider. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die 16S rDNS- Sequenz untersucht. In konservativen und variablen Bereichen dieser Sequenz konnten Unterschiede zwischen urantoleranten und uransensitiven Stämmen nachgewiesen werden. Die untersuchten *T. ferrooxidans*- Stämme konnten in zwei phylogenetische Gruppen eingeordnet werden. Eine dieser Gruppen besteht aus den Stämmen TFSS 4 und ATCC 23270, den urantoleranten Stämmen, und die andere aus den Stämmen TFSS 6 und ATCC 33020, den uransensitiven Stämmen. Diese phylogenetische Gruppierung der Art *T. ferrooxidans* in Übereinstimmung mit der Uranresistenz der einzelnen Gruppen sind ein Indiz für die Verzweigung in der Entwicklung dieser Art.

6 Literaturverzeichnis

- Amaro, A.M., Chamorro, D., Seeger, M., Arredondo, R., Peirano, I., Jerez, C.A., 1991. Effect of external pH perturbations on in vivo protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. of bacteriology* 173, 910-915
- Amils, R., Irazabal, N., Moreira, D., Abad, J.P., Martin, I., 1998. Genomic organization analysis of acidophilic chemolithotrophic bacteria using pulsed field gel electrophoretic techniques. *Biochimie*, 80, 911-921
- Appia-Ayme, C., Guiliani, N., Ratouchniak, J., Bonnefoy, V., 1997. Characterization of an operon encoding two c-type cytochromes, an aa₃-Type cytochrome oxidase, and rusticyanin in *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 33020. *Appl. environ. microbiol.* 65, 4781-4787
- Avakian, A.A., Karavaiko, G.I., 1970. Submicroscopic organization of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Mikrobiologija*, 39, 855- 861
- Berthelot, D., Leduc, L.G., Ferroni, G.D., 1994. The absence of psychrophilic *Thiobacillus ferrooxidans* and acidophilic heterotrophic bacteria in cold, tailing effluents from a uranium mine. *Can. j. microbiol.* 40, 60-63
- Bosecker, K., 1997. Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiol reviews* 20, 591-604
- Buonfiglio, V., Polidoro, M., Flora, L., Citro, G., Valenti, P., Orsi, N., 1993. Identification of two outer membrane proteins involved in the oxidation of sulphur compounds in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiology Reviews* 11, 43-50
- Buonfiglio, V., Polidoro, M., Soyer, F., Valenti, P., Shively, J., 1999. A novel gene encoding a sulfur regulated outer membrane protein in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Biotechnology* 72, 85-93
- Butcher, B.G., Deane, S.M., Rawlings, D.E., 2000. The chromosomal arsenic resistance genes of *Thiobacillus ferrooxidans* have an unusual arrangement and confer increased arsenic and antimony resistance to *Escherichia coli*. *Appl. environ. microbiol.* 66, 1826-1833
- Cerda, J., Gonzalez, S., Rios, J.M., Quintana, T., 1993. Uranium concentrates bio production in Spain: A case study. *FEMS Microbiology Reviews* 11, 253-260
- Cha, J.-S., Cooksey, D.A., 1991. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. *PNAS* 88, 8915-8919
- Das, A., Modak, J.M., Natarajan, K.A., 1998. Surface chemical studies of *Thiobacillus ferrooxidans* with reference to copper tolerance. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 215-222
- de Sioniz, M. I., Lorenzo, P., Perera, J., 1991. Distribution of Oxidizing Bacterial Activities and Characterization of Bioleaching-Related Microorganisms in a Uranium Mineral Heap. *Microbiologia (Madr)* 7, 82-89
- DiSpirito, A.A., Talnagi, J.W., Tuovinen, O.H., 1983. Accumulation and cellular distribution of uranium in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Arch. Microbiol.* 135, 250-253

- Dybvig, K., 1993. DNA rearrangements and phenotypic switching in prokaryotes. *Molecular Microbiology* 10, 465-471
- Edwards, K.J., Gihring, T.M., Banfield, J.F., 1999. Seasonal variations in microbial populations and environmental conditions in an extreme acid mine drainage environment. *Appl. environ. microbiol.* 65, 3627-3632
- Eisen, J.A., 2000. Assessing evolutionary relationships among microbes from whole-genome analysis. *Curr. opin. microbiol.* 3, 475-480
- Elbehti, A., Brasseur, G., Lemesle-Meunier, D., 2000. First evidence for existence of an uphill electron transfer through the bc1 and NADH-Q Oxidoreductase complexes of the acidophilic obligate chemolithotrophic ferrous iron-oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J Bacteriol* 182, 3602-3606
- Fischer-Appelt, K., Larue, J., Henze, G., Pinka, J., 1999. Analyses concerning the estimation of the release behaviour heaps of the former mining activities and uranium ore mining. *Forschungszentrum Karlsruhe Technik und Umwelt Wissenschaftliche Berichte FZKA 6291*, 15-18
- Flemming, K., Satschanska, G., Selenska-Pobell, S., 2001. Comparison of the natural bacterial communities in one uranium waste pile and in one uranium mill tailings. *Wissenschaftlich-technische Berichte, FZR-318*, 35
- Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., Krieg, N.R. (Eds.), 1994. *Methods for general and molecular bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington
- Glew, M.D., Papazisi, L., Poumarat, F., Bergonier, D., Rosengarten, R., Citti, C., 2000. Characterization of a multigene family undergoing high-frequency DNA rearrangements and coding for abundant variable surface proteins in *Mycoplasma agalactiae*. *Infection and immunity* 68, 4539-4548
- Harrison, A.P.Jr., 1982. Genomic and Physiological Diversity Amongst Strains of *Thiobacillus ferrooxidans*, and Genomic Comparison with *Thiobacillus thiooxidans*, *Arch. Microbiol.* 131, 68-76
- Hutchins, S. R., Davidson, M. S., Brierley, J. A., Brierley, C. L., 1986. Microorganisms in Reclamation of Metals. *Ann. Rev. Microbiol.* 40, 311-336
- Inoue, C., Sugawara, K., Shiratori, T., Kusano, T., Kitagawa, Y., 1989. Nucleotide Sequence of the *Thiobacillus ferrooxidans* Chromosomal Gene Encoding mercuric Reductase. *Gene* 84, 47-54
- Irazabal, N., Marin, I., Amils, R., 1997. Genomic organization of the chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 21834. *J. of Bacteriology* 179, 1946-1950
- Jeong, B.C., Hawes, C., Bonthron, K.M., Macaskie, L.E., 1997. Localization of enzymically enhanced heavy metal accumulation by *Citrobacter sp.* and metal accumulation in vitro by liposomes containing entrapped enzyme. *Microbiology*, 143, 2497-2507
- Ji, G., Silver, S., 1995. Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern. *J. of industrial microbiology* 14, 61-75
- Johnson, D.B., 1995. Selective media for isolating and enumerating acidophilic bacteria. *J. of microbiological methods* 23, 205-218

- Jolivet-Gougeon, A., David-Jobert, S., Tamanai-Shacoori, Z., Ménard, C., Cormier, M., 2000. Osmotic stress-induced genetic rearrangements in *Escherichia coli* H10407 detected by random amplified polymorphic DNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5484-5487
- Kelly, D.P., Harrison, A.P., 1989. Genus *Thiobacillus*. in: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 3. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md., 1842- 1858
- Kelly, D.P., Wood, A.P., 2000. Reclassification of some Species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov.. *International Journal of systematic and evolutionary microbiology* 50, 511-516
- Кондратьева, Т.Ф., Пивоварова, Т.А., Каравайко, Г. И., 1996. Структурные особенности хромосомной ДНК у штаммов *T. ferrooxidans*, адаптированных к росту на средах с пиритом или элементарной серой. *Микробиология* 65, 675-681
- Кондратьева, Т.Ф., Меламуд, В.С., Цаплина, И.А., Богданова, Т.И., Сенюшкин, А.А., Пивоварова, Т.А., Каравайко, Г. И. , 1998. Особенности структуры хромосомной ДНК у *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* проанализированной методом пульс-электрофореза. *Микробиология* 67, 19-25
- Kutschke, S., Selenska-Pobell, S., Classification and genomic fingerprinting of several natural *Thiobacillus ferrooxidans* isolates recovered from a uranium mining waste pile. Report FZR 272, 74
- Lane, D.J., Harrison, A.P., Stahl, D., Pace, B., Giovannoni, S.J., Olsen, G.J., Pace, N.R., 1992. Evolutionary Relationships among Sulfur- and Iron- Oxidizing Eubacteria. *J. of Bacteriology* 174, 269-278
- Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Reviews* 15, 155-173
- Macaskie, L.E., Bonthrone, K.M., Ping, Y., Goddard, D.T., 2000. Enzymically mediated bioprecipitation of uranium by a *Citrobacter* sp.: a concerted role for exocellular lipopolysaccharide and associated phosphatase in biomineral formation. *Microbiology* 146, 1855-1867
- Mackintosh, M.W., 1978. Nitrogen fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of general Microbiology* 105, 215-218
- Martin, P. A. W., Dugan, P. R., Tuovinen, O. H., 1983. Uranium Resistance of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Eur. J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 392-395
- Mejáre, M., Bülow, L., 2001. Metal-binding proteins and peptides in bioremediation of heavy metals. *TRENDS in Biotechnology* 19, 67- 73
- Merroun, M.L., Henning, Ch., Reich, T., Selenska- Pobell, S., 2000. EXAFS investigation of uranium (VI) complexes formed at the *A. ferrooxidans* types, Poster 2nd Eurokonferenz on Bacterial-Metal/Radionuklide interaction, Rossendorf, Germany, 30.08.-01.09.2000
- Merroun, M.L., Selenska- Pobell, S., 2002. Interactions of three eco-types of *Acidithiobacillus ferrooxidans* with U(VI). *BioMetals* 14, 171-179

- Mjoli, N., Kulpa, C.F., 1998. Identification of a unique outer membrane protein required for iron oxidation in *Thiobacillus ferrooxidans*, in: Norris, P.R., Kelly, D.P. (eds.) Biohydrometallurgy. Antonie Rowe Ltd. Chippenham, Wiltshire, Great Britain, 89-102
- Novo, M.T.M., de Souza, A.P., Garcia, O., Ottoboni, L.M.M., 1996. RAPD Genomic Fingerprinting Differentiates *Thiobacillus ferrooxidans* Strains. System. Appl. Microbiol. 19, 91-95
- Ohmura, N., Tsugita, K., Koizumi, J.-I., Saiki, H., 1996. Sulfur-binding protein of flagella of *Thiobacillus ferrooxidans*. J. of bacteriology 178, 5776- 5780
- Old, R.W., Primrose, S.B., 1992. Gentechnologie: eine Einführung. Thieme, Stuttgart, New York
- Olsen, G.J., Woese, C.R., 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. FASEB J. 7, 113-123
- Panak, P., 1996. Untersuchung von intramolekularen Energietransferprozessen in Cm(III)- und Tb(III)-Komplexen mit organischen Liganden mit Hilfe der zeitaufgelösten Laserfluoreszenzspektroskopie. Dissertation, Institut für Radiochemie, TU- München
- Panak, P., Hard, B.C., Pietzsch, K., Kutschke, S., Röske, K., Selenska-Pobell, S., Bernhard, G., Nitsche, H., 1998. Bacteria from uranium mining waste pile: interactions with U(VI). J. Alloys Compounds, 271, 262- 266
- Panak, P., Selenska-Pobell, S., Kutschke, S., Geipel, G., Bernhard, G., Nitsche, H., 1999. Complexation of U(VI) with cells of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiomonas cuprina* of different geological origin. Radiochim. Acta 84, 183-190
- Puers, C., Selenska-Pobell, S., Nitsche, H., 1999. Investigation of bacterial diversity in a soil sample of a depleted saxonian uranium mining area via sequencing of PCR-amplified and TA-cloned 16S rRNA genes. Wissenschaftlich-technische Berichte FZR- 272, 69
- Rawlings, D.E., Gawith, C., Petersen, A., Woods, D.R., 1983. Characterisation of plasmids and potential genetic markers in *Thiobacillus ferrooxidans*. in: Rossi, Torma (eds.) Recent Progress in biohydrometallurgy. Associazione mineraria sarda, 555- 570
- Rawlings, D.E., Kusano, T., 1994. Molecular Genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. Microbio. Reviews 58, 39-55
- Salazar, O., Takamiya, M., Ornellana, O., 1989. Characterization of the two rRNA gene operons present in *Thiobacillus ferrooxidans*. FEBS Lett. 242, 439-443
- Sand, W., Gerke, T., Hallmann, R., Schippers, A., 1995. Sulfur chemistry, biofilm and the (in)direct attack mechanism- a critical evaluation of bacterial leaching. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43, 961- 966
- Sar, P., Kazy, S.K., Singh, S.P., 2001. Intracellular nickel accumulation by *Pseudomonas aeruginosa* and its chemical nature. Letters in applied Microbiology 32, 257-261
- Schippers, A., Sand, W., 1999. Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. Appl. environ. microbiology 65/1, 319-321

- Selenska- Pobell, S., Otto, A., Kutschke, S., 1998. Identification and diskrimination of Thiobacilli using ADREA, RAPD and rep- APD. J. Appl. Microbiology, 84, 1085- 1091
- Selkov, E., Overbeek, R., Kogan, Y., Chu, L., Vonstein, V., Holmes, D., Silver, S., Haselkorn, R., Fonstein, M., 2000. Functional analysis of gapped microbial genomes: Amino acid metabolism of *Thiobacillus ferrooxidans*. PNAS 97, 3509-3514
- Siegrist, H.H., Chauv-de-Fonds, L., Blanc, D.S., 1995 Typisierung von Bakterien: Methoden und epidemiologische Aussagekraft. Swiss-NOSO Nosokomiale Infektionen und Spitalhygiene: Aktuelle Aspekte 2, 1-6
- Silver, S., Misra, T.K., Laddaga, R.A., Bacterial resistance to toxic heavy metals. in: T. J. Beveridge, R. J. Doyle (Eds.). Metal ions and bacteria, John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, 1989, 325- 358
- Silver, S., Phung, L.T., 1996. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. Annu. rev. microbiol. 50, 753-789
- Silvermann, M.P., Lundgren, D.G., 1959. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. J. Bacteriol. 77, 642-647
- Tuovinen, O.H., Kelly, D.P., 1974a. Studies on the Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* II. Toxicity of uranium to growing cultures and tolerance conferred by mutation, other metal cations and EDTA. Arch. Mikrobiol. 95, 153- 164
- Tuovinen, O.H., Kelly, D.P., 1974b. Studies on the Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* III. Influence of uranium, other metal ions and 2:4- Dinitrophenol on ferrous iron oxidation and carbon dioxide fixation by cell suspensions. Arch. Mikrobiol. 95, 165- 180
- Tuovinen, O.H., Niemelä, S.I., Gyllenberg, H.G., 1971. Tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans* to some metals. Antonie van Leeuwenhoek 37, 489- 496
- Tzvetkova, I., Tzvetkova, Tz., Groudeva, V., Selenska-Pobell, S., 2001. Bacteria cultured from soil samples of uranium mining waste piles. Forschungszentrum Rossendorf Wissenschaftlich- technische Berichte, FZR-318, 39
- van de Peer, Y., Chapelle, S., de Wachter, R., 1996. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. Nucleic acids research 24, 3381-3391
- van de Peer, Y., de Wachter, R., 1994. TreeCon for Windows : a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. Comput. Applic. Biosci. 10, 569-570
- Varela, P., Levican, G., Rivera, F., Jerez, C.A., An immunological strategy to monitor *in situ* the phosphate starvation state in *Thiobacillus ferrooxidans*. Appl. environ. Microbiol. 64, 4990-4993
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F. J., Lupinski, J. R., 1994. Genomic Finger printing of Bacteria Using Repetitive Sequence-Based Polymerase Chain Reaction. Methods in Molecular and Cellular Biology 5, 25-40
- Volesky, B., Holan, Z.R., 1995. Biosorption of heavy metals. Biotechnol. Prog. 11, 235-250
- von Eggeling, F., Spielvogel, H., 1995. Applications of random PCR, Cell. mol. biol. 41, 653- 670

- West, J. M., Christofi, N., McKinley, I. G., 1985. An Overview of Recent Microbiological Research Relevant to the Geological Disposal of Nuclear Waste. *Radioact. Waste Manage. Nucl. Fuel Cycle* 6, 79-95
- Westermeier, R., 1990. *Elektrophorese- Praktikum*. VCH, Weinheim, BRD
- Woese, C.R., 1993. There must be a prokaryote somewhere: microbiology's search for itself. *Microbiological reviews* 58,1-9
- Yates, J.R., 1987. Two families of repeated DNA sequences in *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 169, 1861-1870
- Zuckermandl, E., Pauling, L., 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *J. theoret. Biol.* 8, 357-366